

SVEUČILIŠTE U SPLITU

MEDICINSKI FAKULTET

Silvana Karabatić Knezović

**ANALIZA POVEZANOSTI POLIMORFIZMA GENA *TOLL-LIKE* RECEPTORA
2, 3 I 9 S KERATOAKANTOMOM I VIRUSNIM BRADAVICAMA**

Doktorski rad

Split, 2025.

Doktorski rad je izrađen u Laboratoriju za dermatološku patohistologiju Klinike za kožne i spolne bolesti Kliničkog bolničkog centra Split, te u Laboratoriju za molekularnu genetiku Kliničkog zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju Kliničkog bolničkog centra Split.

Mentor: prof. dr. sc. Irena Drmić Hofman.

Komentor: prof. dr. sc. Neira Puizina Ivić.

ZAHVALE

Hvala mojoj obitelji, suprugu Draženu i kćerima Dori i Jeleni, na beskrajnoj ljubavi, strpljenju i razumijevanju. Njihova podrška i vjera u mene bili su moj najveći oslonac kroz sve izazove ovog zahtjevnog puta. Hvala im što su bili uz mene u svakom trenutku, što su me bodrili kad je bilo teško, i što su svojom topline i prisutnošću činili svaki korak lakšim.

Od srca zahvaljujem mojim mentoricama, prof. dr. sc. Ireni Drmić Hofman i prof. dr. sc. Neiri Puizina Ivić, na nesebičnoj pomoći i neiscrpnom strpljenju tijekom izrade ovog doktorskog rada. Njihovo znanje i savjeti bili su ključni u svim fazama istraživanja i pisanja. Posebno cijenim njihovu spremnost da podijele svoje vrijeme i iskustvo, što je uvelike pridonijelo kvaliteti i oblikovanju ovog rada. Hvala im što su vjerovale u mene i pružale mi podršku, kako profesionalnu tako i ljudsku.

Doktorski rad posvećujem kćerima Dori i Jeleni

SADRŽAJ

1. UVOD	9
1.1. Keratoakantom (lat. <i>Keratoacanthoma</i>)	2
1.1.1. Epidemiologija keratoakantoma	3
1.1.2. Etiologija keratoakantoma	3
1.1.3. Klinička slika keratoakantoma	4
1.1.4. Patohistološke karakteristike keratoakantoma	9
1.1.5. Molekularni putovi nastanka keratoakantoma	16
1.1.6. Dijagnostika keratoakantoma	17
1.1.7. Liječenje keratoakantoma	17
1.2. Bradavice (lat. <i>Verrucae</i>)	18
1.2.1. Genom HPV-a	18
1.2.2. Epidemiologija i etiologija virusnih bradavica	20
1.2.3. Patogeneza HPV infekcije	21
1.2.4. Klinička slika kožnih bradavica	23
1.2.5. Dijagnostika kožnih bradavica	31
1.2.6. Liječenje kožnih bradavica	32
1.3. Toll-like receptor (TLR)	33
1.3.1. Toll-like receptori i njihovi ligandi	34
1.3.2. Građa i signalni putovi TLR-a	36
1.3.3. Polimorfizam TLR-a	39
2. HIPOTEZA I CILJEVI	44
2.1. Hipoteza	45
2.2. Ciljevi istraživanja	45
3. MATERIJALI I METODE	46
3.1. Materijali	47
3.1.1. Etička načela	47
3.1.2. Uzorci tkiva	47
3.1.3. Ispitivani lokusi	47
3.1.4. Kemikalije	49
3.1.5. Puferske otopine	49
3.1.6. Korištena aparatura	49
3.2. Metode istraživanja	50
3.2.1. Deparafinizacija tkiva	50
3.2.2. Izolacija DNA	50
3.2.3. Određivanje čistoće i koncentracije DNA	51

3.2.4. Provjera kvalitete izolirane DNA elektroforezom na gelu	51
3.2.5. Genotipizacija polimorfizama gena <i>TLR</i>	52
3.2.6. Statistička obrada podataka	54
4. REZULTATI.....	55
5. RASPRAVA.....	63
5.1. Povezanost polimorfnihi varijanti u genima <i>TLR</i> s keratoakantomom i virusnim bradavicama.....	64
5.1.1. Povezanost polimorfizma rs4696480 u genu <i>TLR2</i> s keratoakantomom i virusnim bradavicama	65
5.1.2. Povezanost polimorfizma rs7657186 u genu <i>TLR3</i> s keratoakantomom i virusnim bradavicama	66
5.1.3. Povezanost polimorfizma rs352139 u genu <i>TLR9</i> s keratoakantomom i virusnim bradavicama	67
5.2. Ograničenja studije	67
5.3. Zaključak	68
6. ZAKLJUČCI	69
7. SAŽETAK.....	71
8. LAIČKI SAŽETAK	73
9. SUMMARY	75
10. LAY SUMMARY	77
11. POPIS CITIRANE LITERATURE.....	79
10. ŽIVOTOPIS	92

POPIS KRATICA

KA - engl. *keratoacanthoma*

PCC - engl. *carcinoma planocellulare*

WHO - engl. *World health organization*

UV- engl. *ultraviolet*

MSSE - eng. *multiple self-healing squamous cell epithelioma*

CK - eng. *Cytokeratin*

PD-1 - eng. *programmed cell death protein 1*

PD-L1- eng. *programmed cell death-ligand 1*

IL - eng. *interleukin*

LAG-3 - eng. *Lymphocyte activation gene 3 protein*

CTLA-4 - eng. *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*

TGF- β - eng. *transforming growth factor beta*

FOXp3 - eng. *forkhead box protein P3*

STAT - eng. *signal transducer and activator of transcription*

Tgf β r1 - eng. *transforming growth factor beta receptor I*

MAPK - eng. *mitogen-activated protein kinase*

Par3 - eng. *proteinase activated receptor 3*

DMBA/TPA - eng. *7,12-dimethylbenz[a]-anthracene/12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate*

MEK - eng. *mitogen-activated protein kinase kinase*

PI3K-mTOR - eng. *phosphatidylinositol 3-kinase - mammalian target of rapamycin*

mTORC1 - eng. *mammalian target of rapamycin complex 1*

PTEN - eng. *phosphatase and tensin homolog*

AP-1 - eng. *activator protein 1*

Tim-3 - eng. *T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3*

BRAF - eng. *B rapidly accelerated fibrosarcoma*

PI3K/Akt - eng. *phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B*

RAS - eng. *rat sarcoma*

NF- κ B - eng. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

p21^{WAF} - eng. *cyclin-dependent kinase inhibitor*

p16^{INK4} - eng. *cyclin-dependent kinase 4 inhibitors*

HPV - eng. *human papilloma virus*

DNA - eng. *deoxyribonucleic acid*

RNA - eng. *ribonucleic acid*

ORFs - eng. *open reading frames*
E - eng. *early*
L - eng. *late*
R - eng. *regulatory*
Hsp – eng. *heat shock protein*
RPA – engl. *replication protein A*
IFN- γ – engl. *interferon-gamma (IFN- γ)*
TMC6 – engl. *transmembrane channel-like 6*
TMC8 – engl. *transmembrane channel-like 8*
TLR – eng. *Toll-like receptors*
PAMP – engl. *pathogen-associated molecular pattern*
LPS - eng. *lipopolysaccharide*
LTA - eng. *lipoteichoic acid*
RSV - eng. *respiratory syncytial virus*
NK - eng. *natural killer*
CMV – engl. *cytomegalovirus*
HCV – engl. *hepatitis C virus*
MCMV - eng. *murine cytomegalovirus*
pDC - eng. *plasmacytoid dendritic cell*
DAMP - engl. *damage-associated molecular patterns*
HMGB1- eng. *high mobility group box-1*
LRR - engl. *leucin-rich repeats*
TIR - engl. *Toll/IL-1 receptor*
IFN- β - eng. *interferon β*
IRAK.- eng. *IL-1 receptor associated kinase*
IRF - eng. *IFN regulatory factor*
I κ B - eng. *NF kappa B inhibitor beta*
MyD88 - eng. *myeloid differentiation primary response gene 88*
TRAF6 - eng. *TNF receptor associated family 6*
TRIF - eng. *TIR domain containing adaptor protein inducing IFN- β*
Ubc13 - eng. *ubiquitin-conjugating enzyme*
Uev1A - eng. *ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1*

CD – eng. *cluster of differentiation*

COX-2 – eng. *ciklooksigenaza-2*

dsDNA - eng. *double strand DNA*

JNK - eng. *Jun N-terminal kinase*

MAP - eng. *mitogen activated protein*

MKK6 - eng. *MAP kinase 6*

RFLP - eng. *restriction fragment length polymorphisam*

TAB - eng. *TAK binding protein*

TAK1 - eng. *TGF- β -activated kinase 1*

TANK - eng. *TRAF family member associated NF- κ B aktivator*

TBK1 - eng. *TANK bindig kinase 1*

TIRAP/Mal - eng. *TIR domina contaning adaptor protein/MyD88 adaptor like*

TNF - eng. *tumor necrosis factor*

TRIF/TICAM -1 - eng. *TIR domain contaning adaptor including IFN- β /TIR domain
contaning adaptor molecule*

PCR - eng. *polymerase chain reaction*

SNP - eng. *single nucleotide polimorphysam*

STR - eng. *short tandem repeat*

1. UVOD

1.1. Keratoakantom (lat. *Keratoacanthoma*)

Keratoakantom (KA) je brzo rastući tumor kože za koji se pretpostavlja da nastaje iz folikula dlake (Slika 1) (1). Iako rijetko, keratoakantom se može pojaviti i na sluznicama (2). Karakterizira ga brza progresija, najčešće unutar 4 do 5 tjedana, česta spontana regresija te izražena histološka sličnost s planocelularnim karcinomom (PCC). Najčešće se javlja kao solitarna lezija, rijetko kao multipli i generalizirani eruptivni keratoakantom (1). Iako se keratoakantom smatra benignom lezijom, zabilježeni su slučajevi maligne alteracije, koja se može dogoditi u bilo kojoj fazi razvoja tumora. Prema rezultatima studije iz 2000. godine, približno 25 % keratoakantoma pokazalo je progresiju u lokalno invazivni karcinom epitela, pri čemu je ta transformacija najčešće zabilježena u starijih osoba te na područjima kože izloženima kroničnom djelovanju UV zračenja (3). Tijekom posljednjih stotinu godina keratoakantom je klasificiran na različite načine - kao oblik raka kože, kao bradavica te kao *molluscum sebaceum* (4). Prvi ga je opisao Hutchinson 1889. godine kao "*facial crateriform ulcer*", dok je Freudenthal 1936. godine prvi upotrijebio naziv „keratoakantom“ (5). Prema najnovijoj klasifikaciji tumora Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) iz 2018. godine keratoakantom se smatra varijantom planocelularnog karcinoma (6).



Slika 1. Keratoakantom (lat. *Keratoacanthoma*).

Izvor: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499931/> (CC BY-NC-ND 4.0)

1.1.1. Epidemiologija keratoakantoma

Točna incidencija keratoakantoma nije poznata, dijelom zbog njeogove sposobnosti spontane regresije prije postavljanja dijagnoze, kao i zbog čestih zamjena s planocelularnim karcinomom. Incidencija je različita među različitim populacijama diljem svijeta, a bolest je učestalija u toplijim klimatskim područjima, među osobama svjetlije puti, osobito tijekom ljeta i rane jeseni. Rijetko se pojavljuje u tamnoputih osoba (1). Iako se keratoakantom može dijagnosticirati u svim dobnim skupinama, njegova učestalost raste s dobi, a najviša incidencija zabilježena je u osoba starijih od šezdeset godina. Tipično se pojavljuje kao solitarna lezija na fotoeksponiranim dijelovima kože, posebno u osoba svjetlije puti, odnosno onih koji prema Fitzpatrickovoj klasifikaciji spadaju u prve tri skupine. Osim na koži, opisane su pojedinačne lezije na sluznici usne šupljine, usana, nosa i konjunktive, na sluznici anusa i vulve. Rijetki oblici multiplog i generaliziranog eruptivnog keratoakantoma javljaju se podjednako u oba spola, češće mlađe odrasle osobe (1, 7, 8). Istraživanje provedeno u Kliničkom bolničkom centru Split tijekom četverogodišnjeg periodu (od 2010. do 2014.) pokazalo je incidenciju od 144 keratoakantoma na 100 000 stanovnika, što je u skladu s podacima dostupnima u literaturi (9).

1.1.2. Etiologija keratoakantoma

Etiologija keratoakantoma još uvijek nije u potpunosti razjašnjena. Budući da se većina lezija javlja na fotoeksponiranim dijelovima kože, osobito na glavi i gornjim udovima, najčešće ga se povezuje s izloženošću UV zračenju kao najvažnijim čimbenikom rizika, iako konkretni mehanizam razvoja bolesti ostaje i dalje nejasan (6). Prema Claeson M i sur., osim UV zračenja, čimbenici rizika za razvoj keratoakantoma uključuju muški spol, životnu dob iznad 60 godina, nezdrave životne navike poput pušenja i konzumacije alkohola u većim količinama (10). Razvoj keratoakantoma također se povezuje s izloženošću kemijskim tvarima, poput katrana i mineralnih ulja, traumama kože, uključujući ozljede, tetovaže, medicinske i kozmetičke intervencije, kožne transplantante i prisutnost stranih tijela. Dodatno, rizični čimbenici uključuju i primjenu lijekova koji djeluju na stanični ciklus, poput BRAF inhibitora te inhibitora Hedgehog puta (11).

Opisani su slučajevi keratoakantoma u bolesnika s karcinomom larinksa (12), leukemijom (13), imunosupresivnim stanjima (14) te su opisani i u osoba s transplantiranim organima (15). Genetička predispozicija potvrđena je u nekoliko nasljednih sindroma, uključujući autosomno dominantne *Ferguson-Smith*, *Muir-Torre* i *Witten-Zak*, autosomno

recesivni sindrom *Xeroderma pigmentosum* te X–vezani dominantni sindrom *Incontinentia pigmenti* (16).

Keratoakantom može nastati i kao posljedica upalnih kožnih bolesti koje potiču mitotičku aktivnosti epitela, poput seboroičnog dermatitisa, kroničnog ekcema i psorijaze (17). Osim navedenog, sve se češće razmatra i moguća virusna etiologija keratoakntoma, odnosno povezanost s humanim papiloma virusom (HPV), osobito genotipovima 9, 11, 13, 16, 18, 24, 25, 33, 37 i 57 (1, 18, 19).

1.1.3. Klinička slika keratoakantoma

Keratoakantom se klinički očituje kao polukuglasti, uglavnom jasno ograničen keratinizirajući tumor čvrste konzistencije, zadebljale strukture i crvenkaste boje. Prolazi nekoliko stadija, od početne male papule do okruglastog nodula s centralnim keratinizirajućim dijelom (2). Tumor brzo raste i u nekoliko tjedana poprima promjer od 1 do 2 cm. Početni stadij razvoja keratoakantoma je proliferativna faza, u kojoj lezija brzo raste unutar 6 do 8 tjedana. Slijedi faza sazrijevanja, u kojoj se tijekom nekoliko tjedana ili mjeseci formira tipičan krater. U završnoj fazi keratoakantom prolazi kroz proces regresije (20), pri čemu lezija najčešće zadržava svoj karakterističan kraterasti oblik, dok se njezina visina i promjer postupno smanjuju (21). Lezija tipično ima glatke, sjajne, vaskularizirane rubove i središnju udubinu u vidu kratera, ispunjenu rožnatom masom koja se postupno širi. Vremenom, centralni keratinizirani dio može djelomično ili potpuno otpasti, ostavljajući za sobom defekt, najčešće ulceraciju koja ne krvari, ili, pak, cjelokupna masa lezije postupno će keratinizirati i otpasti, ostavljajući za sobom neestetski ožiljak.

Smatra se da su recidivi keratoakantoma najčešće povezani s lezijama prethodno uklonjenima kirurškim putem, pri čemu se trauma nastala tijekom zahvata navodi kao jedan od mogućih čimbenika ponovnog razvoja tumora (2, 22). Keratoakantomi se najčešće javljaju na koži izloženoj suncu, odnosno UV zračenju (2), no mogu se pojaviti i na mukoznim i akralnim djelovima, kao što su usnica, usna šupljina (23) (Slika 2), vulva (24), konjuktiva te perianalna i perinealna regija (25). Lezije obično dosežu veličinu do 2 cm, a rijetko narastu znatno više. Primjerice, zabilježen je slučaj divovskog keratoakantoma promjera 15 cm, koji se može razviti unutar jednog do dva mjeseca, a u nekim slučajevima i tijekom duljeg vremenskog razdoblja (26). Keratoakantomi su najčešće benignog tijeka, ali se smatra kako lokalizacija na vratu i licu povećava rizik za malignu transformaciju. Opisani su i slučajevi u kojima se unutar keratoakantoma događaju mutacije, što je dovelo do razvoja malignog tumora poput

planocelularnog karcinoma. Također, neki tumori pluća, dojke i jednjaka mogu metastazirati u kožu i klinički imitirati keratoakantom (27).



Slika 2. Keratoakantom donje usnice

Izvor: <https://www.scielo.br/j/jaos/a/DtW4TkJRHBfJNrdHYCC3yhd/?lang=en>
(CC BY 4.0)

Keratoakantom se klinički manifestira u obliku solitarnih i multiplih lezija. Najčešće se pojavljuje kao solitarni, sporadični tip na središnjem dijelu lica i vjeđama. Tumor se razvija brzo, simetrično kao kupolasti keratinizirajući čvor, koji dosegne veličinu do 2 cm u promjeru i do 0,5 centimetra u debljini (1).

Postoje i posebne kliničke varijante solitarnog keratoakantoma, kao što su:

- Gigantski (divovski keratoakantom), veličine do 15 cm u promjeru, s posljedičnom destrukcijom potkožnog tkiva. Najčešće je lokaliziran na nosu i dorzumu šake, a rijede se javlja na sluznicama, osobito u usnoj šupljini (6, 7, 28).
- Subungvalni keratoakantom (solitarni distalni keratoakantom prsta) najčešće je lokaliziran na palcu i srednjem prstu šake te na palcu stopala. Karakterizira ga agresivniji rast, lokalna destrukcija tkiva i rijetka spontana regresija. Prati ga intenzivna bol i nodularni čvorić s

centralnim keratinizirajućim kraterom. Prema nekim autorima, ova varijanta može predstavljati PCC niskog stupnja malignosti (6, 7, 29).

- Mukozni keratoakantom je iznimno rijetka varijanta solitarnog keratoakantoma, koja se javlja uglavnom u usnoj šupljini. Za razliku od tipičnih keratoakantoma, ne pokazuje tendenciju spontane regresije (6).

Posebni, rijetki oblici keratoakantoma uključuju multipli keratoakantom, koji može biti sporadičan ili familijaran. Sporadični multipli keratoakantomi najčešće se javljaju na fotoeksponiranoj koži potkoljenice u žena starije životne dobi, a povezuju se i s pojavom na mjestu tetovaže te s mijelodisplastičnim sindromom (6, 30, 31, 32). Multipli centrifugalni keratoakantom (lat. *keratoacanthoma centrifugum marginatum*) je rijedak oblik multifolikularnog podrijetla, koji se širi periferno i ima karakterističan prstenast izgled, poput koraljnog grebena. Najčešće se nalazi na dorzalnoj strani šake i može dosegnuti veličinu od 2 do 40 cm, slično gigantskom obliku (Slika 3). Lokalno je destruktivan, a rijetko regredira spontano (6, 33, 34).



Slika 3. Multipli centrifugalni keratoakantom (lat. *keratoacanthoma centrifugum marginatum*)

Izvor: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4885138/> (CC BY 4.0)

Familijarni *Ferguson-Smith tip* je najčešći oblik multiplog keratoakantoma, poznat i kao multipli samoizlječivi skvamozni epiteliom (MSSE). Pojavljuje se najčešće u mladih osoba, a nasljeđuje se autosomno dominantno. Karakterizira ga nagla pojava, ubrzan rast, spora regresija i povremeni recidivi. Oboljele osobe mogu razviti do nekoliko stotina keratoakantoma, koji se najčešće lokaliziraju na ušima, nosu i perioralnom području, rjeđe na ekstremitetima (izuzev palmarne i plantarne površine), dok je zahvaćenost trupa rijetka (Slika 4). Uz lokalno invazivan rast, keratoakantomi spontano regrediraju u roku od nekoliko mjeseci, ostavljajući duboke ožiljke na licu i pliće na udovima (6, 35, 36).



Slika 4. Multipli familijarni keratoakantomi (*Ferguson-Smith tip*)

Izvor: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9552544/figure/ccr36429-fig-0001/>
(CC BY 4.0)

Generalizirani eruptivni keratoakantomi tipa Grzybowski predstavljaju rijetku, nenasljednu varijantu multiplih keratoakantoma, a karakterizirani su pojavom brojnih lezija na koži i sluznicama. Pojavljuju se nakon 50. godine života, u obliku brojnih malih, dobro ograničenih papula (1-3 mm), s keratinizirajućim centrom. Lezije su diseminirane po koži i mukoznim membranama (Slika 5). imaju progresivni tijek i perzistentan pruritus. Najčešće su zahvaćeni dijelovi tijela izloženi UV zračenju, posebno lice, no lezije se mogu pojaviti i na trupu te u intertriginoznim regijama. Zbog izražene zahvaćenosti očnih kapaka, često se razvija i ektropija, što može za posljedicu imati kseroftalmiju i ponavljajući konjuktivitis (37, 38).



Slika 5. Generalizirani eruptivni Grzybowski keratoakantomi

Izvor: <https://www.mdpi.com/1999-4915/16/8/1260> (CC BY 4.0)

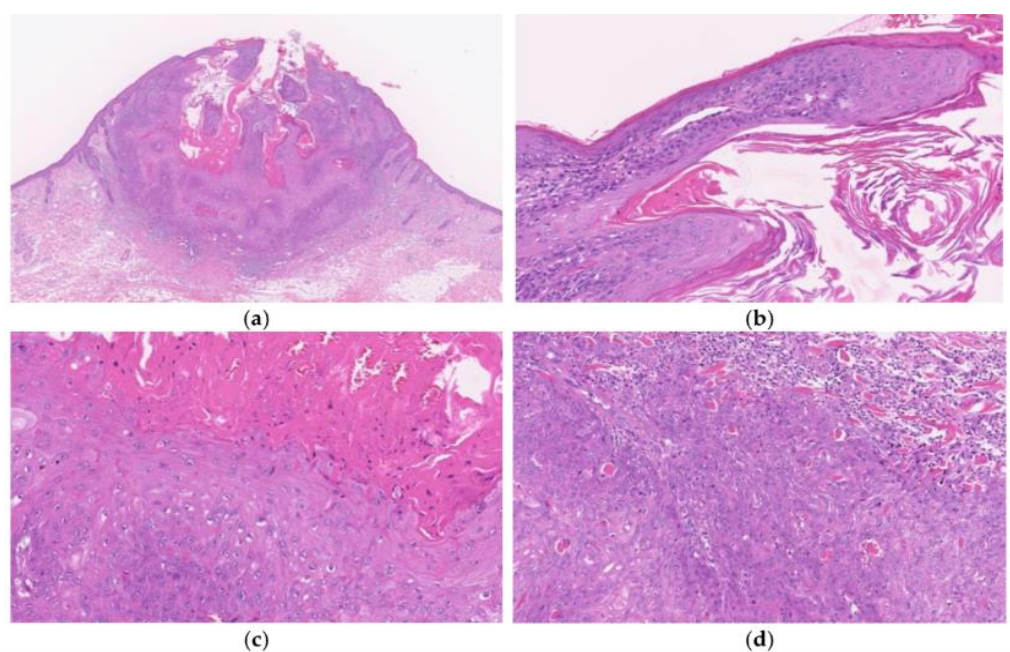
Familijarni Witten – Zak tip predstavlja rijetku formu multiplih keratoakantoma. Etiološki faktori uključuju genetičku predispoziciju i UV izloženost. Lezije se prezentiraju kao 1-30 papula, koje ostaju male ili rastu poput Grzybowski i Ferguson – Smith tipa (1, 35).

Keratoakantom u sklopu Muir-Torreovog sindroma može se pojaviti kao solitarna ili multipla lezija. Ovaj sindrom, koji se nasljeđuje autosomno dominantno je dermatosa koja je povezana sa zloćudnim novotvorinama unutarnjih organa, najčešće debelog crijeva i rektuma (51% slučajeva). Keratoakantomi u ovom sindromu potječu iz pilosebacealnih žlijezda (1).

Keratoakantomi su opisani i u pacijenata s *Xerodermom pigmentosum*, autosomno recesivnim poremećajem popravka DNA, karakteriziranim osjetljivošću na sunce i pojavom melanoma, PCC-a i KA na fotoekspoziranim dijelovima tijela. Perzistirajući keratoakantomi su sporadična i idiopatska varijanta multiplog keratoakantoma. Prezentira se na konjunktivama, dlanovima i tabanima bez spontane regresije (1).

