



УНИВЕРЗИТЕТ „СВ. КИРИЛ И МЕТОДИЈ“ ВО СКОПЈЕ
Медицински факултет во Скопје
ИНСТИТУТ ЗА МИКРОБИОЛОГИЈА И ПАРАЗИТОЛОГИЈА



Елена П. Крстевска- Келепуровска

**КОРЕЛАЦИЈА ПОМЕЃУ ИНФЕКЦИИ ПРЕДИЗВИКАНИ СО
ХУМАН ПАПИЛОМА ВИРУС (ХПВ), КОНЦЕНТРАЦИЈА НА
ХПВ ДНК И ВАГИНАЛЕН МИКРОБИОМ СО
ИНТРАЕПИТЕЛНИ ЛЕЗИИ И КАРЦИНОМ НА ГРЛОТО НА
МАТКАТА - СТУДИЈА НА ЖЕНИ ОД ЈУГОЗАПАДНИОТ
РЕГИОН НА РЕПУБЛИКА СЕВЕРНА МАКЕДОНИЈА**

Докторски труд

Скопје, 2025



„SS. CYRIL AND METHODIUS” UNIVERSITY IN SKOPJE
FACULTY OF MEDICINE/
INSTITUTE OF MICROBIOLOGY AND PARAZITOLOGY



Elena P. Krstevska-Kelepurovska

**A CORRELATION STUDY ON THE RELATIONSHIP BETWEEN
INFECTION CAUSED BY ONE OR MORE TYPES OF HUMAN
PAPILLOMA VIRUS (HPV), HPV VIRAL LOAD AND VAGINAL
MICROBIOME IN COMPARISON TO THE INTRAEPITELIAL
LESIONS AND CERVICAL CANCER IN WOMEN FROM THE
SOUTHWESTERN REGION OF THE REPUBLIC OF NORTH
MACEDONIA**

Doctoral Dissertation

Skopje, 2025

Докторанд:

ЕЛЕНА, ПАВЛЕ КРСТЕВСКА - КЕЛЕПУРОВСКА

Тема:

КОРЕЛАЦИЈА ПОМЕЃУ ИНФЕКЦИИ ПРЕДИЗВИКАНИ СО ХУМАН
ПАПИЛОМА ВИРУС, КОНЦЕНТРАЦИЈА НА ХПВ ДНК И ВАГИНАЛЕН
МИКРОБИОМ СО ИНТРАЕПИТЕЛНИ ЛЕЗИИ И КАРЦИНОМ НА ГРЛОТО НА
МАТКАТА - СТУДИЈА НА ЖЕНИ ОД ЈУГОЗАПАДНИОТ РЕГИОН НА
РЕПУБЛИКА СЕВЕРНА МАКЕДОНИЈА

Ментор:

Проф. д-р Марјан Стојовски,

Клиника за гинекологија и акушерство, Медицински факултет, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје, Република Северна Македонија

Комисија за одбрана:

Проф. д-р АНА КАФТАНЦИЕВА (претседател)

Институт за микробиологија и паразитологија, Медицински факултет, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје, Република Северна Македонија

Проф. д-р МАРЈАН СТОЈОВСКИ,

Клиника за гинекологија и акушерство, Медицински факултет, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје, Република Северна Македонија

Проф. д-р ЕЛЕНА ТРАЈКОВСКА-ДОКИЌ,

Институт за микробиологија и паразитологија, Медицински факултет, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје, Република Северна Македонија

Проф. д-р ВИКТОРИЈА ЈОВАНОВСКА,

Клиника за гинекологија и акушерство, Медицински факултет, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје, Република Северна Македонија

Проф. д-р ГОРДАНА ЈАНКОСКА,

Институт за микробиологија и паразитологија, Медицински факултет, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје, Република Северна Македонија

Научна област: Медицински науки

Потесна научна област: Микробиологија – Вирусологија

Благодарност

Искрено им благодарам на мојот ментор и на членовите на Комисијата за нивната поддршка и насоки во текот на целиот процес.

Огромна благодарност и до моето семејство, чија љубов и трпение ми дадоа сила да истраам.

Елена П. Крстевска- Келепуровска

**КОРЕЛАЦИЈА ПОМЕЃУ ИНФЕКЦИИ ПРЕДИЗВИКАНИ СО ХУМАН
ПАПИЛОМА ВИРУС (ХПВ), КОНЦЕНТРАЦИЈА НА ХПВ ДНК И ВАГИНАЛЕН
МИКРОБИОМ СО ИНТРАЕПИТЕЛНИ ЛЕЗИИ И КАРЦИНОМ НА ГРЛОТО НА
МАТКАТА - СТУДИЈА НА ЖЕНИ ОД ЈУГОЗАПАДНИОТ РЕГИОН НА
РЕПУБЛИКА СЕВЕРНА МАКЕДОНИЈА**

- А п с т р а к т -

Вовед: Перзистентна инфекција со високо ризичен хуман папиломавирус се смета за основна причина за појава на преинвазивни и инвазивни цервикални лезии. До денешен ден, целосно се карактеризирани 225 генотипови, од кои 40 се сексуално преносливи. Бројни студии се обидуваат да одредат дали ХПВ инфекцијата со еден (ЕТ-ХПВ) или повеќе типови на ХПВ (ПТ-ХПВ), возраста и високата концентрација на ХПВ ДНК во гинеколошки примероци, како и присуство на дисбиоза во вагиналниот микробиом, се поврзани со појава на цитолошки абнормалности.

Цел на трудот е да се проучат корелациите помеѓу инфекции предизвикани со еден или повеќе типови на ХПВ, возраста на пациентките, концентрацијата на ДНК на ХПВ, како и составот на вагиналниот микробиом во зависност од цитолошкиот наод на цервикалната лезија.

Материјал: Во студијата беа вклучени 350 жени, на возраст од 18 – 64 години, од Битола, Ресен и Кичево, кои во периодот од февруари 2019 до август 2023, доброволно го посетија својот матичен гинеколог, во рамките на програмата за примарен скрининг на грлото на матката. Во анализа беа вклучени 300 жени со комплетни резултати од ПАП тест и ХПВ тестирање. Кај дополнителни 50 пациентки, освен детекција на присуство на 21 тип на ХПВ, беше извршена и анализа на квалитативниот и квантитативниот состав на вагиналниот микробиом. Овие пациентки беа поделени во две групи. Во едната група влегоа пациентки, кај кои при ХПВ тестирањето не беше детектирана инфекција со ХПВ, а другата група ја сочинуваа пациентки со докажана ХПВ инфекција.

Метод: Примероците за генотипизација на ХПВ и анализа на вагиналниот микробиом се собираа со стружење на епителот и на цервикалниот канал и на вагината, соодветно, и се транспортираа одделно во пластични епруветки за еднократна употреба, со волумен од 2 ml. Присуството на ХПВ генотиповите и концентрација на вирусна ДНК се детектираше со комплет реагенси за ПБР во реално време (Real-time PCR), HPV Quantitative Real-time PCR Kit, DNA-Technology, Russia. Кит наменет за типизација и квантификација на 21 тип на ХПВ, а составот на вагиналниот микробиом се одредуваше со квантитативен кит за Real-time PCR со Femoflor®16, DNA-Technology, Russia. Добиените резултати софтверски се анализираа на DTprime Real-Time PCR инструмент, DNA-Technology, Russia.

Резултати: Кај анализираните 300 пациентки, преваленцата на инфекции предизвикани со ПТ-ХПВ во корелација со возраста, покажа бимодална дистрибуција, поточно, ко-инфекција со ПТ-ХПВ беше значајно почеста кај жените на возраст до 24 години (14.37%) и кај оние на возраст од 55 до 64 години (6.35%), во споредба со инфекциите со еден тип (1.72%; $p = 0.035$). Инфекција со ЕТ-ХПВ беше најчесто детектирана кај пациентките со нормален ПАП тест (59.38%), во споредба со 57.50% кај жените со лезии со низок ризик и 57.14% кај жените со лезии со висок ризик од прогресија во карцином. Ко-инфекција со ПТ-ХПВ беше најчеста кај пациентките со високоризични лезии (42.86%), но не беше утврдена статистички значајна поврзаност помеѓу бројот на типови и степенот на цитолошките промени ($\chi^2 = 0.11$; $p = 0.94$). Најчесто изолирани типови беа ХПВ 16 и 31, при што тип 31 доминираше кај пациентките со негативен ПАП тест (19.79%), додека тип 16 имаше највисока застапеност кај пациентките со позитивен ПАП тест (26.47%). Концентрацијата на вирусна ДНК беше статистички значајно повисока кај жените со високоризични лезии ($6.34 \pm 1.4 \log$ копии/ 10^5 клетки), во споредба со оние со нормален ПАП наод ($5.58 \pm 1.8 \log$ копии/ 10^5 клетки) и со лезии со низок ризик ($5.78 \pm 1.6 \log$ копии/ 10^5 клетки) ($p = 0.013$). Висока вирусна концентрација почесто беше измерена кај пациентките со високоризични цервикални лезии споредено со пациентките со нискоризични цервикални лезии и со нормален наод од ПАП тестот (79.76% vs 69.17% vs 60.42%). Кај 50 пациентки, анализата на вагиналниот микробиом беше утврди дека апсолутна нормоценоза беше присутна кај 60% од ХПВ негативните пациентки, во споредба со 16% кај ХПВ позитивните ($p = 0.0014$). Исто така, кај ХПВ позитивните пациентки почесто беа изолирани *Gardnerella vaginalis*, *Prevotella bivia* и *Porphyromonas spp.* (64% vs 24%), *Eubacterium* (52% vs 12%), *Magasphaera spp.*, *Veillonella spp.*, *Dialister spp.* (24% vs 4%) и *Sneathia spp.*, *Leptotrichia spp.*, *Fusobacterium spp.* (24% vs 4%).

Заклучок: Резултатите од студијата укажуваат дека типот и бројот на ХПВ инфекции, вирусното оптоварување и состојбата на вагиналниот микробиом претставуваат вредни параметри за прецизна стратификација на ризик кај жените вклучени во скрининг програмите за превенција на карцином на цервикс. Ваквиот пристап овозможува унапредување на секундарната превенција преку персонализирано следење и навремена интервенција, особено кај жени со ко-инфекции со повеќе типови на ХПВ, зголемено вирусно оптоварување и присутна дисбиоза.

Клучни зборови: хуман папилома вирус, ПАП тест, интраепителни лезии, карцином на грлото на матката, инфекција со повеќе типови на ХПВ, возраст, концентрација на ХПВ ДНА, вагинален микробиом, вагинална дисбиоза, молекуларни тестови

Elena P. Krstevska- Kelepurovska

A Correlation Study on the Relationship Between Infections Caused by One or More Types of Human Papilloma Virus (HPV), HPV Viral Load and Vaginal Microbiome in Comparison to the Intraepithelial Lesions and Cervical Cancer in Women From the Southwestern Region of the Republic of North Macedonia

- Abstract -

Introduction: Persistent infection with high-risk human papillomavirus is considered the primary cause of preinvasive and invasive cervical lesions. To date, 225 genotypes have been fully characterized, 40 of which are sexually transmitted. Numerous studies are trying to determine whether HPV infection with one or multiple types of HPV, along with age and high HPV viral load in gynecological samples, as well as the presence of dysbiosis in the vaginal microbiome are associated with the occurrence of cytological abnormalities.

The aim of this study is to examine the correlations between infections caused by single or multiple HPV types, patient age, HPV viral load, as well as the composition of the vaginal microbiome, in relation to the cytological findings of cervical lesions.

Material: The study included 350 women aged 18 to 64 years, from the regions of Bitola, Resen, and Kichevo, who voluntarily visited their primary gynecologist between February 2019 and August 2023 as part of the national cervical cancer screening program. Of these, 300 women with complete Pap smear and HPV testing results were included in the main analysis. For an additional 50 patients, alongside detection of 21 HPV genotypes, both qualitative and quantitative analysis of the vaginal microbiome were performed. These patients were divided into two groups: one consisting of women with no detectable HPV infection, and the other composed of women with confirmed HPV infection.

Method: Samples for HPV genotyping and vaginal microbiome analysis were collected by scraping the epithelium of the cervical canal and the vagina, respectively. The samples were placed separately into 2 ml single-use plastic tubes for transport. The presence of HPV genotypes and the viral load (HPV DNA concentration) were determined using a Real-time PCR reagent kit HPV Quantitative Real-time PCR Kit, DNA-Technology, Russia, designed for the genotyping and quantification of 21 HPV types. Vaginal microbiome composition was analyzed using the Femoflor®16 quantitative real-time PCR reagent kit, DNA-Technology, Russia. The obtained data were analyzed using the corresponding software tools.

Results: Among the 300 analyzed patients, the prevalence of infections caused by multiple HPV types (MT-HPV) in relation to age demonstrated a bimodal distribution. MT-HPV co-infections were significantly more frequent in women aged ≤ 24 years (14.37%) and those aged 55–64 years (6.35%), compared to single-type (ST-HPV) infections (1.72%; $p = 0.035$). ST-HPV infections were most commonly detected in patients with a normal Pap test (59.38%), followed by those with low-grade lesions (57.50%) and high-grade lesions (57.14%). Conversely, MT-HPV co-infections were most prevalent among patients with high-grade cervical lesions (42.86%). However, no statistically significant association was observed between the number of HPV types and the severity of cytological abnormalities ($\chi^2 = 0.11$; $p = 0.94$). HPV types 16 and 31 were the

most frequently detected genotypes. Type 31 was predominant in women with negative cytology (19.79%), whereas type 16 showed the highest prevalence among those with abnormal Pap results (26.47%). The HPV viral load was significantly higher in women with high-grade cervical lesions (6.34 ± 1.4 log copies/ 10^5 cells), compared to those with normal cytology (5.58 ± 1.8 log copies/ 10^5 cells) and low-grade lesions (5.78 ± 1.6 log copies/ 10^5 cells) ($p = 0.013$). A higher proportion of patients with high-grade lesions had elevated viral loads compared to those with low-grade lesions or normal cytology (79.76% vs. 69.17% vs. 60.42%). Analysis of the vaginal microbiome, in 50 patients, revealed that absolute normocenosis was present in 60% of HPV-negative patients, in contrast to only 16% of HPV-positive women ($p = 0.0014$). HPV-positive patients also showed a higher prevalence of specific anaerobic bacteria, including *Gardnerella vaginalis*, *Prevotella bivia*, and *Porphyromonas spp.* (64% vs. 24%), *Eubacterium* (52% vs. 12%), *Magasphaera spp.*, *Veillonella spp.*, and *Dialister spp.* (24% vs. 4%), as well as *Sneathia spp.*, *Leptotrichia spp.*, and *Fusobacterium spp.* (24% vs. 4%).

Conclusion: The results of this study indicate that the type and number of HPV infections, viral load, and the composition of the vaginal microbiome represent valuable parameters for accurate risk stratification in women enrolled in cervical screening programs. This approach allows for improved secondary prevention through personalized monitoring and timely intervention, particularly among women with co-infections involving multiple HPV types, elevated viral load, and microbiome dysbiosis.

Keywords: human papillomavirus, Pap test, intraepithelial lesions, cervical cancer, multiple type HPV infection, age, HPV viral load, vaginal microbiome, vaginal dysbiosis, molecular testing.

Содржина

Апстракт	6
Abstract	8
Содржина	10
Список на скратеници	12
1. Вовед	14
1.1. Историја на ХПВ	14
1.2. Епидемиолошки податоци	15
1.2.1. Глобална перспектива	15
1.2.2. Европа	16
1.2.3. Балкански регион	17
1.3. Класификација на ХПВ	18
1.4. Структура и организација на вирусот	20
1.4.1. Вирусни протеини	20
1.4.2. Механизам на инфекција и карциногенеза	22
1.4.3. Непродуктивна ХПВ инфекција и малигна трансформација	24
1.5. ХПВ и имунитет	26
1.5.1. Избегнување на имунитетот	26
1.5.2. Природни имунолошки одговори на ХПВ	27
1.6. Начини на пренос на ХПВ	28
1.7. Интраепителни лезии и карцином на грлото на матката поврзани со ХПВ	28
1.7.1. Природен тек на премалигните лезии на грлото на матката	28
1.7.2. Проценка на ризикот за прогресија на ЦИН кон инвазивен карцином ...	29
1.8. Фактори од страна на вирусот и од страна на домаќинот кои имаат влијание на перзистенција на инфекцијата со ХПВ	30
1.8.1. Инфекции предизвикани со еден или со повеќе типови на ХПВ истовремено	30
1.8.2. Концентрација на ДНК на ХПВ	30
1.8.3. Возраст	31
1.8.4. Сексуално однесување	31
1.8.5. Пушење	31
1.8.6. Алкохол	32
1.8.7. Долго трајна употреба на контрацептиви	32
1.8.8. Имуносупресија	32
1.8.9. Состав на вагиналниот микробиом	33
1.9. Стратегии за превенција и скрининг на ХПВ	38
1.9.1. Примарна превенција: ХПВ вакцинација	38

1.9.2. Секундарна превенција: Скрининг за рак на грлото на матката	39
1.9.3. Третична превенција: Третман и палијативна нега	44
2. Мотив	46
3. Цели	47
4. Материјал и методи	48
4.1. Испитувана популација	48
4.1.1. Инклузиони критериуми	49
4.1.2. Ексклузиони критериуми	49
4.2. Примероци	49
4.3. Цитолошка класификација	49
4.4. Микробиолошки анализи	50
4.4.1. Детекција на присуство на 21 тип на ХПВ	50
4.4.2. Мерење на концентрацијата на ДНК на ХПВ	52
4.4.3. Квалитативна и квантитативна детекција на компонентите на вагиналниот микробиом	52
4.5. Статистичка обработка на податоците	55
5. Резултати	56
Цел 1.	58
Цел 2.	79
Цел 3.	86
Цел 4.	94
6. Дискусија	102
7. Заклучоци	117
8. Список на користена литература	121
9. Прилози	131

Список на скратеници

XPIB	Хуман папилома вирус
BP-XPIB	Високо ризични типови на ХПВ
ORFs	Отворени рамки за читање
LCR	Долга контролна област
URR	Горен регулаторен регион
NCR	Некодирачки регион
VLPs	Честички слични на вирус
HSPGs	Хепаран сулфат протеогликан
Rb протеини	Ретинобластома протеини
PDZ PSD95/Dlg/ZO-1)	PSD-95 (postsynaptic density protein 95), Dlg (discs large protein), ZO-1 (zonula occludens-1) протеини кои учествуваат во формирањето и стабилизирањето на постсинаптичките структури и меѓуклеточните врски
IRF	Транскрипциски фактори за регулација на синтезата на интерферон
CIN	Цервикална интраепителна неоплазија
ET- XPIB	Инфекции предизвикани со еден тип на ХПВ
IT-XPIB	Инфекции предизвикани со повеќе типови на ХПВ истовремено
BM	Вагиналниот микробиом
NGS	Next-generation sequencing
CSTs	Community state types
VMT	Трансплантација на вагинален микробиом
LSIL	Сквамозна интраепителна лезија од низок степен
HSIL	Сквамозна интраепителна лезија од висок степен
ESGO/ESTRO/ESP	Европското здружение за гинеколошка онкологија/ Европско здружение за радиотерапија и онкологија/ Европско здружение за патологија
PBS	Солен раствор со фосфатен пуфер
hrCLs	Цервикални лезии со висок ризик од прогресија во карцином
non-hrCL	Цервикални лезии со низок ризик од прогресија во карцином
ASC-H	Наоди каде не можат да се исклучат сквамозни интраепителни лезии од висок степен
HSIL	Сквамозни интраепителни лезии од висок степен
LSIL	Сквамозни интраепителни лезии од низок степен
SCC	Сквамозен цервикален карцином
ASC-US	Атипични сквамозни клетки со неодредено значење
NILM	Негативен наод за интраепителна лезија или малигнитет

SIC	Контрола на примерокот (sample intake control)
LBC	Течната цитологија
FDA	Управата за храна и лекови на САД
VIA	Визуелна инспекција со оцетна киселина
LLETZ	Електрода со електрохируршка единица за ексцизија на зоната на трансформација
LEEP	Постапка за електрохируршка ексцизија со јамка
CNC	Конизација со ладен нож (скалпел)

1. Вовед

1.1. Историја на ХПВ

Хуманиот папилома вирус (ХПВ) постои колку и самиот човечки род, исклучително е стабилен со мала тенденција за мутација. Најстарите докази за ХПВ инфекција потекнуваат од древен Египет. При аутопсија мумифицираното тело на Нахт, древен египетски работник на имотот на фараонот Сетнахт во 12-тиот век пред нашата ера, пред повеќе од 3000 години, била утврдена брадавица на петата, што претставува доказ за една од првите видови на кожни лезии поврзани со вирусот. Брадавиците биле добро опишани во класичната грчка и римска медицинска литература: терминот „кондилома“ доаѓа од грчкиот збор „кондилос“ што значи „јазол“ или „издаденост“ и латинскиот збор „верука“ што значи папилома на стапалото. Постојат докази дека Хипократ, таткото на медицината, има опишано третмани за брадавици на гениталиите со користење на билки, а во римско време, лекарите веќе препознавале дека брадавиците на гениталиите може да се пренесуваат сексуално, но не биле во можност да ја поврзат оваа инфекција со појава на рак, особено затоа што карциномот на цервиксот бил релативно редок поради краткиот животен век на жените (1).

Важен чекор во историјата на ХПВ бил направен 1700 година, од италијанскиот професор по медицина Бернардино Рамацини, кој забележал дека кај монахињите многу ретко бил дијагностициран рак на грлото на матката (1). Тој не можел да го објасни ова набљудување, но тоа бил голем чекор во идентификацијата на сексуалниот контакт или целибатот како фактори на ризик за болест. Друг италијански лекар, Доменико Ригони-Штерн, во 1842 година, анализираше смртни случаи 80 години наназад во Верона и заклучил дека карциномот на грлото на матката е непропорционално повисок кај проститутки и мажени жени отколку кај калуѓерки и девици, што укажувало дека причинителот веројатно се пренесува сексуално (2).

Во 1891 година, Џозеф Пејн, лекар во болницата „Свети Тома“ во Лондон, формално ја пријавил инфективната природа на брадавиците, но потврдата дека тој материјал по потекло бил вирус дошла од експериментите на друг италијанскиот лекар, патолог, Џузепе Чуфо. Чуфо подготвил екстракт од брадавици, го филтрирал за да ги отстрани бактериите и габите, а потоа се инокулирал себе си, при што развил брадавици на местото на инјектирањето. Бидејќи во филтратот немало клетки, Чуфо заклучил дека причинителот на брадавиците е вирус (2,3).

Во меѓувреме, сè уште немало доказ дека постои поврзаност помеѓу брадавиците, ХПВ и цервикалниот карцином, ниту пак идеја за причината на ракот. Следниот голем напредок дошол во 1910-1911 година, благодарение на Пејтон Роус, млад тексашки вирусолог кој работел во Рокфелер институтот. Роус докажал дека филтриран екстракт од туморски клетки од карциноми кај кокошки,

трансплантиран кај здрави кокошки, промовирал раст на сарком, што довело до откритие на првиот онкоген вирус, познат како вирус на Роусов сарком (2). Дваесет и пет години подоцна, д-р Роус и д-р Ричард Шоуп го идентификувале првиот папилома вирус, познат како Шоупов папилома вирус (Shope PV), од брадавици на зајаци со памучни опашки. Тие покажале дека овој вирус може да предизвика неопластични израстоци кај домашни зајаци (3,4).

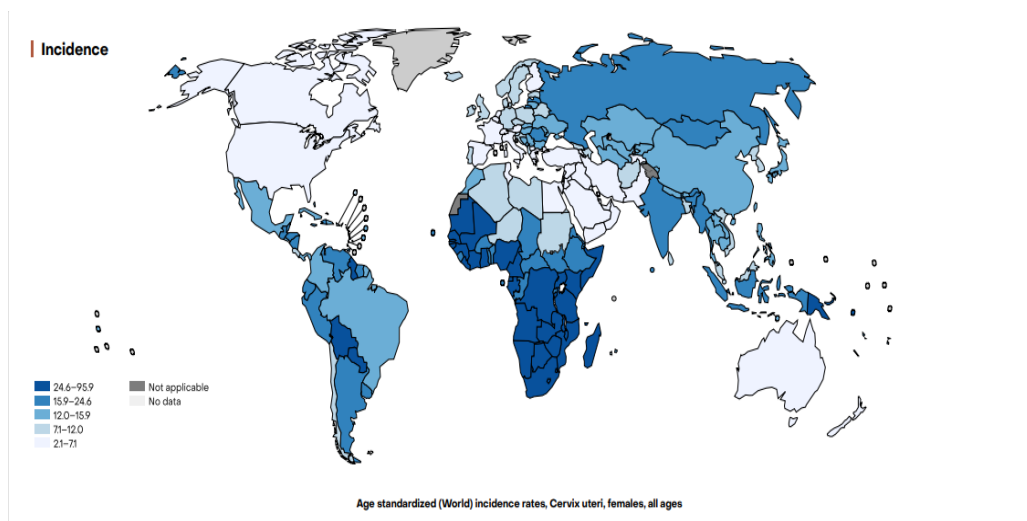
Голем напредок во проучувањето на ХПВ и неговата врска со карциномот се случил во 1982 година, кога германскиот научник Харалд цур Хаузен го докажал присуството на ХПВ во примероци од цервикален карцином, за што добил Нобелова награда (4). Тој докажал дека специфични типови на ХПВ, како што се типовите 16 и 18, се главни причинители на карцином на цервиксот. Откритието дека ХПВ е главен причинител на рак на грлото на матката и на околу 20% од ракот на главата и вратот ги мотивираше научната и медицинската заедница да се фокусираат на овој вирус како значаен карциноген (1,2).

Првите обиди за да се создаде вакцина против ХПВ биле направени од страна на микробиологот проф. Лешек Борисиевич и неговиот тим. Во студија, објавена во 1996 година, покажале дека имунолошки одговори против ХПВ антигени може да се создадат преку вакцинација (1). Конечно во 2006 година, била одобрена првата превентивна вакцина против ХПВ, позната како „*Gardasil*“, која штити од типовите на ХПВ кои се директно одговорни за повеќе од 70% од случаите на цервикален карцином и 90% од случаите на генитални брадавици (1).

1.2. Епидемиолошки податоци

1.2.1. Глобална перспектива

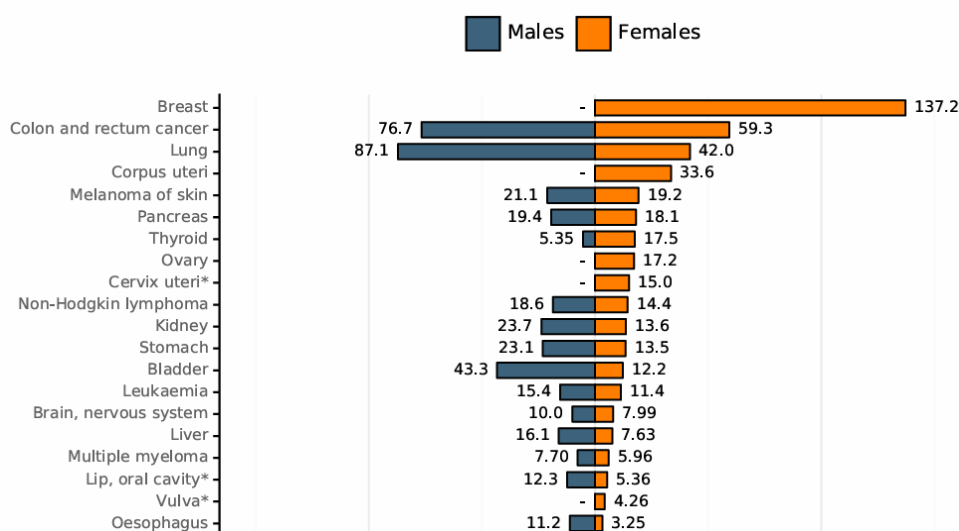
Хуманиот папилома вирус (ХПВ) е водечка причина за карцином на грлото на матката, одговорен за приближно 99% од случаите на глобално ниво, при што типовите на ХПВ, 16 и 18 придонесуваат за 70% од карциномите на цервикс. Според резултатите на Глобокан студијата, карциномот на грлото на матката е четврто најчесто малигно заболување кај жените во светот со 661.021 нови случаи на годишно ниво и 348.189 смртни случаи, за 2022 година (5). Овие бројки рефлектираат значителни разлики помеѓу развиените и земјите во развој, при што земјите со низок и среден приход го носат поголемиот дел од товарот. Оваа нееднаквост главно се должи на ограничената достапност на вакцинација против ХПВ, скрининг за рак на грлото на матката и навремено лекување (Слика 1).



Слика 1. Инциденца на карцином на грлото на матката на глобално ниво (5)

1.2.2. Европа

Европа претставува хетерогена слика за инциденцата и смртноста од карцином на грлото на матката, под влијание на разликите во програмите за скрининг, покриеноста со вакцинација и пристапот до здравствена грижа. Карциномот на грлото на матката е рангиран како деветта водечка причина за појава на рак кај жените во Европа, а претставува трет најчест тип на карцином кај жени на возраст од 15 до 44 години. Годишно, Европа бележи приближно 58.169 нови случаи и 25.989 смртни случаи од рак на грлото на матката. Стандардизираната стапка на инциденца според возраст е 10,7 на 100.000 жени, со значителни варијации низ регионите (6).



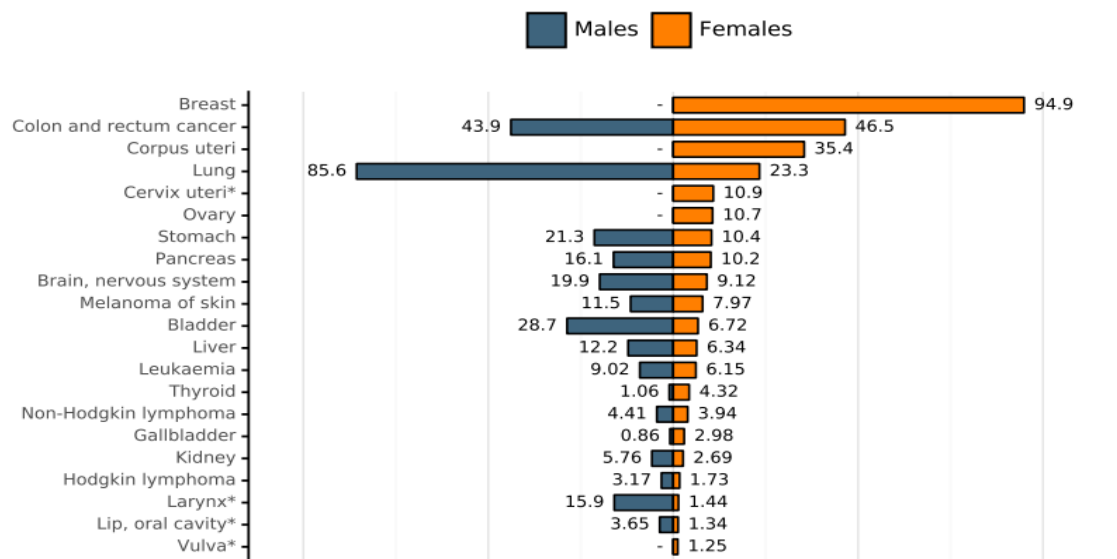
Слика 2: Споредба на инциденцата на карциномите поврзани со ХПВ со другите типови карциноми кај мажи и жени од сите возрасти во Европа (проценки за 2020 година) (7)

Во Источна Европа се забележуваат највисоки стапки на инциденца и смртност од цервикален карцином, што се должи на ограничен пристап на населението до широко распространети програми за скрининг и вакцинација. Регионите на Северна и Западна Европа имаат имплементирано робусни програми за вакцинација и скрининг против ХПВ, што резултира со релативно ниски стапки на инциденца и смртност од цервикален карцином. Додека во Јужна Европа постои мешана слика, при што земјите како Италија и Шпанија покажуваат ефективни стратегии за превенција, додека други заостануваат поради културни и системски пречки (7).

1.2.3.Балкански регион

Балканскиот регион, кој ги опфаќа Србија, Босна и Херцеговина, Северна Македонија и Косово (UNSCR 1244), ги одразува предизвиците на транзициските здравствени системи. Стапките на инциденца и смртност се значително повисоки во споредба оние на Западна Европа, главно поради неконзистентната имплементација на програмите за превенција.

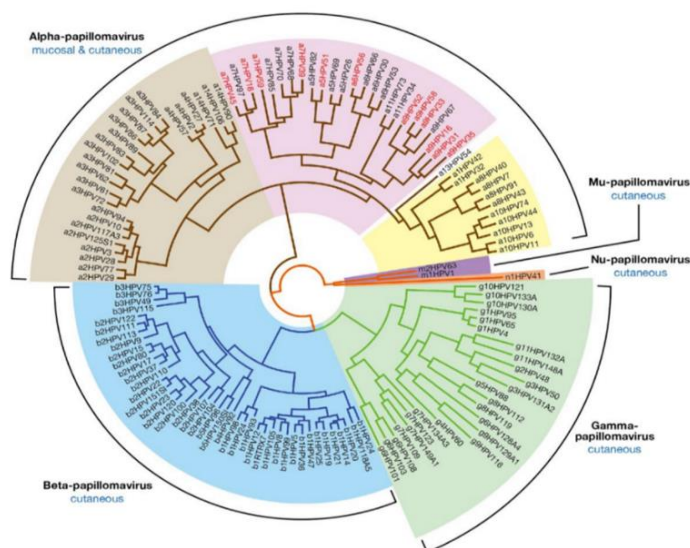
- Србија годишно бележи приближно 1.200 нови случаи, при што ракот на грлото на матката е рангиран како петта најчеста болест кај жените. Воведени се кампањи за подигнување на свеста и едукативни иницијативи, кои се клучни за справување со овој проблем (8).
- Босна и Херцеговина се соочува со нееднаков пристап до редовни гинеколошки прегледи, ПАП тестови и тестови за ХПВ, и покрај неодамнешните успеси во воведувањето на програмите за вакцинација (8).
- Во Република Северна Македонија ракот на грлото на матката е трет најчест карцином, и четврта водечка причина за смртност од рак кај жени на возраст од 15 години до 44 години. Северна Македонија има постигнато напредок во скринингот и вакцинацијата за ХПВ, но стапките на искористеност на ресурсите остануваат недоволни. Годишно во Република Северна Македонија се дијагностицираат околу 113 нови случаи на рак на грлото на матката со околу 62 смртни случаи (проценки за 2020 година) (9).



Слика 3. Споредба на инциденцата на рак поврзан со ХПВ со други видови ракај мажи и жени од сите возрасти во Република Северна Македонија (проценки за 2020 година) (9)

1.3. Класификација на ХПВ

Папилома вирусите според најновата класификација припаѓаат на фамилијата *Papillomaviridae* (10,11). Името на папилома вирусите доаѓа од латинскиот збор *papilla*-брадавица, и грчкиот збор *oma* што значи тумор (2,3). Се идентификуваат со кратенката ПВ и една или две букви кои го означуваат видот на домаќинот. Оваа ознака може да биде изведена од англискиот јазик, на пример, „ХПВ“ за човечки папиломавируси.



Слика 4. Типовите на хуманот папиломавирус кои се наоѓаат кај луѓето припаѓаат на пет родови, при што родовите Алфа и Бета/Гама ги претставуваат најголемите групи. Типовите на ХПВ од родот Алфа често се класифицирани како нискоризични кожни (сиви), нискоризични мукозни (портакалови) или вискоризични (розови). Високо ризични типови, идентификувани со црвен текст, се потврдени како „човечки канцерогени“. Останатите вискоризични типови се потенцијално канцерогени. (12)

Семејството *Papillomaviridae* е поделено на 39 родови (13), врз основа на идентичност на секвенцата L1, како најконзервиран ген во геномот на ХПВ. За да припаѓа на посебен род, потребна е 60% или поголема идентичност на секвенцата L1, при што секој род се обележува со буква од грчката азбука. До сега се откриени 225 типови на ХПВ кои се категоризирани во пет родови, вклучувајќи: 65 *Alphapapillomaviruses*, 51 *Betapapillomaviruses*, 84 *Gammapapillomaviruses*, 4 *Mupapillomaviruses* и еден *Nupapillomavirus* (11,13).

На филогенетското ниво под родот, тесно поврзаните типови на ХПВ со 60-70% идентичност во L1 генот се групирани во ист вид. Типовите на ХПВ што се групирани заедно во еден вид имаат тенденција да споделуваат заеднички карактеристики, како што се ткивниот тропизам и онкогениот потенцијал.

Врз основа на нивните геномски секвенци, сите ХПВ типови од родот *Alphapapillomaviruses* формираат 15 видови. Од нив најзначајни се: *Alpha-5* (ХПВ23, 51, 69 и 82), *Alpha -6* (ХПВ30, 53, 56 и 66), *Alpha -7* (ХПВ18, 39, 45, 59, 68, 70, 85 и 97) и *Alpha -9* (ХПВ16, 31, 33, 35, 52, 58 и 67) (14).

На Меѓународниот работен состанок за папиломавируси одржан во Квебек во 1995 година, меѓу сите научници кои работеле на таксономија и дијагностика на ПВ било договорено дека за идентификација на нови типови на ПВ ќе се користи генот L1, како најконзервиран ген во геномот. При тоа нов тип на ПВ се препознава како таков доколку целиот геном е клониран и ДНК секвенцата на генот L1 се разликува за повеќе од 10% од најблискиот познат тип на ПВ (4,10,13).

Меѓународната агенција за испитување на карциномот (eng. International Agency for Research on Cancer - IARC) во 2003 година предложила врз основа на нивниот онкоген потенцијал, познатите генотипови да се поделат во три групи (16–18):

- Високо ризични типови (ВР-ХПВ): Овие типови се силно поврзани со развојот на цервикален карцином и други аногенитални и орофарингеални малигнитети. Најзначајни се ХПВ 16 и 18, кои се одговорни за околу 70% од случаите на рак на грлото на матката. Други високо ризични типови вклучуваат: 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 и 68 .
- Потенцијално високо ризични типови (ПВР-ХПВ): Овие типови имаат нецелосно разјаснет онкоген потенцијал, но се сметаат за можни причинители на преканцерозни лезии. Во оваа група спаѓаат ХПВ типови: 26, 53, 66, 67, 70, 73 и 82.
- Ниско ризични типови (НР-ХПВ): предизвикуваат бенигни промени како генитални брадавици и ретко се поврзани со развој на малигнитети. Најчести се ХПВ 6 и 11 (4,16–18).

Типовите на ХПВ се делат на субтипови. Терминот „субтипови“ бил користен во 1980-тите за да се идентификуваат изолати на ХПВ типови со различни

рестрикциски обрасци. Денес овој термин се однесува на изолат чија секвенца на генот L1 се разликува од 2–10% во однос на кој било познат тип (10,11,16).

„Варијантите“ на ХПВ типовите се идентични околу 98% со оригиналниот изолат, кој во овој контекст се нарекува „прототип“ или „референтен геном“, додека новите варијанти можат да се означат со произволни кратенки. Два важни заклучоци кои произлегле во однос на испитувањето на варијантите се, прво, дека постои ограничен број (на пример, 20–100) на чести варијанти за секој тип на ХПВ, и, второ, варијантите покажале максимална дивергенција кога биле земени примероци од етнички групи кои долго време еволуирале без контакт, на пример Африканци и Американски Индијанци. Од ова може да се заклучи дека секој тип на ХПВ кој постоел кај човечката популација уште од почетокот, еволуирал и се проширувал заедно со инфицираните популации. Никогаш не постоело време или етничка група без обични брадавици, генитални брадавици и рак на грлото на матката, при што ХПВ не ги инфицира луѓето од животински резервоар, како што е случајот со некои други вируси како вирусот на хумана имунодефициенција (ХИВ), Ебола, SARS корона вирус или инфлуенца. Варијантите на ист тип на ХПВ се биолошки и етиолошки различни (19). Овие разлики може да се причина за различната инциденца на рак на грлото на матката низ светот (11, 20).

1.4. Структура и организација на ХПВ

ХПВ е необвиткан ДНК вирус со тропизам за сквамозен епител. Секоја вирусна честичка има икосаедрален капсид со пречник од околу 60 nm, кој содржи единечна молекула на двојно-верижна кружна ДНК со приближно 8.000 базни парови. Само една верига од геномот на двојно-верижната ДНК се користи како шаблон за транскрипција и оваа кодирачка верига содржи три геномски региони, кои вклучуваат околу десет отворени рамки за читање (ORFs) (13), прикажани на Слика 5. Раниот регион (E) содржи до седум ORFs кои кодираат вирусни регулаторни протеини и онкопротеини додека доцниот регион (L) ги кодира двата вирусни капсидни протеини. Третиот регион на геномот е познат како долга контролна област (LCR), горен регулаторен регион (URR) или некодирчки регион (NCR). Овој геномски регион содржи почеток на ДНК репликација, како и секвенции за контрола на транскрипција (13,21).

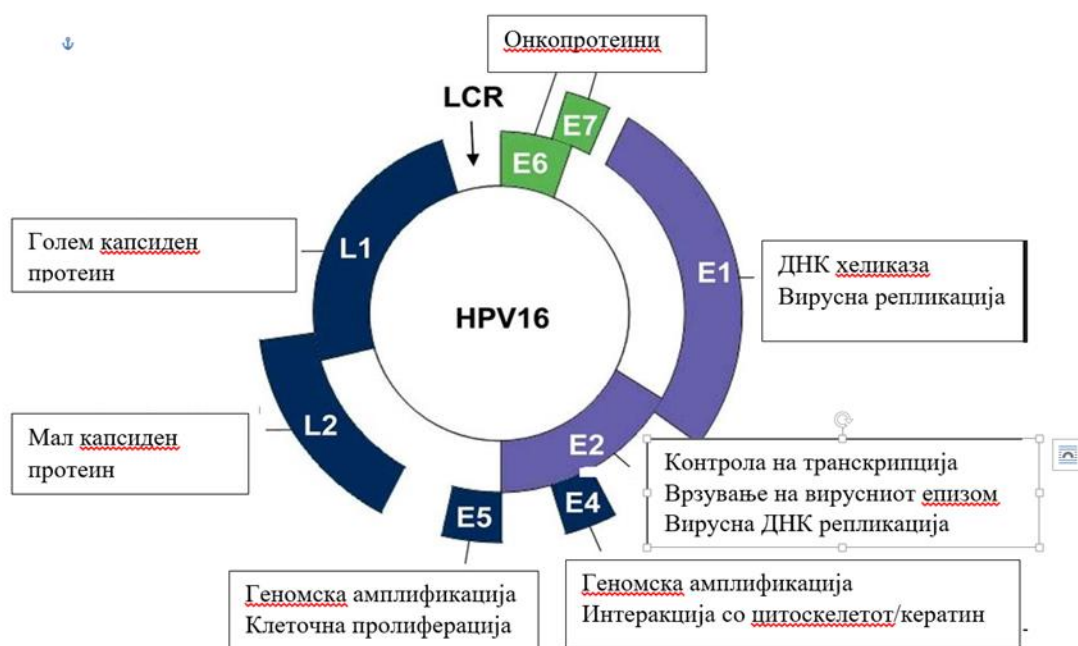
1.4.1 Вирусни протеини

Ран регион (E)

Е регионот зафаќа околу 4.500 bp и содржи шест отворени рамки за читање (ORFs) кои кодираат шест функционални вирусни протеини: E1, E2, E4, E5, E6 и E7 (21).

- E1 протеинот: Показува активност на ДНК хеликаза, со што го овозможува почетокот на репликацијата на вирусната ДНК (22).

