



УНИВЕРЗИТЕТ „СВ. КИРИЛ И МЕТОДИЈ“ ВО СКОПЈЕ



МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

Ивана Александар Наков

**СПОРЕБА НА СЕРУМСКИТЕ НИВОА НА
ВИТАМИН Д И ФОЛАТ КАЈ
ПАЦИЕНТКИ СО ХИСТОЛОШКИ
ВЕРИФИЦИРАНИ ЦЕРВИКАЛНИ
ИНТРАЕПИТЕЛНИ ЛЕЗИИ (ЦИН 1, ЦИН 2 И
ЦИН 3), НАСПРОТИ ПАЦИЕНТКИ СО
УРЕДЕН НАОД**

Докторски труд

Клиничка медицина-гинекологија и акушерство

Скопје, 2025



SS CYRIL AND METHODIUS UNIVERSITY



FACULTY OF MEDICINE, SKOPJE

Ivana Aleksandar Nakov

**“COMPARATION OF SERUM VITAMIN D AND
FOLATE LEVELS IN PATIENTS WITH
HISTOLOGICALLY VERIFIED CERVICAL
INTRAEPITHELIAL LESIONS (CIN 1, CIN 2,
AND CIN 3) VERSUS PATIENTS WITH
NORMAL CYTOLOGY”**

Doctoral dissertation

Clinical medicine-gynecology and obstetrics

Skopje, 2025

Ментор:

Проф.д-р ГОРАН ДИМИТРОВ

Универзитетска клиника за гинекологија и акушерство-Скопје

Комисија за одбрана:

Проф.д-р Ана Данева Маркова (претседател)

Проф.д-р Горан Димитров (ментор)

Проф.д-р Катерина Николоска (член)

Проф.д-р Соња Топузовска (член)

Проф.д-р Марија Димзова (член)

Научна област:

ГИНЕКОЛОГИЈА И АКУШЕРСТВО

Датум на одбрана:

Докторанд:

ИВАНА АЛЕКСАНДАР НАКОВ

Тема:

СПОРЕБА НА СЕРУМСКИТЕ НИВОА НА ВИТАМИН Д И ФОЛАТ КАЈ
ПАЦИЕНТКИ СО ХИСТОЛОШКИ ВЕРИФИЦИРАНИ ЦЕРВИКАЛНИ ИНТРАЕПИТЕЛНИ
ЛЕЗИИ (ЦИН 1, ЦИН 2 И ЦИН 3), НАСПРОТИ ПАЦИЕНТКИ СО УРЕДЕН НАОД

Благодарност до моето семејство, мојот сопруг Зоран и моите Ева и Максим, за безрезервната поддршка и љубов, за нивната присутност и тогаш кога крадев од нашите заеднички моменти, за да се посветам на овој мој личен проект.

Изјавувам дека докторскиот труд е оригинален труд што го имам изработено самостојно.

с.р.

Изјавувам дека електронската верзија на докторскиот труд е идентична со отпечатениот докторски труд.

Потпис на авторот, с.р

Ивана Наков

СПОРЕБА НА СЕРУМСКИТЕ НИВОА НА ВИТАМИН Д И ФОЛАТ КАЈ ПАЦИЕНТКИ СО ХИСТОЛОШКИ ВЕРИФИЦИРАНИ ЦЕРВИКАЛНИ ИНТРАЕПИТЕЛНИ ЛЕЗИИ (ЦИН 1, ЦИН 2 И ЦИН 3), НАСПРОТИ ПАЦИЕНТКИ СО УРЕДЕН НАОД

~Апстракт~

Позадина: Цервикалниот карцином е еден од најчестите малигноми кај жените во светот и претставува значаен јавноздравствен предизвик, особено во земјите во развој. Главен етиолошки фактор е перзистентната инфекција со високо ризични типови на хуман папиломавирус (ХПВ), меѓу кои најчести се ХПВ 16 и ХПВ 18. Сепак, фактот што само дел од инфицираните жени развиваат преканцерозни лезии укажува дека постојат и други кофактори кои влијаат врз прогресијата на болеста. Во последните години, зголемено внимание се посветува на нутритивните и метаболичките фактори, особено на витамин Д и фолатите, поради нивната улога во регулацијата на клеточниот циклус, имунолошката реакција и стабилноста на геномот. Дефицитот на овие микронутриенти може да ја ослаби клеточната отпорност на онкогената трансформација и да ја поттикне перзистенцијата на вирусот, што ја зголемува веројатноста за појава на цервикални интраепителни лезии (ЦИН).

Цел: Главната цел на ова истражување беше да се испита поврзаноста меѓу серумските нивоа на витамин Д и фолат и присуството и тежината на ЦИН кај жени со различен ХПВ статус, како и да се утврди нивната улога во прогресијата на лезиите. Дополнително, се анализираа влијанието на возраста, индексот на телесна маса (БМИ), пушењето и другите биохемиски параметри врз нивото на овие витамини и ризикот од појава на ХПВ инфекција.

Материјали и методи: Истражувањето беше спроведено како проспективна клиничка студија во која беа вклучени 122 испитанички поделени во четири групи: контрола со уреден ПАП тест и три групи со хистолошки потврдени ЦИН 1, ЦИН 2 и ЦИН 3. Се определуваа серумските нивоа на витамин Д и фолат со ензимско имунохемиски метод (ELISA), а биохемиските параметри (хемоглобин, глукоза, холестерол и железо) беа определени со стандардни лабораториски техники. Генотипизацијата на ХПВ беше извршена со PCR метод, при што беа детектирани и класифицирани високо ризичните типови. Податоците беа статистички обработени со употреба на SPSS, користејќи t-тест, ANOVA и корелациски анализи; $p < 0,05$ се сметаше за статистички значајно.

Резултати: Испитаничките со ЦИН имаа значајно пониски нивоа на витамин Д и фолат во споредба со контролната група ($p < 0,05$). Најизразен дефицит беше регистриран кај жените со ЦИН 3 и инфекција со ХПВ 16. Се утврди негативна корелација меѓу концентрацијата на витамин Д и степенот на лезијата ($r = -0,42$, $p < 0,01$), како и меѓу фолатите и присуството на ХПВ инфекција ($r = -0,37$, $p < 0,05$). Пушачките и испитаничките со повисок БМИ имаа дополнително намалени вредности на овие витамини. Анализата покажа дека комбинираниот дефицит на витамин Д и фолат е значаен предиктор за прогресија на ЦИН (OR = 3,27; 95% CI: 1,48–7,21). Жените со адекватни нивоа на овие витамини имале повисока стапка на спонтан клиренс на ХПВ, што укажува на заштитна биолошка улога.

Заклучок: Добиените резултати потврдуваат дека дефицитот на витамин Д и фолат е значајно поврзан со повисок ризик од појава и прогресија на цервикални интраепителни лезии, особено кај жени инфицирани со високо ризични ХПВ типови. Овие витамини претставуваат важни имунолошки и метаболички регулатори кои можат да влијаат на природниот тек на ХПВ инфекцијата. Истражувањето укажува дека редовниот скрининг на витамин Д и фолат, како и нивната суплементација, може да бидат корисен дополнителен пристап во превенцијата на ЦИН и цервикален карцином. Овие наоди отвораат нови перспективи за развој на интегрирани стратегии кои комбинираат нутритивна, имунолошка и вирусолошка проценка на ризикот кај жените со ХПВ инфекција.

Клучни зборови: витамин Д; фолат; хуман папиломавирус (ХПВ); цервикални интраепителни лезии (ЦИН); ХПВ 16; ХПВ 18; нутритивен статус; имунолошки одговор; ризик фактори; превенција на цервикален карцином

Ivana Nakov

COMPARATION OF SERUM VITAMIN D AND FOLATE LEVELS IN PATIENTS WITH HISTOLOGICALLY VERIFIED CERVICAL INTRAEPITHELIAL LESIONS (CIN1, CIN 2, AND CIN) VERSUS PATIENTS WITH NORMAL CYTOLOGY

~Abstract~

Background: Cervical cancer remains one of the most common malignancies among women worldwide and represents a major public health challenge, particularly in developing countries. Persistent infection with high-risk types of human papillomavirus (HPV), primarily HPV 16 and HPV 18, is recognized as the main etiological factor. However, since only a small proportion of infected women develop precancerous lesions, it is assumed that additional cofactors influence the disease progression. In recent years, growing attention has been directed toward nutritional and metabolic factors, especially vitamin D and folate, due to their role in cell cycle regulation, immune response modulation, and genomic stability. Deficiency of these micronutrients may weaken cellular defense mechanisms against oncogenic transformation and promote viral persistence, thereby increasing the risk of developing cervical intraepithelial neoplasia (CIN).

Objective: The main objective of this study was to investigate the association between serum levels of vitamin D and folate and the presence and severity of CIN among women with different HPV status, with special emphasis on high-risk HPV types 16 and 18. Additionally, the study aimed to evaluate the influence of age, body mass index (BMI), smoking habits, and other biochemical parameters on vitamin and folate concentrations and their potential impact on HPV infection and lesion progression.

Materials and Methods: This prospective clinical study included 122 women divided into four groups: a control group with normal cytological findings and three groups with histologically confirmed CIN 1, CIN 2, and CIN 3. Serum concentrations of vitamin D and folate were determined using an enzyme-linked immunoassay (ELISA), while biochemical parameters (hemoglobin, glucose, cholesterol, and serum iron) were analyzed using standard laboratory methods. HPV genotyping was performed using PCR to detect and classify high-risk viral types. Statistical analysis was conducted using SPSS software, applying Student's t-test, ANOVA, and correlation analyses; a p-value < 0.05 was considered statistically significant.

Results: Women with CIN had significantly lower serum levels of vitamin D and folate compared to the control group ($p < 0.05$), with the lowest concentrations observed in women with CIN 3 and HPV 16 infection. A negative correlation was found between vitamin D levels and lesion severity ($r = -0.42$, $p < 0.01$), as well as between folate levels and HPV persistence ($r = -0.37$, $p < 0.05$). Smokers and women with higher BMI showed additional reductions in these vitamin levels. The combined deficiency of vitamin D and folate was identified as a strong predictor for CIN progression (OR = 3.27; 95% CI: 1.48–7.21). Furthermore, women with adequate levels of both vitamins demonstrated higher rates of spontaneous HPV clearance, indicating a protective biological effect.

Conclusion: The findings of this study confirm that vitamin D and folate deficiencies are significantly associated with an increased risk of developing and progressing cervical intraepithelial lesions, particularly in women infected with high-risk HPV types. These vitamins act as essential immunological and metabolic regulators that can influence the natural course of HPV infection. The study suggests that regular screening of vitamin D and folate levels, alongside appropriate supplementation, may serve as a beneficial adjunct strategy in cervical cancer prevention. The results provide new insight into the interplay between nutritional status and viral oncogenesis and open avenues for future interventional research aimed at nutritional and immunological modulation in women with HPV infection.

Keywords: vitamin D; folate; human papillomavirus (HPV); cervical intraepithelial neoplasia (CIN); HPV 16; HPV 18; nutritional status; immune response; risk factors; cervical cancer prevention.

СОДРЖИНА:

1. ВОВЕД.....	14
1.1 Причини кои водат до појава на цервикален карцином	15
1.2 Превенција на појава на цервикален карцином.....	16
1.2.1 Рано детектирање на ХПВ инфекција и други чекори на превенција.....	16
1.2.1.1 Вакцинација против ХПВ.....	18
1.2.1.2 Најнови препораки на СЗО за вакцините против хуман папиломавирус.....	19
1.2.2 Цервикален скрининг и третман на преканцерози.....	20
1.2.3 Рана детекција, дијагноза и третман на цервикалниот карцином	21
1.3 Хуман папиломавирус и неговото значење	22
1.3.1 Епидемиологија.....	22
1.3.2 Класификација на хуман папиломавирусите.....	22
1.3.3 Ризик фактори.....	23
1.3.4 Патогенеза и симптоми на инфекцијата.....	25
1.3.4.1 Симптоми и клинички манифестации.....	26
1.3.5 ХПВ-асоцирани карциноми: патогенеза и епидемиологија.....	27
1.4 Витамин Д како модулатор на имунолошкиот одговор и ризикот за цервикални интраепителни лезии.....	29
1.4.1 Улогата на витамин Д кај цервикалниот карцином.....	30
1.4.2 Витамин Д ендокрин систем.....	31
1.4.3 Витамин Д ендокриниот систем кај цервикалниот карцином.....	33
1.5 Фолат како модулатор на имуниот одговор и ризикот од цервикални интраепителни лезии.....	40
1.5.1 Фолат и неговата улога во клеточната репродукција.....	41
1.5.2 Фолат и ризикот од ХПВ инфекција.....	42
1.6 Други биолошки и животни фактори поврзани со ризикот за цервикални интраепителни лезии.....	43
1.7 Мотив на истражувањето.....	44
2. ЦЕЛИ НА ИСТРАЖУВАЊЕТО.....	44
2.1 Општа цел.....	45
2.2 Специфични цели.....	45

3. МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ.....	46
3.1 Дизајн на студијата.....	46
3.2 Испитаници.....	46
3.3 Групи.....	46
3.4 Временска рамка.....	47
3.5 Инклузиони критериуми.....	47
3.5.1 За испитуваната група.....	47
3.5.2 За контролната група.....	47
3.6 Ексклузиони критериуми.....	47
3.7 Прашалник за собирање на податоци.....	48
3.8 Земање и обработка на примероци.....	50
3.8.1 Одредување на витамин Д.....	50
3.8.2 Одредување на фолат.....	51
3.8.3 ХПВ типизација.....	51
3.9 Статистичка анализа.....	52
3.10 Етички аспекти.....	53
4.РЕЗУЛТАТИ.....	54
4.1 Демографски и базични карактеристики на испитаниците.....	54
4.2 Возраст, пушачки статус и останати здравствени карактеристики.....	59
4.3 Индекс на телесна маса.....	63
4.4 Други лабораториски параметри.....	64
4.5 Поврзаност на хигиено-диететски навики и присуството на високо-ризичен ХПВ.....	67
4.6 Серумски вредности на витамин Д и фолат кај пациентки со цервикални интраепителни лезии.....	68
4.6.1 Серумски концентрации на витамин Д.....	68
4.6.2 Серумски концентрации на фолат.....	70
4.7 Распределба на ХПВ генотипови кај испитуваните пациентки.....	74
4.7.1 Доминирачки ХПВ типови.....	75
4.7.2 Опис на застапеноста.....	76
4.8 Резултати од корелационата и регресиската анализа.....	76
5.ДИСКУСИЈА.....	78
5.1 Интерпретација на резултатите.....	78

5.2 Молекуларен механизам на дејството на витамин Д и фолатот во патогенезата на ХПВ инфекцијата.....	79
5.3 Споредба со литература.....	80
5.4 Биолошка интерпретација и механизми.....	81
5.5 Нутритивни навики и клиничка важност.....	81
5.6 Ограничувања и идни насоки.....	82
6.ОГРАНИЧУВАЊА И ЛИМИТАЦИИ.....	82
6.1 Ограничувачки фактори за витамин Д.....	83
6.2 Ограничувачки фактори во однос на фолат.....	85
7. ЗАКЛУЧОЦИ.....	86
7.1 Заклучоци од демографската и биохемиската анализа.....	86
7.2 Главни научни заклучоци.....	86
7.3 Потенцијална клиничка импликација.....	86
7.4 Нучен придонес и значење на резултатите.....	87
7.5 Ограничувања и насоки за идни истражувања.....	88
7.6 Општи заклучоци и јавноздравствени импликации.....	88
7.7 Финален заклучок.....	89
Листа на најчесто употребувани кратенки.....	91
Референци.....	92

1. ВОВЕД

Цервикалниот карцином останува еден од водечките малигнитети кај женската популација на глобално ниво, со значително оптоварување врз здравствените системи, особено во земјите со низок и среден приход. Меѓу карциномите кај женската популација го зазема високото четврто место, со околу 660000 нови случаи детектирани во 2022 година, според податоците на GLOBOCAN (WHO, IARC)^[1]. Истата година, околу 94% од сите 350000 смртни случаи поради овој карцином се случиле во земјите во развој^[1].

Најголемиот дел од новорегистрираните случаи и смртноста се забележуваат во региони каде што превентивните програми, вакцинацијата и организираниот скрининг се ограничени или недоволно достапни.

Имуносупресијата предизвикана од ХИВ инфекцијата значително го зголемува ризикот за перзистенција на високо-ризични ХПВ типови и последователен развој на цервикален карцином. Се проценува дека кај оваа популација веројатноста за појава на инвазивна болест е повеќекратно зголемена во споредба со општата женска популација. Пресметано дека околу 5% од сите случаи на цервикален карцином се поврзани со ХИВ^[1]. Цервикалниот карцином непропорционално ги афектира помладите жени, и како резултат на тоа, 20% од децата кои ги губат своите мајки поради карцином, ги губат поради цервикалниот карцином^[2].

Република Северна Македонија има популација од 890171 жена постари од 15 години кои спаѓаат во ризична категорија за развој на цервикален карцином. Според IARC/HPV Centre, секоја година се дијагностицираат приближно 113 нови случаи на цервикален карцином, а стапката е 10.9/100 000 жени^[2]. Цервикалниот карцином се рангира како петти најчест карцином кај жените во Северна Македонија и трети најчест меѓу жените помеѓу 15 и 44 годишна возраст. За жал, немаме официјални податоци за преваленцата на инфекциите со високоризични соеви на хуман папиломавирус^[2].

Еден од најзначајните чекори во напредокот на науката за проучување на цервикалниот карцином е откривањето на перзистентната инфекција со некои генотипови на хуман папиломавирус (ХПВ), како причина за настанување на цервикален карцином. Ова е многу значајно научно откритие на германскиот вирусолог Harald zur Hausen. Тој, во 70-тите години на

минатиот век, прв предложил дека хуман папиломавирусот (ХПВ) е причина за настанување на лезиите на грлото на матката, а не херпес симплекс вирусот, на кој дотогаш научниците се сомневале.

Иако последниве години, забележан е значаен напредок, стратегијата заснована на вакцинација и тестирања останува темел во борбата против ХПВ-асоциран карцином на грлото на матката^[3]. 70% од сите цервикални карциноми се предизвикани од типови 16 и 18.

1.1 Причини кои водат до појава на цервикален карцином

Инфекцијата со ХПВ е најчестата сексуално пренослива инфекција која ги зафаќа кожата, гениталната област, вклучително и гениталните органи и грлото на утерусот. Факт е дека, скоро сите сексуално активни луѓе, во некој момент од нивниот живот, ќе дојдат во контакт или ќе бидат инфицирани со хуман папиломавирус, вообичаено без симптоми.

Во најголем дел од случаите имуниот систем ќе го елиминира хуман папиломавирусот од телото, бидејќи постои т.н. спонтан клиренс. Но, перзистентната инфекција со високо-ризичен хуман папиломавирус, може да предизвика да се развијат абнормални клетки, кои потоа можат да преминат во цервикален карцином^[1,2].

Хуманите папиломавируси (ХПВ) претставуваат група на мали ДНК вируси со изразена афинитет кон епителните клетки, особено кон плочестиот епител и клетките со сквамозна диференцијација. Нивниот биолошки циклус е строго поврзан со процесот на диференцијација на инфицираните клетки, при што вирусната репликација се одвива исклучиво во целосно диференциран епител. ХПВ се високо вид-специфични и ги инфицираат исклучиво луѓето, покажувајќи јасно дефиниран ткивен тропизам.

Во последните 25 години, едно од најзначајните научни откритија во проучувањето на карциномите е идентификацијата на перзистентната инфекција со хуман папиломавирусни генотипови како причинител на цервикалниот карцином^[3]. Токму таа, перзистентна инфекција со ХПВ на грлото на матката, која е нетретирана, е причина за 95% од сите цервикални карциноми.

Развојот на цервикалниот карцином по инфекција со високо-ризичен ХПВ обично претставува долг и постепен процес, кој кај имуно-компетентни жени може да трае повеќе од една деценија. Кај пациентки со нарушен имунолошки одговор, како што се жени со

нетретирана ХИВ инфекција, овој временски интервал може значително да се скрати, што резултира со побрза прогресија од преканцерозни лезии кон инвазивна болест. Ризик фактори кои се од значење за прогресијата на карциномот се висока онкогеност на типот на ХПВ, имуниот статус, присуството на друга сексуално пренослива инфекција, паритетот, рана возраст на прва бременост, употреба на орални контрацептиви и пушење, односно консумација на тутун^[1,2].

1.2. Превенција на појава на цервикален карцином

Централната стратегија на СЗО од 2020 година е тројниот пристап, односно вакцинација, скрининг, третман.

Зголемувањето на свеста во јавноста, пристапот до информации и услуги се клучни за превенцијата и контролата на цервикалниот карцином, и тоа преку:

- Вакцинацијата, која е високо ефикасен начин за превенирање на ХПВ инфекција, цервикален карцином и други ХПВ-асоцирани карциноми
- Скринингот, од возраст од 30 години (или 25 години кај жени заразени со ХИВ) кој овозможува откривање на цервикални преканцерозни промени, кои ако се истретираат на време, можат да ја спречат прогресијата во карцином
- И, без разлика на возраста и присуството на симптоми, раната детекција проследена со соодветен и квалитетен третман може да доведе до излекување на цервикалниот карцином^[4-8].

1.2.1 Рано детектирање на ХПВ инфекција и други чекори за превенција

Начинот на рано детектирање на ХПВ инфекција се базира главно на тестови кои откриваат присуство на вирусот или преканцерозните промени предизвикани од инфекцијата. Главните методи се:

1. ПАП тест (Папаниколау тест)

Тој е најчесто користениот скрининг метод за откривање на аномалии на клетките во грлото на матката. Открива абнормални клетки кои можат да укажуваат на ХПВ инфекција или преканцерозни состојби. Овај тест не ја детектира директно ХПВ инфекцијата, но е важен за рано откривање на промени.

2. Тест за ХПВ ДНК (ХПВ типизација)

Ова е молекуларен тест кој директно ги открива вирусните ДНК типови, особено високоризичните (на пр. ХПВ-16 и ХПВ-18). Може да се користи за скрининг кај жени со абнормален ПАП тест или како дел од рутински преглед. Овој тест помага да се утврди дали инфекцијата е со високоризичен тип кој има потенцијал да предизвика рак.

3. Визуелна инспекција со оцетна киселина (VIA)

Самиот тест е дел од процедурата колпоскопија. Се однесува на аплицирање на оцетна киселина на грлото на матката. Промените на клетките инфицирани со ХПВ се визуелно препознаваат како бели дамки. Ова е поедноставен метод, користен во земји со ограничени ресурси.

4. Тестови за цитологија и хистологија

Опфаќаат биопсија и микроскопска анализа на сомнителни ткива. Се користи кога ПАП тестот или ХПВ тестот укажуваат на абнормалности.

Други значајни начини за превенција на ХПВ инфекција вклучуваат:

- Престанок со пушење
- Употреба на кондоми
- Спроведување на циркумсизија кај мажи^[4-8]

1.2.1.1 Вакцинација против ХПВ

Вакцините стимулираат имунолошки одговор против ХПВ, спречувајќи инфекција. Од 2023 година, глобално се достапни шест ХПВ вакцини. Сите тие обезбедуваат заштита од ХПВ типовите 16 и 18 — најчести причинители на цервикален карцином — и се покажале како безбедни и ефикасни во превенцијата на инфекцијата и последователниот развој на болест.

Како приоритет, ХПВ вакцините треба да се администрираат кај девојчиња на возраст од 9–14 години, пред сексуалната активност. Вакцината може да се даде во една или две дози, додека кај лица со ослабен имунитет се препорачуваат две или три дози.

Некои држави спроведуваат вакцинација и кај момчиња, со цел да се намали преваленцата на ХПВ во популацијата и да се превенираат ХПВ-асоцирани карциноми кај мажите.

Моментално лиценцираните вакцини против ХПВ се претставени во Табела 1., кои се разликуваат по бројот на ХПВ соеви од кои штитат.

Cervarix (2-валентна вакцина)

- Го покрива ХПВ 16 и ХПВ 18, два најчести типови поврзани со рак на грлото на матката.

Gardasil (4-валентна вакцина)

- Го покрива ХПВ 6, 11 (кои предизвикуваат генитални брадавици) и ХПВ16, 18.

Gardasil 9 (9-валентна вакцина)

- Го покрива ХПВ 6, 11, 16, 18, и дополнително пет високоризични типови (31, 33, 45, 52 и 58). Ова е најширокоспектарната вакцина која нуди заштита од приближно 90% од ХПВ асоцираните ракови.

Other region-specific vaccines (на пример: Cocolin, qHPV вакцини во некои земји)

- Некои земји имаат свои верзии или варијанти на вакцини кои се слични по покриеност.

Во 2020 година, Светската здравствена организација ја апдејтираше нејзината позиција во однос на вакцините против ХПВ, претставувајќи нови препораки кои вклучуваа опција за распоред за вакцинација со една доза^[4]. Овие препораки дојдоа по алармирањето за глобалниот пад на стапките на вакцинација против ХПВ. Помеѓу 2019 и 2021 година, стапката на девојчиња кои примиле прва доза на вакцина против ХПВ паднала од 25% на 15%, оставајќи дополнителни 3,5 милиони девојчиња невакцинирани во 2021, споредено со 2019^[6].

Име на брендот	Валентност	Таргетираны ХПВ типови
Cervarix	bivalent	16,18
Cecolin	bivalent	16,18
Walrinvax	bivalent	16,18
Gardasil	quadrivalent	16,18,6,11
Cervavax	quadrivalent	16,18,6,11
Gardasil9	nonvalent	16,18,31,33,45,52,58,6,11

Табела 1. ХПВ вакцини лиценцирани од СЗО 2024^[4].

Во табела 1 се прикажани сите шест вакцини кои се официјално лиценцирани од СЗО^[4].

1.2.1.2 Најнови препораки на СЗО за вакцините против хуман папиломавируси

Во октомври 2024 година, Светската здравствена организација (СЗО) објави преквалификација на Cecolin како четврта вакцина против хуман папиломавирус одобрена за употреба во еднодозен распоред^[9]. Оваа одлука беше подржана од новите податоци кои демонстрираа дека Cecolin ги исполнува критериумите поставени од СЗО од 2020 година. ХПВ вакцината Cecolin, е двовалентна вакцина, која ги таргетира ХПВ типовите 16 и 18. Беше воведена во Кина во 2020 година како вакцина со пониска цена за разлика од алтернативите^[10]. Клиничките студии ја демонстрираа нејзината безбедност и имуногеност, и не забележуваат инфериорност во однос на Gardasil, дадена во две дози^[11]. Фазата 2 од студијата на деветвалентната верзија, Cecolin 9, покажала висока стапка на сероконверзија и добра

толерантност кај жени од 18 до 45 години^[12]. Мета-анализа која ги компарира ХПВ вакцините открива дека Secolin е најефикасна против ХПВ тип 18 перзистентната инфекција, со ефикасност од 98%^[13].

