

Vilniaus Universitetas

Rūta Kurtinaitienė

**Gimdos kaklelio ryškių intraepitelių pokyčių rizikos veiksniai ir diagnostikos
metodai**

Daktaro disertacija

Biomedicinos mokslai, medicina (07B)

Vilnius, 2009

Darbas atliktas 2005-2009 metais Vilniaus Universiteto Medicinos fakulteto Akušerijos ir ginekologijos klinikoje

Mokslinis vadovas:

Doc. dr. Aurelija Vaitkuvienė (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, medicina-07B);

Moksliniai konsultantai:

Prof. dr. Osvaldas Rukšėnas (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai , biofizika-B02);

Prof. dr. Gražina Stanislava Drąsutienė (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, medicina- 07B);

Sutrumpinimai

APP - absoliutūs pikų (smailių) plotai

ASCUS - nenustatytos reikšmės atipinės plokščiojo epitelio ląstelės

Ak-antikūnas

BP - bendras plotas

CIN - intraepitelinė gimdos kaklelio neoplazija

CIS –gimdos kaklelio ryški intraepitelinė neoplazija *Ca in situ*

CMV - citomegalo virusas

CK – citokeratinas

EBV – Ebšteino-Baro virusas

FAD – flavinadenindinukleotidas

GK - geriamieji kontraceptikai

GKV - gimdos kaklelio vėžys

G-KSF - granulocitų kolonijas stimuliuojantis faktorius

HC – (angl. *hybrid capture*) – DNR hibridizacijos metodas

HSIL – ryškus gimdos kaklelio intraepiteliniai pokyčiai

HSV - herpes simplex virusas

HHV - human herpes virusas

IPPNN - intraepitelinų pokyčių arba piktybinio naviko neaptikta

LSIL – nežymūs gimdos kaklelio intraepiteliniai pokyčiai

LPL - lytiškai plintančios ligos

MCP - monocitų chemotaktinis proteinas

Pap tepinėlis - *Papnicolaou* citologinis tepinėlis

PCNA - proliferuojančio ląstelės branduolio antigenas

PI - pasikliautinis intervalas

PGR - polimerazės grandininė reakcija

PSPC - pirminės sveikatos priežiūros centras

SPP - santykiniai pikų (smailių) plotai

STC - skystų terpių citologija

ŠS - šansų santykis

ŽPV - žmogaus papilomos virusas

ŽIV - žmogaus imunodeficito virusas

Turinys

1. ĮVADAS	8
1.1. Darbo tikslas	12
1.2. Darbo uždaviniai	12
1.3. Ginami teiginiai	12
1.4. Darbo mokslinė ir praktinė vertė, naujovės	13
2. GIMDOS KAKLELIO RYŠKIŲ INTRAEPITELINIŲ POKYČIŲ RIZIKOS VEIKSNIAI IR DIAGNOSTIKOS METODAI (LITERATŪROS APŽVALGA)	15
2.1 Gimdos kaklelio vėžio epidemiologija	15
2.2. Gimdos kaklelio vėžio rizikos veiksniai	18
2.2.1. Žmogaus papilomos virusas	18
2.2.2. Tabako rūkymas	23
2.2.3. Lytinė elgsena ir lytinio gyvenimo ypatumai	25
2.2.4. Socialinė moterų padėtis ir informuotumas apie gimdos kaklelio patikros programą	26
2.2.5. Neštumai ir gimdymai	27
2.2.6. Kontraceptikai	27
2.2.7. Imuninė organizmo būklė	28
2.3. Gimdos kaklelio patologijos diagnostika	31
2.3.1. Įprastiniai gimdos kaklelio diagnostikos metodai - Pap testas ir skystų terpių citologiniai tyrimai	31
2.3.2. Naujieji gimdos kaklelio patologijos diagnostikos metodai	34
3. TYRIMO OBJEKTAS	46
3.1. Tirtų moterų kontingentas	47
3.2. Gimdos kaklelio nuograndų ir biopsijos mėginiai	49
4. TYRIMO METODAI	50
4.1. Anketinė apklausa	50
4.2. Laboratoriniai tyrimai	52
4.2.1. Citologinis gimdos kaklelio nuograndų tyrimas Pap tepinėlio metodu	54

4.2.2. Gimdos kaklelio biopsinės medžiagos histologinis tyrimas	56
4.2.3. Imunocheminiai baltymo p16INK4a tyrimo metodai.....	57
4.3. Optiniai tyrimo metodai	58
4.3.1. Supernatanto tyrimai liuminescenciniu spektrofotometru „Perkin Elmer LS 50B“	58
4.3.2. Sužadinimas 355 nm ilgio banga portatyviniu lietuvišku mikrolazeriu STA-01 su spektrometru „AvaSpec-2048TEC-USB2, Avantes“	59
4.3.3. Spektrinių tyrimų rezultatų vertinimas	61
4.4. Žmogaus papilomos viruso DNR nustymas ir biocheminiai proteominiai supernatanto tyrimai.....	64
4.4.1. Žmogaus papilomos viruso DNR nustatymas.....	65
4.4.2. Mikrogardelių metodas	65
4.4.3. Dvidimensinės elektroforezės ir Western bloto metodas.....	68
4.5. Statistinė duomenų analizė	69
5. TYRIMO REZULTATAI	72
5.1. Pirmosios anketinės apklausos rezultatai.....	72
5.2. Antroji anketinė apklausa	79
5.3. Laboratoriniai tyrimai	84
5.3.1. Gimdos kaklelio nuograndų citologinių tyrimų rezultatai	84
5.3.2. Gimdos kaklelio biopsinės medžiagos histologinių tyrimų rezultatai	85
5.3.3. Baltymo p16INK4a raiškos nustatymas imunocheminiais metodais	87
5.3.4. Nuograndų supernatanto tyrimų optiniais metodais rezultatai	91
5.3.5. Žmogaus papilomos viruso DNR tyrimų rezultatai	97
5.3.6. Tyrimų mikrogardelių ir biocheminiais proteominiais metodais rezultatai.....	98
6. REZULTATŲ APTARIMAS	104
7. IŠVADOS	128
8. REKOMENDACIJOS	129
9. LITERATŪROS SĄRAŠAS	130
10. PUBLIKACIJOS DISERTACIJOS TEMA	154

11. PRIEDAI	157
-------------------	-----

1. ĮVADAS

Gimdos kaklelio vėžys pagal piktybinių navikų dažnį užima antrąją vietą, o pasaulinėje moterų mirčių nuo vėžio struktūroje jam tenka trečioji vieta (Arbyn, Raifu et al. 2007; Ferlay, Autier et al. 2007). Remiantis Pasaulinės sveikatos organizacijos duomenimis, 2005 metais sergamumas gimdos kaklelio vėžiu Lietuvoje buvo 27,4/100000, mirtingumas - 11,8/100000. Lietuvos rodikliai gerokai didesni už vidutinius Europos rodiklius (World Health Organization. 2008).

Pirminė ir antrinė gimdos kaklelio vėžio profilaktika stipriai sumažintų sergamumą ir mirtingumą gimdos kaklelio vėžiu (GKV). Pirminei profilaktikai priskiriamas GKV rizikos veiksnių žinojimas, tų veiksnių eliminacija ir jų įtakos mažinimas. Pirmiausia, tai liečia moterų žinias apie žmogaus papilomos virusą ir šios infekcijos paplitimo mažinimą (vengimas užsikrėsti, profilaktika skiepais).

Antrinei profilaktikai priskiriama ikivėžinės patologijos ir ankstyvų gimdos kaklelio vėžio stadijų diagnostika (Lorincz, Castle et al. 2002), taikant citologinių tyrimų metodus, tokius kaip *Papanicolaou* (Pap tepinėlio) metodas. Šis metodas profilaktinėse gimdos kaklelio patologijos patikrose visame pasaulyje naudojamas daugiau nei 50 metų. Gimdos kaklelio vėžys yra viena iš nedaugelio piktybinių ligų, kurią nesunku diagnozuoti ankstyvoje ikivėžinių pokyčių stadijoje. Po adekvataus gydymo pasveiksta 95-100 proc. moterų (Kalliala, Anttila et al. 2005). Medicininės statistikos duomenimis, daugiau nei 90 proc. gimdos kaklelio vėžio atvejų būtų galima išvengti, jei moterys dalyvautų prevencijos programoje (Mai 2000). Didžioji moterų dalis savo nedalyvavimą patikros programoje pateisina žinių stoka apie gimdos kaklelio ligas, apie vėžio rizikos veiksnius ir apsisaugojimo būdus, taip pat patiriamu nemalonumu ar gėda, kai jas apžiūri ginekologas. Kai kurios moterys akcentuoja neturinčios jokios informacijos apie patikros programą ir siūlomas rekomendacijas (Nugent and Tamlyn-Leaman 1992; Jubelirer, Blanton et al. 1996; Branoff, Santi et al. 1997; Fitch, Greenberg et al. 1998; Larsen and Olesen 1998; Munk, Kjaer et al. 1998; Gerhardt, Pong et al. 2000; Munoz, Castellsague et al. 2006).

Klinikinių tyrimų rezultatai patvirtina gimdos kaklelio patikros programos veiksmingumą GKV prevencijoje, vis dėlto moterų dalyvavimas šioje programoje nė vienoje šalyje nėra šimtaprocentinis. Lietuvoje per pirmuosius trejus patikros metus tyrimams Pap tepinėlio metodu atvyko tik 44 proc. moterų. Anglijoje ir Švedijoje patikros programoje dalyvauja apie 83 proc., o Suomijoje – net iki 93 proc. (Anttila, Ronco et al. 2004). JAV Nacionalinis sveikatos institutas 2004 metais vykusioje konferencijoje pateikė duomenų, kad 50-60 proc. miestuose gyvenančių moterų sąmoningai ignoruoja patikros programą, joje nedalyvauja ir neatvyksta išsirtinti Pap tepinėlio metodu. Net 50 proc. moterų, kurioms buvo diagnozuotas invazinis gimdos kaklelio vėžys, niekada nebuvo iširtos Pap metodu arba joms paskutinis tyrimas buvo atliktas anksčiau nei prieš 5 metus (Spitzer 1998; Sawaya and Grimes 1999).

Pap tepinėlio metodo jautrumo ribos CIN diagnostikoje svyruoja tarp 30-80 proc., specifiškumo - tarp 14-97 proc. (Nanda, McCrory et al. 2000; Wiley, Monk et al. 2004; Arbyn, Sankaranarayanan et al. 2008). Tokie dideli rodiklių skirtumai reiškia, kad didelė dalis tyrimų yra įvertinami klaidingai kaip teigiami arba klaidingai kaip neigiami. Visa tai skatina ieškoti naujų tyrimo metodų, kurie būtų tikslesni ir palengvintų gimdos kaklelio intraepitelinį pokyčių diagnostiką, būtų patrauklūs ir tiktų rizikos grupių moterims.

JAV Maisto ir vaistų kontrolės tarnyba patvirtino naują vienasluoksnio citologinio gimdos kaklelio tepinėlio tyrimo metodą, kuriam naudojama skysta fiksuojanti terpė su pasklidusiomis joje ląstelėmis. Nustatyta, kad centrifugavimo būdu paruošti gimdos kaklelio citologiniai preparatai pagal jų kokybę ir citologinės medžiagos adekvatumą gerokai kokybiškesni ir mikroskopiniam tyrimui tinka labiau nei įprastiniai. JAV Maisto ir vaistų kontrolės tarnyba taip pat patvirtino, kad likusi po centrifugavimo skystoji mėginio dalis (supernatantas) yra tinkama žmogaus papildomos virusui nustatyti (ŽPV), chlamidijoms, gonorėjai ir kt. lytiniu keliu plintančioms ligoms tirti (Af Klinteberg, Wang-Nordman et al. 1997; Hillemanns, Weingandt et al. 2000; Munoz, Bosch et al. 2003).

Sukurtos kitos naujos technologijos - automatinis gimdos kaklelio tepinėlių analizatorius, ŽPV nustatymas PGR (*hybrid capture*) metodu, daug dėmesio skiriama molekulinį gimdos kaklelio vėžinių žymenų paieškai (p16, Ki-67, bcl-2, p53), būdų nustatyti žmogaus papilomos viruso E6/E7 mRNR (Lie, Kristensen 2008; Nam, Kim et al. 2008; Conesa-Zamora, Domenech-Peris et al. 2009; Haidopoulos, Partsinevelos et al. 2009).

Skystų terpių citologiniai tyrimai atveria platesnes galimybes ir kitiems diagnostikos metodams, tokiems kaip optiniai bei proteominiai, nes supernatantuose susikaupia daug medžiagų, būdingų įvairiems epitelio pokyčiams charakterizuojančių epitelio proliferacijos ypatybės. Tarp šių apykaitos produktų yra medžiagų, kurios gali būti aptiktos fluorescencinės spektroskopijos būdu. Plačios žadinimo zonos fluorescencijos spektrų vizualizacija leistų sukurti taip vadinamą „elektroninį Pap tepinėlį“, kuris gali būti informatyvus vaizdinis tyrimo metodas gimdos kaklelio patologijos diagnostikoje, taip pat ir patikimą skaitmeninį diagnostinį algoritmą.

Per pastarąjį dešimtmetį daug dėmesio skiriama optiniams diagnostiniams metodams. Susidomėjimą jais stiprina jų neinvazinis pobūdis, didesnis jautrumas ir skiriamoji geba lyginant su įprastais diagnostikos metodais: branduolio magnetiniu rezonansu, kompiuterine tomografija arba sonoskopija (Hillemanns, Weingandt et al. 2000). Optiniais metodais galima aptikti morfologinius ir biocheminius gimdos kaklelio epitelio pokyčius be chirurginės invazijos ir iškart. Tai taip vadinama „diagnostika prie paciento lovos“.

Kiti optiniai tyrimo metodai gimdos kaklelio ligų diagnostikoje yra atspindžio spektroskopija (Ramanujam, Mitchell et al. 1994; Richards-Kortum, Mitchell et al. 1994; Ramanujam, Mitchell et al. 1996; Ramanujam, Mitchell et al. 1996), fluorescencinė spektroskopija (Brookner, Utzinger et al. 1999; Mitchell, Cantor et al. 1999; Chang, Dawood et al. 2002; Brookner, Utzinger et al. 2003), Ramano sklaidos spektroskopija (Drezek, Brookner et al. 2001), konfokalinė mikroskopija (Shim, Song et al. 2000). Vis dėlto iš neinvazinių mobilių diagnostikos metodų labiausiai perspektyvi fluorescencinė spektroskopija. Šio metodo jautrumas gimdos kaklelio patikroje yra pakankamai aukštas - 75 proc., specifiškumas - 80 proc. Spektrofotometriniai tyrimai *in vitro* gali būti derinami

su papildomu proteominiu, biocheminiu tiriamosios medžiagos ištyrimu ir biožymenų panaudojimu, nustatant pakitusius baltymus gimdos kaklelio nuograndose (Wong, Cheung et al. 2004).

Optinės technologijos turi didžiulį pritaikymo klinikinėje praktikoje potencialą. Gimdos kaklelio intraepitelinių pakitimų diagnostika iš karto, vietoje, nereikalaujanti papildomų paciento vizitų, sutaupytą laiko ir lėšų. Visa tai ypač aktualu ekonomiškai silpnose ir besivystančiose šalyse.

