

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Jolita Rimienė

GIMDOS KAKLELIO IKINAVIKINĖS PATOLOGIJOS ĮVERTINIMO EFEKTYVUMAS
NAUDOJANT *SHANDON PAPSPIN* SISTEMĄ

Daktaro disertacija

Biomedicinos mokslai, medicina (07B)

Vilnius 2010

Disertacija rengta 2005–2009 metais Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Patologijos, teismo medicinos ir farmakologijos katedroje, Valstybiniame patologijos centre.

Mokslinis vadovas :

Prof. dr. Arvydas Laurinavičius (Vilniaus Universitetas, biomedicinos mokslai, medicina (07B)).

NUOŠIRDŽIAI DĖKOJU:

dr. Živilei Gudlevičienei už metodinę pagalbą, vertingus patarimus ir atliktus ŽPV DNR tyrimus;

doc.Zofijai Stukonienei už perteiktas citologijos žinias

doktorantūros komiteto nariams ir oponentams, įvertinusiems šį darbą;

gyd. ginekologams Julei Musteikienei, Daivai Keršulytei, Saulei Murmienei už pagalbą surenkant medžiagą;

citopatologijos tyrimų skyriaus darbuotojams už pagalbą atliekant citologinius tyrimus ir patologijos technologams už paruoštus preparatus citologiniam tyrimui;

lietuvių kalbos redaktorei Gražinai Pruskuvienei;

dr.Giedrei Smailytei už statistinę analizę ir vertingus patarimus;

vyrui Darijui ir visai šeimai už palaikymą.

TURINYS

SANTRUMPOS.....	6
1. ĮVADAS.....	8
1.1. Tiriamoji problema.....	8
1.2. Darbo aktualumas ir reikšmė.....	10
1.3. Darbo tikslai.....	11
1.4. Darbo uždaviniai.....	11
1.5. Darbo naujumas.....	12
1.6. Ginamieji teiginiai.....	13
2. LITERATŪROS APŽVALGA.....	13
2.1. Gimdos kaklelio vėžio epidemiologija.....	13
2.2. Gimdos kaklelio atrankinės patikros programų įtaka gimdos kaklelio vėžio epidemiologijai.....	17
2.3. Gimdos kaklelio histologijos įpatumai.....	20
2.4. Radiniai PAP tepinėlyje.....	22
2.5. Gimdos kaklelio vėžio rizikos veiksniai.....	28
2.5.1. ŽPV infekcija kaip gimdos kaklelio vėžio rizikos veiksnys.....	29
2.5.2. Oraliniai kontraceptikai.....	31
2.5.3. <i>Chlamydia trachomatis</i> infekcija.....	31
2.5.4. Imuniteto susilpnėjimas.....	31
2.5.5. Lytinio gyvenimo įpatumai.....	32
2.6. Gimdos kaklelio vėžio vystymasis.....	33
2.7. Gimdos kaklelio vėžio diagnostikos metodų vystymasis.....	35
2.7.1. Citologinių gimdos kaklelio tyrimų apžvalga.....	39
2.7.2. Histologiniai gimdos kaklelio tyrimo metodai.....	44
2.7.3. ŽPV tyrimo metodų apžvalga.....	45
3. MEDŽIAGOS IR METODAI.....	47
3.1. Pacientų įtraukimo kriterijai.....	47
3.2. Pacientų atšaukimo kriterijai.....	47
3.3. Tiriamosios imties dydžio įvertinimas.....	48
3.4. Dalytos medžiagos tyrimo fazė.....	49
3.5. Nedalytos medžiagos tyrimo fazė.....	55
3.6. ŽPV ištyrimas.....	58
3.7. Statistinė analizė.....	65
4. REZULTATAI.....	66
4.1. Dalytos medžiagos tyrimo fazės rezultatai.....	68
4.2. Nedalytos medžiagos tyrimo fazės tyrimo rezultatai.....	78
4.3. Histologinio tyrimo rezultatai.....	80
4.4. ŽPV DNR tyrimo rezultatai.....	83
5. REZULTATŲ APTARIMAS.....	89
5.1. Dalytos medžiagos citologinių tyrimų efektyvumo įvertinimas.....	87
5.2. Nedalytos medžiagos citologinių tyrimų palyginimas.....	97
5.3. Histologinio tyrimo rezultatai.....	98
5.4. ŽPV DNR tyrimo rezultatai.....	101

6. IŠVADOS.....	103
7. PRAKTINĒS REKOMENDACIJOS.....	105
8. DISERTACIJOS TEMA PASKELBTU DARBU SARĀŠAS.....	106
9. LITERATŪRA.....	110
10. PRIEDAI.....	121

SANTRUMPOS

ASCCP	Amerikos kolposkopijos ir gimdos kaklelio patologijos draugija (<i>angl.</i> American society for colposcopy and cervical pathology)
ASC	Atipinės plokščiojo epitelio ląstelės (<i>angl.</i> atypical squamous cell)
ASCUS	Atipinės plokščiojo epitelio ląstelės - nenustatytos reikšmės (<i>angl.</i> atypical squamous cell undeterminate significance)
ASC-H	Atipinės plokščiojo epitelio ląstelės, galimi žymūs plokščialąsteliniai intraepiteliniai pakitimai (<i>angl.</i> atypical squamous cell suggestion for high grade squamous intraepithelial lesion)
AGC	Atipinės liaukinės ląstelės (<i>angl.</i> atypical glandular cell)
AGUS	Atipinės liaukinės ląstelės, nenustatytos reikšmės (<i>angl.</i> atypical glandular cells undeterminate significance)
AIS	Adenokarcinoma <i>in situ</i>
AC	Adenokarcinoma
ALTS	ASCUS/LSIL stebėsenos tyrimas (<i>ASCUS/LSIL triage study</i>)
CIN	Displazija ar intraepitelinė gimdos kaklelio neoplazija (<i>angl.</i> cervical intraepithelial neoplasia)
CIN1	I laipsnio intraepitelinė gimdos kaklelio neoplazija (<i>angl.</i> cervical intraepithelial neoplasia)
CIN2	II laipsnio intraepitelinė gimdos kaklelio neoplazija (<i>angl.</i> cervical intraepithelial neoplasia)
CIN3	III laipsnio intraepitelinė gimdos kaklelio neoplazija (<i>angl.</i> cervical intraepithelial neoplasia III)
CIS	karcinoma <i>in situ</i>
CAP	Amerikos patologų draugija (<i>angl.</i> College of American pathologists)
H&E	Dažymo hematoksilinu ir eozinu metodas
HSIL	Žymūs plokščialąsteliniai intraepiteliniai pakitimai (<i>angl.</i> high grade squamous intraepithelial lesions)
LLETZ	Elektrokonizacija plačiąja kilpa kitimo sričiai pašalinti (<i>angl.</i> Large loop electroexcision with transformation zone)
LSIL	Nežymūs plokščialąsteliniai intraepiteliniai pakitimai (<i>angl.</i> low grade squamous intraepithelial lesion)
mm	Milimetrai
µm	Mikrometrai
NTPV	Neigiama tyrimo prognozinė vertė

NCI	Tarptautinis vėžio institutas (<i>angl. National Cancer Institute</i>)
Pap	Citologinis gimdos kaklelio tepinėlio tyrimas (<i>Papanicolaou tyrimas</i>)
PSO	Pasaulinė sveikatos apsaugos organizacija
PI	Pasikliautiniai intervalai
PGR	Polimerazės grandininė reakcija
PBS	Fosfatinis buferis (<i>angl. phosphate buffered saline</i>)
PCNA	Proliferuojančios ląstelės branduolio antigenas
ROC	ROC kreivės, skirtos diagnostinėms testo charakteristikoms apibūdinti (<i>angl. receiving operating curve</i>)
SN	standartinis nuokrypis
SCC	plokščialąstelinė karcinoma (<i>angl. squamous cell carcinoma</i>)
TTPV	teigiama tyrimo prognozinė vertė
VPC	Valstybinis patologijos centras
VUOI	Vilniaus universiteto onkologijos institutas
VLK	Valstybinė ligonių kasa
ŽPV	Žmogaus papilomos virusas

1. ĮVADAS

1.1 Tiriamoji problema

Vėžys yra aktuali visuomenės sveikatos problema. Pasaulyje kasmet užregistruojama apie 10 mln. sergančiųjų vėžiu (1). Daug pastangų dedama siekiant užkirst kelią vėžiui ir vis dėlto sergamumas piktybiniais navikais ir mirtingumas nuo jų didėja. Pasaulinės sveikatos apsaugos organizacijos duomenimis, prognozuojama, kad vėžio atvejų skaičius iki 2010 m. pasaulyje išaugs dar 50%, todėl vis daugiau dėmesio turėtų būti skiriama pirminei ir antrinei vėžio profilaktikai. Dalis vėžį sukeliančių rizikos veiksnių ir jų paplitimas populiacinėse grupėse yra nustatytas epidemiologiniais tyrimais ir tai leidžia atlikti pirminę ligos profilaktiką. Svarbu pažymėti, kad sukurtos vakcinos nuo kancerogeninių tipų virusų papildė pirminės vėžio profilaktikos priemones (2). Tarp antrinės profilaktikos priemonių svarbios yra atrankinės gyventojų sveikatos būklės patikros, turinčios apimti apie 80 proc. gyventojų (2).

Pasaulyje pagal dažnumą gimdos kaklelio vėžys tarp moterų piktybinių ligų užima antrąją vietą po pirmaujančio krūties vėžio ir trečiąją vietą moterų mirčių nuo vėžio lentelėje po mirčių nuo krūties ir plaučių vėžio. Pasaulyje kasmet diagnozuojama 471 000 gimdos kaklelio vėžio atvejų, o mirtimi baigiasi iki 230 000 atvejų (1). 80% gimdos kaklelio vėžio yra užregistruojama ekonomiškai silpnose šalyse. Sukaupta daug žinių apie gimdos kaklelio vėžio vystymąsi ir priemones, kaip užkirst kelią šiai ligai (3). Iki vėžiniai gimdos kaklelio pakitimai virsta vėžiu per ilgą laikotarpį. Periodiniai kliniškai sveikų moterų patikrinimai atliekant citologinį gimdos kaklelio tepinėlio tyrimą – efektyvus būdas mažinti sergamumą ir mirtingumą nuo gimdos kaklelio vėžio. Kai kuriose valstybėse įdiegus atrankinę patikrą dėl gimdos kaklelio vėžio ženkliai sumažėjo susirgimų šia liga skaičius. Atrankinė patikra dėl gimdos kaklelio vėžio kai kuriose pasaulio šalyse (JAV, Suomijoje) vykdoma apie 40-

30 metų. Ten sergamumas gimdos kaklelio vėžiu ir mirtingumas nuo jo ženkliai sumažėjo 70-80%. Įgyvendinant atrankinę patikrą dėl gimdos kaklelio vėžio buvo pastebėta tiesioginė sąsaja tarp patikrinimų dažnumo ir mirtingumo mažėjimo. Pastaraisiais metais prasiplėtė žinios apie gimdos kaklelio vėžio rizikos veiksnius. 2008 m. prof. H. Zur Hauseno, Nobelio premijos laureato, įrodytas žmogaus papilomos viruso vaidmuo sukeliant gimdos kaklelio ikivėžinius pakitimus ir vėžį privertė pažvelgti į šią ligą kaip į plintančią lytiniu keliu ir infekcinės kilmės. Buvo sukurtas naujas ginklas kovoti su gimdos kaklelio vėžiu–vakcinos nuo žmogaus papilomos viruso, skirtos skiepyti 8-12 metų mergaites. Derinant šias dvi profilaktikos priemones – jaunų mergaičių vakcinaciją ir moterų patikrą atliekant citologinį gimdos kaklelio tyrimą – galima išvengti 90% gimdos kaklelio vėžio atvejų (4).

Citologinis gimdos kaklelio tepinėlio tyrimas ikivėžiniams pakitimams diagnozuoti pradėtas taikyti nuo 1928 m.(Papanicolaou testas) ir iki šios dienos išlieka atrankinės patikros standartu siekiant anksti nustatyti ikivėžinius gimdos kaklelio ląstelių pakitimus, tačiau jis nėra tobulas. Gimdos kaklelio citologiniam tyrimui būdingi klaidingai teigiami ir klaidingai neigiami tyrimo rezultatai. Nustatyta, kad invazinio gimdos kaklelio vėžio atveju klaidingai neigiami rezultatai gali sudaryti 16–82% atvejų (5). Mažas tyrimo jautrumas, didelis netinkamų citologiniam tyrimui tepinėlių ir neapibrėžtų išvadų kiekis – pagrindinės citologinio gimdos kaklelio tepinėlio tyrimo silpnosios pusės. Žinoma, kad jo jautrumo stoką sąlygoja tepinėlyje būnančios priemaišos (uždegimo eksudatas, kraujas, gleivės, ląstelių džiūvimo ore artefaktai, ruošiant tepinėlių deformuotos ląstelės ir kt.) ir tai, kad 50% ląstelių ruošiant tepinėlių nepakliūna ant stiklelio bet yra išmetama su medžiagos paėmimo instrumentu (Bigrass). Atliekant citologinį tokio tepinėlio tyrimą išvadoje tenka rašyti, kad tepinėlis netinkamas citologiškai tirti arba kad ląstelės yra neapibrėžtų kategorijų (ASC, ASC-H). Ieškant būdų, kaip patobulinti citologinį gimdos kaklelio tyrimą (Pap testą) pirmiausia buvo pradėtos kurti sistemos, automatiškai atliekančios citologinius gimdos kaklelio tepinėlio tyrimus.

Kuriant automatinės analizės sistemas buvo sukurtas gimdos kaklelio ląstelių fiksacijos ir transportavimo skystosiose terpėse būdas. Iš skystosiose terpėse fiksuotų ląstelių paruošti preparatai yra vienasluoksniai, leidžia matyti kokybišką mikroskopinį ląstelių vaizdą, neturi priemaišų, tad puikiai tinka citologiniam tyrimui atlikti. Paaiškėjo, kad efektyviau tokius preparatus ištiria žmonės nei automatinės analizės aparatai. Reikia pabrėžti, kad preparatai, paruošti iš ląstelių, fiksuotų skystosiose terpėse, pasižymi mažu netinkamų, neapibrėžtų kategorijų (ASC, ASC-H) ląstelių procentu, leidžia aptikti 18% ir daugiau HSIL atvejų (6). Netrukus buvo sukurta nemažai automatinių sistemų vienasluoksniams gimdos kaklelio ląstelių preparatams ruošti citologiniam tyrimui. Remdamasi naujų technologijų, naudojamų paruošti preparatus iš gimdos kaklelio citologinės medžiagos mokslinių tyrimų rezultatais, 1996 m. JAV vaistų ir maisto kontrolės tarnyba patvirtino citologinių tyrimų preparatų ruošimo iš ląstelių, fiksuotų skystoje terpėje, membraninės filtracijos būdą, kuriuo pagrįsta ThinPrep™ (Cytoc corporation, Boxborough, MA) sistema, vėliau, 1999 m., patvirtino SurePath™ sistemą (BD TriPath Imaging, Burlington, NC). Naujų sistemų kaštų ir naudos analizė parodė, kad yra kokybiškų pigesnių alternatyvių sistemų, kurios jau daugelį metų efektyviai naudojamos dalyje Centrinės Europos laboratorijų. Viena jų PapSpin™ (ThermoShandon Inc, Pittsburg, USA) – citocentrifugavimo principu paremta citologinė sistema, kuri jau daugiau nei 50 metų yra siejama su geros laboratorinės praktikos reikalavimais. Pagal šią technologiją paruošti preparatai pasižymi gera kokybe (7,8,9,10), tačiau trūksta mokslinių tyrimų, kurie leistų įvertinti šios centrifugavimo paremtos sistemos diagnostinį efektyvumą. Ir ją taikyti gimdos kaklelio citologinių tyrimų srityje.

1.2 Darbo aktualumas ir reikšmė

Lietuvoje sergamumas gimdos kaklelio vėžiu didžiausias Baltijos šalių regione ir antroje vietoje Rytų Europoje po Rumunijos. 2004 m. liepos mėn. Lietuvoje buvo pradėta Atrankinės patikros dėl gimdos kaklelio patologijos

programa, kurioje naudojamas testas - įprastinis gimdos kaklelio tepinėlio tyrimas.

Citologinio tepinėlio tyrimas nėra tobulas, jam būdingi klaidingai neigiami ir klaidingai teigiami tyrimo rezultatai, didelis netinkamų ir neapibrėžtų diagnostinių kategorijų kiekis. Tepinėlio tyrimui būdingi trūkumai pasireiškia ir Lietuvoje vykdant gimdos kaklelio patikros programą. VLK „Sveidros“ informacinės sistemos duomenimis, tiriant tepinėlius konstatuojamas didelis 5-12% netinkamų tepinėlių kiekis, didelis neapibrėžtų ASC/ASC-H diagnozių procentas, nepakankamai aptinkama HSIL atvejų. Nepakankama tepinėlio kokybė verčia mus ieškoti efektyvesnių gimdos kaklelio ląstelių tyrimo būdų, o kaštų-naudos analizė pigesnių, tačiau kokybiškų alternatyvų. Mums atsirado galimybė palyginti įprastinio ir *Shandon PapSpin* sistema iš skystosiose terpėse fiksuotos gimdos kaklelio medžiagos paruoštų preparatų tyrimų efektyvumą. Tyrinėsime minėtos sistemos naujesnį variantą –*Shandon PapSpin* sistema. Mūsų atiktas darbas leis įvertinti šios privalumus, jos diagnostinį efektyvumą ir palyginti jį su įprastinio tepinėlio tyrimo diagnostiniu efektyvumu. Šis darbas leis efektyviau pritaikyti citologinio centrifugavimo sistemas atliekant gimdos kaklelio citologinius tyrimus ir pagerinti gimdos kaklelio ikivėžinių pakitimų diagnostiką.

1.3 Darbo tikslas

Įvertinti skystojoje terpėje fiksuotų gimdos kaklelio ląstelių preparatų, paruoštų naudojant *Shandon PapSpin*TM sistema, citologinio tyrimo efektyvumą diagnozuojant gimdos kaklelio ikinavikinę patologiją.

1.4 Darbo uždaviniai:

1. Naudojant dalytą* (*angl.* split-sample) gimdos kaklelio medžiagą, išanalizuoti gimdos kaklelio tepinėlio citologinio tyrimo (Pap testo) ir

skystojoje terpėje fiksuotų gimdos kaklelio ląstelių preparatų, paruoštų naudojant Shandon Papspin™ sistemą, citologinio tyrimo informatyvumą bei palyginti jų rezultatus su atitinkamais histologinio tyrimo rezultatais.

2. Naudojant nedalytą* (*angl.* direct –to-vial) gimdos kaklelio medžiagą išanalizuoti ir palyginti skystojoje terpėje fiksuotų gimdos kaklelio ląstelių preparatų, paruoštų naudojant Shandon Papspin™ sistemą, citologinio tyrimo rezultatus su atitinkamais histologinio tyrimo rezultatais.
3. Palyginti nedalytos gimdos kaklelio medžiagos citologinio tyrimo naudojant Shandon Papspin™ sistemą informatyvumą su gimdos kaklelio tepinėlio citologinio tyrimo informatyvumu.
4. Įvertinti likusios po citologinio tyrimo skystosios terpės tinkamumą nustatyti ŽPV PGR metodu.

Dalyta medžiaga*- *angl.* split sample

Nedalyta medžiaga*- *angl.* direct-to-vial

1.5 Darbo naujumas

Pirmą kartą Lietuvoje mes įvertinome Shandon PapSpin™ sistema paruoštų preparatų tyrimo jautrumą, specifiškumą, teigiamas ir neigiamas tyrimo prognozes vertes, netinkamų ir neapibrėžtų diagnozių procentą, kai tiriama dalyta ir nedalyta gimdos kaklelio medžiaga, ir palyginome su įprastinio tepinėlio rezultatais. Sukūrėme skystosiose terpėse fiksuotos gimdos kaklelio medžiagos ir įprastinio (Pap) gimdos kaklelio tepinėlio ištyrimo metodiką. Taip pat įvertinome likusios po citologinio tyrimo skystosios terpės tinkamumą ŽPV nustatyti PGR metodu. Taip pat vadovaudamiesi sukaupta patirtimi

įdiegėme pasaulinėje praktikoje plačiai naudojamą ir pripažintą skystosiose terpėse fiksuotos gimdos kaklelio medžiagos tyrimo metodą.

1.6 Ginamieji teiginiai

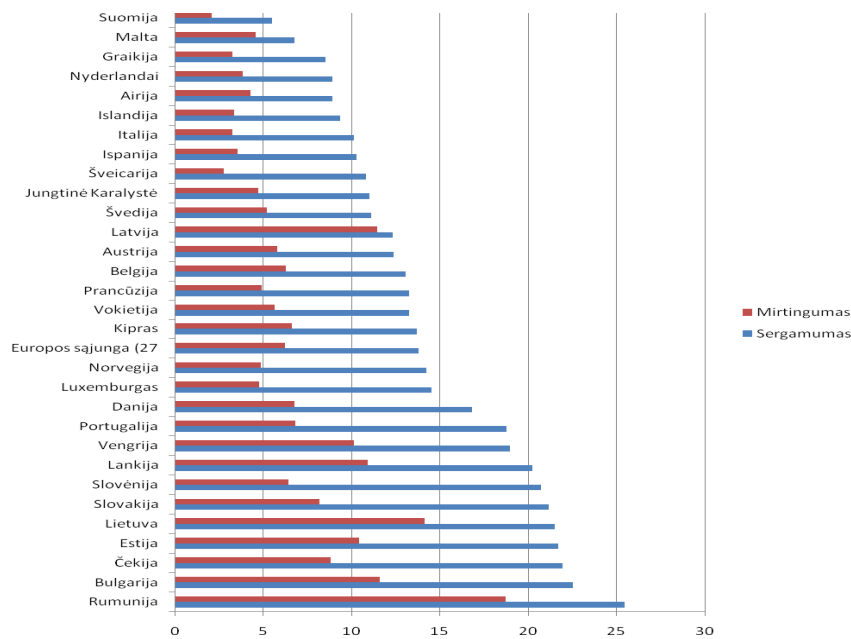
1. Skystojoje terpėje fiksuotų gimdos kaklelio ląstelių preparatų, paruoštų naudojant Shandon PapSpin™ sistemą, citologinio tyrimo efektyvumas yra didesnis nei įprastinio (PAP) tepinėlio citologinio tyrimo.
2. Skystoji terpė, likusi po citologinio tyrimo, mažiau tinka ŽPV nustatyti naudojant PGR metodiką nei nefiksuota gimdos kaklelio medžiaga.

2. Literatūros apžvalga

2.1 Gimdos kaklelio vėžio epidemiologija

Vėžys yra dažna vyresnio amžiaus žmonių liga, bet gimdos kaklelio vėžiu serga jauno 35–50 metų amžiaus moterys, kurios aktyviai rūpinasi savo šeima (1). Gimdos kaklelio vėžys yra antroji pagal dažnumą vėžio lokalizacija (po pirmaujančio krūties vėžio) pasaulyje ir trečioje vietoje Europoje (po pirmaujančio krūties ir antroje vietoje esančio plaučių vėžio), tarp moterų onkologinių ligų. 80% gimdos kaklelio vėžio užregistruojama ekonomiškai silpnose pasaulio šalyse (1). Plokščialąstelinė gimdos kaklelio karcinoma – dažniausia histologinė gimdos kaklelio vėžio forma. 2004 m. Tarptautinė kovos su vėžiu draugija (IARC) paskelbė duomenis, kad kasmet 27 Europos valstybėse diagnozuojama 34 300 moterų, sergančių gimdos kaklelio vėžiu, 2006 m. 16300 moterų mirė nuo šios ligos. Atskirose Europos Sąjungos šalyse mirtingumas nuo gimdos kaklelio vėžio labai skiriasi (1 pav.).

1 pav. Sergamumas ir mirtingumas nuo gimdos kaklelio vėžio Europos Sąjungos šalyse 2006 m. Standartizuotas rodiklis 100 000 gyventojų



Europos Sąjungoje didžiausias mirtingumas nuo gimdos kaklelio vėžio Rumunijoje, Lietuvoje, Bulgarijoje, Latvijoje, Lenkijoje ir Estijoje (standartizuotas mirtingumo rodiklis nuo 18,7 iki 10,4/100 000 atv./per metus) ir mažiausias Suomijoje – 1,6 atv. /100 000 per metus (11).

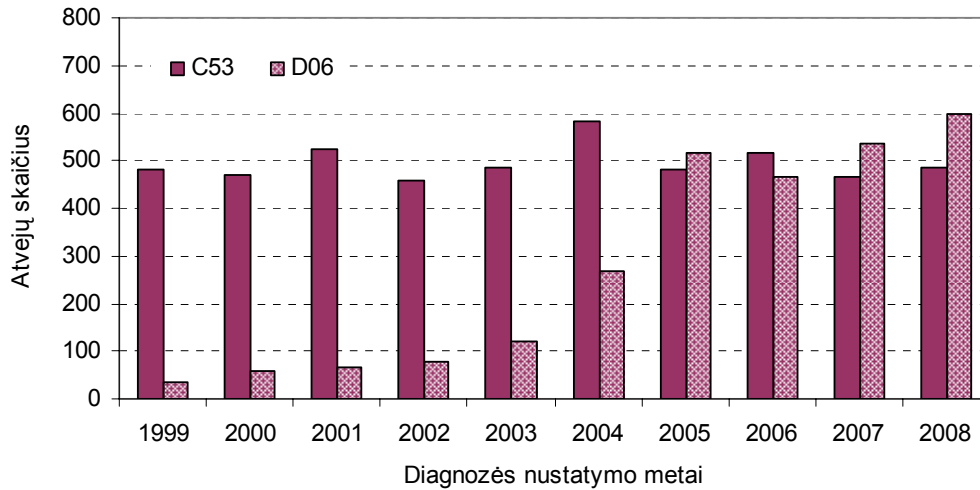
Didelis sergamumas gimdos kaklelio vėžiu būdingas naujai į Europos Sąjungą įstojusiose šalyse, išskyrus Malta. Didžiausias sergamumas registruojamas Rumunijoje, Bulgarijoje, Čekijoje, Slovėnijoje, Slovakijoje, Lietuvoje, Estijoje (20,7-25,5/100 000 atv./per metus).

Mažiausiais sergamumas gimdos kaklelio vėžiu Europos Sąjungos šalyse registruojamas Suomijoje, Airijoje, Nyderlanduose, Airijoje ir Islandijoje (<9,4 /100 000 atv./per metus). Tiek sergamumas gimdos kaklelio vėžiu, tiek ir

mirtingumas nuo jo Lietuvoje yra didžiausias tarp Šiaurės Europos šalių ir Baltijos jūros regione.

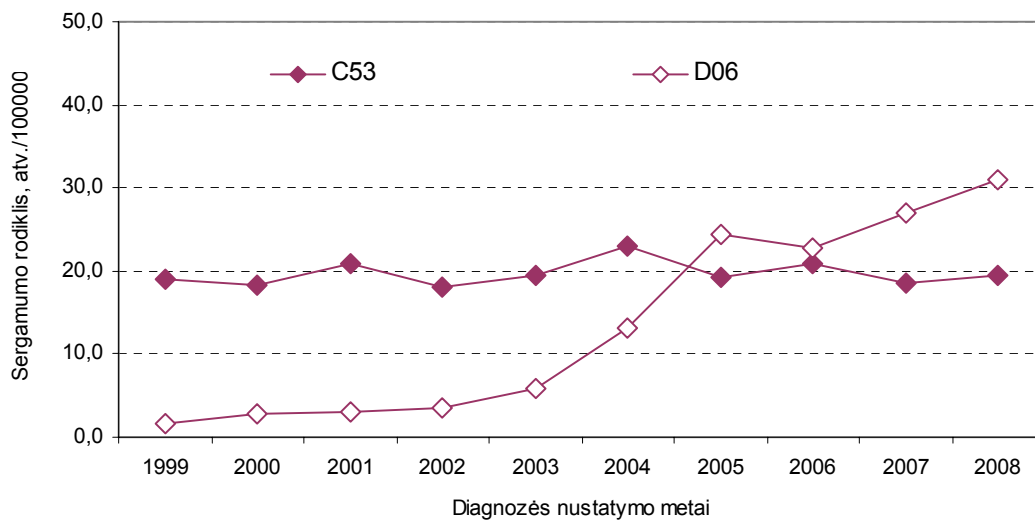
Lietuvoje sergamumas gimdos kaklelio vėžiu, kaip ir daugelyje kitų šalių, 1964–1988 metais mažėjo dėl visuotinio sveikų moterų tikrinimo (12). Sergamumo pokyčių skirtumai nustatyti tarp skirtingo amžiaus moterų 1983–1997 metų laikotarpiu - sergamumas reikšmingai mažėjo tarp 50–64 metų moterų, o jaunų (30–49 metų) moterų sergamumas didėjo (12). Didėjant jaunų moterų sergamumui didėjo ir bendri sergamumo gimdos kaklelio vėžiu rodikliai. 1998–1999 metais Lietuvoje sergamumas gimdos kaklelio vėžiu buvo 17,4 atv./100 000 moterų (13,14). 1999-2008 metais buvo diagnozuota 4951 invazinio gimdos kaklelio vėžio atvejis ir 2743 CIN3/karcinomos *in situ* (CIN3/ CIS sudarė 35,7 proc. visų gimdos kaklelio navikų) atvejai. Naujai diagnozuotų atvejų skaičiaus pokyčiai pateikiami 2 paveiksle. 2004 metais pradėjus vykdyti Atrankinės patikros dėl gimdos kaklelio patologijos programą ženkliai padidėjo naujai nustatytų gimdos kaklelio vėžio atvejų skaičius, o 2005-2008 metais CIN3/CIS atvejų skaičius pralenkė invazinio vėžio atvejų skaičių. Nuo 1999 iki 2008 metų invazinio gimdos kaklelio vėžio atvejų skaičius liko nepakitęs, o moterų skaičius Lietuvoje sumažėjo beveik 84 tūkstančiais.

2 pav. Gimdos kaklelio vėžio ir CIN3/CIS atvejų skaičiaus pokyčiai Lietuvoje 1999-2008 metais



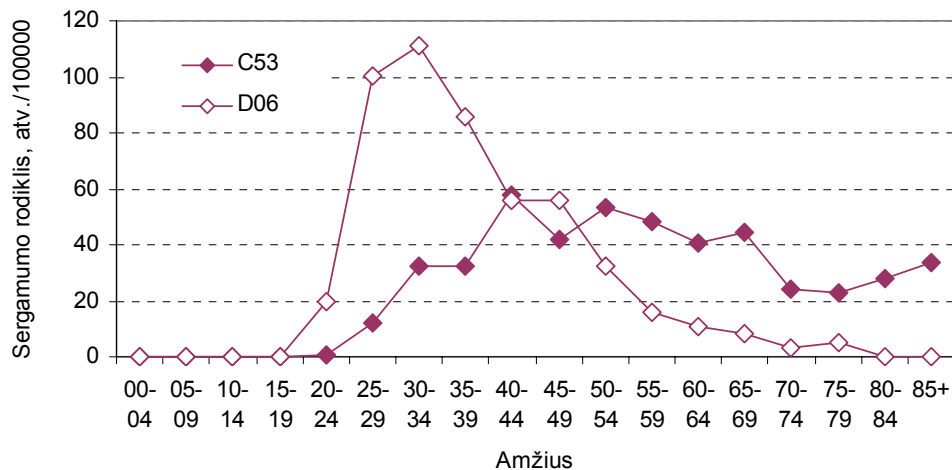
Standartizuotas sergamumo gimdos kaklelio vėžiu rodiklis nuo 19,0 atv./100000 (95 proc. PI 17,3-20,8) 1998 metais dešimties metų laikotarpiu išliko nepakitęs – 2008 metais sergamumo rodiklis buvo 19,5 atv./ 100000 (95 proc. PI 17,5-21,3). Didžiausias sergamumas nustatytas 2004 metais – 23,1 atv./100000 (95 proc. PI 21,1-25,0). Tačiau sergamumas CIN3/CIS pakito gana ženkliai – nuo 1,7 atv./100000 (95 proc. PI 1,1-2,2) iki 31,1 atv./100000 (95 proc. PI 28,6-33,6) (3 pav.)

3 pav. Sergamumo gimdos kaklelio vėžiu ir CIN3/CIS pokyčiai Lietuvoje 1999-2008 metais



4 paveiksle pateikiami sergamumo rodikliai 2008 metais amžiaus grupėse. 25-29 metų amžiaus grupėje 2008 metais nustatyti vieni didžiausių sergamumo CIN3/CIS rodikliai.

4 pav. Sergamumo rodikliai 2008 metais amžiaus grupėse



Išnagrinėjus sergamumo gimdos kaklelio vėžiu ir CIN3/CIS pokyčius Lietuvoje 1999-2008 metais pagal stadijas, nustatytas sergamumo CIN3/CIS didėjimas (3 pav). Pastarosios patologijos rodikliai didėjo po 34,4 proc. kasmet, vertinant visų amžiaus grupių moterų sergamumą, po 33,7 proc. 25-59 metų amžiaus grupėje ir po 26,4 proc. 60 ir daugiau metų amžiaus grupėje. Sergamumo invaziniu vėžiu rodikliai reikšmingai nagrinėtu laikotarpiu nekito patikros grupėje ir visose amžiaus grupėse. Patikros grupėje nustatytas statistiškai reikšmingas sergamumo I stadijos gimdos kaklelio vėžiu didėjimas (po 11,1 proc. kasmet) ir sergamumo II stadijos vėžiu mažėjimas (po -7,2 proc. kasmet). Kiti sergamumo pokyčiai pagal stadijas nereikšmingi, t.y. sergamumo III ir IV stadijos vėžiu mažėjimo nebuvo. 60 metų ir vyresnio amžiaus moterų, kurios nedalyvavo patikros programoje, I stadijos gimdos kaklelio vėžiu sergamumas didėjo, II, III ir IV stadijų gimdos kaklelio vėžiu mažėjo (po -4,9 proc., -3,1 proc. ir -9,4 proc.) kasmet atitinkamai.

2.2 Gimdos kaklelio atrankinės patikros programų įtaka gimdos kaklelio vėžio epidemiologijai

Daugiau nei 60 metų citologinis gimdos kaklelio tepinėlis buvo naudojamas nustatyti ikivėžiniams gimdos kaklelio pakitimams ar anktyvajam gimdos kaklelio vėžiui moterims, kurioms nepasireiškia simptomai. Tyrimo metu nuo gimdos kaklelio paviršiaus paimtos patologinės ląstelės apžiūrint jas mikroskopu pasižymėjo specifine morfologija, tai leido jas identifikuoti ir priskirti ikivėžiniams pakitimams. Priklausomai nuo nustatyto ląstelių pažeidimo laipsnio moteris buvo stebima ar gydoma. Pagrindinis atrankinės gimdos kaklelio patikros tikslas sumažinti mirtingumą nuo šios ligos. Sergamumo sumažėjimas nuo invazinio gimdos kaklelio vėžio taip pat yra atrankinės patikros programos tikslas. Šiuo metu yra įrodyta, kad organizuotos atrankinės gimdos kaklelio patikros sumažina sergamumą ir mirtingumą nuo šios ligos (11).

Organizuotos atrankinės gimdos kaklelio patikros programos, paremtos periodišku sveikų moterų tikrinimu kas trejus ar penkerius metus gali sumažinti sergamumą gimdos kaklelio vėžiu 80% (11), taip pat sergamumą galima sumažinti šalyse, vykdant ne taip gerai organizuotas ar oportunistines atrankinės gimdos kaklelio patikros programas, tačiau šiuo atveju sergamumo sumažėjimas nebus toks efektyvus–10-60% (11). Oportunistinei gimdos kaklelio patikrai būdingas mažas pasitikrinusių moterų aktyvumas dėl kvietimų sistemos nebuvimo. Ši patikra pasižymi dideliu savaimė motyvuotų moterų, priklausančių tam tikriems populiacijos segmentams, apsilankymų skaičiumi, jos yra aktyvios ir tikrinasi intensyviai, kartu egzistuojant ir kitoms mažai patikrintoms socioekonominėms grupėms, dėl ko bendras programos efektyvumas yra mažas (11). Gerai organizuota atrankinė gimdos kaklelio patikros programa vykdoma tik keliose šalyse: Skandinavijoje, Jungtinėje Karalystėje, Nyderlanduose ir dalyje Italijos provincijų (15). Kitose šalyse atrankinė patikra yra oportunistinė, jos rezultatai priklauso nuo moterų ar gydytojų aktyvumo.

Europos šalyse sergamumas gimdos kaklelio vėžiu skirtingas. Galime pastebėti, jog ten, kur jau seniai buvo pradėta atrankinės patikros programa ir pripažįstamas jos taikymo veiksmingumas, mirtingumas dėl šio piktybinio naviko sparčiai mažėjo. Pvz., atrankinis moterų patikrinimas dėl gimdos kaklelio patologijos Šiaurės šalyse (Suomijoje, Švedijoje, Islandijoje) pradėtas vykdyti daugiau kaip prieš 30 metų. Šiose šalyse 30-54 metų amžiaus moterys buvo kviečiamos į patikrą kas treji penkeri metai, joms buvo atliekamas citologinis gimdos kaklelio tepinėlio tyrimas. 1960 metų viduryje mirtingumo sumažėjimas buvo akivaizdus, o iki 1990 metų jis nuo 7atv./100 000 moterų sumažėjo iki 1,2atv./100 000 moterų(16). Jungtinėje Karalystėje visuotinė gimdos kaklelio patikra buvo pradėta 1960 metais, tačiau organizuotai kviešti moteris tikrintis telefonu pradėta nuo 1988 m. Oportunistinės patikros metu sergamumas ir mirtingumas mažėdavo 1-2% per metus, pradėjus moteris į patikrą kviešti sistemingai šie rodikliai sumažėdavo 7% kas metai (11).