На втори август 2024 година, СЗО ја преквалификуваше и петтата вакцина против ХПВ, Walgriavax, за глобална употреба. Оваа вакцина е одобрена во дво-дозен режим. Студиите за оваа двовалентна ХПВ 16/18 вакцина демонстрираат одговори кај адолесцентните девојки кои не се инфериорни, споредено со млади жени, со перзистентни нивоа на антитела до 36 месеци после вакцинација^[14]. За сега не е одобрена за употреба во една доза, но понатамошните истражувања во иднина, можеби ќе ја докажат и оправданоста на овој пристап.

1.2.2 Цервикален скрининг и третман на преканцерози

Жените треба да подлежат на скрининг за цервикален карцином секои 5–10 години, почнувајќи од 30-годишна возраст. Кај жени заразени со ХИВ, скринингот треба да се спроведува на секои 3 години, почнувајќи од 25-годишна возраст. Глобалната стратегија препорачува минимум два скрининзи со високо-сензитивен ХПВ тест — првиот на возраст од 35 години, а вториот на 45 години. Бидејќи преканцерозните лезии ретко предизвикуваат симптоми, редовниот скрининг е клучен, дури и кај жените кои се вакцинирани против ХПВ. Самостојното земање примерок за ХПВ тест, кое претставува популарна алтернатива за многу жени, се покажало како сигурен метод, подеднакво точен како примерокот земен од здравствен работник. Доколку резултатот од ХПВ тестот (или друг скрининг метод) е позитивен, следи колпоскопски преглед за детекција на евентуални преканцерозни промени на грлото на матката.

Третманот на преканцерозните лезии обично е едноставна, брза и безболна процедура која значително го намалува ризикот од развој на цервикален карцином^[1,2].

Чекорите во третманот на преканцерозите вклучуваат:

- Колпоскопија или визуелна инспекција на грлото на матката за идентификација на лезијата
- Процена на лезијата
- Соодветен третман според клиничките упатства

- Термална аблација, која користи загреана сонда за уништување на абнормалните клетки
- Криотерапија, при што се користи ладна сонда за замрзнување и елиминирање на клетките
- LEETZ (large loop excision of the transformation zone), метод со електрично загреана жица за отстранување на абнормалното ткиво
- Конус биопсија, која вклучува хируршко отстранување на ткиво во форма на конус, со помош на скалпел^[1-8].

1.2.3 Рана детекција, дијагноза и третман на цервикалниот карцином

Цервикалниот карцином може да се излечи доколку се дијагностицира и третира во рана фаза на болеста. Раното препознавање на симптомите и навременото барање медицинска помош се од суштинско значење^[1,2]. Жените треба да побараат лекарска помош доколку имаат некој од следните симптоми:

- Невообичаено вагинално крварење помеѓу менструални циклуси, по менопауза или по сексуален однос
- Вагинален исцедок со непријатен мирис
- Перзистентна болка во грбот, нозете или карлицата
- Необјаснето губење на телесна тежина, гадење, губиток на апетит
- Прекумерно потење на нозете

По иницијалната клиничка проценка и дијагностичките испитувања, следи соодветно упатување за третман: хируршка интервенција, радиотерапија и/или хемотерапија. Во напреднати стадиуми, важна е и палијативната нега која овозможува супортивна грижа и контрола на болката.

Соодветен менаџмент на инвазивниот цервикален карцином е клучен за навремено дијагностицирање и започнување на соодветен третман. Целта е пациентката да биде адекватно упатена, навремено дијагностицирана и вклучена во соодветен третман. Клучните карактеристики на квалитетната грижа вклучуваат :

- Ран пристап до дијагностика и третман

- Обезбедување интегрирана грижа на сите нивоа
- Навремено следење и поддршка
- Присуство на мултидисциплинарни тимови
- Обука на медицинскиот персонал
- Навремен одговор на потребите на пациентките^[1-8].

1.3 Хуман папиломавирус и неговото значење

1.3.1 Епидемиологија

Над 80% од мажите и жените ќе се заразат со ХПВ до 45-годишна возраст, покажале Chesson et al. кои работела на проценка на веројатноста во тек на животот за инфекција со ХПВ во САД пред воведувањето на вакцинацијата против ХПВ. Кај поединци кои имале барем еден партнер од спротивниот пол, се проценува дека 85% од жените и 91% од мажите ќе се заразат со ХПВ во текот на животот^[1]. Мета-анализата од 2010 година, која вклучувала 194 студии и околу еден милион жени тестирани на цервикална ХПВ инфекција, покажала дека најчестите генотипови се ХПВ типовите 16, 18, 52, 31, 58, 39, 51 и 56, но преваленцата се разликува по региони. Потсахарска Африка има највисока преваленца (24,0%), особено Источна Африка (33,6%). Инфекцијата е почеста во сиромашните отколку во индустријализираните земји, според географската распределба. Сепак, без оглед на степенот на развој, Западна Азија (1,7%) има најниска преваленца, додека Источна Европа (21,4%) има висока преваленца^[2]. Северна Америка има најниска генотипска разновидност, додека Азија покажува највисока^[3]. Дополнително, најновата мета-анализа покажа дека преваленцата на генитална ХПВ инфекција е висока и кај мажите над 15 години. Глобално, речиси еден од тројца мажи е инфициран со ХПВ од кој било тип, а приближно еден од пет мажи носи еден или повеќе високо-ризични (HR) типови на хуман папиломавирус^[4].

1.3.2 Класификација на хуман папиломавирусите

Класификацијата на ХПВ се заснова врз разликите во нивната ДНК секвенца. Постојат пет родови на ХПВ: Alpha, Beta, Gamma, Mu и Nu, кои понатаму се категоризираат на

подтипови со висок ризик (high-risk ХПВ, HR-ХПВ) и со низок ризик (low-risk ХПВ, LR-ХПВ)^[5]. Според досега достапните податоци, идентификувани се најмалку 448 различни типови на ХПВ, од кои 15 се класифицирани како канцерогени: ХПВ типови 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 и 82^[6,7]. Дополнително, типовите 26, 53 и 66 се сметаат за потенцијално канцерогени^[7]. Највисок онкоген потенцијал покажуваат типовите ХПВ 16 и ХПВ 18; меѓутоа, нивната патогеност може да варира зависно од регионалната генетска разновидност^[8]. Врз основа на анализа на секвенците од долгиот контролен регион (long control region, LCR) на ХПВ 16, можат да се разликуваат пет генетски групи: Европска (Е), Азијска (As), Азијско-Американска (АА), Африканска 1 (Af-1) и Африканска 2 (Af-2)^[3].

1.3.3 Ризик фактори

Иако бариерните методи на контрацепција, како што се кондомите, се ефикасни во намалувањето на преносот на голем број сексуално преносливи инфекции, тие не обезбедуваат целосна заштита од ХПВ, бидејќи вирусот може да се пренесе и преку контакт кожа-на-кожа или преку контакт помеѓу инфицирани прсти и гениталии, а според најновите сознанија и може да помине и преку порите на презервативот^[9].

Дополнително, присуството на *Chlamydia trachomatis* може да го зголеми ризикот од инфекција со ХПВ, како и да придонесе за подолготрајна перзистенција на вирусот^[10,11]. Други ризик-фактори вклучуваат полот, младата возраст и бројот на сексуални партнери^[9,12]. Полов однос со нов сексуален партнер носи зголемен ризик од вирусна инфекција, а со тоа и потенцијален развој на канцер^[13,14].

Жените се почувствителни на инфекција со хуман папиломавирус. Фреквенцијата на откривање на ХПВ се јавува во два пика низ животниот век. Најзагрозени се девојките во пубертет и жените под 20-годишна возраст. Откривањето на ХПВ, особено на типови со низок ризик (LR-ХПВ), се среќава и кај постари жени над 55 години, што најверојатно повеќе е поврзано со перзистенција или реактивација на претходно стекната инфекција, отколку со нова или неодамнешна инфекција^[15,16].

Зголемемиот број на породувања во термин за породување е поврзан со повисок ризик од инвазивен цервикален карцином и хронична ХПВ инфекција. Оваа поврзаност може да се

објасни со имуносупресија предизвикана од бременост, која може да ја поттикне ХПВ инфекцијата или да го засили нејзиниот канцероген потенцијал^[17,18].

Децата, како вулнерабилна категорија, може да се заразат со ХПВ преку контакт помеѓу брадавица кај родителот (присутна на раката на пример) и кожата на детето при менување пелени или чистење на аногениталната регија^[19,20]. Постои и ризик од инфекција со вирусот во перинаталниот период, бидејќи е утврдено присуство на исти на генотипови на ХПВ кај мајките и новороденчињата^[21]. Доколку мајката има генитална ХПВ инфекција, фетусот може да се зарази преку микроскопски оштетувања (микроруптури) на феталните мембрани или плацентата^[19]. Бидејќи ХПВ не предизвикува виремија, малку е веројатно дека вирусот се пренесува преку мајчиното млеко^[22].

Новите истражувања покажуваат дека пушењето тутун ја поттикнува прогресијата на лезиите предизвикани од ХПВ со висок ризик (HR-ХПВ) кон преканцерозни состојби и сквамозноклеточни карциноми на главата и вратот, грлото на матката, анусот и пенисот^[23,24,25]. Супстанциите присутни во чаdot од цигари, од кои најмалку 60 се канцерогени кај човекот, може да придонесат за зголемена експресија на вирусот во клетките^[26].

Прашањето дали употребата на орални хормонални контрацептиви го зголемува ризикот од прогресија на ХПВ инфекцијата останува контроверзно, поради што се потребни дополнителни анализи^[27].

Најновите студии укажуваат дека одредени здравствени состојби, како што се дијабетес, преддијабетес и имуносупресија, предиспонираат поединци за инфекција со ХПВ^[25,28]. Перзистенцијата на ХПВ, особено на типовите со висок ризик, се забележува и кај лица со нарушен имунолошки одговор, како што се ХИВ-позитивни пациенти^[29,30].

Дополнително, ХПВ претставува фактор кој што придонесува во патогенезата на вагинална интраепителна неоплазија кај пациентки изложени на диетилстилбестрол (DES)^[31].

1.3.4 Патогенеза и симптоми на инфекцијата

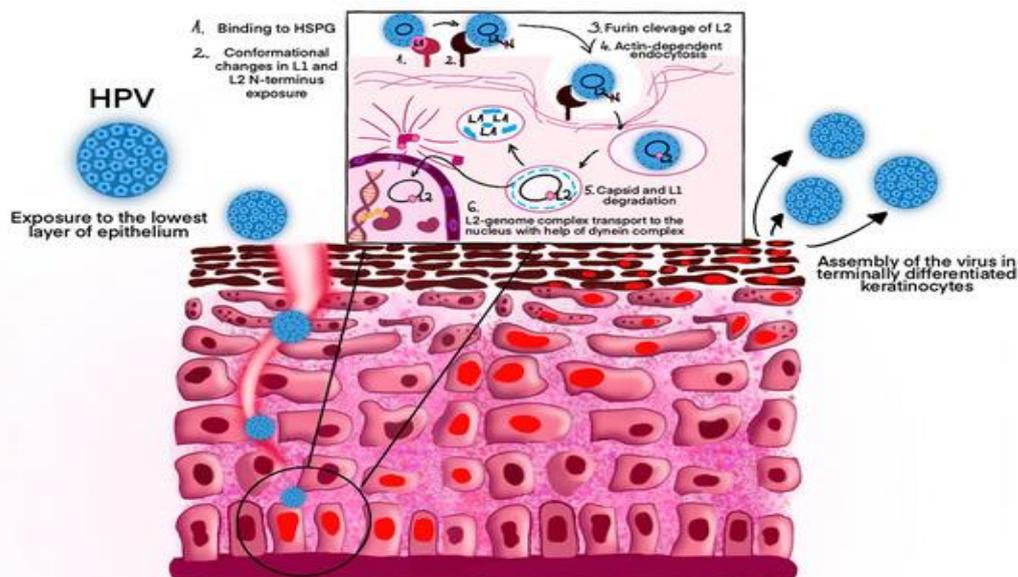
Хуманите папиломавируси (ХПВ) го инфицираат базалниот слој на епителните клетки, кој е недиференциран и подложен на делба. Пристапот до овие клетки е можен само при микроповреди што го нарушуваат интегритетот на епителот^[32].

Во првата фаза, L1 протеинот од вирусниот капсид се врзува за хепаран сулфат протеогликаните на површината на клетките. Потоа се менува структурата на капсидот под влијание на циклофилин В, при што L2 протеинот станува изложен и се активира преку фурин-зависна протеолиза^[33–37]. Ако не дојде до ова сечење, вирусот останува заробен во ендозомите и инфекцијата не продолжува.

Следува актино-зависна ендоцитоза на вирусот, по што вирионот навлегува во ендозоми со кисела средина. L1 протеинот се деградира, додека L2 го транспортира вирусниот геном до јадрото преку интеракција со сортинг-протеин нексин 17 и микротубуларниот мотор динеин^[32,38,39].

Во јадрото започнува транскрипција на раните вирусни протеини E1 и E2, кои ја регулираат репликацијата на вирусната ДНК. Протеините E6 и E7 ја менуваат функцијата на клеточниот циклус, овозможувајќи продолжена делба на инфицираните клетки. E7 го инактивира pRb, со што E2F останува активен и поттикнува синтеза на клеточни циклини, додека E6 го деградира p53, што ја спречува апоптозата^[40–42].

Созревањето на вирусот се одвива во терминално диференцираните кератиноцити. Во оваа фаза, L1 протеините формираат дисулфидни врски кои го стабилизираат капсидот, а E4 протеинот овозможува ослободување на вирионите од клетката^[43–45].



Слика 1. Патогенеза на ХПВ инфекцијата [46]

На дијаграмот е прикажан циклусот на инфекција — од навлегување преку микроповреди, врзување со клеточната мембрана и ендоцитоза, до транспортот на вирусниот геном во јадрото и ослободување на новите вириони.

1.3.4.1 Симптоми и клинички манифестации

Во повеќето случаи, ХПВ инфекцијата е асимптоматска и транзиторна. Таа обично се елиминира за 12–18 месеци кај инфекции со високоризични типови и за 4–9 месеци кај нискоризични [47].

Цервиковагиналниот микробиом има значајна улога во елиминацијата на вирусот. Доминацијата на *Lactobacillus* spp. се смета за заштитен фактор, додека зголеменото присуство на бактерии како *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus*, *Prevotella* и *Sneathia amnii* е поврзано со перзистенција на HR-ХПВ и ризик од CIN 2+ лезии [48–51]. Некои *Gardnerella* видови продуцираат ензими (сијалидази) кои ја разградуваат мукозната бариера и поттикнуваат биофилм, што дополнително го олеснува опстанокот на вирусот [52].

Потребни се поголеми проспективни студии за потврда на овие наоди и за развој на терапии базирани на модулација на вагиналниот микробиом [48,49,51].

Клинички, инфекцијата може да се манифестира со кожни брадавици, condyloma acuminata и рекурентна респираторна папиломатоза. Кожните брадавици најчесто се јавуваат кај деца и млади лица, предизвикани од ХПВ4 и ХПВ65^[3,53]. ХПВ6 и ХПВ11 предизвикуваат околу 90% од случаите на condyloma acuminata, кои најчесто се појавуваат на аногениталната регија, јазикот или усните^[54,55].

Времето помеѓу инфекцијата и појавата на лезиите изнесува 5–12 месеци, зависно од полот и имунолошкиот одговор. Половите хормони, особено прогестеронот и естрогенот, може да влијаат на клетките инфицирани со ХПВ и да делуваат како кофактори во развојот на цервикалната неоплазија^[56,57].

Лезиите можат да бидат рамни, брадавичести или кератинизирани, а инфекциите со ХПВ16 и ХПВ18 можат да доведат до Bowenoid papulosis, која претставува преканцерозна промена што бара хируршко отстранување^[58,59].

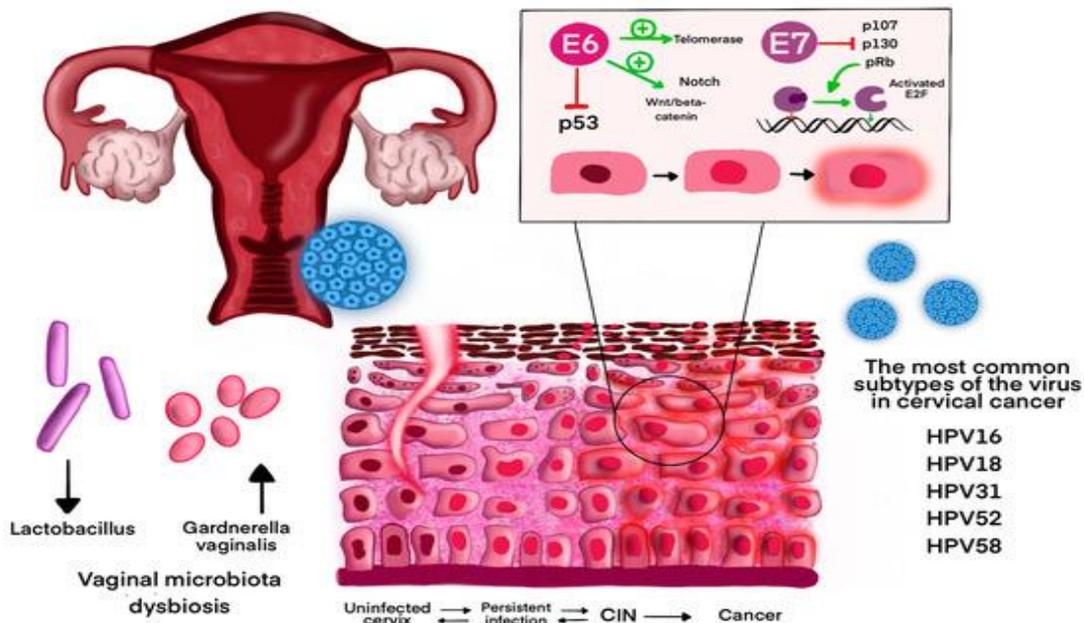
Рекурентната респираторна папиломатоза (RRP), предизвикана од ХПВ6 и ХПВ11, е бенигна, но може да предизвика тешкотии во дишењето и засипнатост. Постојат два типа: Juvenile-onset RRP (перинатално стекната) и Adult-onset RRP (поврзана со орален секс)^[53,60,61].

1.3.5 ХПВ-асоцирани карциноми: патогенеза и епидемиологија

Најзначајна улога во патогенезата на неопластичните промени што произлегуваат од ХПВ инфекциите имаат протеините Е5, Е6 и Е7. Протеинот Е5, присутен кај сите типови на HR-ХПВ, освен кај Betarapillomaviruses, ја поттикнува прогресијата на ракот преку врзување за рецепторите на факторот за раст на тромбоцити (PDGFR) и рецепторите на епидермалниот фактор за раст (EGFR)^[62].

Протеинот Е6 игра клучна улога во инхибиција на регулацијата на клеточниот циклус, бидејќи го инактивира протеинот p53. Со стимулирање на патиштата Wnt/ β -catenin и Notch, го нарушува нормалното клеточно сигнализирање. Исто така, ја поттикнува бесмртноста на клетките преку активација на теломеразата. Протеинот Е7 го инхибира дејството на pRb, p107 и p130. Како резултат на тоа, факторот E2F се активира, што ја поттикнува транзицијата од фазата G1 во S (Слика 2)^[62,61].

Понатаму, кај онкогените типови на ХПВ, тој се врзува за нерецепторската протеин тирозин фосфатаза RTPN14, што доведува до нејзина деградација, резултирајќи со инхибиција на диференцијацијата на кератиноцитите и нивна бесмртност^[64].



Слика 2. Патогенеза на ХПВ асоцираниот цервикален карцином^[46].

Графичкиот приказ ја прикажува патеката која води од инфекција со хуман папиломавирус (ХПВ) до прогресија во рак на грлото на матката. По инфекцијата на епителот, вирусот може да перзистира како хронична инфекција, што доведува до преканцерозни промени (ЦИН – цервикална интраепителна неоплазија), а потоа и до цервикален карцином. Во горниот десен агол е прикажан онкогениот механизам на ХПВ протеините Е6 и Е7. Протеинот Е6 го инхибира дејството на тумор-супресорниот протеин p53 и ја активира теломеразата, поддржувајќи неконтролирана пролиферација на клетките. Дополнително, тој го стимулира патот Wnt/beta-catenin и патот Notch, нарушувајќи го клеточното сигнализирање. Од друга страна, Е7 ги деактивира протеините кои го регулираат клеточниот циклус (pRb, p107, p130). Деактивацијата на pRb протеинот доведува до постојана активација на E2F, нарушување на регулацијата на клеточниот циклус, промовирање на транзицијата од фазата G1 во S, и неконтролирана делба на епителните клетки. Понатаму, прикажано е влијанието на дизбиозата на вагиналниот микробиом врз ХПВ инфекцијата. Намалувањето на бројот на заштитните *Lactobacillus* spp. и зголемувањето на популацијата на *Gardnerella vaginalis* може

да ја поттикнат хроничната ХПВ инфекција и прогресијата кон рак. Прикажани се и најчестите онкогени типови на ХПВ поврзани со цервикалниот карцином: ХПВ16, ХПВ18, ХПВ31, ХПВ52 и ХПВ58^[46].

Двата протеини можат да ги активираат сигналните патишта PI3K/AKT/mTOR и JAK/STAT, кои имаат улога во патогенезата на ракот. Посебно, JAK/STAT игра значајна улога во развојот на цервикалниот карцином^[9,65,66].

Овие протеини, дополнително, учествуваат во инхибицијата на имунолошкиот одговор. Протеинот Е5 го потиснува сигналниот пат на интерферонот (IFN) и ги задржува молекулите МНС-I во ендоплазматскиот ретикулум и Голџиевиот апарат. Протеинот Е6 има способност да ја намали презентацијата на антигени преку интерференција со транспортерот поврзан со комплексот за процесирање на антигени (ТАР). Понатаму, Е7 ја зголемува популацијата на Treg лимфоцити, со што го намалува бројот на цитотоксични Т-клетки и ја инхибира пироптозата. Дополнително, двата протеини предизвикуваат зголемена експресија на имунолошки checkpoint молекули како PD-L1^[67].

1.4. Витамин Д и фолат како модулатори на имунолошкиот одговор и ризикот за цервикални интраепителни лезии

Познавањето на овие механизми претставува основа за разбирање на улогата на имунолошките и нутритивните фактори, како што се витамин Д и фолат, во модулацијата на одговорот на домаќинот кон ХПВ инфекцијата.

Во последните години, сè поголемо внимание се посветува на улогата на нутритивните фактори во модулацијата на имунолошкиот одговор и ризикот од појава и прогресија на цервикални интраепителни лезии. Витаминот Д и фолатот претставуваат два есенцијални микронутриенти чиј недостаток може да има значајни последици врз имунолошката функција, контрола на клеточната пролиферација и механизмите на апоптоза. Нивното учество во регулацијата на антиинфламаторни и имunosупресивни патишта е особено релевантно во контекст на ХПВ инфекцијата, каде што перзистенцијата на вирусот и последователниот развој на преканцерозни и канцерозни промени се резултат на нарушената рамнотежа помеѓу вирусот и имунолошкиот систем на домаќинот.

Повеќе студии укажуваат дека пониски серумски концентрации на витамин Д и фолат се поврзани со зголемен ризик за појава и прогресија на ЦИН лезии, што ја нагласува нивната потенцијална улога како биомаркери за проценка на ризик и како можни цели за примарна и секундарна превенција.

1.4.1 Улогата на витамин Д кај цервикалниот карцином

Хроничната инфекција со високоризичен ХПВ подтип, е најважниот ризик фактор за развој на цервикален карцином. Помеѓу високоризичните ХПВ подтипови ХПВ тип 16 и ХПВ тип 18 сочинуваат 75% од сите случаи на напреднат цервикален карцином^[68].

Како забелешка, само редуциран процент на случаи на хронична ХПВ инфекција прогредираат во инвазивен цервикален карцином низ многу бавен процес, кој трае околу 20 години или дури и подолго.

Цервикалниот епител инфициран со ХПВ најпрво се трансформира во цервикална интраепителна неоплазија од прв степен (ЦИН 1, дополнително познат како сквамозна интраепителна лезија од низок степен или LSIL) и подоцна во ЦИН2/3 (исто така познати како сквамозна интраепителна лезија од висок степен или HSIL) пред да се развијат во инвазивен цервикален карцином^[69].

Освен хроничната инфекција со високоризичен ХПВ вирус, многу други фактори влијаат на прогресијата и развојот на цервикалниот карцином. Некои од овие ризик фактори се поврзани со личната сексуална историја, со тоа што шансите за ХПВ инфекција растат со пораната возраст на стапување во сексуални односи, имањето на повеќе сексуални партнери и термински бремености, како и пораната возраст на првата терминска бременост^[70-73].

Инфламацијата на грлото на матката предизвикано од *Chlamydia trachomatis* и *Neisseria gonorrhoeae*^[74] и други сексуално преносливи инфекции како *Herpes Simplex Virus* тип 2^[75] дополнително придонесуваат за прогресија на цервикалниот карцином.

Хронична инфламација на цервиксот од семенскиот простагландин Е2 го зголемува ризикот, дополнително^[76]. Други ризик фактори за цервикален карцином се имуносупресија од инфекција со ХИВ^[77], долгогодишна употреба на орални контрацептиви^[78], пушење на тутун^[79], низок степен на образование^[80], ретка употреба на зеленчук и овошје во

исхраната^[81,82], фамилијарна анамнеза за овој вид на карцином^[83] и обезитет^[84,85]. Како дополнување на овие генетски, инфективни, фактори на околината или поврзани со начинот на живот, постојат студии кои го асоцираат дефицитот на витамин Д со зголемен ризик за цервикален карцином^[86-92].

1.4.2 Витамин Д ендокрин систем

Витамин Д ендокринот систем го сочинуваат комплекс на регулаторни системи кои се формирани од липидни прекурзори, митохондријални хидроксилази, еден транспортрачки протеин и еден рецептор со интризинг активност на факторот на транскрипција, кои се лоцирани на неколку органи вклучувајќи ги кожата, црниот дроб, бубрезите, цревата и коските. Сметајќи на фактот што најголем извор на витамин Д кај човекот е обезбедена од витамин Д3 фотосинтезата, целокупниот витамин Д во организмот се однесува на збир од витамин Д2 (од растителни извори) и витамин Д3 (од животински извори, млечните производи, мрсни риби, јајца и производи збогатени со витамин Д3).

Витамин Д3 главно се создава во кожата под дејство на процес кој е зависен од УВ-светлината од 7-дехидрохолестерол, при што се раскинува врска меѓу 9 и 10 во Б прстенот, по што следи термална изомеризација на молекулата^[93]. На овој начин, растворливиот во масло витамин Д3, кој исто се нарекува холекалциферол, задржува 27 атоми на јаглерод од неговиот прекурзор 7-дехидрохолестерол, но има отворен Б-прстен, и затоа се смета за сецостероид (secosteroid).

