

# Povezanost bakterijskih, gljivičnih i virusnih infekcija genitalnog trakta žena s njihovim životnim navikama, općim zdravstvenim stanjem i stvaranjem niskomolekularnih metabolita

---

**Findri-Guštek, Štefica**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2012**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:171:280119>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-30**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



Sveučilište u Splitu  
Medicinski fakultet

Štefica Findri Guštek

**Povezanost bakterijskih, gljivičnih i virusnih  
infekcija genitalnog trakta žena s njihovim  
životnim navikama, općim zdravstvenim stanjem i  
stvaranjem niskomolekularnih metabolita**

Doktorska disertacija

Split, 2012.

Ovaj rad izrađen je u Privatnoj specijalističkoj ginekološkoj ordinaciji, Mikrobiološkom odjelu Zavoda za javno zdravstvo "Dr. Andrija Štampar", Centru za forenzična istraživanja i vještačenja "Ivan Vučetić", Zavodu za kliničku citologiju i citogenetiku Kliničke bolnice te Jedinici za mutagenezu Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada.

Voditelj rada:

prof. dr. sc. Emilija Mlinarić-Missoni, dr. med.  
spec. med. mikrobiologije i parazitologije

Rad ima:

99 stranica, 15 slika, 15 tablica, 136 literaturnih navoda

Iskrenu zahvalnost ukazujem:

- mojoj mentorici, prof. dr. sc. Emiliji Mlinarić-Missoni, spec. med. mikrobiologije i parazitologije, voditeljici Referentnog centra Ministarstva zdravlja za dijagnostiku sustavnih mikoza Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo, koja mi je bila velika podrška te je svoj rad, veliko znanje i entuzijazam unijela u ovaj rad;
- dr. sc. Višnji Oreščanin iz Ministarstva zaštite okoliša i prirode, na poticanju nastanka ovoga rada, prijateljskoj i stručnoj pomoći;
- dr. med. Ani Mlinarić Džepina, spec. mikrobiologije i parasitologije iz Mikrobiološkog odjela Zavoda za javno zdravstvo «Andrija Štampar», koja mi je pomogla u izradi praktičnog dijela rada;
- doc. dr. sc. Gordanu Mršić, ravnatelju Centra za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja «Ivan Vučetić», na pruženoj podršci za izradu praktičnog dijela rada;
- dr. sc. Maji Petek iz Centra za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja «Ivan Vučetić», koja mi je pomogla u izradi praktičnog dijela rada;
- gospodinu Zoranu Ferenčeku iz Centra za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja «Ivan Vučetić», na poticanju, stručnoj i prijateljskoj pomoći;
- dr. sc. Nevenki Kopjar, rukovoditeljici Jedinice za mutagenezu Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada, koja mi je pomogla u izradi praktičnog dijela rada;
- prim. dr. sc. Ines Krivak Bolanča iz Zavoda za kliničku citologiju i citogenetiku Kliničke bolnice Merkur, koja mi je pomogla u izradi praktičnog dijela rada;
- mojim zaposlenicima na velikoj brizi i pomoći tijekom izrade rada;
- mojem suprugu, djeci i roditeljima koji su me uvijek podržavali u svim trenucima mojeg stručnog i znanstvenog rada.

## SADRŽAJ

1.	UVOD.....	1
1.1.	Mikrobiološka flora genitalnog trakta žena .....	2
1.2.	Vaginalna kandidoza .....	3
1.3.	Egzogeni i endogeni faktori vaginalne kandidoze .....	4
1.4.	<i>Mycoplasma</i> i <i>Ureaplasma</i> .....	7
1.5.	<i>Chlamydia trachomatis</i> .....	9
1.6.	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> .....	10
1.7.	Genitalni herpes .....	10
1.8.	Humani papiloma virus .....	10
1.9.	Regulacija bakterijske flore .....	12
1.10.	Imunološki mehanizmi zaštite vaginalne sluznice .....	14
1.11.	Neimunološki mehanizmi zaštite vaginalne sluznice .....	20
1.12.	Uloga imunološkog odgovora u infekcijama mikroorganizmima .....	20
1.13.	Tvorba i toksični učinak niskomolekularnih metabolita .....	21
1.14.	Mikronukleusi .....	23
2.	CILJEVI I HIPOTEZE .....	25
3.	MATERIJALI I METODE .....	26
3.1.	Materijali .....	26
3.1.1.	Ispitanice i uzorci .....	26
3.1.2.	Upitnik .....	27
3.1.3.	Obrisci za bakteriološku i mikološku pretragu .....	29
3.1.3.1.	Obrisak vrata maternice .....	29
3.1.3.2.	Obrisak rodnice .....	29
3.1.4.	Obrisci za pretragu na <i>Mycoplasma</i> i <i>Ureaplasma</i> .....	29
3.1.4.1.	Obrisak vrata maternice .....	29
3.1.5.	Obrisci za pretragu na <i>Chlamydia trachomatis</i> .....	30
3.1.5.1.	Obrisak vrata maternice .....	30
3.1.6.	Obrisci za pretragu na hrHPV .....	30
3.1.6.1.	Obrisak vrata maternice .....	30
3.1.7.	Uzimanje uzoraka za PAPA test .....	30
3.1.8.	Uzimanje uzoraka iscjetka rodnice za GC-MS analizu .....	31
3.1.9.	Uzimanje uzoraka obriska rodnice za test genotoksičnosti .....	31
3.2.	Metode .....	31

3.2.1.	Mikrobiološka analiza uzoraka.....	31
3.2.1.1.	Mikrobiološka analiza kvasaca.....	31
3.2.1.2.	Mikrobiološka analiza Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija.....	33
3.2.1.3.	Mikrobiološka analiza <i>M. hominis</i> i <i>U. urealyticum</i> .....	33
3.2.1.3.1.	Kultivacija na agaru.....	33
3.2.1.3.2.	Kultivacija u tekućoj podlozi.....	34
3.2.1.3.3.	Komercijalni test identifikacije i osjetljivosti.....	35
3.2.1.4.	Mikrobiološka analiza <i>Chlamydiae trachomatis</i> .....	36
3.2.2.	Molekularna detekcija humanog papiloma virusa iz obriska vrata maternice.....	36
3.2.3.	Bojenje po Papanicolaou.....	37
3.2.3.1.	Fiksiranje obriska.....	37
3.2.3.2.	Pokrivanje (uklapanje) preparata.....	38
3.2.4.	Priprema uzoraka i uvjeti metodevezanog sustava GC-MS za analizu iscjetka rodnice.....	38
3.2.4.1.	Standardna otopina 2-feniletanola.....	38
3.2.4.2.	"Stock" otopine 2-feniletanola.....	38
3.2.4.3.	Priprema uzorka iscjetka rodnice.....	38
3.2.4.4.	Priprema uzorka kulture bakterija.....	39
3.2.5.	Priprema uzorka i uvjeti metode vezanog sustava GC-MS za analizu vrsta roda <i>Candida</i> dobivenih biosintezom u uvjetima <i>in vitro</i> .....	39
3.2.5.1.	Uzgoj vrsta roda <i>Candida</i> .....	39
3.2.5.2.	Standardna otopina 2-feniletanola.....	39
3.2.5.3.	"Stock" otopine 2-feniletanola.....	39
3.2.5.4.	Sojevi vrsta roda <i>Candida</i> dobiveni biosintezom u uvjetima <i>in vitro</i> .....	40
3.2.6.	Vezani sustav GC-MS i uvjeti analize.....	40
3.2.7.	Mikronukleus tehnika.....	41
3.2.8.	Statistička analiza.....	44
4.	REZULTATI.....	45
4.1.	Opis ispitivane populacije.....	45
4.2.	Utjecaj stila života i zdravstvenog stanja na rezultate analize obrisaka vrata maternic i rodnice na gljive, aerobne bakterije, Ureaplazmu, hrHPV i Papa-test.....	53
4.3.	Određivanje 2-feniletanola <i>in vivo</i> .....	58
4.4.	Multivarijantna analiza ovisnosti pojave metabolita s prediktorskim varijablama.....	59
4.5.	Određivanje 2-feniletanola <i>in vitro</i> .....	62

4.6.	Povezanost infekcija genitalnog trakta žena, stila života i općeg zdravstvenog stanja s učestalošću mikronukleusa.....	67
4.7.	Multivarijantna analiza povezanosti prediktorskih varijabli i učestalosti mikronukleusa.....	70
5.	RASPRAVA.....	74
5.1.	Opis ispitivane populacije.....	74
5.2.	Utjecaj načina života i zdravstvenog stanja na prisustvo/odsustvo infekcije.....	74
5.3.	Određivanje 2-feniletanola <i>in vivo</i> .....	78
5.4.	Određivanje 2-feniletanola <i>in vitro</i> .....	78
5.5.	Povezanost infekcija genitalnog trakta žena, stila života i općeg zdravstvenog stanja s učestalošću mikronukleusa.....	79
6.	ZAKLJUČCI.....	82
7.	SAŽETAK.....	83
8.	SUMMARY.....	84
9.	LITETARURA.....	86
10.	BIOGRAFIJA.....	97

## POPIS OZNAKA I KRATICA

<b>Kratika</b>	<b>Značenje</b>
ADH	alkohol dehidrogenaza
ALDH2	engl. <i>Aldehyde dehydrogenase 2</i>
<i>C.albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>C. glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
<i>C. parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
<i>C. tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>
<i>C. krusei</i>	<i>Candida krusei</i>
<i>C. trachomatis</i>	<i>Chlamydia trachomatis</i>
CFU	engl. <i>Colony forming units</i>
DNA	engl. <i>DeoxyriboNucleic Acid</i>
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>G. vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>
GBS	engl. <i>group B Streptococcus</i>
GC-MS	engl. <i>gas chromatography-mass spectrometry</i>
<i>H. influenzae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
HIV	engl. <i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HNL	hormonsko nadomjesno liječenje
HPV	engl. <i>Human papiloma virus</i>
hrHPV	engl. <i>high risk Human papiloma virus</i>
HZJZ	Hrvatski zavod za javno zdravstvo
5-HT	5-hidroksi-triptofol
I	engl. <i>Intermediate</i>
IST	engl. <i>culture Identification enumeration Susceptibility Testing</i>
IU	engl. <i>International Unit</i>
<i>L. plantarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
<i>L. brevis</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>
<i>L. jensenii</i>	<i>Lactobacillus jensenii</i>
<i>L. casci</i>	<i>Lactobacillus casci</i>
<i>L. delbrucchii</i>	<i>Lactobacillus delbrucchii</i>
<i>L. Salivarius</i>	<i>Lactobacillus Salivarius</i>
<i>M. fermentans</i>	<i>Mycoplasma fermentans</i>
<i>M. genitalium</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i>
<i>M. hominis</i>	<i>Mycoplasma hominis</i>



<i>M. Landlawi</i>	<i>Mycoplasma Landlawi</i>
MBA-antigen	engl. <i>Multiple band antigen</i>
N	frekvencija
<i>N. gonorrhoeae</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
NMM	niskomolekularni metabolit
PCR	engl. <i>Polymerase Chain Reaction</i>
2-PE	2-feniletanol
R	engl. <i>Resistant</i>
RNA	engl. <i>RiboNucleic Acid</i>
S	engl. <i>Sensitive</i>
SAP	sekretorna aspartil-proteinaza
spp.	nekoliko vrsta
<i>S. pyogenes</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>S. agalactiae</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>T. vaginalis</i>	<i>Trichomonas vaginalis</i>
<i>U. urealyticum</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i>
<i>U. parvum</i>	<i>Ureaplasma parvum</i>
UZV	ultrazvuk



## 1. UVOD

### 1.1. Mikrobiološka flora genitalnog trakta žena

Mikrobiološka flora genitalnog trakta žena dinamičan je i kompleksan primjer mikrobne kolonizacije čija regulacija nije dovoljno razjašnjena. Saznanja koja imamo o bakterijskim uzročnicima infekcija genitalnog trakta žena dolaze iz kvalitativnih i deskriptivnih studija. Korištenje neprikladnog načina transporta, neodgovarajućih medija i tehnika izolacije anaerobnih kultura dalo je različite rezultate mnogih studija vezanih za identifikaciju prisutnih bakterijskih uzročnika.<sup>1</sup>

Iako su vrste anaerobnih bakterija već ranije poznate, njihova je uloga u održavanju zdravlja odnosno uzrokovanju bolesti, prvi put jasnije definirana tek objavom radova Gorhack i sur.,<sup>2</sup> a potom i radom Ohma i Galaska.<sup>3</sup> Gorhack i sur. dokazali su da je kod žena u reproduktivnoj dobi broj anaerobnih bakterija veći od broja aerobnih i to u omjeru otprilike 10:1.<sup>2</sup> Taj omjer odražava dinamičan proces kolonizacije. Iako adolescenti imaju veću prevalenciju anaerobnih bakterija, aerobne bakterije postaju brojnije s porastom dobi početkom seksualne aktivnosti te paritetom. Studija koja se bavila ženama u postmenopauzi, kako onima koje nisu uzimale nadomjensku estrogensku terapiju tako i onima koje su uzimale, pokazala je da takva terapija nema učinka na fakultativne mikroorganizme. Značajnom su se iznimkom pokazali anaerobni laktobacili koji nisu imali veću prevalenciju u tkivu žena koje su primale estrogensku terapiju.<sup>4</sup>

Gustoća mikrobne kolonizacije važna je ne samo za opće stanje žena bez simptoma vaginoze već i za početak pojedinih faza bolesti u kojima je kritičan faktor.<sup>5</sup> Količina mikroba u pojedinom makroorganizmu faktor je za nastanak infekcije. Mikroorganizme koji se pojavljuju u većem broju u genitalnom traktu žena nalazimo u kulturama uzoraka, dok za one koji se pojavljuju u manjem broju postoji mogućnost da ne budu uočeni tijekom izolacije.<sup>6</sup>

Ono što potiče patogene da koloniziraju tkivo (poput tkiva u genitalnom traktu žena) ovisno je ne samo o tipu patogenog mikroorganizma i njegovoj intrizičkoj virulenciji, već i o kompleksnosti flore, tj. o brojčanoj dominaciji bakterija koje čine vaginalnu floru.

Tradicionalno se patogen definira kao mikroorganizam s nekim genetski prirođenim faktorom koji bi kad bi bio izražen uzrokovao bolest. Prisutnost potencijalno patogene vrste u vaginalnoj flori ne mora podrazumijevati nužno i pojavu simptoma vaginoze. Mikroorganizmi poput *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* i *Trichomonas vaginalis* ne predstavljaju uobičajene sastavnice flore ženskog genitalnog trakta. Oni stvaraju mogućnost za nastanak bolesti u vaginalnom i endocervikalnom području zbog

svojih inherentnih bioloških svojstava, ali sama prisutnost tih mikroorganizama ne mora značiti da će se bolest i pojaviti.<sup>7</sup>

Bakterije koje su uobičajena sastavnica vaginalne flore mogu ponekad imati potencijal da stvore simptome bolesti, što se događa često uslijed neke promjene u mikrokolini. *C. albicans*, *Streptococcus* gr. B, *G. vaginalis* i *E. coli* mikroorganizmi su koji se često izoliraju u donjem ženskom genitalnom traktu i mogu pod određenim uvjetima uzrokovati bolest.

Samo prisutnost egzogene i potencijalno patogene vrste bakterija ne podrazumijeva nužno infekciju ukoliko se ne pojave simptomi. Razumijevanje mehanizama kako pojedina bakterija može dovesti do nastanka infekcije povezano je s poznavanjem njezinih virulentnih svojstava. Ta svojstva omogućuju bakterijama da funkcioniraju kao samostalni uzročnici infekcije. U definiranju fiziološke flore genitalnog trakta žena, suočavamo se s potrebom objašnjenja kako komenzalne bakterije (npr. *G. vaginalis*, *E. coli* i *Streptococcus* gr. B) mogu uzrokovati infekciju.

Sastav mikrobne flore rezultat je složene interakcije pripadnika fiziološke flore, patogena i genotipa žene s kojim su izravno u vezi receptori na epitelnim stanicama, lučenje protuupalnih i drugih citokina od strane vaginalnog epitela te lučenje manosa-vezujuće bjelančevine.<sup>8</sup>

Iako je streptokok grupe B (group B *Streptococcus*, GBS) važan uzročnik novorođenačke i post porođajne septikemije, incidencija bolesti u velikom je neizmjeru s kolonizacijom. Od 14 do 25% žena ima streptokok grupe B u svojoj vaginalnoj flori. Što je veći broj streptokoka grupe B (tj. što je veća gustoća kolonizacije), to je veća vjerojatnost za nastanak infekcije.<sup>9</sup> Streptokok grupe B često se izolira zajedno s laktobacilima, *G. vaginalis*, koagulaza-negativnim stafilokokima i enterokokima. Ni u jednom od slučajeva u kojima je izoliran streptokok grupe B nije prisutna nijedna druga vrsta beta-hemolitičkih streptokoka dok u slučajevima prisutnosti drugih beta-hemolitičkih streptokoka nije uočena popratna prisutnost streptokoka grupe B.<sup>10</sup>

*Gardnerella vaginalis* učestala je sastavnica vaginalne flore kod žena, no ipak samo mali postotak tih žena ima simptome ili klinički značajan vaginalni iscjedak. Razlika između kolonizacije i bolesti djelomično je funkcija jakosti replikacije ove bakterije. Kvantitativne bakteriološke studije pokazale su da simptomi koji uključuju *G. vaginalis* vidljivi tek iznad  $10^7$  CFU po gramu vaginalne tekućine. Ako dođe do ponovnog unošenja nakon provedene terapije i to kao rezultat spolnog odnosa s neliječenim partnerom, pacijentica obično nema simptoma. Kod takvih pacijenata radi se o koncentracijama  $<10^5$  CFU po gramu vaginalne tekućine. Da bi se infekcija pojavila, mora postojati okolina koja u svojoj mikrobiološkoj flori sadrži *G. vaginalis*  $10^7$  CFU te izostanak inhibicijskih mehanizama koji kontroliraju stupanj

replikacije. Kod pacijentica s bakterijskom vaginozom na izostanak inhibicije replikacije utječu povišeni pH (u rasponu od 5 do 5,5) te prisutnost različitih primarnih amina i poli amina koji se detektiraju temeljem karakterističnog mirisa koji podsjeća na ribu, a koji se pojavljuju nakon dodavanja KOH-a. Smanjenje broja laktobacila može dovesti do smanjene produkcije hidrogen-peroksida čime se omogućuje neograničeni rast drugih sastavnica te flore.<sup>11</sup> Zbog proizvodnje amina anaerobne bakterije mogu metabolizirati proteine i aminokiseline koje se tada otpuštaju. Amini ujedno doprinose alkalizaciji vaginalne okoline te utječu na pojavu neugodnog vaginalnog mirisa te vaginalne iritacije. Neke anaerobne bakterije proizvode kiselinu za koju je poznato da umanjuje učinkovitost aktivnosti neutrofilnih fagocita zbog čega može doći do ubrzanog rasta broja nekih bakterija. Povećani rast vrsta *Gardnerella* može dovesti do povećane proizvodnje hemolizina koji pak može oslabiti zaštitu koju fagociti osiguravaju u vaginalnom miljeu.<sup>12</sup>

Iako nisu u sastavu flore genitalnog trakta žena, mikroorganizmi koje običavamo nazvati "patogenim" poput *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* i *Trichomonas vaginalis* također mogu biti prisutni, a da pritom ne izazivaju simptome.

## 1.2. Vaginalna kandidoza

Zadnjih nekoliko desetljeća u objavljenim istraživanjima sastavnih vrsta vaginalne flore izuzete od žena bez simptoma vaginoze, pokazano je da *C. albicans* može biti nazočna i bez tipičnih simptoma gljivičnog vaginitisa. U studiji koju su proveli Glover i Larsen rezultati sukcesivnih kultura obrisaka rodnice, oduzetih od žena praćenih tijekom trudnoće, pokazali su da je prisutnost vrsta roda *Candida* u čvrstoj vezi s epitelom genitalnog trakta žena.<sup>13</sup> Većina žena koje su imale gljivični vaginitis taj su mikroorganizam imale i u crijevima. Stopa učestalosti nositelja gljivica varira između različitih populacija te se povećava nakon puberteta i tijekom trudnoće što ukazuje na važnost fiziologije domaćina u slučajevima vaginalne kandidoze.

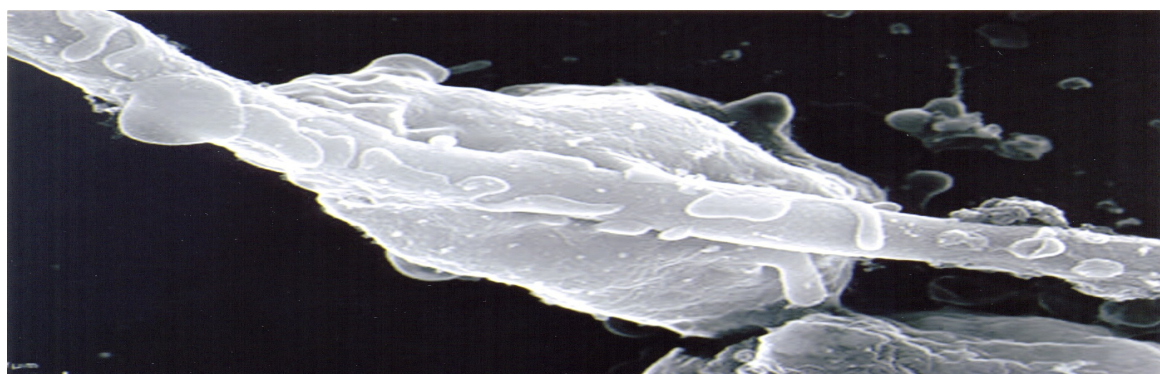
Povezanost razine estrogena i bakterijske kolonizacije poznata je od samog početka proučavanja normalne vaginalne flore. Rast bakterija u flori genitalnog trakta stimuliran je estrogenom. Prevalencija vrsta *Lactobacillus* te prevalencija gljivica u različitim populacijama pokazuje da kad je prevalencija vrsta *Lactobacillus* najviša (u reproduktivnoj dobi i osobito tijekom trudnoće), i prevalencija vrsta roda *Candida* također je najviša. Iako su vrste roda *Candida* manje podložne mikrobicidnom djelovanju hidrogen-peroksida u usporedbi s vrstama koje su katalaza-negativne poput *Streptococcus agalactiae*, one također mogu biti inhibirane djelovanjem hidrogen-peroksida. To se događa zato što hidrogen-

peroksid neometan unutar staničnom katalazom oštećuje stanične membrane. Vulvovaginalna kandidoza tipično se pojavljuje u korelaciji sa značajnim povećanjem broja CFU vrste *Candida* koje napadaju tkivo. Bilo kakav mikrobiološki čimbenik koji dovodi do porasta koncentracije gljiva, može dovesti i do razvoja simptoma dok bilo koji mikrobiološki čimbenik koji smanjuje broj gljiva, omogućava da te gljive ostanu kao komenzalni mikroorganizmi.<sup>14</sup>

Rezultati dobiveni u studijama provedenim na životinjama te praćenjem i zapažanjem kod ljudi pokazuju da postoji obrnuta korelacija između bakterijske i gljivične flore s obzirom na prevalenciju i brojnost. Savege je u poznatoj studiji želučane flore miševa došao do zaključka da postoje područja dvaju različitih tkiva koja tipično koloniziraju vrste *Lactobacillus*, odnosno gljivice pri čemu je utvrđena gotovo čista kultura bakterija/gljivica.<sup>15</sup> Nakon uklanjanja vrste *Lactobacillus* antibiotskim tretmanom taj prostor koloniziran je gljivama. Time se ukazuje na kontrolu gljiva pomoću antagonističkog učinka vrsta *Lactobacillus*. I obrnuto, vrste roda *Candida* mogu antagonistički djelovati na populaciju bakterija.

Hipp i suradnici dokazali su da vrste *Candida* mogu proizvesti supstancu koja suzbija rast *N. gonorrhoeae*.<sup>16</sup> Kasnije su Shak i Larsne dokazali da vrste *Candida* mogu proizvesti gliotoksin koji zajedno s drugim inhibitorским tvarima u primjerenim koncentracijama antagonistički djeluje na različite bakterije.<sup>17</sup>

Prevalencija vulvovaginalne kandidoze u općoj populaciji procjenjuje se na 5-15 %. Vulvovaginalna kandidoza je nakon bakterijske vaginoze najčešći oblik vaginalne infekcije i čini trećinu svih vaginitisa. Najčešći je uzročnik *Candida albicans*. Vrste roda *Candida* čine dio fiziološke flore donjeg dijela spolnog sustava u 20-50% zdravih asimptomatskih žena. Rod *Candida* obuhvaća oko 200 vrsta. U posljednje vrijeme uočen je porast učestalosti vaginoza uzrokovanih drugim vrstama roda *Candida*, osobito *C. glabrata*. Rijetki uzročnici gljivičnog vaginitisa jesu *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* i *C. krusei*. Sve vrste roda *Candida* daju slične vulvovaginalne simptome koje je klinički gotovo nemoguće razlikovati.<sup>8</sup>



**Slika 1.** Preparat s izoliranom *C. albicans* (ljubaznošću gospodina Z. Ferenceka)

### 1.3. Egzogeni i endogeni faktori vaginalne kandidoze

Vulvovaginalna kandidoza prvenstveno uzrokovana vrstom *C. albicans* i dalje je značajan problem žena u reproduktivnoj dobi.<sup>18</sup> Stanično posredovana imunost smatra se dominantnim mehanizmom obrane domaćina protiv infekcija uzrokovanih vrstama roda *Candida*.

Vulvovaginalna kandidoza značajan je problem s kojim se barem jednom u životu susreće 75% žena. Tako visoka prevalencija ove infekcije u korelaciji je s milijunima dolara utrošenim na lijekove koje pacijentice uzimaju ili samovoljno ili prema savjetu liječnika ili pak odlaskom na liječenje u liječničke ordinacije. Kao rezultat te izloženosti gotovo su sve, ako ne i sve zdrave individue, razvile stečeni candida-specifični imunitet, a koji se demonstrira mukoznim antitijelima *in vitro* odgovorima T stanica te kožnim testovima s odgođenom reakcijom.<sup>18</sup> Ako se obrana domaćina modulira ili sam mikroorganizam biva moduliran okolišnim faktorima, mogu uslijediti simptomatske infekcije.

Egzogeni faktori povezani s akutnom vulvovaginalnom kandidozom uključuju modulaciju ili disbalans reproduktivnih hormona (tj. uporabu oralnih kontraceptiva, trudnoću, uporabu antibiotika i dijabetes mellitus). Iako se infekcije *Candidama* koje su povezane navedenim faktorima uglavnom mogu liječiti, one imaju značajni utjecaj na kvalitetu života zaraženih osoba.

Postoji populacija žena (njih 5-10%) koje imaju recidivirajuću vulvovaginalnu kandidozu što znači da se infekcija javlja tri ili više puta godišnje. Dva su oblika recidivirajuće vulvovaginalne kandidoze.

Primarna recidivirajuća vulvovaginalna kandidoza idiopatska je i nema poznatih predisponirajućih faktora poput onih identificiranih za akutnu vulvovaginalnu kandidozu. Sekundarne recidivirajuće vulvovaginalne kandidoze zapravo su učestale epizode akutne vulvovaginalne kandidoze budući da takve žene ne mogu izbjeći određene predisponirajuće faktore (dijabetes mellitus). Žene oboljele od recidivirajuće vulvovaginalne kandidoze u pravilu pozitivno reagiraju na antimikotički režim bez rezistencije, no to ne sprječava ponovnu pojavu bolesti.

Opće je prihvaćeno da ženama kojima je dijagnosticirana primarna recidivirajuća vulvovaginalna kandidoza, zapravo nedostaje važni imunoprotektivni faktor. Zbog toga bi nakon provedene konvencionalne antimikotičke terapije u pojedinoj simptomatičnoj epizodi, mikroorganizam, koji nije u potpunosti eliminiran antimikotičkim agensima, lako mogao povećati svoj broj i uzrokovati recidivirajuće infekcije.

Poznavanje obrambenog mehanizma domaćina povezanog s otpornošću na infekcije te

poznavanje faktora povezanih s podložnošću infekciji, mogli bi omogućiti razvoj imunoterapijskih strategija kojima bi se recidivirajuća vulvovaginalna kandidoza sprečavala ili liječila isto kao i akutna vulvovaginalna kandidoza.

Kao i u svim modelima interakcije domaćina i parazita protektivnim stanično posredovanim i humoralnim odgovorom moraju biti dobro usklađeni i regulirani mehanizmi kako bi se izbjegla nadmoćna stimulacija koja bi mogla stvoriti lokalnu upalu i oštećenje stanica domaćina. Zajedno sa svojstvima gljiva koja dopuštaju komenzalni imunoregulacijski mehanizam mogli bi imati ulogu u vaginalnom okolišu.

Neki imunoregulacijski poremećaji perifernog tkiva nastanjenog bakterijama uključuju povećanu stimulaciju odgovora tipa Th1 i s njima povezano stvaranje proupalnih citokina i homokina i povećanu mobilizaciju upalnih stanica na određeno mukozno mjesto. Mnogo više klonova T stanica tipa Th1 koji luče proupalne citokine, može se generirati iz vagine subjekta oboljelih od recidivirajuće vulvovaginalne kandidoze nego iz vagine subjekata kojima nije dijagnosticirana recidivirajuća vulvovaginalna kandidoza. Postoje neki dokazi da se IL-23, citokin čija je prekomjerna proizvodnja u presudnoj vezi s nekim vrstama upalnih intestinalnih poremećaja izlučuju tijekom vaginalne infekcije.

IL23 inducira stanice Th17 i IL17 što potencijalno izaziva upalu stanice na mukozno mjesto. Dva defenzivna, ali proupalna citokina IL12 gama interferon i IL23 i IL 17 mogu doprinijeti patologiji ukoliko postoji jaka stimulacija.

Prema hipotetskom tumačenju, dominantni oblici vaginalne kandidoze upalni su imuno poremećaji u kojima je prevladavajuća Th1-Th17 stimulacija udružena s upalnim odgovorima vaginalnih epitelnih stanica, a koje stimuliraju ili oštećuju virulentne *Candida* vrste.

Patogeneza vaginalne kandidoze sadrži nekoliko faza.

Vrste roda *Candida* mogu se naći u vagini kao komenzalni mikroorganizmi i to zbog ravnoteže postignute između ekspresije virulentnih svojstava i imunološkog odgovora kako prirodnog tako i adaptivnog, a čije su važne sastavnice funkcionalna epitelna barijera, "imunološki bijeg" gljiva, imunoregulacijski mehanizam i lokalna tolerancija. Do oboljenja dolazi kod ekscesivne virulencije, a do koje može doći i zbog preopterećenja gljivičnih stanica, a koje tada uzrokuje oštećenje epitelnih stanica i preuzima kontrolu nad imunološkim odgovorima i njihovu regulaciju.

Adherencija za epitelne stanice i oštećenje epitelnih stanica uzrokovane vrstom *C. albicans* tvori najvažniji moment patogenosti, a faktori koji inhibiraju adherenciju i oštećuju, vjerojatno su protektivni.

Antitijela (dobivena aktivnom ili pasivnom vakcinacijom) izravna su terapijska opcija. Manje su izravne opcije koje utječu na upalu i imunoregulaciju (poput npr. citokina i



probiotika).

#### 1.4. *Mycoplasma* i *Ureaplasma*

Mikoplazme su po veličini stanice i genoma najmanji mikroorganizmi sposobni za samostalno umnožavanje. Za razliku od ostalih bakterija nemaju staničnu stijenku već troslojnu membranu koja sadržava sterol. Zbog nedostatka stanične stijenke imaju pleomorfni oblik i rezistentne su na betalaktamske antimikrobne lijekove.<sup>19</sup>

Mikoplazme imaju malen genom, a najmanji je genom *M. genitalium*. Zbog toga imaju ograničene biosintetske sposobnosti, osjetljive su na uvjete u okolini, a za rast zahtijevaju obogaćene hranjive podloge.<sup>20</sup>

Mikoplazme većinom su fakultativni anaerobi. Rastu sporo s generacijskim vremenom od 1 sat kod *Ureaplasma spp.* do 16 sati kod *M. genitalium*. Mikoplazme mogu stvarati energiju razgradnjom glukoze i aminokiselina (npr. arginina), a *Ureaplasma spp.* ima sposobnost razgradnje uree.<sup>19</sup>

Mikoplazme su obligatni paraziti čovjeka i životinja te se mogu naći na sluznicama usne šupljine, gornjeg dišnog sustava i genitalnog trakta, adherirajući na epitelne stanice. Na jednom kraju stanice nalaze se takozvane "terminalne strukture", pomoću kojih mikoplazme adheriraju na stanice domaćina, a čini se da pomoću njih osiguravaju i određenu pokretljivost. Zna se da one ne ulaze u stanice domaćina, već samo parazitiraju na njegovoj površini, adherirajući na nju pomoću terminalnih struktura. Osim na epitelne stanice mogu adherirati na spermatozoite, eritrocite i makrofage. Tako adherirane koriste stanični metabolizam i vjerojatno oštećuju stanicu svojim metaboličkim produktima (vodikov peroksid).<sup>21</sup>

Nakon adhezije mikoplazme mogu oštetiti stanicu domaćina na nekoliko načina: direktnom citotoksičnošću stvaranjem vodikova peroksida ili superoksidnih radikala, citolizom koja nastaje zbog kemotaksije mononukleara ili reakcije antigen-protutijelo te na kraju iskorištavaju metabolizam stanice domaćina i njezine hranjive tvari.<sup>19</sup> Stanice domaćina iscrpljuju se, a stimulacijom imunološkog odgovora budu uništene i stanice domaćina i bakterije. Mikoplazme su sposobne zaobići imunski sustav domaćina mijenjanjem površinskih antigena, ući u stanicu i uzrokovati staničnu fuziju, apoptozu pa čak i djelovati onkogeno.<sup>8</sup>

Kod nekih mikoplazma (npr. kod *M. genitalium* pronađen je jedinstveni način pokretljivosti klizanjem (engl. gliding). Pokretljivost klizanjem temelji se na stvaranju membranskog izdanka na jednom polu stanice kojim se mikoplazme vežu za čvrstu površinu i po njoj klize.<sup>22</sup>

Mikoplazme putem receptora sličnog *Tollu* (TLR) aktiviraju makrofage i monocite uzrokujući sekreciju proupalnih citokina kao što su TNF- $\alpha$ , interleukini i interferon  $\gamma$ .<sup>23</sup> Citokini potiču sintezu i oslobađanje prostaglandina, što dovodi do stvaranja proteaza i drugih tvari koje mogu utjecati na ishod trudnoće. Također postoje dokazi da mikoplazme koje metaboliziraju arginin kao što je *M. hominis* posjeduju membranski aktivne tvari koje imaju hemolitičko djelovanje.<sup>24</sup>

Kod *Ureaplasma spp.* važnost za nastanak infekcije ima MBA-antigen (engl. Multiple-band antigen) za koji se pretpostavlja da potiče upalnu reakciju kod domaćina. *In vitro* je ovaj antigen podložan čestim varijacijama, što bi mogao biti jedan od mehanizama na koji ovaj mikroorganizam izbjegava obranu domaćina.<sup>25</sup>

*Ureaplasma spp.* posjeduje i specifičnu A1-proteazu koja razgrađuje imunoglobuline na Fab i Fc-fragmente. Njezina sposobnost razgradnje uree smatra se mehanizmom u nastanku kamenaca u mokraćnom sustavu.

