

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Sanela Štibi

POLIMORFIZAM GENA *IL-1B* I *IL-10*
KOD KARCINOMA VRATA
MATERNICE

Diplomski rad

Osijek, 2019.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Sanela Štibi

POLIMORFIZAM GENA *IL-1B* I *IL-10*
KOD KARCINOMA VRATA
MATERNICE

Diplomski rad

Osijek, 2019

Rad je izrađen u Laboratoriju za medicinsku genetiku pri Katedri za medicinsku biologiju i genetiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Mentorica rada: izv. prof. Jasenka Wagner Kostadinović, spec. med. biok. i lab. med.

Rad ima 27 stranica, 5 tablica.

ZAHVALA

Zahvaljem mentorici izv. prof. Jasenki Wagner, spec. med. biokemije i lab. medicine na stručnoj pomoći tijekom pisanja diplomskoga rada.

Zahvaljujem svojoj obitelji na moralnoj podršci koju su mi pružili tijekom studiranja.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Karcinom vrata maternice	1
1.2. Humani papiloma virus (HPV)	1
1.2.1. Imunološki odgovor na infekciju HPV-om.....	3
1.3. Citokini	3
1.3.1. Interleukin 1 beta (IL-1B).....	5
1.3.2. Interleukin-10 (IL-10).....	6
2. HIPOTEZA	8
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	9
4. ISPITANICI I METODE	10
4.1. Ispitanici	10
4.2. Metode	10
4.2.1. Izolacija DNA iz pune krvi	10
4.2.2. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (eng. <i>real time PCR</i>).....	11
4.2.3. Statistička obrada dobivenih podataka.....	11
5. REZULTATI	12
6. RASPRAVA	14
7. ZAKLJUČAK	18
8. SAŽETAK	19
9. SUMMARY	20
10. LITERATURA	21
11. ŽIVOTOPIS	25

KRATICE

HPV	humani papiloma virus
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
CIN	cervikalna intraepitelna neoplazija
APC	antigen predočne stanice (eng. <i>antigen presenting cells</i>)
NK	stanice prirodnoubilačke stanice (eng. <i>natural killer cells</i>)
TNF	faktor nekroze tumora (eng. <i>tumor necrosis factor</i>)
Th1	tip1 (eng. <i>T helper 1</i>)
Th2	tip2 (eng. <i>T helper 2</i>)
TNF α	faktor nekroze tumora alfa
IFN- γ	interferon gama
IL-1	interleukin-1
IL-2	interleukin-2
IL-12	interleukin-12
IL-4	interleukin-4
IL-5	interleukin-5
IL-6	interleukin-6
IL-8	interleukin-8
IL-10	interleukin-10
IL-1B	interleukin 1 beta
SNP	polimorfizam jednog nukleotida (eng. <i>single nucleotide polymorphism</i>)
IL-19	interleukin-19

IL-20	interleukin-20
IL-22	interleukin-22
IL-24	interleukin-24
IL-26	interleukin-26
IL-3	interleukin-3
MCH	glavni sustav tkivne podudarnosti (eng. <i>major histocompatibility complex</i>)
GM-CSF	faktor stimulacije granulocita i makrofaga
EDTA	etilendiamintetraoctenakiselina
PCR	lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (eng. <i>polymerase chain reaction</i>)

1. UVOD

1.1. Karcinom vrata maternice

Karcinom vrata maternice jedan je od vodećih uzroka smrti i drugi po učestalosti karcinoma u žena u svijetu. Bolest je češća u zemljama niskog ekonomskog statusa zbog nedostatka zdravstvene zaštite i loše osobne higijene. U 2008. godini dijagnosticirano je 530 000 novooboljelih slučajeva od karcinoma vrata maternice. Od ukupno 275 000 smrti uzrokovanih karcinomom vrata maternice godišnje u svijetu, 80 % događa se u zemljama u razvoju (1, 2).

U Europi od karcinoma vrata maternice godišnje oboli oko 58 000 žena, a umre oko 24 000 žena (3). Karcinom vrata maternice bolest je mlađih žena, najveće incidencije u dobi između 35 i 50 godine života. Incidencija ove bolesti najviša je u zemljama istočne Europe. Za razliku od država srednje i jugoistočne Europe, Hrvatska ima nižu incidenciju ove bolesti (4). Prema raspodjeli novooboljelih od raka prema sijelima kod žena u 2016. godini u Hrvatskoj, rak vrata maternice javlja se u 9 % (1013) slučajeva, od toga 3 % (319) odnosi se na karcinom vrata maternice (5).

Najčešći je uzrok nastanka karcinoma vrata maternice infekcija humanim papiloma virusom (HPV) koji je otkriven u 99,7 % cervikalnih tumora. Istraživanja su pokazala da su sojevi 16 i 18 odgovorni za oko 70 % karcinoma vrata maternice porijeklom iz pločastih stanica i za oko 86 % adenokarcinoma vrata maternice (4).

1.2. Humani papiloma virus (HPV)

Humani papiloma virus DNA je virus, promjera oko 50 nm. Pripada porodici *Papillomaviridae*. Sastoji se od dvolančane kružne DNA dužine oko 8000 parova baza. Kapsida je ikozaedričnog oblika, a čine ju 72 kapsomere. Virusni gen podijeljen je na tri područja. Područje L (eng. *late*), u kojem su zapisi za strukturne proteine. Područje E (eng. *early*) sadrži zapise za proteine odgovorne za umnažanje virusa i transformaciju stanice, odnosno onkogeni učinak. Područje R (eng. *regulatory*) obuhvaća gene koji kodiraju proteine ključne za regulaciju procesa umnažanja virusa (6, 7). Kasni geni *L1* i *L2* kodiraju proteinsku ovojniciu oko virusnog genoma, a rani geni (*E1-E7*) kodiraju proteine koji su uključeni u

kontrolu replikacije virusa, ekspresiju gena i interakciju sa staničnim proteinima stanice domaćina. Virusni onkogeni *E6* i *E7* uključeni su u niz staničnih procesa koji dovode do nekontrolirane proliferacije i stanične imortalizacije. Harald zur Hausen dokazao je da je HPV uzročnik karcinoma vrata maternice, za to je 2008. godine dobio Nobelovu nagradu za fiziologiju ili medicinu (7).

Infekcija HPV-om odvija se na sljedeći način:

1. Umnožavanje HPV-a ovisi o prisutnosti određenih virusnih proteina i zrelosti epitelnih stanica domaćina. U stanicama bazalnog sloja pločastog epitela odvija se početak infekcije. U tim stanicama otkriveni su kružni izvankromosomski dijelovi virusne DNA te je prisutna latentna infekcija.

2. Drugli oblik infekcije HPV-om vezan je uz tvorbu različitih tumora pločastog epitela koja se odvija u tri stupnja. U prvom stupnju HPV inficira stanicu, u drugom stupnju uz prisutnost HPV-a, glavnu ulogu imaju karcinogene tvari, dok treći stupanj karakterizira ugradnja virusne DNA u genom domaćina.

Obilježja onkogeneze i infekcije HPV-om jesu:

- samo kod nekolicine osoba koje su inficirane HPV-om dolazi do tvorbe tumora
- vremenski razmak od početka infekcije pa do tvorbe tumora je dug
- sinergistični učinak HPV-a s drugim karcinogenim čimbenicima (6).