Витамин Д3 е биолошки неактивен и се активира со две ензимски хидроксилазии. Првата хидроксилација на витамин Д3 се случува во црниот дроб, каде неколку протеини со 25-хидроксилазна активност (CYP27A1, CYP3A4, I CYP2R1) продуцираат 25-хидроксивитамин Д3 (25OHD3), најголемиот циркуирачки метаболит се користи за евалуирање на нутритивниот статус на витамин Д^[94].

Кога еднаш ќе се транспортира до бубрезите од витамин Д-поврзувачкиот протеин (DBP), 25OHD3 подлегнува на хидроксилација на позиција 1 од 25OHD3 1 α -хидроксилаза (CYP27B1) во форма 1,25-дихидроксивитамин Д3 (калцитриол или 1,25-дихидроксихолекалциферол)^[95]. Калцитриолот е моќна липидна молекула која ја чини хормоналната форма на витамин Д ендокриниот систем. Калцитриолот го активира

интрацелуларниот рецептор за витамин Д (VDR), и преку оваа интеракција, се вршат многу геномски или негеномски биолошки одговори кои не се ограничени на зачувување на интегритетот на скелетот и балансот на минералите како калциум и фосфат^[96].

Во согласност со неговата класична функција како фактор на транскрипција, VDR влегува во интеракција со многу модулатори на транскрипцијата, вклучувајќи ги и подтиповите на ретиноид X рецепторот (RXR). Како хетеродимер со RXR, VDR го контролира начинот на генска експресија на гените одговорни за калцитриол со регрутирање на специфични DNA секвенци кои се нарекуваат елементи на одговор на витамин Д (VDREs) кои се лоцирани во промотер регионите на таргет гените^[97].

Последната мајорна компонента на витамин Д ендокриниот систем е 25OHD3 24-хидроксилазата (CYP24A1), ензим кој го катаболизира калцитриолот како и 25OHD3. Овој митохондијален ензим, силно поттикнат од калцитриолот, го конвертира активниот хормон калцитриол во неактивен 24-хидроксилиран продукт кој понатаму се оксидира во поларни продукти кои се екскретираат преку жолчката^[98].

VDR експресијата е детектирана во повеќе од 30 различни типови на клетки^[99], вклучувајќи го и женскиот репродуктивен тракт^[100], каде во експериментални услови е докажана утерина хипоплазија со нарушената фоликулогенеза мутирани глувци без VDR^[101], потенцирајќи ја важноста на овој хормонален систем за фертилитетот кај жената.

Делувањето на витамин Д ендокриниот систем е есенцијално за физиологијата на многу органи во телото, и нарушувањето на оваа регулаторна оска се забележува кај многу медицински состојби како остеопороза, рахитис, осетливоста на инфекции, автоимунни болести, дијабетес, кардиоваскуларни болести и карцином^[102].

Добро е установено дека витамин Д ендокриниот систем има превентивен и терапевтски ефекти против многу типови на хумани неоплазми преку различни механизми кои вклучуваат супресија на клеточната пролиферација, зголемена апоптоза, редуцирана ангиогенеза, меѓу другото. Уште повеќе, улогата на витамин Д и VDR во неоплазмите на дојка, ендометриум, овариум, цервикс, вулва и вагина се опишани претходно^[100-105].

Севкупните патишта на биосинтеза на витамин Д3 и новите придонеси во проучувањето на дејството на витамин Д3 и кај ин vivo и кај ин vitro модели на цервикален карцином, се доаѓа со заклучоци за жените со нарушен имунитет чијшто цервикален епител е инфициран со високоризичен ХПВ дали можат да развијат хронична вирусна инфекција која може да резултира со појава на генитални брадавици, ЦИН1/2/3 и цервикален карцином.

Понатаму, кога имуната функција е засегната, маркерите на инфламација се покачени кај пациентките со цервикален карцином^[106]. Нивоата на DBP во серум се значајно намалени кај пациентки со цервикален карцином во споредба со здрави контроли, нагласувајќи ја улогата на витамин Д ендокриниот систем во физиопатологијата на цервикалниот карцином^[107].

1.4.3 Витамин Д ендокриниот систем кај цервикалниот карцином

Докажано е дека CYP27A1, CYP27B1, CYP24A1 и VDR се експресираат и во нормалното и во туморското цервикално ткиво^[108-110], што сугерира на локални дејства од овие хормонални системи во цервиксот. Студиите во HeLa клетките на цервикален карцином демонстрираат дека калцитриолот ја зголемува генската експресија и на CYP27A1 и на CYP24A1, без да го афектира CYP27B1, чија што mRNA е редуцирана од 25OHD3^[111]. Понатаму, CYP27B1 експресијата и активноста се детектира во SiHa клетките на цервикалниот карцином, кои се во корелација со локалната продукција на калцитриол од неговиот прекурзор 25OHD3^[112].

Во овие клетки, се детектира базална експресија на CYP24A1, што е индуцирана од присуството на калцитриол, како што се случува во најголемиот број од VDR-експресираните клетки^[112]. VDR експресијата и активноста дополнително се детектираат во SiHa и HeLa линии но не и во C33A клетките^[112-114], каде индукцијата на CYP24A1 генот од страна на калцитриол не се забележува^[113].

Иако VDR е силно експресиран во ткивото на цервикален карцином споредено со здраво ткиво^[108,109], VDR имунореактивноста не е прогностички фактор за оваа неоплазма, се додека не корелира со стадиумот на туморот, статусот на лимфните јазли, степенот, хистолошкиот тип на туморот или експресијата на Ki-67 маркерот на пролиферација^[115].

Неодамнешните студии открија дека Fok1 и Taq1 VDR полиморфизмите се асоцирани со висок ризик за ХПВ 16-зависен ЦИН2 и цервикален карцином^[115-117]. Fok1 и Taq1, помеѓу останатите VDR-изолирани полиморфизми, се полиморфизми со скратување на дожината на фрагментот и се асоцирани со зголемен ризик од гинеколошки неоплазми како оваријален карцином^[118]. Механизмот на преку кој овие VDR полиморфизми промовираат карцином вклучува промени во афинитетот на рецепторот, врзувањето на ДНА и ефикасноста на транскрипцијата и транслацијата^[118].

Голем број на ин витро и ин vivo студии заклучиле дека витамин Д ендокриниот систем има протективна улога во хуманата карциногенеза^[104]. Овој концепт е подржан од регулаторната улога на витамин Д на фундаменталните процеси поврзани со карцином, како што се клеточна пролиферација, апоптоза, клеточна диференцијација, ангиогенеза, аутофагија, инфламација, оксидативен и енергетски метаболизам, како и модулација на имуниот одговор^[119].

Овие општи механизми на акцијата на витамин Д се добиени главно од студии кај различни тумори, вклучувајќи меланом, колоректален, карцином на простата и модели на карцином на дојка. За споредба, студиите од асоцијација меѓу витамин Д и цервикален карцином се оскудни, а корисни анти-канцер ин витро резултати се забележани само со покачени концентрации на калцитриол или на неговиот прекурзор 25ОНД3, што може да резултира со хиперкалцемија ин vivo. Во таа смисла, карцитриолот ја супресира пролиферацијата на SiHa и HeLa клетките на цервикален карцином^[112,120]. Во SiHa клетките кои се третирани со витамин Д3, пролиферацијата е дополнително супримирана, а апоптозата е индуцирана^[121].

Онкогениот калиумов канал ether a gogo-1 (EAG1) е супримиран од калцитриол во цервикалните канцерски клеточни линии HeLa и SiHa^[112], преку механизам кој вклучува репресивната функција на негативен VDRE во промоторот на EAG1^[113]. EAG1 е мембрански протеин чија нормална распределба е главно ограничена на централниот нервен систем; сепак, неговата ектопична експресија се смета за карциногена карактеристика^[122].

Кај ракот на грлото на матката, експресијата на EAG1 е ран маркер на болеста, бидејќи неговата експресија на протеинот се детектира во рани стадиуми на ЦИН^[123]. Понатаму, експресијата на EAG1 е зголемена од естрадиолот во HeLa клетки трансфектирани со естроген α рецептор и дополнително во хуманите кератиноцити трансформирани од ХПВ16-Е6 и ХПВ16-Е7 онкогени^[124], што нагласува дека експресијата на EAG1 е нагорно регулирана од фактори што промовираат цервикален карцином.

Понатаму, калцитриолот ја потиснува пролиферацијата на HeLa клетките на грлото на матката делумно преку механизам кој вклучува намалување на експресијата на хуманиот онкоген за карцином на грлото на матката (HCCR1, LETM1 дел кој содржи 1)^[120], кој кодира протеин во надворешната мембрана на митохондриите кој што е високо експресиран во ткивата со цервикален карцином^[125]. Потиснувањето на синтезата на HCCR-1 предизвикано од

калцитриол е поврзано со зголемена експресија на инхибиторот на циклин-зависна киназа p21, силен инхибитор на клеточен циклус кој е вклучен во туморогенезата^[120].

Покрај тоа, демонстрирано е дека во HeLa клетките калцитриолот ја потиснува митохондријалната хомеостаза преку активација на PI3K-AKT-mTOR патеката, што последично доведува до инхибиција на аутофагијата^[126]. Понатаму, преку индукција на апоптоза, витамин Д3 и 25OHD3 ги инхибираат пролиферациите на CaSki и SiHa клетките, соодветно^[127,128]. Овие ефекти се резултат на ендогениот калцитриол произведен во овие клетки на грлото на матката преку дејството на калцитриол-активирачки хидроксилази. Заедно, овие докази го поддржуваат заштитниот ефект на витамин Д ендокриниот систем врз пролиферацијата на клетките на карциномот на грлото на матката.

Интересно е што, иако CaSki клетките имаат голем број на копии на ХПВ16, тие се многу чувствителни на ефектите на антипролиферативни фактори. Природното соединение α -мангостин ја инхибира пролиферацијата на CaSki клетки, процес кој беше придружен со намалување на експресијата на EAG1 и ХПВ16 E6/E7 онкогените^[129].

Калцитриолот има регулаторно дејство врз експресијата на некои компоненти од машинеријата за биогенеза на микроРНК и експресијата на микроРНК во клетки на SiHa и HeLa VDR-позитивни, но не и во карциномски клетки од грлото на матката C33A VDR-негативни^[114,130]. МикроРНК се класа на мали некодирачки молекули на РНК кои глобално ја регулираат генската експресија. МикроРНК се вклучени во различни основни клеточни процеси вклучувајќи развој, апоптоза, клеточна диференцијација, раст на клетки, метаболичка контрола и репродуктивни функции^[131].

Понатаму, дисрегулацијата на микроРНК е поврзана со неколку болести кај човекот, вклучително и рак^[131]. Канонскиот пат на биогенеза на микроРНК започнува во клеточното јадро каде што РНК полимеразата II транскрибира примарен транскрипт наречен pri-microRNA, кој се обработува до pre-microRNA од микропроцеорскиот комплекс формиран од рибонуклеазата Drosha, протеинот за врзување на двојна РНК DGCR8, и РНК хеликазите DDX5 и DDX17. Откако ќе биде изнесен во цитоплазмата преку акцијата на exportin 5/RAN-GTP, pre-microRNA понатаму се обработува од рибонуклеазата Dicer за да формира зрел едно-верижен микроРНК долг 18-25 нуклеотиди, кој се вчитува во мулти-протеинскиот комплекс за индукција на намалување на молекулите на РНК, што доведува до репресија на транслацијата или деградација на mRNA^[131].

Меѓу протеините што учествуваат во биогенезата на микроРНК, РНК хеликазата DDX5 и рибонуклеазата Dicer се индуцирани од високи концентрации на калцитриол во клетки на SiHa преку механизам кој вклучува регрутирање на активиран VDR до индуцирани VDRE во нивните промоторски региони^[114,130]. Овие регулаторни ефекти на калцитриол врз Dicer и DDX5 се придружени со зголемено изразување на неколку микроРНК со анти-канцерогени својства, вклучувајќи микроРНК-22, -29с, -4455, соодветно. Интересно е што микроРНК супресорот на туморите микроРНК-22 се намалува од ХПВ16 Е6 во карциномските клетки на грлото на матката^[132]. МикроРНК-29с ја инхибира епително-мезенхималната транзиција на клетките на рак на грлото на матката, доведувајќи до инхибиција на пролиферацијата, инвазијата и метастазите^[133]. Инхибицијата на експресијата на микроРНК-4455 го ослабува растот на карциномските клетки на грлото на матката и *in vitro* и *in vivo*^[134].

Така, изгледа дека зголемената био-достапност на DDX5 зависна од калцитриол може да предизвика РНК супстратите да се процесираат од рибонуклеазата Dicer, зголемувајќи на тој начин стапката на созревање на микроРНК поврзани со анти-канцерогени функции.

Од друга страна, калцитриолот ја намалува експресијата на микро РНК во SiHa клетките на ракот на грлото на матката^[114]; но сепак, треба да се доистражи нивната улога.

Податоците од досегашните клинички испитувања укажуваат на тоа дека суплементацијата со витамин Д најверојатно го редуцира морталитетот од карцином на грлото на матката^[135] но, постојат и студии кои не го поддржуваат овој заклучок^[136].

Одредени епидемиолошки студии покажуваат инверзна корелација помеѓу сончевата ирадијација и инциденцата на карцином на грло на матка^[87,88], што најверојатно е посредувано од биосинтезата на витамин Д3. Во 2010 година, во јапонска case-control студија, во која беа вклучени 405 пациенти со инцидентен наод на неоплазии на грлото на матката, се покажа дека ризикот од рак на грло на матка е намален со зголемување на внесот на витамин Д^[86], што сугерира дека витамин Д има заштитна улога во развојот на цервикален карцином.

Одреден број клинички испитувања го проучувале ефектот на долготрајната суплементација со витамин Д врз преканцерозните лезии на грлото на матката. Во таа насока, евидентираме една иранска, рандомизирана, двојно слепа, плацебо-контролирана клиничка студија која ги евалуирала ефектите на долготрајната суплементација со витамин Д3 врз регресијата на ЦИН1. Студијата била спроведена во тек на 6 месеци кај 58 ирански жени со дијагностициран ЦИН1, кои биле случајно распределени во плацебо групата (n = 29) или

групата која примала витамин Д3 (50.000 IU двапати месечно, n = 29). Поголем процент жени во групата што примала витамин Д3 покажале регресија на ЦИН1 во споредба со плацебо групата (84,6% наспроти 53,8%, p = 0.01)^[91].

Во друга студија пациентките кои користеле вагинални супозитории (кои содржат 12.500 IU витамин Д), 3 ноќи неделно во текот на 6 недели, имале добар антиинфламаторен и антидиспластичен ефект во групата со ЦИН1, но не биле забележани значајни позитивни ефекти кај групата со ЦИН2^[137]. Механизмите кои ги објаснуваат заштитните ефекти на витамин Д врз регресијата на ЦИН1 може да се поврзат со елиминирањето на ХПВ од лезиите, како предложено претходно^[89,138].

Сепак, кога било спроведено друго слично долгорочно испитување за суплементација со витамин Д3 кај жени со понапреднати преканцерозни лезии (ЦИН 2/3), очекуваниот корисен ефект врз рецидивите не бил забележан^[92].

Различни студии кои ги испитувале ефектите на интралезионален витамин Д3 за третман на ХПВ-индуцирани брадавици покажале ветувачки резултати, што укажува на антивирусен ефект на витамин Д3. На пример, во една single-blind рандомизирана контролирана студија спроведена кај 100 пациентки во текот на една година, каде што имало интралезионалното администрирање на витамин Д3 дало ефикасни резултати во однос на елиминацијата на брадавиците^[139].

Слично, кај друга рандомизирана плацебо-контролирана студија спроведена кај пациенти со резистентни екстрагенитални брадавици, третманот со витамин Д3 (600.000 IU) бил ефикасен, безбеден и добро поднослив, со исклучително ниски стапки на рецидиви^[140].

Целта на третманот со витамин Д3 е да се зајакне локалниот имунолошки одговор, а предложениот механизам на дејство се поврзува со регулацијата на пролиферацијата/диференцијацијата на епидермалните клетки, како и со регулацијата на продукцијата на цитокини. Во овој контекст, витамин Д3, преку активното дејство на неговиот метаболит калцитриол, има две важни биолошки дејства: антиинфламаторно дејство, кое се медира преку инхибиција на проинфламаторните цитокини како што се интерлеукин 1 α , тумор-некротизирачки фактор α (TNF- α) и интерлеукин 6, како и индукција на синтезата на антимикробни пептиди^[104,140,141].

Рационалноста зад индукцијата на вродениот имунитет преку витамин Д3 е дека, кога инфективен агенс ќе го активира Toll-like рецепторот, започнува поврзана низа настани кои вклучуваат зголемена експресија на рецепторот за витамин Д (VDR) и CYP27B1, што резултира со зголемено производство и активност на калцитриол, кој пак транскрипциски ја индуцира експресијата на антимикробни пептиди, како кателицидинот^[142]. Соодветно на тоа, експресијата на кателицидин по интралезионална инјекција на витамин Д3 кај брадавици е докажана, со добар клинички одговор^[143], што сугерира дека предизвиканата имунолошка реакција дефинитивно го вклучува кателицидинот.

Важно е да се напомене дека не само екстрагениталните брадавици биле успешно третирани со витамин Д3, туку и аногениталните брадавици, кои дополнително се предизвикани од ХПВ и најчесто се сексуално преносливи. Ова е забележано кај возрасен маж со кондилома акумината, кај кого, по инјектирањето на витамин Д3, било постигнато целосно исчезнување на кондиломите^[144]. Сличен ефект е постигнат и кај аногенитални брадавици кои биле третирани топикално со дериват на витамин Д3^[145].

Сето ова укажува на потенцијален корисен терапевтски ефект на витамин Д3 во одбраната против ХПВ, што бара понатамошни истражувања. Долготрајната суплементација со витамин Д3, дополнително, имала позитивни ефекти врз метаболизмот на гликоза и липиди, како и врз биомаркерите на оксидативниот стрес и воспалението. Овие наоди се значајни бидејќи хроничното воспаление, преку различни проинфламаторни медијатори и оксидативен стрес, придонесува за цервикална карциногенеза^[76].

Следствено, антиинфламаторниот ефект на калцитриолот може да делува превентивно во развојот на цервикалниот карцином, како што претходно е докажано со употреба на аналог на калцитриол во воспалително-зависната туморогенеза на гастричен карцином^[146]. Овој антиинфламаторен ефект делумно е посредуван преку супресија на воспалителни медијатори како што се циклооксигеназа-2 (COX-2) и нуклеарниот фактор капа-лакотен-синцир-енханцер на активираните Б-клетки (NFκB)^[147].

Познато е дека рецепторот за витамин Д (VDR) физички стапува во интеракција со IκB киназа β (IKKβ), блокирајќи го формирањето на IKK комплексот индуцирана од TNFα и активноста на NF-κB^[147]. Сè повеќе докази укажуваат дека ендокриниот систем на витамин Д има заштитна улога во развојот на автоимуни заболувања. Соодветно, недостатокот на витамин Д е чест кај пациенти со автоимуни заболувања како што се инсулин-зависен дијабетес

мелитус, мултиплекс склероза, воспалителни болести на цревата, ревматоиден артритис и системски лупус еритематозус, каде што не е познато дали недостатокот на витамин Д е последица или причина за овие заболувања^[148–150].

Интересно е што кај жените со ревматоиден артритис и системски лупус еритематозус е забележан 1,5 пати поголем ризик од високостепена цервикална дисплазија и цервикален карцином во споредба со жените кои немаат системски воспалителни болести^[151].

Сепак, во пресек-студија во Мексико, спроведена кај жени со системски лупус еритематозус, концентрацијата на 25ОНD3 во крвта не била поврзана со цервикална ХПВ инфекција^[152].

И покрај овие резултати, добро е утврдено дека витамин Д е заштитен агенс против широк спектар на инфекции, а недостатокот на витамин Д често ја влошува тежината на инфекциите^[153]. Калцитриол-зависните заштитни механизми против вирусни и бактериски инфекции вклучуваат, меѓу другото, модулација на воспалителните имунолошки одговори и калцитриол-медирана синтеза на антимицробни пептиди, како што се кателицидинот и дефензините^[154].

Интересно, α -дефензинот HD5 има заштитна улога во настанувањето на цервикалниот карцином, блокирајќи ја инфекцијата со ХПВ 16 преку насочување на капсидот кон лизозомска деградација^[155]. Во овој контекст, потребни се дополнителни студии за да се оценат можните антивирусни ефекти на метаболитите на витамин Д врз животниот циклус на ХПВ.

Други витамини како што се А, Б9, Б12, Ц, Е и К, дополнително, привлекуваат внимание во однос на превенцијата и третманот на цервикалниот карцином. На пример, кај жени кои примале додаток на витамин А, биле забележани подобри прогнози и подобрени исходи, како елиминацијата на ХПВ инфекцијата, која го инхибира раниот развој на цервикалниот карцином^[156].

Витамините Б9 и Б12 го инхибираат инфицирањето со ХПВ и прогресијата кон повисоки степени на ЦИН^[157]. Дополнително, е забележано дека внесувањето на витамини Ц и Е е обратно поврзано со ризикот од цервикален карцином^[158]. Витаминот К е вклучен во превенцијата на развојот на одредени видови на рак, вклучувајќи го и цервикалниот карцином^[159].

Сепак, важно е да се истакне дека, за разлика од витамините А, Б, Ц, Е и К, витамин Д3 не е вистински витамин^[160]. Наместо тоа, тој е про-хормон кој се синтетизира во нашето тело во доволни количини по изложување на сончева светлина. Понатаму, 25ОНД3 е пред-хормон, секреторен производ на жлездите со минимална или без значајна биолошка активност, кој се трансформира во периферните ткива во активниот и моќен секостероиден хормон калцитриол, чиј механизам на дејство е споредлив со оној на стероидните хормони, како што се естрадиолот и прогестеронот, кои дополнително ги медијатираат своите биолошки ефекти во различни целни органи преку транскрипциски фактори.

1.5 Фолат како модулатор на имуниот одговор и ризикот од цервикални интраепителни лезии

Фолатот, како есенцијален водорастворлив витамин од групата Б (витамин В9), игра клучна улога во биолошките процеси кои го регулираат клеточниот раст, диференцијацијата и имуниот одговор. Неговата основна биохемиска функција е учество во метаболизмот на еднојаглеродни единици, неопходни за синтеза на пурины и пиримидини, како и за реметилацијата на хомоцистеин во метионин^[161].

Овие процеси се директно поврзани со синтезата и стабилноста на ДНК, како и со епигенетската регулација преку метилација на ДНК и хистоните. Нарушената метилација, која може да се појави при дефицит на фолат, води до геномска нестабилност, абнормална експресија на онкогени и намалена транскрипција на гени кои го контролираат имуниот одговор^[162,163].

Во контекст на инфекцијата со ХПВ, доволните нивоа на фолат се покажале како заштитен фактор кој може да ја намали перзистенцијата на вирусот и прогресијата кон цервикални интраепителни лезии (ЦИН). Неколку студии укажуваат дека жени со ниски серумски концентрации на фолат имаат поголема веројатност за развој на ЦИН 2 и ЦИН 3, како и повисок ризик за прогресија кон инвазивен цервикален карцином^[164,165].

Имуниот одговор кон ХПВ инфекцијата е комплексен и зависи од балансираното функционирање на клеточно-имунолошките механизми. Фолатот учествува во регулацијата на пролиферацијата на Т-лимфоцитите и во продукцијата на цитокини, особено оние поврзани со Th1-одговорот, кој е клучен за ефикасно елиминирање на вирусно инфицираните клетки^[166].

Дефицитот на фолат може да доведе до нарушена пролиферација на CD4+ и CD8+ Т-клетки, што ја компромитира ефикасноста на имуниот систем во елиминацијата на ХПВ. Дополнително, фолатот е значаен во одржувањето на соодветна активност на природните клетки-убијци (НК-клетки), кои имаат централна улога во раната контрола на вирусната инфекција и во превенцијата од прогресија кон малигнитет^[167].

Од епигенетски аспект, недоволниот внес на фолат води до глобална хипометилација на ДНК и локална хиперметилација на промоторските региони на гени кои имаат заштитна улога против карциногенеза. Ова резултира со епигенетско исклучување на гени кои ја регулираат апоптозата и имуниот одговор, со што се овозможува вирусот да ја избегне имунолошката контрола и да придонесе за клеточна трансформација^[168].

Врз основа на овие податоци, јасно е дека оптималните серумски нивоа на фолат претставуваат значаен фактор во одржување на имунолошката одбрана и во превенцијата на прогресијата на ХПВ-индуцираните лезии кон цервикален карцином.

Истражувањата покажуваат дека суплементацијата со фолат кај пациентки со ниски нивоа може да има превентивен ефект врз перзистенцијата на ХПВ и ризикот од ЦИН, иако потребни се дополнителни клинички испитувања за да се дефинираат оптималните дози и времетраењето на интервенцијата^[169].

Сумирано, постојат доволни докази дека фолатот игра двојна улога: од една страна, тој обезбедува геномска стабилност и епигенетска регулација, а од друга страна, го модулира имуниот одговор, што заедно влијае врз ризикот за појава и прогресија на цервикални интраепителни лезии.

1.5.1 Фолат и неговата улога во клеточната репродукција

Фолатот, познат и како витамин Б9, е неопходен за нормално функционирање на клетките, посебно во процесите на клеточната репродукција и метаболизмот на ДНК. Овој витамин е вклучен во метилацијата на ДНК, што е критично за репарацијата на ДНК и синтезата на нуклеотиди, основни компоненти на генетскиот материјал. Недостатокот на фолат во организмот може да доведе до генетска нестабилност и мутации што можат да резултираат во неправилна клеточна поделба^[170].

Фолатот игра критична улога во производството на пурин и пиримидин нуклеотиди, кои се неопходни за синтезата на ДНК и РНК^[171]. Во услови на дефицит на фолат, овие процеси се нарушени, што може да доведе до неконтролирана клеточна поделба, генетски оштетувања и потенцијален развој на предканцерозни или канцерозни клетки^[172]. Ова е од особено значење за жени во репродуктивен период, каде што фолатот игра улога во оптимизацијата на здравјето на грлото на матката и спречување на развојот на цервикални интраепителни лезии (ЦИН)^[173].

Фолатниот дефицит е поврзан со геномска нестабилност и мутагеност, што ги зголемува шансите за настанување на малигни трансформации^[174]. Во контекст на ЦИН, се претпоставува дека ниските нивоа на фолат можат да ја нарушат апоптозата на абнормалните клетки, што може да дозволи натамошна прогресија на лезиите во канцерозни форми^[175]. Истражувањата покажуваат дека ниското ниво на фолат може да биде фактор што влијае на воспоставување на стабилни клеточни линии, особено во присуство на генетски абнормалности^[176].

1.5.2 Фолат и ризикот од ХПВ инфекции

Хуманите папилома вируси (ХПВ) се главен етиолошки фактор за развој на цервикални интраепителни лезии, кои можат да прогресираат во инвазивен цервикален карцином. Иако инфекцијата со ХПВ е честа, не секоја инфекција доведува до клинички значајни лезии, што укажува на имунолошките механизми и нутриционистичката состојба како важни фактори во прогресијата на инфекцијата^[177]. Одредени нутритивни фактори, како фолатот, се сметаат за значајни во контрола на ризикот од прогресија на ХПВ инфекцијата.