Mikoplazme kao ubikvitarni mikroorganizmi mogu za ljude biti patogeni ili komenzali. U urogenitalnom traktu su *M. hominis*, *M. fermentans*, *M. genitalium*, *M. Ladlawi*, *Ureaplasma urealyticum* i *Ureaplasma parvum*.<sup>24,26</sup> Mikoplazme u urogenitalnom sustavu čovjeka mogu biti prisutne kao kolonizacija, a susreću se već u novorođenačkoj dobi. To je najčešće posljedica kontakta koji nastaje tijekom porođaja prolaskom novorođenčeta kroz inficirani porođajni kanal. Kolonizacija obično nastaje nakon druge godine života. U odrasloj dobi kolonizacija nastaje spolnim kontaktom. Kolonizacija *Mycoplasma hominis* prisutna je u 15% spolno aktivnih muškaraca i žena, a *Ureaplasma spp.* kod njih 45-75%. Zbog tako visokog postotka urogenitalnih mikoplazmi u zdravoj populaciji, važno je utvrditi njihovu ulogu u izazivanju bolesti, a interpretacija nalaza urogenitalnih mikoplazmi upravo zato predstavlja veliki problem mikrobiologu i kliničaru. Potrebno je postaviti kriterije infekcije u zdravoj populaciji bez simptoma i razlikovati kolonizaciju od infekcije. Obzirom da kolonizacija označava prisutnost mikroorganizma koja nije praćena upalnim odgovorom domaćina, treba je razlikovati od infekcije u kojoj je prisutnost mikroorganizma obavezno praćena imunološkim odgovorom makroorganizma. Stoga je neophodno provoditi mikrobiološku dijagnostiku. Stopa kolonizacije ovisi i o dobi, rasnoj pripadnosti, socijalno-ekonomskom položaju, uzimanju kontraceptiva, hormonskim promjenama u trudnoći i menopauzi.<sup>19</sup>

Infekcije urogenitalnim mikoplazmama prenose se spolnim putem te se ubrajaju u spolno prenosive infekcije. Po učestalosti i težini kliničke slike na četvrtom su mjestu iza HPV infekcije, infekcije klamidijom i gonoreje. *U. urealyticum* i *M. hominis* često se nađu u urogenitalnom traktu žena kao apatogeni komenzali.

Ukoliko se radi o asimptomatskoj infekciji kod žena s neznatno pojačanim vaginalnim iscjetkom, mikoplazme se najčešće izoliraju iz obrisaka rodnice dok se rjeđe nađu u obrisku vrata maternice. Suprotno gotovo saprofitnom ponašanju mikoplazmi u rodnici i vratu maternice, širenje bakterije na maternicu, jajovode ili malu zdjelicu izaziva tešku kliničku sliku. Ukoliko se infekcija ne prepozna i ne liječi, može dovesti do steriliteta.

### 1.5. *Chlamydia trachomatis*

*Chlamydia trachomatis* je sitna, kokoidna, nepokretna, obligatno intracelularna bakterija koja najčešće inficira skvamokolumnarni epitel. *C. trachomatis* u žena može dovesti do infekcije cilindričnih i prijelaznih epitelnih stanica sluznice uretre, endocerviksa, endometrija, tuba, anorektuma, respiracijskog sustava i konjunktive.<sup>27</sup>

Klamidija ima jedinstveni bifazični životni ciklus. Pojavljuje se u dva stanična oblika. Elementarno ili osnovno tjelešce prilagođeno je izvanstaničnom preživljavanju. Veličine je 250-350 nm. Metabolički je neaktivna i uspoređuje se sa sporom. To je infektivni oblik s jednakim omjerom DNA i RNA. Retikularno tjelešce prilagođeno je intracelularnom preživljavanju i umnožavanju, no ne može preživjeti izvan stanice domaćina pa nije zarazno. Veličina mu je od 500-1000 nm.

Životni ciklus, tj. replikacija nakon ulaska u stanicu traje 48-72 sata. Elementarno tjelešce se pričvrsti na stanicu domaćina što inducira fagocitozu (endocitozu) pa elementarno tjelešce ulazi u stanicu unutar vakuole (endosoma) dobivene od stanične opne domaćina. Tijekom nekoliko sati od ulaska u stanicu nastaje niz promjena: sinteza DNA, RNA i proteina te povećanje citoplazme s ribosomima. Tako nastaje retikularno tjelešce koje se počinje dijeliti unutar vakuole koja se povećava. Zbog toga u citoplazmi stanice domaćina nastaju karakteristična klamidijaska inkluzijska tjelešca. Retikularno tjelešce se smanjuje, oslobađa se iz stanice domaćina i započinje novi ciklus infekcije.<sup>28,29</sup>

Klamidija se prenosi kontaktom, vaginalnim iscjetkom (kod spolnog odnosa, prolaza djeteta kroz porođajni kanal inficirane majke ili autoinokulacijom rukama na oko), spermom, očnim sekretom i krvlju.<sup>30</sup>

Infekcija je asimptomatska u više od 80% žena pa se naziva tiha infekcija.<sup>31</sup> U trećine žena s pozitivnim nalazom klamidije u cervikalnom obrisku se pri pregledu u spekulima vidi pojačan vaginalni iscjedak, mukopurulentna cervikalna sluz ili hipertrofični ekto pij.<sup>32</sup>

Kako infekcija često uzrokuje teške komplikacije, pravodobna dijagnoza je od osobite važnosti.

## 1.6. *Neisseria gonorrhoeae*

Gonoreja je najčešća bakterijska spolno prenosiva bolest u svijetu. Asimptomatska gonoreja stalni je neotkriveni izvor infekcije, a nosi opasnost da kod nje nastanu komplikacije ili diseminirana gonokokna infekcija. Žene češće (do 75%) nego muškarci (1-2%) boluju od asimptomatske genitalne gonoreje. Asimptomatska gonoreja ili neadekvatno liječena gonoreja rezultira različitim komplikacijama kao što su zdjelična upalna bolest, neplodnost, korioamnionitis, septički abortus u žena te rijetka komplikacija perihepatitis (u oba spola).<sup>33</sup>

Gonoreja je jedna od najčešćih spolno prenosivih bolesti (četvrta po učestalosti nakon infekcije trihomonasom, klamidijom te genitalnih bradavica). Čovjek je jedini domaćin za *N. gonorrhoeae*. Bolest se prenosi samo izravnim kontaktom sluznica, najčešće spolnim putem te perinatalno.<sup>34</sup>

## 1.7. Genitalni herpes

Herpes simpleks virus (HSV) često uzrokuje infekcije u čovjeka. Nakon primarne infekcije virus ostaje u latentnom stanju u stanicama ganglija. Povremene reaktivacije virusa očituju se kao rekurirajuće HSV infekcije. Genitalni herpes među najraširenijim je spolnim bolestima u svijetu te je poprimio epidemijske razmjere. Herpes simpleks virus je osjetljiv, stoga prijenos zahtijeva inokulaciju svježe, virusom inficirane tjelesne tekućine izravno u osjetljivo tkivo neinficirane osobe.<sup>35</sup>

Čovjek je jedini prirodni rezervoar HSV-a. Glavni način prijenosa HSV-1 izravni je kontakt s inficiranim oralnim sekretom, a HSV-2 inficiranim genitalnim sekretom.<sup>36</sup>

## 1.8. Humani papilomavirus

HPV pripada porodici *Papovaviridae* i rodu Papillomavirus. Virus je ikozaedralne strukture, promjera 55 do 60 nm. Proteinska kapsida je sastavljena od 72 kapsomere. Virus je otporan na eter, 70%-tni etanol, kiseline i toplinu jer kapsida nema lipida. Genom je statičan, mutacije su rijetke. Čini ga zatvorena, kružna, dvolančana DNA veličine 7800 do 7900 parova baza. Geni su podijeljeni na rano (engl. *Early-E*), kasno (engl. *Late-L*) i regularno (engl. *Regular-R*) područje.<sup>8</sup>

U epidemiološkom smislu genitalne infekcije uzrokovane visoko rizičnim humanim papiloma virusom (engl. high risk human papiloma virus, hrHPV) ubikvitarne su i njihov je broj u stalnom porastu.<sup>37</sup> Inkubacija HPV-genitalnih infekcija relativno je duga i traje od 2 do

9 mjeseci (ponekad i dulje), a zaražene osobe mogu biti neprepoznati subklinički izvor zaraze i vjerojatno su razlogom relativno teškog načina otkrivanja izvora i praćenja puteva širenja HPV-genitalne infekcije.<sup>38</sup>

U etiološkom smislu treba napomenuti da je danas poznato više od 200 različitih tipova virusa, a više ih od 40 zahvaća spolni sustav. Infekcija započinje u stanicama bazalnog sloja pločastog epitela. Virus se umnožava u staničnoj jezgri, a stanice propadaju, što se očituje kao koilocitoza vidljiva svjetlosnim mikroskopom. Inficira epitel penisa, skrotuma, analnog kanala, cerviksa, vulve i perianalnog područja.<sup>8</sup> Na temelju povezanosti prisutnosti pojedinoga genotipa HPV-a na vratu maternice i pojave raka vrata maternice, standardno se određuje onkogeni rizik tipova HPV-a. Tako postoje: HPV-DNA tipovi niskog rizika (6,11,30,...) i HPV-DNA tipovi visokog rizika (16,18,31,33,...)

Gledajući s onkogenog aspekta HPV-a Zur Hausen i sur. prvi su dokazali uzročno-posljedičnu vezu između HPV infekcije tipom 16 i 18 i karcinoma vrata maternice.<sup>39</sup> Temeljni molekularni mehanizmi koji pokreću i održavaju nekontroliranu diobu tumorske stanice su aktivacija onkogeni i inaktivacija tumor-supresorskih gena. Onkogeni su geni čija je aktivnost povezana sa zloćudnom preobrazbom stanice, dok su tumor-supresorski geni oni geni čija aktivnost koči zloćudnu preobrazbu. Integracija virusa u genom domaćina smatra se bitnim mehanizmom u karcinogenezi.<sup>40</sup>

U posljednje se vrijeme sve veća pozornost pridaje povezanosti HPV-a i cervikalne intraepitelne neoplazije (CIN). CIN i karcinom materničnog vrata tretiraju se kao spolno prenosive bolesti. Infekcija HPV-om nužan je (99,7%), ali nedovoljan uzrok razvoja karcinoma vrata maternice. Najvažniji poznati predisponirajući čimbenici karcinoma vrata maternice su: infekcija HPV-om visokog rizika, količina HPV unosa, perzistentna HPV infekcija, ugradnja virusne DNA u humani genom domaćina, ekspresija E6 i E7 onkoproteina (E6 inaktivira staničnu regulacijsku bjelančevinu p53 odgovornu za popravak i apoptozu, a E7 pRB bjelančevinu retinoblastoma, što uzrokuje nekontroliranu diobu), utjecaj drugih karcinogeni npr. infekcija (HIV, *C. trachomatis*, *Herplex simplex* tipa 2), duhan, ultraljubičaste zrake i zračenje. Infekcija najčešće nestaje (postane nedetektibilna) nakon 6 mjeseci, u 70% slučajeva nestaje tijekom godine dana, a u 91% tijekom 2 godine. Tip 16 perzistira dulje, najčešće 2 godine. Čimbenici koji utječu na perzistenciju infekcije su: starija dob, HPV tipovi visokog rizika, infekcija s više tipova virusa i imunosupresija.<sup>8</sup>

Prijenos virusa ostvaruje se izravnim kontaktom kože spolnih partnera tako što virusne čestice mogu penetrirati kroz površinske stanice kože i/ili sluznice nakon mikroskopskih abrazija anogenitalne regije koje nastaju pri spolnom kontaktu. Također se prijenos virusa ostvaruje neizravno putem kontaminiranih predmeta, autoinokulacijom iz okolnih područja

kože te prolazom ploda kroz inficirani porođajni kanal.<sup>8</sup>

Infekcije HPV-om mogu biti klinički vidljive ili se ne vide na liječničkom pregledu (subklinička infekcija). Latentna je infekcija karakterizirana prisutnošću HPV-DNA u tkivu, dok je virus odsutan u histološkim nalazima, a otkriva se HPV-DNA detekcijskim metodama.<sup>41</sup>

Smatra se da većina HPV infekcija spontano regradira za 5 do 6 godina.<sup>42</sup>

## 1.9. Regulacija bakterijske flore

"Bakterijska interferencija" pojam je koji se koristi za *in vivo* situacije u kojima autohtone mikrobne vrste reguliraju kolonizaciju tako što predvode egzogene mikroorganizme. Bakterijska se interferencija može pojaviti kao proizvodnja antimikrobnih supstanci od strane interferirajućeg mikroorganizma, i to kao učinkovito korištenje nekih supstrata u lokalnoj okolini, kao preventivno vezivanje za tkivo ili pak stupanj rasta u usporedbi s konkurentnim mikroorganizmima. Čini se da su kvantitativni odnosi između bakterijskih vrsta ključni regulatori bakterijske interferencije. Jakost inhibicijskog efekta rezultat je učinkovitosti inhibicijske supstance i broja mikroorganizama koji je proizvode.<sup>43</sup>

Vrste *Lactobacillus* su bakterije koje se često nalaze u kulturama vaginalnih uzoraka izuzetih od asimptomatskih pacijentica. Kvantitativne analize pokazuju da vaginalni ispirak sadrži oko  $10^7$  laktobacila po gramu sekreta. Najučestalije *Lactobacillus* vrste uključuju *L. acidophilus* i *L. fermentum* dok su manje učestale *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. jensenii*, *L. casei*, *L. delbrueckii* i *L. Salivarius*. U vaginalnom uzorku jedne osobe može biti prisutno više vrsta laktobacila.<sup>44</sup>

U *in vitro* studiji dokazana je sposobnost laktobacila da inhibiraju rast nekoliko bakterijskih vrsta uključujući *Gardnerella* i *Bacteroides*.<sup>45</sup> Autori su tu inhibiciju pripisali prvenstveno proizvodnji niskog pH. Reid i suradnici misle da postoji alternativni mehanizam kontrole bakterijske flore laktobacilima.<sup>45</sup> Otkrili su da fragmenti stanične stijenke laktobacila mogu spriječiti vezivanje bakterijskih patogena za uroepitelne stanice. Nije jasno vrijedi li taj zaključak i za vaginalne epitelne stanice i može li vezivanje vaginalnih mikroorganizama za epitel biti spriječeno istim tim mehanizmom. Kolonizacija ulaznog otvora uretre vrstom *Enterobacteriaceae* predisponirajući je faktor za infekciju urinarnog trakta u žena. Raz i suradnici dokazali su da estrogenska terapija smanjuje mogućnost opetovane infekcije urinarnog trakta kod velikog broja žena.<sup>46</sup> Prethodnim istraživanjima potvrđena je uloga estrogena u povećanju gustoće kolonizacije vagine mikroorganizmima normalne flore.

Poseban je naglasak stavljen na mehanizam bakterijskog antagonizma *Lactobacillus*

vrsta, povezan s stvaranjem hidrogen-peroksida. Eschenbach i suradnici utvrdili su da je osnovno regulacijsko svojstvo laktobacila hidrogen-peroksid, a ne pH.<sup>47</sup> Autori su pokazali da su *Lactobacillus* vrste nađene samo kod 35% žena s bakterijskim vaginitisom. Od onih žena kod kojih je postojala kolonizacija *G. vaginalis* i vrstama *Lactobacillus* samo je 11% imalo sojeve koji su proizvodili hidrogen-peroksid.

Hillier i suradnici pokazali su značajnu korelaciju između odsustva laktobacila koji proizvode vodikov peroksid i vaginalne kolonizacije *G. vaginalis*, vrstama *Bacteroides*, vrstama *Peptostreptococcus* i *Mycoplasma hominis*.<sup>48</sup> Međutim, u slučaju istovremene izolacije enterokoka, streptokoka grupe B, alfa-hemolitičnih streptokoka te katalaza-pozitivnih bakterija poput difteroida, koagulaza-negativnih stafilokoka i vrsta *Enterobacteriaceae* nisu uočene značajne razlike između sojeva laktobacila koji su proizvodili vodikov peroksid i onih koji ga nisu proizvodili. Prevalencija *M. hominis* ili *U. urealyticum* nije se mijenjala kad su kulture sadržavale vrste laktobacila koji su H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> negativne ni kad u tim kulturama nisu bili izolirani laktobacili. U slučaju prisutnosti vrlo jednostavne flore kao što je slučaj kod mlađih adolescenata, laktobacili obično brojećano dominiraju, a obično prevladava vrsta *Lactobacillus*. To je važno ako imamo na umu malu fizičku udaljenost između otvora rodnice i međice koja ima bogatu i kompleksnu floru.

Seksualna aktivnost, korištenje tampona, rađanje i razni drugi događaji u reprodukcijskom životu žene povezuju se s porastom složenosti flore. Veći broj radova naglašava da je produkcija hidrogen-peroksida osnovna karakteristika antimikrobnog djelovanja laktobacila.<sup>47,48</sup>

Spoznaja da jedna mikrobna vrsta može inhibirati drugu vrstu mikroba, potakla je interes za istraživanja tog fenomena na dobrobit ljudi i životinja. S pojmom probiotika veže se pojam "prebiotika", koji se odnosi na prehranu supstratima koji potpomažu razvoj fiziološke flore. Poznato je da unos fruktooligosaharida potiče razvoj crijevne flore u kojoj dominira vrsta *Bifidobacterium*.

*Bifidobacterium* je jedna od nekoliko rodova mikroba koji imaju probiotički potencijal. Pored *Bifidobacterium bifidus*, većina poznatih probiotika su gram-pozitivne bakterije, uključujući enterokok, različite vrste *Lactobacillus*, *Clostridium butyricum* te vrste *Bacillus*. Pored tih gram-pozitivnih bakterija kao probiotik koristi se gljivica *Saccharomyces cerevisiae*.

Studije su pokazale da mikrobiološka okolina u nastanku bolesti može po važnosti nadrasti odabrane virulencije pojedine bakterijske vrste.<sup>1</sup> Zapažanja koja naglašavaju važnost faktora okoline isprepletana su s postojanjem mikrobne replikacije. Naime, da bi se bolest pojavila, egzogene ili endogene bakterije koje posjeduju patogena svojstva moraju postići replikativnu dominaciju. Njihova sposobnost da to i postignu, potencijalno je ovisna o

inhibicijskim ili sinergijskim međuodnosima s drugim mikrobima. Iako se laktobacili nameću kao ključni regulatori u slučajevima kad su brojčano dominantni, na njihovu sposobnost da održe tu prevlast utječu druge bakterijske vrste u sustavu mikroflore genitalnog trakta.

Kvasci iz roda *Candida* dio su fiziološke flore te se zadržavaju na mukoznim površinama poput onih u ustima i genitalnom traktu žena.<sup>49</sup> Mogu uzrokovati veći broj različitih oboljenja te cijeli spektar mikozijskih infekcija, uključujući orofaringealnu, ezofagealnu, vulvovaginalnu i dermalnu kandidijazu kao i sistemska oboljenja.

*C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parasilosis* i *C. tropicalis* postale su značajni uzročnici infekcije u ljudi. *C. albicans* pronađena je u ustima i gastrointestinalnom traktu otprilike u 30-50% zdravih ljudi, no mnogo je veća stopa izolacije u pacijenata koji primaju neku medicinsku terapiju, uključujući i one starije dobi te one krhkog zdravlja.

### 1.10. Imunološki mehanizmi zaštite vaginalne sluznice

Svojstva koja se povezuju s virulencijom i patogenošću uključuju adhezine te cijeli spektar izlučenih hidrolitičkih enzima (hidrolaza). Uloga dizmorfizma u virulenciji nije jasna. Mutanti vrste roda *Candida* koji nemaju sposobnost stvaranja filamenata manje su virulentni. Suprotno tome, manje su virulentne vrste koje nemaju sposobnost rasta kao kvasci čime se ukazuje na to da su obje vrste nužne za stvaranje patogenosti. Većina lezija sadrži oba oblika iako neke infekcije sadrže samo kvasce čime se sugerira da filamenta nisu nužni uzrok virulencije. Patogenosti *C. albicans* pridonose neki površinski proteini te sekretijski proteini poput adhezijskih molekula, osobito manoproteina te izlučeni proteolitični enzimi.<sup>50</sup>

Morfogenetske promjene koje se događaju tijekom transformacija kvasca u hife, smatraju se esencijalnim za infektivni proces. Rast hifa može biti induciran promjenom pH ili pak promjenom temperature. Hife su izdužene i morfološki se znatno razlikuju od okruglih staničnih oblika. Tijekom hifalnog rasta ekspresija antigena na novoj površini uzrokuje povećanu adheziju hifa na stanice domaćina te olakšava penetraciju u tkivo.<sup>51</sup>

Prvu kariku u patogenetskom lancu čini vezivanje (adherencija) *C. albicans* za epitelne stanice mukoznih membrana. Najbitniji mehanizam koji potpomaže adherenciju *C. albicans* za epitelne stanice interakcija je između glikoproteina-manana na površini stanice mikroorganizma sa receptorima-proteinom fibronektinom na epitelnim stanicama.<sup>52</sup>

Manan-glikoprotein koji sudjeluje u adherenciji *C. albicans* može pokrenuti i alternativni put vezivanja komplementa.<sup>53</sup> Postoje dokazi da C3 receptor komponenti sistema komplementa može imati participirajuću ulogu u procesu adherencije.<sup>54</sup> Pretpostavka je da antigenska mimikrija (koja nastaje pri prelasku gljiva u micelijsku formu) u ispoljavanju C3 i



C2 receptora na zidu stanice može imati za posljedicu infibiciju djelovanja fagocitnih stanica domaćina.<sup>55</sup>

Morfogenetske promjene koje se događaju tijekom transformacije kvasca u hife, mogu biti inducirane promjenom pH ili pak promjenom temperature. Hifalne su tvorevine izdužene i morfološki se znatno razlikuju od okruglih staničnih oblika. Tijekom hifalnog rasta ekspresija antigena na novoj površini uzrokuje povećanu adheziju hifa na stanice domaćina te olakšava penetraciju u tkivo.

*C. albicans* prevladavajući je uzročnik gotovo svih tipova kandidoze. Opisana su dva mehanizma kolonizacije oralnih epitelnih stanica. Prvi se mehanizam odnosi na stvaranje litičkih enzima poput sekretorne aspartil-proteinaze (SAP), a koje stvara sam taj mikroorganizam. Pretpostavlja se da ti enzimi razgrađuju površinu epitelnih stanica čime si osiguravaju ulazak u stanicu. SAP enzim mogao bi se pokazati osobito važnim u kolonizaciji keratiniziranih epitelnih stanica. Također je moguće da SAP enzimi vrste *C. albicans* imaju određenu ulogu u penetriranju u tkivo i to tako da olakšavaju prolazak tog mikroorganizma između stanica domaćina. U tom se pogledu SAP enzim vrste *C. albicans* pokazuje funkcionalno jednakim cistein proteazama *Porphyromonas gingivalis* i streptokoka grupe A, koji tim bakterijama omogućuju da napadnu i oštete epitelne stanice.<sup>56</sup>

Na nekim mukoznim površinama, poput ezofagealne sluznice, za konačnu je dijagnozu infekcije nužno utvrditi prisutnost gljivične invazije budući da je *C. albicans* istovremeno i komenzalni kolonizator. Gljivična invazija površinskih slojeva oralnog epitela potvrđena je u slučajevima ljudi s uznapređovalom imunosupresijom te na životinjskim modelima orofaringealne kandidoze. Sposobnost *C. albicans* za invaziju tkiva u korelaciji je s njenom sposobnošću da stimulira jak upalni odgovor oralnih mukoznih stanica. Iako je dokazana uloga invazije u virulenciji *C. albicans*, mehanizam kojim *C. albicans* napada sluznicu nije u potpunosti razjašnjen.<sup>57</sup>

Drugi mehanizam kandidalne invazije epitelnih stanica jest indukcija endocitoze u epitelnim stanicama. Utvrđeno je da *C. albicans* potiče epitelne stanice na stvaranje pseudopodija koji okruže sam taj mikroorganizam i uvlače ga u stanicu. Stvaranje tih pseudopodija popraćeno je akumulacijom mikrofilamenata epitelnih stanica oko mikroorganizma. Ti su mikrofilamenti nužni za endocitozu jer ukoliko dođe do njihove disrupcije citokalacinom D blokira se ulaz *C. albicans*.<sup>57</sup>

Veći broj različitih ljudskih staničnih linija ima sposobnost uzrokovanja endocitoze *C. albicans*. Tu sposobnost među ostalim imaju i HeLa stanice, HET1-A ezofagealne stanice, Fa Du faringealne stanice te OKF6/TERT-2 oralne epitelne stanice.

Iako endocitozu induciraju mikroorganizmi u obliku kvasaca kao i oni u obliku hifa,

hife su djelotvornije u stimulaciji tog procesa. Veću sposobnost hifa u odnosu na blastospore da induciraju endocitozu ukazuje na to da hife na svojoj površini potiču ekspresiju specifične molekule nekih invazina, a koji se vežu za jedan ili više receptora epitelnih stanica i induciraju endocitozu. Identiteti tih kandidalnih invazina i njihovih epitelnih receptora zasad nisu poznati.<sup>58</sup>

U osjetljivih pacijenata vrste roda *Candida* mogu ući u krvotok translokacijom kroz gastrointestinalnu sluznicu ili pak preko intravaskularnog katetera.<sup>59</sup> Da bi se oslobodili iz krvotoka i napali ciljne organe, ti mikroorganizmi moraju prijeći endotelni stanični pokrov krvnih žila. Postoje tri opća mehanizma koja mogu dovesti do ovog procesa. Prvi se odnosi na fagocitozu mikroorganizma leukocitima. Mikroorganizam potom dijapedezom prolazi preko endotelnog pokrova krvnih žila. Tome u prilog ide činjenica da su vrste roda *Candida* uočene u leukocitima pacijenata s kandidemijom.

Drugi mehanizam uključuje prolazak mikroorganizma između endotelnih stanica. Za takav je proces izgledno da će se pojaviti u vaskularnim bazenima organa poput bubrega gdje je endotelni pokrov krvnih žila fenetriran.

Treći mehanizam predstavlja endocitozu mikroorganizma u endotelne stanice. Filler i Sheppard utvrdili su da do endocitoze *C. albicans* dolazi u ljudskim endotelnim stanicama umbilikalne vene, endotelnim stanicama svinjskog vaskularnog eksplantata te mikrovaskularnim stanicama ljudskog mozga.<sup>58</sup> U većini slučajeva endotelne stanice proizvode pseudopodije koji okružuju te mikroorganizme. Za endocitozu *C. albicans* nužni su mikrofilamenti i mikrotubule intaktnih endotelnih stanica. U tom je procesu sam mikroorganizam pasivan zato što neživi mikroorganizmi imaju sposobnost induciranja endocitoze kao i živi mikroorganizmi. Hife *C. albicans* induciraju endocitozu u ljudsku endotelnu stanicu umbilikalne vene puno učinkovitije nego blastospore.

Rizik kandidoze i njenih specifičnih manifestacija različit je i ovisan o tome koji je aspekt imuniteta oslabljen. Razumijevanje odgovora domaćina na rod *Candida* važno je za donošenje odluke o tome koja će se od trenutno dostupnih antimikotičnih terapija koristiti. Poznato je da stanična imunost ima važnu ulogu, osobito u mukoznim infekcijama te su pacijenti s deficijencijom u ovom djelu imunološkog sustava izloženi osobito visokom riziku. Limfociti sudjeluju u antimikotičnoj obrani domaćina tako što otpuštaju citokine koji pospješuju aktivnost makrofaga i netrofila. Citotoksične stanice i limfociti koji aktiviraju interleukine dokazano inhibiraju rast *C. albicans*.<sup>60</sup>

Klinička zapažanja pokazuju da su mukokutane infekcije rodom *Candida* obično povezane s defektnim stanično posredovanim imunološkim odgovorom, dok su sistemske infekcije učestalije u pacijenata s deficijencijom u broju ili funkciji neutrofila.<sup>61</sup>

Prirođena je imunost dominantni zaštitni mehanizam protiv diseminirane kandidoze.<sup>61</sup> Kvantitativne i kvalitativne abnormalnosti neutrofila i monocita povezuju se sa sistemskom kandidozom. Pacijenti oboljeli od limfoma i leukemije koji primaju intenzivnu kemoterapiju, a koja rezultira neutropenijom, imaju povećan rizik za razvoj diseminirane infekcije. Neutrofil i monociti oštećuju i inaktiviraju stanice kvasca, hife i pseudohife. Velike hife i pseudohife roda *Candida* mogu spriječiti fagocitozu. U takvim slučajevima nekoliko fagocita uspostavlja međusobnu suradnju kako bi utjecali na staničnu inaktivaciju.

Neutrofil i monociti prepoznaju i okružuju opsonizirane i neosponizirane stanice kvasca preko receptora za prepoznavanje uzorka koji su na staničnoj površini i uključuje TLR receptore i receptore za beta glukan. Vezivanje za pojedinačne TLR receptore ili za IL-1R receptor aktivira specijalizirane antimikotičke funkcije neutrofila i drugih fagocita. Inaktivacija se vrši oksidativnim mehanizmima koji uključuju stvaranje reaktivnih oksidativnih produkata kisika i dušika te neoksidativne mehanizme inaktivacije.

Fagocitoza i inaktivacija povećavaju se opsonizacijom i proupalnim citokinima. Invazija vaskularnih struktura olakšava diseminaciju vrsta roda *Candida*. Endotelne stanice odupiru se vaskularnoj invaziji lučenjem protupalnih medijatora i ekspresijom adhezijskih molekula leukocita koji se aktiviraju i vežu za aktivirane leukocite. Medijatori upale na području oštećene endotelne površine induciraju otpuštanje antimikrobnih peptida iz ljudskih trombocita.

TLR receptori ključni su medijatori prirodnog imunološkog sustava koji upućuju stanice prirodnog i adaptivnog odgovora da eliminaciju mikrobne infekcije. Prepoznavanje s patogenom povezanih PAMP molekularnih uzoraka od strane TLR receptora bilo individualnih bilo u heterodimenziji s drugim TLR ili non-TLR receptorima inducira signale odgovorne za aktivaciju prirodnog imunološkog odgovora.<sup>62</sup>

Smatralo se da su stanične stijenke gljiva prekrivene slojem manoproteina, a što je dovelo do povećanog zanimanja za sustave prepoznavanja (prepoznavanje s patogenom povezanih PAMP molekularnih uzoraka) utemeljene na manozi. Rezultati kasnijih istraživanja pokazali su da je riječ o simplističkom tumačenju te da su na staničnoj površini eksponirani i drugi mehanizmi prepoznavanja osobito oni vezani za beta-glukan. U vrsti *C. albicans* beta glukan može činiti do 50% težine neke tvari stanične stijenke i esencijalna je strukturalna komponenta koja osigurava elastičnost i mehaničku snagu.<sup>63</sup>

Prepoznavanje beta glukana od strane stanica domaćina posredovano je uglavnom dektinom-1. To je mijeloidno ekspresiran receptor tipa II sličan transmembranskom lektinu C koji sadrži imunoreceptorsku aktivacijsku tirozinsku bazu u svojem citoplazmatskom repu. Dektin-1 veže se za mnoge gljive uključujući *Saccharomyces*, *Candida*, *Coccidioides* i

*Aspergillus*. In vitro dektin-1 djeluje kao medijator cijelog niza TLR-ovisnih i TLR-neovisnih antimikotičkih staničnih odgovora uključujući fagocitozu, porast metaboličke aktivnosti i proizvodnju mnogih citokina. Sposobnost vrsta roda *Candida* za brz ireverzibilni prijelaz iz kvasca u filament krucijalna je za njihovu patogenost i smatra se da filamentna morfologija osigurava izvjesnu prednost tijekom interakcije s imunološkim sustavom sisavaca. Dokazano je da je stanična stijenka blastonidija roda *Candida* dobrim dijelom zaštićena od dektina-1 sastavnicama vanjske strane stanične stijenke. Normalni mehanizmi pupanja kvasca i dijeljenje stanica stvaraju trajne ožiljke, koji pak stvaraju dovoljno beta glukana koji potiče antimikrobne odgovore kroz dektin-1 uključujući fagocitozu i aktivaciju procesa stvaranja reaktivnog kisika.

Tijekom filamentnog rasta ne dolazi do dijeljenja stanica niti kasnije ekspozicije beta glukana i *Candida* ne aktivira dektin-1.

Nedavno istraživanje pokazalo je da imunološko prepoznavanje *C. albicans* zahtijeva prepoznavanje peptida i beta glukana u staničnoj stijenci od strane lektina i TLR receptora.<sup>62</sup> Prepoznavanje *C. albicans* od strane monocita i makrofaga posredovano je s tri sustava prepoznavanja koji su različite važnosti, a svaki od njih prepoznaje specifične slojeve stijenke *C. albicans*.

Jedna studija pokazala je da je manjak dektina-1 miševa podložna infekciji *C. albicans*.<sup>64</sup> Leukociti s deficijencijom dektina-1 pokazali su znatno oslabljene odgovore na gljive čak i uz prisustvo opsonina. Oslabljeni odgovori leukocita manifestirali su se *in vivo* kroz smanjenu aktivaciju upalnih stanica nakon gljivične infekcije što je rezultiralo značajno povećanim gljivičnim opterećenjem te povećanom gljivičnom diseminacijom.

Ta je studija definirala fundamentalnu funkciju prepoznavanja beta glukana od strane dektina-1 u antimikotičkoj imunosti i pokazala da je signalni non-TLR receptor za prepoznavanje uzorka nužan za indukciju zaštitnih imunoloških odgovora.

Gow i suradnici pokazali su da proizvodnja citokina od strane ljudskih mononuklearnih stanica periferne krvi te mišjih makrofaga ovisi o prepoznavanju beta glukana od strane dektina-1.<sup>65</sup> Inaktivacija stanica *C. albicans* djelovanjem visoke temperature rezultirala je ekspozicijom beta glukana na površini stanične stijenke i potonjim prepoznavanjem od strane dektina-1 dok su živi kvasci stimulirali monocite uglavnom kroz prepoznavanje manana na staničnoj površini. Za dektin-1 dokazano je da inducira stvaranje citokina na dva načina: proizvodnjom interleukina 10-anti-upalnog Th2 citokina te stimulacijom protuupalnih citokina monocitne derivacije ovisnih o TLR receptoru Myd 88 poput faktora nekroze tumora alfa. Suprotno tome, stimulacija Th 1 citokina kakav je gama interferon od strane *C. albicans* bila je neovisna o prepoznavanju beta glukana od strane

dektina-1.

Monociti i makrofagi tipovi su stanica koje se najčešće povezuju s prirodnim imunološkim odgovorima usmjerenim protiv sistemske infekcije vrstom *C. albicans*. Mnogi rezultati eksperimentalnih modela pokazuju da odgovori domaćina protiv diseminirane infekcije ovise o T-stanicama.

Mehanizmi kojima specifična antitijela stupaju u interakciju sa sastavnicama staničnog imunološkog sustava kako bi se obranili od patogena prednost su intenzivnih istraživanja. Novije su studije potvrdile da serumska protutijela koja se prirodno pojavljuju protiv *C. albicans* mogu djelovati kao opsonini koji posreduju u fagocitnoj inaktivaciji.