Daug lūkesčių siejama ir su greita nanomedicinos plėtra. Pastaruoju metu sparčiai besivystančios mikrogardelių technologijos atveria klinacistams naujas galimybes tiek giliau pažinti patologijos procesus, tiek juos aptikti ankstyvesnėje stadijoje (Tomizaki, Usui et al. 2005; Eisenstein 2006). Didelis mikrogardelių metodo privalumas yra tai, kad tokie įrenginiai leidžia betarpiškai analizuoti kelių šimtų pacientų mėginius vienu metu, gauti informaciją apie pasirinktų baltymų-žymenų tarpusavio sąveikas bei įvairių onkogeninių faktorių įtaką. Be to šie tyrimo metodai galėtų būti taikomi kaip savęs patikrinimo testai gimdos kaklelio patologijos profilaktikoje

Naujų, greitų, jautrių, nebrangių ir neinvazyvių diagnostikos metodų paieška sudarytų galimybę diagnozuoti ryškius intraepitelinius gimdos kaklelio pokyčius (HSIL) jau pirmojo pacientės apsilankymo pas ginekologą metu, o sukurtas savęs testavimo metodas, kaip patrauklus ir prieinamas kiekvienai moteriai, paskatintų kreiptis į ginekologus nedelsiant. Šie metodai ir laboratorijoje būtų vertingi patikslinant citologinį įvertinimą. Savime suprantama, kad didelis dėmesys turi būti skiriamas ne tik diagnostikos metodų tobulinimui, bet ir visuomenės, ypač padidintos rizikos grupių švietimui apie GKV rizikos veiksnius, jų prevencijos galimybes, skatinant moteris reguliariai lankytis pas ginekologus.

Mes iškėlėme sau uždavinį ieškoti naujų molekulinį diagnostikos metodų, kuriais būtų galima diagnozuoti HSIL, panaudojant profilaktinėje gimdos kaklelio vėžio patikroje supernatantinius mėginius. Šiam darbui pasirinkome optinius ir biocheminius tyrimo metodus, siekdami nustatyti HSIL rizikos veiksnius. Anketinė moterų apklausa buvo vykdoma, siekiant išaiškinti Vilniaus mieste gyvenančių moterų žinias apie gimdos

kaklelio vėžio rizikos veiksnius, apie Lietuvoje vykdomą profilaktinę gimdos kaklelio vėžio patikros programą, nustatyti moterų lankymosi pas ginekologus dažnį.

1.1. Darbo tikslas

Gimdos kaklelio ryškių intraepitelinių pokyčių tiesioginės patikros metodų paieška ir jų optimizavimas atsižvelgiant į nustatytus rizikos veiksnius.

1.2. Darbo uždaviniai

1. Anketinių apklausų metodu ištirti moterų socialinių ir medicininių rizikos veiksnių ryšį su ikivėžinėmis gimdos kaklelio būklėmis.
2. Pritaikyti gimdos kaklelio nuograndų skystosios dalies (supernatanto) tyrimui tiesioginius molekulinės diagnostikos metodus.
3. Nustatyti supernatanto autofluorescencijos spektrų parametrų skirtumus, kuriais remiantis būtų galima diagnozuoti ryškius intraepitelinius gimdos kaklelio pokyčius, t.y. atskirti ikivėžines būkles nuo sveikų gimdos kaklelio audinių.
4. Įvertinti mikrogardelių metodo tinkamumą diagnozuojant p16INK4a gimdos kaklelio nuograndų supernatante.

1.3. Ginami teiginiai

1. Svarbiausi HSIL rizikos veiksniai yra nesiskiepijimas nuo gripo, nepakankamos higieninės sanitarinės gyvenimo sąlygos (Lietuvoje tokiomis sąlygomis dažniausia gyvena kaimo ir kaimo gyvenviečių moterys), anksčiau negydyta gimdos kaklelio patologija, žemesnis moters išsilavinimas (pradinis-spec.vidurinis), valstybinės gimdos kaklelio patikros programos edukaciniai netolygumai, - visi šie rodikliai rodo mūsų visuomenės socialinės brandos žemą lygį, ir tai trukdo patikros programos sėkmei bei reikalauja specialių prevencinių metodų pritaikymo rizikos grupėms.

GKV atrankos programos efektyvumui padidinti būtina atsižvelgti į žemesnės socialinės brandos visuomenės dalį pritaikant specialias diagnostikos metodikas.

2. Mobili autofluorescencijos spektrometrija ir švytintys proteominiai žymenys ant mikrogardelių yra potencialūs gimdos kaklelio ryškios intraepitelinės neoplazijos diagnostikos metodai, kuriuos galima taikyti rizikos grupių moterims neorganizuotos gimdos kaklelio patikros regionuose.

1.4. Darbo mokslinė ir praktinė vertė, naujovės

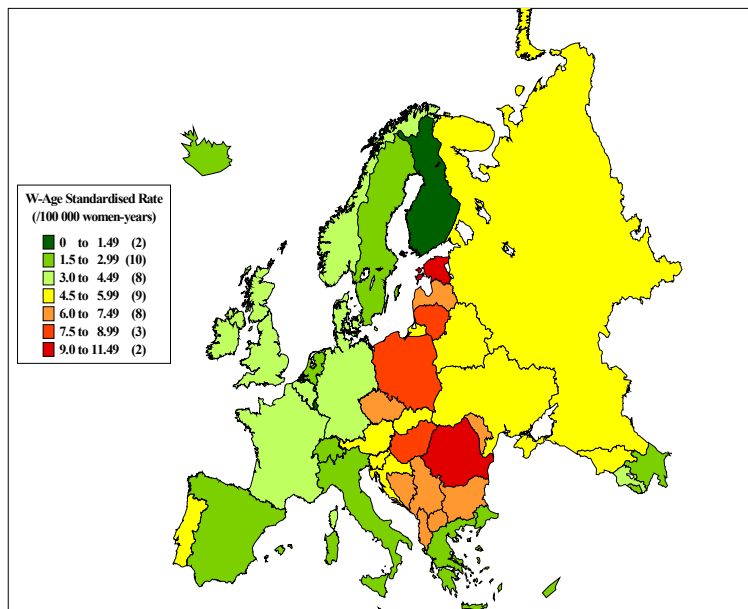
1. Remiantis anketinės apklausos duomenimis, išaiškintas Vilniaus mieste gyvenančių moterų informuotumas apie ŽPV ir gimdos kaklelio vėžio patikros programą Lietuvoje. Darbų, kuriuose gimdos kaklelio patologija būtų siejama su demografiniais, socialiniais ir ekonominiais veiksniais Lietuvoje nėra publikuota. Remiantis mūsų tyrimų duomenimis, Lietuvoje galima padidinti gimdos kaklelio patikros programos efektyvumą, atsižvelgiant į moterų pasiskirstymą pagal rizikos grupes. Žemos socialinės brandos rizikos grupei pritaikius tiesioginius ir tikslus HSIL (CIN2+) atrankos metodus, tikėtini sėkmingesni gimdos kaklelio vėžio profilaktikos rezultatai, sumažėtų sergamumas ir mirtingumas nuo gimdos kaklelio vėžio.
2. Atlikti spektroskopiniai ir biocheminiai proteominiai gimdos kaklelio nuograndų supernatantų tyrimai bei lyginamoji duomenų analizė. Spektroskopinės fluorescencijos tyrimų duomenys buvo lyginti su citologinių ir histologinių gimdos kaklelio tyrimų duomenimis. Nustatytas spektroskopijos metodo jautrumas ir specifiškumas, kuriais galima remtis, diferencijuojant IPPNN atvejus nuo HSIL, t.y. citologiniais tyrimais patvirtintus intraepitelinio naviko ir malignizacijos neturinčius atvejus nuo ryškios intraepitelinių gimdos kaklelio patologijos. Supernatanto fluorescencijos spektrų tyrimai Lietuvoje atlikti pirmą kartą (autofluorescencijos tyrimų literatūroje neaptikta). Praktinė šių tyrimų vertė: sukurtas naujas tiesioginis metodas, pagreitinantis gimdos kaklelio ryškių intraepitelinių pakitimų preliminarią diagnostiką (galutinė diagnozė remiasi histologiniu tyrimu),

- spektroskopiniam tyrimui naudojamas prietaisas yra nešiojamas ir gali būti taikomas gydytojo darbo vietoje.
3. Atlikta baltymo p16INK4a paieška supernatante mikrogardelių metodu, literatūros šaltiniuose analogo nerasta. Mikrogardelių praktinė šio tyrimo vertė:
- siūloma mikrogardelių tyrimo metodo pagrindu sukurti testą, kuris galėtų būti taikomas savityrai-moteris galėtų šį testą atlikti pati ir patologijos atveju kreiptis į gydytojus akušerius ginekologus nedelsiant.

2. GIMDOS KAKLELIO RYŠKIŲ INTRAEPITELINIŲ POKYČIŲ RIZIKOS VEIKSNIAI IR DIAGNOSTIKOS METODAI (LITERATŪROS APŽVALGA)

2.1 Gimdos kaklelio vėžio epidemiologija

Gimdos kaklelio vėžys pagal piktybinių navikų dažnį užima antrąją vietą, o pasaulinėje moterų mirčių nuo vėžio struktūroje jam tenka trečioji vieta (Arbyn, Raifu et al. 2007; Ferlay, Autier et al. 2007). Europos sąjungos 27 valstybėse 2004 metais buvo naujai išaiškinti 34300 gimdos kaklelio vėžio atvejai ir užregistruota apie 16300 mirčių nuo šios ligos, t.y. mirdavo po 44-45 moteris kiekvieną dieną (1 pav.).



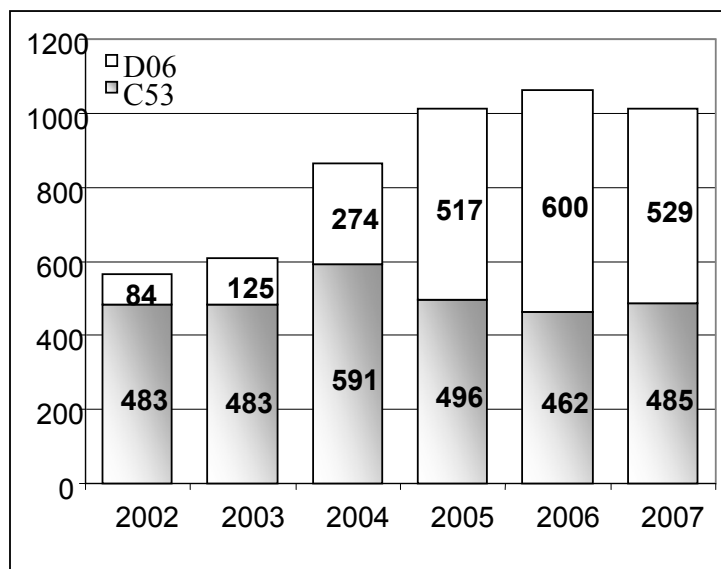
1 pav. Mirtingumas nuo gimdos kaklelio vėžio Europoje (Globocan, 2000, IARC. Žemėlapi parengė M.Arbyn).

Remiantis Pasaulinės sveikatos organizacijos duomenimis, 2005 metais sergamumas gimdos kaklelio vėžiu Lietuvoje buvo 27,4/100000, mirtingumas - 11,8/100000. Lietuvos rodikliai gerokai didesni už vidutinius Europos rodiklius (World Health Organization. 2008).

Gimdos kaklelio vėžio patikros programos yra taikomos arba stengiamasi jas įdiegti visame pasaulyje, nes sergamumo GKV problema aktuali visoms pasaulio šalims (Parkin, Bray et al. 2005). Mažesnis ar didesnis sergamumas bei mirtingumas nuo gimdos kaklelio

vėžio įvairiose šalyse yra aiškinamas gimdos kaklelio patikros programos efektyvumu (Parkin, Bray et al. 2001).

Lietuvoje valstybinė gimdos kaklelio patikros programa pradėta nuo 2004 m. vidurio, jos tikslas - sumažinti Lietuvos moterų sergamumą ir mirtingumą nuo gimdos kaklelio vėžio. Vertinant Lietuvos vėžio registro duomenis apie naujų GKV rodiklių dinamiką 2002-2007 metais, galima teigti, kad nuo gimdos kaklelio piktybinių navikų prevencinių priemonių įgyvendinimo pradžios (t.y. nuo 2004 m.) sergamumo ikivėžinėmis gimdos kaklelio ligomis (D06) išaiškinimas ženkliai išaugo (2 pav.). Toks žymus išaiškintų susirgimų skaičiaus padidėjimas yra tiesioginis gimdos kaklelio patikros programos įgyvendinimo rezultatas. Mirčių nuo GKV rodikliai 2004-2007 metais Lietuvoje nesumažėjo, vis dėlto po kelerių metų patikros programos reikšmė mirtingumo mažėjimui turėtų išaiškėti.



2 pav. Išplitusio gimdos kaklelio vėžio ir *Ca in situ* naujų atvejų išaiškinimo rodikliai Lietuvoje 2002-2007 m.

Skirtingai nei kitų lokalizacijų vėžiniai susirgimai, gimdos kaklelio vėžys aptinkamas jaunoms vaisingo amžiaus moterims, todėl ši liga neabejotinai turi įtakos visuomenės demografiniams ir ekonominiams rodikliams (Žilinskas, Čigrėjienė et al. 2002).

Mokslinėje literatūroje aptinkame teiginių, kad gimdos kaklelio vėžys yra viena iš nedaugelio piktybinių ligų, kurią nesunku diagnozuoti ankstyvoje ikivėžinių pokyčių stadijoje, o po adekvataus gydymo pasveikstama 95-100 proc. (Kalliala, Anttila et al. 2005). Taigi gerinant ankstyvą diagnostiką ir efektyviau išaiškinant gimdos kaklelio patologijos ikivėžines būkles bei skatinant moteris aktyviau dalyvauti patikros programoje, galima pasiekti sergamumo ir mirtingumo nuo gimdos kaklelio vėžio sumažėjimo.

Profilaktinėse gimdos kaklelio patikrose daugiau nei 50 metų visame pasaulyje yra taikomas *Papanicolaou* (Pap tepinėlio) metodas. Šio metodo jautrumo ribos svyruoja tarp 30-80 proc., specifiškumo – tarp 14-97 proc. (Nanda, McCrory et al. 2000; Wiley, Monk et al. 2004; Arbyn, Sankaranarayanan et al. 2008). Pap tepinėlio metodas yra nuolat tobulinamas, stengiamasi padidinti jo jautrumą ir specifiškumą. Sukurtos naujos technologijos, papildomi ir alternatyvūs tyrimo metodai - skystos terpės citologiniams tepinėliams, automatinis gimdos kaklelio tepinėlių analizatorius, ŽPV nustatymas PGR ir HC (*hybrid capture*) metodu, daug dėmesio skiriama molekulinį gimdos kaklelio vėžinių žymenų paieškai (p16 ir Ki-67) bei ŽPV E6/E7 mRNR nustatymui (Lie and Kristensen 2008); (Anttila, Ronco et al. 2004; Kotaniemi-Talonen, Nieminen et al. 2005; Nieminen, Kotaniemi et al. 2005).

1996 m. JAV Maisto ir vaistų kontrolės tarnyba patvirtino naują vienasluoksnio citologinio gimdos kaklelio tepinėlio tyrimo būdą. Vienasluoksnis tepinėlis ruošiamas centrifuguojant skystą fiksuojančią terpę su pasklidusiomis joje ląstelėmis. Vertinant gimdos kaklelio citologinius preparatus pagal jų kokybę ir citologinės medžiagos adekvatumą nustatyta, kad šiuo būdu pagaminti tepinėliai gerokai kokybiškesni ir mikroskopiniam tyrimui tinka labiau nei įprastiniai Pap tepinėliai.

Įvairių autorių duomenimis, skystų terpių citologijos tyrimas yra jautresnis už Pap tepinėlio metodą 2,8-12 proc. Europos klinikinėse mokslo tyrimo laboratorijose atlikta multicentrinė studija parodė, jog tiriant skystų terpių citologijos būdu pavyksta nustatyti žymiai didesnę ikivėžinių gimdos kaklelio susirgimų skaičių (ASCUS daugiau nei 29

proc., LSIL - 39 proc.) nei paprastu Pap tepinėlio metodu (Monsonogo, Autillo-Touati et al. 2001).