Фолатот има важна улога во имунолошкиот одговор, бидејќи е потребен за правилно функционирање на Т-клеточниот одговор и продукцијата на цитокини кои се клучни за контролирање на инфекциите. Недостатокот на фолат може да ја наруши имунолошката функција, што води до намален капацитет за елиминација на ХПВ^[178]. Високите концентрации на фолат во серумот се поврзуваат со подобри имуни одговори на вирусни инфекции, вклучувајќи ги и инфекциите со ХПВ^[179].

Некои студии сугерираат дека ниските нивоа на фолат можат да бидат предиктор за неповолни исходи на ХПВ инфекцијата, вклучувајќи ги и поголеми шанси за развој на ЦИН и прогресија на лезиите во канцер^[180]. Фолатниот дефицит може да ја зголеми имунолошката

инертност на организмот кон инфекциите, што го прави организмот повеќе подложен на ХПВ инфекција и повеќе осетлив на прогресијата на генитални лезии предизвикани од вирусот^[181].

Важно е да се истакне дека фолатот има потенцијал да ја подобри стабилноста на генот и да го зголеми имуниот одговор, што го прави клучен нутритивен фактор во превенцијата на карциномите поврзани со ХПВ^[182].

1.6 Други биолошки и животни фактори поврзани со ризикот за цервикални интраепителни лезии

Покрај серумските нивоа на витамин Д и фолат, постојат и други биолошки и животни фактори кои можат значително да влијаат на појавата и прогресијата на цервикалните интраепителни лезии.

Хематолошките параметри, како хемоглобинот, претставуваат индикатор за општата нутритивна состојба и оксигенација на ткивата, што е клучно за одржување на ефикасен имунолошки одговор^[183].

Метаболичките фактори, вклучувајќи ги гликозата и липидниот профил (серумски холестерол), можат да придонесат кон хронична инфламација и оксидативен стрес, создавајќи средина погодна за перзистенција на ХПВ инфекцијата и развој на преканцерозни промени^[184].

Исто така, железото игра двојна улога во клеточната биологија – како есенцијален кофактор за ензимска активност, но и како потенцијален катализатор на оксидативни реакции кои можат да доведат до оштетување на ДНК и да го зголемат ризикот за канцерогени трансформации^[185].

Индексот на телесна маса (ВМТ) претставува индиректен показател на метаболичкото здравје и е поврзан со имуносупресија, хормонски дисбаланси и хронична инфламација, фактори кои дополнително ја зголемуваат ранливоста на епителот кон ХПВ-индуцирани оштетувања^[169].

Од друга страна, пушењето претставува добро документиран ризик фактор за цервикален карцином, со оглед на тоа што канцерогените супстанции од тутунот доведуваат

до директни генотоксични ефекти врз цервикалните епителни клетки и до супресија на локалниот имунитет^[89]. Овие параметри, разгледани заедно со витамин Д, фолат и ХПВ статусот, овозможуваат поширок увид во мултифакторната етиологија на цервикалните интраепителни лезии и отвораат можности за поцелосен пристап во нивната превенција и третман.

1.7 Мотив на истражувањето

-Клиничка важност- Растечките докази за улогата на нутритивните фактори во канцерогенезата и како витамин Д и фолат влијаат врз прогресијата или превенцијата на цервикалните интраепителни лезии

-Јаз во знаењето- Ограничениот број на студии во Република Северна Македонија за овие маркери, во нашава популација, отвара простор за истражување

-Практична примена- Потенцијалот да резултатите придонесат кон раната детекција, подобрата превенција и индивидуализираниот пристап

-Лична мотивација- Мојата работа како гинеколог/акушер, која ме поттикнува да барам нови методи за подобрување на здравјето на жените

Со оглед на високата преваленца на ХПВ инфекциите и нивната улога во патогенезата на цервикалниот карцином, истражувањето на имунолошките и нутритивните фактори, особено на серумските нивоа на витамин Д и фолат, претставува значаен чекор во разбирањето и превенцијата на преканцерозните промени.

2. ЦЕЛИ НА ИСТРАЖУВАЊЕТО

2.1 Општа цел

Да се испита и спореди нивото на витамин Д и фолат кај жени со различни степени на цервикални интраепителни лезии (ЦИН 1, ЦИН 2, ЦИН 3) и кај жени со уреден ПАП тест, земајќи го предвид ХПВ статусот, со посебен акцент на високо ризичните типови, особено ХПВ 16 и 18, со цел да се утврди нивната потенцијална улога во прогресијата на овие лезии.

2.2 Специфични цели

1. Да се одредат серумските нивоа на витамин Д и фолат кај испитанички со различни степени на цервикални интраепителни лезии (ЦИН 1, ЦИН 2, ЦИН 3).
2. Да се споредат овие вредности со оние кај контролната група на испитанички со уреден ПАП тест.
3. Да се анализира корелацијата помеѓу концентрациите на витамин Д и фолат и степенот на цервикалните лезии.
4. Да се испита влијанието на дополнителни фактори (возраст, БМИ, пушење, употреба на контрацепција, изложеност на сончева светлина) врз нивото на витамин Д и фолат.
5. Да се анализира ХПВ статусот кај сите испитанички и неговата поврзаност со нивото на витамин Д и фолат.
6. Да се процени поврзаноста помеѓу квалитетот на исхрана и ризикот за ХПВ инфекција, преку анализа на диетски скор заснован на зачестеноста на внес на овошје, зеленчук, витамин Д и фолна киселина.
7. Да се направи подгрупна анализа на испитанички со ХПВ 16 и 18, во споредба со други ХПВ-позитивни и ХПВ-негативни испитанички, во однос на нивото на витамин Д и фолат.
8. Да се утврди дали постои разлика во прогресијата на лезиите меѓу жени со ХПВ тип 16 и 18 во споредба со други високо ризични ХПВ типови, во корелација со нивото на витамин Д и фолат.
9. Да се испита постоењето на синергистички ефект помеѓу дефицитот на витамин Д и/или фолат и инфекцијата со различни високо ризични ХПВ типови во однос на ризикот од напредување на лезиите.
10. Да се процени дали постои статистички значајна поврзаност помеѓу дефицитот на витамин Д и/или фолат и ризикот од прогресија на цервикалните интраепителни лезии.

11. Да се предложат потенцијални интервенции — нутритивни препораки или суплементација за жени со зголемен ризик од прогресија на лезиите.

3. МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ

3.1 Дизајн на студијата

Оваа студија е дизајнирана како проспективна case-control студија, со цел да се испита поврзаноста помеѓу серумските нивоа на витамин Д, фолат и други биохемиски и клинички параметри со ризикот за развој на цервикални интраепителни лезии (ЦИН).

3.2 Испитаници

Во студијата првично беа вклучени вкупно 200 жени, регрутирани преку нивниот матичен гинеколог, во рамките на редовни гинеколошки прегледи и скрининг. По примената на строго дефинираните инклузиони и ексклузиони критериуми, 12 испитанички беа исклучени од анализата, така што конечниот тест примерок опфати 188 жени.

3.3 Групи

Испитаниците беа поделени во две групи:

- Испитувана група: 107 испитанички со хистолошки верифицирани цервикални интраепителни лезии (ЦИН 1, ЦИН 2 и ЦИН 3), во рамките на која испитаничките беа поделени на 3 подгрупи:
 - Испитанички со ЦИН 1
 - Испитанички со ЦИН 2
 - Испитанички со ЦИН 3

- Контролна група: 81 пациентка со нормален ПАП тест и без евиденција за цервикална патологија, кои во истиот временски период се јавиле на преглед.

3.4 Временска рамка

Истражувањето беше спроведено во периодот од јуни 2023 година до февруари 2024 година.

3.5 Инклузиони критериуми

3.5.1 За испитуваната група

- Хистолошки потврдени цервикални интраепителни лезии.
- Возраст над 18 години.
- Отсуство на бременост.

3.5.2 За контролната група

- Нормален цитолошки наод (уреден ПАП тест).
- Возраст над 18 години.
- Отсуство на бременост.

3.6 Ексклузиони критериуми

- Бременост или сомнеж за бременост.
- Возраст под 18 години.
- Историја на нутритивна мегалобластна анемија.
- Хемолитичка болест.
- Леукемија.
- Заболувања на црниот дроб.
- Хируршка ресекција на грлото на матката.
- Редовна употреба на витамин Б суплементи во последните 3 месеци.

- Редовна суплементација со витамин Д во последните 3 месеци.

3.7 Прашалник за собирање на податоци

Покрај задолжителната информирана согласност, испитаничките пополнуваа и прашалник за нивните нутритивни навики, здравствени и демографски карактеристики.

Анкетен прашалник за испитаници

Инструкции:

Пополнете ги податоците или одбележете го соодветниот одговор. Сите податоци се доверливи и ќе се користат исклучиво за научни цели.

1. Општи податоци

1.1 Возраст: _____ години

1.2 Националност: _____

1.3 Број на деца (паритет):

0 1 2 3 или повеќе

1.4 Брачен/социјален статус:

Немажена / Невенчана

Во брак / Вонбрачна заедница

Разведена

Вдовица

2. Животни навики

2.1 Пушачки статус:

Никогаш не сум пушела

Активен пушач

Поранешен пушач

2.2 Употреба на контрацепција во последните 12 месеци:

Да Не

Ако Да, вид:

Орална хормонска контрацепција

Интраутерини средства (спирала)

Презерватив

Друго: _____

3. Нутритивни навики

3.1 Колку често конзумирате свежо овошје и зеленчук?

Секојдневно

3–5 пати неделно

1–2 пати неделно

Ретко или никогаш

3.2 Дали земате суплементи со витамин D?

Да Не

Ако Да, во последните:

1 месец 3 месеци 6 месеци Повремено

3.3 Дали земате суплементи со фолна киселина?

Да Не

3.4 Колку често јадете храна богата со фолат (зелен лиснат зеленчук, црн дроб, грав)?

Секојдневно

3–5 пати неделно

1–2 пати неделно

Ретко или никогаш

3.5 Колку време дневно поминувате на сонце?

- Повеќе од 30 минути
 - 10–30 минути
 - Помалку од 10 минути
 - Скоро никогаш
-

Беше спроведен и уште еден прашалник за хигиено-диетескиот режим на испитаниците кој опфаќаше прашања за зачестеноста на консумирање морков, кромид и лук, цитрусно овошје, свеж зеленчук и овошје, како и суплементирање со витамин D₃ (2000 IU) и фолна киселина (10 mg). Одговорите беа оценети со бодови од 1 до 3, при што вкупниот диететски скор се движеше од 7 (минимален внес) до 21 (висок дневен внес).

3.8 Земање и обработка на тест примероци

По потпишувањето на информирана согласност, од секоја пациентка беше земен тест примерок од 10 ml венска крв за лабораториска анализа. Крвта се чуваше на собна температура (18–25 °C) сè до коагулација, во времетраење од 15 до 45 минути. Потоа тест примероците беа центрифугирани со цел да се одвои серумот. Добиените серумски тест примероци беа складирани на температура од –20 °C до моментот на нивната анализа.

3.8.1 Одредување на витамин Д

Пред почнувањето на анализата, тест примерокот се третира со регенс кој содржи натриум хидроксид и се ослободува 25-ОН витамин Д од протеините за кои што е врзан во серумот. За време на првата инкубација, 25-ОН витамин Д се врзува за 25-ОН витамин Д-специфичните моноклонални антитела кои се имобилизирани на магнетни микросфери. Ензимски-обележан 25-ОН витамин Д се додава во рективната смеса, кој се натпреварува со 25-ОН витамин Д за прикачување на антителата инкорпорирани за магнетните микросфери.

По секундарната инкубација, магнетните микросфери се мијат за да се отстрани неврзаниот ензимски-обележан 25-ОН витамин Д и се инкубира со флуороген супстрат 4-methylumbelliferyl phosphate (4MUP). Количината на ензимски-обележан 25-ОН витамин Д кој што е врзан за микросферите е обратно пропорционален со концентрацијата на 25-ОН витамин Д во серумот. Кога се калибрира тестот, се конструира калибрациона крива, која што се користи за калкулирање на непознатата концентрација на 25-ОН витамин Д во серумот. Концентрацијата на 25-ОН витамин Д во тест примероците беше одредувана користејќи реagenси на Tosoh Corporation на TOSOH AIA-900 автоматски имунолошки анализатор.

3.8.2 Одредување на фолат

Пред отпочнувањето на анализата, серумот се третира со реагенс кој содржи натрум хидроксид и dithiothreitol и ослободува фолат од протеините со кои е врзан во серумот. Фолатот од тест примерокот се натпреварува со ензимски-обележан фолат за лимитиран број на врзувачки места на флуоресцентен говедски протеин што врзува фолат, кој потоа се врзува за анти-FITS (fluorescein isothiocyanate) антитела имобилизирани на магнетни микросфери. Магнетните микросфери се измиваат за да се отстранат неврзаното количество на ензимски-обележан фолат и се инкубираат со флуороген супстрат 4-methylumbelliferyl phosphate (MUP). Количината на ензимски-обележан фолат што е прикачен за микросферите, е обратно пропорционален на концентрацијата на серумскиот фолат. Кога тестот се калибрира, се конструира калибрациона крива која се користи за калкулирање на непознатата концентрација на фолатот во серумот. Концентрацијата на витамин В9 (фолат) во тест примероците се одредува користејќи реagenси на Tosoh Corporation на TOSOH AIA-900 автоматски имунолошки анализатор.

3.8.3 ХПВ типизација

Кај сите испитанички е направена ХПВ ДНК типизација. По поставување на испитаничките во литотомна гинеколошка позиција, се земеше тест примерок со ендоцервикален цитобраш, кој се депонираше во стерилна епрувета со 0,5мл транспортен медиум. Примероците се чуваа на температура од 2-8oC по што, најдоцна за 7 дена, се вршеше

генотипизитање на Human Papilloma Virus (ХПВ) користејќи polymerase chain reaction (PCR (полимеразна верижна реакција)) метод.

Пристапот вклучува амплификација во реално време (multiplex PCR (полимеразна верижна реакција)) на ДНА фрагментите од ХПВ генотиповите 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 и 68, како и β -globin-скиот генски фрагмент. Детекцијата со полимеразна верижната реакција (PCR (полимеразна верижна реакција)) се базира на амплификација на тапоген-специфична секција од геномот, користејќи специфични прајмери. Во флуоресцентна крајна точка PCR (полимеразна верижна реакција), флуоресцентна боја се користеа да го идентификува амплифицираниот продукт, кој што е поврзан со олигонуклеотидните сонди кои ексклузивно се закачуваат на нив за време на термоиклацијата. Конструиран е повеќеканален ротор-тип флуорометар за детектирање на флуоресцентната емисија од акумулираниот производ без повторно отварање на реакционата епрувета по завршувањето на PCR (полимеразна верижна реакција) циклусот.

3.9 Статистичка анализа

Сите собрани податоци беа обработени и анализирани со користење на статистичкиот софтвер GraphPad Prism верзија 9.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Демографските карактеристики на испитаничките, како и клиничките и лабораториските параметри, беа прикажани со соодветни дескриптивни статистички методи. Континуираните варијабли беа изразени како аритметичка средина \pm стандардна девијација (SD) или медијана со интерквартилен опсег (IQR), во зависност од нормалноста на дистрибуцијата. Категоричките варијабли беа прикажани во форма на апсолутни броеви и проценти (%).

Нормалноста на дистрибуцијата на континуираните варијабли беше проверена со Shapiro–Wilk тест. За споредба на разликите меѓу две независни групи се користеше t-тест за независни тест примероци доколку дистрибуцијата беше нормална, а во случај на ненормална дистрибуција се применуваше Mann–Whitney U тест. За споредба на повеќе од две групи се користеше еднонасочна анализа на варијанса (ANOVA) со пост-hoc Tukey тест за парни споредби, или Kruskal–Wallis тест со Dunn’s multiple comparisons тест доколку дистрибуцијата не беше нормална.

За анализа на категоричките податоци се применуваа χ^2 (хи-квадрат) тест или Fisher-ов точен тест (во случаи на мали очекувани фреквенции). Корелацијата помеѓу одделни континуирани параметри (на пример, серумски нивоа на витамин Д и фолат со возраста или BMI) беше анализирана со Pearson-ов тест на корелација (за нормално распределени податоци) или со Spearman-ов тест на ранг-корелација (за ненормални дистрибуции).

Дополнително, беше спроведена логистичка регресиона анализа со цел да се утврди независната асоцијација на нивоата на витамин Д и фолат, како и други релевантни клинички и демографски фактори, со ризикот за појава на цервикални интраепителни лезии. Резултатите од регресионата анализа беа изразени како odds ratio (OR) со соодветни 95% интервали на доверба (CI).

За сите статистички тестови, вредноста $p < 0,05$ се сметаше за статистички значајна. Податоците беа визуелизирани преку табели и графички прикази (столбести графици, box-plot, histogram и scatter plot), со цел подобра илустрација на разликите и асоцијациите меѓу анализираните параметри.

3.10 Етички аспекти

Истражувањето беше спроведено во согласност со етичките принципи на Декларацијата од Хелсинки за медицински истражувања во кои се вклучени луѓе. Пред започнување на студијата, протоколот беше разгледан и одобрен од страна на Етичката комисија при Медицинскиот факултет во Скопје (бр.03-2633/6 од 13.06.2023 година)

Сите учеснички во истражувањето беа детално информирани за целите, методите, можните придобивки и потенцијалните ризици од учеството. Пред вклучување во студијата, секоја испитаничка доброволно потпиша писмена информирана согласност.

При обработката на податоците беше обезбедена целосна анонимност и доверливост, со што личните податоци не беа достапни за трети лица. Учеството во студијата беше целосно доброволно и секоја пациентка имаше право во секој момент да се повлече од истражувањето без никакви последици по понатамошното лекување или здравствена грижа.

Овој тип на студија овозможува директна споредба меѓу групите и идентификација на потенцијални биохемиски и нутритивни детерминанти на ризикот од ЦИН.

Прашалникот беше пилот-тестиран на 10 испитанички за проверка на разбирливоста и времетраењето за пополнување. Резултатите беа квантифицирани како диететски скор.

Анализа	Метод	Опрема	Единици
Витамин Д	Имунолошки анализатор	TOSOH AIA-900	ng/mL
Фолат	Имунолошки анализатор	TOSOH AIA-900	ng/mL
ХПВ типизација	PCR (реално време)	Rotor-Gene Q	типови 16–68

Во финалниот модел на логистичка регресија беа вклучени сите варијабли со $p < 0,1$ од униваријантната анализа.

Истражувањето беше спроведено во согласност со Декларацијата од Хелсинки и Законот за заштита на лични податоци (Сл. весник бр. 42/2020).

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1 Демографски и базични клинички карактеристики на испитаниците

Во студијата беа вклучени вкупно 188 жени, поделени во две групи:

- Испитувана група ($n = 107$) со хистолошки верифицирани цервикални интраепителни неоплазии (ЦИН 1, ЦИН 2 и ЦИН 3),
- Контролна група ($n = 81$) со уреден ПАП тест и без докажана ХПВ инфекција

За поголема јасност и визуелизација на разликите, резултатите се прикажани и графички (бар-графици и дијаграми), при што се користени унифицирани ознаки и скали за споредба на средни вредности на витамин Д и фолати меѓу групите. Ваквиот приказ овозможува полесно согледување на трендовите и корелациите помеѓу биохемиските и клиничките параметри.

Карактеристика	n	%
Националност		
Македонска	168	89,4
Албанска	7	3,7
Турска	6	3,2
Ромска	3	1,6
Останато	4	2,1
Место на живеење		
Урбана средина	111	59
Рурална средина	77	41
Степен на образование		
Незавршено образование	2	1,1
Основно образование	16	8,5
Училиште за КВ/ ВКВ	3	1,6
Средно образование	115	61,2
Високо образование	52	27,7

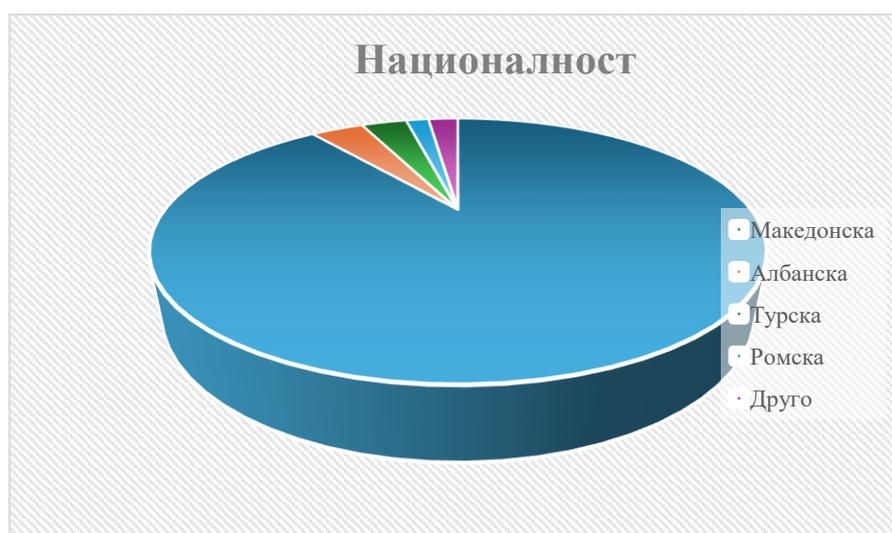
Брачна состојба

Во брак/ живее со партнер	169	89,9
Живее сама	19	10,1

Сопствен приход

Да	120	63,8
Не	68	36,2

Табела 3. Дистрибуција на пациентките според демографските карактеристики



Графикон 1. Дистрибуција на испитуваните испитанички според националност



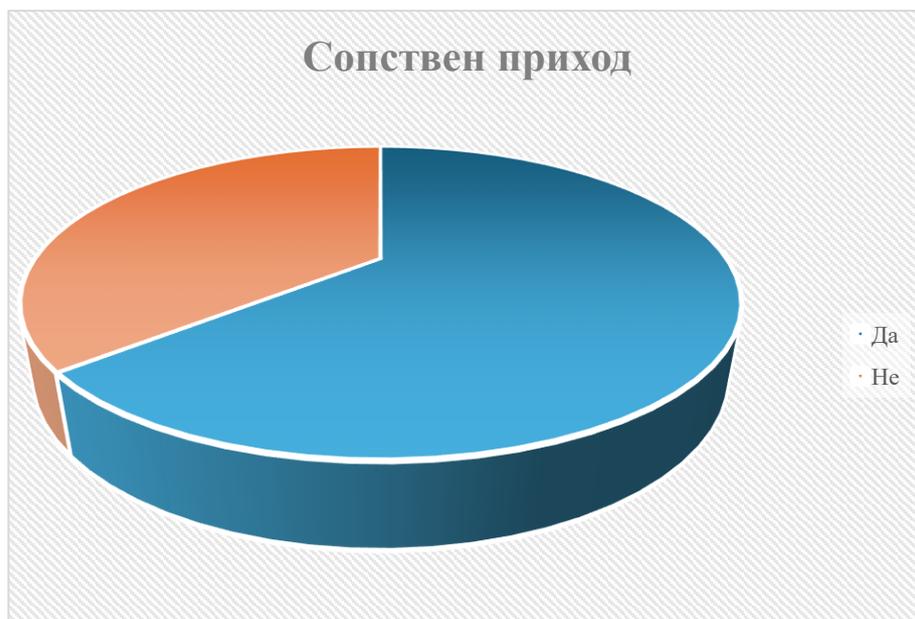
Графикон 2. Дистрибуција на испитуваните испитанички според место на живеење



Графикон 3. Дистрибуција на испитуваните испитанички според степенот на образование



Графикон 4 . Дистрибуција на испитуваните испитанички според брачната состојба



Графикон 5. Дистрибуција на испитуваните испитанички според поседувањето на сопствен приход

4.2 Возраст, пушачки статус и останати здравствени карактеристики

Просечната возраст на сите испитанички изнесуваше 42,18 години, со статистички значајна разлика помеѓу двете групи:

- Контролна група: $45,98 \pm 1,23$ години
 - Испитувана група: $39,31 \pm 1,19$ години
- ($p = 0,0002$)

Ова укажува дека жените со присутни цервикални лезии се значително помлади во споредба со здравите испитанички. Овој податок може да биде индикативен за возраста како можен ризик-фактор за појава на ЦИН, но и за ран почеток на сексуална активност или изложеност на ХПВ во помлада возраст.

Карактеристика	n	%
Менопаузален статус		
Пременопаузални	134	71,3
Постменопаузални	54	28,7
Возраст		
18-29 години	35	18,6
30-39 години	47	25
40-49 години	52	27,6
50-59 години	32	17
60 + години	22	11,7

Категоризација според БМИ

Потхранетост	1	0,5
Нормален БМИ	118	62,8
Пре-обезитет	51	27,1
Обезитет класа 1	16	8,5
Обезитет класа 2	2	1,1
Обезитет класа 3	0	0

Пушачки статус

Непушач	97	51,6
Пушач	91	48,4

Присуство на коморбидитети

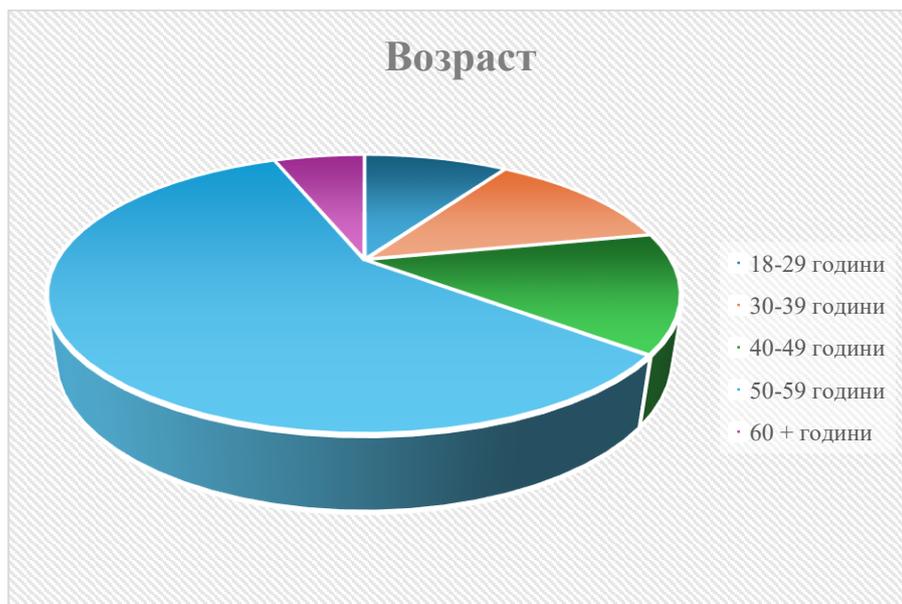
Не	127	67,6
Да	61	32,4

Табела 4. Дистрибуција на испитаничките учеснички спореди здравствените карактеристики

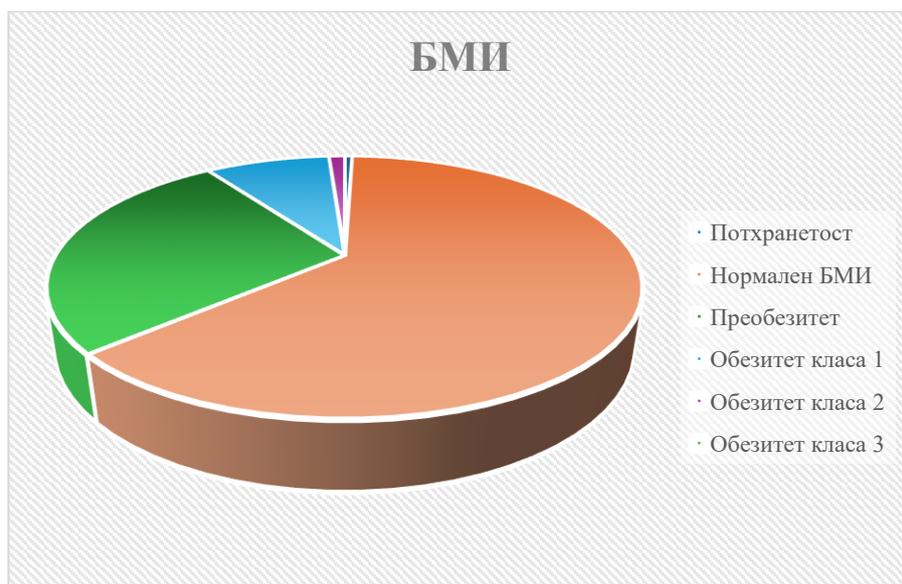


Графикон 6. Дистрибуција на испитуваните испитанички според менопаузалниот статус

За потребите на оваа студија, испитаничките беа поделени во следниве возрастни категории: 18-29 години, 30-39 години, 40-49 години, 50-59 години, и 60+ години. Оваа поделба беше избрана со цел да се истражат разликите во нивоата на витамин Д и фолат во различни животни фази, и да се оценат потенцијалните разлики во ризикот од развој на цервикални интраепителни лезии (ЦИН).