Dendritične su stanice u malom broju prisutne u tkivima koja su u kontaktu s vanjskim okolišem i to uglavnom na koži (gdje se nalazi prelazni tip dendritičnih stanica nazvan Langerhansove stanice) te na unutarnjoj sluznici nosa, pluća, želuca i crijeva. Mukozne se površine smatraju prvom obrambenom linijom za stjecanje protektivnog imuniteta protiv infekcija uzrokovanih rodom *Candida*.

Iako je gastrična kandidoza uobičajena u oslabljenih pacijenata oboljelih od karcinoma, to je stanje često asimptomatično i vrlo se rijetko dijagnosticira za života. Perforacije mogu dovesti do diseminirane infekcije. Koh i suradnici postavili su hipotezu da su u mišjim modelima neutropenija i oštećenje gastrointestinalnog trakta presudni za rašireno sistemsko oboljenje.<sup>66</sup>

Sposobnost regulatornih T-stanica (Treg) da inhibiraju aspekte prirodene i stečene imunosti ključna je za njihovu protektivnu ulogu u gljivičnim infekcijama.

De Luca i suradnici dokazali su da je rast gljiva, upalna imunost te tolerancija na rod *Candida* bila kontrolirana kordiniranom aktivacijom prirodnih Treg stanica koje su sprečavale ranu upalu na mjestima infekcije te patogenom induciranih Treg stanica.<sup>67</sup>

Alfa i beta-defenzini ključne su sastavnice prirodnog obrambenog sustava koji osiguravaju antimikrobno djelovanje. Kolonizacija *Candida* vrstama inducira jaku ekspresiju antimikrobnih peptida. Pozitivna regulacija defenzina mogla bi djelovati kao zaštita od invazivne kandidijaze te limitirati kandidozu na mukoznu površinu.

Humoralni imunološki odgovor u vaginalnoj sluznici očitava se u prisustvu specifičnih antitijela. Mali broj plazma stanica i B-limfocita prisutnih u vaginalnoj sluznici, kao i postojanje antitijela u vaginalnom sekretu, govore u prilog njihove difuzije iz seruma.<sup>68</sup> U genitalnom traktu žena i vaginalnom sekretu su dominantna IgG i IgA antitijela.<sup>69</sup> Visoke doze estrogena smanjuju produkciju IgG i IgA antitijela te samim tim i njihovu koncentraciju na vaginalnom epitelu. U eksperimentalnim radovima in vitro utvrđeno je da estrogen inhibira antigen prezentirajuću ulogu Langerhansovih vaginalnih stanica, a da progesteron zaustavlja

inhibitorni efekt estrogena.<sup>70</sup>

### 1.11. Neimunološki mehanizmi zaštite vaginalne sluznice

Zaštitna uloga sluznice zasniva se na sprečavanju invazije tkiva i lokalnih upala zahvaljujući normalnoj fiziološkoj flori na površini mukoznih membrana. Fiziološku floru čine saprofitni i potencijalno patogeni mikroorganizmi (oportunisti). Kako je sluznica izložena velikom broju različitih mikroorganizama, neimunološki mehanizmi vjerojatno razvijaju odnos tolerancije prema njima. Neimunološki mehanizmi imaju odnos tolerancije samo prema određenom broju mikroorganizama iste vrste ili roda, što vrijedi i za oportuniste gljive roda *Candida*. Čak 20% žena može imati asimptomatsku *Candida spp.* kolonizaciju vaginalne sluznice mjesecima, čak i godinama. Za optimalan odnos i broj svih mikroorganizama (i gljiva roda *Candida spp.*) važan je odnos pH, razine glikogena i glukoze u epitelnim stanicama vaginalne sluznice, nivoa glukoze u vaginalnom sekretu, kao i oslobađanje N-acetil-glukozamina iz zida bakterijskih stanica. Ukoliko je taj odnos poremećen, dolazi do infekcije.<sup>71</sup>

### 1.12. Uloga imunološkog odgovora u infekcijama mikroorganizmima

Živimo u stalnom dodiru s mikrobima.<sup>72</sup> Jedni su korisni (mikrobi u probavnom traktu) dok su drugi patogeni opasni. Djelotvorni mehanizmi obrane usprkos izloženosti patogenim mikrobima, uspješno čuvaju normalne jedinke od infekcije. Nespecifičnu i djelotvornu obranu čine mehaničke prepreke (suze, slina, deskvamacija, defekacija i uriniranje). Lokalno nastaju antimikrobne tvari koje oštećuju bakterije (lizozim), priječe im adherenciju (pH), ubijaju ih (lipaze) ili im usporavaju rast (kiselost).

Mnogi mikrobi imaju posebne molekule-ligandi (athezini) kojima adheriraju na stanične receptore. Sluz normalne sluznice sprečava adheriranje, a time i ulaz mikroba u stanicu i prodiranje u tkivo. Adheriranje posebno djelotvorno ometaju sekretorna antitijela IgA. Prošavši kroz stanicu mikrobi uspijevaju prodrijeti u organizam gdje će naići na sistemsku obranu. Za sistemsku obranu važne su dvije vrste stanica: fagociti i stanice koje sudjeluju u celularnoj imunoreakciji.

Sposobnost fagocitoze imaju mnoge endotelne i epitelne stanice te fibroblasti. Polimorfonuklearni neutrofil i monociti/makrofagi na staničnoj površini imaju receptore za Fc fragment IgG i za C3 komponentu komplementa. Znatno djelotvornije endocitiraju u tijeku imunoreakcije i aktiviranja komplementa, a u citoplazmi imaju enzime koji ubijaju i

razgrađuju endocitirane mikrobe. Polimorfonukleari su važniji pri infekcijama izvanstaničnim mikrobima, a makrofagi pri unutarstaničnim mikrobima.

Stanovite bakterije zbog svoje ovojnice mogu izbjeći endocitiranje, a ima ih koje izlučuju antifagocitne toksine te takvih koje nikad ne prodru dublje u tkiva gdje bi se mogle fagocitirati.

Antitijela i komplement mogu i izravno lizirati stanovite gram negativne bakterije. Aktiviranje komplementa znači i transudaciju (dodatna antitijela) i kemotaksiju (dodatni polimorfonukleari).

### 1.13. Tvorba i toksični učinak niskomolekularnih metabolita

Triptofol (indol-3-etanol) je aromatski alkohol koji nastaje kao završni produkt katabolizma triptofana. Kao svoj sekundarni metabolit proizvode ga određene bakterije, kvasci i gljive. Uz još dva aromatska alkohola, feniletanol i tirozol, triptofol je produkt alkoholne fermentacije koja se odvija tijekom metabolizma soja kvasca *Saccharomyces cerevisiae*.

Novije su studije, vezane za kvasce koji pripadaju oportunističkoj komenzalnoj humanoj mikroflori roda *Candida*, utvrdile da nekoliko medicinski važnih sojeva koji uzrokuju kandidozu izlučuju triptofol kao završni produkt metabolizma triptofana tijekom njihova eksponencijalnog rasta *in vitro*.

Triptofol nastaje kao metabolit triptofana u krvnom parazitu-bičašu afrička *Trypanosoma (Trypanosoma brucei)*. Utvrđeno je da taj parazit ima hipnotički učinak i sudjeluje u patofiziološkim mehanizmima koji dovode do stanja nalik snu ili komatoznog stanja koje je poznato kao tripanosomijaza ili bolest spavanja.

U ljudskom je organizmu triptofol minoran produkt metabolizma triptofana. Njegova proizvodnja u jetri značajno raste u slučaju konzumacije alkohola. Najvažnija je sastavnica triptofola u ljudi i drugih sisavaca 5-hidroksi-triptofol (5-HT), indiciran kao metabolit serotonina (5-hidroksi-triptamina). Kronično uzimanje alkohola povećava kao sintezu, tako i metaboličku izmjenu 5-HT. Prevelika količina 5-HT u laboratorijskih životinja te u ljudskom organizmu uzrokuje abnormalnosti u kognitivnim i bihevioralnim funkcijama u funkciji autonomnog živčanog sustava te u neuromuskularnoj funkciji.

Triptofol je izrazito lipofilan spoj koji slobodno prodire kroz staničnu membranu. Zbog ireverzibilnih promjena u permeabilnosti vode inducira eritrocitozu.

Usprkos zanimljivim biološkim funkcijama, kompletan toksikološki profil triptofola još nije adekvatno objašnjen. Tek se nekoliko studija bavilo pitanjem mutagenosti i

genotoksičnosti triptofola. Najnoviji rezultati istraživanja vezanih za toksičnost triptofola do kojih su došli ukazuju na njegovu sposobnost da inducira apoptozu u staničnoj liniji ljudskog podrijetla *U937*.<sup>73</sup>

Pod pretpostavkom da je toksikološki profil triptofola sličan profilu etanola, njegovi bi genotoksični učinci također mogli biti posredovani stvaranjem reaktivnijih metabolita. Etanol metabolizira u slobodni radikal *1-hidroksi-etil*, *in vitro* i *in vivo*. Budući da taj radikal *1-hidroksi-etil* može uzrokovati oštećenje stanice i staničnu smrt, takav se metabolizam smatra štetnim.

Dosadašnja istraživanja ukazuju da su niskomolekularni metaboliti koji se tvore u *in vitro* biosintezama kliničkih izolata vrsta roda *Candida* alkoholnog tipa.<sup>74</sup> Jedan od njih je i triptofol (3-indol-etenol, TOL) krajnji produkt katabolizma triptofana. Toksični učinak triptofola potvrđen je mikronukleus testom na limfocitima periferne krvi čovjeka (uzrokujući indukciju mikronukleusa, nuklearnih pupova i nukleoplazmatskih mostova kao i indukciju apoptoze izloženih stanica).<sup>75</sup>

Genotoksični učinak subcitotoksičnih koncentracija triptofola (0,25 do 2,0 mM) potvrđen je na epitelnim staničnim linijama, monocitima i limfocitima periferne krvi čovjeka.<sup>74,76</sup> Subcitotoksične koncentracije triptofola uzrokovale su također jasan citotoksični, citostatički i genotoksični učinak *in vitro* s linearnim odnosom doze i učinka uzrokujući apoptozu, kromosomske aberacije, izmjenu sestrinskih kromatida i pojavu mikronukleusa.<sup>77,78</sup>

Genotoksični učinak triptofola u *in vitro* uvjetima u koncentraciji 2,0 mM testiran je na četiri stanične linije A549, CHO, HepG2, and THP-1.<sup>79</sup> Nakon 24-satne izloženosti triptofolu oštećenje DNA utvrđeno je na HepG2, A549 i THP-1 stanicama kao posljedica bioaktivacije i/ili raspada triptofola u još toksičnije produkte kao i stvaranja reaktivnih produkata koji dodatno oštećuju DNA.

Tip i razmjer DNA lezija u stanicama tretiranim triptofolom upućuju na oštećenja uzrokovana reaktivnim aldehydima i/ili slobodnim radikalima. Naime, triptofol se kao lipofilni alkohol metabolizira pomoću alkohol-dehidrogenaze u 3-indol-acetaldehyd, a za acetaldehyde su poznati mutageni, karcinogeni i genotoksični učinci.<sup>80</sup> Nadalje, novija istraživanja daju u prilog hipotezi da komezali tvore toksične metablite koji imaju citotoksičan i genotoksičan učinak na stanice nositelja te ih se povezuje s tvorbom novotvorina.<sup>80,81</sup>

Prema Međunarodnoj agenciji za istraživanje raka (IARC), dokazano je da je acetaldehyd kancerogen *in vivo* za životinje, a moguće je kancerogen i za ljude (IARC, 1985, IARC, 1988). Ovi rezultati potvrđeni su u nekoliko epidemioloških i biokemijskih studija. Mutagene i kancerogene promjene uzrokovane acetaldehydom mogu se pojaviti već u koncentraciji acetaldehyda od 40 do 200  $\mu\text{mol/L}$ , a koja se može pronaći u slini čak i nakon



umjerene konzumacije etanola.<sup>82,83</sup>

Alkohol je jedan od ključnih faktora rizika karcinoma usne šupljine. Alkohol sam po sebi nije kancerogen, no on oksidira u kancerogeni acetaldehid u slini uslijed djelovanja enzima alkohol dehidrogenaze (ADH) nekih oralnih mikroba u sastavu normalne oralne mikroflore.<sup>84,85</sup>

Oralni streptokoki dio su normalne mikroflore i predstavljaju fakultativno anaerobne bakterije. U anaerobnim uvjetima te bakterije mogu proizvesti energiju kroz fermentaciju glukoze u alkohol posredstvom ADH enzima. Uz prisustvo kisika ADH reakcija odvija se u suprotnom smjeru, te se iz etanola stvara acetaldehid.<sup>86</sup>

Važna uloga mikroba u proizvodnji kancerogenog acetaldehida u usnoj šupljini opisana je u nekoliko istraživanja. Povećana proizvodnja acetaldehida u slini povezana je s lošom oralnom higijenom i s povećanim brojem bakterija u slini. *In vivo* pacijenti oboljeli od karcinoma usne šupljine na mjestu tumora imaju povećan broj bakterija normalne flore, kao što su oralni streptokoki. Mjesta tumora često kolonizira soj *Candida albicans*, za koji je već ranije dokazano da stvara veliku količinu acetaldehida.<sup>87,88</sup>

Postoje čvrsti dokazi kancerogenosti acetaldehida. On uzrokuje točkaste mutacije u ljudskim limfocitima, inducira izmjenu sestrinskih kromatida i unakrsno povezivanje kromosoma. Acetaldehid čak interferira s mehanizmom reparacije DNA.<sup>89</sup>

Iz epidemioloških i bioloških istraživanja provedenih *in vivo* na Azijatima, kod kojih je enzim mitohondrijska aldehid dehidrogenaza 2 (*Eng.* Aldehyde dehydrogenase 2, ALDH2) deficijentan, dokazan je kancerogeni utjecaj acetaldehida. Mitohondrijski ALDH2 enzim odgovoran je za većinu procesa oksidacije acetaldehida u acetat. Kod osoba koje imaju deficijenciju ALDH2 enzima taj je enzim djelomično neaktivan, što rezultira akumulacijom acetaldehida u slini nakon konzumacije alkohola. Kod Azijata koji uzimaju veće količine alkohola ALDH2 deficijencija povezuje se s deset puta većim rizikom karcinoma usne šupljine u odnosu na one koji imaju normalnu količinu tog enzima.<sup>90</sup>

#### **1.4. Mikronukleusi**

Mikronukleusi su samostalne kromatinske strukture koje su potpuno odvojene od jezgre. Nastaju kondenzacijom acentričnih kromatinskih fragmenata ili čitavih kromosoma zaostalih u anafazi koji se nisu ugradili u jezgre stanica kćeri.<sup>91</sup>

Mikronukleus test podjednako je osjetljiv za otkrivanje oštećenja diobenog vretena<sup>92</sup> i aberacije kromosoma.<sup>93</sup> Prisutnost mikronukleusa smatra se kvantitativnim pokazateljem postojanja strukturnih i/ili numeričkih aberacija kromosoma nastalih pod utjecajem

genotoksičnih agensa.<sup>94</sup>

Mikronukleus pod svjetlosnim mikroskopom u interfaznoj stanici izgleda poput dodatne stanične jezgre, ali znatno je manji. Opisana su četiri načina nastanka mikronukleusa: gubitak acentričnih fragmenata kromosoma, posljedice različitih tipova oštećenja kromosoma, gubitak cijelog kromosoma kao posljedica oštećenja diobenog vretena ili gubitak funkcionalnosti diobenog vretena te hijazma u paracentričnoj regiji pri čemu će nastati mikronukleus s acentričnim fragmentima.<sup>95</sup>

Mehanizam apoptoze (programirane smrti stanice) javlja se kao normalna pojava, ali i kao reakcija na fizikalno ili kemijsko oštećenje i ne mora biti potaknut ili zaustavljen te je od ključnog značenja u organogenezi, ali i u razvoju neoplazije. Još uvijek nije poznat mehanizam koji pokreće proces apoptoze.<sup>96</sup>

Za stvaranje mikronukleusa nužno je da stanica uđe u diobu. Apoptična stanica ne sadržava glavnu jezgru, a ni nekoliko manjih jezgrića već grupu piknotičkih jezgrinih fragmenata. Stvaranje mikronukleusa ovisi o tipu stanica, mehaničkim karakteristikama, veličini i broju kromosoma. Povišena učestalost mikronukleusa znak je povećanog rizika karcinogeneze.<sup>97</sup>

## 2. CILJEVI I HIPOTEZE

U temeljima napretka prvenstveno stoji znanost pa je i "opravdano" tražiti od znanosti pomoć u rješavanju problema koji su uzrokovani vrstama roda *Candida*. Kandidate mogu iz apatogenog komenzalnog načina života prijeći u patogeni oblik uzrokujući površinsku i sustavnu kandidozu.

Tijekom života u polimikrobnoj zajednici na sluznicama nositelja (usna šupljina, gastrointestinalni i genitalni trakt), *Candida* vrste ulaze u interakcije s ostalim mikrobima sa ciljem održanja vrste. Pri tome oni tvore niz izvanstaničnih metabolita, prije svega hidrolitičke enzime i niskomolekularne metabolite koji imaju metaboličku i obrambenu ulogu.

Na osnov podataka o tvorbi niskomolekularnih metabolita vrsta roda *Candida* u uvjetima *in vitro*<sup>77</sup> nameću se sljedeće hipoteze:

1. Kandidate u genitalnom traktu žena imaju sposobnost stvaranja NMM *in vivo* i *in vitro*.

2. Stvaranje niskomolekularnih metabolita vrsta roda *Candida* u uvjetima *in vivo* povezano je s životnim navikama i stilom života žena.

3. Prisutnost niskomolekularnih metabolita u genitalnom traktu žena povezano je prelaskom komenzala u patogeni stadij.

Shodno tome eksperimentalni dio rada obuhvaća nekoliko metodoloških i po znanstvenim područjima odvojenih dijelova koji su povezani u cjelinu.

Ciljevi istraživanja su:

1. primjenom metoda multivarijantne analize utvrditi najznačajnije čimbenike koji uvjetuju prelazak sastavnica genitalnog trakta žena iz komenzalnog u patogeni oblik uzimajući u obzir 37 varijabli koje uključuju životni stil i opće zdravstveno stanje,
2. utvrditi prisutnost i vrste niskomolekularnih metabolita (triptofola, 2-fenil etanola i tirosole) u uzorcima iscjetka rodnice vezanim sustavom plinske kromatografije-masene spektrometrije (gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS),
3. primjenom metoda multivarijantne analize utvrditi povezanost gljivičnih/bakterijskih/virusnih infekcija s prisutnošću metabolita dokazanih *in vivo*,
4. GC-MS analizom utvrditi koncentraciju niskomolekularnih metabolita dokazanih *in vitro* za svaku pojedinu vrstu roda *Candida*,
5. iz uzorkovanih epitelnih stanica rodnice utvrditi njihov status primjenom metoda mikronukleusa

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Ispitanice i uzorci

Istraživanje je provedeno u Specijalističkoj ginekološkoj ordinaciji, Službi za mikrobiologiju i parazitologiju Zavoda za javno zdravstvo "Dr. Andrija Štampar", Centru za forenzična ispitivanja i vještačenja "Ivan Vučetić", Zavodu za kliničku citologiju i citogenetiku Kliničke bolnice Merkur te Jedinici za mutagenezu Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada od rujna 2009. godine do prosinca 2011. godine.

U istraživanje su bile uključene 203 ispitanice u dobi od 18 do 65 godina. Sve ispitanice svojevrijem su pristale na istraživanje, i nisu bile trudne. Iz istraživanja su isključene trudnice.

Kod uključivanja u istraživanje ispitanice su ispunile upitnik sa 37 varijabli: dob, zanimanje, profesionalna izloženost, bračni status, broj partnera u zadnjih godinu dana, broj poroda, vrsta poroda, spontani pobačaj, inducirani pobačaj, korištenje kontracepcije, podatak o prehrani (brza hrana, kuhana, pečena), konzumacija slatkiša, uzimanje vitamina, antioksidansa (karatenoidi, vitamin C), minerala, biljnih pripravaka, pušenje, konzumacija alkohola i kave, uzimanje narkotika, hobi koji uključuje izloženost kemijskim agensima, bavljenje sportom, izlaganje teškom fizičkom radu, preboljele akutne bolesti, kronične bolesti, tumorske bolesti, preboljeli herpes zoster, virusni hepatitis B ili C, HPV, podatak o rtg snimanju, CT-u ili UZV-u u proteklih godinu dana, uzimanje oralne hormonske kontracepcije, uzimanje hormonskog nadomjesnog liječenja, uzimanje antibiotika i antimikotika (lokalno i/ili sustavno) i ostalih lijekova.

Sve su se one prethodno složile sa sudjelovanjem u istraživanju i pristale na objavu podataka te za to dale pisanu suglasnost (dopuštanjem Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu br. 04-76/2009-292 od 21. svibnja 2009. god.).

Nakon što su ispunile upitnik, svim pacijenticama je tijekom ginekološkog pregleda uzet obrisak za Papa-test, obrisci vrata maternice i rodnice za mikrobiološku analizu na *Candidu*, aerobne bakterije, *Mycoplasma* i *Ureaplasma*, *Chlamydia trachomatis*, hrHPV, iscjedak rodnice za utvrđivanje prisutnosti metabolita te obrisak stražnjeg zida rodnice za test genotoksičnosti.

### 3.1.2 Upitnik

## INFORMIRANI PRISTANAK

### UPITNIK

DATUM PREGLEDA \_\_\_\_\_  
ŠIFRA PREGLEDA \_\_\_\_\_

GODINA ROĐENJA \_\_\_\_\_

ZANIMANJE \_\_\_\_\_

PROFESIONALNA IZLOŽENOST (navesti što i od koje godine) \_\_\_\_\_

**Bračni status:**

Broj partnera u zadnjih godinu dana?

Imate li djece?

Normalan porod (navesti broj djece):

Spontani pobačaj (navesti kada i u kojem mjesecu trudnoće):

Inducirani pobačaj (navesti kada i u kojem mjesecu trudnoće):

Koristite li kakvu kontracepciju? (navesti što i od kada)

**PODACI O ŽIVOTNIM NAVIKAMA I ZDRAVSTVENOM STANJU:**

**PREHRANA**

Prema tipu prehrane, preferiram:

- brzu hranu                      - kuhanu hranu                      - pečenu hranu                      - suhu hranu

Koliko puta tjedno konzumirate:

- povrće i voće \_\_\_\_\_ - meso \_\_\_\_\_ - s atkiši \_\_\_\_\_ - kruh, tijesto, riža, krumpir \_\_\_\_\_

Uzimate li kakve vitamine, antioksidanse, minerale, ljekovite biljne pripravke i sl.?

Naziv \_\_\_\_\_mj./god. \_\_\_\_\_ Naziv \_\_\_\_\_mj./god. \_\_\_\_\_

Naziv \_\_\_\_\_mj./god. \_\_\_\_\_ Naziv \_\_\_\_\_mj./god. \_\_\_\_\_

**PUŠENJE** od \_\_\_\_\_ do \_\_\_\_\_ (god.) Broj cigareta / dan \_\_\_\_\_

**ALKOHOL**                      DA                      POVREMENO                      NE                      Učestalost / količina /vrsta \_\_\_\_\_

**KAVA**                      DA                      POVREMENO                      NE                      Učestalost / količina \_\_\_\_\_

**NARKOTICI** (vrsta/god.) \_\_\_\_\_

Bavite li se hobijem koji uključuje izloženost kemijskim agensima (pesticidi, org. otapala, boje, lakovi, ljepljiva...)?  
 Agens \_\_\_\_\_ od (god.) \_\_\_\_\_ učestalost \_\_\_\_\_ zadnja izloženost \_\_\_\_\_

Bavite li se sportom? \_\_\_\_\_

Teški fizički napori (menzurna treniranja...) u proteklih mjesec dana DA NE (što?) \_\_\_\_\_

**BOLESTI**

Prehlada, gripa, neka druga virusna ili zarazna bolest u proteklih mjesec dana? DA NE (što?) \_\_\_\_\_

Kronične bolesti (što i od kada?) \_\_\_\_\_

Tumorske bolesti u ispitanika i najbližih srodnika? DA NE Naziv bolesti \_\_\_\_\_

Preboljele bolesti (godina): *Herpes zoster* \_\_\_\_\_ *Virusni hepatitis B / C* \_\_\_\_\_  
 HPV \_\_\_\_\_ (tip?) \_\_\_\_\_

**PRETRAGE** (RTG, CT, UZV- navesti vrstu) provedene u proteklih 12 mjeseci:  
 Vrsta \_\_\_\_\_ mj./god. \_\_\_\_\_ Vrsta \_\_\_\_\_ mj./god. \_\_\_\_\_  
 Vrsta \_\_\_\_\_ mj./god. \_\_\_\_\_ Vrsta \_\_\_\_\_ mj./god. \_\_\_\_\_

**KEMIJSKE TERAPIJE**

*Kontracepcija* \_\_\_\_\_ od \_\_\_\_\_ do \_\_\_\_\_ (mj./god.)  
*Horm. nadomjesna terapija* \_\_\_\_\_ od \_\_\_\_\_ do \_\_\_\_\_ (mj./god.)

Kada ste zadnji puta uzimali antibiotike (oralno / injekcija) i navedite koje? \_\_\_\_\_

Kada ste zadnji puta lokalno primjenjivali antibiotike i navedite koje? \_\_\_\_\_

Kada ste zadnji puta uzimali antimikotike (oralno) i navedite koje? \_\_\_\_\_

Kada ste zadnji puta lokalno primjenjivali antimikotike i navedite koje? \_\_\_\_\_

Navesti ostale lijekove (hormoni štitnjače, inzulin, antidepresivi, lijekovi protiv visokog tlaka, masnoća u krvi, alergije, reumatskih bolova, lijekovi za cirkulaciju, antacidi i sl.), koje ste uzimali u zadnje vrijeme (navesti što, kada i koliko dugo je trajala terapija)

Naziv lijeka \_\_\_\_\_ mj./god. \_\_\_\_\_ Naziv lijeka \_\_\_\_\_ mj./god. \_\_\_\_\_  
 Naziv lijeka \_\_\_\_\_ Naziv lijeka \_\_\_\_\_  
 Naziv lijeka \_\_\_\_\_ Naziv lijeka \_\_\_\_\_

Vlastoručnim potpisom potvrđujem svoji informirani pristanak za sudjelovanje u istraživanju. Napominjem da sam podatke za ovaj upitnik dala dragovoljno te da sam u potpunosti upoznata i razumijem ciljeve istraživanja, a uz poštivanje svih etičkih načela, suglasna sam da se rezultati provedenih analiza mogu iskoristiti u znanstvene svrhe.

Mjesto i datum:

Potpis ispitanice:

### **3.1.3. Obrisci za bakteriološku i mikološku pretragu**

#### **3.1.3.1. Obrisak vrata maternice**

Uzorci obriska vrata maternice uzeti su prema sljedećem protokolu:

1. vizualizacija vrata maternice spekulom,
2. prikupljanje uzorka endocervikalnog kanala vatenim štapićem rotirajući štapićem po sluznici,
3. stavljanje obriska u transportni medij po Stuartu i transportirati u laboratorij na sobnoj temperaturi u periodu <2 sata od uzimanja uzorka.

#### **3.1.3.2. Obrisak rodnice**

Uzorci obriska rodnice uzeti su prema sljedećem protokolu:

1. odstraniti veću količinu sekreta ako postoji i odbaciti ga,
2. drugim sterilnim vatenim štapićem skupiti uzorak sekreta mukozne membrane vagine rotirajući po sluznici,
3. staviti obrisak u transportni medij po Stuartu i transportirati u laboratorij na sobnoj temperaturi u periodu <2 sata od uzimanja uzorka.

### **3.1.4. Obrisci za pretragu na *Mycoplasma* i *Ureaplasma***

#### **3.1.4.1. Obrisak vrata maternice**

Uzorci obriska vrata maternice na *Mycoplasma* i *Ureaplasma* uzeti su prema sljedećem protokolu:

1. vizualizirati vrat maternice spekulom,
2. skupiti uzorak vatenim štapićem rotirajući štapićem po sluznici endocervikalnog kanala,
4. obrisak staviti u transportni medij za mikoplazme, odstraniti škarama vrh obriska tako da se može čvrsto zatvoriti poklopcem na navoj i transportirati u laboratorij na sobnoj temperaturi u periodu <2 sata od uzimanja uzorka.

### **3.1.5. Obrisci za pretragu na *Chlamydia trachomatis***

#### **3.1.5.1. Obrisak vrata maternice**

Uzorci obriska vrata maternice na *Chlamydia trachomatis* uzeti su prema sljedećem protokolu:

1. vizualizirati vrat maternice spekulom,
2. skupiti uzorak čvršćim potezima vatenog štapića unutar kanala (kako bi se dobile stanice epitela u kojima su mikroorganizmi),
3. staviti u transportni medij za klamidije, odrezati škarama vrh obriska tako da se može čvrsto zatvoriti čepom i transportirati u laboratorij na sobnoj temperaturi u periodu <2 sata od uzimanja uzorka.

### **3.1.6. Obrisci za pretragu na hrHPV**

#### **3.1.6.1. Obrisak vrata maternice**

Uzorci obriska vrata maternice na hrHPV uzeti su prema sljedećem protokolu:

1. vizualizirati vrat maternice spekulom,
2. skupiti uzorak četkicom rotirajući po sluznici endocervikalnog kanala,
3. uzorak sa četkice staviti u transportni medij za hrHPV i transportirati u laboratorij na sobnoj temperaturi u periodu < 2 sata od uzimanja uzorka.

### **3.1.7. Uzimanje uzoraka za Papa-test**

Uzorci za Papa-test uzeti su standardnom metodom. Nakon što se porcija vizualizira spekulom, vatenim se štapićem uzme obrisak endocervikalnog kanala vrata maternice te se materijal kružnim pokretima nanese na predmetno stakalce, zatim se jednim krajem spatule uzme obrisak s egzocerviksa. Materijal se nanese na predmetno stakalce do prethodnog obriska. Nakon toga uzme se obrisak drugim krajem spatule sa stražnjeg zida rodnice i nanese na predmetno stakalce do prethodnih obrisaka. Predmetno stakalce na jednom je kraju matirano te je na njemu označen broj uzorka. Nakon toga je predmetno stakalce stavljeno u 96 postotni alkohol na fiksaciju. Na taj način uzeti su uzorci od svih 200 ispitanica.



### **3.1.8. Uzimanje uzoraka iscjetka rodnice za GC-MS analizu**

Nakon što je rodnica dobro vizualizirana spekulomom uzet je iscjedak rodnice sterilnom žlicom te je materijal stavljen u sterilnu posudu. Posuda se čvrsto zatvori i stavi u ledenicu na -30°C.

### **3.1.9. Uzimanje uzoraka obriska rodnice za test genotoksičnosti**

Nakon što je rodnica dobro vizualizirana spekulom, spatulom je uzet obrisak s lateralnog zida rodnice te je materijal nanesen na predmetno stakalce koje je prethodno označeno na matiranom dijelu. Nakon sušenja na zraku stakalca su fiksirana "lakom za kosu".

## **3.2. Metode**

### **3.2.1. Mikrobiološka analiza uzoraka**

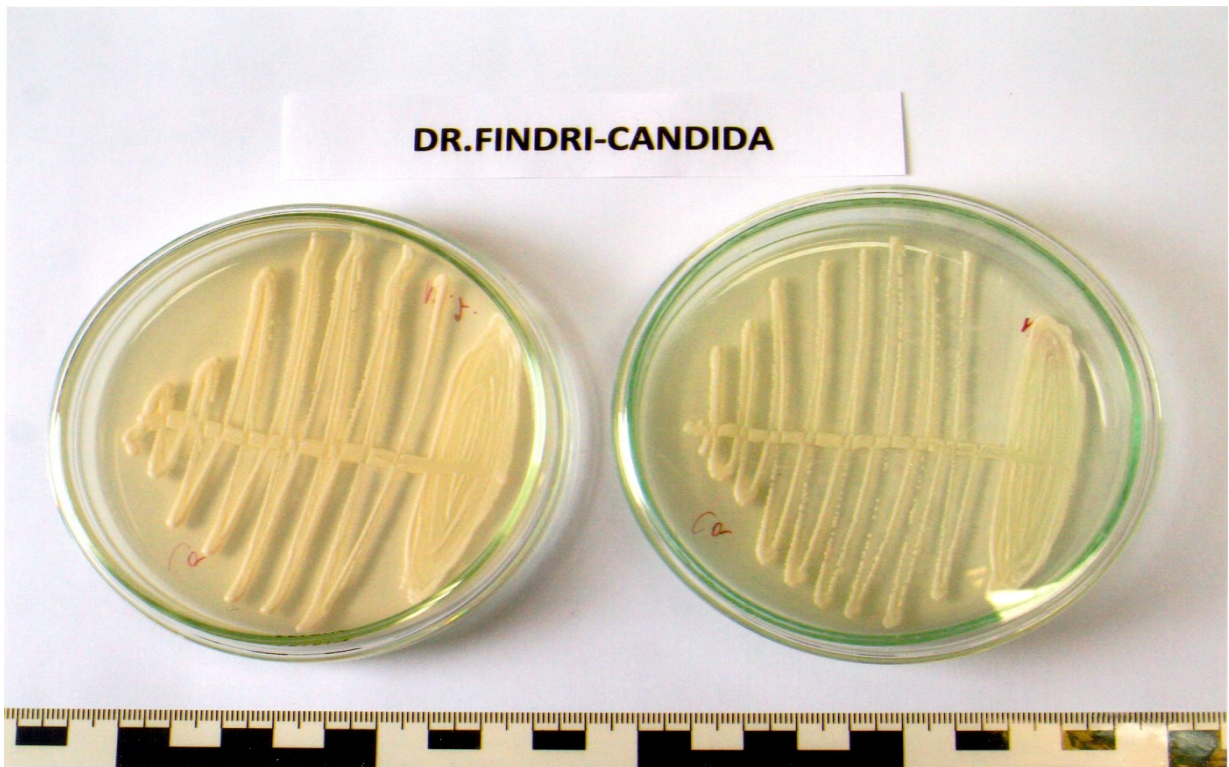
#### **3.2.1.1. Mikrobiološka analiza kvasaca**

Za mikološku obradu korištena su dva obriska. Jedan obrisak korišten je za izradu mikroskopskog preparata obojenog po Gramu kako bi se odredio broj polimorfonuklearnih leukocita i prisustvo višestaničnih kvašćevih oblika, a drugi obrisak, uronjen u Amiesov transportni medij, korišten je za kultivaciju.