JAV pirmosios gimdos kaklelio patikros centrai buvo įkurti 1940 m. Pradėjus įgyvendinti atrankinės patikros dėl gimdos kaklelio patologijos programą, smarkiai sumažėjo mirtingumas nuo šios ligos: Britų Kolumbijoje - 72% (17), Kentukyje-70% (18). Vėliau buvo pastebėtas tiesioginis ryšys tarp patikrinimų, vykdančių atrankinės patikros programą, dažnumo ir mirtingumo sumažėjimo Pvz: Skandinavijos šalyse mirtingumo mažėjimas buvo nevienodas. Islandijoje ir Suomijoje, kur patikrinimai buvo atliekami dažniausiai, mirtingumas dėl gimdos kaklelio vėžio sumažėjo 66-80% (7atv./100 000 iki 1,2atv./100 000). Norvegijoje, kur patikrinimų dažnis buvo mažiausias, mirtingumas sumažėjo 10% (15). Danijoje moters rizika susirgti gimdos kaklelio vėžiu mažėjo priklausomai nuo jai atliktų tepinėlių, kurių tyrimo rezultatas neigiamas, skaičiaus. Vienas Pap tyrimas riziką susirgti gimdos kaklelio vėžiu mažino 48%, 2-4 - 69%, 5 ir daugiau -100% (19).

Įvairiose šalyse intervalai tarp patikrinimų yra skirtingi. Amerikos kovos su vėžiu draugija (*angl.*American Cancer Society) rekomenduoja:

- Gimdos kaklelio patikrinimai dėl vėžio yra pradami po 3 metų nuo lytinių santykių pradžios, bet ne vėliau kaip nuo 21 metų amžiaus.
- Įprastinis Pap tepinėlis moterims atliekamas kiekvienais metais. Skystojoje terpėje fiksuotos citologinės gimdos kaklelio medžiagos Pap tyrimas (*angl.* liquid-based Pap test) - kas dveji metai. 30m. ir vyresnės moterys, kurių trys paeilui Pap tyrimai buvo normalūs, gali tikrintis kas 2-3 metai. Dažniau rekomenduojama tikrintis, kai moterys turi papildomų rizikos veiksnių (apsikrėtusios žmogaus imunodeficito virusu ar turi imuninės sistemos sutrikimų).
- 70m. ir vyresnio amžiaus moterys gali nesitikrinti, kai 10 m. laikotarpiu buvo trys ir daugiau neigiami tepinėliai.
- Moterys, kurių pašalinta gimda ir gimdos kaklelis, Pap tyrimo gali neatlikinėti, išskyrus tuos atvejus, kai gimdos kaklelis buvo pašalintas dėl ikinavikinių ar navikinių pakitimų. Pašalinus tik gimdą, patikros dėl gimdos kaklelio vėžio užbaigiamos ne anksčiau kaip sulaukus 70m.

2.3 Gimdos kaklelio histologijos įpatumai

Gimdos kaklelio kanalas (endocervikinis kanalas) prasideda išorinėmis žiotimis ir baigiasi vidinėmis žiotimis (*external os vs internal os*). Gimdos kaklelio sritis, pereinanti į makštį, yra vadinama makštine gimdos kaklelio dalimi ar egzocerviksu. Makšties skliautas apsupa išorinę gimdos kaklelio dalį. Vidinė gimdos kaklelio sritis pereina į istminę gimdos kūno sritį ir vadinama endocerviksu. Sritis, kurioje susijungia endocerviksu ir egzocerviksu yra vadinama pasikeitimo ar transformacijos zona.

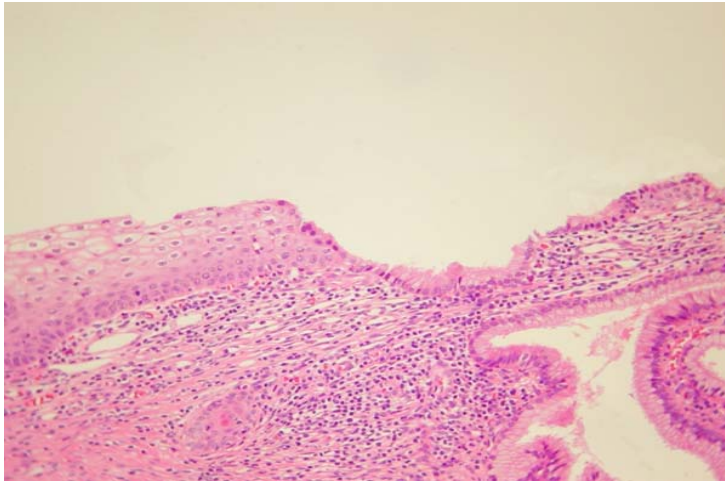
Išorinė egzocervikinė gimdos kaklelio dalis yra išklota daugiasluoksniu neragėjančiu plokščiuoju epiteliumi, kurio brendimą skatina estrogenai. Epitelis nuo gimdos kaklelio stromos yra atskirtas plona jungiamojo audinio juostele – bazine membrana. Daugiasluoksnis plokščiasis epitelis sudarytas iš keturių

ląstelių sluoksnių: parabazinio, bazinio, tarpinio ir paviršinio. Paviršinės plokščiojo epitelio ląstelės labiausiai subrendusios. Jos yra didelės, daugiakampės (poligonalinės) formos su skaidria rožine ar žalia citoplazma. Parabazinės ir bazinės plokščiojo epitelio ląstelės yra nebrandžios. Jos turi stambų apvalų, ovalų branduolį ir negausų citoplazmos kiekį. Bazinės ląstelės pasižymi savybėmis, būdingomis germinatyvinės ir polipotencinėms ląstelėms, iš jų atsinaujina plokščiasis epitelis, esant pažeidimui jos gali regeneruoti ar metaplazuoti.

Vidinė gimdos kaklelio dalis yra išklota liaukiniu epitelium, kurį sudaro vienos eilės gleivės (muciną) sekretuojančios stulpinės ląstelės. Liaukinis epitelis 5mm gylyje įlinksta į gimdos kaklelio stromą ir formuoja endocervikines liaukas. Jos atsiveria gimdos kaklelio paviršiuje. Endocervikinė gimdos kaklelio išorė yra skiltėta ir ryškiai raudonos spalvos dėl endocervikinių liaukų ir gausaus kapiliarų tinklo po dengiamuoju epitelium, taip pat banguota dėl gaurelių, kuriuos sudaro gimdos kaklelio stromos papildinės formos išsikišimai, padengti liaukiniu epitelium. Kiekvienas gaurelis yra vaskuliarizuotas, stromoje yra limfocitų ir plazminių ląstelių. Gimdos kaklelio kanale gausu gleivių, kurios išsiskiria iš kaklelio kanalo. Gleivės atlieka makštyje lubrikanto vaidmenį.

Jau apie 50 metų mokslininkus domino transformacijos zonos metaplazinio plokščiojo epitelio kilmė, nes buvo įrodyta, kad čia pradeda vystytis ikivėžiniai gimdos kaklelio pakitimai. Transformacijos ar pasikeitimo zona – tai gimdos kaklelio sritis (5 pav.), kurioje susiduria endocervikinis ir plokščiasis epiteliai. Šią zoną gali iškloti keletas epitelio tipų: nebrandus metaplazinis epitelis, brandus metaplazinis epitelis ir liaukinis cilindrinis epitelis. Weikel ir kt. įrodė kad epitelis išsivysto iš rezervinių ląstelių, esančių po liaukinėmis ląstelėmis (20). Imunohistocheminiais ir gelio elektroforezės metodais jie nustatė identiškus keratinus rezervinėse ir liaukinėse ląstelėse, bet ne vimentiną, ir paneigė hipotezę, kad rezervinės ląstelės yra kilusios iš epitelio, o ne iš stromos.

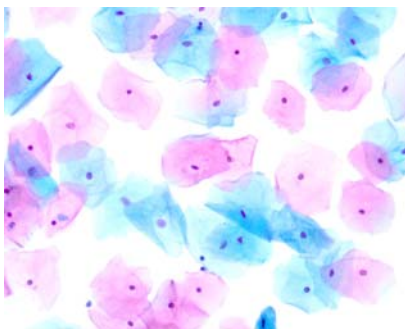
5 pav. Gimdos kaklelio transformacijos zona. H&E x 400



2.4 Radiniai Pap tepinėlyje

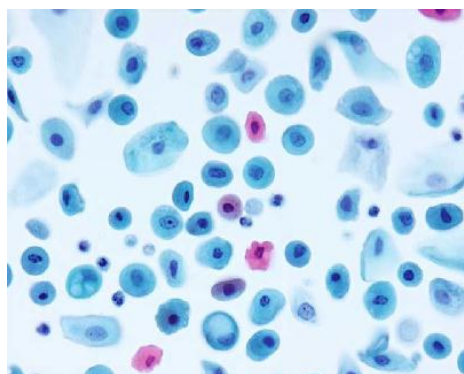
Išorinė - egzocervikinė gimdos kaklelio dalis yra išklota daugiasluoksniu ragėjančiu plokščiuoju epitelium, kurio brendimą skatina estrogenai. Paviršinės plokščiojo epitelio ląstelės subrendusios labiausiai. Jos turi smulkų 5-6 μm dydžio piknotišką branduolį. Tarpinės plokščiojo epitelio ląstelės turi didesnę nei paviršinės 8 μm dydžio nepiknotišką branduolį, kurio chromatinas smulkus, tolygiai grūdėtas. Paviršinės ir tarpinės ląstelės yra didelės, poligonalinės formos su skaidria rožine ar žalia citoplazma (6 pav.).

6 pav. Paviršinės plokščiojo epitelio ląstelės. Papanicolaou dažymo metodas. x 400



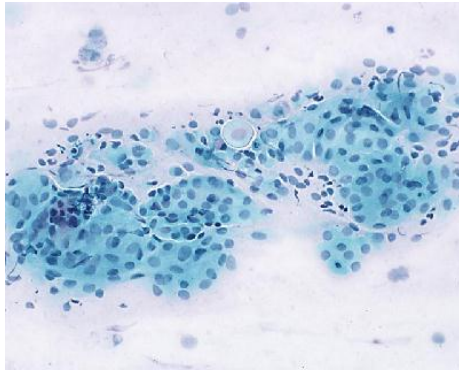
Parabazinės ir bazinės ląstelės yra nebrandžios plokščiojo epitelio ląstelės. Pap tepinėliuose jos retai aptinkamos, nes yra giliuosiuose epitelio sluoksniuose, o citologiniam tyrimui dažniausiai paimamos viršutinių sluoksnių ląstelės. Specialios organizmo būklės, kai nepakanka estrogenų (pomenopauzė, pogrindyminis periodas), sąlygoja nebrandaus epitelio formavimąsi iš parabazinių ir bazinių ląstelių. Tokiomis sąlygomis visas epitelio sluoksnis susiformavęs iš nebrandžių “parabazinių” ir “bazinių” ląstelių ir citologinio tyrimo metu matoma daug šių “giliųjų sluoksnių ląstelių”. Parabazinės ląstelės turi apvalius, ovalius, nevienodo dydžio branduolius, kurie didesni už tarpinių ląstelių branduolius (7 pav.).

7 pav. Parabazinės plokščiojo epitelio ląstelės. Papanicolaou dažymo metodas. x 400



Bazinės ląstelės yra mažiausios, jose negausu citoplazmos. Pomenopauzinio amžiaus moterų gimdos kaklelio tepinėliuose bazinės ir parabazinės ląstelės vyrauja dėl atrofijos. Visiškos atrofijos atveju gimdos kaklelio tepinėliuose aptinkama tik parabazinių ir bazinių ląstelių tankių klodų, paviršinių ir tarpinių plokščiojo epitelio ląstelių juose nėra. Giliųjų sluoksnių ląstelės dengia viena kitą ir sudaro specifines „syncytia“ tipo struktūras (8 pav.).

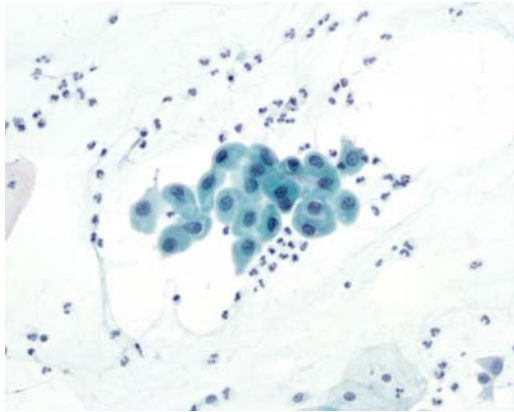
8 pav. Giliųjų sluoksnių ląstelių „syncytia“ tipo struktūros. Papanicolaou dažymo metodas. x 400



Atrofinio tipo epitelio ląstelių chromatinas yra tolygus, smulkiai grūdėtas, branduolio kontūrai lygūs ir ploni. Atrofiniame epitelyje kartais matoma ląstelių degeneracijos požymių. Atrofinio tipo epitelio ląstelės dažnai patiria džiūvimo ore artefaktus. Tokių ląstelių branduoliai apgaulingai padidėja. Pap tepinėliuose, rodančiuose atrofiją, gali būti tamsios, apvalios, amorfinės masės „mėlyni gumulėliai“, kurie yra kondensuoti gleivių kamuoliai ar degeneravę ląstelių branduoliai ir grūdėtas Pap tepinėlio fonas.

Gimdos kaklelio plokščialąstelinė metaplazija (*metaplasia* - vienos audinio rūšies virtimas kitu, dažnai mažiau specializuotu) dažnas endocervikinės /transformacijos zonos pakitimas, būdingas moterims, kurių plokščiojo epitelio branda gera. Veikiamas daugelio faktorių endocervikinės transformacijos zonos liaukinis epitelis pakeičiamas daugiasluoksniu plokščiuoju epiteliumi iš germinatyvinių ar giliųjų sluoksnių ląstelių. Šis epitelis iškloja endocervikines liaukas. Skiriama brandi ir nebrandi plokščialąstelinė metaplazija. Citologinio tyrimo metu galima nustatyti tik nebrandžią plokščialąstelinę metaplaziją, kuriai esant būdingos nebrandžios parabazinių plokščiojo epitelio ląstelės (9 pav.).

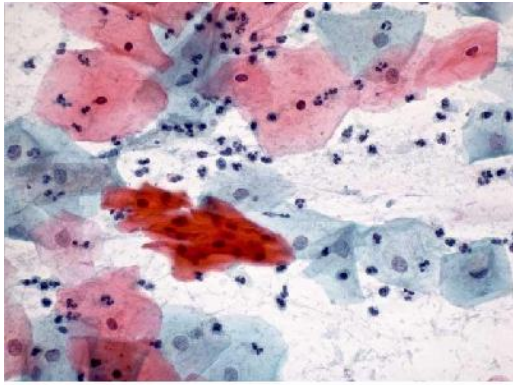
9 pav. Ląstelės esant plokščialąstelinei metaplazijai. Papanicolaou dažymo metodas. x 400



Brandžios metaplazijos požymis - subrendęs epitelis, kuris gali būti atskiriamas nuo normalaus plokščiojo epitelio tik histologinio tyrimo metu. Nebrandžios plokščialąstelinės metaplazijos atveju citologiniuose tepinėliuose matomi plokšti epitelio klodai, sudaryti iš nebrandžių (parabazinių) ląstelių, atrodančių kaip „grindinys“. Parabazinių ląstelių branduoliai yra šiek tiek hiperchromiški, branduolio kontūras netaisyklingas. Branduoliai šiek tiek skiriasi dydžiu.

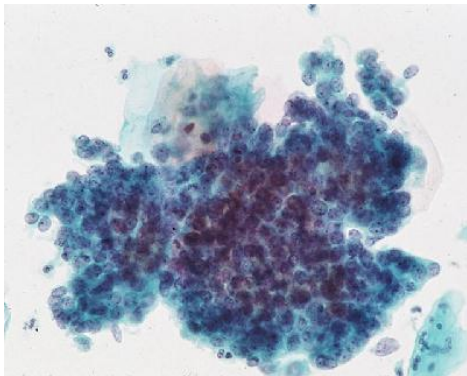
Hiperkeratozė ir parakeratozė yra normalus plokščiojo epitelio ląstelių pakitimas, sąlygotas lėtinio gleivinės dirginimo. Bebranduolės, subrendusios, poligonalinės ląstelės tepinėliuose būdingos hiperkeratozei. Jos gali būti labai gausios arba retos ir sudaryti kompaktiškas plokšteles. Tai gerybiškai pakitusios ląstelės ir tie pakitimai nesusiję su epitelio patologija. Bebranduolės, suragėjusios ląstelės į gimdos kaklelio citologinius tepinėlius gali patekti iš makšties ar nuo pirštų odos asmens, kuris liečia Pap tepinėlį. Parakeratozė yra gerybinis ląstelių atsakas į lėtinį uždegimą. Citologiškai parakeratozė pasireiškia mažomis suragėjusiomis ląstelėmis su ryškiai oranžine citoplazma ir smulkiu piknotišku ląstelės branduoliu (10 pav.).

10 pav. Parakeratotinės plokščiojo epitelio ląstelės. Papanicolaou dažymo metodas. x400



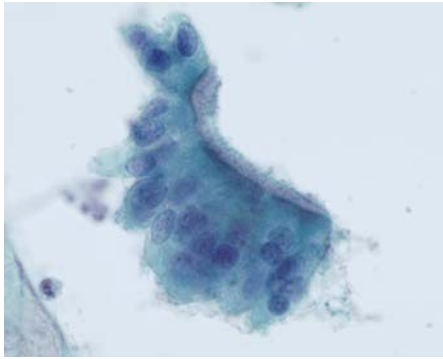
Vidinė gimdos kaklelio dalis yra išklota muciną sekretuojančiomis ląstelėmis su ekscentriškais tolygaus chromatino branduoliais ir gausia vakuolizuota citoplazma. Branduolėliai yra labai smulkūs ir padidėja uždegimo metu. Dažniausiai endocervikinės ląstelės išsidėsčiusios juostelėmis ar klodais. Ląstelių juostelės primena tvorelę, o klodai bičių korį - dėl aiškių citoplazmos membranų ir tolygiai išsidėsčiusių ląstelių (11 pav.). Retkarčiais gali pasitaikyti mitozų.

11 pav. Endocervikinės liaukinės ląstelės. Papanicolaou dažymo metodas. x 400



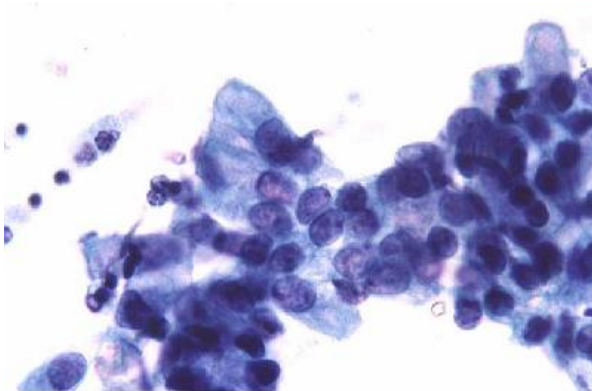
Tubinė metaplazija yra gerybinis endocervikinio epitelio pakitimas (12 pav.). Mokslinių tyrimų duomenimis, 30% konusinės biopsijos ir histerektominės medžiagos aptinkama tubinė metaplazija.

12 pav. Tubinė metaplazija. Papanicolaou dažymo metodas. x 400

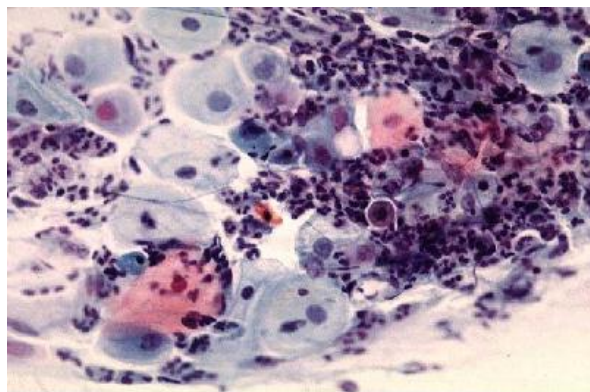


Apatinio gimdos kūno segmento endometriumo ląstelės. Tepinėliuose jos matomos tuomet, kai šepetėliu paimama medžiagos iš endometriumo ar apatinio gimdos kūno segmento. Tai atsitinka dėl trumpo endocervikinio kanalo ar po konusinės biopsijos. Joms būdinga: stambūs ir smulkūs audinio fragmentai, liaukos ir stroma (stromos ląstelės ovalios ar pailgos formos, tolygiai pasiskirstęs branduolių chromatinas, retos mitozės, kapiliarai stambiuose audinių fragmentuose), stromos liaukos (tubulinės, vingiuotos ar šakotos, ryškus branduolių sutapimas ir negausi citoplazma). Specifiškiausias apatinio gimdos kūno segmento požymis – tai gleivinės fragmentas, stroma kartu su liaukomis, kurios gali būti ir atskiros (13 pav.). Apatinio gimdos kūno segmento ląstelės primena endocervikines ląsteles, tik jų branduolio /citoplazmos dydžio santykis didesnis ir ląstelės labiau hiperchromiškos ir mitotiškai aktyvesnės.

13 pav. Apatinio gimdos kūno segmento endometriumo ląstelės. Papnicolaou dažymo metodas. x 400



Uždegimo ląstelės **neutrofiliniai leukocitai** matomi visuose gimdos kaklelio citologiniuose tepinėliuose (14 pav.). Padidėjęs jų kiekis susijęs su infekcija ar pažeidimu. Limfocitai ir plazminės ląstelės yra retos, o didesnis jų kiekis aptinkamas, kai moterys vyresnio amžiaus. Ši būklė vadinama folikuliniu cervicitu ir susijusi su limfoidinių folikulų formavimusi. Histiocitai - tai nespecifinis radinys ir klinikiniu požiūriu yra nereikšmingi.



14 pav. Uždegimo ląstelės. Papanicolaou dažymo metodas. x 400

Laktobacilų aptinkama makštyje, tai lazdelės formos bakterijos. Dažant Papanicolaou būdu jos nusidažo tamsiai mėlyna spalva. Jos metabolizuoja glikogeną iš subrendusių plokščiojo epitelio ląstelių, kurio daugiausia tarpinėse ląstelėse, sukelia ląstelių citolizę, kuri yra matoma citologiniuose tepinėliuose. Ląstelių citoplazma tuomet yra apirusi, matyti tik nuogi, dažnai tarpinių ląstelių branduoliai. Citolizė diagnostinių sunkumų sukelia tuomet, kai reikia objektyviai įvertinti branduolio/citoplazmos santykį plokščialąstelių intraepitelinių pakitimų atveju.

2.5 Gimdos kaklelio vėžio rizikos veiksniai

2.5.1 ŽPV infekcija – kaip gimdos kaklelio vėžio rizikos veiksnys

Persistuojanti infekcija vienu iš 13 ar 16 tipo onkogeniniu žmogaus papilomos virusu yra būtinas, bet nepakankamas veiksnys gimdos kaklelio vėžiui vystytis (21). Nauji kohortinių tyrimų duomenys parodė, kad 16 tipo ŽPV sukelia didelę infekuotų gimdos kaklelio ląstelių piktybinę transformaciją (22). Pagrindinis ŽPV patekimo į organizmą kelias yra seksualinis. Gimdos kaklelio vėžys nesant ŽPV yra išimtinai retas (21). Tyrinėjant ŽPV infekciją pastaraisiais keletą metų paaiškėjo, kad ŽPV infekcija yra dažna jauno seksualiai aktyvaus amžiaus populiacijoje, infekcijos pikas būna ankstyvame reprodukciname amžiuje, infekcija yra trumpalaikė, dažnai pasireiškianti ir išnykstanti be jokių citologinių ląstelių pokyčių, bet persistuojanti to paties tipo ŽPV infekcija yra glaudžiai susijusi su gimdos kaklelio intraepiteline neoplazija. ŽPV infekcija yra dažna seksualiai aktyviems žmonėms ir paprastai išnyksta savaime. Faktoriai, kurie paskatina ŽPV infekciją transformuotis į didelio laipsnio intraepitelinius pakitimus ar vėžį, yra nepakankamai aiškūs ir ištyrinėti.

Lytiniu keliu plintantis žmogaus papilomos virusas paaiškina ryšį tarp lytinio gyvenimo ypatybių (amžius, kurio sulaukus pradedamas lytinis gyvenimas, lytinių partnerių skaičius) ir rizikos susirgti gimdos kaklelio vėžiu (23). Naudojant naujausias šiuolaikinės molekulinės biologijos technologijas ŽPV yra nustatytas beveik visuose gimdos kaklelio vėžiuose (22).

ŽPV pirmiausia buvo nustatytas pačioje plokščiojo epitelio ląstelėje. Pirmasis šias neįprastas ląsteles, kuriose yra ŽPV, 1940 m. aprašė Ayre ir pavadino „ikivėžinių ląstelių kompleksu“. Jis manė, kad šios ląstelės tiesiogiai virsta vėžiu. 1960 m. jis prabyla apie virusinę tokių ląstelių etiologiją. „Eksfoliacinės citologijos atlase“ šias ląsteles pavaizdavo ir dr. Papanicolaou ir pavadino jas „diskariotinėmis“. 1956 m. Koss ir Durfee suteikė joms koilocitų pavadinimą. „Koilos“ graikų kalba reiškia tuštumą, duobę – ji ir matoma viruso pažeistose viršutinio/tarpinio sluoksnio plokščiojo epitelio ląstelėse. Po dviejų dešimtmečių dvi nepriklausomos mokslininkų grupės įrodė „koilocitų“ ryšį su virusu (24,25). Po to buvo atlikta keliolika mokslinių darbų, kuriuose, panaudojant ultrastruktūrinius,

imunohistocheminius ir *in situ* hibridizacijos metodus, koilocituose buvo nustatytas ŽPV. Paskelbus šiuos mokslinius duomenis mokslininkų pastangos nukrypo atskirti koilocitus nuo displazijų/CIN. Po ilgų tyrimų tapo aišku, kad atskirti koilocitus nuo displazijų neįmanoma. Tuomet tyrimais buvo ieškoma ŽPV ir invazinio gimdos kaklelio vėžio ryšio. Šiuo metu nebėra abejonės, kad ŽPV lytiniu keliu plintančios infekcijos vaidmuo gimdos kaklelio vėžio patogenezėje pagrindinis (22). ŽPV teisiogiai gali daryti įtaką ląstelių dauginimosi procesams ir sukelti daugumą patologinių procesų, kurie laikui bėgant transformuojasi į vėžį (22). ŽPV poveikis ląstelėje gali būti:

- Tiesioginis ląstelės dauginimuisi
- Sukeliantis centrosomų sudvigubėjimo efektą
- Sukeliantis telomerazės reguliacijos sutrikimus

Paskutinių dešimtmečių molekulinų biologų darbai įrodė, kad viruso pažeista ląstelė tampa neoplazine, kai ŽPV DNR baltymai inaktyvuoja naviką, supresuojantį *p53* ir retinoblastomos geną, tyrėjai nustatė epidermio augimo faktoriaus, *ras* ir *myc* onkogenų pažeidimus (26,27). Alelio praradimas inaktyvuoja *p53* baltymą ir skatina ląstelių tetraploidiją ir aneuploidiją (28). Apoptozė slopinama, kai proapoptozinių baltymų raiška susilpnėjusi (29). Heterozigotiškumo praradimas leidžia daryti prielaidą, kad preneoplaziniame gimdos kaklelio epitelyje gali būti pažeisti ir kiti svarbūs naviko augimą slopinantys genai (30), taip pat gali būti pažeistos 3 chromosomos histidino triados (31). Progresuojant pakitimui aktyvinama angiogenezė ir tarpląstelinė medžiaga pažeidžiama (32):

Analizuojami ir kiti veiksniai, galintys sąlygoti gimdos kaklelio vėžį. Sąsaja tarp rūkymo ir gimdos kaklelio vėžio išaiškėjo septintame dešimtmetyje, kai buvo nustatyta koreliacija tarp sergamumo gimdos kaklelio vėžiu ir sergamumu kitais su rūkymu kaip rizikos veiksniais siejamais navikais. Kjellberg ir kt. nustatė glaudų ryšį (nepriklausomai nuo ŽPV infekcijos) tarp gimdos kaklelio intraepitelinų neoplazijų ir rūkymo (33). Deacon ir kt. įrodė ryšį tarp surūkytų cigarečių kiekio ir piktybinių gimdos kaklelio navikų (34).

2.5.2 Oraliniai kontraceptikai

Nedidelėm dozėm vartojami oraliniai kontraceptikai padidina gimdos kaklelio neoplazijų riziką. Egzistuoja stiprus ryšys tarp hormonų sąlygotos gimdos kaklelio epitelio augimo ir gimdos kaklelio neoplazijos vystymosi transformacijos zonoje (35). Oraliųjų kontraceptikų vartojimas ir hormonų koncentracijos plazmoje lygis susijęs su gimdos kaklelio intraepiteline neoplazija (36).

2.5.3 *Chlamydia trachomatis* infekcija

Ryšys su *Chlamydia trachomatis* infekcija yra prieštaringas. Antila ir kt. nustatė, kad *Chlamydia* serotipas G susijęs su didele gimdos kaklelio vėžio rizika (37). Kiti neįrodė *Chlamydia* antikūnų ir gimdos kaklelio neoplazijos ryšio (38).

2.5.4 Imuniteto susilpnėjimas

Padidėjusi rizika susirgti gimdos kaklelio neoplazija ar užsikrėsti ŽPV imunosupresuotiems pacientams yra įrodyta. Moterų po transplantacijos rizika užsikrėsti ŽPV ir susirgti gimdos kaklelio neoplazija didesnė. Tyrimais nustatyta penkis kartus didesnė tikimybė susirgti HSIL (50% vs 100%) pacientėms po transplantacijos (39). Atlikto tyrimo, kurio metu buvo tiriamos 105 imunosupresuotos moterys po inkstų transplantacijos, duomenimis, ŽPV buvo nustatytas 17,5 % moterų, neoplazija 9,5%. Infekuotumas šioje kategorijoje buvo devynis kartus didesnis nei normalioje ar 17 kartų nei imunokompetentinėje populiacijoje.

Rizika susirgti gimdos kaklelio intraepitelinėmis neoplazijomis yra gerokai didesnė ŽIV infekuotoms moterims. Ellerbrock ir kt. įrodė, kad 20% vs 5% ŽIV infekuotų ir neinfekuotų moterų vystosi plokščialąsteliniai intraepiteliniai pakitimai (SIL) (40). Heard ir kt. nustatė, kad gimdos kaklelio displazija buvo diagnozuota 27% ŽIV infekuotų moterų, o ŽPV infekcija – 53 % moterų.

Didelės rizikos ŽPV DNR koreliavo su mažu CD4 skaičiumi ir gimdos kaklelio neoplazijos rizika (41).

2.5.5 Lytinio gyvenimo įpatumai

Moterų seksualinio gyvenimo ypatumai glaudžiai susiję su gimdos kaklelio intraepitelinės neoplazijos rizika. Moterims lytinių partnerių skaičiaus ir ŽPV priklausomybė nustatyta, dėl ŽPV infekcijos tiriant prostitutas ir moteris, neturėjusias lytinių santykių (ŽPV paplitimas atitinkamai 48,4 ir 1,5 proc.) (42). Atlikus kitus tyrimus padaryta išvada, kad moterims, turėjusioms 5 ir daugiau lytinių partnerių, ŽPV infekcija nustatoma 3-7 kartus dažniau, palyginti su turėjusiomis mažiau nei 5 partnerius moterimis (43). Tyrimai įrodo, kad lytinių partnerių skaičius padidina užsikrėtimo ŽPV riziką. Lytinio gyvenimo pradžia irgi siejama su ŽPV infekcijos rizika. Daugelio tyrimų rezultatai parodė, kad amžius, kada pradėtas lytinis gyvenimas, gali turėti didelės įtakos ŽPV plisti. Mokslo darbais taip pat įrodyta, kad anksti pradėtas lytinis gyvenimas siejamas su dideliu lytinių partnerių skaičiumi (44). Ankstyvos lytinio gyvenimo pradžios įtaka apsikrėsti ŽPV siejama su biologiniais gimdos kaklelio gleivinės pakitimais paauglystėje. Paauglystėje gleivinė yra lengvai pažeidžiama ir imli lytiškai plintančiai infekcijai. Tai sąlygoja didelę riziką ŽPV pasiekti bazinių ląstelių sluoksnį ir infekcijai persistuoti (45). Tuo laikotarpiu lytinių partnerių gausa labiau didina riziką užsikrėsti ŽPV.

2.6 Gimdos kaklelio vėžio vystymasis

Plokščialąstelių intraepitelinų pakitimų ar displazijų sąvoka plati. Ji apima ikinavikinius gimdos kaklelio pakitimus, anksčiau vadintus displazijomis, karcinomą *in situ* ir gimdos kaklelio intraepitelines neoplazijas (CIN). Invazinė plokščialąstelinė karcinoma glaudžiai susijusi su SIL. Negydomi SIL laikui bėgant gali virsti vėžiu. Invazinį vėžį ir SIL sieja bendri rizikos veiksniai. Svarbiausi jų lytinio gyvenimo ypatumai ir ŽPV infekcija, kuri nustatoma SIL ir invazinio vėžio atvejais. Šios dvi patologijos turi vienodą chromosomų rinkinio patologiją, kuri buvo nustatyta naudojant vaizdinę analizę ir citogenetinio tyrimo metodus. Galiausiai SIL morfologiškai labai primena vėžį. Dažnai histologiniame audinio pjūvyje SIL aptinkami greta invazinio vėžio. Moterys, kurioms yra SIL, paprastai apie 10 metų jaunesnės nei moterys, sergančios gimdos kaklelio vėžiu. Plokščialąstelinis gimdos kaklelio vėžys yra dažniausias gimdos kaklelio navikas. 85-90% gimdos kaklelio vėžio atvejų sudaro ši histologinė naviko forma. Dažniausiai serga 45-55 metų amžiaus moterys, bet šiuo vėžiu gali sirgti 30 metų amžiaus ir net jaunesnės moterys. Plokščialąstelinės karcinomos diferenciacijos laipsnis histologiškai ir citologiškai varijuoja nuo gerai iki blogai diferencijuotų naviko formų esant ragėjimo požymių arba jų nesant.

Sudėtinga tiksliai analizuoti SIL biologinę eigą. Etikos reglamentai draudžia į kontrolines tyrimų grupes įtraukti moteris, kurioms yra SIL, o ypač HSIL pakitimai, nes neįmanoma leisti pakitimui progresuoti į invazinį vėžį. Daugumoje dabartinių mokslinių darbų tiriama LSIL progresavimas iki HSIL. Tačiau moksliniais darbais buvo įrodyta, kad LSIL į vėžį išsivysto labai retai. Histologinė biopsija, kurios metu yra visiškai ar iš dalies pašalinami ikinavikinių gimdos kaklelio pakitimų apimti audiniai arba histologinės biopsijos sukulto uždegimo apimti audiniai, iškreipia natūralią tiriamo proceso biologinę eigą. Pakartotinė histologinė biopsija ar pakartotinis Pap tyrimas siekiant nustatyti tolesnę proceso eigą neatspindi biologinės intraepitelinų neoplazijų raidos. SIL diagnozės ir pakitimų laipsnio vertinimo kriterijai įvairių autorių yra skirtingi. Tyrimais

nustatyta, kad 50% ir daugiau LSIL regresuoja ir tik 1% progresuoja iki vėžio (46). Mažiau HSIL regresuoja ir daugiau vystosi į vėžį (1 lent.).

1 lentelė. Intraepitelinų pakitimų biologinė raida

	Regresuoja	Persistuoja	Vystosi iki CIN III	Vystosi iki invazinio vėžio
LSIL (CIN I)	57%	32%	11%	1%
HSIL (CIN II)	43%	35%	22%	5%
HSIL (CIN III)	32%	<56%	---	>12%

LSIL – tai ŽPV infekcijos sąlygotas trumpalaikis epitelio pažeidimas, kuriam būdinga nedidelė onkogeninė rizika. HSIL susijęs su ilgalaikė persistuojančia ŽPV infekcija ir pasižymi didele progresavimo iki vėžio tikimybe. 93 proc. moterų, kurioms morfologiškai diagnozuotas HSIL, nustatomi didelės onkogeninės rizikos tipų ŽPV (44). HSIL – tai vidutinė, ryški plokščiojo epitelio displazija ir neinvazinė karcinoma, kuri pasireiškia giliųjų plokščiojo epitelio sluoksnių pažeidimu.

8% gimdos kaklelio vėžių sudaro endocervikinės adenokarcinomos. Moksliniais tyrimais įrodyta, kad adenokarcinomos pirmtakas yra adenokarcinoma *in situ*. Histologiniuose gimdos kaklelio tyrimuose greta invazinės adenokarcinomos nutatoma ir adenokarcinoma *in situ*. Pastaroji nustatyta analizuojant nepakitusių histologinės gimdos kaklelio biopsijos medžiagą, t.y. medžiagą moterų, kurios sirgo invazine adenokarcinoma, bet tiriant jų gimdos kaklelį histologiškai invazinio vėžio nebuvo (47). 16 ir 18 tipo ŽPV nustatytas abiem – adenokarcinoms *in situ* ir invazinės adenokarcinomos – atvejais (44).

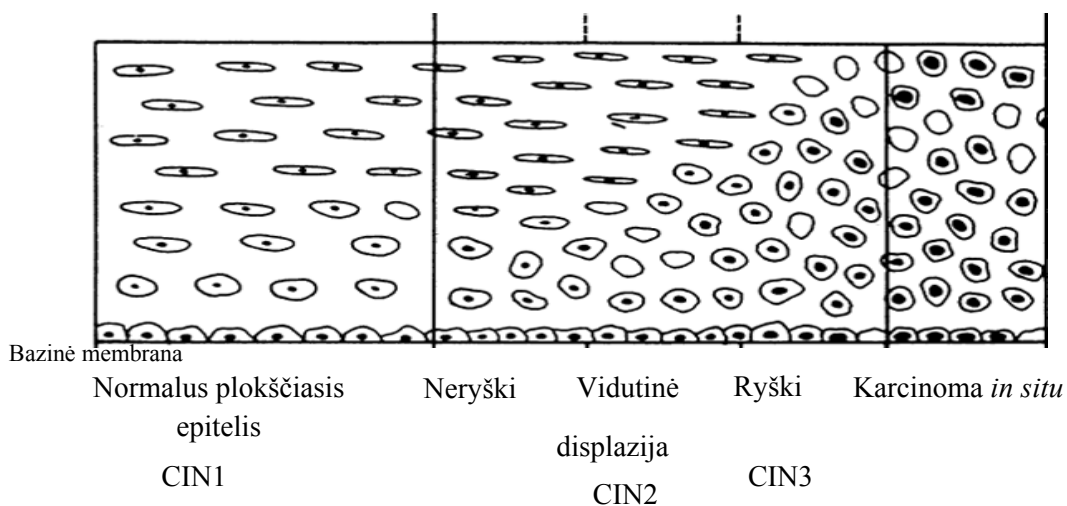
2.7 Gimdos kaklelio vėžio diagnostikos metodų vystymasis

Pirmieji gimdos kaklelio vėžį aprašė Hipokratas ir Galenas, tačiau asimptominės intraepitelinės neoplazijos vaizdams ir buvimui jie nefiksavo. Gimdos kaklelio karcinoma *in situ* kaip ikinavikinis procesas buvo aprašyta 1910 m., tačiau šios ligos esmė vis dar liko neaiški.