1.1.4. Patohistološke karakteristike keratoakantoma

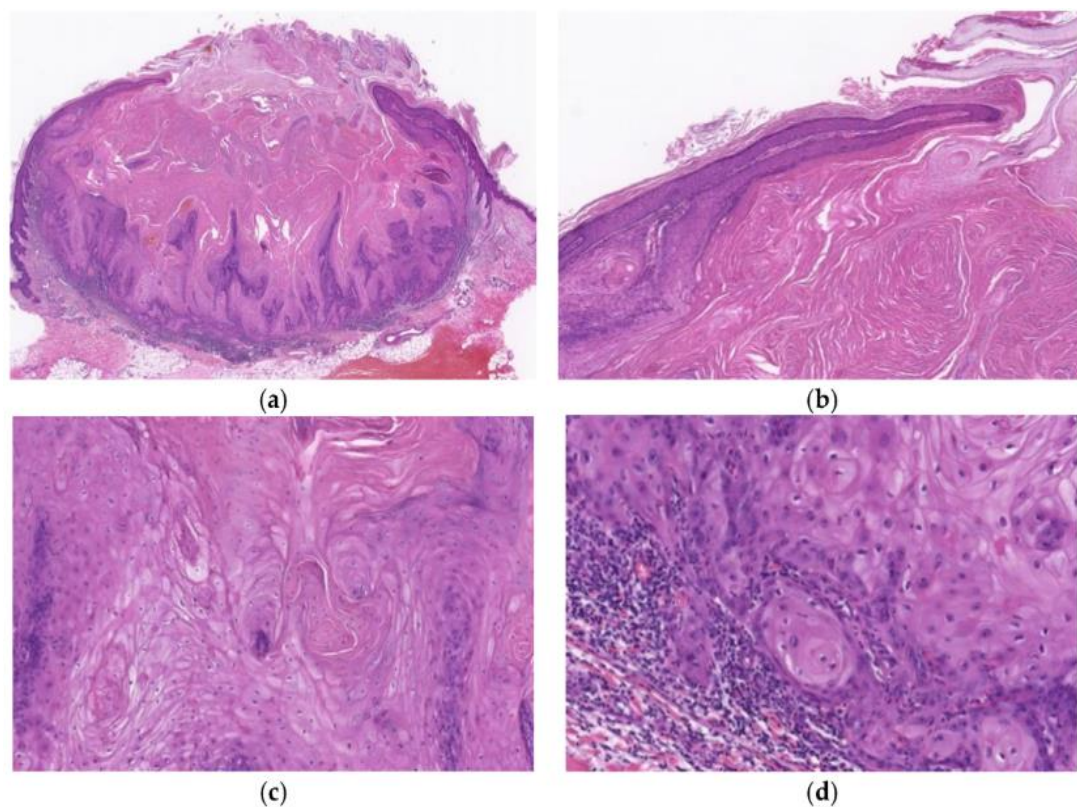
Makroskopski, keratoakantom je crvenkasto žućkaste boje s udubinom koja je ispunjena rožnatom masom. Histološki, keratoakantom je simetrična lezija s keratinocitima ograničene proliferacije. Keratinociti izgleda „mutnog stakla” položeni su bliže centru lezije. Patohistološki izgled ovisi o stadiju razvoja i uključuje četiri faze: ranu (proliferativnu), potpuno razvijenu, fazu regresije i fazu potpune regresije(39, 40). U ranoj, odnosno proliferativnoj fazi keratoakantoma prisutne su invaginirane infundibularne strukture ispunjene lamelama keratina, bez jasno formiranog centralnog keratotičnog kratera. Keratinociti s obilnom, blijedom, staklastom i eozinofilnom citoplazmom, karakterističnog izgleda „mutnog stakla“, uočavaju se isključivo u dubljim epidermalnim slojevima. U bazi lezije, prisutni su nepravilno raspoređeni slojevi blago atipičnih keratinocita s rijetkim mitozama, uz popratni upalni infiltrat sastavljen od neutrofila, limfocita i eozinofila u dermisu (Slika 6) (41, 42).



Slika 6. Patohistološka slika ranog (proliferativnog) stadija keratoakantoma

(a) Krateriformna struktura s centralnim kraterom od keratina (b) Primjećujestruktura nalik usni. (c) U dubljim slojevima primjećuju se blijedoružičasti keratinociti sa staklastim izgledom. (d) Dublji dijelovi lezije slabo su ograničeni od okolnog tkiva i pokazuju blago invazivan rast. Izvor: What Is a Solitary Keratoacanthoma? A Benign Follicular Neoplasm, Frequently Associated with Squamous Cell Carcinoma (CC BY 4.0)

U razvijenoj fazi keratoakantoma prisutne su proširene infundibularne strukture s jasno izraženim centralnim kraterom ispunjenim roževinom. Dominira proliferacija velikih, ružičastih stanica staklastog izgleda. Epitel se izdiže iznad razine tumora, omeđujući krater u obliku usana, a prekriven je normalnim, blago stanjenim epidermisom koji se nastavlja na epidermis u okolini tumora (Slika 7) (41, 42).



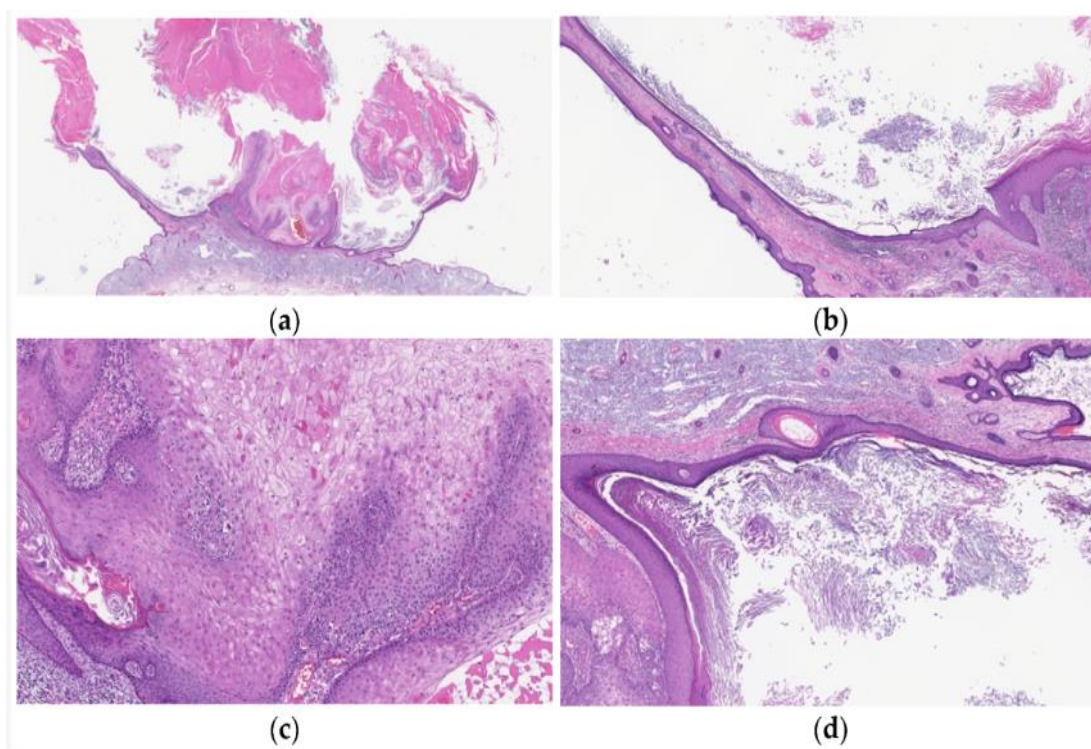
Slika 7. Patohistološka slika razvijenog stadija keratoakantoma

(a) Endoegzofitični rast. (b) Središnji keratinizirani krater okružen je rubovima lezije koji su uzdignuti i zakrivljeni, nalik usnama. (c) U većem dijelu lezije uočava se karakteristična proliferacija velikih blijedoružičastih stanica staklastog izgleda koje pokazuju kompaktnu keratinizaciju. (d) Dublji dijelovi lezije slabo su ograničeni od okolnog tkiva i pokazuju blago invazivan rast

Izvor: What Is a Solitary Keratoacanthoma? A Benign Follicular Neoplasm, Frequently Associated with Squamous Cell Carcinoma (CC BY 4.0)

Faza regresije keratoakantoma nastupa relativno sporo, najčešće unutar 12 tjedana, uz gubitak mitotičke aktivnosti na periferiji lezije i postupnim gubitkom staklastih stanica. Iako keratoakantom zadržava krateriformnu morfologiju, tijekom regresije dolazi do postupnog

smanjenja visine i širine lezije, uz formiranje plitkih struktura ispunjenih roževinom, okruženih tankim slojem epitela. U okolnom djeli (dermisu) prisutne su upalne stanice, limfociti i neutrofili, dok su u dubljim slojevima vidljivi fibroblasti koji sudjeluju u procesu fibroze. Epitel u fazi regresije pokazuje infundibilarna obilježja s laminarnom keratinizacijom te nešto blijedo eozinofilnih keratinocita. Stadij regresije vjerojatno je posljedica djelovanja imunoloških mehanizama s obzirom na prisutnost aktiviranih CD4⁺ T limfocita u infiltratu (Slika 8). U stadiju potpune regresije, keratoakantom poprima oblik plitke epidermalne strukture s uzdignutim rubovima, s atrofično stanjenim epidermisom (41, 42).



Slika 8. Patohistološke značajke regresivnog stadija keratoakantoma

(a) Plitke strukture ispunjene roževinom. (b) Okružene tankim epitelom, struktura nalik usni. (c) Lezija pokazuje infundibularna obilježja lamelarne keratinizacij uz gubitak blijedoružičastih keratinocita staklastog izgleda. (c) Također se uočava fibroza u dermalnim papilama i upala s miješanim staničnim infiltratom.

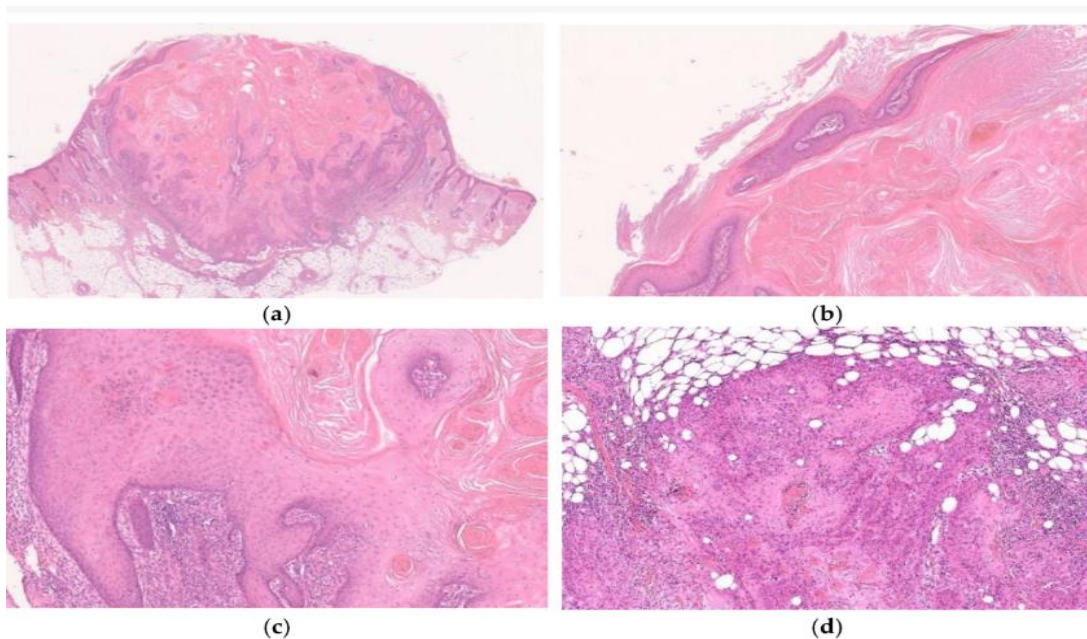
Izvor: What Is a Solitary Keratoacanthoma? A Benign Follicular Neoplasm, Frequently Associated with Squamous Cell Carcinoma (CC BY 4.0)

Multipli centrifugalni keratoakantom pokazuje proliferaciju keratinocita s blijedom eozinofilnom citoplazmom i upalnim infiltratom neutrofila i limfocita (34).

U familijarnom Ferguson – Smith tipu keratoakantoma prisutni su epitelni tračci koji prožimaju dermis, uz centralnu keratinizaciju, a u regresiji formira se krater ispunjen roževinom. Dermis je infiltriran limfocitima, dok u kasnijim fazama postaje fibrozan, uz izražen gubitak elastičnih vlakana. Opisana je infiltracija tumorskih stanica u limfne čvorove, potkožno tkivo i skeletne mišiće, ali bez smrtnih ishoda (36).

Generalizirani eruptivni keratoakantomi tipa Grzybowski obično pokazuju karakterističnu patohistološku sliku keratoakantoma. Ponekad, papulozne promjene pokazuju značajke početnog proliferativnog stadija keratoakantoma, a u nekim slučajevima male folikularne papule nemaju keratinizirajući centar (37).

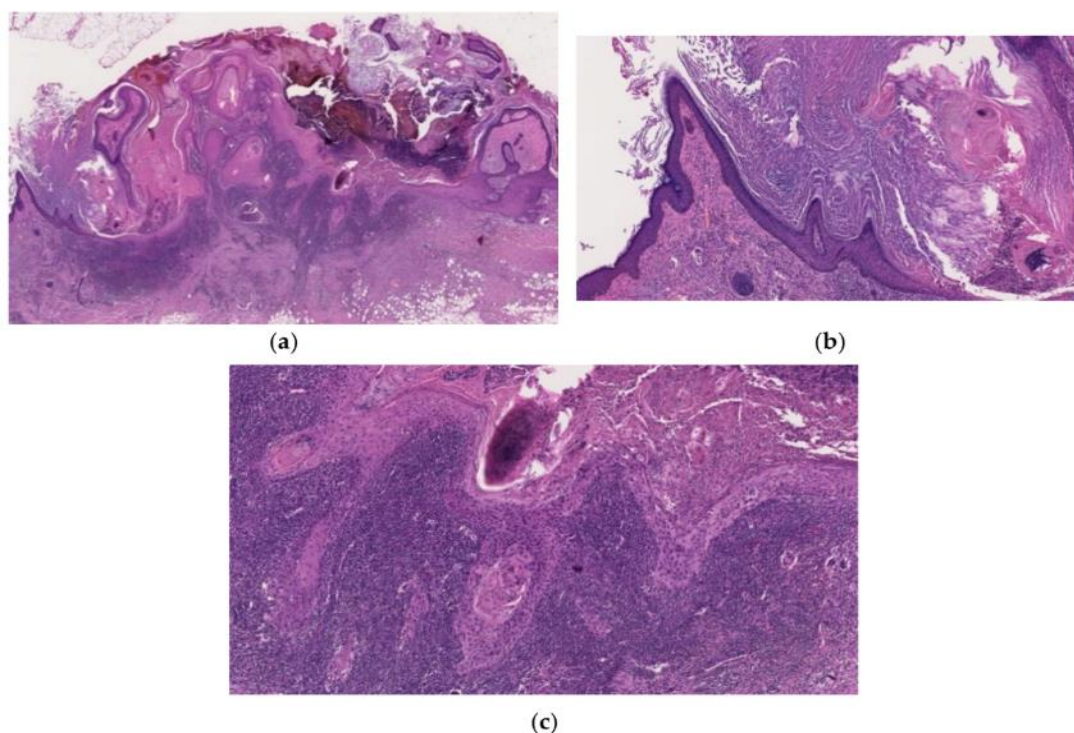
Keratoakantom nalik PCC-u (lat. *Keratoacanthoma-like SCC*) i keratoakantom s malignom alteracijom predstavljaju varijante koje histološki zadržavaju obilježja keratoakantoma s centralnim kraterom, endoegzofitičan rast, multilobularnu strukturu te lobule građene od velikih, rozih stanica staklasta izgleda, uz minimalnu ili odsutnu atipiju. Kod keratoakantoma koji morfološki nalikuju planocelularnom karcinomu, patohistološke značajke tih dviju lezija često se preklapaju, pri čemu granica između njih nije jasno definirana (Slika 9). Nasuprot tome, keratoakantom s malignom alteracijom pokazuje jasno odvojena područja s obilježjima keratoakantoma i planocelularnog karcinoma (Slika 10). Komponente koje odgovaraju keratoakantomu mogu se nalaziti u bilo kojem stadiju razvoja, a omjer keratoakantom i planocelularni karcinom unutar iste lezije može značajno varirati (41, 42).



Slika 9. Patohistološka slika planocelularnog karcinoma nalik keratoakantomu (*keratoacanthoma – like SCC*)

(a) Lezija s multilobularnom građom. (b, c) U leziji uočavaju se patohistoške značajke tipične za KA. (d) Komponenta SCC-a građena je od atipičnih keratinocita s izraženom nuklearnom atipijom te pokazuje invazivan rasta.

Izvor: What Is a Solitary Keratoacanthoma? A Benign Follicular Neoplasm, Frequently Associated with Squamous Cell Carcinoma (CC BY 4.0)



Slika 10. Patohistološke značajke keratoakantoma s malignom alteracijom

(a) Lezija s centralnim kraterom, jasna razlika između KA i SCC. (b) S obje strane lezije nalazi se komponenta KA (c) Dok se komponenta SCC-a nalazi u središtu.

Izvor: What Is a Solitary Keratoacanthoma? A Benign Follicular Neoplasm, Frequently Associated with Squamous Cell Carcinoma (CC BY 4.0)

Prema dostupnim podacima, keratoakantom, ovisno o patohistološkom stadiju, ekspresira stanične markere citokeratina CK1/CK10, CK16/CK17 te kalretinina, proteina koji su karakteristično prisutni u infundibulumu i istmusu folikularnih struktura. Ovi nalazi dodatno podupiru teoriju o folikularnoj diferencijaciji kaeratoakantoma (6). Ekspresija CK1/CK10 u kombinaciji s odsutnom ekspresijom kalretinina upućuje na infundibularnu diferencijaciju dijela sa slojevitom keratinizacijom u ranom stadiju keratoakantoma. U ranom stadiju, kombinirana ekspresija CK16, CK17 i kalretinina, uz istovremenu odsutnost izražaja CK1 i CK10 u bazalnim slojevima lezije s kompaktnom keratinizacijom, ukazuje na diferencijaciju stanica ispod infundibuluma. Sličan ekspresijski obrazac zadržava se i u razvijenom stadiju keratoakantoma, u kojem dominiraju veliki rozi keratinociti, što također upućuje na diferencijaciju prema vanjskoj ovojnici folikula dlake. U stadiju regresije keratoakantoma ponovno se javljaju obilježja infundibularne diferencijacije, što je vidljivo kroz gubitak velikih, blijedoružičastih stanica. U stadiju potpune regresije, istmička diferencijacija više nije prisutna

ni morfološki ni imunohistokemijski, dok prevladavaju obilježja infudibuluma uključujući obnovljenu ekspresiju CK1/CK10 i CK15 (43).

Važnu ulogu u zaustavljanju rasta i regresiji keratoakantoma imaju T limfociti. Njihovu funkcionalnost, međutim, može narušiti tumorski mikrookoliš kroz mehanizame kao što su ekspresija inhibirajućih receptora, prisutnost stanica i liganada inhibirajućeg djelovanja, metabolizam tumorskog tkiva, epigenetički utjecaji i regulacija transkripcije. Nereaktivni T limfociti izražavaju inhibitorne receptore, poput proteina programirane stanične smrti 1 (PD-1, od engl. *programmed cell death protein 1*), proteina LAG-3 (od engl. *lymphocyte activation gene-3*), proteina 4 povezan s citotoksičnim T-limfocitima (CTLA-4) i proteina Tim-3, čija je aktivacija posredovana putem njihovih liganda u tumorskom mikrookolišu. Što je veći broj tih receptora, to je disfunkcija T limfocita izraženija.

Na smanjenu aktivnost anti-tumorskih T limfocita dodatno utječu inhibitorne stanice, poput makrofaga povezanih s tumorom, mijeloidnih supresorskih stanica te regulacijski T limfociti preko interleukina, IL-10 i IL-35 te transformirajućeg čimbenika rasta beta (TGF- β). Disfunkciju T limfocita može potaknuti i smanjena dostupnost glukoze, usljed njenog povećanog iskorištavanja od strane tumorskih stanica (44). Povećana infiltracija FOXP3+ regulacijskih T limfocita tijekom rane proliferativne faze može potaknuti smanjenu antitumorsku obranu (45). Značajna infiltracija CD4+T limfocita u regresijskom stadiju keratoakantoma sugerira da je ovaj proces imunološki posredovan (45). Osim toga, u tumorskom mikrookolišu nalazi se veliki broj stanica koje luče interleukin 27, koji u limfocitima T potiče aktivaciju prenositelja signala i aktivatora transkripcije, STAT1 i STAT3, što rezultira proliferacijom CD4+T limfocita, odnosno ranom Th1 diferencijacijom (46).

U KA i PCC pronađena je značajna korelacija između izražaja PD-L1 u stanicama tumora i limfocitima kojima obiluje tumor (47). Osim toga, TGF- β regulira izražaj PD-1 i PD-L1, a mutacije koje uzrokuju gubitak funkcije receptora TGF- β 1 smatraju se odgovornim za pojavu Ferguson – Smith sindroma. Razvoj keratoakantoma može biti potaknut primjenom protutijela koja neutraliziraju TGF- β , što upućuje na mogućnost da smanjeni izražaj PD-L1, ovisan o TGF- β , ima ulogu u patofiziologiji keratoakantoma (39). U histološkom razlikovanju keratoakantoma od planocelularnog karcinoma potencijalno korisna metoda mogla bi biti imunohistokemijsko bojenje na TGF- β . U KA je bojenje uglavnom difuzno i bez perifernog bojenja stanica, dok u PCC prevladava krpičasto bojenje, s perifernom raspodjelom stanica (48). Također su opisani slučajevi razvoja keratoakantoma kao rijetke nuspojave terapije inhibitorima PD-1 (Nivolumab i Pembrolizumab) te BRAF inhibitorima poput Vemurafeniba (49, 50).

1.1.5. Molekularni putovi nastanka keratoakantoma

Prema dosadašnjim saznanjima, u razvoj, regresiju i potencijalnu invaziju keratoakantoma uključeni su različiti signalni putovi. Goudie i suradnici istraživali su povezanost TGF- β signalnog puta s nastankom keratoakantoma te su ustanovili jasnu korelaciju između mutacije u genu *Tgf β 1* (od engl. *transforming growth factor beta receptor 1*) i gubitka funkcije na 9. kromosomu s pojavom *Ferguson-Smith tip* KA (1, 51). TGF- β signalni put regulira diferencijaciju i proliferaciju u različitim tkivima, a njegova disfunkcija povezuje se s malignom transformacijom keratinocita. Još jedan put signalizacije koji je povezan s nastankom keratoakantoma, koji također djeluje na sudionike TGF- β signalnog puta, poput fosfatidilinozitol 3-kinaze/proteinske kinaze B (PI3K/Akt) i mitogenom aktivirana proteinska kinaza (MAPK), je put aktiviran proteazom -PAR3 (od engl. *partitioning defective 3 homolog gene*), ima važnu ulogu u apikobazalnoj polarnosti stanice i asimetričnoj diobi stanica. Naime, gubitak polariteta stanice preduvjet je za razvoj i progresiju tumora. U tumorskim modelima (DMBA/TPA), prekomjerna ekspresija PAR3 smanjuje vjerojatnost nastanka KA, dok njegov gubitak ima suprotan učinak (1, 52).

Specifičan oblik keratoakantoma pojavljuje se u bolesnika s melanomom liječenih BRAF inhibitorima, najčešće Vemurafenibom. Ovaj lijek potiče povećanu aktivnost BRAF-a neovisno o RAS-u, što rezultira pojačanom aktivacijom MAPK signalnog puta te može dovesti do razvoja planocelularnog karcinoma ili keratoakantoma. Sličan učinak ima i Sorafenib. U tim lezijama, koje se pretežito javljaju na fotoeksponiranim područjima, utvrđena je prisutnost RAS mutacija, što sugerira da UV zračenje može inducirati mutacije RAS gena u keratinocitima. Kada su stanice s RAS mutacijama izložene BRAF inhibitorima, dolazi do paradoksalne aktivacije MAPK signalnog puta, što potiče abnormalnu proliferaciju i može rezultirati razvojem kožnih tumora. U osoba s melanomom koje se umjesto BRAF inhibitorima liječe mitogen aktivirana proteinska kinaza (MEK) inhibitorima (koji djeluju niže u istom putu) učestalost keratoakantoma je smanjena, jer MEK inhibitori blokiraju MAPK put (1, 53). MAP kinazni put aktivira se više posredstvom stresa i upalnih medijatora nego mitogenima, pa današnja učestalost upalnih procesa, uzrokovanih traumama, kožnim bolestima ili različitim dermatološkim zahvatima mogu pogodovati nastanku KA na koži prethodno oštećenoj UV zračenjem, slično učinku BRAF inhibitora (54). Lijek Imikvimod, koji se koristi u terapiji aktinične keratoze i bazocelularnog karcinoma, može sekundarno uzrokovati KA, aktivacijom NF κ B signalnog puta i porastom proinflamatornih citokina (1). Visoka ekspresija tumor

supresora fosfataza i tensinski homolog (*PTEN*), negativnog regulatora PI3K-mTOR signalnog puta, uz smanjenu staničnu proliferaciju upućuje na prevenciju stanične transformacije. Čak i kada *PTEN* nije aktivan, aktiviraju se alternativni tumorsupresorski mehanizmi, p53/ p21^{WAF} i p16^{INK4}. Tumor supresor p16^{INK4} prisutan je kroz većinu stadija KA, što potvrđuje postojanje brojnih obrambenih mehanizama koji podržavaju benigni karakter tumora i vode njegovoj involuciji (55).

Prema izvješću Li J i suradnika, postoji značajna genetička razlika između keratoakantoma i planocelularnog karcinoma. Komparativnom genskom hibridizacijom zabilježene su rekurentne aberacije na kromosomima 7, 8 i 10 koje se češće povezuju s planocelularnim karcinomom, dok su mutacije gena na kromosomima 17, 19, 20 i X povezane s nastankom keratoakantoma (56).

1.1.6. Dijagnostika keratoakantoma

Dijagnoza keratoakantoma temelji se na anamnezi pacijenta, kliničkoj slici te patohistološkoj analizi. Anamnestički podatak o brzorastućoj leziji, koja u kratkom vremenu dosegne promjer od nekoliko centimetara, uz karakterističan izgled polukuglastog tumora sa središnjim kraterom ispunjenim rožnatom masom i očuvanom okolnom kožom, kao i sklonost spontanoj regresiji, upućuju na dijagnozu KA. Za potvrdu dijagnoze keratoakantoma ključna je patohistološka analiza tkiva dobivenog ekscizijskom biopsijom. U slučajevima sumnje na subungvalni KA potrebno je napraviti i radiološku dijagnostiku zbog moguće osteolize (5). Budući da je keratoakantom patohistološki vrlo sličan planocelularnom karcinomu kože, osobito u fazi progresivnog rasta, njihovo razlikovanje predstavlja dijagnostički izazov. Pokušaji uvođenja imunohistokemijskih bojenja za nekoliko biljega za razlikovanje ovih lezija, do sada nisu rezultirali pronalaženjem dijagnostički pouzdanog markera (7).

1.1.7. Liječenje keratoakantoma

Iako keratoakantomi imaju sklonost spontanoj regresiji i izlječenju, kao posljedicu mogu ostaviti neestetski ožiljak. Pouzdana terapija keratoakantoma uključuje kiruršku eksciziju s rubom sigurnosti od 4 mm, što omogućuje potpunu eliminaciju tumora, uz optimalan uzorak za patohistološku analizu i minimalan rizik od recidiva. Manje lezije na ekstremitetima, promjera do 2 cm, moguće je ukloniti i elektrodesikacijom ili kiretažom. Mohsove mikrografske operacije su terapija izbora za KA s perineuralnom invazijom i za lezije veličine

veće od 2 cm, smještene na kozmetički osjetljivim područjima, gdje je važno očuvanje okolnog tkiva. Od nekirurških terapija koriste se metotreksat i imikvimod (5-FU), dok su interferon i bleomicin zamjenske opcije. 5-Fluorouracil primjenjuje se intralezijski. Imikvimod i 5-fluorouracil koriste se u topičkoj primjeni kao 5%-tne kreme, pri čemu potiču brzu regresiju lezija. Sistemski retinoidi, koriste se za liječenje multiplih keratoakantoma. U slučajevima rezistentnim na terapiju retinoidima i metotreksatom, kao terapijska alternativa može se primijeniti Ciklofosfamid. Uzimajući u obzir sve veću potrebu za očuvanje tkiva i estetike, konzervativno nekirurško liječenje i Mohsova kirurgija su preferirani pristupi. Recidivi KA javljaju se u 1-8% slučajeva, stoga je važno dugotrajno praćenje pacijenata te njihova edukacija o preventivnim mjerama i samopregledu (1, 5, 7).