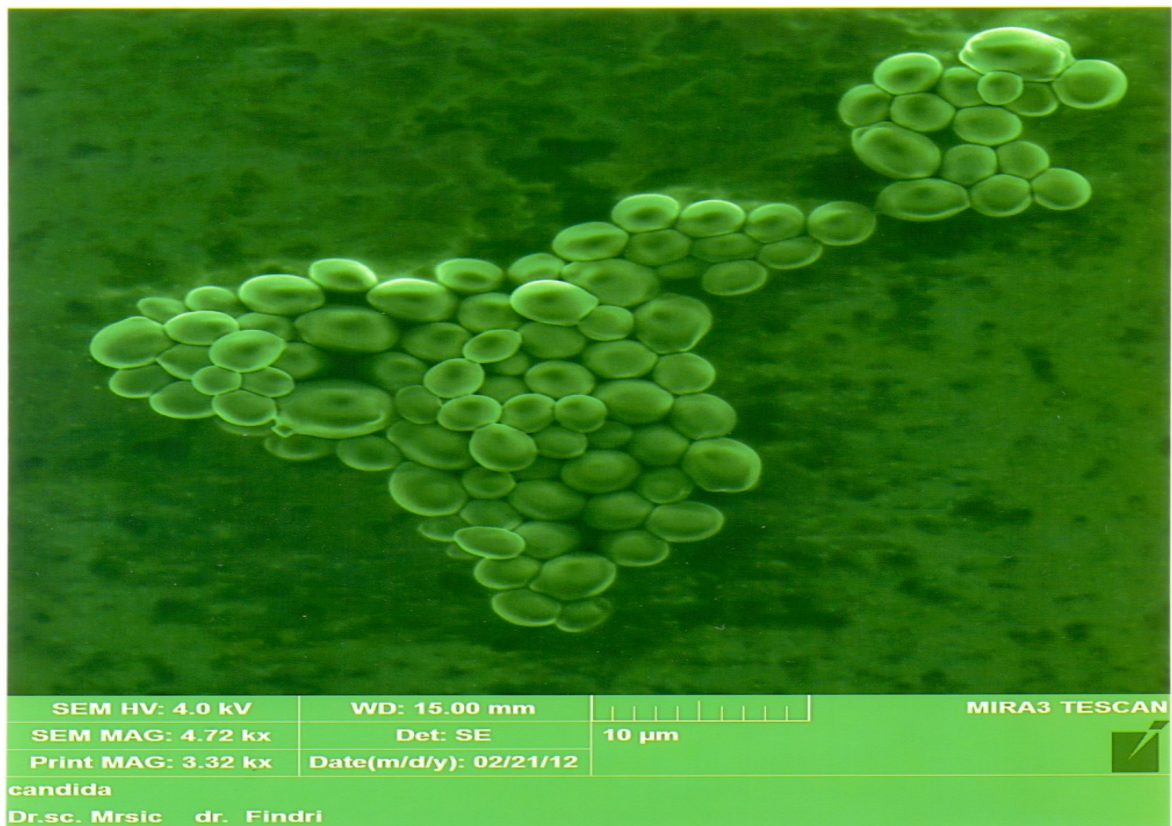
Za kultivaciju kvasca korišteni su Sabouradov glukozni agar i kromogeni Candida ID 2 agar (BioMereux, Francuska). Hranilišta su inkubirana na 35°C tijekom 48 sati.

Vrste roda *Candida* identificirane su testom germinacije, izgledom rasta na kromogenom i kukuruznom agaru te standardiziranim identifikacijskim testom (API-Candida, BioMerieux, Francuska). Identifikacija vrste *C.dubliniensis* izvršena je u Referentnom centru MZISS RH za mikološku dijagnostiku sustavnih i disemeniranih infekcija Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo.

Osjetljivost izolata kandida na pet sustavnih antifungika (5-flucitozin, amfotericin B, flukonazol, itrakonazol i vorikonazol) određena je mikrodilucijskom metodom standardiziranim testom (ATB FUNGUS 3, BioMerieux, Francuska).



Slika 2. Kultivacija na agaru (ljubaznošću prof. dr. sc. E. Mlinarić-Missoni)



Slika 3. Izgled preparata vrsta roda *Candida* nakon kultivacije (ljubaznošću g. Z. Ferenček)

### **3.2.1.2. Mikrobiološka analiza Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija**

Obrisci su kultivirani na podlogama s koaguliranom krvi (čokoladni agar) i podlogama s dodatkom ljudske krvi za identifikaciju *G. vaginalis*. Nakon 48 sati inkubacije u mikroaerofilnim uvjetima, pregledane su podloge s koaguliranom krvi (čokoladni agar) te je daljnja identifikacija provedena subkultivacijom na podlogama krvnog agara s konjskom krvi za Gram-pozitivne bakterije i selektivnoj podlozi MacConkey (Becton & Dickinson, Franklin Lakes, USA) za Gram-negativne bakterije. Identifikacija mikroorganizama izvršena je na temelju morfoloških i biokemijskih karakteristika bakterija, a potvrđena je komercijalnim testovima (API, BioMerieux, Francuska). Identifikacija *G. vaginalis* izvedena je temeljem mikroskopskog preprata, tipične morfologije i beta hemolize na podlogama s humanom krvi, negativnih reakcija katalaze i oksidaze i testom osjetljivosti na metronidazol (disk od 80 µg).

### **3.2.1.3. Mikrobiološka analiza *M. hominis* i *U. urealyticum***

Obrisci vrata maternice također su dostavljeni u laboratorij u transportnom mediju za genitalne mikoplazme te su nasađeni i kultivirani na krutim i tekućim podlogama za bakterije *M. hominis* i *U. urealyticum*. Kultivacija je izvršena u mikroaerofilnim uvjetima. Identifikacija je izvršena na temelju morfoloških i biokemijskih karakteristika bakterija, a potvrđena je komercijalnim testovima (*Mycoplasma* IST 2, BioMerieux, Francuska). Dijagnoza genitalnih mikoplazmi potvrđena je korištenjem semikvantitativnih testova za kultivaciju Mycofast i MacoIST (BioMerieux, Francuska), a molekularna detekcija je izvršena korištenjem lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu (real-PCR), Applied Biosystem.

#### **3.2.1.3.1. Kultivacija na agaru**

Uzorci, obrisci vrata maternice, nakon uzimanja stavljeni su u transportne bujone i dostavljeni u laboratorij. Dio uzorka koji nije odmah iskorišten za dijagnostiku, zamrznut je za daljnje testiranje (za PCR dijagnostiku).

Kultivacija ureaplazme izvedena je tako da su uzorci nasađeni i kultivirani na krute podloge s ekstraktom kvasca, konjskog seruma (HZJZ) i tekuće podloge (HZJZ) za bakterije *M. hominis* i *U. urealyticum*. Kruta podloga sadržavala je: 13 g Bacto-agara, 24 g tripton-soja bujona, 1,6 mL 2% vodene otopine fenolnog crvenila, 0,15 g CaCl<sub>2</sub>, 10 mL 10% vodene

otopine uree, 200 mL konjskog seruma, 10 mL autolizata svježeg kvasca, 2,4 mL 4% vodene otopine L-cistein hidroklorida i 5 mL 200 000 IU/mL penicilina (Crystacilline, Pliva, Zagreb).

Direktnim mikroskopiranjem kolonija na podlozi svjetlosnim mikroskopom ("Ernst Leitz Wetzler", Njemačka) s najmanjim povećanjem potvrđeno je da se radi o kolonijama *M. Hominis*, kolonije su bile poput "jaja na oko", dok su i nježne, smeđe kolonije ukazivale na prisutnost *U. urealyticum*. One podloge koje su promijenile boju u crveno nakon kultivacije, dodatno su potvrdile da se radi o porastu *U. urealyticum*.

### **3.2.1.3.2. Kultivacija u tekućoj podlozi**

Kultivacija krutih podloga (HZJZ) izvršena je u mikroaerofilnim uvjetima, a tekućih podloga u atmosferskim uvjetima u trajanju 48 sati. Za detekciju rasta u tekućem mediju (HZJZ) iskorištena je metabolička aktivnost ureaplazmi. Tekuće podloge na koje su nasijani uzorci bile su arginin i urea. Argininska podloga sadržava je: 9 g tripton-soja bujona, 4,2 g L-arginin monohidroklorida, 300 mL demineralizirane vode, 0,3 mL 2% vodene otopine fenolnog crvenila; 42,9 mL autolizata svježeg kvasca, 85,8 mL konjskog seruma i 2,1 mL 200 000 IU/ml penicilina (Crystacilline, Pliva, Zagreb). Tekuća podloga urea sadržaval je: 3 g tripton-soja bujona, 2 g natrijevog hidrokolorida, 0,08 g kalijevog dihidrogenfosfata, 400 mL demineralizirane vode, 0,4 mL 2% vodene otopine fenolnog crvenila, 2 mL 10% vodene otopine uree, 16 mL konjskog seruma i 2 ml 200 000 IU/mL penicilina (Crystacilline, Pliva, Zagreb).

Alikvoti iz tekućeg medija koji je promijenio boju subkultivirani su na agar. Identifikacija *U. urealyticum* i *M. hominis* na podlogama HZJZ izvršena je na temelju morfoloških i biokemijskih osobina bakterija. Kontrola rasta i identifikacija na subkultiviranim krutim podlogama provedena je gore opisanim postupkom.

### 3.2.1.3.3. Komercijalni test identifikacije i osjetljivosti

Test *Mycoplasma* (IST 2, BioMerieux, Francuska) poslužio je za dodatnu identifikaciju, određivanje koncentracije bakterija i ispitivanje osjetljivosti na antibiotike sojeva poraslih na agaru ili u bujonima. Nakon što je došlo do porasta kolonija bilo na krutoj ili na tekućoj podlozi, izveden je test dodatne identifikacije, određivanja broja bakterija i osjetljivosti na antibiotike *Mycoplasma* IST 2 testom (BioMerieux, Francuska). Inokulirani medij je otopljen, inkubiran je na 37°C 24 sata, snažno promiješan i 3 mL je dodano R2 mediju. R2 sadržavao je 1 mL urea/arginin liofiliziranog medija. Nakon dodavanja u R2, mješavina je sadržavala: mesni pepton (8 g/L), kazein peptone (8 g/L), kvašćev ekstrakt (4 g/L), natrijev klorid (3,5 g/L), arginin hidroklorid (5 g/L), cistein hidroklorid (0,1 g/L), polyVitex mješavinu (10 ml/L) i odgovarajuće antibiotike (10 ml/L). *Mycoplasma* IST 2 traka, koja se sastojala od 22 jažice, inokulirana je sa R2 rehidriranim medijem (50 µL po jažici) te je prekrivena mineralnim uljem.

Jažice test trake podijeljene su u tri dijela od kojih svaki dio ima posebnu funkciju. Jažice od jedan do tri identificirale su vrstu urogenitalne mikoplazme (*U. urealyticum*, *M. hominis*) promjenom boje (pozitivan rezultat: narančasto do crveno, negativan rezultat: žuto), dok su jažice četiri i pet omogućile određivanje broja poraslih kolonija. Ovaj dio odredio je da li je broj urogenitalnih mikoplazmi u uzorku jednak ili veći od graničnog broja 10 000 CFU (engl. *Colony Forming Units*) ili  $\geq 10^4$  (pozitivan rezultat: narančasto do crveno, negativan rezultat: žuto). Jažice od šest do 22 služile su za određivanje osjetljivosti na antibiotike. One su uključile devet različitih antibiotika: doksiciklin, josamicin, ofloksacin, eritromicin, tetraciklin, ciprofloksacin, azitromicin, klaritromicin i pristinamicin.

Za određivanje antibiotske osjetljivosti u testu rabila se metoda mikrodilucije u bujonu, koja je kombinirana s metodom graničnih koncentracija. Antibiotici su se nalazili u jažicama u dvije koncentracije, na njih se dodala ispitivana bakterija u tekućoj podlozi s indikatorom i nakon inkubacije od 24 do 48 sati prema promjeni boje odredio se rast odnosno osjetljivost na određeni antibiotik (pozitivan rezultat: narančasto do crveno, negativan rezultat: žuto).

Jažice od šest do 22 očitane su prateći promjene boje u jažicama. Ako su gornja i donja jažica bile žute – soj je proglašen osjetljivim (S, engl. *Sensitive*). Ako je gornja crvena, a donja žuta – soj je pokazao umjerenu osjetljivost ili umjerenu rezistenciju (I, engl. *Intermediate*). Ukoliko su obje jažice bile crvene – soj je proglašen otpornim ili rezistentnim (R, engl. *Resistent*) (Slika 4).



**Slika 4.** Kultivacija i test osjetljivosti proveden *Mycoplasma* IST 2 testom

Očitavanje jažica moralo je biti izvršeno nakon 24 sata samo za jažicu pod brojem četiri – *U. urealyticum* >10 000 CFU, a nakon 24 i 48 sati za sve ostale jažice. Rezultati su zabilježeni na formular dobijen s testom, a ako je kontrolna jažica bila negativna, ostale jažice nisu očitavane.

Preostali bujon i inokulirana trakica inkubirana je na 37°C i interpretirana je bilo koja promjena boje nakon 24 i 48 sati inkubacije. Izolati *Ureaplasma* spp. u preostalom R2 mediju zamrznuti su za -70°C za daljnje testiranje.

#### **3.2.1.4. Mikrobiološka analiza *C. trachomatis***

Identifikacija *C. trachomatis* izvršena je PCR molekularnom metodom na aparatu COBAS AMPLICOR (Roche, Basel, Švicarska).

#### **3.2.2. Molekularna detekcija humanog papiloma virusa iz obriska vrata maternice**

Test hc2 HPV-DNA, zasnovan na tehnologiji Hybrid Capture 2, test je hibridizacije i vezanja antitijela, a koristi se detekcijom produkta u makrotitarskoj ploči uz kemiluminescentno pojačavanje signala. Uzorci koji sadrže ciljnu DNA hibridiziraju se s probom koja sadrži koktel specifičnih HPV RNA. Nastali hibridi RNA-DNA vežu se na površinu mikrotitarske pločice obložene antitijelima koja su specifična za hibride RNA-DNA.

Vezani hibridi potom reagiraju s antitijelima koja su specifična za te hibride i obilježena alkalnom fosfatazom, a nastali se produkt dokazuje kemiluminiscentnim supstratom. Na svaku je molekulu antitijela vezano nekoliko molekula alkalne fosfataze. Na svaki se hibrid

veže više molekula konjugiranog antitijela, čime se postiže znatno pojačavanje signala. Alkalna fosfataza vezana na antitijela cijepa supstrat, pri čemu emitira svjetlo, mjeri luminimetrom i izražava u relativnim svjetlosnim jedinicama (relative light units, RLU). Jačina emitiranog svjetla upućuje na prisutnost ili odsutnost ciljne DNA u uzorku. Vrijednost RLU koja je iznad granične, označava prisutnost HPV DNA u uzorku. Vrijednost RLU koja je ispod granične znači da je koncentracija specifične HPV DNA ispod donje granice mjerljivosti testa.

### **3.2.3. Bojanje po Papanicolaou**

#### **3.2.3.1. Fiksiranje obriska**

Fiksiranje obriska izvršeno je 96 postotnim alkoholom u trajanju od 15 do 30 min.

#### **3.2.3.2. Bojenje obriska**

Bojenje obriska izvršeno je prema sljedećem protokolu:

1. 70% etilni alkohol - 10 uranjanja
2. 50% etilni alkohol - 10 uranjanja
3. destilirana voda - 10 uranjanja
4. Harris hematoxylin - 2 minute
5. tekuća voda (indirektan mlaz) - 3 minute
6. 0,5% HCL - 3 umakanja
7. tekuća voda – 2 do 3 minute
8. Lithium carbonata - 1 minuta (3 kapi saturirane otopine litijeva karbonata u 100 ml destilirane vode)
9. tekuća voda – 2 do 3 minute
10. 50% etilni alkohol - 10 uranjanja
11. 70% etilni alkohol - 10 uranjanja
12. 80% etilni alkohol - 10 uranjanja
13. 96% etilni alkohol - 10 uranjanja
14. ORANGE G – 2 do 3 minute
15. 96% etilni alkohol-3puta po 2 uranjanja
16. EA 50 - 2 minute

17. 96% etilni alkohol – 3 puta 2 do 5 uranjanja
18. apsolutni alkohol -2 puta 4 minute
19. Xylol – 2 puta 5 minuta

### **3.2.3.3. Pokrivanje (uklapanje) preparata**

Vlažni preparati uklapljeni su sa Canada balzomom i grijani na porculanskoj ploči na 50°C.

### **3.2.4. Priprema uzoraka i uvjeti metode vezanog sustava GC-MS za analizu iscjetka rodnice**

#### **3.2.4.1. Standardna otopina 2-feniletanola**

10 $\mu$ L 2-feniletanola (2-PE) dodano je u 50 $\mu$ L diklormetana (p.a.Merck, Darmstadt, Njemačka). Otopina je stavljena u ultrazvučnu kupelj (Branson 5210, Branson, Danbury, USA) na 2 minute, prebačena u analitičke bočice i analizirana vezanim sustavom GC-MS.

#### **3.2.4.2. "Stock" otopine 2-feniletanola**

10  $\mu$ L 2-PE dodano je u odmjernu tikvicu od 10 mL te je tikvica nadopunjena diklormetanom (p.a., Merck) do oznake. Otopine 2-PE korištene za kalibracijsku krivulju pripremljene su razrjeđivanjem "stock" otopine.

#### **3.2.4.3. Priprema uzorka iscjetka rodnice**

Nakon odmrzavanja, iscjetku rodnice dodan je 1mL deionizirane vode, stavljen je u ultrazvučnu kupelj (Branson 5210, Branson, Danbury, USA) na 3 minute i prebačen u epruvete koje su sadržavale po 0,9 g natrijevog volframata dihidrata (p.a., Merck, Darmstadt, Njemačka). Smjese su mućkane 1 minutu kako bi se otopio natrijev volframat dihidrat te im se zatim dodalo 2,5 mL mješavine diklormetana (p.a. Merck) i etil acetata (p.a. Merck) (3:1). Otopine su mućkane 10 minuta te centrifugirane (EBA, Hettich, Buckinghamshire, Engleska) 20 minuta pri 3000 okretaja u minuti. Organski slojevi prebačeni su u analitičke bočice i upareni do suha. U analitičke je bočice zatim dodano po 100  $\mu$ L diklormetana te su otopine analizirane vezanim sustavom GC-MS.



#### **3.2.4.4. Priprema uzorka kulture bakterija**

0,5 ml otopine kulture bakterija dodano je u 0,5 ml diklormetana (p.a., Merck). Otopina je stavljena u ultrazvučnu kupelj (Branson 5210, Bransonic) na 2 minute, prebačena u analitičke bočice i analizirana vezanim sustavom GC-MS.

#### **3.2.5. Priprema uzoraka i uvjeti metode vezanog sustava GC-MS za analizu vrsta roda *Candida* dobivenih biosintezom u uvjetima *in vitro***

##### **3.2.5.1. Uzgoj vrsta roda *Candida***

Sojevi vrsta roda *Candida* uzgojeni su na krumpir-dekstroza agaru (Fluka, Njemačka), 24 sata na 37°C. Nakon porasta soja pripremljen je inokulum uzimanjem uzoraka od po 10 kolonija ezama (žičanim mikrobiološkim petljama). Ti su uzorci potom premješteni u 5 ml sterilne fiziološke otopine. Inokulum je protresen u vortex mješalici te je 1 mL prenešen u plastične Roux-ove bočice (250 mL) sa 100 mL sterilnog Eagleovog minimalnog esencijalnog medija (MEM; Sigma, Njemačka) s 5% (V/V) fetalnog telećeg seruma (Sigma, Njemačka). Tako pripremljen medij sa sojem kvasca inkubiran je šest dana na 37°C.

##### **3.2.5.2. Standardna otopina 2-feniletanola**

10 $\mu$ L 2-feniletanola (2-PE) dodano je u 50 $\mu$ L diklormetana (p.a., Merck). Otopina je stavljena u ultrazvučnu kupelj (Branson 5210, Bransonic) na 2 minute, prebačena u analitičke bočice i analizirana vezanim sustavom GC-MS.

##### **3.2.5.3. "Stock" otopine 2-feniletanola**

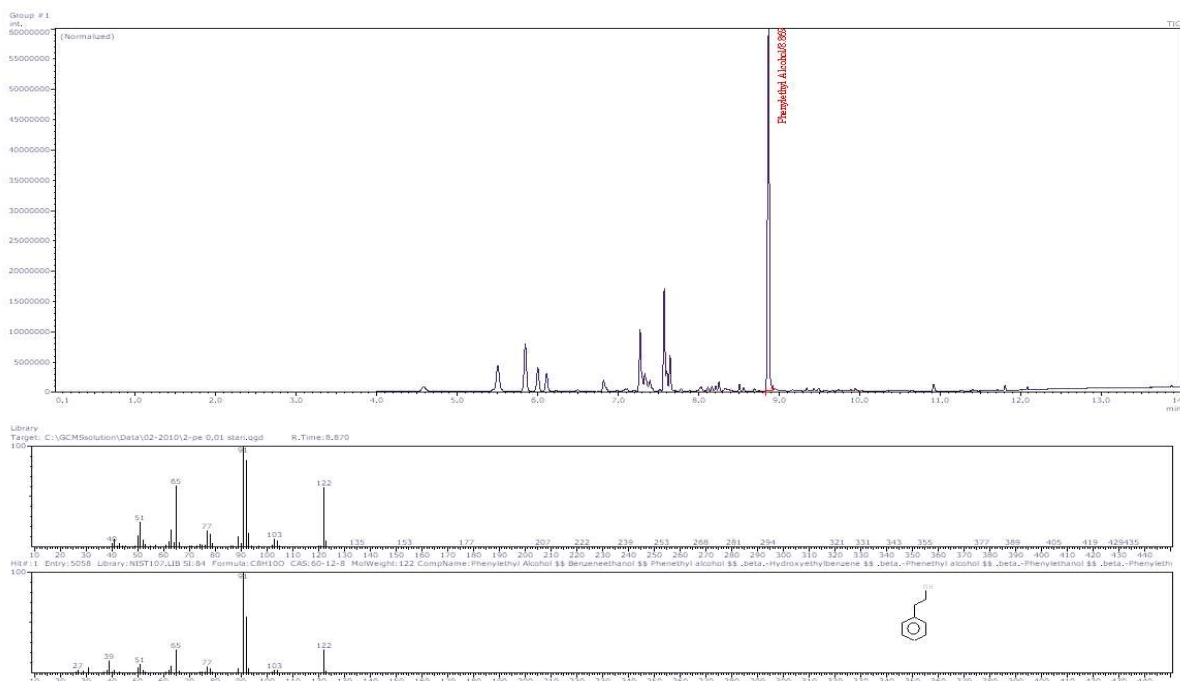
10  $\mu$ L 2-PE dodano je u odmjernu tikvicu od 10 mL te je tikvica nadopunjena diklormetanom (p.a., Merck) do oznake. Otopine 2-PE korištene za kalibracijsku krivulju pripremljene su razrjeđivanjem "stock" otopine.

#### **3.2.5.4. Sojevi vrsta roda *Candida* dobiveni biosintezom u uvjetima *in vitro***

Ranije pripremljenom inokulumu dodan je 1mL deionizirane vode, stavljen je u ultrazvučnu kupelj (Branson 5210, Bransonic) na 3 minute i prebačen u epruvete koje su sadržavale po 0,9 g natrijevog volframata dihidrata (p.a., Merck). Smjese su mućkane 1 minutu kako bi se otopio natrijev volframat dihidrat te im se zatim dodalo 2,5 mL mješavine diklormetana (p.a. Merck) i etil acetata (p.a. Merck) (3:1). Otopine su mućkane 10 minuta te centrifugirane (EBA, Hettich) 20 minuta pri 3000 okretaja u minuti. Organski slojevi prebačeni su u analitičke bočice i upareni do suha. U analitičke bočice zatim je dodano po 100  $\mu$ L diklormetana te su otopine analizirane vezanim sustavom GC-MS.

#### **3.2.6. Vezani sustav GC-MS i uvjeti analize**

Vezani sustav GC-MS sastojao se od Shimadzu QP2010 Plus GC-MS, kolone (Agilent 19091S-433, 350°C Max, HP 5 MS, 0.25 mm\*30 m\*0,25  $\mu$ m), helija kao plina nosioca (Helium 5,0,>99 990 Vol % Messer, Austrija), računala i pisača. Početna temperatura na koloni bila je 45°C (5 min), a završna 300°C (10 min). Brzina zagrijavanja kolone bila je 35 °C/min, temperatura injektora bila je 275°C, a injektiranje je provedeno bez odvajanja otapala. Vrijeme uzorkovanja bilo je 0,50 min, a protok 0,94 mL/min. Analiza je trajala 22,29 minuta. Zaostajanje otapala bilo je 3,70 minuta, a temperatura na spoju između GC-a i MS-a bila je 285°C. Snimala se ukupna ionska struja u rasponu analiziranih masa od 40,00 do 450,00 m/z. Temperatura ionskog izvora bila je 200°C, a temperatura MS kvadrupola bila 150°C. Korištene su sljedeće baze podataka MS spektra: Wiley275, NIST02 i PMW TOX3.

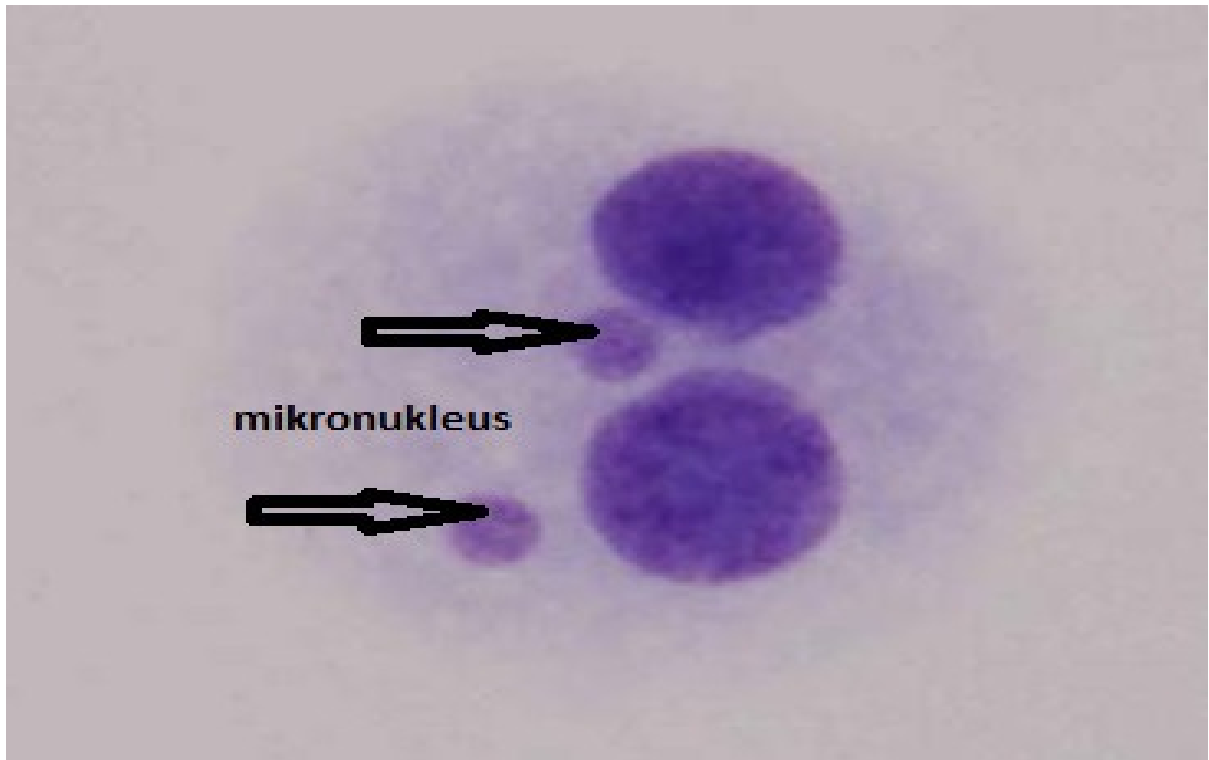


Slika 5. Kromatogram 2-feniletanola

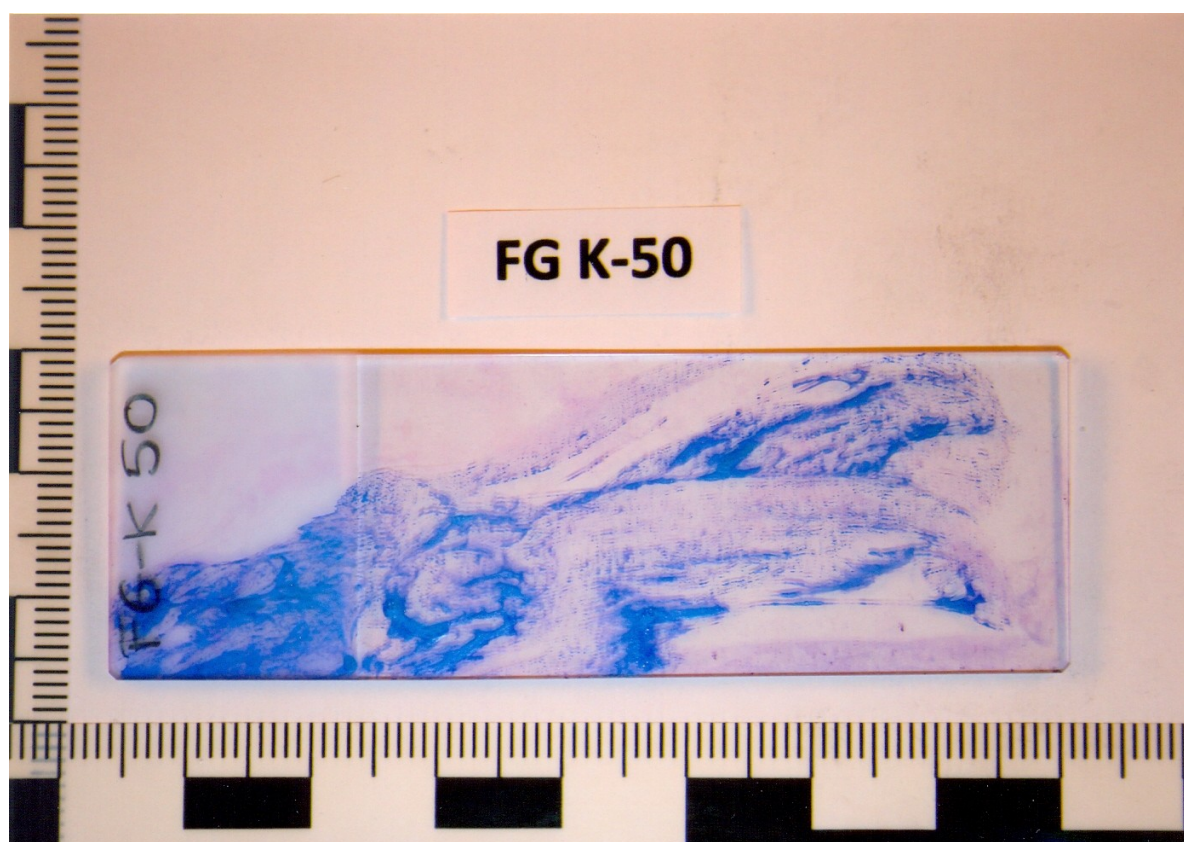
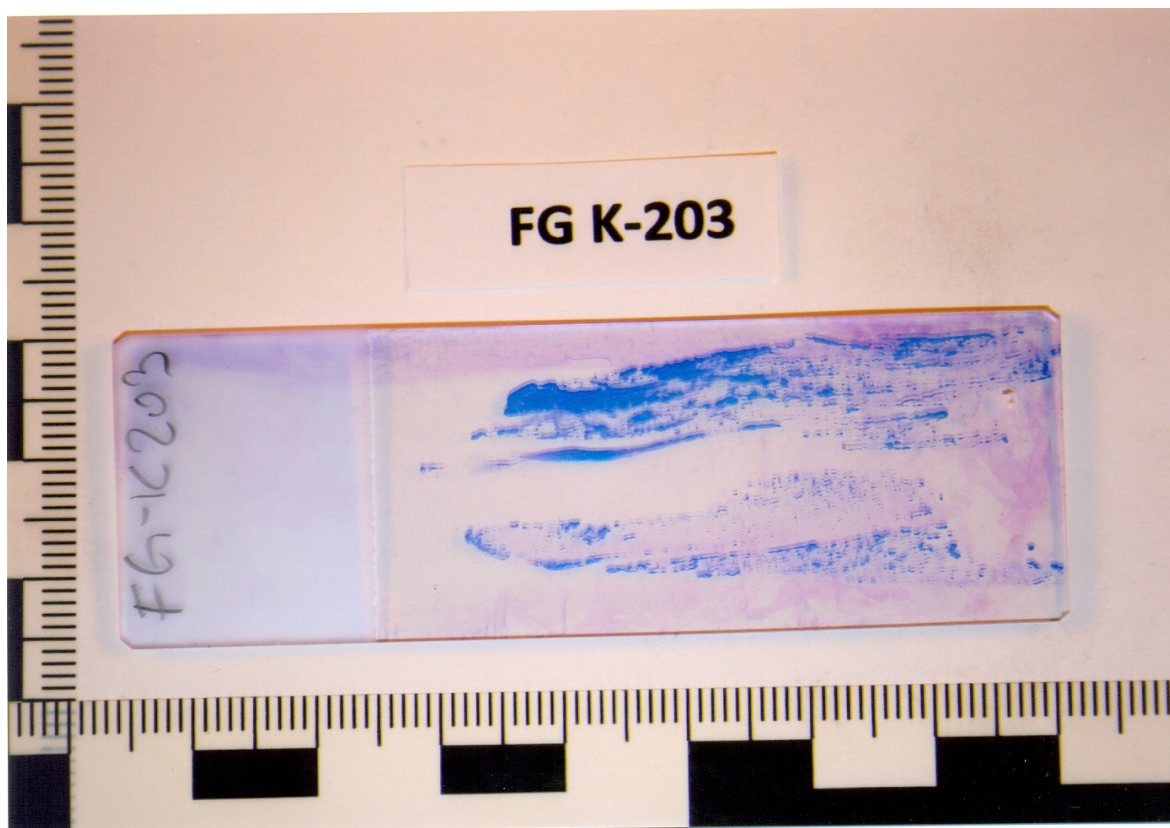
### 3.2.7. Mikronukleus tehnika

Brojenje mikronukleusa provodi se u stanicama koje su prošle kroz drugu mitozu nakon izlaganja ispitivanom ksenobiotiku. Klasični protokol mikronukleus testa uključuje 72-satno kultiviranje *in vitro*, a u 44. satu kultivacije dodaje se citohalazin B koji sprečava diobu citoplazme i omogućuje jednostavno brojanje mikronukleusa unutar binuklearnih stanica. Danas su u uporabi i razne modifikacije osnovnog protokola mikronukleus testa kao imunofluorescencijske tehnike s antikinetohornim protutijelima i fluorescencijska *in situ* hibridizacija (FISH).

U ovom istraživanju primijenjen je modificirani protokol. Nakon dopremanja materijala u laboratorij s površine predmetnog stakalca skinut je sloj "laka za kosu", koji je poslužio za fiksaciju te je preparat obojen 10 postotnom vodenom otopinom citološke boje Giemsa (Sigma). Preparati su analizirani pod svjetlosnim mikroskopom (povećanje 1000 puta). U svakom uzorku pregledano je po 1000 stanica u kojima je utvrđen ukupni broj mikronukleusa, a usporedno su izbrojene stanice s mikronukleusima i njihova raspodjela. Mikronukleusi su determinirani u skladu s propisanim kriterijima HUMN-a pri čemu je njihova veličina smjela iznositi između 1/16 do 1/3 promjera glavnih jezgri.



