

# Utjecaj humanoga papiloma virusa na razvoj nemelanomskih tumora kože

---

Čavka, Vlatka

Doctoral thesis / Disertacija

2016

*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:105:719953>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-27**



*Repository / Repozitorij:*

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Vlatka Čavka**

**Utjecaj humanoga papiloma virusa na  
razvoj nemelanomskih tumora kože**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2016.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Vlatka Čavka**

**Utjecaj humanoga papiloma virusa na  
razvoj nemelanomskih tumora kože**

**DISERTACIJA**

**Zagreb, 2016.**

Disertacija je izrađena na Klinici za kožne i spolne bolesti Kliničkoga bolničkog centra  
»Sestre milosrdnice«.

Voditelj rada: prof. dr. sc. Mirna Šitum, spec. dermatologije i venerologije, specijalist  
uže specijalnosti dermatološke onkologije

Suvoditelj rada: prof. dr. sc. Nada Brnčić, spec. infektologije

Rad posvećujem tati, koji me od početka moje medicinske naobrazbe poticao na znanstveni rad, te momu Mislavu, bez kojega ovaj rad nikad ne bi bio završen.

Prije svega zahvaljujem dragim roditeljima, Dubravki i Željku, na podršci, velikoj pomoći, genima i tomu što su me naučili da trudom i upornošću mogu sve postići. Bez njih ne bih bila to što jesam. Najveće hvala momu Mislavu, mojima Tvrtku i Trpimiru, te svekru i svekrvi što su podnijeli veliku žrtvu i pomogli uvijek kad je trebalo. Veliko hvala mojoj mentorici, cijenjenoj i dragoj profesorici Mirni Šitum, koja je moj potencijal prepoznala i neprestano me poticala na napredak. Zahvaljujem i svojoj komentorici profesorici Nadi Brnčić. Zahvaljujem Kristini Meljanac Salopek na izvedbi laboratorijskog dijela ovog istraživanja. Zahvaljujem docentu Tomislavu Kelavi i kolegi Antoniu Markotiću, te profesoru Mladenu Petrovečkom na statističkoj obradbi podataka. Veliko hvala Ankici Šunjić pomoćnici ravnatelja Leksikografskog zavoda Miroslav Krleža, na lektoriranju disertacije.

Izvedba ove disertacije ne bi bila moguća bez financijske pomoći moje obitelji (Bušić i Čavka) i drugih sponzora (tvrtka Coloplast Hrvatska i gospođa Marija Vlašić, gospodin Ljubo Bušić iz tvrtke Monting d.o.o. te gospodin Zdravko Galić iz tvrtke Skela-Mont d.o.o.) – svima najljepše zahvaljujem.

1. UVOD	1
1.1. Građa i razvoj kože	1
1.1.1. Epidermis	2
1.1.2. Dermis	3
1.1.3. Subcutis	4
1.1.4. Adneksi kože	4
1.1.5. Krvne i limfne žile	5
1.2 Nemelanomski tumori kože	6
1.2.1. Bazocelularni karcinom	6
1.2.2. Spinocelularni (planocelularni) karcinom	9
1.2.3. <i>Carcinoma in situ</i>	12
1.2.3.1. Morbus Bowen	13
1.2.4. Prekanceroze	14
1.2.4.1. Aktinička keratoza	15
1.3 Humani papiloma virus	17
1.3.1. Životni ciklus HPV-a	18
1.3.2. Povijest HPV-a	19
1.3.3. HPV i tumori kože	19
1.4. Ultraljubičasto zračenje	22
1.4.1. UV zračenje i HPV	23
2. HIPOTEZE	25
3. CILJEVI	25
4. MATERIJALI I METODE	26
4.1. Materijali	26
4.2. Metode	26
4.2.1. Detekcija HPV-a	26
4.2.1.1. Izolacija DNK	27
4.2.1.2. Detekcija spolnih (sluzničkih) tipova HPV-a	27

4.2.1.3. Detekcija kožnih tipova HPV-a	28
4.2.2. Određivanje razlike u insolaciji između gradova Rijeke i Zagreba	29
4.3. Statistička obradba podataka	30
5. REZULTATI	30
5.1. Deskriptivna statistika – svi ispitanici	30
5.1.1. Aktinička keratoza	32
5.1.2. Morbus Bowen	32
5.1.3. SCC s fotoeksponiranih dijelova kože iz Grada Zagreba	32
5.1.4. BCC s fotoeksponiranih dijelova kože iz Grada Zagreba	33
5.1.5. BCC s nefotoeksponiranih dijelova kože iz Grada Zagreba	33
5.1.6. SCC s fotoeksponiranih dijelova kože iz Grada Rijeke	33
5.1.7. BCC s fotoeksponiranih dijelova kože iz Grada Rijeke	33
5.1.8. SCC – ukupno	34
5.1.9. BCC – ukupno	34
5.2. Usporedba prekanceroza i <i>carcinoma in situ</i> s razvijenim karcinoma kože u uzorcima iz Grada Zagreba	34
5.2.1. AK vs SCC (uzorci iz Grada Zagreba)	35
5.2.2. MB vs SCC (uzorci iz Grada Zagreba)	36
5.3. Usporedba BCC-a s kože trupa i lica na uzorcima iz Grada Zagreba	37
5.4. Usporedba karcinoma u gradovima Zagrebu i Rijeci	38
5.4.1. Usporedba BCC-a u gradovima Zagrebu i Rijeci	39
5.4.2. Usporedba SCC-a u gradovima Zagrebu i Rijeci	40
5.5. Sluznički tipovi HPV-a (HPV 16 i 18)	41
6. RASPRAVA	43
7. ZAKLJUČAK	50
8. SAŽETAK	52



9. STRUKTURIRANI SAŽETAK NA ENGLISKOM JEZIKU	53
10. LITERATURA	54
11. ŽIVOTOPIS	73

## Kratice

AJCC	American Joint Committee on Cancer
AK	aktinička keratoza
BCC	basal cell carcinoma
DNA	deoxyribonucleic acid
DNK	deoksiribonukleinska kiselina
EGF	epidermal growth factor
ER	early region
EV	Epidermodysplasia verruciformis
HIV	human immunodeficiency virus
HPV	humani papiloma virus
IL-6	interleukin 6
IL-8	interleukin 8
LR	late region
MB	morbus Bowen
mRNK	glasnička ribonukleinska kiselina
nbUVB	narrow band Ultra Violet B
NMSC	nonmelanoma skin cancer
NMTK	nemelanomski tumori kože
npr.	na primjer
pb	parovi baza
PCR	polymerase chain reaction
pr. Kr.	prije Krista
PTCH	patched homolog
PUVA	Psoralen combined Ultra Violet A
SCC	squamous cell carcinoma
SPSS	Statistical Package for Social Sciences
TGF- $\beta$	transforming growth factor $\beta$
tj.	to jest
tzv.	takozvani

UV	ultraljubičast
UVA	ultraljubičasto A zračenje
UVB	ultraljubičasto B zračenje
UVC	ultraljubičasto C zračenje

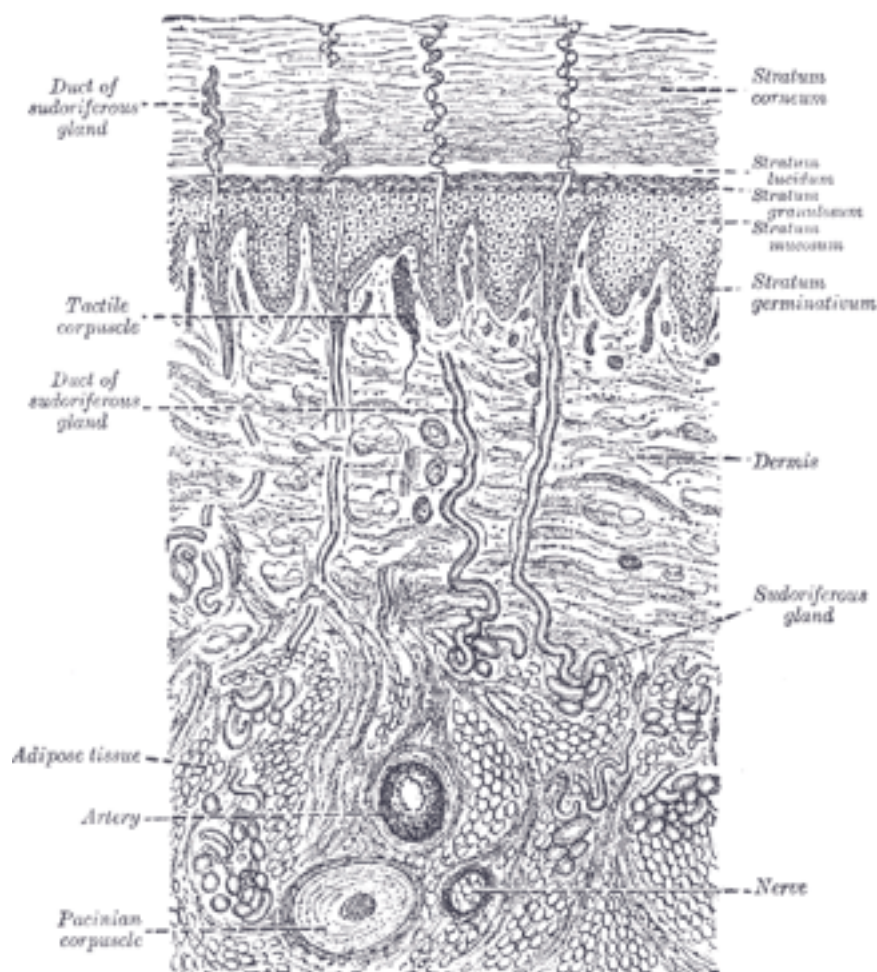
# 1. UVOD

## 1.1. Građa i razvoj kože

Koža je najveći organ ljudskoga tijela. Površina joj u odrasla čovjeka iznosi oko 1,7 m<sup>2</sup>, a sastavljena je od triju slojeva: epidermisa, dermisa i subkutisa (potkožnoga masnog tkiva). Razvija se iz dvaju zametnih listića: ektoderma i mezoderma. Sloj najbliži površini, epidermis, razvija se iz ektoderma, dok se dermis, subkutis, živci i krvne žile razvijaju iz mezoderma. Potkraj četvrtoga mjeseca gestacije epidermis dobiva konačan izgled [1]. Već tada razlikujemo temeljni sloj, iz kojega tijekom života diobom nastaju nove epidermalne stanice – keratinociti, nazubljeni sloj, zrnati sloj te rožnati (površinski) sloj. U prvom trimestru trudnoće u epidermis migriraju pigmentne stanice melanociti i neuroendokrine Merkelove stanice, podrijetlom iz neuralnoga grebena, te Langerhansove, antigen prezentirajuće stanice, podrijetla iz koštane srži [2]. U početku razvoja dermis ima veći broj stanica nego dermis razvijene kože odrasla čovjeka, a tijekom razvoja fibroblasti stvaraju kolagen, te dermis poprima vlaknastu strukturu. U trećem i četvrtom mjesecu gestacije dermis se izbočuje u slojeve epidermisa i stvara »dermalne papile«. Potkožno masno tkivo razvija se u drugoj polovici embrionalnoga razvoja. Kožni adneksi nastaju kao posljedica interakcije epidermisa i dermisa. Dlake, sebacealne i apokrine žlijezde nastaju interakcijom nakupina bazalnih epidermalnih stanica i specijaliziranih mezenhimalnih stanica [2], a ekrine žlijezde iz otočića epidermalnih stanica [1]. Nokti nastaju kao posljedica invaginacije epidermisa na distalnom dijelu prstiju između 9. i 20. tjedna embrionalnog razvoja [1]. U trećem trimestru trudnoće postupno sazrijevaju sve strukture kože, zadebljava se rožnati sloj te se povećava debljina potkožnoga masnog tkiva [3].

### 1.1.1. Epidermis

Najpovršniji sloj kože, epidermis, podijeljen je u nekoliko slojeva: stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum, stratum lucidum i stratum corneum (Slika 1). Temeljni sloj (stratum basale) čini red cilindričnih stanica velikih jezgara i oskudne citoplazme. Stanice su međusobno povezane dezmosomima, a za bazalnu membranu na kojoj leže i koja ih dijeli od dermisa povezani su hemidezmosomima. Mitotskom diobom stanica temeljnoga sloja nastaju sve stanice epidermisa, zbog čega se taj sloj naziva i germinativnim slojem [1]. Sljedeći sloj (od baze prema površini kože) jest nazubljeni sloj (stratum spinosum) nazvan prema »nazubljenomu« izgledu pojedinačnih stanica. Taj sloj sastoji se od nekoliko redova (3–7) pločastih stanica obilne citoplazme. Stanice toga sloja također su međusobno povezane dezmosomima, no gušće raspoređenima [1]. Nakon nazubljenoga sloja slijedi zrnati sloj (stratum granulosum), sastavljen 2–4 reda spljoštenih stanica. Stanice toga sloja sadržavaju keratohijaline granule bitne u procesu keratinizacije. Slijedi svijetli sloj (stratum lucidum), kojega nalazimo samo na mjestima najdebljeg epidermisa (dlanovi i tabani), između zrnatog i rožnatog sloja. Najpovršniji sloj epidermisa, rožnati sloj (stratum corneum), sastoji se od više redova spljoštenih stanica ispunjenih keratinom koje nemaju jezgara (korneociti). Površinski dio toga sloja neprekidno se ljušti, a stanice bazalnog sloja stvaraju nove keratinocite, koji putujući prema površini, prolaze proces diferencijacije. Cijeli taj proces, od stvaranja keratinocita do njegova odljuštenja, u zdravoj koži traje oko mjesec dana. Osim keratinocita u epidermisu nalazimo i druge stanice: melanocite, Langerhansove i Merkelove stanice. Pigmentne stanice, melanocite, nalazimo u temeljnom sloju epidermisa, a one su odgovorne za proizvodnju i prijenos pigmenta melanina. Melanin prenose keratinocitima epidermisa preko dendritskih nastavaka, a o njegovoj količini ovisi boja kože i dlaka [1]. U temeljnom sloju nalazimo još i Merkelove stanice, koje djeluju kao mehanoreceptori [4], a iznad temeljnoga sloja smještene su Langerhansove stanice, funkcija kojih je prezentacija antigena T limfocitima.



Slika 1. Presjek kože u poznatom anatomskom atlasu Henryja Graya (slika u javnom vlasništvu) [5]

### 1.1.2. Dermis

Sloj smješten ispod epidermisa, dermis, predstavlja glavninu kože. Podijeljen je u dva sloja: površinski ili papilarni dermis i dublji ili retikularni dermis. Vezivno tkivo dermisa sastavljeno je većinom od kolagenih vlakana, a uz njih u dermisu nalazimo i elastična vlakna te proteoglikane i glikozaminoglikane, koji čine ekstrasfibrilarni matriks [4]. Kolagena i elastična vlakna stvaraju fibroblasti, stanice koje također nalazimo u dermisu, uz mastocite, krvne i limfne žile, živce i adneксе. U dermisu možemo naći i upalne stanice, koje su u nepromijenjenoj koži uglavnom smještene oko malih krvnih žila i u vrlo malom broju. To su limfociti, plazma stanice te neutrofilni i eozinofilni leukociti [3].

### **1.1.3. Subcutis**

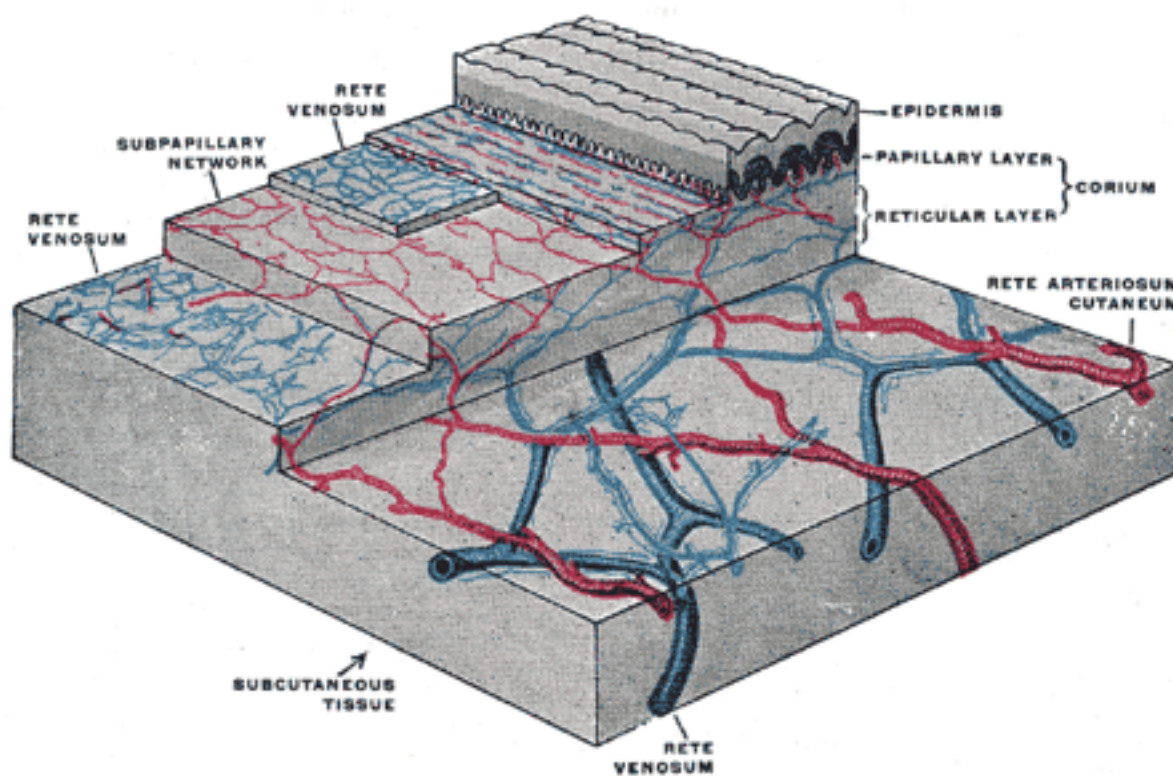
Subcutis ili potkožno masno tkivo najdublji je sloj kože, a njegova debljina uvelike ovisi o lokalizaciji na tijelu, dobi, spolu, genetskim i metaboličkim čimbenicima [4]. Sastoji se od nakupina masnih stanica koje tvore režnjeve odijeljene tračcima vezivnoga tkiva (septima) kroz koja prolaze krvne i limfne žile te živci. Na nekim područjima kože taj sloj nedostaje (npr. na nosu, vjeđama, uškama, penisu, skrotumu, velikim i malim usnama) [3].

### **1.1.4. Adneksi kože**

U adneksu kože ubrajamo nokte, dlake i žlijezde. Od žlijezda razlikujemo znojnice, mirisne žlijezde, lojne (sebacealne) žlijezde te mliječne žlijezde [3]. Znojnice (glandulae sudoriferae) jesu ekrine žlijezde sastavljene od zavijenih sekretornih dijelova smještenih duboko u dermisu i potkožnom masnom tkivu te dugačkoga odvodnog kanala koji prolazi cijelim dermisom i epidermisom te se otvara na površini kože. Mirisne žlijezde (glandulae sudoriferae maiores) također su građene po tipu jednostavnih zavijenih tubulusnih žlijezda, a odvodni kanal otvara im se u dlačne folikule [3]. Lojnice (sebacealne žlijezde) nalaze se uz dlačni folikul u kojega, nakon kontrakcije dlačnog mišića arektora, prazne svoj sekret. Na nekim posebnim lokalizacijama (npr. male usne, anus, prepucij) dolaze u obliku slobodnih žlijezda, nevezano uz dlačni folikul [3]. Najveća žlijezda u koži jest mliječna žlijezda (mamma), složena alveotubulusna žlijezda sastavljena 15–20 međusobno odvojenih režnjeva [3]. Osim žlijezda u adneksu ubrajamo i orožale nitaste tvorbe, dlake, te rožnate tvorevine, nokte. Nokti su po građi slični koži i sastoje se od epidermalnog i vezivnog dijela. Rastu proliferacijom stanica matice nokta cijeloga života [3].

### 1.1.5. Krvne i limfne žile

Krvne i limfne žile nalaze se u dermisu (Slika 2). Arterije i prateće limfne žile skupljene su u dvije krvožilne mreže, između papilarnog i retikularnog dermisa (plexus arteriosus subpapillaris), te između dermisa i potkožnoga masnog tkiva (plexus arteriosus cutaneus) [3]. Vene nalazimo u četiri mreže: ispod papila, na granici papilarnog i retikularnog dermisa, između dermisa i potkožnoga masnog tkiva te u potkožnom masnom tkivu.



Slika 2. Shema krvnih žila kože u poznatom anatomskom atlasu Henryja Graya (slika u javnom vlasništvu) [5]



## 1.2. Nemelanomski tumori kože

Nemelanomski tumori kože (NMTK) nastaju iz stanica koje nisu melanociti. Najčešći NMTK-i ujedno najčešći tumori kože uopće, jesu bazocelularni karcinomi (BCC). Po učestalosti ih slijede spinocelularni (planocelularni) karcinomi (SCC), a u NMTK-e ubrajaju se i mnogobrojni rijetki tumori, kao što su karcinom Merkelovih stanica, angiosarkom, kožni limfomi T i B stanica, dermatofibrosarcoma protuberans, tumori adneksa te metastatski karcinomi u koži. U središtu su ovog istraživanja BCC-i i SCC-i, kao i lezije koje im prethode. Tako se SCC-i najčešće razvijaju iz *carcinoma in situ* tijekom duljega vremenskog razdoblja [6], a potencijal prelaska u SCC imaju i prekanceroze. U ovom istraživanju korišteni su uzorci Morbus Bowena (MB) kao *carcinoma in situ* te aktiničke keratoze (AK) kao prekanceroze.

### 1.2.1. Bazocelularni karcinom

Bazocelularni karcinom (BCC) lokalno je agresivan zloćudni epitelni tumor kože koji u iznimno rijetkim slučajevima metastazira. Potječe od stanica temeljnoga sloja epidermisa ili vanjske ovojnice folikula dlake, tj. matičnih stanica korijena dlake [7]. Dokaz je za to i ekspresija keratina 5 i 14 u tim tumorima koje nalazimo u stanicama vanjske ovojnice dlake [7]. Najčešći je tumor kože, a javlja se u starijoj životnoj dobi, najčešće između 50. i 80. godine života, te u osoba svijetle puti (tip kože I i II) [6]. Velika većina tih tumora javlja se na glavi (najčešće na licu) [8], a nastaju na klinički nepromijenjenoj koži (što ih razlikuje od SCC-a). U patogenezi BCC-a najveću ulogu ima ultraljubičasto (UV) zračenje, no bitni su i drugi čimbenici (genetski utjecaj, kemijski karcinogeni, imunosupresija i ionizirajuće zračenje) [7]. Iako je uloga UVB zračenja u nastanku BCC-a puno veća, ulogu u nastanku imaju i UVA zrake [9]. UV zračenje uzrokuje mutacije DNK. Za UVB induciranu mutaciju karakteristična je translokacija citozina u timin [7], što može uzrokovati ili aktivaciju onkogena ili inaktivaciju gena supresora tumora, što pak dovodi do početka karcinogeneze [10]. UV zračenjem uzrokovane promjene na nukleotidima dvaju gena supresora tumora (p53 i PTCH) povezane su s ranim razvojem BCC-a [11]. Doza primljenog UV zračenja tijekom se života akumulira, što dovodi do nastanka tih tumora, nakon duljega razdoblja latencije. BCC

najčešće nalazimo upravo na fotoeksponiranim područjima kože, češći je u zemljopisnim područjima s većim brojem sunčanih dana [12], a povećana učestalost tih tumora povezana je i s upotrebom umjetnih izvora svjetlosti (solarija) [13, 14]. Osim UV zračenja pretpostavlja se da u patogenezi BCC-a ulogu imaju i genetski čimbenici. Iako je mutacija gena supresora tumora (PTCH) utvrđena na 9. kromosomu (9q22.3) samo kod bolesnika sa sindromom bazocelularnog nevusa (Gorlin-Goltzov sindrom), i kod sporadičnih BCC-a nalazimo mutacije gena. Tako je u sporadičnim tumorima utvrđen poremećaj »hedgehog« signalnog puta, inhibicijom kojega dolazi do stanične hiperproliferacije [15]. O utjecaju genetskih čimbenika govori i činjenica kako se ti tumori češće javljaju u osoba svijetle puti tj. tipa kože I i II [6]. Od kemijskih karcinogena kao mogućih uzročnika BCC-a spominje se arsen. Tako su u prošlosti osobe izložene arsenu, bilo radi potreba liječenja bilo onečišćenosti vode, imale veću pojavnost BCC-a [6]. Ionizirajuće zračenje također može dovesti do razvoja BCC-a, s dugim razdobljem latencije. Imunosupresija je također jedan od čimbenika u patogenezi BCC-a. Smanjeni T-stanični odgovor povećava rizik za razvoj BCC-a, zbog čega su ti tumori česti u bolesnika s transplantiranim organom. Na kraju, BCC može nastati i na kronično oštećenoj koži, npr. u kroničnoj rani ili u području ožiljka. Postoje različiti klinički oblici BCC-a (superficialni, nodularni, cistični, ulcerozni, pigmentirani, morfeiformni i sklerozirajući), a najznačajnije karakteristike većine oblika jesu erozija ili ulceracija, krvarenje, perlasto sjajna površina, uzdignuti rubovi i površinske teleangiektazije (Slika 3).