JAV Maisto ir vaistų kontrolės tarnyba taip pat patvirtino, kad likusi po centrifugavimo skystoji mėginio dalis yra tinkama žmogaus papilomos virusui nustatyti (ŽPV), kuris yra pagrindinis gimdos kaklelio vėžio rizikos veiksnys ir neabejotina jo priežastis (Af Klinteberg, Wang-Nordman et al. 1997; Hillemanns, Weingandt et al. 2000; Munoz, Bosch et al. 2003).

2.2. Gimdos kaklelio vėžio rizikos veiksniai

Pagal kilmę rizikos veiksniai skirstomi į 3 grupes:

1. Virusiniai: ŽPV tipas, virusinio užkrato krūvis, viruso integracija į genomą.
2. Egzogeniniai arba aplinkos (šeimininko koreguojami) veiksniai, tokie kaip hormoniniai kontraceptikai, rūkymas, įvairios lytiškai plintančios ligos, nėštumų skaičius, lytinio gyvenimo ypatumai ir kt.
3. Endogeniniai (šeimininko nekoreguojami) veiksniai, kaip, pvz., endogeninių hormonų būklė, genetiniai ir imuniniai veiksniai (Munoz, Castellsague et al. 2006).

2.2.1. Žmogaus papilomos virusas

Rizikos veiksniai, susiję su žmogaus papilomos virusu, gali būti skirstomi į infekcijos plitimą skatinančius veiksnius, į viruso persistenciją sąlygojančius veiksnius ir paties viruso onkogeniškumo laipsnį.

ŽPV - lytiniu keliu plintanti liga, todėl didžiausia rizika užsikrėsti šiuo virusu yra jauniems, lytiškai aktyviems asmenims (Schlecht, Franco et al. 2001). Lytinių partnerių skaičius, jų didelė kaita, lytinio gyvenimo ankstyva pradžia padidina užsikrėtimo riziką (Karlsson, Jonsson et al. 1995; Thomas, Ray et al. 1996; Castellsague, Ghaffari et al. 1997; Koutsky and Harper 2006; Szostek, Zawilinska et al. 2009). Mokslinėje literatūroje skelbiama, kad jau yra žinoma daugiau kaip 130 ŽPV tipų (Clifford, Gallus et al. 2005; Dillner, Rebolj et al. 2008).

ŽPV per mikropažeidimus patenka į epitelio pamatinio sluoksnio ląsteles, čia dauginasi, patenka į paviršinius sluoksnius ir išsiskiria į aplinką. Virusų veikimo esmė - ląstelės genų, dalyvaujančių ląstelės dalijimosi ir proliferacijos procesuose, funkcijų sutrikdymas (Haverkos 2004). Nustatyta, kad daugiau nei 99,7 proc. gimdos kaklelio navikų (epitelinių ir liaukinių) priežastis yra žmogaus papilomos virusas (Af Klinteberg, Wang-Nordman et al. 1997; Hillemanns, Weingandt et al. 2000; Bosch and Munoz 2002; Kjaer, van den Brule et al. 2002; Munoz, Bosch et al. 2003).

Kai kurie autoriai tvirtina, kad nuo 70 iki 90 proc. lytiškai aktyvių vyrų ir moterų bent kartą gyvenime būna užsikrėtę ŽPV (Walboomers, Jacobs et al. 1999), vis dėlto per 12-30 mėnesių virusas iš organizmo pasišalina savaime iki 90 proc. visų užsikrėtimo atvejų (Evander, Edlund et al., 1995; Ho, Bierman et al., 1998; Moscicki, Shiboski et al., 1998). Kiti autoriai nurodo, kad onkogeninių ŽPV tipų persistencija organizme yra ilgesnė nei analogiškai mažo onkogeniškumo virusų (Sun, Kuhn et al. 1997; Kjaer, van den Brule et al. 2002; Bulkman, Berkhof et al. 2007). Manoma, kad ŽPV 16 tipas ir savo genetinė struktūra į jį panašūs virusų tipai persistuoja organizme ilgiausiai, o ilgalaikė persistencija skatina gimdos kaklelio vėžį (zur Hausen 2002; Munger, Baldwin et al. 2004; Woodman, Collins et al. 2007; Ralston Howe, Li et al. 2009). Gimdos kaklelio audiniai į virusinę infekciją atsako lėtiniu uždegimu, audinių hiperplazija, metaplazija arba displazija, dar vėliau išsivysto anaplazija ir vėžys. Didėjant displazijos laipsniui, atsiranda imunotolerancija (Mikaelsdottir, Benediktsdottir et al. 2003).

ŽPV integracija į ląstelės genomą yra viena iš pagrindinių gimdos kaklelio vėžio priežasčių. Labiausiai agresyvūs yra ŽPV 16 ir ŽPV 18 tipai, jie sukelia apie 70 proc. visų ŽPV piktybinių susirgimų (Munoz, Bosch et al. 2004). ŽPV 16 tipas dažniausiai aptinkamas epiteliniuose gimdos kaklelio navikuose, o ŽPV 18 - liaukiniuose (Zielinski, Rozendaal et al. 2003; Clifford, Gallus et al. 2005). Lietuvoje buvo ištirtos 588 moterys dėl ŽPV infekcijos, iš kurių 191 jau sirgo invaziniu vėžiu. Sergančiosioms plokščialąsteliniu vėžiu ŽPV 16 tipas buvo aptiktas 55,8 proc. atvejų, o adenokarcinoma - 35,8 proc. atvejų. Kai moterims buvo diagnozuota adenokarcinoma, ŽPV 18 tipas

būdavo aptinkamas dažniau (17,7 proc.) nei sergant plokščialąsteliniu vėžiu (5,2 proc.) (Gudleviciene, Didziapetriene et al. 2005).

Laikotarpis nuo užsikrėtimo ŽPV iki pirmųjų mikroskopu aptinkamų ląstelės pakitimų yra trumpas – tik 5 metai (Woodman, Collins et al. 2001). Kai kurie autoriai nurodo, kad ikivėžiniai gimdos kaklelio pakitimai histologiškai gali būti diagnozuojami vos po 2 metų nuo pirmųjų lytinių santykių (Richardson, Kelsall et al. 2003; Winer, Lee et al. 2003). Daugelis autorių savo tyrimais patvirtino stiprų ryšį tarp užsikrėtimo onkogeniniais virusais ir ankstyvųjų gimdos kaklelio patologinių pokyčių (Woodman, Collins et al. 2001; Schlecht, Trevisan et al. 2003) Schlecht et al., 2002).

Kitas naujas tyrimo metodas – tai molekulinį žymenų paieška. Žymenų metodu galima nustatyti ŽPV integracijos laipsnį ląstelėje ir diagnozuoti karcinomą jau pačiose pirminėse stadijose bei prognozuoti ligos eigą. Nustatyta, kad ŽVP tipų onkogeniškumą lemia jų genome esantys vadinamųjų ankstyvųjų baltymų E6 ir E7 genai. Normaliūs ląstelės dauginimasis koordinuojamas per 2 baltymus: p53 ir pRb. Baltymas p53 yra atsakingas už pažeistos ląstelės DNR savaiminę mirtį – apoptozę, o pRb atsakingas už tvarkingą ląstelės dauginimąsi (transkripciją). Kai virusų genai patenka į epitelinių ląstelių DNR, ląstelės pačios pradeda gaminti E6 ir E7 baltymus, o šie savo ruožtu sutrikdo abi organizmo savisaugos nuo vėžio sistemas. Baltymas E6 suriša p53 ir sutrikdo neoplastinių ląstelių natūralios apoptozės mechanizmą, o E7 suriša pRb ir sutrikdo neoplastinių ląstelių DNR replikacijos natūralų stabdymo procesą. Taigi neoplastinės ląstelės natūraliai nežūsta, jos turi galimybę daugintis sparčiau ir netvarkingai. Šie ikivėžinio epitelio pokyčiai vėliau gali progresuoti į invazinę karcinomą. Visa tai patvirtinta daugybe eksperimentų su audinių kultūromis ir laboratoriniais gyvūnais (Androphy, Hubbert et al. 1987; von Knebel Doeberitz, Oltersdorf et al. 1988; Sedman, Barbosa et al. 1991; zur Hausen 2001).

Lietuvoje 1998-2001 metais atliktas dviejų etapų tikslinis lyginamasis tyrimas, siekiant išaiškinti mūsų šalies moterų užsikrėtimo ŽPV statistiką. Tyrime dalyvavo 1020 vaisingo amžiaus moterų. 25,1 proc. visų tirtų moterų buvo užsikrėtusios didelės onkogeninės

rizikos ŽPV tipais. Jaunos moterys iki 35 metų amžiaus onkogeniniais ŽPV tipais buvo užsikrėtusios beveik kas trečia - 28,9 proc. (Kliucinskas, Nadisauskiene et al. 2006).

Žinant, kad gimdos kaklelio vėžys yra glaudžiai susijęs su ŽPV infekcija, galima prognozuoti, jog naujai sukurti veiksmingi skiepai ir pokyčiai seksualinėje elgsenoje gali ženkliai sumažinti šios virusinės infekcijos paplitimą. Pastaraisiais metais aptariamos vakcinacijos galimybės ir augantis paskiepytų nuo ŽPV jaunų mergaičių skaičius ekonomiškai išsivysčiusiose šalyse suteikia vilties, kad ateityje bus ryškiai sumažintas sergamumas gimdos kaklelio vėžiu. Vis dėlto, nepaisant daug žadančių rezultatų, sergamumo ikivėžine gimdos kaklelio patologija sumažinimas vakcinacijos metodu ilgalaikiais tyrimais dar nėra patvirtintas (Paavonen, Jenkins et al. 2007).

Pastaruoju metu ŽPV infekcijos problemos yra nagrinėjamos platesniame kontekste. Jau įrodyta, kad ŽPV sukelia ne tik gimdos kaklelio vėžį, bet apie 50 proc. ŽPV tipų gali sukelti odos-gleivinės piktybinius navikus, tarp jų vulvos, makšties, varpos arba išangės (Steenbergen, de Wilde et al. 2005; Kayes, Ahmed et al. 2007), taip pat galvos ir kaklo odos (Gillison, Koch et al. 2000; Koskinen, Chen et al. 2003; Psyrrri and DiMaio 2008).

Siekiant sumažinti sergamumą gimdos kaklelio vėžiu yra sukurta ir pasauliniu mastu taikoma gimdos kaklelio vėžio patikros programa. Klinikistai gerina GKV diagnostikos metodus, ieško įvairiausių naujų priemonių apsisaugoti nuo ŽPV infekcijos, daug dėmesio skiria moterų sanitariniam švietimui ir aiškinamajam mokymui apie gimdos kaklelio vėžio rizikos veiksnius (rūkymą, ŽPV infekciją ir kaip jos išvengti), skatina vartoti prezervatyvus, bando diegti ŽPV testus, kuriuos galėtų atlikti pačios moterys ir t.t. (Sanner, Wikstrom et al. 2009). Kuriant naujus ir tobulinant senus diagnostikos metodus, pasitelkiami kitų sričių specialistai - biofizikai, biochemikai, genetikai.

Sergamumą GKV galėtų sumažinti tiek pirminė, tiek antrinė gimdos kaklelio vėžio profilaktika. Pirminei profilaktikai priskiriamas žinojimas veiksnių, susijusių su ligos atsiradimu, tų veiksnių eliminacija ir jų įtakos mažinimas. Pirmiausia tai liečia žinias apie ŽPV infekciją ir visus kitus rizikos veiksnius, kurie susiję su šia infekcija.

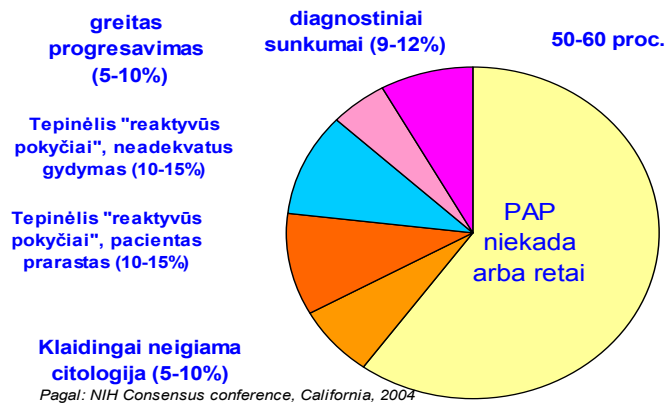
Antrinei profilaktikai priskiriama ankstyva ikivėžinių ir ankstyvųjų gimdos kaklelio vėžinių būklių diagnostika (Lorincz, Castle et al. 2002).

Daugiau nei 90 proc. gimdos kaklelio vėžio atvejų būtų galima išvengti, jei moterys dalyvautų prevencijos programoje (Mai 2000). Klinikiniai tyrimai rodo, kad gimdos kaklelio vėžio patikros programa yra veiksminga ir padeda užkirsti kelią invaziniam GKV. Vis dėlto dalyvavimas šioje programoje nė vienoje šalyje nėra šimtaprocentinis. Lietuvoje per pirmuosius trejus patikros metus Pap tepinėlio tyrimams atvyko tik 44 proc. moterų. Anglijoje ir Švedijoje patikros programoje dalyvauja apie 83 proc., o Suomijoje – net iki 93 proc. (Anttila, Ronco et al. 2004). JAV Nacionalinis sveikatos institutas 2004 metais vykusioje konferencijoje pateikė duomenų, kad 50-60 proc. miestuose gyvenančių moterų sąmoningai ignoruoja patikros programą ir joje nedalyvauja. Net 50 proc. moterų, kurioms buvo diagnozuotas invazinis gimdos kaklelio vėžys, niekada nebuvo iširtos Pap tepinėlio metodu arba joms paskutinis tepinėlio tyrimas buvo atliktas prieš 5 metus (Spitzer 1998; Sawaya and Grimes 1999).

Kokios yra šio reiškinio priežastys? Didžioji dalis moterų savo nedalyvavimą patikros programoje pateisina žinių stoka apie gimdos kaklelio ligas, vėžio rizikos veiksnius ir apsisaugojimo nuo ŽPV būdus. Nemažai moterų nurodė, kad jos patiria gėdą ir jaučiasi nemaloniai, kai jas apžiūri ginekologas, dalis moterų teigė neturinčios informacijos apie patikros programą ir rekomenduojamas profilaktikos priemones (Nugent and Tamlyn-Leaman 1992; Jubelirer, Blanton et al. 1996; Branoff, Santi et al. 1997; Fitch, Greenberg et al. 1998; Larsen and Olesen 1998; Munk, Kjaer et al. 1998; Gerhardt, Pong et al. 2000; Munoz, Castellsague et al. 2006). Jaunos moterys dažniausiai nurodydavo, kad jos bijo ginekologinių tyrimų (Branoff, Santi et al. 1997; Fitch, Greenberg et al. 1998). Apsilankymus pas ginekologą riboja moterų migracija, kalbos barjeras, bedarbystė, socialinis nedraustumas, susisiekimo sunkumai, vis dėlto didžiausias rizikos veiksnys yra pačių moterų nenoras reguliariai lankytis pas ginekologą ir nesuvokimas, kad profilaktiniai patikrinimai yra itin svarbūs ankstyvai gimdos kaklelio patologijos diagnostikai.

3 paveikslėlyje grafiškai pateikiami JAV Nacionalinio sveikatos instituto duomenys apie gimdos kaklelio vėžio priežastis. Teigiama, kad gimdos kaklelio priežastis yra dėl dviejų

pagrindinių veiksnių-moterų nedalyvavimo patikros programoje (neatlieka Pap testo) ir dėl pačio Pap testo netobulumo.



3 pav. Gimdos kaklelio vėžio pagrindinės priežastys (pagal NIH Consensus Conference, California, 2004).

2.2.2. Tabako rūkymas

Tabako rūkymas apima daugybę akivaizdžių egzogeninių ir endogeninių faktorių, kurie veikdami kartu su onkogeniniais ŽPV tipais labai padidina gimdos kaklelio vėžio riziką. Ryšį tarp rūkymo ir GKV susirgimų dažnio 1977 metais nustatė Winkelstein su bendraautoriais (Winkelstein, Sacks et al. 1977). Vėliau kiti autoriai taip pat patvirtino rūkymo ir GKV ryšį (Hildesheim, Herrero et al. 2001; Lacey, Frisch et al. 2001; Castle, Wacholder et al. 2002; Munoz, Castellsague et al. 2006).

