

Usporedba citološkog i patohistološkog nalaza u bolesnica s displazijom vrata maternice

Ljubičić, Lana

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:979900>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-08**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Lana Ljubičić

**Usporedba citološkog i patohistološkog nalaza
bolesnica s displazijom vrata maternice**

Diplomski rad



Zagreb, 2019.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Klinici za ženske bolesti i porode – KBC Zagreb, a mentorirao ga je doc. dr. sc. Joško Lešin i predan je na ocjenu u 2019. godini.

SADRŽAJ

SAŽETAK

SUMMARY

1. CERVICALNA INTRAEPITELNA NEOPLAZIJA (CIN)
 - 1.1 TERMINOLOGIJA I POVIJESNI PRIKAZ
 - 1.2 EPIDEMIOLOGIJA
 - 1.3 RIZIČNI ČIMBENICI
 - 1.4 PAPILOMA VIRUSI ČOVJEKA
 - 1.4.1 POVIJEST
 - 1.4.2 KLASIFIKACIJA PAPILOMAVIRUSA
 - 1.4.3 GENOM PAPILOMAVIRUSA
 - 1.4.4 ŽIVOTNI CIKLUS PAPILOMAVIRUSA
 - 1.4.5 IMUNOSNI ODGOVOR NA INFEKCIJU HUMANIM PAPILOMAVIRUSOM
 - 1.4.6 UTJECAJ VIRUSNIH ONKOPROTEINA E6 I E7
 - 1.5 DIJAGNOSTIKA CIN-A
 - 1.5.1 CITOLOŠKA SLIKA PAPA-TESTA
 - 1.5.2 PATOHISTOLOŠKO STUPNJEVANJE CIN-A
 - 1.5.3 KOLPOSKOPIJA
 - 1.6 LIJEČENJE CIN-A
2. ISTRAŽIVANJE
 - 2.1 CILJ
 - 2.2 MATERIJALI I METODE
 - 2.3 REZULTATI
 - 2.4 RASPRAVA
 - 2.5 ZAKLJUČAK
3. ZAHVALE
4. LITERATURA
5. ŽIVOTOPIS

SAŽETAK

Citološki probir ranog otkrivanja raka vrata maternice i intraepitelnih promjena značajno je smanjio morbiditet i mortalitet od ove bolesti zadnjih 50-ak godina širom svijeta, a naročito u razvijenim zemljama koje već desetljećima provode sustavni nacionalni probir i imaju dostupne nacionalne baze podataka prethodnih citoloških, kolposkopskih, mikrobioloških i patohistoloških nalaza. Najvažniji cilj probira je otkrivanje rizične populacije prije nastanka invazivne bolesti kako bi liječenje bilo što manje invazivno. To je posebno važno zbog činjenice da često obolijevaju žene reproduktivne dobi koje još planiraju trudnoću. Boljim razumijevanjem karcinogeneze i uloge infekcije humanim papiloma virusom visokog rizika (hrHPV) razvijeni su komercijalni testovi za otkrivanje ove infekcije i prije razvoja epitelnih promjena. Hrvatski nacionalni program ranog citološkog otkrivanja raka vrata maternice i intraepitelnih promjena pokrenut je 2012. godine, ali se zbog određenih nedostataka trenutno revidira. Trenutni prijedlog pilot programa predviđa citološki probir žena dobne skupine 20-29 godina, kotestiranje citologijom i hrHPV testom žena 30-34 godine te primarno hrHPV testiranje žena 35-65 godine života.

Cilj ovog rada je doprinijeti izboru najbolje opcije za rani probir raka vrata maternice u Hrvatskoj, kao i preinvazivnih promjena.

Materijali i metode: U ovom retrospektivnom istraživanju analizirali smo dostupne podatke iz bolničkog informatičkog sustava (BIS) za žene kojima je tijekom 2017. godine, u našem patohistološkom laboratoriju, rađena analiza promjena vrata maternice. Izdvojeno je 128 žena s patohistološkom dijagnozom HSIL i dostupnim prethodnim nalazima citologije i hrHPV testiranja.

Rezultati: Prosječna dob žena bila je 44.7 godina s rasponom od 21 do 77 godina. Za 76 bolesnica s dijagnozom HSIL na konusu prosječna dob je bila 39.7, a za skupinu od 8 bolesnica s mikroinvazivnim i invazivnim karcinomom prosječna dob bila je 44 godine. Kod 76 bolesnica s PHD nalazom HSIL na konusu, PAPA nalazi prije konizacije su bili HSIL/ASC-H 87% (66/76), CIS/CIN 7.8% (6/76), Ca planocelulare rana invazija 1.3% (1/76), AGC-NOS 1.3 (1/76). U dva slučaja PAPA nalaz je bio LSIL – 2.6%. Nije bilo citološki negativnih nalaza u obje skupine (LSIL i HSIL). Kod 13 bolesnica s planocelularnim karcinomom cerviksa, FIGO I A1 i FIGO I A2 i s adenokarcinomom, PAPA test prije zahvata je ukazivao na visoki stupanj preinvazivnih, i sumnje na invazivni zloćudni tumor vrata maternice. Kod 19% bolesnica kod kojih je konačni PHD nalaz bio HSIL, prethodna biopsija je bila negativna. Analizirajući hrHPV nalaze, oni su bili pozitivni u 80% bolesnica s HSIL na konusu. Analizom konusa prema tipu operacije vidljivo je da je neadekvatan nakon LETZ konizacije bio kod 62% bolesnica, a kod konizacije nožem u 29% bolesnica.

Zaključak: Citologija je prepoznata kao dobra metoda probira raka vrata maternice, posebno

u Hrvatskoj gdje je ta grana medicine vrlo razvijena. Prikazani rezultati potvrđuju pouzdanost i dijagnostičku točnost ove metode naročito kod HSIL promjena vrata maternice. Prije prijelaza na primarni hrHPV probir, trebalo bi napraviti dobro definiranu pilot studiju koja uključuje kotestiranje, i razmotriti koja metoda hrHPV tipizacije bi se uključila u primarni probir jer različite metode u različitim sredinama nemaju iste rezultate. HrHPV negativni slučajevi HSIL-a opisani su u brojnim radovima u literaturi, a najčešće se objašnjavaju kao: neadekvatno uzet uzorak za tipizaciju, malen broj čestica virusa u uzorku, onečišćenje uzorka tvarima koje ometaju analizu, kao i malom broju zaista hrHPV negativnih slučajeva.

SUMMARY

Comparison of cytological and histopathological findings in patients with cervical dysplasia

The early screening for cervical cancer and intraepithelial changes significantly reduced the morbidity and mortality of this disease in the last 50 years, especially in developed countries that have implemented systematic national screening and have available national databases of previous cytological, colposcopic, microbiological and pathohistological findings. The most important aim of the screening is to determine the risk population prior to the onset of invasive disease in order, to make the treatment less invasive. This is especially important due to the fact that the most common patients are women of childbearing potential. Better understanding of carcinogenesis and the role of high-risk Human papillomavirus (hrHPV) infection has developed tests to detect this infection before the development of epithelial lesions. The first organised national cytology screening program for detecting cervical cancer and intraepithelial lesions in Croatia was initiated in 2012, but due to the certain shortcomings, it is currently under revision. The working proposal of the program is to screen women aged 20-29 by cytology alone, the cytology and high-risk HPV test for women age group 30-34, and primarily high-risk HPV testing for women 35-65 years old.

The aim of this study is to help to choose the best option for early screening of cervical cancer, and preinvasive lesions in Croatia.

Sample and methods: In this retrospective study, we have analyzed available information from the Hospital Information System (BIS) for women who, during the year 2017, underwent our analysis of cervical changes. 128 women with histopathological diagnosis of HSIL and available previous cytology and hrHPV testing were selected.

Results: The average age of women was 44.7 years, ranging from 21 to 77 years. For 76 patients with HSIL diagnosis, the average age was 39.7, and for the group of 8 patients with microinvasive and invasive cancer the average age was 44 years. In 76 patients HSIL on the PHD was found, and the PAPA-test findings prior to the conisation were HSIL/ASC-H 87% (66/76), CIS/CIN 7.8% (6/76), early invasion of planocellular carcinoma 1.3% (1/76), AGC-NOS 1.3 (1/76). In two cases PAPA was found to be LSIL - 2.6%. There were no cytological negative findings in either of these two groups (LSIL and HSIL). In 13 patients with planocellular carcinoma of the cervix, FIGO I A1 and FIGO I A2 and with adenocarcinoma, the PAPA test prior to the procedure indicated a high degree of preinvasive and suspected invasive malignant tumor of the cervix. In 19% of patients with final PHD findings of HSIL, the previous biopsy was negative. Detecting high-risk HPV was positive in 80% of patients with

HSIL at the cone. The analysis of the cones showed that the sample was inadequately taken after LETZ-conization in 62% of the patients, and in the conization with a knife in 29%.

Conclusion: Cytologic evaluation has been recognized as a good method for cervical cancer screening, especially in Croatia where this branch of medicine is very developed. The results presented confirm the reliability and diagnostic accuracy of this method, especially in HSIL cervical occlusion. Prior to the transition to the primary hrHPV screening, a well-defined pilot study should be conducted because different methods in different environments do not have the same results. hrHPV negative cases of HSIL have been described in many papers, and most often explained as: inadequate sampling, small number of virus particles in the sample, or sample contamination by substances that interfere with the analysis.