Tuo metu gimdos kaklelio vėžio diagnostika buvo paremta vizualine gimdos kaklelio apžiūra, palpacija ir akla invazinio vėžio židinio biopsija. Shileris sukūrė testą: jodu nudažomas dengiamasis gimdos kaklelio epitelis ir tada galima atskirti pakitusias epitelio vietas nuo normalių (48). Testas turėjo trūkumų, jis neleido atskirti metaplazinio epitelio nuo displazinio ir mikroinvazinio vėžio vietų nuo toli pažengusio vėžio. Tuo metu buvo žinoma, kad greta invazinio vėžio egzistuoja kliniškai asimptomi vėžys, kuris dažnai nustatomas pašalintuose gimdos kaklelio audinio kraštuose. Egzistavo didelė kontroversija dėl intraepitelinių pakitimų kilmės. Tai 1920 ir 1930 m. davė pradžią fundamentiniams citologijos tyrimams. Pirmasis eksfoliacinės citologijos reikšmę diagnozuojant ankstyvuosius gimdos kaklelio pakitimus prancūzų literatūroje aprašė Babes, tuo pačiu metu dr. Papanicolaou tai paskelbė JAV. Garbė įdiegiant metodą į praktiką priklauso dr. Papanicolaou. Tolesniuose bendruose su ginekologu dr. Herbert Traut tyrimuose dr. Papanicolaou tęsė gimdos kaklelio navikinių pakitimų tyrinėjimus ir gilinosi į ikinavikinius gimdos kaklelio pakitimus.

Supratimas apie gimdos kaklelio vėžio etiologiją vystėsi progresyviai. Ikiinvazinė CIS prigimtis buvo ilgų debatų objektas. Buvo įrodyta, kad CIS gali progresuoti iki gimdos kaklelio vėžio ar savaimė regresuoti. Po to buvo nukreiptas dėmesys tyrinėti ikivėžinius CIS pakitimus. Žymiausi darbai buvo paskelbti ir 1960 m. Dr. Ralph Richard pasiūlė naują gimdos kaklelio intraepitelinės neoplazijos (*angl.* CIN-cervical intraepithelial lesion) terminą vietoje ankstesnio plokščiojo epitelio ikinavikinių pakitimų termino. 1962 m. šio termino vartojimui buvo visuotinai pritarta Tarptautiniame eksfoliacinės

citologijos kongrese (15 pav.) (49). CIN Richard skirstė į tris laipsnius (I – nedidelio, II – vidutinio, III – didelio). Dr. Richard manė, kad visos nedidelės gimdos kaklelio intraepitelinės neoplazijos (CIN I) laikui bėgant progresuoja ir tampa iš pradžių didelėmis gimdos kaklelio intraepitelinėmis neoplazijomis (CIN III), o paskui vėžiu. Savo įsitikinimus jis pagrindė dideliais CIN I biologijos tyrinėjimo darbais. Jo tyrimuose CIN1 išsivystymas į vėžį buvo gerokai dažnesnis nei kituose to meto tyrimuose. Dr. Richard ir bendraautoriai savo moksliniuose darbuose tyrė tik tas moteris, kurioms tris kartus paeiliui buvo nustatytas CIN I. Taigi CIN biologinė eiga nebuvo išsamiai iširta, vyravo supratimas, kad visi CIN laikui bėgant progresuoja iki vėžio, todėl visus ikinavikinius gimdos kaklelio pakitimus reikėjo gydyti vadovaujantis pakitimų dydžiu ir jų lokalizacija, bet ne pakitimų laipsniu.



15 pav. Gimdos kaklelio epitelio modelis, kuriame parodyta intraepitelinės neoplazijos morfologinė išraiška ir įvairi terminija nusakant pažeidimo laipsnį (99)

Moksliniais darbais įrodžius karcinomos *in situ* ryšį su invaziniu gimdos kaklelio vėžiu CIS buvo pradėta gydyti taikant radikaliausias ir modifikuotas radikaliausias histerektomijas (50). Histologiniuose šių pacienčių gimdos kaklelio medžiagos tyrimuose buvo matomi invazijos židiniai gimdos kaklelio stromoje. Daugėjant tyrimų rezultatų paaiškėjo, kad šie ikinavikiniai pakitimai nemetastazuoja, jeigu nėra mikroinvazijos židinių, kurių buvo pradėta

intensyviai ieškoti konusinės biopsijos medžiagoje (51,52). Intraepiteliniams pakitimams gydyti pradėtos taikyti konservatyvios gydymo metodikos panaudojant elektrokauterį, CO₂, abliaciją lazeriu ir diatermokonzivaciją (53,54). Gimdos kaklelio audinio histologinis tyrimas moterims, kurių gimdos kaklelio tepinėlių citologinio tyrimo rezultatai rodė patologiją, rėmėsi keturių kvadrantų akla biopsija, atlikta po Shilerio testo (54). Aklos biopsijos vertė, kai pakitimai yra akimi nenustatomi, išlieka ir iki šių dienų. Konusinė biopsija, pasiūlyta 1989 m. Prendeville ir kolegų, iki šiol išlieka standartu histologiškai tiriant transformacijos zoną. Spaudžiamoji (*angl.* punch) biopsija rezervuojama akimis identifikuojamiems makroskopiniams pakitimams ar pakitimams, aptiktiems kolposkopijos metu (53). Kolpomikroskopas buvo sukurtas kaip alternatyva morfologiniam tyrimui. Šis 480 kartų didinantis prietaisas apžiūrėti gimdos kaklelio audiniam dėl technologinių apribojimų praktikoje taikomas nebuvo (55). 1925 m. Hinselmanas aprašė kolposkopijos techniką ir kai kuriose šalyse ji buvo pradėta taikyti intraepitelinių pakitimų praktikoje. Tik 1950 m. JAV ji buvo plačiai įtraukta į mokymo programas ir pradėta taikyti praktikoje (56). Iš pradžių buvo tikėtasi, kad kolposkopija bus naudojama kaip patikros metodas diagnozuojant CIN, tačiau dėl citologinio tyrimo paprastumo ir prienamumo kolposkopija nebuvo įdiegta kaip patikros tyrimas, nors kolposkopijos palyginimo su konusine biopsija rezultatai buvo optimistiniai (57). Kolposkopijos vertė įvertinant invazinį gimdos kaklelio vėžį buvo įrodyta (58). Pastaraisiais dešimtmečiais kolposkopija tobulinta. Pradėta taikyti videokolposkopija, kuri įrašo vaizdą, pasižymi puikia vizualizacija, mokymo galimybe. Palyginamieji videokolposkopijos ir optinės kolposkopijos tyrimai buvo publikuoti. Paaikškėjo, kad videokolposkopijos patikimumas diagnozuojant intraepitelinius pakitimus išlieka panašus kaip optinės kolposkopijos, tačiau keičiasi specialistų įgūdžių įgijimo ir mokymo laikotarpis (58). Kompiuterinės vaizdo analizės kolposkopai, suteikiantys galimybę stebėti pakitimų dinamiką, integruoja nematomų spektrų audinio fluorescenciją į vaizdo analizę (59).

Tyrimai parodė, kad CIN gali savaime regresuoti ir jų negydant. 1980 m. daugėjant žinių apie gimdos kaklelio intraepitelinius pakitimus nebuvo vieningos nuomonės, kaip gydyti ikivėžinius pakitimus, ypač nedidelio laipsnio pakitimus, kurie konstatuojami citologinio tyrimo atsakyme. Richart moksliniais tyrimais pagrįsto supratimo apie gimdos kaklelio intraepitelinių pakitimų biologinę eigą sukurta Bethesda sistema atspindėjo naują, susijusią su žmogaus papilomos viruso (ŽPV) atradimu požiūrį į ikinavikinių gimdos kaklelio pakitimų biologinę eigą ir standartizavo gimdos kaklelio citologijos rezultatus (60). Citologinėje Bethesda gimdos kaklelio diagnozių sistemoje anksčiau vartotas ikinavikinių plokščiojo epitelio pakitimų terminas buvo pakeistas plokščialąstelių intraepitelinių pakitimų terminu. Šie pakitimai suskirstyti į mažus ir didelius intraepitelinius plokščialąstelinis pakitimus.

1988 m. įvyko pirmasis Bethesda sistemos darbo grupės susitikimas. 1991m. ir 2001m. – kiti du, kurie pakeitė pirmosios 1989 m. citologinės klasifikacijos struktūrą ir terminus. 2001m. Bethesda sistemos aptarimas buvo viešas ir platesnis nei ankstesnių klasifikacijų. Internetinio tinklalapio skiltyje daugiau nei 1000 dalyvių išsakė savo pastabas apie citologinę Bethesda klasifikaciją.

2001m. Bethesda sistema, kaip ir ankstesni jos pirmtakai, rekomenduoja tam tikrą citologinio atsakymo formą. Ji susideda iš Pap tepinėlio tinkamumo tirti įvertinimo, citologinės išvados/rezultatų interpretacijos ir patologo komentaro/rekomendacijos (61).

2.7.1 Citologinių gimdos kaklelio tyrimų apžvalga

Citologinio gimdos kaklelio tyrimo metodo pripažinimo garbė priklauso dr. George Papanicolaou. 1928 m. tepinėliuose, paimtuose iš makšties, jis aptiko piktybinio gimdos kaklelio naviko ląstelių (62). Tolesniuose bendruose su ginekologu dr. Herbert Traut tyrimuose dr. Papanicolaou tęsė gimdos kaklelio

navikinių pakitimų tyrinėjimus ir gilinosi į ikinavikinius gimdos kaklelio pakitimus (63). Patologai ir klinicistai šį naują tyrimo būdą vertino skeptiškai. Vėliau, 1940m., dr. Papanicolaou tyrinėjimus gimdos kaklelio ikinavikinių pakitimų srityje patvirtino ir kiti mokslininkai. Kanadietis ginekologas dr. J. Ernest Ayre pasiūlė naują citologinės medžiagos paėmimo būdą - medžiagą imti mentele tiesiai nuo gimdos kaklelio, o ne pipete iš makšties, kaip iš pradžių rekomendavo dr. Papanicolaou (64).

Pap tyrimas niekada nebuvo ištirtas prospektyviniuose tyrimuose, bet keletas darbų patvirtino atrankines šio tyrimo galimybes ir jo privalumus nustatant ankstyvuosius gimdos kaklelio vėžio pakitimus. Laikui bėgant Pap tepinėlis tapo tobulu tyrimu nustatyti ikinavikiniams gimdos kaklelio pakitimams, kuriuos, laiku aptikus, galima išgydyti ir taip išvengti gimdos kaklelio vėžio.

Pap tyrimui, kaip ir dauguma kitų tyrimų, būdingi klaidingai teigiami ir klaidingai neigiami rezultatai. Dalis moterų, sergančių gimdos kaklelio vėžiu, praeityje turėjo vieną ir daugiau neigiamų Pap tyrimų. Klaidingai neigiami Pap tyrimo rezultatai esant invaziniam vėžiui svyruoja nuo 16 iki 82% atvejų. Įvertinti klaidingai neigiamus citologinius rezultatus ikinavikinės gimdos kaklelio patologijos atveju sudėtinga, nes nėra visiškai aiškus ikinavikinių pakitimų dažnis populiacijoje. Ikinavikiniai pakitimai nustatomi tik pasitelkus biopsiją, kuri atliekama vadovaujantis patologine citologija. Taigi citologinių klaidingai neigiamų rezultatų vertinimas ikinavikinių pakitimų atveju yra šališkas, nes moterims, kurių Pap tyrimai yra neigiami, nėra atliekamos biopsijos, galinčios patvirtinti citologiškai nenustatytus ikinavikinius gimdos kaklelio pakitimus. Tyrimų duomenimis, Pap tyrimo jautrumo vidurkis yra 49% (30-80%), specifiškumo vidurkis – 95% (86-100%) (65). Skirtingų tyrėjų tarpusavio sutarimas diagnostinės patologijos atveju geras, kas atspindi citologinių išvadų patikimumą. Mokslinių tyrimų duomenimis, normalių, atipinių, nežymių ir žymių plokščialąstelių intraepitelinų pakitimų kategorijų kappa koeficientas yra 0,46 (65). Tai reiškia vidutinį tyrimo patikimumą (kai

kappa koeficientas yra 0 ar mažiau – skirtingi tyrėjai nesutaria, 0-0,2 – sutarimas tarp skirtingų tyrėjų žemas, 0,2- 0,4 – pakankamas sutarimas, 0,4-0,6 - geras, 0,6-0,8 – labai geras, o 0,8-1,0 – puikus). Histologinis šių kategorijų sutarimo patikimumas yra panašus (0,46). Citologijoje dažniausiai nuomonės skiriasi ASC-US kategorijos atveju. Pirminė išvada yra patvirtinama tik 43% atvejų. Histologijoje diskutuojama ties LSIL. Pakartotinai tiriant medžiagą, pirminė LSIL išvada patvirtinama tik 43 % atvejų (65).

1996 m. Pap tepinėlio istorijoje įvyko dideli pasikeitimai. JAV maisto ir vaistų kontrolės tarnyba patvirtino naują vienasluoksnį citologinį gimdos kaklelio tepinėlį *ThinPrep* (Cytoc Corporation, Boxborough, MA), kuriam gauti naudojama skysta fiksuojanti terpė su pasklidusiomis joje ląstelėmis. 1999 m. buvo patvirtintas ir kitos kompanijos TriPath Imaging (Burlington, NC) vienasluoksniu citologinio tepinėlio *AutoCytePrep* (dabar *SurePath*) gamybos būdas. Vienasluoksniu Pap tepinėlis gaunamas taip: ginekologinio tyrimo metu paimta gimdos kaklelio medžiaga įdedama į transportinį konteinerį su fiksuojančiu ir transportuojama į laboratoriją, kur procesorius citologinę medžiagą labai plonu sluoksniu paskleidžia ribotame objektyvio stiklo plokštumoje ir nudažo Pap dažymo būdu (66).

Vienasluoksniu citologiniai Pap tepinėliai buvo sukurti naudoti automatinio Pap citologinio tyrimo mašinose, kurių pagrindinis darbas buvo mikroskopuoti Pap tepinėlius ir suklasifikuoti juos pagal patologiją. Tokios mašinos negalėjo išanalizuoti ir patikimai interpretuoti įprastinių storų gimdos kaklelio tepinėlių, kuriuose gausu storų ląstelių grupių, jų klodų. Mokslinių tyrimų duomenimis, vienasluoksnių preparatų mikroskopijos vertinimo rezultatai buvo tokie geri, kad jie nedelsiant buvo plačiai įdiegti praktikoje.

Kaip minėta, sukurti du būdai gauti vienasluoksnius citologinius tepinėlius - *ThinPrep* ir *SurePath*. Abiem būdais gauti Pap tepinėliai atrodo beveik vienodai, yra ploni, bet jų gamybos procesas skirtingas.

Moksliniuose tyimuose buvo palyginti *ThinPrep* ir įprastiniu būdu pagaminti Pap tepinėliai. Vienasluoksniuose *ThinPrep* metodu pagamintuose tepinėliuose nežymių ir žymių plokščialąstelių intraepitelinų pakitimų (SIL) buvo nustatyta 18% daugiau nei įprastiniuose Pap tepinėliuose. Žymių endocervikinių liaukinių pakitimų (AIS, AGC) dažnumas buvo vienodas abiem tyrimų atvejais (0,14% ir 0,11%) ir tyrimo specifiškumas diagnozuojant patologiją buvo vienodas. Gaminant preparatus *ThinPrep* būdu liaukinio epitelio morfologiniai bruožai nepakinta. Analizuojant Pap tepinėlius esant endometriumo patologijai, skirtumo diagnozuojant ir klasifikuojant šią patologiją nepastebėta (67).

Maisto ir vaistų kontrolės tarnyba taip pat patvirtino, kad pagaminus citologinius preparatus *ThinPrep* būdu likusi skystoji terpė yra tinkama tirti žmogaus papilomos virusą. Tos pačios terpės tyrimai (citologiniai ir virusologiniai) yra naudingi koreliuojant abiejų tyrimų rezultatus ir prižiūrint moteris, kurių citologiniame tyrime aptikta atipinių plokščiojo epitelio ląstelių (ASC).

TriPath Imaging kompanija taip pat sukūrė vienasluoksnių gimdos kaklelio citologinių tepinėlių gamybos būdą – *SurePath*. Šiuo būdu gaminant vienasluoksnius tepinėlius naudojama etanolio pagrindu pagaminta transportinė terpė ir joje pasklidusios ląstelės. Moksliniuose tyimuose buvo palyginti *SurePath* ir įprastiniu būdu pagaminti Pap tepinėliai. Vienasluoksniuose *SurePath* metodu pagamintuose tepinėliuose nežymių ir žymių plokščialąstelių intraepitelinų pakitimų (SIL) buvo nustatyta 7% daugiau nei įprastiniuose Pap tepinėliuose dėl geresnės citologinės medžiagos paruošimo kokybės (68).

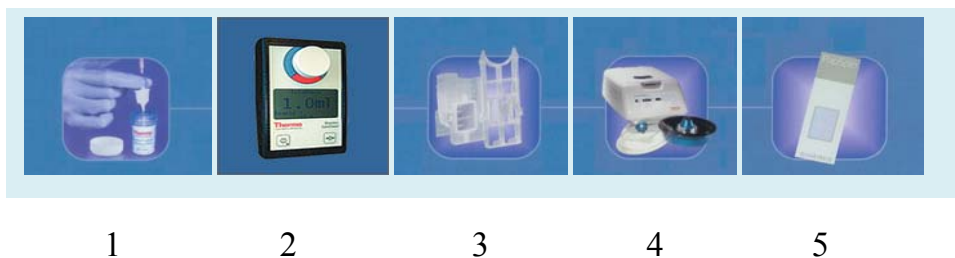
Automatinės gimdos kaklelio citologinius tepinėlius analizuojančios sistemos pradėtos kurti nuo 1950 m. Pirmąją tokią sistemą sukūrė JAV Airborne Instrument kompanija ir pavadino citoanalizatoriumi (69). Projekto įgyvendinimas nutrūko, kai ikiklinikiniuose tyimuose bandyta sistema nepateisino su ja siejamų vilčių bent iš dalies pakeisti atrankos darbuotojus

(citotechnologus) atliekant pirminę gimdos kaklelio citologinių tepinėlių atranką. Europoje ir Japonijoje susidomėjimas šiomis sistemomis išblėso sukūrus automatinius analizatorius *QUANTIMET* (70), *BIOPEPR* (71), *CERVIFIP* (72), *CYBEST* (73), *DIASCANNER* (74,75), *FAZYTAN* (76) ir *LEYTAS* (77). Dalies šių sistemų vertė yra muziejinė, kita dalis tapo dabartinių sistemų prototipais.

Susidomėjimas galimybėmis automatizuotai tirti gimdos kaklelio citologinius tepinėlius Europoje atslūgo nuo 1990 m. (78). Amerikoje ir Kanadoje tyrinėjimai tęsiasi finansuojami iš privataus kapitalo. Šios srities tyrinėjimus vykdo didelės kompanijos, šios srities lyderės AutoCyte (kadaise Roche Image Analysis System), Cytyc, Neopath ir Neuromedical Systems. 1999 m. trys iš jų (visos, išskyrus Cytyc) susijungė į didelę Tripath Image Analysis kompaniją. Kompanija sukūrė *AutoPap* (dabar *FocalPoint*) analizatorių (TriPath Imaging, Burlington, NC), skirtą automatinei gimdos kaklelio citologinių tepinėlių analizei. 1998m. šią sistemą patvirtino JAV vaistų ir maisto kontrolės tarnyba.

ThinPrep ir *SurePath* sistemas JAV vaistų ir maisto kontrolės tarnyba patvirtino tinkamas atlikti citologinį ištyrimą. Šioms sistemoms skverbiantis į laboratorijas ir taikant jas gimdos kaklelio citologijoje pradėta ieškoti pigesnių ištyrimo alternatyvų. Pradėta domėtis citologinių skystųjų terpių sistemomis, paremtomis citocentrifugavimu. Vakarų Europoje yra keletas alternatyvų: *PapSpin*TM (ThermoShandon Inc., Pittsburg, the USA), *Turbitec*® (Labonord, Templemars, France), *CytoSCREEN*® (Seroa, Monaco, Monaco). Pirmieji šių sistemų efektyvumo analizės tyrimai publikuoti 2000 m. Khalbuss ir kt. paskelbė ThermoShandon sistema *PapSpin* atliktų 791 gimdos kaklelio citologinių tyrimų analizę, kuri pranoko įprastinio tepinėlio ištyrimo rezultatus. Šiame tyrime Khalbus išsamiai aprašė šios technologijos atlikimą (16 pav.). *PapSpin* metodu ruošiant preparatus iš skystosios terpės, kurioje yra *Wallach Papette* šluotėlės galiukas, paimama 25 ml ląstelių suspensijos ir supilama į piltuvėlį, įstatytą į centrifugą. Prie piltuvėlio prispaudžiamas objektinis

stiklelis. Medžiaga centrifuguojama ir ląstelės išcentrinės jėgos iš piltuvėlio paskleidžiamos ant objekcinio stiklelio 20x14,75 mm plote.



16 pav. *Shandon PapSpin* metodas: 1) Skystoji terpė su ląstelėmis, 2) Ląstelių densitometras *CytoCheck*, 3) Megapiltuvėlis, į kurį pilama skysta citologinė medžiaga, 4) Citologinė centrifuga, 5) *PapSpin* objekcinis stiklelis, ant kurio paskleidžiama medžiaga iš piltuvėlio

Vėlesni trys tyrimai – 2002 m. Weynand ir kt., 2005 Garbar ir kt., 2006 m. Rosenthal ir kt. – taip pat skirti *PapSpin* sistemos analizei. Tik Garbar tyrime yra apskaičiuotas *PapSpin* sistemos jautrumas ir specifiškumas, neigiama ir teigiama tyrimo prognozė. Taip pat įrodytas šios sistemos tinkamumas nustatyti ŽPV naudojant *Hybrid Capture 2* technologiją. Šiame tyrime buvo analizuojami 51 *PapSpin* sistema atliktas tyrimas lyginant su *Turbitec* sistema atliktais 215 tyrimais. Paskutinis Rosenthal tyrimas buvo kiek didesnis ir analizavo 482 *PapSpin* atvejus. Reikia pažymėti, kad trys pastarieji tyrimai buvo dalytos medžiagos tyrimai, t.y. iš pradžių buvo atliekamas citologinis tepinėlis, visa likusi medžiaga buvo tiriama *PapSpin* metodu. Įprastinio tepinėlio tyrimų rezultatai lyginti su *PapSpin* ištyrimo rezultatai. Garbar ir kt. atliktas tyrimas (n=51) buvo nedalytos medžiagos tyrimas. Lieka neaišku, kokia yra nedalytos ir dalytos medžiagos *PapSpin* tyrimo diagnostinė vertė. Taip pat neaišku, ar tinka ši skysta etilo alkoholio pagrindu paruošta terpė atlikti ŽPV tyrimams PGR metodika. Tai, kad pasaulinėje literatūroje trūksta vientisos medžiagos tyrimų ir yra publikuojami dalytos medžiagos tyrimai, galima paaiškinti JAV vaistų ir maisto kontrolės sistemos apribojimais, taikomais gimdos kaklelio citologinių tyrimų srityje, kur citologinius gimdos

kaklelio tyrimus atlikti galima tik naudojant *ThinPrep* ir *SurePath* sistemas. JAV patirtį perima ir Vakarų Europa, pvz: Anglijoje ar Švedijoje gimdos kaklelio patikrą, t.y. citologinį tyrimą, galima atlikti tik naudojant *ThinPrep* ir *SurePath* sistemas. Pasirinkimą lemia ir gausūs šių sistemų pozityvūs efektyvumo vertinimo rezultatai pasaulinėje literatūroje, o citocentrifugavimo principu paremtų sistemų analizės stinga.

2.7.2 Histologiniai gimdos kaklelio tyrimo metodai

Gimdos kaklelio citologinis tyrimas yra patikrinimo metodas, tačiau jis neleidžia nustatyti galutinės diagnozės. Gimdos kaklelio citologinio tyrimo rezultatai yra patvirtinami histologiškai tiriant gimdos kaklelio audinį (79). Patenkinama kolposkopija yra būtina siekiant nustatyti patologines gimdos kaklelio pakitimų vietas (79). Histologinis gimdos kaklelio tyrimas kaip „auksinis standartas“ leidžia vertinti gimdos kaklelio citologinio tyrimo rezultatus, kolposkopijos tyrimų kokybę. Naudojant histologinį tyrimą yra planuojamas moterų stebėjimas po ikivėžinių gimdos kaklelio pakitimų gydymo, tolesnis karcinomos gydymas. Histologinio tyrimo kokybė priklauso nuo medžiagos kokybės, dydžio. Nuo 1910 m., kai Rubin aprašė kliniškai nepasireiškiantį vėžį histologinėje medžiagoje, praėjo apie 100 metų, per tuos metus vystantis supratimui apie ikivėžinius gimdos kaklelio pakitimus evoliucionavo histologinės klasifikacinės sistemos, greta įprastinio histologinio gimdos kaklelio tyrimo buvo įdiegti imunohistocheminiai audinio tyrimai. Svarbiausi jų: proliferacinis žymuo Ki-67, ekspresuojamas visuose ląstelės branduolio fazės baltymuose, išskyrus G0 fazės (80). Ki-67 vartojimas leidžia atskirti atrofinių epitelį nuo displazinio. Dažniausiai naudojamas šio Ag klonas yra MIB1. KI-67 imunohistocheminės reakcijos intensyvumas tiesiogiai siejamas su displazijos laipsniu. Proliferacinis ląstelės PCNA žymuo identifikuoja ląstelę, esančią G1 ir S fazėse (81). Gimdos kaklelio

intraepitelinės neoplazijos ekspresuoja didelį kiekį nuo ciklino priklausančios kinazės inhibitorių p16 baltymą. Šio imunohistocheminio p16 reakcijos vertė buvo įvertinta Klaes ir kt. (82) diferencijuojant nebrandžią metaplaziją nuo displazijos. Šiuo metu diskutuojama dėl Faktorius –VIII, CD 31, podoplanino, kurie identifikuoja kraujagyslių ir limfagyslių endotelį, efektyvumo (83,84).

2.10 ŽPV tyrimo metodų apžvalga

Kadangi ŽPV tipai, priklausantys didelės vėžio rizikos grupėms, yra susiję su gimdos kaklelio vėžio išsivystymu, todėl ankstyva lytinių takų infekcijos ir ikivėžinių pažeidimų diagnostika tapo aktuali ir reikšminga (85). ŽPV infekcijai identifiкуoti naudojami įvairūs metodai. Laboratorinėje ŽPV infekcijos diagnostikoje naudojami metodai skirstomi į morfologinius (citologija, histologija), ŽPV specifinės DNR nustatymo, imuninius, serologinius. Vieni jautriausių yra molekuliniai ŽPV genomines DNR identifikavimo metodai, iš kurių populiariausi ir plačiausiai naudojami yra polimerazės grandininė reakcija (PGR) bei įvairūs ŽPV DNR hibridizacijos metodai (85,86).

Signalų pagausinimo metodams priskiriamas *Hybrid Capture 2* (HC2) yra vienintelis metodas, kurį ŽPV DNR tirti patvirtino JAV maisto ir vaistų kontrolės tarnyba. Todėl jis taikomas klinikinėje praktikoje. O polimerazės grandininė reakcija (PGR) naudojama tik vykdant mokslinius tyrimus.

HC metodo principas – skystoje terpėje susidariusių denatūruotos tiriamosios DNR, komplementarių RNR pradmenų hibridinių molekulių ir Ak, žymėtų Ak kompleksams, sukeliama liuminescencija, kuri matuojama liumenometru. Kuo stipresnis švytėjimas, tuo didesnis kiekis DNR-RNR hibridinių molekulių. Šiuo metodu galima nustatyti mažos rizikos (6, 11, 42, 43 ir 44) bei didelės rizikos (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 56, 58, 59 ir 68) tipų

ŽPV. HC2 metodo jautrumas nustatant ŽPV DNR, esant histologiškai patvirtintom CIN II/CIN III, yra 85,2– 5,6%, o specifiškumas 24,1–67,2% (86). HC2 metodo jautrumas ir specifiškumas artimas PGR metodo jautrumui ir specifiškumui. Taigi *Hybrid Capture 2* yra tinkamas naudoti didelės apimties patikros programose (87).

Nukleino rūgščių pagausinimo metodas PGR yra vienas jautriausių metodų tiriant ŽPV DNR. PGR yra greitas ir lankstus fermentinis *in vitro* metodas norimam genominei DNR ar kDNR fragmentui pagausinti. PGR principas yra toks pats kaip ir DNR dvigubėjimo (replikacijos), kai ląstelė ruošiasi dalytis. PGR yra ciklinė ir kiekvieną jos ciklą sudaro 3 etapai: DNR denatūravimas, pradmenis prisijungimas ir pradmenis pratęsimas (komplementarios DNR grandinės sintezė) (87).

Šio metodo analitinis jautrumas yra didžiausias ir klinikiniame mėginyje galima aptikti net labai mažą ŽPV genomų kopijų kiekį, t.y. 10–100 genomų kopijų. PGR atlikti reikia labai nedidelio tiriamosios medžiagos kiekio ir nesudėtingo paruošimo prieš pagausinimą. Pagrindiniai plačiausiai naudojami pradmenys ŽPV DNR nustatyti yra MY09/MY11 ir GP5+/GP6+. Šie pradmenys yra komplementarūs viruso *L1* geno sekos atitinkamai daliai. Naudojant MY09/MY11 pradmenis yra pagausinama *L1* geno 450 bp seka, o naudojant GP5+/GP6+ – pagausinama 140 bp seka (87).

PGR metodo jautrumas nustatant ŽPV DNR, esant histologiškai patvirtintom CIN II/CIN III, yra 92,9–100%, o specifiškumas 23,5–30% (149). O Kumala ir bendraautorių gauti duomenys rodo, kad šio tyrimo jautrumas esant HSIL yra 74%, o specifiškumas 64,1% (88).

ŽPV DNR nustatymo tyrimai jautrumu priylgsta ir netgi viršija citologinio tyrimo jautrumą (85). Tačiau jų specifiškumas mažesnis, kadangi ŽPV paplitęs ir tarp sveikų moterų. Vis dėlto, didelė tyrimo kaina ir daug klaidingai teigiamų atsakymų riboja šių metodų taikymą pirminėje gimdos kaklelio vėžio atrankoje.

3. Medžiagos ir metodai

2006-2009 metais Valstybinis patologijos centras (VPC), Vilniaus universiteto Onkologijos institutas (VUOI), Vilniaus Centro, Karoliniškių, Vilniaus rajono centrinė poliklinikos pradėjo vykdyti tyrimą „Ikinavikinės gimdos kaklelio patologijos diagnostikos efektyvumo naudojant *Shandon PapSpin* sistemą įvertinimas“* gavus Lietuvos bioetikos komiteto leidimą Nr. 7 šiam tyrimui atlikti. Nuo 2006 m. kovo mėnesio iki 2008 kovo mėnesio į tyrimą įtrauktos 2945 moterys.

* Darbinis pavadinimas „Ikinavikinės gimdos kaklelio patologijos panaudojus naują kombinuotą skystų terpių *PapSpin* citologijos ir ŽPV DNR nustatymo metodą, tyrimo efektyvumo įvertinimas“

3.1 Pacientų įtraukimo kriterijai:

30-60 m. amžiaus moterys, atėjusios profilaktiškai pasitikrinti į Pirminį sveikatos priežiūros centrą (PSPC) pagal SAM patvirtintą Atrankinės patikros dėl gimdos kaklelio patologijos programą ir sutikusios dalyvauti šiame tyime bei pasirašiusios informuoto asmens sutikimo formą, nenėščios.

3.2 Pacientų atšaukimo kriterijai

1. Amžius: mažiau nei 30 ir daugiau nei 60 metų.
2. Nustatytas nėštumas.

3.3 Tiriamosios imties dydžio įvertinimas

Tiriamoji imtis skaičiuota pasirinkus 95% pasikliautinuosius lygmenis ir 80% statistinę galią dviem proporcijoms palyginti. Patologinių tepinėlių proporcijos (senas vs naujas metodas): jei proporcijos 8 ir 11 proc. - 2992 tiriamosios, po 1496 kiekvienoje grupėje. Tikimasi rasti apie 10 proc. patologijos (300 atvejų), tuomet reikia ištirti 3000 moterų. Hipotezei dėl tiriamųjų moterų skaičiaus iškelti nustatėme šią sąlygą – mūsų tiriamojoje grupėje patologijos turėtų būti nustatyta ne mažiau kaip 200 atvejų. Tiriamosios populiacijos imties dydžiui nustatyti rėmėmės 2006m. VLK duomenimis apie gimdos kaklelio medžiagos citologiniu tyrimu nustatytų patologinių pakitimų dažnio pagal patologijos tarnybas duomenų analize Lietuvoje (2 lentelė) bei Klinkhamer ir kt. išsamia paskelbtų skystosiose terpėse fiksuotos gimdos kaklelio medžiagos citologinių tyrimų metaanalize. Minėti autoriai nustatė, kad atliktuose skystosiose terpėse fiksuotos ir transportuotos gimdos kaklelio citologinės medžiagos preparatų tyrimuose SIL patologijos dažnis yra nuo 2-3%. Tai patvirtina ir VLK „Sveidra“ statistinės programos duomenys, pagal kuriuos Lietuvos 30-60 m. amžiaus moterų populiacijoje gimdos kaklelio medžiagos citologinių tyrimų nustatytų patologinių pakitimų dažnis yra 7–10 %.

2 lentelė. Gimdos kaklelio medžiagos citologiniu tyrimu nustatytų patologinių pakitimų dažnis pagal patologijos tarnybas, remiantis VLK „Sveidra“ informacine duomenų baze

ASH pavadinimas		Natūrk 1846	Natū IPN 1847	ASCUS 1848	ASGH 1849	LSIL 1850	HSL 1851	SC 1852	ACLS 1853	ACC 1854	AS 1855	AC 1856	HM 1857	Kiti 1858	Šviso
VšĮ Kamėdros universiteto klinika	V	938	1966	288	29	171	178	24	0	4	0	0	0	0	1763
	%	531	905	153	017	097	101	014	0	002	0	0	0	0	100
VšĮ Mindaugo universiteto ligoninė	V	483	8207	1063	221	336	107	25	11	5	1	1	4	0	9094
	%	52	918	118	025	037	115	003	001	001	0	0	0	0	100
VšĮ Šalies apskritys ligoninė	V	70	3662	34	85	37	22	11	29	15	1	0	15	2	3293
	%	237	943	109	026	104	008	003	009	005	0	0	005	001	100
VšĮ Karo 2-gilė klinika ligoninė	V	290	494	86	1	35	11	1	0	0	0	0	0	0	538
	%	541	929	161	002	065	021	002	0	0	0	0	0	0	100
KMU Kiti laboratorijos ligoninė	V	101	3066	155	631	33	92	64	55	8	0	2	16	0	4323
	%	231	895	346	144	069	22	015	013	002	0	0	024	0	100
VšĮ Paryžių apskritys ligoninė	V	148	1665	55	45	48	52	2	13	1	0	0	0	0	1829
	%	771	857	289	024	231	028	001	099	001	0	0	0	0	100
VšĮ Klaipėdos universiteto ligoninė	V	336	763	121	74	38	39	9	43	0	0	0	1	0	934
	%	358	764	143	074	33	09	009	043	0	0	0	001	0	100
VšĮ Klaipėdos apskritys ligoninė	V	120	2308	473	38	77	12	1	0	3	0	0	6	0	2308
	%	488	922	189	015	031	041	0	0	001	0	0	002	0	100
UAB SKIMPEKS Medicinos diagnostikos centras	V	282	2594	75	76	12	36	14	4	2	1	0	2	0	3028
	%	96	859	255	025	037	125	005	001	001	0	0	001	0	100
Vakcinos patologijos centras	V	326	5367	195	24	35	76	51	37	19	2	4	0	0	5366
	%	545	912	201	043	06	119	009	006	003	0	001	0	0	100
Šviso	v	1689	29132	765	144	242	335	212	362	57	5	7	134	2	33116
	%	506	908	231	044	075	112	006	011	002	000	000	004	000	1000

3.4 Dalytos medžiagos tyrimo fazė

Dalytos medžiagos tyrimo fazėje prieš pradėdant tyrimą buvo atlikti tyrimo dalyvavusių gyd. akušerių-ginekologų mokymai. Buvo patobulintos jų žinios, kaip paimti gimdos kaklelio medžiagos Pap tepinėliui paruošti.

- Gimdos kaklelio citologinė medžiaga buvo imama praėjus 2 savaitėms nuo pirmosios paskutinių mėnesinių dienų, optimaliausia 10-20 mėnesinių ciklo dieną, siekiant išvengti PAP tepinėlio užteršimo krauju.
- 48 val. prieš paimant gimdos kaklelio citologinės medžiagos moterys turėjo nenaudoti tamponų, intravagininų preparatų, vengti lytinių santykių ir neplauti makšties.

Tepinėlio ruošimo instrukcijos (1 priedas) ir informuoto asmens sutikimo formos (2 priedas) buvo įteiktos gydytojams akušeriams-ginekologams.