Do sada je izolirano više od 110 genotipova HPV-a. Otprilike njih 40 ima sposobnost inficirati sluznicu anogenitalnog područja. Površinski sloj pločastog epitela kože i sluznice je regija koja je najčešće zahvaćena infekcijom. Prema tipu lezija koje izazivaju dijele se u tri skupine - tipove visokog rizika (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 i 59), mogući karcinogeni sojevi (26, 53, 66, 68, 73 i 82) te tipove niskog rizika (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, 89). U više od 90 % HPV pozitivnih karcinoma vrata maternice dokazana je prisutnost pet HPV genotipova: HPV 16, HPV 18, HPV 31, HPV 33 i HPV 45 (4, 7).

Infekcija HPV-om prva je najučestalija spolno prenosiva bolest. Rezultati epidemioloških studija pokazuju da je prevalencija HPV infekcija najviša u spolno aktivnih žena od 25 godina te da naglo opada između 45 - 50 godine života. Nakon 50. godine života zabilježen je drugi prevalencijski vršak što može upućivati na reaktivaciju latentnih infekcija. Veliki postotak ovakvih infekcija prolazi spontano (4).

Za razvoj preinvazivnih lezija vrata maternice (CIN) i karcinoma potrebna je trajna infekcija visoko onkogenim sojevima HPV virusa. Utvrđeno je da sklonost za razvoj

prekanceroznih lezija vrata maternice imaju žene koje su pozitivne na infekciju visokoonkogenog soja u dva navrata nakon 6 ili 12 mjeseci (4).

Glavni čimbenik rizika za kontinuitet i napredovanje infekcija papiloma virusa je imunodeficijencija i tip ljudskog papiloma virusa. Čimbenici rizika još uključuju: veći broj partnera, nedavnu uporabu oralne kontracepcije, pušenje te infekcije *Chlamydom trachomatis* (8).

1.2.1. Imunološki odgovor na infekciju HPV-om

Imunološki sustav kontrolira većinu infekcija humanim papiloma virusom prije nego što se razvije karcinom. Prvi korak u otkrivanju oštećenja od strane nespecifičnog (urođenog) imunološkog odgovora uključuje aktivaciju antigen predočnih stanica (APC, eng. *antigen presenting cells*). Izlučivanje proinflamatornih citokina i kemokina potiče migraciju viralnog antigena do regionalnih limfnih čvorova. U limfnim čvorovima APC stimuliraju različite antigen specifične CD4+ T stanice. Stimulacija CD4+ T stanica može pomoći u aktivaciji CD8+ T stanica ili omogućiti B stanicama proizvodnju neutralizirajućih antitijela usmjerenih prema proteinima kapside virusa. Aktivacija urođenog imunološkog odgovora uključuje i aktivaciju NK stanica (eng. *natural killer cells*), sekreciju interferona i poticanje aktivacije specifičnog (adaptivnog) imunološkog odgovora. Aktivirane CD8+ T stanice ciljaju stanice inficirane virusom u bazalnim slojevima epitela i tako postaju ključne za uklanjanje virusne infekcije. Plazma stanice potom luče neutralizirajuća protutijela koja imaju sposobnost ukloniti ostatke virusa, ali ne i stanice inficirane HPV-om (9).

1.3. Citokini

Citokini su pleiotropni proteini ili mali glikoproteini koji imaju molekularnu masu manju od 30kDA (200 aminokiselina). Proizvode ih različiti tipovi stanica poput leukocita koji reguliraju imunitet, upalna stanja i hematopoezu. Do danas je poznato oko 200 citokina (10). Funkcija citokina temelji se na građi pojedinih citokina i njihovih receptora te na vrsti stanica koje ih luče. Većina je citokina važna za rast, sazrijevanje i mobilizaciju stanica imunološkog sustava. Uloga citokina očituje se u stvaranju i regulaciji efektorskih funkcija u imunološkom odgovoru na infekcije, transplantaciju organa ili kod autoimunih bolesti.

Komunikacija između tkiva i imunološkog sustava u različitim bolestima posredovana je upravo citokinima pa je proučavanje njihova djelovanja važno za razumijevanje patofiziologije različitih bolesti (11).

Citokini posreduju međustaničnu komunikaciju, potiču aktivaciju, proliferaciju i diferencijaciju stanica, a mogu djelovati i citotoksično. Djeluju na imunosne, upalne i hematopoetske stanice (parakrino djelovanje). Autokrino djeluju na stanice koje ih luče. Imaju utjecaj na udaljena tkiva, a manji broj citokina luči se u krv (endokrino djelovanje). U djelovanju citokina izraženi su pleotropizam (jedan te isti citokin djeluje na nekoliko vrsta stanica) i redundancija (nekoliko citokina može imati isto djelovanje na istu stanicu) (12).

U literaturi je moguće pronaći različite klasifikacije citokina. Jedna je od klasifikacija klasična, u kojoj se citokini dijele na interleukine, interferone, čimbenike rasta hematopoetskih kolonija i citoksine. Također, citokini se mogu podijeliti na temelju građe receptora i prijenosu unutarstaničnog signala na pet obitelji: hematopoetska obitelj (tip I receptora), interferonska obitelj (tip II receptora), obitelj s receptorom poput imunoglobulina, obitelj receptora za faktor nekroze tumora (TNF, eng. *tumor necrosis factor*) i obitelj kemokinskih receptora. Prema funkciji citokini se dijele u četiri skupine: citokini urođene imunosti, citokini stečene imunosti, čimbenici rasta kolonija i imunosupresivni citokini (12).

Citokine urođene imunosti ili protuupalne citokine luče makrofagi i ostale akcesorne imunološke stanice kao odgovor na nespecifične upalne podražaje. Navedeni citokini mogu djelovati lokalno ili sustavno. Lokalno djelovanje obuhvaća aktivaciju endotelnih stanica kapilara i upalnih stanica na mjestu ozljede. Sustavno, citokini povećavaju tjelesnu temperaturu tijela i sintezu proteina akutne faze u jetrima. Tako se povećava otpornost organizma na infekcije i štetne agense. Limfociti su glavni izvor citokina specifične imunosti. Citokini specifične imunosti potiču rast i diobu zrelih limfocita, sazrijevanje aktivnih B limfocita u plazma stanice, rast i diferencijaciju NK stanica i proizvodnju protutijela (12).

Stvaranje je citokina potaknuto antigen specifičnom aktivacijom limfocita T4. Glavni regulatori imunološke reakcije su limfociti T4 ili pomoćnički limfociti T. Imunološki odgovor na infekciju reguliran je ravnotežom između citokina tipa 1 (Th1, eng. *T helper 1*) i tipa 2 (Th2, eng. *T helper 2*) (13). Th1 - utječu na stanični imunološki odgovor. Njihova je funkcija aktivacija makrofaga i reakcija stanične citotoksičnosti, koja uključuje faktor nekroze tumora alfa (TNF- α), interferon γ (IFN- γ), interleukin-1 (IL-1), interleukin-2 (IL-2), interleukin-12 (IL-12). Th2 - utječu na humoralni imunološki odgovor, inhibiraju makrofage. Neki od njih

jesu: interleukin-4 (IL-4), interleukin-5 (IL-5), interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8), interleukin-10 (IL-10) (13, 14).