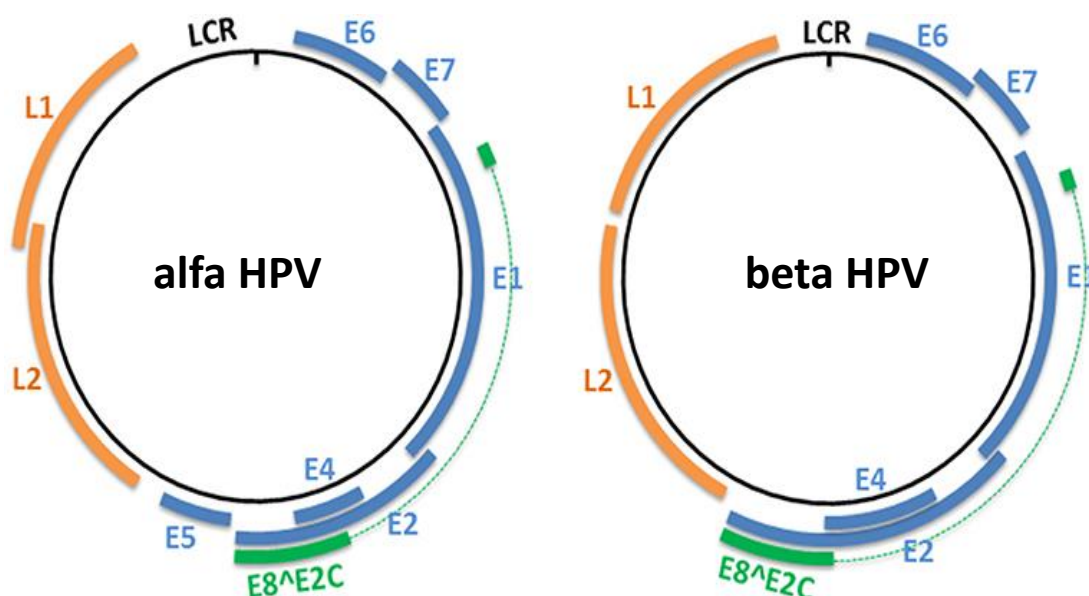
1.2. Bradavice (lat. *Verrucae*)

Bradavice su benigne proliferativne lezije kože i sluznica uzrokovane humanim papiloma virusom (HPV) iz porodice *Papillomaviride*. Najčešće se pojavljuju u djece i mladih osoba. Poznato je više od 200 različitih genotipova HPV-a, od kojih se oko 110 povezuje s različitim dermatološkim oblicima bolesti (57, 58).

1.2.1. Genom HPV-a

HPV su mali DNA virusi čiji genom obavlja kapsida sastavljena od 72 kapsomere. Genom HPV-a sastoji se od zatvorene, kružne dvolančane DNA dužine između 7.800 i 7.900 baza, podijeljene na kodirajući i nekodirajući segment. Kodirajuća područja (od engl. *open reading frames* – ORFs) sadrže gene grupirane u tri funkcionalna područja: kasno (L, od engl. *late*), rano (E, od engl. *early*) i regulatorno (R, od engl. *regulatory*) područje. Kasno područje (L) kodira strukturne bjelančevine kapside virusne čestice, velike (L1) i male (L2). Rano područje (E) sadrži gene koji kodiraju proteine uključene u različite faze virusnog životnog ciklusa: replikaciju (E1), transkripciju (E2), vezivanje za citokeratin (E4), staničnu transformaciju (E5) te onkogeno djelovanje (E6 i E7). Regulatorno područje (R) sadrži gene koji kodiraju transkripcijske faktore uključene u kontrolu virusne replikacije. Šest ranih gena – E1, E2, E4, E5, E6 i E7 koji kodiraju bjelančevine nužne za replikaciju virusa, prisutni su u većini genotipova HPV-a. Međutim, kod visokorizičnih genotipova, ovi geni doprinose i transformaciji zaraženih stanica (59).

Humani papiloma virus je heterogena skupina DNA virusa razvrstanih u različite genotipove prema redoslijedu baza u regiji L1. Genotip se smatra novim ako njegov nukleotidni slijed u određenom segmentu genoma pokazuje više od 10 % razlike u usporedbi s prethodno poznatim genotipovima. Prema Međunarodnom referentnom centru za HPV (<http://www.hpvcenter.se/>) identificirano je 218 tipova HPV-a. Razvrstani su u pet rodova: Alfa-papilomavirusi (α -HPV) s 14 vrsta i 65 tipova, Beta-papilomavirusi (β -HPV) s 6 vrsta i 52 tipa, Gama-papilomavirusi (γ -HPV) s 27 vrsta i 97 tipova, Mu-papilomavirusi (μ -HPV) s 3 vrste i 3 tipa i Nu-papilomavirusi (ν -HPV) s jednom vrstom i jednim tipom (Slika 11) (59, 60, 61).



Slika 11. Rodovi Alfa i Beta humanog papiloma virusa (HPV)

Izvor: <https://www.frontiersin.org/journals/oncology/articles/10.3389/fonc.2019.00355/full>
(CC BY 4.0)

S obzirom na onkogeni potencijal, genotipovi se dijele na:

- niskorizične genotipove (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 i CP6108)
- visokorizične genotipove (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82), te
- vjerojatno visokorizične genotipove (26, 53, 66).

Ova klasifikacija se stalno ažurira novim znanstvenim spoznajama i identificiranim genotipovima. Zastupljenost pojedinih genotipova razlikuje se ovisno o zemljopisnoj regiji. U Europi i Sjevernoj Americi najčešći visokorizikni genotip je HPV 16 (Tablica 1) (59).

Tablica 1. Rod i značajni HPV genotipovi, tkivni tropizam i povezane bolesti (59)

Rod	Vrsta	Representativni tipovi HPV	Tropizam	Povezanost s bolestima
Alfa-PV	$\alpha 1$	32	mukozni	Heckova bolest
	$\alpha 2$	3, 10, 28	kožni	ravne bradavice
	$\alpha 4$	2, 27, 57	kožni	obične bradavice
	$\alpha 7$	18, 39, 45, 59, 68	mukozni	intraepitelna neoplazija, invazivni karcinom
	$\alpha 9$	16, 31, 33, 35, 52, 58	mukozni	intraepitelna neoplazija, invazivni karcinom
	$\alpha 10$	6, 11	mukozni	condylomata acuminata
		13		Heckova bolest
Beta-PV	$\beta 1c$	5, 8, 12, 14, 19, 20, 21, 24, 25, 36, 47	kožni	Epidermodysplasia verruciformis
	$\beta 2$	9, 15, 17, 22, 23, 37, 38	kožni	Epidermodysplasia verruciformis
	$\beta 3$	49	kožni	Epidermodysplasia verruciformis
Gama-PV	$\gamma 1$	4, 65	kožni	bradavice
	$\gamma 4$	60	kožni	bradavice
Mu-PV	$\mu 1$	1	kožni	ravne bradavice
	$\mu 2$	63	kožni	bradavice
Nu-PV	v	41	kožni	bradavice

1.2.2. Epidemiologija i etiologija virusnih bradavica

Do danas je izolirano više od 200 genotipova HPV-a, koji uzrokuju infekcije u ljudi. Od toga, 45 genotipova izaziva infekcije genitalnog trakta, dok ostali uzrokuju infekcije kože. Rod *Alfa* HPV uključuje tipove koji uzrokuju klinički vidljive lezije na sluznicama i koži, dok su *Beta* i *Gama* HPV-ovi povezani s perzistentnim subkliničkim lezijama kože koje su često posljedica infekcija stečenih u ranom djetinjstvu. Glavni način prijenosa infekcije je direktni kontakt, iako se prijenos može ostvariti i neizravno, putem kontaminiranih predmeta. Dodatno, mikrotrauma predstavlja važan čimbenik u patogenezi i progresiji verukoznih promjena.

Kožne bradavice su najčešće uzrokovane HPV genotipovima 1, 2, 4, 27 i 59, pokazuju različite epidemiološke karakteristike koje se pripisuju socio-geografskim razlikama. U istraživanju provedenom u nizozemskim školama, kožne bradavice su bile prisutne u trećine djece. Prevalencija je rasla s dobi, od oko 15% kod četvorogodišnjaka do čak 44% u jedanaestogodišnjaka, bez značajne razlike među spolovima. Infekcija HPV genotipom 1 češće se javlja u mlađih osoba, uglavnom na plantarnim regijama, a same lezije su obično manje. S druge strane, HPV genotip 2 se češće pojavljuje u drugoj ili trećoj dekadi života. Glavni čimbenici rizika za infekciju u djece su najbliži članovi obitelji s kožnim bradavicama te veći broj djece u obitelji. Prevalencija kožnih bradavica u općoj populaciji procjenjuje se na oko 5%, što je posljedica učestalih i ponovljenih infekcija različitim tipovima HPV-a (63).

Imunosupresija predstavlja važan rizični čimbenik u nastanku HPV lezija. Naime, 40% osoba koje su prošle transplataciju solidnih organa razviju kožne bradavice, a incidencija karcinoma kože u ovoj populaciji procjenjuje se na 5% godišnje, s kumulativnim rizikom od 40% nakon devet godina (64). Slični trendovi su uočeni i u incidenciji premalignih i malignih HPV lezija na sluznicama povezanim s imunosupresijom (65).

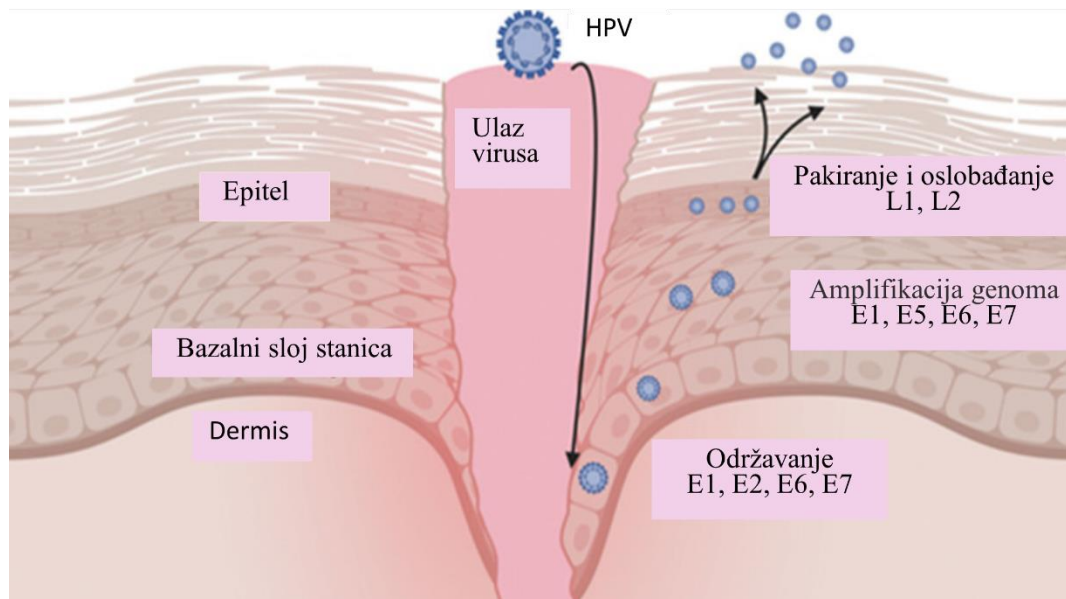
1.2.3. Patogeneza HPV infekcije

Humani papiloma virus veže se za stanice bazalnog sloja kože i sluznice, a njegov životni ciklus ovisi o sposobnosti diferencijacije tih stanica. Infekciji keratinocita bazalnog sloja epitela pogoduju mikrotraume u proliferacijskom bazalnom sloju. Inicijalno se virus veže za heparan-sulfat proteoglikan, receptor na membrani bazalnih stanica koje se dijele. putem virusnog proteina L1. Ta veza izaziva promjene u strukturi virusne kapside koje omogućuju vezivanje s drugim, još uvijek nepoznatim receptorom. Virus ulazi u stanicu endocitozom, što može trajati od dva do četiri sata. U citoplazmi dolazi do raspada virusne čestice, a genom virusa se, uz pomoć proteina L2, transportira u jezgru(62).

Replikacija virusa odvija se u tri faze: početna amplifikacija DNA, uz aktivnost proteina E1 i E2; faza održavanja - virusna DNA replcira se u skladu s proliferacijom inficirane stanice i kasna faza amplifikacije genoma i formiranja novih virusa - u trenutku kad stanica završava diferencijaciju. Faza održavanja može potrajati mjesecima ili godinama. Stupanj diferencijacije epitelnih stanica domaćina izravno utječe na učinkovitost replikacije. U bazalnim stanicama, u S fazi staničnog ciklusa replikaciju pokreće protein E2, koji prepoznaje specifične nizove (AACCg(N4)cGGTT) i veže se za njih svojom C-terminalnom domenom. Helikaza E1, jedini enzim koji kodira genom HPV-a, veže se na ishodište replikacije. Nakon vezanja E1, dolazi do

disocijacije E2, a E1, uz pomoć staničnih Hsp40 i Hsp70, usvaja funkcionalnu konformaciju dvostrukog heksamernog prstena. Ova struktura omogućuje odmotavanje DNA lanaca, čime se otvara pristup replikacijskim proteinima stanice domaćina, uključujući replikacijski protein A (RPA) i DNA polimerazu α . Nakon završene replikacije, protein E2 sudjeluje u preciznoj segregaciji novonastalih kopija virusnog genoma u stanice kćeri tijekom mitoze. Nakon diobe, virusne kopije (episomi) dopiru do suprabazalnih slojeva epitela. Za razliku od neinficiranih keratinocita, čija je dioba ograničena na bazalni sloj, inficirani keratinociti nastavljaju s mitotskom aktivnošću i u suprabazalnim slojevima, pri čemu je njihova diferencijacija odgođen (67).

Većina HPV genotipova je niskog onkogenog rizika, te prolazi samo produktivni ciklus, koji dovodi do stvaranja novih infektivnih virusnih čestica. U lezijama koje uzrokuju, ekspresija virusnih gena je dobro regulirana, tijekom migracije inficiranih stanica prema površini epitela. Stvaranje određenih virusnih proteina odvija se u određeno vrijeme i u određenoj količini, pri čemu se aktiviraju i signalni putevi, koji ovise o diferencijaciji. U površnim slojevima epitela, virus obavlja svoj genom kapsidom uz pomoć proteina E2 i strukturnih proteina L1 i L2, dok njihovo otpuštanje omogućuje protein E4, koji se nakuplja u visokim koncentracijama u citoplazmi površinskih keratinocita (Slika 12).



Slika 12. Životni ciklus HPV-a u diferencirajućem skvamoznom epitelu

Ulazak virusa događa se sekundarno uslijed mikro-abrazije i izravne invazije bazalnih epitelnih stanica. Faza održavanja HPV-a odvija se u bazalnim epitelnim stanicama uz naknadnu migraciju prema površini. Površinski slojevi epitela omogućuju amplifikaciju genoma, sastavljanje viriona i naknadno oslobađanje. (CC BY 4.0)

Izvor: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38787972/#&gid=article-figures&pid=figure-2-uid-1>

Infekcija visokorizičnim HPV genotipovima prati gubitak regulatorne funkcije virusnog proteina E2, što dovodi do povećane ekspresije onkoproteina E6 i E7. U bazalnim slojevima epitela ti proteini funkcionalno onemogućuju tumorsupresorske gene p53 i pRB, čime se omogućuje prelazak stanica u S-fazu staničnog ciklusa, što rezultira nekontroliranom proliferacijom i genskom nestabilnošću inficiranih stanica. Uglavnom, HPV završava životni ciklus u epitelnim stanicama, ne izaziva viremiju niti razaranje inficirane stanice, čime učinkovito izbjegava urođeni imunološki odgovor, ostaje i doprinosi perzistiranju HPV infekcije (68). Iako su keratinociti imunološki aktivne stanice sposobne pokrenuti kaskadu imunološkog odgovora, proteini E6 i E7 visokorizičnih tipova (16, 18 i 31) mogu ometati taj proces. Osim toga, HPV ne privlači anigen prezentirajuće Langerhansove stanice u epitelu, čime izostaje antigen-specifični imunološki odgovor.

Dok se početne infekcije nekih HPV tipova mogu kontrolirati urođenim imunološkim odgovorom, klinički vidljive lezije zahtijevaju složeniji imunološki odgovor, koji uključuje citotoksične CD8⁺ T limfocite i CD4⁺ pomagačke T limfocite. Oni prepoznaju virusne E2, E6 i E7, luče interleukin 2 (IL-2) i interferon gama (γ -IFN) te pospješuju eliminaciju virusa. Ipak, određeni HPV genotipovi mogu ostati latentni i izbjeći imunološki nadzor (69).

1.2.4. Klinička slika kožnih bradavica

Infekcije uzrokovane HPV-om mogu se manifestirati u tri oblika: kao kliničke infekcije vidljive golim okom, kao subkliničke infekcije koje nemaju izražene simptome, ali se mogu detektirati mikroskopski u inficiranom epitelnom tkivu ili kolposkopski kroz promjene izazvane virusom, te kao latentne infekcije, pri čemu se prisutnost virusa može potvrditi isključivo molekularnim dijagnostičkim metodama..

Kliničke manifestacije HPV infekcije su raznolike i ovise o genotipu virusa, njegovom tropizmu te imunološkom odgovoru domaćina. Na primjer, HPV tip 1 iz roda *Mu* uzrokuje bradavice na dlanovima i tabanima te se rijetko pojavljuje drugdje; HPV tip 7 iz roda *Alpha* uzrokuje bradavice uglavnom na rukama, dok su HPV tipovi 6 i 11 usmjereni na sluznicu. HPV 6 na sluznicu genitalne regije, dok HPV 11 češće inficira sluznicu usne šupljine. Različiti tkivni tropizmi odražavaju gensku raznolikost virusa i promjenjivu otpornost epitelnih barijera na različitim anatomskim pozicijama.

Prema tkivnom tropizmu razlikuju se:

1. HPV infekcije kože (benigne i maligne)
2. HPV infekcije sluznice (benigne i maligne)

Kožne bradavice predstavljaju benigne proliferativne lezije uzrokovane infekcijom keratinocita *humanim papiloma virusom*. Najčešće se spontano povlače, no mogu perzistirati mjesecima, pa i godinama, čime doprinose širenju virusa u populaciji. Klinički se kožne HPV infekcije manifestiraju kao: obične bradavice (lat. *verrucae vulgares*), plantarne bradavice (lat. *verrucae plantares*) i ravne mladenačke bradavice (lat. *verrucae plane juveniles*) (70).

Obične bradavice (lat. *verrucae vulgares*) su najčešće kožne bradavice, uzrokovane HPV genotipovima 2, 4, 7, 26, 27, 28 i 57. Najčešće se pojavljuju u djece i adolescenata, iako mogu zahvatiti sve dobne skupine. Klinički se očituju kao egzofitične, hiperkeratotične papule hrapave i grube površine, boje kože, pojedinačne ili multiple. Veličine su do 1cm u promjeru, 3 do 4 mm iznad površine kože, mogu se međusobno spajati i formirati plakove. Na površini lezije ponekad su vidljive crne točkice, osobito ako se površina ogrebe, što mikroskopski odgovara epidermalnim krvarenjima ili proširenim kapilarnim petljama unutar dermalnih papila. Najčešće se nalaze na izloženim dijelovima tijela poput ruku, prstiju, laktova i koljena. Obično su asimptomatske, mogu perzistirati nepromijenjene mjesecima ili godinama, naglo se proširiti stvaranjem brojnih novih lezija ili spontano regredirati (Slika 13).

Morfološka varijanta običnih bradavica su nitaste (filiformne) bradavice koje se prezentiraju kao nitaste papile s karakterističnim rastom okomito ili pod kutom u odnosu na površinu kože. Pojavljuju se kao pojedinačne ili multiple, najčešće na bradi, oko usnica, očnih kapaka i nosnica. Posebna varijanta je tzv. mesarska bradavica, rijetka forma obične bradavice povezana s HPV genotipom 7. Pojavljuje se u osoba koje dolaze u kontakt s mesom i ribom, ima izgled nalik cvjetači i najčešće je lokalizirana na rukama (70, 71).



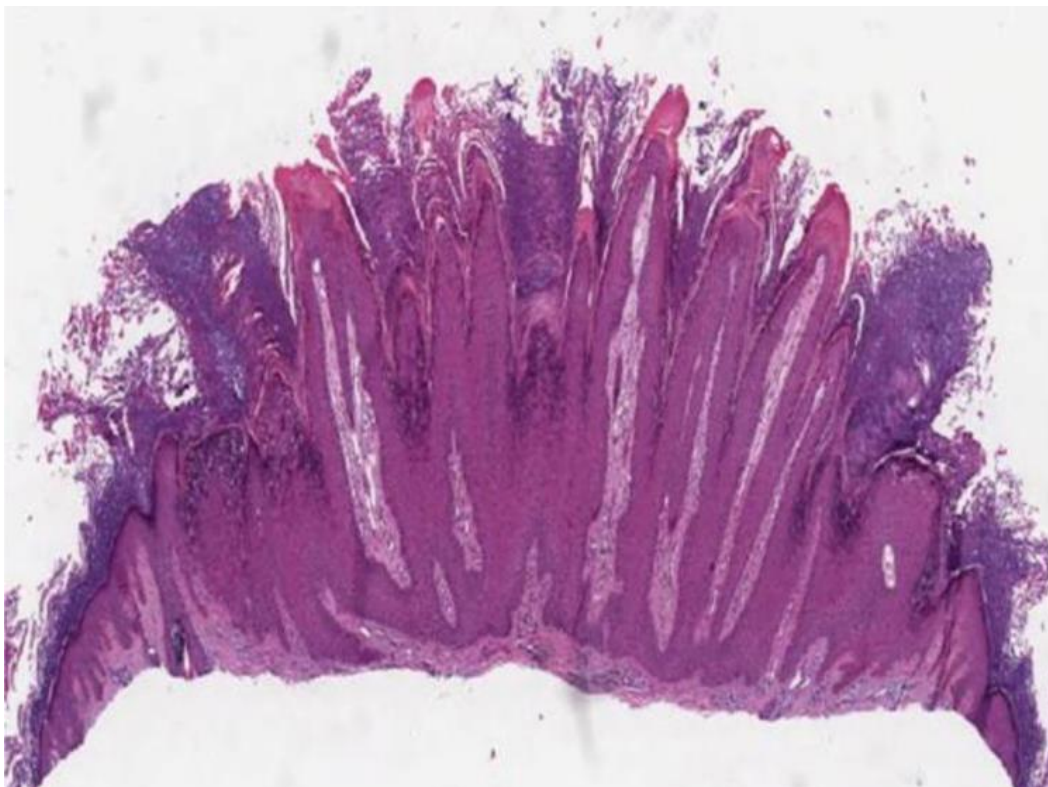
Slika 13 . Obične bradavice (lat.*verrucae vulgares*)

(A) Obična bradavica, papule s keratotičnom površinom, neke s tamnim točkama.

(B) Obična bradavica pod dermatoskopom, točkasto krvarenje.

Izvor: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0365059620306620> (CC BY 4.0)

U običnim bradavicama patohistološke promjene lokalizirane su u epidermisu. Prisutne su akantoza, papilomatoza i izražena hiperkeratoza, uz zadebljanje zrnatog sloja i vakuolizaciju citoplazme stanica unutar njega. Bazalni sloj može biti upalno promijenjen, uz oštećenje bazalne membrane i prisutnost velikih reaktivnih keratinocita. Tri patohistološka obilježja običnih bradavica uključuju: prisutnost koilocita, vertikalne stupce parakeratoze i gusto raspoređene granule keratohijalina (Slika 14). Nitaste, filiformne bradavice pokazuju izraženiju papilomatpzu s naglašenom hiperkeratozom, proširenim kapilarama u dermisu i povremeno malim hemoragijskim žarištima (71).



Slika 14. Patohistološka slika obične bradavice (*verrucae vulgares*) prikazuje hiperkeratozu, papilomatozu, akantozu i mrežaste izbočine epidermisa (Hematoksilin i eozin, 40×).

Izvor: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8007546/figure/fig0005/> (CC BY 4.0)

Plantarne bradavice (lat. *verrucae plantares*) i palmarne bradavice (lat. *verrucae palmares*) klinički se prezentiraju kao hiperkerotične papule s endofitičkim rastom i tvrdim keratiniziranim rubovima (Slika 15). Kao i kod običnih bradavica, mogu se uočiti točkasta krvarenja, što odgovara tromboziranim krvnim žilama. Zbog lokalizacije, na područjima pod pritiskom, često izazivaju izraženu bol. Učestalo se javljaju u djece, adolescenata i mlađih odraslih osoba. Najčešće nastaju izravnim infekcijom HPV genotipovima 1, 2, 4, 57, 63, 65 i 95 (71).

Prema Wilchey J.D., plantarne bradavice mogu nastati i neizravno, primjerice preko dijeljene obuće, sportske opreme, hodanjem bosim nogama oko bazena i u zajedničkim tuševima. Također, hiperhidroza stopala povezuje se s većim rizikom za nastanak plantarnih bradavica (72). Histološki su vrlo slične običnim bradavicama, s izraženijom hiperkeratozom i lezijom koja može prodrijeti dublje ispod razine epidermisa. Izgled keratohijalinskih granula unutar površinskih pločastih stanica ovisi o tipu HPV-a: HPV 1 povezan je s velikim, eozinofilnim keratohijalinskim granulama uz citoplazmatsku vakuolizaciju, HPV 4 povezan je s velikim, vakuoliziranim keratinocitima s malim brojem granula i malim, periferno smještenim jezgrama.