Графикон 7. Дистрибуција на испитуваните испитанички според возраста

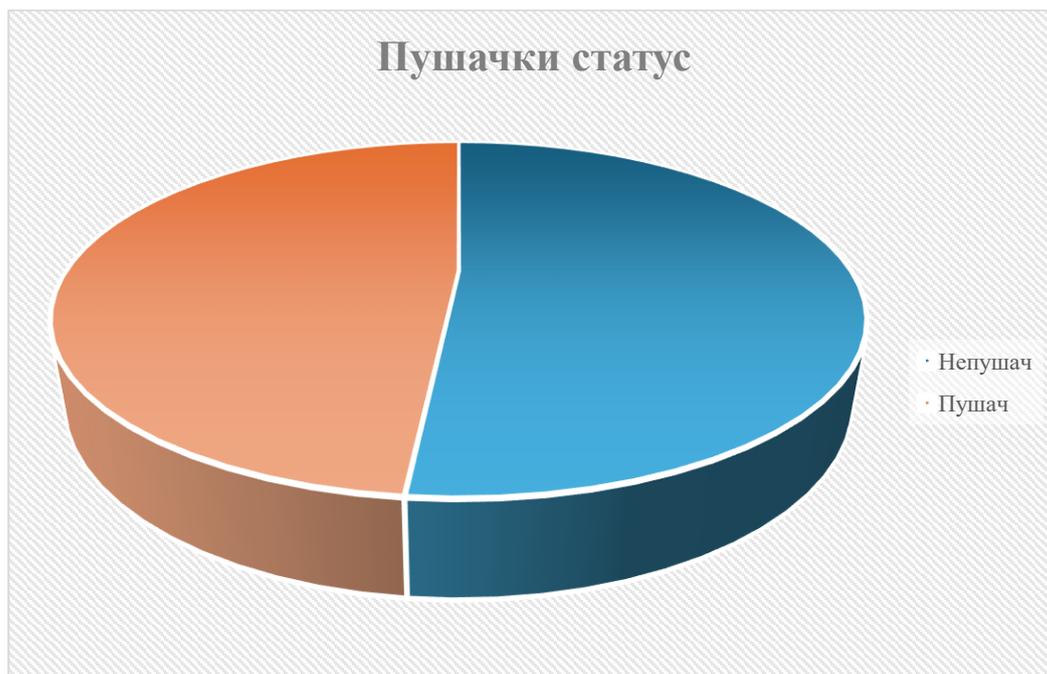


Графикон 8. Дистрибуција на испитуваните испитанички според БМИ

4.3 Индекс на телесна маса (БМИ)

- Индексот на телесна маса во контролната група изнесува: $25,34 \pm 0,46 \text{ kg/m}^2$
- А во испитуваната група изнесува: $23,80 \pm 0,34 \text{ kg/m}^2$
($p = 0,0076$)

Жените со ЦИН имаат значително понизок БМИ, што би можело да се должи на возраст, диететски навики или други фактори. Интересно е што, иако повисокиот БМИ често се поврзува со хронична воспаленост и метаболички нарушувања, тука не се потврдува како ризик-фактор за ЦИН.



Графикон 9. Дистрибуција на испитуваните испитанички според пушачкиот статус

Во поглед на пушачкиот статус, 91 од вкупно 188 испитанички (48,4%) се изјасниле како пушачи:

- Во испитуваната група, 49,53% (n=53) се пушачи,

- Во контролната група, 46,91% (n=38) се пушачи.

Иако разликата не е статистички обработена, високата застапеност на пушење во двете групи потенцира потреба од понатамошна анализа на пушењето како ко-фактор во прогресијата на ХПВ инфекцијата и ЦИН.



Графикон 10. Дистрибуција на испитуваните испитанички според присуството на коморбидитети

4.4 Други лабораториски параметри

- Глукоза (mmol/L):

Просечната концентрација на глукоза во контролната група изнесува: $5,645 \pm 0,174$

Просечната концентрација на глукоза во испитуваната група изнесува: $5,433 \pm 0,092$

($p = 0,9059$) → незначајна разлика

- Холестерол (mmol/L):

Просечната концентрација на холестерол во контролната група изнесува: $5,273 \pm 0,089$

Просечната концентрација на холестерол во испитуваната група изнесува: $4,961 \pm 0,102$

($p = 0,0089$) → значајна разлика

Намалени нивоа на холестерол кај испитуваните може да укажуваат на изменет липиден метаболизам или нутритивен статус.

- Триглицериди (mmol/L):

Просечната концентрација на триглицеридите кај контролната група: $2,304 \pm 1,062$

Просечната концентрација на триглицеридите кај испитуваната група: $1,160 \pm 0,063$

($p = 0,4753$) → незначајна разлика

- Тромбоцити ($\times 10^3/\mu\text{L}$):

Просечен број на тромбоцити во контролната група изнесува: $259,6 \pm 8,30$

Просечен број на тромбоцити во испитуваната група изнесува: $263,1 \pm 6,87$

($p = 0,9327$) → незначајна разлика

- Хемоглобин (g/dL):

Просечната концентрација на хемоглобинот кај контролната група: $13,13 \pm 0,15$

Просечната концентрација на хемоглобинот кај испитуваната група: $14,17 \pm 1,05$

($p = 0,8160$) → незначајна разлика

- MCV (fl):

Среден волумен на еритроцитите за контролната група: $83,59 \pm 0,81$

Среден волумен на еритроцитите за испитуваната група: $85,28 \pm 0,61$

($p = 0,0898$) → гранична разлика

- Седиментација (SE):

Просечна стапка на седиментација за контролната група: $13,06 \pm 0,99$

Просечна стапка на седиментација за испитуваната група: $14,96 \pm 1,14$

($p = 0,3616$) → незначајна разлика

- Железо (Fe $\mu\text{mol/L}$):

Просечна концентрација на железо во контролната група: $13,04 \pm 0,67$

Просечна концентрација на железо во испитуваната група: $12,32 \pm 0,54$

($p = 0,3984$) → незначајна разлика

Parameter	Mean \pm SEM	Mean \pm SEM	p-value	
	Control (n=81)	HPV (n=107)	(t-test, Whitney)	Mann-
Age	45.98 \pm 1.230	39.31 \pm 1.185	0.0002*	
Vitamin D (ng/mL)	22.40 \pm 0.8642	11.53 \pm 0.6347	<0.0001*	
Folate (ng/mL)	11 \pm 0.4022	7.239 \pm 0.3300	<0.0001*	
BMI (kg/m ²)	25.34 \pm 0.4619	23.80 \pm 0.3370	0.0076*	
Glucose (mmol/l)	5.645 \pm 0.1736	5.433 \pm 0.0918	0.9059	
Cholesterol (mmol/l)	5.273 \pm 0.0893	4.961 \pm 0.1019	0.0089*	
Triglycerides (mmol/l)	2.304 \pm 1.062	1.160 \pm 0.063	0.4753	
Thrombocytes(x10 ⁹ / μ L)	259.6 \pm 8.304	263.1 \pm 6.869	0.9327	

HGB (g/dL)	13.13±0.1459	14.17±1.046	0.8160
MCV (fl)	83.59±0.8147	85.28±0.6125	0.0898
SE	13.06±0.9987	14.96±1.144	0.3616
Fe (µmol/l)	13.04±0.6725	12.32±0.537	0.3984

Табела 5. Компарација на базичните лабораториски параметри, концентрацијата на витамин Д и фолати кај жени, помеѓу контролната група и испитаничките со ХПВ. Резултатите се прикажани како Mean±SEM, со p<0.05, статистичка значајност

Кога ги споредивме БМИ, возраста и основните лабораториски параметри како, глюкоза, холестерол, триглицериди, седиментација, хемоглобин, MCV и тромбоцитите, статистички значајна разлика помеѓу двете групи, освен за витамин Д и фолат, добивме и за БМИ, каде што добивме средна вредност од 25,34± 0,4619 kg/m² кај испитувана група и вредност од 23,80±0,3370 kg/m² кај контролната група. Понатаму статички значајна разлика добивме и кај холестерол, каде што просечната вредност за испитуваната група беше 5,273±0,0893 mmol/l, а кај контролната група беше 4,961±0,1019 mmol/l и возраста, која беше 45,98±1,230 години односно 39,31±1,185 години, кај испитуваната и контролната група соодветно, како што е прикажано во Табела 4.

4.5 Поврзаност на хигиено-диететските навики и присуството на високо-ризичен ХПВ

При анализата на нутритивните навики беше утврдено дека испитаничките со позитивен ХПВ наод имале значително понизок диететски скор (12,88 ± 0,68) во споредба со негативните (16,85 ± 0,59; p < 0,05).

Нискиот диететски скор беше најчесто присутен кај испитанички со детектирани ХПВ типови 16 и 18, додека испитаничките со негативен тест консумираше поголеми количини на овошје и темнозелен зеленчук и почесто користеле витамин Д и фолна киселина.

4.6 Серумски вредности на витамин Д и фолат кај испитанички со цервикални интраепителни лезии

4.6.1 Серумски концентрации на витамин Д

Серумските нивоа на 25(ОН) витамин Д беа значително пониски кај испитаничките со ЦИН, во споредба со здравите испитанички:

- Просечната концентрација на витамин Д во контролна група изнесуваше: $22,40 \pm 0,86$ ng/mL
- Просечната концентрација на витамин Д во испитуваната група изнесуваше: $11,53 \pm 0,63$ ng/mL
($p < 0,0001$)

Според утврдените клинички категории за витамин Д:

- Концентрација на витамин Д под 12 ng/mL –укажува на тежок дефицит
- Концентрација на витамин Д од 12 до 19 ng/mL – укажува на дефицит на витамин Д
- Концентрација на витамин Д од 20 до 30 ng/mL – укажува на инсуфициенција
- Концентрација на витамин Д >30 ng/mL – укажува на суфициентно ниво на витамин Д

Поголемиот дел од испитаничките со ЦИН имаа нивоа кои припаѓаат во категоријата на тежок дефицит на витамин Д, додека кај контролната група преовладуваа вредности блиски до или во рамки на инсуфициенција. Овој резултат укажува на можна улога на дефицитот на витамин Д во патогенезата или напредувањето на цервикалните интраепителни лезии.

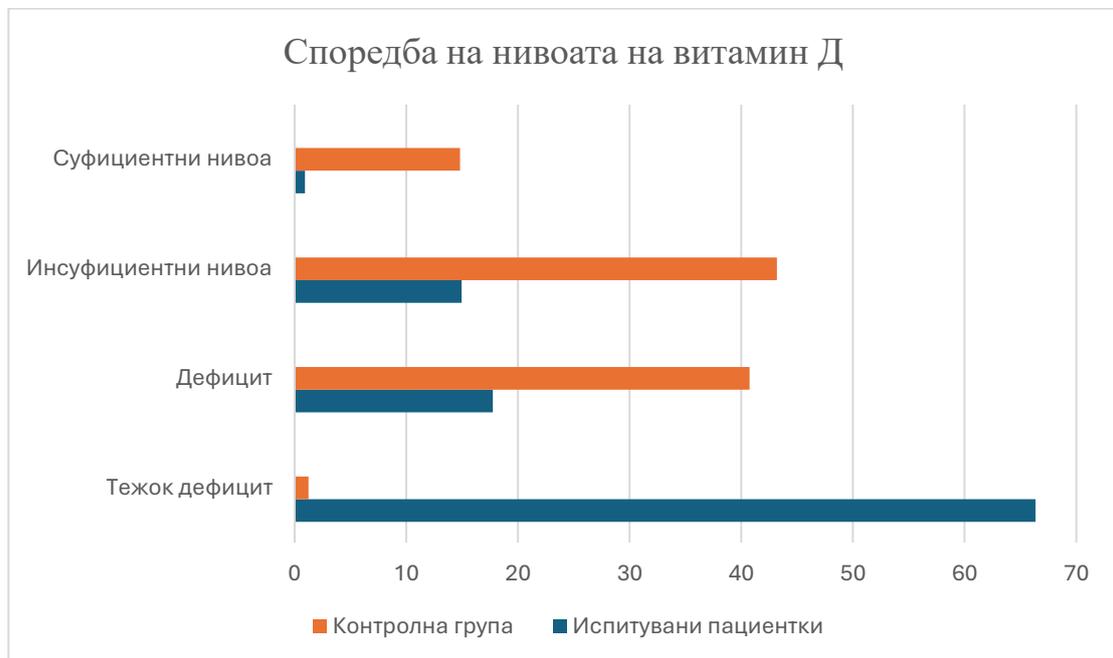
Анализата на серумските концентрации на витамин Д покажа значајна разлика помеѓу испитуваната група (жени со ЦИН 1, ЦИН 2 и ЦИН 3) и контролна група (жени со уреден ПАП тест), со статистичка значајност ($p < 0,05$).

Во групата на испитанички со цервикални интраепителни лезии:

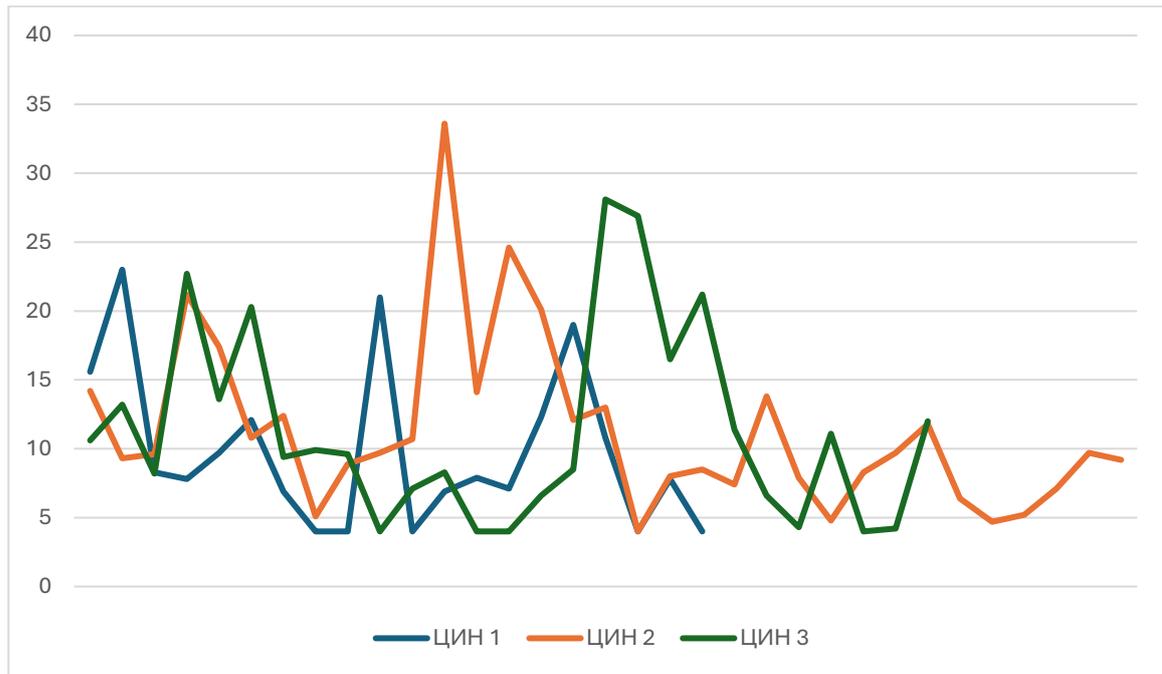
- 66,35% (n=71) од испитаничките имале тежок дефицит на витамин Д (<12 ng/mL),
- 17,75% (n=19) од испитаничките имале дефицит на витамин Д (12–19 ng/mL),
- 14,95% (n=16) од испитаничките имале инсуфициентни нивоа (20–30 ng/mL),
- Само 0,93% (n=1) од испитаничките покажале суфициентни нивоа (≥ 30 ng/mL).

Во контролната група:

- 1,23% (n=1) од испитаничките имале тежок дефицит на витамин Д,
- 40,74% (n=36) од испитаничките имале дефицит на витамин Д,
- 43,20% (n=38) од испитаничките имале инсуфициенција на витамин Д,
- 14,81% (n=13) од испитаничките имале суфициентни нивоа на витамин Д.



Графикон 11. Споредба на нивоата на витамин Д, кај испитуваната група, наспроти контролната група



Графикон 12. Серумски вредности на витамин Д, кај ЦИН 1, ЦИН 2 и ЦИН 3

Овие податоци сугерираат силна поврзаност помеѓу ниските серумски нивоа на витамин Д и присуството на цервикални интраепителни лезии.

4.6.2 Серумски концентрации на фолати

Исто така, беше утврдена статистички значајна разлика и во серумските нивоа на фолати:

- Просечната концентрација на фолат во контролната група изнесуваше: $11,00 \pm 0,40$ ng/mL
- Просечната концентрација на фолат во испитуваната група изнесуваше: $7,24 \pm 0,33$ ng/mL
($p < 0.0001$)

Класификацијата за нивоа на фолати е следна:

- Нивоа на фолат ≤ 3 ng/mL – укажуваат на инсуфициенција на фолат
- Нивоа на фолат од 3 до 17 ng/mL – укажуваат на нормални нивоа

- Нивоа на фолат ≥ 17 ng/mL – укажуваат на концентрација на фолат над нормалните вредности

Иако просечните вредности кај двете групи се во рамки на нормални нивоа, испитуваната група покажува значително пониски вредности, што може да биде клинички релевантно, имајќи предвид дека фолатите се вклучени во ДНК метилацијата и поправка на ДНК – процеси кои се нарушени кај ХПВ-инфекцирани клетки.

Исто така, беше забележана статистички значајна разлика ($p < 0.05$) и во концентрациите на серумски фолати помеѓу двете групи.

Во испитуваната група:

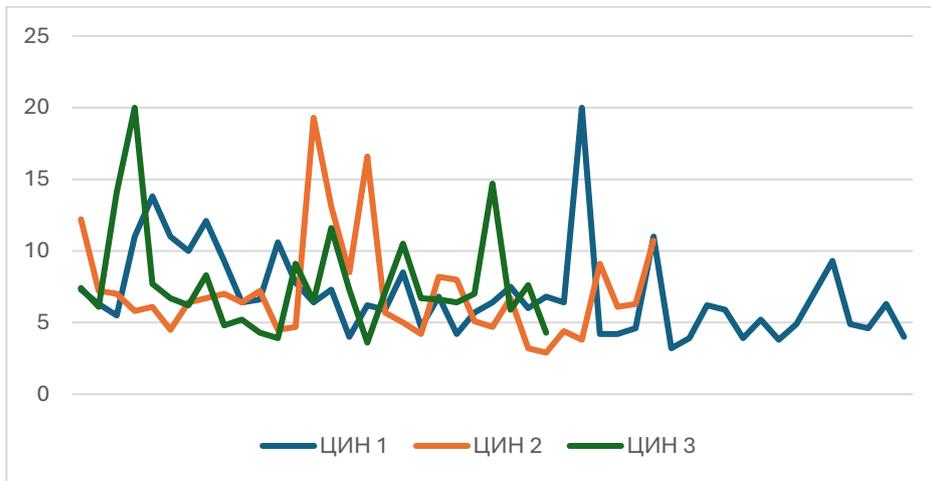
- 0,93% (n=1) пациентка имала дефицит на фолат (≤ 3 ng/mL),
- 96,26% (n=103) имале вредности во рамки на нормалата (3–17 ng/mL),
- 2,8% (n=3) имале вредности над нормалата (≥ 17 ng/mL).

Во контролната група:

- 92,59% (n=75) од испитаничките имале нормални вредности,
- 7,4% (n=6) од испитаничките вредности над нормала.

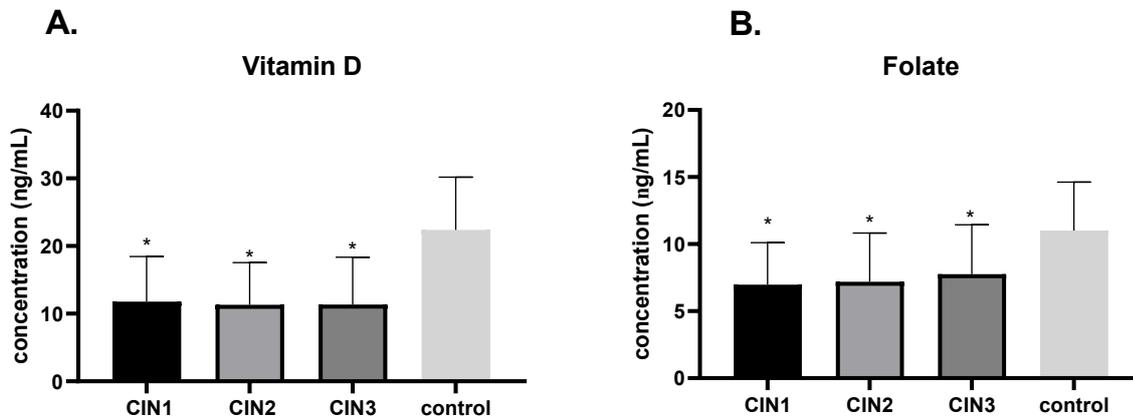


Графикон 13. Споредба на нивоата на фолат, кај испитуваната група, наспроти контролната група



Графикон 14. Серумски вредности на фолат, кај ЦИН 1, ЦИН 2 и ЦИН 3

Овие резултати укажуваат дека кај испитаничките со ЦИН, нивото на фолати е значајно пониско, и покрај тоа што во повеќето случаи останува во рамки на референтните вредности.



Графикон 15. Средна серумска концентрација на (А) витамин Д (ng/mL) и (В) фолат (ng/mL) кај жени со цервикални интраепителни лезии во споредба со жени со нормален ПАП тест (контролна група).

Распределбата на пациентите во однос на цервикалните интраепителни лезии и концентрациите на витамин Д и фолат се прикажани во Графикон 15.

Цервикална интраепителна лезија	Витамин Д (ng/ml) ± SEM	Д р- вредност(t-test)	Фолат (ng/ml) ± SEM	р-вредност(t-test, Mann-Whitney)
CIN1 (n=47)	11.79±0.97	<0.0001	6.97±0.45	<0.0001
CIN2 (n=33)	11.31±1.08	<0.0001	7.19±0.63	<0.0001
CIN3 (n=27)	11.34±1.35	<0.0001	7.76±0.7	<0.0001
Контроли (n=81)	22.40±0.86		11.0±0.40	

Табела 6. Поделба на испитаниците според цервикалните интраепителни лезии и концентрациите на витамин Д и фолат. Резултатите се прикажани како Mean±SEM.

Според овие податоци:

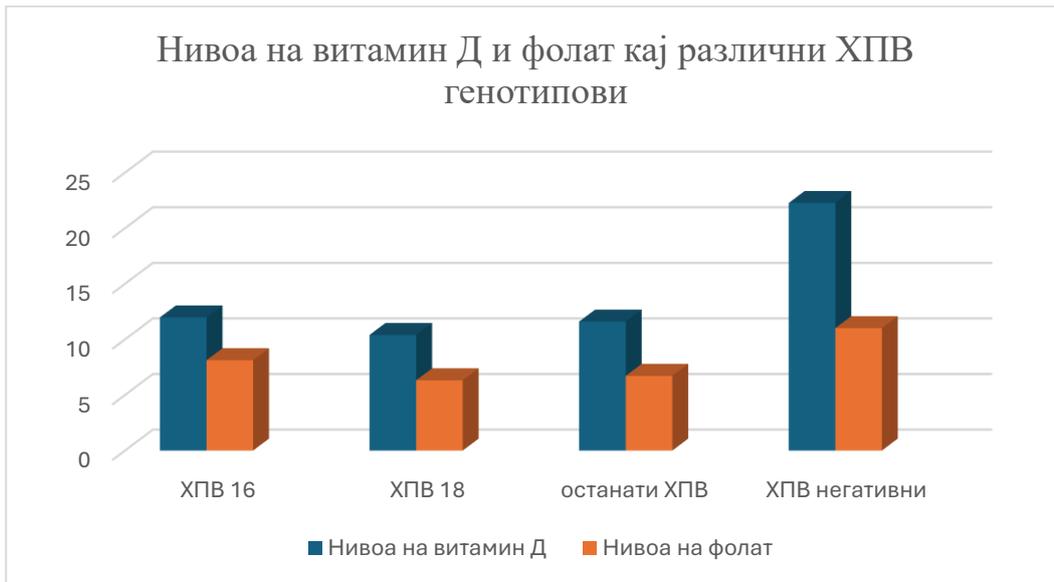
- Кај сите степени на ЦИН (1, 2 и 3), вредностите на витамин Д остануваат стабилно ниски, под 12 ng/mL – што укажува на тежок дефицит.
- Фолатните вредности се исто така значително пониски кај испитаничките со ЦИН, но се зголемуваат со прогресијата од ЦИН 1 кон ЦИН 3, иако остануваат под нивото на контролната група.