1.3.1. Interleukin 1 beta (IL-1B)

Obitelj citokina IL-1 sadrži nekoliko članova uključujući IL-1A, IL-1B i IL-1 antagonist receptora (IL-1RN) (15). Gen koji kodira humani IL-1 kompleks (IL-1A, IL-1B, IL-1RN) smješten je na kromosomu 2q14. Uključen je u posredovanje akutne i kronične upale. Interleukin 1 beta ima mogućnost stimulacije mikrookoliša tumora i povećanja proliferacije stanica te poticanje angiogeneze tumorskog tkiva. Tako IL-1B postaje ključni posrednik interakcije između domaćina i okoliša u karcinogenezi. Gen *IL-1B* pokazao se kao vrlo polimorfan gen koji sadrži nekoliko polimorfizama jednog nukleotida (SNP, eng. *single nucleotide polymorphism*) u promotorskoj regiji. Dva SNP-a pronađena u promotorskoj regiji IL-1B su 31T/C i -511C/T (rs16944). Brojne epidemiološke studije istraživale su povezanost između IL-1B -511C/T (rs16944) i +3954C/T s različitim vrstama karcinoma, kao što karcinom želuca, pluća i dojke (16). IL-1B ističe se kao najbolje okarakteriziran i najviše istraživani citokin od ukupno 11 članova obitelji IL-1. IL-1B snažan je proupalni citokin ključan za imunološki odgovor domaćina na infekcije i ozlijede (17).

U najvećoj mjeri IL-1B proizvode krvne stanice monociti i tkivni makrofazi, iako ga izlučuju i druge vrste stanica poput dendritičkih stanica, neutrofila, masnih stanica, B i T stanica, epitelnih i endotelnih stanica. IL-1B povećava ekspresiju kemokina i adheziju molekula što potiče infiltraciju upalnih i imunokompetentnih stanica iz cirkulacije u tkiva. Zbog svoje važne uloge njegova je funkcija visoko regulirana. Nezreli inaktivni pro-oblik citokina cijepa protuupalna proteaza kaspaza 1 i tvori bioaktivni, zreli oblik citokina koji se zatim izlučuje. Aktivacija kaspaze 1 posredovana je inflamomima. Inflamosomi se sastoje od najmanje jednog člana NOD-u sličnih receptora (NLRs), (NLRP1, NLRP3 I NLRC4) povezanog s PYCARD ili ASC molekulama. Aktivacija inflamosoma ostvaruje se pomoću mikrobnih i ne mikrobnih signala (18).

Polimorfizam rs16944 (-511C/T) nalazi se u intronskoj regiji gena *IL-1B*, povezuje se s većom pojavnošću različitih karcinoma. Također, upravo taj polimorfizam uzrokuje povećanje unutar stanične koncentracije proteina IL-1B koji ima važnu ulogu u procesu karcinogeneze (16).

1.3.2. Interleukin-10 (IL-10)

Humani IL-10 sadrži 178 aminokiselina i V oblik homodimerskog citokina s molekularnom masom 37kDa. Spomenuti interleukin kodiran je genom smještenim na kromosomu 1 (1q31-1q32), a sadrži 5 eksona i 4 introna. Gen za *IL-10* visoko je polimorfan s nekoliko utvrđenih polimorfizama jednog nukleotida u promotorskoj regiji. Neki od SNP-ova djeluju na izražaj *IL-10* u različitim vrstama karcinoma poput karcinoma vrata maternice (19). IL-10 glavni je član superobitelji IL-10 koja uključuje IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, kao i podobitelj IFN- γ tipa III (20).

Interleukin-10 važan je pleiotropni imunoregulacijski citokin kojeg u prvom redu izlučuju makrofagi i Th1 limfociti, ali i Th2 limfociti, dendritičke stanice, B limfociti, monociti i masne stanice. Istraživanja su pokazala da ga proizvode i humane stanične linije karcinoma. Aktivnost IL-10 posredovana je pomoću IL-10 receptora koji je član obitelji citokinskih receptora klase II. Taj interleukin ima važnu ulogu u inhibiciji sposobnosti monocita i makrofaga da prezentiraju antigen T stanicama putem inhibicije ekspresije molekula MHC (eng. *major histocompatibility complex*) klase II. Znanstvenici su svoje zanimanje usmjerili na dva ponavljajuća dinukleotida (mikrosatelita) IL10.G i IL10.R, smještenih 1.2kb i 4kb uzvodno od mjesta početka transkripcije te tri SNP-a -1082 A > G (rs1800896), -819 T > C i -592 C > A, koja čine 3 predominantna haplotipa - GCC, ACC i ATA (21).

Pleiotropni citokin, IL-10 naznačen je kao važan regulator funkcije limfoidnih i mijeloidnih stanica. Osim toga, citokin ima snažan supresorski efekt na funkciju makrofaga, T stanica i NK stanica. Regulacija proliferacije i diferencijacije B stanica, masnih stanica i timocita još su neki od načina na koje IL-10 doprinosi regulaciji imunološkog sustava. Jedinstvena funkcija IL-10 uključuje poticanje, ali i suzbijanje aktivacije imunološkog sustava. IL-10 pripreman je suzbiti proizvodnju IL-2, IL-3, TNF, faktora stimulacije kolonije granulocita i makrofaga (GM-CSF), IFN- γ i ekspresiju molekula MHC II na makrofagima. S druge strane, može stimulirati proliferaciju B stanica, proizvodnju antitijela, masnih stanica i razvoj timocita. Th2 limfociti najvećim su djelom odgovorni za proizvodnju IL-10 što potiskuje aktivnost Th1 limfocita i rezultira smanjenjem IFN- γ , IL-2, GM-CSF i TNF α citokinske obitelji (22).

Veliki broj polimorfizama (prvenstveno polimorfizama jednog nukleotida) identificiran je u promotoru gena *IL-10*. Do danas je na *IL-10* genu zabilježeno najmanje 50 polimorfni lokusa, poput -2849, -2776, -2769 i -2763 i tri SNP -1082 A > G (rs1800896), -819 T > C i -592 C > A. Za navedene SNP-ove u promotorskoj regiji *IL-10* utvrđeno je da značajno utječu na transkripciju i ekspresiju gena. Molekularna istraživanja pokazala su kako ovakvi polimorfizmi mogu utjecati i/ili promijeniti osjetljivost pojedinca na različite oblike karcinoma poput karcinoma vrata, glave, želuca (23).

Polimorfizam rs1800896 (-1082 A > G) gena *IL-10* nalazi se 2 kilobaze uzvodno u promotorskoj regiji gena *IL-10* te je povezan s većom pojavnnošću različitih karcinoma uključujući karcinom vrata maternice (21).

2. HIPOTEZA

Dosadašnja istraživanja pokazala su da međudjelovanje HPV virusa i IL-10 može dovesti do nastanka imunosupresivnog mikrokoliša u cerviksu, dok se prisutnost T alela IL-1B povezuje s kroničnom upalom i perzistentnom infekcijom HPV16/18.

Hipoteza polazi od toga da pojedinci s prisutnim T alelom *IL-1B* (rs16944 ili -511C/T) koji uzrokuje povećanu produkciju IL-1B i polimorfizmom *IL-10* (rs1800896 ili -1082 A > G) imaju povećan rizik za razvoj karcinoma vrata maternice.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

- Analiza polimorfizama rs16944 (-511C/T) gena *IL-1B* i rs1800896 (-1082 A > G) gena *IL-10* između ispitanica s dokazanim karcinomom vrata maternice i ispitanica u kontrolnoj skupini.
- Utvrditi postoji li statistički značajno odstupanje u pojavnosti polimorfizama gena *IL-1B* i *IL-10* između ispitanica s dokazanim karcinomom vrata maternice i ispitanica u kontrolnoj skupini.