Slika 15. Plantarne bradavice (lat. *verrucae plantares*)

Izvor: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0365059620306620> (CC BY 4.0)

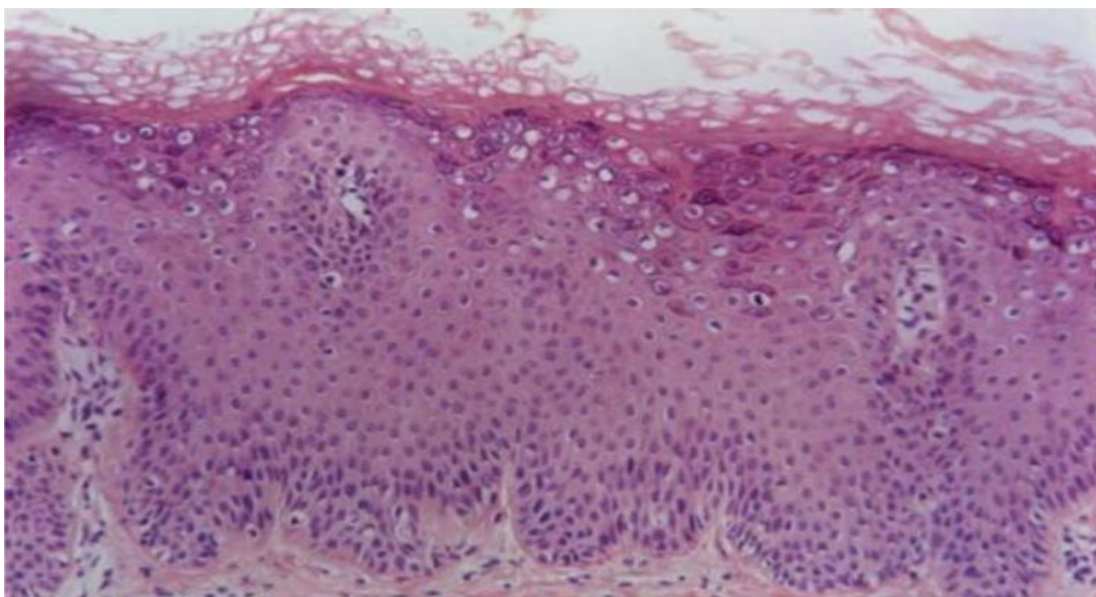
Mozaik bradavice lokalizirane su na tabanima i prezentiraju se površinski, bezbolno. Pojavljuju se kao multiple lezije koje se spajaju u keratotične plakove. Periungularne bradavice često su bolne, rastu subungvalno što može dovesti do oniholize (71, 72) (Slika 16).



Slika 16. *Verrucae plantares mosaicae* (A); *Verrucae periunguales* (B) Izvor:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0365059620306620> (CC BY 4.0)

Ravne bradavice (lat. *verrucae plane*) klinički se očituju kao lagano izdignute papule s glatkom, ravnom površinom veličine 2 do 4 mm. Obično su multiple i grupirane, boje kože ili s blagom pigmentacijom. Najčešće su lokalizirane na licu, vratu i dorzumu šake u mladih osoba, ali se mogu javiti i u odraslih žena te imunokompromitiranih osoba (HIV-pozitivnih i transplantiranih osoba). Uzrokuju ih HPV genotipovi 3, 10, 27, 28, 29 i 41. Histološki izgledaju slično običnim bradavicama, ali s manje izraženom hiperkeratozom i akantozom. Karakteristična značajka je i odsutnost papilomatoze i parakeratoze. Uočljiva je vakuolizacija stanica gornjeg spinoznog sloja i zrnatog sloja stanica s izraženom keratohijalinom granulacijom (Slika 17) (71).



Slika 17. Patohistološka slika ravne bradavice (lat. *verrucae plane*) prikazuje košarastu hiperkeratozu, hiperganulozu, akantozu sa spajanjem mrežastih izbočina epidermisa (rete ridges) i koilocitozu u gornjoj trećini epidermisa (Hematoksilin i eozin, 100×).

Izvor: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8007546/figure/fig0010/> (CC BY 4.0)

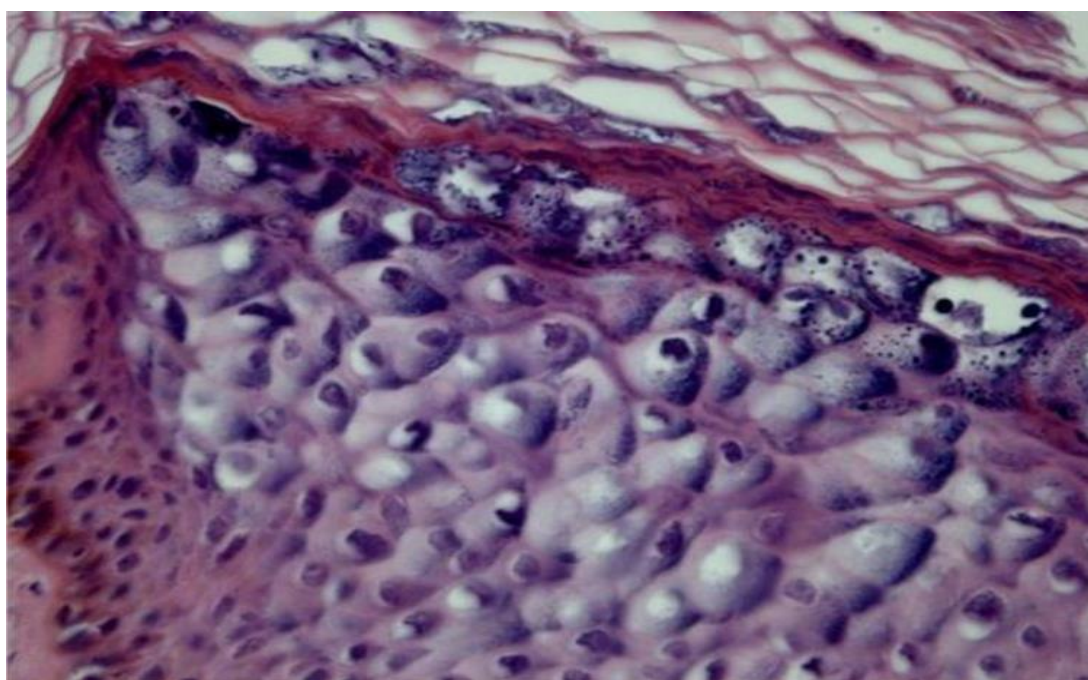
Epidermodysplasia verruciformis (EV)

Ova bolest je prvi put opisana 1922. godine (Lewandoswsky, Lutz). Klinička slika započinje u djetinjstvu ili ranoj adolescenciji, a manifestira se kao eritematozne papule ili plakovi nalik ravnim bradavicama, lokalizirani na trupu, vratu i licu (Slika 18). Lezije se često šire po cijelom tijelu. Oko 75% pacijenata ima autosomno recesivnu abnormalnost u genima *EVER1/TMC6* na lokusu 17q25 ili *EVER2/TMC8* na 2q21-24.7. Geni *TMC6* i *TMC8* kodiraju proteine koji inhibiraju osnovne transkripcijske faktore za ekspresiju HPV gena. Bolest izazivaju HPV genotipovi 5, 8, 3, 9,10, 12, 14, 15, 17, 20, 36, 38, 47, 49 i 50. Osobe s EV-om imaju povećani rizik za razvoj planocelularnog karcinoma, osobito od četvrtog desetljeća života, a najčešće se javlja na fotoeksponiranim dijelovima tijela. HPV genotipovi 5, 8, 17, 20 i 47 povezani su s malignom transformacijom (73). Histološki, keratinociti su svjetliji i blago bazofilni, a keratohijalinske granule različitih su veličina i oblika, raspoređene u zrnatom sloju epidermisa, što nalikuje slici viđenoj u ravnim bradavicama (Slika 19) (74).



Slika 18. *Epidermodysplasia verruciformis*

Izvor: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0365059620306620> (CC BY 4.0)



Slika 19. Patohistološka slika (*Epidermodysplasia verruciformis*)

Epidermodysplasia verruciformis s epitelnim stanicama koje imaju bistru citoplazmu i nuklearnu piknozu (Hematoksilin i eozin, 400×).

Izvor: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8007546/figure/fig0015/> (CC BY 4.0)

Verukozni karcinom kože predstavlja oblik dobro diferenciranog planocelularnog karcinoma koji se pojavljuje na koži stopala, uglavnom u muškaraca starijih od 55 godina. Klinički spektar manifestacija obuhvaća promjene u rasponu od male papule nalik običnoj bradavici do velikih lobularnih tumora nalik na cvjetaču. U usporedbi s ostalim karcinomima kože, raste sporije. Rizični čimbenici za nastanak verukoznog karcinoma uključuju: kroničnu iritaciju, izloženost kemikalijama, kronične rane te infekciju visokorizičnim HPV genotipovima, osobito 2 i 16 (Slika 20) (75).



Slika 20. Verukozni karcinom, dorzuma stopala (A) i taban (B).

Izvor: Update on human papilloma virus - part I: epidemiology, pathogenesis, and clinical spectrum - ScienceDirect (CC BY 4.0)

1.2.5. Dijagnostika kožnih bradavica

Dijagnoza kožnih bradavica postavlja se na temelju anamnestičkih podataka pacijenta i kliničke slike, a prema potrebi provodi se biopsija i patohistološka analiza. U svim tipovima

bradavica prisutna je hiperplazija epidermisa s akantozom i hiperkeratozom. U gornjim slojevima spinoznog epitela mogu se identificirati intranuklearna virusna tjelešca te eozinofilne inkluzije unutar citoplazme. Plantarne bradavice karakterizira izražena hiperkeratoza, dok se kod kondiloma nalaze akantoza i papilomatoza. S druge strane, juvenilne bradavice i epidermodisplazija obično ne pokazuju znakove parakeratoze, akantoze i papilomatoze.

Infekcija HPV-om može se detektirati svjetlosnim mikroskopom (npr. pojava koilocitoze, prvi put opisana 1956. godine), elektronskom mikroskopijom i imunohistokemijskim metodama. Međutim, navedene metode ne omogućavaju genotipizaciju HPV-a te imaju relativno nisku osjetljivost i specifičnost. Za preciznu detekciju HPV-a i utvrđivanje genotipova koriste se specifične i visoko osjetljive metode molekularne biologije, poput hibridizacijskih metoda (npr. HC2) i lančane reakcije polimerazom (PCR). Hibridizacijske metode temelje se na sparivanju komplementarnih sekvenci označenih dijelova nukleinskih kiselina (proba) s ciljnom DNA. Najosjetljivija metoda za dokazivanje i genotipizaciju HPV-a danas je PCR. Temelji se na umnožavanju (amplifikaciji) jedinstvenih sekvenci DNA ili RNA specifičnih za svaki mikroorganizam do razine detekcije. Za amplifikaciju virusnog genoma koristi se genotip-specifične i grupno specifične probe - prve ciljaju sekvencu specifičnu za pojedini genotip, dok druge obuhvaćaju probe zajedničke većem broju genotipova (76).

1.2.6. Liječenje kožnih bradavica

U 50 do 90% slučajeva bradavice se spontano povuku u razdoblju do pet godina. Liječenje je često dugotrajno i zahtijeva višekratna ponavljanja. Najčešće se započinje s lokalnim destruktivnim metodama, kao što su krioterapija (nanošenje tekućeg dušika na leziju) i primjena keratolitika, koji uklanjaju gornji sloj epitela i potiču regeneraciju zdravog tkiva. Najčešće korišteni keratinolitici su bikloroetena, trikloroetena i salicilna kiselina. Krioterapija se ne preporučuje kod periungvalnih bradavica zbog mogućih ireverzibilnih oštećenja.

Kod većih i kompliciranih lezija može se provesti kirurško liječenje (ekscizija, ekskohleacija, elektrokauterizacija), a kod teško dostupnih lezija koristi se laserska terapija (77, 78). 5-Fluorouracil (5-FU) je antimetabolički i antineoplastički lijek, koji inhibira sintezu DNA i RNA, djelujući antiproliferacijski na epitel. Primjenjuje se kao 5% krema jednom dnevno, ali može izazvati lokalnu iritaciju, alergijski kontaktni dermatitis i oniholizu, osobito kod periungvalnih bradavica (78, 79). Tretinoin je retinoid koji se koristi u liječenju multiplih otpornih običnih i ravnih bradavica, dostupan kao 0,005% krema (80). Liječenje je moguće i kremama s imunomodulatornim ili interferonskim djelovanjem. Imikvimod, koji djeluje preko

TLR7 receptora, potiče upalni odgovor i proizvodnju interferona alfa, TNF-a i interleukina 12 te aktivaciju prirodnih stanica ubojica, čime remeti replikaciju virusa. Koristi se za liječenje genitalnih bradavica, ali nema dovoljno dokaza o terapijskom učinku na obične bradavice. Može se koristiti i u kombinaciji s lokalno destruktivnim metodama, s ciljem smanjenja lokalnih recidiva (78, 81).

1.3. Toll-like receptor (TLR)

Kao odgovor na izloženost patogenima, organizam koristi urođene i adaptacijske sposobnosti imunološkog sustava da bi se zaštitio od infekcije. Urođeni imunološki sustav, u cilju zaštite organizma od infekcije, koristi fizičku barijeru, kao što je koža i epitel, te osnovne stanične mehanizme koji uključuju dendritske stanice, monocitima, prirodnim stanicama ubojicama (NK stanicama), granulocitima i epitelnim stanicama. Ove stanice posjeduju strukturne receptore za posredovanje u imunološkom odgovoru.

Humani receptori TLR (od engl. *Toll-like receptors*) pripadaju skupini strukturnih receptora i imaju ključnu ulogu u pokretanju urođenog imunološkog odgovora te utječu na kasnije adaptivne imune odgovore (82). TLR receptori su izraženi u različitim tipovima stanica kože: keratinocitima, Langerhansovim stanicama, monocitima, makrofagima, T i B limfocitima, mastocitima, endotelnim stanicama krvnih žila kože te fibroblastima i adipocitima što doprinosi obrani protiv različitih mikroorganizama (83).

Toll receptor otkriven je u vinskoj mušici (*Drosophila melanogaster*), što je 1995. godine znanstvenicima Christiane Nüsslein-Volhard i Ericu Wieschaus donijelo Nobelovu nagradu. Naziv dolazi od njemačke riječi „toll“, što znači fantastično. Godine 2011. Jules A Hoffmann i Bruce A. Beutler nagrađeni su Nobelovom nagradom za otkriće uloge TLR-a u prirođenom imunitetu, dok je Ralph M. Steinman nagrađen za otkriće dendritičnih stanica i njihove uloge u adaptivnom imunitetu (84).

TLR receptori su transmembranski proteini koji omogućuju domaćinu prepoznavanje širokog spektra mikrobioloških struktura, uključujući lipopolisaharide bakterija, virusnu RNA, DNA s CpG ponavljanjima, flagelin i druge, kao i endogene ligande koji nastaju uslijed staničnog oštećenja tijekom upalnih i stresnih reakcija. Interakcija liganda s TLR-om inicira signalne kaskade koje dovode do aktivacije akutnog odgovora, esencijalnog za uklanjanje patogena. Za pokretanje stanično-specifičnog imunološkog odgovora ključne su dendritičke stanice, čije sazrijevanje potiču TLR-i. Ipak, aktivacija TLR receptora može imati i štetne posljedice. Pretjerana aktivnost određenih TLR-ova povezuje se s patogeneom autoimunih

bolesti (npr. eksperimentalno inducirani autoimuni encefalomijelitis), kroničnih upalnih stanja (poput astme i reumatoidnog artritisa), kao i određenih infektivnih bolesti. TLR receptori mogu doprinijeti pogoršanju infekcija poticanjem prekomjerne proizvodnje proinflamatornih citokina, što dovodi do oštećenja tkiva, ili pak narušiti zaštitni imunitet, čineći organizam podložnijim infekciji. Budući da su TLR-i prisutni na različitim stanicama, mogu inicirati razvoj upalnih i imunoloških bolesti (84, 85). TLR-i uključeni su u proces popravka gena, kao i u posredovanje između upale i oštećenja DNA (86).

1.3.1. Toll-like receptori i njihovi ligandi

Svaki TLR ima specifičnu ulogu u obrani organizma od patogena. Ovi receptori omogućuju domaćinu prepoznavanje patogenima pridruženih molekularnih obrazaca (PAMP), među kojima su polipeptidi, glikoproteini, lipopolisaharidi, bakterijski flagelin, DNA i RNA virusa te druge molekule. Dosad je identificiran velik broj liganada TLR receptora, i patogenog i endogenog podrijetla, koji se međusobno razlikuju upravo prema svojoj specifičnosti za određeni TLR (85).

Prema lokalizaciji i funkciji u stanici domaćina, razlikuju se membranski Toll-like receptori, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 i TLR10 te njihovi dimeri TLR1/TLR2, TLR2/TLR6, TLR2/TLR4/5/10) i unutarstanični TLR-ovi, TLR3, TLR7, TLR8 i TLR9 smješteni na membranama endoplazmatskog retikuluma, endosoma i lizosoma (Slika 21) (87).

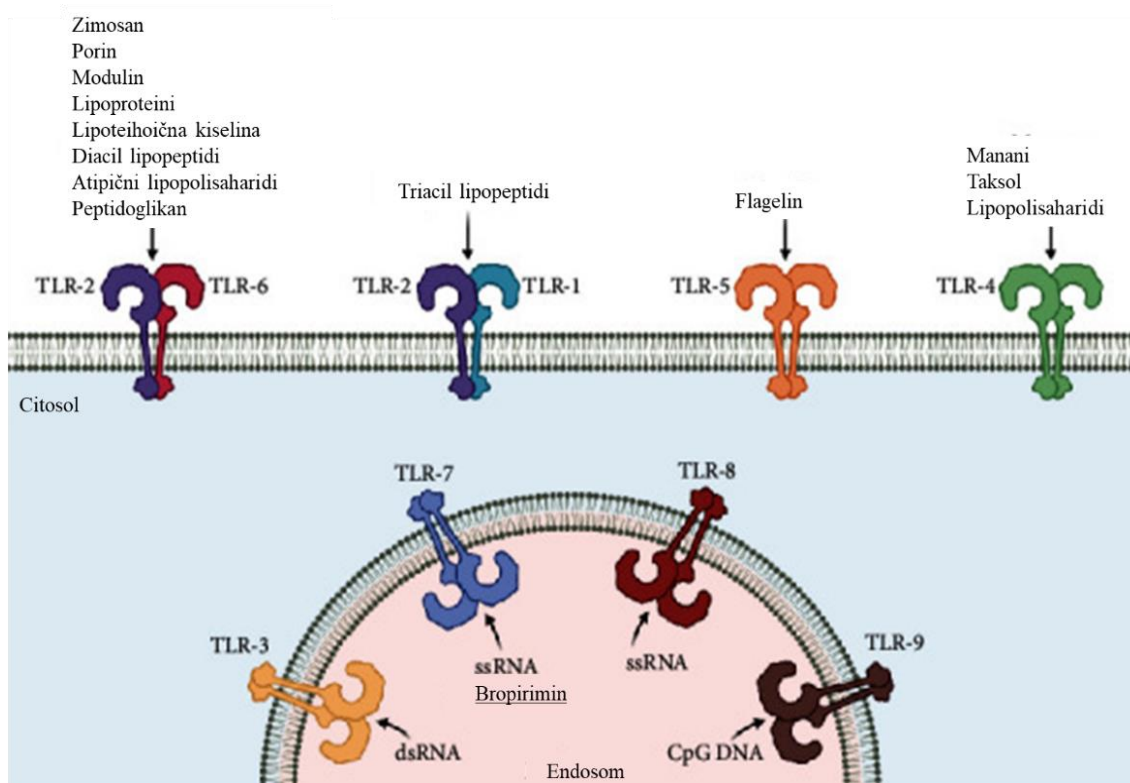
U koži se TLR2 izražava na keratinocitima i stanicama lojnih žlijezda. Ovaj receptor prepoznaje najširi spektar liganada među TLR-ovima, uključujući peptidoglikan Gram-negativnih bakterija, lipoproteine i lipoteihoičnu kiselinu Gram-pozitivnih bakterija, fenol-topivi modulin (*Staphylococcus epidermidis*), glikolipide, zimosan iz gljiva, protein toplinskog šoka 70 (Hsp70), proteine virusa hepatitisa C, DNA herpes virusa te RNA respiratornog sincicijskog virusa (RSV). Također, TLR2 ima mogućnost funkcionalnog stvaranja dimera s TLR1 i TLR6, pa zajedno sudjeluju u prepoznavanju virusa, poput virusa ospica, CMV-a i HCV-a. Stimulacija TLR2 s *C. albicans*, *M. tuberculosis* i *S. aureus*, pokreće intracelularni put prijenosa signala i aktivaciju čimbenika transkripcije NF- κ B u kulturi keratinocita, što pokazuje da keratinociti nisu samo dio fizičke barijere kože već da imaju ključnu ulogu i u imunom odgovoru (88).

TLR3 se nalaze na različitim stanicama kože, poput keratinocitima, Langerhansovim stanicama, mastocitima i fibroblastima. Ligandi za TLR3 su dvolančana RNA (dsRNA) koja je produkt replikacije virusa ili je dio virusnog genoma RNA. Najčešći sintetski ligandi su

poliinozilna:policitidilna kiselina, poli(I:C) i poliadenilna:poliuredilna kiselina, poli (A:U). Poli (A:U) djeluje kao selektivni ligand za TLR3, dok poli (I:C), kao sintetski analog virusne dvočančane RNA, može aktivirati i druge članove TLR obitelji. Signalizacija posredovana TLR3 predstavlja ključnu komponentu urođene imunosti i smatra se važnim mehanizmom u inicijalnoj obrani domaćina protiv virusnih infekcija (84, 85).

TLR9 je izražen na makrofagima, epitelnim stanicama probavnog i respiratornog sustava, dendritskim stanicama i keratinocitima. Posreduje u staničnom odgovoru na bakterijsku DNA bogatu CpG parovima, a aktiviraju ga i herpes virusi i gljivice poput *Aspergillus*. Miševi s hipofunkcionalnim oblikom TLR9 receptora pokazuju povećanu podložnost infekciji mišjim citomegalovirusom (MCMV). Detekcija mišjeg citomegalovirusa uz pomoć Toll-like receptora 9, koji je izražen na plazmacitoidnim dendritičnim stanicama (pDC), inicira urođeni imunološki odgovor aktivacijom prirodnih stanica ubojica (NK stanica), što predstavlja ključni mehanizam rane antivirusne obrane (84, 85).

Osim što prepoznaju patogenima pridružene molekularne obrasce (PAMP), Toll-like receptori mogu se aktivirati i interakcijom s molekulama endogenog podrijetla, koje potječu iz oštećenih, apoptotskih ili nekrotičnih stanica. Među takvim molekulama domaćina nalaze se HMGB1 (od engl. *high mobility group box 1*), surfaktantni protein A, fibrinogen te proteini toplinskog šoka (Hsp), uključujući Hsp60, Hsp70 i Hsp90. Ove molekule klasificiraju se kao endogeni ligandi (DAMP, od engl. *damage-associated molecular patterns*). Međutim, brojna pitanja i dalje ostaju nerazjašnjena u pogledu točnog podrijetla endogenih TLR liganada i mehanizama njihove interakcije s TLR receptorima (Slika 21) (89–92).



Slika 21. TLR receptori i ligandi

Izvor: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8452412/figure/fig2/> (CC BY 4.0)

1.3.2. Građa i signalni putovi TLR-a

Toll like receptori su transmembranski receptori građeni od izvanstanične i unutarstanične domene. Izvanstanična domena sastoji se od ponavljajućih sekvenci bogatih leucinom (LRR, od engl. *leucin-rich repeats*), koje predstavljaju mjesto vezanja liganda. Unutarstanična domena strukturno je slična domeni receptora za interleukin-1 (IL-1), zbog čega se naziva TIR domena (od engl. *Toll/IL-1 receptor*), bitna je u provođenju signalizacije. Ove dvije domene su povezane integralnom membranskom domenom (93). Transmembranski protein UNC93B1 posreduje u unutarstaničnom prijenosu TLR-ova koji prepoznaju nukleinske kiseline (94).

Stimulacija TLR receptora rezultira aktivacijom ključnih faktora transkripcije, NF- κ B, AP-1 i IRF, što posljedično inducira sintezu proinflammatoryh citokina, kemokina i interferona (IFN). Putem ovih signalnih mehanizama, TLR receptori sudjeluju ne samo u inicijaciji urođene imunosti, već i u oblikovanju stečenog imunološkog odgovora domaćina na patogene (95)

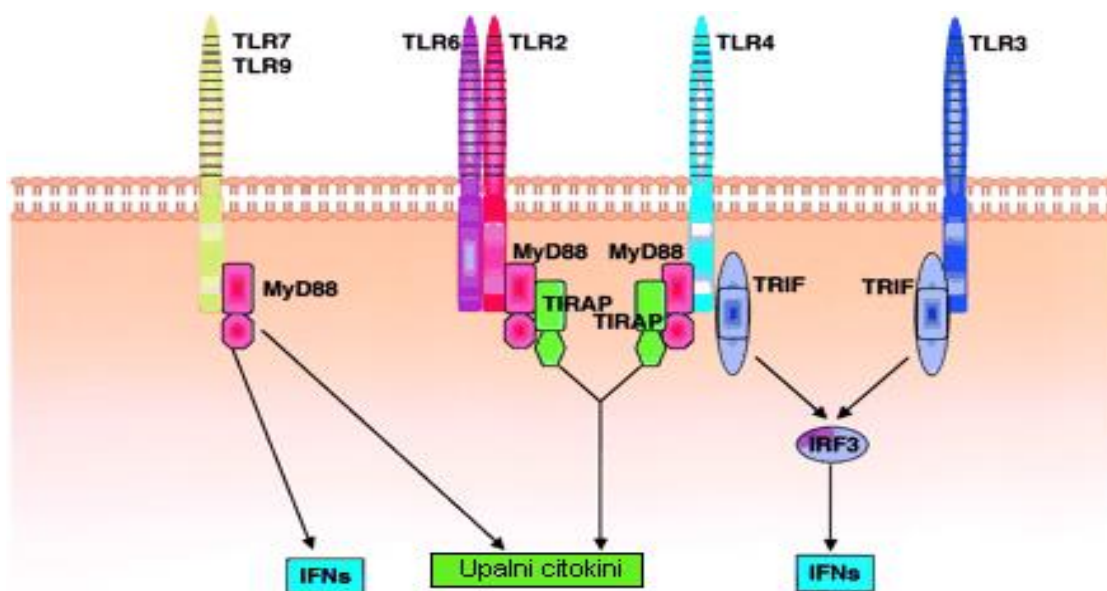
Nakon vezanja liganda, intracelularna domena TLR receptora inicira signalne puteve koji mogu biti MyD88-ovisni ili neovisni. U gotovo svim TLR-ovima, osim TLR3, ključnu ulogu ima adaptor proteinska molekula MyD88 (od engl. *myeloid differentiation primary response gene 88*), koja posreduje u prijenosu signala prema nizvodnim efektorima transkripcije. Aktivacija TLR receptora dovodi do regrutacije adaptor proteina MyD88, koji potom veže kinazu IRAK (od engl. *IL-1 receptor-associated kinase*), omogućujući njihovu interakciju putem njegovih domena smrti (od engl. *death domains*). IRAK se aktivira fosforilacijom, nakon čega se veže na adaptor TRAF6 (od engl. *TNF receptor-associated factor 6*), čime se pokreću nizvodni signalni putevi, uključujući aktivaciju JNK-a (od engl. *c-Jun N-terminal kinase*) i NF- κ B-a (od engl. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*). Ova signalizacija rezultira transkripcijom gena uključenih u upalni odgovor.