Tabako dūmuose aptinkama apie 4000 kancerogenų - benzyl(a)pirenų, policiklinių aromatinių junginių, nitrozaminų. Vienas iš tokių kancerogeninių junginių yra NNK (4-metilnitrozamino-1-(3-pyridil)-1-butanonas), kurio kiekis rūkančių moterų gimdos kaklelio gleivėse yra 3 kartus didesnis nei nerūkančiųjų (Prokopczyk, Trushin et al. 2001). GKV atsiradimui vienareikšmišką įtaką turi rūkymo stažas (Burger, Hollema et al. 1993; Ylitalo, Sorensen et al. 1999; Hildesheim, Herrero et al. 2001; Castellsague, Bosch et al. 2002; Castle, Wacholder et al. 2002; Plummer, Herrero et al. 2003; Vaccarella,

Herrero et al. 2008). Glaudus ryšys nustatytas tarp ŽPV 16 titro rodiklių ir rūkymo (Gunnell, Tran et al. 2006). Vienu metu veikiantys keli rizikos faktoriai, tokie kaip rūkymas, kontraceptikai ir ŽPV infekcija, ypač skatina gimdos kaklelio vėžinės patologijos išsivystymą (Hwang, Ma et al. 2009). Esama ir kitų epidemiologinių studijų, kurios parodė glaudų ryšį tarp rūkymo ir rizikos susirgti GKV (Slattery, Robison et al. 1989; Haverkos, Soon et al. 2003; Plummer, Herrero et al. 2003). Atkreiptinas dėmesys į perspėjančius tyrimų rezultatus, kuriais įrodyta, kad rūkymas stipriai sumažina išgyvenamumą tų pacienčių, kurios jau serga invaziniu gimdos kaklelio vėžiu. Taip pat nustatyta, kad rūkymas turi didelę įtaką ne tik kaip tiesioginis mutageninis veiksnys, bet ir kaip netiesiogiai veikiantis faktorius, mažinantis imunitetą ir darantis organizmą mažiau atsparų virusinėms infekcijoms.

Literatūroje aprašyti tyrimai, kai buvo ištirti 72 rūkančių moterų gimdos kaklelio gleivių mėginiai uždegiminiams ir imuniniams citokinams nustatyti. Lyginant su nerūkančių moterų analogiškais rodikliais, statistiškai patikimi rodiklių skirtumai nustatyti net vos vieną cigaretę per dieną surūkančioms moterims (aišku, skirtumai tuo didesni, kuo daugiau cigarečių per dieną surūkoma). Rūkančių moterų gimdos kaklelio gleivėse aptiktos mažesnės citokinų IL-1 β , IL-6, IFN γ ir IL-10 koncentracijos. Rūkančioms pacientėms, kurioms buvo nustatyta ŽPV infekcija, taip pat aptiktos sumažėjusios IL-1 β , IL-6, IL-2 ir IL-13 citokinų koncentracijos, tačiau statistiškai patikimo skirtumo su analogiškais ŽPV infekcijos neturinčių pacienčių rodikliais nenustatyta ($p < 0,05$). Manoma, kad tabakas galbūt nėra tiesioginis gimdos kaklelio kancerogenas, greičiau jis veikia kaip kofaktorius, kadangi tabako nuodai sutrikdo organizmo imuniteto sistemą (Lieberman, Moscicki et al. 2008).

Lietuvos mokslininkų atlikti tyrimai parodė, kad didelės onkogeninės rizikos žmogaus papildomos virusai 1,8 karto dažniau aptinkami rūkančioms moterims nei nerūkančioms (Kliucinskas, Nadisauskiene et al. 2006). Vis dėlto Lietuvoje vykdomos gimdos kaklelio vėžio studijos tiek profilaktikos, tiek ir terapijos srityje yra tik maža dalis darbų, kurie turėtų būti vykdomi mūsų šalyje. Lietuvoje iki šiol nebuvo taikyta jokių organizuoto tyrimo programų, tuo tarpu kitose šalyse jau atlikti ir aprašyti daugybiniai klinikiniai

moksliniai tyrimai, išaiškinta įvairių rizikos veiksnių svarba bei jų tarpusavio ryšiai gimdos kaklelio vėžio etiologijoje.

2.2.3. Lytinė elgsena ir lytinio gyvenimo ypatumai

Chlamydia trachomatis, lytiniu keliu plintanti infekcija, ŽPV infekuotoms moterims padidina gimdos kaklelio displazijų ir GKV riziką (Hakama, Luostarinen et al. 2000; Koskela, Anttila et al. 2000; Wallin, Wiklund et al. 2002; Smith, Bosetti et al. 2004; Silins, Ryd et al. 2005; Munoz, Castellsague et al. 2006; Madeleine, Anttila et al. 2007). Molekuliniai mechanizmai, kaip ir koku keliu *Chlamydia trachomatis* indukuoja kancerogenezę, kol kas nėra pakankamai išaiškinti. Genetinių pažeidimų ir neoplastinių pakitimų tyrimai *in vitro* parodė, kad *Chlamydia trachomatis* atpalaiduoja azoto oksidą ir sutrikdo natūralią užkrėstos ląstelės apoptozės blokadą, slopinant mitochondrijų citochromo C išskyrimą. Iš dalies tokius mechanizmus galima paaiškinti kaspazių aktyvacija (Gravitt and Castle 2001). Įrodyta, kad bakterinės vaginozės infekcija, *Neisseria gonorrhoeae*, *Treponema pallidum* ir *Candida albicans* taip pat yra gimdos kaklelio kancerogenezės kofaktoriai.

1985-1990 m. Suomijoje pagal GKV patikros programą buvo ištirta 19114 moterų. Buvo tiriami gimdos kaklelio citologiniai tepinėliai, ieškoma lytiniu keliu plintančių infekcijų, atlikti ŽPV, *Herpes simplex-2* ir *Trichomona vaginalis* testai. Vėliau šios moterys 4 metus buvo gydytojo priežiūroje, po to vėl buvo tiriami citologiniai gimdos kaklelio tepinėliai. Klinikistai priėjo išvados, kad *Herpes simplex-2* ir *Trichomona vaginalis* kartu su ŽPV labai padidina GKV riziką (Viikki, Pukkala et al. 2000). Kai moterims buvo nustatoma ŽPV ir *Trichomona vaginalis* vienu metu, jų statistiniai rodikliai, lyginant su moterų, užsikrėtusių tik ŽPV, analogiškais rodikliais, skyrėsi (ŠS = 6,4; 95 proc.PI = 3,7-10 ir ŠS = 5,5; 95 proc.PI = 4,2-7,2 atitinkamai). Nors *Herpes simplex* buvo aptinkamas retai, tačiau būtent esant šiam virusui nustatytas pats didžiausias statistinių rodiklių ryšys: ŠS = 12; 95 proc.PI = 2,4-34 (Viikki, Pukkala et al. 2000).

Mokslinėje literatūroje aprašyti daugybinių tyrimų duomenys, kurie patvirtina, kad įvairūs kiti *Herpes* šeimai priklausantys virusai, tokie kaip citomegalo virusas (CMV),

Human herpes-6 virusas (HHV-6), Epštein-Baro virusas (EBV), taip pat transformuoja audinių kultūras, vis dėlto statistiškai patikimo ryšio tarp šių virusų ir gimdos kaklelio vėžio rodiklių neaptikta (Razzaque 1990; Kashanchi, Araujo et al. 1997); (Doniger, Muralidhar et al. 1999). Vėlesni tyrimai parodė, kad CMV ir EBV infekcija gali būti susijusi su ŽPV 16 genomo integracija ir gali prisidėti prie gimdos kaklelio vėžio išsivystymo. Szostek su bendraautorais tyrė CMV, EBV, HSV-1, HSV-2, HHV-6 ir HHV-7 infekcijų įvairių rodiklių koreliaciją su ŽPV genomo fizine būkle gimdos kaklelio vėžio ir ikivėžinių pakitimų atvejais šešiasdešimčiai moterų, kurioms jau buvo diagnozuota ŽPV 16 infekcija. Tyrimų rezultatai parodė, kad citomegalo viruso DNR dažniau aptinkama mėginiuose su mišria ŽPV 16 forma nei episomine ($p < 0,025$). Rodiklių koreliacija buvo nustatyta ir EBV atvejais ($p < 0,005$). Kai moterys buvo infekuotos CMV, integruoto ar mišraus ŽPV 16 genomo rizikos rodikliai būdavo didesni šešis kartus (ŠS = 6,069; 95 proc.PI = 1,91-19,22; $P = 0,002$), tuo tarpu EBV atveju analogiška rizika išaugdavo septynis kartus (ŠS = 7,11; 95proc.PI = 1,70-29,67; $P = 0,007$) (Szostek, Zawilinska et al. 2009).

Genitaliniai moters takai nėra apsaugoti nuo infekcijos, kuri stipriai pakenkia gleivinę ir epitelinį sluoksnį. Mikroorganizmų invazija gali būti nevaisingumo, prieššlaikinio gimdymo, ikivėžinės gimdos kaklelio patologijos ar GKV priežastis (Quayle 2002; Cole 2006). Vis dėlto moters organizmas turi savisaugos mechanizmų, kaip susidoroti su patekusiais į genitalijas mikrobais, ir svarbiausia grandis yra gleivinės antibakteriniai peptidai laktoferinas ir lizocimas (Cole 2006).

2.2.4. Socialinė moterų padėtis ir informuotumas apie gimdos kaklelio patikros programą

Remiantis pasaulinės statistikos duomenimis, sergamumas gimdos kaklelio vėžiu ir mirtingumas nuo jo yra glaudžiai susiję su socialinėmis ir ekonominėmis šalies sąlygomis. Apie 80 proc. GKV susirgimų užregistruojama ekonomiškai silpnai išsivysčiusiose šalyse (Arbyn, Raifu et al. 2007). Be to visuose be išimties kraštuose ši liga dažniau aptinkama žemesnio socialinio sluoksnio moterims.

Klinicistai daug dėmesio skiria ŽPV infekcijai ir jos vietai gimdos kaklelio vėžio rizikos veiksnių sąraše. Šiuo klausimu paskelbta daug mokslinių ir visuomenės švietimo straipsnių, vis dėlto įvairių šalių moterų anketinės apklausos parodė, kad tik trečdalis apklaustųjų (apie 35 proc.) buvo girdėjusios apie ŽPV infekciją (Baer, Allen et al. 2000).

Lietuvoje atliktų apklausų duomenys rodo, jog mūsų moterys yra taip pat nepakankamai informuotos apie gimdos kaklelio vėžio priežastis. Bendrovės RAIT 2006 m. gruodį atliktos Lietuvos gyventojų apklausos duomenimis, tik 22 proc. respondentų žinojo, kad gimdos kaklelio vėžio pagrindinė priežastis- žmogaus papilomos virusas. Didžioji dalis respondentų teigė, kad GKV susergama dėl netinkamo gyvenimo būdo, ją nulemia aplinkos veiksniai ir paveldimumas.

Iki šiol, kol nėra surastas efektyvus gydymo nuo ŽPV metodas, tik visuomenės švietimas apie lytiniu keliu plintančias ligas galėtų būti efektyvi pirminė priemonė GKV prevencijos programoje.

2.2.5. Nėštumai ir gimdymai

Kai kurie autoriai skelbia aptikę ryšį tarp GKV ir gimdymų skaičiaus. Lyginant su negimdžiusių moterų duomenimis, gimdžiusioms 1-2 kartus *per vias naturales* rizika susirgti GKV padidėja 2 kartus, o gimdžiusioms 7 ir daugiau kartų - net 4 kartus (Evans, Krivchenia et al. 2002; Munoz, Franceschi et al. 2002). Taip pat nustatytas ryšys tarp abortų skaičiaus ir gimdos kaklelio patologijos dažnio rodiklių. Manoma, kad pastarasis ryšys tiesiogiai priklauso nuo gimdos kaklelio traumavimo pačios procedūros metu ir susidariusių sąlygų ŽPV infekcijai lengviau patekti į gimdos kaklelio epitelio bazinę membraną.

2.2.6. Kontraceptikai

Mokslinėje literatūroje aprašyti ŽPV infekuotų moterų tyrimai, ieškant ryšio tarp sergamumo GKV ir kontraceptikų vartojimo. Lyginant su kontraceptikų nevartojančių moterų duomenimis, oralinių kontraceptikų vartojimas 5-9 metus riziką susirgti GKV

padidina 3 kartus, o vartojimas ilgiau nei 10 metų - net 4 kartus (Moreno, Bosch et al. 2002; Appleby, Beral et al. 2007).

Nustatyta, kad gimdos kaklelio transformacijos zona yra labai jautri ŽPV infekcijai. Estrogenai yra fiziologiškai susiję su liaukinio epitelio išvešėjimu ir išvirtimu į makštinę gimdos kaklelio dalį bei transformacijos zonos susidarymu. Neseniai atlikti tyrimai su ŽPV E6/E7 transgeninėmis pelėmis parodė, kad estrogenai taip pat skatina gimdos kaklelio vėžio atsiradimą ir tolimesnį jo augimą (Riley, Duensing et al. 2003; Brake and Lambert 2005). Nustatyta taip pat, kad sergant GKV, kas trečiai pacientei aptinkamas fermentas aromatazė, kuris atsakingas už androgeno vartimą estrogenų. Sveikuose gimdos kaklelio audiniuose, taip pat ikivėžinių pokyčių pažeistuose audiniuose estrogeno neaptinkama (Nair, Luthra et al. 2005). Minėti tyrimai taip pat parodė, kad egzogeniškai pakeista aromatazė ŽPV užkrėstose gimdos kaklelio vėžinėse ląstelėse stimuliuoja estrogeno receptorių ir jų transkripcinę veiklą, ląstelių dauginimąsi ir nepriklausomą augimą. Įrodyta, kad naviko supresantas BRCA1 slopina estrogeno sukeltą estrogeno receptorių transkripcinę veiklą, o E6 bei E7 tiesiogiai veikia BRCA1 ir priešinas jo slopinimui (Zhang, Fan et al. 2005). Šie rezultatai leidžia manyti, kad estrogenas, aromatazė ir, tikėtina, reaguojantys į estrogeną genai gali būti potencialūs rizikos veiksniai, ne tik sukeltys GKV, bet kartu su E6 ir E7 skatinantys tolimesnį gimdos kaklelio vėžio vystymąsi (Yugawa and Kiyono 2009).

2.2.7. Imuninė organizmo būklė

Uždegimas yra labai dažna patologinė gimdos kaklelio epitelio būklė, kuri gali pasireikšti *per se* arba junginyje su neoplazija. Gimdos kaklelio gleivėse esantys citokinai vaidina svarbų vaidmenį kontroliuojant patogenų veikimą. Organizmo imuninis atsakas yra siejamas su ląstelėmis-mediatoriais, kurios dalyvauja vėžio vystymosi kontrolėje kaip aktyvūs kovotojai su ŽPV infekcija. Tai įvairūs makrofagai, natūralūs ląstelės kileriai (NK), T-ląstelės. Ląstelės-mediatoriai (T limfocitai) didina CD4+ ir CD8+ populiacijas ir tiesiogiai kovoja su ŽPV infekcija. CD4+T limfocitų (ląstelių pagalbininkų),

produkuojami citokinai (limfokinai) veikia visas kitas imuninės sistemos ląsteles, įskaitant B limfocitus, natūralias ląsteles žudikes ir makrofagus.

CD8+T limfocitai (ląstelės slopintojos) reguliuoja imuninį atsaką, stabdydamos T ir B limfocitų proliferaciją, sekretuoja citokinus (limfokinus), bet, svarbiausia, jos veikia tiesiogiai citotoksiškai ir naikina virusais infekuotas bei navikines ląsteles.