4. ISPITANICI I METODE

4.1. Ispitanici

Uzorci periferne krvi ispitanica prikupljeni su na Odjelu za ginekološku kirurgiju Zavoda za kiruršku onkologiju Klinike za tumore pri Kliničkom bolničkom centru Sestre milosrdnice u Zagrebu (ukupno 161 ispitanica). Prikupljeni su uzorci 81 pacijentice s dokazanim invazivnim karcinomom vrata maternice te 80 zdravih žena u kontrolnoj skupini koje imaju uredna zadnja tri citološka nalaza bez abnormalnosti epitela. U istraživanje nisu bile uključene žene s akutnom i kroničnom upalnom bolesti, žene koje su primale imunosupresivnu terapiju i žene liječene od malignih bolesti. Istraživanje je odobreno od strane Etičkog povjerenstva KBC Sestre Milosrdnice Zagreb. Istraživanje je provedeno kao retrospektivno istraživanje parova.

4.2. Metode

4.2.1. Izolacija DNA iz pune krvi

Uzorak krvi uzorkovan je u epruvetu s antikoagulansom EDTA (etilendiamintetraoctenakiselina). Izolacija DNA učinjena je pomoću komercijalnog kompleta za izolaciju DNA NucleoSpin Blood (Macherey-Nagel, Düren, Njemačka). On sadržava Proteinazu K, etanol, kolone, epruvete za prikupljanje uzorka te pufer B3, BW, B5 i BE (elucijski pufer). Tijekom izolacije DNA, dolazi do kontaminacije proteinima koji se moraju ukloniti. To se postiže Proteinazom K. Proteinaza K enzim je koji cijepa peptidnu vezu u proteinima pored karboksilne skupine hidrofobnih aminokiselinskih ostataka (acikličkih i aromatskih). Nakon dodavanja pufera B3, smjesa je inkubirana 20 minuta na 70 °C. Nakon inkubacije, lizatu se dodaje etanol koji će dehidrirati DNA te ukloniti soli zbog razlike u solubilizaciji. Kaotropni ioni koji se nalaze u lizatu stvorit će hidrofobnu okolinu. Pod tim hidrofobnim uvjetima, silica membrana NucleoSpin kolona predstavlja vezujuće mjesto za DNA. Proteini, metaboliti i drugi kontaminanti ne vežu se na membranu i stoga se ispiru tijekom sljedećih koraka pranja pomoću pufera BW te B5. DNA se eluira u zagrijanom blago alkalnom puferu BE. DNA je čuvana u BE puferu na -20 °C. Ukupan volumen izolirane DNA bio je 100µl (24).

4.2.2. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (eng. *real time PCR*)

Analiza točkastih mutacija izvodi se pomoću PCR-a u stvarnom vremenu na uređaju Applied Biosystems 7500 pomoću seta reagensa za genotipizaciju proizvođača Life Technologies/Applied Biosystems™ TaqMan® SNP Genotyping Assays. Ti reagensi koriste TaqMan® 5'- nukleaze za amplifikaciju i otkrivanje specifičnih polimorfizama u pročišćenim uzorcima genomske DNA. Svaki test omogućuje individualnu genotipizaciju jednog polimorfizma nukleotida (SNP). Djelovanje 5' nukleaze odvija se tijekom PCR amplifikacije u svakom ciklusu. Za PCR amplifikaciju, genomska DNA uvodi se u reakcijsku smjesu koja se sastoji od master mix-a, dvaju primera i dvije TaqMan® MGB (eng. *Minor groove binder*) probe s ne-fluorescentnim prigušivačima NFQ (eng. *Nonfluorescent quencher*). Proba za otkrivanje sekvence alela 1 označena je VIC fluorescentnom bojom dok je proba za otkrivanje sekvence alela 2 označena FAM fluorescentnom bojom. Tijekom polimerizacije, egzonukleazna aktivnost DNA polimeraze cijepa samo probe koje su hibridizirane na ciljenu sekvencu. Dolazi do odvajanja reporter boje od probe te posljedično do oslobađanja fluorescentne boje. Porast fluorescencije javlja se samo ako je proba komplementarna ciljnoj sekvenci te hibridizirana. Kao rezultat genotipizacije dobija se jedna od sljedeće tri mogućnosti: homozigot wt/wt, heterozigot, homozigot mt/mt. Rezultati real time PCR amplifikacije analizirani su pomoću 7500 Real time PCR SDS software-a v2.3 (25).

4.2.3. Statistička obrada dobivenih podataka

Analiza polimorfizama napravljena je programom na internetu SHEsis autora Shi i suradnika (ver. Online) (26). Analize genotipova napravljene su programom SNPstats autora Sole i suradnika (ver. Online) (27).

5. REZULTATI

Ukupno su obrađene 161 ispitanice, od toga 81 ispitanica s dokazanim karcinomom vrata maternice i 80 ispitanica u kontrolnoj skupini. Prosječna životna dob ispitanica u kontrolnoj skupini je 53 ± 11 godina, dok su ispitanice s karcinomom bile 53 ± 12 godina starosti.

Nije pronađena statistički značajna razlika između polimorfizma rs1800896 (-1082A > G) gena *IL-10* i polimorfizma rs16944 (-511C/T) gena *IL-1B* između pacijentica s dokazanim karcinomom vrata maternice i kontrolne skupine (Tablica 1).

Tablica 1. Raspodjela i učestalost alela polimorfizama gena *IL-10* i *IL-1B*

Gen	Polimorfizam	Rjedi alel	Učestalog rjeđeg alela kod kontrola	Učestalog rjeđeg alela kod ispitanica	X ²	P vrijednost
<i>IL-10</i>	rs1800896	G	0,43	0,39	0,633	0,426
<i>IL-1B</i>	rs16944	T	0,39	0,3	3,104	0,078

U Tablici 2 prikazana je raspodjela i učestalost genotipova polimorfizma rs1800896 (-1082 A > G) gena *IL-10*, dok je u Tablici 3 prikazana raspodjela i učestalost genotipova polimorfizma rs16944 (-511C/T) gena *IL-1B*. Na temelju podataka iz navedenih tablica vidljivo je da ne postoji značajna razlika u raspodjeli i učestalosti genotipova između ispitanica s dokazanim karcinomom vrata maternice i kontrolne skupine.

Tablica 2. Raspodjela i učestalost genotipova polimorfizma rs1800896 (-1082 A > G) gena *IL-10*

Genotipovi	Kontrole	Ispitanice	X ²	P vrijednost
AA	22 (27,5 %)	29 (36,2 %)	1,524	0,467
AG	47 (58,8 %)	40 (50 %)		
GG	11 (13,7 %)	11 (13,8 %)		

Tablica 3. Raspodjela i učestalost genotipova polimorfizma rs16944 (-511C/T) gena *IL-1B*

Genotipovi	Kontrole	Ispitanice	X ²	P vrijednost
CC	29 (36,2 %)	41 (51,2 %)	3,659	0,161
CT	39 (48,7 %)	30 (37,5 %)		
TT	12 (15,1 %)	9 (11,3 %)		

Analizom tri modela genotipova SNPStats programom pokazano je da ne postoji značajna razlika kod pojedinog modela u oba istraživana gena, *IL-10* i *IL-1B*, između ispitanica s dokazanim karcinomom vrata maternice i kontrolne skupine (Tablica 4 i 5).