1. CERVICALNA INTRAEPITELNA NEOPLAZIJA (CIN)

1.1 TERMINOLOGIJA I POVIJESNI PRIKAZ

Tijekom posljednjih 50 godina brojnim se istraživanjima došlo do ključnih spoznaja u razumijevanju etiologije i patogeneze preinvazivnih promjena vrata maternice. O postojanju neinvazivnih promjena epitela uz invazivni karcinom pločastih stanica vrata maternice poznato je još od davne 1886. godine. Karcinom in situ je stanje u kojemu zloćudne epitelne stanice nisu migrirale ispod granice epitela i vezivnoga tkiva, ili ispod tzv. bazalne membrane“. Uvidjelo se da mnoge žene imaju stanične abnormalnosti, ali citološki i histološki slabije od onih koje su opisivane kao CIS. Za promjene s blažim atipijama Reagan i suradnici uveli su 1956. godine naziv displazija. Ovisno o debljini promjenom zahvaćenog epitela, displazija je podijeljena u tri kategorije: laku, srednje tešku i tešku. Laka je displazija podrazumijevala promjene kod kojih je donja trećina epitela zamijenjena nezrelim, nediferenciranim stanicama s često vidljivim mitozama. Srednje teška displazija odnosila se na lezije u kojima je promjena zahvaćala dvije trećine epitela, dok je u teškoj displaziji promjena zahvaćala čitavu debljinu epitela. Brojne studije kasnih šezdesetih godina prošloga stoljeća pokazivale su da svi stadiji premalignih promjena planocelularnog karcinoma vrata maternice označuju proces razvoja iste bolesti. Na osnovi tih bioloških studija Richart i Barron uveli su naziv cervikalna intraepitelna neoplazija (engl. Cervical intraepithelial neoplasia – CIN). Prema CIN nazivlju preinvazivne se promjene vrata maternice dijele u tri grupe. CIN 1 odgovara promjenama prije označenima kao laka displazija, CIN 2 se poklapa sa srednje teškom displazijom, a CIN 3 obuhvaća tešku displaziju i CIS. Novijim spoznajama o etiologiji preinvazivnih i invazivnih promjena vrata maternice u smislu infekcije humanim papiloma virusom (HPV) uvidjelo se da CIN nazivlje ne obuhvaća sve oblike promjena, jer nije riječ samo o jednoj bolesti raznih stadija, već o dvama različitim biološkim entitetima. Jedan je produktivna virusna infekcija, a drugi pravi neoplastički proces ograničen na epitel. Promjene ranije opisivane kao koilocitna atipija, koilocitoza, ravni kondilom, laka displazija ili CIN 1, zapravo označuju sliku produktivne virusne infekcije, koju karakteriziraju perinuklearna vakuolizacija i periferno pomicanje zgusnute citoplazme, tj. stanice nazvane koilocitima. Odlika takvih promjena jest velika mogućnost spontane regresije i nestanka. Promjene karakterizirane kao srednje teška i teška displazija, te CIS, odnosno CIN 2 i CIN 3 uglavnom su povezane s infekcijom visokorizičnim tipovima HPV-a čija je DNK, gotovo u pravilu, ugrađena u genom zaražene stanice, tako da te promjene imaju znatno veći potencijal maligne progresije. Zbog ovih novih spoznaja, ponovo je predložena promjena nazivlja u skladu s citološkom Bethesda klasifikacijom. Po Bethesda sustavu, koilocitna atipija i CIN 1 tvore skupinu – pločasta intraepitelna promjena niskog stupnja (engl. Low-

grade squamous intraepithelial lesion) -LSIL. CIN 2 i 3 ujedinjeni su u drugu skupinu – pločasta intraepitelna promjena visokog stupnja (engl. High-grade squamous intraepithelial lesion) – HSIL.

1.2 EPIDEMIOLOGIJA

CIN je uglavnom bolest žena generativne dobi, a pojavnost se razlikuje među pojedinim zemljama. Na rezultate različite učestalosti utječu ekonomska razvijenost zemalja i o tome ovisna masovnost citološkog probira, različite spolne navike, kao i utjecaj religije na način života. Q-Probes je studija Američkoga društva patologa koja je obradila 16132 uzorka dobivena iz 306 citoloških laboratorija iz čitavih Sjedinjenih Američkih Država. Rezultati su pokazali da 1.97% svih PAPA testova čine LSIL, a 0.5% HSIL dijagnoze. Posljednjih se godina diljem svijeta bilježi porast učestalosti CIN-a. Učestalost napose raste među adolescenticama i ženama do 30. godine, pa u nekim studijama iznosi i do 18.8 na 1000 žena, a sve se češće bilježi pojava CIN-a u sve mlađoj dobi. Dok se u pedesetim godinama prošlog stoljeća CIN najviše pojavljivao između 35. i 40. godine života, danas se HSIL može naći i u osoba mlađih od 15 godina, a CIN 3 najčešće se pojavljuje u dobi od 25. do 29. godine života. I u Hrvatskoj postoji porast učestalosti preinvazivnih promjena vrata maternice među mladim ženama. Najveća se učestalost CIS-a bilježi u dobi od 30. do 34. godine.

1.3 RIZIČNI ČIMBENICI

Epidemiološke su studije upozorile na brojne moguće čimbenike rizika za nastanak i cervikalnog karcinoma i njegovih preinvazivnih promjena. Žene koje su prvi spolni odnos imale u dobi mlađoj od 20 godina imaju relativni rizik od nastanka CIS-a 2.55 puta veći od onih koje su kasnije započele spolnu aktivnost. Pretpostavlja se da je proces metaplazije razlog povećanog rizika u adolescentica, jer su vjerojatno njihove rezervne stanice posebno podložne utjecaju onkogenih čimbenika. Žene koje su imale spolne odnose s tri do pet partnera imaju osam puta veći rizik nastanka CIS-a u usporedbi sa ženama s jednim vjernim spolnim partnerom. Niski socioekonomski status neovisni je čimbenik rizika za nastanak karcinoma vrata maternice. U žena s bilo kojim oblikom imunosupresije, CIN je češći. Uporaba oralnih kontraceptiva više od 5 godina dva do četiri puta povisuje rizik od nastanka karcinoma vrata maternice. Sigurno je da žene koje se kontinuirano koriste kondomima kao kontracepcijskim sredstvom imaju niži rizik nastanka karcinoma vrata maternice. Također je dokazana pozitivna korelacija između pušenja cigareta i nastanka karcinoma vrata maternice, i to ovisno o dozi. Utjecaj pušenja objašnjava se mutagenim djelovanjem nikotina

i kotinina koji su nađeni u cervikalnoj sluzi žena pušačica cigareta, a nađen je i smanjen broj Langerhansovih stanica, što se može odraziti na efikasnost lokalne imunosti na HPV. Do sada su sve epidemiološke studije upozorile na to da postoji uzročno-posljedična veza između infekcije određenim tipovima HPV-a dobivene spolnim putem i nastanka karcinoma vrata maternice, odnosno promjena koje mu prethode (CIN-a). Infekcija HPV-om tipa visokog onkogenog rizika snažan je neovisni rizični čimbenik za nastanak planocelularnog karcinoma vrata maternice. (1)

1.4 PAPILOMA VIRUSI ČOVJEKA (HP)

1.4.1 Povijest

Poznato je još od antičkih vremena da se genitalne bradavice (condyloma acuminata) mogu prenijeti spolnim putem. Činjenica da je karcinom vrata maternice češći u promiskuitetnih osoba, osnova je hipoteze postavljene 1842. godine, o virusnoj etiologiji ovog raka. Prošlo je više od jednog stoljeća da bi hipoteza o ulozi papilomavirusa čovjeka u nastanku raka vrata maternice postala ponovo zanimljiva.(2) Uporaba metoda molekularne biologije omogućila je razumijevanje odnosa između HPV-a i karcinoma vrata maternice. Zur Hausen i suradnici prvi su izolirali nove tipove HPV-a iz anogenitalne regije. Iz genitalnih bradavica izoliran je HPV 6 (3), HPV 11 je izoliran iz papiloma grkljana 1982. godine, a HPV 16 i HPV 18 izolirani su iz karcinoma vrata maternice. Prvi opisani slijed nukleotida cijelog genoma bio je slijed goveđeg papilomavirusa tip 1 (engl. Bovine papillomavirus – BVP 1)(4). Više od 85 različitih genotipova papiloma virusa do danas je klonirano i sekvencionirano, a više od 120 novih tipova je djelomično sekvencionirano. 1985. godine započela su istraživanja bioloških funkcija, posebno načina specifičnog prepisivanja i ugrađivanja genoma HPV-a u stanice karcinoma vrata maternice.(5) Ključnu ulogu u nastanku zloćudne preobrazbe imaju rani geni E6 i E7 HPV-a što je otkriveno kasnih osamdesetih godina prošlog stoljeća. Dokazano je da produkt gena E7 tipova visokog rizika HPV veže i inaktivira produkt tumor supresorskog gena Rb. Produkt gena E6 veže produkt tumor supresorskog gena p53 čime p53 može biti inaktiviran ili čak razgrađen.(6) U prilog ovome govore i epidemiološka istraživanja koja ukazuju na činjenicu da je zaraza papilomavirusom čovjeka glavni čimbenik nastanka i razvoja raka vrata maternice te se može reći kako ne postoji karcinom vrata maternice negativan na HPV. Ako je nalaz negativan, uzrok može biti jedan od sljedećih čimbenika: 1. Pogrešno uzimanje uzroka, 2. osjetljivost metode detekcije, 3. postojanje još netipiziranih HPV-a, 4. delecija i rearanžiranja genoma HPV-a ili 5. prekid genoma HPV-a tijekom ugradnje u kromosom domaćina.(7)