- E2 протеинот: се врзува за специфични секвенци во контролниот регион на вирусот, при што може да ја инхибира активацијата на транскрипцијата на вирусната ДНК. Исто така, E2 протеинот може да ја инхибира клеточната пролиферација (23,24).
- E4 протеинот: Го спречува влегувањето во јадрото на Cyclin B1/CDK1 (протеински комплекс кој има главна улога во регулација на клеточниот циклус), што доведува до блокада на клеточниот циклус во G2 фазата. Дополнително, E4 може да формира комплекс со E1, формирајќи го протеинот E1^{E4}, кој делува на внатрешклеточниот кератински систем и го деградира цитоскелетот (25).



Слика 5. Организација на поединечните гени во состав на геномот на ХПВ. Шематски приказ на кружниот геном на ХПВ16 што ја покажува локализацијата на раните (E) и доцните гени (L1 и L2) и на долгиот контролен регион (LCR). Геномот на ХПВ кодира осум добро карактеризирани протеини, чии функции се наведени. Меѓу нив се и вирусните протеини за репликација E1 и E2 (виолетови) и вирусните онкогени E6 и E7 (зелени), сите наведени гени играат важна улога во вирусната патогенеза (26)

- E5 протеинот: Активира епидермални рецептори за раст и влијание врз ендоцитозата, ацидификацијата на Голџиевиот апарат, метаболизмот на рецепторите за раст и меѓуклеточната комуникација (22).
- E6 протеинот: Во комбинација со E6-AP убиквитин протеин лигаза, го деградира p53 протеинот, што доведува до губиток на неговата функција во спречување на појава на карцином. Покрај тоа, E6 може да ја активира теломеразата, што доведува до појава на хромозомски абнормалности (13,17, 25).

- E7 протеинот: Го деградира pRb (ретинобластома) протеинот, овозможувајќи му на транскрипцискиот фактор E2F да влезе во јадрото и да ја иницира S фазата на клеточниот циклус (13,17,21,25).

Доцен регион (L)

L регионот зафаќа околу 2.500 bp и кодира два капсидни протеини: L1 (голем капсиден протеин) и L2 (мал капсиден протеин). Капсидните протеини L1 и L2 имаат важна улога како во составувањето на папиломавирусот така и во самиот инфективен процес. Додека L1 формира најголем дел од капсидот и може самостојно да се составува во празни честички слични на вирус (VLPs - virus-like particles), L2 претставува помала компонента на капсидот и нема способност самостојно да формира VLPs (27,28).

Некодирачки регион (URR)

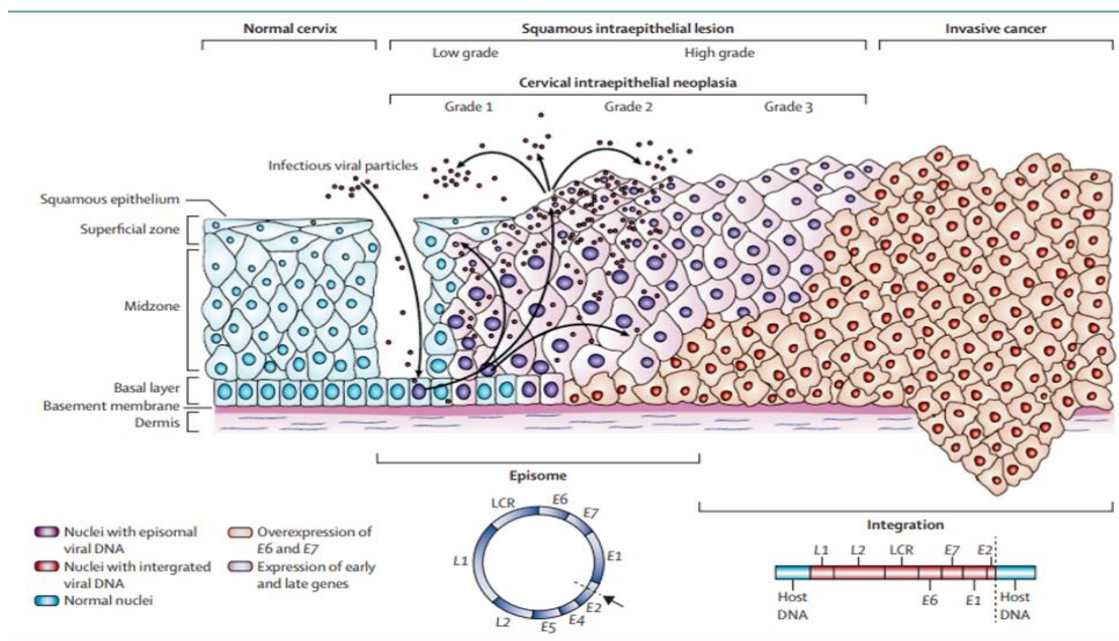
Некодирачкиот регион е долг околу 1.000 bp и се наоѓа помеѓу гените L1 и E6. Овој регион содржи секвенци кои ја регулираат експресијата на гените (13).

1.4.2. Механизам на инфекција и карциногенеза

1.4.2.1. Навлегување на вирусот во клетките на домаќинот

Единствените клетки во сквамозниот епител што можат да се делат се базалните клетки. Следствено, папиломавирусите мораат специфично да ги инфицираат овие клетки за да овозможат воспоставување на перзистентна инфекција. Клетките во базалниот слој на епителот се состојат од матични клетки и транзитни амплифицирачки клетки. За да се одржи перзистентна ХПВ инфекција, потребно е да бидат инфицирани епителните матични клетки во базалниот слој (Слика 6). Меѓутоа, базалните клетки се заштитени од неколку слоеви диференцирани клетки, што ги прави тешко достапни. Вирусот може да ги инфицира овие заштитени клетки преку мали рани што ги откриваат долните слоеви на епителот и на тој начин да овозможи врзување и влез во клетката (13,21).

Вирионите се врзуваат првично за хепаран сулфат протеогликаните (HSPGs), кои служат како примарни рецептори за врзување на базалните клетки или за базалната мембрана која е изложена поради траума на епителот. Ова врзување предизвикува конформациски промени во капсидот на вирусот, што на крај доведува до губење на афинитетот за примарниот рецептор и пренос на вирусот кон друг, влезен рецептор.



Слика 6: Животен циклус на хуманиот папиломавирус и организација на неговиот геном. Базалните клетки на цервикалниот епител лежат на базалната мембрана, која има потпора од дермисот. Се смета дека хуманиот папиломавирус пристапува до базалните клетки преку микроабрази во цервикалниот епител. По инфекцијата, се активираат раните гени на хуманиот папиломавирус E1, E2, E4, E5, E6 и E7 и се создаваат ДНК копии на вирусната епизомална ДНК. Во горните слоеви на епителот (средната зона и површината зона) вирусниот геном дополнително се реплицира, и тука се активирани и доцните гени L1 и L2 и E4. L1 и L2 ги обвиткуваат вирусните геноми за да формираат нови вириони во јадрото. Ослободениот вирус потоа може да предизвика нова инфекција. Интраепителни лезии од низок степен (low grade intraepithelial lesions- LSIL) се поврзуваат со продуктивна вирусна репликација. Одреден број на високоризични интраепителни неоплазми (high-grade cervical intraepithelial neoplasias- HSIL) можат да прогресираат до микроинвазивен и инвазивен цервикален карцином. Оваа прогресија е поврзана со интеграција на геномот на хуманиот папиломавирус во хромозомите на домакиот (црвени јадра), и загуба или нарушување на E2 и последователна зголемена експресијата на онкогените E6 и E7 (29).

Интернализацијата на капсидите од клеточната површина се одвива преку механизам сличен на макропиноцитозата, кој е независен од клатрин, кавеолин и гликолипопротеински липидни микродомени т.н. липидни рафтови. Вирионите потоа се транспортираат низ системот од ендозоми каде што претрпуваат дополнителни структурни промени, што резултира со делумна деконформација. Во ендозомите, циклофилин Б, помага во дисоцијацијата на L1 од L2/вирусниот геномски комплекс, при што настанува лиза на L1. Малиот капсиден протеин, L2 (28), учествува во пренос на вирусниот геном од раните ендозоми преку Голџи системот до јадрото. По влегувањето во јадрото, започнува транскрипција на вирусниот геном (13,21,27).

1.4.2.2. Репликација на геномот и генска експресија

По инфекцијата, и почетната амплификација на геномот, вирусната ДНК се одржува во базалните епителни клетки како стабилен плазмид или епизом. E1 и E2 се меѓу првите вирусни протеини кои се експресираат. Вирусните геноми се реплицираат еднаш по клеточен циклус, за време на S-фазата, обезбедувајќи

перзистентна инфекција на базалните клетки. Во оваа “латентна” фаза на вирусниот животен циклус, ХПВ геномите можат да перзистираат во базалните епителни клетки со години или децении. Сепак, во одреден момент, мора да се случи премин од стабилна репликација (одржување на геномот) кон вегетативна репликација на вирусната ДНК со цел да се овозможи продукција на вирусни геноми за пакување во вириони. Механизмот што го регулира овој премин сè уште е малку познат. Вегетативната репликација на вирусната ДНК се случува во диференцирачките клетки на сквамозниот епител. Покрај двата рани протеини, Е1 и Е2, кои активно се вклучени во репликацијата на вирусниот геном (24), ХПВ ги користи и механизмите на домаќинот за репликација на вирусниот геном, затоа што нема сопствени ензими за репликација (13,21).

1.4.2.3. Склопување, созревање и ослободување на вирусот

Завршувањето на животниот циклус на вирусот вклучува излез од клеточниот циклус и експресија на протеините L1 и L2 со цел да се овозможи пакување на геномот. Склопувањето на вирионот се случува во јадрата на терминално диференцираните кератиноцити, каде што се одвива репликацијата на вирусниот геном и експресијата на вирусните протеини. Влезот на L1 и L2 во јадрото е овозможен од клеточни кариоферини, кои транспортираат молекули меѓу јадрото и цитоплазмата. L1 се склопува во честички слични на вирус (virus like particles-VLPs), а L2 ја зголемува ефикасноста на оваа реакција (27). Созревањето на вирусните честички се одвива во горните слоеви на терминално диференцираниот сквамозен епител, каде што честичките се изложени на оксидирачка средина. Овој процес на созревање вклучува акумулација на дисулфидни врски помеѓу L1 протеините, што резултира во кондензација на капсидот, со што се зголемува неговата стабилност и отпорност на протеолитичко разградување. ХПВ не ја лизираат клетката на домаќинот, па вирусното ослободување се случува како резултат на нормалната загуба на интегритетот во процесот на терминалната диференцијација на инфицираниот кератиноцит. Е4 дополнително придонесува за ослободување на вирионите преку врзување со цитокератинските филаменти и нарушување на нивната структура (13,21).

1.4.3. Непродуктивна ХПВ инфекција и малигна трансформација

Карциномот поврзан со ВР-ХПВ типови најчесто претставува непродуктивна инфекција, каде се јавува експресија на вирусни протеини, но не се произведува инфективен вирус. Дерегулација на експресијата на вирусните гени најчесто е предизвикана со интеграцијата на вирусниот геном во геномот на домаќинот, во премалигните лезии од висок степен.

Интеграцијата се случува во регионот Е1 и Е2 кој ја контролира синтезата на Е6 и Е7 гените. Губење на контролата на овие гени индуцира нивна прекумерна експресија. Е6 и Е7 се толку многу ефикасни во блокирањето на негативните

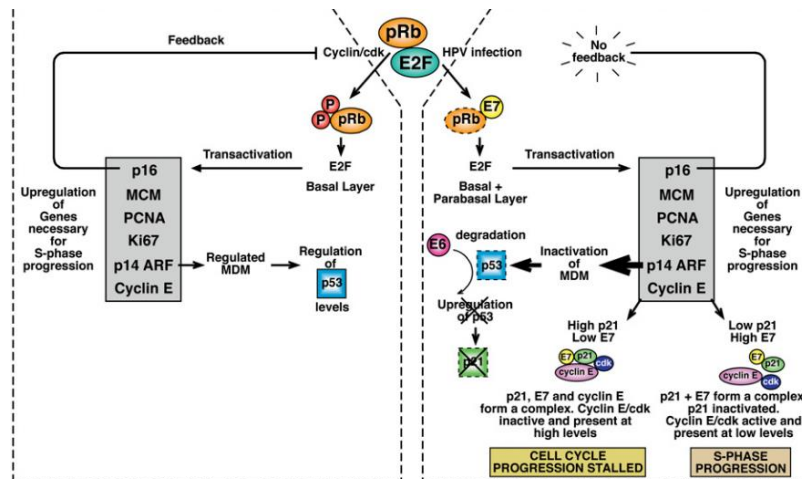
регулатори на клеточниот циклус што инфицираните клетки никогаш не матурираат. Клетките остануваат активно вклучени во прогресијата на клеточниот циклус, додека апоптозата е спречена. Како резултат се јавува генетска нестабилност која овозможува акумулација на генетски измени кои на крај доведуваат до малигна трансформација на клетката инфицирана со ХПВ. Е6 и Е7 ја започнуваат онкогенезата преку добро проучени интеракции со продуктите на туморски супресорни гени- TP53 за Е6 и ретинобластома (Rb) протеините за Е7 (12,17).

1.4.3.1. Механизми на дејствување на ХПВ Е7

Е7 игра клучна улога преку врзување и насочена деградација на тумор супресорниот протеин pRb, како и на сродните “џебни” протеини p107 и p130 (Слика 7). Членовите на Rb фамилијата го регулираат преминот од G1 во S-фаза преку контрола на активноста на E2F транскрипциските фактори. Е7 се врзува за членовите на Rb фамилијата и ја нарушува интеракцијата помеѓу Rb и E2F транскрипциските фактори. Прекин на оваа Rb/E2F интеракција резултира со конститутивна активација на E2F-одговорните гени, што му овозможува на Е7 да ги врати диференцирачките клетки назад во S-фаза, и повторно да ја активира синтезата на клеточната ДНК (30). Како резултат, супрабазалните клетки покажуваат маркери на диференцијација, како и маркери на повторен влез во клеточниот циклус, вклучувајќи пролиферативниот клеточен нуклеарен антиген (PCNA-proliferating cell nuclear antigen), циклин А и циклин Е (31). Протеините Е7 од НР-ХПВ типови исто така се врзуваат за pRb, p107 и p130, но со значително понизок афинитет (26,32).

1.4.3.2. Механизми на дејствување на ХПВ Е6

За да се олесни повторниот влез во клеточниот циклус и амплификацијата на вирусниот геном во супрабазалните клетки, активностите на Е7 се координираат со оние на Е6 (Слика 7). Една од клучните функции на Е6 е инактивацијата на p53. Кај високо-ризичните типови, Е6 ја промовира деградација на p53 преку интеракција со E6AP убиквитин лигазата. Се смета дека деградацијата на p53 од страна на Е6 ги заштитува клетките од апоптоза или од запирање на растот предизвикано од повторниот влез во клеточниот циклус, инициран од Е7, во супрабазалните слоеви (32).



Слика 7: Стимулација на прогресијата на клеточниот циклус од високоризични ХПВ типови (12)

Протеините Е6 од високо-ризичните, онкогени типови на хуман папилома вирусот (ХПВ) се карактеризираат со присуство на PDZ (PSD-95 (postsynaptic density protein 95), Dlg (discs large protein), ZO-1 (zonula occludens-1)) врзувачки мотив на нивните карбоксилни краеви, преку кои тие стапуваат во интеракција со повеќе клеточни супстрати кои содржат PDZ домени (33). PDZ протеините што се поврзуваат со Е6 се вклучени во регулацијата на клеточниот раст и поларитет, како и во сигналните патишта поврзани со клеточната пролиферација, апоптоза, миграција и интрацелуларен транспорт (13,32,34).

1.5. ХПВ и имунитет

1.5.1 Избегнување на имунитетот

Развојот на карциномот не зависи само од ефикасната негативна регулација на контролните механизми на клеточниот циклус кои овозможуваат акумулација на генетски грешки, туку и од софистицираните техники на имунолошка евазија кои овозможуваат вирусот долг период да остане неоткриен. Кај папиломавирусната инфекција нема клеточна смрт, некроза или фаза на виремија која би била тригер фактор за антиинфламаторен одговор (35). Вирусните антигени може да се детектираат само на суперфицијалните епителни клетки кои се десквамираат и се надвор од дометот на имунолошкиот систем. ВР-ХПВ имаат развиено неколку механизми со кои го минимизираат ризикот за нивна детекција од страна на имунолошкиот систем. Високо ризичниот Е6 протеин ја намалува површинската експресија на E-cadherin (CDH1) од епителните клетки, со што ја намалува нивната способност да ги презентираат ХПВ антигените. Специфични toll-like рецептори ги активираат антиген-презентирачките клетки, како дел од вродениот имун одговор на вирусна инфекција, но нивната транскрипција е инхибирана од страна на Е6 и Е7. Е7 ја намалува експресијата на TAP1, клучната компонента во процесот на обработка и презентација на вирусните пептиди, со што спречува активација на специфичните цитотоксични Т лимфоцити. Е6 и Е7 ја инхибираат синтезата на

интерферон преку специфични интеракции со транскрипциски фактори за регулација на синтезата на интерферон, IRF-1 (Interferon Regulatory Factor) и IRF-3 (36). Промената од проинфламаторни во антиинфламаторни сигнали може да влијае на клиренсот на инфекцијата (29,37). Понатаму, концентрацијата на антимикробни пептиди е намалена во цервикавагиналниот тракт кај жени со цервикална интраепителна неоплазија (CIN), што дополнително ја ослабува локалната имунолошка одбрана (37).

Со напредувањето на инфекцијата кон малигнитет, се активираат дополнителни механизми на имуна евазија. Туморските клетки можат да ја намалат експресијата на МНС (major histocompatibility complex) класа I, што ја нарушува презентацијата на антигени и го отежнува препознавањето од страна на Т-клетките. Кај ХПВ-индуцираните тумори често се забележува зголемена инфилтрација на регулаторни Т-клетки, што создава имуносупресивна микро средина и спречува ефективна елиминација на вирусот (29,36).

1.5.2. Природни имунолошки одговори на ХПВ

И покрај овој сложен систем на имуна евазија, најголемиот дел од ХПВ инфекциите се елиминираат во рок од 12 месеци. Улогата која ја игра клеточно посредуваниот имунитет во елиминацијата на вирусот е потврдена со повеќе докази: прво, регресијата на ХПВ-индуцираните лезии е поврзана со инфилтрација на Т-лимфоцити, особено со CD8⁺ цитотоксични Т-клетки. Понатаму, кај имуносупримираните пациенти, како што се ХИВ-инфицираните лица, ХПВ лезиите се поголеми и поупорни, што покажува дека функционален имунолошки систем е клучен за контрола на инфекцијата. ХПВ специфичен имунолошки одговор посредуван преку Т-лимфоцити е детектиран како во лезиите, така и во периферната крв на пациентки кои имаат активна или регресирачка инфекција. Овие наоди укажуваат дека Т-клетките играат важна улога во препознавањето и елиминацијата на ХПВ инфекцијата од организмот (38).

Хуморалниот имун одговор, исто така, игра улога во имунолошката заштита. Антителата против капсидниот протеин L1 може да се откријат приближно шест месеци по инфекцијата и да останат присутни до пет години по успешното елиминирање на вирусот. Меѓутоа, околу 50% од инфицираните лица никогаш не развиваат сероконверзија (29,38).

Улогата на CD4⁺ Т-помошничките (Th1) клетки во елиминацијата на вирусот е исто така значајна. Лонгитудинални студии покажуваат дека Th1 одговорите против вирусниот E2 протеин корелираат со елиминација на вирусот. Спротивно на ова, перзистентните и прогресивните ХПВ инфекции се карактеризираат со дисфункционални Т-клеточни одговори, особено кај пациенти со цервикални интраепителни неоплазии од повисок степен (CIN) и карцином на грлото на матката (12,29,37–39).

1.6. Начини на пренос на ХПВ

Постојат контрадикторни докази за преносот на ХПВ. Додека контактот кожа-кожа или мукоза-мукоза (најчесто при сексуален однос) е главниот пат на трансмисија (40–42), не може да се исклучат и други начини на пренос. Неколку понови студии посочуваат и на не сексуална трансмисија на ХПВ, како вертикален пренос од мајка на новороденче (43–45). Според најновите епидемиолошки студии инфекцијата може да настане и со контакт на контаминирана медицинска опрема во гинеколошките простории (46). Понатаму, ХПВ е детектиран и на разни медицински инструменти како вагинални сонди за ултразвук и инструменти за криотерапија. Овие податоци ја поддржуваат тезата дека гинеколошките простории можат да претставуваат ризик за хоризонтален пренос, имајќи предвид дека често ги посетуваат инфицирани пациенти, а самите прегледи може да предизвикаат микро трауми на гениталната слузница кои ја фаворизираат ХПВ инфекцијата (47).

Преносот на ХПВ од пациенти на здравствен персонал главно се случува во медицински установи каде што се третираат ткива инфицирани со ХПВ. Во студија на Ilmarinen et al. ХПВ ДНК е откриен на хируршки ракавици, маски и инструменти што се користат при ласерска терапија и хируршки третмани на генитални брадавици (41,48).

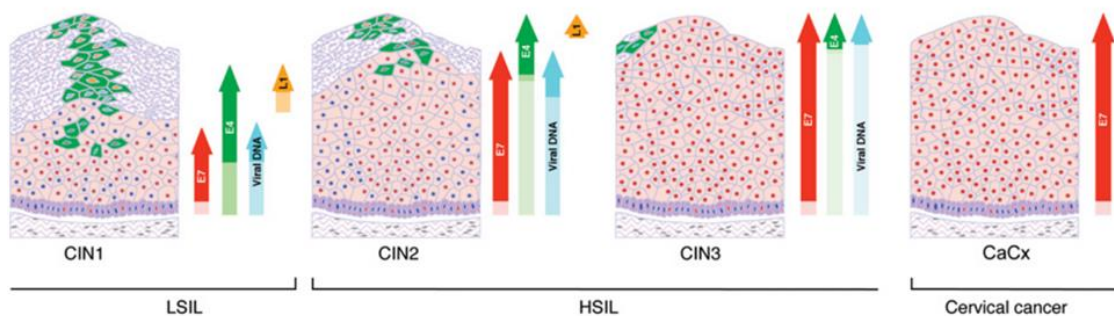
1.7. Интраепителни лезии и карцином на грлото на матката поврзани со ХПВ

1.7.1. Природен тек на премалигните лезии на грлото на матката

Истражувањата на патогенезата на ракот на грлото на матката покажаа дека инфекцијата со хуман папиломен вирус (ХПВ) претставува клучен предуслов за развој на сквамозно-клеточен карцином (SCC), и аденокарцином на грлото на матката. Перзистентна инфекција со онкогени подтипови на ХПВ претставува „неопходен“, но не и доволен фактор за развој на рак на грлото на матката. Репликацијата на вирусот во диференцирачките клетки предизвикува клеточни промени, првенствено во долната третина од епителот, кои се карактеризираат со коилоцитна атипичност, нуклеарно зголемување, хиперхромазија и перинуклеарно просветлување на цитоплазмата. Овие промени се познати како цервикална интраепителна неоплазија 1 (CIN 1) или сквамозна интраепителна лезија од низок степен (LSIL).

Приближно 90% од ХПВ инфекциите се елиминираат во рок од две години како резултат на природниот имунолошки одговор, што доведува до регресија на CIN 1 лезиите. Сепак, кај мал процент од инфицираните жени, перзистентната инфекција со онкогените типови на ХПВ доведува до инактивација на гените супресори на туморите (*p53* и *pRB*) преку вирусните онкопротеини Е6 и Е7, што доведува до развој на премалигни лезии и карцином.

Клеточните и ткивните промени кај сериозните преканцерозни лезии на грлото на матката дополнително се класифицираат како CIN 2 и CIN 3, во зависност од степенот на нарушување на изгледот на клетките и длабочината до која овие промени продираат низ епителниот слој. Промениите класифицирани како CIN 1 може да напредуваат до CIN 2, при што диспластичните клетки се шират до средниот дел од епителот, а понатаму и до CIN 3, каде што овие клеточни нарушувања зафаќаат поголем дел, односно горните две третини, од епителниот слој. CIN 2 и CIN 3 се познати и како значајни интраепителни промени кои укажуваат на сериозен ризик за натамошна прогресија кон цервикален карцином (49).



Слика 8: Промени во експресијата на гените кои ја придружуваат прогресијата кон цервикален карцином. За време на прогресијата кон цервикален карцином, се јавуваат специфични промени во начинот на експресија на вирусните гени на ХПВ. Во раните стадиуми на цервикалните интраепителни лезии (CIN1/LSIL), редоследот на настаните е многу сличен на оној кај продуктивните инфекции. Меѓутоа, во подоцнежните стадиуми (CIN2 и CIN3), се забележува одложена или нарушена експресија на доцните вирусни гени, односно гените одговорни за формирање на вирусни капсиди, при што продукцијата на инфективни вирусни честички е ограничена само на мали области близу површината на епителот. Во овие стадиуми може да дојде до интеграција на ХПВ геномот во геномот на домакиноот, што доведува до понатамошна дерегулација на генската експресија, особено зголемена експресија на онкопротеинот E7 и загуба на протеините за репликација (E1 и E2). Во конечниот стадиум на цервикалниот карцином, продуктивните фази на вирусниот животен циклус повеќе не се одржуваат, а вирусните епизомални ДНК молекули обично исчезнуваат (26)

1.7.2. Проценка на ризикот за прогресија на CIN кон инвазивен карцином

Потенцијалот за прогресија на различните степени на CIN во потешки лезии и инвазивен цервикален карцином е проценет во повеќе лонгитудинални студии. Во мета-анализа на вакви студии, Остор и соработниците (50) забележале дека 60% од CIN 1 лезиите регресираат, 11% прогредираат во карцином *in situ*, а само 1% напредуваат во инвазивен карцином. Во истата анализа, кај 40% од CIN 2 и 33% од CIN 3 лезиите била забележана регресија, додека 5% од CIN 2 и 12% до 30 % од CIN 3 лезиите биле проценети дека ќе напредуваат во инвазивен карцином.

1.8. Фактори од страна на вирусот и од страна на домаќинот кои делуваат на перзистенција на инфекцијата со ХПВ

За повеќето жени, ХПВ инфекциите се минливи и спонтано се отстрануваат од домаќинот без интервенција или клинички последици. Но сепак, 5-10% од ХПВ инфекциите не можат да се елиминираат, и тие стануваат перзистентни инфекции кои можат да предизвикаат карцином на грлото на матката. Тешко е да се предвиди дали ХПВ инфекцијата спонтано ќе исчезне или ќе доведе до малигна трансформација. Се смета дека различни фактори, како возраст, висок паритет, употреба на орална контрацепција, пушење цигари, степен на лезија, генотип на ХПВ, вирусно оптоварување и ко-инфекција со вирусот на хумана имунодефициенција ја зголемуваат можноста за појава на перзистентна инфекција и последователна прогресија во карцином.

1.8.1. Инфекции предизвикани со еден (ЕТ- ХПВ) или со повеќе типови на ХПВ (ПТ-ХПВ) истовремено

Во молекуларно-епидемиолошките студии најчесто се наоѓаат податоци за наод на инфекции со повеќе типови на ХПВ истовремено. Повеќе студии покажаа дека истовремена инфекција со повеќе типови на ХПВ истовремено се јавува значајно почесто отколку што дека тоа би било случајно. Сепак, клиничката важност која овие инфекции ја имаат во модулација на ризикот од појава на сквамозни епителни лезии (SIL) останува контроверзна. Останува отворено и прашањето дали типовите на ХПВ во различните комбинации, при истовремена инфекција на грлото на матката, делуваат меѓу себе компетитивно или кооперативно. Од оваа перспектива има студии (51–53) кои сугерираат дека ХПВ типовите делуваат синергистично во цервикалната карциногенеза, спротивно на нив во литературата има податоци од студии кои сугерираат дека нема значајна разлика меѓу инфекциите предизвикани со ЕТ-ХПВ и ПТ-ХПВ (54,55), или дека ПТ-ХПВ се поврзани со значајно помал ризик од CIN2+ лезии, додека инфекции со ЕТ-ХПВ се почести кај CIN2-3 и цервикален карцином (56,57).

1.8.2. Концентрација на ДНК на ХПВ

Концентрацијата на ДНК на ХПВ во клетките укажува на активноста на вирусот во телото. Голем број студии покажаа дека типот на ХПВ е тесно поврзан со степенот на цервикална лезија и прогноза на третманот, но има неконзистентни резултати во однос на поврзаноста меѓу концентрацијата на ДНК на ХПВ во клетките на домаќинот и степенот на цервикалните лезии. Xi et al. (58), Dalstein et al. (59) и други (60,61), во своите студии докажаа дека високата концентрација на ДНК на ХПВ во примероците со уреден наод на ПАП тестот е поврзан со зголемен ризик од развој на дисплазија и карцином *in situ*. Постојат податоци од студии кои докажале дека само концентрацијата на ДНК на ХПВ 16 е поврзана со ризик од CIN 3 (62), резултатите од други студии укажуваат дека постои позитивна корелација

помеѓу концентрацијата на ДНК на ХПВ -16, -31, -33, -52 и -58 и тежината на цервикалната лезија, додека со концентрацијата на ДНК на ХПВ -18, -45, -56 и -59 не може да се најде таква поврзаност (63,64). Спротивно на претходните, има и студии кои имаат објавено дека цервикални лезии се почести кај пациентки со ниска концентрација на ДНК на ХПВ -16 и -31 (65).

1.8.3. Возраст

Анализите од досегашните студии сугерираат дека преваленцата на инфекција со ПП-ХПВ и цитолошките абнормалности опаѓаат постојано и паралелно со возраста (56,57,62,66,67). За споредба, има и студии кои сугерираат дека кривата на преваленца на инфекции предизвикани со повеќе типови на ХПВ истовремено во однос со возраста има два пика, еден повисок кај помладата популација (<29 години), и друг понизок кај жените на возраст од 50-59 години (68,69).

1.8.4. Сексуално однесување

Повеќе од 40% од младите жени се инфицираат со ХПВ во првите две години по започнување со сексуална активност (70). Особено е висок ризикот од инфекција кај адолесцентите и сексуално активните жени помлади од 25 години. Главна причина зошто младите жени се повеќе подложни на инфекција со ХПВ се ановулаторните циклуси, кои водат до несоодветно производство на цервикална слуз (71). Цервикалната слуз претставува заштитна бариера против инфективни агенси. Исто така физиолошката незрелост на грлото на матката, доведува до ектопија на цервиксот за време на пубертетот, што го прави цервиксот подложен на инфекција со ХПВ и тоа со висока стапка на метапластични промени. Ribeiro et al. (72) и Baudu et al. (73) откриле сигнификантно значајна поврзаност помеѓу жените кои имале прв сексуален однос пред 16 годишна возраст и ХПВ инфекција. Бројот на сексуални партнери, исто така, ги зголемува шансите за контакт со лице кое е носител на ХПВ, а докажана е поврзаност помеѓу детекцијата на ХПВ со употребата на кондоми и обрежување кај мажите. Познато е дека има пониска преваленцата на ХПВ инфекција кај оние кои секогаш користеле кондоми поради помал контакт кожа со кожа (74).

1.8.5. Пушење

Постојат студии кои покажаа дека пушењето цигари е поврзано со преваленцата, инциденцата и перзистанцијата на ХПВ инфекцијата. Жените кои пушат имаат околу два пати поголеми шанси да заболат од рак на грлото на матката (72,75,76). Цервикалната слуз кај пушачите содржи мерливи количества на состојки од цигарите и нивни метаболити. Истражувачите веруваат дека овие супстанции ја оштетуваат ДНК на клетките на грлото на матката, ја зголемуваат клеточната пролиферација и може да придонесат за појава на карцином (34). Пушењето исто

така е ризик фактор за детекција на ХПВ кај мажите, и се поврзува со појава на карцином на аналниот отвор и пенисот (70).

1.8.6. Алкохол

Употребата на алкохол е моќен модулатор на имунолошката функција што може да доведе до имунолошки дефицит и зголемена подложност кон различни хронични заразни болести. Не само хроничната злоупотреба на алкохол, туку и акутното и умерено конзумирање на алкохол може негативно да влијае на имунолошкиот систем. Врз основа на литературните податоци, висок внес на алкохол, и кај мажите и кај жените, е поврзан со зголемен ризик за постоење на инфекција со повеќе типови на ХПВ истовремено, што доведува до повисоки цервикални/анални лезии и почесто, генитални брадавици (70).

1.8.7. Долготрајна употреба на контрацептиви

Постојат докази дека долготрајна употреба на оралните контрацептиви е поврзана со карцином на цервиксот кај ХПВ позитивните жени. Употребата на контрацептиви влијае на клиренсот или перзистенцијата на инфекцијата со ХПВ, со прогресијата или регресијата на преканцерозните промени и карциномот на грлото на матката. Податоците од литературата сугерираат дека ризикот од карцином се зголемува колку подолго жената земала орално контрацептивно средство, но може повторно да се намали доколку се прекине со употреба. Според направените студии, употреба на орални контрацептиви до 4 години, не го зголемува ризикот од карцином на грлото на матката, но нивна употреба повеќе од 5 години значајно е поврзана со цервикален карцином. Според Американското здружение за карцином, жената треба да разговара со лекарот за придобивките и потенцијалните ризици од употреба на контрацептивни средства. Во секој случај жената со повеќе сексуални партнери треба користи кондоми за да го намали ризикот од сексуално преносливи болести без разлика каква друга форма на контрацепција таа користи (70,72).

1.8.8. Имуносупресија

Вирусот на хумана имунодефициенција (ХИВ) го оштетува имунолошкиот систем и го зголемува ризикот од ХПВ инфекција. Во повеќе студии е докажано дека ХПВ инфекцијата е поопасна кај ХИВ позитивните лица поради оштетувањето на клеточно посредуваниот имунитет, кој е клучна компонента во клиренс на ХПВ инфекцијата. Кај жени со ХИВ инфекција, преканцерозните промени на грлото на матката можат да се развијат во карцином побрзо од обично (77). Друга група пациенти изложени на ризик од ХПВ инфекција се пациенти кои земаат имуносупресивна терапија (хемотерапија, моноклонални/ поликлонални антитела, гликокортикоиди и сл.) со цел да се намали нивниот имунолошки одговор, поради лекување на автоимуни или онколошки заболувања или пациенти со

трансплантација на органи. Во овој случај, поради намалување на бројот на бели крвни клетки, се изложени на поголем ризик од инфекции (70).

1.8.9. Состав на вагиналниот микробиом

Вагиналниот микробиом (ВМ) претставува сложен и динамичен микроеколошки систем кој постојано се менува во текот на животот на жената, под влијание на фактори како што се возраста, нивото на хормоните, имунолошкиот систем, хроничниот стрес и други. Дополнително, ВМ значително се разликува помеѓу индивидуите, како резултат на разликите во расната припадност, регионот, сексуалното однесување, хигиената итн. (78). Во последните неколку децении, благодарение на воведување на нови техники како што е секвенционирањето (NGS-next-generation sequencing), беше овозможено да се направи филогенетска и таксономска карактеризација на микробните заедници присутни на различни делови од човечкото тело, вклучително и вагината. Новите истражувања покажуваат дека за разлика од другите мукозни површини на телото (особено цревната мукоза), кои се населени со комплексен микробиом, човечкиот вагинален екосистем е поврзан со ниска микробна разновидност, во која во најголем дел (>90%) доминираат неколку видови на *Lactobacillus*, главно *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus iners*, *Lactobacillus jensenii* и *Lactobacillus vaginalis* (78–80).

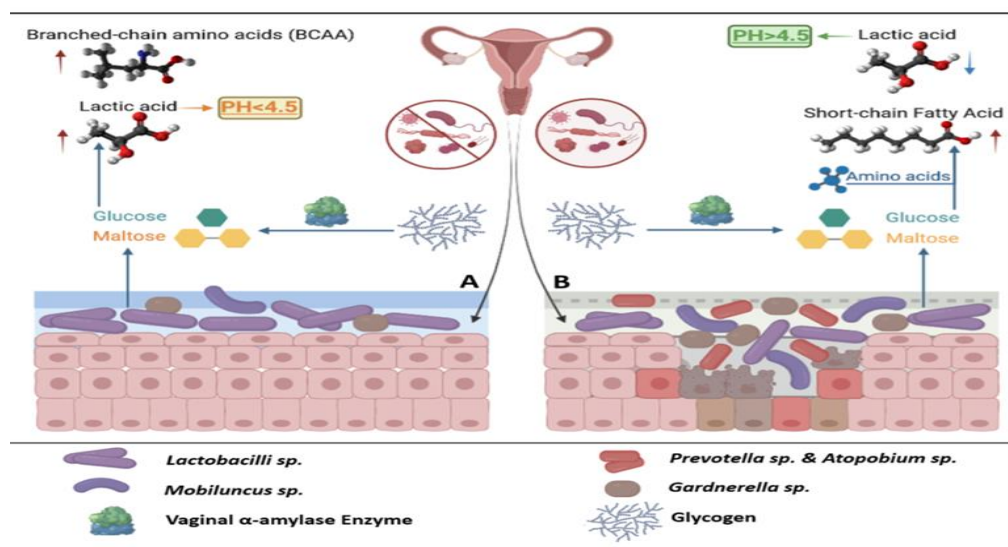
Со помош на NGS, вагиналниот микробиом е категоризиран во пет типови на заедници (CSTs-community state types). Во CST-I, CST-II, CST-III и CST-V доминираат главно видови на *Lactobacillus spp.*, како *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners* и *L. jensenii* (81). За разлика од нив, CST-IV се карактеризира со хетероген микробен состав со подтипови CST-IV-A и CST-IV-B. CST-IV-A содржи умерен број на *Lactobacillus spp.* и низок број на анаеробни бактерии, додека CST-IV-B е збогатен со анаероби како *Atopobium*, *Prevotella*, *Parvimonas*, *Gardnerella*, *Megasphaera*, *Ruminococcaceae*, *Mobiluncus*, *Sneathia*, без присуство на *Lactobacillus spp* (82,83).

1.8.9.1. Здрав вагинален микробиом

Вагиналниот микробиом игра суштинска улога во одржувањето на здравјето на цервиксот и заштитата на домаќинот од патогени преку продукција на антимикробни соединенија и зајакнувањето на имунолошкиот одговор на домаќинот. Кај здрави жени, присутни се CST I, II и V, каде доминира *Lactobacillus spp.* *Lactobacillus spp.* се Грам-позитивни анаеробни бактерии кои се способни да ја колонизираат вагиналната слузница и да го спречат населувањето или прекумерното размножување на други микроорганизми кои можат да бидат потенцијално патогени за домаќинот. Оваа заштита се остварува преку два механизми: специфично прилепување на епителните клетки и производство на соединенија со антимикробни својства (81). Тие се натпреваруваат со патогените микроорганизми за адхезија на вагиналниот епител, преку механичко спречување

на пристапот, или преку блокирање на специфични рецепторски места потребни за прицврстување на патогените (81). Дополнително, го зајакнуваат интегритетот на епителната бариера, со што се спречува миграцијата и инвазијата на патогените микроорганизми (80, 84).

Лактобацилите учествуваат во производство на млечна киселина преку метаболизирање на гликогенот што се наоѓа во вагиналниот лумен. Гликогенот со помош на алфа-амилаза се претвора во малтоза, малтотриоза и алфа-декстрини, кои понатаму се претвораат во млечна киселина под дејство на лактат-дехидрогеназата која ја создаваат лактобацилите (86). Продукцијата на млечна киселина од страна на лактобацилите ја намалува рН (3,5–4,5) на вагиналната средина, што ја отежнува колонизацијата на патогени микроорганизми одговорни за бактериска вагиноза, како што се *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* и *Gardnerella vaginalis*, инфекции со ХИВ (87,88), инфекции предизвикани од *Candida* и сексуално преносливи болести (80). Високата концентрација на D-млечна киселина, особено кај микробиомот во кој доминира *L. crispatus*, ја зголемува вискозноста на цервикалната слуз, што ја подобрува нејзината способност да ги заробува вирусните честички и да го спречи нивниот влез во клетките на домаќинот, на тој начин обезбедувајќи клучна улога во одбрана од инфекција со патогени микроорганизми (89).



Слика 9. ВМ кај здрави (А) и патолошки (Б) состојби. А) Во здрава вагина (еубиоза), доминираат бактериите од родот *Lactobacillus*, кои произведуваат млечна киселина. Тие го одржуваат вагиналниот рН под 4.5, создавајќи кисела средина во која можат да преживеат само бактериите толерантни на кисела средина, а патогените бактерии се инхибирани. Млечната киселина има и антиинфламаторно дејство, кое ги заштитува епителните клетки. Б) При состојба на дисбиоза и бактериска вагиноза (БВ), бројот на бактерии кои продуцираат млечна киселина се намалува, со што се овозможува прекумерен раст на патогени бактерии како *Prevotella* spp., *Gardnerella* spp., *Atopobium* spp. и *Mobiluncus* spp. Овие патогени бактерии произведуваат кратковерижни масни киселини (SCFAs) од глукоза, малтоза и одредени аминокиселини во високи концентрации. Во такви услови, интегритетот на епителот се нарушува поради вирулентните фактори на патогените бактерии, а дополнително се создава средина со непријатен мирис (85)

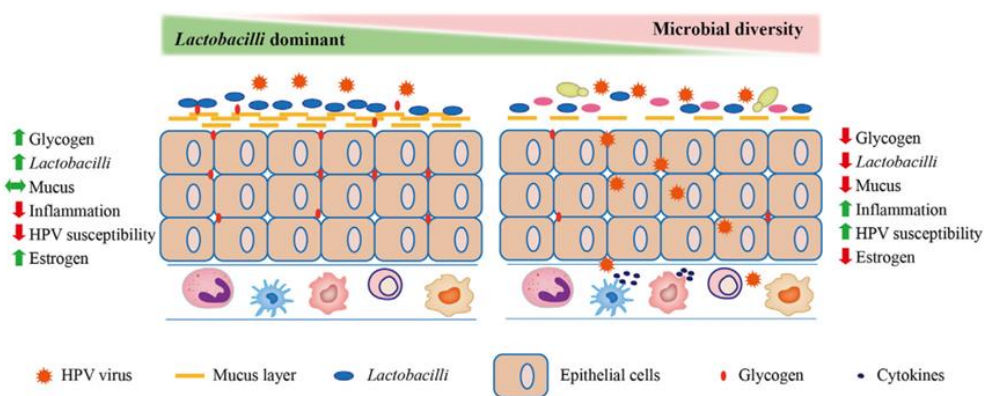
Во повеќе студии е докажано дека некои соеви на вагиналните лактобацили можат да произведат бактериоцини и водороден пероксид (H_2O_2), кои имаат моќни антимикробни својства и го спречуваат преживувањето на патогените микроорганизми (80,84,88,90). Понатаму, ја поттикнуваат елиминацијата на инфицираните клетки преку индукција на автофагија и ја модулираат локалната имунолошка одбрана, со што се засилуваат природните заштитни механизми на организмот (88,91).

1.8.9.2. Дисбиоза, ХПВ инфекција и цервикален карцином

Цервикалниот мукозен имунитет се состои од вроден и стекнат имунитет, при што микробната бариера е клучна компонента на примарниот (вроден) имунитет (92).

Хомеостазата на цервиковагиналниот микробиом се одржува преку интеракција со локалната микросредина. Кога оваа хомеостаза е нарушена, настанува состојба позната како дисбиоза (Слика 10). Бактериска вагиноза (БВ), најчест тип на дисбиоза кај жени во репродуктивна возраст, може да ја промени цервиковагиналната микросредина од доминација на лактобацили кон состојба на дисбиоза, составена главно анаеробни бактерии (81,93). Симптомите на БВ вклучуваат вагинален исцедок, иритација, мирис на риба и зголемена вагинална рН вредност, обично >4.5 . БВ има сериозни последици, вклучувајќи хориоамнионитис, спонтан абортус, предвремено породување, ниска родилна тежина, постпородилен ендометритис и зголемена подложност на сексуално преносливи инфекции (84).