IRAK (od engl. *interleukin-1 receptor-associated kinase*) predstavlja obitelj serin-treonin kinaza koje se vežu za IL-1 receptor i TIR domenu TLR receptora, posredujući u prijenosu signala. Članovi ove obitelji uključuju IRAK-1, IRAK-2, IRAK-4 i IRAK-M. IRAK-1 i IRAK-4 posjeduju konzervirani katalitički aspartatni ostatak neophodan za kinaznu aktivnost, dok on izostaje u IRAK-2 i IRAK-M, čime se oni smatraju pseudokinazama ili regulatornim molekulama. Nakon aktivacije TLR signalnog puta, IRAK-4 fosforilira IRAK-1, čime se ovaj aktivira i djeluje kao ključni efektorski posrednik u nizvodnoj signalizaciji prema transkripcijskim čimbenicima poput NF- κ B i AP-1 (96).

TRAF6, član obitelji adapter proteina povezanih s receptorima za tumor nekrotizirajući faktor (TNF), nakon aktivacije TLR signalnog puta veže se na kompleks s aktiviranim IRAK-1, koji posreduje njegovu aktivaciju. Nakon toga, signalni kompleks disocira, a TRAF6 se veže na TAK1 zajedno s adapter proteinima TAB1, TAB2 i TAB3. IRAK-1 ostaje na membrani i ubrzo biva degradiran, dok se ostatak signalnog kompleksa translocira u citoplazmu, gdje stupa u interakciju s Ubc13 i Uev1A, čime se omogućuje poliubikvitinacija i aktivacija TAK1. Ova aktivacija rezultira fosforilacijom IKK- β i MKK6, što dalje vodi do aktivacije ključnih faktora transkripcije: NF- κ B, MAP kinaza i AP-1. Posljedično dolazi do transkripcije gena uključenih u upalni odgovor, odnosno ekspresije proinflamatornih medijatora (96).

U MyD88-neovisnom signalnom putu, koji je karakterističan za TLR3 i TLR4, signalna transdukcija započinje regrutacijom adaptor proteina TRIF, koji posreduje aktivaciju TRAF3, a zatim aktivira kinazu TBK1. TBK1, zajedno s inducibilnim I κ B kinazama, omogućuje fosforilaciju i aktivaciju transkripcijskih čimbenika IRF3 i IRF7 (od engl. *interferon regulatory factor 3 i 7*), čime se potiče sinteza tip I interferona i drugih antiviralnih medijatora. U okviru MyD88 neovisnog signalnog puta, aktivacija transkripcijskog čimbenika NF- κ B i posljedična

sinteza proupalnih citokina odvija se putem interakcije adaptor proteina TRIF s TRAF6. Ova signalna osovina omogućuje pokretanje upalnog odgovora neovisno o MyD88, posebice u kontekstu TLR3 i TLR4 signalizacije (Slika 22) (97).



Slika 22. TLR - MyD88 ovisan i neovisan signalni put

Izvor: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(20\)83105-6/fulltext](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(20)83105-6/fulltext) (CC BY 4.0)

U prijenosu signala putem MyD88-ovisnog i MyD88-neovisnog puta sudjeluje više adaptornih molekula, uključujući TIRAP/Mal (od engl. *TIR domain-containing adaptor protein / MyD88 adaptor-like*) te TRIF/TICAM-1 (od engl. *TIR domain-containing adaptor inducing IFN- β / TIR domain-containing adaptor molecule-1*). Ove molekule posreduju specifično prepoznavanje i aktivaciju nizvodnih efektorskih mehanizama ovisno o tipu uključenog TLR receptora. Adaptorna molekula TIRAP/Mal (*TIR domain-containing adaptor protein / MyD88 adaptor-like*) posreduje vezanje MyD88 uz TLR2 i TLR4, čime omogućuje aktivaciju nizvodnih signalnih puteva, uključujući JNK i NF- κ B. S druge strane, TRIF/TICAM-1 (*TIR domain-containing adaptor inducing IFN- β*) ključan je adaptor u MyD88-neovisnoj signalizaciji TLR3 i TLR4, pri čemu inducira sintezu interferona β (IFN- β) i proinflamatornih citokina u kasnijim fazama imunološkog odgovora (97).

Signalna transdukcija posredovana receptorima TLR7, TLR8 i TLR9 odvija se isključivo putem MyD88-ovisnog signalnog puta, pri čemu primarno dolazi do aktivacije transkripcijskog čimbenika IRF7 od engl. (*interferon regulatory factor 7*). IRF7 je ključan za indukciju tip I interferona te posjeduje i dokazan onkogeni, ali i protutumorski potencijal, ovisno o kontekstu stanične signalizacije (Slika 22) (98).

Toll-like receptori (TLR) predstavljaju ključne senzore prepoznavanja patogenih mikroorganizama te imaju središnju ulogu u inicijaciji urođenog imunološkog odgovora. Intenzitet i trajanje aktivacije TLR signalnog puta podložni su strogoj regulaciji, budući da njegova prekomjerna ili dugotrajna aktivacija može imati štetne posljedice za domaćina. Naime, disregulirana TLR signalizacija može potaknuti T-stanicama posredovanu autoimunu aktivaciju, što rezultira kroničnom upalom i razvojem različitih kožnih bolesti, uključujući atopijski dermatitis, psorijazu, sistemski eritemski lupus, fibrotične kožne lezije te određene oblike kožnih tumora. Ravnoteža TLR-signalizacije održava se djelovanjem negativnih regulatora čija je ekspresija inducirana isključivo nakon aktivacije TLR-a, pri čemu oni djeluju putem mehanizma negativne povratne sprege. Svaki negativni regulator specifično cilja određene komponente signalnog puta, a njihovi mehanizmi djelovanja su funkcionalno različiti i nepoklapajući. Zbog toga gubitak ili disfunkcija pojedinog regulatora nije nadoknadiiva drugim, što može rezultirati razvojem imunološki posredovanih patoloških stanja (99, 100).

1.3.3. Polimorfizam TLR-a

Genska raznolikost jedno je od temeljnih i najčešće proučavanih obilježja ljudskog genoma, s ključnom ulogom u razumijevanju biološke varijabilnosti, nasljednih bolesti i evolucijskih procesa. Može se analizirati na različitim razinama, od varijabilnosti sekvence cijele DNA, preko genotipskih varijacija, do fenotipskih izražaja. Svaka strukturna promjena genomske DNA koja rezultira prisutnošću dvaju ili više alela na istom lokusu, s učestalošću većom od 1 % u općoj populaciji, definira je kao genski polimorfizam. Osim točkastih mutacija, polimorfizmi mogu nastati i mehanizmima insercije ili delecije određenog broja nukleotida. Ti procesi najčešće proizlaze iz pogrešnog uparivanja baza uslijed iskliznuća replikacijskog djela, neujednačenog crossingovera tijekom mejoze ili rekombinacije sestrinskih kromatida. Genski polimorfizmi najčešće se koriste u istraživanjima kojima je cilj pronalaženje gena koji se nalaze u podlozi određene bolesti. Stoga su najveću primjenu našli mikrosatelitni biljezi (STR, od engl. *short tandem repeat*) i polimorfizmi jednog nukleotida (SNP, od engl. *single nucleotide polymorphism*). STR predstavlja kratku sekvencu sastavljenu obično od dva do šesnaest nukleotida koja se u genomu ponavlja varijabilan broj puta uzastopno, najčešće unutar

nekodirajućih regija DNA. SNP polimorfizam, nastaje zbog zamjene jednog nukleotida s drugim (npr. A → C) u točno određenom mjestu u DNA i predstavlja najčešći oblik varijacije u odsječku DNA (otprilike 90% svih polimorfizama). Da bi promjena jednog nukleotida u slijedu DNA bila klasificirana kao SNP, učestalost najmanje zastupljenog alela mora biti zabilježena u najmanje 1% ispitivane populacije. Do danas je identificirano više milijuna SNP, koji su sustavno pohranjeni u javno dostupne baze podataka i predstavljaju vrijedan izvor informacija za istraživanja genetske raznolikosti (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>; <http://snp.cshl.org>).

Učestalost pojavljivanja SNP-ova na razini kromosoma općenito je konzistentna unutar ljudskog genoma, s izuzetkom spolnih kromosoma, osobito kromosoma Y, gdje je zabilježena znatno niža gustoća. Međutim, unutar pojedinačnih kromosoma uočavaju se razlike u distribuciji SNP-ova, uključujući razlike između kodirajućih i nekodirajućih sekvenci te između različitih gena. Zbog njihove visoke učestalosti i potencijalnog utjecaja na ekspresiju gena i funkcionalnost proteina, SNP-ovi se smatraju ključnim genetskim čimbenicima u patogenezi brojnih bolesti.

Većina znanstvenih genetičkih istraživanja fokusira se na identifikaciju SNP-ova smještenih unutar kodirajućih i regulatornih regija genoma, posebice tzv. kodirajućih SNP-ova (cSNP, od engl. *coding single nucleotide polymorphisms*), koji mogu uzrokovati promjene u strukturi i funkciji proteina. Svaki SNP biljeg označen je jedinstvenom oznakom koja započinje prefiksom „rs“ (od engl. *restriction site*), praćenim serijskim brojem koji se dodjeljuje kronološkim redoslijedom otkrivanja varijante (101, 102). Genetski polimorfizmi ljudskog genoma sustavno su opisani zahvaljujući međunarodnom projektu HapMap (od engl. *International HapMap Project*). Ovaj projekt omogućio je identifikaciju najčešćih obrazaca genetičke varijabilnosti u ljudskoj populaciji, osobito onih varijanti koje su povezane sa sklonošću bolestima, farmakogenetskim odgovorima i interakcijama s okolišnim čimbenicima (103).

U genima *TLR*-a pronađeni su brojni SNP-ovi koji su povezani s različitim zaraznim, autoimunim i malignim bolestima. Neki od tih polimorfizama koreliraju sa smanjenom funkcionalnom aktivnošću TLR proteina, što može utjecati na efikasnost imunološkog odgovora (104).

Gen *TLR2* nalazi se na 4q31.3, kodira protein s 784 aminokiseline, molekularne težine 89,9 kDa (105). Polimorfizam gena *TLR2* (rs4696480) i mikrosatelitski polimorfizam u intronu 2 (GT) povezuje se s povećanim rizikom za razvoj spontanog bakterijskog peritonitisa u osoba s cirozom jetre (106). Genske varijacije u *TLR2* mogu značajno doprinijeti osjetljivosti na astmu. Polimorfizam *TLR2* (rs4696480 A) povezuje se s povećanim rizikom od astme kod djece

koja su više izložena štetnim učincima onečišćenog zraka (107) te se povezuje s astmom i alergijama kod djece poljoprivrednika (108).

Postoje oprečni dokazi povezanosti polimorfizma gena *TLR2* (rs4696480) s atopijskim dermatitisom. Za polimorfizam *TLR2* (rs4696480) uočena je veća učestalost homozigotnog A/A genotipa kod pacijenata s atopijskim dermatitisom u usporedbi s kontrolnom skupinom (109). Mozyrska OV i suradnici iznose povezanost AA verzije polimorfizma *TLR2* rs4696480 s razvojem težeg kiničkog oblika atopijskog dermatitisa (110), dok u Turske djece nije pronađena povezanost ovog polimorfizma s atopijskim dermatitisom (111). Druga istraživanja provedena u Japanu, sugeriraju povezanost s AD -om, te bi mogli biti pokazatelji težine bolesti jer *TLR 2* (rs4696480) polimorfizam utječe na transkripcijske aktivnosti koje su povezane s kliničkim simptomima (112).

U Turskoj populaciji, polimorfizam *TLR2* (rs4696480) pokazuje značajnu povezanost s genetičkom predispozicijom za psorijazu što upućuje na utjecaj TLR na pojavu, razvoj i kliničke ishode bolesti (113).

Gen *TLR3* nalazi se na 4q35.1, kodira protein s 904 aminokiseline s molekularnom težinom, 103,8kDa (114). *TLR3* se nalaze na različitim stanicama kože, poput keratinocitima, Langerhansovim stanica, mastocitima i fibroblastima. Nakon stimulacije *TLR3* egzogenim ili endogenim ligandima, ove stanice sudjeluju u patogenezi virusnih infekcija kože kao i alergijskog kontaktnog dermatitisa. Također, *TLR3* signalni put povezan je s obnovom kožne barijere nakon oštećenja tkiva te bi mogao biti uključen i u patogenezu AD-a, ali točna uloga nije precizno definirana (115). Nalaze se i podaci o ekspresiji gena *TLR3* u virusnim bradavicama u korejskoj populaciji, ali nema objavljenih podataka o polimorfizmu gena *TLR* u virusnim bradavicama (116). Čini se da antagonisti *TLR3* kao multifunkcionalni adjuvansi, mogu potpuno inhibirati rast tumorskih stanica melanoma i povećati humoralni i specifični imunološki odgovor (117).

Polimorfizmi pojedinih nukleotida u *TLR3* mogu potencijalno utjecati na osjetljivost prema nastanku raka. Prema Moore i suradnicima, rs7657186 (intron 1) *TLR3* može se povezati s kontinuiranim odgovorom imunološkog sustava nakon cijepljenja protiv meningokoka serogrupe C (118). Ávila-Castellano i suradnici navode gensku varijaciju u *TLR3* i povezanost više polimorfizama i rs7657186 s predispozicijom za nastanak eozinofilnog ezofagitisa (119). Međutim, nije uočena povezanost rs7657186 (intron 1) *TLR3* s melanomom (120) i karcinomom dojke (121).

Gen *TLR9* nalazi se na kratkom kraku kromosoma 3 (3p21.2), kodira protein s 1032 aminokiseline s molekularnom težinom 115,8 kDa. (122). Polimorfizam gena *TLR9* (rs352139) i *TLR2* (rs4696480) povezuje se s odgovorom na liječenje biološkom terapijom u pacijenata s umjereno do težom kliničkom slikom psorijaze u Danskoj populaciji (123). Promjena u *TLR9* genu (rs352139) pokazuje povezanost s manjim rizikom od velikog broja kopija HPV16 genotipa u osoba s karcinomom cerviksa (124).

Polimorfizam gena *TLR9* (rs352139) povezuje se s povećanim rizikom od tuberkuloze pluća u moldavskoj populaciji (125), s rizikom od infekcije CMV-om u osoba s transplatacijom bubrega (126, 127), s rizikom od infekcije s CMV-om u kasnoj trudnoći među ženama crnačke populacije Zimbabvea (128), s remisijom u pacijenata s reumatoidnim artritisom koji su na TNF- α inhibitorima (129), s većim rizikom od infekcije Epstein-Barr virusom i akutnom fazom mononukleoze u djece i adolescenata (130). Genski polimorfizam *TLR9* rs352139 u donora je ubrzao izlučivanje Tacrolimusa u ranoj postoperativnoj fazi nakon transplatacije jetre među kineskim pacijentima, što bi moglo biti povezano s povećanom aktivnosti enzima CYP3A5 putem NF-kB/PXR signalnog puta (131).

Nadalje, *TLR9* rs352139 utječe na prognozu u novorođenčadi s teškom kliničkom slikom hepatitisa (132), pokazuje značajnu povezanost s karcinomom rektuma žena Saudijske Arabije (133), mogu potaknuti neravnotežu između pro- i antiupalnih citokina što doprinosi kroničnim upalama i mogućeg razvoja karcinoma dojke (134), s većom genskom osjetljivošću prema SLE u azijskoj, europskoj i latinoameričkoj populaciji (135), i značajnu povezanost s rizikom od perinatalne transmisije HIV-1 (136). Nema značajnu povezanost s rizikom od karcinoma cerviksa među ženama iz Švedske populacije (137).

Koža predstavlja ključni pokrovni organ i funkcionalnu barijeru između organizma i vanjskog okoliša, služeći kao primarna kontaktna površina na kojoj dolazi do interakcije između mikroorganizama i imunoloških receptora domaćina. Posredovanjem TLR-a, koža postaje barijera protiv infekcija. TLR-ovi, posebno TLR2, TLR3 i TLR9, mogu identificirati određene dijelove virusa, poput virusnih proteina ili nukleinskih kiselina i pokrenuti niz signalnih putova, što rezultira aktivacijom imunoloških odgovora. Polimorfizmi u genima, poput onih iz skupine *TLR*-a, mogu utjecati na osjetljivost domaćina na HPV infekciju te na razvoj kožnih lezija. Naime, polimorfizmi gena *TLR*-a (*TLR2*, *TLR3*, *TLR9*) povezani su s nizom infektivnih i upalnih bolesti, kao i s razvojem različitih kožnih lezija. Međutim, u dostupnoj literaturi nedostaju podaci koji bi potvrdili povezanost ovih čimbenika s nastankom keratoakantoma i virusnih bradavica. S obzirom na to, opravdano je pretpostaviti da bi raspodjela alela i genotipova u genima *TLR2*, *TLR3* i *TLR9* mogla pokazati razlike između dviju

ispitivanih skupina. To bi moglo doprinijeti boljem razumijevanju etiologije keratoakantoma (bolesti kože nejasne etiologije) i virusnih bradavica, koje imaju jasno definiranu virusnu etiologij.

2. HIPOTEZA I CILJEVI

2.1. Hipoteza

Neke polimorfne varijante gena *TLR 2*, *3* i *9* javljaju se češće u oboljelih od keratoakantoma i virusnih bradavica u odnosu na kontrolnu skupinu i mogle bi biti povezane s imunološkim odgovorom keratinocita koji su u kontaktu s virusom.

2.2. Ciljevi istraživanja

1. Odrediti polimorfne varijante gena *TLR2* (rs4696480), *TLR3* (rs7657186) i *TLR9* (rs352139) u uzorcima keratoakantoma, virusnih bradavica i u kontrolnoj skupini ispitanika.
2. Analizirati raspodjelu učestalosti alela i genotipova navedenih polimorfizama gena u uzorcima keratoakantoma, virusnih bradavica i kontrolnoj skupini ispitanika.
3. Analizirati povezanost određenih alela i genotipova s keratoakantomom i virusnim bradavicama u usporedbi s kontrolnom skupinom ispitanika.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Etička načela

Istraživanje je provedeno prema smjernicama i propisima Helsinške deklaracije, za što je dobivena suglasnost Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Split (broj odobrenja EP/2017/425 i 2181-147/01/06/M.S.-20-02, 01.04.2021.).

3.1.2. Uzorci tkiva

Istraživanje je obuhvatilo uzorke tkiva iz 161 keratoakantoma i 152 obične bradavice. Uzorci su dobiveni kirurškom ekscizijom tkiva te su zatim uklopljeni u parafin. Dijagnoza je postavljena dvostrukom patohistološkom analizom od strane specijalista patologije i dermatologije, uže specijaliziranih za dermatoonkologiju. Opisani uzorci tkiva ugrađeni u parafin su prikupljeni na Zavoda za dermatologiju i venerologiju te na Zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju Kliničkog bolničkog centra Split. Dodatno, odabrana je kontrolna skupina od 469 pojedinaca iz veće populacijske kohorte naziva “10.001 Dalmatinac” iz Hrvatske biobanke (138), koji su prethodno genotipizirani, bez verificiranih kožnih bolesti. Potrebnu veličinu uzorka za keratoakantom i virusne bradavice, od najmanje 150 ispitanika po skupini i 450 kontrolnih ispitanika, izračunali smo usporedbom omjera učestalosti homozigotnog genotipa za sva tri SNP-a, koristeći program *Genetic Association Study (GAS) PoweCalculator*

(https://csg.sph.umich.edu/abecasis/cats/gas_power_calculator/reference.html).

Ova genetička studija na ispitivanim uzorcima ima snagu od 80% za otkrivanje značajnih učestalih genskih varijanti s velikim učinkom (tj. značajnih SNP-ova s učestalošću rizičnog alela od barem 0,39 i relativnim rizikom genotipa od 1,5), na razini značajnosti od $P < 0,017$ (nakon Bonferronijeve korekcije).

3.1.3. Ispitivani lokusi

Polimorfizmi jednog nukleotida u genima *TLR2*, *TLR3* i *TLR9*, prikazani u Tablici 2, određeni su koristeći komercijalni TaqMan SNP esej za genotipizaciju (*TaqMan SNP Genotyping Assays*, Applied Biosystems, Wilmington, DE, SAD).

Tablica 2. Opis polimorfizama jednog nukleotida (SNP) u genima *TLR2*, *TLR3* i *TLR9*

Gen	SNP	Regija	Aleli	MAF
<i>TLR2</i>	rs4696480	4q31.1	A/T	0,47
<i>TLR3</i>	rs7657186	4q35.1	A/G	0,21
<i>TLR9</i>	rs352139	3p21.2	C/T	0,39

SNP - od engl. *single nucleotide polymorphism* (polimorfizmi jednog nukleotida)

MAF - od engl. *minor allele frequency* (učestalost manje zastupljenog alela)

Esej za genotipizaciju polimorfizma rs4696480 u genu TLR2:

- Esej ID: C_27994607_10

- Sekvenca:

TCCAAGATTGAAGGGCTGCATCTGG[A/T]GAGGGTCATCTGGCTACATTATAAC

- Reporter 1 VIC – nukleotid A
- Reporter 2 FAM – nukleotid T

Esej za genotipizaciju polimorfizma rs7657186 u genu TLR3:

- Esej ID: C_27310255_20

- Sekvenca:

TCTTGTCTAGGCACAGACAACACC[A/G]TATGGAATAAGAACTATGTCCTCTA

- Reporter 1 VIC – nukleotid A
- Reporter 2 FAM – nukleotid G

Esej za genotipizaciju polimorfizma rs352139 u genu TLR9:

- Esej ID: C_2301953_10

- Sekvenca:

TGTGTGAGTGGCCGGCCCCCAGCTC[C/T]ACCTCCACCCACTCCACTTCATGGG

- Reporter 1 VIC – nukleotid C
- Reporter 2 FAM – nukleotid T

3.1.4. Kemikalije

- Ksilen (T.T.T. d.o.o., Republika Hrvatska)
- Etanol (J.T. Baker, SAD)
- Molekularna voda (Invitrogen, SAD)
- Agaroza (Sigma, SAD)
- Tris (Sigma-Aldrich, SAD)
- Octena kiselina (Kemika, Republika Hrvatska)
- EDTA (Roth, Njemačka)
- Etidium bromid (Sigma-Aldrich, SAD)

3.1.5. Puferske otopine

- 1X TAE pufer – razrijeđen iz koncentrirane 50 X otopine TAE pufera (pH = 8,0, 2M Tris, 5,7% octena kiselina, 100 mM EDTA)
- 2X TaqMan GT Master Mix (Applied Biosystems, SAD)

3.1.6. Korištena aparatura

- Vortex-Genie 2 (Weber Scientific, SAD)
- Centrifuga (Heraus Fresco 17, Thermo Fisher Scientific, SAD)
- Termoblok (Termo Shaker Incubator Thriller, Peqlab, UK)
- NanoDrop 1000 spektrofotometar (Termo Fisher Scientific, SAD)
- Mini Sub Sell GT i PowerPac Basic sustav za elektroforezu (Bio-Rad, SAD)
- TFX-20M transiluminator (Gibco BRL, SAD)
- 7500 Real-time PCR (RT-PCR) sustav (Applied Biosystems, SAD)

3.2. Metode istraživanja

3.2.1. Deparafinizacija tkiva

Sterilno izrezana 2 - 3 reza tkiva uklopljenog u parafin (debljine 4 μm) stavljena su u tubicu volumena 1,5 ml. Uzorcima je zatim dodano 1 ml ksilena, potom su vorteksirani i inkubirani 30 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije slijedi centrifugiranje 2 minute na 14000 rpm - ova te je odstranjen supernatant. Uslijedilo je ispiranje peleta etanolom na način da se peletima doda 1 ml 100% etanola, dobro se vorteksira te se uzorci inkubiraju 1 minutu na sobnoj temperaturi. Nakon toga uzorci se centrifugiraju 2 minute na 14000 rpm - ova te je odstranjen supernatant. Procedura ispiranje peleta etanolom i centrifugiranje se izvode dva puta. Nakon odrađenog drugog centrifugiranja i odvajanja supernatanta, potrebno je osušiti pelet tj. tkivo u tubici na način da se otvorena tubica inkubira na 56°C u termobloku dok ne ispari cijeli ostatni etanol. Tkivo je zatim spremno za proces izolacije DNA, opisan u odjeljku 3.2.2..

3.2.2. Izolacija DNA

DNA je izolirana iz 2 do 3 mikroskopska reza tkiva uklopljenog u parafin, sljedeći protokol proizvođača *NucleoSpin Tissue* kita za izolaciju DNA (Macherey-Nagel, Njemačka). Za lizu tkiva oslobođenog od etanola iz procesa deparafinizacije, u uzorke je dodano 180 μL pufera T1 i 25 μL proteinaze K. Smjesa je zatim ostavljena na prekonoćnoj inkubaciji u termobloku na 56°C uz vorteksiranje. U uzorke je zatim dodano 200 μL pufera B3, snažno su vorteksirani te su inkubirani u termobloku 10 minuta na 70°C. Za prilagodbu uvjeta vezanja DNA u uzorke je dodano 210 μL 100 % etanola te je smjesa dobro vorteksirana. Vezanje DNA iz uzorka na silika membranu odrađeno je na način da je, za svaki uzorak, jedna *NucleoSpin® Tissue* kolona postavljena u prikupljajuću tubicu te je cijeli uzorak prebačen na kolonu. Tako postavljen sustav tubica centrifugira se 1 minutu na 11,000 g - ova. Prikupljajuća tubica koja sadržava otpadnu otopinu koja je prošla kroz kolonu se odstranjuje te se kolona koja sadržava DNA postavlja u novu prikupljajuću tubicu. Zatim slijedi ispiranje silika membrane. U prvom ispiranju, na kolonu se dodaje 500 μL pufera BW, te slijedi centrifugiranje 1 minutu na 11000 g - ova. Otopina koja je prošla kroz kolonu se odstranjuje te se kolona vraća u istu prikupljajuću tubicu. U drugom ispiranju na kolonu se dodaje 600 μL pufera B5, nakon čega opet slijedi centrifugiranje 1 minutu na 11000 g - ova. Otopina koja je prošla kroz kolonu se odstranjuje te se kolona koja sadržava ispranu DNA vraća u istu prikupljajuću tubicu. Sušenje silika

membrane je odrađeno centrifugiranjem 2 minute na 11000 g – ova, čime se uklanjaju ostatci etanola. Pročišćena DNA se eluirala na način da se kolonica sa silika membranom koja sadržava DNA postavila u tubicu oslobođenu od DNA, nukelaza i inhibitora PCR reakcije te je na kolonu dodano 50 µL BE pufera i provedena je inkubacija na sobnoj temperaturi 3 minute. Na kraju uzorci su centrifugirani 10 minuta na 11000 g – ova čime se u konačnici dobila pročišćena i koncentrirana DNA u BE puferu. Uzorci DNA su pohranjeni na -20 °C.