Tablica 4. Modeli genotipova polimorfizma rs1800896 (-1082 A > G) gena *IL-10*

Model	Genotip	Kontrole	Ispitanice	P vrijednost
Kodominantni	AA	22 (27,5 %)	29 (36,2 %)	1
	AG	47 (58,8 %)	40 (50 %)	
	GG	11 (13,8 %)	11 (13,8 %)	
Dominantni	AA	22 (27,5 %)	29 (36,2 %)	1
	AG+GG	58 (72,5 %)	51 (63,8 %)	
Recesivni	AA+AG	69 (86,2 %)	69 (86,2 %)	1
	GG	11 (13,8 %)	11 (13,8 %)	

Tablica 5. Modeli genotipova polimorfizma rs16944 (-511C/T) gena *IL-1B*

Model	Genotip	Kontrole	Ispitanice	P vrijednost
Kodominantni	CC	29 (36,2 %)	41 (51,2 %)	1
	CT	39 (48,8 %)	30 (37,5 %)	
	TT	12 (15 %)	9 (11,2 %)	
Dominantni	CC	29 (36,2 %)	41 (51,2 %)	1
	CT+TT	51 (63,8 %)	39 (48,8 %)	
Recesivni	CC+CT	68 (85 %)	71 (88,8 %)	1
	TT	12 (15 %)	9 (11,2 %)	

6. RASPRAVA

U ovom radu obrađena je 161 ispitanica, od toga je 81 ispitanica s dokazanim karcinomom vrata maternice i 80 ispitanica u kontrolnoj skupini. Ispitivana je povezanost između polimorfizma gena *IL1-10* i *IL-1B* između ispitanica s dokazanim karcinomom vrata maternice i kontrolne skupine. Rezultati ispitivanja pokazali su da nije pronađena statistički značajna razlika između polimorfizma rs1800896 (-1082 A > G) gena *IL-10* i polimorfizma rs16944 (-511C/T) gena *IL-1B* između ispitanica i kontrolne skupine. Kod polimorfizma rs1800896 (-1082 A > G) gena *IL-10* rjeđe je bio prisutan G alel, dok je kod polimorfizma rs16944 (-511C/T) gena *IL-1B* rjeđe prisutan bio alel T (Tablica 1). Također, ne postoji značajna razlika u raspodjeli i učestalosti genotipova između ispitanica s karcinomom i kontrolne skupine. Analiza tri modela genotipova (kodominatni, dominantni, recesivni) pokazala je da ne postoji značajna razlika ni kod jednog modela u oba testirana polimorfizma gena *IL-10* i *IL-1B* (Tablica 4 i 5).

Interleukin 10 je pleiotropni citokin ključan u imunološkim i upalnim odgovorima. Regulira proliferaciju i diferencijaciju B-stanica, pokazuje imunoregulacijske aktivnosti i djeluje protuupalno. Posljednjih godina provedeno je niz slučaj-kontrola studija kako bi se procijenio učinak polimorfizama gena *IL-10* na rizik razvoja bolesti. Zbog male veličine uzorka i etničke pripadnosti postoje kontroverzni rezultati povezanosti polimorfizma *IL-10* i raka vrata maternice (28).

Poznato je da individualne genetičke varijacije utječu na imunološki odgovor domaćina na maligne tumore. Kako su polimorfizmi citokinskih gena glavni akteri u imunološkom odgovoru organizma provedena su brojna istraživanja koja su se fokusirala na povezanost polimorfizama citokinskih gena i karcinoma. Međutim, rezultati variraju između populacije ispitanika. Učinak polimorfizma *IL-10* rs1800896 (-1082A>G) na rizik od nastanka karcinoma vrata maternice ispitivan je u nekoliko različitih studija. Ipak, dobiveni su rezultati diskutabilni. Uočeno je da je navedeni polimorfizam povezan s povećanim rizikom za karcinom vrata maternice u populacijama Zimbabvea (30) i Japana (31), dok istraživanja u Argentini (32), Južnoj Africi (33), Mađarskoj (34), Nizozemskoj (35) i Tunisu upućuju na nepovezanost s rizikom za nastanak cervikalnog karcinoma (29).

Nedavno provedena meta-analiza na osam studija za polimorfizam *IL-10* rs1800896 (-1082A > G) kod pacijentica s karcinoma vrata maternice nije pokazala korelaciju za rizik od nastanka karcinoma vrata maternice u ukupnoj analizi. Podaci ukazuju da nema povezanosti između polimorfizma gena *IL-10* i karcinoma. Istraživanja su ukazala na to da ovaj polimorfizam može poslužiti kao marker genetičke osjetljivosti za razvoj cervikalnog karcinoma. Uloga polimorfizma *IL-10* rs1800896 (-1082A > G) u sklonosti za nastanak spomenutog karcinoma ostaje nerazjašnjena (28, 29).

Polimorfizam gena *IL-10* rs1800896 (-1082 A > G) uključuje tri genotipa: AA, GA i GG. Genotip AA povezan je s niskom proizvodnjom IL-10, dok su GA i GG vezani za srednju i visoku proizvodnju. Polimorfizam gena *IL-10* rs1800896 (-1082A > G) korelirao je sa značajnim rizikom od raka vrata maternice. Odstupanje je moguće objasniti zbog etničkih razlika u polimorfizmu *IL-10* gena. Nedavna prospektivna studija izvijestila je da polimorfizam *IL-10* rs1800896 (-1082 A > G) doprinosi perzistentnoj infekciji onkogenog HPV-a (31).

Guo C. i suradnici proveli su meta-analizu između polimorfizama *IL-10* i rizika od razvoja raka vrata maternice. Pretraženo je pet internetskih baza podataka (PubMed, Embase, Web SCI, CNKI i Wan). Različiti čimbenici rizika, kao što su kronična upala, nezdravi životni uvjeti i infekcije HPV-om, dokazano povećavaju rizik od tumorogeneze vrata maternice. Sedamnaest članaka s dovoljnim kvantitativnim informacijama uključeno je u ovu meta-analizu (23).

Stanczuk i sur. objavili su 2001. godine prvu studiju slučajeva i kontrola koja je ispitala učinke polimorfizma gena *IL-10* rs1800896 (-1082A>G) na rizik od pojavnosti raka vrata maternice, a rezultati su pokazali da afričke žene s genotipom AG imaju povećan rizik (30).

Do sada su provedene dvije meta-analize čiji je cilj bio razjasniti povezanost između polimorfizama *IL-10* i rizika od karcinogeneze vrata maternice. Međutim, ove meta-analize nisu bile sveobuhvatne i nisu dale dosljedne rezultate (28, 37). Od 2001. godine proveden je veliki broj molekularnih epidemioloških studija slučajeva i kontrola, no rezultati nisu bili konzistentni (29 - 35).

Singhal i sur. izvijestili su da genotipovi AG i GG mogu značajno povećati rizik od razvoja raka vrata maternice u usporedbi s AA genotipom u indijskoj populaciji (36).

Ni i sur. objavili su 2013. godine prvu meta-analizu koja je ispitivala povezanost polimorfizama *IL-10* gena i rizika od razvoja raka vrata maternice. Njihova meta-analiza obuhvatila je osam studija koje su analizirale 1498 slučajeva i 1608 kontrola za *IL-10* rs1800896 (-1082 A > G) polimorfizam, kao i pet studija koje su uključivale 2396 slučajeva i 1388 kontrola za *IL-10* -592 C/A polimorfizam. Istraživači su otkrili da je polimorfizam gena *IL-10*-592 C/A povezan s povećanim rizikom od razvoja raka vrata maternice. Nije pronađena značajna povezanost za polimorfizam *IL-10* rs1800896 (-1082 A > G) (28).