1.4.2 Klasifikacija papilomavirusa čovjeka

Papilomavirusi nalaze se u obitelji Papovaviridae, podobitelji Papillomaviridae. Građeni su od dvolančane kružne DNA veličine oko 8 000 pb (parova baza); virion je bez ovojnice, promjera 55 do 60 nm(8) s ikozaedarnom kapsidom koja se sastoji od 72 kapsomere. Papiloma virusi su vrsno specifični, tj. svaki papiloma virus je patogen za određenu vrstu domaćina, a ime i dobivaju prema svom domaćinu; npr. papilomavirus čovjeka - HPV (engl. human papillomavirus), goveđi papilomavirus - BPV (engl. bovine papillomavirus) itd. Za razliku od većine drugih virusa u kojih proteini kapside imaju različitu antigenu strukturu, kod svih papiloma virusa životinja i ljudi proteini kapside imaju konzervirani slijed aminokiselina. Stoga protutijela na npr. proteine kapside BPV križno reagiraju s papilomavirusima čovjeka.(9) To je razlog što se specifični tipovi HPV ne mogu identificirati serološkim metodama (serotipovi), već sekvencioniranjem DNA (genotipovi). Tipovi HPV-a označavaju se brojevima, prema vremenskom slijedu njihovih otkrića. Budući da danas postoji mogućnost sekvencioniranja genomske DNA, nova definicija genotipova temelji se na homologiji slijeda nukleotida. Različitim tipovima smatraju se izolati koji dijele manje od 90% nukleotida u konzerviranim regijama genoma, L1, E6 i E7.(10) Izolirane su i varijante specifičnih tipova odnosno subtipovi. Da bi se neki virus smatrao subtipom, mora imati više od 90% homologije s originalnim tipom. Različiti podtipovi mogu imati drugačije biološke značajke. Tako je otkriveno da neki podtipovi HPV-16 imaju izraženiju sposobnost zloćudne preobrazbe od drugih.(11)

Osim što su vrsno specifični, ovi virusi imaju specifičan tropizam za epitelne stanice (koža i sluznice). Na tim mjestima izazivaju proliferaciju epitela.(12) Te dobroćudne proliferacije epitela ili papilomi u određenim uvjetima imaju sposobnost zloćudne preobrazbe. Papilomavirusi čovjeka zaražavaju epitel spojnice oka, usne šupljine, grkljana, dušnika, jednjaka, mokraćnog mjehura, analnog otvora i genitalne regije oba spola.

Prema tkivu kojeg najčešće inficiraju pojedini se papilomavirusi čovjeka dijele u tri grupe: kutanu, mukokutanu i mukoznu. Mukokutanoj grupi pripadaju: 1. virusi koji inficiraju kožu i sluznicu usne šupljine, 2. virusi izolirani iz bolesnika s epidermodysplasia verruciformis, te 3. virusi koji zaražavaju anogenitalnu regiju. U anogenitalne viruse ubraja se više od 40 različitih tipova. Na osnovu sposobnosti (potencijala) izazivanja zloćudne preobrazbe ovi se virusi dijele u tri grupe:

1. niski rizik: HPV tip 6, 11, 26, 40, 42, 43, 44, 53, 54, 55, 62, 66
2. visoki rizik: HPV tip 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68
3. vjerojatno visoki rizik: 26,53,66.

1.4.3 Genom papilomavirusa čovjeka

Za različite tipove HPV-a, organizacija genoma je ista. Genom svih HPV-a može se podijeliti u tri regije: 1. uzvodnu regulatornu regiju (engl. upstream regulatory region – URR) koja se naziva i dugačka kontrolna regija (engl. long control region - LCR) ili nekodirajuća regija (engl. noncoding region – NCR), 2. ranu kodirajuću regiju (engl. early - E), i 3. kasnu kodirajuću regiju (engl. late - L).

Uzvodna regulatorna regija (URR) sadrži niz elemenata koji pod utjecajem raznih transkripcijskih čimbenika virusa i stanice domaćina, kao i drugih molekula, reguliraju transkripciju i replikaciju papilomavirusa. Rana i kasna regija sadrže gene koji kodiraju za proteine neophodne za replikaciju i transkripciju virusa te preobrazbu stanica domaćina. (12)

ORF E1 (engl. open reading frame – ORF) kodira za fosfoprotein molekulske mase 68 do 85 kDa koji ima važnu ulogu u izvankromosomalnoj replikaciji virusa. Pokazuje aktivnost ATP-aze i helikaze.

ORF E2 kodira za dva proteina koji imaju više funkcija. Jedan od njih predstavlja glavni replikacijski protein papilomavirusa. Naime, protein E2 stvara kompleks s enzimski aktivnim E1 i mjestom početka replikacije - ori (engl. origin of replication). Ori predstavlja djelomični palindrom od 18 pb, a nalazi se u regiji URR. Kompleks između E1, E2 i ori prepoznaje replikacijski sustav stanice domaćina i sintetizira novu virusnu molekulu DNA.(13) Produkt gena E2 važan je i kao pozitivni i kao negativni regulator transkripcije virusnih gena. Kad nastaje prepisivanjem cijelog gena ORF E2 ima ulogu transkripcijskog aktivatora (u skraćenom obliku protein sadrži samo DNA vezujuću domenu koji ima ulogu transkripcijskog represora). Proteini E2 su vrlo važni i u regulaciji ekspresije proteina E6 i E7. Smanjuju prevođenje gena E6 i E7, čime se smanjuje količina onkoproteina E6 i E7 u stanici. Protein E2 može imati i ulogu u programiranoj staničnoj smrti (apoptoza). (14)

ORF E4 kodira za nekoliko proteina čija uloga još uvijek nije jasna, a pretpostavlja se da imaju značenje u produktivnoj zarazi te izlasku viriona iz stanice domaćina.(15)

ORF E5 kodira za mali, hidrofobni protein, pretežno prisutan u staničnoj membrani te ima malu sposobnost zloćudne preobrazbe.

ORF E6 kodira za onkoprotein koji se nalazi u jezgri i citoplazmi. Transkripcija gena E6 (kao i E7) pod negativnom je kontrolom E2. Ugradnjom virusnog genoma gubi se ekspresija gena E1 i E2, a time i kontrola nad onkogenima E6 i E7, čiji su transkripti jedini prisutni u zloćudnim promjenama. (16)

Preko E6AP (engl. E6 associated protein) događa se vezanje proteina E6 s p53. Kompleks E6-E6AP veže i razgrađuje tumor supresorski protein p53 ubikvitinskim putem, što dovodi do smanjenja količine p53 u stanici i gubitka njegovog reparatornog svojstva. Vezanje E6 s E6AP sprečava ubikvitinizaciju i razgradnju tirozin kinaze Blk, što može dovesti do stimulacije proliferacije stanica. E6 ima antiapoptotički učinak koji je djelomično posredovan razgradnjom p53 i Bak,(17) E6 može aktivirati i telomerazu, staničnu reverznu transkriptazu, što pospješuje rast transformiranih stanica. Aktivaciju telomeraze može posredovati i onkogen myc.(18) Osim navedenog pojačava i učinak proteina E7 u imortalizaciji stanica.

ORF E7 kodira za onkofosfoprotein E7 koji visokim afinitetom veže hipofosforilirani oblik proteina RB čime se upliće u transkripciju u ranim fazama staničnog ciklusa, a ujedno se veže i za proteine p107 i p130 koji imaju važnu ulogu u kontroli stanične proliferacije. Vezanje HPV za RB i proteine p120 i p170 sprečava njihovo vezanje za E2F što dovodi do nekontrolirane proliferacije stanice. Pokusi in vitro su pokazali da je prisutnost gena za E6 i E7 HPV 16 ili HPV 18, ali ne i HPV 6/11, dovoljna da izazove imortalizaciju stanica u kulturi.(19) Za zloćudnu preobrazbu nužna je ekspresija oba gena. Važno je napomenuti da niskorizični HPV mijenjaju stanicu, ali ne izazivaju zloćudnu preobrazbu stanice. Osim pokusa in vitro, E6 i E7 su uvijek nađeni u karcinomima vrata maternice što ukazuje da je prekomjerna ili neregulirana ekspresija tih gena nužna za održavanje zloćudnog stanja.

Kasna regija smještena je nizvodno od rane regije, a sadrži dvije ORF (L1 i L2) koje kodiraju za dva proteina kapside. Protein L1 je glavni protein kapside. Ima ga dvostruko više od manjeg strukturnog proteina L2. L1 ima jako konzervirani slijed aminokiselina u svih papilomavirusa životinja i ljudi. Određeni slijed aminokiselina proteina L2 sačuvan je u svim spolnim HPV-ovima i mogao bi biti razlogom specifičnog tropizma tih virusa.(20) Čini se da transkripciju kasne regije određuju regulatori transkripcije stvoreni u stanicama domaćina, obzirom da je stvaranje proteina L1 i L2 strogo ograničeno na intermedijalan i superficijalan sloj epitela.