**Slika 6.** Binuklearna stanica sa 2 mikronukleusa (Fatić, 2008.)



Slika 7. Preparati za mikronukleus (ljubaznošću g. Z. Ferenček)

### 3.2.8. Statistička analiza

Za statističku obradu rezultata koristit će se statistički paketi: Statistica® inačice 6.0 i MedCalc®. U svrhu utvrđivanja mogućeg uzroka bakterijskih i gljivičnih infekcija rezultati Papa- testa i obrisaka vrata maternice i rodnice stavit će se u korelaciju s dvije skupine prediktorskih varijabli: (1) varijable iz upitnika (životne navike i zdravstveno stanje); (2) niskomolekularni metaboliti nastali u uvjetima *in vivo* i *in vitro*. U tu svrhu koristit će se: višestruka regresijska analiza, napredni regresijski modeli i kanonička korelacijska analiza. Primjenom metoda multivarijantne analize utvrdit će se najznačajniji čimbenici povezani sa životnim stilom i općim zdravstvenim stanjem s jedne strane te tvorbom niskomolekularnih metabolita s druge strane, koji uvjetuju bakterijske, gljivične i virusne infekcije donjeg genitalnog trakta žena. Koristit će se razina značajnosti  $p=0,05$  u svim statističkim testovima.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Opis ispitivane populacije

U ovo istraživanje uključene su 203 ispitanice kojima su obrisci vrata maternice i rodnice obrađeni metodama kultivacije na kandidu, aerobe, mikoplazmu i ureaplazmu. Za detekciju klamidije i hrHPV-a korištene su molekularne metode.

Svim ispitanicama napravljen je Papa-test.

Prikupljeni su podaci o dobi, zanimanju, profesionalnoj izloženosti (toksični agensi), bračnom statusu, broju partnera u zadnjih godinu dana, broju poroda, vrsti poroda, spontanim pobačajima, induciranim pobačajima, korištenju kontracepcije, podatak o prehrani (brza hrana, kuhana, pečena), konzumaciji slatkiša, uzimanju vitamina, antioksidanata (karatenoidi, vitamin C), minerala, biljnih pripravaka, pušenju, konzumaciji alkohola i kave, uzimanju narkotika, hobiju koji uključuje izloženost kemijskim agensima, bavljenju sportom, izlaganju teškom fizičkom radu, preboljelim akutnim bolestima, kroničnim bolestima, tumorskim bolestima, preboljenom herpesu zosteru, virusnom hepatitisu B ili C, HPV, izloženosti dijagnostici (rtg, CT, UZV) u proteklih godinu dana, uzimanju oralne hormonske kontracepcije, uzimanju hormonskog nadomjesnog liječenja (HNL), uzimanje antibiotika i antimikotika (lokalno i/ili sustavno) te ostalih lijekova.

Od 203 ispitanice 116 ispitanica navele su da imaju simptome vaginoze.

Tablica 1. Frekvencija (N) i postotak prediktorskih varijabli profesionalna izloženost, bračni status, broj partnera, broj poroda, vrsta poroda, spontani pobačaj, inducirani pobačaj

Varijabla	Skupina	N	Postotak
profesionalna izloženost	NE	174	85,71
	DA	18	8,87
	nema podataka	11	5,42
bračni status	udata	101	49,75
	neudata	93	45,81
	nema podataka	9	4,43
broj partnera	0	15	7,39
	1	152	74,88
	2	16	7,88
	3	7	3,45
	4	1	0,49
	5	3	1,48
	nema podataka	9	4,43
broj poroda	0	93	45,81
	1	33	16,26
	2	54	26,60
	3	11	5,42
	4	1	0,49
	5	2	0,99
	nema podataka	9	4,43
vrsta poroda	normalan porod	178	87,68
	carski rez	16	7,88
	nema podataka	9	4,43
spontani pobačaj	0	174	85,71
	1	11	5,42
	2	6	2,96
	4	1	0,49
	5	1	0,49
	nema podataka	10	4,93
inducirani pobačaj	0	176	86,70
	1	16	7,88
	2	2	0,99
	nema podataka	9	4,43

Frekvencija i postotak varijabli profesionalna izloženost, bračni status, broj partnera, broj poroda, vrsta poroda, spontani pobačaj i inducirani pobačaj prikazani su u Tablici 1.

Od uključene populacije 174 (85,71%) žene nisu u toku svog radnog vijeka bile profesionalno izložene nekom od toksičnih agenasa.

Što se tiče bračnog statusa 101 (49,75%) je u trenutku testiranja bila udata. Broj partnera kretao se od 0 do 5 pri čemu prevladava 1 partner (74,88% populacije), a zatim 2 partnera (7,88%) populacije.

Broj poroda također se kretao od 0 do 5. Prevladavaju žene koje nisu rađale (45,81% populacije). Od žena koje su rađale najviše ih je s dva poroda (26,60% populacije) nakon čega slijede žene s jednim porodom (16,26% populacije). Većina žena imala je normalan porod (87,68% populacije).



85,71% populacije nije imalo ni jedan spontani pobačaj dok je ostatak populacije imao od 1 do 5 pobačaja s najvećom učestalosti 1 pobačaja (5,42%). Inducirani pobačaj nije imalo 86,70% populacije dok je 7,88% žena imalo 1 pobačaj, a 0,99% 2 pobačaja.

Tablica 2. Frekvencija (N) i postotak prediktorskih varijabli: korištenje kontracepcije, tip prehrane, uzimanje vitamina, uzimanje antioksidansa, uzimanje minerala, uzimanje biljnih pripravaka, pušenje, konzumiranje alkohola, konzumiranje kave, korištenje narkotika, izloženost kemijskim agensima

Varijabla	Grupa	N	Postotak
kontracepcija	DA	56	27,59
	NE	138	67,98
	nema podataka	9	4,43
prehrana	pečena hrana	29	14,29
	kuhana hrana	108	53,20
	kuhana i pečena	57	28,08
	nema podataka	9	4,43
vitamini	NE	154	75,86
	DA	37	18,22
	nema podataka	12	5,91
antioksidansi	NE	177	87,19
	DA	15	7,39
	nema podataka	11	5,42
minerali	NE	175	86,21
	DA	17	8,37
	nema podataka	11	5,42
biljni pripravci	NE	171	84,24
	DA	15	7,39
	nema podataka	17	8,37
pušenje	NE	130	64,04
	DA	56	27,57
	nema podataka	17	8,37
alkohol	DA	65	32,02
	NE	129	63,55
	nema podataka	9	4,43
kava	DA	164	80,79
	NE	30	14,78
	nema podataka	9	4,43
narkotici	NE	185	91,13
	DA	8	3,94
	nema podataka	10	4,93
kemijski agensi	NE	193	95,07
	DA	1	0,49
	nema podataka	9	4,43

Frekvencija i postotak prediktorskih varijabli: korištenje kontracepcije, tip prehrane, uzimanje vitamina, uzimanje antioksidansa, uzimanje minerala, uzimanje biljnih pripravaka, pušenje, konzumiranje alkohola, konzumiranje kave, korištenje narkotika, izloženost kemijskim agensima su prikazani u Tablici 2.

Od testirane populacije 27,59% žena koristilo je neki oblik kontracepcije.

Što se tiče prehrane prevladava kuhana hrana (53,20% populacije) te kombinacija kuhane i pečene hrane (28,08% populacije).

Vitamine je uzimalo 18,22% populacije, antioksidante 7,39% populacije, minerale 8,37% populacije, biljne pripravke 7,39% populacije.

U trenutku ispunjavanja upitnika 27,57% žena je pušilo, 32,02% je konzumiralo neki oblik alkohola dok je 80,79% populacije konzumiralo kavu.

Narkotike je koristilo 3,94% populacije dok je kemijskim agensima bila izložena samo jedna žena (0,49% populacije).

Tablica 3. Frekvencija (N) i postotak prediktorskih varijabli: bavljenje sportom, izloženost teškim fizičkim naporima, virusne bolesti, kronične bolesti, tumorske bolesti, hepatitis, HPV, medicinska izloženost rtg-u, medicinska izloženost CT-u, medicinska izloženost UZV-u, HNL, uzimanje antibiotika - lokalno, uzimanje antibiotika - oralno, uzimanje antimikotika - lokalno, uzimanje antimikotika - oralno, uzimanje ostalih lijekova, prisutnost simptoma

Varijabla	Grupa	N	Postotak
sport	NE	135	66,50
	DA	59	29,06
	nema podataka	9	4,43
teški fizički napori	NE	180	88,67
	DA	14	6,89
	nema podataka	9	4,43
virusne bolesti	NE	133	65,52
	DA	49	24,14
	nema podataka	21	10,34
kronične bolesti	NE	145	71,43
	DA	49	24,14
	nema podataka	9	4,43
tumorske bolesti	NE	185	91,13
	DA	9	4,43
	nema podataka	9	4,43
hepatitis	NE	192	94,58
	DA	2	0,99
	nema podataka	9	4,43
hrHPV	NE	167	82,27
	DA	27	13,30
	nema podataka	9	4,43
RTG	NE	163	80,30
	DA	31	15,27
	nema podataka	9	4,43
CT	NE	187	92,12
	DA	7	3,45
	nema podataka	9	4,43
UZV	NE	132	65,02
	DA	62	30,54
	nema podataka	9	4,43
HNL	NE	187	92,12
	DA	7	3,45
	nema podataka	9	4,43
antibiotici-lokalno	NE	179	88,18
	DA	15	7,39
	nema podataka	9	4,43
antibiotici-oralno	NE	83	40,89
	DA	111	54,68
	nema podataka	9	4,43
antimikotici-lokalno	NE	156	76,85
	DA	38	18,72
	nema podataka	9	4,43
antimikotici-oralno	NE	190	93,60
	DA	4	1,97
	nema podataka	9	4,43
ostali lijekovi	NE	134	66,01
	DA	60	29,56
	nema podataka	9	4,43
simptomi	NE	87	42,86
	DA	116	57,14

Frekvencija i postotak prediktorskih varijabli: bavljenje sportom, izloženost teškim fizičkim naporima, virusne bolesti, kronične bolesti, tumorske bolesti, hepatitis, HPV, medicinska izloženost rtg-u, medicinska izloženost CT-zračenju, medicinska izloženost UZV-zračenju, HNL, uzimanje antibiotika - lokalno, uzimanje antibiotika - oralno, uzimanje antimikotika - lokalno, uzimanje antimikotika-oralno, uzimanje ostalih lijekova, prisutnost simptoma su prikazani u Tablici 3.

Od testirane populacije 29,06% žena se u trenutku popunjavanja upitnika bavilo sportom. Teškim fizičkim naporima je bilo izloženo 6,89% žena. Neku od virusnih bolesti imalo je 24,14% populacije dok je isto toliko populacije imalo neku od kroničnih bolesti.

Tumorske bolesti bile su prisutne u 4,43% populacije, hepatitis u 0,99% populacije, a HPV u 13,30% populacije.

Medicinska izloženost X-zračenju bila je prisutna u 15,27% populacije, CT-zračenju u 3,45% slučajeva, UZV-zračenju u 30,54% slučajeva, HNL u 3,45% populacije.

Lokalne antibiotike je uzimalo 7,39% populacije, a oralne 54,68% populacije. Lokalne antimikotike je koristilo 18,72% populacije, a oralne 1,97% populacije. Simptomi poput bijelog sirastog iscjetka, svrbeži i inkontinencije bili su prisutni kod 116 (57,14%) ispitanica.

Tablica 4. Učestalost (N) i postotak svakog pojedinog parametra dobivenog Papa-testom, analizom obrisaka vrata maternice i rodnice i rezultati GC-MS analize za ispitanu populaciju

Tip testa		Dobiveni parametar	N	%	
Papa-test		ASCUS	32	15,76	
		ASCUS/CIN I	3	1,48	
		CIN I	55	27,09	
		CIN II	4	1,97	
		HPV	40	19,70	
		<i>Gardnerella vaginalis</i>	16	7,88	
		<i>Chlamydia trachomatis</i>	4	1,97	
		upala	19	9,36	
		<i>Bacilus vaginalis</i>	8	3,94	
		Metaplazija	7	3,45	
		<i>Actinomyces</i>	1	0,50	
		Gljive	14	6,90	
Obrisci vrata maternice i rodnice	Aerobne bakterije	Nisu izolirane	61	30,05	
		fiziološka flora	85	41,87	
		SHGB	22	10,84	
		<i>Escherichia coli</i>	12	5,91	
		<i>Enterococcus sp.</i>	12	5,91	
		<i>Enterococcus faecium</i>	5	2,46	
		<i>Haemophilus influenzae</i>	2	0,99	
		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3	1,48	
		<i>Streptococcus constellatus</i>	1	0,49	
	Gljive	<i>Candida albicans</i>	28	13,80	
		<i>Candida glabrata</i>	5	2,46	
		<i>Candida lusitaniae</i>	1	0,49	
		<i>Candida kefyr</i>	1	0,49	
		<i>Candida parapsilosis</i>	1	0,49	
		Nisu izolirane	167	82,27	
	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	Nije izolirana	142	69,95	
		1.00E+03	36	17,73	
		1.00E+04	18	8,87	
		1.00E+05	7	3,45	
	<i>Mycoplasma</i>	nije izolirana	201	99,01	
		1.00E+03	2	0,99	
	<i>Chlamydia trachomatis</i>	NE	199	98,03	
		DA	4	1,97	
	hrHPV	NE	152	74,88	
		DA	51	25,12	
	GC-MS	Metaboliti	NE	61	81,3
			DA	10	13,3
tragovi			4	5,3	

Tablica 4. prikazuje učestalost i postotak svakog parametra utvrđenog uz pomoć Papa-testa, obrisaka vrata maternice i rodnice, prisustva/odsustva metabolita utvrđenih GC-MS analizom.

Rezultati Papa-testa otkrili su prevalenciju lezija niskog stupnja u ispitivanoj populaciji. Od uključene populacije 32 (15,76%) žena je imalo ASCUS, 3 (1,48) žene su imale ASCUS/CIN I, 55 (27,09%) žena je imalo CIN I, a 4 (1,97%) žene imale su CIN II u PAPA-testu. ASCUS, ASCUS/CIN I, CIN I i CIN II imali su udio od 46.3% u ukupnim rezultatima, dok je HPV pronađen kod 40 ispitanica (19,70%), a gljive u 14 (6,90%) ispitanica.

Rezultati obrisaka vrata maternice i rodnice otkrili su da aerobne bakterije nisu izolirane u 61 (30,05%) ispitivane populacije, dok je u 85 (41,87%) populacije pronađena fiziološka flora. Streptokok grupe B je izoliran u 22 (10,84%) ispitanice, nakon čega su slijedile *Escherichia coli* u 12 (5,91 %) ispitanica i *Enterococcus sp.* u 12 (5,91%) ispitanica.

Gljive su izolirane u 36 (17,73%) ispitanica i to s prevalencijom *Candida albicans* u 28 (13,80%) žena, nakon koje je slijedila *Candida glabrata* u 5 (2,46%) žena.

*Ureaplasma urealyticum* izolirana je u 61 (30,05%) žene, a *Mycoplasma spp.* je izolirana kod 2 (0,99%) žene.

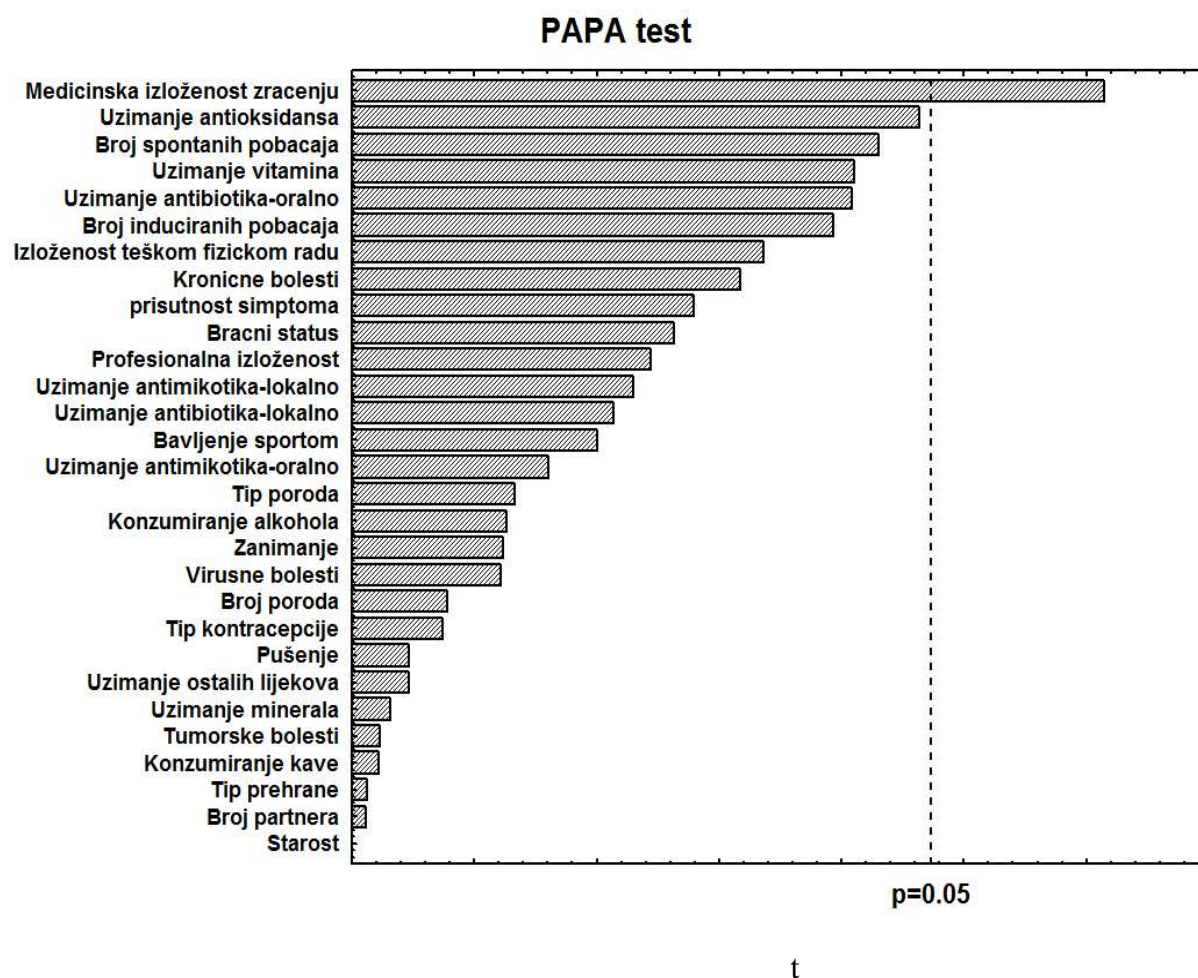
*Chlamydia trachomatis* izolirana je kod 4 (1,97%) ispitanice.

Kod 51 (25,12%) ispitanica je pronađen hrHPV.

Metabolit 2-feniletanol utvrđen je u 14 (18,65) od 74 ispitana uzorka. U 4 (5,3%) od 14 uzoraka metabolit je pronađen samo u tragovima.

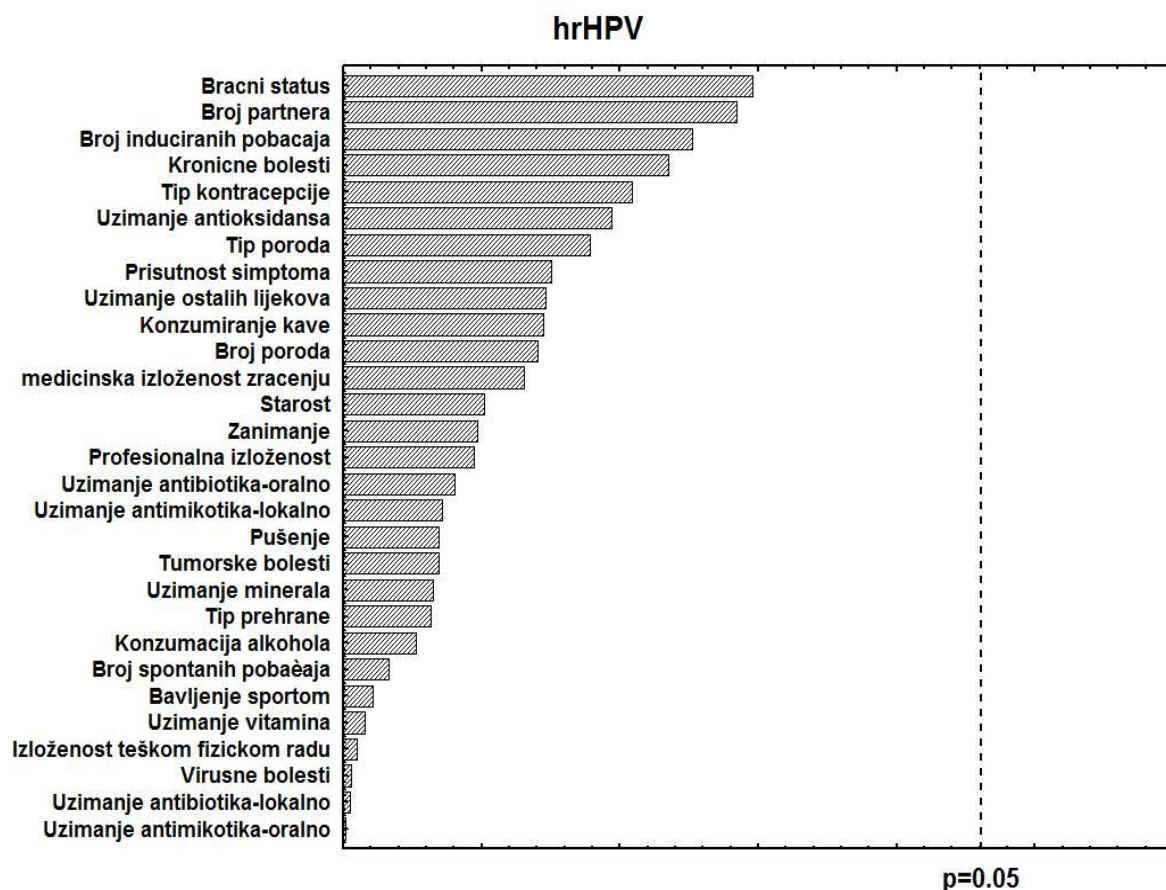
#### 4.2. Utjecaj stila života i zdravstvenog stanja na rezultate analize obrisaka vrata maternice i rodnice na gljive, aerobne bakterije, Ureaplazmu, hrHPV i Papa-test

Utjecaj prediktorskih varijabli (stila života i zdravstvenog stanja) na zavisne varijable (rezultate Papa-testa, prisustvo aerobnih bakterija, gljive, ureaplazmu, mikoplazmu i hrHPV) određen je naprednim regresijskim modelom, a rezultati za svaku zavisnu varijablu prezentirani su u obliku pareto grafikona (Slike 8a-e).



**Slika 8a.** Pareto grafikon s prikazom utjecaja različitih prediktorskih varijabli na rezultate PAPA-testa

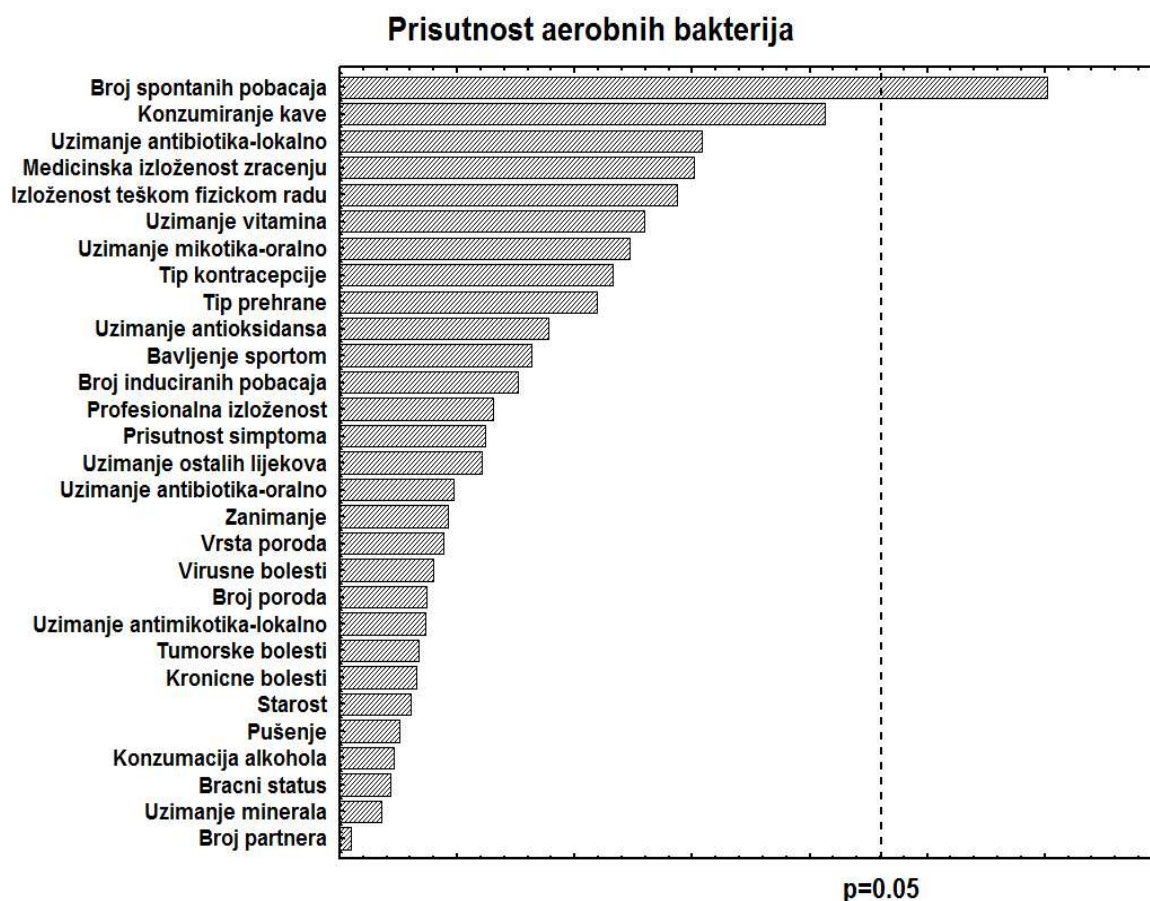
Izloženost medicinskom ozračenju i broj spontanij pobačaja u pozitivnoj su korelaciji s razvojem lezija utvrđenih Papa-testom, dok je uzimanje antioksidansa u negativnoj korelaciji. Statistički je značajan utjecaj na rezultate Papa-testa imala samo prvospomenuta varijabla (Slika 8a).



**Slika 8b.** Pareto grafikon s prikazom utjecaja različitih prediktorskih varijabli na incidenciju hrHPV.

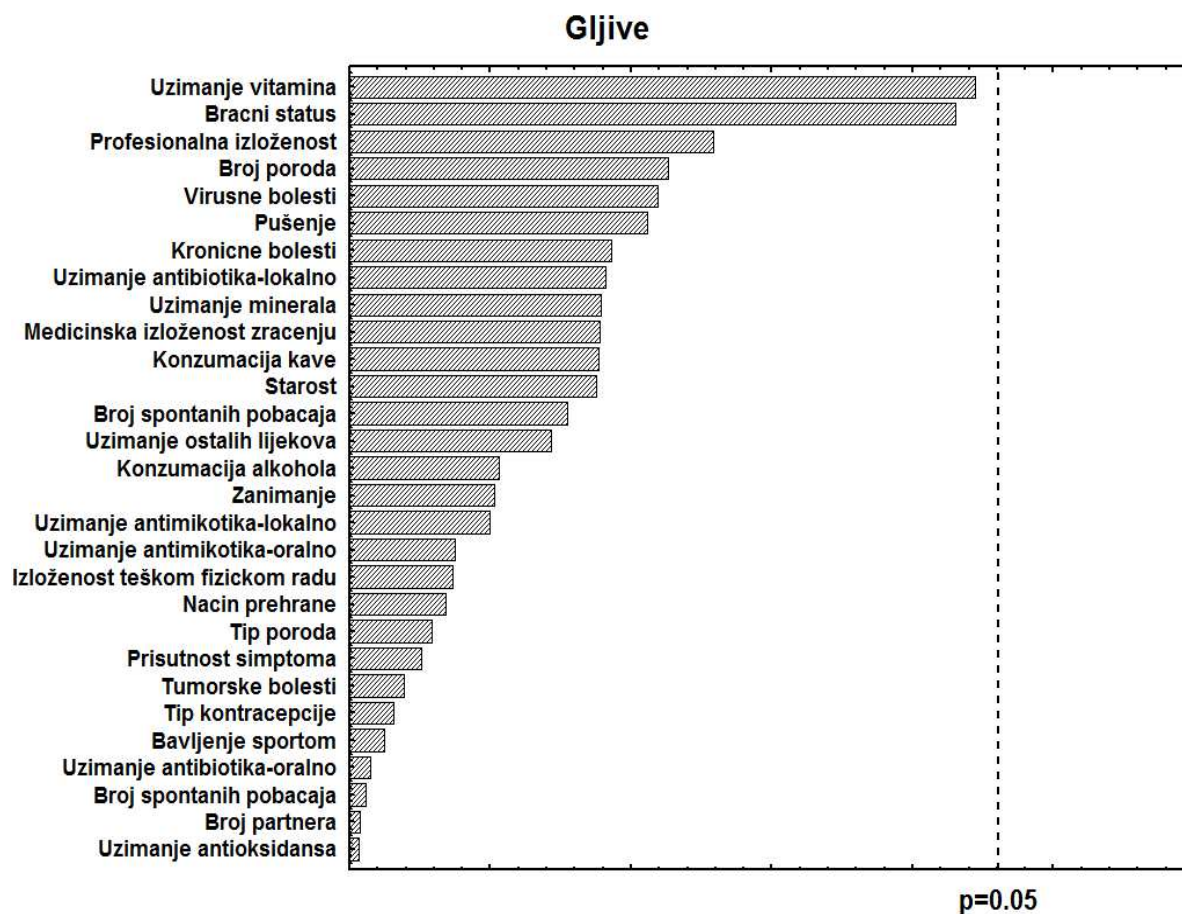
Bračno stanje, broj partnera i broj induciranih pobačaja imali su najvišu pozitivnu korelaciju s prisustvom hrHPV, no ni jedna od ispitivanih prediktorskih varijabli nije bila statistički značajna (Slika 8b).





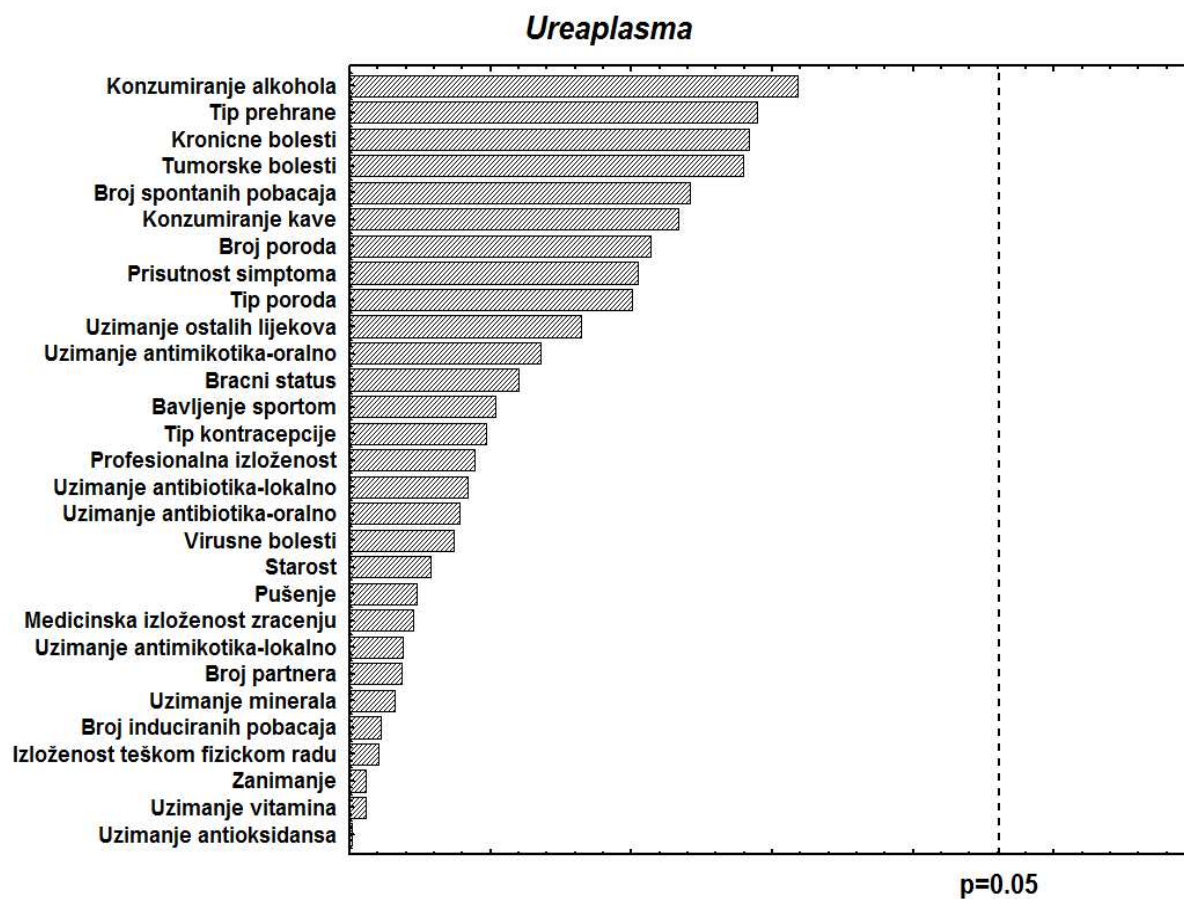
**Slika 8c.** Pareto grafikon s prikazom utjecaja različitih prediktorskih varijabli na prisustvo aerobnih bakterija u obriscima vrata maternice

Broj spontanih pobačaja bio je u značajnoj korelaciji s prisustvom aerobnih bakterija (Slika 8c).



**Slika 8d.** Pareto grafikon s prikazom utjecaja različitih prediktorskih varijabli na prisustvo gljiva u obriscima vrata maternice i rodnice

Niti jedna od ispitivanih varijabli nije imala statistički značajan utjecaj na prisustvo gljiva (Slika 8d).



**Slika 8e.** Pareto grafikon s prikazom utjecaja različitih prediktorskih varijabli na prisustvo ureaplazme u obriscima vrata maternice

Niti jedna od ispitivanih varijabli nije imala statistički značajan utjecaj na prisustvo ureaplazme (Slika 8e).

### 4.3 Određivanje 2-feniletanola *in vivo*

Usporedba rezultata kvalitativne analize metabolita 2-feniletanola *in vivo* sa simptomima te rezultati Papa-testa i obrisaka vrata maternice i rodnice za iste pacijentice prezentirana je u Tablici 5.

Tablica 5. Rezultati kvalitativne analize metabolita 2-feniletanola (2-PE) *in vivo* u usporedbi s odabranim prediktorskim varijablama.