Slika 3. Bazocelularni karcinom

Najčešći je oblik nodularni, a uz prije nabrojene češće tipove BCC-a postoje i rijetki oblici, kao što su fibroepiteliom ili Pinkusov tumor, polipoidni, metatipični te metastatski BCC [7]. Iako BCC iznimno rijetko metastazira ( $< 0,1\%$ ), najčešće su metastaze u limfne čvorove, kosti i pluća [16, 17]. Prognoza je za bolesnika s BCC-om odlična, a stopa preživljenja gotovo 100% ako se tumor ekscidira u cijelosti i na vrijeme. U slučaju dugotrajne progresije može doći do lokalne destrukcije, zahvaćanja dubljih struktura i disfiguracije (posebno na licu), a postoje i neki lokalno iznimno agresivni oblici BCC-a, kao što su ulcerirajući BCC (Carcinoma basocellulare exulcerans ili ulcus rodens), morfeiformni (Carcinoma basocellulare morpheiforme) i metatipični karcinom (Carcinoma basocellulare metatypicum). Iako je prognoza BCC-a odlična, postoje rizici recidiva tumora ili pojave novoga [18, 19]. Tako je rizik pojave novog BCC-a 35% unutar tri godine, a 50% unutar pet godina [20]. Patohistološki kod tih tumora nalazimo proliferaciju stanica, kojih jezgre nalikuju stanicama bazalnoga sloja epidermisa, te na rubovima navedenih proliferacija cilindrične, palisadno poredane stanice. Tumorske stanice mogu biti povezane s epidermisom ili udaljene od njega [21]. Epidermis može biti atrofičan ili ulceriran, a u slučaju ulceracije u stromi postoji upalna reakcija. Terapijski je cilj ukloniti tumor u cijelosti uz što bolje očuvanje funkcije i što prihvatljiviji estetski rezultat. U velikoj je većini slučajeva terapija izbora kirurška [22]. S obzirom na radiosenzitivnost jedna je od terapijskih mogućnosti i radioterapija, koja se primjenjuje kod opsežnih, uznapredovalih tumora te u slučaju kontraindikacija za kirurški zahvat. Radioterapija je terapija izbora i kod recidivirajućih tumora, a može se koristiti i postoperativno [23]. Kod površinskih i manjih BCC-a u obzir dolaze i terapija različitim lokalnim pripravcima (5-fluorouracil, interferon, imiquimod, tazaroten) te fotodinamska terapija. Nove su terapijske mogućnosti inhibitori »hedgehog« signalnog puta (vismodegib i sonidegib) [24, 25].

## 1.2.2. Spinoceleularni (planocelularni) karcinom

Spinoceleularni karcinom (SCC) jest zloćudni, invazivni tumor koji potječe od suprabazalnih epidermalnih keratinocita. Može nastati i u adneksima kože te u sluznicama koje imaju sposobnost orožnjavanja [21]. Invazivni SCC razvija se iz *in situ* karcinoma (kao što je MB) tijekom duljega razdoblja [6], pri čemu tumorske stanice nalazimo ispod bazalne membrane, u dermisu, u obliku nakupina (tj. »gnijezda«) okruženih upalnim infiltratom. Drugi je po učestalosti tumor kože, nakon BCC-a, a također se javlja u starijoj životnoj dobi (od 60. do 80. godine), češće kod osoba svjetlije puti (tip kože I i II) [6]. No u novije vrijeme sve je više pokazatelja za pojavnost ovih tumora u mlađoj životnoj dobi [26]. Znakovi zloćudnosti SCC-a jesu lokalni destruirajući rast te mogućnost metastaziranja u limfne čvorove i udaljene organe. Ti su tumori najčešće lokalizirani u području glave i vrata, gdje mogu uzrokovati značajnu disfiguraciju destrukcijom okolnih struktura i perineuralnom invazijom. U patogenezi najveću ulogu ima UV zračenje, poglavito UVB, a od drugih čimbenika spominju se kemijski karcinogeni, kronični upalni procesi, životne navike, genetski čimbenici, ionizirajuće zračenje, imunosupresija i onkogeni virusi (humani papiloma virus-HPV). UVB zračenje uzrokuje oštećenja DNK koja dovode do mutacija gena supresora tumora p53. Navedene mutacije utvrđene su i u prekursorskim lezijama i drže se ključnima za početak invazivnoga SCC-a [27]. Opetovanim izlaganjem UV zračenju dolazi do klonalne ekspanzije keratinocita, nakupljanja genetskih mutacija i u konačnici razvoja invazivnoga tumora. Stoga kronična izloženost UV zračenju, bilo zbog vrste zanimanja (npr. poljoprivrednici, ribari, pomorci) bilo zbog terapijskih potreba (fototerapija) ili estetskih razloga (solarij), povećava rizik za razvoj SCC-a. O ulozi UV zračenja govori i povećana pojavnost toga tumora u bolesnika s albinizmom, koji zbog nedostatka melanina nemaju zaštitu od UV inducirane karcinogeneze [28]. Isto tako zbog nasljednoga poremećaja u mehanizmu popravka UV induciranih oštećenja DNK bolesnici s xerodermom pigmentosum skloni su razvoju SCC-a [29]. Imunosupresija je jedan od čimbenika koji također povećavaju rizik za razvoj SCC-a. Dokaz tomu jest višestruko povećan rizik za nastanak tih tumora kod osoba s transplantiranim organom (jatrogena imunosupresija), kao i kod osoba sa stečenim sindromom imunodeficijencije (AIDS) [30, 31]. Uz to osobe s imunodeficijencijom razvijaju agresivnije, slabije diferencirane tumore [32]. Da ulogu u patogenezi igraju i genetski

čimbenici, govore podatci o češćoj pojavi tih tumora u osoba svijetle puti (tip kože I i II), plavih očiju i plave ili crvene kose te utvrđene promjene na sedam gena (TP53, PIK3CA, CCND1, CDKN2A, SOX2, NOTCH 1, FBXW7) u različitim vrstama SCC-a (uključujući i SCC kože) [33]. Od kemijskih karcinogena koji imaju ulogu u patogenezi SCC-a spominju se arsen, kemijske tvari u proizvodnji nafte, katrani, aromatski ugljikovodici i duhan [6]. Duhan je uz alkohol najznačajniji čimbenik rizika za pojavu SCC-a u usnoj šupljini [34]. Mjesta kronične upale ili oštećenja kože predisponirajuća su za razvoj SCC-a (npr. ožiljci od opeklina, radiodermatitis i kronične rane). SCC se može razviti i na mjestima nekih kroničnih dermatoza (npr. kronični kutani eritemski lupus, erozivni oralni lihen planus, lupus vulgaris i dr.), a povećanu učestalost nalazimo i kod junkcijske i distrofične bulozne epidermolize gdje, SCC predstavlja vodeći uzrok smrti tih bolesnika [35, 36]. Uloga HPV-a poznata je dulje vrijeme u slučaju SCC-a usne šupljine i genitalnoga područja, a HPV 16 najčešće je izoliran tip u tumorima područja glave i vrata [37]. No sve je više dokaza kako i drugi tipovi HPV-a (kožni ili tzv. Epidermodysplasia verruciformis tipovi) djeluju kao sučimbenici u nastanku tih tumora. Kliničke karakteristike tih tumora jesu ljuskanje, hiperkeratoza, ulceracija i krusta (Slika 4).



Slika 4. Spinocelularni karcinom

SCC najčešće počinje kao keratotična ili verukozna tvorba, a povećavajući se nastaje ulceracija ili nekroza [6]. Nekoliko posebnih oblika SCC-a svrstava se u verukozne tumore, tj. tumore relativno indolentnoga kliničkog tijeka koji su patohistološki obilježeni minimalnom staničnom atipijom [38]. To su papilomatosis cutis carcinoides, papilomatosis oralis florida, epitelioma cuniculatum i keratoacanthoma. Iako SCC obično nije smrtonosan, može uzrokovati značajnu mutilaciju (posebno u području lica i vrata, gdje su i najčešći), a u slučaju pojave metastaza značajno smanjuje stopu preživljenja [39]. Metastaze mogu biti u limfne čvorove i udaljene ograde (najčešće pluća). Neki oblici SCC-a drže se visokorizičnima i povezani su s lošijom prognozom. Riječ je o tumorima većim od 2 cm, slabo diferenciranim tumorima, onima koji invadiraju potkožno masno tkivo (i dublje strukture) te tumorima lokaliziranim na usnama, uškama, anogenitalnoj regiji ili u području ožiljka ili kronične rane. Perineuralna invazija i recidiv također se drže lošim prognostičkim čimbenicima [40]. Patohistološki kod tih tumora u epidermisu nalazimo prekomjerno orožnjenje i staničnu atipiju, dok u dermisu nalazimo tračke atipičnog epidermisa, unutar kojih se nalaze područja orožnjenja (perle). U vezivnoj stromi nalazimo gust infiltrat limfocita i plazma stanica [21]. Ovisno o stupnju diferenciranosti stanica razlikujemo četiri histološka stupnja (stupnjevi prema Brodersu), a viši stupanj donosi lošiju prognozu.

U klasifikaciji SCC-a služimo se »TNM« klasifikacijom AJCC-a (American Joint Committee on Cancer), koja se temelji na veličini tumora i proširenosti bolesti (Tablica 1).

<b>stadij</b>	<b>primarni tumor</b>	<b>regionalni limfni čvorovi</b>	<b>udaljene metastaze</b>
<b>stadij 0</b>	Tis	N0	M0
<b>stadij I</b>	T1	N0	M0
<b>stadij II</b>	T2	N0	M0
<b>stadij III</b>	T3	N0	M0
	T1-3	N1	M0
<b>stadij IV</b>	T4	N0	M0
	bilo koji T	N2-3	M0
	bilo koji T	bilo koji N	M1

Tablica 1. TNM klasifikacija

Terapija tih tumora uglavnom je kirurška, a prednost ima mikroskopski kontrolirana kirurgija [41]. U slučaju tumora manjih od 1 cm u obzir dolaze i druge terapijske mogućnosti, kao što su krioterapija, kiretaža i elektrodisekcija [42]. U slučaju kontraindikacija za kirurško liječenje te u slučaju nekih posebnih lokalizacija tumora (npr. na vjeđi, usnici i sl.) u obzir dolazi radioterapija malim, frakcioniranim dozama, koja se može koristiti i postoperativno kod visokorizičnoga SCC-a i regionalnih metastaza [43]. U slučaju metastatske bolesti potrebna je kemoterapija, a nekoliko studija govori o uspješnosti cetuximaba (kimeričnog IgG monoklalnoga protutijela), inhibitora receptora epidermalnoga čimbenika rasta [44, 45].

### **1.2.3. Carcinoma in situ**

Pod *carcinoma in situ* podrazumijevamo intraepidermalne karcinome koji tijekom vremena mogu prijeći epidermo-dermalnu granicu i postati invazivni. Toj skupini pripadaju MB, Erythroplasia Queyrat, Bowenoidne papule penisa i vulve te Pagetova bolest [6, 46]. Pagetova bolest jest intraepidermalni adenokarcinom, a razlikujemo mamarni i ekstramamarni oblik koji se javlja na područjima kože s apokrinim žlijezdama (pazusi i anogenitalno područje). Bowenoidne papule nalazimo na muškom (penis) ili ženskom vanjskom spolovilu (vulva), a patohistološki odgovaraju intraepitelnoj neoplaziji visokoga stupnja [46]. Klinički se razlikuju od drugoga *in situ* karcinoma genitalne regije, Erythroplasiae Queyrat, jer je riječ o multiplim crvenkasto-smečkastim, djelomično verukoznim papulama ili plakovima [46]. S druge je strane Erythroplasia Queyrat eritematozni, oštro ograničen plak najčešće lokaliziran na glansu penisa. Etiološki *in situ* karcinomi genitalne regije (Erythroplasia Queyrat i Bowenoidne papule) povezani su s visokorizičnim tipovima HPV-a 16 i 18 [42]. S navedenim HPV tipovima u vezu se dovodi i MB, no rizik progresije u invazivni karcinom veći je u slučaju genitalne lokalizacije [42].

### 1.2.3.1. Morbus Bowen

Morbus Bowen (MB) jest *in situ* karcinom s mogućnošću prelaska u invazivni karcinom [6]. Bolest se javlja u starijoj populaciji (iznad 60. godine) i češća je u osoba svijetle puti (tip kože I i II) [47]. Najčešće se javlja na fotoeksponiranim područjima kože, no može se javiti i na nefotoeksponiranim dijelovima, što je češće u osoba tamnije puti [48]. Bolest nalazimo i na sluznicama (usna šupljina i vanjsko spolovilo). Najčešći uzrok MB-a u prošlosti bila je izloženost arsenu, ali danas se sve više kao uzrok spominje HPV [49]. Najčešće je izoliran HPV-16, no i drugi visokorizični tipovi HPV-a (18, 31, 33 i drugi) [50, 51]. S obzirom na dob u kojoj se najčešće javlja te na distribuciju, utjecaj UV zračenja mora biti značajan u etiopatogenezi tih tumora [52], kao i imunosupresija, s obzirom na to da imunosuprimirani bolesnici razvijaju multiple i agresivnije tumore [53]. U etiologiji se još spominju i genetski čimbenici te kemijski karcinogeni, a o ulozi ionizirajućeg zračenja svjedoči prijašnja učestala pojava te bolesti na prstima šaka specijalista radiologije i doktora dentalne medicine (profesionalna izloženost ionizirajućemu zračenju) [42]. Klinički se očituje kao ograničen eritematozni plak, nepravilna ruba, prekriven ljuskama i krustama (Slika 5).



Slika 5. Morbus Bowen



Patohistološki u proširenom epidermisu kroz sve slojeve nalazimo atipične stanice s velikim jezgrama, diskeratotične stanice i mitoze [6]. Ponekad su epidermalne stanice vakuolizirane (tzv. pagetoidne stanice), a u dermisu nalazimo upalni infiltrat limfocita i plazma stanica [21]. Terapija ovisi o brojnim čimbenicima (veličini, broju lezija, lokalizaciji). U većini slučajeva prednost se daje kirurškomu liječenju [54], a u obzir dolaze i krioterapija tekućim dušikom, kiretaža, lokalna terapija primjenom 5-fluorouracila ili imiquimoda te fotodinamska i radioterapija [55].

#### **1.2.4. Prekanceroze**

Lezije koje imaju potencijal preći u invazivni SCC nazivaju se prekanceroze. One su u patohistološkom smislu *carcinoma in situ*, ali mogu regredirati ili perzistirati u tom obliku, a samo rijetko prelaze u invazivni SCC (u 5–10% slučajeva) [56]. U prekanceroze ubrajamo aktiničke, arsenske, iradijacijske i katranske keratoze, kronični aktinički heilitis, cornu cutaneum i leukoplakiju. Kao posljedica oštećenja kože izazvanih ionizirajućim zračenjem, dugotrajnom izloženošću katranima, derivatima nafte ili arsenu nastaju ograničene hiperkeratotične lezije s potencijalom prelaska u SCC. Kronični aktinički heilitis nalazimo na donjoj usni kao posljedicu dugotrajne izloženosti UV zrakama [38]. Cornu cutaneum rožnata je izraslina na makuloznoj, papuloznoj ili nodularnoj bazi. Najčešće je hipertrofični oblik aktiničke keratoze (AK), no u podlozi se mogu nalaziti i *in situ* karcinom, ili čak invazivni tumor te benigne promjene (npr. vulgarna veruka) [57]. Leukoplakija je prekanceroza oralne i genitalne sluznice, a razlikujemo različite kliničke oblike (verukozni, erozivni i drugi oblici). Verukozni oblik leukoplakije ima povećan rizik preći u invazivni karcinom, a povezan je i s HPV-om [38]. Najčešća prekanceroza i jedna od najčešćih lezija na koži uopće jest AK.

### 1.2.4.1. Aktinička keratoza

Aktinička keratoza (AK) najčešće se očituje u obliku multiplih promjena na fotoeksponiranim dijelovima kože u starijih osoba svijetle puti [38, 58]. Klinički se najčešće manifestira kao eritematozna ili smečkasta lezija hrapave površine, koja pak može biti manje ili jače ljuskava (Slika 6).

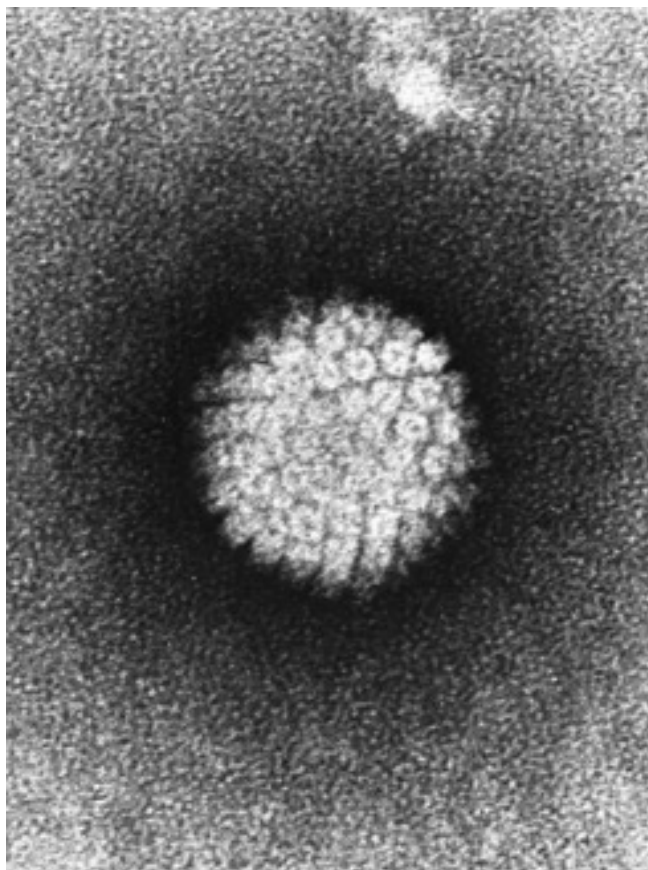


Slika 6. Aktinička keratoza

U početku su promjene diskretne, pa ih bolje možemo uočiti palpacijom nego inspekcijom, no s vremenom postaju elevirane i hiperkeratotične [59]. Najvažniji etiopatogenetski čimbenik u nastanku tih promjena jest UVB zračenje [60]. Učestalost pojave AK-a povećava se s dobi, te je veća u osoba koje su više izložene UV zračenju, bilo zbog zanimanja (npr. poljoprivrednici i pomorci) bilo zbog zemljopisnoga položaja (život u zemljama bližim ekvatoru) [58, 61, 62]. Promjene se javljaju na područjima dugotrajne izloženosti UV zračenju [63, 64], koje uzrokuje DNK oštećenja, tj. oštećenja gena supresora tumora p53 i p16 [65, 66]. Povećana pojavnost tih promjena jest i kod imunosuprimiranih bolesnika (npr. bolesnika nakon transplantacije organa) [67], a kao mogući sučimbenik u nastanku spominje se i HPV [68]. Patohistološki nalazimo hiperkeratozu i parakeratozu, pleomorfizam bazalnih keratinocita i diskeratotične stanice. Prisutni su i znakovi solarne elastoze, a u dermisu nalazimo gusti upalni infiltrat [57]. Dlačni folikuli, sebacealne žlijezde te izvodni kanali apokrinih i ekrinih žlijezda obično nisu zahvaćeni [69]. Atipični keratinociti progrediraju od bazalnog sloja prema površini epidermisa, a stupanj navedene progresije razlikuje ih od MB-a [70]. U liječenju se najčešće primjenjuje krioterapija koja dovodi do potpunog izlječenja u 67–88% slučajeva [71, 72]. Ostale su mogućnosti lokalna terapija 5-fluorouracilom, imiquimodom ili natrijevim diklofenakom [73, 74] te fotodinamska terapija. I neke dermokozmetičke metode kojima se uklanja epidermis mogu se primjeniti u terapiji AK-a (npr. srednje duboki i duboki kemijski piling, dermoabrazija i ablativni laserski tretman). [75]. Kod sumnje na invazivni karcinom i u slučaju rezistentnih AK-a, preporučuje se ekscizija u cijelosti. Iako su AK-i lezije s potencijalom prelaska u invazivni SCC, većina njih ipak ne prelazi. S druge strane u većini invazivnih SCC-a nalazimo dokaze o preegzistirajućem AK-u [76]. Promjene koje ne prijeđu u SCC mogu spontano nestati ili ostati nepromijenjene godinama [76].

### 1.3. Humani papiloma virus

Humani papiloma virus (HPV) dvolančani je DNK virus, sferoidna oblika, promjera 50–55 nm, koji pripada porodici Papillomaviridae (Slika 7). DNK HPV-a ima 7200–8000 parova baza koje su podijeljene u tri regije: nekodirajuća regija, rana regija – ER (engl. early region) i kasna regija – LR (engl. late region). ER većine genotipova HPV-a sadržava gene koji kodiraju za šest proteina potrebnih za razmnožavanje virusa – E1, E2, E4, E5, E6 i E7. Neki od tih proteina bitni su i u procesu karcinogeneze (E6 i E7) [77, 78]. Ovisno o dijelu genoma LR koji kodira glavni strukturalni protein L1, papiloma virusi podijeljeni su u rodove ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\mu$  i  $\nu$ ), vrste i tipove. Danas je identificirano preko 200 tipova virusa [79], od kojih je oko 100 patogeno za čovjeka, a svakodnevno se otkrivaju i novi HPV tipovi [80-89]. Virusi roda  $\alpha$  uglavnom inficiraju epitel sluznice, dok virusi roda  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\mu$  i  $\nu$  imaju afinitet prema epitelu kože. Čak 51 tip HPV-a može inficirati genitalnu sluznicu [90], a od navedenih razlikujemo visokorizične (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 i 82) i niskorizične tipove (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 i CP6108) za karcinogenezu [91]. Nakon što su određeni tipovi HPV-a otkriveni u rijetkoj genetskoj bolesti Epidermodysplasiji verruciformis (EV) nazvani su kožnim tipovima HPV-a i upravo su oni povezani s etiopatogenezom NMTK-a. To su HPV 5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 19–25, 36–38, 47, 49, 75, 76, 80, 92, 93 i 96.