Dalytos medžiagos tyrimo fazėje (n=1500) buvo pakviestos ir įtrauktos į tyrimą 30-60 metų amžiaus moterys, atėjusios profilaktiškai pasitikrinti pagal Atrankinės patikros dėl gimdos kaklelio patologijos programą į Vilniaus Centro, Karoliniškių Vilniaus raj., Centrinę poliklinikas, nenėščios. Moterys gydytojų ginekologų buvo informuotos apie vykdomą tyrimą, jo naudą ir galimas pasekmes. Raštiška informuoto asmens sutikimo forma buvo pasirašyta kiekvienos įtrauktos į tyrimą moters. 17 pav. pateikta tyrimo eiga.

Pirmosioms 1500 moterų buvo imama citologinės medžiagos nuo gimdos kaklelio paviršiaus *Rover Wallach Papette* šluotele ir vadovaujantis tepinėlio ruošimo instrukcija (1 priedas) ruošiamas įprastinis citologinis gimdos kaklelio tepinėlis. Iš likusios po tepinėlio paruošimo gimdos kaklelio medžiagos buvo ruošiama medžiaga *PapSpin* tyrimui. Tam šluotelė su paimta citologine medžiaga buvo įmerkiama į konteinerį su fiksuojamąja *PapSpin* skystąja terpe, paskalaujama, po to atsargiai nulaužiamas šluotelės kotelis ir šluotelė paliekama konteineryje, konteineris sandariai uždaromas. Konteineris buvo energingai 10 kartų pavartomas. Ant konteinerio priklijuotoje etiketėje buvo nurodoma pacientės vardas, pavardė, gimimo metai, gydymo įstaiga. Taip pat buvo užpildomas siuntimas „Operacinės ir biopsinės medžiagos siuntimas tirti Nr. 014/a (1 priedas). Moterų citologiniai gimdos kaklelio tepinėliai ir tų pačių moterų gimdos kaklelio citologinė medžiaga, esanti *PapSpin* skystosios terpės konteineryje, pridėjus užpildytą siuntimą tirti Nr.014/a ir raštišką moters sutikimo formą buvo siunčiama į VPC iširti.

17 pav. Tyrimo eiga

Dalytos medžiagos tyrimo fazė

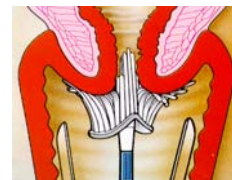


↓
 Įprastinis citologinis
 tepinėlis

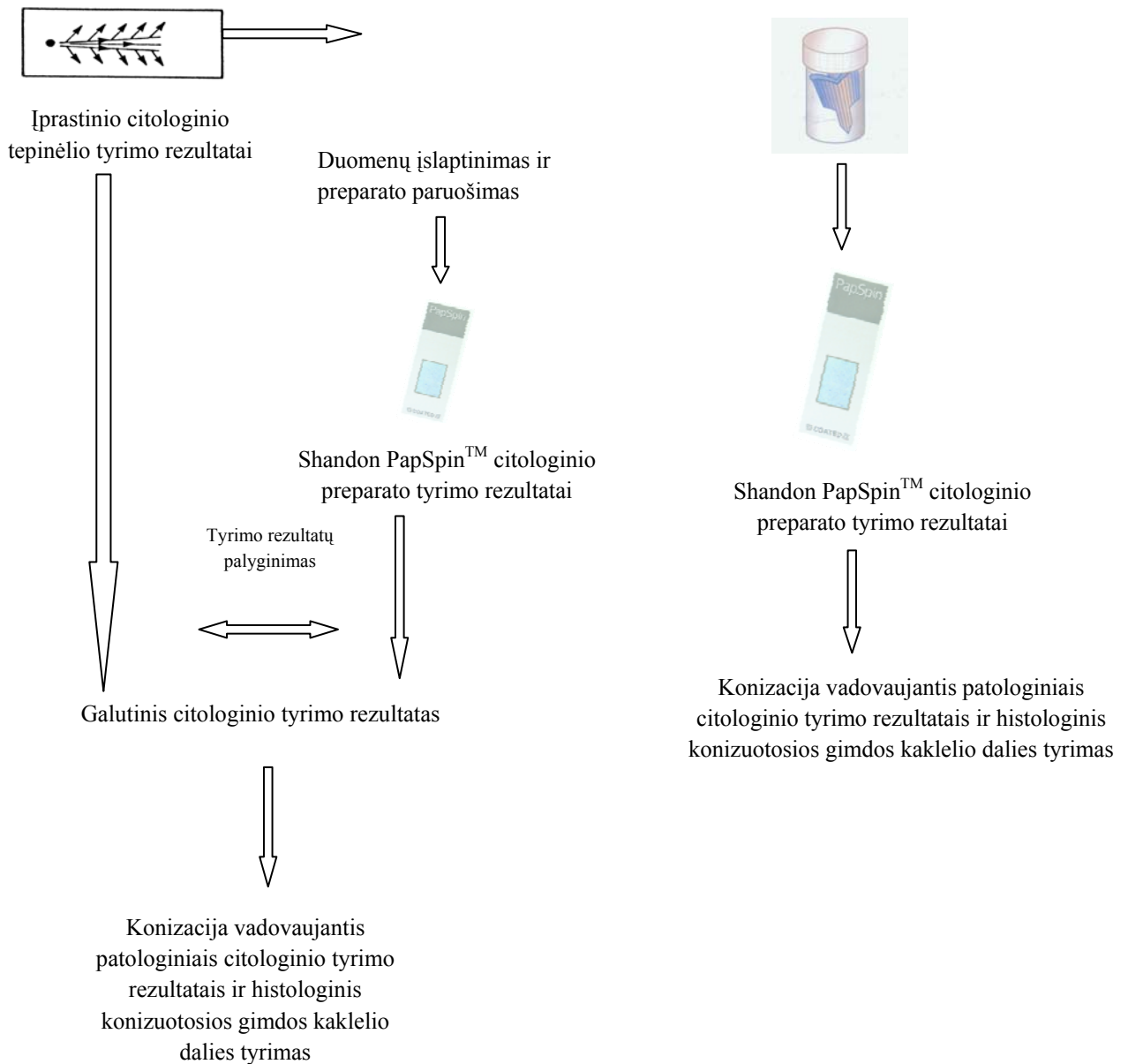
Shandon PapSpin™ skystojoje
 terpėje fiksuota citologinė
 medžiaga



Nedalytos medžiagos tyrimo fazė



↓
 Shandon PapSpin skystojoje terpėje
 fiksuota citologinė medžiaga



Valstybiniame patologijos centre citologinis gimdos kaklelio tepinėlis buvo registruojamas *Pathis* duomenų bazėje, jam suteikiamas tyrimo numeris. Tepinėlis buvo dažomas vadovaujantis Papanicolaou dažymo metodikos modifikacija, galiojančia VPC. Po to buvo atliekamas mikroskopinis ištyrimas. Ištyrimo metu buvo vertinama:

- Preparato fonas.
- Mikroorganizmai.
- Ląstelinė tepinėlio sudėtis.

- Matomi ląstelių pakitimai.
- Transformacijos zonos elementų buvimas.
- Priemaišų kiekis.
- Dažymo kokybė, tepinėlio storis, džiūvimo ore artefaktai.

Buvo daroma išvada apie tepinėlio tinkamumą citologiniam tyrimui. Vadovaujantis 2001m. Bethesda sistema (4 priedas) buvo padaroma diagnostinė išvada. Tyrimo atsakymas buvo sulaikomas iki *PapSpin* skystojoje terpėje fiksuotos medžiagos preparato citologinio tyrimo atsakymo.

PapSpin terpė, kurioje fiksuota gimdos kaklelio medžiaga, buvo registruojama atskirai nuo įprastinio tepinėlio. Ji buvo registruojama „*Shandon PapSpin* tyrimo efektyvumo įvertinimo projektas“ tyrimų registracijos žurnale, mėginiui buvo suteikiamas tyrimo numeris. Šis tyrimo numeris buvo užrašomas ir skystosios *Shandon PapSpin* terpės su citologine medžiaga konteinerio etiketėje. Tyrimo registracijos numeris buvo užrašomas ir *PapSpin* objektinio stiklelio šlifuitoje dalyje. Žymėtas objektinis stiklelis buvo įstatomas į specialią megapiltuvėlio vietą *Shandon Cytospin* centrifugoje taip, kad pažymėta stiklelio pusė būtų atsukta į megapiltuvėlio mėgintuvėlį. Ląstelių densitometru *CytoCheck* buvo atliekamas ląstelių tankio matavimas. Nustačius, kad ląstelių tankis per didelis atlikti citologiniam tyrimui, megapiltuvėlio turinys buvo atskiedžiamas fiksatoriumi, žr. 3 lentelę.

3 lentelė. *PapSpin* fiksuojamosios terpės ir reikiamos ištirti medžiagos kiekio priklausomybė nuo ląstelių tankio

Mėginio ląstelių tankio įvertinimo duomenys densitometro ekrane	Mėginio, kurio turi būti pilama į megapiltuvėlio mėgintuvėlių, tūris	<i>PapSpin</i> fiksatoriaus, kurio turi būti pilama į megapiltuvėlio mėgintuvėlių, tūris
Per didelis ląstelių tankis	0,2 ml	1,8 ml
Didelis ląstelių tankis	0,2 ml	1,8 ml
0,2 ml	0,2 ml	1,8 ml
0,3 ml	0,3 ml	1,7 ml
0,4 ml	0,4 ml	1,6 ml
0,5 ml	0,5 ml	1,5 ml
0,6 ml	0,6 ml	1,4 ml
0,7 ml	0,7 ml	1,3 ml
0,8 ml	0,8 ml	1,2 ml
0,9 ml	0,9 ml	1,1 ml
1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml
1,1 ml	1,1 ml	0,9 ml
1,2 ml	1,2 ml	0,8 ml
1,3 ml	1,3 ml	0,7 ml
1,4 ml	1,4 ml	0,6 ml
1,5 ml	1,5 ml	0,5 ml
1,6 ml	1,6 ml	0,4 ml
1,7 ml	1,7 ml	0,3 ml
1,8 ml	1,8 ml	0,2 ml
1,9 ml	1,9 ml	0,1 ml
2 ml	2,0 ml	Fiksatoriaus nepilama
3 ml	2,0 ml	Fiksatoriaus nepilama
4 ml	2,0 ml	Fiksatoriaus nepilama
5 ml	2,0 ml	Fiksatoriaus nepilama
Mažas ląstelių tankis	2,0 ml	Fiksatoriaus nepilama

Mėginio ląstelių tankio matavimas ląstelių densitometru *CytoCheck*:

1. *PapSpin* terpė suplakama (ne trumpiau kaip 10-15 sekundžių). Palaukiama keletą sekundžių, kol išnyks plakimo metu susidarę oro burbuliukai ir mėginys taps homogeniškas.
2. Nedelsiant konteineris su *PapSpin* terpe, kurioje fiksuota gimdos kaklelio citologinė medžiaga, įstatomas į *CytoCheck* prietaisą (negalima delsti per ilgai, nes ląstelės greitai nusėda ant konteinerio dugno). Šluotelės smailus

kraštelis turi būti atsuktas į prietaiso raudonąją zoną, nes tik tokioje padėtyje šluotelė nedaro įtakos matavimo rezultatams.

3. Prietaiso ekrane atsiranda mėginio ląstelių tankio įvertinimo duomenys.

Megapiltuvėlio mėgintuvėlio užpildymas mėginiu:

1. *PapSpin* konteineris su mėginiu švelniai pajudinamas (mėginys homogenizuojamas) ir nuo konteinerio dugno mikrodozatoriumi paimamas reikiamas mėginio tūris vadovaujantis 3 lentelės duomenimis.
2. Mėginys per piltuvėlio formos griovelį supilamas į mėgintuvėlį.
3. Į mėgintuvėlį įpilamas reikiamas *PapSpin* fiksatoriaus kiekis arba *PapSpin* fiksatoriaus nepilama.
4. Mėgintuvėlis uždaromas dangteliu.
5. Megapiltuvėlis atsargiai (taip, kad mėginys nesukontaktuotų su objektiniu stikleliu) įstatomas į citocentrifugos rotorių. Mėginys centrifuguojamas 5 min. 1250 aps./min. (rpm) greičiu.
6. Pasibaigus centrifugavimui iš megapiltuvėlio atsargiai (taip, kad supernatantas nesukontaktuotų su objektiniu stikleliu) išimamas objektinis stiklelis su plonasluoksniu tepinėliu.
7. Objektinis stiklelis kuo skubiau horizontalioje padėtyje dedamas ant transportavimo padėklo.
8. Paruoštas preparatas nedelsiant fiksuojamas pamerkiant jį į 96 % etilo alkoholių 10 min. ir Papanicolaou būdu dažomas automatizuotu dažymo aparatu pagal VPC galiojančius standartus: „Papanicolaou dažymo metodas, pritaikytas MEDITE COT 20 dažymo automatiui”.

Paruošti preparatai buvo tiriami mikroskopu. Tyrimo metu buvo vertinami analogiški parametrai kaip ir tiriant paprastą tepinėlį (mikroorganizmai, ląstelinė preparato sudėtis, priemaišos, paruošto preparato storis, fiksacija, nusidažymo kokybė). Buvo padaroma išvada dėl preparato tinkamumo citologiniam tyrimui. Vadovaujantis 2001m. Bethesda citologinių diagnozių

sistema (1priedas) įvertinus tyrimo mikroskopu metu matomus komponentus buvo padaroma diagnostinė išvada. Tyrimo rezultatai įrašomi į *PapSpin* citologinio tyrimo duomenų rinkimo anketa (4 priedas). Darbo dienos pabaigoje buvo sulyginami *PapSpin* ir įprastinio tepinėlio tyrimo rezultatai. Jeigu šio lyginimo metu paaiškėdavo, kad abiejų tyrimų rezultatai sutampa, įprasto tepinėlio atsakymas buvo siunčiamas tyrimą užsakiusiam gydytojui, tačiau jeigu *PapSpin* tyrimo rezultatai parodydavo didesnę pažeidimo laipsnį nei įprastas tepinėlis, tai įprasto tepinėlio atsakymas buvo formuluojamas pagal didesnę patologijos laipsnį.

3.5 Nedalytos medžiagos tyrimo fazė

Nedalytos medžiagos tyrimo fazėje į tyrimą buvo įtrauktos 1445 moterys. Patikrinimo metu, paėmus gimdos kaklelio ląstelių, įprastas citologinis tepinėlis nebuvo ruošiamas. *Wallach Papette* šluotelė su visa joje esančia citologine medžiaga buvo merkiama į *PapSpin* skystąją terpę, esančią konteineriulyje, ir paskalaujama. Šluotelės kotelis buvo atsargiai nulaužiamas ir šluotelė paliekama konteineriulyje. Konteineris buvo energingai 10 kartų pavartomas. Ant konteinerio priklijuotoje etiketėje buvo nurodoma pacientės vardas, pavardė, gimimo metai, gydymo įstaiga. Taip pat buvo užpildomas siuntimas „Operacinės ir biopsinės medžiagos siuntimas tirti Nr. 014/a (1 priedas). *PapSpin* skystosios terpės konteineris, pridėjus užpildytą siuntimą tirti Nr.014/a ir raštišką moters sutikimo formą buvo siunčiama į Valstybinį patologijos centrą ištirti.

Valstybiniame patologijos centre gauta medžiaga buvo registruojama „Pathis“ duomenų bazėje. Kiekvienos moters *PapSpin* skystajai terpei su gimdos kaklelio medžiaga, esančia konteineriulyje, buvo suteikiamas tyrimo numeris. Pagal ankščiau aprašytą *PapSpin* mėginių paruošimo mikroskopiniam ištyrimui eigą buvo ruošiami *PapSpin* preparatai. Šie preparatai buvo dažomi Papanicolaou dažymo metodu kaip ir dalytos medžiagos tyrimo fazėje.

Preparatai buvo tiriami mikroskopu. Mikroskopinio tyrimo metu buvo vertinama ląstelinė preparato sudėtis ir ląstelių kiekis, priemaišų kiekis, preparato storis ir nusidažymas. Buvo įvertinamas preparato tinkamumas citologiniam tyrimui. Vadovaujantis 2001m. Bethesda citologinių diagnozių sistema (4 priedas) buvo padaroma diagnostinė išvada iš mikroskopinio tyrimo metu matomų preparate ląstelių vaizdo. Mikroskopinio tyrimo radiniai ir tyrimo rezultatai buvo registruojami „Pathis“ duomenų bazės elektroninio tyrimo formoje.

Vadovaudamasis gautais citologinio tyrimo rezultatais gydytojas akušeris-ginekologas pasirinkdavo pacientės stebėsenos taktiką (1priedas). Moterims, kurioms citologinė išvada būdavo ASC-US, LSIL, buvo atliekami pakartotiniai citologiniai gimdos kaklelio tyrimai ir ŽPV DNR ištyrimas, moterims, kurioms būdavo nustatyta ASC-H, HSIL, piktybinio naviko išvada, buvo siunčiamos patikslinti diagnozę ir gydytis į VUOI ir VUSL. Šiose gydymo įstaigose atlikus gimdos kaklelio biopsiją ar konizaciją histologinė gimdos kaklelio medžiaga, fiksuota 10% buferinio formalino tirpalu, buvo pristatoma ištirti į Valstybinį patologijos centrą. Konizuotosios gimdos kaklelio dalies histologinis ištyrimas buvo atliekamas tokia tvarka:

1. Medžiagos priėmimo skyriuje konizuotoji gimdos kaklelio dalis (konusas ar fragmentuotas konusas) buvo apžiūrimas, išmatuojamas.
2. Buvo aprašomi akimi matomi gimdos kaklelio gleivinės ir transformacijos zonos pokyčiai .

Gimdos kaklelio medžiagos makroskopinio separavimo procedūra:

3. Gimdos kaklelio konusas buvo atveriamas išilgai (ties 12 val.), išskleidžiamas ir fiksuojamas.
4. Buvo daromi 0,3-0,5 cm storio išilginiai pjūviai– ne mažiau kaip 3 iš kiekvieno kvadranto (ties 12-3, 3-6, 6-9, 9-12 val.). Tirti buvo paimama visa medžiaga.
5. Kiekvienas pjūvis buvo dedamas į atskirą kasetę eilės tvarka. Medžiaga kasetėse buvo fiksuojama *ThermoShandon* audinių procesoriumi pagal Valstybiniame patologijos centre galiojančią tvarką. Mikroskopiniam

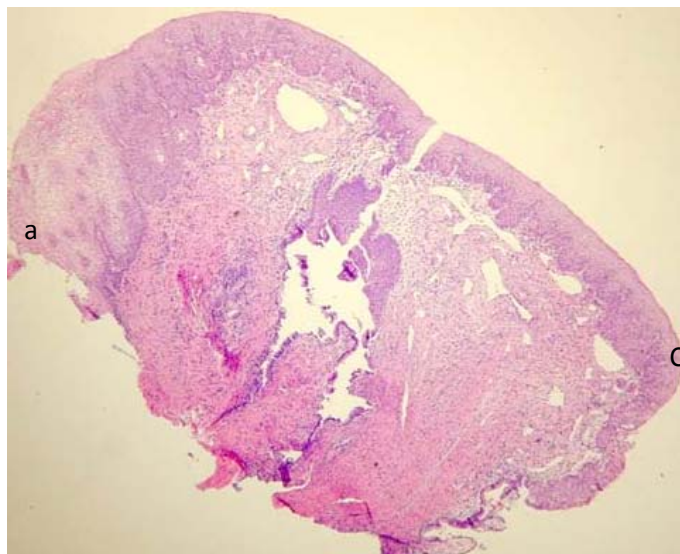
tyrimui buvo ruošiami šeši 3 µm storio parafininiai pjūviai iš 3 mėginio lygių. Parafininiai pjūviai dažyti pagal standartinę H&E dažymo metodiką.

6. Gimdos kaklelio biopsijų medžiaga tirta visa. Iš jos ruošti preparatai aukščiau aprašyta tvarka.

Buvo atliekamas paruoštų preparatų mikroskopinis histologinis ištyrimas (18 pav.). Gimdos kaklelio patologijos išvada formuluota vadovaujantis 2003 m. PSO krūtų ir moters genitalijų piktybinių navikų klasifikacijos sistema ir 3 laipsnių gimdos kaklelio intraepitelinės neoplazijos CIN sistema (4 priedas).

Histologinio tyrimo išvadoje buvo įvertinama:

- CIN laipsnis.
- CIN lokalizacija ekscizinės biopsijos medžiagoje.
- Ar židinytis multifokalinis, ar ne.
- CIN židinio dydis (jeigu rastas inavazinis gimdos kaklelio vėžys, tuomet buvo išmatuojamas jo horizontalus ir vertikalus diametras, būtinas nustatant gimdos kaklelio vėžio stadiją.
- Gimdos kaklelio stromos reakcija.
- Kraujagyslių pažeidimas.
- Operacinio pjūvio kraštų audinių pažeidimas.



18 pav. Konizuotosios gimdos kaklelio dalies histologinis ištyrimas. H&E x 40. a) egzocervikinis operacinio pjūvio kraštas; b) gilusis operacinio pjūvio kraštas; c) endocervikinis operacinio pjūvio kraštas

- Kiti gerybiniai gimdos kaklelio radiniai (tubinė metaplazija, mikroliaukinė hiperplazija, endometriozė, regeneraciniai ir reparaaciniai gimdos kaklelio epiteliai).
- Kai buvo nustatomas invazinis gimdos kaklelio navikas, tyrimo išvadoje pateikiamas jo horizontalus ir vertikalus matmuo. Naviko stadija.
- Aprašomi atliktų histocheminių ir imunohistocheminių reakcijų rezultatai.

3.6 ŽPV ištyrimas

ŽPV tyrimams PGR metodu, kurie buvo atliekami VUOI, buvo atrinktos *PapSpin skystosios* terpės (tiriamoji grupė) su citologine medžiaga 160 moterų, kurioms gimdos kaklelio skystosios terpės preparato, gauto panaudojant *PapSpin* technologiją, citologinio tyrimo metu nustatyti citologiniai pakitimai, tai yra atipinės plokščiojo epitelio ląstelės (ASC), intraepiteliniai plokčialąsteliniai pakitimai (SIL) ar vėžys (SCC). Kartu į VUOI buvo siunčiamas tos pačios moters *PapSpin* terpės numerį atitinkantis kontrolinis gimdos kaklelio citologinės medžiagos mėginys PBS terpėje (kontrolinė grupė). Tokių mėginių buvo 16. Iš viso tiriamojo darbo metu PGR metodu ištirtas 171 citologinės medžiagos mėginys.

Žmogaus papilomos virusui ištirti buvo naudotos ląstelės, paimtos nuo gimdos kaklelio transformacijos zonos. Vizito pas ginekologą metu iš pacientės gimdos kaklelio buvo paimami 2 mėginiai. Pirmajam citologinės medžiagos mėginiui paimti buvo naudojama *Wallach Papette* šluotelė ir transportinės terpės komplektas: žymėtas *PapSpin* konteineris su *PapSpin* fiksuojamąja terpe. Šluotelė su paimta citologine medžiaga buvo įmerkiamą į konteinerį su skystąja *PapSpin* terpe, paskui atsargiai nulaužiamas šluotelės kotelis, šluotelę

paliekant konteineryje. Kiekvienam mėginiui buvo suteiktas individualus tyrimo numeris. Medžiaga tyrimui imta ne mėnesinių metu, 10–20 ciklo dieną. Iki tyrimo pradžios medžiaga buvo laikoma specialiame konteineryje kambario temperatūroje (18–20°C). Antrasis citologinės medžiagos mėginys imtas *PapSpin* terpės ŽPV tyrimui patikrinti. Ląstelėms paimti naudotas sterilios šluotelės ir mėgintuvėlio su 0,5 ml transportinės terpės PBS komplektas. Šluotelė su paimta citologine medžiaga buvo merkiama į PBS terpę, paskalaujama joje ir atsargiai nulaužus jos kotelį paliekamas mėgintuvėlyje. Iki ŽPV tyrimo medžiaga buvo saugoma -20°C temperatūroje.

ŽPV nustatymas naudojant DNR pagausinimo metodą. Naudojant polimerazės grandininės reakcijos su žmogaus papildomos viruso bendraisiais pradmenimis metodą, buvo nustatoma, ar tiriamoje citologinėje medžiagoje yra ŽPV DNR. Naudoti MY09/MY11 pradmenys (4 lent.).

4 lentelė. PGR pradmenys MY09 ir MY11 ŽPV DNR nustatyti

Pradmuo	Seka (5'→3')	Gausinamasis produktas (bp)
MY09	5'→CGT-CCM-ARR-GGA-WAC-TGA-TC →3'	450 bp
MY11	5'→GCM-CAG-GGW-CAT-AAY-AAT- GG→3'	450 bp

*Kur M=C arba A, R=G arba A, W=T arba A, Y=T arba C.

Atliekant PGR, tiriamoji medžiaga ruošta keliais etapais. *PapSpin* terpėje esanti citologinė medžiaga, prieš atliekant DNR išskyrimą, buvo papildomai nuplaunama PBS buferiniu tirpalu (pH=7.4), visi centrifugavimai atliekami 20-23°C temperatūroje:

1. Iš *PapSpin* terpės paimama 2 ml ląstelių suspensijos ir centrifuguojama 10 minučių esant 2000 aps./min. (RCF=2880);
2. Supernatantas nupilamas. Ant dugne likusių ląstelių užpilama 500 µl PBS buferinio tirpalo lengvai jas papipetuojuant;
3. Centrifuguojama 5 minutes esant 2000 aps./min. (RCF=2880);

4. Supernatantas nupilamas. Ant dugne likusių ląstelių užpilama 500 µl PBS buferinio tirpalo jas pipetuojant;
5. Centrifuguojama 5 minutes esant 2000 aps./min. (RCF=2880);
6. Supernatantas nupilamas ir, jeigu reikia, pridedama PBS buferinio tirpalo. DNR išskirti naudojama 200 µl nuplautų ląstelių.

Citologinė medžiaga, kurią ginekologai merkė tiesiai į mėgintuvėlį su PBS buferiniu tirpalu papildomai ruošiama nebuvo. Iš mėgintuvėlio buvo išimama palikta šluotelė, o likusi citologinė medžiaga naudojama tolesniems tyrimams.

DNR buvo išskirta naudojant Genominės DNR išskyrimo rinkinį (*Genomic DNA Purification Kit*, AB Fermentas) pagal gamintojo rekomendacijas ir kolonėlių metodu išskyrimui naudojant Genominės DNR išskyrimo rinkinį (*SorpoCleanTM Genomic DNA Extracion Module*, SORPO Diagnostics) pagal gamintojo rekomendacijas.

DNR išskyrimo protokolas naudojant AB Fermentas Genominės DNR išskyrimo rinkinį:

1. Sumaišoma 200 µl ląstelių suspensijos ir 400 µl lizavimo tirpalo, inkubuojama vandens vonelėje 10 min. 65° C temperatūroje.
2. Pridedama 600 µl chloroformo, švelniai suplakama, kol pasidaro vientisa emulsija, centrifuguojama 5min. mikrocentrifugoje esant 14000 aps./min. (RCF=20160).
3. Iš 10-kartinio nusodinimo (precipitacijos) tirpalo paruošiamas darbinis tirpalas, sumaišant 80 µl 10-kartinio nusodinamojo tirpalo ir 720 µl sterilaus dejonizuoto vandens.
4. Viršutinė vandeninė centrifugato dalis labai atsargiai perkeliama į paruoštą nusodinimo tirpalą, švelniai sumaišoma, kelias minutes paliekama kambario temperatūroje, o tada centrifuguojama 5min. esant 14.000 aps./min. (RCF=20160).

5. Supernatantas nupilamas, susiurbiami visi likučiai ir likusi DNR ištirpinama 100 µl 1,2M NaCl tirpalo švelniai suplakant. Vizualiai patikrinama, ar esanti DNR visiškai ištirpo.
6. Pridedama 300 µl šalto etanolio (96%), DNR inkubuojama 20val. - 20° C temperatūroje. Išimti po inkubacijos mėginiai centrifuguojami 5min. esant 14000 aps./min. (RCF=20160). Supernatantas pašalinamas. Nuosėdos plaunamos 75% etanoliu ir tirpinamos 100 µl sterilaus dejonizuoto vandens lengvai suplakant. Vizualiai patikrinama, ar DNR ištirpo.

DNR išskyrimo protokolas naudojant kolonėlių metodą (SORPO Diagnostics):

1. Laštelių lizė (suardymas):

- Mėginiai turi būti kambario temperatūros (15 – 20°C);
- Į 1,5 ml mikrocentrifuginį mėgintuvėlį įpilama 20µl proteinazės K;
- Įpilama 200 µl mėginio;
- Įpilama 200 µl lizės tirpalo;
- 10 sekundžių maišoma tolygiai purtant, kol gaunamas homogeninis tirpalas;
- 2 s centrifuguojama, kad pasišalintų lašeliai nuo mėgintuvėlio dangtelio vidaus;
- 10 minučių mėginiai inkubuojami 56°C vandens vonelėje, purtant kas porą minučių.

2. Medžiagos perkėlimas ant kolonėlės:

- Išėmus mėginius iš vandens vonelės, į kiekvieną mėginį pridedama po 230 µl etanolio (96-100%);
- 10 sekundžių mėginiai maišomi tolygiai purtant;
- Mišinys atsargiai perkeliamas iš kiekvieno mėgintuvėlio į iš anksto pasiruoštas kolonėles (jos yra 2 ml surinkimo mėgintuvėliuose);

- Kolonėlės dangtelis uždaromas ir mėginiai centrifuguojami 1 minutę esant 6000xg apsisukimų;
- Apatinis mėgintuvėlis su filtratu išmetamas, o kolonėlė perkeliama į švarų 2 ml surinkimo mėgintuvėlį. Jeigu centrifuguojant ne visas lizatas persifiltravo pro kolonėlę, ji centrifuguojama dar kartą esant didesniems apsisukimams.

3. Plovimas:

- Kolonėlė atidaroma ir pridedama 0,5 ml praskiesto **plovimo buferinio tirpalo 1**;
- Dangtelis uždaromas ir mėginiai centrifuguojami 1 minutę esant 6000xg apsisukimų;
- Apatinis mėgintuvėlis su filtratu išmetamas, kolonėlė įdedama į švarų 2 ml surinkimo mėgintuvėlį;
- Atidaromas kolonėlės dangtelis ir pridedama 0,5 ml praskiesto **plovimo buferinio tirpalo 2**;
- Kolonėlės dangtelis uždaromas ir centrifuguojama 3 minutes esant maksimaliam greičiui (20000xg);
- Apatinis surinkimo mėgintuvėlis su filtratu išmetamas, o kolonėlė įdedama į iš anksto pasiruoštą 1,5 ml surinkimo mėgintuvėlį.

4. DNR išplovimas:

- Kolonėlė atidaroma ir į ją pripilama 100µl iki 70° C pašildyto **plaunamojo buferinio tirpalo**;
- Kolonėlės dangtelis uždaromas ir mėginiai inkubuojami 2 minutes kambario temperatūroje;
- Po inkubacijos centrifuguojama 1 minutę esant 6000xg apsisukimų;
- Išplovimo procedūra pakartojama dar kartą nekeičiant apatinio surinkimo mėgintuvėlio;

- PGR naudojama 5–10 μ l išskirtos DNR priklausomai nuo gautos DNR koncentracijos.

DNR koncentracijos matavimas biofotometru

Išskirtos DNR koncentracija buvo matuojama biofotometru (BioPhotometer, *Eppendorf*) VU Gamtos fakulteto Genetikos katedroje. Darbo eiga:

1. Mėginiai tolygiai supurtomi, lašai nuo sienelių pašalinami centrifuguojant;
2. Pasiruošiama 50 μ l 10 kartų praskiesto mėginio (skiedžiama distiliuotu vandeniu). Skiedimo pobūdis gali būti pasirenkamas priklausomai nuo to, kiek išskirtos DNR turima ir kad pakankamai liktų tolesniems tyrimams;
3. Paruošti mėginiai suvorteksuojami, pašalinami lašai nuo sienelių;
4. Visas mėgintuvėlio tūris perkeliamas į kiuvetę (*Eppendorf*).
5. Prieš statant kiuvetę į biofotometrą mėginio koncentracijai pamatuoti, nustatomi matavimo atskaitos taškai. Tai daroma į kitą kiuvetę įpylus tokį patį kiekį distiliuoto vandens ir ištačius ją biofotometrą;
6. Matuojama mėginio DNR koncentracija. Gautos reikšmės užrašomos.
7. Kitam mėginiui naudojama ta pati kiuvetė, prieš tai ją kelis kartus praplovus distiliuotu vandeniu.

Kitame etape buvo atliekamas išskirtos DNR pagausinimas PGR metodu. ŽPV nustatyti buvo naudoti bendrieji MY09 ir MY11 pradmenys (4 lent.), taip pat *REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix with MgCl₂* (SIGMA, USA). PGR tirpalo sudėtis: 20 mM Tris-HCl (pH 8.3), 100 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 0.002 % želatinos, 0,4 mM dNTP mišinio (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), stabilizatoriai, 0,06 vienetai (U/ μ l) Taq DNA polimerazės. PGR buvo

atliekama naudojant termociklerį (BIO-RAD, Vokietija), o programa pasirinkta pagal pasirinktus pradmenis.

DNR pagausinimas PGR reakcijos metu

1. Pasiruošiamas mišinys PGR reakcijai. Bendro reakcijos mišinio visų medžiagų kiekiai apskaičiuojami priklausomai nuo mėginių skaičiaus. Į vieną mėginį pilama 10–15 µl mišinio:
 - 10–11 µl REDTaq® ReadyMix™ reakcija su MgCl₂;
 - Po 1–2 µl pradmens MY09 ir pradmens MY11;
2. Į mėgintuvėlius supilstoma PGR reakcijos mišinio ir po 5–10 µl tiriamosios DNR, priklausomai nuo jos DNR koncentracijos. Reakcija atliekama esant 25 µl tūriui.
3. Paruošti mėgintuvėliai sudedami į PGR termociklerį ir nustatoma reikiama programa. Mūsų PGR programa truko 3 val. 30 min.:
 - Iš pradžių 93° C temperatūroje atliekamas vienas pradinės denatūracijos ciklas, kurio trukmė 3 min.
 - Toliau atliekama 40 ciklų, kurių kiekvieną sudaro:
 - 1 min. denatūracija 94°C temperatūroje,
 - 1 min. pradmens prisijungimas 55°C temperatūroje,
 - 1 min. 30 s pradmens prailginimas 72°C temperatūroje.
 - Pabaigoje 72°C temperatūroje atliekamas pradmens pratęsimo 1 ciklas, kuris trunka 5 minutes.

Pagausinti PGR produktai analizuojami naudojant elektroforezę. Elektroforezė atliekama 2% agarozės gelyje, dažytame etidžio bromidu. Elektroforezei imta 6 µl pagausinto PGR produkto ir leista į agarozės šulinėlį nepridedant papildomų dažų PGR produktui stebėti, nes į gamintojo PGR reakcijos mišinį dažų jau būdavo įdėta. Po elektroforezės etidžio bromidu dažyti produktai analizuoti transiliuminatoriuje (HEROLAB, Belgija ar Vokietija) naudojant UV šviesos šaltinį. Gauti rezultatai buvo nufotografuojami.

3.7 Statistinė analizė

Kiekybiniai kintamieji pateikiami kaip vidurkis ir standartinis nuokrypis, kategoriniai kintamieji pateikiami absoliutaus kiekio ir procentine išraiška. Įvertintas procentinis diagnostinis gimdos kaklelio tarpusavio tyrimų atitikimas panaudojus poros atitikimo analizę. Koreliacija tarp įprastinio tepinėlio tyrimų ir *PapSpin* metodu pagaminto preparato tyrimų nustatant gimdos kaklelio ikivėžinius pakitimus įvertinta naudojant kapa koeficientą (κ). Kapa koeficientas buvo apskaičiuotas naudojant dichotominę (teigiamą ir neigiamą) patologinių pokyčių klasifikaciją. Atitikimas, kai kapa koeficiento reikšmės 0,81-1, interpretuotas kaip puikus, 0,61-0,8 – geras, 0,41-0,6 – vidutinis, 0,21-0,4 – ribinis, mažiau kaip 0,2 – blogas.

Buvo apskaičiuota dalytos ir nedalytos medžiagos tyrimo fazės citologinių tyrimų jautrumas ir specifiškumas remiantis histologinio ir citologinio tyrimo metodų koreliacinėmis lentelėmis. Kaip teisingai teigiamą citologinę diagnozę nustatant HSIL vertinome, kai buvo histologiškai patvirtinta CIN2/CIN3/SCC ir piktybinio naviko patologija. Skirtumui tarp grupių įvertinti naudotas χ^2 . Apskaičiuoti pasikliautinieji intervalai. Skirtumas laikytas statistiškai reikšmingas, p sutampant su pasikliautiniu intervalu ar p įgaunant mažesnę nei 0,05 reikšmę. Diagnostiniam tyrimo tikslumui nustatyti buvo naudotos ROC kreivės, įvertinant plotą po kreive. Diagnostinė tyrimo vertė, kai plotas po kreive 0,9-1, interpretuotas kaip puikus, 0,8-0,9 –labai geras,0,7-0,8 – geras,0,6-0,7–patenkinamas,0,5-0,6 – nepakankamas.

Operacinio pjūvio kraštų būklės pažeidimui pooperacinei liekamajai ligai įvertinti apskaičiuotas tikimybių santykis (*angl. Odds ratio*) ir jo 95 proc. pasikliautinis intervalas. Tikimybių santykiu (TS) įvertinta liekamosios ligos po operacijos rizika priklausomai nuo operacinių kraštų pažeidimo. Statistinė analizė atlikta naudojant „Microsoft Excel“ (*Microsoft Corp., Redmond, WA, USA*) ir SPSS programos 13.0 versija (*SPSS Inc., Chicago, Ill, USA*).