Metabolit	Simptomi/ znakovi	Papa-test	Aerobne bakterije	Gljive	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	hrHPV
2-PE	inkontinencija	ASCUS	<i>Enterococcus sp.</i>	<i>Candida albicans</i>	nije izolirana	-(neg)
2-PE	nema simptoma	CIN I, HPV	nisu izolirane	<i>Candida glabrata</i>	1.00E+04	-(neg)
2-PE	svrbež	CIN I	fiziološka flora	nisu izolirane	nije izolirana	-(neg)
2-PE	svrbež	upala	nisu izolirane	nisu izolirane	nije izolirana	-(neg)
2-PE	nema simptoma	upala	nisu izolirane	nisu izolirane	nije izolirana	-(neg)
2-PE	bijeli iscjedak	CIN I, HPV	fiziološka flora	nisu izolirane	nije izolirana	-(neg)
2-PE- tragovi	nema simptoma	upala	nisu izolirane	<i>Candida albicans</i>	nije izolirana	-(neg)
2-PE- tragovi	bijeli iscjedak	upala	fiziološka flora	nisu izolirane	nije izolirana	-(neg)
2-PE- tragovi	nema simptoma	ASCUS	nisu izolirane	<i>Candida albicans</i>	1.00E+05	+(poz)
2-PE	bijeli iscjedak	upala	SHGB	<i>Candida albicans</i>	1.00E+04	-(neg)
2-PE	bijeli iscjedak	Gljive	nisu izolirane	<i>Candida albicans</i>	1.00E+03	+(poz)
2-PE	bijeli iscjedak	<i>Gardnerella</i>	nisu izolirane	<i>Candida albicans</i>	1.00E+03	-(neg)
2-PE- tragovi	nema simptoma	upala	nisu izolirane	<i>Candida albicans</i>	nije izolirana	-(neg)
2-PE	bijeli iscjedak	CIN I	nisu izolirane	<i>Candida albicans</i>	nije izolirana	-(neg)

U 9 od 14 uzoraka prisustvo feniletanola (PE) moglo se povezati s vrstama roda *Candida* (8 *Candida albicans* + 1 *Candida glabrata*). Pored toga, u 5 je uzoraka izolirana *Ureaplasma urealyticum*, dok su preostala dva uzorka bila pozitivna i na hrHPV.

Prisustvo metabolita uglavnom je bilo popraćeno sljedećim simptomima i znakovima: bijeli sirasti iscjedak (u šest ispitanica), nesposobnost zadržavanja mokraće (jedna ispitanica) i svrbež (dvije ispitanice). Kod drugih pet ispitanica nije bilo nikakvih simptoma.

Kada su razmatrani rezultati Papa-testa, prisustvo je metabolita povezano s lezijama niskog stupnja.

#### 4.4. Multivarijantna analiza ovisnosti pojave metabolita s prediktorskim varijablama

Rezultati višestruke regresijske analize za povezanost tvorbe metabolita *in vivo* i prediktorskih varijabli (simptomi, rezultati Papa-testa, prisutnost aerobnih bakterija, prisutnost gljiva, prisutnost ureaplazme, prisutnost hrHPV ) prikazani su u Tablici 6.

Tablica 6. Rezultati analize višestrukim regresijskim modelom vezani za prisustvo metabolita 2-feniletanola (2-PE) *in vivo* i odabrane prediktorske varijable

Varijabla	Statistički parameter		
	Beta	t	p
simptomi	<b>0,29</b>	1,71	0,0964
Papa-test	0,14	0,83	0,4121
aerobne bakterije	0,10	0,62	0,5383
gljive	0,09	0,51	0,6137
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	<b>0,20</b>	1,14	0,2624
hrHPV	<b>0,26</b>	1,44	0,1593
R=0,41			

Utvrđen je određeni stupanj pozitivne korelacije (R=0,41) između navedenih varijabli. Iako ni jedna od prediktorskih varijabli ne pokazuje statistički značajnu korelaciju na razini značajnosti  $p < 0,05$  najveći utjecaj na tvorbu metabolita imaju sljedeće varijable: prisutnost simptoma (Beta = 0,29;  $t=1,71$ ;  $p=0,0964$ ), prisutnost hrHPV DNA (Beta = 0,26;  $t=1,44$ ;  $p=0,1593$ ), prisutnost ureaplazme (Beta = 0,20;  $t=1,14$ ;  $p=0,2624$ ).

Tablica 7. Rezultati kanonske korelacijske analize vezani za prisustvo metabolita 2-feniletanola (2-PE) *in vivo* i odabrane prediktorske varijable

Varijabla	Statistički parametar		
	Korelacijski faktori	Strukturni faktori	Kanoničke težine
<b>Simptomi</b>	<b>0,26</b>	<b>0,64</b>	<b>0,70</b>
Papa-test	0,15	0,20	0,34
Aerobne bakterije	0,08	0,35	0,25
Gljive	0,04	0,09	0,21
<b><i>Ureaplasma urealyticum</i></b>	<b>0,15</b>	<b>0,36</b>	<b>0,48</b>
<b>hrHPV</b>	<b>0,15</b>	<b>0,37</b>	<b>0,62</b>
R=0,41; $\chi^2=6,4$ ; p=0,378			

Rezultati kanoničke korelacijske analize za povezanost tvorbe metabolita *in vivo* i gore navedenih prediktorskih varijabli prikazani su u Tablici 7.

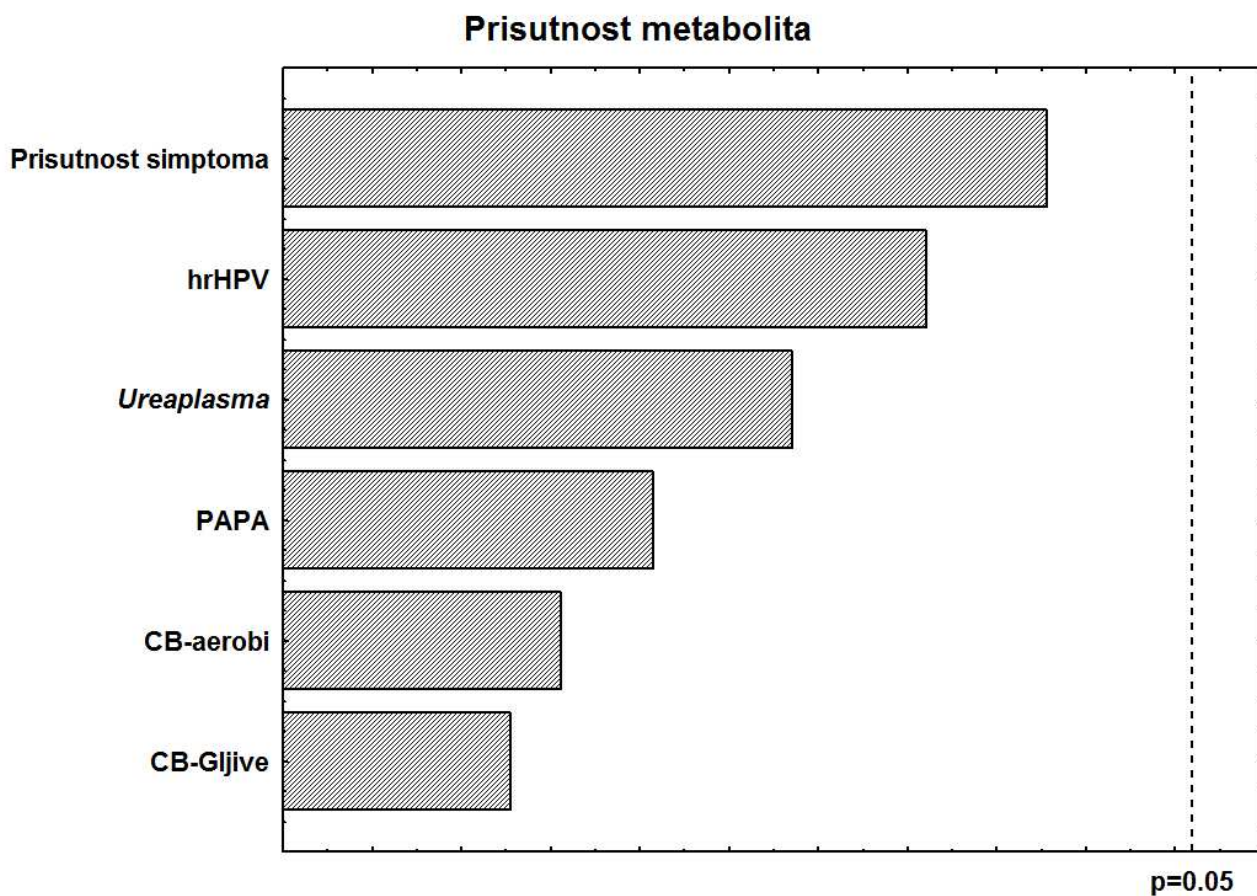
Utvrđena je pozitivna korelacija između tvorbe metabolita i prediktorskih varijabli (R=0,41;  $\chi^2=6,4$ ; p=0,378).

Promatrana su sljedeća tri kvantitativna parametra: korelacijski faktori, strukturni faktori i kanoničke težine.

Iz rezultata sva tri navedena parametra utvrđeno je da varijable prisutnost simptoma, prisutnost hrHPV-a i prisutnost *Ureaplasmae urealyticum* imaju najznačajniji utjecaj na tvorbu metabolita *in vivo*.

Iz rezultata višestruke regresijske analize, kanoničke korelacijske analize i naprednog regresijskog modela moguće je zaključiti da su prisustvo simptoma, hrHPV i *Ureaplasma urealyticum* tri prediktorske varijable s najvećim utjecajem na stvaranje metabolita *in vivo*.

Manjak statističke značajnosti mogao bi biti povezan s malim brojem uzoraka koji su sadržavali metabolit proizveden *in vivo*.



**Slika 9.** Pareto grafikon s prikazom utjecaja različitih prediktorskih varijabli na prisustvo metabolita *in vivo*

Slika 9. prikazuje rezultate naprednog regresijskog modela prikazanog u formi pareto dijagrama za povezanost tvorbe metabolita *in vivo* i gore navedenih prediktorskih varijabli.

Kao i u prethodnom tekstu utvrđeno je da varijable prisutnost simptoma, prisutnost hrHPV-a i prisutnost *Ureaplasmae urealyticum* imaju najznačajniji utjecaj na tvorbu metabolita *in vivo*. Nijedna od navedenih varijabli ne pokazuje i statističku značajnost.

#### 4.5. Određivanje 2-feniletanola *in vitro*

Koncentracije metabolita 2-feniletanola određene *in vitro* za svaku pojedinu ispitivanu vrstu roda *Candida* te bakterije *Streptococcus* spp. i *Enterococcus* spp. Prikazane su u Tablici 8.

Tablica 8. Koncentracije metabolita 2-feniletanola određene *in vitro* za svaku pojedinu ispitivanu vrstu roda *Candida*

Uzorak	Vrsta/Soj	c (2-PE) / µg/mL
FG-K5	<i>C. albicans</i> 30016/2	0,92
FG-K8	<i>C. albicans</i> 30018/2	2,53
FG-K15	<i>C. albicans</i> 30023	2,60
FG-K30	<i>C. albicans</i> 31646/2	0,96
FG-K39	<i>C. albicans</i> 32749/2	0,60
FG-K35	<i>C. albicans</i> 32750/2	3,12
FG-K50	<i>C. albicans</i> 33815/2	0,92
FG-K82	<i>C. albicans</i> 37251/2	2,68
FG-K98	<i>C. albicans</i> 39446/2	0,84
FG-K106	<i>C. albicans</i> 40633/2	1,76
FG-K111	<i>C. albicans</i> 41696	3,00
FG-K179	<i>C. albicans</i> 44923	2,80
FG-K173	<i>C. albicans</i> 44926	2,28
FG-K169	<i>C. albicans</i> 44929	3,28
FG-K170	<i>C. albicans</i> 44930	1,28
FG-K171	<i>C. albicans</i> 44931	1,08
FG-K182	<i>C. albicans</i> 44932	1,16
FG-K130	<i>C. albicans</i> 47006	2,08
FG-K151	<i>C. albicans</i> 47015	0,80
FG-K196	<i>C. albicans</i> 47016	4,64
FG-K192	<i>C. albicans</i> 47018	1,04
FG-K190	<i>C. albicans</i> 47019	0,96
FG-K191	<i>C. albicans</i> 47020	2,48
FG-K151	<i>C. albicans</i> 48008	1,44
FG-K202	<i>C. albicans</i> 48861	2,36
FG-K200	<i>C. albicans</i> 48862	1,52
FG-K201	<i>C. albicans</i> 48863	1,84
FG-K166	<i>C. albicans</i> 48867	2,88
FG-K41	<i>C. glabrata</i> 32748/2	2,40
FG-K111	<i>C. glabrata</i> 30028	1,93
FG-K56	<i>C. glabrata</i> 33809	3,61
FG-K121	<i>C. glabrata</i> 48009	1,93
FG-K119	<i>C. kef</i> gr 41692	4,20
FG-K148	<i>C. parapsilosis</i> 48000	0,76
FG-K138	<i>Enterococcus</i> 42804/1	trag
FG-K138	<i>Enterococcus</i> 42804/2	trag
FG-K183	<i>Enterococcus</i> 44933	trag
FG-K197	<i>Enterococcus</i> 47009	trag
FG-K162	<i>Enterococcus</i> 48006	trag
FG-K158	<i>Streptococcus</i> 43822 B	trag
FG-K153	<i>Streptococcus</i> 43824 B	trag
FG-K180	<i>Streptococcus</i> 44917	trag
FG-K130	<i>Streptococcus</i> 47006	trag
FG-K128	<i>Streptococcus</i> 47012 B	trag
FG-K15	<i>Streptococcus</i> 47015 B	trag
FG-K149	<i>Streptococcus</i> 48002	trag
FG-K141	<i>Streptococcus</i> 48004	trag
FG-K195	<i>Streptococcus</i> 48865 B	trag



*In vitro* ispitivanje rezultiralo je izolacijom tragova 2-feniletanola generiranih bakterijama *Streptococcus* spp. (N=9) i *Enterococcus* spp. (N=5) te izolacijom 2-feniletanola povezanim s vrstama roda *Candida* (28 sojeva *C. albicans*, 4 soja *C. glabrata* i po jedan soj *C. kefyr* i *C. parapsilosis*).

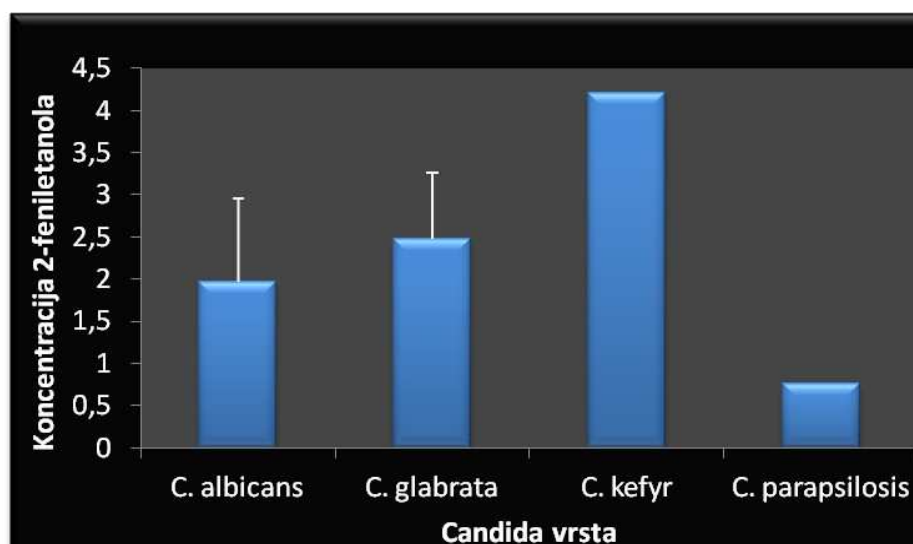
Rezultati GC-MS analize potvrdili su da su samo vrste roda *Candida* proizvodile metabolit niske molekularne mase. Raspon koncentracija 2-feniletanola vezanih na vrstu *C. albicans* se kretao od 0,60 do 4,64 µg/mL (srednja vrijednost 1,97 µg/mL).

U slučaju vrste *C. glabrata* taj raspon kretao se od 1,93 do 3,61 µg/mL (srednja vrijednost 2,47 µg/mL).

Koncentracija 2-feniletanola povezana s vrstama *C. kefyr* i *C. parapsilosis* (svaka po jedan soj) iznosila je 4,20 µg/mL odnosno 0,76 µg/mL. Uzimajući u obzir vrste roda *Candida*, koncentracije 2-feniletanola kretale su se u rasponu od 0,6 – 4,64 µg/mL (srednja vrijednost 2,06 µg/mL).

Tablica 9. Osnovni statistički parametri za koncentracije metabolita 2-feniletanola određene *in vitro* za svaku pojedinu ispitivanu vrstu roda *Candida* (X- srednja vrijednost; N-broj uzoraka; SD-standardna devijacija; SP-standardna pogreška; M-medijan)

<i>Candida</i> vrste	Statistički parametar						
	$\bar{X}$	N	SD	SP	Min.	Max.	M
<i>C. albicans</i>	1,97	28	0,98	0,19	0,60	4,64	1,86
<i>C. glabrata</i>	2,47	4	0,79	0,40	1,93	3,61	2,17
<i>C. kefyr</i>	4,20	1	0,00				
<i>C. parapsilosis</i>	0,76	1	0,00				
Ukupno	2,06	34	1,03	0,18	0,60	4,64	1,93

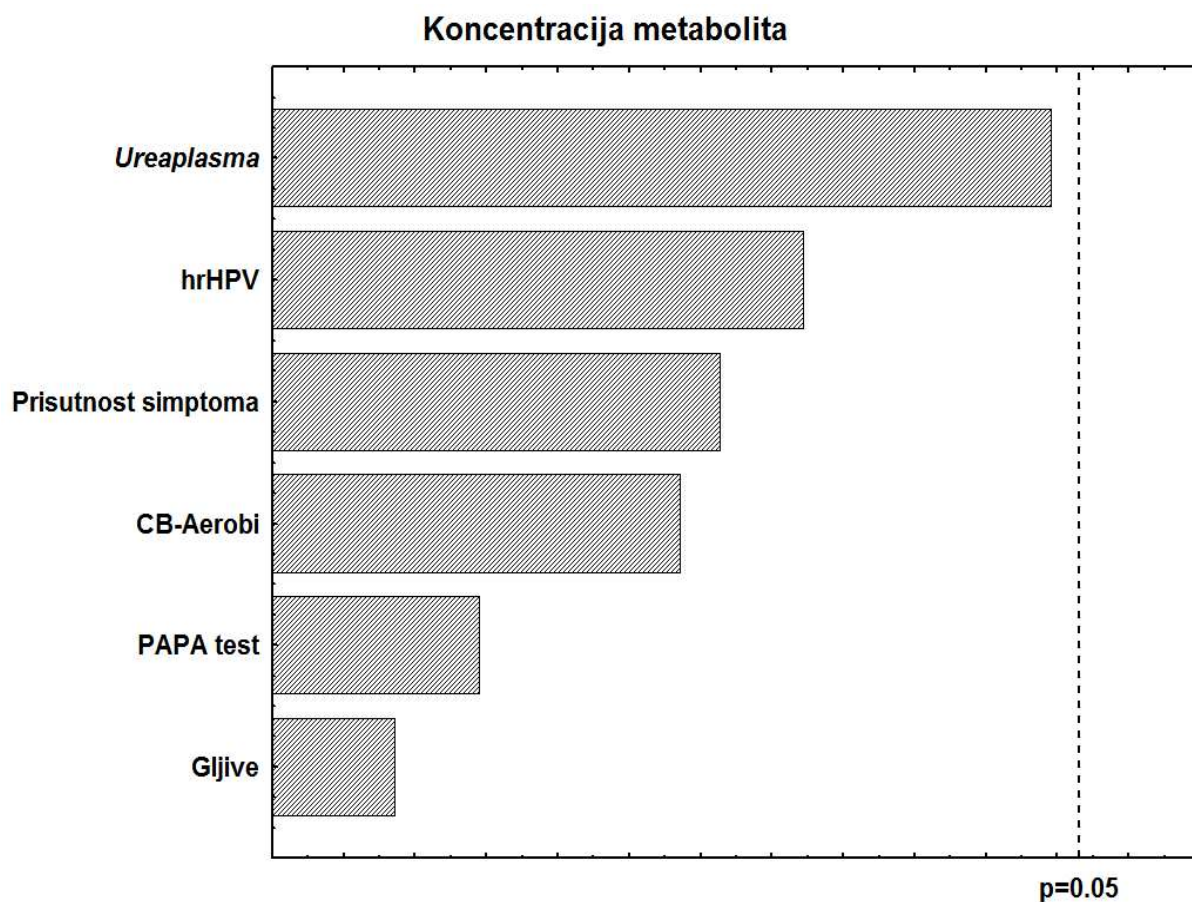


**Slika 10.** Srednje vrijednosti i standardne devijacije za koncentracije metabolita 2-feniletanola određene *in vitro* za svaku pojedinu ispitivanu vrstu roda *Candida*.

Tablica 10. Rezultati t testa između srednjih vrijednosti koncentracije metabolita u uvjetima *in vitro* za bakterije *C. albicans* i *C. glabrata*

Varijabla	Statistički parametar										
	$\bar{X}_{CA}$	$\bar{X}_{CG}$	t	df	p	$N_{CA}$	$N_{CG}$	$SD_{CA}$	$SD_{CG}$	F	p
<b>Koncentracija metabolita</b>	1,97	2,47	-0,964	29	0,343	27	4	0,98	0,79	1,54	0,819461

T- test (Tablica 10) pokazao je da nema značajne razlike u proizvedenoj količini 2-feniletanola između vrsta *C. albicans* i *C. glabrata*. Takav rezultat je vjerojatno povezan s malim brojem analiziranih uzoraka za sve vrste roda *Candida* osim *C. albicans* te značajnom varijacijom koncentracija unutar pojedine skupine (Tablica 6, slika 10)



**Slika 11.** Pareto grafikon s prikazom utjecaja različitih prediktorskih varijabli na koncentracije metabolita *in vitro*

Slika 11 prikazuje rezultate naprednog regresijskog modela prikazanog u formi pareto dijagrama za povezanost koncentracije metabolita 2-feniletanola *in vitro* i gore navedenih prediktorskih varijabli.

Rezultati naprednog regresijskog modela potvrdili su da prisutnost *Ureaplasma urealyticum*, hrHPV i simptomi tri prediktorske varijable s najvećim utjecajem na stvaranje metabolita *in vitro*.

Tablica 11. Rezultati višestruke regresijske analize za vrijednosti koncentracija 2-feniletanola u uvjetima *in vitro* u odnosu na prediktorske varijable

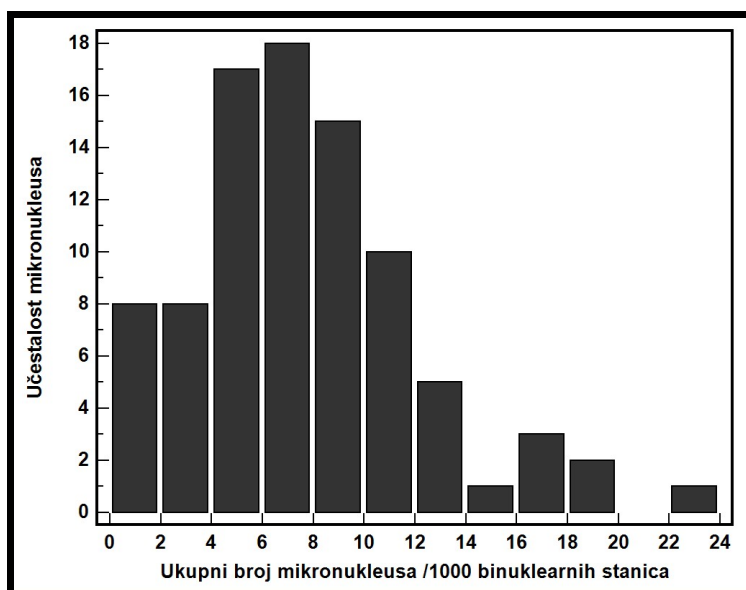
Varijabla	Statistički parametar		
	$\beta$	t	p
simptomi	<b>-0,45</b>	-1,28	0,246
Papa-test	-0,20	-0,45	0,667
aerobne bakterije	0,38	0,85	0,429
Gljive	-0,11	-0,28	0,790
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	<b>-0,73</b>	-1,97	0,096
hrHPV	<b>0,56</b>	1,54	0,174
<b>R=0,71</b>			

Rezultati višestruke regresijske analize za koncentraciju metabolita *in vitro* i prediktorskih varijabli (simptomi, rezultati Papa-testa, prisutnost aerobnih bakterija, prisutnost gljiva, prisutnost *Ureaplasmae urealyticum* i prisutnost hrHPV-a) prikazani su u Tablici 11.

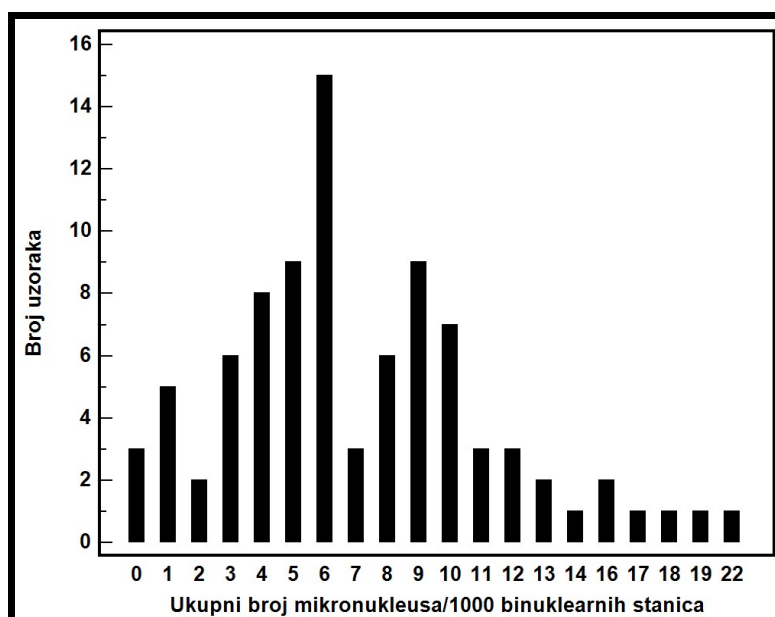
Utvrđena je dobra pozitivna korelacija ( $R=0,71$ ) između navedenih varijabli. Iako ni jedna od prediktorskih varijabli ne pokazuje statistički značajnu korelaciju na razini značajnosti  $p<0,05$  najveći utjecaj na koncentraciju metabolita imaju sljedeće varijable: prisutnost *Ureaplasmae urealyticum* (Beta = 0,73;  $t=1,97$ ;  $p=0,096$ ), prisutnost hrHPV (Beta = 0,56;  $t=1,54$ ;  $p=0,174$ ) i prisutnost simptoma (Beta = 0,45;  $t=1,28$ ;  $p=0,246$ ).

#### 4.6. Povezanost infekcija genitalnog trakta žena, stila života i općeg zdravstvenog stanja s učestalošću mikronukleusa

Histogram razdiobe mikronukleusa prikazan je na slici 12, dok je učestalost mikronukleusa u 88 analiziranih uzoraka prikazana na slici 13 i tablici 12. Vidljivo je da mikronukleusi pokazuju logaritamsku raspodjelu. Broj mikronukleusa kretao se od 0 (u tri analizirana uzorka) do 22 (u jednom analiziranom uzorku). Najviše uzoraka (njih 15) imalo je 6 mikronukleusa dok je 5 i 9 mikronukleusa nađeno u 9 uzoraka.



Slika 12. Histogram razdiobe mikronukleusa. N=88



Slika 13. Učestalost mikronukleusa

Tablica 12. Distribucija i postotak mikronukleusa u 88 analiziranih uzoraka

broj mikronukleusa	N	postotak
0	3	3,4%
1	5	5,7%
2	2	2,3%
3	6	6,8%
4	8	9,1%
5	9	10,2%
6	15	17,0%
7	3	3,4%
8	6	6,8%
9	9	10,2%
10	7	8,0%
11	3	3,4%
12	3	3,4%
13	2	2,3%
14	1	1,1%
16	2	2,3%
17	1	1,1%
18	1	1,1%
19	1	1,1%
22	1	1,1%

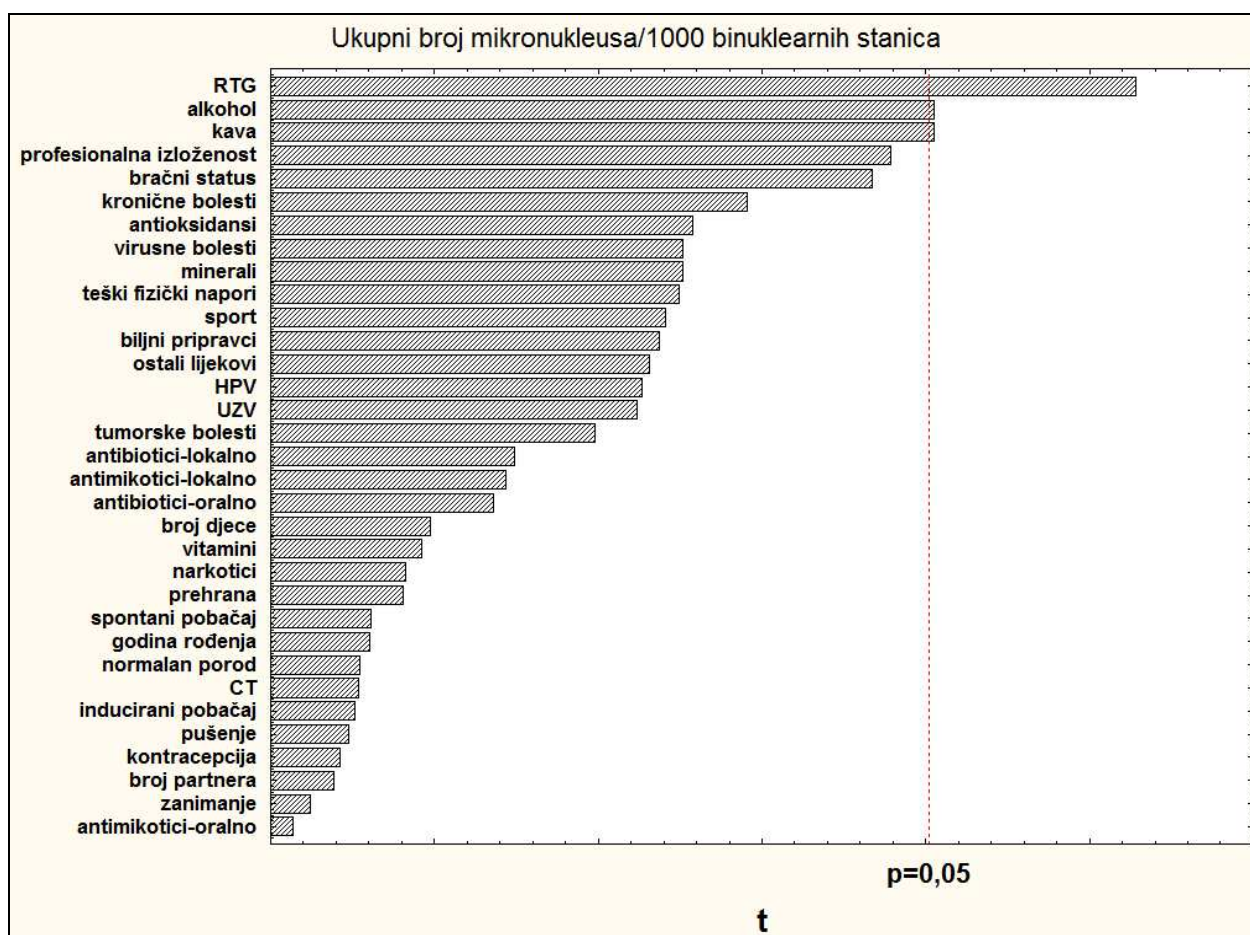
Tablica 13. osnovni statistički parametri za ukupni broj mikronukleusa određenih na 1000 binuklearnih stanica. X-srednja vrijednost, SD-standardna devijacija, RSD-relativna standardna devijacija; M-medijan; ND-test normalne distribucije

Statistički parametar	MN
N	88
$\bar{X}$	7,17
SD	4,41
RSD	0,62
SP	0,47
M	6
Minimum	0
Maksimum	22
ND	0,001

Osnovni statistički parametri za ukupan broj mikronukleusa su prikazani u Tablici 13. Srednja vrijednost iznosila je 7,17 mikronukleusa na 1000 pregledanih binuklearnih stanica dok je medijan vrijednost 6 mikronukleusa. Rezultati su karakterizirani velikom standardnom devijacijom (4,41), dok je relativna standardna devijacija iznosila 62%.

#### 4.7. Multivarijantna analiza povezanosti prediktorskih varijabli i učestalosti mikronukleusa

Regresijskom analizom utvrđena je statistički značajna korelacija između prediktorskih varijabli i učestalosti mikronukleusa ( $R=0,69$ ;  $p=0,0441$ ). Najveći, statistički značajan utjecaj imaju sljedeće varijable: medicinska izloženost X-zračenju ( $\beta=0,34$ ;  $t=2,63$ ;  $p=0,0115$ ), konzumiranje kave ( $\beta=0,29$ ;  $t=2,04$ ;  $p=0,0471$ ) i konzumiranje alkohola ( $\beta=0,29$ ;  $t=2,01$ ;  $p=0,0497$ ). Zračenje i alkohol imaju pozitivan utjecaj dok kava ima negativan utjecaj na učestalost mikronukleusa. Naprednim regresijskim modelom dobiveni su identični rezultati.