При состојба на дисбиоза (Слика 10) можат да се јават неколку карактеристични збиднувања кои доведуваат до појава на карцином, вклучувајќи нарушување на епителната бариера, абнормална клеточна пролиферација, геномска нестабилност, ангиогенеза, хронично воспаление и метаболичка дисрегулација (82).



Слика 10. Влијанието на микробиомот врз подложноста кон заболувања во цервиковагиналниот тракт кај жените. Вагиналниот микробиом, кога е богат со видови на *Lactobacillus* и има помала микробна разновидност, спречува појава на воспаление и ја намалува подложноста кон микробни инфекции, вклучително и вирусни инфекции. Сепак, кога е отсутен *Lactobacillus* и има зголемена микробна разновидност, се намалува продукцијата на антимикробни пептиди и млечна киселина, што доведува до зголемено воспалително оштетување на епителните клетки на вагината, олеснувајќи го пристапот на вирусите (82)

Бактериите како *Fusobacterium* и *Gardnerella vaginalis*, кои се вообичаени кај БВ, излучуваат сијалидази (94), кои ја деградираат заштитната мукозна бариера и го оштетуваат цервикалното епително ткиво, притоа продуцирајќи биогени амини и предизвикувајќи оксидативен стрес, што ја зголемува опасноста од перзистентна ХПВ инфекција и развој на цервикални лезии (95,96). Оксидативниот стрес предизвикан од дисбиозата, генерира реактивни кислородни видови (ROS), кои предизвикуваат оштетување на протеините, липидите, а може и да предизвика прекин во двоверижната ДНК, овозможувајќи ја интеграцијата на вирусниот геном што е клучен чекор во онкогенезата (97).

Хроничното воспаление, како уште една од карактеристиките на карциномот, дополнително се потенцира во присуство на бактерии поврзани со БВ, како што е *Atopobium*, кои активираат проинфламаторни патишта вклучувајќи *NF-Kb* (98), *TNF- α* , *IL-6*, *IL-8* и *MIP-3 α* . Другите бактерии поврзани со БВ имаат слични воспалителни профили со зголемени *IL-1 α* , β и γ , *IL-8*, *TNF α* и стимулирачки фактор на гранулоцити-макрофаги (GM-CSF), со што дополнително придонесуваат за оштетување на ткивото и зголемување на карциногениот потенцијал на ХПВ (82,99). Клиничко истражување кое вклучувало 60 жени во репродуктивна возраст од САД и Африка ја истражувало врската меѓу БВ, ХПВ и прогресијата на цервикалната интраепителна неоплазија (CIN). Резултатите покажале дека покачениот однос на цитокините *IL-1 β /IP-10* поврзан со БВ негативно корелирал со елиминацијата на BP-ХПВ генотипови (100).

Меѓу различните CST групи, CST III и IV се поврзани со дисбиоза. Под одредени услови, *Lactobacillus iners* претставува вистински симбионт на вагиналната флора, но истовремено има својства на опортунистички патоген (101). Има намалена способност да ја спречи колонизацијата на патогени, може да преживее во широк спектар на рН и други стресни метаболички состојби. *L. iners* произведува интеролизин, кој е холестерол-зависен цитотоксин што формира пори во вагиналниот епител и овозможува патогените да влезат во клетката (82,102).

Друга студија покажала дека CST IV подгрупата е тесно поврзана со перзистентна ХПВ инфекција. Голема количина вагинолизин, друг холестерол-зависен цитотоксичен протеин, се излучува првенствено кај CST IV, особено од *Gardnerella vaginalis*. Овој протеин може да предизвика лиза на клетките, разградување на ткивото и да придонесе за појава на бактериска вагиноза, геномска нестабилност, хронично воспаление и ангиогенеза (103).

Студиите покажуваат дека жените со CST III и IV тип на микробиом имаат повисок сооднос на L-лактат во однос на D-лактат, што предизвикува зголемена експресија на екстраклеточен индуктор на матрикс металопротеиназа (*EMMPRIN*- extracellular matrix metalloproteinase inducer), кој ја активира матрикс металопротеиназата (*MMP-8*- matrix metalloproteinase). MMP-8 ги разградува клеточните врски преку

разложување на колагенот, што го менува интегритетот на цервиксот и го олеснува влезот на ХПВ во базалните кератиноцити (82,89).

1.8.9.3. Приоди за модулација на вагиналниот микробиом

Современите приоди за модулирање на вагиналниот микробиом од состојба на дисбиоза до оптимална заедница во која доминира *Lactobacillus spp.* претставуваат значаен чекор за подобрување на терапевтската ефикасност и регресија на лезиите. Денес, модулацијата на вагиналниот микробиом вклучува употреба на пробиотици, пребиотици, трансплантација на вагинална микробиота (VMT) и деструктори на биофилм (82,104).

Пробиотиците се живи микроорганизми кои, кога се внесуваат во доволна количина, имаат поволно влијание врз здравјето на домаќинот. Тие вклучуваат бактерии од родовите *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* и *Streptococcus*, кои можат да го изменат составот на микробиомот, да го зајакнат имунолошкиот одговор и да се користат како помошна терапија заедно со антибиотици (*метронидазол* и *клиндамицин*) за третман на БВ.

Со оглед на силната поврзаност помеѓу нарушувањата на вагиналниот микробиом и инфекцијата со ХПВ, сè повеќе се смета дека модулирањето на вагиналниот микробиом со пробиотици претставува иновативен терапевтски пристап за инфекцијата со ХПВ (105,106). Неколку студии биле спроведени за да се испита врската помеѓу пробиотиците и клиренсот на ХПВ.

Во една интервенциска студија, кај пациенти со БВ и истовремена ХПВ инфекција, комбинираната примена на *Lactobacillus rhamnosus* BMX 54 со антибиотска терапија довела до двојно зголемување на клиренсот на ХПВ (31.2% наспроти 11.6%) (107). Испитувањата на ефикасноста на пробиотиците во превенција и третман на БВ покажале дека долготрајна терапија (6 месеци) со *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 и *Lactobacillus fermentum* RC-14 дава подобри резултати од краткотрајна терапија (108). Verhoven и соработниците во проспективна контролирана пилот студија докажале дека употребата на антибиотици за два пати ги зголемува шансите за регресија на цитолошките абнормалности (60% наспроти 30%), ХПВ бил елиминиран кај 19% пациентите од контролната група, наспроти 29% од пациентите кои примале пробиотици (109).

Трансплантацијата на вагинален микробиом претставува нова терапевтска процедурата кај жени со дисбиоза, која подразбира пренос на здрав микробиом изолиран од здрав донор во вагината на пациентот (110). Потребни се подетални медицински проценки, тестирања и дополнителни студии за целосно оценување на нивната ефикасност и можни несакани ефекти, како што се пренос на организми резистентни на антибиотици, несакани патогени или несакана бременост. Ова претставува нов пристап кој е сеуште во фаза на испитување (111,112).

1.9. Стратегии за превенција и скрининг на ХПВ

Според Светската здравствена организација (СЗО), ракот на грлото на матката останува една од најпревентабилните форми на малигни заболувања, но и понатаму предизвикува стотици илјади смртни случаи годишно поради неадекватна превенција, скрининг и третман. За справување со овој глобален здравствен проблем, СЗО разви сеопфатна стратегија за елиминација на ракот на грлото на матката како јавно-здравствен проблем. Оваа стратегија се заснова на целите 90-70-90, според кои до 2030 година треба да се постигне:

- 90% од девојчињата да бидат целосно вакцинирани против ХПВ до 15-годишна возраст,
- 70% од жените да бидат скринирани со високоефикасен метод барем двапати во животот (на 35 и 45 години),
- 90% од жените со преткарцинозни или карцинозни лезии да добијат соодветен третман (113).

1.9.1. Примарна превенција: ХПВ вакцинација

Вакцинацијата против ХПВ е најефикасната стратегија за примарна превенција на ракот на грлото на матката. СЗО препорачува сите девојчиња на возраст од 9 до 14 години да примат вакцина против ХПВ пред да станат сексуално активни, бидејќи ова значително го намалува ризикот од ХПВ инфекција и последователни малигни заболувања. Земјите со силни национални програми за имунизација покажуваат значително намалување на заболувањата поврзани со ХПВ, што ја нагласува потребата од универзална програма за вакцинација. Сепак, предизвици како што се достапноста на вакцината, дезинформациите и финансиските ограничувања и понатаму го спречуваат поширокото спроведување на оваа стратегија, особено во сиромашните региони (113).

Првата вакцина за превенција на заболувања поврзани со ХПВ беше лиценцирана во 2006 година. Во моментот, се достапни шест профилактички ХПВ вакцини. Вакцините се произведени со употреба на технологија на рекомбинантна ДНК и клеточна култура, од пречистен L1 структурен протеин, кој самостојно се склопува во празни обвивки специфични за типот на ХПВ, наречени честички слични на вируси (VLPs) (114). ХПВ вакцините не содржат живи биолошки продукти или вирусна ДНК и затоа не се заразни. Вакцини кои се вклучени во Листата на препорачани вакцини на СЗО (115,116):

- Бивалентни ХПВ вакцини (Cervarix, Cecolin, Walrinvax): Се состојат од VLP од ХПВ типовите 16 и 18, кои се составени од L1 протеин произведен и пречистен од клетки на инсекти заразени со рекомбинантен *baculovirus*.
- Четиривалентни ХПВ вакцини (Gardasil): Се состои од ХПВ типови 6, 11, 16 и 18 VLP, самостојно составени од L1 протеин произведен и пречистен од

Saccharomyces cerevisiae (пекарски квасец) кој содржи L1 експресивни плазмиди;

- Деветвалентна ХПВ вакцина (Gardasil9): Покрај 16, 18, 6 и 11, опфаќа пет дополнителни онкогени ХПВ типови (типови 31, 33, 45, 52 и 58); вакцината е произведена според истиот процес како четиривалентната вакцина.

1.9.2. Секундарна превенција: Скрининг за рак на грлото на матката

Меѓу стратегиите за секундарна превенција на карциномот на грлото на матката, СЗО предлага три методи на скрининг: конвенционална или течна цитологија (liquid-based cytology), визуелна инспекција со оцетна киселина (VIA) и молекуларна детекција на високоризични типови на ХПВ (ВР-ХПВ).

Од 2013 година СЗО ги препорачува молекуларните тестови за детекција на ДНК на ХПВ како примарен метод за скрининг на цервикален карцином. Оваа препорака беше дополнително зацврстена во насоките на СЗО од 2021 година, каде што се препорачува ХПВ ДНК тестирање на секои 5 до 10 години кај жени на возраст од 30 до 49 години, во зависност од достапноста на ресурси (113).

1.9.2. Методи за детекција на ХПВ

1.9.2.1. Молекуларни методи за детекција на ХПВ

Достапни се неколку молекуларни тестови за детекција на присуството, количината и типот на ХПВ инфекцијата, во примероци од ткиво или експлирани клетки, со различен степен на сензитивност и специфичност. Овие тестови се групираат во три главни категории: 1. тестови за директна хибридизација, 2. тестови со амплификација на сигналот, 3. тестови со амплификација на таргет секвенца/ ПВР (41,117,118).

Тестови со амплификација на таргет секвенца/ ПВР

ПВР-базираните техники предизвикаа револуција во детекцијата на ХПВ поради нивната висока сензитивност и способност да детектираат повеќе генотипови во една реакција.

а. Конвенционален ПВР

Полимеразната верижна реакција (ПВР) е најшироко користениот метод за амплификација на нуклеински киселини. ПВР-базираната детекција на ХПВ е високо сензитивна и специфична. Овој метод се заснова на термостабилна ДНК полимераза која препознава и продолжува пар на олигонуклеотидни прајмери што го опфаќаат регионот од интерес. На крајот, вирусната ДНК е доволно амплифицирана *in vitro* за да се генерира количина на таргет секвенца, која потоа може директно да се визуелизира на агарозен гел.

Сензитивноста и специфичноста на ПВР-базираните методи може да варираат, во зависност од: изборот на прајмерите, големината на ПВР ампликонот, реакциските услови и активноста на ДНК полимеразата, спектарот на ХПВ типови кои се амплифицираат способноста за детекција на повеќе ХПВ типови истовремено. ПВР може да произведе неколку милиони копии од една двоверижна молекула на ДНК.

б. Тестови кои се базираат на Полимеразна Верижна Реакција во реално време (Real-Time PCR тестови)

Техниките на PCR во реално време (Real-time PCR) се развиени за квантитативно одредување на ХПВ-ДНК во клинички примероци. Real-time PCR има следниве предности: флуоресцентниот сигнал е пропорционален на количината на ПВР производот, што овозможува следење на ПВР реакцијата во реално време; овозможува детекција на вирусното оптоварување; со користење на различни флуорохроми кои емитираат флуоресценција за време на PCR реакцијата, може да се изведуваат мултиплекс реакции, со што истовремено се амплифицираат различни целни нуклеински киселински; со користење на динамичен опсег од 7 логаритми за екстраполација на вирусното оптоварување преку стандардна крива, овозможена е да се детектираат нуклеински киселини и при многу ниски концентрации кои не би се откриле со конвенционален PCR. Конечно, Real-time PCR е крајно репродуцибилна, брза и применлива техника во клинички услови (119).

Иако постојат многу методи за генерирање на флуоресцентен сигнал во ПВР реакцијата, најчесто користени се:

- SYBR® Green, боја што емитира флуоресценција кога е сврзана за ПВР производот (119).
- 5'-нуклеазни проби, кои при расцепување за време на фазата на екстензија во ПВР, ослободуваат флуоресцентен сигнал (120).

Без разлика кој метод се користи, флуоресцентниот сигнал е пропорционален на количината на ПВР производот, што овозможува следење на ПВР реакцијата во реално време. Овие податоци можат да се искористат за генерирање на амплификациски криви и за проценка на почетната концентрација на темплејтот во секоја реакција преку два пристапа:

1. Апсолутна квантификација – користење на стандардни криви.
2. Релативна квантификација – споредување на таргет секвенцата со соодветна контролна секвенца во истиот примерок.

Комерцијално достапни Real-time PCR системи вклучуваат Abbott Real Time HPV Assay (Abbott, Abbott Park, IL), GenoID Real Time HPV Assay (Budapest, Hungary) и cobas® 4800 HPV Test (Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA), Real-time PCR

тест за детекција на 14 високо-ризични ХПВ типови и индивидуална идентификација на ХПВ типови 16 и 18.

в. Генотипизациски тестови за ВР- ХПВ и нивната клиничка примена

Во однос на целосната генотипизација на ХПВ т.е. детекција на секој тип поодделно, на пазарот има неколку молекуларни тестови кои се базираат на ПВР амплификација на L1 регионот и реверзна хибридизација со генотип-специфични проби. Врз основа на оваа техника, развиени се тестови како што се INNO-LiPA Genotyping Extra II (Innogenetics), кој идентификува 32 генотипови, Linear Array (Roche) со можност за откривање на 37 ХПВ генотипови, HPV Direct Flow CHIP (Master Diagnostica) кој идентификува 36 генотипови, како и Anyplex™ II HPV28 кој користи Real-time PCR за идентификација на 28 различни генотипови. Овие тестови овозможуваат не само детекција на високо и нискоризични ХПВ, туку и идентификација на коинфекции, што е од особено значење за клиничката практика.

г. Детекција на онкогените Е6 и Е7 како биомаркери за висок ризик од појава на цервикален карцином

Освен генотипизацијата, значајна нова стратегија за тријажа на ХПВ позитивните пациентки е детекцијата на мРНК на онкогените Е6 и Е7 на ХПВ. Овие онкогени играат клучна улога во прогресијата на преканцерозните лезии и се сметаат за биомаркери со висок предиктивен потенцијал. Популациската студија спроведена од Dabeski и соработници покажа дека Е6/Е7 mRNA има повисока специфичност од 88.89% и повисока позитивна предиктивна вредност од 93.59% за HSIL и инвазивен сквамозен карцином, во споредба со тестирањето за ХПВ ДНК (121).

д. Улога на секвенционирањето од нова генерација (NGS) во детекцијата на ХПВ

Секвенционирањето од следната генерација (NGS) нуди огромни можности за проучување на геномот на ХПВ за примена во епидемиологијата, јавното здравство и клиничката дијагностика.

При користење на секвенциски платформи, како што се Illumina, Nanopore MinION и PacBio, овозможено е секвенционирање на целосниот геном на ХПВ. Со што со висока прецизност може да се утврдат секвенците под филогенетското ниво на генотип, а овозможено е откривање и на ретки или нови варијанти (122). Во последните години, различни студии со употреба на NGS покажале дека одредени сублинии на ХПВ се поврзани со повисок ризик од појава на карцином (123,124), а неговата висока сензитивност овозможува со поголема прецизност да се детектира карциномот на грлото на матката поврзан со ХПВ, споредено со конвенционалните ПВР техники (124).

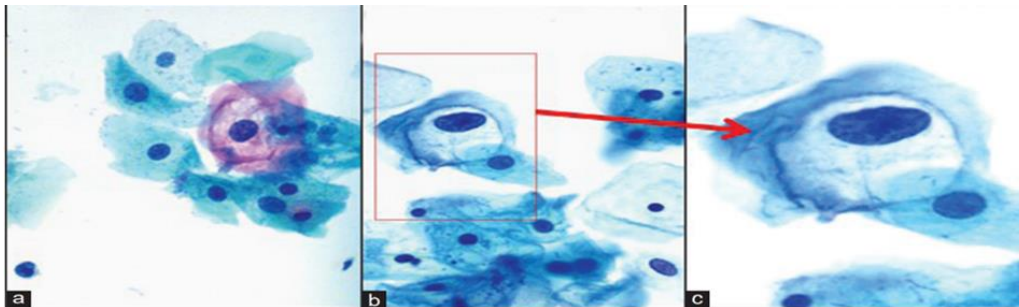
Иако тестовите за детекција на Е6/Е7 mRNA и NGS веќе неколку години се користат во истражувањата на ХПВ со различни апликации, како што е опишано погоре, нивната клиничка употреба сè уште не е широко распространета.

Недостатокот на стандардизација и упатства за контрола на квалитетот, како и високите трошоци и потребата од дополнителна лабораториска инфраструктура го забавија усвојувањето на овие технологии во клиничките лаборатории (122).

1.9.2.2. Конвенционална и еднослојна цитологија

Папаниколау тестот (ПАП тест) претставува еден од најефикасните методи за скрининг, овозможувајќи идентификација на потенцијално преканцерозни и канцерозни лезии на грлото на матката. Овој метод, воведен од патологот Георгиос Папаниколау во 1941 година, претставуваше првиот систематски обид за откривање на раниот стадиум на карцином на цервиксот. Епидемиолошките податоци покажуваат дека добро организираниот скрининг со ПАП тест значително влијаел на намалувањето на морбидитетот и смртноста од рак на грлото на матката (117).

ПАП тестот користи ексфолијативна цитологија, дијагностичка метода со која се анализираат дескваматирани клетки земени од зоната на трансформација, спојот на ектоцервиксот и ендцервиксот, каде што се јавуваат цервикалната дисплазија и карциномот на грлото на матката (117). Според ПАП тестот, детекција на дискариотски клетки во цервикален брис укажува на присуство на сквамозна интраепителна лезија (SIL-a), додека инфекција со ХПВ се карактеризира со појава на коилоцити. Коилоцитите се епителни клетки кои содржат хиперхроматско јадро кое е ацентрично поместено заради присуство на перинуклеарна вакуола (125).



Слика 11. Коилоцити (a,b,c) со перинуклеарна вакуола и хиперхроматско јадро, карактеристика на цитопатскиот ефект на ХПВ

Во контекст на цервикалната цитологија, за изведување на ПАП тестот се користат две техники: конвенционален ПАП тест и течна цитологија (LBC- liquid-based cytology). Конвенционалниот ПАП тест останува најчесто применуван метод благодарение на неговата лесна достапност и ниска цена. Типичниот метод вклучува земање примерок од зоната на трансформација со помош на дрвена шпатула и ендцервикална четка, по што примерокот се нанесува на стаклено предметно стакло и се фиксира со хемиски фиксатив (117).

Течната цитологија (LBC) претставува напредок во однос на конвенционалната цитологија, вклучува земање на цервикалните брисеви и нивно поставување во

течна средина, по што се обработуваат во лабораторија. Се подготвуваат стакленца со еднослојна размаска и се анализираат. Постојат два главни типа на LBC: „ThinPrep“ (126) и „SurePap“ (127), одобрени од FDA во 1996 година како алтернатива на конвенционалниот ПАП тест, со цел да се надминат неговите недостатоци.

Со цел да се поврзе етиологијата и патогенезата на премалигните и малигните промени на грлото на матката со ХПВ, експертите од Одделот за превенција и контрола на ракот на Националниот институт за рак (NCI), во 1988 г. го препорачаа “The 1988 Bethesda System – TBS” како единствена класификација на цитолошките наоди на меѓународно ниво. Предложената Bethesda класификација, ревидирана во 1991, 2001 и последен пат 2014 година, го воведува името сквамозна интраепителна лезија - SIL и нејзината поделба на: сквамозна интраепителна лезија од низок степен (low-grade squamous intraepithelial lesion – LSIL) и сквамозна интраепителна лезија од висок степен (high-grade squamous intraepithelial lesion – HSIL). Кај LSIL, на ПАП тестот, клетките имаат диплоидна или полиплоидна содржина на ДНК, поради што е почеста спонтанa регресија. LSIL вклучува инфекција со ХПВ или лесна дисплазија (Cervical Intraepithelial Neoplasia- CIN 1) на наодот од биопсија направен при колпоскопија. Промените се лесни и спонтано поминуваат и не бараат дополнителен третман. HSIL се карактеризира со анеуплоидија на клетките на ПАП тестот. Анеуплоидија е показател за малиген потенцијал, т.е. анеуплоидните сквамозни интраепителни лезии претставуваат прекурзори на карциномот на грлото на матката. HSIL опфаќа умерена (CIN 2) и тешка дисплазија (CIN 3/CIS), со забелешка дали лезијата има карактеристики што укажуваат на инвазија (125,128,129).

Во зависност од квалитативните и квантитативните ограничувања со примерокот, некои двосмислени морфолошки карактеристики што укажуваат на абнормалности на сквамозните спаѓаат во категорија: Атипични сквамозни клетки (Atypical squamous cells -ASCs), кои се поделени во две категории: Атипични сквамозни клетки со неодредено значење (Atypical squamous cells of undetermined significance- ASC-US) или Атипични сквамозни клетки за кои не може да се исклучи лезија од висок степен (Atypical squamous cells for which a high-grade lesion cannot be excluded- ASC-H), врз основа на тоа дали основната лезија е сомнителна за LSIL или HSIL. И категорија сквамозен карцином (Squamous cell carcinoma-SCC). Оваа категорија се користи кога во примерокот се детектирани малигни клетки (125,128,129).

1.9.2.3. Хистопатологија

Пациентите кои имаат абнормални резултати од ПАП тестот, но немаат докази за постоење на цервикална лезија понатаму се евалуираат со колпоскопија и дополнителна биопсија. За време на колпоскопијата, грлото на матката се испитува со силна филтрирана светлина при десет- до петнаесеткратно зголемување, по

апликација на 3% раствор на оцетна киселина. Со оваа техника може да се открие дисплазија од низок или од висок степен, но не може да се детектираат микроинвазивни лезии. Карактеристичните лезии кои се состојат од острови на дисплазија или карцином имаат ацето-бележење (оцетната киселина го претвора мукозниот епител во бел) (117).

Покрај тоа, колпоскопистот може да изврши конизациска биопсија за да ја потврди дијагнозата преку набљудување на карактеристични патолошки карактеристики на инфекција со ХПВ, како што се коилоцитоза (дегенеративна цитоплазматска вакуолизација) и акантоза (епителна хиперплазија) (130,131).

1.9.3. Трциерна превенција: Третман и палијативна нега

Раното откривање и соодветниот третман на преткарцинозните лезии значително ја намалуваат смртноста од рак на грлото на матката. СЗО ја препорачува стратегијата "скринирај и третирај", што подразбира непосреден третман на позитивните случаи со криотерапија или термална аблација. За инвазивниот карцином на грлото на матката, стандардниот третман вклучува хирургија, радиотерапија и хемотерапија. Важно е и обезбедувањето на палијативна нега и психосоцијална поддршка за пациентките со напреднат стадиум на болеста (113).

1.9.3.1. Принципи и техники на третирање на премалигните лезии

Земајќи го во предвид малигниот потенцијал на HSIL, постои интернационален консензус дека овие лезии треба да се третираат зависно од дијагнозата, освен во бременост. CIN1 лезиите не се третираат, со исклучок на случаи каде лезијата перзистира повеќе од две години. Лезиите CIN2 и CIN3 се третираат со аблативна техника, каде епителот во длабочина од 6-7мм се отстранува со студ (криотерапија) или со топлина (термо-коагулација или термална аблација). Алтернативна метода која се користи е ексцизија на зоната на трансформација со електрода со електрохирушка единица (LLETZ- large loop excision of transformation zone) или со скалпел (CNC- cold knife conization). Аблативните техники се поедноставни и посигурни отколку ексцизиите. Најголем недостаток е што со нив може да се третираат само мали целосно видливи лезии и не може да се земе примерок за хистолошка дијагноза. Се препорачува да се направи тенкоиглена биопсија пред аблативниот третман. Доколку хистологијата покаже присуство на цервикален карцином, пациентот треба да се прати за понатамошен третман. Хистеректомија не е индицирана како метода кај CIN (49,132,133).

1.9.3.2. Принципи и техники на третирање на цервикален карцином

Оптималниот третман на ракот на грлото на матката се заснова на стадиумот на болеста. Третманот на ран стадиум на карцином на грлото на матката (IA-IB2) вклучува хируршка интервенција, конизација со ладен нож, хистеректомија со отстранување на карличните лимфни јазли (134,135), при што 5 годишното

преживување изнесува 97,6% за стадиум IA2 и 95,3% за стадиум IB1. За помладите пациентки кои планираат бременост во иднина достапни се процедури за зачувување на фертилитетот, како што е вагинална трахелектомија со стапка на преживување (97,2%) споредлива со радикалната хистеректомија (136).

Локално напреднатиот рак на грлото на матката (стадиум IB3-IVA) претставува 37% од сите случаи на рак на грлото на матката на глобално ниво, но достигнува до 90% во региони со ограничени ресурси и низок социоекономски статус, со 5 годишна стапка на преживување од 74%. Според актуелните Европски протоколи засновани на докази за управување со пациенти со рак на грлото на матката ESGO/ESTRO/ESP одлични резултати се постигнуваат со терапија со цисплатин комбинирана со брахитерапија. Докажано е дека овој интегриран пристап каде на хемотерапијата се додава радиотерапија ја зголемува тераписката ефикасност и стапката на преживување (137–139).

2. Мотив за изработка на докторската дисертација

Мотивацијата за изработка на оваа докторска дисертација произлегува од потребата за подобро разбирање на биолошката и клиничката поврзаност помеѓу ХПВ инфекцијата, вирусното оптоварување, цитолошките промени и вагиналниот микробиом, како фактори кои играат значајна улога во иницирање и прогресија на цервикалните лезии и развојот на карциномот на грлото на матката.

Преканцерозните промени може да напредуваат во инвазивна форма во рок од 5-20 години, обезбедувајќи клучен момент за интервенција. Скринингот е основа за секундарната превенција, овозможувајќи рано откривање на преканцерозните промени на епителот на цервикалниот канал. Светската здравствена организација за примарен скрининг на карцином на грлото на матката препорачува детекција на ХПВ ДНК, заедно со традиционалниот ПАП тест. За да се намали бројот на жени со нормална цитологија, кои се изложени на непотребно клиничко следење на минлива ХПВ инфекција со високоризичен тип, потребна е соодветна тријажа. Воведување на повеќе стандардизирани и репродукцибилни молекуларни методи за тријажа на ХПВ позитивните жени, како што се целосна генотипизација на високоризични ХПВ типови и генотип специфично вирусно оптоварување, може да ја подобри стратификацијата на ризикот во програмите за скрининг на цервикален карцином.

Дополнително, со сè поголемото разбирање на улогата на вагиналниот микробиом во одржување на локалниот имунитет и спречување на перзистентна инфекција со ХПВ, ова истражување има за цел да утврди дали одредени профили на микробиомот можат да се искористат како биомаркери за ризик или за следење на терапевтски одговор. Вакви сознанија имаат значителен потенцијал за клиничка примена, како во подобрување на стратегиите за скрининг, така и во индивидуализирање на третманите и интервенциите кај ХПВ позитивни жени.

3. Цели

1. Да се испита корелацијата помеѓу инфекциите предизвикани со еден или повеќе типови на ХПВ со возраста на пациентките
2. Да се испита преваленцата на инфекции предизвикани со еден или повеќе типови на ХПВ, во однос на цитолошкиот наод на пациентките
3. Да се проучи корелацијата на концентрацијата на ДНК на ХПВ со цитолошкиот наод на пациентките
4. Да се направи разлика помеѓу квалитативниот и квантитативниот состав на вагиналниот микробиом на жени со ХПВ инфекција споредено со микробиомот кај жени без ХПВ инфекција и да се оцени влијанието на вагиналниот микробиом во спречување на ХПВ инфекција

4. Материјал и методи

Студијата беше ретроспективно-проспективна, пресечна студија во една точка. Тоа подразбира мерење на предвидените параметри (т.е. тестирање на цервикална ХПВ инфекција преку директна детекција на ДНК, исходот од ПАП тестот, тестирање на вагиналниот микробиом) кај индивидуалните учесници во една точка од времето.

4.1. Испитувана популација

Во студијата беа вклучени 350 жени, на возраст од 18 – 64 години, од Битола, Ресен и Кичево, кои во периодот од февруари 2019 до август 2023, доброволно го посетија својот матичен гинеколог, во рамките на програмата за примарен скрининг на грлото на матката.

Пациентките при посета на гинеколог имаа целосен физички преглед, ПАП тест, и им беа земени по два примероци за молекуларни иследувања: еден од грлото на матката за ХПВ ДНК тестирање и еден од вагината за ПВР тест за одредување на квалитативниот и квантитативниот состав на вагиналниот микробиом.

Студијата се изведуваше во ЈЗУ Центар за јавно здравје Битола, во Одделот за микробиологија, Отсек серологија со молекуларна микробиологија, каде се изработија молекуларните тестови за детекција на ХПВ и вагиналниот микробиом.

ПАП тестовите на пациентките беа анализирани од страна на патолог, а податоците беа добиени во соработка со матичните гинеколози.

За првите три цели беа вклучени 300 жени. Овие 300 жени, беа поделени во две групи. Во првата група беа пациентки кај кои цитолошката размаска за време на студијата беше негативна и немаа историја за абнормален ПАП тест, но имаа позитивен тест за детекција на ХПВ. Во втората група беа вклучени пациентки кои имаа абнормален ПАП тест и позитивен тест за детекција на испитуваните типови на ХПВ.

За четвртата цел, во оваа студија беа вклучени 50 пациентки, кај кои, покрај тоа што беа тестирани за присуство на 21 тип на ХПВ, дополнително беше анализиран квалитативниот и квантитативниот состав на вагиналниот микробиом. Овие пациентки беа поделени во две групи. Во едната група влегоа пациентки, кај кои при ХПВ тестирањето не беше детектирана инфекција со ХПВ, а другата група ја сочинуваа пациентки со докажана ХПВ инфекција.

4.1.1. Инклузиони критериуми

Во студијата беа вклучени жени кои ги исполнуваа следните критериуми:

1. Возраст од 18- 65 години
2. Не беа бремени
3. Кај кои не беше извршена оперативна интервенција (хистеректомија)
4. Немаа историја за третман на цервикс со електрокоагулација, криотерапија или конизација во последните 6 месеци
5. Потпишана согласност

4.1.2. Ексклузиони критериуми

Од студијата беа исклучени жените кои:

1. Немаа комплетни резултати од ХПВ или ПАП тестот
2. Немаа доволно примерок, т.е. доволен број на клетки во донесениот материјал за да се изведе тестот
3. Имаа историја за гинеколошки карцином - цервикален, оваријален, ендометријален
4. Имаа хронична болест- црнодробна цироза, ренална инсуфициенција, кардиоваскуларна болест
5. Примале антибиотици последните 2 недели (важи за пациентките кај кои се испитува вагинален микробиом)

4.2. Примероци

Гинекологот при цервикален преглед од секоја пациентка земаше по два ексфолијативни цервикални примероци. Првиот се земаше со четка од грлото на матката, и се користеше за подготовка на конвенционален ПАП тест. Вториот примерок на грлото на матката, кој беше земен со Дакрон стерилан памучен брис, веднаш по првиот се складираше во транспортен медиум кој содржеше стерилан солен раствор со фосфатен пуфер (PBS), и се користеше за ХПВ ДНК тестирање. Кај пациентките кои беа вклучени во студијата од 2022, за детекција на вагиналниот микробиом со ПВР во реално време (Real- time PCR) заедно со брисевите од цервикс, беше земен истовремено и брис од задниот сид на вагината, со помош на стерилан Дакронски брис, кој се поставуваше во 1,5 ml Eppendorf-ови епрувети со стерилан физиолошки раствор и се чуваше на -20°C до изведување на анализата.

4.3. Цитолошка класификација

Евалуацијата на цитолошките наоди се изведуваше според резултатите добиени од конвенционалниот ПАП тест. Наодите се толкуваа според критериумите поставени

од страна на Bethesda системот. Врз основа на цитолошките дијагнози, пациентките беа поделени во две општи групи. Оние со:

1. цервикални лезии со висок ризик од прогресија во карцином (hrCLs), кои вклучуваа: атипични сквамозни клетки, наоди каде не можат да се исклучат сквамозни интраепителни лезии од висок степен (ASC-H), сквамозни интраепителни лезии од висок степен (HSIL), сквамозен карцином (SCC).
2. цервикални лезии со низок ризик од прогресија во карцином (non-hrCL) кои вклучуваа: атипични сквамозни клетки со неодредено значење (ASC-US), сквамозни интраепителни лезии со низок степен (LSIL).
3. негативен наод за интраепителна лезија или малигнитет (negative for intra-epithelial lesion or malignancy -NILM).

ПАП тестовите беа анализирани од страна на патолог, а податоците беа добиени во соработка со матичните гинеколози.

4.4. Микробиолошки молекуларни анализи

4.4.1. Детекција на присуство на ДНК на 21 тип на ХПВ

4.4.1.1 Екстракција на вирусна ДНК

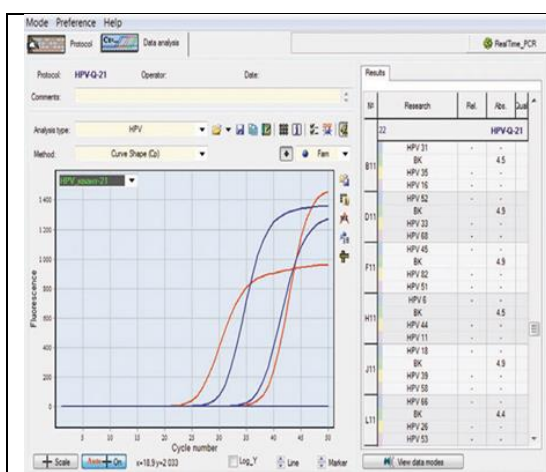
Примероците на ДНК беа собирани со стружење на епителот на цервикалниот канал, по што се поставуваа во пластична епруветка со волумен од 1,5 ml со транспортен медиум со помош на стерилен брис за еднократна употреба. Складирањето и транспортот на материјалот се извршуваа според важечките прописи. Екстракцијата на ДНК се изведуваше со помош на комплетот реагенси за изолирање на нуклеински киселини, PureLink Genomic DNA, INVITROGEN развиен од „Life-Technology“. Китот се базираше на селективно врзување на ДНК за мембрана базирана на силика во присуство на хаотропни соли. Клетките се дигерираа со протеиназа К на 55°C при што беше користена оптимизирана формулација на пуфер која помагаше во денатурација на протеините и ја подобруваше активноста на протеиназата К. Секоја преостаната РНК се отстрануваше со дигестија со RNase A пред врзувањето на примероците со силика мембраната. Лизатот се мешаше со етанол и сврзувачки пуфер кој овозможуваше врзување на ДНК на спин колоните. По врзување на ДНК за силика мембраната во спин колоната, нечистотиите се отстрануваа со темелно миење со два пуфери за перење. На крај геномската ДНК се елуираше во пуфер за елуција кој содржеше мала количина на сол.

4.4.1.2. Тестирање на присуство на ДНК на 21 тип на ХПВ со помош на ПВР во реално време

За генотипизација на хуман папилома вирусот (ХПВ), односно за детекција на ДНК на 21 генотип на ХПВ, во ова истражување беше користен комплетот реагенси HPV

QUANT-21 Quantitative REAL-TIME PCR Kit, DNA-Technology, Russia. Овој *in vitro* тест за ДНК овозможува специфична идентификација и квантификација на нискоризични типови на ХПВ (6, 11, 44) и високоризични типови (16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82), во зависност од нивниот онкоген потенцијал. Имплементираната техника на мултиплекс ПВР во реално време (Real-Time PCR) овозможуваше истовремено детектирање на повеќе генотипови на ХПВ во една реакција, без неспецифична вкрстена реактивност, со задржување на висока чувствителност и специфичност. Методот се базираше на амплификација на таргет ДНК секвенци, при што ДНК молекулите се денатурира со топлина низ циклуси на амплификација. Специфични прајмери се врзуваа за денатурираните темплејти, а во присуство на азотни бази и Таq полимераза, се овозможуваше синтеза на комплементарни ДНК вериги и амплификација на целната секвенца.

ПВР технологијата во реално време се заснова на мерење на флуоресценцијата во секој циклус од реакцијата. ПВР миксот содржи таргет специфични хомогенизирани проби со репортер и квенчер молекули. Додека пробата е интактна, овие молекули се наоѓаат доволно блиску за да се овозможи пригушување на сигналот. Еднаш кога ќе се хибридизира таргет секвенцата, пробата се хидролизира со помош на Таq полимераза. Притоа репортерот и квенчерот се одделуваат и флуоресценцијата се зголемува пропорционално со амплификацијата на таргет секвенцата. Интензитетот на флуоресценцијата се анализира со Real time PCR инструмент и со помош на соодветен софтвер. При изведување на реакцијата за детекција на поодделните специфични секвенци на ДНК на ХПВ беа користени флуоресцентните бои: FAM, ROX и Cy 5. HEX боја се користеше за детекција на внатрешната контрола (IC- internal control), FAM бојата за детекција на SIC (sample intake control). Употребата на неколку препознатливи (различни бои) овозможуваше детекција на неколку ПВР продукти истовремено, во една микротубичка.



Слика 12. Амплификациски криви добиени при анализа со Real-Time PCR на DT Prime (DNA-Technology, Russia), при генотипизација на 21 тип на ХПВ.

Дата: 4 декември 2020, 7:56:02
 Број на туби: ---
 Име и презиме: ---
 Пол: ---
 Година: ---
 Упатен од: ---
 Амбуланта: ---
 Коментар: ---

ЈЗУ Центар за јавно здравје
 - Битола
 Лабораторија за молекуларна дијагностика

Број на пациент: Simona_Naumovska

№	Тема на истражување	Резултат		
		Реалитивна, Log(X/SIC)	Квантитативна, Log(копие/микролитр)	Квалитативна
1	HPV 31	Не детектиран	Не детектиран	Не детектиран
2	HPV 35	Не детектиран	Не детектиран	Не детектиран
3	HPV 16	Не детектиран	4.4	Детектиран
4	HPV 52	Не детектиран	Не детектиран	Не детектиран
5	HPV 33	Не детектиран	Не детектиран	Не детектиран
6	HPV 68	Не детектиран	Не детектиран	Не детектиран
7	HPV 45	Не детектиран	Не детектиран	Не детектиран
8	HPV 82	Не детектиран	Не детектиран	Не детектиран
9	HPV 51	Не детектиран	6.0	Детектиран
10	HPV 6	Не детектиран	Не детектиран	Не детектиран
11	HPV 44	Не детектиран	Не детектиран	Не детектиран
12	HPV 11	Не детектиран	Не детектиран	Не детектиран
13	HPV 18	Не детектиран	Не детектиран	Не детектиран
14	HPV 39	Не детектиран	Не детектиран	Не детектиран
15	HPV 58	Не детектиран	Не детектиран	Не детектиран
16	HPV 66	Не детектиран	Не детектиран	Не детектиран
17	HPV 26	Не детектиран	Не детектиран	Не детектиран
18	HPV 53	Не детектиран	Не детектиран	Не детектиран
19	HPV 59	Не детектиран	Не детектиран	Не детектиран
20	HPV 56	Не детектиран	Не детектиран	Не детектиран
21	HPV 73	Не детектиран	Не детектиран	Не детектиран
22	SIC	Не детектиран	5.4	Детектиран
23	Тотален број на ХПВ	6.0	6.4	

* HPV DNA copies/10⁴ cells

Слика 13. Извештај за резултати добиени со HPV Q-21 Real-Time PCR тест, прикажан преку софтверот на термалсајклерот DT Prime.

4.4.2. Мерење на концентрација на ДНК на ХПВ

Квантификацијата на ДНК на ХПВ беше овозможена со софтвер кој беше компатибилен со тестовите за детекција на ХПВ на инструментот за DTprime Real-Time PCR, DNA-Technology, Russia. Со него беа овозможени два типа на анализи: апсолутна (ДНК копии / примерок) и релативна (ДНК копии / 10^5 епителни клетки).

Апсолутната амплификација се пресметуваше, земајќи во предвид три параметри.

Ni- карактеристичен циклус за концентрација на единечна копија која се одредува емпириски за секој примерок од парот.

Cr- карактеристичен циклус за тестираниот примерок.

Ei- број на циклуси потребни за 10-кратна амплификација на таргет секвенцата (исто така, се одредува емпириски).

Апсолутна концентрација = $(N_i - C_r)/E_i$.

Релативна концентрација се одредуваше земајќи ги во предвид Ni, Cr, Ei и SIC вредноста која претставува број на хумани геноми во примерокот и затоа корелира со бројот на клетки кои се земени за анализа. Релативната концентрација се прикажува како разлика од $(N_i - C_r \text{ тест})/E_i$ и $(N_i - C_r \text{ SIC})/E_i$.

Во студијата се користеше релативната анализа, која овозможуваше да бидат земени во предвид варијациите при земањето на примерокот.

Резултатите беа интерпретирани во логаритамски копии на ХПВ на 100.000 човечки клетки, каде што:

- вирусното оптоварување со помалку од 10^3 во релативна квантификација има ниско клиничко значење и се претпоставува дека човечкиот имунолошки систем може да ја отстрани инфекцијата;
- вирусното оптоварување од 10^3 до 10^5 во релативна квантификација се сметаше за клинички значајно и се толкуваше како ризик од дисплазија;
- вирусното оптоварување поголемо од 10^5 во релативна квантификација се сметаше за клинички значајно и се толкуваше како ризик од карцином на грлото на матката.