Slika 7. HPV elektronski migrogram (javno vlasništvo, nepoznati autor – Laboratory of Tumor Virus Biology, National Cancer Institute Rockville, Maryland, SAD)

### 1.3.1. Životni ciklus HPV-a

HPV inficira rožnati sloj epidermisa te ulazi u stanice bazalnog sloja. U tim stanicama virus opstaje u obliku ekstrakromosomalnih elemenata i ubrzano se replicira do oko 50–100 kopija genoma po stanici. Infekcija je izglednija u slučaju ozljede kože. S obzirom na to da dolazi do diferencijacije keratinocita, dolazi i do procesa amplifikacije virusa. Usporedo s tim dolazi i do procesa sinteze proteina kapside i konačnog oslobađanja viriona. Stanična i virusna replikacija sinkronizirane su, te je za amplifikaciju genoma virusa potreban aktivan stanični ciklus keratinocita [92]. Životni ciklus virusa razlikuje se kod različitih rodova. Tako je za amplifikaciju visokorizičnih tipova roda  $\alpha$  potrebna aktivacija »ataxia telangiectasia« puta, a za tipove roda  $\beta$  nije. Dok visokorizični tipovi HPV-a stimuliraju proliferaciju u stanicama bazalnog sloja degradacijom pRb i p107 [93], niskorizični tipovi stimuliraju

proliferaciju u srednjim i gornjim slojevima epidermisa, jer njihovi E7 proteini inhibiraju samo p130 [94]. E5 protein, koji kod HPV-a roda  $\alpha$  potiče amplifikaciju genoma barem djelomično preko stabilizacije receptora epidermalnog čimbenika rasta (EGF), nedostaje kod virusa roda  $\beta$  [95].

### 1.3.2. Povijest HPV-a

Za razliku od virusa HIV-a, koji se kod čovjeka pojavio prije 30-ak godina, čini se da HPV »napada« ljudsku vrstu od samih njezinih početaka [96]. Godine 1974. na autopsiji egipatske mumije Nakht iz 12. stoljeća pr. Kr. utvrđena je vulgarna veruka na koži tabana, što se drži najranijim nalazom vulgarne veruke [97]. Kondilome spominje i Hipokrat u 5. stoljeću pr. Kr. [96], a i sama riječ kondilom dolazi od grčke riječi κόνδυλος, što znači šaka ili udarac šakom [98]. Kondilome spominje i rimski enciklopedist Celsus u 1. stoljeću nakon Krista, te poslije u 2. stoljeću i Galen [96], koji će preko tisuću godina sloвити kao vrhunski medicinski autoritet [99]. Na aragonskoj mumiji iz ranoga novog vijeka u Napulju opisana je pedunkularna tvorba ingvinalno te po prvi puta na mumiji molekularnom metodom utvrđen HPV [100]. Iako postoje ozbiljne sumnje u mogućnost izolacije drevne DNK [101], ona postaje danas nezaobilazni dio paleopatologije te otvara nove poglede u patocenuzu prošlosti.

### 1.3.3. HPV i tumori kože

O HPV-u se najviše govori u kontekstu rizika za razvoj cervikalnog karcinoma. Perzistirajuća infekcija visokorizičnim HPV tipovima roda  $\alpha$  nužna je za razvoj cervikalnog karcinoma, pa su gotovo svi cervikalni karcinomi HPV pozitivni [102]. HPV virus predstavlja veći rizik za razvoj cervikalnog karcinoma nego što to predstavlja pušenje za karcinom pluća ili virus hepatitisa B za karcinom jetre [102, 103]. U dermatologiji HPV uzrokuje široki raspon bolesti, od običnih virusnih bradavica, preko kondiloma genitalne regije s onkogenim potencijalom do NMTK-a, koji su i tema ove rasprave. Za HPV kao mogući uzrok karcinoma kože zna se već 30-ak godina. Stefania Jablonska i Gerard Orth otkrili su 1978. HPV 5 u tumorima kože, [104] a još prije (1972.) otkrivena je poveznica između HPV-a i tumora kože kod EV-a [105]. Toj iznimno rijetkoj, autosomno recesivnoj bolesti možemo zahvaliti za

današnje spoznaje o HPV-u kao mogućem uzroku nastanka NMTK-a [106]. Najmanje 30% bolesnika oboljelih od EV-a razvit će SCC, a u oko 90% ovih tumora, nalazi se HPV 5 ili HPV 8 [107]. I danas HPV 5 jest tip s najvećom prevalencijom u svijetu (ukupna prevalencija 6,5%), tj. najčešće izoliran tip HPV-a [108]. U literaturi se kožni tipovi HPV-a nazivaju i EV HPV tipovi (najčešće HPV 5 i 8, potom HPV 2, 3, 10, 12, 14, 15, 17, 19–25, 34, 47, 50) i oni su u mnogobrojnim istraživanjima povezani s NMTK-ima u imunokompetentnih bolesnika. Tek posljednjih 20-ak godina intenzivno se provode istraživanja o HPV-u kao uzroku ili sučimbeniku nastanka prekanceroza i NMTK-a [109]. Prvo veće istraživanje na imunokompetentnim bolesnicima kojim je utvrđena poveznica između HPV-a i SCC rađeno je u Australiji [110]. Bili su to početci istraživanja HPV-a kao mogućega sučimbenika u nastanku NMTK-a, no odgovor na pitanje kolika je stvarna uloga virusa i danas ostaje nepoznat. Naime, HPV DNK nalazimo u keratinocitima zdravih ljudi, a infekcija perzistira i nekoliko godina [111, 112]. Virus napada isključivo epitelne stanice kože i sluznica, te se lako i brzo prenosi kontaktom (deskvamiranim zaraženim keratinocitima) [113], a dokazan je i porast protutijela na različite HPV tipove s dobi čovjeka [114-117]. Kod članova iste obitelji utvrđeni su jednaki tipovi HPV-a [111, 118, 119]. Sve navedeno govori o velikoj proširenosti HPV infekcije u općoj populaciji.

Kod zdravih imunokompetentnih bolesnika riječ je o latentnoj infekciji koja ne mora imati kliničko značenje, no kod imunokompromitiranih osoba češće dolazi do bolesti kože uzrokovanih virusima te razvoja NMTK-a. Glavni mehanizam imunosti protiv HPV infekcije jest T-stanična imunost, dok je humoralni odgovor na infekciju slab [120, 121]. Upravo zbog toga oslabljena stanična imunost (nasljedna, stečena ili jatrogena) dovodi do povećane prijemljivosti za infekciju HPV-om. Tako su HPV infekcije najčešće infekcije u bolesnika s presađenim bubregom [118, 122], a infekcija virusom HIV-a uvelike povećava rizik od HPV infekcije [123]. Uz to HPV DNK češće je utvrđivana na površini tumora kože nego u njihovim biopstatima [124], iz čega proizlazi pitanje je li HPV uistinu odgovoran za patogenezu tumora kože ili je samo slučajan nalaz. Objašnjenje koje se nudi u literaturi jest tzv. »hit and run« teorija, a temelji se na mišljenju kako je HPV nuždan za početak stvaranja NMTK-a, a nepotreban nakon što prekanceroza prijeđe u karcinom. Naime, u ranoj regiji genoma virusa nalaze se, među ostalim, onkogeni (E6 i E7). Oni kodiraju proteine koji sudjeluju u staničnoj transformaciji i dovode do imortalizacije te, posljedično tomu,

hiperproliferacije keratinocita. Najprije su otkriveni u visokorizičnim tipovima HPV 16 i 18 i drže se odgovornima za nastanak cervikalnog karcinoma [77], a poslije je potvrđeno njihovo postojanje i u nekim kožnim tipovima HPV-a (HPV 5, 8, 38, 77) koji se dovode u vezu s nastankom NMTK-a. [125-128]. E7 onkoproteini inaktiviraju supresorske proteine p53 i pRb, dok E6 onkoproteini sprječavaju UV induciranu apoptozu u zaraženim stanicama [124, 129]. Ipak, isti onkogeni (E6 i E7) različito djeluju u poticanju proliferacije keratinocita kod visokorizičnih HPV tipova roda  $\alpha$  i kožnih HPV tipova roda  $\beta$  [130]. Razlika je i u utjecaju na DNK domaćina, tako se DNK visokorizičnih tipova HPV-a može integrirati u DNK domaćina, a HPV DNK ostalih tipova perzistira u staničnoj jezgri u obliku episoma, odvojeno od DNK domaćina [131]. Mnogi tipovi HPV-a imaju sposobnost utjecaja na stanični ciklus umnažanjem genoma u suprabazalnim slojevima epidermisa, no za razliku od visoko rizičnih HPV tipova ne podupiru opsežniju staničnu proliferaciju i progresiju preko mitozu [130]. E6 proteini različitih HPV tipova (najviše HPV 5 i 8) djeluju tako da smanjuju sekreciju IL-8, koji »upozorava« okolno tkivo na oštećenje izazvano UV zračenjem, što pogoduje nakupljanju mutacija [127], a u slučaju destabilizacije genoma smanjuju stabilizaciju p53 proteina i na taj način uzrokuju poremećaj proliferacije [132]. Također interakcijom s p300 histonom smanjuju sposobnost p53 proteina da inducira apoptozu [133, 134]. Protein E6 HPV tipova 1, 8 i 16 utječe na mehanizam popravka DNK inhibirajući XRCC1 protein bitan u održavanju integriteta genoma [135]. E7 protein HPV-a 38 može vezati i razgraditi pRb na vrlo sličan način kao E7 protein visokorizičnoga HPV-a 16 [129]. E6 i E7 proteini HPV-a 38 potičući aktivnost telomerase te djelujući na stanični ciklus i proces starenja, mogu produljiti vijek keratinocitima [136, 137]. Isti proteini inhibiraju sposobnost p53 da inducira transkripciju gena uključenih u apoptozu [138]. E6 proteini HPV tipova 5 i 8 inhibiraju signalni put TGF  $\beta$  degradacijom SMAD3 transkripcijskog čimbenika, što u konačnici dovodi do ubrzanja staničnog ciklusa i ubrzane replikacije virusa [139]. Za razliku od visokorizičnih sluzničnih HPV tipova genom HPV tipa 5 progresivno se gubi u kulturama tkiva keratinocita koji se ubrzano dijele, potvrđujući teoriju o ulozi virusa u ranim stadijima nastanka tumora te njegovu gubitku u razvijenom tumoru [130]. »Hit and run« teoriju potvrđuje i to što je u nekim istraživanjima utvrđena veća prevalencija virusa u prekancerozama i karcinomima *in situ* nego u kožnim tumorima, što govori o važnosti HPV-a u ranim stadijima razvoja tumora kože [140-142].



NMTK-i i infekcija HPV-om češći su kod imunokompromitiranih bolesnika, iz čega se također može zaključiti kako HPV ima određenu ulogu u patogenezi NMTK-a [143]. Harwood i suradnici određivali su HPV status NMTK-a kod imunokompetentnih i imunokompromitiranih bolesnika. Iako su utvrdili bitne razlike između dviju skupina, prevalencija i spektar HPV tipova nisu se bitnije razlikovali. U objema grupama bolesnika prevladavali su EV HPV tipovi [140]. Rezultati mnogobrojnih studija o HPV-u kao uzroku nastanka NMTK-a i dalje nisu usuglašeni. Većina studija potvrđuje ulogu HPV-a u nastanku NMTK-a učestalom prisutnošću HPV sekvencija [140, 144-146], a mnogim studijama utvrđena je povećana prevalencija HPV-a u SCC [147-152]. U slučaju BCC neke studije potvrđuju ulogu HPV-a u nastanku tih tumora [153], iako neke studije nisu utvrdile vezu između HPV-a i BCC-a [110, 148, 154]. Većina rezultata brojnih istraživanja ipak govori u prilog HPV-u kao čimbeniku u nastanku NMTK-a te čak prediktoru za razvoj NMTK-a godinama nakon infekcije [155]. Tako su Genders i suradnici utvrdili da je seropozitivnost na  $\beta$  HPV tipove (godinu prije i godinu nakon transplantacije organa) prediktor za razvoj NMTK-a nakon 22 godine u bolesnika s transplantiranim organom [156], a iste rezultate dobili su i Andersson i suradnici za bolesnike sa SCC-om i BCC-om [155]. Mnogobrojne studije utvrdile su vezu i između AK-a i HPV-a [140-142, 145, 146, 157]. Dok je jednim istraživanjem utvrđeno da HPV(+)/p53(+) tipovi AK-a i MB-a pokazuju veću proliferacijsku aktivnost u usporedbi s HPV(-)/p53(+) tipovima [158], druga studija nije utvrdila bitnu razliku u proliferacijskoj aktivnosti između HPV(+) i HPV(-) lezija [159]. Osim uloge u nastanku AK-a, pretpostavljena je i veza između HPV-a i recidiva AK-a [160]. Epidemiološke studije ipak upućuju na to kako HPV igra ulogu i u nastanku *in situ* te invazivnih SCC-a [161].

#### **1.4. Ultraljubičasto zračenje**

Ultraljubičasto (UV) zračenje jest elektromagnetsko zračenje valnih duljina između 400 i 10 nm [162], iako neki njegovu kratkovalnu granicu proširuju i do 4 nm [163]. Prirodni je izvor UV zračenja Sunce, a postoji i niz umjetnih izvora (različite UV lampe, fluorescentno svjetlo, određene vrste lasera). Na UV zračenje otpada samo 10% Sunčeva spektra [163]. U fizici se dijeli se na blisko UV područje (400 do 300 nm), daleko (300 do 200 nm), ekstremno

(200 do 100 nm) i vakuumsko (od 200 do 10 nm) [163]. U biologiji se pak dijeli na blisko (400 do 315 nm), aktiničko (kemijsko) (315 do 200 nm) i vakuumsko (manje od 200 nm) [163]. Na temelju interakcije valnih duljina UV zračenje dijeli se na UVA (400 do 315 nm), UVB (315 do 280 nm) i UVC (280 do 100 nm) [163]. Većina UV zračenja iz sunčevih zraka apsorbira se u ozonskom omotaču stratosfere, a od zraka što stignu do Zemlje gotovo su 99% UVA zrake [163].

Za razliku od rendgenskog zračenja, UV zračenje ima manju moć penetracije, pa su njegovi učinci ograničeni na površinu kože [163]. Direktni utjecaj na kožu očituje se crvenilom, pigmentacijom, starenjem i karcinogenim učincima [163]. U slučaju izloženosti umjetnim izvorima UVC zračenja dolazi do apsorpcije u površinskim slojevima epidermisa, zbog čega mogu nastati opekline kože (nakon oko 6 sati) te oštećenja rožnice. UVB zračenje ima najznačajniji utjecaj na nastanak tumora kože. Njega samo djelomično apsorbira ozonski omotač, što ovisi o kutu pod kojim zrake prodiru u atmosferu. Što je veći kut pod kojim UVB zrake prodiru u atmosferu, njihovo će filtriranje biti efikasnije. Upravo iz toga razloga preporučuje se izbjegavati izlaganje suncu između 10 i 15 sati, jer je tada kut pod kojim zrake prodiru u atmosferu najmanji i one se slabije filtriraju. UVB zračenje apsorbira se u epidermisu, a oko 10% njegove količine prelazi i u dermis [164]. Izlaganje UVB zračenju može nakon 12–24 sata dovesti do opekline, a naknadno i do nastanka tumora kože ili razvoja katarakte (161). UV zračenje ima i pozitivne učinke na ljudsko tijelo. Ono stimulira proizvodnju vitamina D u koži, a može biti korišteno i kao terapijsko sredstvo kod mnogih dermatosa [163]. UV zračenje koje ozonski omotač slabo apsorbira i koje gotovo u potpunosti prolazi u atmosferu jest UVA zračenje. Ono prodire i u gornji sloj dermisa, a u ljudi izlaganje većim dozama dovodi do neposrednog tamnjenja kože, koje nastaje kao posljedica oksidacije melanina i stimulacije melanogeneze [164]. Pokazalo se da i UVA zračenje pridonosi razvoju tumora kože [9, 165].

#### **1.4.1. UV zračenje i HPV**

Kako β HPV tipovi nisu povezani s neoplastičnim procesom odmah po infekciji, drži se da na gensku ekspresiju β HPV-a utjecaj moraju imati i neki drugi čimbenici [130]. S obzirom na to da se i kod imunokompetentnih i imunokompromitiranih bolesnika, a tako i

kod bolesnika s EV-om, NMTK-i češće javljaju na dijelovima tijela izloženima suncu, istraživanja pokušavaju utvrditi vezu između UV zračenja i HPV-a u nastanku NMTK-a [107]. Jednostavno objašnjenje jest to da lokalna imunosupresija uzrokovana UV zračenjem potiče HPV infekciju [166]. Naime, utječući na prezentaciju antigena, UV zračenje smanjuje stanično-posredovanu imunost, i na taj način može dovesti do nastanka tumora [167]. No utjecaj UV zračenja puno je složeniji. Dokazano je kako UVB zračenje potiče veću sekreciju proinflammatoryh citokina IL-6, IL-8 i TGF- $\beta$  u keratinocitima zaraženim HPV tipovima 16 i 38 nego u nezaraženim keratinocitima [168]. Akgul i suradnici utvrdili su da UVB zračenje aktivira HPV 5 i 8 u ljudskim keratinocitima [169]. Wallace i suradnici dokazali su da određeni  $\beta$  HPV tipovi (HPV 5 i 8) koji sadržavaju E6 onkogen pojačavaju karcinogeni potencijal UVB zračenja djelujući na mehanizme popravka DNK (potičući degradaciju p300 histona) [169]. Holloway i suradnici utvrdili su specifičan i jedinstven mehanizam djelovanja E6 proteina HPV-a 5 na BAK, proapoptotički BCL-2 protein, u sprječavanju UV inducirane apoptoze. Naime, utvrdili su da je za E6 posredovanu degradaciju BAK proteina potreban enzim HERC1 ubikvitin ligaza [170]. S druge su strane Aung i suradnici ispitujući proapoptotički protein BAK i  $\beta$  HPV u *in situ* i razvijenim SCC fotoeksponiranih područja, zaključili da virus ne sprječava UV induciranu apoptozu [171]. Purdie i suradnici utvrdili su da nekodirajuća regija virusa HPV 77 veže gen supresor tumora p53 i da je promotorska aktivnost stimulirana UV zračenjem [125]. In vivo studija Michela i suradnika na transgeničnim miševima pokazala je utjecaj E6 i E7 proteina HPV tipova 20 i 27 na proliferaciju i diferencijaciju epidermisa kad su izloženi kroničnom UVB zračenju. Također su dokazali da dodatna infekcija papiloma virusom dovodi do ekspresije ranih proteina virusa i razvoja NMTK-a nakon nekoliko desetljeća [172]. U sličnoj studiji Viarisio i suradnici utvrdili su da kronična izloženost UV zračenju izaziva promjene slične aktiničkim keratozama na koži HPV 38 E6/E7 transgeničnih miševa. Tim istraživanjem zaključeno je da onkoproteini E6 i E7 HPV tipa 38 pridonose razvoju SCC, kao i povećanoj podložnosti keratinocita UV induciranoj karcinogenezi [173]. Hsiao i suradnici otkrili su na staničnim linijama BCC-a s ugrađenim E6 i E7 onkogenima mogućnost indukcije ekspresije IL-6 i IL-8 navedenim onkogenima i bez UVB zračenja. No isto su tako utvrdili da kronična izloženost UVB zračenju inducira ekspresiju E6 i E7 onkogeni, kao i IL-6 i IL-8 [174]. Neke studije govore u prilog povećanoj prevalenciji HPV-a na fotoeksponiranoj koži [80, 148], dok drugim studijama

nije utvrđena razlika u prevalenciji s obzirom na razlike u izloženosti UV zračenju [175, 176]. Ipak, ulogu UV zračenja potvrđuje i dokazana veća učestalost HPV-a u psorijatičnim plakovima tretiranima fototerapijom (nbUVB i PUVA) nego u onima koji nisu na taj način tretirani ili u kontrolnoj skupini. Uz to je utvrđena veća učestalost HPV-a u plakovima tretiranima PUVA terapijom nego u onima tretiranima nbUVB terapijom, što govori o značenju valnih duljina i jačine UV oštećenja za HPV infekciju [177]. Drugom studijom utvrđena je povećana učestalost virusa na depigmentiranoj koži bolesnika s vitiligom koji su liječeni fototerapijom. Navedena učestalost bila je podjednaka onoj kod psorijatičnog plaka tretiranoga PUVA terapijom te bitno veća nego u grupi bolesnika s psorijazom koji su liječeni nbUVB terapijom. Na temelju navedenoga može se zaključiti da »oštećena« koža kod psorijatičnog plaka ne predstavlja povećan rizik za HPV infekciju te da je u povećanju toga rizika puno veća uloga UV zračenja [178].

## **2. HIPOTEZE**

Povećana je zastupljenost HPV DNK u prekancerozama (AK) i karcinomima *in situ* (MB) kao i zastupljenost HPV-a u uzorcima BCC-a s područja kože trajno izloženoga UV zračenju (lice) te u uzorcima BCC-a i SCC-a sa zemljopisnog područja s većim brojem sunčanih dana.

## **3. CILJEVI**

Istražiti zastupljenost i tipove HPV-a u AK-a, MB-a i SCC-a.

Istražiti prevalenciju i tipove HPV-a u BCC-a.

Istražiti moguću razliku u prevalenciji i tipovima HPV-a kod BCC-a s obzirom na lokalizaciju (lice – kontinuirana izloženost suncu, trup – intermitentna izloženost suncu).

Istražiti moguću razliku u prevalenciji i tipovima HPV-a u BCC-a ekscidiranim s kože lica između dvaju zemljopisnih područja s različitim brojem sunčanih dana (Grad Rijeka i Grad Zagreb).

Istražiti moguću razliku u prevalenciji i tipovima HPV-a u SCC-a ekscidiranim s kože lica između dvaju zemljopisnih područja s različitim brojem sunčanih dana (Grad Rijeka i Grad Zagreb).

## **4. MATERIJALI I METODE**

### **4.1. Materijali**

HPV DNK izolirana je iz 130 parafinskih kocki patohistološki potvrđenih NMTK-a, AK-a i MB-a. Iz arhive Kliničkoga zavoda za patologiju »Ljudevit Jurak« Kliničkoga bolničkog centra »Sestre milosrdnice« posuđene su parafinske kocke 20 patohistološki potvrđenih AK-a, 20 patohistološki potvrđenih MB-a, 20 patohistološki potvrđenih SCC-a i 20 patohistološki potvrđenih BCC-a. Svi navedeni uzorci bili su s fotoeksponiranih dijelova kože (lice). Uz to je s istoga Kliničkog zavoda posuđeno 10 patohistološki potvrđenih BCC-a s dijelova tijela koji nisu fotoeksponirani (trup). Iz arhive Zavoda za patologiju i patološku anatomiju Medicinskoga fakulteta u Rijeci posuđene su parafinske kocke 20 patohistološki potvrđenih SCC-a i 20 patohistološki potvrđenih BCC-a, svi s fotoeksponiranih dijelova kože (lice).

### **4.2. Metode**

#### **4.2.1. Detekcija HPV-a**

Prisutnost i kožni tipovi HPV-a određivani su s pomoću RHA kit Skin (beta) HPV-a (Diassay, Nizozemska), a prisutnost i spolni (sluznički) tipovi HPV-a s pomoću HPV screening kita (AID, Njemačka). Metode obaju kitova temelje se na hibridizaciji. Prvo se izolira DNK, zatim slijedi umnažanje i na kraju hibridizacija.