Imunines ląsteles pritraukiantys chemokinai ir jas aktyvuojantys citokinai reguliuoja fiziologinę homeostazę ir yra reikalingi kovai su patogeniniais mikrobais. Veikiant patogeniniams mikrobams, gimdos kaklelio epitelinėse ląstelėse aptinkama padidėjusi citokinių IL-8, IL-6, G-KSF ir MCP-1 koncentracija (Fahey, Schaefer et al. 2005; Meter, Wira et al. 2005). ŽPV indukuoja imuninį atsaką infekcijos vietoje greičiau, nei sureaguoja bendra viso organizmo imuninė sistema. Serumo antikūnai prieš onkoproteiną E7 nėra specifinis kriterijus, diagnozuojant arba prognozuojant gimdos kaklelio vėžį. Nguyen su bendraautorais (2005) aptiko, kad ŽPV 16 onkoproteino E7 IgA titras makšties nuoplovose yra ryškiai mažesnis moterims, sergančioms GKV ir gimdos kaklelio neoplazija, nei sveikoms pacientėms. Autoriai daro išvadą, kad ŽPV infekcija sergančiosioms GKV selektyviai slopina lokalią IgA gamybą (Nguyen, Broker et al. 2005).

Klinikistai priėjo išvados, kad gimdos kaklelio uždegimas apskritai, nesvarbu koks bebūtų sukėlėjas, gali būti GKV rizikos faktorius, kadangi sudaro sąlygas įsiskverbti į ląstelę ŽPV infekcijai (Castle and Giuliano 2003).

Daugybė autorių teigia, kad ŽPV dažniau užsikrečia moterys, sergančios imunitetą slopinančiomis ligomis. Pavyzdžiui, ŽIV infekuotos moterys turi stipriai padidėjusią riziką tiek ŽPV infekcijos persistencijai, tiek ligos progresavimui, ypač tais atvejais, kai aptinkami sumažėję CD4+ ląstelių kiekiai arba didelis viruso titras (Cappiello, Garbuglia et al. 1997; Maiman, Fruchter et al. 1997; Sun, Kuhn et al. 1997; Holcomb, Maiman et al. 1998; Maiman, Fruchter et al. 1998; Rezza, Giuliani et al. 1998; Cubie, Seagar et al. 2000; Ellerbrock, Chiasson et al. 2000; Heard, Tassie et al. 2000; Duerr, Kieke et al. 2001; Hawes, Critchlow et al. 2003; Pereira, Antoni et al. 2003).

Imunosupresija padidina GKV riziką. Australijoje ir Naujojoje Zelandijoje buvo atlikti klinikiniai tyrimai, kai inkstų patologiją turinčios pacientės buvo ginekologo priežiūroje vidutiniškai 5,8 metus. Vienos iš jų buvo tik dializuojamos, kitoms atlikta inkstų transplantacija. Kartu buvo tiriamos sveikos moterys (kontrolinė grupė). Tyrimai parodė, kad gimdos kaklelio susirgimų dažnis tarp inkstų transplantaciją turėjusių pacienčių ir vartojančių imunosupresantus yra didesnis nei bendroje populiacijoje. Lyginant su kontrolinės grupės rodikliais, moterims po inkstų persodinimo operacijos gimdos kaklelio patologija aptikta 3,3 kartus dažniau, o dializuojamoms moterims - 0,74 karto dažniau (Fairley, Sheil et al. 1994).

Gimdos kaklelio vėžio atsiradimas yra daugiapakopinis procesas, kuris kol kas nėra visiškai išaiškintas. Viena aišku, kad GKV išsivysto iš ikivėžinių ląstelių pokyčių, kurie atsiranda dėl ilgalaikio ŽPV infekcijos veikimo (persistencijos), o ŽPV persistencija, savo ruožtu, tiesiogiai priklauso nuo makroorganizmo imuniteto nepakankamumo (Koutsky, Holmes et al. 1992; Remmink, Walboomers et al. 1995; Nobbenhuis, Walboomers et al. 1999; Schlecht, Kulaga et al. 2001).

Makrofagai – tai dar vienas ikivėžinės gimdos kaklelio patologijos bei GKV išsivystymo stadijos kriterijus. Tiriant moteris, turinčias sveiką gimdos kaklelio struktūrą arba LSIL ir HSIL pokyčių bei sergančias gimdos kaklelio vėžiu, nustatyta, kad makrofagų kiekio rodikliai turi tiesioginę priklausomybę nuo gimdos kaklelio patologijos sunkumo laipsnio: kuo didesni gimdos kaklelio sukelti patologiniai pažeidimai, tuo didesni makrofagų kiekybiniai rodikliai. Esant didesniai intraepitelinių pažeidimų laipsniui, uždegiminė reakcija pasireiškia intensyviau, o kai intraepitelinė gimdos kaklelio neoplazija progresuoja iki invazyvaus vėžio fazės, makrofagų migracija į epitelį ryškiai padidėja. Makrofagų skaičiaus pokyčiai aptinkami net esant lengviems gimdos kaklelio pažeidimams, pvz., LSIL regresijos atveju mažėja ir makrofagų kiekybiniai rodikliai, tačiau persistencijos ir progresijos atvejais – makrofagų rodikliai visada didėja. Taigi daugybiniai klinikiniai tyrimai leidžia daryti bendrą išvadą, kad intraepiteliniai gimdos kaklelio pažeidimai pritraukia makrofagus ir skatina jų proliferaciją (Hammes, Tekmal et al. 2007).

Mokslinėje literatūroje autoriai dažnai diskutuoja apie makrofagų vaidmenį CIN patologijos malignizacijos procese, vis dėlto ryšys tarp makrofagų ir ŽPV infekcijos progresijos rodiklių kol kas pakankamai nėra ištirtas (Fujimoto, Sakaguchi et al. 2000; Schoppmann, Birner et al. 2002; Zijlmans, Fleuren et al. 2006).

2.3. Gimdos kaklelio patologijos diagnostika

2.3.1. Įprastiniai gimdos kaklelio diagnostikos metodai - Pap testas ir skystų terpių citologiniai tyrimai

Jei klinicistai turėtų galimybę laiku diagnozuoti ikivėžinius gimdos kaklelio pakitimus ir prognozuoti vėžį dar iki morfologinės jo išraiškos, moterų sergamumas GKV būtų sumažintas labai ženkliai, o išgyvenamumo rodikliai nuo šios ligos ir apskritai nuo vėžinės patologijos būtų patenkinami. Ankstyvosios diagnostikos pagrindas galėtų būti vėžiui specifinio žymens nustatymas (Sullivan and Ferrari 2004).

2004 metais Tarptautinis vėžio tyrimų centras (IARC) pateikė išvadą, kad gimdos kaklelio patikros programoje yra trys patikimi patikros metodai - skystų terpių citologinis tyrimas, gimdos kaklelio tepinėlių vertinimas automatinio analizatorium ir ŽPV testavimas (IARC 2005).

Šiuo metu pasaulyje naudojami tokie profilaktinio patikrinimo dėl gimdos kaklelio vėžio metodai:

1. Gimdos kaklelio nuograndų citologinis tyrimas. Šis tyrimas laikomas kaip sėkmingiausias gimdos kaklelio vėžio kontrolės būdas.
2. Gimdos kaklelio apžiūra plika akimi (*downstaging*). Metodo tikslas - diagnozuoti ne ikivėžinę patologiją, o GKV ankstyvosiose stadijose. Vis dėlto šio metodo jautrumas ir specifiškumas yra nepatikimi.
3. Gimdos kaklelio apžiūra, prieš tai jį sutepus 3–5 proc. acto rūgšties tirpalu, kitaip vad. VIA metodas (VIA - *Visual Inspection with Acidi acetici*). Metodo jautrumas, diagnozuojant HSIL, t.y. ryškius intraepitelinius daugiasluoksnio plokščio epitelio

pažeidimus (HSIL - *high grade squamous intraepithelial lesion*), prilygsta citologinio tyrimo jautrumui, tačiau specifiškumas ryškiai mažesnis.

4. Spekuloskopija - gimdos kaklelio apžiūra liuminescencinėje šviesoje, prieš tai jį sutepus 3-5 proc. acto rūgštimi. Tai tarytum vizualinės apžiūros VIA metodu tęsinys, tik jau panaudojant instrumentus. Metodo jautrumo ir specifiškumo rodikliai prilygsta VIA metodo analogiškiems rodikliams, vis dėlto tyrimui būtinas specialus pasiruošimas mažina jo populiarumą neturtinguose kraštuose.

5. Cervikografija - gimdos kaklelio išdidinto fotografinio vaizdo analizė. Suteptas 3-5 proc. acto rūgšties tirpalu gimdos kaklelis fotografuojamas. Tai tyrimo gimdos kaklelio apžiūros ir spekuloskopijos metodais savotiškas tęsinys. Metodo jautrumas, diagnozuojant ryškius intraepitelinius daugiasluoksnio plokščio epitelio pažeidimus (HSIL), yra mažesnis nei citologinio tyrimo ir VIA metodų, o specifiškumo rodikliai visų metodų maždaug vienodi.

6. Žmogaus papilomos viruso DNR tyrimas. Metodus jautrumo rodikliais prilygsta ir net lenkia citologinio tyrimo jautrumo rodiklius, tačiau specifiškumo rodikliai yra ryškiai mažesni. Būtent dėl metodo mažo specifiškumo ŽPV infekcija gali būti klaidingai diagnozuojama pakankamai dideliame reliatyviai sveikų jaunų moterų skaičiui. Tyrimo kaina ir didelis klaidingai teigiamų atsakymų skaičius riboja šio metodo panaudojimą pirminiam gimdos kaklelio vėžio išaiškinimui. Statistiškai tik 5 proc. moterų, kurioms šiuo metodu diagnozuota ŽPV infekcija, negydant išsivystytų gimdos kaklelio vėžys.

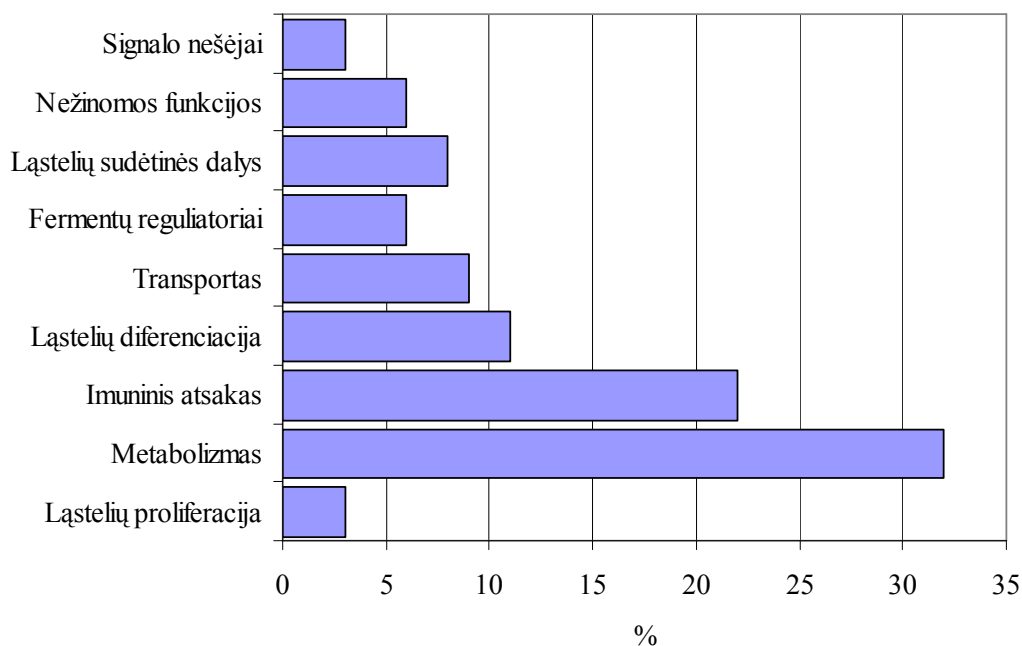
7. Kolposkopija – tai brangus tyrimo metodas, reikalaujantis brangios aparatūros ir profesionalaus patyrusio klinicisto kolposkopuotojo. Šio metodo jautrumas diagnozuojant HSIL 30-90 proc., specifiškumas 67-97 proc. (Olaniyan 2002). Vis dėlto klinicistai kolposkopijos tyrimo metodo pirminėje gimdos kaklelio patikroje nerekomenduoja (Kyrgiou, Tsoumpou et al. 2006). Lietuvoje nustatytas 69,3 proc. citologinio ir kolposkopinio tyrimų jautrumas, diagnozuojant gimdos kaklelio vėžį (el-Aawar 2002).

8. Biopsija ir histologinis medžiagos ištyrimas. Invazyvus. Juo remiasi diagnozės patikslinimas arba patvirtinimas.

Pirminėje moterų sveikatos priežiūros grandyje turėtų būti taikomi paprasti ir nebrangūs testai, kuriuos galėtų atlikti gydytojai arba vidurinis medicinos personalas be specialaus pasiruošimo. Šių tyrimų rezultatai turėtų padėti klinacistams apsispręsti dėl tolimesnės pacienčių priežiūros ir gydymo.

Skystų terpių citologiniai tyrimai yra alternatyva įprastiniam Pap tepinėlio metodui. Ląstelės nuo gimdos kaklelio paskleidžiamos ne tiesiogiai ant mikroskopinio stikliuko, o į buferinę konservuojančią skystą terpę. Terpė centrifuguojama, susidaro plonas vienasluoksnis tepinėlis, kurį nesunku vertinti citologams. Šiuo metodu galima sumažinti tyrimui netinkamų tepinėlių skaičių ir dažniau aptikti ikivėžinę gimdos kaklelio patologiją. Lyginant su įprasto Pap tepinėlio diagnostinėmis galimybėmis, skystų terpių citologinio tyrimo metodu diagnozuoti ASCUS pavyksta 29 proc. dažniau, o LSIL – net 39 proc. (Colgan, McLachlin et al. 2004; Doyle, O'Farrell et al. 2006; Giorgi-Rossi, Segnan et al. 2007). Kiti autoriai teigia, kad ir CIN2+ atvejais skystų terpių citologijos metodu teisingą diagnozę galima nustatyti dažniau nei įprasto Pap tepinėlio metodu – 88 proc. ir 68 proc. atitinkamai (Clavel, Masure et al. 2001; Snijders, van den Brule et al. 2003). Vis dėlto aptinkama nuomonių, kad statistškai patikimo skirtumo tarp šių diagnostikos metodų nėra (Ronco, Cuzick et al. 2007; Arbyn, Bergeron et al. 2008). Nežiūrint to, klinacistai pirmenybę suteikia skystų terpių citologijos metodui, nes tai yra automatizuotas tyrimo būdas, leidžiantis sutaupyti laiko, lėšų ir išvengti netinkamų tyrimui tepinėlių skaičių (Davey, d'Assuncao et al. 2007; Ronco, Cuzick et al. 2007). Be to, likusi nucentrifuguota mėginio dalis (supernatantas) gali būti panaudota tyrimams dėl ŽPV infekcijos, mikoplazmų, chlamidijų, ureoplazmų paieškos bei biocheminiams, imunologiniams, imunohistocheminiams, spektriniams ir kt. tyrimams (Monsonego, Autillo-Touati et al. 2001).

Supernatato tyrimai parodė, kad gimdos kaklelio nuograndų buferiniame skystyje centrifugatas turi gausiai įvairių biologiškai aktyvių medžiagų. Jų tyrimo duomenys yra labai informatyvūs gimdos kaklelio patologijos diagnostikoje (pav. 4).