4.7 Распределба на ХПВ генотипови кај испитуваните испитанички

ХПВ (хуман папиломавирус) е главниот етиолошки фактор за развој на цервикални интраепителни лезии и рак на грлото на матката. Според генотипизацијата спроведена кај нашата група на испитанички со хистопатолошки верифицирани цервикални интраепителни лезии, беше идентификувана различна дистрибуција на ХПВ подтиповите, што укажува на потенцијално различно онкогено влијание на секој генотип.

HPV група	Витамин D (ng/mL), Mean \pm SD (Min–Max)	Фолат (ng/mL), Mean \pm SD (Min–Max)
HPV 16	11,98 \pm 7,34	8,12 \pm 4,4
HPV 18	10,4 \pm 6,31	6,32 \pm 2,06
HPV други типови	11,6 \pm 6,84	6,72 \pm 2,60
HPV негативни	22,3 \pm 7,48	11,01 \pm 3,6

Табела 7. Серумски нивоа на витамин Д и фолат според ХПВ статус



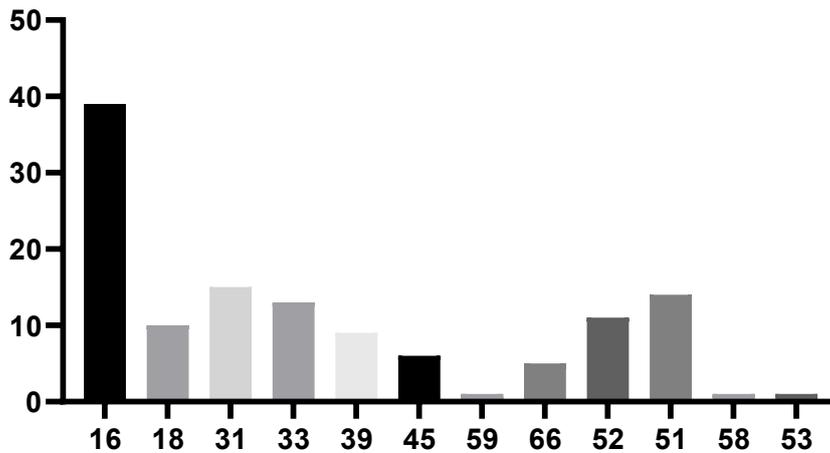
Графикон 16. Нивоа на витамин Д и фолат кај групите според ХПВ статус

Серумските нивоа на витамин Д беа најниски кај испитаничките со ХПВ 16, додека највисоки кај ХПВ-негативната група. Фолатот исто така покажа значајни разлики помеѓу групите ($p < 0,05$).

4.7.1 Доминирачки ХПВ типови

Како што е прикажано на Графикон 15, најзастапени генотипови на ХПВ кај испитуваните испитанички беа:

- ХПВ тип 16 – најчесто детектиран тип, кој е добро познат како високоризичен онкоген тип, одговорен за значителен процент од случаите на ЦИН 2, ЦИН 3, и инвазивен цервикален карцином. Неговото високо присуство во оваа популација е конзистентно со глобалните податоци за распространетост.
- ХПВ тип 31 – втор најчест генотип во нашата студија. Исто така припаѓа на групата на високоризични типови и е често поврзан со перзистентни инфекции кои можат да прогредираат кон повисоки степени на ЦИН.
- ХПВ тип 51 – трет по застапеност, исто така се класифицира како високоризичен тип, иако со помала трансформациона способност во однос на типот 16.



Графикон 17. ХПВ генотипизација во согласност со цитолошката дојагноза

4.7.2 Опис на застапеноста

Во нашава студија дистрибуцијата сугерира дека:

- ХПВ 16 беше доминантен кај повеќето случаи со повисоки степени на ЦИН (особено ЦИН 2 и ЦИН 3),
- ХПВ 31 се појавува во мешани инфекции или кај ЦИН 1 и ЦИН 2,
- ХПВ 51 најчесто се среќава во ЦИН 1 или транзиторни инфекции.

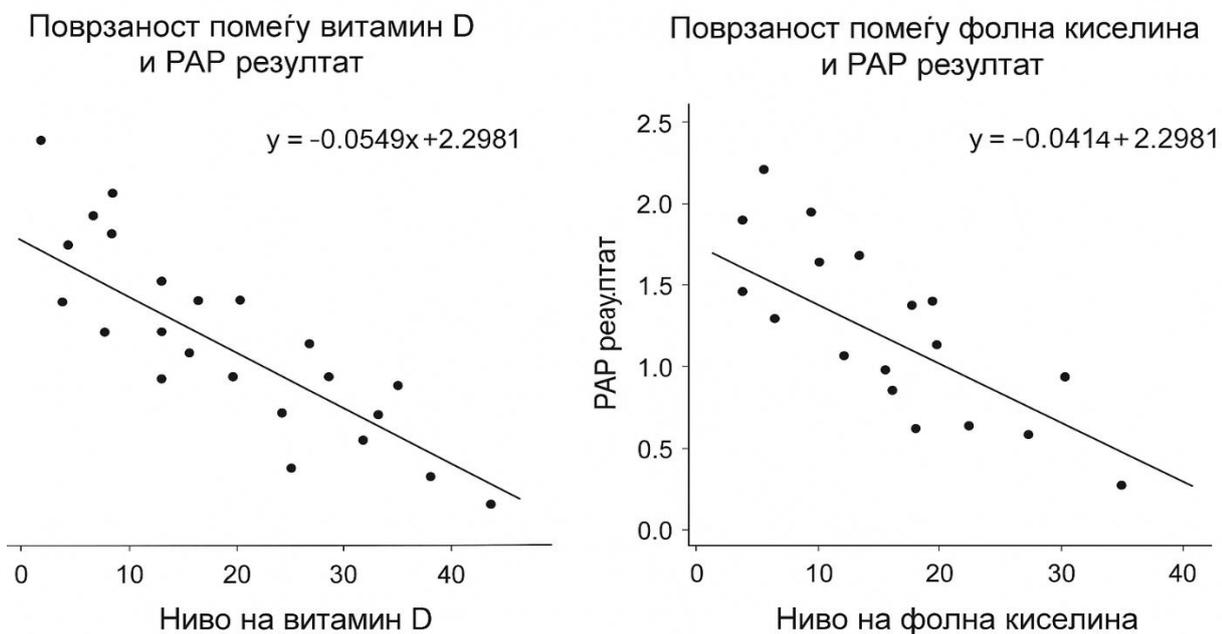
Овие наоди ја потенцираат потребата од редовна ХПВ генотипизација во клиничката пракса, како алатка за ризична стратификација и индивидуализирање на следењето и третманот.

4.8 Резултати од корелационата и регресиската анализа

Со цел да се процени поврзаноста помеѓу серумските нивоа на витамин Д, фолна киселина и цитолошките резултати (ПАП тест), беше спроведена линеарна регресиска анализа.

Моделот покажа дека двата параметра имаат негативна поврзаност со ПАП резултатите, што укажува дека повисоките нивоа на витамин Д и фолна киселина се асоцирани со подобар цитолошки наод и помала веројатност за присуство на клеточни абнормалности.

- Коефициент на витамин Д: $-0,0549$
→ силна негативна поврзаност со ПАП резултатите,
 $p = 1,6 \times 10^{-9}$, што укажува на висока статистичка значајност.
- Коефициент на фолна киселина: $-0,0414$
→ умерено негативна поврзаност,
 $p = 0,035$, што исто така е статистички значајно, но со послаб ефект во однос на витамин Д.
- Intercept (константа): 2,2981
- $R^2 = 0,285$, што значи дека околу 28,5% од варијацијата во ПАП резултатите може да се објасни преку нивоата на витамин Д и фолна киселина.



Слика 3. Поврзаност помеѓу серумските нивоа на витамин Д и фолна киселина со цитолошките резултати (ПАП тест). Линиите на тренд ја прикажуваат негативната зависност помеѓу концентрацијата на витамин Д и фолати и индексот на абнормалност на клеточниот наод.

Вкупно земено, резултатите од оваа студија покажуваат силна и статистички значајна поврзаност помеѓу ниските серумски нивоа на витамин Д и фолат и појавата на цервикални интраепителни лезии. Дополнително, анализите укажуваат на потенцијална улога на нутритивниот статус во елиминацијата на ХПВ инфекцијата, што го потенцира значењето на овие параметри во превенцијата и терапевтскиот пристап.

5. ДИСКУСИЈА

Резултатите од ова истражување ја потврдуваат хипотезата дека дефицитот на витамин Д и фолна киселина има значајна улога во појавата и прогресијата на патолошките промени на цервикалниот епител кои водат до развој на цервикален карцином.

5.1 Интерпретација на резултатите

Во нашата студија беше утврдена статистички значајна разлика во нивоата на витамин Д и фолати помеѓу испитуваната и контролната група, при што двете вредности беа значително пониски кај испитаничките со хистолошки потврдени цервикални интраепителни лезии. Меѓу подгрупите (ЦИН 1, ЦИН 2 и ЦИН 3) не беше најдена статистички значајна разлика, што може да се должи на ограничениот број на испитанички во секоја подгрупа и можните конфаундери како зависност на вредностите од сезоната, нутритивен статус и навики во исхраната.

Линеарната регресиска анализа покажа негативна поврзаност помеѓу нивото на витамин Д и цитолошките резултати (коефициент -0.0549 ; $p = 1.6 \times 10^{-9}$), како и помеѓу нивото на фолна киселина и ПАП резултатите (коефициент -0.0414 ; $p = 0.035$). Околу 28.5% од варијацијата на ПАП резултатите може да се објасни преку нивото на овие два витамина ($R^2 = 0.285$), што укажува на нивна значајна, но не единствена улога во патогенезата на цервикалните лезии.

Графичките прикази потврдуваат дека со зголемување на нивото на витамин Д и фолната киселина во серум се намалува индексот на цитолошки абнормалности, што укажува на подобар цитолошки исход и поголема веројатност за регресија на промените.

5.2 Молекуларен механизам на дејството на витамин Д и фолатот во патогенезата на ХПВ инфекцијата

Витаминот Д, преку активниот метаболит $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, делува како нуклеарен сигнален молекул кој посредува преку рецепторот за витамин Д (VDR). Овој рецептор се врзува за специфични делови од ДНК, наречени vitamin D response elements (VDRE), регулирајќи експресија на повеќе од 900 гени поврзани со имунолошкиот одговор, клеточната пролиферација и апоптозата^[186,187]. Витаминот D преку VDR, исто така, влијае врз експресијата на неколку тумор-супресорски микроРНК, вклучително и miR-22, која е инхибирана од HPV16 E6 онкогенот^[132].

Активацијата на VDR ја потиснува експресијата на вирусните онкогени E6 и E7 на ХПВ, со што се овозможува стабилизација на p53 и pRb, два клучни тумор-супресорски протеини кои инаку се инактивирани при инфекција со високо ризични типови ХПВ^[188]. Ниското ниво на витамин Д резултира со нарушен антивирусен имунолошки одговор, карактеризиран со намалена продукција на IL-10 и TGF- β , и зголемена експресија на IL-6 и TNF- α , што доведува до хронична воспалителна состојба и перзистенција на ХПВ-инфекцијата^[189,190].

Дополнително, активацијата на VDR во епителните клетки поттикнува продукција на кателицидини (LL-37) и β -дефензини, кои имаат директна антивирусна активност и учествуваат во одржување на епителниот интегритет^[191].

Фолатот, од друга страна, е клучен кофактор во метаболизмот на еднојаглеродните единици и во метилацијата на ДНК. Недостатокот на фолат води кон глобална хипометилација на ДНК, што резултира со геномска нестабилност, хромозомски аберации и олеснета интеграција на ХПВ-ДНК во геномот на домаќинот^[192,193].

Хипометилацијата исто така доведува до повишена експресија на онкогени и инхибиција на метилацијата на промоторите на тумор-супресорските гени, што дополнително го олеснува процесот на неопластична трансформација^[194]. Истражувањата покажуваат дека

фолатот го одржува епигенетскиот баланс и стабилноста на клеточниот циклус, а неговиот недостаток може да ја зголеми трансформациската активност на вирусните онкогени E6/E7^[195].

Синергистичкиот недостаток на витамин Д и фолат создава услови за перзистенција на вирусот, нарушена ДНК репарација, зголемена оксидативна штета и олеснета интеграција на вирусниот геном, што претставува клучен механизам во преминот од ЦИН 2/ ЦИН3 кон инвазивен цервикален карцином^[188,193,195].

Овие податоци ја потврдуваат потребата за редовно следење и корекција на нутритивниот статус, како потенцијална стратегија за превенција на прогресијата на ХПВ-индуцираните лезии.

5.3 Споредба со литература

Нашите резултати се во согласност со повеќе студии кои ја потврдуваат заштитната улога на витамин Д и фолатите во контекст на ХПВ инфекцијата и цервикалните интраепителни промени.

Özgül и соработниците известуваат дека ХПВ-ДНК позитивните жени имаат значително пониски нивоа на витамин Д во споредба со здравите контроли, а дефицитот е поврзан со перзистенција на вирусот и развој на ЦИН лезии [89]. Слично, Shim et al. покажуваат асоцијација помеѓу ниските серумски нивоа на витамин Д и поголемата преваленца на ХПВ инфекција кај повеќе од 2300 жени [90].

Во однос на фолатите, бројни студии го потврдуваат нивното заштитно дејство. Zhao et al. утврдиле дека ниските серумски нивоа на фолат го зголемуваат ризикот за прогресија на ЦИН и дека постои синергистичка интеракција помеѓу нискиот фолат и високоризичната ХПВ инфекција [196].

Chen и соработниците (2025) во систематска прегледна и мета-аналитичка студија утврдиле дека повисоките серумски концентрации на фолат се поврзани со значајно намален ризик за ЦИН (OR = 0.42) и цервикален карцином (OR = 0.53) [197].

5.4 Биолошка интерпретација и механизми

Витаминот Д и неговиот рецептор (VDR) имаат централна улога во модулацијата на имунолошкиот одговор, регулацијата на клеточната пролиферација и индукцијата на апоптоза.

Неговото дејство се поврзува со зголемена експресија на антимицробни пептиди, како кателицидин, и со потиснување на воспалителните цитокини, што овозможува подобра контрола на ХПВ инфекцијата и намалување на ризикот за трансформација на епителните клетки [198–200].

Фолатите, пак, се клучни за синтезата и метилацијата на ДНК. Нивниот недостаток доведува до хипометилација на промоторските региони на тумор-супресорните гени (p16INK4a, p53), што може да ја олесни интеграцијата на ХПВ ДНК во геномот на домаќинот. Соодветниот внес на фолати може да ја зачува геномската стабилност и да придонесе за подобар имунолошки одговор и спонтан клиренс на вирусот.

5.5 Нутритивни навики и клиничка важност

Резултатите од анкетата за исхрана потврдуваат дека урамнотежената исхрана богата со свежо овошје, зеленчук и суплементи со витамин Д и фолати е поврзана со поголем процент на ХПВ клиренс и подобри биохемиски параметри. Напротив, пушењето и неуррамнотежената исхрана се поврзани со пониски нивоа на овие витамини и зголемен ризик за перзистенција на вирусот и развој на ЦИН лезии.

Овие наоди имаат практична вредност во контекст на примарната превенција и јавноздравствените стратегии, особено во популации со висока преваленца на витамин Д дефицит.

5.6 Ограничувања и идни насоки

Главните ограничувања на студијата се регионалната застапеност на примерокот, можната сезоналност во вредностите на витамин Д, и недостигот на детална нутритивна анализа. Дополнителни проспективни и интервенциски студии, со подолг период на следење и поширок географски опфат, се неопходни за потврдување на овие резултати и за развој на препораки за суплементација со витамин Д и фолна киселина.

Комбинираниот дефицит на витамин Д и фолат може синергистички да придонесе за нарушена ДНК стабилност и намалена имунолошка контрола на ХПВ инфекцијата.

Овие резултати ја нагласуваат потребата од скрининг и суплементација со витамин Д и фолати како дел од јавноздравствените програми за превенција на цервикален карцином.

И покрај ограничувањата на студијата, резултатите претставуваат важен придонес во разбирањето на улогата на нутритивните фактори во ЦИН и создаваат основа за идни интервенциски истражувања.

Во целина, дискусијата укажува дека оптималните нивоа на витамин Д и фолат може да имаат протективна улога против развојот и прогресијата на цервикалните лезии. Овие резултати ја потенцираат потребата од мултидисциплинарен пристап кој ги вклучува нутриционистичките, имунолошките и вирусолошките аспекти при проценката на ризикот и превенцијата на ХПВ-инфекцијата.

6. ОГРАНИЧУВАЊА И ЛИМИТАЦИИ

Иако студијата опфаќа голем број параметри и мултидимензионален пристап кон проценката на ХПВ инфекцијата, неколку ограничувања треба да се земат предвид при интерпретацијата на резултатите:

- **Самопријавени нутритивни податоци:** Нутритивните навики беа оценувани преку прашалник, што носи можност за субјективна преценка и пристрасност на одговорите (recall bias).
- **Еднократна проценка на исхраната:** Диететскиот скор е базиран на моментална состојба и не ја одразува долгорочната исхрана на испитаничките.
- **Недостиг на квантитативни податоци за микронутриенти:** Внесот на витамин Д и фолна киселина не беше прецизно измерен во mg или IU, туку беше оценет според зачестеноста на употребата.
- **Интерференција со други фактори:** Исхраната, индексот на телесна маса (БМИ) и пушачкиот статус можат меѓусебно да влијаат врз серумските вредности на витамин Д и фолати, што ја комплицира прецизната проценка на индивидуалниот ефект.
- **Следење во ограничен временски период:** Периодот на набљудување може да не биде доволен за проценка на долготрајните промени во нутритивниот статус и нивното влијание врз ХПВ клиренсот.

Сепак, интеграцијата на нутритивните параметри со серумските вредности на витамин Д и фолати овозможува поширок увид во имунолошките механизми кои влијаат на природниот тек на ХПВ инфекцијата.

6.1. Ограничувачки фактори во однос на витамин Д

Сезонски варијации:

- Нивото на витамин Д варира со сезоната поради променлива изложеност на сонце.
- Пациентките тестирани во лето може да имаат повисоки вредности во споредба со оние тестирани во зима.

Изложеност на сонце / УВБ зрачење:

- Сонцето е главен природен извор на витамин Д. Нивото зависи од:
 - времето поминато надвор,
 - користењето на заштитен крем,

- облеката што ја покрива кожата,
- географската локација и надморската височина.

Тип на кожа (меланин):

- Потемната кожа има повисоко ниво на меланин, што ја намалува синтезата на витамин Д преку кожата.

Телесна тежина / дебелина:

- Витаминот Д е липосолубилен (растворлив во масти), па кај лица со повисок БМИ може да се „задржи“ во масното ткиво и да биде помалку биодостапен.

Возраст:

- Со стареењето се намалува способноста на кожата да произведува витамин Д.

Исхрана:

- Количината на витамин Д внесена преку храна (риба, млечни производи, јајца) или суплементи варира индивидуално.

Употреба на суплементи:

- Ако некои испитанички земаат додатоци со витамин Д, тоа може значително да влијае врз нивото и треба да се контролира како варијабла.

Здравствени состојби:

- Болести на црн дроб, бубрези и гастроинтестиналниот тракт (нпр. целијакија, Кророва болест) можат да го нарушат метаболизмот или апсорпцијата на витамин Д.

Лекови:

- Одредени лекови (антиконвулзиви, глукокортикоиди, антиретровирусни лекови) можат да влијаат врз нивото на витамин Д.

Методологија на мерење:

- Различни лаборатории и аналитички методи (нпр. ELISA, LC-MS/MS) можат да дадат различни резултати, поради што е важно да се стандардизира методот на мерење.

6.2. Ограничувачки фактори во однос на фолатите

Серумскиот фолат ги рефлектира само раните промени во нивото на фолат во телото, кои зависат од исхраната и апсорпцијата, додека фолатот во еритроцитите подобро ги одразува долгорочните резерви. Затоа, во идни истражувања би било корисно истовремено да се анализираат и серумскиот и еритроцитниот фолат во однос на ЦИН.

Нашите податоци обезбедуваат основни информации за односот помеѓу фолатот и ЦИН, но не овозможуваат утврдување на причинско-последична врска или насока на асоцијацијата. Динамично следење на промените во нивото на фолат низ времето може да помогне во потврдување или отфрлање на можната причинско-последична поврзаност со развојот на ЦИН.

Како заклучок, ниските нивоа на серумски фолат може да го зголемат ризикот од прогресија на ЦИН, а можно е да постои и синергизам помеѓу нискиот фолат и инфекцијата со високоризичен ХПВ генотип, што дополнително го поттикнува развојот на лезиите.

Поради тоа, идните истражувања треба истовремено да ги мерат и серумскиот и еритроцитниот фолат, како и нивната врска со специфичните ХПВ генотипови, за попрецизно утврдување на биолошката релевантност на фолатниот статус во патогенезата на ЦИН.

И покрај наведените ограничувања, студијата овозможува валидни и клинички значајни согледувања за улогата на витамин Д и фолатите во имунолошкиот и морфолошкиот одговор на ХПВ инфекцијата.

7. ЗАКЛУЧОЦИ

7.1 Заклучоци од демографската и биохемиска анализа

- Серумските нивоа на витамин Д и фолати се значајно пониски кај жените со ЦИН, што укажува на можна поврзаност со имунолошката функција и метаболичката поддршка во контекст на ХПВ инфекција.
- Возраста, индексот на телесна маса (БМИ) и нивото на холестерол покажуваат статистички значајни разлики меѓу групите, што може да придонесе кон дефинирање на ризик-профил кај жените со цервикални лезии.
- Останатите биохемиски параметри не покажаа значајни разлики, што укажува дека системските воспалителни или хематолошки нарушувања не се доминантни во оваа фаза на болеста.

7.2 Главни научни заклучоци

- Потврдена е силна поврзаност помеѓу ниските серумски нивоа на витамин Д и појавата на ЦИН, особено во случаите на тежок дефицит.
- Жените со ЦИН покажуваат ниско до гранично нормално ниво на фолати, што може да има улога во патогенезата на епителните промени.
- Забележана е јасна статистичка разлика помеѓу контролната и испитуваната група и во однос на двата параметра (витамин Д и фолати), што ги истакнува како потенцијални биомаркери за ризик и прогресија на ХПВ-индуцирани лезии.

7.3 Потенцијални клинички импликации

Овој труд претставува оригинален обид за интегрирање на клиничките, биохемиските и нутритивните параметри во единствен модел за проценка на ризик од ХПВ инфекција и цервикални интраепителни лезии. Таквиот пристап има потенцијал да придонесе во создавање на нови стратегии за превенција и индивидуализирана терапија.

Идентификацијата на ХПВ генотипот, особено на тип 16, има директна прогностичка вредност и може да помогне при:

- определување на динамиката на следење,
- одлука за потребата од колпоскопија,
- индикација за биопсија или третман кај пациенти со нискостепени или неодредени лезии.

Присуството на високоризични генотипови како 31 и 51, иако со нешто пониска агресивност од ХПВ 16, не треба да се занемари, бидејќи и тие можат да придонесат кон перзистенција и малигна трансформација.

7.4 Научен придонес и значење на резултатите

Оваа докторска дисертација имаше за цел да ги испита и спореди серумските нивоа на витамин Д и фолат кај испитанички со хистолошки верифицирани цервикални интраепителни лезии (ЦИН 1, 2 и 3) во однос на контроли со уреден наод.

Добиените резултати покажуваат статистички значајни разлики во нивоата на овие микронутриенти меѓу групите, што укажува на потенцијална поврзаност помеѓу нивниот дефицит и ризикот од развој на ЦИН.

Овие резултати се во согласност со современите истражувања кои ја нагласуваат улогата на микронутриентите во клеточната пролиферација, имунолошкиот одговор и канцерогенезата.

Практичните импликации се значајни, бидејќи укажуваат на можност за примена на нутритивни стратегии во превенцијата и поддршката на испитаничките со ЦИН, како и за развој на персонализирани превентивни програми.

7.5 Ограничувања и насоки за идни истражувања

И покрај вредноста на добиените наоди, истражувањето има одредени ограничувања, вклучувајќи ја големината на примерокот, дизајнот на студијата и неопфатени конфундирачки фактори (како изложеност на сонце, нутритивни навики и употреба на орална контрацепција).

Идните истражувања треба да:

- опфатат поголем број испитаници и подолг период на следење,
- применат мултифакторска анализа за подобро дефинирање на индивидуалниот ризик,
- вклучат поширок спектар на биохемиски и нутритивни параметри.

7.6 Општи заклучоци и јавноздравствени импликации

Исхраната и нутритивниот статус имаат суштинска улога во природниот клиренс на ХПВ инфекцијата. Жените со редовен внес на свежо овошје, зеленчук и суплементи на витамин Д и фолна киселина имаат значително понизок ризик од перзистентна инфекција.

Комбинираното следење на диететскиот скор, серумските вредности на витамин Д и фолати, и пушачкиот статус може да биде корисен индикатор за процена на ризикот од прогресија кон ЦИН.

Овие резултати ја потврдуваат потребата од интеграција на нутритивни препораки и суплементација во националните превентивни програми за ХПВ инфекција.

Во поширок јавноздравствен контекст, особено во области со ограничени ресурси, се наметнува можност за фортификација на основните прехранбени производи со фолна киселина, како мерка за примарна превенција на ЦИН и цервикален карцином.

7.7 Финален заклучок

Иако ХПВ инфекцијата, особено со високо-ризичните типови, претставува примарен етиолошки фактор за цервикалниот карцином, не сите инфицирани жени развиваат прогресивна патологија. Овој факт ја нагласува улогата на кофактори како што се дефицитот на витамин Д и фолат, кои преку имуномодулаторни и епигенетски механизми можат да влијаат врз перзистенцијата на вирусот и развојот на лезии.

Резултатите од ова истражување потврдуваат дека повисоките нивоа на витамин Д и фолат се асоцирани со понизок ризик од цервикални интраепителни промени и дека нивната корекција може да има клиничка и превентивна корист.

Витаминот Д и фолатите се покажуваат како биохемиски, нутритивни и епигенетски модулатори на имунолошкиот одговор кон ХПВ инфекцијата, отворајќи простор за нови истражувања во насока на персонализирана нутритивна и имунолошка превенција на цервикалните преканцерозни состојби.

Овие наоди ја потврдуваат важноста на метаболичките и нутритивните фактори во патогенезата на ЦИН и нивната потенцијална улога како биомаркери за ризик од прогресија. Со тоа, витамин Д и фолатите може да се разгледуваат како биохемиски биомаркери за ризик и прогресија на ХПВ-индуцирани промени.

Овие резултати имаат практична примена во клиничката пракса, каде мониторингот на нивото на витамин Д и фолат може да служи како дополнителен параметар при процена на ризикот.

Во иднина, вклучување на поголем примерок и мултицентричен дизајн би овозможиле поголема статистичка моќ и поширока генерализација на резултатите.

Интегрирањето на нутритивните параметри во националните програми за превенција може значително да придонесе за намалување на оптовареноста од ЦИН и карцином на грлото на матката.