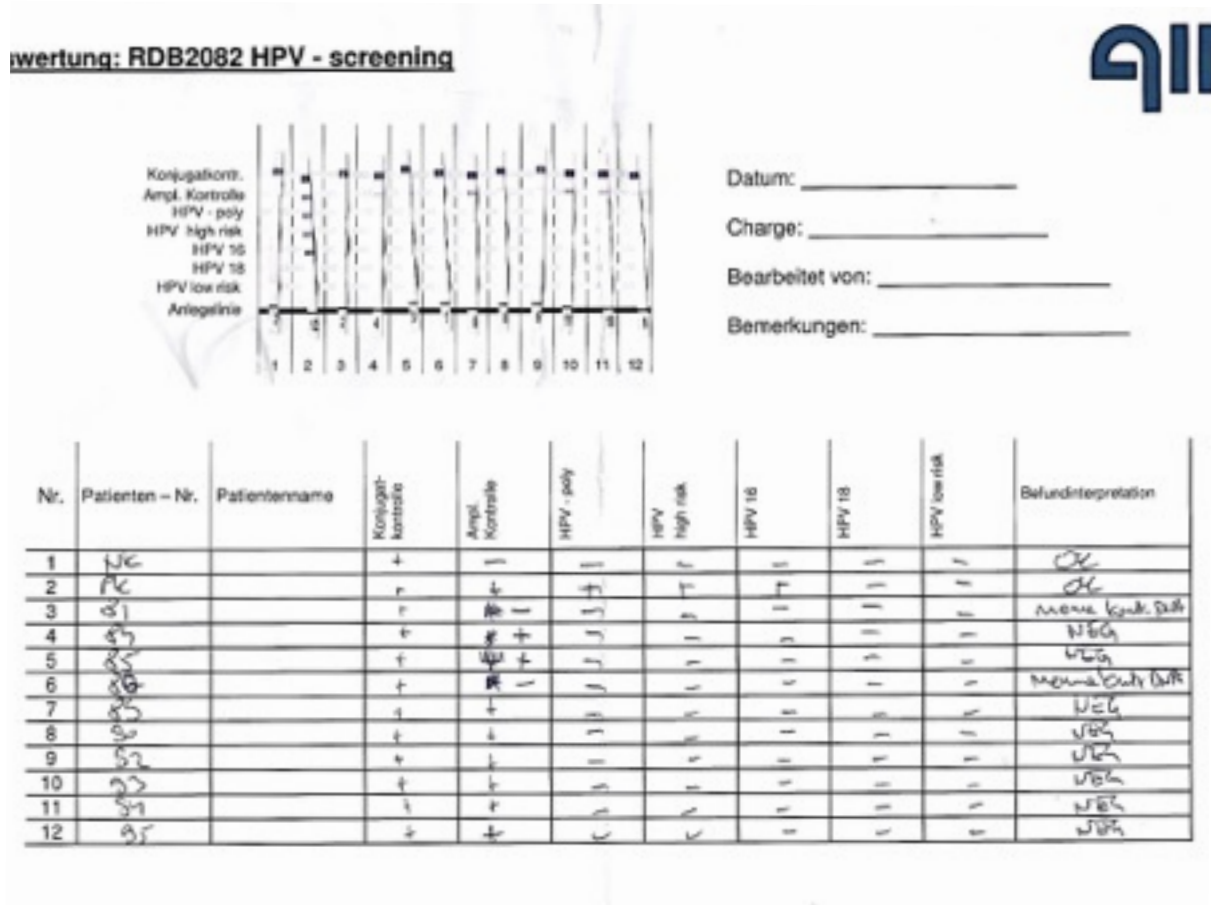
#### **4.2.1.1. Izolacija DNK**

Uzeti su rezovi tkiva uklopljenog u parafin (6x10 µm) i pohranjeni u sterilne epruvete. Izolacija DNK napravljena je prema QiAmp DNA Mini Kit protokolu (QIAGEN, Hilden, Germany). Parafin je uklonjen s pomoću 1200 µL ksilena (centrifugiranje na 14 000 g, 5 min) te dvaput ispran u etanolu. Rezovi tkiva inkubirani su s proteinazom K (20 µL) na 56 °C preko noći. Idući dan dodan je etanol i pročišćena DNK vezala se na filter kolone za izolaciju. Slijedilo je ispiranje (dvaput) te na kraju odvajanje DNK od membrane elucijom (u 50 µL elucijskog pufera). Izolirana DNK odmah je pohranjena na +4 °C. Kvaliteta izolirane DNK provjerena je umnožavanjem gena za β-globin, provjerom na 2% agaroznom gelu pod UV lampom (očekivana veličina produkta jest 265 pb), te mjerenjem gustoće (Nanodrop).

#### **4.2.1.2. Detekcija spolnih (sluzničkih) tipova HPV-a**

Detekcija spolnih (sluzničkih) tipova HPV-a napravljena je prema uputama proizvođača kita. Kit omogućuje identifikaciju HPV tipova 16 i 18 te utvrđivanje postojanja visokorizičnih (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82) i niskorizičnih tipova (HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44). Prvo je umnožen dio genoma HPV-a lančanom reakcijom polimerazom (PCR) s dva seta smjesa nukleotida i biotiniliranih početnica (PN I i PN II) koje obuhvaćaju visoko konzerviranu regiju HPV genoma. PN I sadržava i početnice za gen GAPDH te služi kao interna kontrola za prisutnost DNK u pojedinom uzorku. Dobiveni amplikoni (PCR produkti) provjereni su na 2% agaroznom gelu pod UV lampom (očekivane veličine produkata jesu 145pb za HPV te 226pb za GAPDH). Zatim se amplikoni obiju reakcija miješaju (PN I i PN II), a potom inkubiraju s denaturacijskom otopinom (40 µL) pet minuta na sobnoj temperaturi. Dodaje se hibridizacijska otopina (1 mL) i membranski stripovi koji na sebi imaju imobilizirane specifične probe. Slijedi 30-minutna inkubacija na 47 °C u tresućoj vodenoj kupelji. Nakon ispiranja otopinom za ispiranje na 47 °C u tresućoj vodenoj kupelji 15 minuta, slijedi konjugacija na sobnoj temperaturi 30 minuta, a zatim se dodavanjem substrata (1 mL)

formiraju precipitati na membranskim stripovima. Rezultati su vizualno interpretirani (Slika 8).

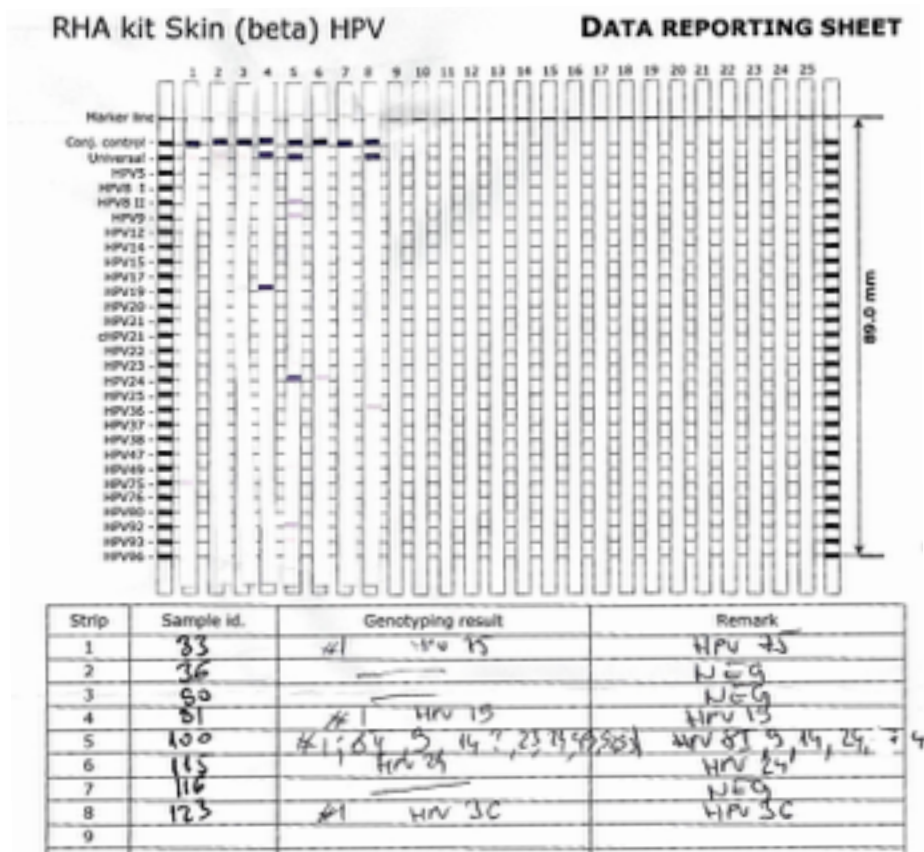


Slika 8. Vizualna interpretacija rezultata

#### 4.2.1.3. Detekcija kožnih tipova HPV-a

Detekcija kožnih tipova HPV-a napravljena je prema uputama proizvođača kita. Kit omogućuje identifikaciju sljedećih tipova virusa: HPV 5, 8 I i 8 II, 9, 12, 14, 15, 17, 19–25, 36, 37, 38, 47, 49, 75, 76, 80, 92, 93 i 96. Prvo je umnožen dio E1 regije genoma HPV-a lančanom reakcijom polimerazom (PCR) miješanjem sa skin (beta) HPV Primermixom. Dobiveni biotinizirani PCR produkti (10 µL) denaturirani su miješanjem s denaturacijskom otopinom (10 µL) i 3B puferom (10 µL) na sobnoj temperaturi 5 minuta. Potom je dodana hibridizacijska otopina (2 mL) zagrijana na 37–50 °C te je sve inkubirano u tresućoj vodenoj kupelji na temperaturi od 50 °C tijekom 60 minuta. Slijedi zatim ispiranje otopinom za

ispiranje na 50 °C u tresućoj vodenoj kupelji 30 minuta te konjugacija na sobnoj temperaturi 30 minuta. Nakon dodavanja substrata i inkubiranja u mraku formiraju se precipitati na membranskim stripovima. Rezultati su vizualno interpretirani (Slika 9).



Slika 9. Vizualna interpretacija rezultata

#### 4.2.2. Određivanje razlike u insolaciji između gradova Rijeke i Zagreba

Koristeći se podatcima portala Current Results, weather and science facts, potvrđena je razlika između broja sunčanih dana u gradovima Rijeka i Zagreb. Prosječan broj sunčanih dana godišnje u Gradu Rijeci iznosi 76, a u Gradu Zagrebu 49. Navedeni brojevi označuju prosječan broj dana u jednoj godini, kad oblaci ne prekrivaju više od 20% Sunca. Iznos dobivenih sunčanih dana prosjek je skupljenih podataka od 1971. do 2000. godine.



### **4.3. Statistička obradba podataka**

Nominalne varijable prikazane su u obliku frekvencije i postotka. Za analizu nominalnih varijabli korišten je hi-kvadrat ( $\chi^2$ ) test, a pri manjku očekivane frekvencije varijable su testirane Fisherovim egzaktnim testom. Mogućnost pogreške prihvatila se pri  $\alpha < 0,05$ , te su razlike među skupinama bile prihvaćene kao statistički značajne za  $p < 0,05$ . Vrijednosti p koje se nisu mogle iskazati do najviše tri decimalna mjesta, prikazane su kao  $p < 0,001$ .

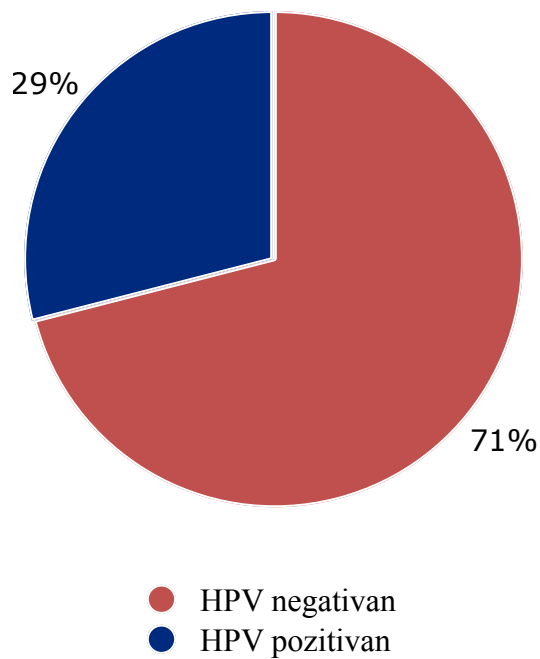
Za statističku analizu dobivenih podataka rabljeni su programi Statistical Package for Social Sciences (SPSS) for Windows (inačica 15.0, SPSS Inc, Chicago, Illinois, SAD) i Microsoft Excell (inačica Office 2007, Microsoft Corporation, Redmond, WA, SAD).

## **5. REZULTATI**

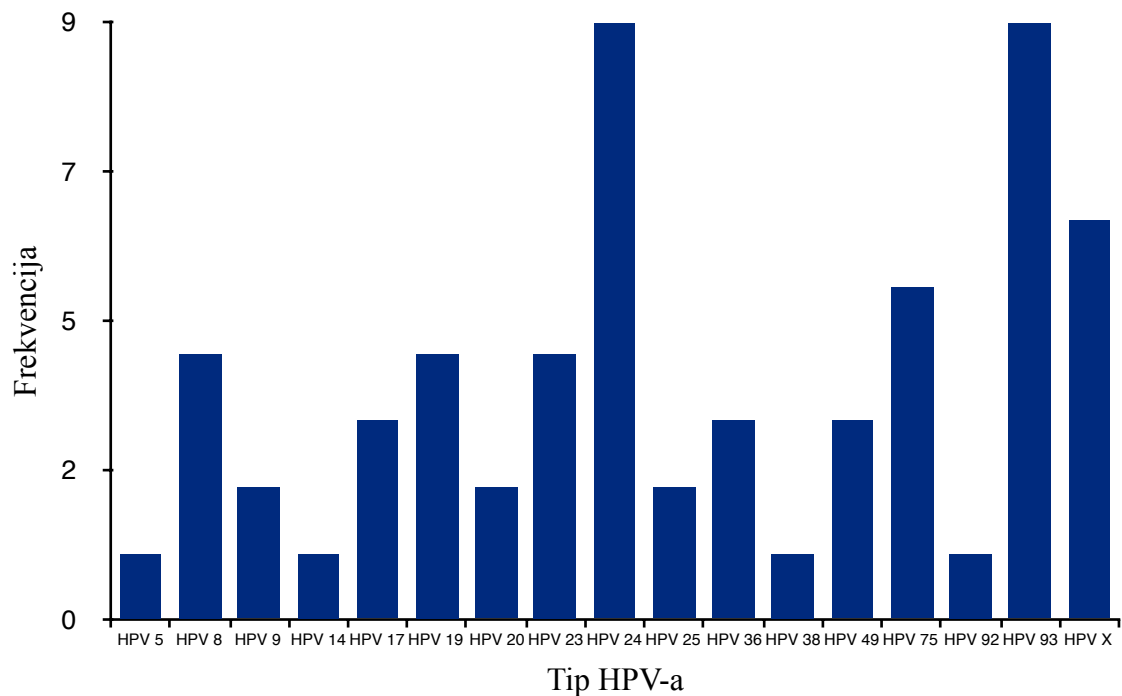
### **5.1. Deskriptivna statistika – svi ispitanici**

U istraživanje je uključeno 130 parafinskih kocaka. Iz Zagreba s fotoeksponiranih dijelova tijela 20 AK-a, 20 MB-a, 20 SCC-a i 20 BCC-a, a s nefotoeksponiranih dijelova tijela 10 BCC-a. Iz Rijeke s fotoeksponiranih dijelova tijela 20 SCC-a i 20 BCC-a. Ukupno je u 38 uzoraka utvrđena DNK HPV-a (29%) (Slika 10). Najčešće izolirani tipovi HPV-a bili su 24 i 93, i to u devet uzoraka. HPV 75 utvrđen je u šest uzoraka. HPV tipovi 8, 19 i 23 utvrđeni su u četiri uzorka. HPV tipovi 17, 36 i 49 utvrđeni su u tri uzorka. HPV tipovi 9, 20 i 25 utvrđeni su u dva uzorka, a najmanje je bilo HPV tipova 5, 14, 38 i 92, svaki izoliran samo u jednom uzorku (Slika 11). U šest uzoraka utvrđen je nepoznati tip HPV-a (nije obuhvaćen kitom).

## HPV status



Slika 10. Učestalost HPV-a u ukupnom uzorku



Slika 11. Prikaz pojavnosti ispitanih tipova HPV-a u ukupnom uzorku

### **5.1.1. Aktinička keratoza**

Od 20 uzoraka AK-a u jednom uzorku nije bilo dovoljno materijala za analizu, a u njih četiri (21,1%) utvrđen je neki od kožnih tipova HPV-a (HPV 5, 19, 24, 38, 75, 93); u tri uzorka utvrđeno je po dva tipa HPV-a, od kojih je jedan nepoznat, a u jednom uzorku samo jedan HPV tip (HPV 75).

### **5.1.2. Morbus Bowen**

Od 20 uzoraka MB-a u njih sedam utvrđen je neki od kožnih tipova HPV-a (HPV 8, 17, 20, 23, 36, 75, 93); u dva uzorka utvrđeno je po tri tipa HPV-a, u jednom uzorku dva tipa, a u četiri uzorka po jedan HPV tip. U tri uzorka MB utvrđeni su nepoznati HPV tipovi. U tri uzorka utvrđeni su HPV tipovi 93 i 23, a u dva uzorka HPV 17. U jednom uzorku MB nije bilo dovoljno materijala za analizu. HPV DNK utvrđena je u 10 uzoraka MB (52,6%).

### **5.1.3. SCC s fotoeksponiranih dijelova kože iz Grada Zagreba**

Od 20 uzoraka SCC-a s fotoeksponirane kože iz Grada Zagreba u njih 11 utvrđen je neki od kožnih tipova HPV-a (HPV 8 I, 9, 17, 19, 20, 23, 24, 25, 49, 75, 93). U dva uzorka utvrđeno je po četiri tipa HPV-a, u jednom uzorku dva tipa, a u ostalima po jedan HPV tip. U četiri uzorka SCC-a iz Grada Zagreba utvrđen je HPV 93, u tri uzorka HPV 24, a u po dva uzorka utvrđeni su HPV 8 I i 25. U jednom uzorku SCC-a iz Grada Zagreba utvrđen je nepoznati tip HPV-a. HPV DNK utvrđena je u 12 uzoraka SCC-a s fotoeksponiranih dijelova kože iz Grada Zagreba (60%).

#### **5.1.4. BCC s fotoekspoziranim dijelovima kože iz Grada Zagreba**

Od 20 uzoraka BCC-a s fotoekspozirane kože iz Grada Zagreba u njih šest utvrđen je neki od kožnih tipova HPV-a (HPV 19, 24, 36, 49, 75). U dva uzorka utvrđeno je po dva tipa HPV-a, a u ostalim po jedan HPV tip. Najčešće izoliran tip bio je HPV 24 (u tri uzorka). U dva uzorka BCC-a iz Grada Zagreba utvrđeni su nepoznati HPV tipovi. HPV DNK utvrđena je u osam uzoraka BCC-a s fotoekspoziranim dijelovima kože iz Grada Zagreba (40%).

#### **5.1.5. BCC s nefotoekspoziranim dijelovima kože iz Grada Zagreba**

Od 10 uzoraka BCC-a s nefotoekspoziranim dijelovima kože (trup) iz Grada Zagreba u jednom je uzorku utvrđen HPV 36 dok u ostalim nije utvrđena DNK HPV-a. HPV DNK utvrđena je u jednom uzorku BCC-a s nefotoekspoziranim dijelovima kože iz Grada Zagreba (10%).

#### **5.1.6. SCC s fotoekspoziranim dijelovima kože iz Grada Rijeke**

Od 20 uzoraka SCC-a s fotoekspozirane kože iz Grada Rijeke u jednom je uzorku utvrđen kožni tip HPV-a, HPV 24. HPV DNK utvrđena je u jednom uzorku SCC-a s fotoekspoziranim dijelovima kože iz Grada Rijeke (5%).

#### **5.1.7. BCC s fotoekspoziranim dijelovima kože iz Grada Rijeke**

Od 20 uzoraka BCC s fotoekspozirane kože iz Grada Rijeke u dva uzorka utvrđeni su kožni tipovi HPV-a (HPV 8 I, 9, 14, 19, 24, 49, 92, 93). U jednom uzorku BCC-a iz Grada Rijeke utvrđeno je sedam kožnih HPV tipova, a u drugom jedan HPV tip. HPV DNK utvrđena je u dva uzorka BCC-a s fotoekspoziranim dijelovima kože iz Grada Rijeke (10%).

### **5.1.8. SCC – ukupno**

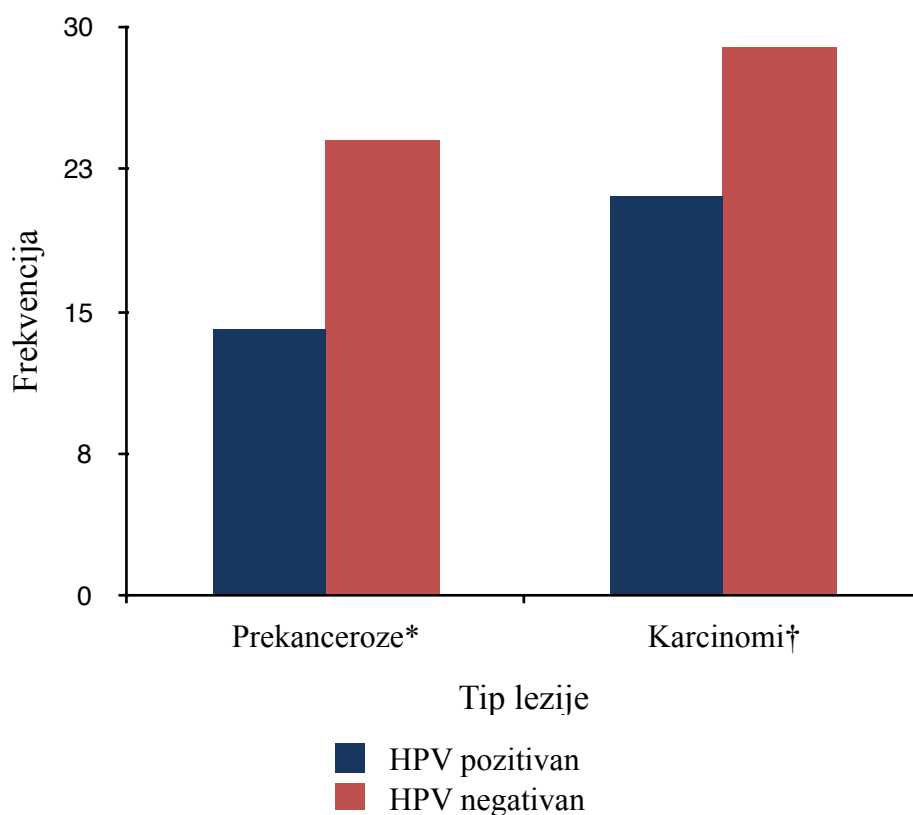
Od ukupno 40 uzoraka SCC-a u njih 12 utvrđeni su kožni tipovi HPV-a. U dva uzorka utvrđena su po četiri tipa HPV-a, u jednom uzorku dva tipa, a u ostalima po jedan tip HPV-a. Najčešće izolirani tipovi bili su HPV 24 i 93. U jednom uzorku SCC-a utvrđen je nepoznat tip HPV-a. HPV DNK utvrđena je u 13 uzoraka SCC-a (32,5%).

### **5.1.9. BCC – ukupno**

Od ukupno 50 uzoraka BCC-a u njih devet utvrđeni su kožni tipovi HPV-a. U jednom uzorku izolirano je sedam tipova HPV-a, u dva uzorka po dva tipa, a u ostalima po jedan tip HPV-a. Najčešće izoliran tip bio je HPV 24. U dva uzorka utvrđen je nepoznat tip HPV-a. HPV DNK utvrđena je u 11 uzoraka BCC-a (22%).