1.4.4 Životni ciklus papilomavirusa čovjeka

Kao posljedica mikrotraume epitela, virus ulazi u pričuvne-pluripotente stanice. Čini se da ove stanice posjeduju receptore za papilomaviruse čovjeka. Ulaskom u stanicu, replikacija virusa odvija se na tri načina: 1. niska razina umnožavanja neposredno nakon ulaska virusa u bazalnu stanicu oštećenog epitela, 2. latentno, minimalno umnožavanje prati diobu pričuvnih-pluripotentnih stanica (latentna zaraza), i 3. normalno umnažanje – stvaranje novih viriona u diferenciranim stanicama epitela (produktivna zaraza).

Nakon ulaska u stanicu virus se stabilizira u episomalnom stanju i umnoži u oko 20 do 100 kopija. Replikacija episomalne DNA u latentnoj se zarazi održava na razini koja prati diobu bazalnih i parabazalnih slojeva. Obzirom da se u latentnoj zarazi ne stvaraju kompletni virioni, ne dolazi do nastanka karakterističnog citopatskog učinka te se nazočnost HPV-a može utvrditi jedino metodama molekularne biologije. U višim slojevima virus umnaža svoj genom usporedno s diferencijacijom stanica domaćina. U diferenciranim stanicama, odnosno intermedijalnom i superficijalnom sloju, dolazi do ekspresije kasnih gena i korištenja specifičnih čimbenika transkripcije iz stanice domaćina koji stimuliraju stvaranje proteina kapside virusa. Taj proces omogućava stvaranje zrelog virusnog potomstva i nastanak karakterističnog citopatskog učinka HPV-a koji se može dokazati u citološkim obriscima i histopatološkim rezovima. Ovaj prikaz vrijedi za tipove HPV-a niske zloćudne sposobnosti. Razlika između nisko- i visokorizičnih HPV-a krije se u fizičkom stanju njihovih genoma u stanici domaćina. Episomalni oblik DNA HPV-a prisutan je u kondilomima i CIN 1.(21) Kada je virus u episomalnom obliku regija ORF E2 je intaktna što omogućava reguliranu transkripciju ORF E6 i E7. U zloćudnim je promjenama stvaranje viriona HPV-a neznatno, jer je njihova DNA uglavnom ugrađena u kromosom domaćina.(4) Uslijed ugradnje događa se delecija gena E2 (ponekad i E4 i E5) i L2.(22) Obzirom da gen E2 kodira za supresor transkripcije gena E6 i E7, njegovom delecijom gubi se i kontrola transkripcije ovih gena, a time i kontrolirana proliferacija stanica. Rijetki su slučajevi karcinoma vrata maternice gdje se HPV može naći u episomalnom obliku, a u tim slučajevima gen E2 je obično mutiran.

1.4.5 Imunosni odgovor na infekciju humanim papilomavirusom

Infekcija HPV-om karakterizirana je izostankom viremije, upalne reakcije i uništavanja zaraženih stanica (stanične smrti). Uobičajeni odgovor na infekciju je aktivacija lokalnih makrofaga, odnosno Langerghansovih dendritičkih stanica. Tako aktivirane Langerhansove stanice kreću prema prvom drenažnom limfnom čvoru i prezentiraju HPV-antigen T-limfocitima. Potom se T-limfociti diferenciraju u različite izvršne stanice koje kreću prema mjestu infekcije i uništavaju zaražene keratinocite. Međutim, to se ne događa kod infekcije HPV-om.

Ova infekcija je karakterizirana slabim ili nikakvim otpuštanjem proinflammatoryh citokina, stoga nedostaje esencijalni signal aktivacije lokalnog imunskog sustava. Zaraženi keratinociti mogu aktivirati snažan obrambeni sustav posredovan sekrecijom interferona. Pojedini tipovi interferona imaju snažan protuvirusni, protuproliferacijski, protuangiogenički i imunostimulacijski učinak. Međutim, produkti HPV E6 i E7-gena suprimiraju gene odgovorne za sintezu interferona i na taj način ruše vrlo važan obrambeni sustav. Nadalje, HPV ima

mehanizme izbjegavanja prirodnog imunskog odgovora i tako onemogućuje stjecanje imuniteta i sprječavanje ponovne zaraze. U određivanju tijeka HPV-infekcije ključan je stanični imunski odgovor posredovan CD4 Th1-populacijom limfocita. Imunski sustav najčešće uspije eliminirati virus. Proteinski produkti HLA-antigena imaju važnu ulogu u prezentaciji antigena T-limfocitima domaćina. U dva odvojena istraživanja izolirani su različiti haplotipovi HLA-sustava. Neki od ovih haplotipova smanjuju rizik od nastanka trajne HPV-infekcije tri do četiri puta, dok nositelji nekih haplotipova imaju do sedam puta veći rizik od nastanka trajne HPV-infekcije.(23)

1.4.6 Utjecaj virusnih onkoproteina E6 i E7

U svim karcinomima vrata maternice nađena je povećana ekspresija virusnih gena E6 i E7. Dokazano je da E6 ima sposobnost vezanja s različitim važnim regulatornim proteinima kao što je p53. Vezanje E6 s p53 dovodi do razgradnje p53 čime se gubi njegova uloga u kontroli gena koji kontroliraju zastoje u G1-fazi, pa se, dozvoljavanjem prolaza kroz stanični ciklus prije nego što je DNA popravljena, omogućava nakupljanje mutiranih gena. Uloga proteina E7 u zloćudnoj promjeni ostvaruje se preko produkata tumor supresorskog gena Rb (engl. retinoblastoma gene).(24) Retinoblastomski protein je glavni negativni regulator staničnog ciklusa. Tijekom G0 i G1-faze staničnog ciklusa Rb je hipofosforiliran i vezan za transkripcijski čimbenik E2F-1 koji ima važnu ulogu u ekspresiji staničnih regulatornih gena kao što je c-myc. Vezanje Rb i proteina p107 i p130 za E2F-1 onemogućava djelovanje E2F čime se sprečava ulazak stanice u S-fazu. Početak sinteze DNA i prijelaz stanice iz G1 u S-fazu zahtijeva raspad te veze, koja se događa hiperfosforilacijom Rb. Visoka razina nevezanog E2F-1 stimulira ekspresiju drugih staničnih regulacijskih gena i dovodi do proliferacije. Vezanje HPV E7 za Rb i proteine p107 i p130 onemogućava njihovo vezanje s E2F-1, što uzrokuje nekontroliranu proliferaciju stanice. Gubitak funkcije proteina p53 i Rb dovodi do kontinuirane replikacije i proliferacije stanica. Stimulirana je sinteza DNA bez popravka oštećene DNA, nakupljaju se genetske greške, izostavljena je programirana smrt stanice i tako dolazi do zloćudne preobrazbe.

Zaraza HPV-om bilježi se prosječno desetak godina prije nastanka karcinoma vrata maternice. Osim toga, samo mali broj žena zaraženih s HPV-om visokog rizika razvije karcinom. Svi ti nalazi govore u prilog dodatnih događaja ili čimbenika koji su bitni za nastanak karcinoma, stoga je identifikacija dodatnih genetskih – kromosomskih promjena vrlo važna za razumijevanje biologije ovog karcinoma. (25)

1.5 DIJAGNOSTIKA CIN-a

PAPA test, kolposkopija s ciljanom biopsijom i patohistološka analiza uzorka tri su komplementarne metode otkrivanja i verifikacije intraepitelne neoplazije i potrebno ih je učiniti u sklopu cjelovite dijagnostičke obrade CIN-a.(26) U novije vrijeme, ovom klasičnom dijagnostičkom trijasu možemo dodati i tipizaciju HPV DNK, čiji su nam podaci zanimljivi kod heterogene skupine LSIL-a, jer je HSIL uglavnom izazvan tipovima HPV-a iz grupe visokog onkogenog rizika.(27)

1.5.1 Citološka slika PAPA testa

Citološka slika premalignih lezija karakterizira morfološke promjene koje se ponajprije nalaze na jezgrama. Prema intenzitetu morfoloških promjena intraepitelne lezije pločastog epitela dijele se na: dysplasia levis – DL, dysplasia media – DM, dysplasia gravis – DG i Ca in situ – CIS. Sve citološke karakteristike koje se nalaze kod displazije i koje su, obzirom na težinu displazije bile sve intenzivnije, kod CIS-a su još jačeg intenziteta uz karakterističnu pojavu deskvamacije u nizu i sinciciju s preklapanjem jezgara i gubitkom polarnosti, te zadebljane i naborane jezgrene ovojnice s usječcima i uzdužnim naborima, uz nepravilno nakupljanje kromatina.

Citomorfološke promjene kod intraepitelnih lezija često su udružene s morfološkim promjenama karakterističnima za infekciju HPV-om u obliku uže ili šire, svijetle, nepravilne, oštroograničene zone oko jezgre.