1.4.3. Квалитативна и квантитативна детекција на компонентите на вагиналниот микробиом

4.4.3.1. Екстракција на бактериска ДНК со цел да се одреди вагиналниот микробиом

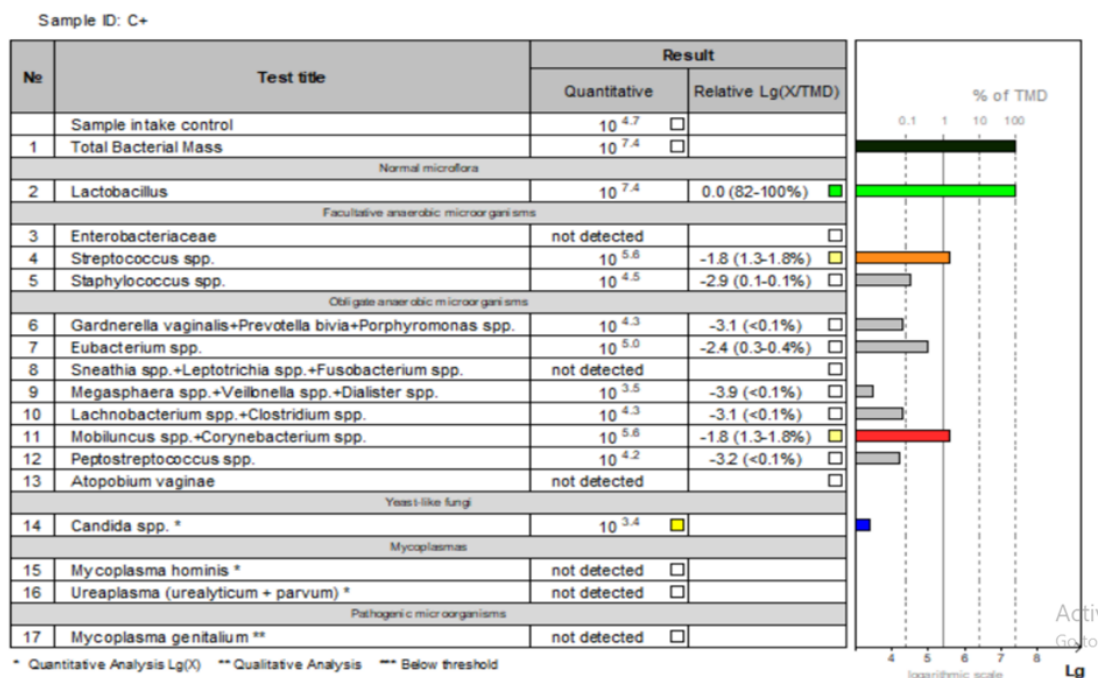
Екстракција на бактериска ДНК од примерокот се изведуваше со помош на автоматизиран систем за екстракција Mag Core, при што беше користен специфичен комплет реагенси за екстракција на бактериска ДНК, MagCore Genomic DNA Tissue Kit, според препораките на производителот. На крај се

добиваше елуат од 100 микролитри во епендорфова епрувета од 1,5 милилитри, кој се користеше за понатамошна анализа.

4.4.3.2. Квалитативна и квантитативна детекција на компонентите на вагиналниот микробиом со помош на ПВР во реално време

За детекција на вагиналниот микробиом се користеше метод на квантитативен ПВР во реално време со помош на комплет реагенси Femoflor®16, DNA-Technology, Russia. Амплификација се изведуваше на апаратот DT Prime, DNA-Technology, Russia и процесот беше идентичен како и претходно опишаниот, кај амплификација на ХПВ.

Со овој метод беше овозможено со користење на еден биолошки примерок, да се направи проценка на вкупната бактериска маса, урогенитална нормална флора - лактобацили, комплекс од аеробни и анаеробни микроорганизми, типични за женскиот урогенитален тракт, микоплазми, габи на родот *Candida*, вклучени во развојот на дисбиотски процеси во урогениталниот микробиом. Односно беше овозможена детекција на количината (изразена во геномски еквиваленти на 1 ml (GE/ml)) на лактобацили и 15 групи опортунистички микроорганизми (ОМ). По завршувањето на процесот на амплификација, беше користен специјалниот софтвер за автоматско пресметување на вкупниот број на бактерии (вкупната бактериска маса- ВБМ) и процентот на ОМ и лактобацилите во корелација со ВБМ. За да се исклучат лажно негативните примероци, беше земена во предвид количината на човечка ДНК (SIC-sample intake control).



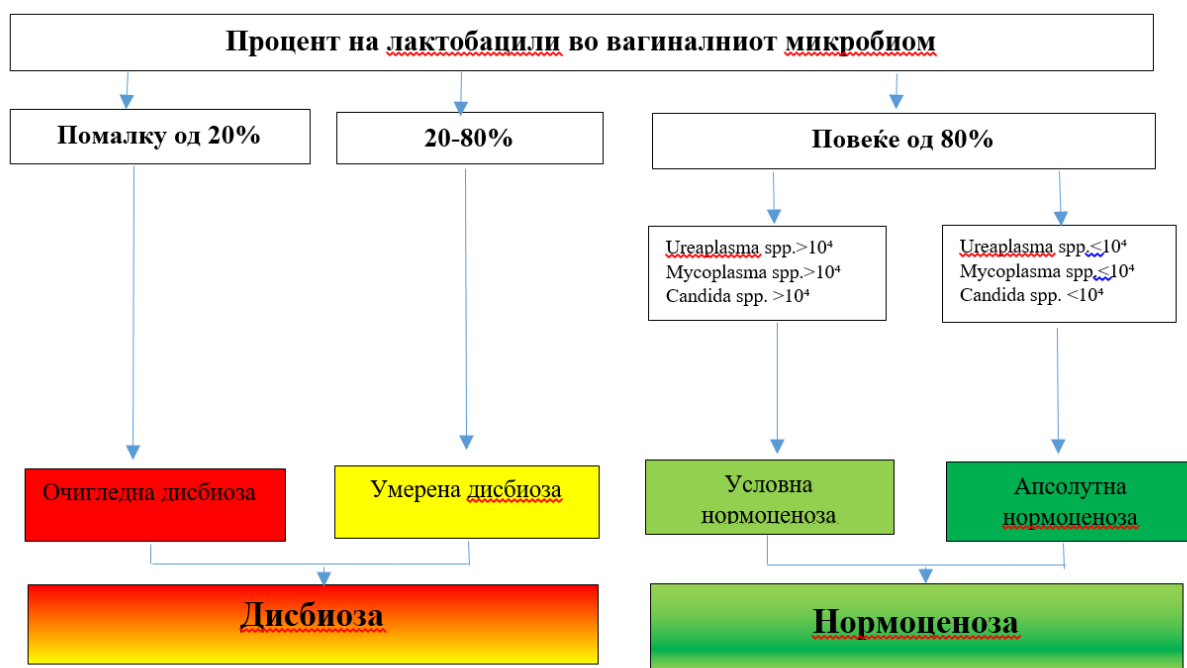
Слика 14. Пример за графички приказ на резултати добиени со софтверот на DT Prime (DNA-Technology, Russia) при анализа на вагинален микробиом со комплет реагенси Femoflor®16.

Варијанти на вагиналниот микробиом анализирани со користење на ПВР во реално време со комплет реагенси Femoflor®16

Во зависност од процентот на лактобацили и опортунистички микроорганизми (ОМ) во ВБМ, беа идентификувани се три основни варијанти на вагиналниот микробиом:

1. „Нормоценоза“ Во оваа варијанта на вагиналниот микробиом преовладуваа лактобацилите. Процентот на лактобацили беше повеќе од 80% од ВМ, а процентот на опортунистички микроорганизми (конкретно анаероби) беше помалку од 20 % од ВМ.
2. „Умерена дисбиоза“ - состојба на вагиналната микробиомна заедница кога процентот на лактобацилите беше намален и сочинуваше помалку од 80%, но повеќе од 20% од ВБМ. Така, процентот на опортунистички микроорганизми беше повеќе од 20%, но помалку од 80% од ВМ.
3. „Дисбиоза“ – во оваа варијанта на вагиналниот микробиом преовладуваа различни опортунистички бактерии: процентот на лактобацили беше помал од 20% од ВМ, а разновидните опортунистички микроорганизми (облигатно анаеробни бактерии) сочинуваа повеќе од 80% од ВМ.

Алгоритам за издавање на лабораториски извештај од rt-pcr тест за вагинален микробиом



4.5. Статистичка обработка на податоците

За анализа на повеќе независни групи, како што беа пациентките со нормален ПАП тест, со цервикални лезии со низок ризик и со висок ризик од појава на карцином, беше користена ANOVA анализа на варијанса (F-тест). Понатамошната детална анализа на паровите групи беше направена со post-hoc Tukey honest test, кој овозможи детекција на специфични статистички значајни разлики меѓу групите, особено во однос на концентрацијата на ХПВ ДНК кај различни степени на цитолошки наод.

Номиналните и категоричните податоци (како присуство/отсуство на инфекција, типови на микробиом, позитивен/негативен ПАП тест) беа анализирани со χ^2 (хи-квадрат) тест, а беше применет и Fisher's exact test, особено при анализа на мали примероци. Во сите анализи, статистичката значајност беше прифатена при p -вредност < 0.05 . Податоците беа обработени со употреба на соодветен статистички софтвер и претставени во табеларна и графичка форма за полесна визуелизација на резултатите.

5. Резултати

Во студијата беа вклучени 350 жени, на возраст од 18 – 64 години, од Битола, Ресен и Кичево, кои во периодот од февруари 2019 до август 2023, доброволно го посетија својот матичен гинеколог, во рамките на програмата за примарен скрининг на грлото на матката.

Од нив, 300 пациентки со комплетни резултати од ПАП тест и ХПВ тестирање беа опфатени во главната анализа во првиот дел од истражувањето. Овие пациентки беа на возраст од 18 до 64 година, со просечна возраст од 34.4 ± 9.8 години, при што најголем дел (37%) припаѓаа на возрасната група од 25 до 34 години.

Според типот на детектирана ХПВ инфекција, кај 174 пациентки (58%) беше детектирана инфекција со еден тип на ХПВ (ЕТ-ХПВ), додека кај 126 пациентки (42%) беше присутна ко-инфекција со повеќе ХПВ типови (ПТ-ХПВ).

Дополнително, во рамките на вториот дел од студијата беа анализирани уште 50 пациентки, кај кои, покрај ХПВ генотипизација, беше извршена и квалитативна и квантитативна анализа на вагиналниот микробиом.

Врз основа на цитолошкиот наод и присуството на ХПВ, кај 96 пациентки (32%) беше утврдена нормална цитологија со истовремено позитивен ХПВ тест. Лезии со низок ризик од прогресија беа регистрирани кај 120 пациентки (40%), додека 84 пациентки (28%) имаа лезии класифицирани како високоризични за појава на цервикален карцином.

Табела 1. Карактеристики на пациентите

варијабла	вредност
Возраст/години (mean $\pm$ SD)(min- max)median (IQR)	(34.4 $\pm$ 9.8)(18 – 61) 33(26 – 41)
Возрасни групи	
≤ 24	56 (18.67)
25 – 34	111 (37)
35 – 44	87 (29)
45 – 54	35 (11.67)
55 – 64	11 (3.67)
ЕТ – ХПВ	174 (58)
ПТ-ХПВ	126 (42)
Наоди од ПАП тест	
нормален наод	96 (32)
нискоризични	120 (40)
високоризични	84 (28)

Согласно добиените резултати, вкупно беа изолирани 543 ХПВ генотипови, од кои највисока преваленца имаше типот 16 (13.07%), следено со тип 31 (9.76%). Пониска преваленца беше регистрирана кај инфекции со типовите 53, 66, 44, 52, 59, 68 (7.73%, 7.73%, 5.89%, 5.71%, 5.16%, 4.97%, соодветно). Слична преваленца имаа инфекциите со типовите 39, 56 и 73 (4.24%, 4.05% и 4.05%, соодветно). Инфекцијата со типовите 35 и 82 имаше најниска преваленца (1.84% и 2.03%, соодветно) (Табела 2).

Во групата ХПВ инфекции предизвикани со еден тип, најчесто беше изолиран тип 16 (22.99%), во групата инфекции со повеќе ХПВ типови најчесто беа изолирани типовите 53, 31 и 16 (8.94%, 8.67% и 8.40%, соодветно).

Табела 2. Застапеност на генотиповите на ХПВ кај инфекции предизвикани со ЕТ-ХПВ и ПТ-ХПВ

варијабла	n (%)	Инфекција со ЕТ-ХПВ n (%)	Инфекција со ПТ-ХПВ n (%)
HPV 6	21 (3.88)	1 (0.57)	20 (5.42)
HPV 16	71 (13.07)	40 (22.99)	31 (8.40)
HPV 18	20 (3.68)	4 (2.30)	16 (4.34)
HPV 31	53 (9.76)	21 (12.07)	32 (8.67)
HPV 33	15 (2.76)	2 (1.15)	13 (3.52)
HPV 35	10 (1.84)	4 (2.30)	6 (1.63)
HPV 39	23 (4.24)	6 (3.45)	17 (4.61)
HPV 44	32 (5.89)	10 (5.75)	22 (5.96)
HPV 45	19 (3.50)	2 (1.15)	17 (4.61)
HPV 51	36 (6.63)	12 (6.89)	24 (6.50)
HPV 52	31 (5.71)	8 (4.60)	23 (6.23)
HPV 53	42 (7.73)	9 (5.17)	33 (8.94)
HPV 56	22 (4.05)	8 (4.60)	14 (3.79)
HPV 58	18 (3.31)	4 (2.30)	14 (3.79)
HPV 59	28 (5.16)	9 (5.17)	19 (5.15)
HPV 66	42 (7.73)	17 (9.77)	25 (6.77)
HPV 68	27 (4.97)	9 (5.17)	18 (4.88)
HPV 73	22 (4.05)	7 (4.02)	15 (4.06)
HPV 82	11 (2.03)	1 (0.57)	10 (2.71)
вкупно	543	174	369

Цел 1. Да се испита корелацијата помеѓу инфекциите предизвикани со еден или повеќе типови на ХПВ со возраста на пациентките

Групата од 300 пациентки вклучени во студијата, кај кои беа извршени ХПВ тестирање и ПАП тест, беше стратифицирана во пет возрасни категории. Во возрасната група под 24 години беа вклучени 56 пациентки, додека најголем број, односно 111 жени, припаѓаа на групата од 25 до 34 години. Групата од 35 до 44 години опфати 87 пациентки, а во возрасните категории од 45 до 54 години и од 55 до 64 години беа вклучени 23 пациенти и 11 пациентки, соодветно.

Пациентките со нормален цитолошки наод беа на просечна возраст од 31.1 ± 10.1 години, при што, пациентките со цервикална лезија со низок ризик од појава на карцином беа на просечна возраст од 35.1 ± 9.2 години, просечната возраст на пациентките со цервикална лезија со висок ризик од појава на карцином беше 37.1 ± 9.5 години.

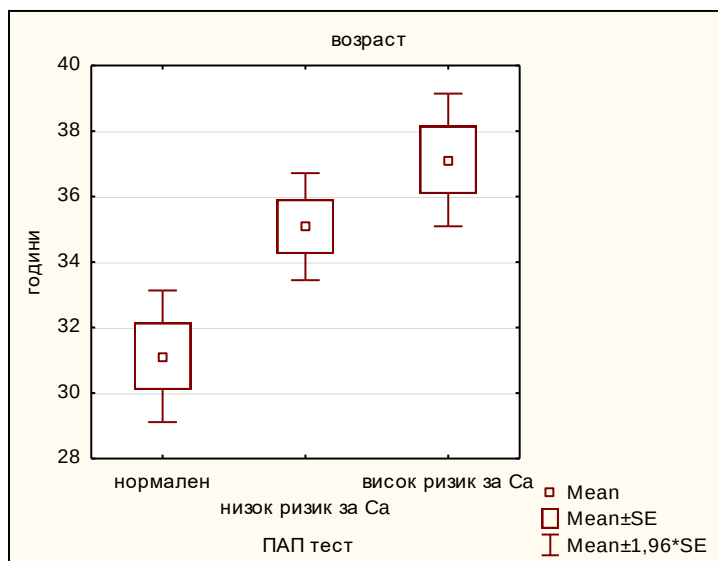
Согласно резултатите од статистичката анализа, резултатот од ПАП тестот сигнификантно зависеше од возраста на пациентките ($p=0.000112$). Post-hoc анализата за меѓугрупни споредби покажа дека оваа вкупна сигнификантна разлика се должи на сигнификантно помлади пациентки со нормален ПАП тест во споредба со пациентки со наод на цервикални лезии со низок и висок ризик од појава на карцином ($p=0.0069$ и $p=0.000095$, соодветно). Возраста на пациентките со ПАП наод на цервикална лезија со низок и висок ризик за карцином не беше статистички сигнификантно различна ($p=0.29$).

Табела 3. Споредба на просечна возраст кај жени со наодот на ПАП тестот според ризикот од појава на цервикален карцином

варијабла	статистички параметри - возраст			p-level
	n	mean $\pm$ SD	min - max	
1. Нормален Пап тест	96	31.12 ± 10.1	18 – 61	F=9.38 *** $p=0.000112$ 1 vs 2 ** $p=0.0069$ 1 vs 3 *** $p=0.000095$
2. Цервикални лезии со низок ризик од појава на	120	35.08 ± 9.1	20 – 61	
3. Цервикални лезии со висок ризик од појава на карцином	84	37.12 ± 9.5	21 – 61	

F(Analysis of variance); post-hoc Tukey honest test

sig $p<0.01$, *sig $p<0.0001$



Слика 15. Просечна возраст на жени со наодот од ПАП тестот според ризикот за цервикален карцином

Пациентите со негативен и позитивен ПАП тест припаѓаа на сигнификантно различни возрастни групи ($p=0.000001$) (Табела 4).

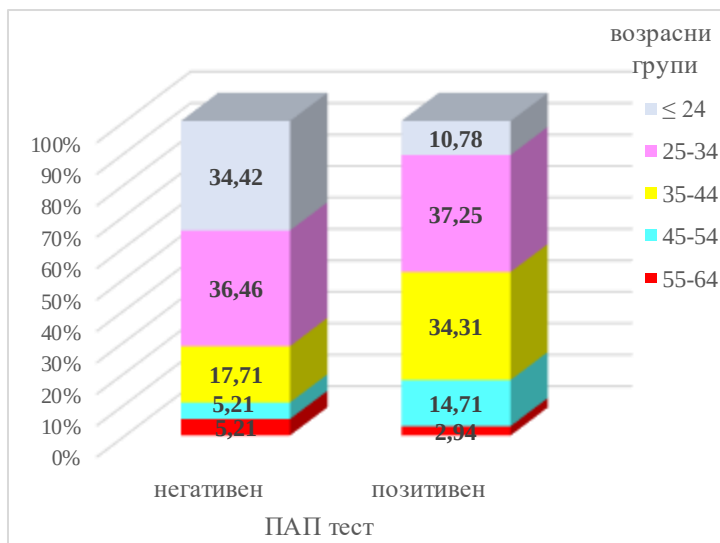
Табела 4. Споредбата на поединечните возрастни групи меѓу пациентите со негативен и позитивен ПАП тест

Возрасни групи години	N	ПАП тест		p-level	difference test
		негативен n(%)	позитивен n(%)		
≤ 24	56	34(34.42)	22(10.78)	$X^2=33.4$ $***p=0.000001$	$***p=0.0000$
25-34	111	35(36.46)	76(37.25)		$p=0.89$
35-44	87	17(17.71)	70(34.31)		$**p=0.0031$
45-54	35	5(5.21)	30(14.71)		$*p=0.0168$
55-64	11	5(5.21)	6(2.94)		$p=0.33$
вкупно	300	96	204		

X^2 (Chi-square test)

*sig $p<0.05$, **sig $p<0.01$, ***sig $p<0.0001$

Споредбата на поединечните возрастни групи меѓу пациентите со негативен и позитивен ПАП тест покажа сигнификантно почест нормален цитолошки наод во најмладата возрастна група (34.42% vs 10.78%, $p=0.0000$); слична застапеност на негативни и позитивни резултати во возрастните групи 25-34 и 55-64 години (36.46% vs 37.25%, $p=0.89$ и 5.21% vs 2.94%, $p=0.33$, соодветно); сигнификантно почесто позитивен тест во возрастните групи 35-44 и 45-54 години (34.31% vs 17.71%, $p=0.0031$ и 14.71% vs 5.21%, $p=0.0168$, соодветно).



Слика 16. Дистрибуција на возрастни групи кај жени со негативен и позитивен ПАП тест

Не беше најдена статистичка сигнификантна разлика во дистрибуцијата на возрастните групи ≤ 24 , 25-34, 35-44, 45-54 и 55-64 години меѓу пациентките со цитолошки наод на цервикални лезии со низок и висок ризик за карцином ($p=0.51$) (Табела 5).

Табела 5. Дистрибуцијата на возрастните групи меѓу пациентки со цитолошки наод на цервикални лезии со низок и висок ризик за карцином

Возрасни групи години	N	Позитивен ПАП тест		p-level
		лезии со низок ризик n(%)	лезии со висок ризик n(%)	
≤ 24	22	16(13.33)	6(7.14)	$\chi^2=3.3$ $p=0.51$
25-34	76	43(35.83)	33(39.29)	
35-44	70	43(35.83)	27(32.14)	
45-54	30	15(12.50)	15(17.86)	
55-64	6	3(2.50)	3(3.57)	
вкупно	204	120	84	

χ^2 (Chi-square test)

Во групата со цервикални лезии со низок ризик најчесто беа застапени пациентки на возраст 25-34 и 35-44 години (35.83%), во групата со цервикални лезии со висок ризик најчесто беа застапени пациентки на возраст 25-34 години (39.29%).

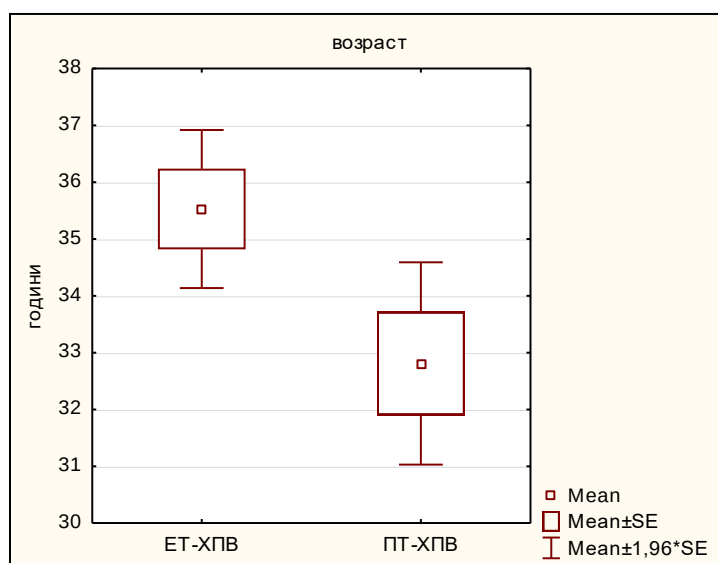
Возраста на пациентките со ХПВ инфекција предизвикана со еден и ко-инфекции со повеќе типови беше сигнификантно различна ($p=0.017$). Пациентките со ХПВ инфекција со еден тип беа сигнификантно постари. Просечната возраст на пациентките со инфекција со ЕТ-ХПВ беше 35.5 ± 9.4 години, просечната возраст на пациентките со инфекција со ПТ-ХПВ беше 32.8 ± 10.2 години (Табела 6).

Табела 6. Просечната возраст на пациентките со инфекција со ЕТ-ХПВ и ПТ-ХПВ

варијабла	статистички параметри - возраст			p-level
	n	mean $\pm$ SD	min - max	
ЕТ-ХПВ	174	35.53 $\pm$ 9.4	18 – 61	t=2.39* p =0.0174
ПТ-ХПВ	126	32.81 $\pm$ 10.2	20 – 61	

t(Student t-test)

*sig $p < 0.05$



Слика 17. Просечна возраст на пациентките со инфекција со ЕТ-ХПВ и ПТ-ХПВ типови

Пациентките на возраст ≤ 24 , 25-34, 35-44, 45-54 и 55-64 години имаа сигнификантно различна преваленца на инфекции предизвикани со ЕТ-ХПВ и ПТ-ХПВ ($p=0.0013$).

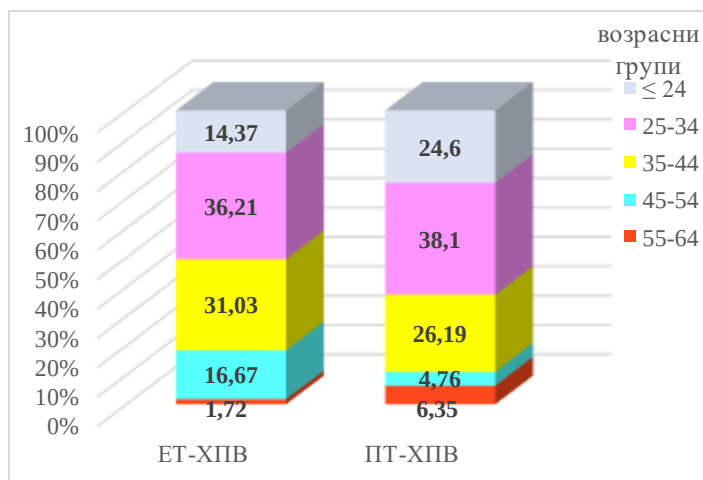
Споредбата на зачестеноста на преваленцата на ХПВ инфекции предизвикани со еден и ко-инфекции со повеќе типови меѓу одделните возрастни категории, покажа сигнификантно пониска преваленца на инфекција со еден тип кај пациентките од најмладата и најстарата возрастна група, односно на возраст од 24 години и помлади, и на возраст помеѓу 55 и 64 години (14.37% vs 24.6%, $p=0.025$; и, 1.72% vs 6.35%, $p=0.035$, соодветно), а сигнификантно повисока преваленца во возрастната група 45-54 години (16.67% vs 4.76%, $p=0.0015$) (Табела 7).

Табела 7. Преваленца на ХПВ инфекции предизвикани со ЕТ-ХПВ и ПТ-ХПВ меѓу одделните возрастни категории

Возрасни групи години	N			p-level	difference test
		ЕТ-ХПВ n(%)	ПТ-ХПВ n(%)		
≤ 24	56	25 (14.37)	31 (24.6)	X ² =17.9 **p=0.0013	*p=0.025
25-34	111	63 (36.21)	48 (38.1)		p=0.74
35-44	87	54 (31.03)	33 (26.19)		p=0.36
45-54	35	29 (16.67)	6 (4.76)		**p=0.0015
55-64	11	3 (1.72)	8 (6.35)		*p=0.035
вкупно	300	174	126		

X²(Chi-square test)

*sig p<0.05, **sig p<0.01



Слика 18. Споредба на возрастната распределба кај инфекции со ЕТ-ХПВ и ПТ-ХПВ

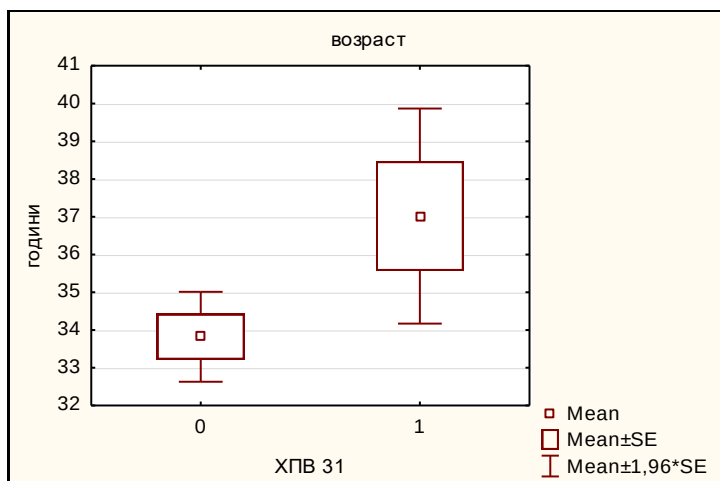
Статистичка сигнификантна разлика во просечната возраст беше најдена кај пациентките со/без ХПВ инфекција со тип 31 (p=0.03), тип 59 (p=0.0083) и тип 73 (p=0.0022); пациентките со ХПВ инфекција со тип 31 беа сигнификантно постари од пациентките кај кои овој генотип не беше детектиран (37.0 ± 10.6 vs 33.8 ± 9.5), пациентките со ХПВ инфекција со тип 59 беа сигнификантно помлади од пациентките кај кои овој генотип не беше детектиран (29.7 ± 8.5 vs 34.9 ± 9.8), и пациентките со ХПВ инфекција со тип 73 беа сигнификантно помлади од пациентките кај кои овој генотип не беше детектиран (28.3 ± 8.8 vs 34.9 ± 9.7) (Табела 8).

Табела 8. Разлика во просечната возраст кај жени со и без присуство на инфекција со поединечни ХПВ генотипови

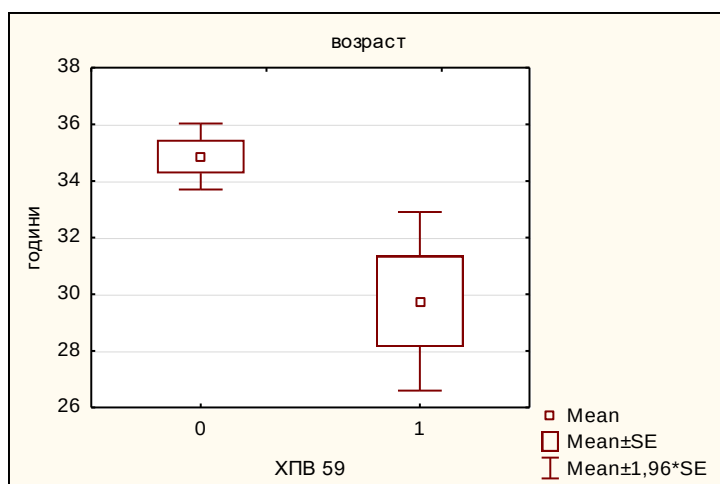
варијабла		статистички параметри - возраст	
		mean $\pm$ SD	p-level
ХПВ 6	има	31.9 $\pm$ 10.4	t=1.18 p=0.238
	нема	34.6 $\pm$ 9.7	
ХПВ 16	има	35.6 $\pm$ 8.5	t=1.19 p=0.236
	нема	34.0 $\pm$ 10.2	
ХПВ 18	има	32.4 $\pm$ 8.9	t=0.9 p=0.35
	нема	34.5 $\pm$ 9.8	
ХПВ 31	има	37.0 $\pm$ 10.6	t=2.17 *p=0.031
	нема	33.8 $\pm$ 9.5	
ХПВ 33	има	33.0 $\pm$ 10.2	t=0.56 p=0.56
	нема	34.5 $\pm$ 9.8	
ХПВ 35	има	39.6 $\pm$ 11.6	t=1.72 p=0.09
	нема	34.2 $\pm$ 9.7	
ХПВ 39	има	34.7 $\pm$ 9.5	t=0.157 p=0.875
	нема	34.4 $\pm$ 9.8	
ХПВ 44	има	35.9 $\pm$ 10.9	t=0.9 p=0.36
	нема	34.2 $\pm$ 9.7	
ХПВ 45	има	36.9 $\pm$ 11.7	t=1.15 p=0.25
	нема	34.2 $\pm$ 9.6	
ХПВ 51	има	32.7 $\pm$ 10.7	t=1.11 p=0.27
	нема	34.6 $\pm$ 9.7	
ХПВ 52	има	32.3 $\pm$ 10.2	t=1.22 p=0.22
	нема	34.6 $\pm$ 9.7	
ХПВ 53	има	33.3 $\pm$ 11.7	t=0.77 p=0.44
	нема	34.6 $\pm$ 9.5	
ХПВ 56	има	35.0 $\pm$ 12.4	t=0.31 p=0.76
	нема	34.3 $\pm$ 9.6	
ХПВ 58	има	35.4 $\pm$ 12.7	t=0.47 p=0.64
	нема	34.3 $\pm$ 9.6	
ХПВ 59	има	29.7 $\pm$ 8.5	t=2.66 **p=0.0083
	нема	34.9 $\pm$ 9.8	
ХПВ 66	има	35.3 $\pm$ 10.8	t=0.67 p=0.5
	нема	34.2 $\pm$ 9.6	
ХПВ 68	има	34.3 $\pm$ 12.5	t=0.03 p=0.976
	нема	34.4 $\pm$ 9.5	
ХПВ 73	има	28.3 $\pm$ 8.8	t=3.08 ***p=0.0022
	нема	34.9 $\pm$ 9.7	
ХПВ 82	има	31.0 $\pm$ 11.4	t=1.17 p=0.24
	нема	34.5 $\pm$ 9.7	

t(Student t-test)

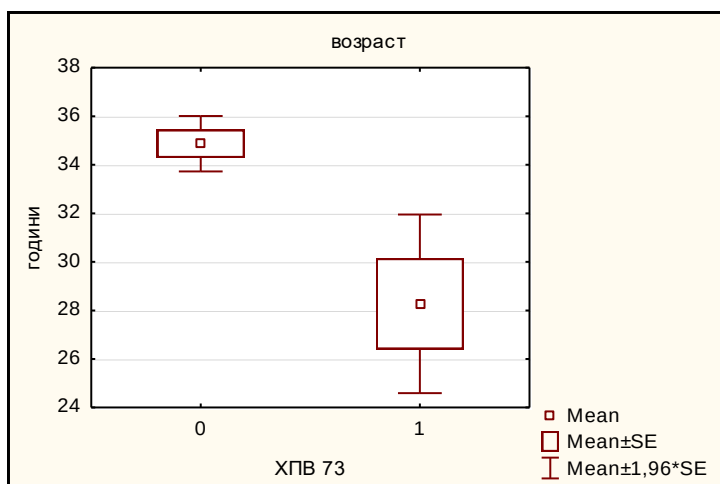
*sig p<0.05, **sig p<0.01,, **sig p<0.01



Слика 19. Просечна возраст на жени со и без инфекција со ХПВ тип 31



Слика 20. Просечна возраст на жени со и без инфекција со ХПВ тип 59



Слика 21. Просечна возраст на жени со и без инфекција со ХПВ тип 73

Возрасната дистрибуција на пациентките со/без ХПВ инфекција со тип 6 не беше сигнификантно различна ($p=0.62$). Пациентки на возраст од 25 до 34 години беа најчесто застапени во групите со/без инфекција со ХПВ 6 (38.10% и 36.92%, соодветно) (Табела 9).

Табела 9. Возрасната дистрибуција на пациентките со/без ХПВ инфекција со тип 6

Возрасни групи години	N	ХПВ 6		p-level
		да n(%)	не n(%)	
≤ 24	56	6 (28.57)	50 (17.92)	Fisher's exact p=0.62
25-34	111	8 (38.10)	103 (36.92)	
35-44	87	4 (19.05)	83 (29.75)	
45-54	35	3 (14.29)	32 (11.47)	
55-64	11	0	11 (3.94)	
вкупно	300	21	279	

Тестираната разлика во возрасната дистрибуција на пациентките со/без ХПВ инфекција со тип 16 беше статистички сигнификантна ($p=0.04$).

Споредбата на поединечните возрасни категории пациентки меѓу групите со/без ХПВ инфекција со тип 16 презентира гранична статистичка сигнификантна разлика во процентот на пациентки на возраст од 35 до 44 (38.03% и 36.92%, соодветно) (Табела 10).

Табела 10. Дистрибуција на инфекција со ХПВ 16 по возрасни групи

Возрасни групи години	N	ХПВ 16		p-level	difference test
		да n(%)	не n(%)		
≤ 24	56	8 (11.27)	48 (20.96)	$\chi^2=10.0$ * $p=0.04$	p = 0.067
25-34	111	25 (35.21)	86 (37.55)		p = 0.72
35-44	87	27 (38.03)	60 (26.20)		p = 0.055
45-54	35	11 (15.49)	24 (10.48)		p = 0.25
55-64	11	0	11 (4.80)		p = 0.06
вкупно	300	71	229		

χ^2 (Chi-square test)

*sig $p<0.05$

Пациентките со/без ХПВ инфекција со тип 18 не се разликуваа сигнификантно во однос на разликата во возрастната дистрибуција на пациентките ($p=0.87$). Најчесто застапена возрастна категорија кај пациентките со/без инфекција со тип 18 беше од 25 до 34 години (50% и 36.07%, соодветно) (Табела 11).

Табела 11. Анализа на застапеноста на ХПВ тип 18 инфекција според возрастни групи

Возрасни групи години	N	ХПВ 18		p-level
		да n(%)	не n(%)	
≤ 24	56	3 (15.0)	53 (18.93)	Fisher's exact p = 0.87
25-34	111	10 (50.0)	101 (36.07)	
35-44	87	5 (25.0)	82 (29.29)	
45-54	35	2 (10.0)	33 (11.79)	
55-64	11	0	11 (3.93)	
вкупно	300	20	280	

Тестираната разлика во возрастната дистрибуција на пациентките со/без ХПВ инфекција со тип 31 беше статистички сигнификантна ($p=0.048$) (Табела 12).

Споредбата на поединечните возрастни категории пациентки меѓу групите со/без ХПВ инфекција со тип 31 презентира сигнификантно помал процент на пациентки инфицирани со овој генотип на возраст од 25 до 34 (24.53% vs 39.68%, $p=0.038$).

Табела 12. Корелација помеѓу возрастна структура и детекција на ХПВ 31 кај испитаничките

Возрасни групи години	N	ХПВ 31		p-level	difference test
		да n(%)	не n(%)		
≤ 24	56	10 (18.87)	46 (18.16)	$\chi^2=9.6$ *p=0.048	p=0.9
25-34	111	13 (24.53)	98 (39.68)		*p=0.038
35-44	87	19 (35.85)	68 (27.53)		p=0.23
45-54	35	6 (11.32)	29 (11.74)		p=0.93
55-64	11	5 (9.43)	6 (4.43)		p=0.14
вкупно	300	53	247		

χ^2 (Chi-square test)

*sig $p<0.05$

Не беше најдена статистичка сигнификантна разлика во возрасната дистрибуција на пациентките со/без ХПВ инфекција со тип 33 ($p=0.45$). Пациентките инфицирани со ХПВ 33 најчесто беа на возраст од 25-34 и 35-44 години (40%), возраста на пациентките без инфекција со овој ХПВ геном најчесто се движеше меѓу 25 и 34 години (36.84%) (Табела 13).

Табела 13. Разлика во возрасната дистрибуција на пациентките со/без ХПВ инфекција со тип 33

Возрасни групи години	N	ХПВ 33		p-level
		да n(%)	не n(%)	
≤ 24	56	2 (13.33)	54 (18.95)	Fisher's exact $p = 0.45$
25-34	111	6 (40.0)	105 (36.84)	
35-44	87	6 (40.0)	81 (28.42)	
45-54	35	0	35 (12.28)	
55-64	11	1 (6.67)	10 (3.51)	
вкупно	300	15	285	

Пациентките со/без ХПВ инфекција со тип 35 имаа статистички сигнификантна дистрибуција на возрасните групи ≤ 24 , 25-34, 35-44, 45-54 и 55-64 години ($p=0.049$).

Споредбата на поединечните возрасни категории пациентки меѓу групите со/без ХПВ инфекција со тип 35 презентира сигнификантно поголем процент на пациентки инфицирани со овој генотип на возраст од 55 до 64 (20.0% vs 3.10%, $p=0.038$) (Табела 14).

Табела 14. Дистрибуција на инфекција со ХПВ 35 по возрастни категории во испитуваната популација

Возрасни групи години	N	ХПВ 35		p-level	difference test
		да n(%)	не n(%)		
≤ 24	56	0	56 (19.31)	Fisher's exact *p=0.049	p=0.12
25-34	111	4 (40.0)	107 (36.90)		p=0.84
35-44	87	4 (40.0)	83 (28.62)		p=0.44
45-54	35	0	35 (12.07)		p=0.24
55-64	11	2 (20.0)	9 (3.10)		**p=0.005
вкупно	300	10	290		

*sig p<0.05, **sig p<0.01

Пациентките со/без ХПВ инфекција со тип 39 не се разликуваа сигнификантно во однос на разликата во возрастната дистрибуција на пациентките (p=0.94); 34.78% пациентки со инфекција со овој тип припаѓаа поединечно на две возрастни категории (25-34 и 35-44 години), 37.18% пациентки без докажана инфекција со ХПВ 39 припаѓаа на возрастната категорија 25-34 години (Табела 15).

Табела 15. Анализа на застапеноста на пациентките со/без инфекција со ХПВ тип 39 по возрастни категории во испитуваната популација

Возрасни групи години	N	ХПВ 39		p-level
		да n(%)	не n(%)	
≤ 24	56	4 (17.39)	52 (18.77)	Fisher's exact p=0.94
25-34	111	8 (34.78)	103 (37.18)	
35-44	87	8 (34.78)	79 (28.52)	
45-54	35	3 (13.04)	32 (11.55)	
55-64	11	0	11 (3.97)	
вкупно	300	23	277	

Пациентките кои имаа инфекција со ХПВ тип 44 најчесто беа на возраст од 35 до 44 години (34.38%), следено со возрасната група од 25 до 34 години (25%);најчеста возраст на пациентките кај кои не беше детектирана инфекција со тип 44 беше од 25 до 34 години.

Статистички несигнификантна беше разликата меѓу пациентките со/без инфекција со ХПВ тип 44 во однос на дистрибуцијата на нивната возраст ($p=0.26$) (Табела 16).

Табела 16. Разлика во возрасната дистрибуција на пациентките со/без ХПВ инфекција со тип 44

Возрасни групи години	N	ХПВ 44		p-level
		да n(%)	не n(%)	
≤ 24	56	7 (21.88)	49 (18.28)	$X^2=5.3$ $p=0.26$
25-34	111	8 (25.0)	103 (38.43)	
35-44	87	11 (34.38)	76 (28.36)	
45-54	35	3 (9.38)	32 (11.94)	
55-64	11	3 (9.38)	8 (2.99)	
вкупно	300	32	268	

X^2 (Chi-square test)

Возрасната дистрибуција на пациентките со/без ХПВ инфекција со тип 45 не беше статистички сигнификантно различна ($p=0.09$).Возрасните категории 25-34 и 35-44 години беа најчесто застапени во групите со/без инфекција со овој тип на ХПВ (26.32% и 36.84%, соодветно во групата со инфекција; 37.72% и 28.47%, соодветно во групата беа инфекција со тип 45).

Табела 17. Фреквенција на пациентките со/без ХПВ 45 инфекција по возрастни категории

Возрасни групи години	N	ХПВ 45		p-level
		да n(%)	не n(%)	
≤ 24	56	3 (15.79)	53 (18.86)	Fisher's exact p=0.09
25-34	111	5 (26.32)	106 (37.72)	
35-44	87	7 (36.84)	80 (28.47)	
45-54	35	1 (5.26)	34 (12.10)	
55-64	11	3 (15.79)	8 (2.85)	
вкупно	300	19	281	

Разликата во возрастните дистрибуции ≤ 24, 25-34, 35-44, 45-54 и 55-64 години на пациентките со/без инфекција со ХПВ 51 не беше статистички сигнификантна (p=0.53).

Пациентките кои имаа/немаа инфекција со овој ХПВ тип најчесто беа на возраст од 25 до 34 години (41.67% и 36.36%, соодветно).

Табела 18. Анализа на застапеноста на пациентките со/без ХПВ тип 51 по возрастни категории

Возрасни групи години	N	ХПВ 51		p-level
		да n(%)	не n(%)	
≤ 24	56	9 (25.0)	47 (17.80)	X ² =3.2 p=0.53
25-34	111	15 (41.67)	96 (36.36)	
35-44	87	7 (19.44)	80 (30.30)	
45-54	35	3 (8.33)	32 (12.12)	
55-64	11	2 (5.56)	9 (3.41)	
вкупно	300	36	264	

X²(Chi-square test)

Возрасната група 25-34 години најчесто беше застапена кај пациентките со/без инфекција со ХПВ тип 52 (48.39% и 35.69%).

Статистички несигнификантна беше разликата во возрастната дистрибуција на пациентките со/без инфекција со ХПВ тип 52 ($p=0.51$).

Табела 19. Корелација помеѓу застапеноста на пациентките со/без ХПВ тип 52 по возрастни категории во испитуваната популација

Возрасни групи години	N	ХПВ 52		p-level
		да n(%)	не n(%)	
≤ 24	56	5 (16.13)	51 (18.96)	$X^2=3.3$ $p=0.51$
25-34	111	15 (48.39)	96 (35.69)	
35-44	87	6 (19.35)	81 (30.11)	
45-54	35	3 (9.68)	32 (11.90)	
55-64	11	2 (6.45)	9 (3.35)	
вкупно	300	31	269	

X^2 (Chi-square test)

Пациентките со/без ХПВ инфекција со тип 53 имаа статистички сигнификантна дистрибуција на возрастните групи ≤ 24, 25-34, 35-44, 45-54 и 55-64 години ($p=0.000$).