## **5.2. Usporedba prekanceroza i *carcinoma in situ* s razvijenim karcinoma kože u uzorcima iz Grada Zagreba**

U zajedničku skupinu prekanceroza i *carcinoma in situ* spadaju uzorci AK-a i MB-a, od kojih u dva uzorka nije bilo dovoljno materijala za analizu. Ukupno je u 14 uzoraka utvrđena DNK HPV-a (36,8%). U skupini karcinoma zbrojeni su uzorci SCC-a i BCC-a iz Grada Zagreba, kojih je ukupno bilo 50. U 21 uzorku utvrđena je DNK HPV-a (41%) (Slika 12). Analizom nije utvrđena statistički bitna razlika u povezanosti učestalosti HPV-a i pojavnosti prekanceroze ili karcinoma kože ( $p=0,624$ ,  $\chi^2=0,24$ ,  $df=1$ ).



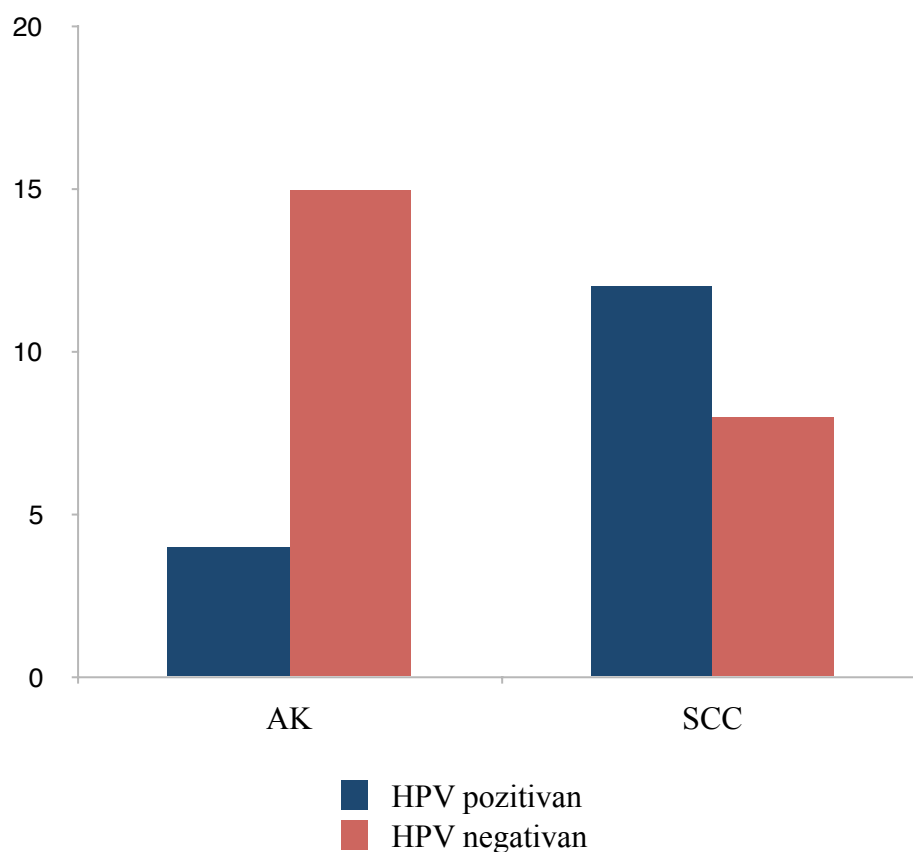
\*Prekanceroze: AK i MB

† Karcinomi: SCC i BCC

Slika 12. Usporedba prekanceroza i *carcinoma in situ* s razvijenim karcinoma kože u uzorcima iz Grada Zagreba

### 5.2.1. AK vs SCC (uzorci iz Grada Zagreba)

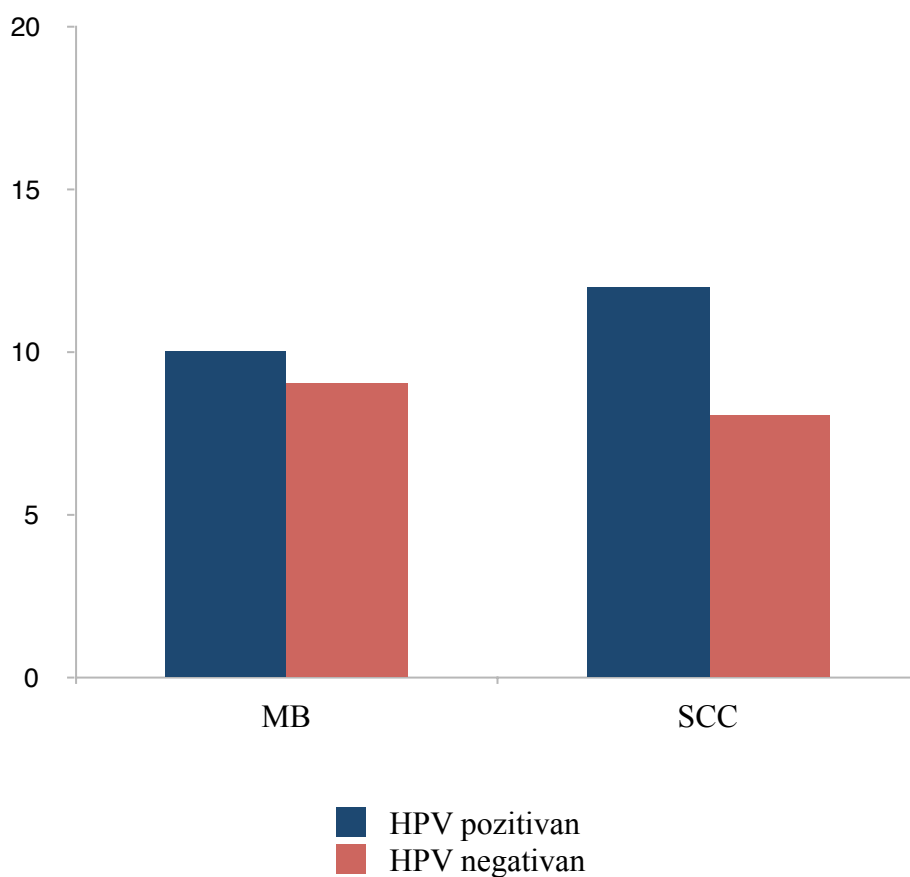
Usporedbom uzoraka AK-a s fotoeksponiranih dijelova kože (utvrđena DNK HPV-a u četiri od 19 uzoraka – 21,1%) i uzoraka SCC-a s fotoeksponiranih dijelova kože iz Grada Zagreba (utvrđena DNK HPV-a u 12 od 20 uzoraka – 60%) nije utvrđena statistički bitna razlika u učestalosti HPV-a i pojavnosti AK-a i SCC-a u Gradu Zagrebu ( $p=0,013$ ,  $\chi^2=6,109$ ,  $df=1$ ) (Slika 13).



Slika 13. Usporedba uzoraka AK-a s fotoeksponiranih dijelova kože i uzoraka SCC-a s fotoeksponiranih dijelova kože iz Grada Zagreba

### 5.2.2. MB vs SCC (uzorci iz Grada Zagreba)

Usporedbom uzoraka MB-a s fotoeksponiranih dijelova kože (od 19 uzoraka u njih 10 utvrđena je DNK HPV-a – 52,6%) i uzoraka SCC-a s fotoeksponiranih dijelova kože iz Grada Zagreba (nađen DNK HPV-a u 12 od 20 uzoraka – 60%) nije utvrđena statistički bitna razlika u učestalosti HPV-a i pojavnosti MB-a i SCC-a u Gradu Zagrebu ( $p=0,643$ ,  $\chi^2=0,215$ ,  $df=1$ ) (Slika 14).

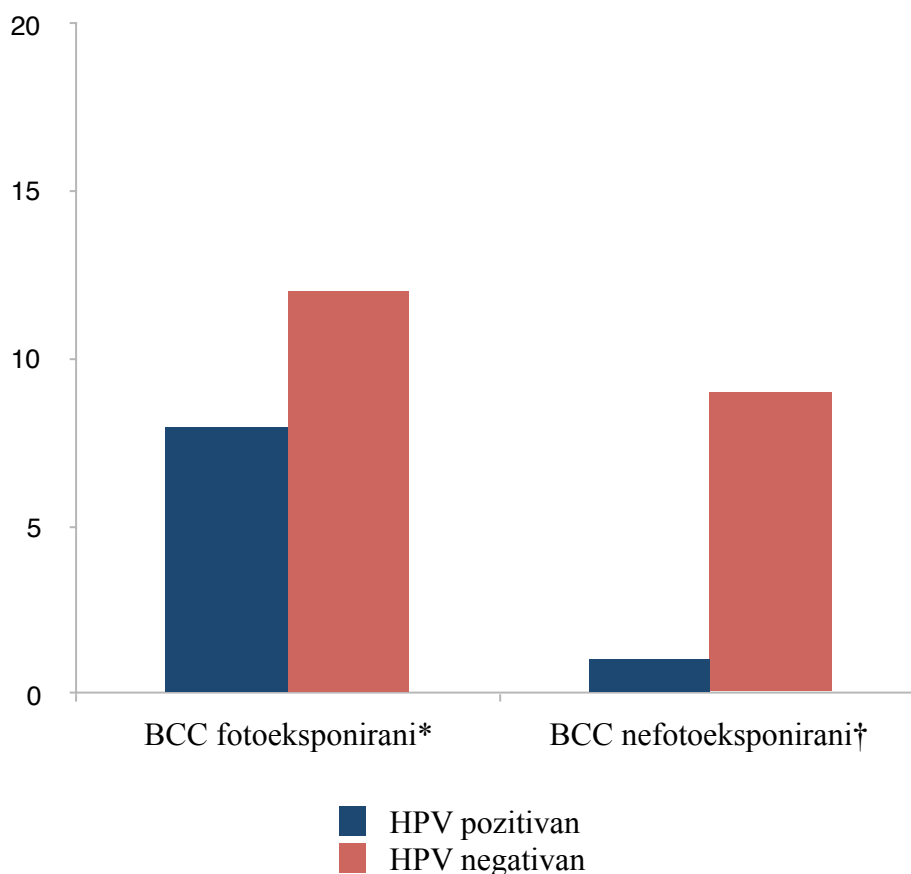


Slika 14. Usporedba uzoraka MB-a s fotoeksponiranih dijelova kože i uzoraka SCC-a s fotoeksponiranih dijelova kože iz Grada Zagreba

### 5.3. Usporedba BCC-a s kože trupa i lica na uzorcima iz Grada Zagreba

Usporedbom uzoraka BCC-a s fotoeksponiranih dijelova kože (utvrđena DNK HPV-a u osam od 20 uzoraka – 40%) i nefotoeksponiranih dijelova kože (utvrđen DNK HPV-a samo u jednom od 10 – 10%) iz Grada Zagreba nije utvrđena statistički bitna razlika u učestalosti HPV-a i pojavnosti BCC-a na trupu i licu ( $p=0,204$ ,  $\chi^2=2,857$ ;  $df=1$ ) (Slika 15).





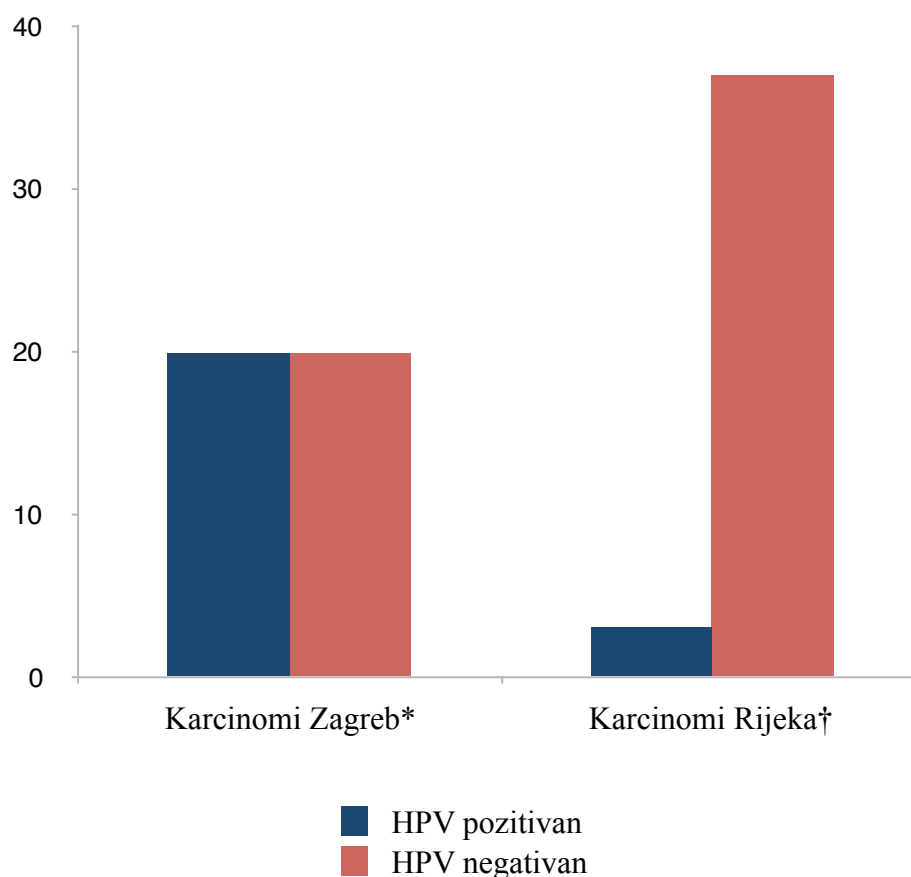
\* uzorci s fotoeksponiranih dijelova kože

† uzorci s nefotoeksponiranih dijelova kože

Slika 15. Usporedba uzoraka BCC-a s fotoeksponiranih dijelova kože i nefotoeksponiranih dijelova kože iz Grada Zagreba

#### 5.4. Usporedba karcinoma u gradovima Zagrebu i Rijeci

Usporedbom uzoraka svih karcinoma s fotoeksponiranih dijelova kože iz Grada Zagreba (SCC i BCC) i uzoraka svih karcinoma s fotoeksponiranih dijelova kože iz Grada Rijeke (SCC i BCC) utvrđena je statistički bitna razlika između učestalosti DNK HPV-a i pojavnosti SCC-a i BCC-a na fotoeksponiranim dijelovima kože u Gradu Zagrebu ( $p < 0,001$ ,  $\chi^2 = 17,635$ ,  $df = 1$ ) (Slika 16).



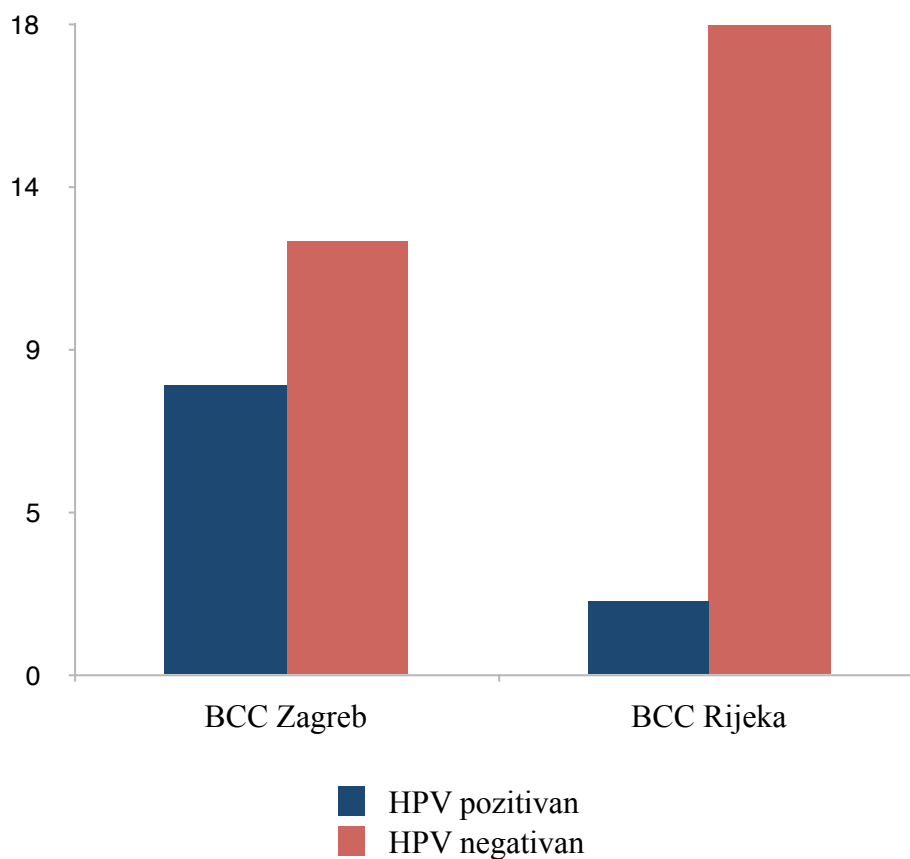
\* BCC-i i SCC-i s fotoeksponiranih dijelova kože iz Grada Zagreba

† BCC-i i SCC-i s fotoeksponiranih dijelova kože iz Grada Rijeke

Slika 16. Usporedba uzoraka svih karcinoma s fotoeksponiranih dijelova kože iz Grada Zagreba (SCC i BCC) i uzoraka svih karcinoma s fotoeksponiranih dijelova kože iz Grada Rijeke (SCC i BCC).

#### 5.4.1. Usporedba BCC-a u gradovima Zagrebu i Rijeci

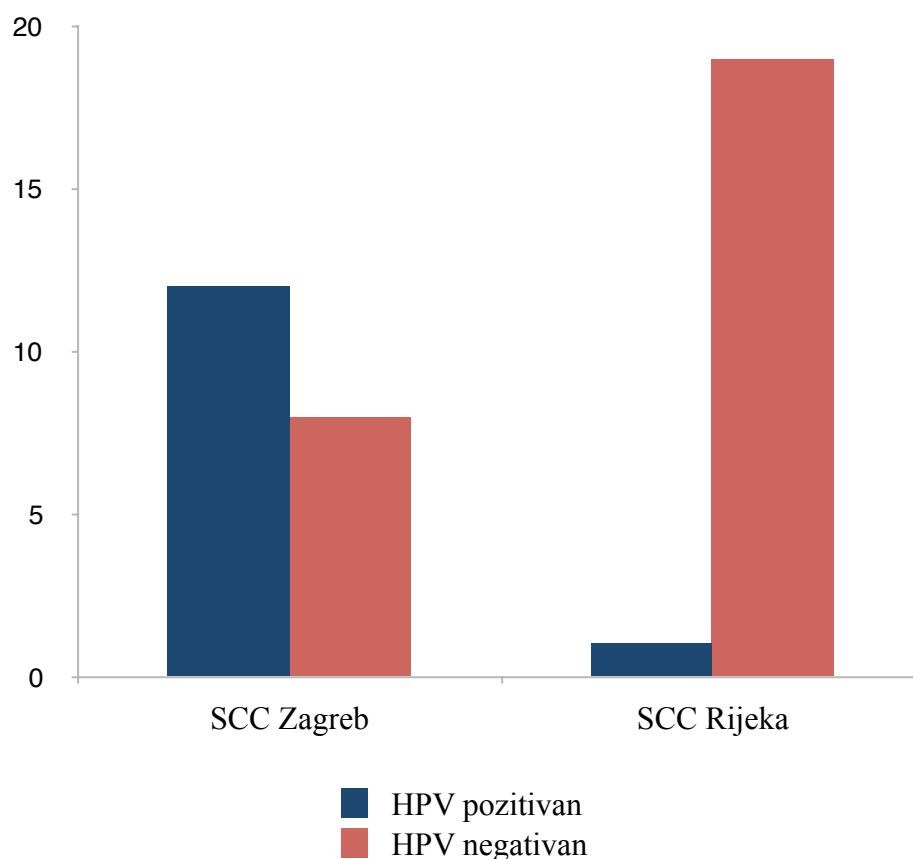
Usporedbom uzoraka BCC-a s fotoeksponiranih dijelova kože iz Grada Zagreba (u osam uzoraka od 20 utvrđena je DNK HPV-a – 40%) i uzoraka BCC-a s fotoeksponiranih dijelova kože iz Grada Rijeke (u dva uzorka od 20 utvrđena je DNK HPV-a – 10%) utvrđena je statistički bitna razlika u učestalosti DNK HPV-a i pojavnosti BCC-a u Gradu Zagrebu ( $p=0,028$ ,  $\chi^2=4,8$ ,  $df=1$ ) (Slika 17).



Slika 17. Usporedba uzoraka BCC-a s fotoekspoziranih dijelova kože iz Grada Zagreba i uzoraka BCC-a s fotoekspoziranih dijelova kože iz Grada Rijeke

#### 5.4.2. Usporedba SCC-a u gradovima Zagrebu i Rijeci

Usporedbom uzoraka SCC-a s fotoekspoziranih dijelova kože iz Grada Zagreba (u 12 od 20 uzoraka utvrđena je DNK HPV-a – 60%) i uzoraka SCC-a s fotoekspoziranih dijelova kože iz Grada Rijeke (samo u jednom od 20 uzoraka utvrđena je DNK HPV-a – 5%) utvrđena je statistički bitna razlika u učestalosti DNK HPV-a i pojavnosti SCC-a u Gradu Zagrebu ( $p < 0,001$ ,  $\chi^2 = 13,789$ ,  $df = 1$ ) (Slika 18).



Slika 18. Usporedba uzoraka SCC-a s fotoekspoziranih dijelova kože iz Grada Zagreba i uzoraka SCC-a s fotoekspoziranih dijelova kože iz Grada Rijeke

### 5.5. Sluznički tipovi HPV-a (HPV 16 i 18)

Od 20 uzoraka AK-a u jednom uzorku nije bilo dovoljno materijala za analizu, a svi ostali uzorci bili su negativni za sluzničke tipove HPV-a. U dva uzorka AK-a nije utvrđena kontrolna DNK i ne možemo sa sigurnošću tvrditi da su negativni za sluzničke tipove HPV-a. Od 20 uzoraka MB-a u jednom uzorku nije bilo dovoljno materijala za analizu, a svi ostali uzorci bili su negativni za sluzničke tipove HPV-a. U pet uzoraka nije utvrđena kontrolna DNK i ne možemo sa sigurnošću tvrditi da su negativni za sluzničke tipove HPV-a. Od 20 uzoraka SCC-a s fotoekspozirane kože iz Grada Zagreba ni u jednom nije utvrđen niti jedan sluznički tip HPV-a. U jednom uzorku nije utvrđena kontrolna DNK, pa ne možemo sa sigurnošću tvrditi da je negativan za sluzničke tipove HPV-a. Od 20 uzoraka BCC-a s

fotoeksponirane kože iz Grada Zagreba u jednom je utvrđen sluznički tip HPV-a, i to visokorizični tip (niti HPV 16, niti HPV 18), ostali su uzorci bili negativni za sluzničke tipove HPV-a. U dva uzorka nije utvrđena kontrolna DNK i ne možemo sa sigurnošću tvrditi da su negativni za sluzničke tipove HPV-a. Od 10 uzoraka BCC-a iz Grada Zagreba s dijelova kože koji nisu fotoeksponirani niti u jednom nije utvrđen niti jedan sluznički tip HPV-a. U jednom uzorku nije utvrđena kontrolna DNK, pa ne možemo sa sigurnošću tvrditi da je negativan za sluzničke tipove HPV-a. Od 20 uzoraka SCC-a s fotoeksponirane kože iz Grada Rijeke niti u jednom nije utvrđen niti jedan sluznički tip HPV-a. U osam uzoraka nije utvrđena kontrolna DNK i ne možemo sa sigurnošću tvrditi da su negativni za sluzničke tipove HPV-a. Od 20 uzoraka BCC-a s fotoeksponirane kože iz Grada Rijeke niti u jednom nije utvrđen niti jedan sluznički tip HPV-a. U dva uzorka nije utvrđena kontrolna DNK i ne možemo sa sigurnošću tvrditi da su negativni za sluzničke tipove HPV-a.