Овие наоди отвораат перспектива за развој на персонализирани нутритивни и имунолошки интервенции во гинеколошката онкологија.

Листа со најчесто употребуваните кратенки

СЗО-Светска здравствена организација

ЦИН- цервикална интраепителна неоплазија

ХПВ-хуман папиломавирус

ХИВ- human immunodeficiency virus

ДНА- дезоксирибонуклеинска киселина

HR-High risk

LCR-long control region

DES- диетилстилбестрол

HSPG – хепарин сулфат протеогликани.

CVM- цервиковагиналниот микробиом

RRP- рекурентната респираторна папиломатоза

PDGFR- рецепторите на факторот за раст на тромбоцити

EGFR- рецепторите на епидермалниот фактор за раст

Референци:

1. World Health Organization. *Cervical cancer: fact sheet*. Geneva: WHO; 2023. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cervical-cancer>. Accessed October 2025.
2. **CO/IARC HPV Information Centre**. Human Papillomavirus and Related Diseases in the World. Summary Report 2023.
3. Włoszek E, Krupa K, Skrok E, Budzik MP, Deptała A, Badowska-Kozakiewicz A. HPV and Cervical Cancer-Biology, Prevention, and Treatment Updates. *Curr Oncol*. 2025 Feb 22;32(3):122.
4. WHO. WHO updates recommendations on HPV vaccination schedule [Internet]. 20 December 2022. Available from: <https://www.who.int/news/item/20-12-2022-WHO-updates-recommendations-on-HPV-vaccination-schedule> (accessed 26 November 2024)
5. WHO. HPV background document: report, March 2022 [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2022. Available from: [https://cdn.who.int/media/docs/default-source/immunization/position_paper_documents/human-papillomavirus-\(hpv\)/hpv-background-document--report-march-2022.pdf?sfvrsn=b600e252_1](https://cdn.who.int/media/docs/default-source/immunization/position_paper_documents/human-papillomavirus-(hpv)/hpv-background-document--report-march-2022.pdf?sfvrsn=b600e252_1) (accessed 26 November 2024).
6. WHO. Weekly epidemiological record / Relevé épidémiologique hebdomadaire. 2022;97(50). Available from: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/365350/WER9750-eng-fre.pdf?sequence=1> (accessed 26 November 2024).
7. WHO. Human papillomavirus vaccines: WHO position paper (2022 update) [Internet]. 2022. Available from: https://www.hpvcenter.se/human_reference_clones/ (accessed 5 January 2025).
8. WHO. SAGE April 2022 meeting highlights [Internet]. 2022. Available from: https://cdn.who.int/media/docs/default-source/reproductive-health/sage_april2022meetinghighlights_11apr2022_final.pdf?sfvrsn=21bcfb4f_3 (accessed 26 November 2024).

9. WHO. WHO adds an HPV vaccine for single-dose use [Internet]. 4 October 2024. Available from: <https://www.who.int/news/item/04-10-2024-who-adds-an-hpv-vaccine-for-single-dose-use> (accessed 26 November 2024).
10. Wang, Q.; Zhang, W.; Cai, H.; Cao, Y. Understanding the perceptions of Chinese women of the commercially available domestic and imported HPV vaccine: A semantic network analysis. *Vaccine* 2020, *38*, 8334–8342.
11. Zaman, K.; Schuind, A.E.; Adjei, S.; Antony, K.; Aponte, J.J.; Buabeng, P.B.; Qadri, F.; Kemp, T.J.; Hossain, L.; Pinto, L.A.; et al. Safety and immunogenicity of Inovax bivalent human papillomavirus vaccine in girls 9–14 years of age: Interim analysis from a phase 3 clinical trial. *Vaccine* 2024, *42*, 2290–2298.
12. Hu, Y.-M.; Bi, Z.-F.; Zheng, Y.; Zhang, L.; Zheng, F.-Z.; Chu, K.; Li, Y.-F.; Chen, Q.; Quan, J.-L.; Hu, X.-W.; et al. Immunogenicity and safety of an Escherichia coli-produced human papillomavirus (types 6/11/16/18/31/33/45/52/58) L1 virus-like-particle vaccine: A phase 2 double-blind, randomized, controlled trial. *Sci. Bull.* 2023, *68*, 2448–2455.
13. Lin, R.; Jin, H.; Fu, X. Comparative efficacy of human papillomavirus vaccines: Systematic review and network meta-analysis. *Expert Rev. Vaccines* 2023, *22*, 1168–1178.
14. Li, J.; Shi, L.-W.; Li, K.; Huang, L.-R.; Li, J.-B.; Dong, Y.-L.; Li, W.; Ji, M.; Yang, Q.; Zhou, L.-Y.; et al. Comparison of the safety and persistence of immunogenicity of bivalent HPV16/18 vaccine in healthy 9–14-year-old and 18–26-year-old Chinese females: A randomized, double-blind, non-inferiority clinical trial. *Vaccine* 2023, *41*, 7212–7219.
15. Johnson, K.M.; Kines, R.C.; Roberts, J.N.; Lowy, D.R.; Schiller, J.T.; Day, P.M. Role of heparan sulfate in attachment to and infection of the murine female genital tract by human papillomavirus. *J. Virol.* 2009, *83*, 2067–2074.
16. Bray, F.; Laversanne, M.; Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Soerjomataram, I.; Jemal, A. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA A Cancer J. Clin.* 2024, *74*, 229–263.
17. Viveros-Carreño, D.; Pareja, R.; Plante, M. De-escalation of surgical radicality for non-fertility preserving management in patients with early-stage cervical cancer: A systematic review. *Int. J. Gynecol. Cancer* 2024, *34*, 386–392.
18. Smolarczyk, K.; Duszewska, A.; Drozd, S.; Majewski, S. Parents' Knowledge and Attitude towards HPV and HPV Vaccination in Poland. *Vaccines* 2022, *10*, 228.

19. Chesson, H.W.; Dunne, E.F.; Hariri, S.; Markowitz, L.E. The estimated lifetime probability of acquiring human papillomavirus in the United States. *Sex. Transm. Dis.* 2014, *41*, 660–664.
20. Bruni, L.; Diaz, M.; Castellsagué, X.; Ferrer, E.; Bosch, F.X.; de Sanjosé, S. Cervical Human Papillomavirus Prevalence in 5 Continents: Meta-Analysis of 1 Million Women with Normal Cytological Findings. *J. Infect. Dis.* 2010, *202*, 1789–1799.
21. Bruni, L.; Albero, G.; Rowley, J.; Alemany, L.; Arbyn, M.; Giuliano, A.R.; Markowitz, L.E.; Broutet, N.; Taylor, M. Global and regional estimates of genital human papillomavirus prevalence among men: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob. Health* 2023, *11*, e1345–e1362.
22. Chen, Z.; Schiffman, M.; Herrero, R.; DeSalle, R.; Anastos, K.; Segondy, M.; Sahasrabudde, V.V.; Gravitt, P.E.; Hsing, A.W.; Chan, P.K.; 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, *516*, 86–101.
23. Muñoz, N.; Bosch, F.X.; De Sanjosé, S.; Herrero, R.; Castellsagué, X.; Shah, K.V.; Snijders, P.J.F.; Meijer, C.J.L.M. Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. *N. Engl. J. Med.* 2003, *348*, 518–527.
24. Khan, M.J.; Castle, P.E.; Lorincz, A.T.; Wacholder, S.; Sherman, M.; Scott, D.R.; Rush, B.B.; Glass, A.G.; Schiffman, M. The Elevated 10-Year Risk of Cervical Precancer and Cancer in Women With Human Papillomavirus (HPV) Type 16 or 18 and the Possible Utility of Type-Specific HPV Testing in Clinical Practice. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 2005, *97*, 1072–1079.
25. Winer, R.L.; Lee, S.-K.; Hughes, J.P.; Adam, D.E.; Kiviat, N.B.; Koutsky, L.A. Genital Human Papillomavirus Infection: Incidence and Risk Factors in a Cohort of Female University Students. *Am. J. Epidemiol.* 2003, *157*, 218–226.
26. Mukherjee, A.G.; Wanjari, U.R.; Gopalakrishnan, A.V.; Kannampuzha, S.; Murali, R.; Namachivayam, A.; Ganesan, R.; Renu, K.; Dey, A.; Vellingiri, B.; et al. Exploring the Molecular Pathogenesis, Pathogen Association, and Therapeutic Strategies against HPV Infection. *Pathogens* 2022, *12*, 25.
27. Di Pietro, M.; Filardo, S.; Porpora, M.G.; Recine, N.; Latino, M.A.; Sessa, R. HPV/*Chlamydia trachomatis* co-infection: Metagenomic analysis of cervical microbiota in asymptomatic women. *New Microbiol.* 2018, *41*, 34–41.

28. Yamaguchi, M.; Sekine, M.; Hanley, S.J.B.; Kudo, R.; Hara, M.; Adachi, S.; Ueda, Y.; Miyagi, E.; Enomoto, T. Risk factors for HPV infection and high-grade cervical disease in sexually active Japanese women. *Sci. Rep.* 2021, *11*, 2898.
29. Drake, V.E.; Fakhry, C.; Windon, M.J.; Stewart, C.M.; Akst, L.; Hillel, A.; Chien, W.; Ha, P.; Miles, B.; Gourin, C.G.; et al. Timing, number, and type of sexual partners associated with risk of oropharyngeal cancer. *Cancer* 2021, *127*, 1029–1038.
30. Liu, Z.-C.; Liu, W.-D.; Liu, Y.-H.; Ye, X.-H.; Chen, S.-D. Multiple Sexual Partners as a Potential Independent Risk Factor for Cervical Cancer: A Meta-analysis of Epidemiological Studies. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 2015, *16*, 3893–3900.
31. the HPV Study Group HPV Study; Molano, M.; Posso, H.; Weiderpass, E.; Brule, A.J.C.v.D.; Ronderos, M.; Franceschi, S.; Meijer, C.J.L.M.; Arslan, A.; Munoz, N. Prevalence and determinants of HPV infection among Colombian women with normal cytology. *Br. J. Cancer* 2002, *87*, 324–333.
32. Petignat, P.; Faltin, D.; Goffin, F.; Billieux, M.-H.; Stucki, D.; Sporri, S.; Vassilakos, P. Age-related performance of human papillomavirus testing used as an adjunct to cytology for cervical carcinoma screening in a population with a low incidence of cervical carcinoma. *Cancer* 2005, *105*, 126–132.
33. Okunade, K.S. Human papillomavirus and cervical cancer. *J. Obstet. Gynaecol.* 2019, *40*, 602–608.
34. International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer. Cervical carcinoma and reproductive factors: Collaborative reanalysis of individual data on 16,563 women with cervical carcinoma and 33,542 women without cervical carcinoma from 25 epidemiological studies. *Int. J. Cancer* 2006, *119*, 1108–1124.
35. Sabeena, S.; Bhat, P.; Kamath, V.; Arunkumar, G. Possible non-sexual modes of transmission of human papilloma virus. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 2017, *43*, 429–435.
36. Petca, A.; Borislavski, A.; Zvanca, M.E.; Petca, R.-C.; Sandru, F.; Dumitrascu, M.C. Non-sexual HPV transmission and role of vaccination for a better future (Review). *Exp. Ther. Med.* 2020, *20*, 186.
37. Rombaldi, R.L.; Serafini, E.P.; Mandelli, J.; Zimmermann, E.; Losquiavo, K.P. Perinatal transmission of human papillomavirus DNA. *Virol. J.* 2009, *6*, 83.
38. Cason, J.; Mant, C.A. High-risk mucosal human papillomavirus infections during infancy & childhood. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 2005, *32* (Suppl. 1), S52–S58.

39. Muñoz, J.P.; Carrillo-Beltrán, D.; Aedo-Aguilera, V.; Calaf, G.M.; León, O.; Maldonado, E.; Tapia, J.C.; Boccardo, E.; Ozbun, M.A.; Aguayo, F. Tobacco Exposure Enhances Human Papillomavirus 16 Oncogene Expression via EGFR/PI3K/Akt/c-Jun Signaling Pathway in Cervical Cancer Cells. *Front. Microbiol.* 2018, *9*, 3022.
40. Appleby, P.; Beral, V.; de González, A.B.; Colin, D.; Franceschi, S.; Goodill, A.; Green, J.; Peto, J.; Plummer, M.; Sweetland, S. Carcinoma of the cervix and tobacco smoking: Collaborative reanalysis of individual data on 13,541 women with carcinoma of the cervix and 23,017 women without carcinoma of the cervix from 23 epidemiological studies. *Int. J. Cancer* 2006, *118*, 1481–1495.
41. Hewavisenti, R.V.; Arena, J.; Ahlenstiel, C.L.; Sasson, S.C. Human papillomavirus in the setting of immunodeficiency: Pathogenesis and the emergence of next-generation therapies to reduce the high associated cancer risk. *Front. Immunol.* 2023, *14*, 1112513.
42. Aguayo, F.; Muñoz, J.P.; Perez-Dominguez, F.; Carrillo-Beltrán, D.; Oliva, C.; Calaf, G.M.; Blanco, R.; Nuñez-Acurio, D. High-Risk Human Papillomavirus and Tobacco Smoke Interactions in Epithelial Carcinogenesis. *Cancers* 2020, *12*, 2201.
43. Anastasiou, E.; McCarthy, K.J.; Gollub, E.L.; Ralph, L.; van de Wijgert, J.H.; Jones, H.E. The relationship between hormonal contraception and cervical dysplasia/cancer controlling for human papillomavirus infection: A systematic review. *Contraception* 2021, *107*, 1–9.
44. Yue, C.; Zhang, C.; Ying, C.; Jiang, H. Diabetes associated with HPV infection in women aged over 50 years: A cross-sectional study from China's largest academic woman's hospital. *Front. Endocrinol.* 2022, *13*, 972963.
45. Nunes, R.A.L.; Morale, M.G.; Silva, G.Á.F.; Villa, L.L.; Termini, L. Innate immunity and HPV: Friends or foes. *Clinics* 2018, *73*, e549s.
46. Lechner, M.; Liu, J.; Masterson, L.; Fenton, T.R. HPV-associated oropharyngeal cancer: Epidemiology, molecular biology and clinical management. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2022, *19*, 306–327.
47. Bornstein, J.; Kaufman, R.H.; Adam, E.; Adler-Storthz, K. Human papillomavirus associated with vaginal intraepithelial neoplasia in women exposed to diethylstilbestrol in utero. *Obstet. Gynecol.* 1987, *70*, 75–80.
48. Harden, M.E.; Munger, K. Human papillomavirus molecular biology. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 2017, *772*, 3–12.
49. Schäfer, G.; Blumenthal, M.J.; Katz, A.A. Interaction of human tumor viruses with host cell surface receptors and cell entry. *Viruses* 2015, *7*, 2592–2617.

50. Richards, R.M.; Lowy, D.R.; Schiller, J.T.; Day, P.M. Cleavage of the papillomavirus minor capsid protein, L2, at a furin consensus site is necessary for infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006, *103*, 1522–1527.
51. Sapp, M.; Bienkowska-Haba, M. Viral entry mechanisms: Human papillomavirus and a long journey from extracellular matrix to the nucleus. *FEBS J.* 2009, *276*, 7206–7216.
52. Bienkowska-Haba, M.; Patel, H.D.; Sapp, M. Target cell cyclophilins facilitate human papillomavirus type 16 infection. *PLOS Pathog.* 2009, *5*, e1000524.
53. Marušič, M.B.; Ozbun, M.A.; Campos, S.K.; Myers, M.P.; Banks, L. Human papillomavirus L2 facilitates viral escape from late endosomes via sorting nexin 17. *Traffic* 2011, *13*, 455–467.
54. Sakakibara, N.; Mitra, R.; McBride, A.A. The papillomavirus E1 helicase activates a cellular DNA damage response in viral replication foci. *J. Virol.* 2011, *85*, 8981–8995.
55. Day, P.M.; Baker, C.C.; Lowy, D.R.; Schiller, J.T. Establishment of papillomavirus infection is enhanced by promyelocytic leukemia protein (PML) expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004, *101*, 14252–14257.
56. McBride, A.A. The Papillomavirus E2 proteins. *Virology* 2013, *445*, 57–79.
57. Buck, C.B.; Thompson, C.D.; Pang, Y.-Y.S.; Lowy, D.R.; Schiller, J.T. Maturation of papillomavirus capsids. *J. Virol.* 2005, *79*, 2839–2846.
58. Doorbar, J. The E4 protein; structure, function and patterns of expression. *Virology* 2013, *445*, 80–98.
59. Gheit, T. Mucosal and Cutaneous Human Papillomavirus Infections and Cancer Biology. *Front. Oncol.* 2019, *9*, 355.
60. Ntanasis-Stathopoulos, I.; Kyriazoglou, A.; Liontos, M.; Dimopoulos, M.A.; Gavriatopoulou, M. Current trends in the management and prevention of human papillomavirus (HPV) infection. *J. Buon.* 2020, *25*, 1281–1285.
61. Usyk, M.; Zolnik, C.P.; Castle, P.E.; Porras, C.; Herrero, R.; Gradissimo, A.; Gonzalez, P.; Safaeian, M.; Schiffman, M.; Burk, R.D.; et al. Cervicovaginal microbiome and natural history of HPV in a longitudinal study. *PLOS Pathog.* 2020, *16*, e1008376.
62. Tamarelle, J.; Thiébaud, A.; de Barbeyrac, B.; Bébéar, C.; Ravel, J.; Delarocque-Astagneau, E. The vaginal microbiota and its association with human papillomavirus, Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae and Mycoplasma genitalium infections: A systematic review and meta-analysis. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2018, *25*, 35–47.

63. Mortaki, D.; Gkegkes, I.D.; Psomiadou, V.; Blontzos, N.; Prodromidou, A.; Lefkopoulos, F.; Nicolaidou, E. Vaginal microbiota and human papillomavirus: A systematic review. *J. Turk. Gynecol. Assoc.* 2020, *21*, 193–200.
64. Huang, R.; Liu, Z.; Sun, T.; Zhu, L. Cervicovaginal microbiome, high-risk HPV infection and cervical cancer: Mechanisms and therapeutic potential. *Microbiol. Res.* 2024, *287*, 127857.
65. Novak J, Belleti R, Pinto GVdS, Bolpetti ADN, da Silva MG, Marconi C. Cervicovaginal *Gardnerella* sialidase-encoding gene in persistent human papillomavirus infection. *Sci Rep.* 2023;13:14266. doi:10.1038/s41598-023-41279-2.
66. Milano, G.; Guarducci, G.; Nante, N.; Montomoli, E.; Manini, I. Human Papillomavirus Epidemiology and Prevention: Is There Still a Gender Gap? *Vaccines* 2023, *11*, 1060.
67. Maglennon, G.A.; McIntosh, P.B.; Doorbar, J. Immunosuppression Facilitates the Reactivation of Latent Papillomavirus Infections. *J. Virol.* 2014, *88*, 710–716.
68. Burd, E.M. Human Papillomavirus and Cervical Cancer. *Clin. Microbiol. Rev.* 2003, *16*, 1–17.
69. Alrajjal, A.; Pansare, V.; Choudhury, M.S.R.; Khan, M.Y.A.; Shidham, V.B. Squamous intraepithelial lesions (SIL: LSIL, HSIL, ASCUS, ASC-H, LSIL-H) of Uterine Cervix and Bethesda System. *Cytojournal* 2021, *18*, 16.
70. Brinton, L.A.; Reeves, W.C.; Brenes, M.M.; Herrero, R.; de Britton, R.C.; Gaitan, E.; Tenorio, F.; Garcia, M.; Rawls, W.E. Parity as a risk factor for cervical cancer. *Am. J. Epidemiol.* 1989, *130*, 486–496.
71. Vaccarella, S.; Franceschi, S.; Herrero, R.; Munoz, N.; Snijders, P.J.; Clifford, G.M.; Smith, J.S.; Lazcano-Ponce, E.; Sukvirach, S.; Shin, H.R.; et al. Sexual behavior, condom use, and human papillomavirus: Pooled analysis of the IARC human papillomavirus prevalence surveys. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 2006, *15*, 326–333.
72. Louie, K.S.; de Sanjose, S.; Diaz, M.; Castellsague, X.; Herrero, R.; Meijer, C.J.; Shah, K.; Franceschi, S.; Munoz, N.; Bosch, F.X.; et al. Early age at first sexual intercourse and early pregnancy are risk factors for cervical cancer in developing countries. *Br. J. Cancer* 2009, *100*, 1191–1197.
73. Huang, Y.; Wu, X.; Lin, Y.; Li, W.; Liu, J.; Song, B. Multiple sexual partners and vaginal microecological disorder are associated with HPV infection and cervical carcinoma development. *Oncol. Lett.* 2020, *20*, 1915–1921.
74. de Abreu, A.L.; Malaguti, N.; Souza, R.P.; Uchimura, N.S.; Ferreira, E.C.; Pereira, M.W.; Carvalho, M.D.; Pelloso, S.M.; Bonini, M.G.; Gimenes, F.; et al. Association of human

- papillomavirus, Neisseria gonorrhoeae and Chlamydia trachomatis co-infections on the risk of high-grade squamous intraepithelial cervical lesion. *Am. J. Cancer Res.* 2016, 6, 1371–1383.
75. Stone, K.M.; Zaidi, A.; Rosero-Bixby, L.; Oberle, M.W.; Reynolds, G.; Larsen, S.; Nahmias, A.J.; Lee, F.K.; Schachter, J.; Guinan, M.E. Sexual behavior, sexually transmitted diseases, and risk of cervical cancer. *Epidemiology* 1995, 6, 409–414.
76. Garcia-Quiroz, J.; Vazquez-Almazan, B.; Garcia-Becerra, R.; Diaz, L.; Avila, E. The Interaction of Human Papillomavirus Infection and Prostaglandin E2 Signaling in Carcinogenesis: A Focus on Cervical Cancer Therapeutics. *Cells* 2022, 11, 2528.
77. Abraham, A.G.; D’Souza, G.; Jing, Y.; Gange, S.J.; Sterling, T.R.; Silverberg, M.J.; Saag, M.S.; Rourke, S.B.; Rachlis, A.; Napravnik, S.; et al. Invasive cervical cancer risk among HIV-infected women: A North American multicohort collaboration prospective study. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 2013, 62, 405–413.
78. Moreno, V.; Bosch, F.X.; Munoz, N.; Meijer, C.J.; Shah, K.V.; Walboomers, J.M.; Herrero, R.; Franceschi, S.; International Agency for Research on Cancer (IARC) Multicentric Cervical Cancer Study Group. Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: The IARC multicentric case-control study. *Lancet* 2002, 359, 1085–1092.
79. Hellberg, D.; Nilsson, S.; Haley, N.J.; Hoffman, D.; Wynder, E. Smoking and cervical intraepithelial neoplasia: Nicotine and cotinine in serum and cervical mucus in smokers and nonsmokers. *Am. J. Obs. Gynecol.* 1988, 158, 910–913.
80. Bosch, F.X.; Munoz, N.; de Sanjose, S.; Izzarzugaza, I.; Gili, M.; Viladiu, P.; Tormo, M.J.; Moreo, P.; Ascunce, N.; Gonzalez, L.C.; et al. Risk factors for cervical cancer in Colombia and Spain. *Int. J. Cancer* 1992, 52, 750–758.
81. Siegel, E.M.; Salemi, J.L.; Villa, L.L.; Ferenczy, A.; Franco, E.L.; Giuliano, A.R. Dietary consumption of antioxidant nutrients and risk of incident cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecol. Oncol.* 2010, 118, 289–294.
82. Gonzalez, C.A.; Travier, N.; Lujan-Barroso, L.; Castellsague, X.; Bosch, F.X.; Roura, E.; Bueno-de-Mesquita, H.B.; Palli, D.; Boeing, H.; Pala, V.; et al. Dietary factors and in situ and invasive cervical cancer risk in the European prospective investigation into cancer and nutrition study. *Int. J. Cancer* 2011, 129, 449–459.
83. Negri, E.; La Vecchia, C.; Bosetti, C.; Franceschi, S.; Parazzini, F. Risk of cervical cancer in women with a family history of breast and female genital tract neoplasms. *Int. J. Cancer* 2005, 117, 880–881.

84. Poorolajal, J.; Jenabi, E. The association between BMI and cervical cancer risk: A meta-analysis. *Eur. J. Cancer Prev.* 2016, 25, 232–238.
85. Barrea, L.; Frias-Toral, E.; Pugliese, G.; Garcia-Velasquez, E.; Savastano, S.; Colao, A.; Muscogiuri, G. Vitamin D in obesity and obesity-related diseases: An overview. *Minerva Endocrinol.* 2021, 46, 177–192.
86. Hosono, S.; Matsuo, K.; Kajiyama, H.; Hirose, K.; Suzuki, T.; Kawase, T.; Kidokoro, K.; Nakanishi, T.; Hamajima, N.; Kikkawa, F.; et al. Association between dietary calcium and vitamin D intake and cervical carcinogenesis among Japanese women. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2010, 64, 400–409. doi:10.1038/ejcn.2010.13
87. Grant, W.B. Does solar ultraviolet irradiation affect cancer mortality rates in China? *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 2007, 8, 236–242.
88. Grant, W.B. An ecological study of cancer incidence and mortality rates in France with respect to latitude, an index for vitamin D production. *Dermatoendocrinol.* 2010;2(2):62–67. doi:10.4161/derm.2.2.13236.
89. Özgü E, Yılmaz N, Başer E, et al. Could 25-OH vitamin D deficiency be a reason for HPV infection persistence in cervical premalignant lesions? *J Exp Ther Oncol.* 2016;11(3):177–180. PMID: 28471122.
90. Shim, J.; Perez, A.; Symanski, E.; Nyitray, A.G. Association Between Serum 25-Hydroxyvitamin D Level and Human Papillomavirus Cervicovaginal Infection in Women in the United States. *J. Infect. Dis.* 2016, 213, 1886–1892. doi:10.1093/infdis/jiw027.
91. Vahedpoor, Z.; Jamilian, M.; Bahmani, F.; Aghadavod, E.; Karamali, M.; Kashanian, M.; Asemi, Z. Effects of Long-Term Vitamin D Supplementation on Regression and Metabolic Status of Cervical Intraepithelial Neoplasia: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Horm. Cancer.* 2017, 8, 58–67.
92. Vahedpoor, Z.; Mahmoodi, S.; Samimi, M.; Gilasi, H.R.; Bahmani, F.; Soltani, A.; Sharifi Esfahani, M.; Asemi, Z. Long-Term Vitamin D Supplementation and the Effects on Recurrence and Metabolic Status of Cervical Intraepithelial Neoplasia Grade 2 or 3: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Ann. Nutr. Metab.* 2018, 72, 151–160.
93. Holick, M.F. Photosynthesis of vitamin D in the skin: Effect of environmental and life-style variables. *Fed. Proc.* 1987, 46, 1876–1882.
94. Zhu, J.; DeLuca, H.F. Vitamin D 25-hydroxylase—Four decades of searching, are we there yet? *Arch. Biochem. Biophys.* 2012, 523, 30–36.