Споредбата на поединечните возрастни категории пациентки меѓу групите со/без ХПВ инфекција со тип 53 презентира сигнификантно поголем процент на пациентки без инфекција со овој генотип на возраст од 45 до 54 (13.57% vs 0%, $p=0.0111$), и сигнификантно поголем процент на пациентки инфицирани со овој генотип на возраст од 55 до 64 (14.29% vs 1.94%, $p=0.0001$) (Табела 20).

Табела 20. Фреквенција на пациентките со/без ХПВ 53 инфекција по возрастни категории во испитуваната популација

Возрасни групи години	N	ХПВ 53		p-level	difference test
		да n(%)	не n(%)		
≤ 24	56	9 (21.43)	47 (18.22)	Fisher's exact ***p=0.000	p=0.62
25-34	111	20 (47.62)	91 (35.27)		p=0.12
35-44	87	7 (16.67)	80 (31.01)		p=0.058
45-54	35	0	35 (13.57)		*p=0.0111
55-64	11	6 (14.29)	5 (1.94)		***p=0.0001
вкупно	300	42	258		

*sig p<0.5, ***sig p<0.0001

Возрасната дистрибуција на пациентките со/без ХПВ инфекција со тип 56 не беше статистички сигнификантно различна (p=0.33). Возрасните категории ≤ 24 и 25-34 години беа подеднакво и најчесто застапени во групата со инфекција со овој тип на ХПВ (27.27%), возрасната категорија 25-34 години беше најчесто застапена во групата без ХПВ инфекција со тип 56 (37.77%).

Табела 21. Возрасната дистрибуција на пациентките со/без ХПВ инфекција со тип 56

Возрасни групи години	N	ХПВ 56		p-level
		да n(%)	не n(%)	
≤ 24	56	6 (27.27)	50 (17.99)	Fisher's exact p=0.33
25-34	111	6 (27.27)	105 (37.77)	
35-44	87	5 (22.73)	82 (29.50)	
45-54	35	3 (13.64)	32 (11.51)	
55-64	11	2 (9.09)	9 (3.24)	
вкупно	300	22	278	

Пациентките на возраст ≤ 24, 25-34, 35-44, 45-54 и 55-64 години имаа несигнификантно различна зачестеност на инфекција со ХПВ тип 58 (p=0.08), со

мнозинство на пациентки во двете групи на возраст 25-34 години (38.89% и 36.88%, соодветно).

Табела 22. Фреквенција на пациентките со/без ХПВ 58 инфекција по возрастни категории во испитуваната популација

Возрасни групи години	N	ХПВ 58		p-level
		да n(%)	не n(%)	
≤ 24	56	4 (22.22)	52 (18.44)	Fisher's exact p=0.08
25-34	111	7 (38.89)	104 (36.88)	
35-44	87	3 (16.67)	84 (29.79)	
45-54	35	1 (5.56)	34 (12.06)	
55-64	11	3 (16.67)	8 (2.84)	
вкупно	300	18	282	

За $p=0.035$ се потврди статистичка сигнификантна разлика во возрастната дистрибуција на пациентките со/без ХПВ инфекција со тип 59.

Споредбата на поединечните возрастни категории пациентки меѓу двете групи презентира гранична сигнификантност меѓу процентот на пациентки со/без инфекција со ХПВ 59 на возраст од 24 години и помлади (32.14% vs 17.28%, $p=0.05$), и сигнификантно помал процент на пациентки инфицирани со овој генотип на возраст од 45 до 54 (0% vs 12.87%, $p=0.043$).

Табела 23. Корелација помеѓу застапеноста на пациентките со/без ХПВ тип 59 по возрастни категории

Возрасни групи години	N	ХПВ 59		p-level	difference test
		да n(%)	не n(%)		
≤ 24	56	9 (32.14)	47 (17.28)	X ² =10.3 *p=0.035	p = 0.05
25-34	111	14 (50.0)	97 (35.66)		p = 0.13
35-44	87	4 (14.29)	83 (30.51)		p = 0.07
45-54	35	0	35 (12.87)		*p = 0.043
55-64	11	1 (3.57)	10 (3.68)		p = 0.98
вкупно	300	28	272		

X²(Chi-square test), *sig p<0.5

Статистички несигнификантна беше разликата во возрастната дистрибуција на пациентките со/без ХПВ инфекција со тип 66 (p=0.42). Возрасната категорија 25-34 години беше најчесто застапена во групата со инфекција со овој тип на ХПВ (35.71%), возрастната категорија 25-34 години беше најчесто застапена во групата без ХПВ инфекција со тип 66 (39.15%).

Табела 24. Анализа на застапеноста на ХПВ тип 66 по возрастни категории во испитуваната популација

Возрасни групи години	N	ХПВ 66		p-level
		да n(%)	не n(%)	
≤ 24	56	10 (23.81)	46 (17.83)	X ² = 3.9 p = 0.42
25-34	111	10 (23.81)	101 (39.15)	
35-44	87	15 (35.71)	72 (27.91)	
45-54	35	5 (11.9)	30 (11.63)	
55-64	11	2 (4.76)	9 (3.49)	
вкупно	300	42	258	

X²(Chi-square test)

Пациентките со/без ХПВ инфекција со тип 68 имаа статистички сигнификантна дистрибуција на возрастните групи ≤ 24 , 25-34, 35-44, 45-54 и 55-64 години ($p=0.012$).

Споредбата на поединечните возрастни категории пациентки меѓу групите со/без ХПВ инфекција со тип 68 презентира сигнификантно помал процент на пациентки инфицирани со овој генотип на возраст од 35 до 44 (7.41% vs 31.14%, $p=0.0095$), а сигнификантно поголем процент на овие пациентки на возраст 55-64 години (11.11% vs 2.93%, $p=0.03$).

Табела 25. Фреквенција на пациентки со / без ХПВ 68 инфекција по возрастни категории во испитуваната популација

Возрасни групи години	N	ХПВ 68		p-level	difference test
		да n(%)	не n(%)		
≤ 24	56	8 (29.63)	48 (17.58)	Fisher's exact *p = 0.012	p = 0.12
25-34	111	10 (37.04)	101 (37.0)		p = 0.99
35-44	87	2 (7.41)	85 (31.14)		**p = 0.0095
45-54	35	4 (14.81)	31 (11.36)		p = 0.59
55-64	11	3 (11.11)	8 (2.93)		*p = 0.03
вкупно	300	27	273		

*sig $p<0.05$, **sig $p<0.01$

Тестираната разлика во возрастната дистрибуција на пациентките со/без ХПВ инфекција со тип 73 беше статистички сигнификантна ($p=0.000$).

Споредбата на поединечните возрастни категории пациентки меѓу групите со/без ХПВ инфекција со тип 73 презентира сигнификантно поголем процент на пациентки инфицирани со овој генотип на возраст од 24 години и помлади (59.09% vs 15.47%, $p=0.0000$), а сигнификантно помал процент на возраст од 25-34 години (13.64% vs 38.85%, $p=0.018$).

Табела 26. Корелација помеѓу застапеноста на ХПВ тип 73 по возрастни групи во испитуваната популација

Возрасни групи години	N	ХПВ 73		p-level	difference test
		да n(%)	не n(%)		
≤ 24	56	13 (59.09)	43 (15.47)	Fisher's exact ***p = 0.000	***p = 0.0000
25-34	111	3 (13.64)	108 (38.85)		*p = 0.018
35-44	87	6 (27.27)	81 (29.14)		p = 0.85
45-54	35	0	35 (12.59)		p = 0.077
55-64	11	0	11 (3.96)		p = 0.34
вкупно	300	22	278		

*sig p<0.05, ***sig p<0.0001

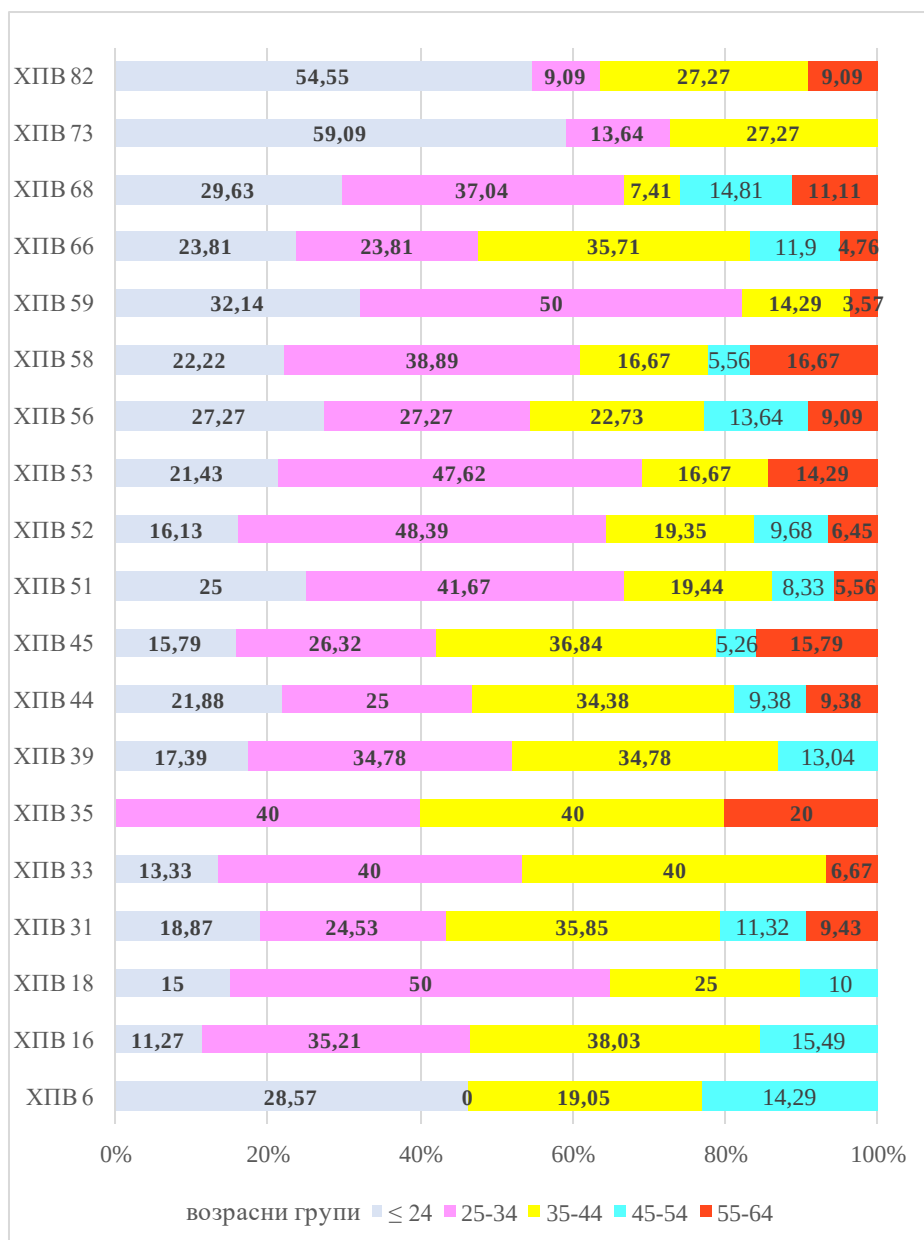
Тестираната разлика во возрастната дистрибуција на пациентките со/без ХПВ инфекција со тип 82 беше статистички сигнификантна (p=0.014).

Споредбата на поединечните возрасни категории пациентки меѓу групите со/без ХПВ инфекција со тип 82 презентира сигнификантно поголем процент на пациентки на возраст ≤ 24 години (54.55% и 17.30%, p=0.0018), и гранична статистичка сигнификантна разлика во процентот на пациентки на возраст од 25 до 34 години (9.09% vs 38.06%, p=0.05).

Табела 27. Анализа на застапеноста на пациентките со/без ХПВ тип 82 по возрастни групи

Возрасни групи години	N	ХПВ 82		p-level	difference test
		да n(%)	не n(%)		
≤ 24	56	6 (54.55)	50 (17.30)	Fisher's exact *p = 0.014	**p = 0.0018
25-34	111	1 (9.09)	110 (38.06)		p = 0.05
35-44	87	3 (27.27)	84 (29.07)		p = 0.9
45-54	35	0	35 (12.11)		p = 0.22
55-64	11	1 (9.09)	10 (3.46)		p = 0.33
вкупно	300	11	289		

*sig p<0.05, **sig p<0.01



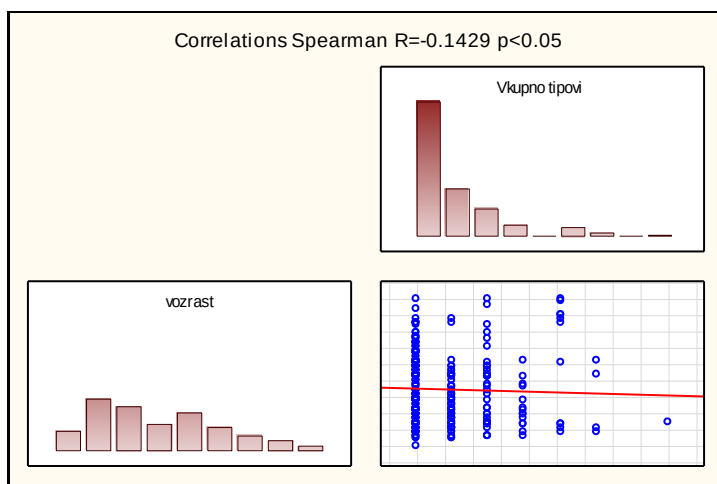
Слика 22 . Застапеност на возрастни групи по поединечни ХПВ генотипови

Испитуваната корелација помеѓу возраста и бројот на детектирани ХПВ типови беше статистички сигнификантна ($p=0.013$). Согласно вредноста на Spearman-овиот коефициент, оваа корелација беше негативна, односно индиректна, и покажува дека со зголемување на возраста бројот на ХПВ типови опаѓа, и обратното. Кај помладите жени се регистрираат истовремени инфекции со повеќе типови на ХПВ.

Табела 28. Корелација помеѓу возраста и бројот на детектирани ХПВ типови

КОРЕЛАЦИИ		
варијабла	Spearman R	p-level
возраст & вкупно ХПВ типови	-0.1429	*0.013

*sig p<0.05



Слика 23. Корелација помеѓу возраста и бројот на детектирани ХПВ типови

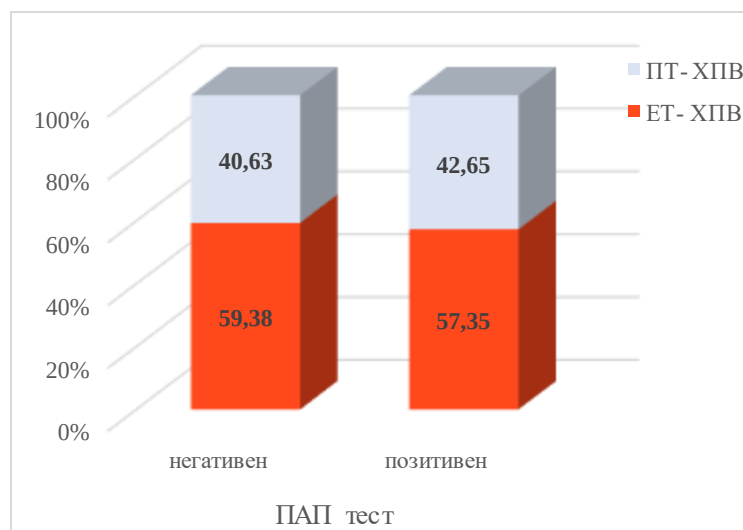
Цел 2. Да се испита преваленцата на инфекции предизвикани со еден или повеќе типови на ХПВ, во однос на цитолошкиот наод на пациентките

Согласно добиените резултати, кај испитуваните 300 пациентки, преваленцата на инфекции предизвикани со ЕТ-ХПВ беше нешто повисока кај пациентките со негативен ПАП тест (59.38%) во споредба со оние со позитивен ПАП тест (57.35%). Спротивно, кај ПТ-ХПВ, повисока преваленца беше забележана кај пациентките со позитивен ПАП тест (42.65%) отколку кај оние со негативен наод (40.63%). Сепак, и покрај овие разлики во процентуалната застапеност, не беше утврдена статистички значајна разлика помеѓу групите ($p=0.74$) (Табела 29).

Табела 29. Корелација помеѓу типот на ХПВ инфекција (инфекција со ЕТ-ХПВ наспроти инфекција предизвикана со ПТ-ХПВ) и резултатите од ПАП тестот

варијабла	ПАП тест			p-level
	N	негативен n(%)	позитивен n(%)	
ЕТ- ХПВ	174	57 (59.38)	117 (57.35)	$X^2 = 0.11$; $p = 0.74$
ПТ- ХПВ	126	39 (40.63)	87 (42.65)	

X^2 (Chi-square test)



Слика 24. Дистрибуцијата на пациентки со позитивен и негативен ПАП тест, во однос на инфекција предизвикана со ЕТ- и ПТ-ХПВ

Во табела 30, прикажана е дистрибуцијата на пациентки со позитивен и негативен ПАП тест, во однос на зачестеноста на типовите на ХПВ. Во наодите со негативен ПАП тест, најчесто беше детектиран типот 31, со преваленца од 19.79%, следено со ХПВ тип 16, со преваленца од 17.71%. Во позитивните ПАП резултати, ХПВ тип 16 имаше највисока преваленца од 26.47%.

Тестираната разлика меѓу позитивните и негативни ПАП резултати во однос на поединечната зачестеност на ХПВ типовите беше статистички несигнификантна за сите типови ($p>0.05$).

Табела 30. Дистрибуцијата на пациентки со позитивен и негативен ПАП тест, во однос на зачестеноста на типовите на ХПВ

варијабла	ПАП тест		p-level
	негативен n(%)	позитивен n(%)	
ХПВ 6	5 (5.21)	16 (7.84)	$X^2=0.7p=0.4$
ХПВ 16	17 (17.71)	54 (26.47)	$X^2=2.8p=0.096$
ХПВ 18	4 (4.17)	16 (7.84)	$X^2=1.4p=0.23$
ХПВ 31	19 (19.79)	34 (16.67)	$X^2=0.44p=0.51$
ХПВ 33	4 (4.17)	11 (5.39)	$p=0.78$
ХПВ 35	2 (2.08)	8 (3.92)	$X^2=0.68p=0.41$
ХПВ 39	7 (7.29)	16 (7.84)	$X^2=0.03p=0.87$
ХПВ 44	11 (11.46)	21 (10.29)	$X^2=0.09p=0.76$
ХПВ 45	5 (5.21)	14 (6.86)	$X^2=0.3p=0.58$
ХПВ 51	12 (12.50)	24 (11.76)	$X^2=0.03p=0.85$
ХПВ 52	11 (11.46)	20 (9.80)	$X^2=0.19p=0.66$
ХПВ 53	15 (15.63)	27 (13.24)	$X^2=0.31p=0.58$
ХПВ 56	10 (10.42)	12 (5.88)	$X^2=1.97p=0.16$
ХПВ 58	3 (3.13)	15 (7.35)	$X^2=2.07p=0.15$
ХПВ 59	12 (12.50)	16 (7.84)	$X^2=1.67p=0.196$
ХПВ 66	14 (14.58)	28 (13.73)	$X^2=0.04p=0.84$
ХПВ 68	12 (12.50)	15 (7.35)	$X^2=2.11p=0.15$
ХПВ 73	9 (9.38)	13 (6.37)	$X^2=0.87p=0.35$
ХПВ 82	4 (4.17)	7 (3.43)	$X^2=0.099p=0.75$

X^2 (Chi-square test)

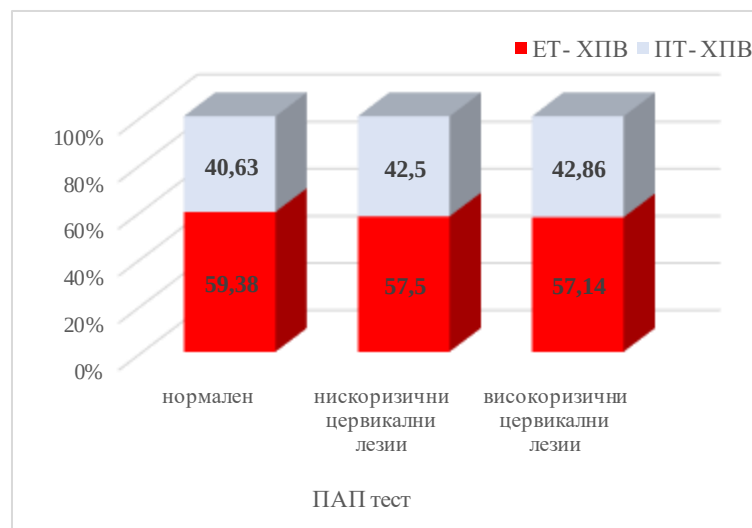
Согласно резултатите добиени во нашата студија, единечен генотип на ХПВ (ЕТ-ХПВ) најчесто беше изолиран кај примероци од пациентки со нормален ПАП тест (59.38%), во споредба со пациентки со цервикална лезија со низок ризик (57.50%)

и висок ризик за прогресија во карцином (57.14%). Наспроти тоа, ко-инфекција со повеќе ХПВ типови (ПТ-ХПВ) беше почесто детектирана кај пациентки со високоризични лезии (42.86%), отколку кај пациентки со лезии со низок ризик (42.50%) и со нормален наод од ПАП тестот (40.63%). Сепак, и покрај овие мали разлики во зачестеноста, не беше утврдена статистички значајна разлика помеѓу испитуваните групи ($\chi^2=0.11$; $p=0.94$), што укажува дека бројот на детектирани ХПВ генотипови не претставува независен предиктор за тежината на цитолошките промени (Табела 31).

Статистички несигнификантна беше разликата во дистрибуција на пациентки со ХПВ инфекција предизвикана со еден и ко-инфекции со повеќе типови меѓу групите со нормален ПАП тест, со цервикална лезија со низок и висок ризик за појава на карцином ($p=0.94$).

Табела 31. Разликата во дистрибуција на пациентки со ХПВ инфекција предизвикана со еден и ко-инфекции со повеќе типови во однос на наодот на ПАП тестот

варијабла	ПАП тест				p-level
	N	нормален n(%)	нискоризични цервикални лезии n(%)	високоризични цервикални лезии n(%)	
ЕТ-ХПВ	174	57 (59.38)	69 (57.50)	48 (57.14)	$\chi^2=0.11p=0.94$
ПТ- ХПВ	126	39 (40.63)	51 (42.50)	36 (42.86)	



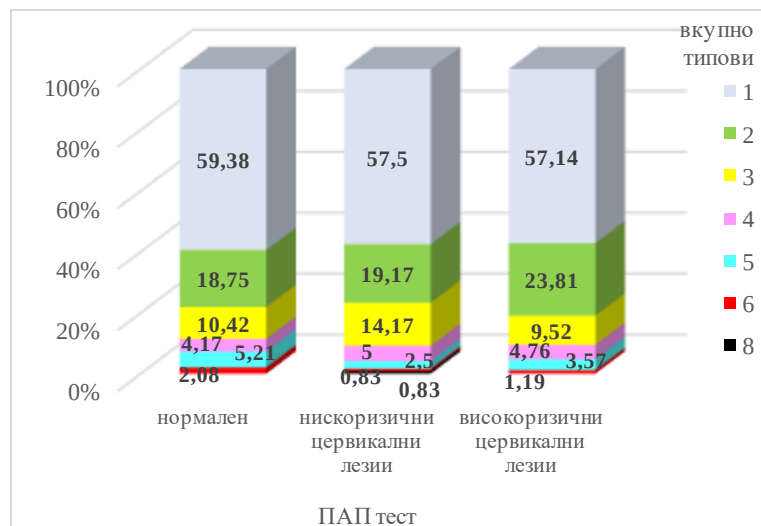
Слика 25. Застапеност на инфекции со ЕТ-ХПВ и ПТ-ХПВ кај жени во однос на наодот на ПАП тестот

Во табела 32 прикажани се цитолошките групи во зависност од бројот на детектирани типови на ХПВ. Согласно добиените резултати, единечен генотип на ХПВ беше најчесто детектиран кај примероци од пациентки со нормален ПАП тест (59.38%), во споредба со пациентки со цервикална лезија со низок (57.50%) и висок ризик за појава на карцином (57.14%). За разлика од нив, два генотипа на ХПВ беа

почесто детектирани кај пациентки со високоризични лезии (23.81%), во однос на оние со лезии со низок ризик (19.17%) и пациентки со нормален ПАП тест (18.75%). И покрај овие разлики во застапеноста, не беше утврдена статистички значајна разлика во бројот на детектирани ХПВ генотипови во однос на цитолошкиот наод ($p=0.98$).

Табела 32. Дистрибуција на бројот на детектирани ХПВ типови кај жени според наодот на ПАП тестот

број на ХПВ	ПАП тест				p-value
	N	нормален n(%)	нискоризични цервикални лезии n(%)	високоризични цервикални лезии n(%)	
1	174	57 (59.38)	69 (57.50)	48 (57.14)	Fisher's exact $p = 0.98$
2	61	18 (18.75)	23 (19.17)	20 (23.81)	
3	35	10 (10.42)	17 (14.17)	8 (9.52)	
4+	30	11 (11.46)	11 (9.17)	8 (9.52)	
вкупно	300	96	120	84	



Слика 26. Дистрибуција на бројот на детектирани ХПВ типови кај жени според наодот на ПАП тестот

Споредбата на преваленцијата на детектираните ХПВ типови меѓу групите со нормален и абнормален цитолошки наод (цервикални лезии со низок и висок ризик за карцином) презентира: поголема застапеност на тип 16 кај нискоризичните цервикални лезии (27.5%), на тип 18 кај нискоризичните цервикални лезии (9.17%), на тип 31 кај високоризичните цервикални лезии (21.43%), на тип 33 кај нискоризичните цервикални лезии (6.67%), на тип 35 кај нискоризичните цервикални лезии (5.0%), на тип 39 кај нискоризичните цервикални лезии (8.33%), на тип 44

слична зачестеност кај ниско и високоризичните цервикални лезии (10 % и 10.71%, соодветно), на тип 45 кај високоризичните цервикални лезии (7.14%), на тип 51 кај високоризичните цервикални лезии (15.48%), на тип 52 кај нормалните резултати (11.46%), на тип 53 слична зачестеност кај нормалните наоди и нискоризичните цервикални лезии (15.63% и 15.83%, соодветно), на тип 56 кај нормалните наоди (10.42%), на тип 58 кај нискоризичните цервикални лезии (9.17%), на тип 59 кај нормалните наоди (12.5%), на тип 66 кај нискоризичните цервикални лезии (15%), на тип 68 кај нормалните наоди (12.5%), на тип 73 исто така кај нормалните наоди (9.38%), и идентична застапеност на тип 82 кај нормалните наоди и нискоризичните цервикални лезии (поединечно 4.17%).

Табела 33. Разлика меѓу цитолошките групи во однос на типот на изолиран ХПВ

варијабла	наод			p-level
	нормален n(%)	нискоризични цервикални лезии n(%)	високоризични цервикални лезии n(%)	
ХПВ 6	5 (5.21)	8 (6.67)	8 (9.52)	$X^2=1.32p=0.52$
ХПВ 16	17 (17.71)	33 (27.50)	21 (25)	$X^2=2.94p=0.23$
ХПВ 18	4 (4.17)	11 (9.17)	5 (5.95)	$X^2=2.24p=0.33$
ХПВ 31	19 (19.79)	16 (13.33)	18 (21.43)	$X^2=2.66p=0.26$
ХПВ 33	4 (4.17)	8 (6.67)	3 (3.57)	$X^2=1.2p=0.55$
ХПВ 35	2 (2.08)	6 (5.0)	2 (2.38)	$p=0.51$
ХПВ 39	7 (7.29)	10 (8.33)	6 (7.14)	$X^2=0.13p=0.94$
ХПВ 44	11 (1.46)	12 (10)	9 (10.71)	$X^2=0.12p=0.94$
ХПВ 45	5 (5.21)	8 (6.67)	6 (7.14)	$X^2=0.32p=0.85$
ХПВ 51	12 (12.5)	11 (9.17)	13 (15.48)	$X^2=1.89p=0.39$
ХПВ 52	11 (11.46)	13 (10.83)	7 (8.33)	$X^2=0.53p=0.77$
ХПВ 53	15 (15.63)	19 (15.83)	8 (9.52)	$X^2=1.94p=0.38$
ХПВ 56	10 (10.42)	6 (5.0)	6 (7.14)	$X^2=2.31p=0.31$
ХПВ 58	3 (3.13)	11 (9.17)	4 (4.76)	$X^2=3.77p=0.15$
ХПВ 59	12 (12.5)	8 (6.67)	8 (9.52)	$X^2=2.15p=0.34$
ХПВ 66	14 (14.58)	18 (15.0)	10 (11.90)	$X^2=0.43p=0.8$
ХПВ 68	12 (12.5)	10 (8.33)	5 (5.95)	$X^2=2.45p=0.29$
ХПВ 73	9 (9.38)	6 (5.0)	7 (8.33)	$X^2=1.67p=0.43$
ХПВ 82	4 (4.17)	5 (4.17)	2 (2.38)	$p=0.8$

Појединечните или мултипли ХПВ инфекции не беа сигнификантно асоцирани со нискоризични и високоризични цервикални лезии.

Табела 34. Асоцијација помеѓу нискоризични и високоризични цервикални лезии и специфични ХПВ генотипови

варијабла	нормал (N)	нискоризични			високоризични		
		N	OR (95% CI)	p-level	N	OR (95% CI)	p-level
ХПВ 6 (ЕХИ)	0	1		1.0	1		0.467
ХПВ6 (ПХИ)	5	7	1.127(0.35 – 3.67)	0.84	7	1.655(0.5 – 5.42)	0.4
ХПВ 16(ЕТИ)	9	18	1.706 (0.73 – 3.99)	0.21	15	2.101 (0.87 – 5.09)	0.09
ХПВ 16 (ПХИ)	8	15	1.571 (0.64 – 3.88)	0.32	5	0.696 (0.22 – 2.22)	0.54
ХПВ 18(ЕТИ)	0	4		0.13	0		0.47
ХПВ 18 (ПХИ)	4	8	1.68 (0.49 – 5.77)	0.40	4	1.139 (0.28 – 4.71)	1.0
ХПВ 31(ЕТИ)	5	7	1.127 (0.35 – 3.67)	0.84	7	1.655 (0.50 – 5.42)	0.4
ХПВ 31 (ПХИ)	14	9	0.457 (0.19 – 1.15)	0.09	11	0.883 (0.38 – 2.07)	0.77
HPV 33(ЕТИ)	1	2	1.610 (0.14–18.03)	1.0	1	1.145 (0.07–18.59)	1.0
ХПВ 33 (ПХИ)	3	6	1.632 (0.39 – 6.70)	0.73	2	0.756 (0.12 – 4.64)	1.0
ХПВ 35(ЕТИ)	0	2		0.504	1		0.47
ХПВ 35 (ПХИ)	2	3	1.205 (0.19 – 7.36)	1.0	1	0.566 (0.05 – 6.36)	1.0
ХПВ 39(ЕТИ)	3	2	0.525 (0.09 – 3.21)	0.66	1	0.373 (0.04 – 3.66)	0.62
ХПВ 39 (ПХИ)	3	8	2.214 (0.57 – 8.58)	0.35	5	1.962 (0.45 – 8.47)	0.47
ХПВ 44(ЕТИ)	5	2	0.308 (0.06 – 1.63)	0.25	3	0.674 (0.16 – 2.91)	0.72
ХПВ 44 (ПХИ)	6	10	1.364 (0.48 – 3.89)	0.56	6	1.154 (0.36 – 3.72)	0.81
ХПВ 45(ЕТИ)	0	2		0.503	1		0.47
ХПВ 45 (ПХИ)	5	6	0.958 (0.28 – 3.24)	1.0	5	1.152 (0.32 – 4.12)	1.0
ХПВ 51(ЕТИ)	7	3	0.326 (0.08 – 1.29)	0.11	2	0.310 (0.06 – 1.54)	0.18

ХПВ 51 (ПХИ)	5	8	1.30 (0.41 – 4.11)	0.65	11	2.742 (0.91 – 8.25)	0.064
ХПВ 52(ЕТИ)	4	2	0.390 (0.07 – 2.17)	0.41	2	0.561 (0.10 – 3.14)	0.69
ХПВ 52 (ПХИ)	7	11	1.283 (0.48 – 3.45)	0.62	5	0.805 (0.25 – 2.64)	0.72
ХПВ 53(ЕТИ)	4	5	1.0 (0.26 – 3.83)	1.0	1	0.277 (0.03 – 2.53)	0.37
ХПВ 53 (ПХИ)	11	14	1.021 (0.44 – 2.36)	0.96	7	0.702 (0.26 – 1.90)	0.48
ХПВ 56(ЕТИ)	5	2	0.308 (0.06 – 1.63)	0.25	1	0.219 (0.02 – 1.92)	0.22
ХПВ 56 (ПХИ)	5	4	0.628 (0.16 – 2.40)	0.51	5	1.152 (0.32 – 4.12)	1.0
ХПВ 58(ЕТИ)	1	2	1.610 (0.14–18.03)	1.0	2	2.317 (0.21–26.02)	0.59
ХПВ 58 (ПХИ)	2	9	3.811 (0.81–18.07)	0.12	2	1.146 (0.16 – 8.32)	1.0
ХПВ 59(ЕТИ)	2	2	0.797 (0.11 – 5.76)	1.0	2	1.146 (0.16 – 8.32)	1.0
ХПВ 59 (ПХИ)	10	6	0.453 (0.16 – 1.29)	0.13	6	0.662 (0.23 – 1.91)	0.44
ХПВ66(ЕТИ)	4	11	2.321 (0.71 – 7.53)	0.15	4	1.150 (0.28 – 4.75)	1.0
ХПВ66 (ПХИ)	10	7	0.533 (0.19 – 1.46)	0.21	5	0.544 (0.18 – 1.66)	0.28
ХПВ68(ЕТИ)	4	3	0.590 (0.13 – 2.70)	0.702	2	0.561 (0.10 – 3.14)	0.69
ХПВ68 (ПХИ)	8	7	0.681 (0.24 – 1.95)	0.47	3	0.196 (0.10 – 1.59)	0.18
ХПВ73(ЕТИ)	2	3	1.205 (0.19 – 7.36)	1.0	2	1.146 (0.16 – 8.32)	1.0
ХПВ73 (ПХИ)	5	3	0.467 (0.11 – 2.04)	0.47	4	0.910 (0.24 – 3.51)	1.0
ХПВ82(ЕТИ)	1	0		0.44	0		1.0
ХПВ82 (ПХИ)	3	4	1.069 (0.23 – 4.89)	1.0	2	0.756 (0.12 – 4.64)	1.0

Цел 3. Да се проучи корелацијата на концентрацијата на ДНК на ХПВ со цитолошкиот наод на пациентките

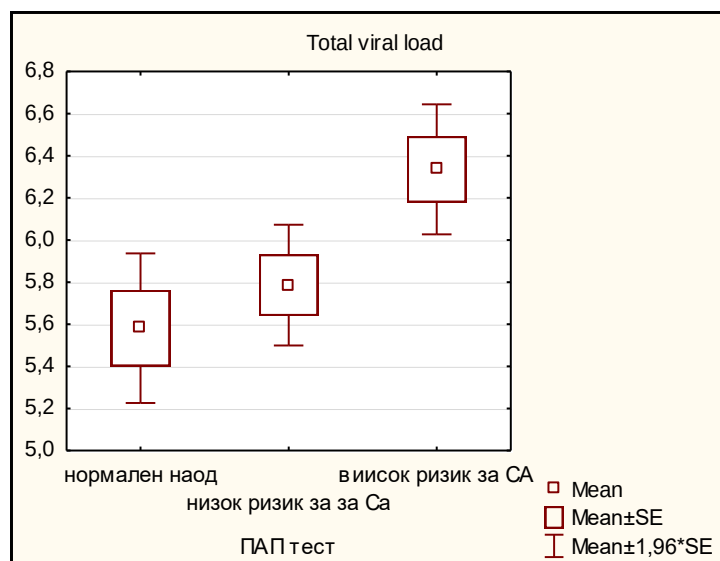
Концентрацијата на ДНК на ХПВ просечно изнесуваше $5.58 \pm 1.8 \log$ копии/ 10^5 клетки во групата пациентки со нормален цервикален наод, $5.78 \pm 1.6 \log$ копии/ 10^5 клетки во групата со нискоризична цервикална лезија, и највисока, од $6.34 \pm 1.4 \log$ копии/ 10^5 клетки беше во групата со високоризична цервикална лезија.

За $p = 0.013$ се потврди вкупна статистичка сигнификантна разлика во концентрацијата на ДНК на ХПВ во зависност од цитолошкиот наод. Post-hoc анализата за меѓугрупни компарации покажа дека оваа вкупна сигнификантност се должи на значајно повисока вирусна концентрација во клетките кај пациентките со цервикална лезија со висок ризик за појава на карцином во однос на пациентките со нормален цитолошки наод ($p = 0.015$).

Табела 35. Концентрација на ДНК на ХПВ во зависност од цитолошкиот наод

варијабла	статистички параметри - Total viral load				p-level
	n	mean $\pm$ SD	min - max	median(IQR)	
1. Нормален Пап тест	96	5.58 ± 1.8	0.3 – 9.5	5.55(4.45 – 6.9)	F = 8.72 $p = 0.013$ Post-hoc 1vs3 $p = 0.015$
2. Цервикални лезии со низок ризик од појава на карцином	120	5.78 ± 1.6	2 – 10.3	5.8(4.8 – 6.8)	
3. Цервикални лезии со висок ризик од појава на карцином	84	6.34 ± 1.4	2.4 – 9.6	6.2(5.35 – 7.35)	

F(Analysis of variance), post-hoc (Tukey honest test)



Слика 27. Разлика во дистрибуцијата на ниска, средна и висока вирусна концентрација на ДНК на ХПВ во зависност од цитолошкиот наод

Концентрацијата на ДНК на ХПВ ја анализираме и во 3 категории: ниска (≤ 3), средна (3.1 – 5) и висока (>5). Ниска вирусна концентрација беше измерена почесто кај пациентките со нормален цитолошки наод во споредба со пациентките со нискоризични и високоризични цервикални лезии (7.29% vs 5% vs 1.19%), умерена вирусна концентрација исто така почесто беше детектирана кај пациентките со нормален цитолошки наод во споредба со пациентките со нискоризични и високоризични цервикални лезии (32.29% vs 25.83% vs 19.05%), додека висока вирусна концентрација почесто беше измерена кај пациентките со високоризични цервикални лезии споредено со пациентките со нискоризични цервикални лезии и со нормален наод од ПАП тестот (79.76% vs 69.17% vs 60.42%).

На граница на статистичка сигнификантност беше тестираната разлика во дистрибуцијата на ниска, средна и висока вирусна ХПВ ДНК концентрација во зависност од цитолошкиот наод.

Табела 36. Корелација помеѓу концентрација на ДНК на ХПВ и цитолошкиот наод на ПАП тестот

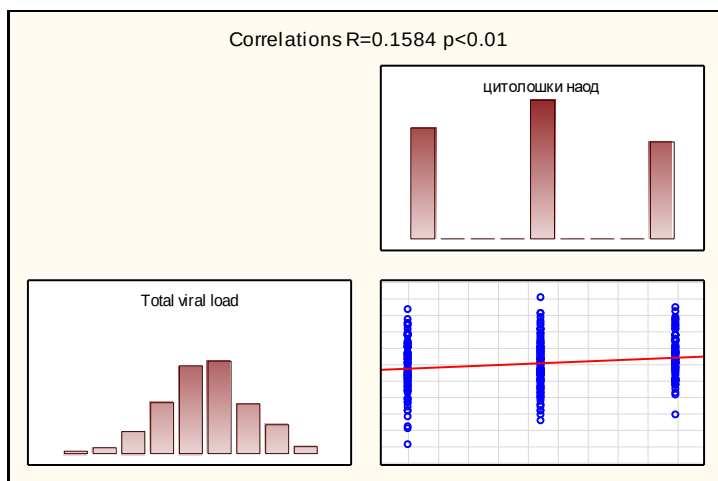
Концентрација на ДНК на ХПВ	N	ПАП тест			p-value
		нормален n(%)	нискоризични цервикални лезии n(%)	високоризични цервикални лезии n(%)	
≤ 3	14	7 (7.29)	6 (5)	1 (1.19)	Fisher's exact p=0.054
3.1 – 5	78	31 (32.29)	31 (25.83)	16 (19.05)	
>5	208	58 (60.42)	83 (69.17)	67 (79.76)	
вкупно	300	96	120	84	

Позитивна статистички сигнификантна корелација беше најдена помеѓу концентрацијата на ДНК на вирусот и цитолошкиот наод ($R = 0.1584$ $p = 0.006$).

Табела 37. Корелација помеѓу концентрацијата на ДНК на вирусот и цитолошкиот наод

КОРЕЛАЦИИ		
варијабла	Spearman R	p-level
Концентрација на ДНК на ХПВ & ПАП тест	0.1584	**0.006

**sig $p < 0.01$



Слика 28. Корелација помеѓу концентрацијата на ДНК на ХПВ и цитолошкиот наод од ПАП тестот

Во табела 38 прикажани се тип-специфичните вирусни оптоварувања кај поединечните ХПВ типови. Вирусното оптоварување беше најниско за ХПВ тип 35 (просечна ХПВ ДНК концентрација од $5.31 \pm 0.9 \log$ копии/ 10^5 клетки), највисоко за ХПВ тип 33 (просечна ХПВ ДНК концентрација од $7.02 \pm 1.2 \log$ копии/ 10^5 клетки).

Табела 38. Детектирана вирусна концентрација кај поединечните ХПВ типови

ХПВ тип	Концентрација на ДНК на ХПВ	
	mean $\pm$ SD	min - max
ХПВ 6	6.55 ± 1.5	2.9 – 8.8
ХПВ 16	6.0 ± 1.4	1.4 – 9.2
ХПВ 18	5.55 ± 1.9	2.0 – 9.2
ХПВ 31	6.25 ± 1.2	3.6 – 8.9
ХПВ 33	7.02 ± 1.2	5.3 – 9.2
ХПВ 35	5.31 ± 0.9	3.8 – 6.4
ХПВ 39	6.67 ± 1.9	2.6 – 9.3
ХПВ 44	5.98 ± 1.3	3.2 – 8.8
ХПВ 45	6.24 ± 1.4	4 – 8.8
ХПВ 51	6.30 ± 1.8	2.2 – 9.6
HPV 52	6.79 ± 1.3	4 – 9.5
ХПВ 53	6.10 ± 1.4	0.3 – 9.2
ХПВ 56	6.18 ± 1.5	2.7 – 8.5
ХПВ 58	5.90 ± 1.5	3.0 – 9.2

ХПВ 59	6.54 ± 1.6	3.5 – 10.3
ХПВ 66	6.12 ± 1.4	2.3 – 9.2
ХПВ 68	5.95 ± 1.6	2.9 – 9.2
ХПВ 73	5.64 ± 1.7	1.5 – 9.6
ХПВ 82	6.61 ± 0.9	5.0 – 5.8

Во табела 39 прикажана е корелацијата помеѓу тип-специфичното вирусно оптоварување со различните генотипови на ХПВ и цервикалниот цитолошки статус, односно, влијанието на концентрацијата на ХПВ на ДНК на цитолошката дијагноза.