1.5.2 Patohistološko stupnjevanje CIN-a

Većina dijagnostičko-terapijskih postupaka preporučuje, u slučaju kolposkopski vidljive promjene, učiniti ciljanu biopsiju. Uzorci tkiva mogu se uzeti bioptičkim kliještima („punch“ biopsija), a pri sumnji na početnu invaziju, preporučuje se učiniti klinastu biopsiju nožem (na raspolaganju veća količina strome). Upotrebom male niskovoltazne dijatermijske petlje također se dobiva adekvatan uzorak tkiva, a postoji i mogućnost da se manje i ograničene promjene u potpunosti odstrane. Tkivo koje patolog dobiva na uvid trebalo bi sadržavati epitel, bazalnu membranu i dio podležeće strome. Pod pretpostavkom da je analiziran reprezentativan uzorak tkiva, patohistološka se dijagnoza smatra „zlatnim standardom“ u dijagnostici preinvazivnih promjena genitalnog trakta.

Morfološki kriterij za postavljanje dijagnoze CIN-a uključuje ove promjene stanica višeslojnoga pločastog epitela vrata maternice: nejednakost u obliku i veličini stanica i

njihovih jezgara, poremećaj sazrijevanja, poremećaj omjera citoplazma/jezgra, kvantitativna i kvalitativna promjena kromatina, kao i izgled i broj nukleola, prisutnost patoloških mitozu, te specifična orijentacija jezgara u stanicama. Za određivanje patohistološkog stupnja CIN-a primjenjuje se procjena debljine promjenama zahvaćenog epitela.

Kod CIN 1 vidljive morfološke promjene ograničene su na bazalni i parabazalni sloj, tj. zahvaćaju do trećine debljine epitela, mjereno od bazalne membrane, uz održanu stratifikaciju i diferencijaciju intermedijarnog i superficijalnog sloja.

Kod CIN 2 može se vidjeti poremećaj rasporeda i sazrijevanja stanica u donjim dvjema trećinama debljine epitela, a postoje i patološke mitoze.

U CIN-u 3 promijenjena je cijela debljina epitela, ali nema prodora kroz bazalnu membranu, brojne su patološke mitoze, a promijenjeni epitel može manje ili više ispunjavati žljezdane kriptu.(26,27)

Citohistološka korelacija

Vrijednost diferencijalne citodijagnostike izravno je ovisna o klasifikaciji citoloških nalaza s obzirom na jasnoću morfoloških kriterija koji razdvajaju pojedine skupine i broj upotrijebljenih dijagnostičkih skupina. Dijagnostička točnost diferencijalne citologije (kod podudarnosti istog stupnja) za dvije skupine, Bethesda 1988. iznosi 82%, za tri skupine, Zagreb 1968. 53-67%, a za četiri skupine, Zagreb 1990. 51-61%. Analiza vrijednosti diferencijalne citodijagnostike za pojedine lezije pokazuje da je kod primjene klasifikacije „Zagreb 1990“ s više dijagnostičkih podskupina citodijagnostika najpouzdanija u predviđanju histološke dijagnoze CIS-a, a posebice CIN 3 (dijagnostička točnost 88-96%), dok je za lezije blažeg stupnja nepouzdana, (posebice za srednje tešku displaziju), gdje se u 37-48% slučajeva krije histološki verificirana teža lezija, što upućuje na potrebu izravne dopunske ocjene kolposkopijom i po potrebi ciljanom biopsijom takvih lezija. Točnost diferencijalne citološke dijagnoze povećava se s težinom intraepitelne lezije i upravo je proporcionalna reproducibilnosti dijagnoze. Dysplasia media kritična je dijagnoza, koja uz slabu reproducibilnost ima najmanju vjerojatnost da se citološki otkrije i ispravno dijagnosticira.(28)

1.5.3 Kolposkopija

Kolposkopija je dijagnostički postupak u kojem se pomoću optičkog instrumenta, kolposkopa, pod različitim povećanjima i osvjetljenjima mogu pregledati stidnica, rodnica i

vrat maternice.(29) Njemački ginekolog Hans Hinselman izumitelj je kolposkopije. Kolposkopski aparat sastoji se od stereoskopskog binokularnog mikroskopa s različitim povećanjima 3.5 do 50 puta. Uz to, postoji jaki izvor svjetla. Uobičajeno je raditi prošireni kolposkopski pregled uz upotrebu 3-5%-tne octene kiseline, pod čijim djelovanjem dolazi do koagulacije proteina u jezgrama i citoplazmi pa tkivo s većom staničnom aktivnošću poprima bijelu boju. Krvožilna mreža stvara karakteristične kolposkopske slike. Kolposkopski bi nam pregled trebao pružiti ove podatke: je li citološki utvrđena atipija epitela uopće kolposkopski vidljiva, a ako jesti, gdje se nalazi, koliku površinu zahvaća, širi li se u cilindrični epitel cervikalnog kanala, je li multicentrična ili multilokularna, je li promjena u cijelosti vidljiva i postoji li sumnja na invazivni proces.

Kolposkopska je terminologija u posljednje vrijeme uvelike pojednostavljena i standardizirana, a u upotrebi je zadnja klasifikacija usvojena na 7. Svjetskom kongresu za cervikalnu patologiju i kolposkopiju održanom 1990. godine u Rimu.

Abnormalna kolposkopska slika unutar i izvan zone preobrazbe:

- | | |
|-----------------------|---------------------------|
| 1. Acidobijeli epitel | 4. Leukoplakija |
| 2. Punktacije | 5. Jod negativna područja |
| 3. Mozaik | 6. Atipične krvne žile |

Kolposkopija se smatra zadovoljavajućom kada je sekundarna SKG u cijelosti vidljiva, tako da je prikazana čitava zona preobrazbe (engl. transformation zone – TZ). Višeslojni pločasti epitel je gladak i blijedoružičast, dok je cilindrični epitel baršunast ili papilarni i crven. Prigodom kolposkopije posebno se pretražuje TZ jer je tu CIN najčešći. Područja CIN-a kolposkopski su vidljiva kao manja ili veća polja acidobijelog epitela (promijenjeni epitel koji nakon primjene octene kiseline poprima bijelu boju) udruženog s karakterističnim krvožilnim slikama punktacija i mozaika. Kolposkopska slika atipičnih krvnih žila upućuje na invazivni karcinom vrata maternice, a žile su potpuno nepravilnoga izgleda, širokih lumena, jako izvijugane, neobično razgranate, dok samo pojačana, ali pravilna vaskularizacija može biti prisutna i u potpuno benignim stanjima kao što je kronični cervicitis.

Da bi obrada i liječenje bolesnica s CIN-om na našim prostorima bila standardizirana, i u skladu s najnovijim spoznajama medicinske znanosti, od 2001. godine u primjeni je „Revidirani dijagnostičko-terapijski postupnik za premaligne bolesti vrata maternice“.

1.6 LIJEČENJE CIN-a

U liječenju CIN-a prevladava stav o što poštenijem, a opet dostatnom obliku liječenja koje će omogućiti odstranjenje neoplastične promjene, ali neće ostaviti značajne, trajne posljedice na ženinim reproduktivnim organima. Perzistencija CIN 1 u kombinaciji s HPV tipom niskog onkogenog rizika može se tolerirati do 2 godine, a s HPV tipom visokog onkogenog rizika do godinu dana. Nakon toga se preporučuje neka od poštenih metoda terapije (lokalnodestruktivna ili LETZ- Loop excision of the transformation zone). Perzistencija CIN 2 rješavala bi se unutar godinu dana, napose ako je u kombinaciji s HPV tipom visokog onkogenog rizika. Patohistološki verificiran CIN 3, koji perzistira i nakon biopsije, treba liječiti bez odgađanja, a operativnu metodu treba odabrati u skladu s dobi, paritetom, ginekološkom anamnezom i bolesničnim željama.

Terapiju CIN-a provodimo uglavnom kirurškim metodama, bilo da je riječ o lokalnodestruktivnim ili ekscizijskim tehnikama. U razvijenim je zemljama 80-ih godina uvedena terapija laserom, a od 90-ih se proširila metoda ekscizije TZ-a niskovoltaznom dijatermijskom petljom (LETZ).

Lokalno destruktivne metode imaju za cilj u potpunosti uništiti promijenjeni epitel, ali pri tome ne dobivamo tkivni preparat za patohistološku analizu. Za liječenje ovakvim metodama pogodne su promjene koje su u potpunosti kolposkopski vidljive, koje su smještene egzocervikalno i kod kojih je vidljiva čitava SKG.

Elektrokauterizacija se izvodi ambulantno u lokalnoj analgeziji.

Krioterapija je pothlađivanje tkiva tekućim dušikom ili ugljikovim dioksidom na temperaturu od -180 °C, a izvodi se ambulantno i ne zahtijeva analgeziju.

Laserska se tehnika može upotrebljavati kao lokalnodestruktivna – laserska vaporizacija ili kao ekscizijska metoda. Preciznost laserske zrake pruža maksimalnu točnost, a moguće je odrediti i dubinu destrukcije tkiva. Zahvat se izvodi ambulantno, u lokalnoj analgeziji, a nedostatak mu je što je izrazito skupa metoda.