4 pav. Funkcinė gimdos kaklelio ir makšties nuoplovų baltymų klasifikacija (pagal DAVID bioinformatikos žinyuose skelbiama funkcinę baltymų klasifikaciją)

2.3.2. Naujieji gimdos kaklelio patologijos diagnostikos metodai

2.3.2.1. Fluorescencinė spektrofotometrija

Lazerio ir šviesos diodų indukuojama skystų terpių nuosėdų autofluorescencija ir jos analizė yra daug žadantis optinis tyrimo metodas, kuris gali būti taikomas gimdos kaklelio patikros programoje. Supernatanto fluorescencinės spektroskopijos analizė suteikia daug papildomos informacijos apie neopteriną, triptofaną, NADH ir kt. molekules, susijusias su imunine organizmo būkle.

Kitas tyrimo metodas - optinės koherencijos tomografija (OCT). Šio metodo esmė yra mažos koherencijos interferometrija, naudojant neinvazinius nežalingus infraraudonuosius spindulius. Tiriant šiuo metodu, iš karto (angl. *real-time*) *in vivo* susidaro didelės skiriamosios gebos tiek kietųjų, tiek minkštųjų audinių dvimačiai ir trimačiai vaizdai. OCT suteikia informacijos ne apie cheminę audinio sudėtį, o apie mikrostruktūrą. Tiriant sveikus gimdos kaklelio audinius, OCT diagnostiniai rezultatai 100 proc. sutampa su biopsinės medžiagos histologinio tyrimo rezultatais. Invazyvus

vėžio atvejais taip pat aptikta koreliacija tarp OCT ir histologinio tyrimo duomenų, tuo tarpu vidutinės ir ryškios displazijos arba karcinomos *in situ* atvejais audinio paviršius tik turi panašumų į karcinomai būdingus pakitimus. Remiantis tyrimų rezultatais, autoriai daro išvadą, kad OCT metodas nesudaro galimybės atskirti ikivėžinių pakitimų nuo vėžinių, tačiau šiuo metodu galima identifikuoti sveikus gimdos kaklelio audinius (Escobar, Belinson et al. 2004). Tolesnių tyrimų rezultatai parodė, kad OCT metodu pavyksta diagnozuoti CIN (jautrumas 95 proc.), tačiau cervicito diagnozės atvejais metodo jautrumas krenta iki 50 proc. (Gallwas, H. et al. 2009).

Difuzinė atspindžio spektroskopija – tai dar vienas optinis tyrimo metodas, kuriuo galima kiekybiškai įvertinti audinio absorbcinius ir spinduliuotės sklaidymo parametrus. Naudojant ultravioletinius ir regimosios dalies spindulius, kliniciams pavyko atskirti sveikus ir ikivėžinių pakitimų gimdos kaklelio audinius (Marin, Milbourne et al. 2005).

Atspindžio spektroskopijos metodo atmaina yra hiperspektrinis diagnostinis vaizdinimas (HSDI). Tai potencialus diagnozės nustatymo ir intraepitelinių pokyčių lokalizavimo metodas, paremtas ne tik audinių savybe atspindėti šviesos spindulius, bet ir sugebėjimu fluorescuoti. Gimdos kaklelio paviršius skenuojamas ultravioletiniais spinduliais ir balta šviesa, registruojami trimačiai vaizdai, kurių 2 dimensijas ekrane sudaro erdvinis vaizdas, o trečią – spektrinę informaciją (Gustafsson, McLaughlin et al. 2003). Metodas iki šiol tobulinamas, nes jis nepigus ir nėra paprastas naudoti (Vaitkuviene, Andersen-Engels et al. 2005).

Pastaraisiais metais fluorescencinė spektrometrija tarp diagnostinių metodų užima svarbią vietą, tačiau iki šiol neišaiškinti pagrindiniai fluoroforai, dalyvaujantys ląstelių fluorescencijoje. Identifikavus fluoroforus, būtų galima paaiškinti tam tikrus procesus, vykstančius ląstelėse. Fluoroforų aptikta neutrofiluose. Žmogaus neutrofiluose nustatytos 4 ryškiausios fluorescencijos emisijos: triptofano pikas, esant sužadimui 290 nm ir 330 nm emisijai; NAD(P)H pikas, esant 350 nm sužadimui ir 450 nm emisijai; FAD pikas, kai sužadinama 450 nm ir 530 nm emisija; neidentifikuotos medžiagos pikas, esant sužadimui 500 nm ir 530 nm emisijai.

Fotodiagnostinis tyrimo metodas siūlomas taikyti gimdos kaklelio uždegimui (cervicitui) diagnozuoti (Palsson, Stenram et al. 2006). Lietuvos moterims cervicitas yra dažna gimdos kaklelio patologija.

Gimdos kaklelio epitelinio vėžio ląstelėse susidaro didelė triptofano koncentracija, ir tai potencialiai leidžia atskirti vėžį nuo uždegimo (Heintzelman, Lotan et al. 2000). Triptofanas ir neopterinas yra fluorescuojančios molekulės, kurios atpažįstamos dėl specifinio fluorescuojančio spektro: triptofanas prie 358 nm (Elbaz, Tayer et al. 2005), neopterinas – prie 438 nm (Gavryushin, Auksorius et al. 2002; Vita, Kurilcik et al. 2005).

Neopterinas – tai pterino darinys, kurį gamina INF- γ stimuliuojami makrofagai ir B ląstelės, dažnai taikomas kaip imuninės veiklos sužadinimo žymuo prie įvairių ligų, kurios pirmiausia susijusios su ląstelių reakcija. Padidėjusi neopterino koncentracija aptinkama gimdos kaklelio vėžiu sergančioms pacientėms priklausomai nuo vėžio stadijos. Mokslininkai nenustatė jokie ryšio tarp neopterino koncentracijos rodiklių ir didelės arba vidutinės rizikos žmogaus papildomos viruso DNR. Mažos ŽPV rizikos atvejais neopterino koncentracijos buvo žymiai didesnės nei visomis kitomis ligomis sergančių ir kolposkopijos metodu tirtų pacienčių analogiški rodikliai.

Biocheminių tyrimų metodikoje baltymų fluorescencijos tyrimai užima išskirtinę vietą. Daugelis biologinių medžiagų pasižymi savita fluorescencija - autofluorescencija. Baltymuose yra trys fluorescuojančios aromatinės aminorūgštys: fenilalaninas (Phe), tirozinas (Tyr) ir triptofanas (Trp). Autofluorescencijos metodas vis plačiau naudojamas tiriant baltymų funkcijas, struktūrą, pokyčių dinamiką.

Kiekviena patologija turi savo specifinius simptomus, tik jai būdingus ląstelių cheminės sudėties pakitimus, nuo kurių priklauso audinių ir organų struktūros pokyčiai. Kasdienėje ligų diagnostikoje naudojami klinikiniai tyrimai, audinių biopsija, medicininės vaizdinimo priemonės, kurių rezultatai patvirtina diagnozę.

Epiteliniams ikivėžiniams susirgimams būdingi architektūriniai ir morfologiniai ląstelių pokyčiai, pvz., ląstelės branduolio apimties sumažėjimas, pasikeitusi proporcija tarp branduolio matmenų ir citoplazmos, hiperchromazija, pleomorfizmas ir kt. Vėžio diagnozės patvirtinimas remiasi biopsinės medžiagos iš pažeistų gimdos kaklelio vietų

tyrimu ir jų histologinių pokyčių vertinimu. Vadinasi, biopsija yra „auksinis standartas“, patvirtinantis arba paneigiantis diagnozę. Tuo tarpu optiniais tyrimo metodais galima nustatyti morfologinius ir biocheminius gimdos kaklelio epitelio pokyčius be chirurginės invazijos ir iškart, momentaliai. Tai taip vadinama patikra prie paciento lovos (*point of care screening*). Taigi optiniai metodai teikia daug vilčių ikivėžinių gimdos kaklelio susirgimų diagnostikoje ir kontrolėje. Fluorescenciniai metodai, kaip greiti ir nereikalaujantys tiriamųjų medžiagų suardymo, plačiai taikomi vertinant baltymus bei kitus polipeptidinės prigimties junginius (Deshpande 2001).

Optinių metodų taikymui medicinoje per pastarąjį dešimtmetį skiriamas didelis dėmesys. Fluorescencija, difuzinis atspindys ir šviesos sklaidos spektroskopija suteikia papildomos informacijos apie morfologinius ir biocheminius pokyčius ląstelės ir audinių lygmenyje. Apoptozės mechanizmas užprogramuotoje ląstelės mirtyje yra svarbus veiksnys, kontroliuojant vėžio augimą. Aptikus apoptozės žymenį molekuliniam lygmenyje, galima būtų įvertinti ir optinius pakitimus gimdos kaklelyje *in vitro* ir *in vivo*. Kai ikivėžinė gimdos kaklelio patologija transformuojasi į naviką, kaklelio epitelis keičiasi tiek biochemiškai, tiek ir struktūriškai. Šiuos pokyčius nesunku aptikti, tiriant audinius fluorescencinės spektroskopijos metodu. Be to optinės spektroskopijos duomenys padėtų sumažinti klaidingai įvertinamų tepinėlių dažnį.

Skystų terpių citologiniai tyrimai atveria platesnes galimybes fluorescencinės spektroskopijos tyrimams, naudojant nuoplovų supernatantą. Supernatantuose aptinkama daug medžiagų, charakterizuojančių epitelio proliferacijos ypatumus, kai kurios iš jų gali būti nustatomos fluorescencinės spektroskopijos metodu. Vis dėlto tenka pažymėti, kad tyrėjai iki šiol neatrado kokios nors specifinės medžiagos, nurodančios ikivėžinės patologijos malignizacijos pradžią.

Patologinio proceso vizualizacija spektroskopijos pagalba dar stokoja atitinkamo dėmesio. Spektrai dažnai pateikiami tik siaurai žadinimo sričiai ir atspindi tik dozės-efekto priklausomybę. Plačios žadinimo zonos fluorescencijos spektrų vizualizacija leistų sukurti taip vadinamą „elektroninį Pap tepinėlį“, kuris galėtų tapti informatyviu tyrimu gimdos kaklelio patologijos diagnostikoje. Vis dėlto efektyviausi fluorescencijos

sužadavimo/emisijos parametrai dar nenumatyti. Per paskutiniuosius du dešimtmečius optinio fluorescencinio vaizdinimo pagalba *in vivo* buvo ieškoma įvairių piktybines ligas nurodančių egzogeninių ir endogeninių žymenų.

Spektroskopinis biologinių skysčių tyrimas taip pat turi pranašumų ir prieš biopsijų tyrimą, - jis nereikalauja intervencijos, yra paprastas, greitas, pigus ir saugus naudoti. Svarbiausia yra tai, kad spektrų pagalba galima skaitmeniškai užrašyti duomenis, juos lyginti su ankstesnių tyrimų rodikliais, nustatyti biocheminę fluorofortų (fluorescuojančių medžiagų) sudėtį jau tuomet, kai ląstelės dar nėra pakitusios, ir galbūt nuspėti tolesnę ląstelės morfologinę transformaciją malignizacijos linkme. Taigi šie tyrimai padėtų prognozuoti tolesnę kitimų eigą. Prognozė remtųsi gausia spektrine duomenų baze, surinkta iš visų kancerogenezės etapų ir klasifikuota lyginant su histologinių audinio pakitimų vertinimu.

Kiti optiniai tyrimai gimdos kaklelio ligų diagnostikoje yra atspindžio spektroskopija (Ramanujam, Mitchell et al. 1994; Richards-Kortum, Mitchell et al. 1994; Ramanujam, Mitchell et al. 1996; Ramanujam, Mitchell et al. 1996), fluorescencinė spektroskopija (Brookner, Utzinger et al. 1999; Mitchell, Cantor et al. 1999; Chang, Dawood et al. 2002; Brookner, Utzinger et al. 2003), Ramano sklaidos spektroskopija (Drezek, Brookner et al. 2001) bei konfokalinė mikroskopija (Shim, Song et al. 2000). Tarp visų šių neinvazinių diagnostikos metodų labiausiai perspektyvus yra fluorescencinės spektroskopijos metodas, kuris gimdos kaklelio patikroje pasirodė turintis pakankamai aukštą jautrumą - 75 proc. ir specifiškumą - 80 proc. Atliktos dvi duomenų metaanalizės parodė, kad fluorescencinė spektroskopija, lyginant su Pap tepinėlio ir kolposkopijos metodais, yra jautresnis diagnostikos metodas (Mitchell, Cantor et al. 1999; Mitchell, Cantor et al. 1999). Susidomėjimą jais stiprina jų neinvazinis pobūdis, didesnis jautrumas ir didesnė skiriamoji geba nei taikant įprastinius diagnostikos metodus: branduolio magnetinį rezonansą, kompiuterinę tomografiją arba ultrasonografiją (Hillemanns, Weingandt et al. 2000). Be to gali būti vertinami ne tik fluorescenciniai, bet ir kiti optiniai audinio ar nuoplovų parametrai: atspindys, sklaida, sugertis.

Klinikinėje praktikoje taikomas citologinis tyrimo metodas nėra pakankamai tikslus, nes šepetėliu nubraukiamas gana didelis gimdos kaklelio paviršius, pirminiame mėginyje ląstelių yra gausu, o po centrifugavimo jų ant stikliuko patenka nedaug ir nebūtinai tos ląstelės, kurios buvo mažame pažeistame gimdos kaklelio plote.

Mes savo tyrimuose lyginom po centrifugavimo ant mikroskopinio stikliuko likusių ląstelių ir supernatante esančių medžiagų (leukocitų, gleivių ir bakterijų, kurios turi informacijos ir apie uždegimą) spektrus. Tyrimas neapima visų gimdos kaklelio epitelio pokyčių variantų.

Šiuo metu audiniams tirti *in vivo* naudojamas daugiabangis sužadimas ir vertinami fluorescencijos, atspindžio ir sugertų spindulių rodikliai, taip pat taikomas kombinuotas optinių parametrų vertinimas bei tiriama fluorescencijos gesimo trukmė.

Spektrofotometriniai tyrimai *in vitro* gali būti atliekami kartu su proteominiais, biocheminiais tiriamojo substrato tyrimais, panaudojant biomarkerius, ir visus gautus duomenis panaudoti gimdos kaklelio nuoplovų pakitusių baltymų vertinimui (Wong, Cheung et al. 2004).

Gimdos kaklelio displaziją bandoma susieti su triptofano, kolageno, NADH kiekybiniais ar cheminės sudėties pokyčiais. Šie pokyčiai gali atsirasti dėl galimų ląstelės transportinių baltymų mutacijų, dėl kurių tarpląsteliniame skystyje, taip pat ir nuoplovose, keičiasi šių medžiagų koncentracija (Elbaz, Tayer et al. 2005).