Табела 39. Корелацијата помеѓу тип-специфичното вирусно оптоварување на различните генотипови на ХПВ и наодот на ПАП тестот

варијабла	цитолошки наод			p-value
		n	mean ± SD	
ХПВ 6	нормален	5	6.24 ± 1.9	F=0.865 p=0.438
	нискоризични	8	4.77 ± 1.5	
	високоризични	8	5.14 ± 2.4	
ХПВ 16	нормален	17	4.55 ± 1.4	F=4.96 **p=0.0098 нормален vs високоризични **p=0.0073
	нискоризични	33	5.49 ± 1.5	
	високоризични	21	6.03 ± 1.5	
ХПВ 18	нормален	4	5.30 ± 2.1	F=2.18 p=0.145
	нискоризични	10	4.30 ± 1.8	
	високоризични	5	2.96 ± 0.9	
ХПВ 31	нормален	19	5.23 ± 1.2	F=2.22 p=0.119
	нискоризични	16	5.43 ± 1.3	
	високоризични	18	6.07 ± 1.2	
ХПВ 33	нормален	4	5.65 ± 1.7	F=1.05 p=0.38
	нискоризични	8	6.42 ± 1.7	
	високоризични	3	4.97 ± 0.3	

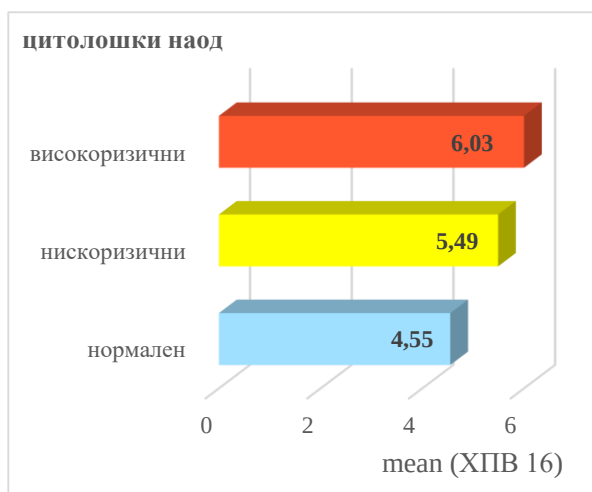
ХПВ 35	нормален	2	4.45 ± 1.6	F=0.39 p=0.69
	нискоризични	6	4.42 ± 0.5	
	високоризични	2	5.0 ± 0.8	
ХПВ 39	нормален	7	4.97 ± 2.1	F=0.2 p=0.82
	нискоризични	10	5.14 ± 1.9	
	високоризични	6	5.70 ± 2.6	
ХПВ 44	нормален	11	4.89 ± 1.2	F=3.68 *p=0.038 нискоризични vs високоризични *p=0.043
	нискоризични	12	5.02 ± 0.7	
	високоризични	9	3.87 ± 1.2	
ХПВ 45	нормален	5	4.84 ± 0.9	F=0.64 p=0.54
	нискоризични	8	5.09 ± 1.99	
	високоризични	6	4.03 ± 1.9	
ХПВ 51	нормален	12	5.08 ± 1.9	F=2.73 *p=0.048 нормален vs високоризични *p=0.026
	нискоризични	11	5.97 ± 2.1	
	високоризични	13	6.78 ± 1.4	
ХПВ 52	нормален	11	6.35 ± 1.6	F=0.35 p=0.71
	нискоризични	13	6.06 ± 1.7	
	високоризични	7	5.76 ± 0.4	
ХПВ 53	нормален	15	4.71 ± 2.1	F=0.74 p=0.482
	нискоризични	19	5.37 ± 1.1	
	високоризични	8	5.01 ± 1.6	
ХПВ 56	нормален	10	6.01 ± 1.6	F=1.15 p=0.337
	нискоризични	6	4.80 ± 1.9	
	високоризични	6	5.33 ± 0.9	
ХПВ 58	нормален	3	3.67 ± 1.2	F=0.77 p=0.48
	нискоризични	11	4.84 ± 1.6	
	високоризични	4	4.45 ± 1.1	

ХПВ 59	нормален	12	4.48 ± 1.9	F=2.466 p=0.105
	нискоризични	8	5.75 ± 2.2	
	високоризични	8	6.30 ± 1.3	
ХПВ 66	нормален	14	5.91 ± 1.2	F=3.76 *p=0.0475 нискоризични vs високоризични *p=0.0252
	нискоризични	18	5.08 ± 1.4	
	високоризични	10	6.33 ± 1.4	
ХПВ 68	нормален	12	5.04 ± 1.4	F=4.83 **p=0.0079 нормален vs нискоризични *p=0.033
	нискоризични	10	3.87 ± 0.9	
	високоризични	5	4.94 ± 1.1	
ХПВ 73	нормален	9	3.91 ± 1.5	F=3.01 *p=0.043 нормален vs високоризични *p=0.024
	нискоризични	6	4.72 ± 1.5	
	високоризични	7	5.94 ± 1.9	
ХПВ 82	нормален	4	5.77 ± 1.4	F=0.09 p=0.91
	нискоризични	5	5.44 ± 1.9	
	високоризични	2	5.20 ± 0.6	

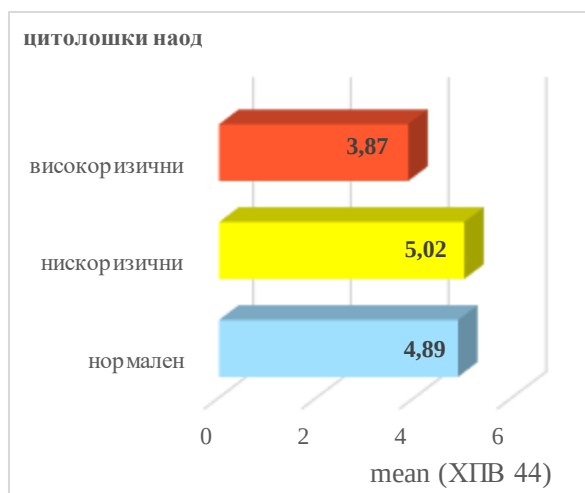
F(Analysis of Variance; post hoc Tukey honest test)

*sig p<0.05, **sig p<0.01

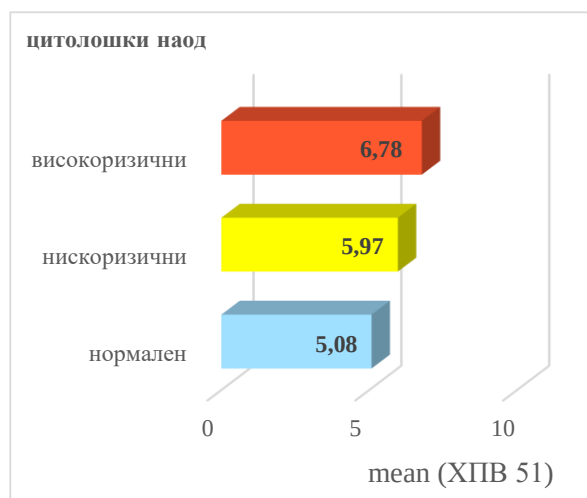
Согласно добиените резултати, вкупна статистичка сигнификантна разлика во вирусното оптоварување меѓу различните цитолошки дијагнози беше добиена за ХПВ тип 16 (p = 0.0098), тип 44 (p = 0.038), тип 51 (p = 0.048), тип 66 (p = 0.0475), тип 68 (p=0.033) и тип 73 (p=0.043). Post-hoc анализата за меѓугрупните споредби презентира значајно повисока вирусна концентрација кај високоризичните лезии во споредба со нормалните наоди за ХПВ тип 16 (6.03 ± 1.5 vs 6.03 ± 1.5 , p=0.0073), значајно повисока вирусна концентрација кај нискоризичните во споредба со високоризичните лезии за ХПВ тип 44 (5.02 ± 0.7 vs 3.87 ± 1.2 , p=0.043), значајно повисока вирусна концентрација кај високоризичните лезии во споредба со нормалните наоди за ХПВ тип 51 (6.78 ± 1.4 vs 5.08 ± 1.9 , p=0.026), значајно повисока вирусна концентрација кај високоризичните лезии во споредба со нискоризичните лезии за ХПВ тип 66 (6.33 ± 1.4 vs 5.08 ± 1.4 , p=0.025), значајно повисока вирусна концентрација кај нормалните наоди во споредба со нискоризичните лезии за ХПВ тип 68 (5.04 ± 1.4 vs 3.87 ± 0.9 , p=0.033), и, значајно повисока вирусна концентрација кај високоризичните лезии во споредба со нормалните наоди за ХПВ тип 73 (5.94 ± 1.9 vs 3.91 ± 1.5 , p=0.024).



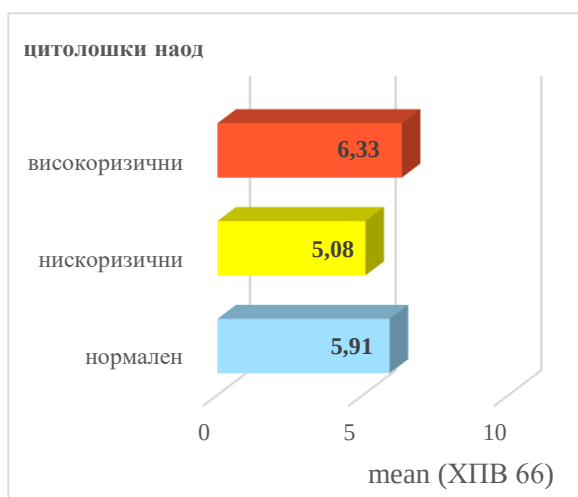
Слика 29.



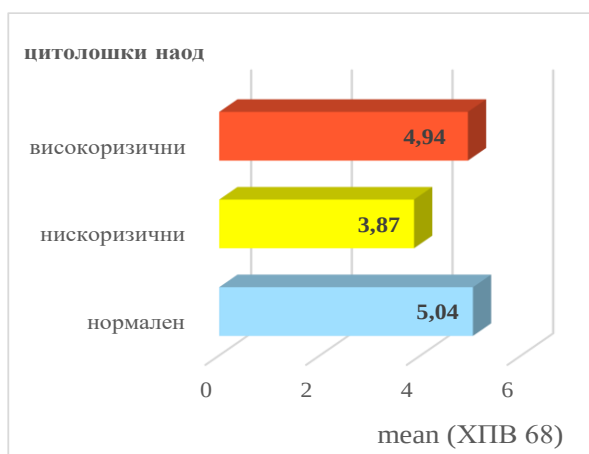
Слика 29а.



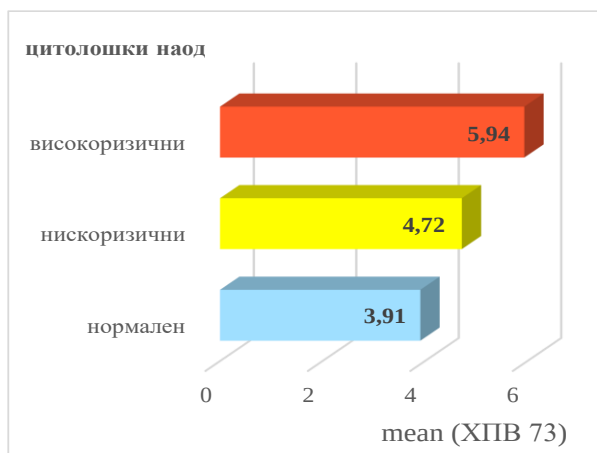
Слика 29б.



Слика 29в



Слика 29г.



Слика 29д

Слики од 29 до 29г. Корелацијата помеѓу тип-специфичното вирусно оптоварување со генотиповите 16, 44, 51, 66, 68 и 73 на ХПВ во однос на цитолошкиот наод на ПАП тестот

Цел 4: Да се направи разлика помеѓу квалитативниот и квантитативниот состав на вагиналниот микробиом на жени со ХПВ инфекција споредено со микробиомот кај жени без ХПВ инфекција и да се оцени влијанието на вагиналниот микробиом во спречување на ХПВ инфекција

Во студијата, за четвртата цел, беа вклучени вкупно 50 пациентки, кај кои, покрај тоа што беше тестирано присуство на 21 тип на ХПВ, дополнително беше анализиран квалитативниот и квантитативниот состав на вагиналниот микробиом. Тие беа поделени во две групи. Во едната група влегоа пациентки, кај кои при ХПВ тестирањето не беше детектирана инфекција со ХПВ, а другата група ја сочинуваа пациентки со докажана ХПВ инфекција.

Квалитативниот состав на вагиналниот микробиом сигнификантно се разликуваше во зависност од ХПВ статусот ($p = 0.00311$).

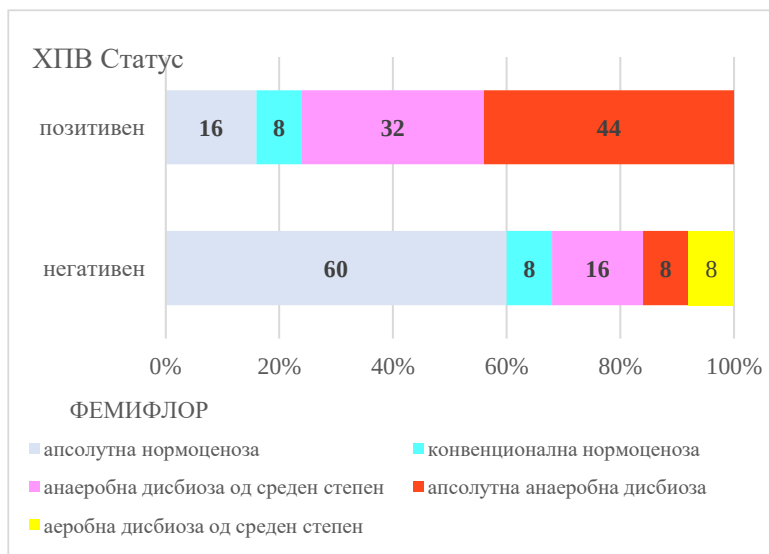
Споредбата на пациентките со и без ХПВ инфекција во однос на поединечните варијанти на микробиомот презентира сигнификантно почеста застапеност на апсолутна нормоценоза кај пациентките без ХПВ инфекција (60% vs 16%, $p=0.0014$), идентична застапеност на конвенционална нормоценоза кај пациентките со и без ХПВ инфекција (8% поединечно), несигнификантно почеста застапеност на анаеробна дисбиоза од среден степен кај пациентките со ХПВ инфекција (32% vs 16%, $p = 0.18$), сигнификантно почеста застапеност на апсолутна анаеробна дисбиоза кај пациентките со ХПВ инфекција (44% vs 8%, $p = 0.0037$), и, несигнификантно почеста застапеност на аеробна дисбиоза од среден степен кај пациентките без ХПВ инфекција (8% vs 0%, $p = 0.15$).

Табела 40. Споредбата на пациентките со и без ХПВ инфекција во однос на поединечните варијанти на микробиомот

ФЕМИФЛОР	ХПВ Статус			p-value	difference test
	n	позитивен n(%)	негативен n(%)		
апсолутна нормоценоза	19	4 (16)	15 (60)	$X^2=15.93$ $**p=0.00311$	$**p=0.0014$
конвенционална нормоценоза	4	2 (8)	2 (8)		
анаеробна дисбиоза од среден степен	12	8 (32)	4 (16)		$p=0.18$
апсолутна анаеробна дисбиоза	13	11 (44)	2 (8)		$**p=0.0037$
аеробна дисбиоза од среден степен	2	0	2 (8)		$p=0.15$

X^2 (Pearson Chi-square)

$**\text{sig } p<0.01$



Слика 30.
Квалитативен состав
на вагиналниот
микробиом во
зависност од ХПВ
статусот

Во оваа кохорта на пациентки беа изолирани 13 видови на бактерии: *Enterobacteriaceae*, *Lachnobacterium spp.* + *Clostridium spp.*, *Mobiluncus spp.* + *Corinebacterium spp.* и *Peptostreptococcus spp.* поединечно кај 2 пациентки, *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.* и *Mycoplasma hominis* поединечно кај една пациентка, *Gardnerella vaginalis* + *Prevotella bivia* + *Porphiromonas spp.* кај 22 пациентки, *Eubacterium spp.* кај 16 пациентки, *Magasphaera spp.* + *Veillonella spp.* + *Dialister spp.* и *Sneathia spp.* + *Leptotrichia spp.* + *Fusobacterium spp.* поединечно кај 7 пациентки, *Atopobium vaginae* кај 11 пациентки и *Ureaplasma (urealyticum + parvum)* кај 4 пациентки.

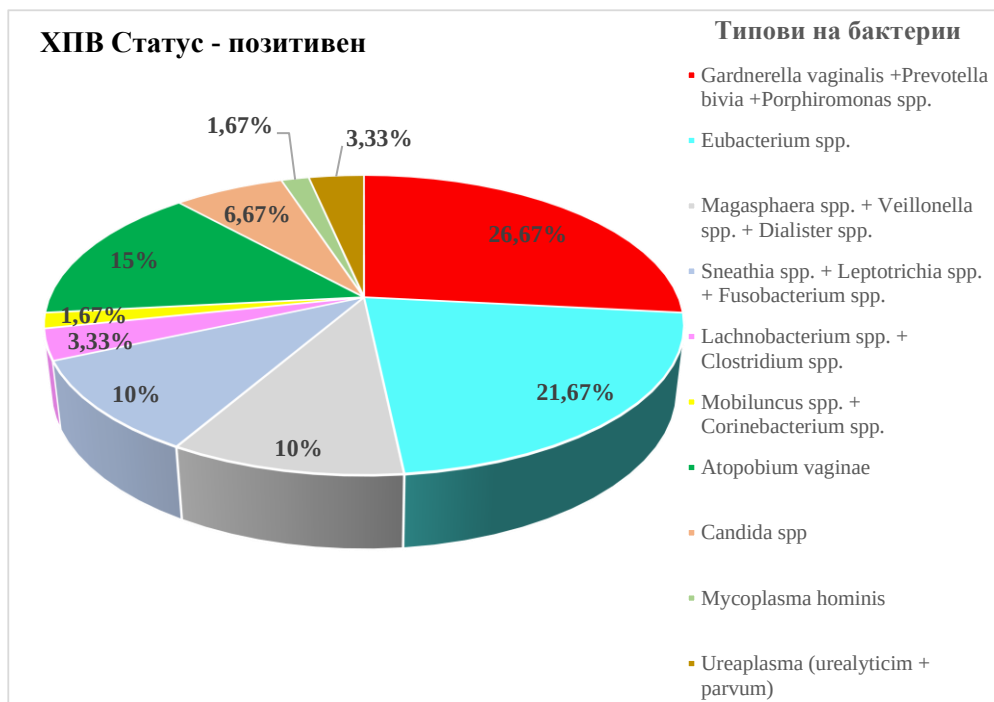
Enterobacteriaceae, *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.* и *Peptostreptococcus spp.* беа присутни само кај ХПВ негативните пациентки; *Lachnobacterium spp.* + *Clostridium spp.* и *Mycoplasma hominis* само кај ХПВ позитивните пациентки. Сигнификантна асоцијација беше најдена помеѓу ХПВ статусот и *Gardnerella vaginalis* + *Prevotella bivia* + *Porphiromonas spp.*, *Eubacterium spp.*, *Magasphaera spp.* + *Veillonella spp.* + *Dialister spp.* и *Sneathia spp.* + *Leptotrichia spp.* + *Fusobacterium spp.* ($p=0.0044$, $p=0.0024$, $p=0.049$, $p=0.049$, соодветно). Сите овие видови бактерии значајно почесто беа изолирани кај пациентките со ХПВ инфекција: *Gardnerella vaginalis* + *Prevotella bivia* + *Porphiromonas spp.* кај 64% vs 24%, *Eubacterium* кај 52% vs 12%, *Magasphaera spp.* + *Veillonella spp.* + *Dialister spp.* кај 24% vs 4%, и, *Sneathia spp.* + *Leptotrichia spp.* + *Fusobacterium spp.* кај 24% vs 4%.

Табела 41. Квалитативниот состав на вагиналниот микробиом во зависност од ХПВ статусот

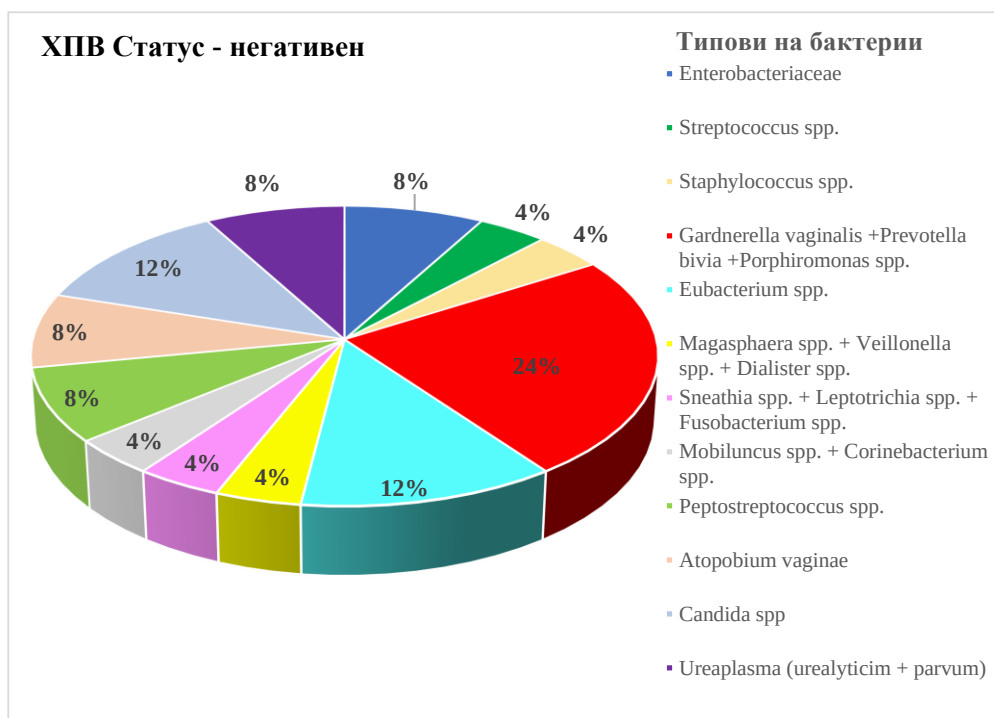
Типови на бактерии	ХПВ Статус			p-value
	n(%)	позитивен n(%)	негативен n(%)	
<i>Enterobacteriaceae</i>	2(4)	0	2(100%)	
<i>Streptococcus spp.</i>	1(2)	0	1(100%)	
<i>Staphylococcus spp.</i>	1(2)	0	1(100%)	
<i>Gardnerella vaginalis</i> + <i>Prevotella bivia</i> + <i>Porphiromonas spp.</i>	22(44)	16 (64)	6 (24)	$X^2=8.12^{**}p=0.0044$
<i>Eubacterium spp.</i>	16(32)	13 (52)	3 (12)	$X^2=9.19^{**}p=0.0024$
<i>Magasphaera spp.</i> + <i>Veillonella spp.</i> + <i>Dialister</i> <i>spp.</i>	7(14)	6 (24)	1 (4)	Fisher's exact*p=0.049
<i>Sneathia spp.</i> + <i>Leptotrichia</i> <i>spp.</i> + <i>Fusobacterium spp.</i>	7(14)	6 (24)	1 (4)	Fisher's exact*p=0.049
<i>Lachnobacterium spp.</i> + <i>Clostridium spp.</i>	2(4)	2(100)	0	
<i>Mobiluncus spp.</i> + <i>Corinebacterium spp.</i>	2(4)	1(50)	1(50)	
<i>Peptostreptococcus spp.</i>	2(4)	0	2(100)	
<i>Atopobium vaginae</i>	11(22)	9 (37.5)	2 (8)	Fisher's exact*p=0.018
<i>Candida spp</i>	7(14)	4 (16)	3 (12)	Fisher's exact p=1.0
<i>Mycoplasma hominis</i>	1(2)	1 (4)	0	
<i>Ureaplasma (urealyticum +</i> <i>parvum)</i>	4(8)	2 (8)	2 (8)	
ВКУПНО	85	60	25	

X^2 (Pearson Chi-square)

**sig p<0.01



Слика 31. Квантитативен состав на вагинален микробиом кај ХПВ позитивни жени



Слика 32. Квантитативен состав на вагинален микробиом кај ХПВ негативни пациентки

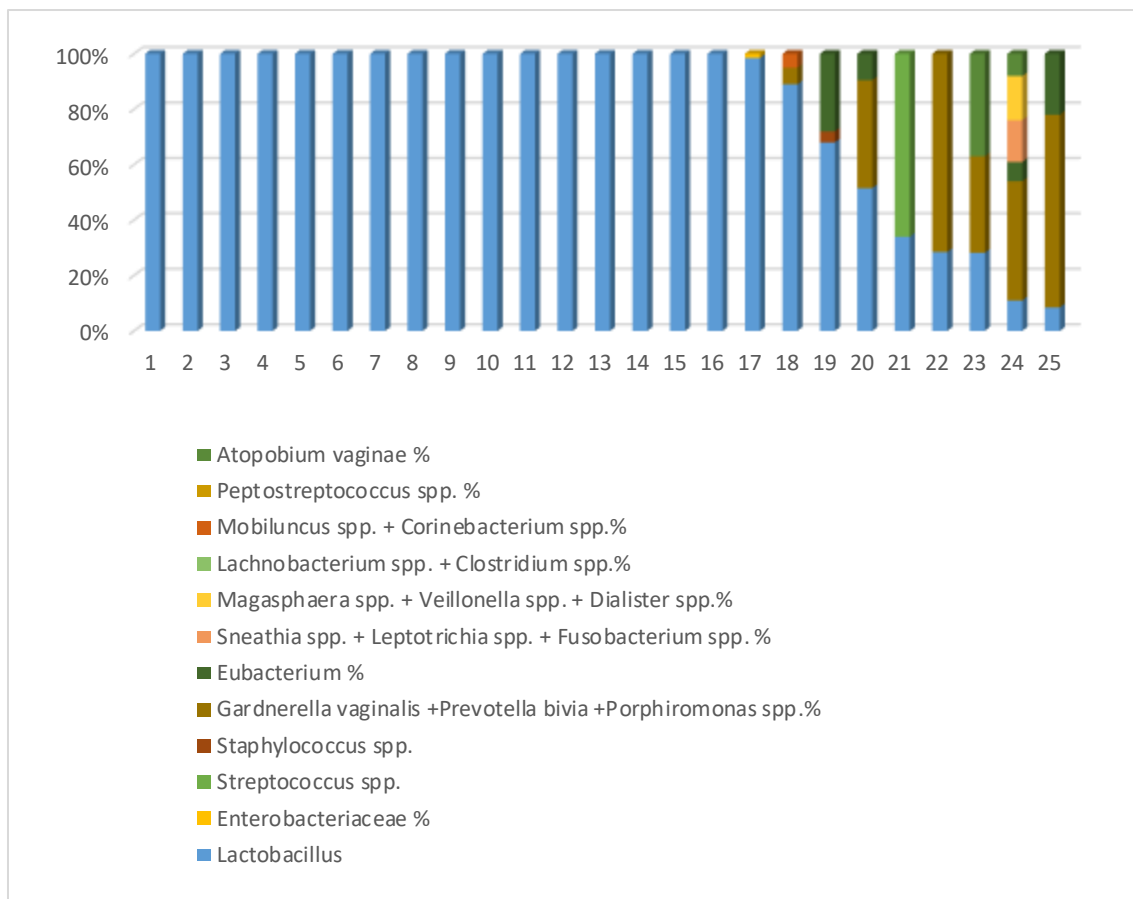
Во табела 42, прикажани се просечните и медијални количини изразени во геномски еквиваленти на милилитар на *Lactobacillus spp.* и 15 групи опортунистички микроорганизми кај жени со и без ХПВ инфекција.

Статистички сигнификантна разлика меѓу двете групи беше потврдена во однос на количината на *Lactobacillus spp.* ($p=0.03$), која се должи на значајно поголема количина кај ХПВ негативните (median=1.0 vs 0.587).

Табела 42. Просечните и медијални количини на *Lactobacillus spp* и 15 групи опортунистички микроорганизми кај жени со и без ХПВ инфекција.

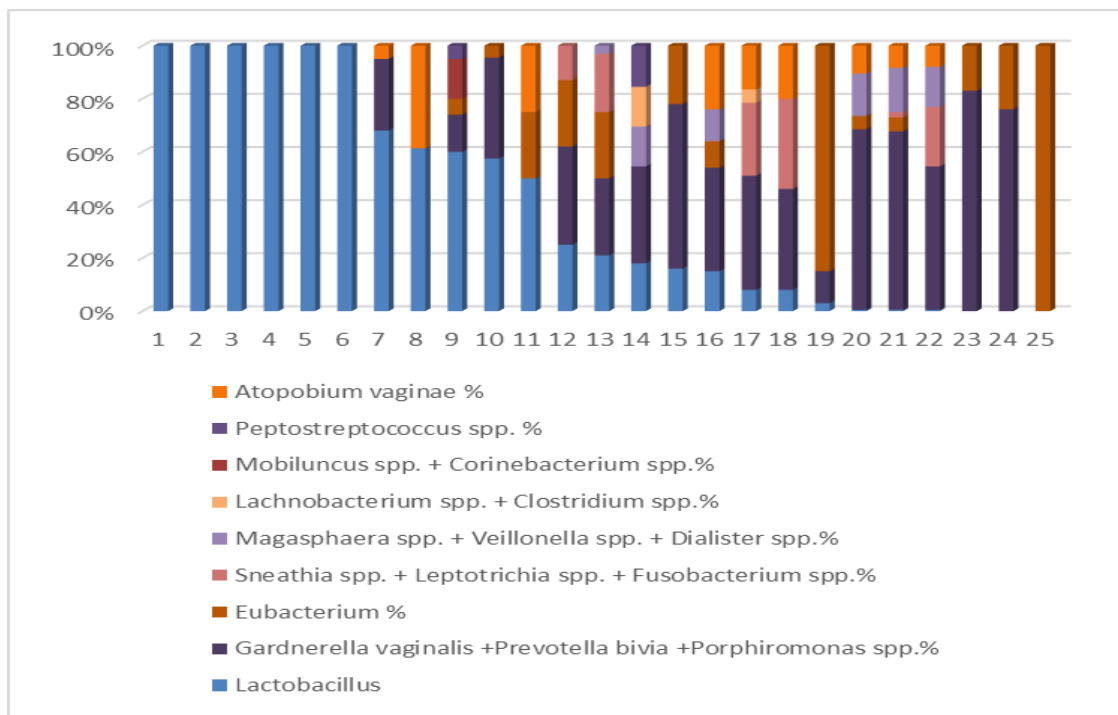
	N	mean	SD	min - max	median	p-level
ХПВ +						
<i>Lactobacillus</i>	22	2.55	6.66	0.005 – 25	0.587	0.03
<i>Enterobacteriaceae</i>	0					
<i>Streptococcus spp</i>	0					
<i>Staphylococcus spp.</i>	0					
<i>Gardnerella vaginalis</i> + <i>Prevotella bivia</i> + <i>Porphyromonas spp.</i>	16	42.71	23.73	0.38 – 83	38.5	0.238
<i>Eubacterium spp.</i>	13	26.85	30.64	0.045 - 100	22	0.31
<i>Sneathia spp.</i> + <i>Leptotrichia spp.</i> + <i>Fusobacterium spp.</i>	6	20.17	11.27	2 – 34	22.25	
<i>Magasphaera spp.</i> + <i>Veillonella spp.</i> + <i>Dialister spp.</i>	6	12.83	5.04	3 – 16	15	
<i>Lachnobacterium spp.</i> + <i>Clostridium spp.</i>	2	10.0	7.07	5 – 15	10	
<i>Mobiluncus spp.</i> + <i>Corinebacterium spp.</i>	1	15				
<i>Peptostreptococcus spp.</i>	2	10.25	7.42	5 – 15.5	10.25	
<i>Atopobium vaginae</i>	9	17.72	10.44	5 – 38.5	16.5	1.0
ХПВ -						
<i>Lactobacillus</i>	25	2.15	6.64	0.085 – 34	1.0	0.03
<i>Enterobacteriaceae</i>	2	14.75	18.74	1.5 – 28	14.75.	

<i>Streptococcus spp</i>	1	66				
<i>Staphylococcus spp.</i>	1	4				
<i>Gardnerella vaginalis</i> + <i>Prevotella bivia</i> + <i>Porphyromonas spp.</i>	6	25.68	28.10	0.39 69.5 –	20.25	0.238
<i>Eubacterium spp.</i>	3	9.69	11.19	0.095 – 22	7.0	0.31
<i>Sneathia spp.</i> + <i>Leptotrichia spp.</i> + <i>Fusobacterium spp.</i>	1	15				
<i>Magasphaera spp.</i> + <i>Veillonella spp.</i> + <i>Dialister spp.</i>	1	16				
<i>Lachnobacterium spp.</i> + <i>Clostridium spp.</i>	0					
<i>Mobiluncus spp.</i> + <i>Corinebacterium spp.</i>	1	5.0				
<i>Peptostreptococcus</i> <i>spp.</i>	0					
<i>Atopobium vaginae</i>	2	22.0	19.79	8 – 36	22	1.0



Слика 33. Квалитативниот состав на вагиналниот микробиом кај ХПВ негативни пациентки

Столбестите графикони (слика 33 и слика 34) ја прикажуваат пропорцијата на доминантните видови во секој примерок, односно на патогени видови и лактобацили, како што е наведено во легендата.



Слика 34. Релативна застапеност (%) на испитувани микроорганизми кај ХПВ позитивни пациентки

Наодите од нашата студија прикажани на слика 33 и слика 34 сугерираат дека *Lactobacillus spp.* преовладува во ВМ во различните кохорти, односно *Lactobacillus* останува најзастапениот род кај ХПВ-позитивните и ХПВ-негативните лица. Сепак, резултатите покажуваат тренд на зголемување на бактериската разновидност кај ХПВ-инфицираните жени, при што диверзитетот на видовите, особено на анаеробните бактерии, беше значително поголем кај ХПВ-позитивните пациенти во споредба со ХПВ-негативните. Забележано беше зголемено присуство на опортунистички и патогени бактерии, како што се *Gardnerella vaginalis*, *Eubacterium spp.* и *Atopobium vaginae*, кои беа значително почести кај ХПВ-позитивните пациентки ($p = 0.0044$, 0.0024 и 0.018 , соодветно). Ова ги поддржува тврдењата дека доминацијата на анаеробни бактерии може да придонесе за перзистенцијата на ХПВ инфекцијата и неговата улога во прогресија кон цервикална дисплазија.

6. Дискусија

Хуманиот папилома вирус (ХПВ) постои колку и самиот човечки род, исклучително е стабилен со мала тенденција за мутација. Најстарите докази за ХПВ инфекција потекнуваат од древен Египет. При аутопсија мумифицираното тело од пред повеќе од 3000 години, била утврдена брадавица на петата, што претставува доказ за една од првите видови на кожни лезии поврзани со вирусот. Брадавиците биле добро опишани во класичната грчка и римска медицинска литература: терминот „кондилома“ доаѓа од грчкиот збор „кондинос“ што значи „јазол“ или „издаденост“ и латинскиот збор „верука“ што значи папилома на стапалото. Постојат докази дека Хипократ има опишано третмани за брадавици, а во римско време, лекарите веќе препознавале дека брадавиците на гениталиите може да се пренесуваат сексуално, но не биле во можност да ја поврзат оваа инфекција со појавата на рак, особено затоа што карциномот на цервиксот бил релативно редок поради краткиот животен век на жените (1). Голем напредок во проучувањето на ХПВ и неговата врска со карциномот се случил во 1982 година, кога германскиот научник Харалд цур Хаузен го докажал присуството на ХПВ во примероци од цервикален карцином, за што добил Нобелова награда (4). Тој докажал дека специфични типови на ХПВ, како што се типовите 16 и 18, се главни причинители на карцином на цервиксот. Откритието дека ХПВ е главен причинител на рак на грлото на матката и на околу 20% од ракот на главата и вратот ги мотивираше научната и медицинската заедница да се фокусираат на овој вирус како значаен карциноген (1,2).

Хуманиот папилома вирус (ХПВ) е водечка причина за карцином на грлото на матката, одговорен за приближно 99% од случаите на глобално ниво. Според резултатите на Глобокан студијата, за 2022 година карциномот на грлото на матката е четврто најчесто малигно заболување кај жените во светот со 661.021 нови случаи на годишно ниво и 348.189 смртни случаи (5). Овие бројки рефлектираат значителни разлики помеѓу развиените и земјите во развој, при што земјите со низок и среден приход го носат поголемиот дел од товарот. Оваа нееднаквост главно се должи на ограничената достапност на вакцинација против ХПВ, скрининг за рак на грлото на матката и навремено лекување.

Европа претставува хетерогена слика за инциденцата и смртноста од карцином на грлото на матката, под влијание на разликите во програмите за скрининг, покриеноста со вакцинација и пристапот до здравствена грижа. Карциномот на грлото на матката е рангиран како деветта водечка причина за појава на рак кај жените во Европа со 58.169 нови случаи на годишно ниво и 25.989 смртни случаи од рак на грлото на матката (6).

Во Република Северна Македонија ракот на грлото на матката е трет најчест карцином, и четврта водечка причина за смртност од рак кај жени на возраст од 15

години до 44 години. Годишно во Република Северна Македонија се дијагностицираат околу 113 нови случаи на рак на грлото на матката со околу 62 смртни случаи (проценки за 2020 година).

Папилома вирусите според најновата класификација припаѓаат на фамилијата *Papillomaviridae*. Името на папилома вирусите доаѓа од латинскиот збор *papilla-mamila*, и грчкиот збор *ома* што значи тумор (2,3). Семејството *Papillomaviridae* е поделено на 39 родови, врз основа на идентичност на секвенцата L1. За да припаѓа на посебен род, потребна е 60% или поголема идентичност на секвенцата L1, при што секој род се обележува со буква од грчката азбука. Папиломавирусите (ПВ) во рамките на еден род кои споделуваат 60-70% идентичност на секвенцата L1 се нарекуваат видови. Понатаму, во рамките на еден вид, ПВ со 70-89% идентичност на секвенцата L1 се сметаат за типови. Од 2016 година, идентификувани се 225 различни типови на HPV, кои се категоризирани во пет родови, вклучувајќи: 65 *Alphapapillomaviruses*, 51 *Betapapillomaviruses*, 84 *Gamma papillomaviruses*, 4 *Mupapillomaviruses* и еден *Nupapillomavirus*. ХПВ со 90-98% идентичност на секвенцата L1 се нарекуваат подтипови, а оние со >98% идентичност се сметаат за варијанти. Родот алфа се смета за медицински најзначаен, бидејќи е поврзан со карцином на оралните, мукозните површини, како и со карциноми на аногениталниот тракт (13).

ХПВ е необвиткан ДНК вирус со тропизам за сквамозниот епител. Секоја вирусна честичка има икосаедрален капсид со пречник од околу 60 nm, кој содржи единечна молекула на двојно-верижна кружна ДНК со приближно 8,000 базни парови. Само една верига од геномот на двојно-верижната ДНК се користи како шаблон за транскрипција и оваа кодирачка верига содржи три геномски региони, кои вклучуваат околу ORFs (13). Раниот регион (E) содржи до седум ORFs кои кодираат вирусни регулаторни протеини и онкопротеини додека доцниот регион (L) ги кодира двата вирусни капсидни протеини. Третиот регион на геномот е познат како долга контролна област (LCR), горен регулаторен регион (URR) или некодирачки регион (NCR). Овој геномски регион содржи почеток на ДНК репликација, како и секвенции за контрола на транскрипција (13,21).

ХПВ ги инфицира само епителните клетки и зависи од нивниот животен циклус т.е. од нивната диференцијација. До клетките од базалниот слој на епителот ХПВ доаѓа најверојатно преку микроабрази на површината на епителот. Вирусната интернализација трае неколку часа, по што вирусната ДНК се ослободува од капсидот и се транспортира до јадрото како слободен генетски материјал или како екстрахромозомален епизом. По навлегувањето на вирусот во базалните епителни клетки се активира експресијата на раните гени E1 и E2. E1 протеинот е директно вклучен во репликацијата, додека E2 има помошна улога во репликацијата на ДНК и во латенцијата. E1 се врзува за местото од кое што започнува репликацијата на ДНК. После расплетување на синџирот на ДНК, доаѓа до препишување на иРНК и

синтеза на L1 и L2, протеините на капсидот. Репликацијата, како и склопувањето на нуклеокапсидот се одвиваат во јадрото. Ослободувањето на вирионот настанува десквамација на суперфицијалните (површинските) епителни клетки (21,32).

Инфекција со ХПВ може да има и друг тек, односно вирусниот геном може да се вгради во геномот на домаќинот во базалните клетки на плочестиот епител, во тој случај настанува перзистентна непродуктивна инфекција. Интеграцијата се случува во регионот E1 и E2 кој ги контролира E6 и E7 гените. Губење на контролата на овие гени индуцира нивна прекумерна експресија. E6 и E7 се толку многу ефикасни во блокирањето на негативните регулатори на клеточниот циклус што инфизираните клетки никогаш не матурираат. Клетките остануваат активно вклучени во прогресијата на клеточниот циклус, додека апоптозата е спречена. Како резултат се јавува генетска нестабилност која овозможува акумулација на генетски измени кои на крај доведуваат до малигна трансформација на клетката инфицирана со ХПВ. E6 и E7 ја започнуваат онкогенезата преку добро проучени интеракции со продуктите на туморски супресорни гени- TP53 за E6 и ретинобластома протеините за E7. TP53 има клучна улога во заштитата на интегритетот на генетскиот материјал со тоа што предизвикува апоптоза или стопирање на клеточниот циклус додека се поправаат грешките направени при репликација на ДНК. E6, раниот вирусен протеин, предизвикува деградација на TP53 со помош на убикининската патека, на тој начин спречувајќи ја апоптозата и овозможувајќи им на потенцијално трансформираниите клетки да се реплицираат (12,25,33). E7 придонесува за онкогенезата преку негова интеракција со членовите на ретинобластома фамилијата, RB1, RBL1 и RBL2, така наречените, џебни протеини. E7 ги врзува овие протеини и предизвикува нивна деградација (30,140). Како резултат на оваа активност, доаѓа до ослободување и активација на E2F факторите на транскрипција кои ја активираат експресијата на гените на S-фазата, вклучувајќи ги и оние кои ги кодираат циклините A и E, одговорни за синтеза на ДНК. E5 протеинот во корелација со E6 и E7 ја активира клеточната пролиферација и е кофактор во развој на малигна трансформација (141).

Развојот на карциномот не зависи само од ефикасната негативна регулација на контролните механизми на клеточниот циклус кои овозможуваат акумулација на генетски грешки, туку и од софистицираните техники на имунолошка евазија кои овозможуваат вирусот долг период да остане неоткриен. Кај папилома вирусната инфекција нема клеточна смрт, некроза или фаза на виремија која би била тригер фактор за антиинфламаторен одговор (35). Вирусните антигени може да се детектираат само на суперфицијалните (површинските) епителни клетки кои се десквамираат и се надвор од дометот на имунолошкиот систем (37).

Репликацијата на вирусот во диференцирачките клетки предизвикува клеточни промени, првенствено во долната третина од епителот, кои се карактеризираат со коилоцитна атипичност, нуклеарно зголемување, хиперхромазија и перинуклеарно

просветлување на цитоплазмата. Овие промени се познати како цервикална интраепителна неоплазија 1 (CIN 1) или сквамозна интраепителна лезија од низок степен (LSIL).

Приближно 90% од ХПВ инфекциите се елиминираат во рок од две години како резултат на природниот имунолошки одговор, што доведува до регресија на CIN 1 лезиите. Сепак, кај мал процент од инфицираните жени, перзистентната инфекција со онкогените типови на ХПВ доведува до развој на високостепени премалигни лезии и карцином. CIN 1 може да прогресира во CIN 2 (диспластични промени кои се прошируваат до средната третина на епителот) и потоа во CIN 3 (диспластични промени кои ги зафаќаат горните две третини од епителот) (49).