3.2.3. Određivanje čistoće i koncentracije DNA

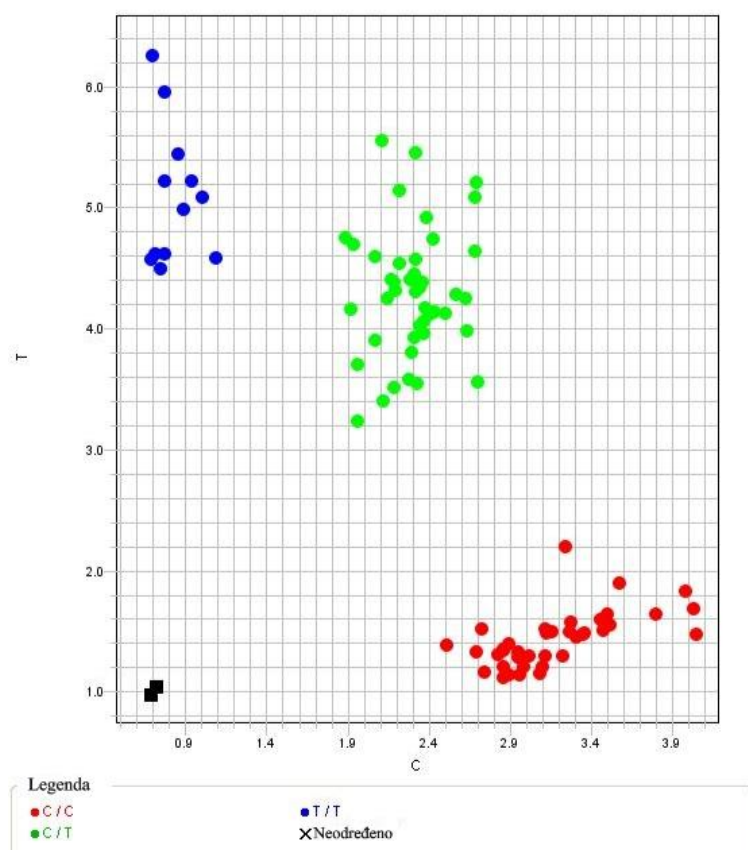
Čistoća i koncentracija DNA utvrđena je korištenjem spektrofotometra NanoDrop 1000 (Termo Fisher Scientific, SAD). Prag za čistoću uzoraka je postavljen na omjer A260/280 između 1,8 i 2, dok je minimalna prihvatljiva koncentracija iznosila 10 ng/µL.

3.2.4. Provjera kvalitete izolirane DNA elektroforezom na gelu

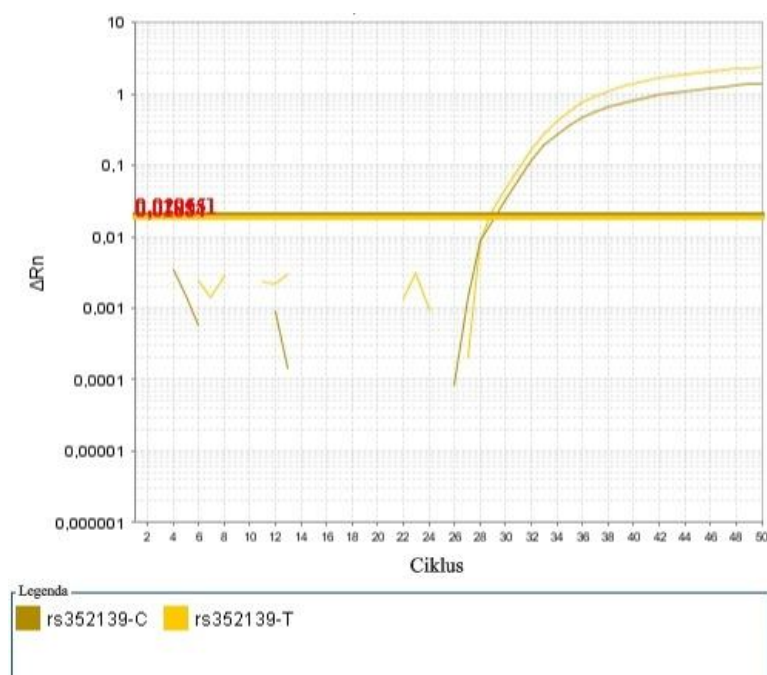
Kvalitativna procjena izolirane DNA provedena je horizontalnom elektroforezom na 1,5 % agaroznom gelu, koji je pripremljen vaganjem 1,5 g agaroze (Sigma, SAD) koja se prenese u tikvicu i doda se 100 ml TAE pufera. Otapanje agaroze se pospješi zagrijavanjem u mikrovalnoj pećnici do vrenja. Nakon vrenja lagano promiješati vruće i ponoviti postupak dok se sva agarozna ne otopi. Nakon otapanja agaroze otopila i hlađenja smjese na 60°C, u nju se dodalo 2 µL etidij bromida za vizualizaciju nukleinskih kiselina. Otopina se zatim izlije u prethodno pripremljen kalup s češljevim, koji je, uz kadicu, sastavni dio sustava za horizontalnu elektroforezu (Mini Sub Sell GT, Bio - Rad, SAD). Nakon što gel polimerizira, 10 µL uzorka se pomiješa s 2 µL boje za nanošenje uzorka (LB, od engl. *loading buffer*, 0.25% bromfenolplavilo, 0.25% ksilen cijanol, 30% glicerol) i nanese se u formirane jažice. Elektroforeza je provedena koristeći *Power Pac Basic* uređaj za elektroforezu (Bio-Rad, SAD) pri struji jakosti 100 V tijekom 30 minuta. Za detekciju DNA koristio se transiluminator (TFX-20M, Gibco BRL, SAD) s tamnom komorom i kamerom (Canon, 8-megapixel digital camera, Japan). Rezultati se očitaju pod ultraljubičastom svjetlošću, a gel fotografira. Kvaliteta izolirane DNA za daljnje molekularne analize. procijenjena je analizom debljine i izgleda pruga.

3.2.5. Genotipizacija polimorfizama gena *TLR*

Tri SNP-a, rs4696480, rs7657186 i rs35213 u genima redom *TLR2*, *TLR3* i *TLR9*, genotipizirani su metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (RT-PCR), korištenjem *TaqMan Genotyping Master Mix* i *TaqMan SNP Genotyping Assays*, proizvođača *ThermoFisher Scientific* (Wilmington, DE, SAD) na 7500 *Real-time* PCR sustavu (*Applied Biosystems*, SAD), prema uputama proizvođača. Ukupni volumen reakcijske smjese po uzorku je iznosio 13 μL , a sastojala se od 6,5 μL 2X *TaqMan* Master Mix-a, 0,65 μL 20X *TaqMan* SNP eseja za genotipizaciju te 5,85 μL DNA. Za potrebe genotipizacije svi uzorci DNA prethodno su razrijeđeni u molekularnoj vodi na koncentraciju od 10 ng/ μL . Reakcija se odvijala u nekoliko koraka. Aktivacija polimeraze se odvijala na 95°C 10 minuta. Uzorci su prošli kroz 50 PCR ciklusa koji su se sastojali od denaturacije DNA lanca na 95°C 15 sekundi te prijanjanja početnica i elongacije novosintetiziranog lanca na 60°C tijekom 1 minute. Vizualizacija rezultata i procjena uspješnosti reakcija izvršena je analizom točkastih i linijskih grafova koji prikazuju alelnu segregaciju.



Slika 3.1. Primjer alelne homozigotne i heterozigotne segregacije polimorfizma rs352139. Crni kvadratići predstavljaju negativne kontrole. C – nukleotid C; T – nukleotid T.



Slika 3.2. Primjer prikaza heterozigotnog genotipa polimorfizma rs352139. C – nukleotid C; T – nukleotid T. ΔR_n – magnituda generiranog signala.

3.2.6. Statistička obrada podataka

Epidemiološki podaci (dob i spol) analizirani su koristeći hi-kvadrat test. Frekvencije alela i genotipova izračunate su izravnim brojanjem. Frekvencije alela i Hardy-Weinbergova ravnoteža (HWE) izračunati su zasebno za svaku populaciju koristeći VCFtools (139).

ANOVA je provedena kako bi se procijenila povezanost između dobi i genotipova u odnosu na opažene kožne lezije. Logistička regresija korištena je za procjenu korelacije između dobi i kožnih lezija. Ovi testovi provedeni su korištenjem statističkog softvera MedCalc V. 22 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgija).

Razlike u frekvencijama alela i genotipova SNP-a, kao i njihova povezanost sa spolom pacijenata, izračunate su korištenjem hi-kvadrat testa i Fisherovog egzaktnog P-testa u softveru PowerMarker V.3.25 (140). Dodatno su provedena testiranja logističke regresije u kojima su kožne lezije bile zavisna varijabla, a promatrani polimorfizmi nezavisne varijable. Model logističke regresije proveden je uz prilagodbu za spol i dob, korištenjem programa SPSS v28. Rezultati s p-vrijednostima manjima od 0,05 smatrani su statistički značajnima.

Razina značajnosti za sve testove je postavljena dodatno na $P < 0.017$, nakon Bonferronijeve korekcije.

4. REZULTATI

U ovoj studiji analizirana je povezanost polimorfizama rs4696480 u genu *TLR2*, rs7657186 u genu *TLR3* i rs352139 u genu *TLR9* s keratoakantomom (KA) i običnim bradavicama (VV) na koži.

Karakteristike pacijenata s keratoakantomom i običnim bradavicama prikazane su u Tablici 3. Ukupno je obrađeno 161 uzorak keratoakantoma i 152 uzorka običnih bradavica s pripadajućih 469 kontrolnih uzoraka. Ispitivane skupine keratoakantoma i običnih bradavica imale su podjednake udjele po spolovima ($P = 0,423$). S obzirom na raspodjelu ispitanika po dobnim skupinama, utvrđeno je kako su keratoakantomi bili češći među pacijentima starijima od 76 godina, dok su se obične bradavice češće javljale u ispitanika mlađih od 46 godina ($P < 0,001$).

Tablica 3. Demografske karakteristike (dob i spol) ispitanika u skupinama keratoakantoma (KA), običnih bradavica (VV) i kontrolnoj skupini (CTRL)

Varijabla		KA (n = 161)	VV (n = 152)	CTRL (n = 469)
Godine (n)	< 46	19	60	147
	46 - 65	41	41	247
	66 - 76	49	32	67
	> 76	52	18	8
Spol (n)	Žene	69	72	302
	Muškarci	92	80	167

Frekvencije alela i genotipova u KA i VV skupinama te u kontrolnoj skupini prikazane su u Tablici 4. Raspodjele genotipova za sva tri analizirana polimorfizma (SNP) u svim skupinama bile su u skladu s Hardy-Weinbergovom ravnotežom (HWE).

Tablica 4. Frekvencije alela i genotipova gena *TLR2*, *TLR3* i *TLR9* u uzorcima keratoakantoma (KA), običnih bradavica (VV) i u kontrolnoj skupini

Gen/ SNP*	Genotip/Alel	KA		VV		Kontrola	
		n [†]	f [‡]	n	f	n	f
<i>TLR2</i> rs4696480	AA	88	0,568	91	0,628	114	0,234
	AT	30	0,194	21	0,115	245	0,522
	TT	37	0,239	33	0,228	110	0,235
	A	206	0,665	203	0,7	473	0,504
	T	104	0,335	87	0,3	465	0,498
<i>TLR3</i> rs7657186	GG	117	0,778	120	0,857	297	0,633
	GA	30	0,197	20	0,143	150	0,32
	AA	5	0,033	0	0	22	0,047
	G	264	0,868	260	0,929	744	0,793
	A	40	0,132	20	0,071	194	0,207
<i>TLR9</i> rs352139	CC	49	0,303	60	0,395	172	0,367
	CT	90	0,563	69	0,454	229	0,488
	TT	21	0,131	23	0,151	68	0,145
	C	188	0,588	189	0,622	573	0,611
	T	132	0,413	115	0,378	365	0,389

*SNP - od engl. *single nucleotide polymorphism* (polimorfizmi jednog nukleotida)

[†]n - broj genotipova i alela

[‡]f - frekvencija genotipova i alela

Razlike u frekvencijama alela i genotipova za ispitivane polimorfizme pojedinačnih nukleotida (SNP) u genima *TLR2*, *TLR3* i *TLR9* između skupina keratoakantoma (KA) i običnih bradavica (VV) prikazane su u Tablici 5. Za polimorfizam rs4696480 te rs352139 u genu *TLR9* nije utvrđena statistički značajna razlika u frekvencijama alela i genotipova između skupina KA i VV. Nasuprot tome, za polimorfizam rs7657186 u genu *TLR3* zabilježene su više frekvencije određenih alela i genotipova u skupini običnih bradjeica u usporedbi s keratoakantomom. Konkretno, u VV utvrđena su značajno viša relativna frekvencija alela G (0,929 u VV naspram 0,868 u KA, $P = 0,017$) te genotipa GG (0,857 u VV naspram 0,778 u KA, $P = 0,038$) za polimorfizam rs7657186 u genu *TLR3* (Tablica 4 i Tablica 5). Također, u skupini običnih bradavica nije zabilježen ni jedan slučaj homozigotnog genotipa AA (Tablica 4). Međutim, primjenom restriktivnijeg kriterija statističke značajnosti ($P = 0,017$; Bonferronijeva korekcija), razlika u frekvenciji alela G za polimorfizam rs7657186 u genu *TLR3* pokazuje graničnu statističku značajnost, dok razlika u relativnoj frekvenciji genotipa GG ne doseže prag statističke značajnosti.

Tablica 5. Usporedba frekvencija alela i genotipova u polimorfizama gena *TLR2*, *TLR3*, i *TLR9* između skupina keratoakantoma (KA) i običnih bradavica (VV)

Skupine	SNP [†]	Alel value*	Alel P^*	Genotip value*	Genotip P^*	Alel P^{**}	Genotip P^{**}
KA-VV	rs4696480	0,77	0,378	1,44	0,487	0,332	0,487
KA-VV	rs7657186	5,72	0,017	6,56	0,038	0,012	0,033
KA-VV	rs352139	0,66	0,418	3,52	0,172	0,443	0,181

SNP[†] – od engl. *single nucleotide polymorphism* (polimorfizmi jednog nukleotida)

*hi – kvadrat test

** Fisher - ov egzaktni test

Rezultati studije pokazali su značajnu povezanost polimorfizama rs4696480 i rs7657186, na alelnoj i genotipskoj razini, sa keratoakantomom i običnim bradavicama (Tablica 6). Navedeni polimorfizmi bili su značajno više zastupljeni u KA i VV skupinama u usporedbi s kontrolama. Također, VV skupina je bila značajnije povezana s polimorfizmom rs7657186 u genu *TLR3* u odnosu na KA skupinu (Tablica 6).

Tablica 6. Usporedba frekvencija alela i genotipova SNP polimorfizama tri gena *TLR2*, *TLR3* i *TLR9* između skupina keratoakantoma (KA), običnih bradavica (VV) i kontrolne skupine (CTRL)

Skupina vs. CTRL	SNP [†]	Alel value*	Alel <i>P</i> *	Genotip Value*	Genotip <i>P</i> *	Alel <i>P</i> **	Genotip <i>P</i> **
KA	rs4696480	24,90	<0,001	67,63	<0,001	<0,001	<0,001
KA	rs7657186	8,50	0,003	9,67	0,008	0,002	0,006
KA	rs352139	0,43	0,510	2,44	0,296	0,510	0,275
VV	rs4696480	34,30	<0,001	85,51	<0,001	<0,001	<0,001
VV	rs7657186	27,29	<0,001	26,56	<0,001	<0,001	<0,001
VV	rs352139	0,11	0,736	0,55	0,758	0,733	0,736

[†]SNP – od engl. *single nucleotide polymorphism* (polimorfizmi jednog nukleotida)

vs – od engl. *versus*

CTRL – kontrolna skupina

*hi – kvadrat test

** Fisher – ov egzaktni test

U uzrocima keratoakantoma (KA) utvrđene su značajno više relativne frekvencije alela A (0,665 naspram 0,504 u kontrolnoj skupini, $P < 0,001$) i genotipa AA (0,568 naspram 0,234 u kontrolnoj skupini, $P < 0,001$) za polimorfizam rs4696480 u genu *TLR2*, u usporedbi s kontrolnom skupinom (Tablice 4 i 6). Također, za polimorfizam rs7657186 u genu *TLR3*, skupina KA imala je značajno višu frekvenciju alela G (0,868 naspram 0,793 u kontrolnoj skupini, $P = 0,003$) i genotipa GG (0,778 naspram 0,633 u kontrolnoj skupini, $P = 0,008$) u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablice 4 i 6). Za polimorfizam rs352139 u genu *TLR9*, nije utvrđena statistički značajna razlika u frekvenciji između skupine keratoakantoma i kontrolne skupine (Tablica 6).

Slično, u uzrocima običnih bradavica (VV) također su zabilježene značajno više relativne frekvencije alela A (0,665 naspram 0,504 u kontrolnoj skupini, $P < 0,001$) i genotipa AA za polimorfizam rs4696480 u genu *TLR2* (0,628 naspram 0,234 u kontrolnoj skupini, $P <$

0,001) u usporedbi s kontrolnom skupinom. U slučaju polimorfizma rs7657186 u genu *TLR3*, skupina VV pokazala je još izraženiju razliku u odnosu na kontrolnu skupinu, s višom frekvencijom alela G (0,929 naspram 0,793; $P < 0,001$) i genotipa GG (0,857 naspram 0,633 u kontrolnoj skupini, $P < 0,001$) (Tablice 4 i 6). Nije utvrđena značajna razlika između običnih bradavica i kontrolne skupine u frekvenciji polimorfizma rs352139 u genu *TLR9* (Tablica 6).

Tabela 7. Usporedba frekvencija alela i genotipova SNP polimorfizama gena *TLR2*, *TLR3* i *TLR9* prema spolu u skupinama s keratoakantomom (KA) i običnim bradavicama (VV).

Skupina vs. CTRL	SNP [†]	Alel value*	Alel P^*	Genotip value*	Genotip P^*	Alel P^{**}	Genotip P^{**}
KA	rs4696480	0,24	0,627	0,20	0,906	0,629	0,900
KA	rs7657186	0,16	0,691	0,71	0,699	0,749	0,792
KA	rs352139	0,13	0,719	5,47	0,065	0,631	0,075
VV	rs4696480	2,70	0,101	2,18	0,336	0,088	0,351
VV	rs7657186	0,02	0,894	0,02	0,890	1,000	1,000
VV	rs352139	0,36	0,549	0,71	0,703	0,588	0,762

[†]SNP – od engl. *single nucleotide polymorphism* (polimorfizmi jednog nukleotida)

vs – engl. *versus*

CTRL – kontrolna skupina

*hi – kvadrat test

** Fisher – ov egzaktni test

Analizom raspodjele genotipova prema spolu ispitanika nije utvrđena statistički značajna povezanost između ispitivanih polimorfizama (rs4696480, rs7657186 i rs352139) i prisutnosti kožnih lezija u skupinama keratoakantoma (KA) i običnih bradavica (VV) (Tablica 7). Nadalje, analizom odnosa između dobi ispitanika i zastupljenosti pojedinih genotipova u kontekstu promatranih kožnih promjena, nisu zabilježene značajne korelacije.

Logističkom regresijskom analizom nije utvrđena statistički značajna razlika u distribuciji genotipova polimorfizama rs4696480 (*TLR2*), rs7657186 (*TLR3*) i rs352139 u genu (*TLR9*) između skupina keratoakantoma (KA) i obinih brdavica (VV) (Tablica 8).

Tablica 8. Logistička regresijska analiza frekvencija genotipova SNP polimorfizama gena *TLR2*, *TLR3* i *TLR9* u skupinama keratoakantoma (KA) i običnih bradavica (VV)

SNP [†]	OR [‡]	95 % CI*	P
rs4696480	0,800	(0,587 – 1,089)	0,157
rs7657186	1,756	(0,958 – 3,221)	0,069
rs352139	0,869	(0,603 – 1,251)	0,450

[†]SNP – od engl. *single nucleotide polymorphism* (polimorfizmi jednog nukleotida)

[‡]OR – omjer izgleda;

*CI – interval pouzdanosti

Usporedbom učestalosti genotipova polimorfizama rs4696480 u genu *TLR2*, rs7657186 u genu *TLR3* i rs352139 u genu *TLR9* između skupine običnih bradavica (VV) i kontrolne skupine, utvrđene su statistički značajne razlike u distribuciji genotipova za rs4696480 i rs7657186, dok za rs352139 nisu zbijene statistički značajne razlike (Tablica 9). U ispitanika s običnim bradavicama utvrđene su značajno više relativne frekvencije alela A i genotipa AA za polimorfizam rs4696480 u genu *TLR2* u usporedbi s kontrolnom skupinom (Tablica 4). Rezultati ukazuju da prisutnost alela T smanjuje vjerojatnost razvoja VV, što potvrđuje i logistička regresija (Tablica 9). Slično tome, u skupini VV utvrđene su više frekvencije alela G i genotipa GG za polimorfizam rs7657186 u genu *TLR3*, u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablica 4), pri čemu svaki alel G povećava vjerojatnost pojave običnih bradavica (VV) (Tablica 9).

Tablica 9. Usporedba učestalosti genotipova navedenih polimorfizama između običnih bradavicama (VV) i kontrolne skupine analizom logističke regresije

SNP [†]	OR [‡]	95 % CI*	P
rs4696480	0,466	(0,350 – 0,616)	<0,001
rs7657186	3,430	(2,098 – 5,604)	<0,001
rs352139	0,952	(0,727 – 1,248)	0,724

[†]SNP – od engl. *single nucleotide polymorphism* (polimorfizmi jednog nukleotida)

[‡]OR – omjer izgleda

*CI – interval pouzdanosti

Usporedbom učestalosti genotipova polimorfizama rs4696480 u genu *TLR2*, rs7657186 u genu *TLR3* i rs352139 u genu *TLR9* između KA i kontrola, utvrđene su razlike u distribuciji genotipova za rs4696480 i rs7657186, dok za rs352139 nisu utvrđene statistički značajne razlike (Tablica 10). U uzrocima keratoakantoma utvrđene su značajno više relativne frekvencije alela A i genotipa AA u genu *TLR2* za polimorfizam rs4696480 u usporedbi s kontrolnom skupinom (Tablica 4) tj. svaki T alel smanjuje šansu za nastanak KA (Tablica 10). Što se tiče polimorfizma rs7657186 u genu *TLR3*, skupina KA imala je značajno višu frekvenciju alela G i genotipa GG u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablica 4), odnosno svaki G alel povećava šanse za nastanak KA (Tablica 10).

Tablica 10. Logistička regresijska analiza učestalosti genotipova SNP polimorfizama *TLR2*, *TLR3* i *TLR9* gena u skupini keratoakantoma (KA) u usporedbi s kontrolnom skupinom

[†] SNP	OR [‡]	95 % CI*	P
rs4696480	0,616	(0,462 – 0,822)	0,001
rs7657186	1,899	(1,250 – 2,877)	0,002
rs352139	1,087	(0,803 – 1,472)	0,590

[†]SNP – od engl. *single nucleotide polymorphism* (polimorfizmi jednog nukleotida)

[‡]OR – omjer izgleda

*CI – interval pouzdanosti

5. RASPRAVA

U ovom istraživanju analizirana je učestalost polimorfizama rs4696480 u genu *TLR2*, rs7657186 u genu *TLR3* i rs352139 u genu *TLR9* u uzorcima keratoakantoma (KA) i virusnih bradavica (VV), u usporedbi s kontrolnom skupinom. Dobiveni rezultati podržavaju hipotezu da se određene polimorfne varijante ovih gena češće javljaju u oboljelih, što ukazuje na njihovu moguću ulogu u modulaciji imunološkog odgovora keratinocita na virusne infekcije.

Analiza demografskih podataka pokazala je da su pacijenti s keratoakantomom u prosjeku stariji od pacijenata s običnim bradavicama, što je u skladu s prethodnim spoznajama da keratoakantom češće pogađa stariju populaciju (7). Ipak, nije utvrđena značajna povezanost između analiziranih genskih varijanti i dobi ili spola ispitanika, što sugerira da genski faktori djeluju neovisno o tim demografskim karakteristikama.

5.1. Povezanost polimorfni varijanti u genima *TLR* s keratoakantomom i virusnim bradavicama

Glavni rezultat ove studije ukazuje na snažnu statistički značajnu povezanost polimorfizama rs4696480 u genu *TLR2* i rs7657186 u genu *TLR3* s obje kožne bolesti ($P < 0,001$), pri čemu virusne bradavice pokazuju jaču povezanost s polimorfizmom rs7657186 u odnosu na keratoakantom. Ovi rezultati sugeriraju da genske varijante u *TLR2* i *TLR3* mogu utjecati na imunološki odgovor keratinocita na HPV infekciju, što može povećati rizik od razvoja ovih kožnih lezija.

U slučaju običnih bradavica, koje su primarno uzrokovane humanim papilomavirusom (HPV), kao i u patogenezi keratoakantoma, pretjerana ili disregulirana upala može doprinijeti njihovom nastanku, pri čemu TLR-ovi imaju važnu ulogu u regulaciji imunološkog odgovora (141). Neagu i suradnici navode ulogu HPV-a u karcinomima kože koji potječu iz keratinocita. U njihovoj studiji, od ukupno 321 pacijenta s KA, 37 je bilo pozitivno na HPV (11,52%), uglavnom tipa beta (142), što podržava hipotezu o povezanosti HPV-a s kožnim lezijama poput KA. HPV je također povezan s određenim slučajevima KA i kožnog planocelularnog karcinoma (143). Općenito, TLR-ovi igraju važnu ulogu u prepoznavanju HPV-a i pokretanju imunoloških odgovora, što naglašava njihovu važnost u antivirusnoj obrani domaćina (141).