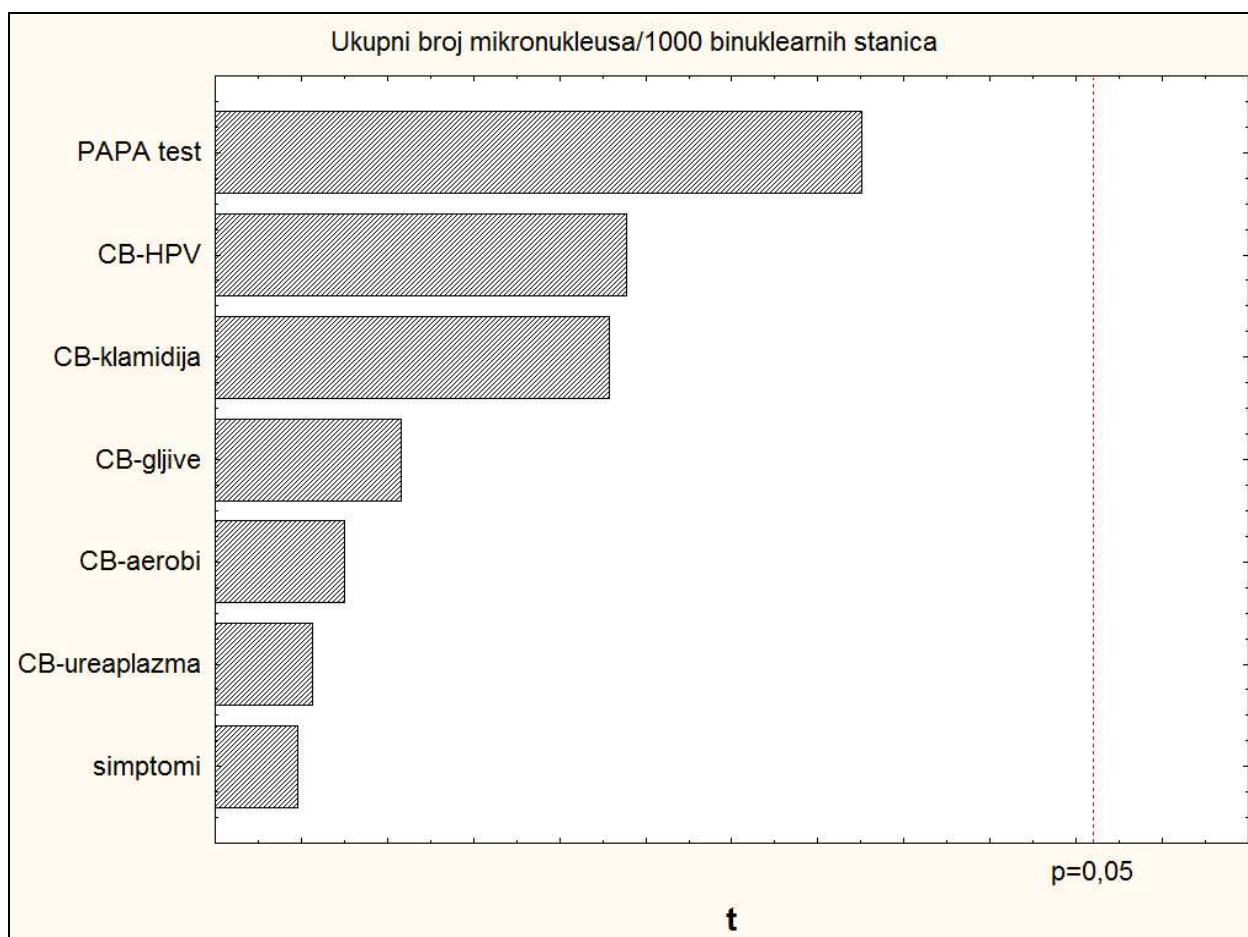
Slika 14. Pareto dijagram povezanosti prediktorskih varijabli (stil života i zdravstveno stanje) i učestalosti mikronukleusa



Tablica 14. Rezultati višestruke regresijske analize povezanosti prediktorskih varijabli (životne i radne navike te zdravstveno stanje žena) i učestalosti mikronukleusa

Prediktorska varijabla	Statistički parametar		
	Beta	t	p
godina rođenja	0,07	0,31	0,7589
zanimanje	0,01	0,07	0,9420
profesionalna izloženost	0,28	1,88	0,0661
bračni status	0,26	1,86	0,0690
broj partnera	0,02	0,16	0,8730
broj djece	0,14	0,57	0,5702
normalan porod	0,07	0,32	0,7493
spontani pobačaj	0,12	0,22	0,8272
inducirani pobačaj	0,08	0,15	0,8776
kontracepcija	0,02	0,15	0,8822
prehrana	0,05	0,41	0,6870
vitamini	-0,07	-0,52	0,6057
antioksidanti	-0,16	-1,26	0,2127
minerali	-0,17	-1,26	0,2150
biljni pripravci	-0,16	-1,17	0,2487
pušenje	0,03	0,23	0,8190
alkohol	0,29	2,01	0,0497*
kava	-0,29	-2,04	0,0471*
narkotici	0,05	0,39	0,7011
sport	0,17	1,19	0,2401
teški fizički napori	0,17	1,23	0,2261
virusne bolesti	0,17	1,29	0,2039
kronične bolesti	0,19	1,46	0,1502
tumorske bolesti	0,13	1,01	0,3161
HPV	-0,16	-1,14	0,2588
RTG	0,34	2,63	0,0115*
CT	0,03	0,23	0,8161
UZV	0,16	1,13	0,2644
antibiotici-lokalno	0,10	0,69	0,4921
antibiotici-oralno	0,11	0,68	0,5011
antimikotici-lokalno	0,09	0,66	0,5098
antimikotici-oralno	0,02	0,12	0,9089
ostali lijekovi	0,24	1,21	0,2328
R=0,69; p=0,0441			

Utjecaj životnih i radnih navika te zdravstvenog stanja žena na učestalost mikronukleusa utvrđen je višestrukom regresijskom analizom (Tablica 14) i naprednim regresijskim modelom (slika 9).



**Slika 15.** Pareto dijagram povezanosti prediktorskih varijabli (simptomi, rezultati Papa testa i obrisaka vrata maternice) i učestalosti mikronukleusa

**Tablica 15.** Rezultati višestruke regresijske analize povezanosti prediktorskih varijabli (simptomi, rezultati Papa-testa i mikrobiološke analize obrisaka vrata maternice i rodnice) i učestalosti mikronukleusa

	<b>Beta</b>	<b>t</b>	<b>p</b>
simptomi	0,03	0,19	0,8502
<b>Papa-test</b>	<b>-0,26</b>	<b>-1,50</b>	<b>0,1432</b>
aerobi	-0,05	-0,30	0,7665
gljive	-0,07	-0,43	0,6693
ureaplazma	-0,04	-0,23	0,8220
<b>klamidija</b>	<b>-0,16</b>	<b>-0,91</b>	<b>0,3673</b>
<b>hrHPV</b>	<b>-0,17</b>	<b>-0,96</b>	<b>0,3466</b>
R= 0,41; p=0,52990			

Utjecaj prediktorskih varijabli (prisutnost simptoma, Papa-test i rezultati obrisaka vrata maternice i rodnice) na učestalost mikronukleusa utvrđen je višestrukim regresijskom analizom (Tablica 15) i naprednim regresijskim modelom (slika 15).

Regresijskom analizom utvrđen je određeni stupanj korelacije između prediktorskih varijabli i učestalosti mikronukleusa ( $R= 0,41$ ;  $p=0,5299$ ). Najveći, ali ne i statistički značajan utjecaj imaju sljedeće varijable: rezultati Papa-testa ( $\beta=-0,26$ ;  $t=-1,50$ ;  $p=0,1432$ ), prisutnost klamidije ( $\beta=-0,16$ ;  $t=0,91$ ;  $p=0,3673$ ) i prisutnost hrHPV ( $\beta=-0,17$ ;  $t=-0,96$ ;  $p=0,3466$ ). Naprednim regresijskim modelom dobiveni su identični rezultati.

## 5. RASPRAVA

### 5.1. Opis ispitivane populacije

Tablica 1. prikazuje učestalost i postotak svakog parametra utvrđenog uz pomoć Papa-testa, obrisaka vrata maternice i prisutnost/odsustva metabolita utvrđenih GC-MS analizom.

Rezultati Papa-testa otkrili su prevalenciju lezija niskog stupnja u ispitivanoj populaciji. ASCUS, ASCUS/CIN I, CIN I i CIN II imali su udio od 46,3% u ukupnim rezultatima, dok je hrHPV utvrđen u 40 pacijentica (19,70%), a gljive u 14 pacijentica.

Rezultati mikrobiološke analize obrisaka vrata maternice i rodnice otkrili su da aerobne bakterije nisu izolirane u 30,05% ispitivane populacije, dok je u narednih 41,87% populacije utvrđena prisutnost fiziološke flore.

Streptokok grupe B pokazao je najvišu učestalost (22 slučaja), nakon čega su slijedile *E.coli* i *Enterococcus sp.* (svaka s po 12 slučajeva). Gljive su izolirane u 36 slučajeva i to s prevalencijom *Candida albicans* (u 28 od 36 slučajeva), nakon koje je slijedila *Candida glabrata* (u 5 od 36 slučajeva).

*Ureaplasma urealyticum* izolirana je u 61 uzorku, a *Mycoplasma* u samo dva uzorka, dok je *Chlamydia trachomatis* izolirana u pet uzoraka.

U 51 uzorku je dokazan hrHPV (25,12% ispitivane populacije). Metabolit 2-feniletanol nastao *in vivo* utvrđen je u 14 od 74 ispitana uzorka. U 4 od 14 uzoraka 2-feniletanol pronađen je samo u tragovima.

### 5.2. Utjecaj načina života i zdravstvenog stanja na prisustvo/odsustvo infekcije

Utvrđeno je da životne navike (pušenje, alkohol, opijati i česta promjena partnera), izloženost različitim fizičkim i kemijskim agensima i iradijaciji mogu imati pozitivan učinak na pojavu genitalnih infekcija.

Rahm i suradnici utvrdili su da je 91 od ukupno 707 testiranih uzoraka pozitivnih na *Chlamydia trachomatis* bilo izuzeto od seksualno aktivnih tinejdžerki. Zaključili su da su najvažniji predisponirajući faktori u slučaju infekcije ovom bakterijom pušenje, česta promjena partnera te prijašnja infekcija. Od 460 spolno aktivnih studentica iz Irske, 22 su bile pozitivne na *Chlamydia trachomatis*. Varijable povezane sa značajno povećanim rizikom bili su trenutno postojeći simptomi, dva ili više partnera za jednu noć te tri ili više partnera tijekom života. Ukupna prevalencija infekcija uzrokovanih *C.trachomatis* u testiranoj studentskoj populaciji u Belgiji u dobi od 18 do 39 godina iznosila je 2,9%. Novi partner u

zadnjih 6 mjeseci i više od jednog partnera u zadnjih godinu dana bili su najvažniji faktori rizika u ispitivanoj populaciji.<sup>98</sup>

U našoj je studiji samo pet uzoraka bilo pozitivno na *C. trachomatis*. Svi su oni bili izuzeti od mladih žena dobi od 22 do 42 godine (četiri su imale manje od 30 godina). Broj partnera u zadnjih godinu dana kretao se od 1 do 3. Dvije od njih nisu koristile kontracepciju, a preostale su tri koristile oralne kontraceptive. Dvije su pušačice, a tri redovito konzumiraju alkohol. Četiri od njih bile su pozitivne i na *Ureaplasma urealyticum*, a tri na hrHPV. Iz tih se rezultata može zaključiti da mlade žene koje često mijenjaju partnere, puše, konzumiraju alkohol i ne koriste kondom tijekom seksualnog odnosa, imaju veći rizik infekcije *C. trachomatis*.

Povezanost prediktorskih varijabli (životnog stila i zdravstvenog stanja) sa zavisnim varijablama (rezultati Papa-testa, prisutnost aerobnih bakterija, gljiva, *Ureaplasma urealyticum* i hrHPV) utvrđena je korištenjem naprednog regresijskog modela, a rezultati su za svaku zavisnu varijablu prezentirani u vidu Pareto grafikona s t-vrijednostima. Nije bilo dovoljno uzoraka pozitivnih na *Mycoplasma hominis* i *Chlamydia trachomatis* da bi ih se uključilo u model.

Izloženost medicinskoj iradijaciji, broj spontanih pobačaja te uzimanje antioksidansa povezani su s razvojem lezija utvrđenih Papa-testom. Od toga samo medicinska izloženost iradijaciji je statistički značajno povezana ( $p < 0,05$ ) s rezultatima Papa-testa. 29 ispitanica od onih kojima su utvrđene cervikalne lezije (niskog ili visokog stupnja) bile su izložene ultrazvuku zbog neke vrste medicinskih pretraga. U 7 od 14 ispitanica koje su uzimale antioksidante dijagnosticirane su cervikalne lezije (uglavnom niskog stupnja). U 11 od 27 žena koje su imale od 1 do 5 spontanih pobačaja dijagnosticirane su cervikalne lezije. U našoj ispitivanoj populaciji lezije niskog stupnja (CIN I, ASCUS) dominiraju, dok su samo u četiri uzorka zapažene lezije visokog stupnja (CIN II). Sva četiri uzorka uzeta su od mladih žena u dobi od 26 do 31 godine. Ti su rezultati sukladni onima koje su dobili Gram i suradnici, prema kojima je najveća incidencija cervikalnih lezija visokog stupnja zapažena u žena dobi od 25 do 29 godina.<sup>99</sup> Ho i suradnici utvrdili su značajnu korelaciju između pušenja i incidencije lezija visokog stupnja u pacijentica koje su pozitivne i na hrHPV.<sup>100</sup> Sve četiri naše pacijentice kojima je dijagnosticiran CIN II bile su pozitivne i na hrHPV.

Bračno stanje, broj partnera, broj induciranih pobačaja, kronične bolesti i vrsta kontracepcije imali su najveći utjecaj na prisutnost hrHPV-a, no ni jedna od ispitivanih prediktorskih varijabli nije bila statistički značajna (slika 8b). Samo 12 od 51 žene pozitivne na hrHPV bile su u braku u vrijeme sudjelovanja u istraživanju. Broj seksualnih partnera kretao se od 0 do 5, s prevalencijom jednog partnera (34 od 51 pacijentice). Od 51 ispitanice

tri su imale inducirane pobačaje, dok je neka vrsta kronične bolesti bila prisutna kod 10 od 51 ispitanice. Od 51 ispitanice 36 nije koristilo kontracepciju, a samo su četiri koristile kondom tijekom spolnog odnosa. Dob ispitanica bila je u rasponu od 18 do 54 godine, s prevalencijom mlađih žena do 30 godina (N=38).

Cotton i suradnici utvrdili su da je rizik infekcije hrHPV-om povećan u mlađih žena, žena s niskom stupnjem obrazovanja, u onih koje nisu udane/ne žive u zajednici, u onih koje koriste hormonsku kontracepciju te u pušačica.<sup>101</sup>

Del Prete i suradnici izvjestili su da je najveći postotak (32,6%) pacijentica zaraženih hrHPV-om u dobi od 20 do 30 godina.<sup>102</sup> Do istih su rezultata došli Bardin i suradnici, koji najveću prevalenciju hrHPV-a (24,2%) utvrdili u žena od 25 do 34 godine.<sup>103</sup> Bell i suradnici utvrdili su da je incidencija infekcija hrHPV-om u obrnutoj korelaciji s dobi. U mlađih žena (<24 godine) broj infekcija hrHPV-om bio je značajno viši (41 %,  $p < 0,005$ ) u usporedbi sa svim drugim dobnim skupinama.<sup>104</sup> Clarke i suradnici izvjestili su da spolna aktivnost u ranoj dobi i veći broj seksualnih partnera mogu dovesti do infekcija hrHPV-om.<sup>105</sup>

Broj spontanih pobačaja, konzumacija kave, korištenje antibiotika lokalno te medicinska izloženost iradijaciji imali su najveći utjecaj na prisutnost aerobnih bakterija, no samo je prvo spomenuta varijabla imala statistički značajan utjecaj ( $p < 0,005$ ). U ispitivanoj populaciji 56 ispitanica bilo je pozitivno na aerobne bakterije. One su bile u dobi od 18 do 64 godine, s prevalencijom mlađih žena u dobi ispod 40 godina (N=38). Broj spontanih pobačaja kretao se u rasponu od 1 do 4. Od 56 žena njih 50 redovito su konzumirale kavu, 24 su bile izložene iradijaciji zbog medicinski indiciranih pretraga, s prevalencijom ultrazvuka (N=21), 10 žena koristile su antibiotike lokalno u vrijeme ispitivanja. Simptomi su bili prisutni kod 32 od 56 pacijentica, dok su cervikalne lezije utvrđene kod njih 27. Aerobne su bakterije također bile popraćene hrHPV-om i *Ureaplasma urealyticum* u 9 slučajeva, dok je *Chlamydia trachomatis* bila prisutna kod jedne ispitanice, a *C. albicans* kod njih 6.

Nes i suradnici proveli su istraživanje na 1200 Amerikanki te zaključili da žene crnačke rase, niskog stupnja obrazovanja, s niskim prihodima, pušačice, s barem jednom trudnoćom, koje su imale spolne odnose tijekom mjesečnice te u anamnezi spolno prenosive bolesti, imaju veći rizik vaginalne infekcije uzrokovane aerobnim bakterijama.<sup>106</sup>

Konzumacija alkohola, vrsta prehrane, kronične bolesti i tumori te broj spontanih pobačaja imali su najveći utjecaj na infekcije uzrokovane *Ureaplasma urealyticum*. Niti jedna od ispitivanih varijabli nije imala statistički značajan utjecaj ( $p < 0,05$ ). Od 61 ispitanice njih 38 su imale izražene simptome u vrijeme ispitivanja. Kod njih 36 dijagnosticirane su cervikalne lezije (većinom CIN I i ASCUS). Aerobne su bakterije izolirane u 10 slučajeva, a *Candida spp* u 15 slučajeva (13 slučajeva *Candida albicans* i po jedan slučaj *C. glabrata* i *C.*

kefyr ). *Ureaplasma urealyticum* također je bila popraćena prisutnošću *Mycoplasma hominis* u dva slučaja, *Chlamydia trachomatis* u četiri slučaja te hrHPV u 27 slučajeva. Dob populacije pozitivne na *Ureaplasma urealyticum* kretala se u rasponu od 18 do 58 godina, s prevalencijom u žena mlađih od 30 godina (N=48). Od 61 ispitanice njih 27 je konzumiralo alkohol, dok je njih 15 jelo prženu i brzu hranu. 18 ispitanica imalo je neku kroničnu bolest, a 13 tumor u vrijeme ispitivanja, dok su njih pet imale 1 do 4 spontana pobačaja. 30,05% naših ispitanica bilo je pozitivno na *Ureaplasma urealyticum*.

Ruso i suradnici proveli su istraživanje donjeg dijela genitalnog trakta u kojem je sudjelovalo 137 adolescentica te utvrdili da je 10% spolno aktivnih sudionica istraživanja zaraženo *U. urealyticum*. Neke su od njih bile pozitivne i na *M.hominis*.<sup>107</sup>

Visoku korelaciju između *M. hominis* i *U. urealyticum* potvrdili su i Van der Schee i sur.<sup>108</sup>

Pordeli je vodio istraživanje koje je uključivalo 130 sudionica u dobi od 20 do 50 godina te utvrdio da je 22,33% njih pozitivno na *U. urealyticum*, 28,4% njih na *M. hominis*, dok je njih 18,4% bilo zaraženo objema spomenutim genitalnim mikoplazmama.<sup>109</sup> Najveća je prevalencija obiju mikroorganizama utvrđena u udanih žena dobi od 21 do 30 godina, a što je u skladu s rezultatima naše studije.

Young i suradnici utvrdili su da je 69% testirane populacije pozitivno na *U. Urealyticum* iz obriska vrata maternice dok je prevalencija tako izolirane *M.hominis* iznosila 33%.<sup>110</sup>

Od ukupno 36 ispitanica kod kojih je utvrđena infekcija *Candidom spp*, kod njih 79,6% izolirana je *C. albicans*, a *C. glabrata* bila je prisutna u 13,9% uzoraka. Ti su rezultati u skladu s onima koje je objavio Sobel, koji je utvrdio da 85-95% sojeva gljiva izoliranih iz vagine pripada vrsti *C. albicans*, dok se *C. glabrata* kreće u rasponu od 10 do 20%.<sup>111</sup> Ispitivane varijable uzimanje vitamina, bračno stanje, profesionalna izloženost, broj porođaja te virusne bolesti imale su najveći utjecaj na infekciju vrstama roda *Candida*, no niti jedna od ispitivanih varijabli nije imala statistički značajan ( $p < 0,05$ ) utjecaj. Manjak vitamina i faktori poput porođaja, profesionalne izloženosti i djelovanja kemijskih agensa te različitih virusnih bolesti mogu oslabiti imunološki sustav i posljedično promovirati tranziciju gljiva iz normalnog komenzalnog oblika u patogeneni. Učestalost spolnih odnosa mogla bi predstavljati značajan faktor rizika. Samo je 7 naših ispitanica zaražene *Candidom* redovito uzimalo vitamine. Njih 22 su bile udane, 2 su bile izložene djelovanju kemijskih agensa, 20 ih je rodilo u rasponu od 1 do 5 puta, a virusne su bolesti bile prisutne u 11 ispitanica za vrijeme provođenja ispitivanja. Infekcija *Candidom* bila je popraćena infekcijom hrHPV-om u 9 slučajeva, infekcijom *U. urealyticum* u 13 slučajeva, aerobnim bakterijama u 6 slučajeva te

cervikalnim lezijama (isključivo niskog stupnja) u 10 slučajeva. Simptomi su bili prisutni u 23 od 36 ispitanica. Dob zaražene populacije kretala se u rasponu od 19 do 58 godina, s prevalancijom žena dobi do 30 godina (N=21). Naši rezultati potvrđuju povezanost infekcija uzrokovanih *Candidom* s prisutnošću cervikalnih lezija i/ili bakterijskih infekcija, a što je u skladu s rezultatima drugih istraživanja.

Guijon i suradnici i Takac utvrdili su statistički značajnu korelaciju između prisutnosti bakterijskih i gljivičnih infekcija te pojave CIN-a.<sup>112</sup>

### 5.3. Određivanje 2-feniletanola *in vivo*

Usporedba rezultata kvalitativne analize metabolita 2-feniletanola *in vivo* sa simptomima, rezultatima Papa testa i obrisaka vrata maternice i rodnice za iste ispitanice prezentirani su u tablici 2. U 9 od 14 uzoraka prisustvo 2-PE moglo se povezati s vrstama roda *Candida* ( 8 *Candida albicans* +1 *Candida glabrata* ). Pored toga, u 5 je uzoraka izolirana *Ureaplasma urealyticum*, dok su preostala 2 uzorka bila pozitivna i na hrHPV. Prisustvo 2-PE uglavnom je bilo popraćeno slijedećim simptomima: bijeli iscjedak (6 ispitanica), inkontinencija (1 ispitanica) te svrbež (2 ispitanice). Kod drugih pet ispitanica nije bilo nikakvih simptoma. Kada su razmatrani rezultati Papa-testa, prisustvo 2-PE povezano je sa lezijama niskog stupnja. Rezultati višestruke regresijske analize (tablica 3), kanonske korelacijske analize (tablica 4) i naprednog regresijskog modela (slika 2), potvrdili su da prisutnost simptoma, hrHPV-a i *Ureaplasma urealyticum* tri prediktorske varijable s najvećim utjecajem na stvaranje 2-PE *in vivo*. Manjak statističke značajnosti mogao bi biti povezan s malim brojem uzoraka koji su sadržavali metabolit proizveden *in vivo*.

Gregus i suradnici testirali su uzorke iscjetka rodnice uzetih od žena s odnosno, bez simptoma vulvo vaginitisa. Dobiveni rezultati pokazuju prisutnost tirozola i/ili farnezola aromatskih alkohola, u 10 od 12 testiranih uzoraka. Koncentracija farnezola kretala se u rasponu od 128 do 3133 nM, a koncentracija tirozola u rasponu od 237 do 1758 nM.<sup>113</sup>

### 5.4. Određivanje 2-feniletanola *in vitro*

*In vitro* ispitivanje rezultiralo je izolacijom *Streptococcus spp.* i *Enterococcus spp.* (N=14), kao i izolacijom vrsta roda *Candida* (28 sojeva *C. albicans*, 4 soja *C. glabrata* i po jedan soj *C. kefyr* i *C. parapsilosis*). Rezultati GC-MS analize potvrdili su da su samo vrste roda *Candida* proizvodile 2-feniletanol.

Tablica 5. prikazuje osnovne statističke parametre za koncentracije 2-feniletanola



utvrđenog *in vitro* za svaku pojedinu vrstu roda *Candida*. Vrijednosti meana kretale su se u rasponu od 0,76 (*C. parapsilosis*) do 4,20 µg/mL (*C. kefyr*). Kada su analizirane sve vrste roda *Candida*, koncentracije 2-feniletanola kretale su se u rasponu od 0,6 do 4,64 µg/mL. T-test pokazao je da nema značajne razlike u proizvedenoj količini 2-feniletanola između *C. albicans* i *C. glabrata*. Rezultati naprednog regresijskog modela (slika 3) potvrdili su da prisutnost *Ureaplasma urealyticum*, hrHPV-a i simptoma tri prediktorske varijable s najvećim utjecajem na stvaranje 2-feniletanola *in vitro*.

U mojem istraživanju izoliran je samo 2-feniletanol (metabolitski nusprodukt triptofola). 2-feniletanol, triptofol i tirozol aromatski su alkoholi koje su identificirali Chan i Fink,<sup>114</sup> dok su samo tirozol izolirali Alem i suradnici te Chen i suradnici.<sup>115,116</sup>

Kosalec i suradnici pronašli su triptofol kao nusprodukt sekrecije samo kod *Candida albicans*. Čini se da svi alkoholi imaju važan utjecaj na dinamiku rasta i morfogenezu vrsta roda *Candida*. 2-feniletanol i triptofol u visokim koncentracijama ( $\geq 500$  µM) inhibiraju filamentni rast *Candida* i stvaranje bio filma, dok tirozol stimulira oba učinka.<sup>77,78,79</sup>

Martins i suradnici identificirali su izoamilni alkohol, 2-feniletanol, E-nerolidol te E-farnesol u ekstra celularnom mediju planktonskih stanica i stanicama bio filma *C. albicans*. 7,37 µmol/g suhe težine stanica 2-feniletanola izolirano je nakon 24 sata inkubacije u planktonskom obliku *C. albicans* odnosno 5,29 µmol/g suhe težine stanica 2-feniletanola nakon 24 sata inkubacije u bio filmu stanica *C. albicans*, a to se povećava s povećanim vremenom inkubacije. Autori su zaključili da izolirani alkoholi, uključujući 2-feniletanol inhibiraju morfološku tranziciju u vrstama roda *Candida*.<sup>117</sup>

## **5.5. Povezanost infekcija genitalnog trakta žena, stila života i općeg zdravstvenog stanja s učestalošću mikronukleusa**

U korelaciju su dovedeni simptomi, rezultati obrisaka vrata maternice na aerobe, gljive, ureaplazmu, klamidiju, hrHPV i Papa-testa sa učestalošću mikronukleusa.

Spontanom nastanku mikronukleusa pridonose različiti endogeni čimbenici, a dodatno čimbenici koji su normalno prisutni u okolišu, navike i način života. Poznavanje mehanizama i uzroka spontanog nastanka mikronukleusa vrlo je važno za pravilno tumačenje mikronukleus testa. Budući da su mikronukleusi pokazatelji oštećenja na razini DNA i /ili kromosoma i diobenog vretena, svi procesi koji izravno potiču takva oštećenja pridonose i porastu broja mikronukleusa.<sup>118</sup> Tu su posebno značajni oksidacijski procesi koji se odvijaju unutar stanice i organizma,<sup>119</sup> polimorfizmi gena te različite mutacije gena koje mogu rezultirati nestabilnostima genoma.<sup>120</sup>

U ovom istraživanju proučena je razina citogenetičkog oštećenja epitelnih stanica rodnice u pacijentica sa simptomima upale. Vrijednost za ukupni broj mikronukleusa utvrđena za promatrane pacijentice (medijan 6 mikronukleusa na 1000 stanica), vrlo je slična vrijednosti medijana od 6,5 mikronukleusa na 1000 stanica, koja je dobivena na osnovi vrednovanja gotovo 5000 pojedinačnih podataka iz 23 svjetske baze podataka i objavljena 2001.g.<sup>121</sup> Iz raspona pojedinačnih vrijednosti vidljive su individualne razlike koje su obilježje ljudske populacije i primjećene su u sličnim istraživanjima. U našem istraživanju najveći broj pojedinačnih vrijednosti se kretao od 6 do 9 mikronukleusa. U ranijim istraživanjima te su vrijednosti bile između 3 i 12 mikronukleusa.<sup>121</sup> Vidljivo je da prediktorske varijable (životne navike) poput alkohola i kave te izlaganje rendgenskom snimanju imaju utjecaj na učestalost mikronukleusa. Također je vidljivo (prikazano Paretovim dijagramom) da odljuštene epitelne stanice u pacijentica koje imaju cervikalnu leziju (rezultat Papa-testa) imaju veću učestalost mikro nuklearnih stanica. U ovom istraživanju veća je učestalost mikronukleusa dobivena u pacijentica kojima je iz obriska izoliran hrHPV visokog rizika. Iz ranijih istraživanja dokazano je da infekcije hrHPV-a visokog rizika su primarni etiološki agensi karcinoma vrata maternice. Dokazano je da je HPV ekspresor onkogenih proteina p53 i Rb, koji interferiraju sa kontrolnim funkcijama rasta stanice. To može imati za posljedicu pojavu genske nestabilnosti, koja dovodi do transformacije stanica.<sup>122-124</sup> U ovom istraživanju nije utvrđena bitna razlika u učestalosti mikronukleusa u lezijama vrata maternice niskog i visokog stupnja (Bethesda sustav). Na ukupni broj mikronukleusa utječe i klamidija izolirana iz obrisaka vrata maternice.

Istraživanja su različito organizirana te obuhvaćaju različitu populaciju, a ukupni je broj mikronukleusa nerijetko manji ili veći od ovoga broja koji je dobiven u ovom istraživanju. U većini istraživanja broj mikronukleusa kreće se između 7 i 10 mikronukleusa na 1000 stanica.<sup>125-129</sup>

U nekim istraživanjima postoji pozitivna korelacija između učestalosti mikronukleusa i životne dobi.<sup>121,125</sup> Starenjem nastaje niz procesa na razini stanice i organizma koji mogu utjecati na porast razine primarnih oštećenja DNA, povećanu učestalost kromosomskih aberacija, ali i spontani nastanak aneuploidije zbog gubitka pojedinih kromosoma.<sup>120,130,131</sup>

Podaci o medicinskoj izloženosti pri dijagnostičkim pretragama (ultrazvuk, x-zračenje) i njezinu doprinosu nastanka mikronukleusa su kontradiktorni. Suvremeni rendgenski uređaji tehnički su napredniji, pa su i niže doze zračenja koje se primaju pri pojedinoj dijagnostičkoj pretrazi. Nakon kraće izloženosti X-zračenju ne očekujemo veća oštećenja. Neki pojedinci genetički su osjetljiviji, pa je podatak o medicinskoj izloženosti x-zračenju važan pri tumačenju mikronukleus testa. Dijagnostički postupci u kojima je primjena kontrastnog

sredstva u vezi su sa porastom broja mikronukleusa.<sup>132,133</sup>

Na osnovi dosadašnjih iskustava i spoznaja, mikronukleus test ima veliku prednost pred ostalim citogenetičkim testovima jer omogućuje procjenu oštećenja na razini funkcije i cjelovitosti diobenog vretena, što ostale metode ne mogu. U praksi je važno utvrditi ukupan broj mikronukleusa kao vjerodostojan pokazatelj razine citogenetičkog oštećenja.

Mikronukleus test koristan je u otkrivanju nestabilnosti genoma koja se dovodi u vezu s povećanim rizikom od pojave raka.<sup>134</sup> Dokazana je i uzročno-posljedična veza između povećanog broja mikronukleusa i urogenitalnih karcinoma.<sup>135</sup> Također je dokazano da neovisno o sijelu karcinoma oboljeli ispitanici prije liječenja imaju povišenu razinu mikronukleusa u odnosu na opću populaciju.<sup>136</sup>

## 6. ZAKLJUČCI

1. Ustanovljena je značajna korelacija između prediktorskih varijabli (stila života i zdravstvenog stanja) i zavisnih varijabli (Papa-testa i mikrobiološke analize obrisaka vrata maternice i rodnice).
2. Rezultati dobiveni vezanim sustavom plinske kromatografije-masene spektrometrije (GC-MS) potvrdili su prisutnost metabolita 2-feniletanola *in vivo* u 14 (18,5%) od 76 ispitivanih uzoraka. U 9 (64,3%) od 14 uzoraka prisutnost NMM moglo se povezati s vrstama roda *Candida*.
3. Prisutnost simptoma, hrHPV i *Ureaplasma urealyticum* prediktorske su varijable s najvećim utjecajem na stvaranje NMM *in vivo*.
4. Rezultati *in vitro* potvrdili su da samo vrste roda *Candida* proizvode niskomolekularni metabolit 2-feniletanol u koncentracijama u rasponu 0,6-4,64 µg/ml. Stvaranje metabolita niske molekularne mase *in vivo* kao i *in vitro* potvrđeno je i povezano s vrstama roda *Candida*.
5. U ovom istraživanju veća je učestalost mikronukleusa dobivena u pacijentica kojima je iz obriska vrata maternice izoliran hrHPV visokog rizika.

## 7. SAŽETAK

Cilj ovog istraživanja je odrediti uzročne faktore nastanka infekcija genitalnog trakta žena i njihovu korelaciju s različitim prediktorskim varijablama uzimajući u obzir stil života i opće zdravstveno stanje. Također je ispitana uloga nisko molekularnih metabolita koje luče vrste roda *Candida* u nastanku infekcije te upotrebljivost mikronukleus testa kao citogenetičke tehnike u predviđanju nastanka infekcije.

U istraživanje su uključene 203 žene u dobi od 18 do 65 godina. Nakon ispunjavanja upitnika koji je sadržavao 37 pitanja o životnim navikama i općem zdravstvenom stanju, tijekom ginekološkog pregleda uzeti su obrisci vrata maternice i rodnice za mikrobiološku, citološku i analizu genotoksičnosti te iscjedak rodnice za GC-MS analizu.

Ustanovljena je značajna korelacija između prediktorskih varijabli (stila života i zdravstvenog stanja) i zavisnih varijabli (rezultati Papa-testa i obrisaka vrata maternice i rodnice). Rezultati GC-MS analize potvrdili su prisutnost metabolita 2-feniletanola *in vivo* u 14 od 74 ispitana uzorka. U 9 od 14 uzoraka prisutnost metabolita moglo se povezati s vrstama roda *Candida*. Prisutnost simptoma, hrHPV-a i *Ureaplasma urealyticum* prediktorske su varijable s najvećim utjecajem na stvaranje metabolita *in vivo*. Rezultati *in vitro* potvrdili su da su vrste roda *Candida* proizvele 2-feniletanol u koncentracijama u rasponu od 0,6-4,64 µg/mL. Potvrđeno je stvaranje 2-feniletanola *in vivo*, kao i *in vitro* povezano s vrstama roda *Candida*. Pored toga, temeljem rezultata statističkih testova može se zaključiti da su prisutnostsimptoma, hrHPV-a i *Ureaplasma urealyticum* također imali značajnu ulogu u stvaranju 2-feniletanola *in vivo*.

Broj mikronukleusa na 1000 vaginalnih epitelnih stanica kretao se u rasponu od 0 do 22 sa srednjom vrijednosti od 7,17. Veće vrijednosti povezane su s izloženosti rendgenskim zrakama tijekom liječničkog pregleda i redovitim konzumiranjem alkohola. Pacijenti s lezijama vrata maternice, prisutnošću hrHPV-a i / ili *C. trachomatis* također su pokazivali povećane vrijednosti stanica s mikronukleusima.

## 8. SUMMARY

### **Correlation of bacterial, fungal and viral infections of the female genital tract with their lifestyle habits, general health and creating of low-molecular metabolites**

The aim of this study was to determine the causal factors for the development of the infection of the female genital tract and their correlation with different predictor variables taking into account the lifestyle and general health status. The role of low molecular weight metabolites produced by *Candida* species in the infections development and usability of the micronucleus test as a cytogenetic technique in the prediction of the infection was also examined.

203 women in the age range from 18 to 65 years were included in the study. After the completion of questionnaire all the patients were subjected to Pap test, cervical swabs for the presence of aerobic bacteria, yeasts, *Ureaplasma urealyticum*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma*, and hrHPV DNA. Separate samples of vaginal secretion were taken for GC-MS analysis of metabolites and micronucleus assay.