4. Rezultatai

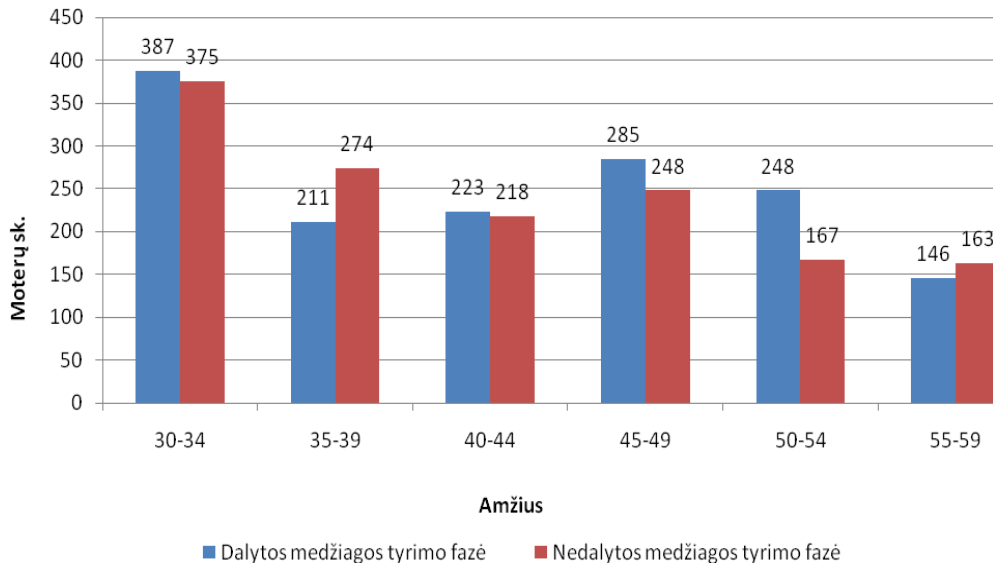
Į mūsų atliekamą tyrimą buvo įtraukta 2945 moterys. Visos tiramosios buvo sugrupuotos į šešias amžiaus grupes 5 metų intervalu. I moterų grupė – 30-34 metų amžiaus, II grupė – 35-39, III grupė – 40-44, IV – 45-49, V grupė – 50-54, VI grupė – 55-60 (5 lentelė). Vidutinis tyrime dalyvavusių moterų amžius buvo 42,4 metai, jauniausios buvo 30 metų, vyriausios – 60 metų (SD±9,0). Kaip matyti 5 lentelėje, daugiausia gimdos kaklelio citologinių tyrimų (25,9%) buvo atlikta 30-34 metų amžiaus grupėje, o 55-60 metų amžiaus moterų grupėje gerokai mažiau (10,5%).

5 lentelė. Atliktų tyrimų skaičius pagal amžiaus grupes tyrimo laikotarpiu

Amžiaus grupė	Amžius	Moterų, dalyvavusių tyrime, skaičius	%
I	30-34	762	25,9
II	35-39	485	16,5
III	40-44	441	15
IV	45-49	533	18,1
V	50-54	415	14,1
VI	55-60	309	10,5

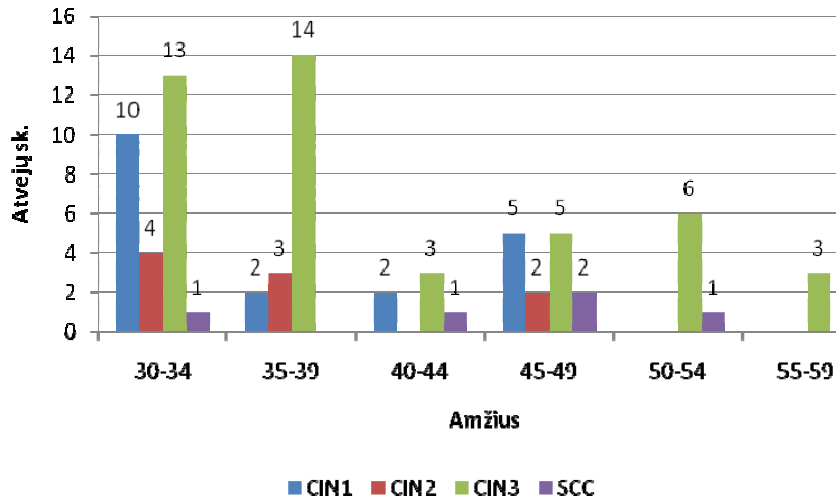
Abiejose mūsų tyrimo fazėse pasireiškė analogiškos dalyvavimo atrankinėje patikroje dėl gimdos kaklelio patologijos pagal amžiaus grupes tendencijos (19 pav.).

19 pav. Moterų dalyvavimas tyrime priklausomai nuo amžiaus grupių dalytos ir nedalytos medžiagos tyrimo fazėse



Iš viso tyrimo laikotarpiu buvo atlikta 4945 citologiniai gimdos kaklelio tyrimai. 189 (6,4 %) moterims citologinis tyrimas leido nustatyti patologijos atvejus. Nedalytos medžiagos tyrimo fazėje 1500 moterims buvo atliktas dvigubas citologinis ištyrimas: atlikta 1500 gimdos kaklelio citologinių tepinėlių ir 1500 *PapSpin* preparatų tyrimų. Dvigubo citologinio tyrimo rezultatai 104 (6,8%) moterims leido aptikti gimdos kaklelio patologiją. Daugiausia ikivėžinių CIN2/CIN3/CIS gimdos kaklelio pakitimų tyrimo laikotarpiu buvo nustatyta ir gydyta 30-40 metų amžiaus moterų grupėje (20 pav.), CIN1 patologija dažniau buvo diagnozuojama 30-34 metų amžiaus moterims.

20 pav. Diagnozuota ikinavikinė ir navikinė gimdos kaklelio patologija tyrimo laikotarpiu pagal pacienčių amžių



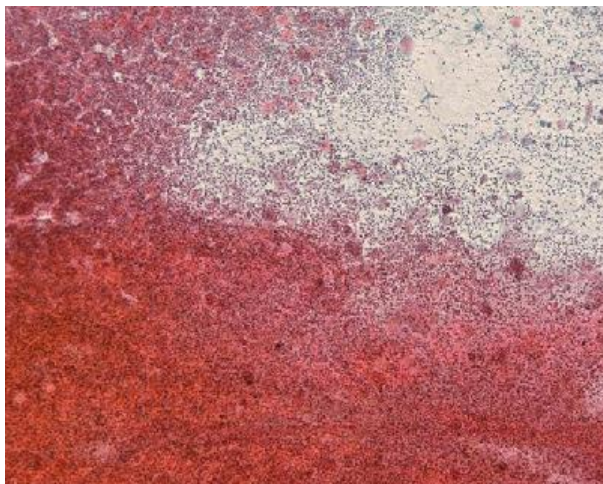
4.1 Dalytos medžiagos tyrimo fazės rezultatai

Analizuojant citologinius gimdos kaklelio įprastinius tepinėlius ir *PapSpin* preparatus pagal atitikimo citologiniam tyrimui kriterijus tarp jų nustatytas statistiškai reikšmingas skirtumas. Tiriant gimdos kaklelio ląsteles įprastinio tepinėlio metodu rasta 25 (1,7%) atvejai citologiniam tyrimui netinkamų tepinėlių, palyginti su 6 (0,4%) atvejais, nustatytais *PapSpin* būdu ($p=0,001$).

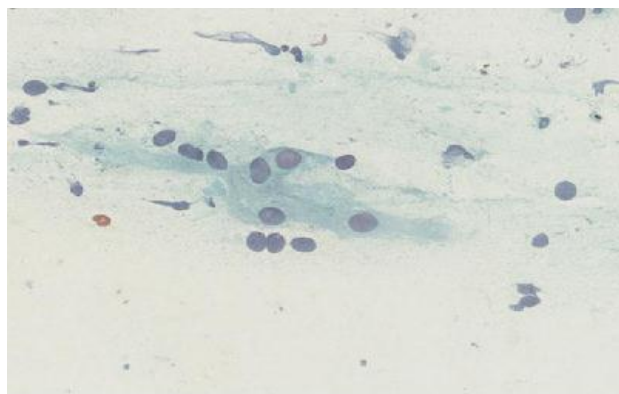
25 įprastinių tepinėlių netinkamumo citologiniam tyrimui priežastys:

1. 3 atv. – gausios priemaišos (kraujo, uždegimo eksudato), dėl to buvo neįmanoma įvertinti daugiau nei 75% epitelio ląstelių (21 pav.)
2. 14 atv. – džiūvimo ore artefaktai laiku nefiksavus tepinėlio (22 pav.)
3. 2 atv. – tepinėlio storumas
4. 6 atv. – nebuvimas reikiamo nustatyto minimalaus ne mažesnio kaip 8 000 plokščiojo epitelio ląstelių, paimtų nuo egzocervikinės gimdos kaklelio dalies, kiekio (23 pav.)

21 pav. Gausios priemaišos (kraujo ir uždegimo eksudato) gimdos kaklelio citologiniame tepinėlyje. Papanicolaou dažymo metodas. x 400



22 pav. Džiūvimo ore artefaktai laiku nefiksavus gimdos kaklelio tepinėlio. Papanicolaou dažymo metodas. x 400



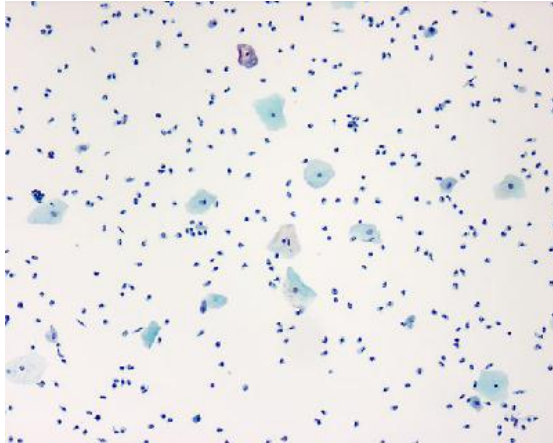
23 pav. Nepakankamas pokščiojo epitelio ląstelių kiekis tepinėlyje. X400



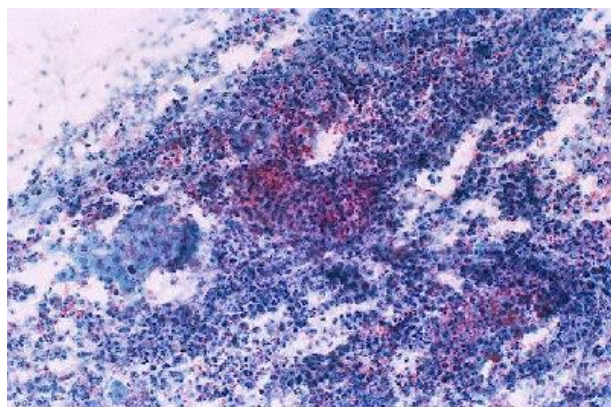
6 *PapSpin* preparatų netinkamumo citologiniam tyrimui priežastys:

1. 5 atv. - nepakankamas plokščiojo epitelio ląstelių, paimtų nuo egzocervikinės gimdos kaklelio dalies, ląstelių skaičius (24 pav.)
2. 1 atv. – gausus uždegimo eksudatas (neleido apžiūrėti daugiau nei 75 % gimdos kaklelio ląstelių) (25 pav.)

24 pav. Gausus uždegimo eksudatas. *PapSpin* preparatas. Papanicolaou dažymo metodas. x400



25 pav. Gausus uždegimo eksudatas. *PapSpin* preparatas. Papanicolaou dažymo metodas. x400



Skirtingas patologijos atvejų procentas buvo gautas tiriant gimdos kaklelio ląsteles įprastinio tepinėlio ir *PapSpin* metodu. Įprastinio tepinėlio metodas leido aptikti 6% patologijos atvejų, *PapSpin* – 5,3%. Dalytos medžiagos tyrimo fazės įprastinio tepinėlio ir *PapSpin* preparato tyrimų rezultatai pateikti 6 lentelėje.

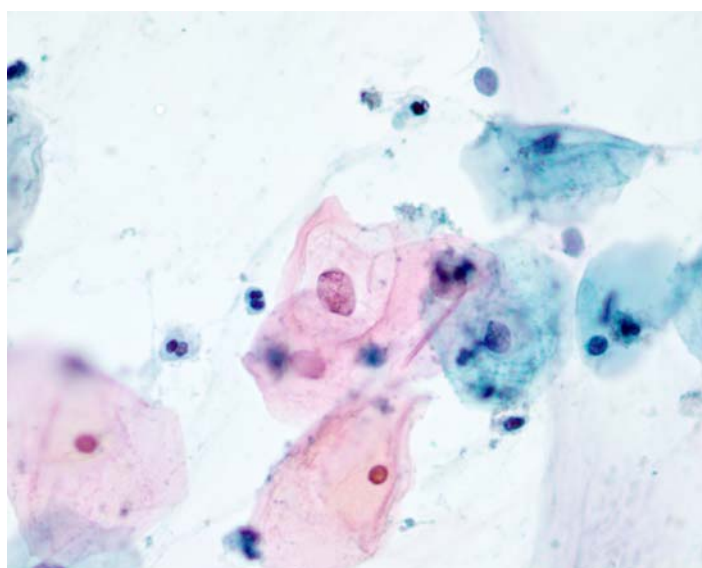
6 lentelė. Dalytos medžiagos tyrimo fazės įprastinio tepinėlio ir *PapSpin* preparato tyrimų rezultatai

Bethesda kategorija	I tyrimo fazė (n=1500)	
	Tepinėlis	<i>PapSpin</i>
	(%)	(%)
Nėra pakitimų	1387 (92,5)	1416 (94,5)
Tepinėlis netinkamas		
tirti	25 (1,7)	6 (0,4)
ASC-US	31 (2,1)	10 (0,7)
ASC-H	4 (0,3)	3 (0,2)
LSIL	20 (1,3)	29 (1,9)
HSIL	28 (1,9)	33 (2,2)
AGC	3 (0,2)	1 (0,1)
AIS	1 (0,1)	-

Plokščialąstelinė karcinoma	1 (0,1)	1 (0,1)
Skrandžio karcinomos metastazė	-	1 (0,1)
Iš viso	1500	1500

Dalytos medžiagos tyrimo fazėje didesnis ASC–US diagnozių skaičius buvo nustatytas įprastinio tepinėlio metodu – 31 atv. (2,1 %) nei *PapSpin* metodu – 10 atv. (0,7 %) ($p=0.001$). Rezultatas statistiškai reikšmingas. Didesnio ASC–US diagnozės skaičiaus priežastys buvo mechaniškai suardytos ląstelės ruošiant įprastinį tepinėlį, džiūvimo ore artefaktai laiku nefiksavus tepinėlio, mažas atipinių ląstelių kiekis (26 pav.).

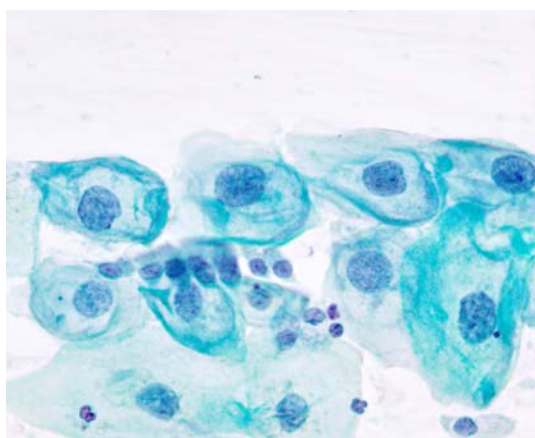
26 pav. Nenustatytos reikšmės atipinės plokščiojo epitelio ląstelės. Įprastinis tepinėlis. Papanicolaou dažymo metodas. x600



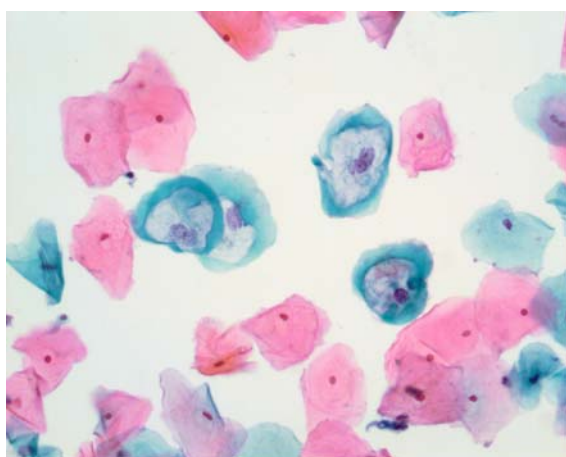
Didesnis LSIL atvejų skaičius buvo aptiktas tiriant gimdos kaklelio ląsteles *PapSpin* metodu – 29 atv. (1,9%), palyginti su 20 atv. (1,3%), nustatytų įprasto tepinėlio metodu, tačiau statistiškai patikimo skirtumo diagnozuojant šią patologiją nebuvo ($p=0,12$). Analizuojant įprastinio tepinėlio ir *PapSpin* metodu mikroskopiniam tyrimui paruoštas ląsteles, paaiškėjo, kad geresnę LSIL atvejų diagnostiką *PapSpin* preparatuose sąlygojo optimali ląstelių

fiksacija, leidžianti matyti pašviesėjimą apie ląstelių branduolį ir branduolio atipiją, kurią sąlygoja ŽPV infekcijos sukeltas ląstelių pažeidimas – koilocitai. 27 pav. pateiktos LSIL ląstelės, matomos tiriant įprastinį tepinėlį, 28 pav. – LSIL ląstelės, matomos *PapSpin* preparate.

27 pav. LSIL ląstelės, matomos citologiniame gimdos kaklelio tepinėlyje. Papanicolaou dažymo metodas. x 600



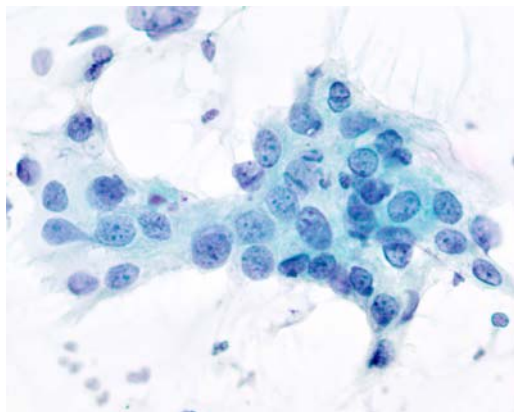
28 pav. LSIL ląstelės, matomos *PapSpin* metodu paruoštame preparate. Papanicolaou dažymo metodas. x 600



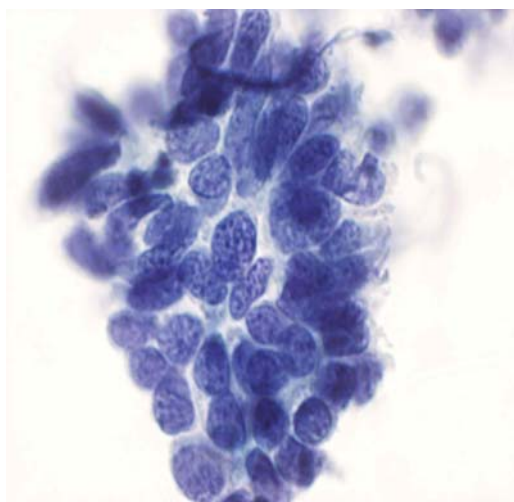
Dalytos medžiagos tyrimo fazėje įprastinio tepinėlio būdu nustatytas mažesnis HSIL ir piktybinių navikų atvejų skaičius – 28 (1,9%) nei *PapSpin* metodu – 33 (2,2%), tačiau šis skirtumas nėra statistiškai reikšmingas ($p=0,33$).

29 ir 30 pav. matomi mikroskopiniai HSIL skirtumai įprastiniame tepinėlyje ir *PapSpin* preparate.

29 pav. HSIL ląstelių *syncytio* klodas įprastiniame tepinėlyje. Papanicolaou dažymo metodas. X600



30 pav. *PapSpin* preparate matoma HSIL *syncytio* struktūra. Papanicolaou dažymo metodas. x 600



Nustatytas vienodas mikroorganizmų kiekis įprastame citologiniame tepinėlyje ir *PapSpin* preparate (7 lentelė).

7 lentelė. Patologiniai mikroorganizmai, nustatyti įprastinio tepinėlio ir *PapSpin* metodais dalytos medžiagos tyrimo fazėje

Patologinė mikroflora	Tepinėlis, atv.	<i>PapSpin</i> , atv.
<i>Trichomonas vaginalis</i>	6	6
<i>Candida albicans</i>	5	5
<i>Actinomyces spp.</i>	4	4
<i>Herpes simplex</i>	1	1
Kokobacilinė mikroflora – tikriausiai dėl bakterinės vaginozės	20	20

Gimdos kaklelio citologinių tepinėlių ir *PapSpin* preparatų tyrimų rezultatų sutapimas matomas 8 lentelėje. 95% tyrimų rezultatų sutapo.

8 lentelė. Įprastinio citologinio tepinėlio ir *PapSpin* preparatų tyrimo rezultatų sutapimas dalytos medžiagos tyrimo fazėje

<i>PapSpin</i>	Tepinėlis									Iš viso <i>PapSpin</i> preparatų
	Tyrimui netinka	Nėra pakitimų	ASC-US	ASC-H	LSIL	HSIL	AGC	AIS	SCC	
Netinka tyrimui	6	-	-	-	-	-	-	-	-	6
Nėra pakitimų	18	1371	20	1	1	2	2	1	-	1416
ASC-US	1	7	2	-	-	-	-	-	-	10
ASC-H	-	1	1	1	-	-	-	-	-	3
LSIL	-	4	7	-	18	-	-	-	-	29
HSIL	-	2	1	2	1	26	1	-	-	33
AGC	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1
Metastazinė skrandžio karcinoma	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1
Plokščialąstelinė karcinoma	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
Iš viso tepinėlių	25	1387	31	4	20	28	3	1	1	1500

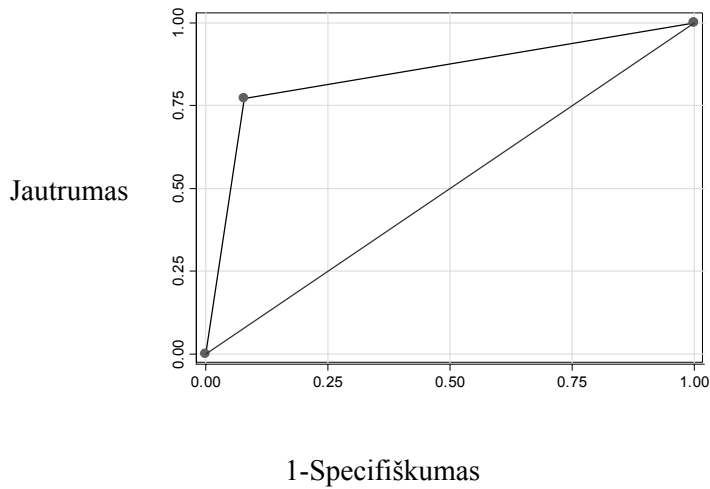
Apskaičiavus kappą koreliacijos koeficientą patvirtintas 0,87 (95% PI:0.81-0.92) puikus abiejų metodų rezultatų sutapimas. Dalytos citologinės gimdos kaklelio medžiagos tyrimo fazėje 81 moteriai, dalyvavusiai mūsų tyrime, buvo atliktas gimdos kaklelio dalies chirurginis pašalinimas. Tiriamųjų moterų gimdos kaklelio citologinių ir histologinių tyrimų palyginimas pateiktas 9 lentelėje. Dalytos medžiagos tyrimo fazėje įprasto tepinėlio ir *PapSpin* tyrimų jautrumas buvo 68,7% vs 78,1%, specifiškumas – 93,8% vs 91,8% atitinkamai. Teigiama įprastinio tepinėlio ir *PapSpin* tyrimų prognozinė vertė buvo statistiškai reikšmingai neskirtinga – 88,0% ir 86,2%. Taip pat nenustatytas neigiamos tyrimo prognozinės vertės statistiškai reikšmingas skirtumas – 82,1 vs 86,8 %. Citologinių ir histologinių tyrimų palyginimas pateiktas 9 lentelėje.

9 lentelė. Dalytos medžiagos tyrimo fazės tiriamųjų moterų gimdos kaklelio citologinio ir histologinio tyrimų palyginimas

Histologinė diagnozė	Įprastinis tepinėlis						
	Nėra pakitimų	ASC-US	ASC-H	LSIL	HSIL	AIS	SCC
Gerybiniai pakitimai	26	5	1	2	1		
CIN1		4		8	2		
CIN2				2			
CIN3/CIS	1	2	3		20	1	
Piktybinis navikas	2						1

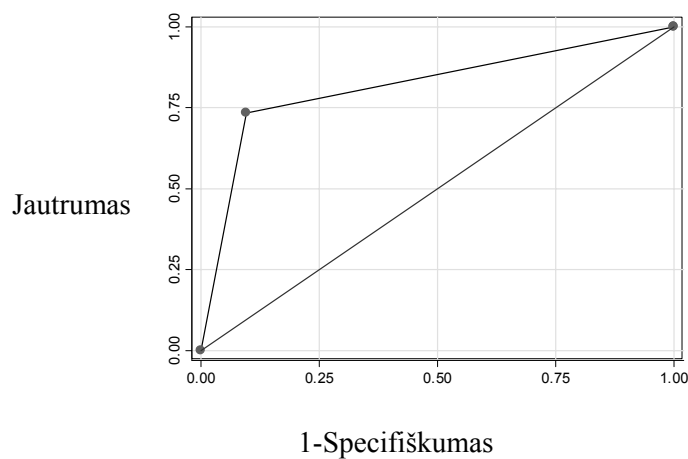
Histologinė diagnozė	PapSpin™						
	Nėra pakitimų	ASC-US	ASC-H	LSIL	HSIL	Karcinoma	SCC
Gerybiniai pakitimai	29	2		3	1		
CIN1	2	1		8	3		
CIN2				2			
CIN3/CIS	2		2		23		
Piktybinis navikas			1			1	1

31 pav. Dalytos medžiagos įprastinio tepinėlio tyrimo efektyvumo (ROC) kreivė



Plotas po kreive yra 0,8469 (95% PI: 0,78-0,91), kas rodo labai gerą tyrimo tikslumą (31 pav.).

32 pav. Dalytos medžiagos *PapSpin* preparato tyrimo efektyvumo (ROC) kreivė.



Plotas po kreive yra 0,8190 (95%PI:0,72-0,91), kas rodo labai gerą tyrimo tikslumą (32 pav.).

Palyginti su įprastiniais tepinėliais, *PapSpin* metodu paruošti preparatai yra optimalios fiksacijos, geros kokybės, kontroliuojamos laboratorijoje. Homogeniška ląstelių suspensija yra vienodai paskleidžiama objektinio

stiklelio plote. Nėra priemaišų – kraujo, uždegimo eksudato. Displazinių ląstelių ir audinių fragmentų morfologiniai požymiai su visais specifiniais diagnostiniais kriterijais yra identifikuojami. Mikroskopinis *PapSpin* preparato tyrimas yra mažiau varginantis nei įprastinio tepinėlio.

4.2 Nedalytos medžiagos tyrimo fazės rezultatai

Atlikti 1450 *PapSpin* preparatų tyrimai. Visa medžiaga buvo tiriama *PapSpin* metodu. Citologinis *PapSpin* metodu gautų preparatų tyrimas leido aptikti 85 (5,9 %) patologijos atvejus. Citologinio tyrimo rezultatai, gauti tyrimo metu, pateikti 10 lentelėje.

10 lentelė. Citologinio tyrimo rezultatai, gauti nedalytos medžiagos tyrimo metu

Bethesda kategorija	II tyrimo fazė (n=1445)
	<i>PapSpin</i> , %
Nėra pakitimų	1352 (94,5)
Preparatas netinkamas tirti	8 (0,6)
ASC-US	20 (1,4)
ASC-H	10 (0,7)
LSIL	22 (1,5)
HSIL	31 (2,1)
AGC	2 (0,1)
AIS	-
Plokščialąstelinė karcinoma	-
Iš viso	1445

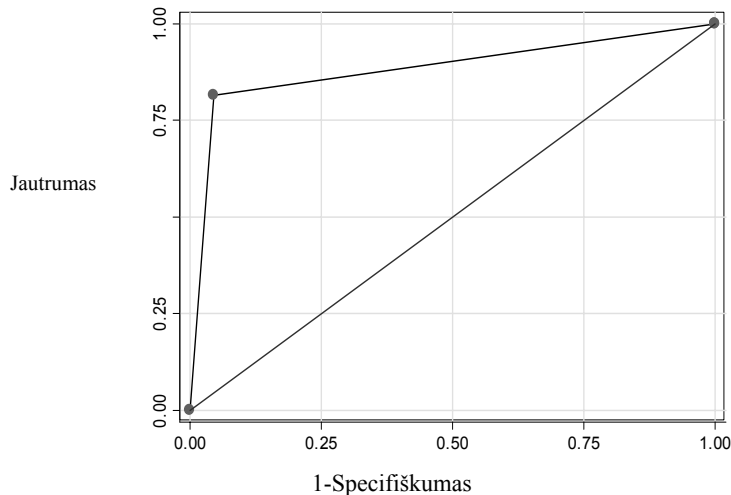
Nedalytos medžiagos tyrimo fazėje buvo aptikta 31 (2,1%) HSIL+ ir 22 (1,5%) LSIL atvejų skaičius, palyginti su dalytos medžiagos tyrimo fazės 28 (1,9) vs 20 (1,3). Mažas ASC-US ir ASC-H atvejų procentas – 1,4% ir 0,7% – iš esmės panašus kaip ir tiriant citologinę medžiagą dalytos medžiagos tyrimo fazėje *PapSpin* metodu – 0,7% ir 0,2% atitinkamai. Netinkamų preparatų procentas panašus kaip ir nedalytos medžiagos tyrimo fazėje – 0,6% ir 0,4% atitinkamai. Šis procentas tris kartus mažesnis nei netinkamų įprastinių tepinėlių dalytos medžiagos tyrimo fazėje.

Nedalytos medžiagos tyrimo fazės laikotarpiu buvo atlikta 60 gimdos kaklelio operacijų. Tiriamųjų moterų gimdos kaklelio citologinių ir histologinių tyrimų palyginimas pateiktas 11 lentelėje.

11 lentelė. Tiriamųjų moterų gimdos kaklelio citologinių ir histologinių tyrimų palyginimas nedalytos medžiagos tyrimo fazėje

Histologinė diagnozė	<i>PapSpin</i>						
	Nėra intraepitelių pakitimų	ASC-US	ASC-H	LSIL	HSIL	Karcinom a	Preparatas netinkamas tirti
Gerybiniai pakitimai	15	1	2	5	1		1
CIN1			1	4			
CIN2		1	1		5		
CIN3/CIS		1	3	1	16		
Karcinoma					1		1

33 pav. Nedalytos medžiagos *PapSpin* preparato tyrimo efektyvumo (ROC) kreivė.



Plotas po kreive yra 0,8847 (95% PI:0,79-0,97), kas rodo labai gerą tyrimo tikslumą (33 pav).

PapSpin tyrimo jautrumas – 75,9%, specifiškumas – 96,5% Teigiama tyrimo prognozė – 95,7%, neigiama tyrimo prognozė 80,0%. Statistiškai reikšmingų skirtumų tarp pirmos tyrimo fazės įprastinio tepinėlio ir *PapSpin* preparato tyrimo jautrumo, specifiškumo, teigiamos ir neigiamos tyrimo prognozės vertės nenustatyta ($p < 0,05$).

4.3 Histologinio tyrimo rezultatai

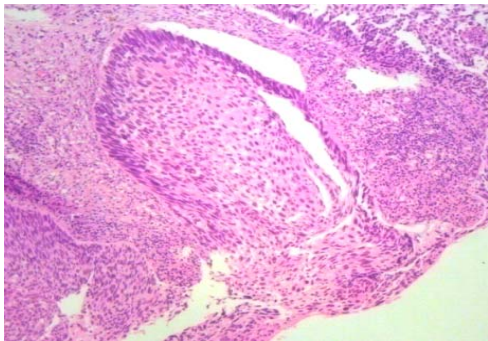
Tiriant histologinę gimdos kaklelio medžiagą paaiškėjo papildoma informacija. Tyrimo laikotarpiu buvo atliktos 141 chirurginės operacijos: 57 konizacijos, 68 biopsijos, 19 histerektomijų. Indikacijos chirurginiam gydymui buvo: patologiją rodantys gimdos kaklelio citologiniai tyrimai (94), gimdos kaklelio endometriozė (1), gimdos kūno leiomioma (6), endometriumo adenokarcinoma (3), kiaušidžių paribinė serozinė cistadenoma (1), disgerminoma (1), kiaušidžių adenokarcinoma (2), pataloginiai kolposkopijos radiniai (15), informacijos nebuvimas (17).

58 moterims, dalyvavusioms mūsų tyrime, buvo atlikta gimdos kaklelio konizacija dėl CIN3/CIS. Atliekant histologinį tyrimą 26 (44,8 %) atvejais konizacinio pjūvio kraštuose buvo nustatytas CIN3/CIS, 20 (34,5%) atvejų nustatyta, kad CIN3/CIS visiškai pašalintas, 12 (20,7%) atvejų operacinio

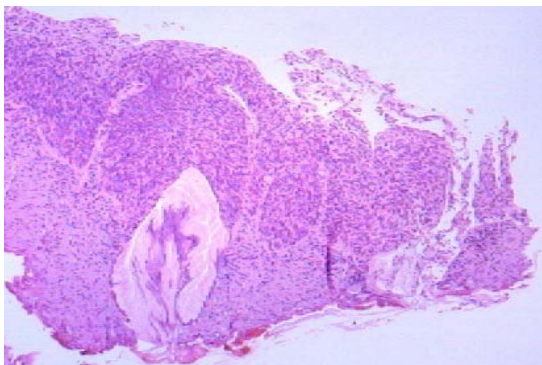
pjūvio kraštų pažeidimas nebuvo nurodytas. Pagal makroskopinį medžiagos, gautos iširti, pobūdį dominavo fragmentuota gimdos kaklelio medžiaga – 33 (59%) atvejais, 24 atvejais (41 %) iširti buvo gautas vientisas konusas.

Tolesniame tyrime naudojamos iš Valstybinio patologijos centro informacinės sistemos gauta informacija apie 48 (84%) moterų iš 58 operuotų stebėjimą po operacijos, susidedantį iš citologinių tepinėlių tyrimų ir pakartotinių konizacijų. Iš 48 stebimų moterų 11 (44 %) moterų, kurių operacinio pjūvio kraštuose buvo matoma CIN3/CIS (34,35 pav.), buvo atliktas pooperacinis citologinis tyrimas, kurio metu nustatytas HSIL, todėl jos pakartotinai konizuotos.

34 pav. CIN3/CIS, matomas giliajame operacinio pjūvio krašte (H&E, x 100)



35 pav. CIN3/CIS, matomas endocervikinio operacinio pjūvio srityje (H&E, ×100)



14 (56%) moterų histologinio tyrimo išvadose konstatuotas CIN3/CIS plitimas operacinio pjūvio kraštuose nepasitvirtino atliekant vėlesnius citologinius

tyrimus (10 atvejų) ar pakartotinai konizavus (4 atvejai). Didesnė HSIL rizika pagal citologinio tyrimo rezultatus po konizacijos buvo susijusi su operacinio pjūvio kraštų būkle (12 lentelė). Ligos plitimo stebėjimo metu rizika turėti po operacijos HSIL buvo 20 kartų didesnė esant nustatytai displazijai operacinio pjūvio kraštuose (TS=20,0)

12 lentelė. HSIL, nustatomo atliekant citologinį tyrimą stebėjimo metu, priklausomybė nuo operacinio pjūvio kraštų būklės. * PI - pasikliautinis intervalas

Radikalumas	Stebėjimas		Tikimybių santykis (95 % PI*)
	Liekamoji liga nustatyta	Liekamoji liga nenustatyta	
Pažeisti operacinio pjūvio kraštai	11	14	20,0 (2,0 - 159,3)
Nepažeisti operacinio pjūvio kraštai	1	18	1,0

25 moterų operacinio pjūvio kraštai buvo pažeisti CIN3/CIS. 7 moterų buvo pažeisti endocervikinio ir giliojo operacinio pjūvio kraštai, 18 - endocervikinio operacinio pjūvio kraštai. 5 (34%) moterims, kurių buvo pažeisti endocervikinio pjūvio kraštai, pooperaciniu citologiniu tyrimu buvo nustatytas HSIL. 7 (85%) moterims, kurioms buvo pažeisti endocervikinis ir gilusis operacinio pjūvio kraštai, praėjus 4 mėn. po operacijos citologiniu tyrimu buvo nustatytas HSIL. Nustatyta ženkliai didesnė recidyvo rizika esant CIN3/CIS pažeidimui dviejuose operacinio pjūvio kraštuose (TS=161,0) nei viename (TS=10,5) (13 lentelė).

13 lentelė. HSIL, nustatomo atliekant citologinį tyrimą priklausomybė nuo CIN3/CIS vieno ir dviejų operacinio pjūvio kraštuose

Operacinio pjūvio kraštų būklė	Stebėjimas		Tikimybių santykis (95 proc. PI*)
	Liekamoji liga nustatyta	Liekamoji liga nenustatyta	
Pažeistas endocervikinis ir gilusis kraštas	6	1	161,0 (5,9-2006,1)
Pažeistas endocervikis kraštas	5	13	10,5 (0,9-88,2)
Nėra pažeidimo	1	18	1,0 (ref.)

* PI - pasikliautinis intervalas

4.4 ŽPV DNR tyrimų rezultatai

Tiriamųjų moterų *PapSpin* skystosios terpės su gimdos kaklelio medžiaga, likusia po citologinio tyrimo, buvo siunčiamos ŽPV nustatyti. Kaip *PapSpin* terpės kontrolė virusologiniam tyrimui, buvo siunčiamas ir naujos, nefiksuotos medžiagos mėginys PBS terpėje, atitinkantis *PapSpin* terpės numerį. Iš viso dėl žmogaus papilomos viruso buvo ištirti 176 mėginiai: 160 *PapSpin* terpės ir 16 naujai paimtos, nefiksuotos medžiagos mėginiai.