## 6. RASPRAVA

U ovom istraživanju ispitivali smo učestalost HPV infekcije u 130 uzoraka prekanceroza, *in situ* karcinoma i NMTK-a. Uzorci su histološki preparati u kojima je moguće utvrditi prisutnost virusa u dubljim slojevima epidermisa, što je bitno s obzirom na to kako se on vrlo često nalazi u stanicama dlačnog folikula ili izvodnih kanala ekrinih žlijezda [179]. Prema literaturi u odrasloj populaciji prevladavaju određeni tipovi HPV-a, a isti su utvrđeni i nakon nekoliko godina, što govori u prilog kroničnoj perzistenciji virusa [111, 119]. Na navedenu perzistenciju virusa ne utječe dob, spol niti prijašnje postojanje virusnih bradavica [111]. Iako se navedeni podatci odnose na zdravu kožu, mišljenja sam kako dob i spol ne utječu na učestalost niti na specifičnost prema tipu HPV-a u NMTK-a. Uzevši u obzir pretpostavljenu kroničnu perzistenciju virusa u odrasloj dobi, povećanje učestalosti HPV infekcije s dobi [114-117] te činjenicu da se NMTK-i uglavnom javljaju u starijoj populaciji, u ovom istraživanju nismo uzeli u obzir dob bolesnika.

Prva hipoteza ovog istraživanja bila je potvrditi »hit and run« teoriju o ulozi HPV-a u nastanku NMTK-a, tj. njegove važnosti u početku karcinogeneze s obzirom na prijašnjim studijama utvrđenu povećanu učestalost HPV-a u prekancerozama i *in situ* karcinomima. Naime, mehanizam djelovanja HPV-a roda  $\beta$  razlikuje se od načina na koji visokorizični HPV tipovi roda  $\alpha$  djeluju na karcinogenezu. Episom  $\beta$  HPV-a ne može se zadržati u tumorskim stanicama koje se brzo dijele, zbog čega se pretpostavlja da virus djeluje samo na početku karcinogeneze utječući na nakupljanje genetskih grešaka [130]. Mnogobrojne studije potvrdile su navedenu činjenicu. Tako su Harwood i suradnici utvrdili veću zastupljenost HPV-a u prekancerozama imunokompetentnih i imunosuprimiranih bolesnika u odnosu na prevalenciju u SCC-a i BCC-a [140]. Weissenborn i suradnici dokazali su bitno veću prisutnost HPV-a u aktiničkim keratozama nego u SCC-a [142], a slične rezultate dobili su i Pfister i suradnici, koji su utvrdili veću prisutnost EV HPV tipova u AK-a nego u razvijenim tumorima i MB-a [141]. Forslund je u svom istraživanju o prisutnosti HPV-a u NMTK-a i AK-a bolesnika u Australiji utvrdio bitno veću učestalost HPV tipa 38 u AK-a nego u SCC-a i BCC-a [157]. Schneider i suradnici pronašli su veću prevalencija HPV-a u iščupanim obrvama bolesnika s aktiničkim keratozama (84%) u usporedbi s prevalencijom u samim

aktiničkim keratozama (47%) i zdravoj koži (37%) istih bolesnika [180]. Iako su mnogobrojna istraživanja dokazala veću zastupljenost HPV-a u prekancerozama i karcinomima *in situ* nego u razvijenim tumorima kože [127, 140, 142], ovim istraživanjem nismo potvrdili navedenu činjenicu. Štoviše, najveću zastupljenost HPV-a utvrdili smo u razvijenom tumoru kože, i to u SCC-u (32,5%). Mnogim prethodnim studijama utvrđena je upravo povećana prevalencija HPV-a u SCC-a nego u BCC-a [110, 145, 181, 182]. Analizirajući prisutnost DNK svih do sada poznatih  $\beta$  HPV tipova u tumorima imunokompetentnih bolesnika, Patel i suradnici nisu pronašli razliku u prevalenciji HPV-a između SCC-a i BCC-a, ali su utvrdili povećanu učestalost HPV roda  $\beta$  vrste 1 (kojoj pripadaju tipovi 5 i 8) te povećanu učestalost multiplih HPV tipova kod SCC-a nego kod BCC-a [183]. Vezu između HPV-a i SCC-a potvrdili su dvjema studijama Iannacone i suradnici analizirajući serumska protutijela na kožne EV HPV tipove. Dokazali su statistički bitnu razliku u seropozitivnosti između HPV tipova roda  $\beta$  i  $\gamma$  te SCC-a u odnosu na kontrolnu skupinu [151, 184]. Dobivene rezultate potvrdili su i drugom studijom, u kojoj su određivali HPV roda  $\beta$  u obrvama bolesnika sa SCC-om i samim tumorima [185]. Meyer i suradnici PCR su metodom od svih do tada poznatih HPV tipova identificirali DNK HPV-a u 69% SCC-a, 52% BCC-a, 41% AK-a i 31% ekstragenitalnog MB-a [145]. Iako nisu utvrdili statistički bitnu razliku, Boxman i suradnici dokazali su pozitivnu vezu između EV HPV tipova i SCC-a [110]. Ledić Drvar i suradnici također su utvrdili veću pojavnost HPV DNK u SCC-a nego u BCC-a [182], a isto su dokazali i Zakrzewska i suradnici [117]. Paradisi i suradnici utvrdili su da je HPV seropozitivnost za neke  $\beta$  i  $\gamma$  HPV tipove povezana s povećanim rizikom razvoja drugog SCC-a nakon 5 godina, dok veza između serološkog statusa za različite HPV tipove i povećanog rizika za razvoj BCC-a nije utvrđena [186]. Kad pogledamo literaturu, najčešće izolirani tipovi HPV-a u SCC-u jesu 5, 8, 15, 20, 24, 36 i 38 [106, 148, 183, 187]. U istraživanju Patela i suradnika u 100 SCC-a najčešće izolirani tipovi HPV-a bili su HPV 15 i 36 [183]. Analizom seropozitivnosti na određene HPV tipove, Karagas i suradnici potvrdili su da je HPV 5 najčešće izoliran tip u SCC-a [148], dok je u drugim studijama najčešće izoliran tip HPV 8 [147, 188, 189]. Waterboer i suradnici najčešće su identificirali HPV 15, 17 i 38 [190]. Najčešći tipovi HPV-a izolirani u SCC-u u ovom istraživanju jesu HPV 24 i 93. I druge studije povezuju HPV 24 sa SCC-om [106, 187], a DNK navedenog tipa HPV-a pronađena je i u tumorima kože bolesnika s EV-om [191]. S

obzirom na sve navedeno može se zaključiti kako HPV uistinu ima utjecaj i sudjeluje u nastanku SCC-a. Ta je veza od prije poznata i jasno dokazana na primjeru SCC-a genitalnog i orofaringealnog područja, no bitno je naglasiti kako se s navedenim malignim neoplazijama uglavnom povezuju visokorizični HPV tipovi (najčešće 16 i 18). Pitanje koje se nameće jest uloga sluzničkih tipova u karcinogenezi NMTK-a. U jednoj od prijašnjih studija Piercealla i suradnika, iz 1991. godine, nije utvrđena veza između HPV tipova 6b/11 i 18 i NMTK-a, ali je u 19% SCC-a i 19% BCC-a utvrđen HPV tip 16 [192]. Park i suradnici nisu dokazali postojanje sluzničkih tipova HPV-a u SCC-a [193]. U svojoj studiji Zakrzewska i suradnici nisu identificirali sluzničke tipove HPV-a u uzorku od 50 BCC-a i 9 SCC-a [117]. S druge su strane Shayanfar i suradnici PCR metodom i imunohistokemijom utvrdili povećanu učestalost sluzničkih HPV tipova u SCC-a kod imunokompetentnih bolesnika u Iranu, s HPV 18 kao najčešćim tipom [194]. Hama i suradnici u 23% SCC-a pronašli su sluzničke HPV tipove, a najčešći tip bio je HPV 31 [195]. U zanimljivoj prospektivnoj studiji Andersson i suradnici utvrdili su protutijela na HPV 16 i 18 iz seruma ljudi koji su 30 godina poslije razvili NMTK. S obzirom na dobivene rezultate povezali su seropozitivnost na HPV tipove 16 i 18 s povećanim rizikom za nastanak SCC-a, dok povećani rizik za BCC nije utvrđen. No bitno je naglasiti kako je samo u nekolicine seropozitivnih ispitanika utvrđena HPV DNK u NMTK-a (u 4 od 79 SCC-a seropozitivnih ispitanika utvrđen je samo HPV 16, s tim da su dva iz područja genitalne regije), a seropozitivnost je vjerojatno posljedica prijašnje genitalne HPV infekcije [196]. U ovom istraživanju analizirajući zastupljenost sluzničkih tipova HPV-a (16 i 18) u uzorcima NMTK-a te uzorcima prekanceroza i *in situ* karcinoma, nismo utvrdili postojanje navedenih tipova. Iz navedenoga bi se dalo zaključiti da u nastanku NMTK-a sudjeluju isključivo kožni (EV) HPV tipovi.

Danas je poznata veza između visoko rizičnih tipova HPV-a i MB-a genitalnog područja. Međutim, kod MB-a ekstragenitalne lokalizacije studije su oprečne. Većina dosadašnjih studija potvrđuje vezu između visokorizičnih HPV tipova i ekstragenitalnog Bowena, a najčešće je izoliran tip HPV 16 [50, 197, 198]. Derancourt i suradnici utvrdili su sluzničke tipove HPV-a u 28,6% ekstragenitalnog MB-a [50]. Zheng i suradnici identificirali su sluzničke tipove HPV-a u 7% ekstragenitalnog MB-a, a EV HPV tipove u 5% [197]. Idriss i suradnici utvrdili su HPV DNK (tipove 11,16 i 58) u pet od 14 uzoraka posebnoga ortokeratotičnog oblika MB-a [199]. S druge strane kod bolesnika u Koreji od 30 uzoraka



ekstragenitalnog MB-a samo su u dva uzorka potvrđeni sluznički tipovi HPV-a, i to 16 i 33 [193]. Hama i suradnici utvrdili su da je učestalost HPV-a u Bowenoidnoj papulozi bitno veća nego u MB-a [195]. Lampert i suradnici pronašli su visokorizične tipove HPV-a u samo tri od 12 uzoraka PCR metodom, dok *in situ* i Southern blot hibridizacijom nisu utvrđeni visokorizični HPV tipovi u ekstragenitalnom MB-u [200]. U našem istraživanju od 19 uzoraka MB-a (svi lokalizirani u području glave) niti u jednom uzorku nije izoliran HPV 16, niti HPV 18. U pet od 19 uzoraka (26%) nije utvrđena kontrolna DNK, zbog čega ne možemo sa sigurnošću tvrditi da u navedenim uzorcima nema visokorizičnih HPV tipova. Svakako je uzorak premali da bi se na osnovi njega dalo zaključiti da ne postoji veza između sluzničkih tipova HPV-a i MB-a ekstragenitalne lokalizacije.

Većina studija nije potvrdila povezanost BCC-a i HPV-a [110, 154, 201]. Tako Escutia i suradnici nakon analize 70 BCC-a na kožne HPV tipove zaključuju kako HPV ne igra ulogu u nastanku BCC-a [201]. Mokhtari i suradnici imunohistokemijskom su metodom na uzorku od 80 BCC-a dokazali HPV u samo 10% uzoraka. Uzorci su bili pozitivni u samom tumoru i u okolnoj zdravoj koži, dok je tek pet od 80 uzoraka (6,3%) pokazalo imunoreaktivnost za HPV marker samo u uzorku BCC-a, ali ne i u zdravoj okolnoj koži [154]. Karagas i suradnici nisu utvrdili razliku u HPV seropozitivnosti između bolesnika s BCC-om i kontrolne skupine [148], a iste rezultate dobili su i Andersson i suradnici [202]. No malobrojne studije dokazale su zastupljenost HPV-a i u tim NMTK-ima. Tako Iannacone i suradnici utvrđujući s jedne strane protutijela na kožne tipove HPV-a, a s druge HPV DNK u uzorcima BCC-a istih bolesnika, navode veću vjerojatnost seropozitivnosti na HPV tipove roda  $\beta$  kod bolesnika s utvrđenom HPV DNK u BCC-u. Na temelju rezultata zaključili su da bi  $\beta$  HPV tipovi mogli imati ulogu u nastanku BCC-a [153], a prijašnjom studijom utvrdili su statistički bitnu razliku u seropozitivnosti na HPV tipove roda  $\alpha$  i  $\gamma$  u bolesnika s BCC-om nego u kontrolnoj skupini [151]. Bitno povećanu prevalenciju  $\beta$  HPV tipova vrste 1 u BCC-a nego u SCC-a i perilezionalnoj koži te povećanu učestalost miješane infekcije utvrdili su Zakrzewska i suradnici. Zaključili su da su  $\beta$ 1 HPV tipovi kao i koinfekcija s više HPV tipova bitni u nastanku BCC-a [117]. Harwood i suradnici ispitivali su zastupljenost HPV-a u NMTK-a i utvrdili HPV DNK u 27,2% SCC-a, 36,7% BCC-a i 54,4% *in situ* karcinoma kod imunokompetentnih bolesnika [140], a Zaravinos i suradnici prisutnost HPV DNK u 33% SCC-a, 33% BCC-a, 31% AK-a i u 15% tkiva zdrave kože [146]. Ovim istraživanjem u

uzorku od ukupno 50 BCC-a DNK HPV-a utvrđena je u 22% uzoraka. Gledajući najčešće izolirane tipove HPV-a u BCC-u, rezultati su različiti u različitim studijama. Najčešće izoliran tip HPV-a u uzorcima BCC-a u studiji Patela i suradnika bio je HPV 76 [183]. Feltkamp i suradnici pronašli su analizirajući seroreaktivnost da je ona povišena za HPV tipove 20 i 24 [106]. U ovom istraživanju u uzorcima BCC-a najčešće je izoliran tip upravo HPV 24.

Pretpostavlja se da kožni HPV tipovi utječući na mehanizme popravka DNK i sprječavajući UV induciranu apoptozu, mogu djelovati sinergistički s UV zračenjem u poticanju karcinogeneze. Stoga su mnogobrojna istraživanja usmjerena na ispitivanje interakcije UV zračenja i HPV-a. Veza između UV zračenja i HPV-a osim za tumore kože istraživana je i za karcinome genitalnog i orofaringealnog područja. Godar i suradnici utvrdili su bitnu korelaciju između većih doza UV zračenja i cervikalnog karcinoma te karcinoma farinksa. Potvrdili su vezu samo za bijelu rasu, dok u crne rase ta veza nije utvrđena [203]. Forslund i suradnici određivali su HPV DNK u NMTK-a (BCC i SCC), prekancerozama (AK), benignim lezijama i zdravoj koži istih bolesnika, utvrdivši povećanu prevalenciju virusa na dijelovima tijela izrazito izloženima suncu [149]. Isto su potvrdili i Karakas i suradnici, koji su pronašli veću seropozitivnost za  $\beta$  HPV tipove kod osoba s tumorima na područjima kože kontinuirano izloženima suncu nego kod osoba s tumorima drugih anatomskih područja [148]. Kako bi ispitali postoji li razlika u imunom odgovoru na HPV s obzirom na vrijeme izloženosti i intenzitet sunčeva zračenja, Waterboer i suradnici istraživali su antitijela na 26 tipova HPV-a u uzorcima krvi zdravih ispitanika u Nizozemskoj, Italiji i Australiji. Zanimljivo je da je seroprevalencija bila podjednaka u svim zemljama, a prevladavali su i isti  $\beta$  i  $\gamma$  tipovi HPV-a. Zaključili su da količina i intenzitet UV zračenja ne utječu na stvaranje protutijela na kožne tipove HPV-a [176]. U još jednoj studiji rađenoj u Australiji ispitivana je prevalencija i spektar kožnih HPV tipova u brisevima kože čela kod zdravih pojedinaca redovito izloženih suncu i onih koji su rjeđe izloženi. Nije utvrđena razlika u prevalenciji HPV DNK između dviju grupa ispitanika, ali u skupini bolesnika redovito izloženih suncu utvrđen je veći broj HPV tipova  $\beta$ 2 i  $\gamma$  grupe. S druge strane utvrđeno je da se rizik za infekciju kožnim tipovima HPV-a povećava s brojem godina provedenim radeći na otvorenom [175]. Iannacone i suradnici utvrdili su bitnu povezanost između nemogućnosti »tamnjenja« i SCC-a kod bolesnika seropozitivnih na HPV tipove rodova  $\alpha$  i  $\beta$  nego kod seronegativnih bolesnika [151]. Istraživanja su se provodila i u smislu utvrđivanja razlike u HPV prevalenciji između

različitih etničkih skupina i klimatskih područja. Proučavajući prevalenciju i spektar HPV tipova na zdravoj koži u različitim zemljama svijeta, Antonsson i suradnici utvrdili su najveću prevalenciju u Švedskoj (HPV DNK utvrđena je u 68% uzoraka iz Bangladeša, 54% uzoraka iz Japana, 52% uzoraka iz Etiopije, 42% uzoraka iz Zambije te 70% uzoraka iz Švedske) [108]. Bouwes Bavinck i suradnici ispitivali su prisutnost 25  $\beta$  HPV tipova u folikulima obrva bolesnika sa SCC-om i u kontrolnoj skupini. Pronašli su bitno veću prevalenciju  $\beta$  HPV-a u Nizozemskoj, statistički neznatno veću prevalenciju u Italiji, dok razlika između SCC i kontrolne skupine u prevalenciji HPV-a u Australiji nije utvrđena. Uz to su utvrdili da je u Nizozemskoj prisutnost  $\beta$  HPV infekcije povezana s gotovo tri puta povećanim rizikom od SCC-a, dok ista veza nije utvrđena za Italiju i Australiju (zemlje s većom insolacijom) [204]. Slične rezultate dobili smo i ovom studijom, gdje smo uspoređujući SCC-e ekscidirane s kože lica između dva zemljopisna područja s različitim brojem sunčanih dana (gradovi Rijeka i Zagreb), utvrdili statistički bitno povećanu zastupljenost HPV-a u SCC-a s kože lica u gradu s manjim brojem sunčanih dana (Grad Zagreb). Moguće objašnjenje za takve rezultate bilo bi da UV zračenje ima veći utjecaj u etiopatogenezi tumora kože u područjima jače insolacije (u našem slučaju Grad Rijeka), dok u područjima slabije insolacije veću ulogu u etiopatogenezi ima HPV (u našem slučaju Grad Zagreb). Malobrojne su studije koje ispituju utjecaj UV zračenja i HPV-a na BCC. Zakrzewska i suradnici u svom istraživanju na 50 BCC-a nisu utvrdili bitnu korelaciju između  $\beta$  HPV pozitivnosti s jedne strane te UV zračenja i tipa kože s druge strane [117]. U ovom istraživanju ispitivanjem razlike u zastupljenosti HPV-a u BCC-a ekscidiranim s kože lica između dva zemljopisna područja s različitim brojem sunčanih dana (razlike između gradova Rijeke i Zagreba) utvrđena je statistički bitna razlika u zastupljenosti HPV-a u uzorcima BCC-a iz Grada Zagreba. S druge strane nije utvrđena statistički bitna razlika u zastupljenosti HPV-a u BCC-a koji su ekscidirani s kontinuirano fotoekspoziranoga područja (lice) i intermitentno ekspoziranoga područja (leđa). Ipak, u BCC-a s kože lica utvrđeni su različiti HPV tipovi (najčešće HPV 24), dok je u BCC-a s kože leđa utvrđen samo jedan HPV tip (HPV 36) u jednom uzorku. Na daljnjim je studijama da se utvrdi stvarna i točna uloga HPV-a u nastanku NMTK-a. Novije metode mogle bi nas dovesti do odgovora na ta pitanja. Tako mjerenjem virusne mRNK u stanicama možemo odrediti aktivnost virusa i na taj način potvrditi njegovu ulogu u patogenezi NMTK-a. Arron i suradnici analizom ekspresije mRNK u SCC-a kože nisu utvrdili transkripcijsku aktivnost HPV-a, za razliku od

povećane aktivnosti u periungvalnom i cervikalnom SCC-u. Na osnovi dobivenih rezultata zaključili su da niska prisutnost  $\beta$  HPV DNK u SCC-a kože uz nedokazanu aktivnu ekspresiju virusnih gena govori više u prilog kolonizaciji nego stvarnoj ulozi virusa u etiologiji tih tumora [205]. No navedeni rezultati samo su potvrda da karcinogenezi, uz sučimbenike, pridonose drugi mehanizmi djelovanja. Uzevši u obzir sve navedeno i rezultate ovog istraživanja, zaključujemo da HPV i UV zračenje djeluju kao sučimbenici u nastanku SCC-a, a moguće i BCC-a. Kako bi se mogli dati konačni zaključci, potrebna su daljnja istraživanja na puno većim uzorcima.

## 7. ZAKLJUČAK

Ovim istraživanjem nismo utvrdili statistički bitno povećanu zastupljenost DNK HPV-a u prekancerozama (AK) i karcinomima *in situ* (MB) nego u već razvijenim karcinomima (NMTK), no utvrđena je statistički bitno povećana zastupljenost DNK HPV-a u uzorcima SCC-a i BCC-a s fotoeksponirane kože iz Grada Zagreba (područje slabije insolacije). Navedeno ne ide u prilog »hit and run« teoriji i govori da je HPV bitan i u kasnijim stadijima karcinogeneze, uz druge važne čibenike (UV zračenje).

Nešto veća zastupljenost HPV-a utvrđena je u uzorcima SCC-a nego BCC-a. Zbog čega HPV dovodi do neoplazije suprabazalnih, a ne i bazalnih epidermalnih keratinocita, ostaje nepoznato. Pretpostavlja se kako biološki mehanizmi koji potiču HPV proliferaciju potiču i inficirane keratinocite više prema razvoju SCC-a nego BCC-a [206]. Nije utvrđena veća zastupljenost DNK HPV-a u uzorcima BCC-a s kože trajno izložene UV zračenju nego s kože koja je većinom nefotoeksponirana (koža trupa), no utvrđena je veća zastupljenost DNK HPV-a kod BCC-a ekscidiranih sa zemljopisnog područja s manjim brojem sunčanih dana (Grad Zagreb). Isto tako, suprotno očekivanju, utvrđena je veća zastupljenost DNK HPV-a u uzorcima SCC-a sa zemljopisnog područja s manjim brojem sunčanih dana (Grad Zagreb). Navedeno bismo mogli objasniti većom ulogom HPV-a u nastanku NMTK-a u područjima gdje UV zračenje ima manje značenje.

Iako visokorizični tipovi HPV-a imaju bitnu ulogu u nastanku karcinoma genitalnoga i orofaringealnoga područja, pitanje je igraju li ulogu i u nastanku karcinoma kože. Patogenetsko značenje sluzničkih tipova HPV-a (HPV 16 i 18) u nastanku NMTK-a, prekanceroza i karcinoma *in situ* nije potvrđena s obzirom da navedeni tipovi HPV-a nisu dokazani u spomenutim bolestima.

Ovim istraživanjem i pregledom dosadašnje literature potvrđena je uloga HPV-a kao sučimbenika u nastanku NMTK-a. Potrebna su daljnja istraživanja i studije na većem broju ispitanika kako bi se sa sigurnošću potvrdilo da HPV uzrokuje NMTK. Danas primjenjivana imunomodulatorna terapija u budućnosti bi mogla postati prva terapija izbora ranih stadija NMTK-a koja poticanjem otpuštanja upalnih citokina, poticanjem proliferacije te migracije imunih stanica djeluje i na početnu staničnu displaziju i na HPV infekciju. S druge strane otvara se mogućnost za razvoj cjepiva koje bi pružalo zaštitu od brojnih tipova HPV-a (EV

HPV tipovi) koji su uzročnici širokoga spektra dermatoloških bolesti. Uspjesi su već polučeni na životinjskim modelima, a sve je izvjesniji razvoj humanog cjepiva koje će spriječiti nastanak NMTK-a [207]. Posebnu važnost navedena terapija imala bi u određenim »rizičnim« skupinama bolesnika (npr. bolesnici nakon transplantacije organa), gdje bi se već i pravovremenim cijepljenjem protiv određenih HPV tipova eventualno mogao spriječiti kasniji razvoj NMTK-a [208]. Konačno, sve navedeno moglo bi pozitivno utjecati na kvalitetu života i zdravlja bolesnika s NMTK-om, kao što bi i moglo rezultirati smanjenjem troškova liječenja.