Danas je u svijetu ekscizija niskovoltaznom dijatermijskom petljom ipak najraširenija metoda liječenja CIN-a. Elektrodijatermijsku eksciziju malom petljom prvi je opisao Certier 1981. Godine. Poslije su Prendiville i suradnici počeli upotrebljavati petlje većega promjera, kojima su u jednom potezu odstranili čitavu TZ, stoga je metoda nazvana LETZ (Loop excision of the transformation zone). Princip rada temelji se na niskovoltaznoj visokofrekventnoj izmjeničnoj struji koja izaziva vaporizaciju stanica duž linije reza, a istodobno se postižu

rezanje i koagulacija. Na odstranjenom tkivnom preparatu moguća je uobičajena patohistološka obrada uz procjenu stanja rubova i težine lezije. Ovisno o opsežnosti zahvata, ova se metoda može rabiti i u dijagnostičke i u terapijske svrhe. Studije su potvrdile visoku stopu izlječenja, koja se kreće od 90 do 97%, dok su stope intraoperativnih i postoperativnih krvarenja, te cervikalnih stenoza minimalne. Za sada je još nedovoljan broj dugoročnih studija koje bi dokazale nepobitan učinak LETZ-a na fertilitet pa se ne preporučuje kao prvi korak u dijagnostičkoj obradi abnormalnih citoloških nalaza.

U liječenju CIN-a konizacija nožem ima dijagnostički, a po mogućnosti i terapijski učinak. Optimalna bi konizacija trebala odstraniti čitavu promjenu, TZ i barem trećinu cervikalnog kanala. Glavni problem konizacije jest CIN koji zahvaća žljezdane kriptе, stoga, osim veličine samog konusa, veoma bitan i njegov oblik. Konizacija nožem izvodi se u operativnoj dvorani, u općoj anesteziji, a nakon odstranjenja tkiva skalpelom slijedi uspostava hemostaze. Kao komplikacije konizacije navode se intraoperativno i postoperativno krvarenje, cervikalna stenoza te infertilitet.

Bez obzira na provedenu metodu liječenja, prve godine nakon operacije potrebne su redovite citološke, a po potrebi i kolposkopske kontrole u intervalima od 3 do 4 mjeseca. U slučajevima urednih nalaza u sljedećim se godinama kontrole mogu provoditi u šestomjesečnim razmacima. Ako unutar 3-5 godina nema recidiva, preporučuje se standardna godišnja citološka kontrola. (30)

2. ISTRAŽIVANJE

2.1. CILJ

Cilj ovog rada je doprinijeti izboru najbolje opcije za rani probir raka vrata maternice u Hrvatskoj. Trenutna hipoteza je da je najbolji izbor citološki probir žena dobne skupine 20-29 godina, kotestiranje citologijom hrHPV žena 30-34 godine te primarno hrHPV testiranje žena 35-65 godina.

2.2. MATERIJALI I METODE

U ovom retrospektivnom istraživanju analizirali smo dostupne podatke iz bolničkog informatičkog sustava (BIS), za žene kojima je tijekom 2017. godine u našem patohitološkom laboratoriju rađena analiza promjena vrata maternice. Kod bolesnica je učinjena konizacija kao terapijski postupak u liječenju preinvazivnih lezija vrata maternice.

Izdvojene su žene koje su imale prethodni PAPA nalaz u našem citološkom laboratoriju, a za većinu je postojao PHD nalaz prethodne biopsije i HPV testiranje prije konizacije. Analizirano je 128 bolesnica.

PHD dijagnoza postavljena je na kirurškom materijalu, a interpretirao ju je patolog ginekološke klinike Petrova (Klinika za patologiju i citologiju), KBC-a Rebro.

Materijal je dobiven ekscizijskom metodom LETZ ili konizacijom hladnim nožem.

HSIL je uključio cervikalnu intraepitelnu neoplaziju – CIN gradus 2 i 3 (CIN 2 i CIN 3).
LSIL je uključio cervikalnu intraepitelnu neoplaziju – CIN gradus 1 (CIN 1).

Zadnji PAPA test bio je konvencionalni cervikalni obrisak analiziran u citološkom laboratoriju ginekološke klinike Petrova. Rezultati su objavljeni u formi poznatoj kao „Zagreb 2002.“.

Za citološki – histološku korelaciju upotrijebili smo PAPA obrisak uzet 4 – 12 mjeseci prije biopsije.

U ginekološkoj klinici Petrova, ali i u drugim ustanovama učinjen je hrHPV test. Nalazi hrHPV testa pohranjeni su u bazi podataka Klinike, a različite metode nisu posebno analizirane.

2.3. REZULTATI

Distribucija po dobi

Prosječna dob žena bila je 44,7 godina, s rasponom od 21 do 77 godina.

Za 9 slučajeva kod kojih je PHD nalaz bio uredan, a konizacija i amputacija cerviksa su rađeni zbog elongacije ili inkontinencije, prosječna dob bila je 59,9 godina.

Za 76 bolesnica s histološkom dijagnozom HSIL na konusu, prosječna dob je bila 39,7 godina s rasponom od 22 do 66 godina, a za skupinu od 8 bolesnica s mikroinvazivnim i invazivnim karcinomom cerviksa, prosječna dob bila je 44 godine s rasponom 30-58 godina.

Citološko – histološka korelacija

Na konačnom histološkom nalazu konizata, kod 3 bolesnice nađen je LSIL. Prethodni PAPA je u jednom slučaju bio LSIL (1/3), a u dva HSIL /ASC-H (2/3). Kod 76 bolesnica s PHD nalazom HSIL na konusu, PAPA nalazi prije konizacije bili su: HSIL/ASC-H (66/76)- 87%, CIS/CIM (6/76)-7,8%, Ca.planocellulare – rana invazija (1/76)-1,3%, AGC-NOS (1/76)-1,3%. U 2 slučaja PAPA nalaz je bio LSIL (2/76)-2,6%. Nije bilo citološki negativnih nalaza u obje skupine (LSIL i HSIL).

Tablica 1. Zadnji PAPA nalaz u usporedbi s histološkim nalazom

Citologija	Histologija			
	LSIL		HSIL	
	No	%	No	%
Negativna	0	0	0	0
LSIL	1	33,33	2	2,6
HSIL/ASC-H	2	66,66	66	87
CIS/CIM	0	0	6	7,8
Ca.Plano-ran	0	0	1	1,3
AGC – NOS	0	0	1	1,3
Ukupno	3	100	76	100

Tablica 2. Citološko-histološka korelacija

Histologija:	b.o.	b.o.	Epitel ned.	LSIL	HSIL	Mikroin vazovni CaPlano	CaPlano	AdenoCa	
	Kl.dg. elong..	Kl.dg. Dysplasio							
Citologija									
Neg.	9	1	1						
ASC-US			1						
DL				1	2				
HSIL/ASC-H		6	16	2	66	2			
CIS/CIM			2		6	4	1	1*	
CaPlano-rana					1	2	1		
AGC-NOS					1			1	
Adenoca								1	
Ukupno	9	7	20	3	76	8	2	3	128
Raspon dob	39-77	28-48	21-85	48-52	22-66	30-58	39-46	31-59	
Prosjeck dob	59,89	38,1	43,9	49,67	39,69	44	42,5	42,67	

Kod 8 bolesnica histološki nalaz bio je mikroinvazivni planoceluralni karcinom (FIGO IA1). Kod te skupine bolesnica konizacija je i konačni terapijski postupak ukoliko su rubovi i vrh konusa slobodni. Analizirajući PAPA nalaz prije konizacije, u 2 slučaja nalaz je bio HSIL/ASC-H (2/8), u 4 slučaja CIS/CIM (4/8) dok je kod dvije bolesnice prethodni PAPA nalaz bio Ca.planocellularae-rana invazija 2/8.

Kod 2 bolesnice konačni PHD nalaz bio je Ca.Planocellularae 2/128 1,6%., a kod 3 adenokarcinom (3/128), 2,3 %.

PAPA nalazi kod onih sa histološkim nalazima Ca.Planocellularae bili su CIS/CIM u jednom slučaju te Ca.planocellularae – rana invazija također u jednom slučaju.

Kod 3 bolesnice sa histološkim nalazom adenokarcinoma PAPA nalaz je bio CIS/CIM 1/3, adenokarcinom 1/3 te AGC-NOS 1/3.

U skupini od 9 bolesnica kod kojih je konizacija učinjena zbog nekog drugog nalaza, a ne sumnje na preinvazivne promjene vrata maternice, histološki nalaz bio je uredan. Kod svih bolesnica iz te skupine, PAPA nalaz je bio negativan.

Kod 7 bolesnica kod kojih je PHD nalaz bio uredan, a na konizaciju su upućene pod kliničkom dijagnozom sumnje na displaziju, prethodni PAPA je u jednom slučaju bio negativan 1/7, a kod 6 HSIL/ASC-H.

Kod 20 bolesnica, 20/128 histološki nalaz bio je da epitel nedostaje, a izražen je opisno, nije bilo definitivne dijagnoze CIN-a. Prethodni PAPA nalaz kod jedne bolesnice je bio negativan 1/20 kod jedne ASC-US 1/20, kod 16 HSIL/ASC-H 16/20, a kod dvije bolesnice CIS/CIM 2/20.