Потенцијалот за прогресија на различните степени на CIN кон повисоки степени и инвазивен карцином е проценет во повеќе лонгитудинални студии. Во мета-анализа на вакви студии, Остор и соработниците (50) забележале дека 60% од CIN 1 лезиите регресираат, 11% прогредираат во карцином *in situ* (епителна инвазија низ целата дебелина, но без инвазија во подлежащите ткива), а само 1% напредуваат во инвазивен карцином. Во истата анализа, кај 40% од CIN 2 и 33% од CIN 3 лезиите била забележана регресија, додека 5% од CIN 2 и 12% до 30 % од CIN 3 лезиите биле проценети дека ќе напредуваат во инвазивен карцином.

За повеќето жени, ХПВ инфекциите се минливи и спонтано се отстрануваат од домаќинот без интервенција или клинички последици. Но сепак, 5-10% од ХПВ инфекциите не можат да се елиминираат, и тие стануваат перзистентни инфекции кои можат да предизвикаат карцином на грлото на матката. Тешко е да се предвиди дали ХПВ инфекцијата спонтано ќе исчезне или ќе доведе до малигна трансформација. Се смета дека различни фактори, како возраст, висок паритет, употреба на орална контрацепција, пушење цигари, степен на лезија, генотип на ХПВ, вирусно оптоварување и ко-инфекција со вирусот на хумана имунодефициенција ја зголемуваат можноста за појава на перзистентна инфекција и последователна прогресија во карцином.

Цел 1. Да се испита корелацијата помеѓу инфекциите предизвикани со еден или повеќе типови на ХПВ со возраста на пациентките

Анализа на податоците од литературата сугерираат дека преваленцата на инфекцијата со ПП-ХПВ и цитолошките абнормалности опаѓаат постојано и паралелно со возраста (56,57,62,66,67). За споредба, има и податоци кои укажуваат дека кривата на преваленца на инфекции предизвикани со повеќе типови на ХПВ истовремено во однос со возраста има два пика, еден повисок кај помладата популација (<29 години), и друг понизок кај жените на возраст од 50-59 години (68,69).

Pista et al. во студија на 1057 жени од Португалија дава податок дека инфекции со ПП-ХПВ биле детектирани почесто кај жени помлади од 30 години (35.3%) кои

имале поголемо ниво на сексуална активност. Поточно помладата возраст почесто била асоцирана со зголемен процент на мултипли инфекции, а обратната корелација се должи на развој на стекнат имунитет во тек на животот (66).

Корелацијата помеѓу возраста и преваленцата на инфекцијата со ХПВ е добро документирана и во студијата на Tekkesm et al. Резултатите го потврдуваат инверзниот однос помеѓу возраста и бројот на детектирани ХПВ генотипови по инфекција. Помладите жени, особено оние под 31 година, покажале највисока преваленца на инфекција со ХПВ, со стапка од 45% (67). Исти епидемиолошки податоци дава и студијата на Salazar et al., во која средната возраст на пациентките била 36.5 години. Највисок процент на инфекција со ПТ-ХПВ кај жени на возраст од 20-29 години кој градиентно опаѓал со зголемување на возраста (57).

Интересно, во студијата на Resende et al. кај 328 жени од Бразил, најдено било дека преваленцата на инфекции предизвикани со ПТ-ХПВ покажала бимодална дистрибуција со пикови кај најмладите, помали од 29 години и кај тие на возраст од 50 до 59 години. Инфекциите со ПТ-ХПВ биле најчести кај жени на возраст под 29 години. Кај возрасната група од 40-49 години преовладувале инфекции со ЕТ-ХПВ. Потоа се случува уште една промена кај жените од 50-59 години во корист на инфекции со ПТ-ХПВ, за кај жените над 60 години нивната преваленца да се намали повторно (69).

Donnikov et al. во студија на 32650 жени од различни региони од Русија кај кои биле тестирани за присуство на 21 тип на ХПВ докажал дека најголем процент од пациентките со инфекција со ПТ-ХПВ бил најден кај жени на возраст помлади од 25 години и меѓу 55-60 години. Најчесто изолиран ХПВ тип бил 16 најден кај 25.6% од жените. Процентот на јавување на инфекциите со ПТ-ХПВ имал тенденција на намалување кај жените од возрасната група од 40-45 години за повторно да се зголеми од 45-60 години (68). Како можни причини за оваа слика се наведуваат започнување на сексуални односи на 21 година и друга причина е тоа што можно е да се разликуваат мотивите за барање на лекарски преглед во разни периоди од животот. Возрасните пациентки со симптоми почесто бараат лекарски преглед од пациентките од помладите демографски групи, кои бараат лекарска помош обично за репродуктивни проблеми и контрацепција, ова го објаснува присуството на двата различни пикови.

Резултатите од нашата студија се совпаѓаат со податоците од судиите на Resende et al. и Donnikov et al.. При анализа на резултатите од нашата студија односно при споредбата на зачестеноста на преваленцата на ХПВ инфекции предизвикани со еден и ко-инфекции со повеќе типови меѓу одделните возрасни категории, беше детектирана сигнификантно повисока преваленца на инфекција предизвикана со повеќе ХПВ типови истовремено кај пациентките од најмладата и најстарата возрасна група, односно на возраст од 24 години и помлади, и на возраст помеѓу 55 и 64 години (14.37% vs 24.6%, $p=0.025$; и, 1.72% vs 6.35%, $p=0.035$, соодветно), а

сигнификантно повисока преваленца на инфекции предизвикани со еден тип на ХПВ во возрастната група 45-54 години (16.67% vs 4.76%, $p=0.0015$).

Наодите од студијата на Iacobone et al. ја потврдуваат инверзната корелација меѓу возраста на пациентките и хистолошкиот степен на цервикалните лезии. Iacobone потенцира уште еден важен податок, дека почетокот на CIN се јавува порано од врвот на инциденцата на инвазивен цервикален карцином, што е во согласност со природниот тек на ХПВ карциногенезата (56). Во нашата студија беше најдено дека при споредбата на поединечните возрасни групи меѓу пациентите со негативен и позитивен ПАП тестот покажа сигнификантно почест нормален цитолошки наод во најмладата возрасна група (34.42% vs 10.78%, $p=0.0000$); слична застапеност на негативни и позитивни резултати кај возрасните групи 25-34 и 55-64 години (36.46% vs 37.25%, $p=0.89$ и 5.21% vs 2.94%, $p=0.33$, соодветно); сигнификантно почест позитивен тест во возрасните групи 35-44 и 45-54 години (34.31% vs 17.71%, $p=0.0031$ и 14.71% vs 5.21%, $p=0.0168$, соодветно).

Овој заклучок го потврдува и студијата на Wang et al. во регионот на делтата на реката Јанг-це, според која било докажано дека инфекциите предизвикани со ПТ-ХПВ се почести кај помлади, сексуално активни жени. Дополнително возрастната група во која начесто се јавувал цервикален карцином била помеѓу 40 и 54 години, додека за појава CIN била помеѓу 30 и 39 години. Во просек, врвната возраст за појава на CIN била 5–10 години порано од онаа за цервикален карцином (142). Студијата дава интересен податок за статистички значајна поврзаност меѓу ХПВ тип 33 и зголемување на возраста, што сугерира дека постои потенцијална предиспозиција на одредени типови можат да перзистираат подолго кај постарата популација или да станат позастапени поради промени во имунолошкиот надзор и хормонални промени поврзани со стареењето.

Резултатите од нашата студија покажаа дека статистичка сигнификантна разлика беше најдена во просечната возраст на пациентките со/без ХПВ инфекција со тип 31 ($p=0.03$), тип 59 ($p=0.0083$) и тип 73 ($p=0.0022$). Поточно, пациентките со ХПВ инфекција со тип 31 беа сигнификантно постари од пациентките кај кои овој генотип не беше детектиран (37.0 ± 10.6 vs 33.8 ± 9.5), пациентките со ХПВ инфекција со тип 59 беа сигнификантно помлади од пациентките кај кои овој генотип не беше детектиран (29.7 ± 8.5 vs 34.9 ± 9.8), и пациентките со ХПВ инфекција со тип 73 беа сигнификантно помлади од пациентките кај кои овој генотип не беше детектиран (28.3 ± 8.8 vs 34.9 ± 9.7).

Интересен податок дава Kovacic et al. во студија на 1222 жени со единечна ХПВ инфекција. Во студијата е најдено дека процентот на цитолошки абнормалности за повеќето ВР-ХПВ типови рапидно се намалува кај постарите возрасни групи жени (>54 години) во споредба со било која група од помладите. Иако само 22,6% од постарите жени со ХПВ-16 инфекција имале цитолошки абнормалности, четири од пет жени имале дијагноза HSIL или полоша. Соодветно, кај истата возрасна

популација, 50% од жените со цитолошки абнормалности заради присуство на останатите ВР-ХПВ типови кои припаѓаат на видовите $\alpha 9/\alpha 11$ имале дијагноза HSIL или полоша, додека ниту една од жените инфицирани со НР-ХПВ типови од $\alpha 1/\alpha 8/\alpha 10/\alpha 13$ и $\alpha 3/\alpha 15$ видовите немале дијагноза HSIL или полоша.

Доколку присуството на ХПВ предизвикува појава на абнормалности кај жените од сите возрасни групи, би очекувале еквивалентен процент на цитолошки абнормалности кај ХПВ позитивните жени од сите возрасни групи. Спротивно на тоа, актуелните податоци покажуваат дека процентот на жени со ЕТ-ХПВ инфекција кои покажале цитолошки абнормалности бил приближно ист кај жени <35 и од 35-45 години, а сигнификантно понизок кај жени од возрасната група >54 години (62).

Бројни механизми поединечно придонесуваат за намалување на ризикот од цитолошки абнормалности кај повозрасни групи жени (>54 години). Пример, промената на нивото на хормони кај повозрасните жени доведува до атрофија и смена на сквамозен епител, т.е. епителот од зоната на трансформација со вагинален сквамозен епител. Краен резултат на овие промени е присуство на клетки кои се помалку подложни на ХПВ индуцирани цитопатолошки промени т.е. вагиналниот епител има предилекција за НР-ХПВ типови. Интересен е фактот што кај жени од возрасната група >54 години било забележано отсуство на LSIL. Ова авторот го објаснува со тоа што поради атрофија на епителот кај повозрасните жени се среќаваат само субтилни цитолошки промени со неколку коилоцити на видно поле.

Цел 2. Да се испита преваленцата на инфекции предизвикани со еден или повеќе типови на ХПВ, во однос на цитолошкиот наод на пациентките

До денес нема консензус дали инфекциите со ПТ-ХПВ се јавуваат спонтано или преку компетитивна или кооперативна релација. Испитувањата покажаа дека инфекции со ПТ-ХПВ се јавуваат почесто отколку случајно. Од оваа перспектива некои студии сугерираат кај ХПВ инфекциите во цервикалната карциногенеза повеќето типови меѓу себе делуваат синергистички. Пример Trotier et al. докажале дека типовите ХПВ 51, 52, 56 и 58 можат да соработуваат со ХПВ 16 во предизвикување на кој било SIL или карцином (143). Dickson et al. покажале дека ХПВ 52, 53, 81 и 83 почесто се јавуваат кај инфекции со ПТ-ХПВ, додека ХПВ 16, 58 и 66 поретко се јавуваат во инфекции заедно со другите ХПВ типови (144).

Во студијата ја Chagas et al. каде е испитувана корелацијата помеѓу HSIL, LSIL и инфекции предизвикани со ЕТ-ХПВ и ПТ-ХПВ со типови кои се вклучени во вакцините и типови кои не се вклучени во вакцините, најдено било дека 42.7% од ХПВ позитивните жени имале инфекција со ЕТ-ХПВ, а 57.3% имале инфекција со ПТ-ХПВ. При калкулирање на поврзаност на SIL со присуство на ХПВ 16, 18, 58 и 56, најдено било дека инфекција со ЕТ-ХПВ со ХПВ 31 била статистички значајно поврзана со LSIL, додека ХПВ 31 кај инфекција со ПТ-ХПВ била поврзана со HSIL

и LSIL. Понатаму интересен е наодот каде жени со инфекција со ПТ-ХПВ 16/31/56 имале шест пати зголемен ризик од HSIL, а пет пати од LSIL, додека жени со инфекција со ПТ-ХПВ без ХПВ16/18 имале два пати зголемен ризик од HSIL и LSIL (52). Во модели на мултиваријабилна логистичка регресија каде биле земени во предвид и изложеноста на други фактори на ризик како што е сексуалното однесување, резултатите покажале дека жени со инфекција со ЕТ-ХПВ, со ХПВ 16 имале 23.6 пати зголемен ризик од HSIL кога инфекцијата е асоцирана со бројот на сексуални партнери (3-4 партнери). Исто така пациентките со коинфекција со ХПВ 31 и ХПВ 56 имале 4.5 пати и 10.9 пати зголемен ризик од HSIL соодветно (52).

Во студијата Chaturvedi et al., кај 2478 жени е анализирана интеракцијата помеѓу различните генотипови на ХПВ од $\alpha 9$ видот (ХПВ16, 31, 33, 35, 52 и 58) и нивниот збирен ефект врз прогресијата на цервикални заболувања. Доказите покажале дека коинфекција со повеќе $\alpha 9$ генотипови била поврзана со значително зголемен ризик од CIN2+. Сепак статистичките анализи не покажале значајни интеракции помеѓу типовите во зголемување на ризикот од CIN2+, кои би укажале на синергистичко зголемување на ризикот од CIN2 надвор од адитивниот ефект. Ова укажува дека ризикот поврзан со инфекции ПТ-ХПВ е приближно еднаков на збировите на ризиците од индивидуалните инфекции, а не е резултат на нивно засилување. Слични резултати биле забележани кај HSIL+ каде ниту еден од индексите на синергија не бил статистички значаен, што дополнително ја потврдува хипотезата дека инфекции со ПТ-ХПВ допринесуваат на адитивен, но не на експоненцијален начин кон ризикот од развој на цервикално заболување (53).

Согласно резултатите добиени во нашата студија, единечен генотип најчесто беше изолиран кај примероци од пациентки со нормален ПАП тест (59.38%), во однос на пациентки со цервикална лезија со низок (57.50%) и со висок ризик за појава на карцином (57.14%). За разлика од нив два типа најчесто беа изолирани кај примероци од пациентки со висок ризик од појава на карцином (23.81%), во однос на пациентки со низок ризик од појава на карцином (19.17%) и пациентки со нормален наод на ПАП тестот (18.75%). Но, при статистичката анализа на податоците не беше најдена сигнификантна разлика помеѓу испитуваните групи.

Na et al. направиле ретроспективна анализа на 400 пациентки со цервикален карцином, при што кај 67.7% била детектирана инфекција со ЕТ-ХПВ, кај 25.29% инфекција со два типа ХПВ, додека кај 7% инфекција со три и повеќе типови. Резултатите од студијата сугерираат дека нема значајна разлика меѓу инфекциите со ЕТ-ХПВ и ПТ-ХПВ во однос на патолошката класификација, ткивната диференцијација, FIGO стадиумот, големината на туморот. Ова укажува дека клиничкиот исход на карциномот не зависи исклучиво од бројот на ХПВ типови, туку од комплексната интеракција на повеќе фактори. Овие фактори вклучуваат дијагноза, стратегии за третман, биологија на туморот и интеграција на ХПВ во човечкиот геном, кои заедно влијаат врз прогресијата и прогнозата на заболувањето (54).

Во истражувањето на Iacobone et al се добија податоци дека инфекции со ПТ-ХПВ биле поврзани со значајно помал ризик од CIN2+ лезии, додека инфекции со ЕТ-ХПВ почести кај CIN 2-3 и цервикален карцином. Овие резултати ја подржуваат теоријата дека единечниот ХПВ генотип е главниот фактор во прогресијата на цервикалните лезии. Wang et al. исто така утврдија дека инфекции со ПТ-ХПВ не го зголемуваат ризикот од CIN 2 лезии (142).

Според напречно-пресечна студија на Salazar et al. жените со инфекции со ПТ-ХПВ имаат намалена стапка на високо ризични цервикални лезии во споредба со оние со инфекција со ЕТ-ХПВ. Интересно е што, според овие наоди, ризикот од цервикални лезии со висок ризик од појава на карцином бил највисок кај жени инфицирани со ЕТ-ХПВ и изнесувал 18.9%, додека кај оние со ПТ-ХПВ бил понизок, т.е. стапката на цервикални лезии со висок ризик од појава на карцином кај жени инфицирани со два типа ХПВ изнесувала 18.5%, а кај оние со три или повеќе типови паднала на 11% (57). Понатаму оваа студија покажа дека инфекција со ХПВ16/18 во комбинација со други ВР ХПВ типови била поврзана со пониска стапка на цервикални лезии со висок ризик од појава на карцином во споредба со единечните инфекции со ХПВ 16. Овој наод укажува на веројатноста дека постојат антагонистички интеракции помеѓу одредени генотипови, кои можат да ја намалат можноста за онкогена трансформација.

Спротивно на горенаведените тврдења постојат студии кои наведуваат дека инфекција со ПТ-ХПВ е поврзана со цервикални лезии. Schmitt et al. потврдиле дека инфекции со ПТ-ХПВ со високо вирусно оптоварување статистички значително се поврзани со цервикални лезии. Поточно инфекциите со ПТ-ХПВ со високо вирусно оптоварување најчесто биле поврзани со LSIL (62.6%) и HSIL (51.9%), а поретко со ASCUS (40.7%) и NILM(19.3%). Пациентките со инфекции со ПТ-ХПВ и високо вирусно оптоварување покажале 4- до 6- пати повисок ризик од појава на цервикални преканцерозни лезии од пациентките со ЕТ-ХПВ и високо вирусно оптоварување. Во споредба со пациентките со нормален цитолошки наод, инфекции со ПТ-ХПВ доколку биле следени со високо вирусно оптоварување, биле сигнификантно почесто асоцирани со цитолошки преканцерозни лезии. Сепак присуството на инфекција со ПТ-ХПВ не овозможи диференцијација меѓу цитолошки лезии со низок и со висок ризик од појава на карцином (145).

Resende et al. во студија на 328 жени со сквамозни и glandularни интраепителни лезии, кај 87% детектирал инфекција со ЕТ-ХПВ, а кај 52% инфекција со ПТ-ХПВ. При тоа најчесто изолиран тип бил ХПВ 16 кај 49% од жените, следен од ХПВ 58, 52, 31, 35 и 33, ХПВ 18 бил присутен само кај 8% од случаите. Инфекции со ПТ-ХПВ биле значајно почести кај жени со сквамозни во споредба со жени со glandularни лезии. Останува непознато дали ПТ-ХПВ се поврзани со зголемен ризик од сквамозни цервикални лезии. Во студијата не била најдена статистички

значајна разлика во преваленцата на инфекции со ЕТ-ХПВ или ПТ-ХПВ кај жени со CIN 1 во споредба со жени со CIN 2 (69).

Согласно резултатите добиени во нашата студија, единечен генотип на ХПВ (ЕТ-ХПВ) најчесто беше изолиран кај примероци од пациентки со нормален ПАП тест (59.38%), во споредба со пациентки со цервикална лезија со низок ризик (57.50%) и висок ризик за прогресија во карцином (57.14%). Наспроти тоа, ко-инфекција со повеќе ХПВ типови (ПТ-ХПВ) беше почесто детектирана кај пациентки со високоризични лезии (42.86%), отколку кај пациентки со лезии со низок ризик (42.50%) и со нормален наод од ПАП тестот (40.63%). Сепак, и покрај овие мали разлики во зачестеноста, не беше утврдена статистички значајна разлика помеѓу испитуваните групи.

При проценка на ризик од високо ризични цервикални лезии кај жени со инфекција со ПТ-ХПВ со цел да се образложи компетитивниот однос меѓу ХПВ генотиповите треба да се земе во предвид и имуниот одговор на домаќинот. ХПВ инфекцијата вообичаено создава неефикасни антители кај околу половина од инфицираните жени. Кај жени со ПТ-ХПВ, конкурентната инфекција со повеќе генотипови може колективно да индуцира локално поефикасен хуморален имун одговор, отколку единечна ХПВ инфекција. Алтернативно, слаб и неефикасен имун одговор поттикнат од секој тип посебно може заеднички да обезбеди посилен имунитет против ХПВ инфекција преку вкрстена имуна реакција со антители.

Цел 3. Да се проучи корелацијата на концентрацијата на ДНК на ХПВ со цитолошкиот наод на пациентките

Улогата на вирусното оптоварување со ХПВ, односно концентрацијата на ХПВ ДНК како предиктор за развој на цервикална неоплазија, и понатаму претставува значајна област на научно истражување. Се смета дека кај жени позитивни на високо-ризични типови на ХПВ, нивото на вирусно оптоварување може да придонесе за идентификација на оние со повисок ризик за развој на цервикални лезии во однос на оние со понизок ризик.

Податоците од литературата упатуваат дека вирусното оптоварување зависи од возраста на пациентките, хистолошкиот наод, инфекција предизвикана со повеќе типови на ХПВ истовремено, локализација на цервикалната лезија и методот на земање на примерок. Lu и соработниците нашле дека вирусното оптоварување било значително повисоко доколку примерокот бил земен од екто- и ендоцервикс истовремено во споредба со примероците земени само од ендоцервикс (61).

Во обид да се утврди дали вирусно оптоварување со одредени ХПВ генотипови може да се користи како индикатор за тријажа на ризик од појава на свамозни интраепителни лезии од висок степен, Dong et al. докажале дека постои позитивна корелација помеѓу вирусното оптоварување на ХПВ 16, 31, 33, 52 и 58 и тежината на цервикалната лезија. Поточно, вирусното оптоварување било сигнификантно

повисоко кај пациенти со $\geq$ HSIL, додека вирусното оптоварување на ХПВ18, 45, 56, 59 не било поврзано со тежината на цервикалната лезија (63).

За подобро да го предвидат ризикот од LSIL на цервиксот на матката кај жени со ХПВ, Но et al. во лонгитудинална студија го мереле вирусното оптоварување на ХПВ16, 18, 52 и 58 во две точки, на 1 и 6 месеци. При тоа нашле дека жените со LSIL кај кои било докажано зголемување на вирусното оптоварување по 6 месеци имале 45% зголемен ризик од појава на HSIL тестирано со Real time PCR. Од добиените резултати Но и соработниците заклучиле дека со евалуација на промените на вирусното оптоварување со повторувано ХПВ ДНК тестирање може да се предвиди прогресијата на заболувањето кај жени со LSIL кој кои се детектирани ХПВ типовите 16, 18, 52 и 58 (64).

Во нашата студија согласно добиените резултати, вкупна статистичка сигнификантна разлика во вирусното оптоварување меѓу различните цитолошки дијагнози беше добиена за ХПВ тип 16 ($p=0.0098$), тип 44 ($p=0.038$), тип 51 ($p=0.048$), тип 66 ($p=0.0475$), тип 68 ($p=0.033$) и тип 73 ($p=0.043$). Post-hoc анализата за меѓугрупните споредби презентира значајно повисока вирусна концентрација кај високоризичните лезии во споредба со нормалните наоди за ХПВ тип 16, ХПВ тип 51, ХПВ тип 66 и ХПВ тип 73, значајно повисока вирусна концентрација кај нискоризичните во споредба со високоризичните лезии за ХПВ тип 44, значајно повисока вирусна концентрација кај нормалните наоди во споредба со нискоризичните лезии за ХПВ тип 68.

За разлика од претходните извештаи кои сугерираат дека високата концентрација на ДНК на ХПВ е поврзана со цитолошки абнормалности и дека кај ХПВ-позитивните жени со нормална цитологија често се забележуваат многу ниски вирусни оптоварувања со минимален ризик од последователна прогресија во карцином, Kovacic et al. користејќи ја јачината на ПВР сигналот како квалитативна мерка за вирусното оптоварување на 40 ХПВ типови докажале дека единствена најсилна значајна позитивна линеарна врска помеѓу вирусното оптоварување и цитолошките абнормалности била пронајдена кај жени позитивни на ХПВ16. Цитолошките абнормалности во помала мера биле поврзани со високо вирусно оптоварување кај жените со други $\alpha 9/\alpha 11$ (претежно канцерогени) типови на ХПВ (62).

Проспективна студија на Dalstein et al. која опфатила 781 жени со нормална цитологија, атипични сквамозни клетки од неопределено значење (ASCUS) или лесни сквамозни интраепителни лезии (LGSIL) покажа дека стапката на елиминација на инфекции со ВР-ХПВ типови била повисока кај жени со ниско вирусно оптоварување во споредба со оние со високо оптоварување. Медијаната за елиминација на вирусот кај ВР-ХПВ позитивните жени била 7,5 месеци, при што повисока стапка на елиминација била забележана кај жени со ASCUS/LGSIL во однос на оние со нормална цитологија на почетокот. Студијата покажала дека

инциденцата и перзистенцијата на цитолошките абнормалности биле силно поврзани со почетното вирусно оптоварување со ДНК на ВР-ХПВ типови. Жените кои биле негативни за ВР-ХПВ типови при сите прегледи или биле привремено позитивни не развиле CIN2/3 за време на следењето, односно повисок ризик за CIN2/3 бил забележан кај жени со перзистентна инфекција и со иницијално високо вирусно оптоварување (59).

Наодите од голема, лонгитудинална студија на Xi Fu et al. се во согласност со претходните извештаи дека повисоко вирусно оптоварување со ХПВ16 е поврзано со зголемена преваленција на болеста и прогресија кон цервикални интраепителни неоплазии од висок степен (CIN3). Xi Fu et al. со оваа студија дополнително ги прошируваат овие наоди, покажувајќи дека ризикот од CIN3 поврзан со концентрацијата на ДНК на ХПВ16 варира во зависност од цитолошкиот статус на цервиксот во моментот на мерење на вирусното оптоварување. Значително зголемен ризик бил забележан кај жени со нормална цитологија, додека оваа поврзаност била отсутна кај жени со HSIL (146).

Една од можните причини за влијанието што го има цервикалната цитологија на ризикот поврзан со вирусното оптоварување на појава на CIN3 е тоа што бројот на абнормални епителни клетки во цервикалните ексфолијативни примероци се зголемува со тежината на цитолошките промени, и тој зголемен број на епителни клетки може да рефлектира продуктивна инфекција што може да ја направи потешка детекцијата на вирусното оптоварување што потекнува од CIN3 лезиите.

Овие наоди го потврдуваат значењето на вирусното оптоварување како индикатор за ризик од CIN3, но исто така укажуваат дека неговото влијание може да варира во зависност од цитолошкиот статус и големината на лезиите. Овие информации се клучни за подобрување на стратегиите за скрининг и стратификација на ризикот кај жени со ХПВ16 инфекција (146).

Rio-Ospina et al. ја анализирале корелацијата помеѓу вирусното оптоварување на 6 најчести ВР-ХПВ генотипови во Колумбија и фреквенцијата на цервикалната интраепителна неоплазија при што даваат податок дека највисоки вирусни оптоварувања биле идентификувани кај ХПВ 33 позитивни пациентки со CIN и кај ХПВ 31 позитивни пациентки со нормален наод. За разлика од претходно наведените студии Ospina и соработниците докажале дека лезиите биле почесто идентификувани кај пациентки кои имале пониска концентрација на ДНК на ХПВ 16 и 31 (147).

Податоците од нашата студија се во согласност со првата група на истражувања, кои укажуваат дека повисокото вирусно оптоварување со ХПВ е поврзано со зголемен ризик од развој на цервикални лезии од висок степен. Во нашата студија концентрацијата на ДНК на ХПВ просечно изнесуваше 5.58 ± 1.8 во групата пациентки со нормален цервикален наод, 5.78 ± 1.6 во групата со нискоризични цервикални лезии, и највисока од 6.34 ± 1.4 во групата со високоризични

цервикални лезии. Потврдена беше статистичка сигнификантна разлика во концентрацијата на ДНК на ХПВ во зависност од цитолошкиот наод. Беше детектирана значајно повисока вирусна концентрација во клетките кај пациентките со цервикална лезија со висок ризик за појава на карцином во однос на пациентките со нормален цитолошки наод ($p=0.015$).

Концентрацијата на ДНК на ХПВ беше анализирана во 3 категории: ниска (≤ 3), средна (3.1 – 5) и висока (>5). Ниска вирусна концентрација беше измерена почесто кај пациентките со нормален цитолошки наод во споредба со пациентките со нискоризични и високоризични цервикални лезии (7.29% vs 5% vs 1.19%), умерена вирусна концентрација исто така почесто беше детектирана кај пациентките со нормален цитолошки наод во споредба со пациентките со нискоризични и високоризични цервикални лезии (32.29% vs 25.83% vs 19.05%), додека висока вирусна концентрација почесто беше измерена кај пациентките со високоризични цервикални лезии споредено со пациентките со нискоризични цервикални лезии и со нормален наод од ПАП тестот (79.76% vs 69.17% vs 60.42%).

Цел 4: Да се направи разлика помеѓу квалитативниот и квантитативниот состав на вагиналниот микробиом на жени со ХПВ инфекција споредено со микробиомот кај жени без ХПВ инфекција и да се оцени влијанието на вагиналниот микробиом во спречување на ХПВ инфекција

Односот помеѓу вагиналниот микробиом и инфекцијата со ХПВ добива сè поголемо внимание во научната јавност, бидејќи промените во микробните заедници можат да влијаат врз перзистенцијата на вирусната инфекција, нејзина елиминација и прогресија кон цервикална дисплазија. И покрај високата преваленца на ХПВ и БВ во светот, нивната причинско последична поврзаност останува нејасна. Додека во останатите студии се претпоставува дека БВ е ризик фактор за здобивање на ХПВ инфекција и појава на карцином по одредено време, во голема ретроспективна студија, на 6085 жени, дополнета со *in vivo* испитување на K14-HPV16 трансгенетски модел на глупци, Lebeau et al. докажал дека постои и обратна поврзаност (релација). Lebeau et al. докажа дека E7 онкопротеинот на ХПВ преку интеракција со протеините од NF-Kb Wnt/B катенин сигналните патишта, ја инхибира одбраната на домаќинот преку спречување на експресија на пептиди кои ги создава сквамозниот епител. Поточно во случај на ХПВ инфекција намалена е синтезата на неколку молекули од вродениот имунитет кои се користат од страна на лактобацилите како извор на аминокиселини кои го поддржуваат нивниот раст и преживување. Во оваа студија е прикажана нова стратегија на вирусот за избегнување на имуниот систем, која има негативно влијание врз преживувањето на лактобацилите и овозможува развој на БВ. Оксидативниот стрес кој е резултат на БВ дополнително ја поттикнува прогресијата на пренеопластичните лезии што потврдува дека поврзаноста меѓу ХПВ и БВ е комплементарна во два правци (149).

Во студијата на Voroshilina et al. (150), кај 413 пациентки со CIN бил анализиран квалитативниот и квантитативниот состав на вагиналниот микробиом и било испитано присуство на ХПВ инфекција со Real time PCR. Анализата на составот на вагиналниот микробиом покажала значителни разлики помеѓу групите на испитувани пациентки. Нормоценоза била значително поретко забележана кај пациентките со LSIL, кои биле ХПВ-негативни (апсолутна нормаценоза (41%), условна нормаценоза (33%)), додека дисбиоза била детектирана кај 26% од пациентките. Составот на вагиналниот микробиом кај жените со LSIL, ХПВ-позитивни, бил сличен. Овие резултати укажуваат на тоа дека дисбиотичните нарушувања биле значително почести кај жени со LSIL, независно од нивниот ХПВ статус. Што упатува на фактот дека вагиналната дисбиоза најверојатно има улога во развојот на цервикалната дисплазија дури и во отсуство на активна ХПВ инфекција. Сепак, пациентките кои биле ХПВ-негативни во моментот на испитувањето можеби претходно биле инфицирани, но вирусот бил спонтано елиминиран. Во таков случај, ХПВ повеќе не може да биде детектиран, но присутната дисбиоза може да придонесе за одржување на епителните промени типични за LSIL. Понатаму, дисбиоза, како умерена така и изразена, била детектирана кај 58.8% од жените со HSIL, што било значително почесто во споредба со жените од контролната група и пациентките со LSIL. Овие податоци ја поддржуваат теоријата за улогата на вирусно-бактериските асоцијации во прогресијата на цервикалната дисплазија. Апсолутниот број на облигатни и факултативни анаероби бил значително зголемен кај жени со HSIL, во споредба со пациентките во другите групи, особено кај *Gardnerella vaginalis*, *Prevotella bivia*, *Porphyromonas spp.*, *Atopobium vaginae*, *Eubacterium spp.*, и *Megasphaera spp./Veillonella spp./Dialister spp.*, кај кои бројноста била 1000–10000 пати повисока (150).

Овие резултати сугерираат корелација помеѓу степенот на CIN и сериозноста на дисбиозата кај пациентките со цервикални лезии. Прашањето што останува е дали вагиналната дисбиоза придонесува за развојот на поизразени промени во цервикалниот епител инфициран со ХПВ, или пак перзистенцијата на ХПВ создава поволна средина за раст на опортунистички анаеробни бактерии во вагината, што доведува до изразена дисбиоза.

Lin et al. во студија на 448 учесници кај кои било извршена ХПВ генотипизација, цитолошко тестирање, и кај 28 дополнително бил испитан составот на вагиналниот микробиом со секвенционирање на 16S V4 рибозомалниот RNA генски регион докажал дека преваленцата на ВР-ХПВ била повисока кај пациенти со БВ. Процентот на ВР-ХПВ позитивни бил 72.73% кај пациенти со *Gardnerella vaginalis*, и бил сигнификантно повисок од процентот на пациенти со *Lactobacillus spp.* како доминантен микроорганизам (44.72%). Резултатите од секвенционирањето покажале дека лактобацилите биле доминантна бактерија кај нормалниот

вагинален микробиом, додека процентите на *Gardnerella vaginalis* и *Prevotella* биле значително зголемени кај ХПВ позитивни пациентки (79).

Во студија од 2022 година, Yang et al., го анализирале ефектот на поодделни микроорганизми во вагиналниот микробиом врз статусот на ХПВ инфекцијата преку метагеномско секвенционирање. При тоа било заклучено дека промените во балансот на нормалниот вагинален микробиом биле статистички значајно поврзани со перзистенција на ХПВ. Ова пилот-истражување на Yang et al. имало за цел да ја испита корелацијата помеѓу вагиналниот микробиом, личните ризик-фактори, вклучувајќи возраст, приходи, историја на инфекции на репродуктивниот тракт и вкупен број на сексуални партнери, со конверзијата на ХПВ статусот, со цел да се идентификува кој состав на вагиналниот микробиом е поврзан со клиренсот на ХПВ во услови на хетерогени лични ризик-фактори. Вкупно 38 жени кои учествувале во истражувањето, биле поделени во три групи: ХПВ негативни, ХПВ со перзистентна инфекција, ХПВ група со конверзија на ХПВ статусот од позитивен во негативен. Релативната застапеност на компонентите на ВМ и личните фактори беа споредувани меѓу овие три групи. Генерално биле идентификувани 17 микроорганизми од кои пет се корисни за човековото здравје: *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus iners* и *Lactobacillus jensenii*, а 12 се патогени *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma hominis*, *Candida albicans*, *Prevotella bivia*, *Streptococcus agalactiae* и *Prevotella timonensis*. Заклучено е дека иако зголеменото присуство на патогени бактерии не било директно поврзано со ХПВ инфекцијата, промените во балансот на нормалниот вагинален микробиом биле статистички значајно асоцирани со перзистенција на ХПВ (151).

Нашата анализа се совпаѓа со податоците од веќе објавените студии кои покажуваат дека *Lactobacillus spp.* доминира во вагиналниот микробиом кај здрави индивидуи, додека инфекцијата со ХПВ е поврзана со зголемено присуство на анаеробни бактерии. Во нашата студија, споредбата на пациентките со и без ХПВ инфекција во однос на поединечните варијанти на микробиомот покажа сигнификантно почеста застапеност на апсолутна нормоценоза кај пациентките без ХПВ инфекција (60% vs 16%, $p=0.0014$) и сигнификантно почеста застапеност на апсолутна анаеробна дисбиоза кај пациентките со ХПВ инфекција (44% vs 8%, $p=0.0037$). Сигнификантна асоцијација беше најдена помеѓу ХПВ статусот и *Gardnerella vaginalis* + *Prevotella bivia* + *Porphyromonas spp.*, *Eubacterium spp.*, *Magasphaera spp.* + *Veillonella spp.* + *Dialister spp.* и *Sneathia spp.* + *Leptotrichia spp.* + *Fusobacterium spp.* ($p=0.0044$, $p=0.0024$, $p=0.049$, $p=0.049$, соодветно). Сите овие видови бактерии значајно почесто беа изолирани кај пациентките со ХПВ инфекција: *Gardnerella vaginalis* + *Prevotella bivia* + *Porphyromonas spp.* кај 64% vs 24%, *Eubacterium* кај 52% vs 12%, *Magasphaera spp.* + *Veillonella spp.* + *Dialister spp.* кај 24% vs 4%, и, *Sneathia spp.* + *Leptotrichia spp.* + *Fusobacterium spp.* кај 24% vs 4%.

7. Заклучоци

Врз основа на резултатите добиени во тек на ова истражување изведени се следните заклучоци:

Во однос на Цел 1: Да се испита корелацијата помеѓу инфекциите предизвикани со еден или повеќе типови на ХПВ со возраста на пациентките

- Пациентките со нормален цитолошки наод имаат значително пониска просечна возраст (31.1 ± 10.1 години) во споредба со пациентките со нискоризични (35.1 ± 9.2 години) и високоризични лезии (37.1 ± 9.5 години), што укажува на поврзаност помеѓу возраста и ризикот од развој на цервикални лезии.
- Споредбата на поединечните возрасни групи меѓу пациентите со негативен и позитивен ПАП тест покажа сигнификантно почест нормален цитолошки наод во најмладата возрасна група (34.42% vs 10.78%, $p=0.0000$); и сигнификантно почест позитивен тест во возрасните групи 35-44 и 45-54 години (34.31% vs 17.71%, $p=0.0031$ и 14.71% vs 5.21%, $p=0.0168$, соодветно).
- Инфекциите со единечен тип на ХПВ (ЕТ-ХПВ) беа значајно почести кај постари пациентки (просек 35.5 години), додека инфекциите со повеќе типови (ПТ-ХПВ) беа застапени кај помлади пациентки (просек 32.8 години).
- Преваленцата на ХПВ инфекции предизвикани со еден и ко-инфекции со повеќе типови меѓу одделните возрасни категории, покажа сигнификантно повисока преваленца на инфекција со ПТ-ХПВ кај пациентките од најмладата и најстарата возрасна група, односно на возраст од 24 години и помлади, и на возраст помеѓу 55 и 64 години (14.37% vs 24.6%, $p=0.025$; и, 1.72% vs 6.35%, $p=0.035$, соодветно).
- Преваленцата на ХПВ инфекции предизвикани со еден и ко-инфекции со повеќе типови меѓу одделните возрасни категории, покажа сигнификантно повисока преваленца на инфекција со ЕТ-ХПВ кај пациентките во возрасната група 45-54 години (16.67% vs 4.76%, $p=0.0015$).
- Статистичка сигнификантна разлика беше најдена во просечната возраст на пациентките со/без ХПВ инфекција со тип 31 ($p=0.03$), тип 59 ($p=0.0083$) и тип 73 ($p=0.0022$);
- Пациентките со ХПВ инфекција со тип 31 беа сигнификантно постари од пациентките кај кои овој генотип не беше детектиран (37.0 ± 10.6 vs 33.8 ± 9.5),
- Пациентките со ХПВ инфекција со тип 59 беа сигнификантно помлади од пациентките кај кои овој генотип не беше детектиран (29.7 ± 8.5 vs 34.9 ± 9.8)

- пациентките со ХПВ инфекција со тип 73 беа сигнификантно помлади од пациентките кај кои овој генотип не беше детектиран (28.3 ± 8.8 vs 34.9 ± 9.7).

Овие податоци се важни бидејќи помагаат во попрецизна идентификација на групите жени кои би имале најголема корист од превентивни мерки како што се вакцинација, рана проверка и здравствена едукација. Нашата студија покажува дека жените на возраст до 24 години почесто имаат инфекции со повеќе типови на ХПВ, што укажува на нивна поголема чувствителност на вирусот и зголемена веројатност за појава на промени на грлото на матката.

Дополнително, добиените резултати укажуваат на потреба за проширување на вакцините со вклучување на повеќе типови на ХПВ, што би овозможило поголема заштита кај најпогодената популација.

Во однос на Цел 2: Да се испита преваленцата на инфекции предизвикани со еден или повеќе типови на ХПВ, во однос на цитолошкиот наод на пациентките

- Единечен генотип на ХПВ (ЕТ-ХПВ) најчесто беше изолиран кај примероци од пациентки со нормален ПАП тест (59.38%), во споредба со пациентки со цервикална лезија со низок ризик (57.50%) и висок ризик за прогресија во карцином (57.14%).
- Ко-инфекција со повеќе ХПВ типови (ПТ-ХПВ) беше почесто детектирана кај пациентки со високоризични лезии (42.86%), отколку кај пациентки со лезии со низок ризик (42.50%) и со нормален наод од ПАП тестот (40.63%). Сепак, и покрај овие мали разлики во зачестеноста, не беше утврдена статистички значајна разлика помеѓу испитуваните групи ($\chi^2=0.11$; $p=0.94$), што укажува дека бројот на детектирани ХПВ генотипови не претставува независен предиктор за тежината на цитолошките промени.
- ХПВ тип 16 и тип 31 беа најчесто изолирани во обете групи, но со разлика во доминацијата: тип 31 доминираше кај пациентките со негативен ПАП тест (19.79%), додека тип 16 имаше највисока застапеност кај пациентките со позитивен ПАП тест (26.47%).

Ова може да придонесе за подобрување на клиничките алгоритми, каде што ризикот нема да се проценува само врз основа на бројот на детектирани типови на ХПВ, туку ќе се земаат предвид и конкретните генотипови, нивната индивидуална онкогена моќ, како и потенцијалната синергистичка или компетитивна интеракција помеѓу нив. Дополнително, добиените резултати може да бидат особено корисни за персонализирано управување со пациентките – во смисла на одредување на фреквенцијата на контролите, потребата од колпоскопија или биопсија, или дефинирање на индивидуален скрининг интервал, согласно присутниот генотип или комбинација на генотипови.

Истовремено, податоците даваат основа за развој на дијагностички пристапи кои ќе ги интегрираат молекуларните резултати со параметри како што се вирусно оптоварување и имунолошки статус, со цел да се добие посеопфатна проценка на ризик. Воведувањето на вакви комбинирани биомаркери во алгоритмите за клиничка проценка може да помогне во избегнување на непотребни интервенции кај жени со нискоризични профили, а истовремено да овозможи побрза идентификација и третман на жени со реално повисок ризик од прогресија.

Во однос на Цел 3: Да се проучи корелацијата на концентрацијата на ДНК на ХПВ со цитолошкиот наод на пациентките

- Пациентките со високоризични лезии имаа значително повисоко вирусно оптоварување (6.34 ± 1.4) во споредба со оние со нормален наод (5.58 ± 1.8) и нискоризични лезии (5.78 ± 1.6), со статистички значајна разлика ($p=0.013$).
- Позитивна статистички сигнификантна корелација беше најдена помеѓу концентрацијата на ДНК на вирусот и цитолошкиот наод.
- Ниска вирусна концентрација беше измерена почесто кај пациентките со нормален цитолошки наод во споредба со пациентките со нискоризични и високоризични цервикални лезии (7.29% vs 5% vs 1.19%).
- Умерена вирусна концентрација исто така почесто беше детектирана кај пациентките со нормален цитолошки наод во споредба со пациентките со нискоризични и високоризични цервикални лезии (32.29% vs 25.83% vs 19.05%).
- Висока вирусна концентрација почесто беше измерена кај пациентките со високоризични цервикални лезии споредено со пациентките со нискоризични цервикални лезии и со нормален наод од ПАП тестот (79.76% vs 69.17% vs 60.42%).
- За ХПВ тип 16, 51, 66 и 73 беше потврдена значајна позитивна корелација помеѓу повисоко вирусно оптоварување и присуство на високоризични лезии.
- За ХПВ тип 44, вирусното оптоварување беше повисоко кај нискоризични лезии, додека кај типот 68 беше повисоко кај нормални цитолошки наоди, што укажува на различна биолошка активност на типови од иста ризична класа.