Tiriamųjų grupių DNR koncentracijų palyginimas. DNR buvo išskirta naudojant genomines DNR išskyrimo rinkinį (*Genomic DNA Purification Kit, AB Fermentas*) pagal gamintojo rekomendacijas. DNR išskirta kolonėlių metodu, tam naudojant genomines DNR išskyrimo rinkinį (*SorpoCleanTM Genomic DNA Extracion Module, SORPO Diagnostics*) pagal gamintojo rekomendacijas. Išskirtos DNR koncentracijos matuotos biofotometru (VU Gamtos mokslų fakulteto Genetikos katedroje) (*Ependorff, Vokietija*). Koncentracijų vidurkis pateikiamas 14 lentelėje

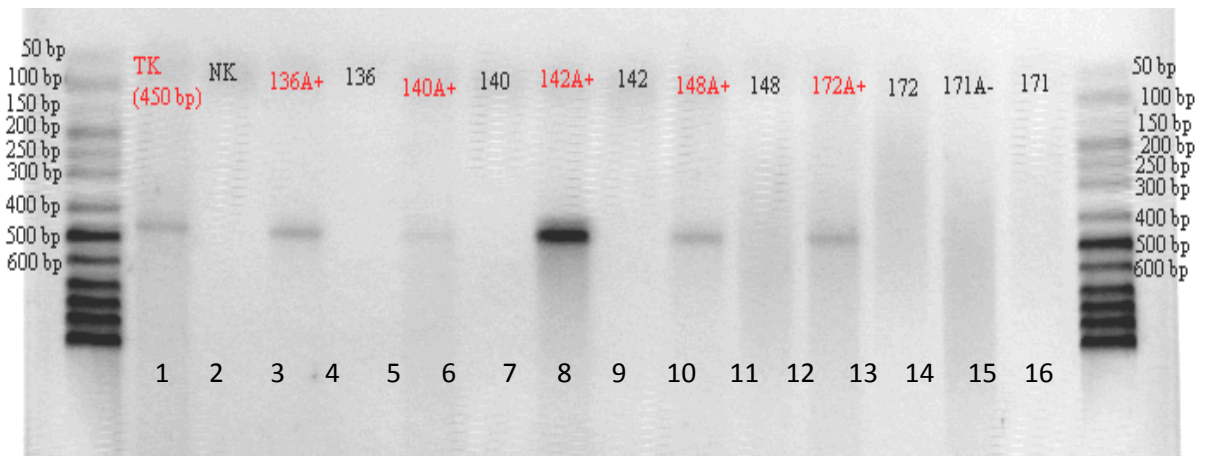
14 lentelė. DNR koncentracijų palyginimas tiriant *PapSpin* skystąją terpę ir nefiksuotą medžiagą

	DNR koncentracija, vidurkis($\mu\text{g/ml}$)	DNR koncentracija, min ($\mu\text{g/ml}$)	DNR koncentracija, max ($\mu\text{g/ml}$)	$\pm\text{SD}$
PapSpin terpė (n =160)	11,1	1,0	58,0	20,1
Kontrolinis mėginys nefiksuota medžiaga (n=16)	67,5	2,0	201,0	45,5

Kaip matyti iš 14 lentelėje pateiktų duomenų matyti statistiškai reikšmingas skirtumas tiriant *PapSpin* skystąją terpę su citologine medžiaga ir nefiksuotos medžiagos mėginius. Koncentracija svyruoja nuo 11,1 $\mu\text{g/ml}$ ir 67,5 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0,0001$). Vidurkis išskirtos DNR buvo taip pat didesnis nefiksuotoje medžiagoje nei *PapSpin* terpėje. Vadovaujantis gamintojo rekomendacijomis darome prielaidą, kad *PapSpin* skystojoje terpėje ląstelės buvo lizuotos ir DNR koncentracija nebuvo išskirta, skirtingai nei nefiksuotoje medžiagoje, kurioje fiksuojančių medžiagų nėra.

ŽPV DNR nustatymas tiriamosiose grupėse

ŽPV DNR nustatytas tiriant išskirtą DNR. PGR metodu buvo pagausinta DNR, o pagausinti produktai, atlikus elektroforezę etidžio bromidu dažytame 2% agarozės gelyje, buvo analizuoti transiliumatoriuje naudojant UV šviesos šaltinį (36 pav.). Žmogaus papilomos viruso DNR produktas yra 450 bazių porų ilgio.



36 pav. Tiriamosios ir kontrolinės grupės mėginių PGR produktų analizė elektroforezės metodu

1, 16 takeliai - 50bp DNR ilgio standartas

2 takelis – teigiama ŽPV kontrolė

3 takelis – neigiama ŽPV kontrolė

4 takelis – 136A+ - ŽPV teigiamas kontrolinės grupės mėginys

5 takelis – 136 – ŽPV neigiamas tiriamosios grupės mėginys

6 takelis – 140A+ - ŽPV teigiamas kontrolinės grupės mėginys

7 takelis – 140 – ŽPV neigiamas tiriamosios grupės mėginys

8 takelis – 142A+ - ŽPV teigiamas kontrolinės grupės mėginys

9 takelis – 142 – ŽPV neigiamas tiriamosios grupės mėginys

10 takelis – 148A+ - ŽPV teigiamas kontrolinės grupės mėginys

11 takelis – 148 – ŽPV neigiamas tiriamosios grupės mėginys

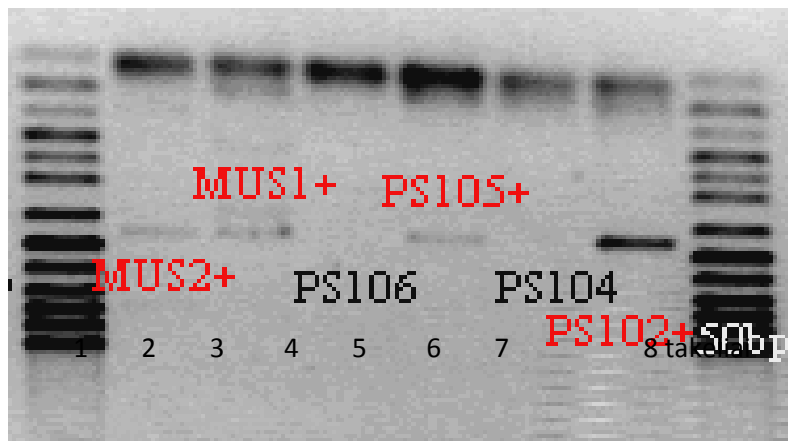
12 takelis – 172A+ - ŽPV teigiamas kontrolinės grupės mėginys

13 takelis – 172 - ŽPV neigiamas tiriamosios grupės mėginys

14 takelis – 171A- ŽPV neigiamas kontrolinės grupės mėginys

15 takelis – 171 – ŽPV neigiamas tiriamosios grupės mėginys

36 paveiksle tiriamosios grupės mėginiai 136, 140, 142, 148, 172 ir 171 yra ŽPV neigiami (pažymėti juoda spalva). Atitinkami kontrolinės grupės mėginiai (pažymėti raudona spalva) 136A, 140A, 142A, 148A, 172A yra ŽPV teigiami, o 171A kontrolinės grupės mėginys – neigiamas (pažymėtas juoda spalva). Teigiamai PGR kontrolei naudotos CaSki ląstelės (gimdos kaklelio ląstelės, infekuotos 16 tipo ŽPV). Neigiamai PGR kontrolei naudotas distiliuotas vanduo.



37 pav. PGR produktų analizė 2% agarozės gelyje, dažytame etidžio bromidu

1,8 takeliai – 50bp DNR ilgio standartas

2 takelis – MUS2+ - ŽPV teigiamas kontrolinės grupės mėginys

3 takelis – MUS1+ - ŽPV teigiamas kontrolinės grupės mėginys

4 takelis – PS106 - ŽPV neigiamas tiriamosios grupės mėginys

5 takelis – PS105+ - ŽPV teigiamas tiriamosios grupės mėginys

6 takelis – PS104 - ŽPV neigiamas tiriamosios grupės mėginys

7 takelis – PS 102+ - ŽPV teigiamas tiriamosios grupės mėginys

37 paveiksle ŽPV teigiami mėginiai pavaizduoti raudona spalva. MUS1 ir MUS2 yra kontrolinės grupės mėginiai, abu ŽPV teigiami. PS106 ir PS104 – tiriamosios grupės mėginiai, abu ŽPV neigiami. Tiriamosios grupės mėginiai PS105 ir PS102 yra ŽPV teigiami. PGR produktams matuoti naudotas 50 bp DNR ilgio standartas.

Atlikus ŽPV DNR nustatymą PGR metodu stebimas ryškūs nustatymo skirtumai *PapSpin* fiksuojančioje terpėje ir nefiksuotos medžiagos mėginyje. Gauti šie rezultatai: 5,6%(9/160) *PapSpin* skystosios terpės mėginių buvo nustatytas ŽPV, tuo tarpu kontrolinės grupės mėginiuose ŽPV buvo nustatyta 50%(8/16) ($p < 0,000001$). ŽPV nustatymo rezultatai pateikti 15 lentelėje.

15 lentelė ŽPV nustatymas *PapSpin* skystojoje terpėje ir nefiksuotos medžiagos mėginiuose

	PapSpin terpė (n=160)		Nefiksuotos medžiagos mėginiai (n=16)		p
	n	%	n	%	
ŽPV teigiami	9	5,6	8	50,0	$p < 0,000001$
ŽPV neigiami	151	94,4	8	50,0	

Pagal citologinio tyrimo rezultatus, kontrolinės nefiksuotos medžiagos grupės tyrimai, pasiskirstė sekančiai: 3atv. LSIL atvejai, 3 atv. HSIL atvejai ir 2 atv. ASC-H ir 8 nėra intraepitelinų pakitimų. 8 atv. (3LSIL,3HSIL,2ASC-H) buvo nustatytas ŽPV DNR.

5. Rezultatų aptarimas

5.1 Dalytos medžiagos citologinių tyrimų efektyvumo įvertinimas

Lietuvoje ir pasaulyje sergamumas piktybiniais gimdos kaklelio navikais didelis. Šių navikų ankstyvosios diagnostikos kokybė tampa labai aktuali onkoginekologijos problema. Mūsų atliktame darbe daug dėmesio skyrėme ankstyvajai gimdos kaklelio vėžio diagnostikai nagrinėdami pakankamai naują *Shandon PapSpin* sistemą, skirtą gimdos kaklelio medžiagos citologiniam

tyrimui. Darbo tikslas buvo įvertinti, koks yra ikinavikinės gimdos kaklelio patologijos diagnostikos efektyvumas tiriant iš gimdos kaklelio medžiagos, fiksuotos skystosiose terpėse, Shandon *PapSpin* sistema paruoštus preparatus. Tyrimo efektyvumui įvertinti nustatėme diagnostinę tyrimo vertę apskaičiavę tyrimo jautrumą, specifiškumą, teigiamą ir neigiamą tyrimo prognozes vertes, netinkamų citologiniam tyrimui *PapSpin* preparatų ir ASCUS išvadų kiekį. Šiam tikslui pasiekti tyrimą organizavome dviem etapais. Pirmuoju tyrimo etapu siekėme išsiaiškinti, kokia yra *Shandon PapSpin* sistema paruoštų preparatų citologinio tyrimo vertė tiriant dalytą gimdos kaklelio medžiagą. Gautus tyrimo rezultatus lyginome su įprastinio (PAP) tepinėlio citologinio tyrimo rezultatais. Antruoju etapu siekėme nustatyti *PapSpin* sistemos diagnostinę vertę tirdami nedalytą gimdos kaklelio medžiagą. Darbo pabaigoje lyginome nedalytos medžiagos *PapSpin* sistema paruoštų preparatų ir dalytos medžiagos įprastinio tepinėlio citologinio tyrimo rezultatus, siekdami išsiaiškinti, kuris metodas yra efektyvesnis. Abiejose tyrimo fazėse HSIL ir piktybinio naviko nustatymo standartu laikėme CIN2, CIN3/CIS ir piktybinį naviką, nustatytą histologiniu gimdos kaklelio tyrimu: konizuotosios gimdos kaklelio dalies ar biopsinės medžiagos. Gali kilti klausimas, kodėl ligos nustatymo standartu pasirinkome histologinėje gimdos kaklelio medžiagoje nustatytą CIN2 ir didesnę patologiją, kodėl atlikdami tyrimą neatsižvelgėme į CIN1. Vertindami testo efektyvumą rėmėmės supratimu apie CIN biologinę eigą. CIN1 retai progresuoja iki vėžio (46), taigi ir nustatyti CIN1 nėra labai svarbu. CIN2 ir CIN3/CIS rizika vystytis į gimdos kaklelio vėžį yra didelė, todėl nenustatytas, ar klaidingai neigiamas CIN2/CIN3/CIS atvejis yra reikšmingas gimdos kaklelio vėžio vystymosi atžvilgiu. CIN2/CIN3/CIS yra pagrindas ir atskaitos taškas moksliniuose tyrimuose vertinant citologinio gimdos kaklelio testo efektyvumą (89).

Pirmiausia mūsų atliktame tyrime mes vertinome *PapSpin* sistema paruoštų preparatų ir įprastinio citologinio tyrimo diagnostines vertes tiriant dalytą medžiagą ir jas palyginome. Tyrimo rezultatai parodė kad *PapSpin* sistema

atlikti dalytos medžiagos preparatų tyrimai yra tikslus diagnostikos metodas, palyginti su įprastinio tepinėlio tyrimais. *PapSpin* sistema paruoštų preparatų citologinių tyrimų jautrumas buvo didesnis nei įprastinių tepinėlių tyrimai – atitinkamai 78,1% ir 68,7 %, nors statistiškai reikšmingo skirtumo nenustatyta ($p < 0,05$). Tuo tarpu specifiškumas buvo panašus - atitinkamai 91,8% ir 93,8%. Verta pažymėti, kad šioje *PapSpin* sistemos vertinimo fazėje tyrimo rezultatams darė įtaką medžiagos dalijimas, t.y. *PapSpin* preparatams paruošti teko po gimdos kaklelio įprastinio citologinio tepinėlio paruošimo likusi medžiaga. Užsienio literatūroje mes neradome nė vieno analogiško darbo, kuriame būtų lyginama įprastinių tepinėlių ir *PapSpin* preparatų diagnostinė vertė, todėl mūsų gautus šios sistemos tyrimo rezultatus galėjome palyginti su *ThinPrep* sistema, kuri, kaip ir mūsų tiriamoji sistema, preparatus ruošia iš skystosiose terpėse fiksuotos gimdos kaklelio medžiagos. Naudojomės *Abulafia* ir kt. atliktos metaanalizės rezultatais, kur konstatuojama, kad lyginant dalytos medžiagos, fiksuotos skystosiose terpėse, preparatų ir įprastinio tepinėlio citologinius tyrimus tyrimo jautrumas atitinkamai yra atitinkamai 76% ir 68%. Šie rezultatai patvirtina mūsų tyrimo gautus rezultatus (78,1% ir 68,7%). *Abulafia* ir kt. metaanalizėje statistiškai reikšmingo skirtumo, kaip ir mūsų tyrimo, taip pat nenustatyta. *Abulafia* ir kt. tyrimo specifiškumą nurodo atitinkamai - 79% ir 86% (90). Mūsų gauti specifiškumo rezultatai yra geresni nei gauti *Abulafia* ir kt. atliktame tyrimo. Tai paaiškinama mūsų atidžiai atlikta pirmine citologinių gimdos kaklelio tyrimų peržiūra ir ilgamete kompetencija tyrėjų, atliekančių gimdos kaklelio citologinius tyrimus, tuo tarpu *Abulafia* tyrimo pateikiami visų JAV laboratorijų tyrimo parametrų vidurkiai. Cox ir kt. lygino *SurePath* sistema paruoštų preparatų ir įprastinių tepinėlių citologinius tyrimus. Paaiškėjo kad rezultatai skiriasi: įprastinio tepinėlio tyrimo jautrumas – 71,5%, *SurePath* sistema paruoštų preparatų – 80,1%, nors statistiškai patikimo skirtumo tiriant ikinavikinę gimdos kaklelio patologiją nenustatyta (89) kaip ir mūsų tyrimo atveju. Skirtingo specifiškumo tiriant gimdos kaklelio citologinę medžiagą

naudojant įprastinius tepinėlius ir *SurePath* sistema paruoštus preparatus nenustatyta.

Dalytos medžiagos tyrimo fazėje *PapSpin* sistemos paruoštų preparatų tyrimo teigiama prognozinė vertė buvo tolygi įprastinio tepinėlio tyrimo vertei: 86,2% ir 88,0% atitinkamai ($p < 0,05$). Nebuvo nustatyta statistiškai reikšmingo skirtumo ($p < 0,05$) ir neigiamos tyrimo prognozinės vertės atžvilgiu: 82,1% ir 86,2% atitinkamai. Palyginome mūsų gautus šio tyrimo rezultatus su užsienio literatūros duomenimis, gautus naudojant *PapSpin* sistemą. Rosenthal ir kt. tyrime *PapSpin* sistema paruoštų preparatų teigiama tyrimo prognozinė vertė – 78%, palyginti su įprastinio tepinėlio tyrimo – 68%. Nustatytas skirtumas nebuvo statistiškai reikšmingas ($p < 0,72$). Nebuvo nustatyta skirtumo neigiamos tyrimo prognozinės vertės atžvilgiu: *PapSpin* prognozinė vertė – 80%, o įprastinio tepinėlio – 83% ($p < 0,83$). Taigi skirtumai labai nereikšmingi.

Daug dėmesio savo tyrime skyrėme dviejų metodų rezultatų atitikimo vertinimui. Mūsų atliktame tyrime mes palyginome 1500 įprastinių tepinėlių ir *PapSpin* sistema paruoštų preparatų citologinių tyrimų išvadų tarpusavio atitikimą tiriant dalytą gimdos kaklelio medžiagą. Mūsų tyrime dalytos medžiagos tyrimo fazėje *PapSpin* preparatų tyrimo rezultatai 95% atvejų buvo konkordantiški, t.y. atitiko vieni kitus. Daugiausia metodų neatitikimo buvo ASCUS kategorijoje. Mūsų tyrimo rezultatus palyginome su užsienio autorių atliktų *PapSpin* sistemos tyrimų atitikimo rezultatais. Rozenhal ir kt. tyrimo duomenimis, įprastinių tepinėlių ir *PapSpin* preparatų tyrimai tarpusavyje atitiko 95% atvejų (lyginami buvo 482 tyrimai), tai patvirtina ir mūsų gautus tyrimo rezultatus. Khalbus ir kt. tyrimo duomenimis, 85% atitikimas gautas lyginant 617 dalytos medžiagos tyrimų. Lyginant Abulafia ir kt. atliktą *ThinPrep* sistemos tyrimų metaanalizę tyrimuose atitikimo vidurkis yra 90% atvejų, tyrimo rezultatai nesutampa 10% (nuo 1 iki 10 %) atvejų ir daugiausia tyrimo rezultatai neatitinka dėl ASCUS kategorijos. Mūsų tyrimo duomenys atitinka užsienio literatūros duomenis ir patvirtina gerą *PapSpin* sistema paruoštų preparatų citologinių tyrimo rezultatų atitikimą įprastinio tepinėlio

tyrimo rezultatams. Tai patvirtina ir papildomai įvertintas abiejų metodų atitikimo kappo koeficientas, kuris buvo 0,87%, vadinasi atitikimas puikus.

Vienas iš sistemos efektyvumo vertinimo parametrų yra netinkamų tyrimų kiekis. Įprastiniams gimdos kaklelio citologiniams tepinėliams būdingas didelis netinkamų tyrimų kiekis dėl priemaišų, mechaniškai sutraiškytų ląstelių ruošiant tepinėlį, uždelstos fiksacijos požymių (neapžiūrimumą nefiksuotų ląstelių), mažo ląstelių kiekio (91). Netinkamas citologiniam tyrimui tepinėlis reikalauja pakartotinio tyrimo. Tai susiję su papildomomis išlaidomis, laiko sąnaudomis, nepatogumais pacientei ir pan. Netinkamų tepinėlių kiekis yra reglamentuojamas laboratorijoje. Maksimali leidžiama netinkamų tepinėlių riba negali viršyti 8 %, viršijus šią ribą vertinama specialistų, ruošiančių nekokybiškus tepinėlius kompetencija, inspektuojamos laboratorijos. Iš skystosiose terpėse fiksuotos medžiagos pagaminti preparatai pasižymi mažu netinkamų tirti preparatų skaičiumi. Ženklaus skirtumas kalbamu atžvilgiu tarp *PapSpin* metodu paruoštų preparatų ir įprastinių tepinėlių matomas ir mūsų tyrime. Dalytos medžiagos tyrimo fazėje buvo nustatyti 1,7% netinkami įprastiniai tepinėliai, o iš *PapSpin* sistema paruoštų preparatų netinkami buvo 0,4%. Nustatytas skirtumas statistiškai reikšmingas, tai rodo *PapSpin* sistema paruoštų preparatų pranašumą įprastinio tepinėlio atžvilgiu. Mes neradome analogiško darbo, kuriame būtų tyrinėjamas ir nustatytas netinkamų citologiniam tyrimui *PapSpin* sistema paruoštų preparatų ir tepinėlių procentas, profilaktiškai atėjusioms patikrinti moterims, todėl turėjome lyginti *ThinPrep* ir *SurePath* sistema paruoštų preparatų lyginimo su įprastiniais tepinėliais rezultatus. Moss ir kt. tyrimo duomenimis, lyginant *ThinPrep* ir *SurePath* sistema paruoštų preparatų ir įprastinių tepinėlių netinkamumą tirti nustatytas ženklus statistiškai reikšmingas skirtumas: *ThinPrep* preparatų ir įprastinių tepinėlių netinkamumas buvo - 9,7% ir 2,0%, *SurePath* preparatų ir įprastinių tepinėlių – 9,7% ir 0,9% (92). Kadangi netinkamų citologiniam tyrimui įprastinių tepinėlių kiekis mūsų tyrime nedidelis, palyginti su visos Lietuvos vidurkiu: 1,7 – 7%, tai *PapSpin* sistemos privalumai nėra įspūdingi. Reikia

pažymėti, kad jie būtų gerokai išpūdingesni, jeigu tepinėliai būtų buvę ruošiami neatrinktose ir neilgametę patirtį turinčiose gydymo įstaigose ar atliekami šeimos gydytojų.

Papildomas skystųjų terpių sistemos privalumas yra galimybė po atlikto preparato citologinio tyrimo pakartotinai paruošti preparatą iš skystojoje terpėje fiksuotos medžiagos tuo atveju, kai preparatas neatitiko kokybiškam tyrimui keliamų reikalavimų ir buvo įvertintas kaip neinformatyvus. Tyrimo pakartojimas susijęs su papildomomis išlaidomis laboratorijoje (reagentais ir darbo sąnaudomis), tačiau jis padidina klinikistų ir pacienčių pasitenkinimą. Mūsų tyrime pasinaudojome galimybe pakartotinai pagaminti *PapSpin* preparatus. Atlikus 6 pakartotinius tyrimus dalytos medžiagos fazėje gauti 2 adekvačios medžiagos pagaminti tinkami tirti preparatai. Tyrimų, kuriuose būtų nustatyta, kiek kartų sumažėja netinkamų tyrimų procentas pakartotinai paruošus preparatus *PapSpin* sistema, užsienio literatūroje neradome, todėl savo tyrimo rezultatus lyginome su *ThinPrep* sistemų rezultatais, kuriuos aptikome literatūroje. Iš Belinson ir kt. atlikto tyrimo duomenų paaiškėjo, kad iš skystojoje terpėje fiksuotos medžiagos buvo pagaminta 7,9% netinkamų citologiniam tyrimui preparatų (93). Pakartotinai paruošus preparatus iš likusios terpės netinkamų tirti atvejų kiekis buvo sumažintas iki 0,15%. Šiame tyrime preparatų netinkamumą sąlygojo gausus kraujo kiekis, nes buvo tyrinėjamos moterys, kurios priklausė didelės rizikos grupei (lytinių partnerių skaičius, ŽPV infekcijos faktas, patloginė anamnezė, patloginės kolposkoijos radiniai). Šioms moterims atliekant gimdos kaklelio citologinį tyrimą kaklelis dažnai kraujuodavo, iš skystųjų terpių gausus kraujas buvo šalinamas papildomai pridedant į terpę hemolizę sukeliančių medžiagų ir nucentrifuguojant kraują. Bentz ir kt. tyrimo duomenimis, pakartotinai atliekant preparatų, pagamintų iš likusios skystosios terpės, tyrimus iš skystųjų terpių po netinkamo tyrimo atsakymo 1,3% netinkamų tyrimų kiekis buvo sumažintas nuo 1,3% iki 0,8% (94). Mūsų tyrimo rezultatai mažesni, todėl ir pakartotinis preparatų paruošimas iš skystosios terpės po netinkamo

citologiniam tyrimui preparato nebuvo toks išpūdingas kaip kituose tyrimuose. Kaip ir prieš tai vardytuose tyrimuose, taip ir mūsų tyrime efektyvus preparato tyrimo pakartojimas buvo naudingas, kai jo netinkamumas buvo sąlygotas priemaišų (kraujo, uždegimo eksudatu) ar uždelstos fiksacijos. Nepaisant visų aplinkybių tiek mūsų tyrime, tiek literatūroje skelbtuose tyrimuose nustatyta, kad lyginant skystąsias terpes naudojančiais preparatais pagamintus preparatus su įprastiniais tepinėliais citologiniams tyrimams pirmuoju būdu pagaminamas didesnis procentas citologiniams tyrimams tinkamos medžiagos.

Citologijos laboratorijos nuo senų laikų vartojo paribines diagnostines kategorijas, kurios buvo skirtos apibūdinti neaiškias atipines ląsteles. Ši terminologija nuo dr. Papanicolaou laikų buvo prieštaringa. Bethesda sistemoje pradėtas vartoti termino ASCUS apibūdinimas – “neaiškios reikšmės atipinės plokščiojo epitelio ląstelės“, t.y. tokios ląstelė, kurių pakitimai didesni už reaktyvinius, bet dar neliudija apie SIL ir nekokybiškas neaiškias ląsteles. Svarbu pažymėti, kad ASCUS taip pat yra vartojamas, kai ląstelių atipija yra sąlygojama nekokybiško tepinėlio paruošimo, t.y. uždelstos fiksacijos, sutraiškytų, mechaniškai suardytų ląstelių. ASCUS – problemiška kategorija tiek gydančiam gydytojui. Nėra vieningos nuomonės, kaip stebėti ir spręsti ASCUS kategorijos problemą pacientėms. Diagnozavus ASCUS kategoriją, rekomenduojama pacientės stebėsenos taktika yra citologinio tyrimo kartojimas, ŽPV DNR tyrimas, kolposkopija ir biopsijos (95). Nustatyta, kad, histologiškai tiriant ASCUS atvejus, 10-20 % būna nustatoma HSIL, likusi dalis ikidisplaziniai pakitimai ir nekokybiško tepinėlio sąlygoti ląstelių pakitimai: džiūvimo ore artefaktai, stori ląstelių klodai, priemaišos, pavienės ląstelės (169). 2003m. atliktos JAV nacionalinio vėžio instituto inicijuoto ALTS tyrimo duomenimis, iš nustatytų ASCUS atvejų 2 metų laikotarpiu tik 27% atvejų yra patvirtinama CIN2/CIN3 diagnozė, kas įrodo ASCUS išvados dviprasmiškumą (96). Nėra vieningos nuomonės apie ASCUS diagnozių kiekį laboratorijose ir citologų kasdieniame darbe, bet viena aišku, kad ASCUS diagnozių skaičių reikia kuo labiau mažinti, stengiantis tiksliau nustatyti

pakitimus ir gerinant citologinio tepinėlio kokybę. Daugelis ekspertų mano, kad tepinėliai, kurie įvertinami kaip ASCUS, turi sudaryti ne daugiau kaip 5 % visų laboratorijos Pap tyrimų. ASCUS rodikliui įtakos turi profesinis citologų, atrankos darbuotojų (citotechnologų) tobulėjimas, tinkama citologiškai tirti gimdos kaklelio medžiaga, technologiškai gerai paruoštas tepinėlis (96). Mes analizavome kiekio skirtumą tarp įprastinio tepinėlio ir *PapSpin* preparato tyrimų nustatant ASCUS išvadą. Mažesnis ASCUS išvadų kiekis buvo gautas atliekant tyrimus *PapSpin* metodu dalytos medžiagos fazėje, t.y. 0,7%, palyginti su 2,1 % atliekant įprastinio tepinėlio tyrimus. Šis skirtumas buvo statistiškai reikšmingas. Šiuos savo tyrimo rezultatus palyginome su užsienio autorių duomenimis. Weynand ir kt. tyrimo duomenimis, mažiau ASCUS išvadų nustatyta gimdos kaklelio medžiagą ištyrimui ruošiant *PapSpin* sistema: 6 atvejai, palyginti su įprastinio tepinėlio 9 atvejais. Khalbus ir kt. taip pat nustatė mažiau ASCUS išvadų naudodami *PapSpin* sistemą negu įprastinį tepinėlį: 5 ir 7 atvejai atitinkamai. Rosenthal ir kt. tyrimas patvirtina šias tendencijas: buvo nustatytas 80 ir 107 ASCUS išvadų skirtumas. Mūsų tyrime gautas ženklus ASCUS išvadų kiekio skirtumas tarp dviejų metodų yra sietinas su nekokybiška įprastinio tepinėlio fiksacija, ko nėra medžiagą ištyrimui ruošiant *PapSpin* sistema. Reikia pažymėti, kad Lietuvoje, patikros programos duomenimis, yra daug didesnis ASCUS išvadų kiekis nei mūsų tyrime medžiagą tiriant įprastinio tepinėlio būdu. Šis rodiklis kai kuriose Lietuvos laboratorijose siekia net 12%, todėl *PapSpin* sistemos privalumai būtų gerokai išpūdingesni, jeigu sistema būtų taikyta šiose laboratorijose.

Mūsų atliktame tyrime analizavome *PapSpin* sistema paruoštų preparatų citologinio tyrimo galimybes iš atėjusių profilaktiškai pasitikrinti moterų atrinkti gimdos kaklelio patologijos atvejus. VLK informacinės sistemos "Sveidros" duomenimis, patologijos tarnybose vykdant atrankinę patikrą dėl gimdos kaklelio vėžio nustatoma iki 6 proc. patloginės citologijos atvejų (97), analogiškos tendencijos pasireiškė ir mūsų tyrime. Tyrimo vykdymo laikotarpiu 182 (6, 2%) moterims panaudojus citologinį tyrimą buvo nustatyti

patologiniai gimdos kaklelio ląstelių pakitimai. Dalytos medžiagos tyrimo fazėje ištyrę įprastinius tepinėlius mes aptikome 5,9% patologijos, PapSpin metodu - 5,2% . Įprastinio tepinėlio tyrimų grupėje daugiau patologijos atvejų rasta dėl didesnio ASCUS išvadų kiekio. Užsienio literatūroje mes aptikome vienintelę darbą, kuriame, kaip ir mūsų tyrime, buvo tikrinamos sveikos profilaktiškai atėjusios pasitikrinti moterys ir vertinama *PapSpin* sistema paruoštų preparatų citologinio tyrimo kokybė. Weynand ir kt. *PapSpin* ir įprastinio tepinėlio metodu atlikdami citologinius gimdos kaklelio tyrimus nustatė mažesnę nei mūsų patologinės citologijos atvejų procentą dalytos medžiagos tyrime vienodą tiek įprastinio tepinėlio, tiek *PapSpin* preparato tyrimu – 3,8%. Weynand ir kt. tyrime buvo tirta 3000 moterų, nustatyta 55 SIL patologijos atvejai, tuo tarpu mūsų dalytos medžiagos tyrime buvo tirta 1500 moterų ir nustatytas 62 SIL patologijos atvejai *PapSpin* metodu, palyginti su 48 SIL atvejais, aptiktais tiriant įprastinį tepinėlį. Mūsų atliktame tyrime radome daugiau intraepitelinių pakitimų atvejų tirdami gimdos kaklelio medžiagą *PapSpin* metodu nei įprastinio tepinėlio būdu taip pat mes radome didesnę procentą patologijos nei Weynand ir kt.

Mūsų atliktame tyrime taip pat nagrinėjomi *PapSpin* metodu paruoštų preparatų ir įprastinio tepinėlio galimybes, nustatant HSIL atvejus ir jas lyginome. Naudojant *PapSpin* sistemą buvo nustatyta daugiau HSIL atvejų nei įprastinio tepinėlio tyrimu - 28 (2,1%) ir 24(1,6%) atitinkamai. Nors šis skirtumas nėra statistiškai reikšmingas, didesnis nustatytų atvejų skaičius rodo *PapSpin* sistemos pranašumą įprastinio tepinėlio atžvilgiu. Užsienio literatūroje aptikome įvairių duomenų, gautų analizuojant HSIL nustatymo efektyvumą. Rosenthal ir kt. nustatė, kad tiriant gimdos kaklelio medžiagą *PapSpin* metodu buvo nustatyta 24 HSIL atvejai, palyginti su 30 įprastinio tepinėlio būdu nustatytais atvejais – šiuos skirtumus sąlygojo medžiagos dalijimas. Tiriant CIN2/CIN3 *PapSpin* metodu gautas 51,9%(15/27) atitikimas lyginant su biopsijos rezultatai, o tiriant CIN2/CIN3 įprastinio tepinėlio metodu – 55,6% (14/27) atitikimas lyginant su biopsijos rezultatais. Mūsų

atliktame darbe tirdami *PapSpin* metodu mes gavome 78% atitikimą su biopsijos rezultatais (CIN2/CIN3/CIS) *PapSpin* metodu ir 65,6% – įprastinio tepinėlio metodu. Weynand ir kt. tyrimo duomenimis, nustatytas didesnis HSIL atvejų skaičius tiriant gimdos kaklelio medžiagą *PapSpin* metodu nei įprastinio tepinėlio metodu – 24 ir 20 atvejų atitinkamai. Tai atitinka mūsų tyrimo rezultatus, kurie rodo *PapSpin* sistemos pranašumą. Taip pat mūsų tyrimo rezultatus lyginome ir su kitų sistemų – *ThinPrep* ir *SurePath* rezultatais šiuo atžvilgiu. Abulafia ir kt. atliktoje metaanalizėje yra konstatuojama, kad dalytos medžiagos tyrime tiriant *ThinPrep* sistema paruoštus preparatus nustatomas vienodas HSIL atvejų skaičius kaip ir tiriant įprastinius tepinėlius. Ir tai yra statistiškai reikšminga. Wang ir kt. (98) atliktame dalytos medžiagos tyrime buvo nustatyta 33% daugiau displazijų *ThinPrep* metodu nei įprastinio tepinėlio metodu ir skirtumai buvo statistiškai reikšmingi $p < 0,006$. Mūsų tyrime *PapSpin* metodu dalytos medžiagos fazėje nustatyta 15,8% daugiau displazijų nei naudojant įprastinį tepinėlį, tačiau skirtumas nėra statistiškai reikšmingas.

Tyrimo vykdymo laikotarpiu *PapSpin* sistema paruoštų preparatų citologinis tyrimas parodė, kad tiriant šiuos preparatus nustatomas didesnis LSIL atvejų skaičius – 29 atv. (1,9%) negu nustatytų įprastinio tepinėlio metodu – 20 atv. (1,3%), Nors statistiškai patikimo skirtumo diagnozuojant šią patologiją nebuvo ($p = 0,12$), didesnis atvejų skaičius liudija apie geresnes ištyrimo galimybes *PapSpin* metodu. Analizuojant įprastinio tepinėlio ir *PapSpin* metodų galimybes, paaiškėjo, kad geresnę LSIL atvejų diagnostiką *PapSpin* preparatuose sąlygojo optimali ląstelių fiksacija skystosiose terpėse, leidžianti matyti pašviesėjimą apie ląstelių branduolį ir branduolio atipiją, kurią sąlygoja ŽPV infekcijos sukeltas ląstelių pažeidimas – koilocitai. Mūsų tyrimo rezultatus palyginome su užsienio literatūros duomenimis. Rosenthal ir kt. taip pat nustatė didesnę LSIL atvejų kiekį tiriant *PapSpin* sistema paruoštus preparatus negu įprastinius tepinėlius – atitinkamai 49 ir 43 atvejai. Khalbuss ir kt. nustatė gerokai didesnę skirtumą diagnozuojant LSIL. Šio tyimo

duomenimis, *PapSpin* metodu buvo aptikta 72 LSIL atvejai, o įprastinio tepinėlio metodu - 61 atvejis. Abiejuose tyrimuose konstatuojama, kad geresnę LSIL atvejų diagnostiką lėmė optimali ląstelių fiksacija, kaip ir mūsų tyrimo atveju. Berenshtein ir kt. atliktoje metaanalizėje pažymima, kad *ThinPrep* metodu nustatomas 12% didesnis LSIL atvejų skaičius negu įprastinio tepinėlio metodu, (95% CI: 7-17%) *SurePath* sistema 27% didesnis negu įprastinio tepinėlio metodu (89).

5.2 Nedalytos medžiagos citologinių tyrimų palyginimas

Kaip minėjome, dėl keliamų apribojimų gimdos kaklelio medžiagos citologiniams tyrimams užsienio literatūroje mes aptikome tik vieną nedalytos medžiagos tyrimą kurio metu nustatytas *PapSpin* sistemos jautrumas ir specifiškumas tiriant visą gimdos kaklelio citologinę medžiagą. Tačiau šiame tyrime, kitaip nei mūsų atliktame, dalyvavo moterys, kurioms ištyrus citologinį tepinėlį buvo nustatyta ląstelių pakitimų, t.y. moterys, kurioms yra gimdos kaklelio patologija. Joms 2 kartus imama gimdos kaklelio medžiagos. Pirmuoju kartu į *PapSpin* skystąją terpę, antruoju kartu į *Turbitec* skystąją terpę. Mūsų atlikto tyrimo rezultatai šioje tyrimo fazėje parodė, kad tiriant *PapSpin* sistema paruoštą visą gimdos kaklelio citologinę medžiagą tyrimas yra tikslus. Jautrumas siekia 75,8% , specifiškumas - 91,8%. Teigiama tyrimo prognozinė vertė - 95,7%, neigiama tyrimo prognozinė vertė – 80,8%. Garbar ir kt. atlikto tyrimo rezultatai panašūs į mūsų gautus. Jie nustatė didesnę nei mūsų *PapSpin* sistemos tyrimo jautrumą – 82,6%, specifiškumą - 92,6%. NTPV or TTPV nebuvo įvertintos. Mūsų gautų šio tyrimo rezultatų skaičiai šiek tiek mažesni nei Garbar ir kt., nes neturėjome patirties pradėdami taikyti *PapSpin* sistemą, o Garbar ir kt. šią sistemą taiko jau penketą metų. Tyrimo rezultatus lyginome ir su *ThinPrep* ir *SurePath* nedalytos medžiagos efektyvumo tyrimais. Abulafia ir kt. atliktoje darbų apie *ThinPrep* metaanalizėje sistemą konstatuoja, kad vidutiniškai jis yra 76%, specifiškumas - 86%.