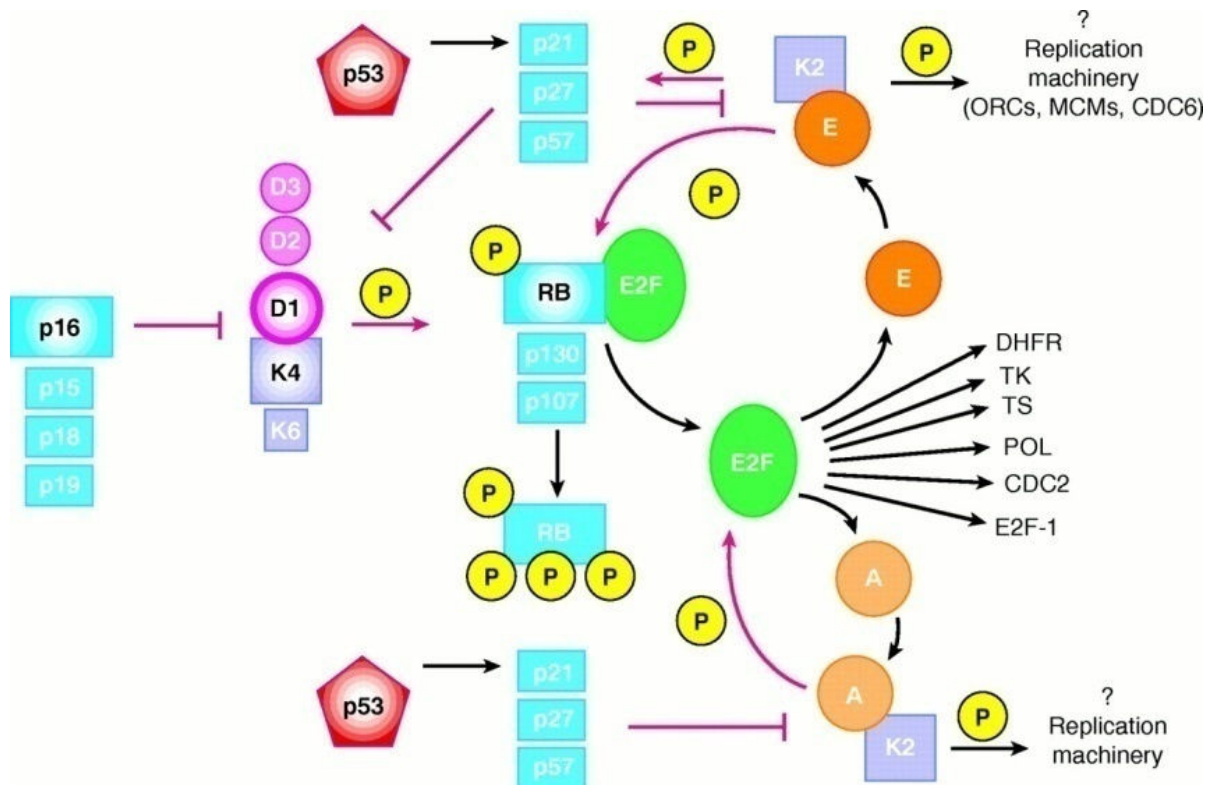
Taigi galima drąsiai teigti, kad optinės technologijos turi didžiulį pritaikymo klinikinėje praktikoje potencialą. Greita diagnostika čia pat vietoje, nereikalaujanti papildomų paciento vizitų, sutaupytų klinacistų ir pacienčių laiko ir lėšų tiek besivystančiose, tiek ir ekonomiškai stipriose šalyse.

2.3.2.2. Baltymas p16^{INK4a}

Pastaruoju metu atliekami tyrimai, siekiant nustatyti genų, susijusių su intraepitelinių pokyčių progresavimu, produktus. Tiriami su ląstelių proliferacija susiję žymenys Ki-67, PCNA (proliferuojančio ląstelės branduolio antigenas) ir kinazių slopiklis p21, priklausomas nuo ciklino E. Vis dėlto jų raiška padidėja ir kitose ląstelėse, aptinkamose gimdos kaklelio citologinėje medžiagoje. Pavyzdžiui, Ki-67 ir PCNA padidėjusi raiška nustatyta mononukleuaruose. Taigi minėti žymenys nėra specifiški ir neatspindi intraepitelinių pokyčių progresavimo (Keating, Ince et al. 2001).

Pastaraisiais metais kelios mokslininkų grupės nagrinėja baltymą p16INK4a kaip galimą papildomą žymenį gimdos kaklelio patologijai diagnozuoti (Lu, Toki et al. 1998; Sano, Oyama et al. 1998; Klaes, Friedrich et al. 2001; Milde-Langosch, Riethdorf et al. 2001; Klaes, Benner et al. 2002; Saqi, Pasha et al. 2002; Volgareva, Zavalishina et al. 2002; Agoff, Lin et al. 2003; Murphy, Ring et al. 2003; Negri, Egarter-Vigl et al. 2003; Volgareva, Zavalishina et al. 2004). Šis baltymas priklauso nuo kinazių inhibitorių Cdk4 ir 6 grupės ciklinų (Okamoto, Demetrick et al. 1994) ir yra koduojamas vėžio supresijos geno CDKN2 (sinonimai - INK 4a, MTS 1, INK4a/ARF) 9p21 chromosomoje. Genas vaidina svarbų vaidmenį Cdk-Rb-E2F patologiniame procese, - jis inaktyvuoja funkciją tų ciklinų kompleksų, kurie yra atsakingi už retinoblastomų baltymo (pRb)-E2F fosforilinimo procesus G1 stadijoje. Baltymas p16 stabdo ląstelių proliferacijos procesus, slopindamas fosforilinimo reakcijas ir taip inaktyvuodamas pRb. Yra įrodyta, kad p16 yra svarbus ląstelės gyvybinio ciklo reguliatorius, jis nedideliais kiekiais kaupiasi senstančiose ląstelėse.

Baltymo p16^{INK4a} nustatymas kartu su citologiniu tepinėlių tyrimu gali padidinti Pap tepinėlio metodo jautrumą nuo 40 iki 97 proc. (Bibbo, Klump et al. 2002; Klaes, Benner et al. 2002). Baltymų p16 ir p53 apykaitos schema pateikiama 5 pav.



5 pav. Baltymų p16 ir p53 apykaitos schema (Pagal C.J.Sherr, 1996)

2.3.2.3. Mikrogardelės

Mikrogardelės (angl. *biochip, microarray*) yra dvidimensinės biosensorių gardelės ant kieto substrato, kurių kiekviename mikroskopiniame laukelyje biologinių molekulių sąveika sukelia kiekybiškai matuojamus fizinių parametrų pokyčius. Daugelio autorių nuomone, mikrogardelės - tai naujausi XXI amžiaus biomedicinos poreikiams skirti technologiniai gaminiai (Tomizaki, Usui et al. 2005; Sotiropoulou, Sierra-Sastre et al. 2008). Klinikinėje praktikoje yra paplitęs kitas biomikrogardelių pavadinimas – biolustai. Mokslininkai jau nustatė ir įvardino žymenis (baltymus), kurie suteikia galimybę kliniciams diagnozuoti kai kuriuos vėžinius susirgimus (Imafuku, Omenn et al. 2004; Basil, Zhao et al. 2006; Sanchez-Carbayo, Socci et al. 2006; Zangar, Daly et al. 2006), širdies ligas (Felker, Petersen et al. 2006; Masson, Latini et al. 2006), inkstų patologiją (Hewitt, Dear et al. 2004; Bonventre 2008; Bonventre 2009), Alzheimerio ligą

(Georganopoulou, Chang et al. 2005). Baltymai, fermentai ir biomolekulės, kurias gamina pačios vėžinės ląstelės, arba organizmo imuninės sistemos išskiriamos medžiagos atsiranda organizmo skysčiuose kaip atsakas į naviką. Dauguma aprašomų žymenų aptinkami serume, šlapime ir plazmoje. Kiti autoriai žymenų ieškojo įvairiose kitose organizmo išskyrose: ašarose, seilėse, cerebrospinaliniame skystyje, audinių biopsinės medžiagos lizatuose, iškvėpto oro kondensate.

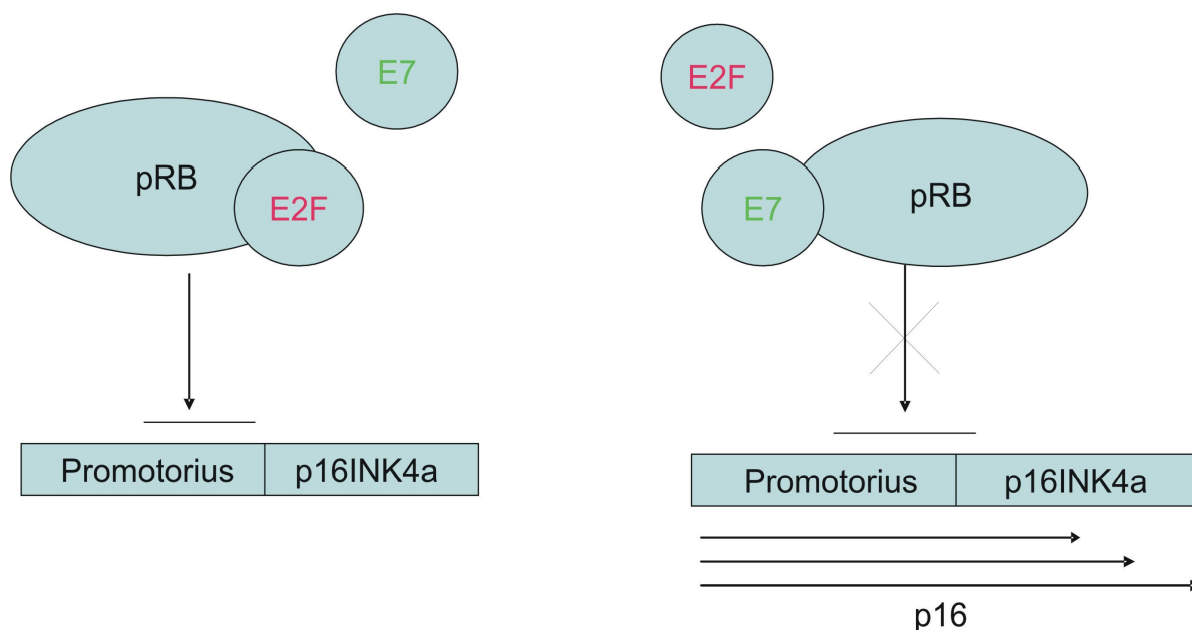
Klinikistams svarbios ne tik patikimų žymenų paieškos, bet nemažiau svarbios šių žymenų pritaikymo diagnostinėje praktikoje galimybės.

Dažniausiai naudojami metodai keletui žymenų nustatyti vienu metu yra masių spektrometrija (Zangar, Varnum et al. 2004; Kolch, Neususs et al. 2005; Ackermann, Hale et al. 2006), 2-D (dvidimensinis) Western blotas (Imafuku, Omenn et al. 2004; Sanchez-Carbayo 2006), 2-D (dvidimensinė) gelio elektroforezė (Choe, Werner et al. 2006) ir imunofermentiniai tyrimai, tokie kaip ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) metodas (Imafuku, Omenn et al. 2004; Zangar, Daly et al. 2006). (ELISA – tai biocheminis metodas, dažniausiai naudojamas imunologijos srityje, siekiant nustatyti antikūnų ir antigeno buvimą mėginėlyje).

Vis dėlto nei vienas iš šių metodų nesuteikia galimybės ištirti daugelio pacientų mėginius vienu metu. Puiki alternatyva jiems yra mikrogardelių (lustų) metodas (Angenendt 2005; Gao, Kuick et al. 2005; Haab 2005; Mattoon, Michaud et al. 2005; Eisenstein 2006; Nettikadan, Radke et al. 2006; Sanchez-Carbayo 2006).

Molekuliniai gimdos kaklelio kancerogenezės mechanizmai šiuo metu nagrinėjami plačiai. Paskelbta darbų, kuriuose aprašomi specifiniai gimdos kaklelio vėžiui būdingi baltymai (Bae, Lee et al. 2005; Lin, Lai et al. 2006). Piktybinėje gimdos kaklelio ląstelių transformacijoje svarbus vaidmuo tenka viruso genų E6 ir E7 koduojamiems produktams, kurie sutrikdo pažeistos ląstelės dalijimosi ciklą - padidina p53 ir pRb baltymų degradaciją (Saito, Ishi et al. 1999; Arias-Pulido, Peyton et al. 2006; Howley 2006).

Baltymo p16 hipersintezavimo mechanizmo grafinė išraiška pateikiama 6 paveikslėlyje.



6 pav. Baltymo p16 INK4a hipersintezavimo mechanizmas

Baltymo p16 INK4a hipersintezavimo procesas skatina ydingą kitų veiksmų ciklą, dėl to atsiranda stipri, nuo ciklinazių priklausančių kinazių inhibitorių, p16^{INK4a} superekspresija. Baltymo p16 INK4a rodikliai atspindi du dalykus: pirma, jis parodo, ar onkogeninio ŽPV DNR E7 integruotas ląstelėje, ir, antra, ar yra pakenkta ląstelės funkcija. Iki šiol atliktų tyrimų autoriai p16^{INK4a} metodą siūlo taikyti gimdos kaklelio imunohistocheminams ir imunocitocheminiams tyrimams, kai moteris, turinčias CIN1 arba didesnius gimdos kaklelio epitelio intraepitelinius pažeidimus, reikia iširti dėl ŽPV (Volgareva, Zavalishina et al. 2004).

Vėžinės ligos diagnostika šiuo metu dažniausiai grindžiama ląstelių ir audinių patologiniais pokyčiais, kurie nustatomi mėginių tyrimais ar vaizdinimo būdu. Nanotechnologiniais tyrimais siekiama aptikti tokius pirminius molekulinis pokyčius, kurie įspėtų apie prasidedančią ligą daug anksčiau, nei tai įmanoma išaiškinti biopsijos ar vaizdinimo metodais. Tam reikalingi specialūs prietaisai, kurie būtų jautrūs diagnozuoti patologiją iš nedidelio medžiagos kiekio. Nors technologiškai toks uždavinys nėra sudėtingas, tačiau ypatingas dėmesys turi būti kreipiamas į specifinių ŽPV tyrimams skirtų mikrogardelių patikimumą. Biofizikiniu požiūriu skirtingų biožymenų integracija vienoje gardelėje yra taip pat sudėtinga, pavyzdžiui, vienalaike integracija

oligonukleotidų, atpažįstančių ŽPV specifines sekas, įvairių viruso kapsidės baltymų, jų produktų bei p16 antikūnų. Šios mokslinės paieškos yra labai vertingos, nes ateityje būtų galima sukurti ir kitų vėžinių susirgimų diagnostikai tinkamas mikrogardelės.

Pastaruoju metu gerai žinomos ir audinių lizatų mikrogardelės. Žymenų raiška įvairiuose naviko progresavimo etapuose taip pat gali būti nustatyta, išdėliojant normalų audinį šalia hiperplastinės, preinvazinės ir invazinės karcinomos audinių (Salvucci et al., 2006; Xie et al., 2003; Ashida et al., 2006; Corzo et al., 2006). Vis dėlto tikroji audinių mikrogardelių (*TMA*–*tissue microarray*) vertė yra jų gebėjimas palengvinti raiškos duomenų koreliaciją su klinikinės informacijos rodikliais (Salvucci et al., 2006). Baltymų mikrorinkiniai esti dviejų pagrindinių formų: pirmaeigės fazės ir atbulinės. Pirmaeigės fazės fiksuojamoji molekulė (antikūnas, peptidas ar baltymas) imobilizuojama ant substrato ir mėginys tiriamas siekiant surasti mus dominantį baltymą ląstelių nuoploose ar biologiniuose skysčiuose. Antikūnų mikrorinkiniai ir mikro ELISA rinkiniai yra pirmaeigės fazės pavyzdžiai, kai imobilizuojama fiksuojamoji (gaudomoji) molekulė yra antikūnas. Vienintelis klinikinis mėginys su pirmaeigės fazės rinkiniu sudaro galimybę vienu metu atlikti daugelio baltymų raiškos analizę. Siekiant greito klinikinio patvirtinimo, baltymų mikrorinkinio platformos pajėgumai turi būti pakankami, labai jautrūs ir leisti aptikti žymenis itin mažuose mėginių kiekiuose.

Atbulinės (reversinės) fazės baltymų mikrorinkiniai (RPPMs) tenkina visus minėtus poreikius ir tampa vis naudingesni, nes efektyviai patvirtina ne tik spėjamus biožymenis. Tokia platforma dabar naudojama kelių tipų mėginių tyrimams, įskaitant nuoplovas nuo ląstelių (Nishizuka et al., 2003-a) ir navikų (Wulfkühle et al., 2003), o taip pat tokius biologinius skysčius kaip serumas (Janzi et al., 2005) ir plazma (Ramaswamy et al., 2005). Vienas didžiausių RPPMs privalumų, lyginant su kitais baltymų nustatymo metodais, pvz., ELISA metodu, yra tai, kad tyrimui pakanka miniatiūrinių medžiagos kiekių. Į vieną vietą-tašką patenka mėginio nanokiekiai, todėl galima iširti mažiausiai šimtą rinkinių iš vos 25 000 mikroskopiškai suardytų ląstelių (Wulfkühle et al., 2003; Sheehan et al., 2005). Su tokiais miniatiūriniais medžiagos kiekiais vienoje vietoje-taške

galima paruošti tūkstančius klinikinių mėginių ant vieno objektinio stiklelio, taip sudarant sąlygas labai našiam ieškomo žymens tyrimui.