Интеграцијата на квантитативното мерење на вирусното оптоварување во рутинската дијагностичка пракса може да обезбеди дополнителен биомаркер за стратификација на ризикот на пациентките. Имено, идентификацијата на праг на концентрација на ХПВ ДНК што корелира со степенот на лезија може да овозможи поставување на алгоритам за тријажа, со што ќе се намали непотребното следење на пациентки со транзиторни, нискоризични инфекции.

Дополнително, динамичкото следење на вирусното оптоварување со повторени мерења кај ХПВ-позитивни жени може да послужи како индикатор за прогресија

или регресија на инфекцијата. Ваквиот пристап би бил од особено значење кај жени со нормален ПАП тест, но со детектирана висока вирусна концентрација, каде навремената интервенција би можела да спречи понатамошен развој на преканцерозни или канцерозни промени.

Во однос на Цел 4: Да се направи разлика помеѓу квалитативниот и квантитативниот состав на вагиналниот микробиом на жени со ХПВ инфекција споредено со микробиомот кај жени без ХПВ инфекција и да се оцени влијанието на вагиналниот микробиом во спречување на ХПВ инфекција

- Квалитативниот состав на вагиналниот микробиом беше статистички значајно поврзан со присуството на ХПВ инфекција ($p=0.00311$).
- Споредбата на пациентките со и без ХПВ инфекција во однос на поединечните варијанти на микробиомот презентира сигнификантно почеста застапеност на апсолутна нормоценоза кај пациентките без ХПВ инфекција (60% vs 16%, $p=0.0014$) и сигнификантно почеста застапеност на апсолутна анаеробна дисбиоза кај пациентките со ХПВ инфекција (44% vs 8%, $p=0.0037$)
- Сигнификантна асоцијација беше најдена помеѓу ХПВ статусот и присуството на анаеробни бактерии. Кај пациентките со ХПВ инфекција во однос на пациентките без ХПВ инфекција значајно почесто беа изолирани: *Gardnerella vaginalis* + *Prevotella bivia* + *Porphyromonas spp.* кај 64% vs 24%, *Eubacterium* кај 52% vs 12%, *Magasphaera spp.* + *Veillonella spp.* + *Dialister spp.* кај 24% vs 4%, и, *Sneathia spp.* + *Leptotrichia spp.* + *Fusobacterium spp.* кај 24% vs 4%.
- Статистички сигнификантна разлика меѓу двете групи беше потврдена во однос на количината на *Lactobacillus spp.* ($p=0.03$), која се должи на значајно поголема количина кај ХПВ негативните жени.

Овие резултати потврдуваат дека вагиналниот микробиом е потенцијален модулатор на ХПВ инфекцијата, што ја отвора можноста за превентивна или адјувантна терапија со пробиотици. Податоците може да се користат за развој на биомаркери кои се базираат на составот на микробиомот за одредување на ризик од перзистенција на ХПВ или прогресија кон цервикални лезии. Може да се размислува за интегрирање на анализата на вагиналниот микробиом во рутинската проценка на пациентките со перзистентни ХПВ инфекции.

Истражувањето претставува вредна основа за понатамошни студии кои ќе ги прошируваат сознанијата за интеракцијата помеѓу ХПВ, микробиомот и домаќинот, и ќе придонесе кон создавање на модерни, прецизни и персонализирани стратегии за јавно-здравствени интервенции.

8. Литература

1. Onon TS. History of human papillomavirus, warts and cancer: What do we know today? *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2011 Oct;25(5):565–74.
2. Harari A, Chen Z, Burk RD. Human Papillomavirus Genomics: Past, Present and Future. In: Ramírez-Fort MK, Khan F, Rady PL, Tyring SK, editors. *Current Problems in Dermatology* [Internet]. S. Karger AG; 2014 [cited 2024 Oct 13]. p. 1–18. Available from: <https://karger.com/books/book/224/chapter/5152522>
3. Syrjänen S, Syrjänen K. The history of papillomavirus research. *Cent Eur J Public Health.* 2008;16(Suppl):S7–S41.
4. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Human papillomaviruses. Lyon, France Geneva, Switzerland: World Health Organization, International Agency for Research on Cancer; 2007. 1 p. (IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans).
5. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2024 May;74(3):229–63.
6. Global Strategy to Accelerate the Elimination of Cervical Cancer As a Public Health Problem. 1st ed. Geneva: World Health Organization; 2020. 1 p.
7. Bruni L, Albero G, Serrano B, Mena M, Collado JJ, Gómez D, Muñoz J, Bosch FX, de Sanjosé S. ICO/IARC Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre). Human Papillomavirus and Related Diseases in Europe: Summary Report 10 March 2023. Barcelona: Institut Català d'Oncologia; 2023. Available from: <http://www.hpvcentre.net>.
8. Cervical cancer country profiles 2021. Geneva: World Health Organization; 2021. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-NMH-NMA-GIA-2021.07>.
9. Bruni L, Albero G, Serrano B, Mena M, Collado JJ, Gómez D, Muñoz J, Bosch FX, de Sanjosé S. ICO/IARC Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre). Human Papillomavirus and Related Diseases in Republic of North Macedonia: Summary Report 10 March 2023. Barcelona: Institut Català d'Oncologia; 2023. Available from: <http://www.hpvcentre.net>.
10. De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, Zur Hausen H. Classification of papilloma viruses. *Virology.* 2004 Jun;324(1):17–27.
11. Bernard HU. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J Clin Virol.* 2005 Mar;32:1–6.
12. Doorbar J, Egawa N, Griffin H, Kranjec C, Murakami I. Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Rev Med Virol.* 2015 Mar;25(S1):2–23.
13. Harden ME, Munger K. Human papillomavirus molecular biology. *Mutat Res Mutat Res.* 2017 Apr;772:3–12.
14. Chen Z, Schiffman M, Herrero R, DeSalle R, Anastos K, Segondy M, et al. Classification and evolution of human papillomavirus genome variants: Alpha-5 (HPV26, 51, 69, 82), Alpha-6 (HPV30, 53, 56, 66), Alpha-11 (HPV34, 73), Alpha-13 (HPV54) and Alpha-3 (HPV61). *Virology.* 2018 Mar;516:86–101.
15. Walboomers JMM, 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.

16. Burk RD, Chen Z, Van Doorslaer K. Human Papillomaviruses: Genetic Basis of Carcinogenicity. *Public Health Genomics*. 2009;12(5–6):281–90.
17. Muñoz N, Castellsagué X, De González AB, Gissmann L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*. 2006 Aug;24:S1–10.
18. 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 Dec;4(1):8.
19. Villa LL, Sichero L, Rahal P, Caballero O, Ferenczy A, Rohan T, et al. Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. *J Gen Virol*. 2000 Dec 1;81(12):2959–68.
20. Calleja-Macias IE, Kalantari M, Huh J, Ortiz-Lopez R, Rojas-Martinez A, Gonzalez-Guerrero JF, et al. Genomic diversity of human papillomavirus-16, 18, 31, and 35 isolates in a Mexican population and relationship to European, African, and Native American variants. *Virology*. 2004 Feb;319(2):315–23.
21. Egawa N, Egawa K, Griffin H, Doorbar J. Human Papillomaviruses; Epithelial Tropisms, and the Development of Neoplasia. *Viruses*. 2015 Jul 16;7(7):3863–90.
22. Bergvall M, Melendy T, Archambault J. The E1 proteins. *Virology*. 2013 Oct;445(1–2):35–56.
23. Laaneväli A, Ustav M, Ustav E, Piirsoo M. E2 protein is the major determinant of specificity at the human papillomavirus origin of replication. Menéndez-Arias L, editor. *PLOS ONE*. 2019 Oct 23;14(10):e0224334.
24. McBride AA. The Papillomavirus E2 proteins. *Virology*. 2013 Oct;445(1–2):57–79.
25. Lim J, Lilie H, Kalbacher H, Roos N, Frecot DI, Feige M, et al. Evidence for direct interaction between the oncogenic proteins E6 and E7 of high-risk human papillomavirus (HPV). *J Biol Chem*. 2023 Aug;299(8):104954.
26. Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci*. 2006 May 1;110(5):525–41.
27. Finnen RL, Erickson KD, Chen XS, Garcea RL. Interactions between Papillomavirus L1 and L2 Capsid Proteins. *J Virol*. 2003 Apr 15;77(8):4818–26.
28. Wang JW, Roden RBS. L2, the minor capsid protein of papillomavirus. *Virology*. 2013 Oct;445(1–2):175–86.
29. Crosbie EJ, Einstein MH, Franceschi S, Kitchener HC. Human papillomavirus and cervical cancer. *The Lancet*. 2013 Sep;382(9895):889–99.
30. Oh KJ, Kalinina A, Bagchi S. Destabilization of Rb by human papillomavirus E7 is cell cycle dependent: E2-25K is involved in the proteolysis. *Virology*. 2010 Jan;396(1):118–24.
31. Cheng S, Schmidt-Grimminger DC, Murrant T, Broker TR, Chow LT. Differentiation-dependent up-regulation of the human papillomavirus E7 gene reactivates cellular DNA replication in suprabasal differentiated keratinocytes. *Genes Dev*. 1995 Oct 1;9(19):2335–49.
32. Moody C. Mechanisms by which HPV Induces a Replication Competent Environment in Differentiating Keratinocytes. *Viruses*. 2017 Sep 19;9(9):261.
33. Kranjec C, Banks L. A Systematic Analysis of Human Papillomavirus (HPV) E6 PDZ Substrates Identifies MAGI-1 as a Major Target of HPV Type 16 (HPV-16) and HPV-18 Whose Loss Accompanies Disruption of Tight Junctions. *J Virol*. 2011 Feb 15;85(4):1757–64.

34. Webb Strickland S, Brimer N, Lyons C, Vande Pol SB. Human Papillomavirus E6 interaction with cellular PDZ domain proteins modulates YAP nuclear localization. *Virology*. 2018 Mar;516:127–38.
35. Steinbach A, Riemer AB. Immune evasion mechanisms of human papillomavirus: An update. *Int J Cancer*. 2018 Jan 15;142(2):224–9.
36. Bordignon V, Di Domenico E, Trento E, D’Agosto G, Cavallo I, Pontone M, et al. How Human Papillomavirus Replication and Immune Evasion Strategies Take Advantage of the Host DNA Damage Repair Machinery. *Viruses*. 2017 Dec 19;9(12):390.
37. Piersma SJ. Immunosuppressive Tumor Microenvironment in Cervical Cancer Patients. *Cancer Microenviron*. 2011 Dec;4(3):361–75.
38. Stanley M. Immune responses to human papillomavirus. *Vaccine*. 2006 Mar;24:S16–22.
39. Moscicki AB, Ma Y, Wibbelsman C, Darragh TM, Powers A, Farhat S, et al. Rate of and Risks for Regression of Cervical Intraepithelial Neoplasia 2 in Adolescents and Young Women. *Obstet Gynecol*. 2010 Dec;116(6):1373–80.
40. Hernandez BY, Wilkens LR, Zhu X, Thompson P, McDuffie K, Shvetsov YB, et al. Transmission of Human Papillomavirus in Heterosexual Couples.
41. Jin J, Li S, Huang H, Li J, Lyu Y, Ran Y, et al. Development of human papillomavirus and its detection methods (Review). *Exp Ther Med*. 2024 Jul 31;28(4):382.
42. Anderson TA, Schick V, Herbenick D, Dodge B, Fortenberry JD. A study of human papillomavirus on vaginally inserted sex toys, before and after cleaning, among women who have sex with women and men: Table 1. *Sex Transm Infect*. 2014 Nov;90(7):529–31.
43. Nantel É, Mayrand MH, Audibert F, Niyibizi J, Brassard P, Laporte L, et al. Association between the Mode of Delivery and Vertical Transmission of Human Papillomavirus. *Viruses*. 2024 Feb 16;16(2):303.
44. Petca A, Borislavski A, Zvanca M, Petca RC, Sandru F, Dumitrascu M. Non-sexual HPV transmission and role of vaccination for a better future (Review). *Exp Ther Med*. 2020 Oct 13;20(6):1–1.
45. Zgura AF, Bratila E, Vladareanu S, Davila C, Pantelimon S. Transplacental Transmission of Human Papillomavirus. 2015;10.
46. Liu Z, Rashid T, Nyitray AG. Penises not required: a systematic review of the potential for human papillomavirus horizontal transmission that is non-sexual or does not include penile penetration. *Sex Health*. 2016;13(1):10.
47. Gallay C, Miranda E, Schaefer S, Catarino R, Jacot-Guillarmod M, Menoud PA, et al. Human papillomavirus (HPV) contamination of gynaecological equipment. *Sex Transm Infect*. 2016 Feb;92(1):19–23.
48. Ilmarinen T, Auvinen E, Hiltunen-Back E, Ranki A, Aaltonen LM, Pitkäranta A. Transmission of human papillomavirus DNA from patient to surgical masks, gloves and oral mucosa of medical personnel during treatment of laryngeal papillomas and genital warts. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2012 Nov;269(11):2367–71.
49. Basu P, Taghavi K, Hu SY, Mogri S, Joshi S. Management of cervical premalignant lesions. *Curr Probl Cancer*. 2018 Mar;42(2):129–36.
50. Östör, Andrew G. M.D., Frcpa. Natural History of Cervical Intraepithelial Neoplasia A Critical Review. *Int J Gynecol Pathol*. 1993 Apr;12(2):186.

51. Trottier H, Mahmud S, Costa MC, Sobrinho JP, Duarte-Franco E, Rohan TE, et al. Human Papillomavirus Infections with Multiple Types and Risk of Cervical Neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006 Jul 1;15(7):1274–80.
52. Chagas BS, Comar M, Gurgel APAD, Paiva S, Seraceni S, De Freitas AC, et al. Association Study between Cervical Lesions and Single or Multiple Vaccine-Target and Non-Vaccine Target Human Papillomavirus (HPV) Types in Women from Northeastern Brazil. Tornesello ML, editor. *PLOS ONE.* 2015 Jul 15;10(7):e0132570.
53. Chaturvedi AK, Katki HA, Hildesheim A, Rodríguez AC, Quint W, Schiffman M, et al. Human Papillomavirus Infection with Multiple Types: Pattern of Coinfection and Risk of Cervical Disease. *J Infect Dis.* 2011 Apr 1;203(7):910–20.
54. Na J, Li Y, Wang J, Wang X, Lu J, Han S. The correlation between multiple HPV infections and the occurrence, development, and prognosis of cervical cancer. *Front Microbiol.* 2023 Jul 28;14:1220522.
55. Wentzensen N, Nason M, Schiffman M, Dodd L, Hunt WC, Wheeler CM. No Evidence for Synergy Between Human Papillomavirus Genotypes for the Risk of High-Grade Squamous Intraepithelial Lesions in a Large Population-Based Study. *J Infect Dis.* 2014 Mar 15;209(6):855–64.
56. Iacobone AD, Bottari F, Radice D, Preti EP, Franchi D, Vidal Urbinati AM, et al. Distribution of High-Risk Human Papillomavirus Genotypes and Multiple Infections in Preneoplastic and Neoplastic Cervical Lesions of Unvaccinated Women: A Cross-sectional Study. *J Low Genit Tract Dis.* 2019 Oct;23(4):259–64.
57. Salazar KL, Zhou HS, Xu J, Peterson LE, Schwartz MR, Mody DR, et al. Multiple Human Papilloma Virus Infections and Their Impact on the Development of High-Risk Cervical Lesions. *Acta Cytol.* 2015;59(5):391–8.
58. Xi LF, Koutsky LA, Castle PE, Edelstein ZR, Meyers C, Ho J, et al. Relationship Between Cigarette Smoking and Human Papilloma Virus Types 16 and 18 DNA Load. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009 Dec 1;18(12):3490–6.
59. Dalstein V, Riethmuller D, Prétet J, Le Bail Carval K, Sautière J, Carbillet J, et al. Persistence and load of high-risk HPV are predictors for development of high-grade cervical lesions: A longitudinal French cohort study. *Int J Cancer.* 2003 Sep;106(3):396–403.
60. Constandinou-Williams C, Collins SI, Roberts S, Young LS, Woodman CBJ, Murray PG. Is Human Papillomavirus Viral Load a Clinically Useful Predictive Marker? A Longitudinal Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010 Mar 1;19(3):832–7.
61. Lu X, Wang T, Zhang Y, Liu Y. Analysis of influencing factors of viral load in patients with high-risk human papillomavirus. *Virol J.* 2021 Dec;18(1):6.
62. Kovacic MB, Castle PE, Herrero R, Schiffman M, Sherman ME, Wacholder S, et al. Relationships of Human Papillomavirus Type, Qualitative Viral Load, and Age with Cytologic Abnormality. *Cancer Res.* 2006 Oct 15;66(20):10112–9.
63. Dong B, Sun P, Ruan G, Huang W, Mao X, Kang Y, et al. Type-specific high-risk human papillomavirus viral load as a viable triage indicator for high-grade squamous intraepithelial lesion: a nested case–control study. *Cancer Manag Res.* 2018 Oct;Volume 10:4839–51.
64. Ho CM, Cheng WF, Chu TY, Chen CA, Chuang MH, Chang SF, et al. Human papillomaviral load changes in low-grade squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix. *Br J Cancer.* 2006 Nov;95(10):1384–9.

65. Del Río-Ospina L, Soto-De León SC, Camargo M, Sánchez R, Moreno-Pérez DA, Pérez-Prados A, et al. Multiple high-risk HPV genotypes are grouped by type and are associated with viral load and risk factors. *Epidemiol Infect.* 2017 May;145(7):1479–90.
66. Pista A, Oliveira A, Verdasca N, Ribeiro F. Single and multiple human papillomavirus infections in cervical abnormalities in Portuguese women. *Clin Microbiol Infect.* 2011 Jun;17(6):941–6.
67. Tekkesin N, Goktas S, Alkis V, Koc S, Gurbuz T, Goktas P. Analysis of the Prevalence and Quantification of viral load of different human papillomavirus types in Turkish women population. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2022 Dec 1;23(12):4347–55.
68. Donnikov DAE, Markelov MMI, Pestrikova PTYu, Yurasova E YEA, Kotelnikova KAV. VES, Plotko PEE, et al. Analysis of the prevalence and viral load of different human papillomavirus types in the regions of the Russian Federation. *Akush Ginekolog (Sofia).* 2019 May 6;4_2019:39–47.
69. Resende LSDA, Rabelo-Santos SH, Sarian LO, Alves RRF, 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 Dec;14(1):214.
70. Zitkute V, Bumbuliene Z. Risk Factors Affecting HPV Infection, Persistence and Lesion Progression in Women and Men. 2016;
71. Moscicki AB. Impact of HPV infection in adolescent populations. *J Adolesc Health.* 2005 Dec;37(6):S3–9.
72. Ribeiro AA, Costa MC, Alves RRF, Villa LL, Saddi VA, Carneiro MADS, et al. HPV infection and cervical neoplasia: associated risk factors. *Infect Agent Cancer.* 2015 Dec;10(1):16.
73. Baudu A, Prétet JL, Riethmuller D, Chotard M, Mougin C, Mercier M. Prevalence and risk factors of human papillomavirus infection types 16/18/45 in a cohort of French females aged 15–23 years. *J Epidemiol Glob Health.* 2014;4(1):35.
74. Hariri S, Warner L. Condom Use and Human Papillomavirus in Men. *J Infect Dis.* 2013 Aug 1;208(3):367–9.
75. Koshiol J, Schroeder J, Jamieson DJ, Marshall SW, Duerr A, Heilig CM, et al. Smoking and Time to Clearance of Human Papillomavirus Infection in HIV-Seropositive and HIV-Seronegative Women. *Am J Epidemiol.* 2006 Jul 15;164(2):176–83.
76. Seo SS, Oh HY, Kim MK, Lee DO, Chung YK, Kim JY, et al. Combined Effect of Secondhand Smoking and Alcohol Drinking on Risk of Persistent Human Papillomavirus Infection. *BioMed Res Int.* 2019 Mar 21;2019:1–9.
77. Konopnicki D, De Wit S, Clumeck N. HPV and HIV Coinfection: A Complex Interaction Resulting in Epidemiological, Clinical and Therapeutic Implications. *Future Virol.* 2013 Sep;8(9):903–15.
78. Wang Y, Thakur R, Shen Q, He Y, Chen C. Influences of vaginal microbiota on human papillomavirus infection and host immune regulation: What we have learned? *Decod Infect Transm.* 2023;1:100002.
79. Lin W, Zhang Q, Chen Y, Dong B, Xue H, Lei H, et al. Changes of the vaginal microbiota in HPV infection and cervical intraepithelial neoplasia: a cross-sectional analysis. *Sci Rep.* 2022 Feb 18;12(1):2812.
80. Santella B, Schettino MT, Franci G, De Franciscis P, Colacurci N, Schiattarella A, et al. Microbiota and HPV: The role of viral infection on vaginal microbiota. *J Med Virol.* 2022 Sep;94(9):4478–84.

81. Barrientos-Durán A, Fuentes-López A, De Salazar A, Plaza-Díaz J, García F. Reviewing the Composition of Vaginal Microbiota: Inclusion of Nutrition and Probiotic Factors in the Maintenance of Eubiosis. *Nutrients*. 2020 Feb 6;12(2):419.
82. Sharifian K, Shoja Z, Jalilvand S. The interplay between human papillomavirus and vaginal microbiota in cervical cancer development. *Virol J*. 2023 Apr 19;20(1):73.
83. Dong W, Wang S, Wang X, Xu G, Liu Q, Li Z, et al. Characteristics of Vaginal Microbiota of Women of Reproductive Age with Infections. *Microorganisms*. 2024 May 20;12(5):1030.
84. Borgogna J, Shardell M, Santori E, Nelson T, Rath J, Glover E, et al. The vaginal metabolome and microbiota of cervical HPV-positive and HPV-negative women: a cross-sectional analysis. *BJOG Int J Obstet Gynaecol*. 2020 Jan;127(2):182–92.
85. Mirzaei R, Kavyani B, Nabizadeh E, Kadkhoda H, Asghari Ozma M, Abdi M. Microbiota metabolites in the female reproductive system: Focused on the short-chain fatty acids. *Heliyon*. 2023 Mar;9(3):e14562.
86. Amabebe E, Anumba DOC. The Vaginal Microenvironment: The Physiologic Role of Lactobacilli. *Front Med*. 2018 Jun 13;5:181.
87. Torcia MG. Interplay among Vaginal Microbiome, Immune Response and Sexually Transmitted Viral Infections. *Int J Mol Sci*. 2019 Jan 11;20(2):266.
88. Tachedjian G, Aldunate M, Bradshaw CS, Cone RA. The role of lactic acid production by probiotic Lactobacillus species in vaginal health. *Res Microbiol*. 2017 Nov;168(9–10):782–92.
89. Witkin SS, Mendes-Soares H, Linhares IM, Jayaram A, Ledger WJ, Forney LJ. Influence of Vaginal Bacteria and D - and L -Lactic Acid Isomers on Vaginal Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer: Implications for Protection against Upper Genital Tract Infections. Blaser MJ, editor. *mBio*. 2013 Aug 30;4(4):e00460-13.
90. O'Hanlon DE, Moench TR, Cone RA. In vaginal fluid, bacteria associated with bacterial vaginosis can be suppressed with lactic acid but not hydrogen peroxide. *BMC Infect Dis*. 2011 Dec;11(1):200.
91. Witkin S, Linhares I. Why do lactobacilli dominate the human vaginal microbiota? *BJOG Int J Obstet Gynaecol*. 2017 Mar;124(4):606–11.
92. De Tomasi JB, Opata MM, Mowa CN. Immunity in the Cervix: Interphase between Immune and Cervical Epithelial Cells. *J Immunol Res*. 2019 Apr 17;2019:1–13.
93. Qi J, Dai C, Song L, Zhang J. Association between bacterial vaginosis with human papillomavirus in the United States (NHANES 2003–2004). *BMC Womens Health*. 2024 Feb 22;24(1):138.
94. Briselden AM, Moncla BJ, Stevens CE, Hillier SL. Sialidases (neuraminidases) in bacterial vaginosis and bacterial vaginosis-associated microflora. *J Clin Microbiol*. 1992 Mar;30(3):663–6.
95. Lee JE, Lee S, Lee H, Song YM, Lee K, Han MJ, et al. Association of the Vaginal Microbiota with Human Papillomavirus Infection in a Korean Twin Cohort. Medeiros R, editor. *PLoS ONE*. 2013 May 22;8(5):e63514.
96. Anton L, Ferguson B, Friedman ES, Gerson KD, Brown AG, Elovitz MA. *Gardnerella vaginalis* alters cervicovaginal epithelial cell function through microbe-specific immune responses. *Microbiome*. 2022 Dec;10(1):119.
97. Castanheira CP, Sallas ML, Nunes RAL, Lorenzi NPC, Termini L. Microbiome and Cervical Cancer. *Pathobiology*. 2021;88(2):187–97.

98. Doerflinger SY, Throop AL, Herbst-Kralovetz MM. Bacteria in the Vaginal Microbiome Alter the Innate Immune Response and Barrier Properties of the Human Vaginal Epithelia in a Species-Specific Manner. *J Infect Dis*. 2014 Jun 15;209(12):1989–99.
99. De Seta F, Campisciano G, Zanotta N, Ricci G, Comar M. The Vaginal Community State Types Microbiome-Immune Network as Key Factor for Bacterial Vaginosis and Aerobic Vaginitis. *Front Microbiol*. 2019 Oct 30;10:2451.
100. Usyk M, Schlecht NF, Pickering S, Williams L, Sollecito CC, Gradissimo A, et al. molBV reveals immune landscape of bacterial vaginosis and predicts human papillomavirus infection natural history. *Nat Commun*. 2022 Jan 11;13(1):233.
101. Zheng N, Guo R, Wang J, Zhou W, Ling Z. Contribution of *Lactobacillus iners* to Vaginal Health and Diseases: A Systematic Review. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021 Nov 22;11:792787.
102. Macklaim JM, Fernandes AD, Di Bella JM, Hammond JA, Reid G, Gloor GB. Comparative meta-RNA-seq of the vaginal microbiota and differential expression by *Lactobacillus iners* in health and dysbiosis. *Microbiome*. 2013 Dec;1(1):12.
103. Lin W, Zhang Q, Chen Y, Dong B, Xue H, Lei H, et al. Changes of the vaginal microbiota in HPV infection and cervical intraepithelial neoplasia: a cross-sectional analysis. *Sci Rep*. 2022 Feb 18;12(1):2812.
104. Machado D, Castro J, Palmeira-de-Oliveira A, Martinez-de-Oliveira J, Cerca N. Bacterial Vaginosis Biofilms: Challenges to Current Therapies and Emerging Solutions. *Front Microbiol* [Internet]. 2016 Jan 20 [cited 2025 Mar 13];6. Available from: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2015.01528/abstract>
105. Chen Z, Schiffman M, Herrero R, DeSalle R, Anastos K, Segondy M, et al. Classification and evolution of human papillomavirus genome variants: Alpha-5 (HPV26, 51, 69, 82), Alpha-6 (HPV30, 53, 56, 66), Alpha-11 (HPV34, 73), Alpha-13 (HPV54) and Alpha-3 (HPV61). *Virology*. 2018 Mar;516:86–101.
106. Mei Z, Li D. The role of probiotics in vaginal health. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022 Jul 28;12:963868.
107. Palma E, Recine N, Domenici L, Giorgini M, Pierangeli A, Panici PB. Long-term *Lactobacillus rhamnosus* BMX 54 application to restore a balanced vaginal ecosystem: a promising solution against HPV-infection. *BMC Infect Dis*. 2018 Dec;18(1):13.
108. Homaouni A, Bastani P, Ziyadi S, Mohammad-Alizadeh-Charandabi S, Ghalibaf M, Mortazavian AM, et al. Effects of Probiotics on the Recurrence of Bacterial Vaginosis: A Review.
109. Verhoeven V, Renard N, Makar A, Royen PV, Bogers JP, Lardon F, et al. Probiotics enhance the clearance of human papillomavirus-related cervical lesions: a prospective controlled pilot study. *Eur J Cancer Prev*. 2013 Jan;22(1):46–51.
110. Tuniyazi M, Zhang N. Possible Therapeutic Mechanisms and Future Perspectives of Vaginal Microbiota Transplantation. *Microorganisms*. 2023 May 29;11(6):1427.
111. Ma D, Chen Y, Chen T. Vaginal microbiota transplantation for the treatment of bacterial vaginosis: a conceptual analysis. *FEMS Microbiol Lett* [Internet]. 2019 Feb 1 [cited 2025 Mar 13];366(4). Available from: <https://academic.oup.com/femsle/article/doi/10.1093/femsle/fnz025/5304978>
112. Meng Y, Sun J, Zhang G. Vaginal microbiota transplantation is a truly opulent and promising edge: fully grasp its potential. *Front Cell Infect Microbiol*. 2024 Mar 22;14:1280636.

113. World Health Organization, Special Programme of Research, Development, and Research Training in Human Reproduction (World Health Organization). WHO guideline for screening and treatment of cervical pre-cancer lesions for cervical cancer prevention. Second edition. Geneva: World Health Organization; 2021. 1 p.
114. Markowitz LE, Unger ER. Human Papillomavirus Vaccination. Solomon CG, editor. *N Engl J Med*. 2023 May 11;388(19):1790–8.
115. World Health Organization (WHO). Human papillomavirus vaccines: WHO position paper (2022 update). *Weekly Epidemiological Record*. 2022 Dec 16;97(50):645–672. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/wer9750>.
116. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). HPV burden and prevention through vaccination. #EUHPP Live Webinar: Health and medical students as HPV vaccination ambassadors; 2024 Jan 25. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/human-papillomavirus>
117. Cobo F. Diagnosis of HPV infection. In: *Human Papillomavirus Infections* [Internet]. Elsevier; 2012 [cited 2025 Mar 15]. p. 65–86. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781907568749500062>
118. Eide ML, Debaque H. HPV detection methods and genotyping techniques in screening for cervical cancer. *Ann Pathol*. 2012 Dec;32(6):e15–23.
119. Zaravinos A, Mammas IN, Sourvinos G, Spandidos DA. Molecular detection methods of human papillomavirus (HPV). *Int J Biol Markers*. 2009;24(4):215–22.
120. Schmitz M, Scheungraber C, Herrmann J, Teller K, Gajda M, Runnebaum IB, et al. Quantitative multiplex PCR assay for the detection of the seven clinically most relevant high-risk HPV types. *J Clin Virol*. 2009 Apr;44(4):302–7.
121. Dabeski D, Duvlis S, Bashkeska N, Antovska V, Stojovski M, Trajanova M, et al. Comparison Between HPV DNA Testing and HPV E6/E7 mRNA Testing in Women with Squamous Cell Abnormalities of the Uterine Cervix. *PRILOZI*. 2019 May 1;40(1):51–8.
122. Mühr LSA, Guerendiain D, Cuschieri K, Sundström K. Human Papillomavirus Detection by Whole-Genome Next-Generation Sequencing: Importance of Validation and Quality Assurance Procedures.
123. Clifford GM, Tenet V, Georges D, Alemany L, Pavón MA, Chen Z, et al. Human papillomavirus 16 sub-lineage dispersal and cervical cancer risk worldwide: Whole viral genome sequences from 7116 HPV16-positive women. *Papillomavirus Res*. 2019 Jun;7:67–74.
124. Arroyo Mühr LS, Lagheden C, Lei J, Eklund C, Nordqvist Kleppe S, Sparén P, et al. Deep sequencing detects human papillomavirus (HPV) in cervical cancers negative for HPV by PCR. *Br J Cancer*. 2020 Dec 8;123(12):1790–5.
125. Alrajjal A, Pansare V, Choudhury MS, Khan MY, Shidham VB. Squamous intraepithelial lesions (SIL: LSIL, HSIL, ASCUS, ASC-H, LSIL-H) of Uterine Cervix and Bethesda System. *CytoJournal*. 2021;18(16).
126. Negri G, Menia E, Egarter-Vigl E, Vittadello F, Mian C. ThinPrep versus conventional Papanicolaou smear in the cytologic follow-up of women with equivocal cervical smears. *Cancer*. 2003 Oct 22;99(6):342–5.
127. Fremont-Smith M, Marino J, Griffin B, Spencer L, Bolick D. Comparison of the Surepath™ liquid-based Papanicolaou smear with the conventional Papanicolaou smear in a multisite direct-to-vial study. *Cancer*. 2004 Aug 31;102(5):269–79.

128. Nayar R, Wilbur DC. The Pap test and Bethesda 2014. *Cancer Cytopathol.* 2015 May;123(5):271–81.
129. Bharadwaj M, Hussain S, Tripathi R, Singh N, Mehrotra R. Human Papillomavirus (HPV). In: *Animal Biotechnology* [Internet]. Elsevier; 2014 [cited 2025 Mar 17]. p. 95–120. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124160026000067>
130. Joshi S, Ghike S, Bhalerao A, Kawthalkar A, Kulkarni S. Correlation of Pap Smear, Colposcopy and Histopathology in Women with Unhealthy Cervix. *J South Asian Fed Obstet Gynaecol.* 2012 Aug;4(2):97–8.
131. Gamde MS, Adeleye TM, O Adisa J. Review on Histopathological Techniques in Cervical Cancer Screening. *Asian Pac J Cancer Care.* 2024 Nov 23;9(4):785–91.
132. Santesso N, Mustafa RA, Wiercioch W, Kehar R, Gandhi S, Chen Y, et al. Systematic reviews and meta-analyses of benefits and harms of cryotherapy, LEEP, and cold knife conization to treat cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Gynecol Obstet.* 2016 Mar;132(3):266–71.
133. Xu L, Jiang Y, Zhao R. Advances in ablative treatment for human papillomavirus related cervical pre-cancer lesions. *Gynecol Obstet Clin Med.* 2023 Dec;3(4):213–9.
134. Khairkhah N, Bolhassani A, Najafipour R. Current and future direction in treatment of HPV-related cervical disease. *J Mol Med.* 2022 Jun;100(6):829–45.
135. Burmeister CA, Khan SF, Schäfer G, Mbatani N, Adams T, Moodley J, et al. Cervical cancer therapies: Current challenges and future perspectives. *Tumour Virus Res.* 2022 Jun;13:200238.
136. Kohler C, Plaikner A, Siegler K, Hertel H, Hasenbein K, Petzel A, et al. Radical vaginal trachelectomy: long-term oncologic and fertility outcomes in patients with early cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer.* 2024 Jun;34(6):799–805.
137. Massobrio R, Bianco L, Campigotto B, Attianese D, Maisto E, Pascotto M, et al. New Frontiers in Locally Advanced Cervical Cancer Treatment. *J Clin Med.* 2024 Jul 30;13(15):4458.
138. Marth C, Landoni F, Mahner S, McCormack M, Gonzalez-Martin A, Colombo N. Cervical cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2017 Jul;28:iv72–83.
139. Stern PL, Van Der Burg SH, Hampson IN, Broker TR, Fiander A, Lacey CJ, et al. Therapy of Human Papillomavirus-Related Disease. *Vaccine.* 2012 Nov;30:F71–82.
140. Wu EW, Clemens KE, Heck DV, Münger K. The human papillomavirus E7 oncoprotein and the cellular transcription factor E2F bind to separate sites on the retinoblastoma tumor suppressor protein. *J Virol.* 1993 Apr;67(4):2402–7.
141. Paolini F, Curzio G, Cordeiro MN, Massa S, Mariani L, Pimpinelli F, et al. HPV 16 E5 oncoprotein is expressed in early stage carcinogenesis and can be a target of immunotherapy. *Hum Vaccines Immunother.* 2017 Feb;13(2):291–7.
142. Wang H, Cheng X, Ye J, Xu X, Hong Y, Sui L, et al. Distribution of human papilloma virus genotype prevalence in invasive cervical carcinomas and precancerous lesions in the Yangtze River Delta area, China. *BMC Cancer.* 2018 Dec;18(1):487.
143. Trottier H, Mahmud S, Costa MC, Sobrinho JP, Duarte-Franco E, Rohan TE, et al. Human Papillomavirus Infections with Multiple Types and Risk of Cervical Neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006 Jul 1;15(7):1274–80.

144. Dickson EL, Vogel RI, Bliss RL, Downs LS. Multiple-Type Human Papillomavirus (HPV) Infections. *Int J Gynecol Cancer*. 2013 Sep;23(7):1295–302.
145. Schmitt M, Depuydt C, Benoy I, Bogers J, Antoine J, Pawlita M, et al. Viral Load of High-Risk Human Papillomaviruses as Reliable Clinical Predictor for the Presence of Cervical Lesions. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2013 Mar 1;22(3):406–14.
146. Xi LF, Kiviat NB, Galloway DA, Zhou X, Ho J, Koutsky LA. Effect of Cervical Cytologic Status on the Association between Human Papillomavirus Type 16 DNA Load and the Risk of Cervical Intraepithelial Neoplasia Grade 3. *J Infect Dis*. 2008 Aug;198(3):324–31.
147. Del Río-Ospina L, Soto-De León SC, Camargo M, Moreno-Pérez DA, Sánchez R, Pérez-Prados A, et al. The DNA load of six high-risk human papillomavirus types and its association with cervical lesions. *BMC Cancer*. 2015 Dec;15(1):100.
148. Liu Y, Xu C, Pan J, Sun C, Zhou H, Meng Y. Significance of the viral load of high-risk HPV in the diagnosis and prediction of cervical lesions: a retrospective study. *BMC Womens Health*. 2021 Dec;21(1):353.
149. Lebeau A, Bruyere D, Roncarati P, Peixoto P, Hervouet E, Cobraiville G, et al. HPV infection alters vaginal microbiome through down-regulating host mucosal innate peptides used by Lactobacilli as amino acid sources. *Nat Commun*. 2022 Feb 28;13(1):1076.
150. Voroshilina E, Vladimirova N, Ignatova K. Vaginal Microbiota Composition according to real-time PCR in Patients with HPV-Associated Cervical Intraepithelial Neoplasias.
151. Yang Z, Zhang Y, Stubbe-Espejel A, Zhao Y, Liu M, Li J, et al. Vaginal microbiota and personal risk factors associated with HPV status conversion—A new approach to reduce the risk of cervical cancer? Zhong G, editor. *PLOS ONE*. 2022 Aug 9;17(8):e0270521.

Прилози

Д-Р ЕЛЕНА КРСТЕВСКА - КЕЛЕПУРОВСКА

Кратка биографија

Д-р Елена Крстевска-Келепуровска е родена во Битола, каде го завршува основното и средното образование. Во академската 1998/1999 година се запишува на Медицинскиот факултет при Универзитетот „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје, каде дипломира во 2003 година и истата година го започнува својот професионален пат како доктор по медицина. Државниот испит го полага во 2004 година.

Во февруари 2009 година полага специјалистички испит по микробиологија со паразитологија на Медицински факултет во Скопје и се стекнува со звање специјалист по медицинска микробиологија со паразитологија.

Паралелно со клиничката пракса, ја развива и својата академска кариера. Во академската 2005/2006 година запишува втор циклус (магистерски) студии на Медицински факултет Скопје при УКИМ во областа микробиологија. Во март 2015 година го брани магистерскиот труд на тема: „Фенотипска и генотипска резистенција кај *Streptococcus agalactiae* кон еритромицин и клиндамицин“.

Во 2017 година се запишува на докторски студии по медицина во насока базична медицина на истиот универзитет, Медицински факултет Скопје при УКИМ, каде ја подготвува и оваа докторска дисертација.

Од 2005 година е дел од тимот на ЈЗУ Центар за јавно здравје – Битола, каде работи како специјалист микробиолог, а од 2009 година е шеф на лабораторијата за бактериски инфекции.

Истовремено, со ист ентузијазам се посветува и на наставната дејност. Нејзиниот наставен ангажман започнува во 2009 како демонстратор во Високата медицинска школа во Битола, каде учествува во практичната настава за студентите по предметот Микробиологија. Во 2015 година е избрана за предавач на Високата медицинска школа во Битола, во научната област Микробиологија, а во 2019 за Виш предавач по микробиологија при Универзитетот „Св. Климент Охридски“ – Битола.

Како специјалист, д-р Елена Крстевска - Келепуровска активно учествува како автор или коавтор на голем број симпозиуми, семинари, конгреси и едукации од областа на микробиологијата и молекуларната медицина. Посебно се издвојуваат нејзините престои во реномирани институции во странство: 2008 реализира едукација на Институтот за микробиологија и имунологија, при Медицинскиот факултет во Белград, Србија, каде се стекна со познавања од „Нови можности на вирусолошката дијагностика“. Во 2016 во успешно ја завршува обуката за „Молекуларно-биолошки методи за детекција и мониторинг на вирусни инфекции“, организирана од Националниот центар за заразни и паразитарни болести во Софија, Бугарија. Истата година учествува на напредна обука за тестирање на антимикробна резистенција според европски стандарди, реализирана на Клиниката за инфективни болести „д-р Фран Михалјевиќ“ во Загреб. Во 2017

година го проширува своето знаење во областа на добрата клиничка практика преку обука Applying GCP in the COMBACTE Studies, организирана од COMBACTE NET-EFGCP во Подгорица, Црна Гора. Во периодот од 17.10. до 19.10.2022, учествува на ESCMID постдипломски едукативен курс „Клиничко микробиолошко тестирање во услови со ограничени ресурси и висока застапеност на антимикробна резистенција: улогата на дијагностичкото управување“, Шибеник, Хрватска.

Има објавено два оригинални научни труда (in extenso) во списанија со меѓународен уредувачки одбор и над 25 апстракти презентирани и објавени во книги на апстракти од домашни и меѓународни конгреси.

Во своето петнаесетгодишно работно искуство во областа на микробиологија со паразитологија од почетокот се занимава со резистенција на антибиотици. 2016 година номинирана е од страна на Министерството за здравство како дел од работниот тим на стручни лица за имплементација на EUCAST методологијата за детекција на антимикробна осетливост во микробиолошките лаборатории во Република Македонија.

За време на пандемијата со КОВИД 19, во 2020 учествува во формирање на Лабораторијата за молекуларна дијагностика на SARS CoV 2 при Центар за јавно здравје Битола.

Во 2022 е номинирана Министерството за здравство како дел од работната група за поддршка во областа за зајакнување на лабораториската мрежа на микробиолошките лаборатории од јавниот сектор и воведување на систем за управување со лабораториски информации во Република Северна Македонија.

Во 2023 година од страна на Светската здравствена организација вклучена е како дел од тимот за спроведување на проценка на ризик и врз основа на истиот подготовка на план за унапредување на биолошката безбедност во 11 јавно здравствени лаборатории во Република Северна Македонија кои спроведуваат детекција на SARS CoV 2.

Д-р Крстевска-Келепуровска е активен член на Здружението на микробиолози на Македонија, Европската федерација на микробиолошки друштва (FEMS), EUCAST, Македонско лекарско друштво и Здружение на лекарите на Битола.

На предлог на Здружението на микробиолози на Македонија (ЗММ), а од страна на Македонското лекарско друштво (МЛД), наградена е со две Благодарници (2012 и 2016 година). Од страна на Лекарската комора на Република Северна Македонија, на м-р д-р Елена Крстевска-Келепуровска (2021 година) доделена и е Благодарница (2021 година) за особен придонес и ангажман при справување со пандемијата предизвикана со SARS CoV 2.

Како признание за нејзиниот придонес, во 2024 година од Министерството за здравство на Република Северна Македонија ѝ е доделено звањето „примариус“.

Со оваа докторска дисертација, д-р Крстевска-Келепуровска го продолжува својот континуиран придонес во развојот на микробиолошката наука, јавната здравствена заштита и медицинската едукација во Република Северна Македонија.