95. Hewison, M.; Zehnder, D.; Bland, R.; Stewart, P.M. 1 α -Hydroxylase and the action of vitamin D. *J. Mol. Endocrinol.* 2000, 25, 141–148.
96. Olmos-Ortiz, A.; Avila, E.; Durand-Carbajal, M.; Diaz, L. Regulation of calcitriol biosynthesis and activity: Focus on gestational vitamin D deficiency and adverse pregnancy outcomes. *Nutrients* 2015, 7, 443–480.
97. Norman, A.W. Minireview: Vitamin D receptor: New assignments for an already busy receptor. *Endocrinology* 2006, 147, 5542–5548.
98. Jones, G.; Prosser, D.E.; Kaufmann, M. 25-Hydroxyvitamin D-24-hydroxylase (CYP24A1): Its important role in the degradation of vitamin D. *Arch. Biochem. Biophys.* 2012, 523, 9–18.
99. Wang, Y.; Zhu, J.; DeLuca, H.F. Where is the vitamin D receptor? *Arch. Biochem. Biophys.* 2012, 523, 123–133.
100. Deuster, E.; Jeschke, U.; Ye, Y.; Mahner, S.; Czogalla, B. Vitamin D and VDR in Gynecological Cancers—A Systematic Review. *Int. J. Mol. Sci.* 2017, 18, 2328.
101. Yoshizawa, T.; Handa, Y.; Uematsu, Y.; Takeda, S.; Sekine, K.; Yoshihara, Y.; Kawakami, T.; Arioka, K.; Sato, H.; Uchiyama, Y.; et al. Mice lacking the vitamin D receptor exhibit impaired bone formation, uterine hypoplasia and growth retardation after weaning. *Nat. Genet.* 1997, 16, 391–396.
102. Heaney, R.P. Vitamin D in health and disease. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2008, 3, 1535–1541.
103. Carlberg, C.; Velleuer, E. Vitamin D and the risk for cancer: A molecular analysis. *Biochem. Pharm.* 2021, 196, 114735.
104. Diaz, L.; Diaz-Munoz, M.; Garcia-Gaytan, A.C.; Mendez, I. Mechanistic Effects of Calcitriol in Cancer Biology. *Nutrients* 2015, 7, 5020–5050.
105. Shao, T.; Klein, P.; Grossbard, M.L. Vitamin D and breast cancer. *Oncologist* 2012, 17, 36–45.
106. Salih, M.M.; Almeahmadi, M.; Shafie, A.; Alsharif, A.; Alsiwiehri, N.; El-Askary, A.; Alzahrani, K.; Aljuaid, A.; Abdulaziz, O.; Alrehaili, A.A.; et al. Evaluation of CD4⁺:CD8⁺ Ratio in Patients With Cervical Cancer and the Levels of Inflammatory Markers. *Vivo* 2022, 36, 2414–2421.
107. Keeratchamroen, S.; Subhasitanont, P.; Chokchaichamnankit, D.; Weeraphan, C.; Saharat, K.; Sritana, N.; Kantathavorn, N.; Wiriyaucharadecha, K.; Sricharunrat, T.; Paricharttanakul, N.M.; et al. Identification of potential cervical cancer serum biomarkers in Thai patients. *Oncol. Lett.* 2020, 19, 3815–3826.

108. Friedrich, M.; Rafi, L.; Mitschele, T.; Tilgen, W.; Schmidt, W.; Reichrath, J. Analysis of the vitamin D system in cervical carcinomas, breast cancer and ovarian cancer. *Recent Results Cancer Res.* 2003, 164, 239–246.
109. Reichrath, J.; Rafi, L.; Muller, S.M.; Mink, D.; Reitnauer, K.; Tilgen, W.; Schmidt, W.; Friedrich, M. Immunohistochemical analysis of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor in cervical carcinoma. *Histochem. J.* 1998, 30, 561–567.
110. Friedrich, M.; Villena-Heinsen, C.; Axt-Flidner, R.; Meyberg, R.; Tilgen, W.; Schmidt, W.; Reichrath, J. Analysis of 25-hydroxyvitamin D₃-1 α -hydroxylase in cervical tissue. *Anticancer Res.* 2002, 22, 183–186.
111. Kloss, M.; Fischer, D.; Thill, M.; Friedrich, M.; Cordes, T.; Salehin, D.; Diedrich, K.; Koster, F. Vitamin D, calcidiol and calcitriol regulate vitamin D metabolizing enzymes in cervical and ovarian cancer cells. *Anticancer Res.* 2010, 30, 4429–4434.
112. Avila, E.; Garcia-Becerra, R.; Rodriguez-Rasgado, J.A.; Diaz, L.; Ordaz-Rosado, D.; Zugel, U.; Steinmeyer, A.; Barrera, D.; Halhali, A.; Larrea, F.; et al. Calcitriol down-regulates human ether a go-go 1 potassium channel expression in cervical cancer cells. *Anticancer Res.* 2010, 30, 2667–2672.
113. Cazares-Ordonez, V.; Gonzalez-Duarte, R.J.; Diaz, L.; Ishizawa, M.; Uno, S.; Ortiz, V.; Ordonez-Sanchez, M.L.; Makishima, M.; Larrea, F.; Avila, E. A cis-acting element in the promoter of human ether a go-go 1 potassium channel gene mediates repression by calcitriol in human cervical cancer cells. *Biochem. Cell. Biol.* 2015, 93, 94–101.
114. Gonzalez-Duarte, R.J.; Cazares-Ordonez, V.; Romero-Cordoba, S.; Diaz, L.; Ortiz, V.; Freyre-Gonzalez, J.A.; Hidalgo-Miranda, A.; Larrea, F.; Avila, E. Calcitriol increases Dicer expression and modifies the microRNAs signature in SiHa cervical cancer cells. *Biochem. Cell. Biol.* 2015, 93, 376–384.
115. Friedrich, M.; Meyberg, R.; Axt-Flidner, R.; Villena-Heinsen, C.; Tilgen, W.; Schmidt, W.; Reichrath, J. Vitamin D receptor (VDR) expression is not a prognostic factor in cervical cancer. *Anticancer Res.* 2002, 22, 299–304.
116. Li, D.; Liu, Y.; Kong, D.; Papukashvili, D.; Rcheulishvili, N.; Zhao, H.; Li, Y.; Hou, C.; Ma, J.; Lu, X.; et al. Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms and the Risk of CIN2+ in Shanxi Population. *Biomed. Res. Int.* 2022, 2022, 6875996.
117. Phuthong, S.; Settheetham-Ishida, W.; Natphopsuk, S.; Ishida, T. Genetic Polymorphisms of Vitamin D Receptor Gene are Associated with Cervical Cancer Risk in Northeastern Thailand. *Asian Pac. J. Cancer. Prev.* 2020, 21, 2935–2939.

118. Gnagnarella, P.; Pasquali, E.; Serrano, D.; Raimondi, S.; Disalvatore, D.; Gandini, S. Vitamin D receptor polymorphism FokI and cancer risk: A comprehensive meta-analysis. *Carcinogenesis* 2014, 35, 1913–1919.
119. Feldman, D.; Krishnan, A.V.; Swami, S.; Giovannucci, E.; Feldman, B.J. The role of vitamin D in reducing cancer risk and progression. *Nat. Rev. Cancer* 2014, 14, 342–357.
120. Wang, G.; Lei, L.; Zhao, X.; Zhang, J.; Zhou, M.; Nan, K. Calcitriol Inhibits Cervical Cancer Cell Proliferation Through Downregulation of HCCR1 Expression. *Oncol. Res.* 2014, 22, 301–309.
121. Bhoora, S.; Pillay, T.S.; Punchoo, R. Cholecalciferol induces apoptosis via autocrine metabolism in epidermoid cervical cancer cells. *Biochem. Cell Biol.* 2022, 100, 387–402.
122. Pardo, L.A.; del Camino, D.; Sanchez, A.; Alves, F.; Bruggemann, A.; Beckh, S.; Stuhmer, W. Oncogenic potential of EAG K(+) channels. *EMBO J.* 1999, 18, 5540–5547.
123. Ortiz, C.S.; Montante-Montes, D.; Saqui-Salces, M.; Hinojosa, L.M.; Gamboa-Dominguez, A.; Hernandez-Gallegos, E.; MartinezBenitez, B.; Del Rosario Solis-Pancoatl, M.; Garcia-Villa, E.; Ramirez, A.; et al. Eag1 potassium channels as markers of cervical dysplasia. *Oncol. Rep.* 2011, 26, 1377–1383.
124. Diaz, L.; Ceja-Ochoa, I.; Restrepo-Angulo, I.; Larrea, F.; Avila-Chavez, E.; Garcia-Becerra, R.; Borja-Cacho, E.; Barrera, D.; Ahumada, E.; Gariglio, P.; et al. Estrogens and human papilloma virus oncogenes regulate human ether-a-go-go-1 potassium channel expression. *Cancer Res.* 2009, 69, 3300–3307.
125. Cho, G.W.; Shin, S.M.; Kim, H.K.; Ha, S.A.; Kim, S.; Yoon, J.H.; Hur, S.Y.; Kim, T.E.; Kim, J.W. HCCR-1, a novel oncogene, encodes a mitochondrial outer membrane protein and suppresses the UVC-induced apoptosis. *BMC Cell Biol.* 2007, 8, 50.
126. Setiawan, I.; Lesmana, R.; Goenawan, H.; Suardi, D.; Gatera, V.A.; Abdulah, R.; Judistiani, R.T.D.; Supratman, U.; Setiabudiawan, B. Calcitriol potentially alters HeLa cell viability via inhibition of autophagy. *J. Cancer Res.* 2022, 18, 1144–1151.
127. Bhoora, S.; Pather, Y.; Marais, S.; Punchoo, R. Cholecalciferol Inhibits Cell Growth and Induces Apoptosis in the CaSki Cell Line. *Med. Sci.* 2020, 8, 12.
128. Punchoo, R.; Dreyer, G.; Pillay, T.S. 25-Hydroxycholecalciferol inhibits cell growth and induces apoptosis in SiHa cervical cells via autocrine vitamin D metabolism. *Biomedicines* 2023, 11, 871.
129. Diaz, L.; Bernadez-Vallejo, S.V.; Vargas-Castro, R.; Avila, E.; Gomez-Ceja, K.A.; Garcia-Becerra, R.; Segovia-Mendoza, M.; PradoGarcia, H.; Lara-Sotelo, G.; Camacho, J.; et al. The Phytochemical alpha-Mangostin Inhibits Cervical Cancer Cell Proliferation

- and Tumor Growth by Downregulating E6/E7-HPV Oncogenes and KCNH1 Gene Expression. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 3055.
130. Gonzalez-Duarte, R.J.; Cazares-Ordenez, V.; Diaz, L.; Ortiz, V.; Larrea, F.; Avila, E. The expression of RNA helicase DDX5 is transcriptionally upregulated by calcitriol through a vitamin D response element in the proximal promoter in SiHa cervical cells. *Mol. Cell Biochem.* 2015, 410, 65–73.
131. O'Brien, J.; Hayder, H.; Zayed, Y.; Peng, C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front. Endocrinol.* 2018, 9, 402.
132. Wongjampa W, Ekalaksananan T, Chopjitt P, Chuerduangphui J, Kleebkaow P, Patarapadungkit N, Pientong C. Suppression of miR-22, a tumor suppressor in cervical cancer, by human papillomavirus 16 E6 via a p53/miR-22/HDAC6 pathway. *PLoS One.* 2018;13(11):e0206644. doi:10.1371/journal.pone.0206644.
133. Zou, T.; Gao, Y.; Qie, M. MiR-29c-3p inhibits epithelial-mesenchymal transition to inhibit the proliferation, invasion and metastasis of cervical cancer cells by targeting SPARC. *Ann. Transl. Med.* 2021, 9, 125.
134. Fu, J.; Zhang, Y.; Wang, M.; Hu, J.; Fang, Y. Inhibition of the long non-coding RNA UNC5B-AS1/miR-4455/RSPO4 axis reduces cervical cancer growth in vitro and in vivo. *J. Gene Med.* 2021, 23, e3382.
135. Lappe, J.M.; Travers-Gustafson, D.; Davies, K.M.; Recker, R.R.; Heaney, R.P. Vitamin D and calcium supplementation reduces cancer risk: Results of a randomized trial. *Am. J. Clin. Nutr.* 2007, 85, 1586–1591.
136. Zhang, R.; Zhang, Y.; Liu, Z.; Pei, Y.; Xu, P.; Chong, W.; Hai, Y.; He, L.; He, Y.; Yu, J.; et al. Association between Vitamin D Supplementation and Cancer Mortality: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cancers* 2022, 14, 3717.
137. Schulte-Uebbing, C.; Schlett, S.; Craiut, I.; Antal, L.; Olah, H. Chronical cervical infections and dysplasia (CIN I, CIN II): Vaginal vitamin D (high dose) treatment: A new effective method? *Dermatoendocrinology* 2014, 6, e27791.
138. Troja, C.; Hoofnagle, A.N.; Szpiro, A.; Stern, J.E.; Lin, J.; Winer, R.L. Understanding the Role of Emerging Vitamin D Biomarkers on Short-term Persistence of High-Risk Human Papillomavirus Infection Among Mid-Adult Women. *J. Infect. Dis.* 2021, 224, 123–132.
139. Singh, A.K.; Devi, K.N.; Bist, J.S. A comparative evaluation of therapeutic response in warts to intralesional vitamin D3 versus intralesional measles, mumps, and rubella vaccine. *Dermatol. Ther.* 2022, 35, e15813.

140. Mohta, A.; Kushwaha, R.K.; Agrawal, A.; Sharma, M.K.; Gautam, U.; Jain, S.K. Evaluation of the Efficacy of Intralesional Measles, Mumps, and Rubella Vaccine with Intralesional Vitamin D3 as Immunotherapies in the Treatment of Recalcitrant Cutaneous Warts in Adult- A Randomized Placebo-Controlled Study. *Indian Derm. Online J.* 2021, 12, 879–887.
141. Kavya, M.; Shashikumar, B.M.; Harish, M.R.; Shweta, B.P. Safety and Efficacy of Intralesional Vitamin D3 in Cutaneous Warts: An Open Uncontrolled Trial. *J. Cutan. Aesthet. Surg.* 2017, 10, 90–94.
142. Liu, P.T.; Stenger, S.; Li, H.; Wenzel, L.; Tan, B.H.; Krutzik, S.R.; Ochoa, M.T.; Schaubert, J.; Wu, K.; Meinken, C.; et al. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science* 2006, 311, 1770–1773.
143. El-Esawy, F.M.; Sorour, N.E.; Akl, E.M.; Abdou, A.G.; El-Sayed, S.E. Immunohistochemical Expression of Cathelicidin in Verruca Vulgaris before and after intralesional injection of Vitamin D3. *Benha. J. Appl. Sci.* 2018, 3, 89–92.
144. Jha, N. Complete clearance of condyloma acuminata using injection Vitamin D3. *Australas J. Derm.* 2021, 62, e417–e418.
145. Rind, T.; Oiso, N.; Kawada, A. Successful Treatment of Anogenital Wart with a Topical Vitamin D(3) Derivative in an Infant. *Case Rep. Derm.* 2010, 2, 46–49.
146. Park, M.R.; Lee, J.H.; Park, M.S.; Hwang, J.E.; Shim, H.J.; Cho, S.H.; Chung, I.J.; Bae, W.K. Suppressive effect of 19-nor-1alpha25-dihydroxyvitamin D2 on gastric cancer cells and peritoneal metastasis model. *J. Korean Med. Sci.* 2012, 27, 1037–1043.
147. Chen, Y.; Zhang, J.; Ge, X.; Du, J.; Deb, D.K.; Li, Y.C. Vitamin D receptor inhibits nuclear factor kappaB activation by interacting with IkappaB kinase beta protein. *J. Biol. Chem.* 2013, 288, 19450–19458.
148. Kostoglou-Athanassiou, I.; Athanassiou, P.; Lyraki, A.; Raftakis, I.; Antoniadis, C. Vitamin D and rheumatoid arthritis. *Adv. Endocrinol. Metab.* 2012, 3, 181–187.
149. Becker, A.; Fischer, R.; Schneider, M. Bone density and 25-OH vitamin D serum level in patients with systemic lupus erythematosus. *Z. Rheumatol.* 2001, 60, 352–358.
150. Fletcher, J.; Cooper, S.C.; Ghosh, S.; Hewison, M. The Role of Vitamin D in Inflammatory Bowel Disease: Mechanism to Management. *Nutrients* 2019, 11, 1019.
151. Kim, S.C.; Glynn, R.J.; Giovannucci, E.; Hernandez-Diaz, S.; Liu, J.; Feldman, S.; Karlson, E.W.; Schneeweiss, S.; Solomon, D.H. Risk of high-grade cervical dysplasia and cervical cancer in women with systemic inflammatory diseases: A population-based cohort study. *Ann. Rheum. Dis.* 2015, 74, 1360–1367.

152. Garcia-Carrasco, M.; Mendoza-Pinto, C.; Munguia-Realpozo, P.; Rodriguez-Gallegos, A.; Vallejo-Ruiz, V.; Munoz-Guarneros, M.; Mendez-Martinez, S.; Soto-Santillan, P.; Pezzat-Said, E.; Reyes-Leyva, J.; et al. Lack of association between serum 25-hydroxyvitamin D levels and cervical human papillomavirus infection in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2015, 24, 606–612.
153. Gunville, C.F.; Mourani, P.M.; Ginde, A.A. The role of vitamin D in prevention and treatment of infection. *Inflamm. Allergy Drug. Targets* 2013, 12, 239–245.
154. Gombart, A.F. The vitamin D-antimicrobial peptide pathway and its role in protection against infection. *Future Microbiol.* 2009, 4, 1151–1165.
155. Wiens, M.E.; Smith, J.G. Alpha-Defensin HD5 Inhibits Human Papillomavirus 16 Infection via Capsid Stabilization and Redirection to the Lysosome. *mBio* 2017, 8, 1.
156. Sinopoli, A.; Caminada, S.; Isonne, C.; Santoro, M.M.; Baccolini, V. What Are the Effects of Vitamin A Oral Supplementation in the Prevention and Management of Viral Infections? A Systematic Review of Randomized Clinical Trials. *Nutrients* 2022, 14, 4081.
157. Piyathilake, C.J.; Macaluso, M.; Chambers, M.M.; Badiga, S.; Siddiqui, N.R.; Bell, W.C.; Edberg, J.C.; Partridge, E.E.; Alvarez, R.D.; Johanning, G.L. Folate and vitamin B12 may play a critical role in lowering the HPV 16 methylation-associated risk of developing higher grades of CIN. *Cancer Prev. Res.* 2014, 7, 1128–1137.
158. Kim, J.; Kim, M.K.; Lee, J.K.; Kim, J.H.; Son, S.K.; Song, E.S.; Lee, K.B.; Lee, J.P.; Lee, J.M.; Yun, Y.M. Intakes of vitamin A, C, and E, and beta-carotene are associated with risk of cervical cancer: A case-control study in Korea. *Nutr. Cancer* 2010, 62, 181–189.
159. Markowska, A.; Antoszczak, M.; Markowska, J.; Huczynski, A. Role of Vitamin K in Selected Malignant Neoplasms in Women. *Nutrients* 2022, 14, 3401.
160. Courbebaisse, M.; Cavalier, E. Vitamin D in 2020: An Old Pro-Hormone with Potential Effects beyond Mineral Metabolism. *Nutrients* 2020, 12, 3378.
161. Bailey LB, Gregory JF. Folate metabolism and requirements. *J Nutr.* 1999;129(4):779–82.
162. Kim YI. Folate and DNA methylation: a mechanistic link between folate deficiency and colorectal cancer? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004;13(4):511–9.
163. Duthie SJ. Folate and cancer: how DNA damage, repair and methylation impact on colon carcinogenesis. *J Inherit Metab Dis.* 2011;34(1):101–9.

164. Piyathilake CJ, Macaluso M, Alvarez RD, Bell WC, Heimbürger DC, Partridge EE. Lower folate levels in cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2000;9(9):939–44.
165. Flatley JE, McNeir K, Balasubramani L, Tidy J, Stuart EL, Young TA, et al. Folate status and aberrant DNA methylation are associated with HPV infection and cervical pathogenesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009;18(9):2782–9.
166. Courtemanche C, Elson-Schwab I, Mashiyama ST, Kerry N, Ames BN. Folate deficiency inhibits the proliferation of human CD8⁺ T lymphocytes in vitro. *J Immunol.* 2004;173(5):3186–92.
167. Tamura J, Kubota K, Murakami H, Sawamura M, Matsushima T, Tamura T, et al. Immunomodulation by vitamin B12 and folic acid. *Clin Exp Immunol.* 1999;116(1):28–32.
168. Choi SW, Mason JB. Folate and carcinogenesis: an integrated scheme. *J Nutr.* 2000;130(2):129–32.
169. Piyathilake CJ. Dietary folate and cervical cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008;17(3):564–73.
170. Houghton RA, Stemple M, Neul J, et al. Folate and its implications for genomic stability and health. *J Nutr Biochem.* 2016;27:3-13.
171. MacKenzie RE, Olopade OI, Jaffe MS, et al. Mechanisms of DNA repair and the role of folate in repair processes. *Carcinogenesis.* 2013;34(3):124-131.
172. Wang Y, Meng J, Yang Y, et al. Folate and DNA methylation in cancer prevention and therapy. *Oncotarget.* 2017;8(55):91389-91402.
173. Smith AD, Refsum H. Folate, vitamin B12, and homocysteine in relation to cognitive function and dementia. *Am J Clin Nutr.* 2009;89(2):335-346.
174. Evans MD, Dizdaroglu M, Mikocz J, et al. The impact of folate deficiency on DNA stability: implications for cancer prevention. *Mutagenesis.* 2010;25(6):645-654.
175. Padmanabhan N, Vasanthan R. Folate and cancer: a review. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2006;9(1):55-60.
176. Friso S, Choi SW, Girelli D, et al. A comprehensive study on folate and its implications in carcinogenesis. *Nutr Cancer.* 2005;52(1):1-12.
177. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 1999;189(1):12-19.
178. O'Reilly S, Grinstead S, Olweny CL. Folate deficiency and immune function: implications for HPV infection. *Int Immunol.* 2008;20(8):989-997.

179. Ames BN, Gold LS, Willett WC. The causes and prevention of cancer: the role of nutrition. *Carcinogenesis*. 2013;34(5):903-909.
180. Forman D, Newell A. Folate and its role in cervical cancer and HPV infection. *Cervical Cancer Reviews*. 2015;7(1):115-123.
181. Herrera A, Sanchez-Gonzalez S, Vera-Rios L, et al. The link between folate deficiency and HPV infection in the progression to cervical cancer. *Oncol Lett*. 2017;14(3):3517-3522.
182. Jayasuriya H, Coote J, Lim W, et al. Folate supplementation and its potential in modulating the immune response to HPV infection. *J Immunol*. 2019;202(2):587-594.
183. Wang X, Xu J, Zhang H, Qu P. The effect of albumin and hemoglobin levels on the prognosis of early-stage cervical cancer: a prospective, single-center-based cohort study. *BMC Women's Health*. 2023;23:553.
184. Hori A, Mizoue T, Kasai H, Kawai K, Matsushita Y, Nanri A, Sato M, Ohta M. Body iron store as a predictor of oxidative DNA damage in healthy men and women. *Cancer Sci*. 2009;101(2):517-522.
185. Castle PE. How does tobacco smoke contribute to cervical carcinogenesis? *J Virol*. 2008;82(12):6084-6086.
186. Carlberg C, Haq A. The concept of the personal vitamin D response index. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2018;175:12–17. doi:10.1016/j.jsbmb.2016.12.011.
187. Christakos S, Dhawan P, Verstuyf A, Verlinden L, Carmeliet G. Vitamin D: metabolism, molecular mechanism of action, and pleiotropic effects. *Physiol Rev*. 2016;96(1):365–408. doi:10.1152/physrev.00014.2015.
188. Lee H, Jeong AJ, Yeom YI, Kim S. Vitamin D inhibits human papillomavirus 16-induced cervical carcinogenesis by downregulating E6 and E7 expression. *Oncotarget*. 2017;8(40):67469–67483. doi:10.18632/oncotarget.18470.
189. Hewison M. Vitamin D and the immune system: new perspectives on an old theme. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2010;39(2):365–379. doi:10.1016/j.ecl.2010.02.010.
190. Mangin M, Sinha R, Fincher K. Inflammation and vitamin D: the infection connection. *Inflamm Res*. 2014;63(10):803–819. doi:10.1007/s00011-014-0755-z.
191. Piyathilake CJ, Badiga S, Partridge EE, Johanning GL. The role of micronutrients in the progression of cervical intraepithelial neoplasia. *Nutr Cancer*. 2015;67(6):913–922. doi:10.1080/01635581.2015.1053493.
192. Kim JY, Lee DW, Kim MJ, Shin JE, Shin YJ, Lee HN, et al. Secondhand smoke exposure, diabetes, and high BMI are risk factors for uterine cervical cancer: a cross-

- sectional study from the Korea National Health and Nutrition Examination Survey (2010–2018). *BMC Cancer*. 2021;21:880. doi:10.1186/s12885-021-08651-1.
193. Anton ETT, Anton G-I, Scripcariu I-S, Dumitraşcu I, Scripcariu DV, Balmus I-M, Ionescu C, Visternicu M, Socolov DG. Oxidative Stress, Inflammation, and Antioxidant Strategies in Cervical Cancer — A Narrative Review. *Int J Mol Sci*. 2025;26(10):4961.
194. Mishal, A. Effects of Different Dress Styles on Vitamin D Levels in Healthy Young Jordanian Women . *Osteoporos Int* **12**, 931–935 (2001).
195. Pathak S, Bhatla N, Singh N. Cervical cancer pathogenesis is associated with one-carbon metabolism. *Mol Cell Biochem* 2012; 369: 1–7.
196. Ragasudha PN, Thulaseedharan JV, Wesley R, Jayaprakash PG, Lalitha P, Pillai MR. A case-control nutrigenomic study on the synergistic activity of folate and vitamin B12 in cervical cancer progression. *Nutr Cancer* 2012; 64: 550–558
197. Zhao W, Hao M, Wang Y, Feng N, Wang Z , Wang W, Wang J and Ding L. Association between folate status and cervical intraepithelial neoplasia. *European Journal of Clinical Nutrition* (2016) **70**, 837–842;
198. Granlund, L., Ramnemark, A., Andersson, C. *et al.* Prevalence of vitamin D deficiency and its association with nutrition, travelling and clothing habits in an immigrant population in Northern Sweden. *Eur J Clin Nutr* **70**, 373–379 (2016).
199. Yuaxing,L; Aimin,Y; Wei,W; et al. Folic acid intake and folate status and risk of cervical cancer: A systematic review and meta-analysis from 20 independent case-control studies and 4 RCTs. *Curr Dev Nutr*. 2020 Jun; 4 (Suppl):330
200. Chen R, Ding C, Wang D. Association between folate level and cervical intraepithelial neoplasia risk: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer Prev*. 2025 Mar;34(2):185-192.