Zhang i suradnici proveli su meta-analizu 2014. godine. Njihova studija obuhvatila je osam studija slučajeva i kontrola s ukupno 1983 pacijentica i 1618 kontrola. Autori nisu utvrdili točnu povezanost između polimorfizma *IL-10* rs1800896 (-1082 A > G) i rizika od raka vrata maternice. Ova meta-analiza sugerira da su polimorfizmi gena *IL-10* rs1800896 (-1082 A > G) i -819 T/C povezani s povećanom osjetljivošću za razvoj raka vrata maternice, ali s kontradiktornim učincima (37).

U usporedbi s prethodnim meta-analizama, meta analiza koju su proveli Guo i sur. uključila je više istraživačkih studija (sedamnaest publikacija s ukupno 7286 ispitanica) kako bi se precizno procijenila povezanost polimorfizma gena *IL-10* rs1800896 (-1082 A > G), -819 T/C i -592 C/A i rizik od nastanka raka vrata maternice. Njihovi rezultati upućuju na to da polimorfizam *IL-10* rs1800896 (-1082 A > G) može biti povezan s povećanim rizikom od razvoja raka vrata maternice (23).

Poznato je da infekcija HPV virusom uzrokuje kronične infekcije keratinocita cerviksa i na taj način igra ključnu ulogu u patogenezi karcinoma vrata maternice. Prethodna istraživanja pokazala su da je kronična upala cerviksa povezana s nastankom prekanceroznih intraepitelnih lezija i karcinomom vrata maternice. Kancerogeni mehanizam raka vrata maternice obuhvaća degradaciju gena p53 pomoću onkogenog HPV E6 proteina. Mutacije gena p53 mogu biti povezane s citokinima, uključujući i prekomjernu ekspresiju citokina IL-1B. Interleukin 1 beta je proupalni citokin kojeg proizvode monociti i tkivni makrofazi. Uključen je u posredovanje akutne i kronične upale. Studija provedena u Egiptu pokazala je da su genotipovi IL1-B 511C/T i T/T bili povezani sa povećanim rizikom od karcinoma vrata maternice. Polimorfizam -511C/T može se razmotriti kao biološki marker za rak vrata maternice (38).

Kang i sur. također su izvijestili da su nositelji genotipova -511C/T ili T/T bili izloženi većem riziku od raka vrata maternice kod korejskih žena (39). Također, Singh i sur. izvijestili su da osobe s polimorfizmom *IL-1B*-511 imaju veći rizik od raka vrata maternice kod indijske populacije (40). Osim HPV infekcije, postoje i drugi faktori za nastanak karcinoma vrata maternice, a to su oralna kontracepcija, pušenje, imunosupresija, imunodeficijencija, prehrana i obiteljska anamneza karcinoma vrata maternice. Studija provedena u Sjevernoj Indiji pokazala je da žene u dobi od 40 godina imaju veću učestalost za nastanak karcinoma vrata maternice. HPV infekcija i upala ključne su komponente tijekom karcinoma vrata maternice. Tijekom HPV infekcije, citokinski geni odgovorni za upalu smatraju se potencijalnim izvorom karcinoma vrata maternice. Otkriveno je da polimorfizam *IL-1B* nije povezan s rizikom od raka vrata maternice u ispitivanoj populaciji. Prethodna izvješća sugeriraju da se *IL-1B* može uključiti u ranim fazama razvoja karcinoma vrata maternice i progresije (41).

Studija provedena na Tuniškoj populaciji pokazala je da polimorfizam *IL-1B*-511T/T i alel T imaju smanjeni rizik za karcinom vrata maternice (43). Polimorfizam *IL-1B*-511C/T može utjecati na osjetljivost karcinoma vrata maternice zbog njegove povezanosti s nekim drugim polimorfizmom *IL-1*, koji može izravno utjecati na ekspresiju gena interleukina 1 beta. Genotipovi *IL-1B* -511C/T i T/T bili su povezani s većim rizikom karcinoma vrata maternice (42).

7. ZAKLJUČAK

- Rezultati istraživanja pokazali su da između ispitanica s dokazanim karcinomom vrata maternice i ispitanica kontrolne skupine nije pronađena statistički značajna razlika u raspodjeli i učestalosti alela i genotipova za proučavane polimorfizme gena *IL-1B* (rs16944) i *IL-10* (rs1800896 ili -1082 A > G). Također, ne postoji razlika između različitih modela genotipova u oba istraživana gena.
- U našem istraživanju nije dokazano da polimorfizam rs16944 *IL-1B* gena i rs1800896 (-1082 A > G) *IL-10* gena imaju ulogu u nastanku karcinoma vrata maternice.

8. SAŽETAK

Uvod: Rak vrata maternice u svijetu je drugi najčešći oblik raka u žena. Infekcija humanim papiloma virusom (HPV) najčešći je uzrok nastanka tog karcinoma. Istraživanja su pokazala da brojni čimbenici značajno povećavaju rizik za karcinom vrata maternice. Za onkogenezu HPV-a bitan je imunološki odgovor zaražene osobe. Dosadašnja istraživanja pokazala su da međudjelovanje HPV virusa i IL10 može dovesti do nastanka imunosupresivnog mikrookoliša u cerviksu, dok se prisutnost T alela IL-1B povezuje s kroničnom upalom i perzistentnom infekcijom HPV16/18.

Ciljevi istraživanja: Analiza polimorfizama gena rs16944 (-511C/T) *IL-1B* i rs1800896 (-1082 A > G) *IL-10* između ispitanica s dokazanim karcinomom vrata maternice i ispitanica u kontrolnoj skupini.

Utvrđiti postoji li statistički značajno odstupanje u pojavnosti polimorfizama gena *IL-1B* i *IL-10* između ispitanica s dokazanim karcinomom vrata maternice i ispitanica u kontrolnoj skupini.

Ispitanici i metode: Navedeni polimorfizmi gena analizirani su kod 81 ispitanice s dijagnozom vrata maternice i 80 ispitanica u kontrolnoj skupini. DNA je izolirana iz uzoraka pune krvi, a genotipizacija je učinjena metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu uz primjenu Taqman metodologije. Napravljena je statistička obrada dobivenih polimorfizama gena rs16944 (-511C/T) *IL-1B* i rs1800896 (-1082 A > G) *IL-10*.

Rezultati: Učestalost rjeđeg alela G *IL-10* rs1800896 (-1082 A > G) bila je 0,43 u kontrolnoj skupini, dok je kod ispitanica s dijagnozom vrata maternice iznosila 0,39. Učestalost rjeđeg alela T *IL-1B* rs16944 (-511C/T) u kontrolnoj skupini iznosila je 0,39 te 0,3 kod ispitanica s dijagnozom vrata maternice.

Zaključak: Nije pronađena statistički značajna razlika u raspodjeli i učestalosti pojedinih alela i genotipova između ispitanica s dokazanim karcinomom vrata maternice i kontrolne skupine.

Ključne riječi: Karcinom vrata maternice, HPV, *IL-10*, *IL-1B*.