Polimorfizmi gena *TLR*, uključujući *rs4696480*, *rs7657186* i *rs352139*, povezani su s različitim bolestima, među kojima su i kožne bolesti (113, 120, 144 - 147). S obzirom na to da se keratoakantom često pojavljuje na koži izloženoj sunčevom zračenju (7), polimorfizmi *rs7657186* u genu *TLR3* (148) i *rs352139* u genu *TLR9* (149), koji su izraženi u fotoekspoziranoj koži, kao i polimorfizam *rs4696480* u genu *TLR2*, koji je povezan s određenim kožnim promjenama kao što su atopijski dermatitis i psorijaza (120, 122, 123) mogli bi odražavati različite odgovore na međudjelovanje virusne izloženosti i oštećenja kože uzrokovanog UV zračenjem (150, 151).

5.1.1. Povezanost polimorfizma *rs4696480* u genu *TLR2* s keratoakantomom i virusnim bradavicama

U ovom radu utvrđena je značajno veća zastupljenost alela A i genotipa AA u genu *TLR2* za polimorfizam *rs4696480* u skupinama KA i VV u usporedbi s kontrolnom skupinom ($P < 0,001$). Ovaj rezultat sugerira moguću ulogu *TLR2* u predispoziciji za razvoj ovih kožnih lezija, vjerojatno kroz modulaciju prepoznavanja patogena i pokretanje upalnog odgovora.

Gen *TLR2* ima ključnu ulogu u prepoznavanju virusnih liganda te je povezan s osjetljivošću na različita infektivna i upalna stanja (152). Polimorfizam *rs4696480* u *TLR2* prethodno je doveden u vezu s nizom dermatoloških i imunoloških poremećaja, uključujući akne vulgaris, atopijski dermatitis i psorijazu (153,113). Konkretno, istraživanja su pokazala veću učestalost homozigotnog genotipa AA u pacijenata s atopijskim dermatitisom u usporedbi s kontrolnom skupinom (109).

Mozyrska OV i suradnici izvijestili su o povezanosti genotipa AA polimorfizma *TLR2* *rs4696480* s razvojem težeg kiničkog oblika atopijskog dermatitisa (110). Dodatno, istraživanja provedena u Japanu, upućuju na moguću povezanost ovog polimorfizma s težinom bolesti, budući da utječe na transkripcijsku aktivnost, koja je povezana s izraženošću kliničkih simptoma (112). Slični nalazi zabilježeni su i u turskoj populaciji, gdje je polimorfizam *TLR2* (*rs4696480*) pokazao značajnu povezanost s genetičkom predispozicijom za razvoj psorijaze, što dodatno potvrđuje značenje *TLR* gena u pojavnosti, progresiji i kliničkim ishodima kožnih bolesti (113)

5.1.2. Povezanost polimorfizma rs7657186 u genu *TLR3* s keratoakantomom i virusnim bradavicama

Ovaj polimorfizam pokazao je značajnu povezanost s obje promatrane bolesti. Analiza polimorfizma rs7657186 u genu *TLR3* pokazala je značajno višu frekvenciju alela G i genotipa GG u skupini pacijenata s keratoakantomom i običnim bradavicama u odnosu na kontrolnu skupinu ($P < 0,001$).

Uspoređujući skupine KA i VV, skupina s bradavicama pokazuje veću povezanost s polimorfizam rs7657186 u genu *TLR3*. Uočen je razlikovni obrazac u učestalosti alela G i genotipa GG za ovaj polimorfizam, točnije obične bradavice su imale veću učestalost navedenog alela, i genotipa u odnosu na keratoakantom. Važno je istaknuti da u skupini ispitanika s običnim bradavicama nije bilo uzoraka s homozigotnim genotipom AA. Izostanak genotipa AA u skupini s bradavicama dodatno potvrđuje hipotezu o njegovoj zaštitnoj ulozi.

Opisani rezultati upućuju na moguću povezanost između signalizacije putem gena *TLR3* i imunološkog odgovora na virusne infekcije, s posebnim naglaskom na bradavice uzrokovane HPV-om. S obzirom da *TLR3* prepoznaje dvolančanu virusnu RNA, moguće je da određene genske varijante utječu na osjetljivost keratinocita na virusnu, HPV infekciju i time doprinose razvoju bradavica (115).

Uzevši u obzir sve prethodno navedeno, dobiveni rezultati su u skladu s recentnim istraživanjima koja ukazuju na to da, kada je gen *TLR3* stimuliran vanjskim ili unutarnjim okidačima, stanice kože i imunološkog sustava igraju značajnu ulogu u razvoju infektivnih ili upalnih kožnih stanja, poput virusnih infekcija, alergija i dermatitisa (115). Toll-like receptor 3 uključen je u antivirusni imunološki odgovor domaćina, djelujući i obrambeno i napadački prepoznajući dvolančanu RNA, koja je uobičajen replikacijski intermedijer kod brojnih virusa, uključujući HPV, flavivirus, virus hepatitisa B i C, herpesvirus, rotavirus, retrovirus, ortomiksovirus i poksvirus. Osim što utječu na virusnu prepoznatljivost, mutacije u *TLR3* povezane su i s promjenama u produkciji protuupalnih citokina, što može imati dugoročne učinke na održavanje kroničnog imunološkog odgovora i rezoluciju lezija (154).

Varijanta u genu rs7657186 *TLR3* mogla bi utjecati na njegovu sposobnost prepoznavanja virusnih patogena ili moduliranje imunoloških signalnih putova kao odgovor na virusne infekcije u fotoeksponiranoj koži (155). *TLR3* prepoznaje i endogene ligande

oslobođene usljed oštećenja stanica, što ga čini ključnim činiteljem u granici između antivirusnog imunološkog odgovora i oštećenja tkiva domaćina. Navedeno može upućivati na ulogu TLR3 u patogenezi keratoakantoma putem aktivacije endogenim signalima oštećenja u koži kronično izloženoj UV zračenju (156, 157).

5.1.3. Povezanost polimorfizma rs352139 u genu *TLR9* s keratoakantomom i virusnim bradavicama

Za razliku od prethodna dva polimorfizma, rs352139 u genu *TLR9* nije pokazao značajne razlike u učestalosti alela i genotipova između skupina keratoakantoma i običnih bradavica međusobno, niti u usporedbis kontrolnom skupinom. Ovi rezultati upućuju na to da ova genska varijanta nema značajnu ulogu u razvoju KA i VV, iako *TLR9* ima važnu ulogu u prepoznavanju virusne DNA (152).

Međutim, postoje dokazi da ovaj polimorfizam može biti relevantan u drugim kontekstima. Naime, istraživanja u danskoj populaciji pokazala su da je rs352139 polimorfizam gena *TLR9* povezan s odgovorom na biološku terapiju u bolesnika s umjerenom do teškom psorijazom(123), kao i s manjim rizikom od prisutnosti velikog broja kopija genotipa HPV16 u žena s karcinomom cerviksa (124). Također, prema dostupnim podacima, polimorfizam gena *TLR9* (rs352139) povezan je s većim rizikom od različitih virusnih infekcija, uključujući infekciju citomegalovirusom (CMV) u osoba s transplattiranim bubregom (126, 127), infekcije tijekom kasne trudnoće u žena iz populacije Zimbabvea, kao i s većim rizikom od infekcije Epstein-Barr virusom, te razvoja akutne faze mononukleoze u djece i adolescenata (130).

5.2. Ograničenja studije

Iako je ova studija pružila značajne uvide u genetičku podlogu keratoakantoma (KA) i običnih bradavica (VV), potrebno je ukazati na određena metodološka ograničenja koja mogu utjecati na širinu interpretacije dobivenih rezultata. Genetička analiza bila je ograničena na tri odabrana polimorfizma, što ne isključuje mogućnost postojanja drugih genetskih varijanti koje bi mogle imati važnu ulogu u razvoju promatranih lezija. Proširena genotipizacija na većem broju uzoraka, uz primjenu sveobuhvatnijih molekularnih tehnika, mogla bi dodatno proširiti spoznaje o genetičkoj osnovi ovih dermatoloških entiteta.

Važno je istaknuti i potrebu za obuhvatnijim istraživanjima koja bi uključivala veći broj ispitanika s jasno definiranim kliničkim fenotipovima i patohistološki potvrđenim dijagnozama KA i VV. Takav pristup, u kombinaciji sa širim genomskim analizama, mogao bi značajno povećati robusnost rezultata i njihovu primjenjivost u kliničkoj praksi.

Unatoč navedenim ograničenjima, rezultati ovog istraživanja predstavljaju čvrstu osnovu za buduća istraživanja te otvaraju perspektivu za primjenu farmakogenomike u personaliziranom pristupu liječenju u dermatologiji.

5.3. Zaključak

Iako molekularni mehanizmi kojima Toll-like receptori (TLR) sudjeluju u patogenezi kožnih promjena poput keratoakantoma (KA) i običnih bradavica (VV) još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni, rezultati ovog istraživanja ukazuju na važnu ulogu određenih genskih varijanti, osobito rs4696480 u genu *TLR2* i rs7657186 u genu *TLR3*, u modulaciji imunološkog odgovora keratinocita na virusne infekcije. Dobiveni nalazi podupiru tezu da genetički čimbenici urođenog imuniteta mogu djelovati kao predisponirajući faktori za razvoj određenih dermatoloških entiteta. Za dublje razumijevanje njihove biološke i kliničke uloge, buduće studije trebale bi uključivati funkcionalne analize ekspresije TLR-a, kao i longitudinalne studije koje bi ispitale dinamiku njihove aktivnosti u različitim fazama bolesti. Dodatno, ovi rezultati otvaraju mogućnost istraživanja TLR-ova kao potencijalnih biomarkera i terapijskih meta u kontekstu personalizirane dermatološke terapije.

6. ZAKLJUČCI

1. Analizom polimorfizma rs4696480 u genu *TLR2* utvrđena je značajno veća zastupljenost alela A i genotipa AA u skupinama keratoakantoma (KA) i običnih bradavica (VV) u odnosu na kontrolnu skupinu ($P < 0,001$), dok između KA i VV nije bilo značajnih razlika.
2. Analizom polimorfizma rs7657186 u genu *TLR3* utvrđena je viša frekvencija alela G i genotipa GG u skupinama keratoakantoma (KA) i običnih bradavica (VV) u usporedbi s kontrolom ($P < 0,001$), pri čemu je povezanost bila izraženija kod virusnih bradavica.
3. U izravnoj usporedbi KA i VV, frekvencija alela G i genotipa GG za polimorfizam rs7657186 u genu *TLR3* bila je viša u skupini VV.
4. Frekvencije alela i genotipova polimorfizma rs352139 u genu *TLR9* nisu se značajno razlikovale ni između keratoakantoma (KA) i običnih bradavica (VV), niti u usporedbi s kontrolnom skupinom.

7. SAŽETAK

Ciljevi: Cilj ove studije bio je ispitati učestalost i povezanost alela i genotipova polimorfizama rs4696480 u genu *TLR2*, rs7657186 u genu *TLR3* i rs352139 u genu *TLR9* s keratoakantomom (KA) i virusnim bradavicama (VV), u usporedbi s kontrolnom skupinom.

Materijali i metode: Istraživanje je obuhvatilo 161 uzorak KA, 152 uzorka VV te kontrolnu skupinu od 469 pojedinaca iz populacijske kohorte “10.001 Dalmatinac” iz Hrvatske biobanke koji su prethodno genotipizirani, bez verificiranih kožnih bolesti. DNA je izolirana iz mikroskopskih rezova tkiva uklopljenog u parafin, korištenjem *NucleoSpin Tissue* kita (Macherey-Nagel, Njemačka). Genotipizacija polimorfizama rs4696480 u genu *TLR2*, rs7657186 u genu *TLR3* i rs352139 u genu *TLR9*, provedena je metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (RT-PCR), korištenjem *TaqMan Genotyping Master Mix* i *TaqMan SNP Genotyping Assays* (ThermoFisher Scientific, Wilmington, DE, SAD) na sustavu 7500 Real-time PCR (Applied Biosystems, SAD).

Rezultati: Za polimorfizam rs4696480 u genu *TLR2* utvrđena je značajno veća zastupljenost alela A i genotipa AA u skupini KA i VV u usporedbi s kontrolnom skupinom ($P < 0,001$). Polimorfizam rs7657186 u genu *TLR3* također je pokazao značajno višu frekvenciju alela G i genotipa GG u obje skupine u odnosu na kontrolnu skupinu, pri čemu virusne bradavice pokazuju jaču povezanost s polimorfizmom rs7657186 u odnosu na KA ($P < 0,001$). Frekvencija alela i genotipova polimorfizma rs352139 u genu *TLR9* nisu se značajno razlikovale između skupina KA, VV i kontrolne skupine.

Zaključci: Rezultati ukazuju na statistički značajnu povezanost polimorfničkih varijanti u genima rs4696480 (*TLR2*) i rs7657186 (*TLR3*) ($P < 0,001$) s keratoakantomom i virusnim bradavicama. Ove genske varijante mogle bi utjecati na imunološki odgovor keratinocita na virusne patogene te predispoziciju za nastanak navedenih kožnih lezija. Daljnja funkcionalna istraživanja, uključujući i analizu drugih polimorfizama u ovim genima, nužna su za bolje razumijevanje mehanizama kojima ovi polimorfizmi moduliraju imunološki odgovor i doprinose razvoju specifičnih kožnih lezija.

8. LAIČKI SAŽETAK

Ciljevi: Cilj ove studije bio je ispitati učestalost i povezanost alela i genotipova polimorfizama rs4696480 u genu *TLR2*, rs7657186 u genu *TLR3* i rs352139 u genu *TLR9* s keratoakantomom (KA) i virusnim bradavicama (VV), u usporedbi s kontrolnom skupinom.

Materijali i metode: Istraživanje je obuhvatilo 161 uzorak KA, 152 uzorka VV te kontrolnu skupinu od 469 pojedinaca, bez kožnih bolesti. DNA je izolirana iz uzoraka tkiva čuvanog u parafinu. Genotipizacija polimorfizama rs4696480 u genu *TLR2*, rs7657186 u genu *TLR3* i rs352139 u genu *TLR9*, provedena je metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (RT-PCR), na sustavu 7500 *Real-time* PCR (*Applied Biosystems*, SAD).

Rezultati: Za polimorfizam rs4696480 u genu *TLR2* utvrđena je značajno veća zastupljenost alela A i genotipa AA u skupini KA i VV u usporedbi s kontrolnom skupinom ($P < 0,001$). Polimorfizam rs7657186 u genu *TLR3* također je pokazao značajno višu frekvenciju alela G i genotipa GG u obje skupine, posebno onih s virusnim bradavicama u odnosu na kontrolnu skupinu, ($P < 0,001$). Nisu utvrđene razlike između skupina KA, VV i kontrolne skupine na temelju frekvencija alela i genotipova polimorfizma rs352139 u genu *TLR9*.

Zaključci: Rezultati ukazuju na povezanost polimorfničkih varijanti rs4696480 (*TLR2*) i rs7657186 (*TLR3*) ($P < 0,001$) s keratoakantomom i virusnim bradavicama. Ove genske promjene mogle bi utjecati na odgovor stanica kože, keratinocita, na virusne uzročnike, što bi moglo potaknuti nastanak navedenih kožnih bolesti.

9. SUMMARY

Objectives: This study aimed to determine the frequency and association of alleles and genotypes of the rs4696480 polymorphism in the *TLR2* gene, rs7657186 in the *TLR3* gene, and rs352139 in the *TLR9* gene with keratoacanthoma (KA) and common warts (VV), compared to a control group.

Materials and Methods: The study included tissue samples from 161 patients with KA, 152 patients with VV, and a control group of 469 individuals from the larger population-based cohort “10,001 Dalmatians” from the Croatian Biobank, previously genotyped and without confirmed skin diseases. DNA was isolated from tissue sections embedded in paraffin (FFPE), using the NucleoSpin Tissue DNA Isolation Kit (Macherey-Nagel, Germany), following the manufacturer's protocol. Genotyping of three single nucleotide polymorphisms (SNPs) - rs4696480 in the *TLR2* gene, rs7657186 in *TLR3* gene, and rs352139 in *TLR9* gene - was performed using real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) with TaqMan Genotyping Master Mix and TaqMan SNP Genotyping Assays (ThermoFisher Scientific, DE, USA) on a 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA).

Results: For the rs4696480 polymorphism in the *TLR2* gene, a significantly higher frequency of the A allele and AA genotype was found in both the KA and VW groups compared to the control group ($P < 0.001$). The rs7657186 polymorphism in the *TLR3* gene also showed a significantly higher frequency of the G allele and GG genotype in both groups compared to controls, with a stronger association observed for viral warts than for KA ($P < 0.001$). No significant differences were found in allele or genotype frequencies of the rs352139 polymorphism in the *TLR9* gene among the KA, VV, and control groups.

Conclusions: The findings indicate a statistically significant association of the polymorphic variants rs4696480 (*TLR2*) and rs7657186 (*TLR3*) ($P < 0.001$) with keratoacanthoma and viral warts. These genetic variants may influence the immune response of keratinocytes to viral pathogens, potentially increasing susceptibility to the development of these skin lesions. Further functional studies, including analyses of additional polymorphisms in these genes, are needed to better understand the mechanisms by which these polymorphisms modulate immune responses and contribute to the development of specific skin lesions.

10. LAY SUMMARY

Objectives: This study aimed to determine the frequency and association of alleles and genotypes of the rs4696480 polymorphism in the *TLR2* gene, rs7657186 in the *TLR3* gene, and rs352139 in the *TLR9* gene with keratoacanthoma (KA) and common warts (VV), compared to a control group.

Materials and Methods: The study included tissue samples from 161 patients with KA, 152 patients with VV, and a control group of 469 individuals, without confirmed skin diseases. DNA was isolated from tissue sections embedded in paraffin. Genotyping of the polymorphisms (SNPs) - rs4696480 in the *TLR2* gene, rs7657186 in *TLR3* gene, and rs352139 in *TLR9* gene - was performed using real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) method, on the 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA).

Results: For the rs4696480 polymorphism in the *TLR2* gene, a significantly higher frequency of the A allele and AA genotype was found in both the KA and VV groups compared to the control group ($P < 0.001$). The rs7657186 polymorphism in the *TLR3* gene also showed a significantly higher frequency of the G allele and GG genotype in both groups, especially among those viral warts compared to the control group ($P < 0.001$). The frequency of alleles and genotypes of the rs352139 polymorphism in the *TLR9* gene showed no differences between the KA, VV, and control groups.

Conclusions: The results indicate an association between the polymorphic variants rs4696480 (*TLR2*) and rs7657186 (*TLR3*) ($P < 0.001$) with keratoacanthoma and viral warts. These genetic changes may influence the response of skin cells, specifically keratinocytes, to viral agents, which could contribute to the development of these skin diseases.

11. POPIS CITIRANE LITERATURE

1. Gleich T, Chiticariu E, Huber M, Hohl D. Keratoacanthoma: a distinct entity? *Exp Dermatol.* 2016;25:85-91.
2. Savage JA, Maize JC. Keratoacanthoma clinical behavior: a systematic review. *Am J Dermatopathol.* 2014 May;36:422-92.
3. Sanchez Yus E, Simon P, Requena L. Solitary keratoacanthoma: a self-healing proliferation that frequently becomes malignant. *Am J Dermatopathol.* 2000;22:305-10.
4. Zito PM, Scharf R. Keratoacanthoma. [Updated 2023 Aug 8]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499931/>
5. Beham A, Regauer S, Soyer HP, Beham-Schmid C. Keratoacanthoma: a clinically distinct variant of well differentiated squamous cell carcinoma. *Adv Anat Pathol.* 1998;5(5):269-80.
6. Elder DE, Massi D, Scolyer RA, Willemze R. WHO classification of skin tumours. 4th edn. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2018;36-38.
7. Kwiek B, Schwartz RA. Keratoacanthoma (KA): An update and review. *J Am Acad Dermatol.* 2016 Jun;74:1220-33.
8. Schwartz RA. Keratoacanthoma. *J Am Acad Dermatol.* 1994 Jan;30:1-19.
9. Pavković I. Učestalost keratoakantoma u KBC Split u razdoblju od 2010. do 2014. g. Repozitorij MEFST. 2015.
10. Claeson M, Pandeya N, Dusingize JC, Thompson BS, Green AC, Rachel E Neale RE i sur. Assessment of incidence rate and risk factors for keratoacanthoma among residents of queensland, Australia. *jama dermatol.* 2020;156:1324-32.
11. Ghadially FN, Barton BW, Kerridge DF. The ethiology of keratoacanthoma. *Cancer* 1963;16:603 -11.
12. Colboc H, Bazin D, Moguelet P, Reguer S, Amode R, Jouanneau C i sur. Chemical composition and distribution of tattoo inks within tattoo-associated keratoacanthoma. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2020 Jul;34(7):e313-e315.
13. Chuang TY. Keratoacanthoma Medication. *MedScape.* 2017.
14. Chapman RS, Finn OA. Carcinoma of the larynx in two patiens with keratoacanthoma. *Br J Dermatol.* 1974;90:685-88.
15. Weber G, Stetter H, Pliess G. Assoziiertes vorkommen von eruptiven keratoacanthomen, tubercarcinom und paramyeloblasten-leukamie. *Arch Klin Exp Dermatol.* 1970;238:107-19.

16. Claudy A, Thivolet J. Multiple keratoacanthomas: association with deficient cell mediated immunity. *Br J Dermatol.* 1975;93:593-95.
17. Bordea C, Wojnarowska F, Miller PR, Doll H, Welsh K, Morris PJ. Skin cancers in renal-transplant recipients occur more frequently than previously recognized in a temperate climate. *Transplantation* 2004;77:574-79.
18. Misago N, Inoue T, Koba S, Narisawa Y. Keratoacanthoma and other types of squamous cell carcinoma with crateriform architecture: classification and identification. *J Dermatol.* 2013 Jun;40:443-52.
19. Okuyama R, Takahashi K, Ohi T, Tagami H. Keratoacanthoma developing in prurigo nodularis treated with cryotherapy. *Dermatology.* 1997;194:290-92.
20. Tisack A, Fotouhi A, Fidai C, Friedman BJ, Ozog D, Veenstra J. A clinical and biological review of keratoacanthoma. *Br J Dermatol.* 2021 Sep;185(3):487-98.
21. Ko CJ, McNiff JM, Bosenberg M, Choate KA. Keratoacanthoma: clinical and histopathologic of regression. *J Am Acad Dermatol.* 2012;67:1008-12.
22. Beare JM. Recurrent molluscum sebaceum. *Lancet.* 1955;268:182-3.
23. Cristalli MP, Marini R, LA Monaca G, Vitolo D, Pompa G, Annibali S. Double localization of keratoacanthoma on the cutaneous and mucosal sides of the lower lip: report of a case. *Oral Implantol.* 2014;6:94-8.
24. Ozkan F, Bilgiç R, Cesur S. Vulvar keratoacanthoma. *APMIS.* 2006;114(7-8):562-5.
25. Paulson N, Gibson J, Glusac E. Perianal and perineal keratoacanthoma: Two cases demonstrating histologic similarity to subungual keratoacanthoma. *J Cutan Pathol.* 2019;46:794-7.
26. Duany NP. Squamous cell pseudoepithelioma (keratoacanthoma): a new clinical variety, gigantic, multiple, and localized. *AMA Arch Derm.* 1958;78:703-9.
27. Cohen PR, Riahi RR. Cutaneous metastases masquerading as solitary or multiple keratoacanthomas. *Cutis.* 2020;106:30-31.
28. Webb AJ, Ghadially FN. Massive or giant keratoacanthoma. *J Pathol Bacteriol.* 1966;91:505-09.
29. Miguel-Gomez L, Turrion-Merino L, Reguero-Calleja ME, Muñoz-Zato E. Subungual keratoacanthoma. *Indian J Dermatol.* 2015;60:623-4.
30. Juhász MLW, Marmur ES. A multiple recurrent keratoacanthoma of the lower leg after repeated wide-excision and mohs micrographic surgery. *Dermatol Surg.* 2018;44:1028-1030.

31. Boyd AS. Multiple keratoacanthomas arising in a new tattoo. *Int J Dermatol*. 2020 Jan;59(1):e11-e12.
32. Zhu P, Wang Y. Multiple keratoacanthomas in a patient with myelodysplastic syndrome. *Lancet Haematol*. 2021;8:e94.
33. Weedon D, Barnetti L. Keratoacanthoma centrifugum marginatum. *Arch Derm*. 1975;111:1024-26.
34. Xiao H, Hooper PB, Umphress BA, Wolverton JE. Keratoacanthoma centrifugum marginatum. *Dermatol Online J*. 2021;27(3):13030.
35. Dauenhauer MA, Wacker D, Neuburg M. Perineural invasion of a Ferguson-Smith-type keratoacanthoma. *Dermatol Surg*. 2006;32:862-3.
36. Ferguson-Smith MA, Goudie DR. Digenic/multilocus aetiology of multiple self-healing squamous epithelioma (Ferguson-Smith disease): TGFBR1 and a second linked locus. *Int J Biochem Cell Biol*. 2014;53:520-5.
37. Nofal A, Assaf M, Nofal E, Alradi M. Generalized eruptive keratoacanthoma: proposed diagnostic criteria and therapeutic evaluation. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2014;28:397-404.
38. Mascitti H, De Masson A, Brunet-Possenti F, Bouaziz JD, Laly P, Mourad N i sur. Successful treatment of generalized eruptive keratoacanthoma of grzybowski with acitretin. *Dermatol Ther (Heidelb)*. 2019;9:383-388.
39. Gibbons M, Ernst A, Patel A, Armbricht E, Behshad R. Keratoacanthomas: A review of excised specimens. *J Am Acad Dermatol*. 2019;80:1794-6.
40. Paolino G, Donati M, Didona D, Mercuri SR, Cantisani C. Histology of Non-Melanoma Skin Cancers: An Update. *Biomedicines*. 2017;5:71.
41. Ogita A, Ansai SI, Misago N, Anan T, Fukumoto T, Saeki H. Histopathological diagnosis of epithelial crateriform tumors: Keratoacanthoma and other epithelial crateriform tumors. *J Dermatol*. 2016;43:1321-31.
42. Takai T. Advances in histopathological diagnosis of keratoacanthoma. *J Dermatol*. 2017;44:304-14.
43. Misago N, Takai T, Toda S, Narisawa Y. The changes in the expression levels of follicular markers in keratoacanthoma depend on the stage: keratoacanthoma is a follicular neoplasm exhibiting infundibular/isthmic differentiation without expression of CK15. *J Cutan Pathol*. 2014;41:437-46.
44. Patil S. Tumor immunotherapy - A lot to learn from Keratoacanthoma. *Med Hypotheses*. 2020;141:109719.