## 8. SAŽETAK

NMTK-i i AK-i jedni su od najčešćih tumora u ljudi uopće. Najznačajniji uzrok tih tumora jest UV zračenje, no u zadnje vrijeme postavlja se pitanje uloge HPV-a u etiopatogenezi. Mnogobrojnim studijama utvrđeni su različiti tipovi HPV-a u uzorcima NMTK-a, prekanceroza i *in situ* karcinoma, koji su nazvani kožnim tipovima (HPV 5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 19–25, 36–38, 47, 49, 75, 76, 80, 92, 93 i 96). Upravo ti tipovi povezani su s nastankom NMTK-a, no s njihovim nastankom povezuju se i neki sluznički, visokorizični tipovi. Prijašnjim istraživanjima utvrđena je veća zastupljenost HPV-a u prekancerozama i *in situ* karcinomima, što je dovelo do »hit and run« teorije, koja govori o važnosti virusa u počecima nastanka tih tumora. S obzirom da ovim istraživanjem nije utvrđena statistički bitno povećana zastupljenost DNK HPV-a u prekancerozama i karcinomima *in situ* u usporedbi s razvijenim karcinomima, »hit and run« teorija nije potvrđena te se zaključuje da je HPV bitan i u kasnijim stadijima karcinogeneze. Pretpostavlja se da kožni HPV tipovi utječući na mehanizme popravka DNK i sprječavajući UV induciranu apoptozu, djeluju sinergistički s UV zračenjem u poticanju karcinogeneze. Stoga smo u ovom istraživanju ispitivali razliku između SCC-a i BCC-a ekscidiranih s fotoeksponirane kože s dvaju područja različite insolacije (gradovi Rijeka i Zagreb). Suprotno očekivanju utvrdili smo statistički bitnu razliku u pojavnosti DNK HPV-a u SCC-a i BCC-a ekscidiranim s fotoeksponirane kože s područja slabije insolacije, tj. u Gradu Zagrebu. Moguće objašnjenje za takav rezultat jest veća uloga HPV-a u nastanku NMTK-a u područjima gdje UV zračenje ima manje značenje. S druge strane nismo utvrdili statistički bitnu razliku u pojavnosti DNK HPV-a u uzorcima BCC-a s kože trajno izložene UV zračenju nego na koži koja je većinom nefotoeksponirana (koža trupa). Utvrđujući prisutnost sluzničkih tipova HPV-a (HPV 16 i 18), nismo utvrdili njihovu prisutnost u NMTK-a i AK-a, kao niti u MB-a (ekstragenitalne lokalizacije). Ovim istraživanjem i pregledom dosadašnje literature potvrđena je uloga HPV-a kao sučimbenika u nastanku NMTK-a, no potrebna su daljnja istraživanja i studije na većem broju ispitanika kako bi se sa sigurnošću potvrdilo da HPV uzrokuje NMTK.

## 9. STRUKTURIRANI SAŽETAK NA ENGLESKOM JEZIKU

### THE INFLUENCE OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS ON NONMELANOMA SKIN CANCER ETIOLOGY

Vlatka Čavka

2016

Introduction: In the recent years there have been some serious discussions about the human papillomavirus as a cofactor in etiology of nonmelanoma skin cancers. Cutaneous HPV types have been established and associated with precancerous lesions, *in situ* carcinomas and nonmelanoma skin cancers in numerous studies, but the actual importance of the virus in etiology of these lesions remains unknown. The aim of this study was to analyse the expression of various HPV types in precancerous lesions (AK), *in situ* carcinomas (MB) and nonmelanoma skin cancers (SCC and BCC) and to investigate differences in expression of various HPV types according to tumor localization (face/trunk) and patient's geographic distribution (two regions with different insolation).

Methods and Materials: 130 paraffin embedded tissues, histologically verified as AK, MB, SCC and BCC were analysed. After DNA isolation, skin HPV genotypes were detected using RHA kit Skin (beta) HPV (Diassay, The Netherlands) and »high risk« genotypes using HPV screening kit (AID, Germany).

Conclusion: Significant difference between HPV DNA expression in precancerous lesions/*in situ* carcinomas and invasive skin carcinomas was not found. Higher expression of HPV DNA was detected in invasive skin carcinomas (SCC and BCC) excised from photo-exposed skin of patients living in a city with lower number of sunny days per year (city of Zagreb). High-risk HPV types (HPV 16 and 18) were not detected in NMSC, AK and MB. These results suggest the role of HPV in NMSC carcinogenesis but further investigations need to be conducted.



## 10. LITERATURA

1. Marinović B. Razvoj kože i poremećaj njezina embrionalnog razvoja. U: Basta-Juzbašić A, ur. Dermatovenerologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2014, str. 3–5.
2. Wolff HH. Introduction to the skin and dermatology. U: Burgdorf WHC, Plewig G, Wolff HH, Landthaler M, ur. Braun-Falco's Dermatology. Heidelberg: Springer; 2009, str. 3–16.
3. Dobrić I, Pašić A. Pregled temeljnih podataka o građi, funkciji i razvitku kože. U: Dobrić I, ur. Dermatovenerologija. Zagreb: Grafoplast; 2005, str. 13–22.
4. Marinović B. Građa i funkcija kože. U: Basta-Juzbašić A, ur. Dermatovenerologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2014, str. 6–10.
5. Lewis WH. Anatomy of the human body, by Henry Gray. Philadelphia: Lea & Febiger; 1918.
6. Pašić A, Čeović R. Maligni epidermalni tumori. U: Basta-Juzbašić A, ur. Dermatovenerologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2014, str. 661–79.
7. Reiffenberger J, Ruzicka T. Basal Cell Carcinoma. U: Burgdorf WHC, Plewig G, Wolff HH, Landthaler M, ur. Braun-Falco's Dermatology. Heidelberg: Springer; 2009, str. 1348–56.
8. Erba P, Farhadi J, Wettstein R, Arnold A, Harr T, Pierer G. Morphoeic basal cell carcinoma of the face. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 2007;41:184–8.
9. Lim JL, Stern RS. High levels of ultraviolet B exposure increase the risk of non-melanoma skin cancer in psoralen and ultraviolet A-treated patients. *J Invest Dermatol* 2005;124:505–13.
10. Walling HW, Fosko SW, Geraminejad PA, Whitaker DC, Arpey CJ. Aggressive basal cell carcinoma: presentation, pathogenesis, and management. *Cancer Metastasis Rev* 2004;23:389–402.
11. Zhang H, Ping XL, Lee PK, i sur. Role of PTCH and p53 genes in early-onset basal cell carcinoma. *Am J Pathol* 2001;158:381–5.

12. Marks R, Jolley D, Dorevitch AP, Selwood TS. The incidence of non-melanocytic skin cancers in an Australian population: results of a five-year prospective study. *Med J Aust* 1989;150:475–8.
13. Wehner MR, Shive ML, Chren MM, Han J, Qureshi AA, Linos E. Indoor tanning and non-melanoma skin cancer: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2012;345:e5909.
14. Ferrucci LM, Cartmel B, Molinaro AM, Leffell DJ, Bale AE, Mayne ST. Indoor tanning and risk of early-onset basal cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol* 2012;67:552–62.
15. Bale AE, Yu KP. The hedgehog pathway and basal cell carcinomas. *Hum Mol Genet* 2001;10:757–62.
16. Patel MS, Thigpen JT, Vance RB, Elkins SL, Guo M. Basal cell carcinoma with lung metastasis diagnosed by fine-needle aspiration biopsy. *South Med J* 1999;92:321–4.
17. Akinci M, Aslan S, Markoc F, Cetin B, Cetin A. Metastatic basal cell carcinoma. *Acta Chir Belg* 2008;108:269–72.
18. Marcil I, Stern RS. Risk of developing a subsequent nonmelanoma skin cancer in patients with a history of nonmelanoma skin cancer: a critical review of the literature and meta-analysis. *Arch Dermatol* 2000;136:1524–30.
19. Levi F, Te VC, Randimbison L, Maspoli M, La Vecchia C. Second primary oral and pharyngeal cancers in subjects diagnosed with oral and pharyngeal cancer. *Int J Cancer* 2006;119:2702–4.
20. Mc Loone NM, Tolland J, Walsh M, Dolan OM. Follow-up of basal cell carcinomas: an audit of current practice. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2006;20:698–701.
21. Dobrić I, Radoš J. Maligni epitelni tumori, prognostički nedovoljno jasne promjene koje se (ponegdje) klasificiraju kao verukozni karcinom, te rjeđi oblici karcinoma kože i metastatski karcinomi u koži. U: Dobrić I, ur. *Dermatovenerologija*. Zagreb: Grafoplast; 2005, str. 395–402.
22. Trakatelli M, Morton C, Nagore E, i sur. Update of the European guidelines for basal cell carcinoma management. *Eur J Dermatol* 2014;24:312–29.

23. Mendenhall WM, Amdur RJ, Hinerman RW, Cогnetta AB, Mendenhall NP. Radiotherapy for cutaneous squamous and basal cell carcinomas of the head and neck. *Laryngoscope* 2009;119:1994–9.
24. Von Hoff DD, LoRusso PM, Rudin CM, i sur. Inhibition of the hedgehog pathway in advanced basal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2009;361:1164–72.
25. Migden MR, Guminski A, Gutzmer R, i sur. Treatment with two different doses of sonidegib in patients with locally advanced or metastatic basal cell carcinoma (BOLT): a multicentre, randomised, double-blind phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2015;16:716–28.
26. Christenson LJ, Borrowman TA, Vachon CM, i sur. Incidence of basal cell and squamous cell carcinomas in a population younger than 40 years. *JAMA* 2005;294:681–90.
27. Brash DE. Roles of the transcription factor p53 in keratinocyte carcinomas. *Br J Dermatol* 2006;154Suppl 1:8–10.
28. Perry PK, Silverberg NB. Cutaneous malignancy in albinism. *Cutis* 2001;67:427–30.
29. Zghal M, El-Fekih N, Fazaa B, i sur. Xeroderma pigmentosum. Cutaneous, ocular, and neurologic abnormalities in 49 Tunisian cases. *Tunis Med* 2005;83:760–3.
30. Jensen P, Hansen S, Moller B, i sur. Skin cancer in kidney and heart transplant recipients and different long-term immunosuppressive therapy regimens. *J Am Acad Dermatol* 1999;40:177–86.
31. Euvrard S, Kanitakis J, Decullier E, i sur. Subsequent skin cancers in kidney and heart transplant recipients after the first squamous cell carcinoma. *Transplantation* 2006;81:1093–100.
32. Veness MJ, Quinn DI, Ong CS, i sur. Aggressive cutaneous malignancies following cardiothoracic transplantation: the Australian experience. *Cancer* 1999;85:1758–64.
33. Schwaederle M, Elkin SK, Tomson BN, Carter JL, Kurzrock R. Squamousness: Next-generation sequencing reveals shared molecular features across squamous tumor types. *Cell Cycle* 2015;14:2355–61.
34. El-Mofty SK. Histopathologic risk factors in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma variants: an update with special reference to HPV-related carcinomas. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2014;19:e377–85.

35. Mallipeddi R, Keane FM, McGrath JA, Mayou BJ, Eady RA. Increased risk of squamous cell carcinoma in junctional epidermolysis bullosa. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2004;18:521–6.
36. Fine JD, Johnson LB, Weiner M, Li KP, Suchindran C. Epidermolysis bullosa and the risk of life-threatening cancers: the National EB Registry experience, 1986-2006. *J Am Acad Dermatol* 2009;60:203–11.
37. Zaravinos A. An updated overview of HPV-associated head and neck carcinomas. *Oncotarget* 2014;5:3956–69.
38. Kostović K. Prekanceroze. U: Basta-Juzbašić A, ur. *Dermatovenerologija*. Zagreb: Medicinska naklada; 2014, str. 632–41.
39. Clayman GL, Lee JJ, Holsinger FC, i sur. Mortality risk from squamous cell skin cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:759–65.
40. Rowe DE, Carroll RJ, Day CL jr. Prognostic factors for local recurrence, metastasis, and survival rates in squamous cell carcinoma of the skin, ear, and lip. Implications for treatment modality selection. *J Am Acad Dermatol* 1992;26:976–90.
41. Nelson BR, Railan D, Cohen S. Mohs' micrographic surgery for nonmelanoma skin cancers. *Clin Plast Surg* 1997;24:705–18.
42. Sterry W, Stockfleth E. Malignant epithelial tumors. U: Burgdorf WHC, Plewig G, Wolff HH, Landthaler M, ur. *Braun-Falco's Dermatology*. Heidelberg: Springer; 2009, str. 1357–76.
43. Veness MJ, Morgan GJ, Palme CE, Gebiski V. Surgery and adjuvant radiotherapy in patients with cutaneous head and neck squamous cell carcinoma metastatic to lymph nodes: combined treatment should be considered best practice. *Laryngoscope* 2005;115:870–5.
44. Bauman JE, Eaton KD, Martins RG. Treatment of recurrent squamous cell carcinoma of the skin with cetuximab. *Arch Dermatol* 2007;143:889–92.
45. Suen JK, Bressler L, Shord SS, Warso M, Villano JL. Cutaneous squamous cell carcinoma responding serially to single-agent cetuximab. *Anticancer Drugs* 2007;18:827–9.

46. Ljubojević-Hadžavdić S, Skerlev M, Ljubojević-Grgec D. Bolesti izvanjskoga spolovila. U: Basta-Juzbašić A, ur. Dermatovenerologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2014, str. 578–607.
47. Kovacs A, Yonemoto K, Katsuoka K, Nishiyama S, Harhai I. Bowen's disease: statistical study of a 10 year period. *J Dermatol* 1996;23:267–74.
48. Gupta S, Nutan, Dogra S, Kanwar AJ. Bowen Disease over photoprotected site in an Indian male. *Dermatol Online J* 2009;15:16.
49. Skerlev M, Ljubojevic S. The specificities of the HPV-genital infections in males. *Med Glas (Zenica)* 2010;7:89-95.
50. Derancourt C, Mougin C, Chopard Lallier M, Coumes-Marquet S, Drobacheff C, Laurent R. Oncogenic human papillomaviruses in extra-genital Bowen disease revealed by in situ hybridization. *Ann Dermatol Venereol* 2001;128:715–8.
51. Shim WH, Park HJ, Kim HS, i sur. Bowenoid Papulosis of the Vulva and Subsequent Periungual Bowen's Disease Induced by the Same Mucosal HPVs. *Ann Dermatol* 2011;23:493–6.
52. Kossard S, Rosen R. Cutaneous Bowen's disease. An analysis of 1001 cases according to age, sex, and site. *J Am Acad Dermatol* 1992;27:406–10.
53. Drake AL, Walling HW. Variations in presentation of squamous cell carcinoma in situ (Bowen's disease) in immunocompromised patients. *J Am Acad Dermatol* 2008;59:68–71.
54. Ferrandiz L, Ruiz-de-Casas A, Trakatelli M, i sur. Assessing physicians' preferences on skin cancer treatment in Europe. *Br J Dermatol* 2012;167Suppl 2:29–35.
55. Morton CA, Birnie AJ, Eedy DJ. British Association of Dermatologists' guidelines for the management of squamous cell carcinoma in situ (Bowen's disease) 2014. *Br J Dermatol* 2014;170:245–60.
56. Glogau RG. The risk of progression to invasive disease. *J Am Acad Dermatol* 2000;42:23–4.
57. Dobrić I, Radoš J. Prekanceroze. U: Dobrić I, ur. Dermatovenerologija. Zagreb: Grafoplast; 2005, str. 391–4.

58. Frost CA, Green AC, Williams GM. The prevalence and determinants of solar keratoses at a subtropical latitude (Queensland, Australia). *Br J Dermatol* 1998;139:1033–9.
59. Anwar J, Wrone DA, Kimyai-Asadi A, Alam M. The development of actinic keratosis into invasive squamous cell carcinoma: evidence and evolving classification schemes. *Clin Dermatol* 2004;22:189–96.
60. Leffell DJ. The scientific basis of skin cancer. *J Am Acad Dermatol* 2000;42:18–22.
61. Salasche SJ. Epidemiology of actinic keratoses and squamous cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol* 2000;42:4–7.
62. Frost CA, Green AC. Epidemiology of solar keratoses. *Br J Dermatol* 1994;131:455–64.
63. Green A, Battistutta D. Incidence and determinants of skin cancer in a high-risk Australian population. *Int J Cancer* 1990;46:356–61.
64. Franceschi S, Levi F, Randimbison L, La Vecchia C. Site distribution of different types of skin cancer: new aetiological clues. *Int J Cancer* 1996;67:24–8.
65. Backvall H, Asplund A, Gustafsson A, Sivertsson A, Lundeberg J, Ponten F. Genetic tumor archeology: microdissection and genetic heterogeneity in squamous and basal cell carcinoma. *Mutat Res* 2005;571:65–79.
66. Nelson MA, Einspahr JG, Alberts DS, i sur. Analysis of the p53 gene in human precancerous actinic keratosis lesions and squamous cell cancers. *Cancer Lett* 1994;85:23–9.
67. Parrish JA. Immunosuppression, skin cancer, and ultraviolet A radiation. *N Engl J Med* 2005;353:2712–3.
68. McBride P, Neale R, Pandeya N, Green A. Sun-related factors, betapapillomavirus, and actinic keratoses: a prospective study. *Arch Dermatol* 2007;143:862–8.
69. Roewert-Huber J, Stockfleth E, Kerl H. Pathology and pathobiology of actinic (solar) keratosis - an update. *Br J Dermatol* 2007;157Suppl 2:18–20.
70. Cockerell CJ. Histopathology of incipient intraepidermal squamous cell carcinoma ("actinic keratosis"). *J Am Acad Dermatol* 2000;42:11–7.
71. Thai KE, Fergin P, Freeman M, i sur. A prospective study of the use of cryosurgery for the treatment of actinic keratoses. *Int J Dermatol* 2004;43:687–92.

72. Kaufmann R, Spelman L, Weightman W, i sur. Multicentre intraindividual randomized trial of topical methyl aminolaevulinate-photodynamic therapy vs. cryotherapy for multiple actinic keratoses on the extremities. *Br J Dermatol* 2008;158:994–9.
73. Spencer JM, Hazan C, Hsiung SH, Robins P. Therapeutic decision making in the therapy of actinic keratoses. *J Drugs Dermatol* 2005;4:296–301.
74. Tutrone WD, Saini R, Caglar S, Weinberg JM, Crespo J. Topical therapy for actinic keratoses, II: Diclofenac, colchicine, and retinoids. *Cutis* 2003;71:373–9.
75. Sherry SD, Miles BA, Finn RA. Long-term efficacy of carbon dioxide laser resurfacing for facial actinic keratosis. *J Oral Maxillofac Surg* 2007;65:1135–9.
76. Marks R, Rennie G, Selwood TS. Malignant transformation of solar keratoses to squamous cell carcinoma. *Lancet* 1988;1:795–7.
77. Pei XF. The human papillomavirus E6/E7 genes induce discordant changes in the expression of cell growth regulatory proteins. *Carcinogenesis* 1996;17:1395–401.
78. Mesri EA, Feitelson MA, Munger K. Human viral oncogenesis: a cancer hallmarks analysis. *Cell Host Microbe* 2014;15:266–82.
79. Ljubojevic S, Skerlev M. HPV-associated diseases. *Clin Dermatol* 2014;32:227–34.
80. Forslund O, Iftner T, Andersson K, i sur. Cutaneous human papillomaviruses found in sun-exposed skin: Beta-papillomavirus species 2 predominates in squamous cell carcinoma. *J Infect Dis* 2007;196:876–83.
81. Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, zur Hausen H, de Villiers EM. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* 2010;401:70–9.
82. Botalico D, Chen Z, Dunne A, i sur. The oral cavity contains abundant known and novel human papillomaviruses from the Betapapillomavirus and Gammapapillomavirus genera. *J Infect Dis* 2011;204:787–92.
83. Kohler A, Gottschling M, Manning K, i sur. Genomic characterization of ten novel cutaneous human papillomaviruses from keratotic lesions of immunosuppressed patients. *J Gen Virol* 2011;92:1585–94.
84. Kovanda A, Kocjan BJ, Potocnik M, Poljak M. Characterization of a novel cutaneous human papillomavirus genotype HPV-125. *PLoS One* 2011;6:e22414.

85. Foulongne V, Sauvage V, Hebert C, i sur. Human skin microbiota: high diversity of DNA viruses identified on the human skin by high throughput sequencing. *PLoS One* 2012;7:e38499.
86. Kocjan BJ, Steyer A, Sagadin M, Hosnjak L, Poljak M. Novel human papillomavirus type 174 from a cutaneous squamous cell carcinoma. *Genome Announc* 2013;1:e00445–13.
87. Johansson H, Forslund O. Complete genome sequences of three novel human papillomavirus types, 175, 178, and 180. *Genome Announc* 2014;2:e00443–14.
88. Arroyo Muhr LS, Hultin E, Bzhalava D, i sur. Human papillomavirus type 197 is commonly present in skin tumors. *Int J Cancer* 2015;136:2546–55.
89. Cohen DN, Lawson SK, Shaver AC, i sur. Contribution of Beta-HPV Infection and UV Damage to Rapid-Onset Cutaneous Squamous Cell Carcinoma during BRAF-Inhibition Therapy. *Clin Cancer Res* 2015;21:2624–34.
90. Schmitt M, Depuydt C, Benoy I, i sur. Prevalence and viral load of 51 genital human papillomavirus types and three subtypes. *Int J Cancer* 2013;132:2395–403.
91. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, i sur. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003;348:518–27.
92. Galloway DA, Laimins LA. Human papillomaviruses: shared and distinct pathways for pathogenesis. *Curr Opin Virol* 2015;14:87–92.
93. Munger K, Jones DL. Human papillomavirus carcinogenesis: an identity crisis in the retinoblastoma tumor suppressor pathway. *J Virol* 2015;89:4708–11.
94. Zhang B, Chen W, Roman A. The E7 proteins of low- and high-risk human papillomaviruses share the ability to target the pRB family member p130 for degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:437–42.
95. Genter SM, Sterling S, Duensing S, Munger K, Sattler C, Lambert PF. Quantitative role of the human papillomavirus type 16 E5 gene during the productive stage of the viral life cycle. *J Virol* 2003;77:2832–42.
96. Onon TS. History of human papillomavirus, warts and cancer: what do we know today? *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2011;25:565–74.
97. McCaffery M. Autopsy of a mummy - warts and all. *Can Fam Physician* 1974;20:89–91.