A significant correlation between the predictor variables (lifestyle and health status) and dependent variables (results of Pap tests and cervical smears) was confirmed. GC-MS analysis confirmed the presence of the metabolite 2-phenylethanol *in vivo* in 14 of 74 samples tested. In 9 out of 14 samples the presence of metabolite could be related to *Candida* species. The symptoms, hrHPV and *Ureaplasma urealyticum* were the predictor variables with the highest influence on the formation of the metabolite *in vivo*. *In vitro* results confirmed that the *Candida* species produce 2-phenylethanol in the concentrations ranging from 0.6-4.64 mg/mL. The formation of 2-phenylethanol, both *in vivo* and *in vitro*, was confirmed and connected with *Candida* species. Besides, according to statistical tests it seems that presence of symptoms, hrHPV DNA and *Ureaplasma urealyticum* had also significant role on the formation of 2-phenylethanol *in vivo*.

Number of micronuclei per 1000 vaginal epithelial cells ranged from 0 to 22 with the

mean value of 7.17. Higher values were associated with the exposure to X-rays during medical examination and regular alcohol consumption. The patients with cervical lesions, presence of hrHPV DNA and/or *Chlamydia trachomatis* also exhibited increased values of micronucleated cells.

## 9. LITERATURA

1. Weinstein L. The bacterial flora of the human vagina. *Yale J Biol Med* 1938; 10: 247-260.
2. Monif GR, Welkos SL, Baer H. Impact of diverging anaerobic technology on cul-de-sac isolates from patients with endometritis/salpingitis/peritonitis. *Am J Obstet Gynecol* 1982; 124: 896-900.
3. Ohm JM, Galask RP. Bacterial flora of the cervix from 100 pre-hysterectomy patients. *Am J Obstet Gynecol* 1975; 122: 638-647.
4. Gopplerud CP, Ohm MJ, Galask RP. Anaerobic and aerobic flora of the cervix during pregnancy and the puerperium. *Am J Obstet Gynecol* 1976; 126: 858-868.
5. Bartlett JG, Onderdonk AB, Drude E, Goldstein C, Anderka M, Alpert S, McCormack WM. Quantitative bacteriology of the vaginal flora. *J Infect Dis* 1977; 136: 271-277.
6. Roy S, Sharma M, Ayyagari A, Malhotra S. A quantitative study of bacterial vaginosis. *Indian J Med Res* 1994; 100: 172-176.
7. Smith T. Parasitism and disease. Princeton NJ. Princeton University Press, 1934: 196.
8. Karelović D i sur. Infekcije u ginekologiji i perinatologiji. Medicinska naklada, Zagreb 2012.
9. Schuchat A, Wenger JD. Epidemiology of group B streptococcal disease: risk factors; prevention strategies and vaccine development. *Epidemiol Rev* 1994; 16: 374-402.
10. MMWR. Prevention of perinatal group B streptococcal disease: a public health perspective. *Morb Mortal Wkly Rep* 1996; 45: 1-24.
11. Holmes KK, Chen KC, Lipinski CM, Eschenbach, DA. Vaginal redox potential in bacterial vaginosis (nonspecific vaginitis). *J Infect Dis* 1985; 152: 379-382.
12. Shubair M, Synder IS, Larsen B. *Gardnerella vaginalis* hemolysin. III. Effects on human leukocytes. *Immunol Infect Dis* 1993; 3: 149-153.
13. Glover DD, Larsen B. Longitudinal investigation of *Candida vaginitis* in pregnancy: role of superimposed antibiotic use. *Obstet Gynecol* 1998; 91: 115-118.
14. White S, Larsen B. *Candida albicans* morphogenesis is influenced by estrogen. *Cell Molecul Life Sci* 1997; 53: 744-749.
15. Savage DC. Microbial interference between indigenous yeast and lactobacilli in the rodent stomach. *J Bacteriol* 1969; 98: 1278-1283.
16. Hipp SS, Lawton WD, Chen NC, Gaafar HA. Inhibition of *Neisseria gonorrhoeae* by a factor produced by *Candida albicans*. *Appl Microbiol* 1974; 27: 192-196.
17. Shah D, Larsen B. Identity of a *Candida albicans* toxin and its production in vaginal secretions. *Med Sci Res* 1992; 20: 353-355.



18. Fidel P. History and update on host defense against vaginal candidiasis. *Am J Reproductive Immunol* 2007; 57: 2-12.
19. Mycoplasma and Ureaplasma. U: Murray Pr, Rosenthal KS, Pfaller MA, ur. *Medical Microbiology*, 6<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Mosby Elsevier 2009; 421-5.
20. Elsner M. Small but not simple. *Nat Biotechnol* 2010; 28 (1): 42.
21. Taylor PR, Tsoni SV, Willment JA, Dennehy KM, Rosas M, Findon H, Haynes K, Steele C, Botto M, Gordon MS, Brown GD. Dectin-1 is required for beta-glucan recognition and control of fungal infection. *Nat Immunol* 2007; 8: 31-38.
22. Miyata M. Unique centipede mechanism of Mycoplasma gliding. *Annu Rev Microbiol* 2010; 64: 519-37.
23. Trouchetet ME, Beven L, Renaudin H i sur. Potential role of *Mycoplasma hominis* in interleukin (IL)-17- producing CD4+ T-cell generation via induction of IL-23 secretion by human dendritic cells. *J Infect Dis* 2011; 204 (11): 1796-805.
24. Waites KB, Taylor-Robinson D. Mycoplasma and ureaplasma. U: Murray PR, Barron EJ, Pfaller MA, Tenover F, Tenover F, Tenover F, Yolken RH (ur.) *Manual of Clinical Microbiology*, 7<sup>th</sup> Ed. American Society for Microbiology, Washington DC, USA 1999; 782-794.
25. Sung TJ. Ureaplasma infection in pre-term infants: Recent information regarding the role of Ureaplasma species as neonatal pathogens. *Korean J Pediatr* 2010; 53 (12): 989-93.
26. Kalenić S. Mikoplazme. U: Kalenić S, Mlinarić-Missoni E, (ur.). *Medicinska bakteriologija i mikologija*. Merkur A.B.D., Zagreb, 2001: 315-320.
27. Manavi K. A review on infection with *Chlamydia trachomatis*. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2006; 20: 941-951.
28. Punda-Polić V. Klamidije. U: Kalenić S, Mlinarić-Missoni E, (ur.) *Medicinska bakteriologija i mikologija*. Zagreb: Merkur; 2001; 243-359.
29. Belland RJ, Zhong G, Crane DD. Genomic transcriptional profiling of the developmental cycle of *Chlamydia trachomatis*. *PNAS* 2003; 100: 8478-8483.
30. Schachter J, Stephens R. *Biology of Chlamydia trachomatis*. U: Holmes KK, Sparling PF, Stamm WE. (ur.), *Sexually Transmitted Diseases*. New York: Mc Graw Hill Medical 2008; 554-574.
31. Gaydos CA, Howell MR, Pare B i sur. *Chlamydia trachomatis* infection in female military recruits. *N Engl J Med* 1998; 339: 739-44.
32. Paavonen J, Stevens CE, Wølner-Hanssen. Colposcopic manifestations of cervical and vaginal infections. *Obstet Gynecol Surv* 1988; 43: 373-381.
33. Kumar Vinay, Abbas Abul K, Fausto Nelson Mitchell, Richard N. Robbins *Basic*

- Pathology (8<sup>th</sup> ed.). Saunders Elsevier 2007; 705-6.
34. Sparling F. Biology of *Neisseria gonorrhoeae*. U: Holmes KK, Sparling FP, Stamm WE; (ur.) i sur. Sexually transmitted diseases. 4. izd. New York: Mc Graw-Hill, 2008; 608-26.
  35. Sacks SL, Griffiths PD, Corey L. HSV-2 transmission. *Antiviral Res* 2004; 63: S27-35.
  36. Genital Herpes Sexually Transmitted diseases: <http://www.cdc.gov/std/Herpes/default.htm>
  37. Elgui de Oliveira D. DNA viruses in human cancer: An integrated overview of fundamental mechanisms of viral carcinogenesis. *Cancer Lett* 2007; 247: 182-196.
  38. Obalek S, Jablonska S, Orth G. Warts and HPV-related squamous cell tumors of the genitoanal region in children. U: Gross G, von Krogh G, (ur.) Human papillomavirus infections in dermatovenerology. CRC-Press, Boca Raton, FI (USA) 1997: 305-314.
  39. Zur Hausen H, De Villiers Em. Human papillomaviruses. *Ann Rev Microbiol* 1994; 48: 427-447.
  40. Daling JR, Sherman KJ. Relationship between human papillomavirus infection and tumors of anogenital sites other than the cervix. U: Muñoz N, Bosch FX, Shah KV, Maheus A. (ur.), The epidemiology of cervical cancer and Human Papillomavirus. International Agency for research of cancer (IARC), Lyon 1992; 223-238.
  41. Von Krogh G. Genitoanal papillomavirus infection: diagnostic and therapeutic objectives in the light of current epidemiological observations. *Int J STD AIDS* 1991; 2: 391-404.
  42. Syrjänen KJ. Epidemiology of human papillomavirus (HPV) infections and their associants with genital squamous cell cancer. *APMIS* 1989; 97: 957-970.
  43. De Klerk HC, Cortzec JM. Antibiosis among lactobacilli. *Nature* 1961; 192: 340-341.
  44. Rogosa M, Shape ME. Species differentiation of human vaginal lactobacilli. *J Gen Microbiol* 1960; 23: 197-201.
  45. Reid G, Servin AL, Bruce AW, Busscher HJ. Adhesion of three *Lactobacillus* strains to human urinary and intestinal epithelial cells. *Microbios* 1993; 75: 57-65.
  46. Raz R, Stamm We. A controlled trial of intravaginal estriol in postmenopausal women with recurrent urinary tract infections. *N Engl J Med* 1993; 329: 753-756.
  47. Eshenbach D, Davick PR, Williams BL. Prevalence of hydrogen peroxide-producing *Lactobacillus* species in normal women and women with bacterial vaginosis. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 251-256.
  48. Hillier SL, Krohn MA, Rabe LK. The normal flora, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producing lactobacilli, and bacterial vaginosis in pregnant women. *Clin Infect Dis* 1993; 16: 273-281.
  49. Rich RR. Clinical immunology: principles and parctice. Vol 2 St. Louis: Mosby; 1996.

50. Calderone RA. (ur.), *Candida and Candidiasis*. Washington, D.C.: America Society for Microbiology Press; 2002.
51. Richardson MD, Warnock DW. *Fungal Infection: Diagnosis and Management*. Oxford: Blackwell Publishing; 2003.
52. Mitrović S. Faktori patogenosti gljiva roda *Candida* (doktorska disertacija). Beograd: Medicinski fakultet; 1994.
53. Frey C, Barone J, Drutz DJ. Role of *Candida albicans* C3b receptor in fungal adherence to endothelial cells (abstr). 90<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society of Microbiology. Washington: American Society of Microbiology; 1990: 425 (ab F101).
54. Heidenreich F, Dierich M. *Candida albicans* and *Candida stellatoidea*, in contrast to other *Candida* species, bind iC3b and C3d but not C3b. *Infect Immun* 1985; 50: 598-603.
55. King RD, Lee JC, Morris AL. Adherence of *Candida albicans* and other *Candida* species to mucosal epithelial cells. *Infect Immun* 1980; 27: 667-673.
56. Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbial Mol Biol Rev* 2003; 67: 400-428.
57. Villar CC, Kashleva H, Mitchell AP, Dongari-Bagtzoglou A. Invasive phenotype of *Candida albicans* affects the host proinflammatory response to infection. *Infect Immun* 2005; 73: 4588-4595.
58. Filler SG, Sheppard DC. Fungal invasion of normally non-phagocytic host cells. *PLOS Pathog* 2, 2006; 129.
59. Mavor AL, Thewwes S, Hube B. Systemic fungal infections caused by *Candida species*: epidemiology, infection process and virulence attributes. *Curr Drug Targets* 2005; 6: 863-874.
60. Saville SP, Lazzell AL, Monteagudo C, Lopez-Ribot JL. Engineered control of cell morphology in vivo reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of *Candida albicans* during infection. *Eukaryot Cell* 2003; 2: 1053-1060.
61. Ashman RB, Farah CS, Wanasaengsakul S, Hu Y, Pang G, Clancy RL. Innate versus adaptive immunity in *Candida albicans* infection. *Immunol Cell Biol* 2004; 82: 196-204.
62. Netea MG, Gow NAR, Munro CA, Bates S, Collins C, Ferwerda G, Hobson RP, Bertram G, Hughes HB, Jansen T, Williams L, Torensma R, McKinnon A, MacCallum DM, Odds FC, An der Meer JWM, Brown AJP, Kulberg BJ. Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors. *J Clin Invest* 2006; 116: 1642-1650.
63. Weindl G, Naglik JR, Kaesler S, Biedermann T, Hube B, Korting HC, Schaller M. Human epithelial cells establish direct antifungal defense through TLR4-mediated signaling. *J*

- Clin Invest 2007; 117: 3664-3672.
64. Taylor PR, Tsoni SV, Willment JA, Dennehy KM, Rosas M, Findon H, Haynes K, Steele C, Botto M, Gordon MS, Brown GD. Dectin-1 is required for beta-glucan recognition and control of fungal infection. *Nat Immunol* 2007; 8: 31-38.
  65. Gow NAR, Netea MGCA, Munro G, Ferwerda S, Bates HM, Mora-Montes L, Walker T, Jansen L, Jacobs V, Tsoni GD, Brown FC, Odds JWM, Vander Meer AJP, Brown B, Kulberg J. Immune recognition of *Candida albicans*  $\beta$ -glucan by dectin-1. *J Infect Dis* 2007; 196: 1565-1571.
  66. Koh AYJR, Köhler KT, Coggshall N, Van Rooijen & Pier GB. Mucosal damage and neutropenia are required for *Candida albicans* dissemination. *PLoS Pathog* 4, e35. Doi: 10.1371/journal.ppat.0040035 (2008)
  67. De Luca A, Montagnoli C, Zelante T, Bonifazi P, Bozza S, Moretti S, D'Angelo C, Vacca C, Boon L, Bistoni F, Puccetti P, Fallarino F, Romani L. Functional yet balanced reactivity to *Candida albicans* requires TRIF, MyD88, and IDO-dependent inhibition of Rorc. *J Immunol* 2007; 179: 5999-6008.
  68. Parr MB, Parr EL. Langerhans cells and T lymphocyte subsets in the murine vagina and cervix. *Biol Reprod* 1991; 44: 491-498.
  69. Mathur S, Virella G, Koistinen J, Horger EO, Mahvi TA, Fudenberg HH. Humoral immunity in vaginal candidiasis. *Infect Immun* 1997; 15: 287-294.
  70. Wira CR, Rossoll RM. Antigen-presenting cells in the female reproductive tract: influence of sex hormones on antigen presentation in the vagina. *Immunology* 1995; 84: 505-508.
  71. Fidel PL, Sobel JD. Immunopathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. *Clin Microbiol Rev* 1996; 9: 335-348.
  72. Nossal GJV. Immunological tolerance: Collaboration between antigen and lymphokines. *Science* 1989; 245: 147-153.
  73. Inagaki S, Morimura S, Gondo K, Tang Y, Akutagawa H, Kida K. Isolation of Tryptophol as an Apoptosis-Inducing Component of Vinegar Produced from Boiled Extract of Black Soybean in Human Monoblastic Leukemia U937 Cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 2007; 71: 371-379.
  74. Kosalec I, Pepeljnjak S, Antolović R, Jelić D, Galtier P, Puel O. Cytotoxicity screening of low-molecular-weight metabolites of *Candida* spp. *Acta Microbiol Immunol Hung (CEFOM)*, Budapest: Akademiai Kiado; 2005; 80.
  75. Šafranić A, Bačun-Družina V, Kosalec I, Ramić S, Kopjar N. Evaluation of tryptophol toxicity in human lymphocytes using the cytokinesis-block micronucleus assay in vitro.

- From Genes to Molecular Epidemiology, 36<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society / Šram, Radim J. (ur.). Prag, Češka: EEMS; 2006; 170.
76. Kosalec I, Kopjar N, Ramić S, Bačun-Družina V. Genotoxicity and mutagenicity of tryptophol from *Candida albicans*. Power of Microbes in Industry and Environment / Kosalec I, Pigac J, Vujaklija D. (ur.). Zagreb: Hrvatsko mikrobiološko društvo; 2007; 116.
  77. Kosalec I, Puel O, Delaforge M, Kopjar N, Antolovic R, Jelic D, Matica B, Galtier P, Pepeljnjak S. Isolation and cytotoxicity of low-molecular-weight metabolites of *Candida albicans*. Front Biosci 2008a; 13: 6893-6904.
  78. Kosalec I, Safranić A, Pepeljnjak S, Bacun-Druzina V, Ramić S, Kopjar N. Genotoxicity of tryptophol in a battery of short-term assays on human white blood cells in vitro. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2008b; 102: 443-452.
  79. Kosalec I, Ramić S, Jelić D, Antolović R, Pepeljnjak S, Kopjar N. Assessment of tryptophol genotoxicity in four cell lines in vitro: a pilot study with alkaline comet assay. Arh. Hig. Rada Toksikol. 2011; 62: 41-49.
  80. Meurman J. H, Uttamo J. Oral micro-organisms in the etiology of cancer. Acta Odontol Scand. 2008; 66(6): 321-326.
  81. Kurkivuori J, Salaspuro V, Kaihovaara P, Kari K, Rautemaa R, Grönroos L, Meurman J, Salaspuro M. Acetaldehyde production from ethanol by oral streptococci. Oral Oncol. 2007; 43(2): 181-186.
  82. Homann N, Jousimies-Somer H, Jokelainen K, Heine R, Salaspuro M. High acetaldehyde levels in saliva after ethanol consumption: methodological aspects and pathogenic implications. Carcinogenesis 1997; 18: 1739-1743.
  83. Salaspuro MP. Acetaldehyd, microbes, and cancer of the digestive tract. Crit Rev Clin Lab Sci 2003; 40: 183-208.
  84. Jokelainen K, Siitonen A, Jousimies-Somer H, Nosova T, Heine M, Salaspuro M. In vitro alcohol dehydrogenase-mediated acetaldehyde production by aerobic bacteria representing the normal colonic flora in man. Alcohol Clin Exp Res 1996; 20: 967-972.
  85. Nosova T, Jousimies-Somer H, Jokelainen K, Heine R, Salaspuro M. Acetaldehyde production and metabolism by human indigenous and probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. Alcohol Alcoholism 2000; 35: 561-568.
  86. Salaspuro MP. Acetaldehyd, microbes, and cancer of the digestive tract. Crit Rev Clin Lab Sci 2003; 40: 183-208.

87. Tillonen J, Homann N, Rautio M, Jousimies-Somer H, Salaspuro M. Role of yeasts in the salivary acetaldehyde production from ethanol among risk groups for ethanol-associated oral cavity cancer. *Alcohol Clin Exp Res* 1999; 23: 1409-1415.
88. Nagy KN, Sonkodi I, Szoke I, Nagy E, Newman HN. The microflora associated with human oral carcinomas. *Oral Oncol* 1998; 34: 304-308.
89. Obe G, Jonas R, Schmidt S. Metabolism of ethanol in vitro produces a compound which induces sister-chromatid exchanges in human peripheral lymphocytes in vitro: acetaldehyde not ethanol is mutagenic. *Mutat Res* 1986; 174: 47-51.
90. Yokoyama A, Muramatsu T, Ohmori T, Yokoyama T, Okuyama K, Takahashi H. Alcohol-related cancers and aldehyde dehydrogenase-2 in Japanese alcoholics. *Carcinogenesis* 1998; 19: 1383-1387.
91. Fenech M. The cytokinesis-block micronucleus technique: detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutat Res* 1993; 285: 35-44.
92. Norppa H, Luomahaara S, Heikonen H, Roth S, Sorsa M, Renzi L, Lindholm C. Micronucleus assay in Lymphocytes as a tool to biomonitor human exposure to aneuploidogens and clastogens. *Environ Health Persp* 1993; 101: 139-143.
93. Kirsch-Volders M, Elhajouji A, Cundari E, Vanhumelen P. The in vitro micronucleus test-a multiendpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction. *Mutat Res* 1997; 392: 19-30.
94. Albertini RJ, Nicklas JA, O'Neill JP. Future research directions for evaluating human genetic and cancer risk from environmental exposures. *Environ Health Persp* 1996; 104: 503-510.
95. Fučić A. Comet assay: a new approach in genotoxicological research: *Arh Hig Rada Toksikol* 1997; 48: 413-419.
96. Kerr JFR, Harmon BV. Definition and incidence of apoptosis: an histological perspective. U: Tomei LD, Cope FO. (ur.), *Apoptosis: the molecular basis of cell death*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1991; 5-29.
97. Scott D, Barber JBP, Levine EL, Burril W, Roberts SA. Radiation-induced micronucleus induction in lymphocytes identifies a high frequency of radiosensitive cases amongst breast cancer patients: a test for predisposition. *Br J Cancer* 1998; 77: 614-620.
98. Rahm VA, Odland V, Pettersson R. *Chlamydia trachomatis* in sexually active teenage girls. Factors related to genital chlamydial infections: a prospective study. *Genitourin Med* 1991; 67: 317-321.

99. Gram IT, Macaluso M, Stalsberg H. Incidence of cervical intraepithelial neoplasia grade III, and cancer of the cervix uteri following a negative Pap-smear in an opportunistic screening. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1998; 77(2): 228–232.
100. Ho GYF, Kadish AS, Burk RD, Basu J, Palan PR, Mikhail M, Romney SL. HPV16 and cigarette smoking as risk factors for high-grade cervical intra- epithelial neoplasia. *Int J Cancer* 1998; 78: 281–285.
101. Cotton SC, Sharp L, Seth R, Masson LF, Little J, Cruickshank ME, Neal K, Waugh N. Lifestyle and socio-demographic factors associated with high-risk HPV infection in UK women. *Br J Cancer* 2007; 97: 133–139.
102. Del Prete R, Di Taranto AM, Lipsi MR, Nirchio V, Antonetti R, Miragliotta G. Prevalence and genotypes identification of human papillomavirus infection in a population of South Italy. *J Clin Virol* 2008; 42: 211–214.
103. Bardin A, Vaccarella S, Clifford GM, Lissowska J, Rekosz M, Bobkiewicz P, Kupryjan'czyk J, Krynicki R, Jonska-Gmyrek J, Danska-Bidzinska A, Snijders PJF, Meijer CJLM, Zatonski W, Franceschi S. Human papillomavirus infection in women with and without cervical cancer in Warsaw, Poland. *Eur J Cancer* 2008; 44: 557–564.
104. Bell MC, Schmidt-Grimminger D, Patrick S, Ryschon T, Linz L, Chauhan SC. There is a high prevalence of human papillomavirus infection in American Indian women of the Northern Plains. *Gynecol Oncol* 2007; 107: 236–241.
105. Clarke MA, Gage JC, Ajenifuja KO, Wentzensen NA, Adepiti AC, Wacholder S, Burk RD, Schiffman M. A population based cross-sectional study of age-specific risk factors for high risk human papillomavirus prevalence in rural Nigeria. *Infect Agents Cancer* 2011; 6: 12–19.
106. Ness RB, Hillier SL, Richter HE, Soper DE, Stamm C, McGregor J, Bass DC, Sweet RL, Rice P. Douching in relation to bacterial vaginosis, lactobacilli, and facultative bacteria in the vagina. *Obstet Gynecol* 2002; 100: 765–772.

107. Russo JF, Coppola K, Furness G (1981) *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, and *Corynebacterium genitalium* recovered from the lower genital tracts of adolescent women. *Int J Gynecol Obstet* 1981; 19: 461–466.
108. Van der Schee C, Sluiters HJF, van der Meijden WI, van Beek P, Peerbooms P, Verbrugh H, van Belkum A. Host and pathogen interaction during vaginal infection by *Trichomonas vaginalis* and *Mycoplasma hominis* or *Ureaplasma urealyticum*. *J Microbiol Meth* 2001; 45: 61–67.
109. Pordeli HA. Prevalence and detection of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in endocervical specimens from women with genitourinary tract diseases in Iran. *Int J Infect Dis* 12(Suppl 1):e 2008; 179.
110. Young H, Tuach S, Bain SSR. Incidence of *Ureaplasma urealyticum* infection in women attending a clinic for sexually transmitted disease. *J Infect* 1981; 3: 258–265.
111. Sobel JD. Vulvovaginal candidosis. *Lancet* 2007; 369: 1961–1971. Guijon F, Paraskevas M, Rand F, Heywood E, Brunham R, McNicol P. Vaginal microbial flora as a cofactor in the pathogenesis of uterine cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Gynecol Obstet* 1992; 37: 185–191.
112. Takac I. The frequency of bacterial and yeast infection in women with different grades of cervical intraepithelial neoplasia (CIN). *Eur J Obstet Gynecol Rep Biol* 1998; 80: 231–234.
113. Gregus P, Vlckova' H, Buchta V, Kestranek J, Krivc'kova' L, Nova'kova' L. Ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of quorum-sensing molecules of *Candida albicans*. *J Pharm Biomed Anal* 2010; 53(3): 674–681.
114. Chen H, Fink GR. Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols. *Genes Dev* 2006; 20: 1150–1161.
115. Alem MA, Oteef MD, Flowers TH, Douglas LJ. Production of tyrosol by *Candida albicans* biofilms and its role in quorum sensing and biofilm development. *Eukaryot*

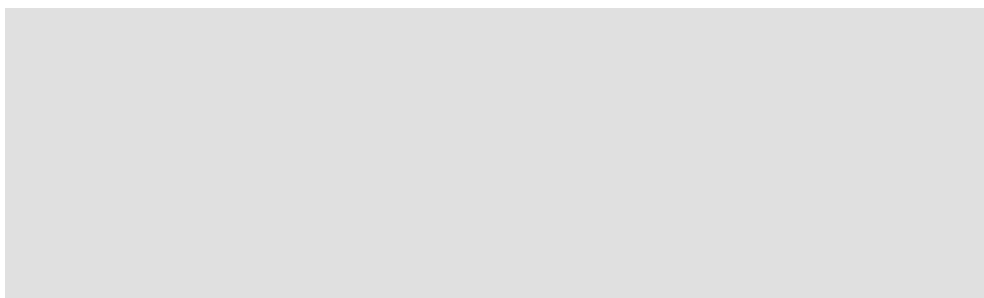


Cell 2006; 5: 1770–1779.

116. Chen HM, Feng FQ, Clardy J, Fink GR. Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. Proc Natl Acad Sci USA 2004; 101: 5048–5052.
117. Martins M, Henriques M, Azeredo J, Rocha SM, Coimbra MA, Oliveira Morphogenesis control in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* through signaling molecules produced by planktonic and biofilm cells. Eukaryot Cell 2007; 6 (12): 2429–2436.
118. Murgia E, Ballardini M, Bonassi S, Rossi AM, Barale R. Validation of micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes as early cancer risk biomarker in a nested case-control study. Mutat Res 2008; 639: 27-34.
119. Burcham PC. Internal hazards: baseline DNA damage by endogenous products of normal metabolism. Mutat Res 1999; 443: 11-36.
120. Mateuca R, Lombaert N, Aka PV, Decodier I, Kircsch-Volders M. Chromosomal changes; induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. Biochemie 2006; 88: 1515-31.
121. Bonassi S, Fenech M, Lando C, Lin Y, Ceppi M, Chang WP, Holland N, Kircsch-Volders M, Zeiger E, Ban S, Barale R, Bigatti M, Bolognesi C, Jia C, Di Giorgio M, Ferguson LR, Fučić A, Garcia Lima O, Hrelia P, Krisnaja Ap, Lee T-K, Migliore L, Mikhalevich L, Mirkova E, Mosesso P, Müller W-U, Odagiri Y, Scarfo M, Szabova E, Vorobtsova I, Vral A, Zijino A. Human Micronucleus Project: International database comparison for results with the Cytokinesis-Block Micronucleus Assay in human lymphocytes: I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria, and host factors on the frequency of micronuclei. Environ Mol Mutagen 2001; 37: 31- 45.
122. Mürger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M, Grace M, Huh K. Mechanisms of human papillomavirus - induced oncogenesis. J Virol 2004; 78: 11451-60.
123. Wise-Draper TM, Wells SI. Papillomavirus E6 and E7 proteins and their cellular targets. Front Biosci 2008; 13: 1003-1017.
124. Tungteakkhun SS, Duerksen- Hughes PJ. Cellular binding partners of the human papillomavirus E6 protein. Arch Virol 2008; 153: 397-408.
125. Fenech M, Morley AA. Measurement of micronuclei in lymphocytes. Mutat Res Tungteakkhun SS, Duerksen- Hughes PJ. Cellular binding partners of the human 1985; 147: 29-36.

126. Heddle JA, Cimino MC, Hayashi M, et al. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present and future. *Environ Mol Mutagen* 1991; 18: 277-91.
127. Yager J. The effect of background variables on human peripheral lymphocyte micronuclei. *IARC Sci Publ* 1990; 104: 147-50.
128. Norppa H, Luomahaara S, Heikanen H, Roth S, Sorsa M, Renzi L, Lindholm C. Micronucleus assay in lymphocytes as a tool to biomonitor human exposure to aneuploidogens and clastogens. *Environ Health Persp* 1993; 101(Suppl 3): 139-43
129. Elhajouji A, Cunha M, Kirsch-Volders M. Spindle poisons can induce polyploidy by mitotic slippage and micronucleate mononucleates in the cytokinesis-block assay. *Mutagenesis* 1998; 13: 193-8.
130. Guttenbach M, Schakowski R, Schmid M. Aneuploidy and ageing:sex chromosome exclusion into micronuclei. *Hum Genet* 1994; 94: 295-8.
131. Catalán J, Autio K, Wessman M, Lindholm C, Knuutila S, Sorsa M, Norppa H. Age-associated micronuclei containing centromeres and the X chromosome in lymphocytes of women. *Cytogenet Cell Genet* 1995; 68: 11-6.
132. Cochran ST, Khodadoust A, Norman A. Cytogenetic effects of contrast material in patients undergoing excretory urography. *Radiology* 1980; 136: 43-6.
133. Norman A, Cochran S, Bass D, Roe D. Effects of age,sex and diagnostic X-rays on chromosome damage. *Int J Radiat Biol* 1984; 46: 317-21.
134. Fenech M, Crott JW. Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes-evidence for breakage-fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutat Res* 2002; 504: 131-6.
135. Bonassi S, Znaor A, Ceppi M, Lando C, Chang WP, Holland N, Kirsch-Volders M, Zeiger E, Ban S, Barale R, Bigatti P, Bolognesi C, Cebulska-Wasilewska A, Fabianova E, Fučić A, Hagmar L, Joksić G, Martelli A, Migliore L, Mirkova E, Scarfi MR, Zijno A, Norppa H, Fenech M. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis* 2007; 28: 625-31.
136. Milošević-Đorđević O, Grujičić D, Vasković Ž, Marinković D. High micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes of untreated cancer patients irrespective of gender, smoking and cancer sites. *Tohoku J Exp Med* 2010; 220: 115-20.

## 10. BIOGRAFIJA



**Obrazovanje** Specijalizacija iz ginekologije i opstetricije u Kliničkoj bolnici Merkur od 1997. do 2001. g.

Poslijediplomski studij iz Pretkliničke eksperimentalne farmakologije na Medicinskom fakultetu u Zagrebu od 1994. do 1998. g.

2. lipnja 1998. g. u Zagrebu na Medicinskom fakultetu obranila je magistarsku radnju pod naslovom „Učinak Lamotrigina na refleksnu aktivnost kralješničke moždine” te stekla naslov magistra znanosti.

Od 1988. do 1993. g. polazi Medicinski fakultet u Zagrebu te 1993. g. diplomira.

**Zaposlenja** Od 2004. g. obavlja privatnu praksu.

Od 1994. do 2004. g. zaposlenica Doma zdravlja u Sesvetama.

**Znanstveni interes** Dijagnostika genitalnih infekcija u žena i ultrazvučna dijagnostika u ginekologiji opstetriciji. Sudjelovala u izradi normograma za double test. Izrada normograma za anti-mullerov hormon u populaciji zdravih žena reproduktivne dobi. Redovito sudjelovanje u europskim i hrvatskim znanstvenim i stručnim skupovima iz područja ginekologije i opstetricije, bolesti dojke te urogenitalnih infekcija. Služi se njemačkim i engleskim jezikom.

**Članstva u** Društvo za ginekologiju i opstetriciju pri HLZ-u

**društvima** Liječnička komora

Udruga poslodavaca u zdravstvu

## **Popis radova prema Hrvatskoj znanstvenoj bibliografiji**

### **Izvorni znanstveni i pregledni radovi u CC časopisima**

1. Findri-Guštek Š, Petek MJ, Sarajlija H, Mršić G, Džepina AM, Oreščanin V. The correlation of the lifestyle and medical conditions with the vaginal infections and production of 2-phenylethanol. Arch. Gynecol. Obstet. 2012; 286 (3), 671-682.
2. Hunjak B, Findri-Guštek Š, Kolarić B, Fisonić I, Lukić-Grlić A, Vojnović G. Lower Urinary Tract Infections and the Effects of Hormone Therapy in Postmenopausal Women in the Zagreb Region. Collegium Antropologicum. 2012; čeka na objavu pod brojem 10224
3. Orescanin V, Kopjar N, Durgo K, Elez L, Findri-Gustek S, Franekic Colic J. Citotoxicity Status of Electrolating Wasterwater prior/after Neutralization/Purification with Alkaline Solid Residue of Electric Arc Furnace Dust. J. Environ. Sci. Health Part A. 2009; 44: 273-278.

### **Sažeci u zbornicima i skupovima**

1. Findri-Guštek Š, Oreščanin V, Kopjar N, Petrović-Raškovski B, Hunjak B. Pozitivna korelacija između učestalosti mikronukleusa i displazije u Papa razmazima//Knjiga sažetaka/Škerk, Višnja (ur.) Zagreb: Hrvatsko društvo za urogenitalne i spolno prenosive infekcije HLZ-a i Klinika za infektivne bolesti; 2012.
2. Kosalec I, Kopjar N, Jelić D, Šegvić Klarić M, Petek MJ, Findri- Guštek Š, Fichorova RN. Cytotoxicity, genotoxicity and microbial activity of 2- phenylethanol, a methabolite of Candida spp., wich is produced in vitro and in vivo. 2<sup>nd</sup> Joint Workshop of ÖGMM, ÖGACH, ÖGIT&ÖGHMP- MedMyc2011. Book of Abstracts of Medical Mycology-From Basic to Clinical Needs. Campus Vienna Biocenter, December 8-10, 2011; 21-21.
3. Findri-Guštek Š, Petek MJ, Sarajlija H, Mršić G, Kosalec I. Povezanost kandidoza s tvorbom niskomolekularnog metabolita 2-feniletanola u uvjetima in vivo i in vitro//Knjiga sažetaka/Škerk, Višnja (ur.). Zagreb: Hrvatsko društvo za urogenitalne i spolno prenosive infekcije HLZ-a i Klinika za infektivne bolesti, 2010; 75-75.

**magistarski** Findri Š. Učinak Lamotrigina na refleksnu aktivnost kralješničke  
**rad** moždine. Magistarski rad. Zagreb: Medicinsk fakultet, 2.6.1998., voditelj:  
Juraj Geber.