Palyginę *PapSpin* nedalytos medžiagos tyrimo fazės ir dalytos medžiagos tyrimų rezultataus įsitikinome, kad *PapSpin* tyrimo efektyvumo tendencijos išlieka panašios. Nedalytos medžiagos fazėje tyrimo jautrumas panašus kaip ir dalytos medžiagos fazėje, t.y. 75,8% ir 78,1% atitinkamai ir didesnis nei įprastinio tepinėlio tyrimo – 75,8% ir 68,7%. Nors statistiškai reikšmingo skirtumo tarp tyrimo metodų jautrumo nenustatyta, didesnės efektyvumo tendencijos būdingos *PapSpin* metodu ruoštų preparatų citologiniam tyrimui. Nedalytos medžiagos *PapSpin* preparatų citologinio tyrimo rezultatai, kaip ir dalytos medžiagos fazėje, pasižymėjo aukštu tyrimų specifiškumu. Palyginę dalytos medžiagos įprastinio tepinėlio specifiškumo tyrimo rezultatus su nedalytos medžiagos *PapSpin* preparatų specifiškumo tyrimais nustatėme abiejų tyrimo metodų aukštą specifiškumą, t.y. 92,6% ir 93,8%.

Siekdami įvertinti nedalytos medžiagos *PapSpin* preparatų tyrimo efektyvumą analizavome netinkamų ir ASCUS išvadų kiekio pokyčius šioje tyrimo fazėje. Kaip ir dalytos medžiagos fazėje, netinkamų citologiniam tyrimui ir ASCUS išvadų kiekis mažas. Užsienio literatūroje neradome nė vieno darbo, kuriame būtų vertinami šie parametrai, todėl mūsų tyrimo rezultatų negalime palyginti su literatūros duomenimis.

5.3 Histologinio tyrimo rezultatai

Jeigu moteriai citologinio tyrimo metu aptinkama žymių plokščialąstelių intraepitelinų gimdos kaklelio pakitimų, kyla didelė rizika, kad negydomi šie pakitimai gali vystytis į gimdos kaklelio vėžį. Citologinis gimdos kaklelio tyrimas yra atrankinis tyrimas nustatant ikivėžinius gimdos kaklelio pakitimus. Galutinė išvada dėl ikivėžinių pakitimų nustatoma atliekant chirurgiškai pašalintų gimdos kaklelio audinių histologinį tyrimą. Pasirenkant chirurginį gimdos kaklelio diagnostikos ir gydymo būdą pirmenybė teikiama ekscizinėms gimdos kaklelio procedūroms – dažniausiai gimdos kaklelio

konizacijai diatermine kilpa, siekiant pašalinti transformacijos zoną (LEEP). Šis metodas pradėtas taikyti 1989 m. Predivillio ir kolegų gydyti displazijoms, kurios identifikuojamos kolposkopijos metu (99). Metodu taip susidomėta, kad ekscizijos pradėtos daryti esant labai mažiems gimdos kaklelio pokyčiams, net jei nebūdavo nustatyta intraepitelinė gimdos kaklelio neoplazija. Po operacijos lyginant histologinius ir citologinius tos pačios moters tyrimus atitikimas tarp tyrimų nėra puikus. Nustatomas tyrimų nesutapimas nuo 11 iki 32 % (101). Mūsų tyrimo duomenimis, citologinio ir histologinio metodų nesutapimas pasireiškia 17,4% atveju. Kappa koreliacijos koeficientas buvo panašus įprasto tepinėlio – 0,651 ir *PapSpin* – 0,718. Neatitikimai buvo sąlygoti vadinamojo medžiagos paėmimo klaidų, kai tiek histologiniam, tiek citologiniam gimdos kaklelio tyrimuose klaidų nėra, nes medžiaga paimta iš skirtingų gimdos kaklelio vietų. Literatūroje aprašomos klaidos, kai gimdos kaklelio medžiaga yra paimta gerai, tačiau dėl nepakankamų serijinių pjūvių kiekio ar neteisingai įlietos į parafiną histologinės gimdos kaklelio medžiagos ji yra interpretuojama kaip neturinti patologinių pokyčių, tačiau šios klaidos sudaro tik nedidelę neatitinkančių tyrimų atvejų skaičių ir gali siekti 0 iki 4,3%. Taip pat literatūroje yra aprašomos ir histologijos interpretacijos klaidos, sudarančios 1,6 iki 13% nesutapusių atvejų.

Paskutiniu dešimtmečiu intensyviai nagrinėjami intraepitelinės gimdos kaklelio neoplazijos /*Carcinoma in situ* prognoziniai faktoriai liekamajai ligai ar recidyvavimui nusakyti: pažeistų kvadrantų kiekis, CIN plitimo endocervikinėmis liaukomis ir operacinio pjūvio kraštų būklės ryšys su pooperacinio citologinio tyrimo rezultatais. Šiuo metu diskutuojama dėl pažeistų CIN3/CIS operacinio pjūvio kraštų ir pooperacinės liekamosios ligos ryšio. Stebėti moteris, kai atliekant histologinį tyrimą kraštuose yra matomas CIN3/CIS, galima pasirinktinai kartojant gimdos kaklelio citologinį tyrimą ar pakartotinai operuojant pacientę, t.y. atliekant rekonizaciją ar histerektomiją. Literatūroje galima rasti 8 pagrindinius tyrimus, atliktus 1970 ir 1980 m., kuriuose analizuojama 3894 konizacijų. Daugumoje tyrimų aprašomas

efektyvus CIN3/CIS patologijos pašalinimas atliekant konizaciją, kurios rezultatas visiškai moterų pasveikimas (42%–68%) nepriklausomai nuo operacinio pjūvio kraštų būklės, o ypač nuo egzocervikinio operacinio pjūvio. Jakus ir kt. konstatuoja, kad CIN3/CIS plitimas operacinio pjūvio kraštuose yra patikimiausias liekamosios ligos prognoziniis faktorius (100). Jis patikimesnis nei citologinio gimdos kaklelio tyrimo kartojimas. Nepaisant šio fakto rekonizacijos sukeltų komplikacijų, tokių kaip gimdos kaklelio stenozė, rizika yra didelė, taip pat nebūtinai CIN3/CIS gali recidyvuoti. Pacienčių, kurioms nevisiškai pašalinta CIN3/CIS patologija, tolesnį stebėsenos ar gydymo taktikos parinkimą lemia pacientės amžius, vaisingumo išsaugojimo aktualumas, gimdos kaklelio kanalo praeinamumas ir liekamosios ligos tikimybė. Fan Q ir kt. tyrimo duomenimis, buvo nustatyta neradikaliai pašalinta CIN3/CIS 42,2 % konizacijos atveju. 25,4% neradikalaus pašalinimo buvo diagnozuota endocervikinio operacinio pjūvio kraštuose (101). Tyler ir kt. atlikdami tyrimą nustatė 39% vs 15% liekamąją ligą atitinkamai esant pažeistiems ir nepažeistiems operacinio pjūvio kraštams (102). Taip pat šio tyrimo duomenimis, rizika turėti HSIL, citologinio tyrimo metu esant pažeistiems dviem (endocervikinio ir giliojo) operacinio pjūvio kraštams, histologinio tyrimo metu padidėja 124 kartais, rizika, kai pažeistas vienas endocervikinis operacinio pjūvio kraštas - 20 kartų. Mūsų atliktame tyrime gauti rezultatai atitinka literatūros duomenis: liekamosios ligos rizika po operacijos padidėja 161 kartą, kai pažeisti endocervikinio ir giliojo operacinio pjūvio kraštai, ir 10 kartų, kai pažeistas vienas - endocervikinis operacinio pjūvio kraštas. Taip pat mūsų atliktame tyrime nustatyta 44% CIN3/CIS liekamosios ligos atveju, kai histologinio tyrimo metu nustatomas operacinio pjūvio kraštų pažeidimas. Literatūros duomenimis, tokių atveju kiekis gali svyruoti nuo 10-69% (103).

Tyler ir kt. tyrimo duomenimis, 62% tiriamos operacinės medžiagos histologiniam ištyrimui buvo gauta daugybinių fragmentų pavidalu, likę 38% - vientiso konuso pavidalo. Tai atitinka mūsų tyrimo rezultatus – atitinkamai

59% vs 41%. Tyler ir kt. nurodo, kad operacinio pjūvio kraštų būklės vertinimas yra patikimas tiriant fragmentuotą medžiagą. Mūsų atliktame tyrime matomas didesnis (56%) nesutapusių teigiamų operacinio pjūvio kraštų ir neigiamo pooperacinio citologinio tyrimo atvejų skaičius. Kitų tyrimų autoriai nurodo 25-46% nesutapusių atvejų skaičių. Pažymėtina, kad mūsų tyrimo duomenimis, 80% šių atvejų buvo nustatyta tiriant fragmentuotą gimdos kaklelio medžiagą. Analizuojant literatūros duomenis, paaiškėjo, kad fragmentuotai gimdos kaklelio konizacijos medžiagai tirti endocervikinis kraštas buvo siunčiamas pažymėtas ar atskirame konteineryje, o mūsų tyrime endocervikinis operacinis kraštas nebuvo pažymėtas, kas padidina histologinio tyrimo įvertinimo tikslumą.

5.4 ŽPV DNR tyrimo rezultatai

Mūsų darbe mes tyrėme 160 *PapSpin* skystųjų terpių su jose fiksuota citologine medžiaga. Tyrimo eigoje buvo pamatuota visų mėginių DNR koncentraciją ir ją palyginome su nefiksuotoje medžiagoje nustatyta koncentracija. Išanalizavus gautus rezultatus paaiškėjo, kad tiriamosios grupės (fiksuojančios terpės) mėginių DNR koncentracijos vidurkis buvo 11,1 $\mu\text{g/ml}$), kai tuo tarpu kontrolinės grupės mėginiuose DNR koncentracijos vidurkis buvo 8,9 kartus didesnis – 67,5 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0,0001$). Manome, kad tokiems rezultatams įtakos galėjo turėti *PapSpin* terpėje esančios fiksuojančios medžiagos, dėl kurių įtakos išskirtosios DNR koncentracija galėjo būti mažesnė. Mūsų gauti rezultatai rodo, kad tiriamosios grupės (fiksuojančios *PapSpin* terpės) mėginiuose ŽPV nustatytas 5,6% atvejų, tuo tarpu kontroliniuose mėginiuose ŽPV nustatytas 50% atvejų ($p < 0,000001$). 8 kontroliniuose mėginiuose citologinio tyrimo pagalba buvo nustatyta 3LSIL, 3 HSIL, 2ASC-H išvadų atvejai. 3 pastaruosiuose atvejuose buvo nustatytas ŽPV DNR, tuo tarpu *PapSpin* skystojoje terpėje ŽPV DNR nebuvo aptikta. Remiantis literatūros duomenimis infekuotumas ŽPV esant įvairiems citologiniams pokyčiams svyruoja nuo 46,7% (moterų kurioms diagnozuoti LSIL) iki 79,3% (moterims kurioms nustatyti HSIL). Šie duomenys neatitinka

mūsų tyrimo rezultų (106). Užsienio literatūroje mes neradome tyrimo, kuriame būtų tyrinėjamas ŽPV nustatymas PGR metodu panaudojant MYO9/MY11 pradmenis. Mes aptikome vieną tyrimą, kurio metu analizuotas *PapSpin* skystosios terpės tinkamumas atlikti ŽPV *Hybride Capture II* metodu. Weynand ir kt. atlikto tyrimo duomenimis, yra demonstruojamas *PapSpin* fiksuojančios terpės ir joje fiksuotų ląstelių tinkamumas atlikti ŽPV tyrimus *HC II* metodu. Šiame tyrime buvo tirta 38 *PapSpin* skystosios terpės su joje fiksuota citologine medžiaga atvejais. Nustatyta, kad 50% atvejų *PapSpin* skystosiose terpėse su gimdos kaklelio medžiaga buvo aptikta ŽPV. ŽPV infekcijos procentai pagal citologines kategorijas pasiskirstė taip: ASCUS – 60%, ASC-H – 100%, LSIL – 87,5%, HSIL – 100%. Tačiau literatūros duomenų, kurie analizuotų skystosios terpės tinkamumą, leidžiantį atlikti PGR reakcijas, mes neradome, todėl mūsų gautų tyrimo rezultatų negalime palyginti su užsienio literatūros duomenimis.

6. Išvados

1. Palyginus *Shandon PapSpin* sistema paruoštų preparatų ir įprastinio tepinėlio citologinių tyrimų diagnostinę vertę dalytos gimdos kaklelio medžiagos tyrimo fazėje paaiškėjo, kad *PapSpin* preparatų citologiniai tyrimai yra efektyvūs ir ne mažiau tikslūs nei įprastinių tepinėlių tyrimai, nors šioje tyrimo fazėje skystųjų terpių sistemai turėjo įtakos medžiagos dalijimas. *Shandon PapSpin* preparatų tyrimo jautrumas - 78,1%, įprastinio tepinėlio–68,7%, specifiškumas – 91,8% ir 93,8 % atitinkamai. Nors nustatyti skirtumai buvo statistiškai nereikšmingi ($p < 0,05$), geresnės efektyvumo tendencijos buvo nustatytos tiriant *Shandon PapSpin* preparatus. Nustatytas statistiškai reikšmingai mažesnis *PapSpin* sistema paruoštų netinkamų preparatų ir ASCUS išvadų kiekis nei įprastinio tepinėlio metodu: netinkamų tyrimų 6(0,4)% ir 25(1,7)% ($p=0,001$), ASCUS 10(0,7%) ir 31(2,1%)($p=0,001$).

2. *Shandon PapSpin* sistema iš skystosios terpės fiksuotos gimdos kaklelio medžiagos paruoštų preparatų citologiniu tyrimu galima tiksliai nustatyti ikivėžinius gimdos kaklelio ląstelių pakitimus. Tiriant nedalytą gimdos kaklelio citologinę medžiagą citologinio tyrimo jautrumas-75,9%, specifiškumas-96,5%, teigiama tyrimo vertė-95,7%, neigiama tyrimo prognozinė vertė-80,0%.

3. Nedalytos medžiagos *Shandon PapSpin* sistema paruošti preparatų tyrimai yra efektyvesni nei įprastinis tepinėlis. Tiriant *Shandon PapSpin* paruoštus preparatus gautas mažesnis ASCUS išvadų kiekis nei įprastinio tepinėlio metodu 20 atv.(1,4%) ir 31 atv.(2,1%) ir mažas netinkamų preparatų kiekis lyginant su įprastiniu tepinėliu 25 (1,7%) ir 8 (0,6%) atitinkamai.

4. Skystoji *Shandon PapSpin* terpė likusi po citologinio gimdos kaklelio tyrimo yra mažiau tinkama tirti ŽPV DNR PGR metodu MYO9/MY11 pradmenimis nei nefiksuota gimdos kaklelio medžiaga.

:

7. Praktinės rekomendacijos

1. Skystųjų terpių *Shandon PapSpin* sistemą rekomenduojama taikyti tiriant gimdos kaklelio citologinę medžiagą moterims, atėjusioms profilaktiškai patikrinti dėl ikinavikinės gimdos kaklelio patologijos.
2. Šią sistemą taip pat rekomenduojama taikyti tiriant gimdos kaklelio citologinę medžiagą moterims, kurioms prieš tai buvusio patikrinimo metu, atlikus gimdos kaklelio tepinėlio tyrimą, citologiniame tyrime buvo nustatyta ASCUS išvada.

8. Disertacijos tema paskelbtų darbų sąrašas

1. Gudlevičienė Ž, Juškevičienė G, Rimienė J., Kurlianskienė E., Didžiapetrienė J., Drulia E. Detection and typing of human Papilloma viruses in cervical scrapes of women with cervical carcinomas, squamous intraepithelial lesions and of healthy women. Acta medica Lithuanica 2002; 19: 40-43.
2. Uleckienė S, Kanopienė D, Gudlevičienė Ž, Drulia E, Kurtinaitis J, Rimienė J, Vaitkienė D. Atrankinė moterų patikra dėl gimdos kaklelio patologijos. Internistas 2004;6(36): 94-9.
3. Vaitkiene D, Kurtinaitis J, Armonaviciene A, Kulik J, Uleckiene S, Kanopiene D, Rimiene J. Atrankinės patikros dėl gimdos kaklelio vėžio eiga Lietuvoje . Lietuvos akušerija ir ginekologija 2005:6.
4. Armonavičienė A, Kurtinaitis J, Smailytė G, Uleckienė S, Rimienė J, Vaitkienė D. Lietuvos atrankinės moterų patikros dėl gimdos kaklelio patologijos programos ir Europos Sąjungos (ES) atrankinės patikros rekomendacijų palyginimas. Lietuvos bendrosios praktikos gydytojas 2005; 9:(7-8) : 551-3.
5. Kurtinaitis J, Smailytė G, Rimienė J, Čigrijienė VM, Laurinavičius A. Gimdos kaklelio vėžio ir ikivėžinės patologijos išaiškinimas Lietuvoje 2001-2003 metais. Medicinos teorija ir praktika 2005;2(42): 99-102.
6. Gimdos kaklelio vėžio profilaktikos aktualijos: Mokslinė monografija (I d.) ir Mokomoji priemonė (II d.) / Sudarytojai: J.Didžiapetrienė, S.Uleckienė, K.P.Valuckas, A.Laurinavičius, R. J.Nadišauskienė, E.S.Cibas. – Vilnius: VĮ Mokslotyros institutas, 54 knyga. – 2005. – 252 P. II Dalis. Iki vėžiniai gimdos kaklelio pokyčiai: profilaktika, diagnostika ir gydymas. 1. Gimdos kaklelio ir makšties citologija. E.S.Cibas, J.Rimienė, A.Laurinavičius. psl. 69-123.

7. Gudleviciene Z, Rimiene J, Krasauskaite I. Evaluation of new cytological fixative liquid medium suitability for HPV testing using PCR. *Acta Medica Lituanica* 2007;14(3):152-6.
8. Rimienė J, Kurtinaitienė R, Musteikienė J, Keršulytė D, Murmienė S, Laurinavičius A. Konizuotosios gimdos kaklelio dalies histologinio ištyrimo svarba esant žymiems plokščialąsteliniams intraepiteliniams pakitimams. *Medicinos teorija ir praktika* 2009; 15: 406-11.
9. Rimiene J, Petronyte J, Gudleviciene Z, Smailyte G, Krasauskaite I, Laurinavičius A. A Shandon PapSpin™ liquid based gynecological test: split-sample and direct- to-vial test with histology follow-up study. *CytoJournal*. Priimtas spaudai.
10. Smailytė G, Rimienė J, Gudlevičienė Ž., Aleknavičienė B. Sergamumas gimdos kaklelio vėžiu patikros programos vykdymo laikotarpiu. *Medicino teorija ir praktika*.2010. Priimtas spaudai.

Tezės disertacijos tema

1. S.Uleckiene, B.Aleknavičiene, D.Kanopiene, J.Rimiene. Actual issues on Cervical Screening in Lithuania. 2004 UICC World Conference for Cancer Organization. Conference programme incorporating book of abstract, pg.134. 2004. November 17. Dublin, Ireland.
2. J.Rimiene, J.Kurtinaitis, A.Laurinavicius, S.Uleckiene, Z.Gudleviciene, J.Petronyte. National cervical cancer screening programme initiated in Lithuania. 31 st European Congress of Cytology. Cytopathology. Volume 16, supplement 2, pg.56. 2005. Paris, France 2-5 October.
3. PapSpin™ Liquid-Based Gynecological Test: Preliminary report on Split-Sample Study. 33th European Congress of Cytology. 14-17 October 2007. Madrid. Spain.
4. J.Rimienė, A.Armonavičienė, A.Laurinavicius, D. Vaitkienė, G.Smailytė, Petronytė J., Gudlevičienė Ž. Three years result of cervical cancer screening programme in Lithuania. 16th International Meeting of the European Society of Gynaecological Oncology. Conference programme incorporating book of abstract pg. 210. Belgrade. Serbia. October 11-14, 2009.

Pranešimai disertacijos tema

1. VUOI mokslinė praktinė konferencija: „Moters lyties organų vėžys. 2001-10- 25
2. Mokslinė-praktinė konferencija “ Diagnostiniai citologijos principai ir klinikinės koreliacijos”. Vilnius. 2003-10-(3-4),
3. Mokslinė-praktinė konferencija „Ar įmanoma išvengti vėžio: vėžio profilaktikos galimybės. 2005-03-31
4. One year results of cervical cancer screening program in Lithuania. 4th Baltic congress of Oncology, 2006-05-25/27, Tartu, Estonia.
5. VUOI mokslinė praktinė konferencija „ Atrankinės sveikatos patikros programos dėl gimdo kaklelio patologijos vykdymo aktualijos“ 2006-02-03.
6. Gimdos kaklelio ikivėžinių būklių morfologinė diagnostika. Prospektinio tyrimo rezultatai. Aktualūs ambulatorinės chirurgijos, akušerijos ir ginekologijos klausimai. IV ambulatorinės chirurgijos draugijos suvažiavimas. 2008 05 16-17d.

9. Literatūra

1. Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin* 2007; 57(1):43-66.
2. The Working Group of IARC. *Cervical Cancer*. Lyon: IARC Press, 2005. Vol.10. IARC Handbooks of Cancer Prevention.
3. Ronco G, van Ballegooijen M, Becker N, et al. Process performance of cervical screening programmes in Europe. *Eur J Cancer* 2009; 45(15):2659-70.
4. Paavonen J, Naud P, Salmerón J, et al. Efficacy of human papillomavirus (HPV)-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against cervical infection and precancer caused by oncogenic HPV types (PATRICIA): Final analysis of a double-blind, randomised study in young women. *Lancet* 2009; 374(9686):301-14.
5. Nanda K, McCrory DC, Myers ER, et al. Accuracy of the Papanicolaou test in screening for and follow-up of cervical cytologic abnormalities: a systemic review. *Ann Intern Med* 2000; 132:810-19.
6. Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program. SEER Database: Incidence – SEER 9 Regs Public-Use, 2004 Sub (1973-2002), Nat Cancer Inst, DCCPS, Surveillance Res Progr, Cancer Statistics Branch, 2005, based on 2004 sub.
7. Khalbuss WE, Rudomina D, Dauff ND, et al. SpinThin, a simple, inexpensive technique for preparation of thin-layer cervical cytology from liquid-based specimens. *Cancer (Cancer Cytopathol)* 2000; 90:135-42.
8. Garbar Ch, Mascaux C, Fontaine V. Efficiency of an inexpensive liquid-based cytology performed by cytocentrifugations: a comparative study using the histology as reference standard. *CytoJournal* 2005; 2(15):
9. Rosenthal DL, Geddes S, Trimble CL, et al. The PapSpin: A reasonable alternative to other, more expensive liquid-based Papanicolaou tests. *Cancer (Cancer Cytopathol)* 2006; 108:137-43.

10. Weynand B, Berliere M, Haumont E, et al. A new, liquid-based cytology technique. *Acta Cytol* 2003; 47:149-53.
11. Anttila A, Ronco G, Clifford G, Bray F, Hakama M, Arbyn M, et al. Cervical cancer screening programmes and policies in 18 European countries. *Br J Cancer* 2004; 91(5):935-41.
12. Stukonis M, Gurevičius R, Kuzmickienė I, Bičiūnaitė V. Sergamumo vėžiui trendai Lietuvoje 1964-1988 m. ir jų prognozė. *Lietuvos medicina* 1991; 2:8-14.
13. Didžiapetris R, Stukonis M, Kurtinaitis J. Time trends in incidence of cervical cancer in Lithuania from 1983 to 1997. *Eur J Epidemiol* 1999; 15:888-892.
14. B. Aleknavičienė, G. Smailytė, B. Elaawar, J. Kurtinaitis. Gimdos kaklelio vėžys. Sergamumo bei mirtingumo pokyčiai Lietuvoje. *Medicina* 2002; 38:223-30.
15. Van den Akker van Marle ME, van Ballegooijen M, van Oortmarsen GJ et al. Cost-effectiveness of cervical cancer screening: comparison of screening policies. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94:193-204.
16. Anttila A, Pukkala E, Soderman B, Kallio M, Nieminen P, Hakama M. Effect of organised screening on cervical cancer incidence and mortality in Finland, 1963–1995: recent increase in cervical cancer incidence. *Int J Cancer* 1999; 83:59-65.
17. Anderson GH, Boyes DA, Benedet JL et al. Organisation and results of the cervical cytology screening programmes in British Columbia, 1955-85. *Br Med J*, 296, 975-78.
18. Christopherson WM, Scott MA. Trends in mortality from uterine cancer in relation to mass screening. *Acta Cytol* 1977; 21:5-9.
19. Lynge E, Poll P. Incidence of cervical cancer following negative smear: a cohort study from Maribo County, Denmark. *Am J Epidemiol* 1986; 124:345-52.
20. Weikel W, Wagner R, Moll R. Characterisation of subcolumnar reserve cells and other epithelia of human uterine cervix. Demonstration of diverse

- cytokeratin polypeptides in reserve cells. *Virchows Arch [Cell Pathology]* 1987; 54:98 -110.
21. Munoz N, Bosh X, Sanjose S et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003; 348:518-27.
 22. Motoyama S, Ladines-Llave CA, Villanueva SL, et al. The role of human papilloma virus in the molecular biology of cervical carcinogenesis. *J Med Sci* 2004; 50(1):9-19.
 23. Schiffman MH, Castle P. Epidemiologic studies of a necessary causal risk factor: human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst.* 2003; Mar 19; 95(6).
 24. Meisels A, Fortin R. Condylomatous lesions of the cervix and vagina: I. Cytologic pattern. *Acta Cytol* 1976; 20:505-9.
 25. Purola E, Savia E. Cytology of gynecologic condyloma acuminatum. *Acta Cytol* 1977; 21:26-31.
 26. Tarapore P, Fukasawa K: p53 mutation and mitotic infidelity. *Cancer Invest* 2000; 18:148.
 27. Hughes RG, Neill WA, Norval M. Papillomavirus and c-myc antigen expression in normal and neoplastic cervical epithelium. *J Clin Pathol* 1989; 42:46.
 28. Rader JS, Gerhard D, O'Sullivan MJ et al. Cervical intraepithelial neoplasia III shows frequent allelic loss in 3p and 6p. *Genes Chromosomes Cancer* 1998; 22:57.
 29. ter Harmsel B, Smedts F, Luijpers J et al. BCL-2 immunoreactivity increases with severity of CIN. A study of normal cervical epithelia, CIN and cervical carcinoma. *J Pathol* 1996; 179:26
 30. Pinion SB, Kennedy JM, Miller RW et al. Oncogene expression in cervical intraepithelial neoplasia and invasive cancer of cervix. *Lancet* 1991; 337:819.

31. Birrer MJ, Hendricks D, Farley J et al. Abnormal FHIT expression in malignant and premalignant lesions of the cervix. *Cancer Res* 1999; 59:5270.
32. Tjalma W, Sonnemans H, Weyler J et al. Angiogenesis in cervical intraepithelial neoplasia and the risk of recurrence. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 181:554.
33. Kjelberg L, Hallmans G, Ahren AM, et al. Smoking, diet, pregnancy and oral contraceptive use as risk factors for cervical intra-epithelial neoplasia in relation to human papillomavirus infection. *Br J Cancer* 2000; 82(7):1332-8.
34. Deacon JM, Evans CD, Yule R, et al. Sexual behaviour and smoking as determinants of cervical HPV infection and of CIN3 among those infected: A case control study nested within the Manchester cohort. *Br J Cancer* 2000; 83(11):1565-72.
35. Elson DA, Riley RR, Lacey A, et al. Sensitivity of the cervical transformation zone to estrogen-induced squamous carcinogens. *Cancer Res* 2000; 60(5):1267-75.
36. Salazar EL, Sojo-Aranda I, Lopez R, Salcedo M. The evidence for an etiological relationship between oral contraceptive use and dysplastic change in cervical tissue. *Gynecol Endocrinol* 2001; 15(1):23-8.
37. Antitila T, Saikku P, Koskela P, et al. Serotypes of *Chlamydia trachomatis* and risk for development of cervical squamous cell carcinoma. *JAMA* 2001; 285(1):47-51.
38. Reesink-Peters N, Ossewaarde JM, van der Zee AG, et al. No association of anti-*Chlamydia trachomatis* antibodies and severity of cervical neoplasia. *Sex Transm Infect* 2001; 77(2):101-2.
39. Alloub MI, Barr BB, MaLaren KM, et al. Human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia in women with renal allografts. *BMJ* 1989; 298(6667):153-6.

40. Ellerbrock TV, Chiasson MA, Bush TJ, et al. Incidence of cervical squamous intraepithelial lesions in HIV-infected women. *JAMA* 2000; 283(8):1031-7.
41. Heard I, Tassie JM, Schmitz V, et al. Increased risk of cervical disease among human immunodeficiency virus-infected women with severe immunosuppression and high human papilloma virus load (I). *Obstet Gynecol* 2000; 96(3):403-9.
42. Ishi K., Suzuki F., Saito A. et al. Prevalence of human papillomavirus infection and its correlation with cervical lesions in commercial-sex workers in Japan. *J Obstet Gynaecol Res* 2000; 26:253-7.
43. Burk RD, Ho GY, Beardsley L, et al. Sexual behavior and partner characteristics are the predominant risk factors for genital human papillomavirus infection in young women. *J Infec Dis* 2006; 174:679-9.
44. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Human Papillomaviruses. 2007. Volume 90.
45. Richardson H, Kelsall G, Tellier P et al. The natural history of type-specific human papillomavirus infections in the femal university students. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003; 12:485-90.
46. Östör AG. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *Int J Gynecol Pathol*, 1993; 12:186-92.
47. Boon ME, Baak JP, Kurver PJ, et al. Adenocarcinoma in situ of the cervix: an underdiagnosed lesion. *Cancer* 1981; 48:768-73.
48. Crum CHP, Lee K. Diagnostic gynecologic and obstetric pathology. Elsevier Saunders. 2009.
49. Richart RM, Barron BA. A follow-up study of patients with cervical dysplasia. *Am J Obstet Gynecol* 1969; 105:386-93.
50. Scaramucci JC, Fennell RH, Hepp JA: Carcinoma in situ of the cervix: A report of fifty-one cases, with consideration of minimal therapy. *Obstet Gynecol* 1958; 12:649.
51. Richart RM, Barron BA. A follow-up study of patients with cervical dysplasia. *Am J Obstet Gynecol* 1969; 105:386-93.

52. Richart RM, Townsend DE, Crisp W, et al: An analysis of "long-term" follow-up results in patients with cervical intraepithelial neoplasia treated by cryotherapy. *Am J Obstet Gynecol* 1980; 137:823-80.
53. Addis IB. Intraepithelial disease of the cervix, vagina, and vulva. In JS Berek, ed., *Berek and Novak's Gynecology* 2007; 14th ed., 561-96. Lippincott Williams and Wilkins.
54. Chase D, Kalouyan M, DiSaia P. Colposcopy to evaluate abnormal cervical cytology. *Am J of Obstet Gynecol* 2008; 200(5):472-80.
55. Ortiz R, Newton M, Langlois PL. Colposcopic biopsy in the diagnosis of carcinoma of the cervix. *Obstet Gynecol*; 1969:303(34).
56. Alvarez RD, Wright TC. Effective cervical neoplasia detection with a novel optical detection system: a randomized trial. *Gynecol Oncol* 2007; 104(2):281-9.
57. Dunn TS, Burke M, Shwayder JSO. A "see and treat" management for high-grade squamous intraepithelial lesion pap smears. *J Low Genit Tract Dis* 2003; 7(2):104-6.
58. Ferris DG, Ho TH, Guijon F et al. A comparison of colposcopy using optical and video colposcopes. *J Lower Genital Tract Dis* 2000; 4:65.
59. Burghardt E, Pickel E, Girardi F. *Colposcopy - Cervical Pathology: Textbook and Atlas* 3rd edition. Theime New York. 1998.
60. Davey DD, Neal MH, Wilbur DC, et al. Bethesda 2001 implementation and reporting rates: 2003 practices of participants in the College of American Pathologists Interlaboratory Comparison Program in Cervicovaginal Cytology. *Arch pathol lab med.* 2004; 128(11):1224-9.
61. Solomon D, Davey D, Kurman R, et al. The 2001 Bethesda system: Terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA* 2002; 287:2114-19.
62. Papanicolaou GN, Traut HF. The diagnostic value of vaginal smears in carcinoma of the uterus. *Am j Obstet Gynecol* 1945; 42:193-206.

63. Nanda K, McCrory DC, Myers ER, et al. Accuracy of the Papanicolaou test in screening for and follow-up of cervical cytologic abnormalities: A systemic review. *Ann Intern Med* 2000; 132:810-19.
64. Johnson T, Maksem J, Belsheim, et al. Liquid-based cervical-cell collection with brushes and wooden spatulas: a comparison of 100 conventional smears from high-risk women to liquid-fixed cytocentrifuge slides, demonstrating a cost-effective, alternative monolayer slide preparation method. *Diagn Cytopathol* 2000; 22:86-91.
65. Cibas ES, Ducatman BS. *Cytology: Diagnostic Principles and Clinical Correlates*, 2nd edition, W.B. Saunders, Edinburgh, 2003.
66. Limaye A, Connor A, Huang X, et al. Comparative analysis of conventional Papanicolaou tests and a fluid-based thin-layer method. *Arch Pathology Lab Med* 2003; 127:200-4.
67. Obwegeser JH, Brack S. Does liquid-based technology really improve detection of cervical neoplasia? A prospective, randomized trial comparing the ThinPrep Pap Test with conventional pap test, including follow-up of HSIL cases. *Acta Cytol* 2001; 45(5):709-14.
68. Alves VA, Bibbo M, Schmitt FC, et al. A comparison of manual and automated methods of liquid-based cytology. A morphologic study. *Acta Cytol* 2004; 48:187-93.
69. Tolles WE, Bostrom RC. Automated screening of cytological smears for cancer: The instrumentation. 1956. *Ann NY Acad Sci*, 63:1211-18.
70. Husain OAN, Allen RWB, Hawkins EJ, Taylor, JE. The quantimet cytoscreen and the interactive approach to cancer screening. *J Histochem Cytochem* 1974; 22:678-84.
71. Zahniser DJ. The development of a fully automated system for the prescreening of cervical smears. PhD thesis, Nijmegen, Netherlands, 1979.
72. Tucker JH, Shippey G. Basic performance tests on the CERVIFIP linear array prescreener. *Anal Quant Cytol* 1983; 5:129-37.

73. Tanaka N, Ikeda H, Ueno T, et al. Automated cytologic screening system (Cybest model 4): An integrated image cytometry system. *Appl Optics* 1987; 26:3301-07.
74. Stenkvisst B, Bergstrom R, Brinne U, et al. Automatic analysis of Papanicolaou smears by digital image processing. *Gynecol Oncol* 1987; 27:1-14.
75. Nordin B. The development of an automated prescreener for the early detection of cervical cancer: Algorithms and implementation. PhD thesis, Uppsala, Sweden, 1989.
76. Reinhardt ER, Blanz WE, Erhardt R, et al. Automated classification of cytological specimens based on multistage pattern recognition. *Proceedings of the 6th International Conference on Pattern Recognition*. Munich: 1982:153-9.
77. Ploem JS, van Driel-Kulker AMJ, Verwoerd NP. Leytas: A cytology screening system using the new modular image analysis computer (MIAC) from Leitz. In: G.Berger , JS Ploem, K.Goerttler, eds. *Clinical cytometry and histometry*. London: Academic Press 1987:24-35.
78. Tucker J, Stenkvisst B. What ever happened to cervical cytology automation? *Anal Cell Pathol*; 1990; 2:259-66.
79. A randomized trial on the management of low-grade squamous intraepithelial lesion cytology interpretations. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 188(6):1393-400.
80. Bulten J, van der Laak J A, Gemmink J H, et al. Ki-67, a promising marker for the classification of cervical intraepithelial neoplasia. *J Pathol* 1996; (178):268-73.
81. Branca M, Ciotti M, Giorgi C, et al. Up-regulation of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) is closely associated with high-risk human papillomavirus (HPV) and progression of cervical intraepithelial neoplasia (CIN), but does not predict disease outcome in cervical cancer. *Eur Obstet & Gynecolo and Reproducti Biol*, 1996; Vol 130 (2):223-31.

82. Klaes R, Benner A, Friedrich T, et al. p16INK4a immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2002; 26:1389-99.
83. Obermair A, Bancher-Todesca D, Bilgi S, et al. Correlation of vascular endothelial growth factor expression and microvessel density in cervical intraepithelial neoplasia. *Nat Cancer Inst* 1997; 89(16):1212-17.
84. Dabbs DJ. *Diagnostic Immunohistochemistry*. 1st ed. Philadelphia, Churchill Livingstone; 2002.
85. Cuzick J, Sasieni P, Davies P, et al. .A systematic review of the role of human papilloma virus (HPV) testing within a cervical screening programme: summary and conclusions. *J Cancer* 2000; 83(5): 561-65.
86. Hubbard R. Human papillomavirus testing methods. *Arch Pathol Lab Med* 2003; 127:940-4.
87. Jurgelevičius V, Steponavičiūtė D. Polimerazės grandininė reakcija: principai ir taikymo sritys. *Laboratorinė medicina* 1999; 3:28-34.
88. Kumala SM, Syrjänen S, Shabalova I, et. al. Human papillomavirus testing with hybrid capture 2 assay and PCR as screening tools. *J Clin Microbiol* 2004; 42(6):2470-75.
89. Ronco G, Cuzick J, Pierotti P, et al. Accuracy of liquid based versus conventional cytology: overall results of new technologies for cervical cancer screening: randomised controlled trial. *BMJ* 2007; 335:28.
90. Abulafia O, Pezzullo JC, Sherer DM. Performance of ThinPrep liquid-based cervical cytology in comparison with conventionally prepared Papanicolaou smears: a quantitative survey. *Gynecol Oncol* 2003; 90:137-44.
91. Bigras G, Malgorzata AR, Lamercy JM et al. Keeping collecting device in liquid medium is mandatory to ensure optimized liquid-based cervical cytologic sampling. *J Lower Genital Tract Dis* 2003; 7(3):168-74.
92. Monson J. Liquid-based cytology for primary cervical cancer screening: a multi-centre study. *Br J Cancer* 2001; 84(3):360-6.