9. SUMMARY

Introduction: Cervical cancer is the second most common cancer in women worldwide. The most common cause of this cancer is the Human papillomavirus (HPV) infection. Research has shown that numerous factors significantly increase the risk of cervical cancer. An immune response is essential for the oncogenesis of HPV infected persons. To date, studies have shown that the interaction of the HPV virus and *IL-10* can lead to the formation of an immunosuppressive microenvironment in the cervix. The presence of the T allele of *IL-1B* is associated with chronic inflammation and persistent infection of HPV16/18.

Research objectives: Analysis of rs16944 (-511C/T) *IL-1B* and rs1800896 (-1082 A > G) *IL-10* gene polymorphisms between subjects diagnosed with cervical cancer and subjects in the control group.

The study aimed to determine whether there is a statistically significant difference in the incidence of *IL-1B* and *IL-10* gene polymorphisms between subjects diagnosed with cervical cancer and subjects in the control group.

Subjects and Methods: Pre-mentioned gene polymorphisms were analyzed in 81 subjects diagnosed with cervical cancer and 80 subjects in the control group. DNA was extracted from the peripheral blood, and genotyping was performed by a real-time polymerase chain reaction.

Results: The frequency of the minor allele G *IL-10* rs1800896 (-1082 A > G) was 0.43 in the control group, while in subjects diagnosed with cervical cancer was 0.39. The frequency of the minor allele T *IL-1B* rs16944 (-511C / T) was 0.39 in the control group, and 0.3 in patients diagnosed with cervical cancer.

Conclusion: No statistically significant difference was found in the distribution and frequency of individual alleles and genotypes between subjects with proven cervical cancer and a control group.

Keywords: Cervical cancer, HPV, *IL-10*, *IL-1B*

10. LITERATURA

1. Chabra S. Cervical Cancer Preventable, Treatable, but Continues to Kill Women. Medknow Publ. 2016;1(3).
2. Chabra S. Early Stage Cervical Cancer, Therapy for Reproductive Health and Quality Survival. Open Med J. 2016;3:1–11.
3. Marth C, Landon F, Mahner S, McCormack M, Gonzales-Martin A, Colombo N. Cervical cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol. 2017;28(4):72-83.
4. Ćorušić A, Škrgatić L, Karadža M, Planinić P, Lovrić Gršić H. Infekcija humanim papiloma virusom (HPV) i genitalni karcinom u žena. Medix. 2013;19:187–192.
5. M. Šekerija: Incidencija raka u Hrvatskoj 2016. Registar za rak Republike Hrvatske, Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Bilten br. 41, Zagreb 2019.
6. Kalenić S. Medicinska mikrobiologija. 1. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2013.
7. Hadžisejdić I, Grce M, Grahovac B. Humani papiloma virus i karcinom cerviksa: mehanizmi karcinogeneze, epidemiologija, dijagnostika i profilaksa. Med Flum. 2010;46(2):112–123.
8. Crosbie EJ, Einstein MH, Franceschi S, Kitchener HC. Human papillomavirus and cervical cancer. The Lancet. 2013;382(9895):889–99.
9. Roden RBS, Stern PL. Opportunities and challenges for human papillomavirus vaccination in cancer. Nat Rev Cancer. 2018;18(4):240–54.
10. Gulati K, Guhathakurta JJ, Rai N, Ray A. Cytokines and their Role in Health and Disease: A Brief Overview. MOJ Immunol. 2016;4(2):1–9.
11. Dembic Z. The Cytokines of the Immune System: The Role of Cytokines in Disease Related to Immune Response. 1. izd. San Diego: Elsevier Inc. 2015.
12. Andreis I, Batinić D, Čulo F, Grčević D, Lukinović-Škudar V, Marušić Z, i sur. Imunologija. 7. izd. Zagreb: Medicinska naklada. 2010;123-139.

-
13. Čulić S. Citokini i autoimunosne bolesti. *Paediatr Croatica* 2005;49(1):148-161.
 14. Paradkar PH, Joshi JV, Mertia PN, Agashe SV, Vaidya RA. Role of Cytokines in Genesis, Progression and Prognosis of Cervical Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014;15(9):3851-3864.
 15. Kang S, Kim JW, Park NH, Song YS, Park SY, Kang SB, i sur. Interleukin-1beta -511 polymorphism and risk of cervical cancer. *J Korean Med Sci.* 2007;22:110–3.
 16. Xu J, Yin Z, Cao S, Gao W, Liu L, Yin Y, i sur. Systematic Review and Meta-Analysis on the Association between IL-1B Polymorphisms and Cancer Risk. *PLoS One.* 2013;8(5):e63654.
 17. Lopez-Castejon G, Brough D. Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2011;22:189–195.
 18. Hayat MA. *Autophagy: Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, Infection, and Aging.* 1. izd. San Diego: Elsevier Inc.2015.
 19. Berti FCB, Pereira APL, Cebinelli GCM, Trugilo KP, Brajão de Oliveira K. The role of interleukin 10 in human papilloma virus infection and progression to cervical carcinoma. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2017;34:1–13.
 20. Mannino MH, Zhu Z, Xiao H, Bai Q, Wakefield MR, Fang Y. The paradoxical role of IL-10 in immunity and cancer. *Cancer Lett.* 2015;367(2):103–107.
 21. Trifunović J, Miller L, Debeljak Ž, Horvat V. Pathologic patterns of interleukin 10 expression-A review. *Biochem medica.* 2015;25(1):36–48.
 22. Prayitno A, Astirin OP, Putra ST. Immune Response Indicated by Expressing of IL-2 and IL-10 in Cervical Cancer. *Journal of Cancer Therapy.*2014;5:420–426.
 23. Guo C, Wen L, Song J-K, Zeng W-J, Dan C, Niu Y-M, i sur. Significant association between interleukin-10 gene polymorphisms and cervical cancer risk: a meta-analysis. *Oncotarget.* 2018;9(15):12365–75.
 24. MACHEREY NAGEL GmbH & Co. KG. Genomic DNA from blood User manual, NucleoSpin® Dx Blood. Dostupno na adresi: <https://www.mn->
-

net.com/Portals/8/attachments/Redakteure_Bio/Protocols/Genomic%20DNA/UM_gDNADxBlood.pdf. Datum pristupa: 12. 8. 2019.

25. Thermo Fisher Scientific. Real-time PCR handbook. Dostupno na adresi: <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/Forms/PDF/real-time-pcr-handbook.pdf>. Datum pristupa: 12. 8. 2019.

26. Shi YY, He L. SHEsis, a powerful software platform for analyses of linkage disequilibrium, haplotype construction, and genetic association at polymorphism loci. *Cell Res.* 2005;15:97–8.

27. Solé X, Guinó E, Valls J, Iniesta R, Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics.* 2006;22:1928–9.

28. Ni J, Yw Y, Teng F, Fang T, Qing W. Interleukin 10 Polymorphisms and Cervical Cancer Risk A Meta-Analysis. *Int J Gynecol Cancer.* 2013;23:126-33.

29. Zidi S, Benothmen Y, Sghaier I, Ghazoueni E, Mezlini A, Slimen B, i sur. Association of IL10-1082 and IFN- γ +874 Polymorphisms with Cervical Cancer among Tunisian Women. *ISRN Genet.* 2014:1–6.

30. Stanczuk GA, Sibanda EN, Perrey C, Chirara M, Pravica V, Hutchinson IV, i sur. Cancer of the uterine cervix may be significantly associated with a gene polymorphism coding for increased IL-10 production. *Int J Cancer.* 2001;94:792–4.