98. Gorski O, Majnarić N. Grčko hrvatski rječnik. 4. izd. Zagreb: Školska knjiga; 1989, str. 237.
99. Dunn PM. Galen (AD 129-200) of Pergamun: anatomist and experimental physiologist. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2003;88:F441–3.
100. Fornaciari G. The Aragonese mummies of the Basilica of Saint Domenico Maggiore in Naples. *Med Secoli* 2006;18:843–64.
101. Marchant J. Ancient DNA: Curse of the Pharaoh's DNA. *Nature* 2011;472:404–6.
102. Carter JR, Ding Z, Rose BR. HPV infection and cervical disease: a review. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2011;51:103–8.
103. Franco EL, Harper DM. Vaccination against human papillomavirus infection: a new paradigm in cervical cancer control. *Vaccine* 2005;23:2388–94.
104. Orth G, Jablonska S, Favre M, Croissant O, Jarzabek-Chorzelska M, Rzeska G. Characterization of two types of human papillomaviruses in lesions of epidermodysplasia verruciformis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1978;75:1537–41.
105. Jablonska S, Dabrowski J, Jakubowicz K. Epidermodysplasia verruciformis as a model in studies on the role of papovaviruses in oncogenesis. *Cancer Res* 1972;32:583–9.
106. Feltkamp MC, Broer R, di Summa FM, i sur. Seroreactivity to epidermodysplasia verruciformis-related human papillomavirus types is associated with nonmelanoma skin cancer. *Cancer Res* 2003;63:2695–700.
107. Haedicke J, Iftner T. Human papillomaviruses and cancer. *Radiother Oncol* 2013;108:397–402.
108. Antonsson A, Erfurt C, Hazard K, i sur. Prevalence and type spectrum of human papillomaviruses in healthy skin samples collected in three continents. *J Gen Virol* 2003;84:1881–6.
109. Czegledy J. Human papilloma viruses in non-melanoma skin cancers. (A short review). *Acta Microbiol Immunol Hung* 1997;44:223–7.
110. Boxman IL, Russell A, Mulder LH, Bavinck JN, Schegget JT, Green A. Case-control study in a subtropical Australian population to assess the relation between non-melanoma skin cancer and epidermodysplasia verruciformis human papillomavirus

- DNA in plucked eyebrow hairs. The Nambour Skin Cancer Prevention Study Group. *Int J Cancer* 2000;86:118–21.
111. Hazard K, Karlsson A, Andersson K, Ekberg H, Dillner J, Forslund O. Cutaneous human papillomaviruses persist on healthy skin. *J Invest Dermatol* 2007;127:116–9.
  112. Asgari MM, Kiviat NB, Critchlow CW, i sur. Detection of human papillomavirus DNA in cutaneous squamous cell carcinoma among immunocompetent individuals. *J Invest Dermatol* 2008;128:1409–17.
  113. Bryan JT, Brown DR. Transmission of human papillomavirus type 11 infection by desquamated cornified cells. *Virology* 2001;281:35–42.
  114. Antonsson A, Karanfilovska S, Lindqvist PG, Hansson BG. General acquisition of human papillomavirus infections of skin occurs in early infancy. *J Clin Microbiol* 2003;41:2509–14.
  115. de Koning MN, Struijk L, Bavinck JN, i sur. Betapapillomaviruses frequently persist in the skin of healthy individuals. *J Gen Virol* 2007;88:1489–95.
  116. Michael KM, Waterboer T, Sehr P, i sur. Seroprevalence of 34 human papillomavirus types in the German general population. *PLoS Pathog* 2008;4:e1000091.
  117. Zakrzewska K, Regalbuto E, Pierucci F, i sur. Pattern of HPV infection in basal cell carcinoma and in perilesional skin biopsies from immunocompetent patients. *Virol J* 2012;9:309.
  118. Hsu JY, Chen AC, Keleher A, McMillan NA, Antonsson A. Shared and persistent asymptomatic cutaneous human papillomavirus infections in healthy skin. *J Med Virol* 2009;81:1444–9.
  119. Weissenborn SJ, de Koning MN, Wieland U, Quint WG, Pfister HJ. Intrafamilial transmission and family-specific spectra of cutaneous betapapillomaviruses. *J Virol* 2009;83:811–6.
  120. Bhat P, Mattarollo SR, Gosmann C, Frazer IH, Leggatt GR. Regulation of immune responses to HPV infection and during HPV-directed immunotherapy. *Immunol Rev* 2011;239:85–98.
  121. Frazer IH, Leggatt GR, Mattarollo SR. Prevention and treatment of papillomavirus-related cancers through immunization. *Annu Rev Immunol* 2011;29:111–38.

122. Tan HH, Goh CL. Viral infections affecting the skin in organ transplant recipients: epidemiology and current management strategies. *Am J Clin Dermatol* 2006;7:13–29.
123. Sun XW, Kuhn L, Ellerbrock TV, Chiasson MA, Bush TJ, Wright TC jr. Human papillomavirus infection in women infected with the human immunodeficiency virus. *N Engl J Med* 1997;337:1343–9.
124. Forslund O, Lindelof B, Hradil E, i sur. High prevalence of cutaneous human papillomavirus DNA on the top of skin tumors but not in "Stripped" biopsies from the same tumors. *J Invest Dermatol* 2004;123:388–94.
125. Purdie KJ, Pennington J, Proby CM, i sur. The promoter of a novel human papillomavirus (HPV77) associated with skin cancer displays UV responsiveness, which is mediated through a consensus p53 binding sequence. *EMBO J* 1999;18:5359–69.
126. Aubin F, Humbey O, Guerrini JS, Mouglin C, Laurent R. Non-melanoma skin cancers and human papillomavirus. *Ann Dermatol Venereol* 2003;130:1131–8.
127. Akgul B, Bostanci N, Westphal K, i sur. Human papillomavirus 5 and 8 E6 downregulate interleukin-8 secretion in primary human keratinocytes. *J Gen Virol* 2010;91:888–92.
128. Ghittoni R, Accardi R, Hasan U, Gheit T, Sylla B, Tommasino M. The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human papillomaviruses. *Virus Genes* 2010;40:1–13.
129. Caldeira S, Zehbe I, Accardi R, i sur. The E6 and E7 proteins of the cutaneous human papillomavirus type 38 display transforming properties. *J Virol* 2003;77:2195–206.
130. Quint KD, Genders RE, de Koning MN, i sur. Human Beta-papillomavirus infection and keratinocyte carcinomas. *J Pathol* 2015;235:342–54.
131. Kamper N, Day PM, Nowak T, i sur. A membrane-destabilizing peptide in capsid protein L2 is required for egress of papillomavirus genomes from endosomes. *J Virol* 2006;80:759–68.
132. Wallace NA, Robinson K, Galloway DA. Beta human papillomavirus E6 expression inhibits stabilization of p53 and increases tolerance of genomic instability. *J Virol* 2014;88:6112–27.

133. Muench P, Probst S, Schuetz J, i sur. Cutaneous papillomavirus E6 proteins must interact with p300 and block p53-mediated apoptosis for cellular immortalization and tumorigenesis. *Cancer Res* 2010;70:6913–24.
134. Wallace NA, Robinson K, Howie HL, Galloway DA. HPV 5 and 8 E6 abrogate ATR activity resulting in increased persistence of UVB induced DNA damage. *PLoS Pathog* 2012;8:e1002807.
135. Iftner T, Elbel M, Schopp B, i sur. Interference of papillomavirus E6 protein with single-strand break repair by interaction with XRCC1. *EMBO J* 2002;21:4741–8.
136. Bedard KM, Underbrink MP, Howie HL, Galloway DA. The E6 oncoproteins from human betapapillomaviruses differentially activate telomerase through an E6AP-dependent mechanism and prolong the lifespan of primary keratinocytes. *J Virol* 2008;82:3894–902.
137. Gabet AS, Accardi R, Bellopede A, i sur. Impairment of the telomere/telomerase system and genomic instability are associated with keratinocyte immortalization induced by the skin human papillomavirus type 38. *FASEB J* 2008;22:622–32.
138. Dong W, Arpin C, Accardi R, i sur. Loss of p53 or p73 in human papillomavirus type 38 E6 and E7 transgenic mice partially restores the UV-activated cell cycle checkpoints. *Oncogene* 2008;27:2923–8.
139. Mendoza JA, Jacob Y, Cassonnet P, Favre M. Human papillomavirus type 5 E6 oncoprotein represses the transforming growth factor beta signaling pathway by binding to SMAD3. *J Virol* 2006;80:12420–4.
140. Harwood CA, Suretheran T, McGregor JM, i sur. Human papillomavirus infection and non-melanoma skin cancer in immunosuppressed and immunocompetent individuals. *J Med Virol* 2000;61:289–97.
141. Pfister H, Fuchs PG, Majewski S, Jablonska S, Pniewska I, Malejczyk M. High prevalence of epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomavirus DNA in actinic keratoses of the immunocompetent population. *Arch Dermatol Res* 2003;295:273–9.
142. Weissenborn SJ, Nindl I, Purdie K, i sur. Human papillomavirus-DNA loads in actinic keratoses exceed those in non-melanoma skin cancers. *J Invest Dermatol* 2005;125:93–7.

143. Lindelof B, Sigurgeirsson B, Gabel H, Stern RS. Incidence of skin cancer in 5356 patients following organ transplantation. *Br J Dermatol* 2000;143:513–9.
144. Shamanin V, zur Hausen H, Lavergne D, i sur. Human papillomavirus infections in nonmelanoma skin cancers from renal transplant recipients and nonimmunosuppressed patients. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:802–11.
145. Meyer T, Arndt R, Christophers E, Nindl I, Stockfleth E. Importance of human papillomaviruses for the development of skin cancer. *Cancer Detect Prev* 2001;25:533–47.
146. Zaravinos A, Kanellou P, Spandidos DA. Viral DNA detection and RAS mutations in actinic keratosis and nonmelanoma skin cancers. *Br J Dermatol* 2010;162:325–31.
147. Masini C, Fuchs PG, Gabrielli F, i sur. Evidence for the association of human papillomavirus infection and cutaneous squamous cell carcinoma in immunocompetent individuals. *Arch Dermatol* 2003;139:890–4.
148. Karagas MR, Nelson HH, Sehr P, i sur. Human papillomavirus infection and incidence of squamous cell and basal cell carcinomas of the skin. *J Natl Cancer Inst* 2006;98:389–95.
149. Forslund O, Iftner T, Andersson K, i sur. Cutaneous human papillomaviruses found in sun-exposed skin: Beta-papillomavirus species 2 predominates in squamous cell carcinoma. *J Infect Dis* 2007;196:876–83.
150. Karagas MR, Waterboer T, Li Z, i sur. Genus beta human papillomaviruses and incidence of basal cell and squamous cell carcinomas of skin: population based case-control study. *BMJ* 2010;341:c2986.
151. Iannacone MR, Gheit T, Waterboer T, i sur. Case-control study of cutaneous human papillomaviruses in squamous cell carcinoma of the skin. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2012;21:1303–13.
152. Bzhalava D, Guan P, Franceschi S, Dillner J, Clifford G. A systematic review of the prevalence of mucosal and cutaneous human papillomavirus types. *Virology* 2013;445:224–31.
153. Iannacone MR, Gheit T, Waterboer T, et al. Case-control study of cutaneous human papillomavirus infection in Basal cell carcinoma of the skin. *J Invest Dermatol* 2013;133:1512–20.

154. Mokhtari M, Mesbah A, Rajabi P, Rajabi MA, Chehrei A, Mougouei K. Determination of the relationship between Basal cell carcinoma and human papilloma virus, based on immunohistochemistry staining method. *Indian J Dermatol* 2009;54:225–8.
155. Andersson K, Michael KM, Luostarinen T, i sur. Prospective study of human papillomavirus seropositivity and risk of nonmelanoma skin cancer. *Am J Epidemiol* 2012;175:685–95.
156. Genders RE, Mazlom H, Michel A, i sur. The presence of betapapillomavirus antibodies around transplantation predicts the development of keratinocyte carcinoma in organ transplant recipients: a cohort study. *J Invest Dermatol* 2015;135:1275–82.
157. Forslund O, Ly H, Reid C, Higgins G. A broad spectrum of human papillomavirus types is present in the skin of Australian patients with non-melanoma skin cancers and solar keratosis. *Br J Dermatol* 2003;149:64–73.
158. Kvlividze O, Gogiashvili L, Burkadze G. The characteristics of human papillomavirus expression and cell proliferation in actinic keratosis and Bowen's disease of the skin. *Georgian Med News* 2006;136:108–12.
159. Mitsuishi T, Kawana S, Kato T, Kawashima M. Human papillomavirus infection in actinic keratosis and bowen's disease: comparative study with expression of cell-cycle regulatory proteins p21(Waf1/Cip1), p53, PCNA, Ki-67, and Bcl-2 in positive and negative lesions. *Hum Pathol* 2003;34:886–92.
160. Dianzani C, Pierangeli A, Chiricozzi A, Avola A, Degener AM. Cutaneous human papillomaviruses as recurrence factor in actinic keratoses. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2008;21:145–52.
161. Arnold AW, Hofbauer GF. Human papillomavirus and squamous cell cancer of the skin--epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomavirus revisited. *Curr Probl Dermatol* 2012;43:49–56.
162. Ultraljubičasto zračenje. *Hrvatska enciklopedija* 11. 1. izd. Zagreb: Leksikografski zavod Miroslav Krleža; 2009, str. 185.
163. Ultraviolet radiation. *Encyclopædia Britannica Online*. Encyclopædia Britannica Inc.; 2015; pristupljeno 22.11.2015., <http://www.britannica.com/science/ultraviolet-radiation>.

164. Kostović K. Fotodermatoze. U: Basta-Juzbašić A, ur. Dermatovenerologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2014, str. 310–25.
165. Moan J, Dahlback A, Setlow RB. Epidemiological support for an hypothesis for melanoma induction indicating a role for UVA radiation. *Photochem Photobiol* 1999;70:243–7.
166. Termorshuizen F, Feltkamp MC, Struijk L, de Gruijl FR, Bavinck JN, van Loveren H. Sunlight exposure and (sero)prevalence of epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomavirus. *J Invest Dermatol* 2004;122:1456–62.
167. Halprin KM, Comerford M, Presser SE, Taylor JR. Ultraviolet light treatment delays contact sensitization to nitrogen mustard. *Br J Dermatol* 1981;105:71–6.
168. Dell'oste V, Azzimonti B, Mondini M, i sur. Altered expression of UVB-induced cytokines in human papillomavirus-immortalized epithelial cells. *J Gen Virol* 2008;89:2461–6.
169. Akgul B, Lemme W, Garcia-Escudero R, Storey A, Pfister HJ. UV-B irradiation stimulates the promoter activity of the high-risk, cutaneous human papillomavirus 5 and 8 in primary keratinocytes. *Arch Virol* 2005;150:145–51.
170. Holloway A, Simmonds M, Azad A, Fox JL, Storey A. Resistance to UV-induced apoptosis by beta-HPV5 E6 involves targeting of activated BAK for proteolysis by recruitment of the HERC1 ubiquitin ligase. *Int J Cancer* 2015;136:2831–43.
171. Aung PP, Batrani M, Yang S, Mahalingam M. Apoptosis and in situ and invasive squamous cell carcinoma in sun-exposed sites. *Am J Dermatopathol* 2013;35:797–803.
172. Michel A, Kopp-Schneider A, Zentgraf H, Gruber AD, de Villiers EM. E6/E7 expression of human papillomavirus type 20 (HPV-20) and HPV-27 influences proliferation and differentiation of the skin in UV-irradiated SKH-hr1 transgenic mice. *J Virol* 2006;80:11153–64.
173. Viarisio D, Mueller-Decker K, Kloz U, i sur. E6 and E7 from beta HPV38 cooperate with ultraviolet light in the development of actinic keratosis-like lesions and squamous cell carcinoma in mice. *PLoS Pathog* 2011;7:e1002125.

174. Hsiao YP, Yang JH, Wu WJ, Lin MH, Sheu GT. E6 and E7 of human papillomavirus type 18 and UVB irradiation cooperatively regulate interleukin-6 and interleukin-8 expressions in basal cell carcinoma. *Exp Dermatol* 2013;22:672–4.
175. Chen AC, McMillan NA, Antonsson A. Human papillomavirus type spectrum in normal skin of individuals with or without a history of frequent sun exposure. *J Gen Virol* 2008;89:2891–7.
176. Waterboer T, Neale R, Michael KM, et al. Antibody responses to 26 skin human papillomavirus types in the Netherlands, Italy and Australia. *J Gen Virol* 2009;90:1986–98.
177. Salem SA, Zuel-Fakkar NM, Fathi G, Abd El-Reheem SM, Abd El-monem El-Tabakh A, Ragab DM. Comparative study of human papilloma virus in untreated and ultraviolet-treated psoriatic patients. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2010;26:78–82.
178. Cronin JG, Mesher D, Purdie K, et al. Beta-papillomaviruses and psoriasis: an intra-patient comparison of human papillomavirus carriage in skin and hair. *Br J Dermatol* 2008;159:113–9.
179. Egawa K. Do human papillomaviruses target epidermal stem cells? *Dermatology* 2003;207:251–4.
180. Schneider I, Lehmann MD, Kogosov V, Stockfleth E, Nindl I. Eyebrow hairs from actinic keratosis patients harbor the highest number of cutaneous human papillomaviruses. *BMC Infect Dis* 2013;13:186.
181. Birch-Johansen F, Norrild B, Olesen AB, Jensen A, Kjaer SK. HPV infection might play a role in the development of non-melanoma skin cancer in immunocompetent individuals. *Ugeskr Laeger* 2012;174:413–7.
182. Drvar DL, Lipozencic J, Sabol I, Mokos ZB, Ilic I, Grce M. Human papillomavirus status in extragenital nonmelanoma skin cancers. *Clin Dermatol* 2014;32:248–52.
183. Patel AS, Karagas MR, Perry AE, Nelson HH. Exposure profiles and human papillomavirus infection in skin cancer: an analysis of 25 genus beta-types in a population-based study. *J Invest Dermatol* 2008;128:2888–93.



184. Iannacone MR, Wang W, Stockwell HG, i sur. Sunlight exposure and cutaneous human papillomavirus seroreactivity in basal cell and squamous cell carcinomas of the skin. *J Infect Dis* 2012;206:399–406.
185. Iannacone MR, Gheit T, Pfister H, i sur. Case-control study of genus-beta human papillomaviruses in plucked eyebrow hairs and cutaneous squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2014;134:2231–44.
186. Paradisi A, Waterboer T, Sampogna F, i sur. Seropositivity for human papillomavirus and incidence of subsequent squamous cell and basal cell carcinomas of the skin in patients with a previous nonmelanoma skin cancer. *Br J Dermatol* 2011;165:782–91.
187. Struijk L, Bouwes Bavinck JN, Wannigen P, i sur. Presence of human papillomavirus DNA in plucked eyebrow hairs is associated with a history of cutaneous squamous cell carcinoma. *J Invest Dermatol* 2003;121:1531–5.
188. Struijk L, Hall L, van der Meijden E, i sur. Markers of cutaneous human papillomavirus infection in individuals with tumor-free skin, actinic keratoses, and squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15:529–35.
189. Casabonne D, Michael KM, Waterboer T, i sur. A prospective pilot study of antibodies against human papillomaviruses and cutaneous squamous cell carcinoma nested in the Oxford component of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Int J Cancer* 2007;121:1862–8.
190. Waterboer T, Abeni D, Sampogna F, i sur. Serological association of beta and gamma human papillomaviruses with squamous cell carcinoma of the skin. *Br J Dermatol* 2008;159:457–9.
191. Gubinelli E, Posteraro P, Cocuroccia B, Girolomoni G. Epidermodysplasia verruciformis with multiple mucosal carcinomas treated with pegylated interferon alfa and acitretin. *J Dermatolog Treat* 2003;14:184–8.
192. Pierceall WE, Goldberg LH, Ananthaswamy HN. Presence of human papilloma virus type 16 DNA sequences in human nonmelanoma skin cancers. *J Invest Dermatol* 1991;97:880–4.
193. Park HR, Kim KH, Min SK, Seo J, Kim DH, Kwon MJ. Low rate of detection of mucosal high-risk-type human papillomavirus in Korean patients with extragenital

- Bowen's disease and squamous cell carcinoma, especially in digital cases. *Biomed Res Int* 2013;2013:421205.
194. Shayanfar N, Hosseini N, Panahi M, i sur. Detection of mucosal type human papillomavirus in cutaneous squamous cell carcinoma in Iran. *Pathol Res Pract* 2013;209:90–4.
  195. Hama N, Ohtsuka T, Yamazaki S. Detection of mucosal human papilloma virus DNA in bowenoid papulosis, Bowen's disease and squamous cell carcinoma of the skin. *J Dermatol* 2006;33:331–7.
  196. Andersson K, Luostarinen T, Strand AS, i sur. Prospective study of genital human papillomaviruses and nonmelanoma skin cancer. *Int J Cancer* 2013;133:1840–5.
  197. Zheng S, Adachi A, Shimizu M, i sur. Human papillomaviruses of the mucosal type are present in some cases of extragenital Bowen's disease. *Br J Dermatol* 2005;152:1243–7.
  198. Mii S, Niiyama S, Takasu H, i sur. Detection of human papillomavirus type 16 in Bowen's carcinoma of the toe. *Int J Dermatol* 2012;51:804–8.
  199. Idriss MH, Misri R, Boer-Auer A. Orthokeratotic Bowen disease: a histopathologic, immunohistochemical and molecular study. *J Cutan Pathol* 2015;Epub ahead of print.
  200. Lampert A, Pauwels C, Duboucher C, Morel G, Poveda JD, Perie G. Detection of human papillomavirus in cutaneous extragenital Bowen's disease in immunocompetent patients. *Ann Dermatol Venereol* 2000;127:40–5.
  201. Escutia B, Ledesma E, Serra-Guillen C, i sur. Detection of human papilloma virus in normal skin and in superficial and nodular basal cell carcinomas in immunocompetent subjects. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2011;25:832–8.
  202. Andersson K, Waterboer T, Kirnbauer R, i sur. Seroreactivity to cutaneous human papillomaviruses among patients with nonmelanoma skin cancer or benign skin lesions. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008;17:189–95.
  203. Godar DE, Tang R, Merrill SJ. Pharyngeal and cervical cancer incidences significantly correlate with personal UV doses among whites in the United States. *Anticancer Res* 2014;34:4993–9.

204. Bouwes Bavinck JN, Neale RE, Abeni D, et al. Multicenter study of the association between betapapillomavirus infection and cutaneous squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2010;70:9777–86.
205. Arron ST, Ruby JG, Dybbro E, Ganem D, Derisi JL. Transcriptome sequencing demonstrates that human papillomavirus is not active in cutaneous squamous cell carcinoma. *J Invest Dermatol* 2011;131:1745–53.
206. Ally MS, Tang JY, Arron ST. Cutaneous human papillomavirus infection and Basal cell carcinoma of the skin. *J Invest Dermatol* 2013;133:1456–8.
207. Vinzon SE, Rosl F. HPV vaccination for prevention of skin cancer. *Hum Vaccin Immunother* 2015;11:353–7.
208. Aldabagh B, Angeles JG, Cardones AR, Arron ST. Cutaneous squamous cell carcinoma and human papillomavirus: is there an association? *Dermatol Surg* 2013;39:1-23.

## 11. ŽIVOTOPIS

Vlatka Čavka, djevojački Bušić, rođena je u Zagrebu 1981. U Zagrebu je i maturirala na VII. gimnaziji 1999. te diplomirala na Medicinskom fakultetu 2005. Pripravnički staž obavila je na Klinici za infektivne bolesti „dr. Fran Mihaljević”, a stručni ispit položila je 2006. Od 2007. radi na Klinici za kožne i spolne bolesti Kliničkoga bolničkog centra „Sestre milosrdnice”. Polazila poslijediplomski specijalistički studij dermatovenerologije, a specijalistički ispit položila 2012. Također pohađala i 2008. završila poslijediplomski tečaj I. kategorije Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu „Dopplerska ultrazvučna dijagnostika vaskularnog sustava”. Godine 2015. bila je dobitnica „John Stratigos” memorijalne stipendije European Academy of Dermatology and Venereology (EADV). Uža su joj područja rada flebologija i psorijaza. Autorica je 37 znanstvenih radova, od toga 13 indeksiranih u Current Contents bazi, te četiriju poglavlja u knjizi. Autorica je i 19 kongresnih sažetaka. Članica je Hrvatskoga liječničkog zbora, Hrvatske liječničke komore, Hrvatskoga dermatovenerološkog društva, Hrvatske udruge za rane i EADV-a. Govori engleski, a pasivno se služi njemačkim jezikom. Udana je i majka dvojice sinova: Tvrtka i Trpimira. Hobi su joj skijanje i balet.