Tablica 3. Korelacija PHD nalaza biopsije sa konačnim PHD nalazom (konus)

Histologija konus:	b.o.	b.o.	Epitel ned.	LSIL	HSIL	Mikroinvazovni CaPlano	CaPlano	AdenoCa
	Kl.dg. elong..	Kl.dg. Dysplasio						
Prethodno biopsija			15		69			
Prethodno konus			3 (svi CIN3; 2 poz vrh)		5			
Neg.		1	4	2	14 (18,9%)			
LSIL					1			
HSIL		3	12		47 (63,5%)	1		
V.opis SIL		1	1	1	7		1	
V.opis SIL/inv?			2		3	6	1	
Mikroinv					2			
AIS/atip.cil. epitel								2
Prethodni phd		5	19		74			2
Nema podatak		2	1		2	1		1
Ukupno	9	7	20	3	76	8	2	3
Raspon dob	39-77	28-48	21-85	48-52	22-66	30-58	39-46	31-59
Prosjeck dob	59,89	38,1	43,9	49,67	39,69	44	42,5	42,67

Od 76 bolesnica s histološkom dijagnozom HSIL, kod 14 (14/128) je prethodni PHD nalaz biopsije bio negativan (18,9%).

Tablica 4. HPV/HSIL+

	N	%
Poz	38	79,17
Neg	10	20,83
Ukupno	48	100,0

Kod 48 bolesnica s histološkim nalazom HSIL+ kod kojih je rađena hrHPV tipizacija unutar godinu dana prije konizacije kod 38 je hrHPV bio pozitivan, 78,17%, a kod 10 negativan 20,83%.

Tablica 5. Valjanost uzoraka tkiva za patohistološku analizu

	Ne zadovoljava (%)	Zadovoljava (%)	χ^2	P
LLETZ (n=24)	15† (62,5)	9 (37,5)	7,089	0,008
Nož ((n=95)	29‡ (30,5)	66 (69,5)		

† - u 8 slučajeva nedostaje zona transformacije, u 7 epitel je dijelom artifičijelno promijenjen ili nedostaje; ‡ u 11 slučajeva nedostaje zona transformacije, u 18 epitel je dijelom artifičijelno promijenjen ili nedostaje; χ^2 – chi kvadrat, P – statistička vjerojatnost

Analizom konusa s prethodnim abnormalnim citološkim nalazom prema tipu operacije vidljivo je da je nakon 62% LETZ operacija, PHD nalaz neadekvatan (33% nedostaje zona transformacije, a u 29% dijelom artifičijelno promijenjen ili dijelom nedostaje epitel). Kod skupine od 95 bolesnica operirane nožem, u 30% PHD nalaz je bio neadekvatan (11.6% nedostaje zona transformacije, a kod 18.9% dijelom artifičijelno promijenjen ili dijelom nedostaje epitel).

2.4 RASPRAVA

PAPA test, kolposkopija s ciljanom biopsijom i PHD analiza uzorka tri su komplementarne metode otkrivanja i verifikacije intraepitelne neoplazije i potrebno ih je učiniti u sklopu cjelovite dijagnostičke obrade CIN-a.

U novije vrijeme ovom klasičnom dijagnostičkom trijasu možemo dodati i tipizaciju HPV virusa. Napredak cervikalne citologije pomogao je u smanjenu morbiditeta i mortaliteta bolesti vrata maternice zadnjih 70 godina, uz limite koji su dobro poznati (31,32,33).

Poznata je direktna povezanost HPV infekcije s visokorizičnim tipovima i razvoja preinanzivnih i invazivnih promjena vrata maternice.

Budući da su visokorizični HPV tipovi detektirani u 99% invazivnih cervikalnih karcinoma, i u visokom postotku HSIL promjena, HPV detekcija može biti alternativa skrining testu za detekciju prekursorskih promjena koje će progredirati u invazivni karcinom.

Visoka osjetljivost hrHPV testiranja opisana je u literaturi, međutim postoje varijacije ovisno o metodi i ispitivanoj populaciji.

Citološko – histološka korelacija

Od 76 bolesnica s HSIL histološkom dijagnozom na konusu zadnji konvencionalni PAPA razmaz bio je abnormalan u svim slučajevima, 76/76 (100%). Abnormalni citološki nalazi bili su LSIL 2/76, HSIL/ASC-H 66/76, CIS/CIM 6/76, Ca planocellulare rana 1/76, AGC-NOS 1/76.

Kod 3 bolesnice s LSIL histološkim nalazom na konusu 33.3% je bilo LSIL, a 66.6% HSIL/ASC-H.

Kada je histološki nalaz konusa bio mikroinvazivni planocelularni karcinom, a riječ je o 8 bolesnica, svi PAPA nalazi su bili abnormalni (100%). U 2 slučaja HSIL/ASC-H u 4 CIS/CIM te u 2 Ca planocellulare rana invazija, kod dvije bolesnica s invazivnim planocelularnim karcinomom PAPA nalaz u oba slučaja je bio abnormalan CIS/CIM, a u drugom Ca planocellulare rana invazija. Isti je slučaj i kod 3 bolesnice s adenokarcinomom cerviksa. Kod sve 3, citološki je nalaz bio abnormalan (1 CIS/CIM, 1 AG-NOS, 1 Adenoca).

Prateći citološko-histološku povezanost skupine s LSIL histološkim nalazom važno je napomenuti da nije bilo negativnih PAPA nalaza. Pajtler i suradnici točno su predvidjeli samo 30% slučajeva CIN II. (33) Al-Nafussi i suradnici slično Pajtleru i suradnicima točno su predvidjeli CIN II u 35%, a CIN I u 22% bolesnica ali s 15% negativnih nalaza. (34)

U našem radu kod histološkog nalaza konusa HSIL PAPA nalaz je bio HSIL, CIS/CIN, Ca planocellulare rana u 74/76 slučajeva 97.4%. U 2 slučaja ili 2.6% nalaz je bio LSIL.

Pajtler i suradnici su izvijestili o 97% povezanosti citološkog i histološkog nalaza kod HSIL.

Važno je napomenuti da je nakon suspektnog PAPA nalaza za HSIL, mikroinvaziju ili invazivni zloćudni tumor bolesnica upućena na hitnu biopsiju, a nakon toga na operativni zahvat tako da ishod kod svih bolesnica bio uspješan (izlječenje – 100%).

U skupini od 20 bolesnica gdje epitel nedostaje na konačnom PHD nalazu, PAPA prije operacije kod 90% bolesnica je bio HSIL i CIS/CIN. Kod te skupine provedena je LETZ biopsija i odstranjena je čitava TZ tako da je konačni PHD nalaz konizacije bio takav da epitel nedostaje. Kontrolni PAPA nalazi nakon 6 mjeseci su kod svih bolesnica bili uredni (100%).

Oko 19% bolesnica kod kojih je konačni PHD nalaz konusa bio HSIL, prethodna biopsija je bila negativna. Za naglasiti je da je kod svih PAPA nalaz bio HSIL, i na konizaciju se išlo zbog nepodudarnosti citologije i histologije. Kontrolni PAPA nakon 6 mjeseci kod svih bolesnica je bio negativan, što upućuje na neadekvatnu obradu bolesnica s nepouzdanim kolposkopskim nalazom i biopsijom s pogrešnog mjesta.

U našem istraživanju hrHPV test prije histološke dijagnoze HSIL i više (HSIL+ je negativan u oko 20% bolesnica 10/48). Zhao. i suradnici u periodu od 4 mj. do 3 godine prije histološke dijagnoze HSIL imali su 24 % hrHPV negativnih nalaza (35), slično kao i Kaiser Permanente study s 20% negativnih nalaza (36). U zadnjem publiciranom Kaiser Permanente study 16.1% negativnih hrHPV nalaza su pronađeni kod bolesnica s biopsijom utvrđenim HSIL. Suprotno POBASCAM (37) ispitivanje je pokazalo 9% hrHPV negativnih nalaza kod biopsije HSIL (23/255).

2.5 ZAKLJUČAK

Citologija je u Hrvatskoj dobro organizirana kao metoda skrininga cervikalne patologije i rezultati prezentirani u ovom radu to potvrđuju.

Za izdvojiti je da zamjena PAPA testa hrHPV testiranjem treba biti predmet daljnjih istraživanja. U kontekstu potencijalne implementacije hrHPV testa kao primarnog u nacionalnom organiziranom probiru u Hrvatskoj, trebalo bi naglasiti i o nekim nedoumicama, posebno različitostima metoda za hrHPV detekciju.

HrHPV negativni slučajevi HSIL-a opisani su u brojnim radovima u literaturi, a najčešće se objašnjavaju kao: neadekvatno uzet uzorak za tipizaciju, malen broj čestica virusa u uzorku, onečišćenje uzorka tvarima koje ometaju analizu, kao i malom broju zaista hrHPV negativnih slučajeva.

Buduća ispitivanja s velikim brojem uzoraka su neophodna za odgovor na ova pitanja. Primarni zadatak programa prevencije bio bi da se uključi što više žena, te da se formira nacionalna kompjuterizirana baza podataka koja bi uključila kolposkopski nalaz, citologiju, hrHPV test i PHD nalaz.

3. ZAHVALE

Svima koji su tijekom mog fakultetskog obrazovanja bili uz mene, zahvaljujem na podršci. Posebno zahvaljujem svojim roditeljima i sestri koji su mi pomagali kada god je trebalo. Neizmjereno mi je drago što sam uz sebe imala svoje prijatelje koji su mi kroz godine postali druga obitelj jer smo uvijek bili spremni pomoći jedan drugome.

Mnogi će profesori ostati u mome sjećanju jer su me motivirali da ne odustajem i da bih svojim radom mogla postići ono što su i oni sami postigli.

Posebnu zahvalu upućujem svome mentoru doc. dr. sc. Jošku Lešinu na trudu i vremenu koje je odvojio pomažući mi da napišem rad.