45. Bauer C, Abdul Pari AA, Umansky V, Utikal J, Boukamp P, Augustin HG i sur. T-lymphocyte profiles differ between keratoacanthomas and invasive squamous cell carcinomas of the human skin. *Cancer Immunol Immunother*. 2018;67:1147-1157.
46. Kambayashi Y, Fujimura T, Aiba S. Comparison of immunosuppressive and immunomodulatory cells in keratoacanthoma and cutaneous squamous cell carcinoma. *Acta Derm Venereol*. 2013;93:663-8.
47. Gambichler T, Gnielka M, Rüddel I, Stockfleth E, Stücker M, Schmitz L. Expression of PD-L1 in keratoacanthoma and different stages of progression in cutaneous squamous cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother*. 2017;66:1199-1204.
48. Cabrijan L, Lipozencic J, Batinac T, Lenkovic M, Stanic Zgombic Z. Differences between Keratoacanthoma and Squamous Cell Carcinoma Using TGF- α . *Collegium antropologicum* [Internet]. 2013 [pristupljeno 28.05.2025.];37(1):147-150. Dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/99546>
49. Antonov NK, Nair KG, Halasz CL. Transient eruptive keratoacanthomas associated with nivolumab. *JAAD Case Rep*. 2019;5:342-345.
50. Russo I, Zorzetto L, Chiarion Sileni V, Alaibac M. Cutaneous Side Effects of Targeted Therapy and Immunotherapy for Advanced Melanoma. *Scientifica (Cairo)*. 2018 Dec 30;2018:5036213.
51. Goudie D R, D Alessandro M, Merriman B, Lee H, Szeverenyi I, Avery S i sur. Multiple self-healing squamous epithelioma is caused by adisease-specific spectrum of mutations in *TGFBR1*. *Nature Genetics* volume. 2011;43:365–369.
52. Iden S, van Riel WE, Schäfer R, Song JY, Hirose T, Ohno S, Collard JG. Tumor type-dependent function of the par3 polarity protein in skin tumorigenesis. *Cancer Cell*. 2012 Sep 11;22(3):389-403.
53. LaPresto L, Cranmer L, Morrison L, Erickson CP, Curiel-Lewandrowski C. A novel therapeutic combination approach for treating multiple vemurafenib-induced keratoacanthomas: systemic acitretin and intralesional fluorouracil. *JAMA Dermatol*. 2013 Mar;149(3):279-81.
54. Selmer J, Skov T, Spelman L, Weedon D. Squamous cell carcinoma and keratoacanthomas are biologically distinct and can be diagnosed by light microscopy: a review. *Histopathology*. 2016;69:535-41.
55. Dillenburg CS, Martins MD, Meurer L, Castilho RM, Squarize CH. Keratoacanthoma of the lip: activation of the mTOR pathway, tumor suppressor proteins, and tumor senescence. *Medicine (Baltimore)*. 2015;94:e1552.

56. Li J, Wang K, Gao F, Janesen TD, Li ST, DeAngelis SM i sur. Array aomparative genomic hybridization of keratoacanthomas and squamous cell carcinomas: different patterns of genetic aberrations suggest two distinct entities. *Journal of Investigative Dermatology*. 2012;2060-2066.
57. Tying SK. Human papillomavirus infections: epidemiology, pathogenesis and host immune response. *J Am Acad Dermatol*. 2000;43: S18 -S26.
58. Grce M, Mravak-Stipetić M. Human papillomavirus–associated diseases. *Clin Deramatol* 2014;32:253-258.
59. Harden E. M, Munger K. Human papillomavirus molecular biology. *Mutat Res*. 2017;772;3-12
60. Shimizu A, Yamaguchi R, Kuriyama Y. Recent advances in cutaneous HPV infection. *J Dermatol*. 2023 Mar;50(3):290-298.
61. Porro A. M., Alchorne M. M. A., Mota G. R., Michalany N., Pignatari A. C. C., Souza I. E. Detection and typing of human papillomavirus in cutaneous warts of patients infected with human immunodeficiency virus type 1. *Br J Dermatol*. 2003;149:1192–1199.
62. Koning M. N. C., Quint K. D., Bruggink S. C., Gussekloo J., Bouwes Bavinck J. N., Feltkamp M. C. W. High prevalence of cutaneous warts in elementary school children and the ubiquitous presence of wart-associated human papillomavirus on clinically normal skin. *Br J Dermatol*. 2015;172:196–201.
63. Silverberg J. I., Silverberg N. B. The US prevalence of common warts in childhood: a population-based study. *J Invest Dermatol*. 2013;133:2788–2790.
64. Nunes E. M., Talpe-Nunes V., Sichero L. Epidemiology and biology of cutaneous human papillomavirus. *Clinics*. 2018;73.
65. Reusser NM, Downing C, Guidry J, Tying SK. HPV carcinomas in immunocompromised patients. *J Clin Med*. 2015 Jan 29;4(2):260-81.
66. Harden ME, Munger K. Human papillomavirus molecular biology. *Mutat Res Rev Mutat Res*. 2017;772:3–12.
67. Van Doorslaer K, Chen Z, Bernard HU, Chan PKS, DeSalle R, Dillner J i sur. ICTV virus taxonomy profile: papillomaviridae. *J Gen Virol*. 2018 Aug;99(8):989-90.
68. Egawa N, Egawa K, Griffin H, Doorbar J. Human papillomaviruses; epithelial tropisms, and the development of neoplasia. *Viruses*. 2015;7:3863–3890.
69. Magalhães GM, Vieira ÉC, Garcia LC, De Carvalho-Leite MLR, Guedes ACM, Araújo MG. Update on human papilloma virus - part I: epidemiology, pathogenesis, and clinical spectrum. *An Bras Dermatol*. 2021;96(1):1-16.

70. Abeck D, Tetsch L, Lüftl M, Biedermann T. Extragenital cutaneous warts - clinical presentation, diagnosis and treatment. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2019;17:613–634.
71. Bacaj P, Burch D. Human papillomavirus infection of the skin. *Arch Pathol Lab Med.* 2018;142:700–705.
72. Witchev JD, Witchev BN, Roth-Kauffman MM, Kauffman KM. Plantar warts: epidemiology, pathophysiology, and clinical management. *J Am Osteopath Assoc.* 2018;118:92–105.
73. Przybyszewska J, Zlotogorski A, Ramot Y. Re-evaluation of epidermodysplasia verruciformis: reconciling more than 90 years of debate. *J Am Acad Dermatol.* 2017;76:1161–75.
74. Jabłońska S, Majewski S, Obalek S, Orth G. Cutaneous warts. *Clin Dermatol.* 1997;15:309–319.
75. Penner KE, Manji KA, Craig AB, Grootegoed RA, Leaming TR, Wirth GA. Atypical presentation of verrucous carcinoma: a case study and review of the literature. *Foot Ankle Spec.* 2013;6:318–322.
76. Araújo MG, Magalhães GM, Garcia LC, Vieira ÉC, Carvalho-Leite MLR, Guedes ACM. Update on human papillomavirus - Part II: complementary diagnosis, treatment and prophylaxis. *An Bras Dermatol.* 2021 Mar-Apr;96(2):125-138.
77. Dall'oglio F, D'Amico V, Nasca MR, Micali G. Treatment of cutaneous warts: an evidence-based review. *Am J Clin Dermatol.* 2012 Apr 1;13(2):73-96.
78. Kwok CS, Gibbs S, Bennett C, Holland R, Abbott R. Topical treatments for cutaneous warts. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012 Sep 12;2012(9):CD001781.
79. Batista CS, Atallah ÁN, Saconato H, da Silva EMK. 5-FU for genital warts in non-immunocompromised individuals. *Cochrane Database Syst Rev.* 2010;CD006562.
80. Sterling JC, Gibbs S, Haque Hussain SS, Mohd Mustapa MF, Handfield-Jones SE. British association of dermatologists' guidelines for the management of cutaneous warts 2014. *Br J Dermatol.* 2014 Oct;171(4):696-712.
81. Leerunyakul K, Thammarucha S, Suchonwanit P, Rutnin S. A comprehensive review of treatment options for recalcitrant nongenital cutaneous warts. *J Dermatolog Treat.* 2022;33(1):23-40.
82. Kang SS, Kauls LS, Gaspari AA. Toll-like receptors: applications to dermatologic disease. *J Am Acad Dermatol.* 2006;54(6):951-83;quiz 983-6.

83. Miller LS, Modlin RL. Toll-like receptors in the skin. *Semin Immunopathol.* 2007;29(1):15–26.
84. Behzadi P, García-Perdomo HA, Karpiński TM. Toll-Like receptors: general molecular and structural biology. *Journal of Immunology Research.* 2021;202.
85. El-Zayat S.R, Sibaii H, Mannaa F.A Toll-like receptors activation, signaling, and targeting: an overview. *Bulletin of the National Research Centre.* 2019;43(1):p.187.
86. Harberts E, Gaspari AA. TLR signaling and DNA repair: are they associated? *Journal of Investive Dermatology.* 2013;133(2):296-302.
87. Gay NJ., Symmons M F., Gangloff M, Bryant C E. Assembly and localization of toll-like receptor signalling complexes. *Nature Reviews. Immunology.* 2014;14(8):546–58.
88. Gay NJ, Gangloff M. Structure and function of toll receptors and their ligands. *Annual Review of Biochemistry.* 2007;76:141–65.
89. Park JS, Svetkauskaite D, He Q, Kim YJ, Strassheim D, Izhizaka A. Involvement of toll-like receptor 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. *J Biol Chem.* 2004;279:7370-77.
90. Guillot Y, Balloy V, McCormack FX, Golenbock DT, Chignard M, Si-Tahar M, Cutting edge: the immunostimulatory activity of the lung surfactant protein A involves Toll-like receptor 4. *J Immunol.* 2002;168:5989-92.
91. Smiley T, King J A, Hancock W W. Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4. *J Immunol.* 2001;167:2887-94.
92. Yu L, Wang L, Chen S. Endogenous Toll-like receptor ligands and their biological significance. *J. Cell. Mol. Med.* 2010;14 2592–2603.
93. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 2004;4:499-511.
94. Brinkmann MM, Spooner E, Hoebe K, Beutler B, Ploegh H L, Kim Y M. The interaction between the ER membrane protein UNC93B and TLR3, 7, and 9 is crucial for TLR signaling. *J. Cell. Biol.* 2007;177:265–275.
95. Zhang FX, Kirschning CJ, Mancinelli R, Xu XP, Jin Y, Faure E, Mantovani A, Rothe M, Muzio M, Arditi M. Bacterial lipopolysaccharide activates nuclear factor-kappaB through interleukin-1 signaling mediators in cultured human dermal endothelial cells and mononuclear phagocytes. *J Biol Chem.* 1999 Mar 19;274(12):7611-4.
96. Kawasaki T, Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol.* 2014;25:5:461.

97. Joung SM, Park ZY, Rani S, Takeuchi O, Akira S, Lee JY. Akt contributes to activation of the TRIF-dependent signaling pathways of TLRs by interacting with TANK-binding kinase 1. *J Immunol.* 2011;186(1):499-507.
98. Ning S, Pagano JS, Barber GN. IRF7: activation, regulation, modification and function. *Genes Immun.* 2011;12(6):399-414.
99. Cook DN, Pisetsky DS, Schwartz DA. Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease. *Nat Immunol.* 2004;5:975-80.
100. Wang J, Hu Y, Wen Deng W, Sun B. Negative regulation of Toll-like receptor signaling pathway. *Microbes Infect.* 2009;11:321-27.
101. International HapMap Consortium; Frazer KA, Ballinger DG, Cox DR, Hinds DA, Stuve LL, Gibbs RA i sur. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature.* 2007;449:851-861.
102. 1000 Genomes Project Consortium; Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Garrison EP, Kang HM, Korbel JO i sur. A global reference for human genetic variation. *Nature.* 2015 Oct 1;526(7571):68-74.
103. The International HapMap Consortium. The International HapMap Project. *Nature* 2003;426:789–96.
104. Medvedev AE. Toll-like receptor polymorphisms, inflammatory and infectious diseases, allergies, and cancer. *J Interferon Cytokine Res.* 2013 Sep;33(9):467-84.
105. Gene Cards. The Human Database (Internet). *TLR2 Gene: Gene Cards* (citirano 3. ožujka 2025.). Dostupno na: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TLR2>.
106. Nischalke HD, Berger C, Aldenhoff K, Thyssen L, Gentemann M, Grünhage F i sur. Toll-like receptor (TLR) 2 promoter and intron 2 polymorphisms are associated with increased risk for spontaneous bacterial peritonitis in liver cirrhosis. *J Hepatol.* 2011;55(5):1010-6.
107. Kerkhof M, Postma DS, Brunekreef B, Reijmerink NE, Wijga AH, de Jongste JC i sur. Toll-like receptor 2 and 4 genes influence susceptibility to adverse effects of traffic-related air pollution on childhood asthma. *Thorax.* 2010;65(8):690-7.
108. Eder W, Klimecki W, Yu L, von Mutius E, Riedler J, Braun-Fahrlander C, Nowak D, Martinez FD; ALEX Study Team. Toll-like receptor 2 as a major gene for asthma in children of European farmers. *J Allergy Clin Immunol.* 2004;113(3):482-8.
109. Salpietro C, Rigoli L, Miraglia Del Giudice M, Cuppari C, Di Bella C, Salpietro A i sur. TLR2 and TLR4 gene polymorphisms and atopic dermatitis in Italian children: a multicenter study. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2011;24:33-40.
110. Mozyrska OV, Volosovets OP, Kryvopustov SP, Goncharov SV, Kupkina AV, Iemets OV i sur. Single nucleotide polymorphism rs4696480 of *tlr2* gene associates with severity of

- atopic dermatitis in children, but not with ige sensitization to malassezia. *Wiad Lek.* 2022;75(5 pt 1):1070-1076.
111. Can C, Yazıcıoğlu M, Gürkan H, Tozkır H, Görgülü A, Süt NH. Lack of association between toll-like receptor 2 polymorphisms (r753q and a-16934t) and atopic dermatitis in children from thrace region of turkey. *Balkan Med J.* 2017;34(3):232-238.
 112. Potaczek DP, Nastalek M, Okumura K, Wojas-Pelc A, Undas A, Nishiyama C. An association of TLR2–16934A >T polymorphism and severity/phenotype of atopic dermatitis. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2011;25:715–721.
 113. Sabah-Özcan S, Gürel G. The polymorphism rs4696480 in the TLR2 gene is associated with psoriasis patients in the Turkish population. *Immunol Lett.* 2019;211:28–32.
 114. Gene Cards. The Human Database (Internet). *TLR3 Gene: Gene Cards* (citirano 3. ožujka 2025.). Dostupno na: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TLR3>.
 115. Tamagawa-Mineoka R, Ueta M, Katoh N. TLR3 and inflammatory skin diseases: from environmental factors to molecular opportunities. In: Wondrak, GT (eds) *Skin Stress Response Pathways*. Cham: Springer International Publishing; 2016.
 116. Ku JK, Kwon HJ, Kim MY, Kang H, Song PI, Armstrong CA i sur. Expression of Toll-like receptors in verruca and molluscum contagiosum. *J Korean Med Sci.* 2008;23(2):307-14.
 117. Salaun B, Lebecque S, Matikainen S, Rimoldi D, Romero P. Toll-like receptor 3 expressed by melanoma cells as a target for therapy? *Clin Cancer Res.* 2007;13:4565-74.
 118. Moore CE, Hennig BJ, Perrett KP, Hoe JC, Lee SJ, Fletcher H i sur. Single nucleotide polymorphisms in the Toll-like receptor 3 and CD44 genes are associated with persistence of vaccine-induced immunity to the serogroup C meningococcal conjugate vaccine. *Clin Vaccine Immunol.* 2012;19(3):295-303.
 119. Ávila-Castellano R, García-Lozano J-R, Cimbollek S, Lucendo AJ, Bozada J-M, Quiralte J. Genetic variations in the TLR3 locus are associated with eosinophilic esophagitis. *United European Gastroenterology Journal.* 2018;6(3):349-357.
 120. Gast A, Bermejo JL, Claus R, Brandt A, Weires M, Weber A i sur. Association of inherited variation in Toll-like receptor genes with malignant melanoma susceptibility and survival. *PLoS One.* 2011;6(9):e24370.
 121. Yeyeodu ST, Kidd LR, Oprea-Ilie GM, Burns BG, Vancleave TT, Shim JY i sur. IRAK4 and TLR3 sequence variants may alter breast cancer risk among African-American women. *Front Immunol.* 2013;4:338.

122. Gene Cards. The Human Database (Internet). *TLR9* Gene: Gene Cards (citirano 3. ožujka 2025.). Dostupno na: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TLR9>.
123. Loft ND, Skov L, Iversen L, Gniadecki R, Dam TN, Brandslund I i sur. Associations between functional polymorphisms and response to biological treatment in Danish patients with psoriasis. *Pharmacogenomics J*. 2018 May 22;18(3):494-500.
124. Pandey N, Chauhan A, Raithatha N, Patel P, Khandelwal R, Desai A i sur. Influence of TLR4 and TLR9 polymorphisms and haplotypes on multiple hrHPV infections and HPV16 copy number in cervical cancer and cervicitis. *Microb Pathog*. 2021;159:105149.
125. Varshney D, Singh S, Sinha E, Mohanty KK, Kumar S, Kumar Barik S i sur. Systematic review and meta-analysis of human Toll-like receptors genetic polymorphisms for susceptibility to tuberculosis infection. *Cytokine*. 2022;152:155791.
126. Redondo N, Navarro D, Aguado JM, Fernandez-Ruiz M. Human genetic polymorphisms and risk of viral infection after solid organ transplantation. *Transplant Rev (Orlando)*. 2022;36(1):100669.
127. Fernandez-Ruiz M, Corrales I, Arias M, Compistol JM, Gimenez E, Crespo J i sur. Association between individual and combined SNP sin genes related to innate immunity and incidence of CMV infection in seropositive kidney transplant recipients. *Am J Transpl*. 2015;15(5):1323-35.
128. Mhandire D, Mhandire K, Magadze M, Wonkam A, Kengne AP, Dandara C. Genetic variation in toll like receptors 2, 7, 9 and interleukin-6 is associated with cytomegalovirus infection in late pregnancy. *BMC Medical Genetics* 21. Article number:113 (2020).
129. Kim W, Kim TH, Oh SJ, Kim HJ, Kim JH, Kim HA i sur. Association of TLR 9 gene polymorphisms with remission in patients with rheumatoid arthritis receiving TNF- α inhibitors and development of machine learning models. *Sci Rep*. 2021;11(1):20169.
130. Jabłońska A, Studzińska M, Szenborn L, Wiśniewska-Ligier M, Karlikowska-Skwarnik M, Gęsicki T i sur. TLR4 896A/G and TLR9 1174G/A polymorphisms are associated with the risk of infectious mononucleosis. *Sci Rep*. 2020;10(1):13154.
131. Ou B, Liu Y, Zhang T, Sun Y, Chen J, Peng Z. TLR9 rs352139 genetic variant promotes tacrolimus elimination in chinese liver transplant patients during the early posttransplantation period. *Pharmacotherapy*. 2019 Jan;39(1):67-76.
132. Qiu X, Dong Y, Cao Y, Luo Y. Correlation between TLR2, TLR3, TLR4, and TLR9 polymorphisms and susceptibility to and prognosis of severe hepatitis among the newborns. *J Clin Lab Anal*. 2018 Mar;32(3):e22292.

133. Semlali A, Parine NR, Al Amri A, Azzi A, Arafah M, Kohailan M i sur. Association between *TLR-9* polymorphisms and colon cancer susceptibility in Saudi Arabian female patients. *Onco Targets Ther.* 2016;10:1-11.
134. Al-Harras MF, Houssen ME, Shaker ME, Farag K, Farouk O, Monir R i sur. Polymorphisms of glutathione S-transferase π 1 and toll-like receptors 2 and 9: Association with breast cancer susceptibility. *Oncol Lett.* 2016;11(3):2182-2188.
135. Lee YH, Song GG. Systemic lupus erythematosus and toll-like receptor 9 polymorphisms: A meta-analysis of genetic association studies. *Lupus.* 2023 Jul;32(8):964-973.
136. Ricci E, Malacrida S, Zanchetta M, Mosconi I, Montagna M, Giaquinto C i sur. Toll-like receptor 9 polymorphisms influence mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus type 1. *J Transl Med.* 2010 May 25;8:49.
137. Castro FA, Haimila K, Sareneva I, Schmitt M, Lorenzo J, Kunkel N i sur. Association of HLA-DRB1, interleukin-6 and cyclin D1 polymorphisms with cervical cancer in the Swedish population--a candidate gene approach. *Int J Cancer.* 2009;125(8):1851-8.
138. Rudan I, Marusic A, Jankovic S, Rotim K. "10001 Dalmatians:" Croatia launches its national biobank. *Croat Med J.* 2009;50(1):4–6)
139. Danecek P, Auton A, Abecasis G, Albers CA, Banks E, DePristo MA i sur.. The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics.* 2011 Aug 1;27(15):2156-8.
140. Liu K, Muse SV. PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. *Bioinformatics.* 2005 May 1;21(9):2128-9.
141. Zhou Q, Zhu K, Cheng H. Toll-like receptors in human papillomavirus infection. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2013;61:203-15
142. Neagu N, Dianzani C, Venuti A, Bonin S, Voidăzan S, Zalaudek I i sur. The role of HPV in keratinocyte skin cancer development: A systematic review. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2023;37:40-6.
143. Baek YS, Kim YC, Kim KE, Jeon J, Kim A, Song HJ i sur. Low detection rate of human papillomavirus in patients with cutaneous squamous cell carcinoma and keratoacanthoma. *Eur J Dermatol.* 2022;32:577-83.
144. Qian C, Cao X. Regulation of Toll-like receptor signaling pathways in innate immune responses. *Ann N Y Acad Sci.* 2013;1283:67-74.
145. Garantziotis S, Hollingsworth JW, Zaas AK, Schwartz DA. The effect of toll-like receptors and toll-like receptor genetics in human disease. *Annu Rev Med.* 2008;59:343-59.

146. Zhou B, Liang S, Shang S, Li L. Association of TLR2 and TLR9 gene polymorphisms with atopic dermatitis: a systematic review and meta-analysis with trial sequential analysis. *Immunol Med.* 2023;46:32-44.
147. Laska MJ, Troldborg A, Hansen B, Stengaard-Pedersen K, Junker P, Nexø BA i sur. Polymorphisms within Toll-like receptors are associated with systemic lupus erythematosus in a cohort of Danish females. *Rheumatology.* 2014;53:48-55.
148. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) Portal. Broad Institute of MIT and Harvard. c2024. Dostupno na: <https://www.gtexportal.org/home/snp/rs7657186>
149. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) Portal. Broad Institute of MIT and Harvard. c2024 (4. svibnja 2024). Dostupno na: <https://www.gtexportal.org/home/snp/rs352139>.
150. Viariso D, Mueller-Decker K, Kloz U, Aengeneyndt B, Kopp-Schneider A, Grone HJ i sur. E6 and E7 from beta hpv38 cooperate with ultraviolet light in the development of actinic keratosislike lesions and squamous cell carcinoma in mice. *PLoS Pathog.* 2011;7:e1002125.
151. Karagas MR, Waterboer T, Li Z, Nelson HH, Michael KM, Bavinck JNB i sur. Genus human papillomaviruses and incidence of basal cell and squamous cell carcinomas of skin: population based case-control study. *BMJ.* 2010;341:c2986.
152. Lester SN, Li K. Toll-like receptors in antiviral innate immunity. *J Mol Biol.* 2014;426:1246-64.
153. Vijay Kumar. Going, Toll-like receptors in skin inflammation and inflammatory diseases. *EXCLI J.* 2021;20:52-7.
154. Perales-Linares R, Navas-Martin S. Toll-like receptor 3 in viral pathogenesis: friend or foe? *Immunology.* 2013;140:153-67.
155. Miller LS. Toll-like receptors in skin. *Adv Dermatol.* 2008;24:71-87.
156. Burns EM, Yusuf N. Toll-like receptors and skin cancer. *Front Immunol.* 2014;5:135
157. Borkowski AW, Gallo RL. UVB radiation illuminates the role of TLR3 in the epidermis. *J Invest Dermatol.* 2014;134:2315-20.

10. ŽIVOTOPIS

OSOBNİ PODACI

Ime i prezime: Silvana Karabatić Knezović

Datum i mjesto rođenja: 9. svibnja 1965., Split

Državljanstvo: Hrvatsko

Adresa stanovanja: Velebitska ul. 20, 21000 Split

E-mail: skrazanj@gmail.com

OBRAZOVANJE

- 2012. Magistar znanosti, Medicinski fakultet, Sveučilište u Splitu
- 2006. – 2007. Dopunsko pedagoško obrazovanje, Fakultet prirodoslovno matematičkih znanosti i kineziologije, Sveučilište u Splitu
- 2002. – 2004. Znanstveni poslijediplomski studij Temeljne kliničke znanosti, Medicinski fakultet, Sveučilište u Splitu
- 2000. – 2001. Stručni poslijediplomski studij Ultrazvuk u kliničkoj medicini, Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu
- 1990. – 1996. Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu – doktor medicine

STRUČNA USAVRŠAVANJA I AKTIVNOSTI

- 2023. Izbor u zvanje profesor izvrstan savjetnik (Agencija za strukovno obrazovanje i obrazovanje odraslih)
- 2018. Izbor u zvanje profesor savjetnik (Agencija za strukovno obrazovanje i obrazovanje odraslih)
- 2013. Izbor u zvanje profesor mentor (Agencija za strukovno obrazovanje i obrazovanje odraslih)

PROFESIONALNO DJELOVANJE I ANGAŽMANI

- 2021. – danas Član Radne skupine za izradu sektorskog i strukovnih kurikulumu iz područja Uzorkovanje i analiza biološkog materijala, Sektor: Zdravstvo i socijalna skrb
- 2019. – 2021. Član Radne skupine za prilagodbu stručnih i izbornih sadržaja strukovnog kurikulumu za stjecanje kvalifikacije medicinska sestra/medicinski tehničar opće njege
- 2019. – 2020. Član Radne skupine za izradu standarda zanimanja: Uzorkovanje i analiza biološkog materijala, Sektor Zdravstvo i socijalna skrb

- 2018. – danas Koordinator Povjerenstva za kvalitetu i samovrjednovanje, Zdravstvena škola Split
- 2017. – danas Član interventnog tima Hrvatskog Crvenog križa

OSTALA ZNANJA I VJEŠTINE

- Strani jezik: Engleski – aktivno znanje

Članstva:

- Hrvatska liječnička komora
- Hrvatsko katoličko liječničko društvo