93. Belinson J, Qiao YL, Pretorius R, et al. Shanxi province cervical cancer screening study: a cross-sectional comparative trial of multiple techniques to detect cervical neoplasia. *Gynecol Oncol* 2001; 83(2):439-44.
94. Bentz JS, Rowe LR, Gopez EV, et al. The unsatisfactory ThinPrep Pap test: missed opportunity for disease detection? *Amer J Clin Patho* 2002; 117(3):225-9.
95. Wright TC, Cox JT, Massad LS, et al. 2001 consensus guidelines for the management of women with cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 189(1):295-4.
96. Solomon D, Schiffman M, Tarone R. Comparison of three management strategies for patients with atypical squamous cells of undetermined significance; baseline results from a randomized trial. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93:293-9.
97. Kurtinaitis J, Smailytė G, Rimienė J, ir kt. Gimdos kaklelio vėžio ir ikivėžinės patologijos išaiškinimas Lietuvoje 2001-2003 metais. *Medicinos teorija ir praktika*. 2005; 2(42):99-102.
98. Wang TY. Comparison of fluid based, thin-layer processing and conventional Papanicolaou methods for uterine cervical cytology. *J Formos Assoc* 1999; 98 (7):500-5.
99. Prendiville W, Cullimore J, Norman S. Large loop excision of the transformation zone (LLETZ): A new method of management for women with cervical intraepithelial neoplasia. *Br J Obstet Gynecol* 1989; 96:1054-60.
100. Jakus S, Edmonds P, Dunton C, King SA. Margin status and excision of cervical intraepithelial neoplasia: review. *Obstet Gynecol Surv* 2000; 55(8):520-7.
101. Fan Q, Tay SK, Shen K. Loop electrosurgical excision procedure: A valuable method for the treatment of cervical intraepithelial neoplasia. *Chin J Obstet Gynecol* 2001; 36:271-4.
102. Tyler LN, Andrews N, Parrish RS, et al. Significance of margin and extent of dysplasia in loop electrosurgery excision procedure biopsies

- performed for high-grade squamous intraepithelial lesion in predicting persistent disease. *Arch Pathol Lab Med* 2007; 131(4):622-4.
103. Dobbs SP, Asmussen T, Nunns D, et al. D. Does histological incomplete excision of cervical intraepithelial neoplasia following large loop excision of transformation zone increase recurrence rates? *BJOG*. 2000; 107(10):1298-301.
104. Robboy SJ, Mutter GS, Prat J, et al. Pathology of the female reproductive tract. Elsevier (Churchill Livingstone), London, Ed 2, 2009.
105. Wright TC, Schiffman M, Solomon D, et al. Interim guidance for the use of human papillomavirus DNA testing as an adjunct to cervical cytology for screening. *Obstet Gynecol* 2004; 103:304-9.
106. Gudlevičienė Ž., Didžiapetrienė J., Sužiedėlis K., Lapkauskaitė L. Žmogaus papilomos viruso, jo tipų ir variantų tyrimai. *Medicina* 2005; 41(11):910-15.

1 priedas

CITOLOGINIO GIMDOS KAKLELIO TYRIMO (PAP) MEDŽIAGOS PAĖMIMO IR SIUNTIMO TIRTI INSTRUKCIJA

Parengė: gyd. J.Rimienė

Recenzavo: doc. D.Vaitkienė, doc. A.Laurinavičius, gyd. D. Kanopienė

INFORMACIJA PACIENTEI:

- Siekiant išvengti PAP tepinėlio užteršimo krauju, PAP tyrimas atliekamas praėjus 2 savaitėms nuo pirmosios paskutinių mėnesinių dienos (optimaliausia 10-20 mėnesinių ciklo diena).
- Moteris neturi naudoti tamponų, intravaginių preparatų, vengti lytinių santykių ir neplauti makšties 48 val. prieš PAP tyrimą.

INFORMACIJA GYDYTOJUI:

1. Tepinėlis tinka tyrimui, kai jame yra egzo ir endocervikinės gimdos kaklelio srities medžiagos.
2. Medžiaga tyrimui yra imama prieš acto rūgšties ir liugolio tirpalų panaudojimą.
3. Medvilnės tamponu švelniai nuvalomas gleivių ir paviršinio eksudato perteklius nuo gimdos kaklelio.
4. Prieš imant medžiagą PAP tyrimui makšties skėtiklis gali būti suvilgytas tik šiltu vandeniu (nenaudoti aliejaus, liubrikantų).
5. Medžiaga PAP tyrimui imama pasirinktinai vienu iš šių būdų:
 - a. mentele ir šepetėliu. Šiais instrumentais atskirai paaimama medžiagos nuo egzo ir endocervikinės gimdos kaklelio srities. Nėštumo metu šepetėlis nerekomenduojamas.
 - b. šluotele. Naudojant šį instrumentą vienu metu paaimama medžiagos nuo egzo ir endocervikinės gimdos kaklelio srities.
6. Tepinėliai fiksuojami vienu iš šių būdų:
 - a. aerosoliniais-purškiamaisiais fiksatoriais;
 - b. 96% etanoliu;

SIUNTIMO TIRTI (SAM forma Nr. 014-1\A, 2000 01 10 d.) PILDYMO REIKALAVIMAI.

Siuntime pažymėti:

1. Vardą, pavardę, asmens kodą, gimimo datą.
2. Tepinėlio fiksacijai naudojamą fiksuojamą medžiagą.
3. Klinikinę išvadą.
4. Paskutinių mėnesinių datą ar klimakterinį periodą.
5. Hormoninių preparatų, kontraceptinių priemonių vartojimą.
6. Makroskopinius gimdos kaklelio pokyčius.
7. Ankščiau atliktus morfologinius tyrimus.
8. ŽPV tyrimo rezultatus, jeigu moteriai buvo atliktas ŽPV tyrimas.
9. Taikytą spindulinį ar chemoterapinį gydymą.

DAŽNIAUSIAI PASITAIKANČIOS KLAIDOS:

- Tepinėlis paimtas aktyvaus uždegimo metu.
- Netinkamai padarytas tepinėlis (storas, užterštas krauju ar gleivėmis, ląstelės suspaustos).

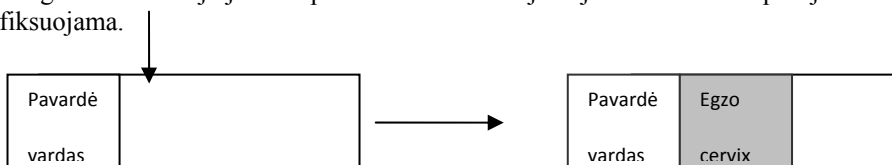
- Tėpinėlio užteršimas drėkinančiomis medžiagomis.
- Nepakanka medžiagos iš makštinės gimdos kaklelio srities (egzocervikso).
- Transformacijos zonos elementų nebuvimas.
- Džiuvimo ore artefaktai laiku ir tinkamai nefiksavus tepinėlio.
- Klaidingai paženklintas arba nepaženklintas tepinėlis.
- Nėra visų reikalingų duomenų paciento identifikavimui, neįskaitomi duomenys, klaidingas asmens kodas.

CITOLOGINIO TEPINĖLIO PARUOŠIMO BŪDAI

A. TEPINĖLIO PARUOŠIMAS NAUDOJANT MENTELĘ IR ŠEPETĖLĮ-



1. Paženklinamas objektinis stiklis: paprastu pieštuku objekcinio stiklio šlifuojuoje dalyje užrašoma moters pavardė ir vardas.
2. Kai medžiaga imama mentele ir šepetėliu pirma naudojama mentelė.
3. Ilgesnis mentelės galas įvedamas į gimdos kaklelio žiotis.
4. Mentelė sukama vieną kartą visu gimdos kaklelio paviršiumi.
5. Gauta medžiaga braukiamuoju judesiu paskleidžiama vienoje objekcinio stiklio pusėje ir tučtuojau fiksuojama.

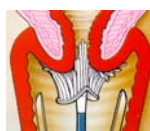


6. Svarbu, kad citologinis fiksatorius nepatektų į priešingą stiklio pusę, todėl citologiniu fiksatoriumi fiksuojama tik ta stiklio pusė, kurioje yra uždėta citologinė medžiaga.
7. Vėliau naudojamas šepetėlis. Jis kišamas į endocervikinį kanalą, kad būtų matomi galiniai jo šereliai. Per giliai įkištas šepetėlis paima apatinio gimdos kūno segmento liaukinių ląstelių.
8. Šepetėlis švelniai pasukamas 1/4 – 1/2 gimdos kaklelio kanalo paviršiaus, nes kraštiniai šepetėlio šereliai kontaktuoja su visu gimdos kaklelio kanalo paviršiumi. Sukant šepetėlį visu gimdos kaklelio kanalu sukliamas kraujavimas, traumuojama gleivinė.
9. Gauta medžiaga nuo šepetėlio ritinamuoju judesiu švelniai paskleidžiama priešingoje stiklio pusėje ir nedelsiant fiksuojama.

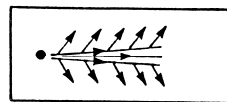


10. Paruoštas tepinėlis fiksuojamas vienu iš šių metodų: aerosoliniu fiksatoriumi – purškama iš 25-30 cm atstumo (2-3 paspaudimai), palaukiama kol nudžius ar 10-15 min. tepinėlis merkiamas į 96° etilo alkoholį.
11. Taip pat tepinėlį galima pagaminti ir paeiliui vieną po kitos paskleidžiant medžiagą per visą objekcinį stiklį ir tuomet užfiksuoti.

B. TEPINĖLIO PARUOŠIMAS NAUDOJANT ŠLUOTELĘ-



1. Paženklinamas objektinis stiklis: paprastu pieštuku objekcinio stiklio šlifuitoje dalyje užrašoma moters pavardė ir vardas.
2. Ilgieji šluotelės šereliai įvedami į endocervikinį kanalą taip, kad šluotelės
3. trumpieji šereliai kontaktuotų su išorine gimdos kaklelio dalimi.
4. Šluotelė sukama 3-5 kartus laikrodžio rodyklės kryptimi.
5. Paimta medžiaga nuo abiejų šluotelės pusių piešiamuoju judesiu paskleidžiama ant stiklio ir nedelsiant fiksuojama.



Pavardė	Egzo/endo
vardas	cervix

5. Paruoštas tepinėlis nedelsiant fiksuojamas vienu iš šių metodų: aerosoliniu fiksatoriumi – purškama iš 25-30 cm atstumo (2-3 paspaudimai), palaukiama kol nudžius ar 10-15 min. tepinėlis merkiamas į 96° etilo

2 priedas

GIMDOS KAKLELIO IR MAKŠTIES CITOLOGINIO TEPINĖLIO (PAP) VERTINIMAS PAGAL 2001m. BETHESDA SISTEMĄ.



© VALSTYBINIS PATOLOGIJOS CENTRAS

Vilnius, 2005

Parengė: J. Rimienė

Recenzavo: D. Kanopienė, J. Didžiapetrienė, A. Vaitkuviene

Patvirtino: VPC direktorius

Šis dokumentas yra parengtas pagal pasaulyje taikomas JAV Nacionalinio vėžio instituto rekomendacijas. Citologinė 2001m. Bethesda sistema yra sudaryta pagal naujausių mokslinių tyrimų ir pirmųjų gimdos kaklelio patologijos patikros programų rezultatus. Ji integruoja dabartinius gimdos kaklelio patologijos vystymosi biomechanizmus ir citologinio tyrimo technologinius momentus. 2001m. Bethesda sistemos tikslas - efektyvus laboratorijų ir klinikistų bendravimas, interpretuojant standartizuotus gimdos kaklelio citologinio tyrimo rezultatus, naudojant visuotinai priimtas pacienčių priežiūros su patologine gimdos kaklelio citologija rekomendacijas. Valstybinis patologijos centras nėra atsakingas už šių rekomendacijų taikymo ar netaikymo pasekmes

Pap tyrimas yra efektyvus gimdos kaklelio vėžio kontrolės būdas. Citologinio tyrimo sėkmę nulemia tyrimus atliekančio personalo kvalifikacija, standartizuotos tyrimo metodikos ir kokybės kontrolė.

Įprastiniu būdu ruošiant tepinėlius Pap tyrimo jautrumo vidurkis – 49 (30-80%), specifiškumo – 95 (86-100%), todėl pastaruosiu metu pasaulyje plačiai diegiamos naujos vienasluoksni citologinio tepinėlio gamybos technologijos iš skystyje pasklidusių ląstelių (skystų terpių preparatai). Šiais metodais gaminant tepinėlius galima dažniau nei įprastiniais (18 %) rasti displazinių ląstelių.

PAP TYRIMO ATSAKYMŲ FORMA

Valstybinio Patologijos centro diagnostikos skyriaus citopatologijos sektorius citologinių gimdos kaklelio tyrimų išvadas formuluoja vadovaujantis 2001m. Bethesda citologinių diagnozių sistema. Ši Bethesda sistema, kaip ir ankstesni jos pirmtakai (1988 ir 1991m.), rekomenduoja tam tikrą citologinio atsakymo formą. Ji susideda iš Pap tepinėlio tinkamumo tirti įvertinimo, citologinės išvados/rezultatų interpretacijos ir patologo komentaro/rekomendacijos.

Pap tyrimo atsakymo dalys:

I. MIKROSKOPINIS APRAŠYMAS.

II. IŠVADA:

a. TEPINĖLIO TINKAMUMO ĮVERTINIMAS.

b. IŠVADA-DIAGNOZĖ.

III. REKOMENDACIJA-KOMENTARAS.

2001m. Bethesda sistema (sutrumpinta)

1. TEPINĖLIO TINKAMUMO ĮVERTINIMAS. KATEGORIJOS:

- **TEPINĖLIS TINKA TYRIMUI**, kai :
 - Tepinėlyje yra 8 000 iki 12 000 plokščiojo epitelio ląstelių iš egzocervikinės gimdos kaklelio srities
 - Yra/nėra transformacijos ir/ar endocervikinės gimdos kaklelio srities komponentų,
 - Esant priemaišų (kraujo, uždegimo eksudato) ar džiūvimo ore artefaktų, laiku nefiksavus tepinėlio, vis dėlto įmanoma išanalizuoti bent 25 % citologinės tepinėlio medžiagos.
- **TEPINĖLIS NETINKA TYRIMUI**, kai:
 - Nepakankam plokščiojo epitelio ląstelių
 - Daugiau nei 75 % tepinėlio epitelio ląstelių neįmanoma išanalizuoti dėl gausaus kraujo, uždegimo eksudato
- **TYRIMO SULAIKYMO PRIEŽASTYS:**
 - Nepažymėtas/klaidingai pažymėtas citologinis tepinėlis
 - Neatstatomai sudužęs tepinėlis ir kt.

2. IŠVADOS. BENDROSIOS KATEGORIJOS (pasirinktinai)

- **NĖRA INTRAEPITELINIŲ PAKITIMŲ AR PIKTYBINIO NAVIKO.**
- **EPITELIO LĄSTELIŲ PATOLOGIJA..**
- **KITA.**

NĖRA INTRAEPITELINIŲ PAKITIMŲ AR PIKTYBINIO NAVIKO KATEGORIJA

- Organizmai:
 - *Trichomonas vaginalis.*
 - *Candida spp.* grybeliai.

- Pakitusi mikroflora, gali būti dėl bakterinės vaginozės.
 - *Actinomyces spp.* bakterijos.
 - Ląstelių pakitimai, susiję su *Herpes simplex* virusu.
- Kiti neneoplaziniai radiniai (pasirinktinai; sutrumpintas sąrašas)
 - Reaktyvūs ląstelių pakitimai, susiję su:
 - uždegimu (priklauso ir tipinė reparacija),
 - radiacija,
 - intrauterinine kontracepcine spirale,
 - liaukinės ląstelės po histerektomijos,
 - atrofija.

EPITELIO LAŠTELIŲ PATOLOGIJA

Plokščiojo epitelio

- Atipinės plokščiojo epitelio ląstelės (ASC):
 - nenustatytos reikšmės (ASC-US),
 - galimi žymūs plokščialąsteliniai intraepiteliniai pakitimai HSIL (ASC-H).
- Nežymūs intraepiteliniai plokščialąsteliniai pakitimai (LSIL): ŽPV/neryški displazija/intraepitelinė gimdos kaklelio neoplazija (CIN I).
- Žymūs plokščialąsteliniai intraepiteliniai pakitimai (HSIL): vidutinė, ryški displazija, carcinoma in situ; intraepitelinė gimdos kaklelio neoplazija (CIN II ir CIN III).
- Plokščialąstelinė karcinoma.

Liaukinio epitelio

- Atipinės liaukinės ląstelės (AGC), klasifikuojamos kaip endocervikinės, endometriumo ar neklasifikuojamos.
- Atipinės liaukinės ląstelės (AGC), gali būti piktybinės ir klasifikuojamos kaip endocervikalinės, endometriumo ar neklasifikuojamos.
- Endocervikinė adenocarcinoma in situ (AIS).
- Adenokarcinoma.

KITI:

- **Savaime nusilupusios 40m. bei vyresnio amžiaus moterų endometriumo ląstelės rastos PAP tepinėlyje.**

3. AUTOMATIZUOTOS PERŽIŪROS IR PAPILDOMŲ TYRIMŲ REZULTATAI

4. PASTABOS, REKOMENDACIJOS IR KOMENTARAI (vartojami pasirinktinai)

Tepinėlio tinkamumo vertinimas pagal Bethesda sistemą yra svarbus kokybės kontrolės veiksnys. Tepinėliai yra skirstomi į “ tyrimui tinkamus“ arba “netinkamus”. Tai nustatoma įvertinus: tepinėlio storį, fiksaciją, egzo/endocervixo ir transformacijos srities komponentus, ląstelių kiekį. Tepinėlio tinkamumo vertinime atžymima ar tyrimui pakankamas epitelio ląstelių kiekis.

Įprastiniu būdu paruoštas Pap tepinėlis tinka tyrimui, kai jame yra ne mažiau, kaip 8 000 - 12 000 plokščiojo epitelio ląstelių, o "vienasluoksnis tepinėlis" paruoštas iš skystyje pasklidusių ląstelių turi turėti ne mažiau kaip 5000 plokščiojo epitelio ląstelių iš egzocervikinės gimdos kaklelio srities. Metaplazavusių ir/ar liaukinių ląstelių iš transformacijos/endocervikinės srities visų tipų tepinėliuose turi būti nemažiau kaip 10. Tepinėlio vertinime gali būti atžymimos pastabos ir apie kitus kokybės indikatorius: uždegimo eksudato, kraujo, nekrozės kiekį.

Rezultatų interpretacija. Gimdos kaklelio ir makšties citologinis tyrimas yra atrankinis gimdos kaklelio patologijos tyrimas. Citologinio tyrimo rezultatai nėra galutiniai nustatant gimdos kaklelio patologiją. Galutinė gimdos kaklelio patologijos diagnozė nustatoma vadovaujantis kolposkopijos, histologijos, citologijos, klinikiniais ir molekulinės biologijos tyrimais.

Nėra intraepitelinių pakitimų ir piktybinio naviko kategorija. Siekiant supaprastinti tyrimų atsakymų interpretavimą, 2001m. Bethesda sistemoje, šia kategorija apibūdinami „normalūs ar reaktyvūs epitelio ląstelių pakitimai“. Tyrimo atsakyme, greta šios kategorijos, pasirinktinai komentuojami ir kiti neneoplaziniai pakitimai, pvz: „*Nėra intraepitelinių pakitimų ir piktybinio naviko. Atrofija.*“ , jeigu nustatyti patologiniai mikroorganizmai tai pvz: *Nėra intraepitelinių pakitimų ir piktybinio naviko. Herpes Simplex.*

Epitelio ląstelių pakitimai. Atipinės plokščiojo epitelio ląstelės (*angl. atypical squamous cell*) yra skirstomos į "nenustatytos reikšmės" (*angl. undeterminate significance*) ir "galimi žymūs plokščialąsteliniai intraepiteliniai pokyčiai" (*cannot exclude high grade squamous intraepithelial lesions*). Šiomis kategorijomis apibūdinamos ląstelės kurių pakitimai didesni už reaktyvinius, bet dar neliudija apie SIL ir negausios ir/ar nekokybiškos displazinės ląstelės. ASC yra suprantama kaip plokščialąstelių intraepitelinių pakitimų įtarimas. Tai neišvengiama, dviprasmė kategorija, kuri yra taikoma siekiant aptikti galimus CIN II/CIN III pakitimus. Moksliniais tyrimais yra įrodyta, kad 10 - 20% moterų, kurioms citologiškai buvo nustatyta ASC, vėliau tiriant histologiškai, buvo aptikta CIN II/CIN III, o 1 iš 1000 - invazinė karcinoma.

"Atipinės plokščiojo epitelio ląstelės, galimi žymūs plokščialąsteliniai intraepiteliniai pakitimai (ASC-H)" sudaro 5 - 10% visų ASC rezultatų. Šia kategorija apibūdinama HSIL ir į jį panašūs morfologiniai pakitimai. Tai tarpinė kategorija tarp ASC-US ir HSIL. ASC-H statistiškai patikimai susijęs su histologiniais CIN II/CIN III.

Plokščialąsteliniai intraepiteliniai pakitimai (*angl. squamous intraepithelial lesion*). Jie yra skirstomi į "nežymius" ir "žymius" plokščialąstelinius intraepitelinius pakitimus (*angl. low and high grade squamous intraepithelial lesion*). Šis pakitimų skirstymas paremtas morfologiniais, virusologiniais, molekulinės biologijos tyrimais bei susirgimo gydymo taktikos skirtumais LSIL ir HSIL atveju ir panašumais CIN II ir CIN III atveju. Dažnai LSIL yra susijęs su mažos rizikos, o HSIL - su persistuojančiais didelės rizikos ŽPV tipais. Citologinis lengvos (LSIL) ir ryškios (HSIL) displazijos vaizdas yra skirtingas, priešingai nei CIN II/CIN III atveju. Vidutinės ir ryškios displazijos (CIN II ir CIN III) gydymas ir pacienčių priežiūra su patologine citologija yra vienoda, tačiau ji skiriasi lengvos (LSIL) ir ryškios (HSIL) displazijos atvejais.

Nežiūrint stipriųjų SIL klasifikacijos pusių, CIN klasifikacija yra naudinga, kai koreliuojami citologinio ir histologinio tyrimo atsakymai, stebimos pacientės. CIN klasifikacija yra vartojama pasirinktinai, greta SIL terminijos pvz: HSIL- žymūs plokščialąsteliniai intraepiteliniai pakitimai (CIN II, vidutinė displazija).

Atipinės liaukinės ląstelės –AGC (*angl. atypical glandular cell*). „Atipinės liaukinės ląstelės” citologiškai skirstomos į endocervikso ir endometriumo ląsteles. Nenustačius liaukinių ląstelių tipo (endocervikalinės vs endometriumo) taikoma “AGC tiksliau neklasifikuojama” kategorija, o plokščiojo vs liaukinio epitelio ląstelėms yra vartojama “atipinių epitelio ląstelių” kategorija. „Atipinių liaukinių ląstelių-AGC“ radimas yra reikšmingas, nes mokslinių tyrimų duomenimis yra nustatyta, kad histologiškai tiriant gimdos kaklelį moterų, kurioms citologiškai buvo nustatyta ASC diagnozė, 10 - 39 % atvejų yra nustatomi HSIL ar ikinavikiniai liaukiniai pakitimai.

Adenocarcinoma in situ –AIS. Pagal 2001m. Bethesda sistemą *adenocarcinoma in situ* yra atskira diagnostinė kategorija; citologinio metodo specifiškumas nustatyti AIS diagnozė patvirtintas moksliniais tyrimais. Morfologiškai AIS primena gerai diferencijuotą endocervikinę adenokarcinomą. Dalis citologiniais tyrimais nustatytų AIS, histologiniuose tyrimuose virsta invazyviomis adenokarcinomomis. AIS citologinę kategoriją rekomenduojama vartoti tik aptikus klasikinį AIS vaizdą. Įtartinos atipinės liaukinės ląstelės su ne visais charakteringais AIS kriterijais yra klasifikuojamos kaip “AGC, gali būti piktybinės”.

40 m. ir vyresnio amžiaus moterų savaime nusilupusių endometriumo ląstelių vertiniams citologinio tyrimo atsakyme. Savaime nusilupusių endometriumo ląstelių radimas, ypač kai jos nesusijusios su menstruaciniu periodu ar egzogenine hormonų terapija, 40m. ir vyresnio amžiaus moterims yra pažymimas citologiniame gimdos kaklelio tyrimo atsakyme. Moksliniais tyrimais įrodyta, kad dažnai gerybiškai atrodančios endometriumo ląstelės susijusios su endometriumo vėžiu (6 %) ir jų radimas citologiniame tepinėlyje padidina riziką sirgti endometriumo vėžiu ir kita endometriumo patologija.

Gimdos kaklelio citologinis tyrimas yra pirminis gimdos kaklelio patologijos atrankos tyrimas nustatant plokščialąstelinius intraepitelinius pakitimus, plokščialąstelinę ir endocervikinę adenokarcinomą ir nėra skirtas endometriumo pakitimams verifikuoti, todėl Pap tyrimas neturėtų būti vartojamas įtartinai endometriumo patologijai tirti.

Automatizuota tepinėlių peržiūra ir papildomi tyrimai. Atžymos apie automatizuotus tepinėlių peržiūros ir atliktus papildomų tyrimų rezultatus yra įrašomos į citologinio tyrimo atsakymą.

Rekomendacijos ir komentarai. Patikra dėl gimdos kaklelio vėžio nebus efektyvi, jei nebus tinkamos pacienčių priežiūros, kurioms citologiškai nustatyta patologija rekomendacijų. 2001m. Bethesda sistema citologinio tyrimo atsakyme rekomenduoja vartoti pacienčių priežiūros su patologine citologija rekomendacijas. Jos turėtų atitikti autoritetingų organizacijų, tokių kaip JAV kolposkopijos ir gimdos kaklelio patologijos (ASCCP), JAV akušerių ir ginekologų

organizacijų priimtus standartus. Šių rekomendacijų vartojimas yra neprivalomas. Jos skiriamos tyrimą atsiuntusiam klinicistui. Nepatartina tiesiogiai kontaktuoti su pacientėmis, tai atlieka klinicistas. Tiesioginis kontaktas su paciente yra rekomenduojamas, kai to pageidauja klinicistas.

3 priedas

Kvietimas dalyvauti tyrime

Data ()

Gydytojo pavardė

Mes kviečiame Jus dalyvauti, mūsų nuomone, svarbaus tyrimo „**Ikinavikinės gimdos kaklelio patologijos panaudojus naują kombinuotą skystų terpių Papspin citologijos ir ŽPV DNR nustatymo metodą, tyrimo efektyvumo įvertinimas**“ projekte. Kad padėtume Jums suvokti tyrimo esmę, pateikiame šią informaciją ir norime būti tikri, kad prieš pradėdami dalyvauti tyrime, ją supratote. Nedvejodami klauskite, kas pateiktoje informacijoje Jums neaišku, o mes pasistengsime kuo aiškiau viską paaiškinti ir suteikti papildomą informaciją. Jei atsisakysite dalyvauti tyrime, vis tiek visi reikalingi tyrimai bus atlikti, o jei reikia paskirtas gydymas.

Įvadas: Atlikus citologinį gimdos kaklelio tyrimą, galima nustatyti ankstyvus ikivėžinius gimdos kaklelio ląstelių pakitimus, juos išgydyti ir taip išvengti gimdos kaklelio vėžio. Šiuo metu Lietuvoje naudojamas tyrimo būdas įprastinis tepinėlis yra nepakankamai tobulas ir net viską gerai atlikus galima nenustatyti esamų pakitimų. Šiuo metu pasaulyje pradėtos taikyti naujos skystų terpių metodikos, kurios 12 proc. daugiau nei įprastinis tepinėlis nustato ikivėžinius pakitimus, o likusi po citologinio tyrimo terpė yra tiriama dėl Žmogaus papilomos viruso (ŽPV) infekcijos, kuri yra vienas svarbiausių gimdos kaklelio vėžio rizikos veiksnių.

Tyrimo tikslas: Įvertinti naujo skystų terpių citologinio Papspin metodo efektyvumą diagnozuojant ikivėžinius gimdos kaklelio pakitimus. Palyginti (įprastinio ir naujo) citologinio tyrimo, histologinio ir ŽPV tyrimų rezultatus, tais atvejais, kai Pap tyrime bus nustatyta ląstelių patologija.

Metodas: Ginekologinės apžiūros metu šluotele paimama medžiagos nuo gimdos kaklelio paviršiaus. Ruošiamas įprastinis tepinėlis, visa likusi nuo tepinėlio medžiaga šluotelėje talpinama į terpę iš kurios bus ruošiami skystų terpių preparatai. Citologiniai tyrimai bus atliekami Valstybiniame Patologijos Centre. Kai tyrime bus nustatyta ląstelių patologija, iš likusios po citologinio tyrimo terpės bus nustatomas žmogaus papilomos virusas (VU Onkologijos Institutas). Tyrime dalyvauja 30-60 m.amžiaus moterys (nenėščios), sutikusios dalyvauti šiame tyrime ir pasirašiusios informuoto asmens sutikimo formą.

Nauda: Planuojamas tyrimas naudingas ne tik tyrėjui, bet ir tiriamosioms - bus atliktas tobulesnis citologinis tyrimas, ir esant ląstelių patologijai bus atliktas Žmogaus papilomos viruso testas.

Žala: Atliekamas citologinis gimdos kaklelio tyrimas yra visiškai nežalingas, nes medžiagos paėmimui vartojamas instrumentas- Papette šluotelė yra elastingas instrumentas švelniais šereliais.

Asmens slaptumas yra garantuojamas, tyrimo duomenimis galės pasinaudoti tik tyrėjų grupės dalyviai.

Jeigu prireiks papildomos informacijos susijusios su tyrimu, tyrėjams bus suteikta teisė susipažinti su jūsų asmens sveikatos istorija.

Pagrindino tyrėjo vardas ir pavardė, parašas:

Arvydas Laurinavičius

Živilė Gudlevičienė

4 priedas

PapSpin duomenų rinkimo anketa

- TEPINĖLIO ĮVERTINIMAS PACIENTĖS ID/a/k □□□□□□□□□□

-

TEPINĖLIO INTERPRETAVIMAS IR IŠVADOS

-

-

- 1 DALIS: (pildo techninis darbuotojas)

Tepinėlis netinka tyrimui, nes: Pažeistas mechaniškai Nepakankamai tiriamosios medžiagos
N/A

Proceso metu stiklelis: Sudužo Pamestas

Techninio darbuotojo inicialai: □□□ Medžiagos paruošimo data:(mėn./d./m.)
□□/□□/□□□□

-

- 2 DALIS: (pildo patologas)

-

	ADEKVATUMAS	REZULTATAS	INFEKGINIAI AGENTAI	Peržiūros data ir tyrėjo inicialai
Citotechnologas	<input type="checkbox"/> PATENKIN <input type="checkbox"/> NEPATENK TZ ląst: <input type="checkbox"/> taip <input type="checkbox"/> ne	<input type="checkbox"/> NIL <input type="checkbox"/> HSIL <input type="checkbox"/> ASC-US <input type="checkbox"/> AGC <input type="checkbox"/> ASC-H <input type="checkbox"/> CA <input type="checkbox"/> LSIL Kita _____	<input type="checkbox"/> grybel <input type="checkbox"/> bakter <input type="checkbox"/> Trich <input type="checkbox"/> Herpes Kita _____	(mėn./d./m.) □□/□□/□□ □□□
Patologas (jei reikalinga) <input type="checkbox"/> Sutinku <input type="checkbox"/> Nesutinku	<input type="checkbox"/> PATENKIN <input type="checkbox"/> NEPATENK TZ ląst: <input type="checkbox"/> taip <input type="checkbox"/> ne	<input type="checkbox"/> NIL <input type="checkbox"/> HSIL <input type="checkbox"/> ASC-US <input type="checkbox"/> AGC <input type="checkbox"/> ASC-H <input type="checkbox"/> CA <input type="checkbox"/> LSIL Kita _____	<input type="checkbox"/> grybel <input type="checkbox"/> bakter <input type="checkbox"/> Trich <input type="checkbox"/> Herpes Kita _____	(mėn./d./m.) □□/□□/□□ □□□

5 priedas. PSO histologinė klasifikacinė sistema:

1. Gimdos kaklelio intraepitelinė neoplazija pagal CIN (*Cervical Intraepithelial Neoplasia*): sistema PSO 2003

1. Gimdos kaklelio intraepitelinė neoplazija 1 laipsnio (CIN1) - branduolių polimorfizmas neryškus, tačiau gali apimti visą epitelio storį, mitozės negausios ir tik apatiniame epitelio 1/3, epitelio brendimo požymiai matomi viršutiniuose 2/3 epitelio, ir /arba koilocitinė atipija.
 - 1.1. Jei CIN1 pasižymi ryškiu branduolių polimorfizmu ir mitozėmis viduriniame 1/3, ji vertinama kaip CIN2.
2. Gimdos kaklelio intraepitelinė neoplazija 2 laipsnio (CIN2) - branduolių atipija ir polimorfizmas, mitozės apima 2/3 epitelio storio, brendimas matomas tik viršutiniame epitelio 1/3, gali būti atipinės mitozės.
 - 2.1. Jei CIN2 pasižymi ryškiu branduolių polimorfizmu ir mitozėmis viršutiniuose sluoksniuose, ji vertinama kaip CIN3.
3. Gimdos kaklelio intraepitelinė neoplazija 3 laipsnio/Carcinoma in situ (CIN3/CIS) - branduolių atipija ir polimorfizmas apima daugiau 2/3 epitelio sluoksnių arba visą jo storį, mitozės, tame tarpe gausios, visuose epitelio sluoksniuose, brendimo nėra arba tik paviršinėse epitelio ląstelėse.

2. Gimdos kaklelio karcinomos išplitimas pagal TNM/FIGO 2003

pT - pirminio naviko išplitimas:

1. pT1 - navikas neperaugantis gimdos ribų:
 - 1.1. pT1a - mikroskopiškai diagnozuotas navikas (kliniškai nematomas);*
 - 1.2. pT1a1 - stromos invazija 3mm ir mažiau į gylį, 7mm ir mažiau į plotį;**
 - 1.3. pT1a2 - stromos invazija 3-5mm į gylį, 7mm ir mažiau į plotį;
 - 1.4. pT1b - kliniškai matomas navikas arba navikas didesnis nei pT1a2;
 - 1.5. pT1b1 - kliniškai matomas navikas iki 4cm;
 - 1.6. pT1b2 - kliniškai matomas navikas virš 4cm.
2. pT2 - navikas išplitęs už gimdos ribų ne daugiau apatinio makšties 1/3 ir ne į mažojo dubens sieną:
 - 2.1. pT2a - be invazijos į parametriumą;
 - 2.2. pT2b - su invazija į parametriumą.
3. pT3 - navikas peraugęs į mažojo dubens sieną ar apatinį makšties 1/3 ar sąlygojęs hidronefrozę ar inksto afunkciją:
 - 3.1. pT3a - navikas peraugęs apatinį makšties 1/3;
 - 3.2. pT3b - navikas peraugęs į mažojo dubens sieną ar sąlygojęs hidronefrozę ar inksto afunkciją.
4. pT4 - naviko invazija į šlapimo pūslės gleivinę ar tiesiąją žarną ar išplitęs už dubens ribų.

pNo, pN1 - metastazės regioniniuose limfmazgiuose (iširti ne mažiau 10 limfmazgių) - regioniniai limfmazgiai - mažojo dubens (paracervikaliniai, parametriniai, iliakaliniai, obturatoriniai, sakraliniai ir presakraliniai) limfmazgiai

pMO, pMI - atokios metastazės

* mikroinvazinė karcinoma - subklinikinė plokščialąstelinė karcinoma, infiltruojanti stromą ne daugiau 5mm į gylį, ne daugiau 7mm į plotį. Patikimai diagnozuojama tik konizacijų ar histerektomijų medžiagoje matant visą pakenkimą.

** invazijos gylis matuojamas milimetrais nuo paviršinio epitelio (daugiasluoksniu plokščio ar liaukinio) bazinio sluoksniu (nuo artimiausios navikai stromos/epitelio jungties) iki giliausio navikinio židinio apatinio taško.

3. Gimdos kaklelio karcinomų klasifikacija pagal PSO 2003

1. Plokščialąstelinė karcinoma:
 - 1.1. Didelių ląstelių ragėjanti plokščialąstelinė karcinoma;
 - 1.2. Didelių ląstelių neragėjanti plokščialąstelinė karcinoma;
 - 1.3. Smulkių ląstelių plokščialąstelinė karcinoma;
 - 1.4. Bazaloidinė plokščialąstelinė karcinoma;
 - 1.5. Verukozinė plokščialąstelinė karcinoma;
 - 1.6. Papilinė plokščialąstelinė karcinoma;
 - 1.7. Papilinė pereinamojo epitelio ar pereinamojo epitelio - plokščialąstelinė karcinoma;
 - 1.8. Limfoepitelinė plokščialąstelinė karcinoma;
 - 1.9. Mikroinvazinė plokščialąstelinė karcinoma.
2. Adenokarcinoma:
 - 2.1. Endocervikalinė;
 - 2.2. Adenoma malignum;
 - 2.3. Viloglandulinė;
 - 2.4. Endometrioidinė;
 - 2.5. Šviesių ląstelių;
 - 2.6. Serozinė;
 - 2.7. Mezonefrinė;
 - 2.8. Žarninė;
 - 2.9. Žiedinių ląstelių.
3. Adenoplokščialąstelinė:
 - 3.1. Stiklo ląstelių (Glassy cell).
4. Adenoidinė bazalinė;
5. Adenocistinė;
6. Neuroendokrininė;
7. Kitos ir mišrios.