4. LITERATURA

1. Ćorušić, A, Babić, D., Šamija, M., Šobat, H.: Ginekološka onkologija.. U: Ljubojević, N., Babić, S., ur. Preinvazivne promjene vrata maternice - Cervikalna intraepitelna neoplazija (CIN); Izd, Medicinska naklada, Zagreb 2005. Str.162-165.
2. zur Hausen H. Condyloma acuminata and human genital cancer. Cancer Res 1976; 36: 794.
3. Gissman L, zur Hausen H. Partial characterization of viral DNA from human genital warts (condyloma acuminata). Int J Cancer 1980; 2: 605-609.
4. Chen EY, Howley PM, Levison AD, Seeburg PH. The primary structure and genetic organisation of the bovine papillomavirus type I genome. Nature 1982; 299: 529-534.
5. 86. Yee C, Krishnan-Hewlett Z, Baker CC I sur. Presence and expression of human papillomavirus sequences in human cervical carcinoma cell lines. Am J Pathol 1985; 119: 361-366.
6. Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM i sur. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. Cell 1990; 63: 1129-1136.
7. Walboomers JM, Meijer CJ. Do HPV-negative cervical carcinoma exists?

- J Pathol 1995; 181: 253-254.
8. Howley PM. Papillomaviridae and their replication. U: Fields BN, Kriple DM (ur.). Fundamental virology, Raven Press, New York, 1990, str. 1625-1650.
 9. Jenson AB, Rosenthal JD, Olson C. Immunologic relatedness of papillomavirus from different species. J Natl Cancer Inst 1980; 64: 495-500.
 10. Delius H, Hofmann B. Primer-directed sequencing of human papillomavirus types. Curr Top Microbiol Immunol 1994; 186: 13-32.
 11. Bontkes HJ, van Duin M, de Gruijl TD. HPV 16 infection and progression of cervical intraepithelial neoplasia: analysis of HLA polymorphism and HPV E6 sequence variants. Int J Cancer 1998; 78: 166-171.
 12. Howley PM. Papillomaviridae and their replication. U: Fields BN, Kriple DM (ur.). Fundamental virology, Raven Press, New York, 1990, str. 743-770.
 13. Materson PJ, Stanley MA, Lewis AP, Romanos MA. A C-terminal helicase domain of the human papillomavirus E1 protein binds E2 and the DNA polymerase α -primase p68 subunit. J Virol 1998; 72: 7407-7419.
 14. Desaintes C, Demeret C., Goyat S i sur. Expression of papillomavirus E2 protein in HeLa cells leads to apoptosis. EMBO J 1997; 16: 504-514.
 15. Breitburd F, Croisant O, Orth G. Expression of human papillomavirus type – 1 E4 products in warts. Cancer Cells 5. Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, New York, 1987; 115-122.
 16. Jeon S, Lambert PF. Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis. Proc Nat Acad Sci USA 1995; 92: 1654-1658.
 17. Thomas M, Banks L. Inhibition of Bak-induced apoptosis by HPV-18 E6. Oncogene 1998; 17: 2943-2954.
 18. Grieder CW. Telomerase activation: one step on the road to cancer? Trends Genet 1999; 15: 109-112.
 19. Smotkin D, Wettstein FO. The major human papillomavirus protein in cervical cancer is a cytoplasmatic phosphoprotein. J Virol 1987; 61:

- 1686-1689.
20. Rho J, Roy-Burman A, Kim H i sur. Nucleotides sequences and phylogenetic classification of human papillomavirus type 59. *Virology* 1994; 203: 158-161.
 21. Schwarz E, Freese UK, Gissmann L i sur. Structure and transcription of human papillomavirus sequence in cervical carcinoma cells. *Nature* 1985; 314: 111-114.
 22. Choo K-B, Pan CC, Han S-H. Integration of human papillomavirus type 16 into cellular DNA of cervical carcinoma: preferential deletion of the E2 gene and invariable retention of the long control region and the E6/E7 open reading frames. *Virology* 1987; 161: 259-261.
 23. Zekan, J. i sur. Onkogeni aspekti HPV-infekcija kod žena. *MEDICUS* 2009; 18(1):67-71.
 24. Seo YS, Muller F, Lusky M, Hurwitz J. Bovine papillomavirus (BPV)- encoded E1 protein contains multiple activities required for BPV DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90(2): 702–706.
 25. Lešin, J. Značenje angiogeneze i tipa HPV-a za terapiju i prognozu invazivnog karcinoma vrata maternice [disertacija]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet; 2006.
 - 26, 27. Ćorušić, A, Babić, D., Šamija, M., Šobat, H.: Ginekološka onkologija.. U: Ljubojević, N., Babić, S., ur. Preinvazivne promjene vrata maternice - Cervikalna intraepitelna neoplazija (CIN); Izd, Medicinska naklada, Zagreb 2005. Str.167-170.
 28. Ćorušić, A, Babić, D., Šamija, M., Šobat, H.: Ginekološka onkologija.. U: Ovanin, A., ur. Cerviks uterusa (vrat maternice); Izd, Medicinska naklada, Zagreb 2005. Str.30-32.
 29. Wikipedia: the free encyclopedia [Internet] St. Petersburg (FL): Wikimedia Foundation, Inc. 2001 - Colposcopy; [ažurirano 5.6.2019.; pristupljeno 13.6.2019.]. Dostupno na: <https://en.wikipedia.org/wiki/Colposcopy>
 30. Ćorušić, A, Babić, D., Šamija, M., Šobat, H.: Ginekološka onkologija.. U: Ljubojević, N., Babić, S., ur. Preinvazivne promjene vrata maternice - Cervikalna intraepitelna neoplazija (CIN); Izd, Medicinska naklada, Zagreb 2005. Str. 168-173.
 31. Katki HA, Kinney WK, Fetterman B, Lorey T, Poitras NE, Cheung L, et al. Cervical cancer risk for women undergoing concurrent testing for human

- papillomavirus and cervical cytology: a population-based study in routine clinical practice. *Lancet Oncol* 2011;12:663-72.
32. Nayar R, Wilbur DC, eds. *The Bethesda system for reporting cervical cytology. Definitions, criteria, and explanatory notes.* 3rd ed. New York: Springer; 2015.
 33. Pajtler M, Ovanin-Rakić A, Audy-Jutković S: Citodijagnostika vrata maternice II. Pouzdanost diferencijalne dijagnostike. Dražančić A, Eljuga D, editors. *Prevenција i dijagnostika tumora ženskih spolnih organa.* Zagreb: Nakladni zavod globus. Hrvatsko društvo ginekologa i opstetričara. Klinika za tumore. Hrvatska liga protiv raka; 1998. P 105-113. (Croatian)
 34. Al-Nafussi AI, Colquhoun MK, Williams AR. Accuracy of cervical smears in predicting the grades of cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Gynecol Cancer* 1993;3:89-93.
 35. Zhao C, Li Z, Nayar R, Levi AW, Winkler BA, Moriarty AT et al. Prior high-risk human papillomavirus testing and Papanicolaou test results of 70 invasive cervical carcinomas diagnosed in 2012: results of a retrospective multicenter study. *Arch Pathol Lab Med* 2015;139:184-8.
 36. Schiffman M, Kinney WK, Cheung LC, Gage JC, Fetterman B, Poitras NE et al. Relative performance of HPV and cytology components of cotesting in cervical screening. *J Natl Cancer Inst* 2018;110:501-508.
 37. Rijkaart DC, Berkhof J, Rozendaal L, van Kemenade FJ, Bulkman NW, Heideman DA et al. Human papillomavirus testing for the detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia and cancer: final results of the POBASCAM randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 2012;13:78-88.

5. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 3. srpnja 1994. godine u Zagrebu gdje sam završila osnovnu školu i Prvu gimnaziju. Godine 2013. upisujem Medicinski fakultet u Zagrebu, a završavam ga 2019.godine.

U djetinjstvu sam se počela baviti košarkom što sam nastavila i tijekom studija sudjelujući u košarkaškoj sekciji. Nastupala sam na Sveučilišnom prvenstvu kao dio tima gdje smo redovito bili među prve četiri ekipe. Također sam sudjelovala na sportsko-rekreativnom natjecanju Humanijada gdje smo osvajali zlatnu medalju gotovo svake godine.

Osim igranja košarke, počela sam se baviti suđenjem utakmica i trenutno imam rang državnog suca.

Tijekom školovanja, položila sam B1 razinu DELF-a iz francuskog jezika.

Sudjelovala sam na Ljetnoj školi intervencijske radiologije u Rijeci 2018. godine.

U kolovozu iste godine provela sam mjesec dana u Houstonu na rotaciji iz kardiologije gdje sam svladala klinički pregled i početnički tečaj UZV srca.

2019. godine sudjelovala sam na skupu Praktična znanja za studente u Splitu gdje sam naučila gotovo sve vrste pregleda i vještine potrebne za rad u općoj ili hitnoj ambulanti.

Bila sam uključena i u projekt Pogled u sebe, u sklopu kojega sam održavala radionice o važnosti mentalnoga zdravlja učenicima trećega razreda srednje škole. Zbog uspješnosti i sveobuhvatnosti projekta, nagrađen je rektorovom nagradom kao jedan od najboljih timskih projekata 2019. godine.