31. Matsumoto K, Oki A, Satoh T, Okada S, Minaguchi T, Onuki M, i sur. Interleukin-10 - 1082 gene polymorphism and susceptibility to cervical cancer among Japanese women. *Jpn J Clin Oncol.* 2010;40(11):1113–6.

32. Barbasian G, Perez LO, Contreras A, Golijow CD. TNF- α and IL-10 promoter polymorphisms, HPV infection, and cervical cancer risk. *Tumor Biology.* 2012;33:1549–56.

33. Govan VA, Carrara HR, Sachs JA, Hoffman M, Stanczuk GA, Williamson AL. Ethnic differences in allelic distribution of IFN-g in South African women but no link with cervical cancer. *J Carcinog* 2003;2:3.

-
34. Szołke K, Szalma's A, Szla'dek G, Veress G, Gergely L, To'th FD, i sur. IL-10 promoter nt-1082A/G polymorphism and human papillomavirus infection in cytologic abnormalities of the uterine cervix. *J Interferon Cytokine Res* 2004;24:245–51.
35. Zoodsma M, Nolte IM, Schipper M, Oosterom E, van der Steege G, deVries EG, i sur. Interleukin-10 and Fas polymorphisms and susceptibility for (pre) neoplastic cervical disease. *Int J Gynecol Cancer* 2005;15(3):282–90.
36. Singhal P, Kumar A, Bharadwaj S, Hussain S, Bharadwaj M. Association of IL-10 GTC haplotype with serum level and HPV infection in the development of cervical carcinoma. *Tumor Biol.* 2015;36:2287–2298.
37. Zhang S, Kong YL, Li YL, Yin YW. Interleukin-10 gene-1082 G/A polymorphism in cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia: meta-analysis. *J Int Med Res.* 2014; 42:1193–1201.
38. Al-Tahhan MA, Etewa RL, El Behery MM. Association between circulating interleukin-1 beta (IL-1 β) levels and IL-1 β C-511T polymorphism with cervical cancer risk in Egyptian women. *Mol Cell Biochem.* 2011;353(1–2):159–65.
39. Kang S1, Kim JW, Park NH, Song YS, Park SY, Kang SB, Lee HP. Interleukin-1 beta-511 polymorphism and risk of cervical cancer. *J Korean Med Sci.* 2007;22:110-3.
40. Singh H1, Sachan R, Goel H, Mittal B. Genetic variants of interleukin-1RN and interleukin-1beta genes and risk of cervical cancer. *BJOG.* 2008;115(5):633-8.
41. Gupta MK, Singh R, Banerjee M. Cytokine gene polymorphisms and their association with cervical cancer: A North Indian study. *Egypt J Med Hum Genet.* 2016;17(2):155–63.
42. Zidi S, Sghaier I, Zouidi F, Benahmed A, Stayoussef M, Kochkar R, i sur. Interleukin-1 Gene Cluster Polymorphisms and its Haplotypes may Predict the Risk to Develop Cervical Cancer in Tunisia. *Pathol Oncol Res.* 2015;21(4):1101–7.

11. ŽIVOTOPIS

Opći podatci:

Ime i prezime: Sanela Štibi

Datum i mjesto rođenja: 21. 10. 1979., Osijek

Adresa stanovanja: Opatijska 51, 31000 Osijek (Hrvatska)

Broj telefona: 0915788747

E-pošta: sanelastibi@yahoo.com

Obrazovanje:

2011. – 2014. Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike na Medicinskom fakultetu u Osijeku

1994. – 1998. Medicinska škola Osijek, smjer zdravstveno laboratorijski tehničar

Radno iskustvo:

2018. – danas: Prvostupnik medicinsko laboratorijske dijagnostike, KBC Osijek

2006. – 2018. Tehnički suradnik u Laboratoriju za citogenetiku, Medicinski fakultet Osijek

1998. – 1999. Pripravnički staž Dom zdravlja Osijek

Dodatna edukacija:

2010. – danas: trajno usavršavanje za zdravstvene djelatnike HKZR

2006. Citogenetički laboratorij, Klinička Bolnica Sveti Duh, Zagreb

2000. Državni stručni ispit u Zagrebu – licenca za rad

Članstvo u profesionalnim udrugama:

Hrvatska komora zdravstvenih radnika

Sudjelovanja na skupovima i kongresima:

- Aktivna sudjelovanja

Lekić, Ivan; Škrlec, Ivana; Štibi, Sanela; Wagner, Jasenka. Molecular Genetic Analysis of AR Gene Among Patients With Androgen Insensitivity Syndrome. 10th ISABS Conference on Forensic and Anthropologic Genetics and Mayo Clinic Lectures in Individualized Medicine. Dubrovnik, Hrvatska: 10th ISABS Conference on Forensic and Anthropologic Genetics and Mayo Clinic Lectures in Individualized Medicine, 2017.

Škrlec, Ivana; Anđelić, Mirna; Teran, Nataša; Hodžić, Alenka; Tomac, Višnja; Štibi, Sanela; Pušeljić, Silvija; Peterlin, Borut; Wagner, Jasenka. MLPA analysis in a cohort of patients with intellectual disabilities. Meeting abstracts from the 11th European Cytogenetics Conference. Firenca, Italija: Molecular Cytogenetics, 2017. str. 17-17

Škrlec, Ivana; Štibi, Sanela; Pušeljić, Silvija; Tomac, Višnja; Wagner, Jasenka. Prikaz de novo rijetkog mozaičnog translokacijskog slučaja trisomije kromosoma 21. 4. hrvatski simpozij o rijetkim bolestima, Nacionalna konferencija o rijetkim bolestima s međunarodnim sudjelovanjem. Zagreb, Hrvatska, 2016.

Škrlec I, Štibi S, Pušeljić S, Heffer M, Liehr T, Wagner J: Prikaz de novo slučaja mozaičnog marker kromosoma 5p. 3. Hrvatski simpozij o rijetkim bolestima. veljača 27 - 28. 2014. Zagreb, Hrvatska

Škrlec, Ivana; Feketija, Vedrana; Galić, Mia; Vrbančić, Kristina; Štibi, Sanela; Wagner, Jasenka. Evaluation of genotoxic effects of commonly used chemicals in medical laboratories. Congress of the Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology on the occasion of the 40th Anniversary. Split, Hrvatska, 2016. str. 104-104

- Pasivna sudjelovanja

2019. One Roche Oncology symposium, 27. – 29. 3. 2019. Split, Hrvatska

2017. VI. hrvatski kongres neuroznanosti, 16. – 18. 9. 2017. Osijek, Hrvatska

2017. Simpozij međunarodnog društva za neurokemiju „Frontiers in Neurochemistry: Crosstalk of Membrane Proteins and Lipids in Health and Disease“, 16. 9. 2017. Osijek, Hrvatska

2016. 4th Central Eastern European Symposium on Free Nucleic Acids in Non-Invasive Prenatal Diagnosis, 25. – 26. 5. 2016., Split, Hrvatska

2016. Autosomno dominantna policistična bubrežna bolest, 6. – 7. 5. 2016., Osijek, Hrvatska

2010. – 2018. Tjedan mozga, međunarodna manifestacija popularizacije Neuroznanosti u organizaciji Medicinskog fakulteta u Osijeku

Stručni pregledni rad:

Wagner J, Škrlec I, Štibi S, Viljetić B, Pušeljić S, Stipoljev F, Heffer M. Sindrom potpune neosjetljivosti na androgene. Med Vjesn 2007;39(1-4):31-34.,