Kitas tinkamų mikrorinkinių platformų pranašumas yra galimybė archyvuoti ir ilgai išsaugoti paruoštus objektinius stiklelius. Vis dėlto ir šis metodas turi minusą, - kol kas stokojama gautų tyrimo duomenų vertinimo standartizacijos, taip pat duomenų, gautų iš skirtingų platformų ir institucijų (ar net iš skirtingų tos pačios platformos rinkinių) vertinimo ir analizės standartizacijos. Visa tai labai riboja lyginamuosius tyrimus. Mikrorinkinio platformos pranašumai, tokie kaip minimalus brangių klinikinių mėginių panaudojimas, daugkartinių eksperimentų standartizacija, eksperimento sparta, prieinami objektinių stiklelių skaitytuvai ir nesunkus objektinių stiklelių saugojimas, yra ir bus sėkmingai panaudojami klinikinėms diagnozėms patvirtinti ir suteiks galimybę patologijos interpretacijoms (Aguilar-Mahecha, Hassan et al. 2006).

3. TYRIMO OBJEKTAS

Profilaktinė moterų patikra dėl gimdos kaklelio vėžio vykdoma daugiau ar mažiau intensyviai beveik visame pasaulyje, o 20-ojo amžiaus pabaigoje ir 21-ojo amžiaus pradžioje daugelyje šalių pradėtos vykdyti tikslinės gimdos kaklelio vėžio patikros programos valstybiniu mastu. Jų tikslas – anksti išaiškinti vėžinę gimdos kaklelio patologiją, suteikti savalaikę medicininę pagalbą ir sumažinti moterų mirtingumą nuo gimdos kaklelio vėžio.

Lietuvoje valstybinė gimdos kaklelio patikros programa pradėta vykdyti nuo 2004 m. vidurio. Prevencinėje patikros programoje nurodoma, kad svarbi gimdos kaklelio vėžio profilaktikos grandis yra visuomenės sanitarinis švietimas, ypač moterų informavimas apie gimdos kaklelio vėžį, jo priežastis, rizikos veiksnius ir jų prevenciją.

Lietuvoje GKV patikros metu labai greit išryškėjo, kad mūsų moterys šiais klausimais turi mažai informacijos. Atsižvelgiant į tai, mes savo darbą atlikome dviem etapais. Pirmasis etapas apėmė tik anketinę moterų apklausą, siekiant išaiškinti moterų lankymosi pas ginekologus dažnį, jų žinias apie gimdos kaklelio vėžio patikros programą ir ŽPV kaip pagrindinį gimdos kaklelio vėžio rizikos veiksnių. Apklausa buvo atlikta 2006 m. kovo-gegužės mėnesiais. Apklauso rezultatai parodė, kad moterys menkai išmano apie ŽPV kaip GKV rizikos veiksnių ir yra nelinkusios kreiptis į ginekologus profilaktiniam patikrinimui. Dauguma moterų buvo linkusios išvengti reguliarių vizitų pas ginekologus, bet neprieštaravo būti paskiepytos nuo ŽPV (R.Kurtinaitienė, G.Drašutienė ir kt., 2008). Būtent todėl mes iškėlėme sau kitą uždavinį - pabandyti pritaikyti naujus, greitus ir jautrius tyrimo metodus, kuriais galėtume diagnozuoti gimdos kaklelio patologiją jau per pirmąjį moters apsilankymą ginekologijos kabinete, arba ieškoti naujų tyrimo testų, kuriuos moterys galėtų atlikti pačios. Tuo tikslu 2007-2008 metais mes pakartotinai apklausėme moteris ir atlikome išsamius lyginamuosius sveikų ir turinčių gimdos kaklelio patologiją moterų klinikinius tyrimus. Šie tyrimai sudarė antrąjį mūsų darbo etapą.

Diagnozavus ikivėžinę gimdos kaklelio patologiją, moterų priežiūra buvo vykdoma pagal 2000 m. rugpjūčio 30 d. patvirtintą gimdos kaklelio ikivėžinių ligų diagnostikos ir gydymo protokolą-rekomendacijas. Visos moterys buvo supažindintos su tyrimo esme, visos savo parašu patvirtino sutikimą dalyvauti tyrime.

Lietuvos Bioetikos komitetas davė leidimą vykdyti šį biomedicininį tyrimą (Nr.61, 2006 12 22).

3.1. Tirtų moterų kontingentas

Pirmoji anketinė apklausa. Apklausoje dalyvavo 1825 moterys, gyvenančios Vilniaus mieste. Moterys buvo 18-60 metų amžiaus, įvairių tautybių, įvairaus išsilavinimo, savanoriškai sutikusios užpildyti anoniminę anketą. Apklausa vykdyta Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikose, Mykolo Rōmerio universitete, Vilniaus universiteto Medicinos ir Chemijos fakultetuose, Vilniaus kolegijos Sveikatos priežiūros fakultete, Vilniaus pedagoginiame universitete.

Anketos klausimynas apėmė tokius punktus:

- socialiniai demografiniai požymiai (amžius, išsilavinimas, užsiėmimas),
- moterų žinios apie gimdos kaklelio vėžio rizikos veiksnius (ŽPV, jo tipai, plitimo būdai),
- moterų žinios apie valstybinę gimdos kaklelio patikros programą,
- moterų lankymosi pas ginekologus dažnis,
- moterų žinios apie vakcinaciją nuo ŽPV, pageidavimas pasiskiepyti.

Anketai užpildyti tereikėjo 5-10 minučių. Respondentėms jokios papildomos informacijos apie ŽPV, gimdos kaklelio vėžį, jo rizikos veiksnius ir Lietuvoje vykdomą gimdos kaklelio patikros programą iš anksto nebuvo suteikiama.

Antrosios anketinės apklausos ir klinikinių tyrimų kontingentas. Buvo tiriamos Vilniaus mieste gyvenančios moterys, kurios į ginekologus kreipėsi pagal Lietuvoje vykdomą gimdos kaklelio patikros programą arba savarankiškai dėl atsiradusių

patologinių požymių, ir joms buvo atlikti gimdos kaklelio skystų terpių citologiniai tyrimai. Iš viso ištirtos 459 moterys.

Į išsamių klinikinių tyrimų (tiriamąją) grupę buvo įrašytos tik tos moterys, kurioms įprastu Pap tepinėlio metodu buvo diagnozuoti ryškūs intraepiteliniai gimdos kaklelio pakitimai (HSIL) ir kurios dėl tolesnio gydymo buvo nukreiptos (arba kreipėsi pačios) į Vilniaus Universiteto Onkologijos Institutą arba Vilniaus universitetinės ligoninės Santariškių klinikos ginekologijos skyrių.

Kontrolinę grupę sudarė sveikos moterys, kurios kreipėsi dėl profilaktinės gimdos kaklelio patikros į pirminę sveikatos priežiūros įstaigą (PSPĮ), jų Pap tepinėliai citologiniais tyrimais įvertinti kaip intraepitelinių pakitimų ar piktybinio naviko neturintys (IPPNN).

Tiriamosios grupės moterys privalėjo atitikti tokius kriterijus:

- Citologinis tyrimas patvirtino HSIL diagnozę, kuri vėliau patvirtinta biopsinės medžiagos histologiniu tyrimu (patvirtinta CIN2, CIN3 arba CIS patologija);
- Moters laisvanoriškas sutikimas dalyvauti tyrime.

Kontrolinę grupę sudarė moterys, kurios atitiko šiuos kriterijus:

- Citologiniu tyrimu intraepitelinės patologijos ar piktybinio naviko neaptikta (IPPNN);
- Amžius – ne daugiau kaip ± 3 metai imtinai, lyginant su tiriamosios grupės moterų amžiumi;
- Moters laisvanoriškas sutikimas dalyvauti tyrime.

Dalis moterų buvo išbrauktos tiek iš tiriamosios, tiek iš kontrolinės grupės ir daugiau mūsų tyrimuose nedalyvavo. Iš tiriamosios grupės moterys buvo eliminuojamos, kai neatitikdavo pagrindinio kriterijaus, t.y. kai Pap tepinėlio citologinio tyrimo rezultatai nebūdavo patvirtinami biopsinės medžiagos histologiniais tyrimais (nepatvirtinama CIN2, CIN3, CIS patologija).

Iš kontrolinės grupės moterys buvo išbraukiamos, kai neatitiko šių kriterijų :

- Moters amžius skyrėsi nuo tiriamosios grupės moterų amžiaus daugiau nei ± 3 metais;
- Moterys, kurioms buvo aptikti įvairūs kiti gimdos kaklelio patologiniai citologiniai pokyčiai (jei kontrolinės grupės moterims buvo nustatoma HSIL arba biopsinės medžiagos tyrimas patvirtindavo CIN2, CIN3, CIS diagnozes, šios pacientės būdavo perkeliamos į tiriamąją grupę);
- Nėščios moterys.

Taigi po pirminio tyrimo iš 459 moterų į tiriamąją grupę buvo pakviestos tik 285 pacientės kaip atitinkančios būtinus kriterijus.

3.2. Gimdos kaklelio nuograndų ir biopsijos mėginiai

Visoms moterims pirmiausia buvo atliekama įprastinė ginekologinė apžiūra, po to imamos gimdos kaklelio nuograndos į standartinę buferinę terpę (GynoPrep arba PapSpin). Iš nuograndų mėginio buvo ruošiami vienasluoksniai citologiniai Pap tepinėliai, o supernatantas tiriamas optiniais ir biocheminiais metodais. Kai Pap tepinėlio citologinio tyrimo rezultatai patvirtindavo HSIL diagnozę, šioms moterims buvo atliekama gimdos kaklelio pažeistų audinių biopsija (arba konizacija) ir biopsinė medžiaga tirama histologiškai bei imunohistocheminiu metodu.

4. TYRIMO METODAI

Mūsų darbe buvo naudojami tokie tyrimo metodai.

1. Anketinė tiriamųjų moterų apklausa.
2. Laboratoriniai tyrimai:
 - gimdos kaklelio išskyrų citologinis tyrimas Pap tepinėlio metodu,
 - gimdos kaklelio biopsinės medžiagos histologinis tyrimas,
 - baltymo p16INK4a raiškos nustatymas imunocheminiais metodais.
3. Optiniai supernatanato tyrimo metodai:
 - liuminescencinis spektrofotometrinis tyrimas „Perkin Elmer LS 50B“ ,
 - savosios fluorescencijos tyrimas lietuvišku 355 nm mikrolazeriu STA-01 su spektrometru „AvaSpec-2048TEC-USB2“.
4. Biocheminiai proteominiai supernatanto tyrimai:
 - švytinčių mikrogardelių metodas,
 - elektroforezės metodas,
 - Western bloto testas.
5. Statistinė duomenų analizė.

4.1. Anketinė apklausa

Pirmoji anketinė apklausa buvo vykdoma vieninteliu tikslu – išaiškinti moterų žinias apie gimdos kaklelio vėžį, jo rizikos veiksnius (ypač ŽPV) ir prevencines priemones, taip pat apie Lietuvoje vykdomą valstybinę gimdos kaklelio patikros programą. Apklausoje dalyvavo moterys iš Vilniaus miesto, taip pat iš kitų regionų, kurioms konsultacinės pagalbos tvarka buvo atliekami Pap tepinėlio tyrimai. Moterys buvo įvairių tautybių, įvairaus išsilavinimo, 18-60 metų amžiaus, savanoriškai sutikusios užpildyti anoniminę anketą. Apklausa vykdyta Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikose, Mykolo Rōmerio universitete, Vilniaus universiteto Medicinos ir Chemijos fakultetuose, Vilniaus kolegijos Sveikatos priežiūros fakultete, Vilniaus pedagoginiame universitete. Iš viso apklaustos 1825 moterys.

Anketos klausimynas apėmė tokius punktus:

- socialiniai demografiniai požymiai (amžius, išsilavinimas, užsiėmimas);
- moterų žinios apie gimdos kaklelio vėžio rizikos veiksnius (ŽPV, jo tipai, plitimo būdai);
- moterų žinios apie valstybinę gimdos kaklelio patikros programą;
- moterų lankymosi pas ginekologus dažnis;
- moterų žinios apie vakcinaciją nuo ŽPV, pageidavimas pasiskiepyti.

Pirmosios apklausos anketą iš viso sudarė 12 klausimų (žr. Priedai). Anketai užpildyti tereikėjo 5-10 minučių. Respondentėms jokios papildomos informacijos nei apie ŽPV, nei apie gimdos kaklelio vėžį ir jo rizikos veiksnius, nei apie Lietuvoje vykdomą gimdos kaklelio patikros programą iš anksto nebuvo suteikiama. Klausimyno tinkamumas buvo tikrinamas pagal tris klausimus – ar respondentė girdėjo ką nors apie prevencijos programą, ar žino ką nors apie ŽPV, ar žino apie onkogeninius ŽPV tipus. Apskaičiuotas tinkamumo koeficientas *Cronbach alfa* pagal šiuos klausimus buvo 0,689. Skaičiavimai atlikti naudojant programas STATA ir SPSS.

Antroje anketinėje apklausoje dalyvavo moterys, kurioms buvo imamas Pap testas. Jos į ginekologus kreipėsi pagal Lietuvoje vykdomą gimdos kaklelio patikros programą arba savarankiškai dėl atsiradusių patologinių požymių. Visoms joms buvo atlikti citologiniai tyrimai Pap tepinėlio metodu. Iš viso apklaustos 459 moterys.

Antroji apklausa vykdyta pagal specialiai tam tikslui paruoštą originalų klausimyną. Šią anketą sudarė 42 klausimai (žr. Priedai). Klausimynas sudarytas kartu su epidemiologu (Lietuvos Vėžio registro vadovu Prof. J.Kurtinaičiu), atsižvelgiant į kitų autorių mokslinėje literatūroje paskelbtas apklausos anketas, jas koreguojant, papildant ir detalizuojant klausimus pagal mus dominančius būsimus atsakymus. Klausimynas apėmė socialinius demografinius požymius (amžius, išsilavinimas, gyvenamoji vietovė, socialinis sluoksnis), ginekologinę anamnezę (lankymosi pas ginekologus dažnis, menarcho anamnezė, gimdymų skaičius, abortų skaičius, gimdos kaklelio susirgimai

praicityje, gimdos kaklelio nuograndų citologinių tyrimų skaičius, kontracepcijos priemonės ir kt.), seksualinio gyvenimo ypatumus (lytinių santykių pradžia, lytinių partnerių kaita), moters žinias apie gimdos kaklelio vėžio patikros programą bei įvairius kitus rizikos veiksnius: stresą, patiriamą namuose ar darbe, žalingus įpročius (rūkymą), lėtines ligas, imunitetą stimuliuojančių arba slopinančių vaistų vartojimą, vakcinaciją nuo gripo ir kt.

Moterų apklausa buvo atliekama prieš paimant gimdos kaklelio nuograndų mėginį. Į klausimus respondentės atsakinėjo savarankiškai. Jokios informacijos apie GKV rizikos veiksnius, žmogaus papildomos virusą ir Lietuvoje vykdomą gimdos kaklelio patikros programą moterims nebuvo suteikiama. Atsakymų laikas nebuvo ribojamas. Užpildytos anketos buvo sumetamos į specialią urną, iš kurių išimamos kartą per mėnesį. Atsakymai į klausimus ir tyrimų duomenys buvo koduojami ir įrašomi į asmeninį kompiuterį.

4.2. Laboratoriniai tyrimai

Tiriamųjų grupių imties parinkimas. Tiriamosios grupės dydis buvo apskaičiuotas remiantis prielaida, jog tiriamieji optiniai metodai bus jautresni diagnozuojant žymius intraepitelinius gimdos kaklelio pakitimus už Pap tepinėlį.

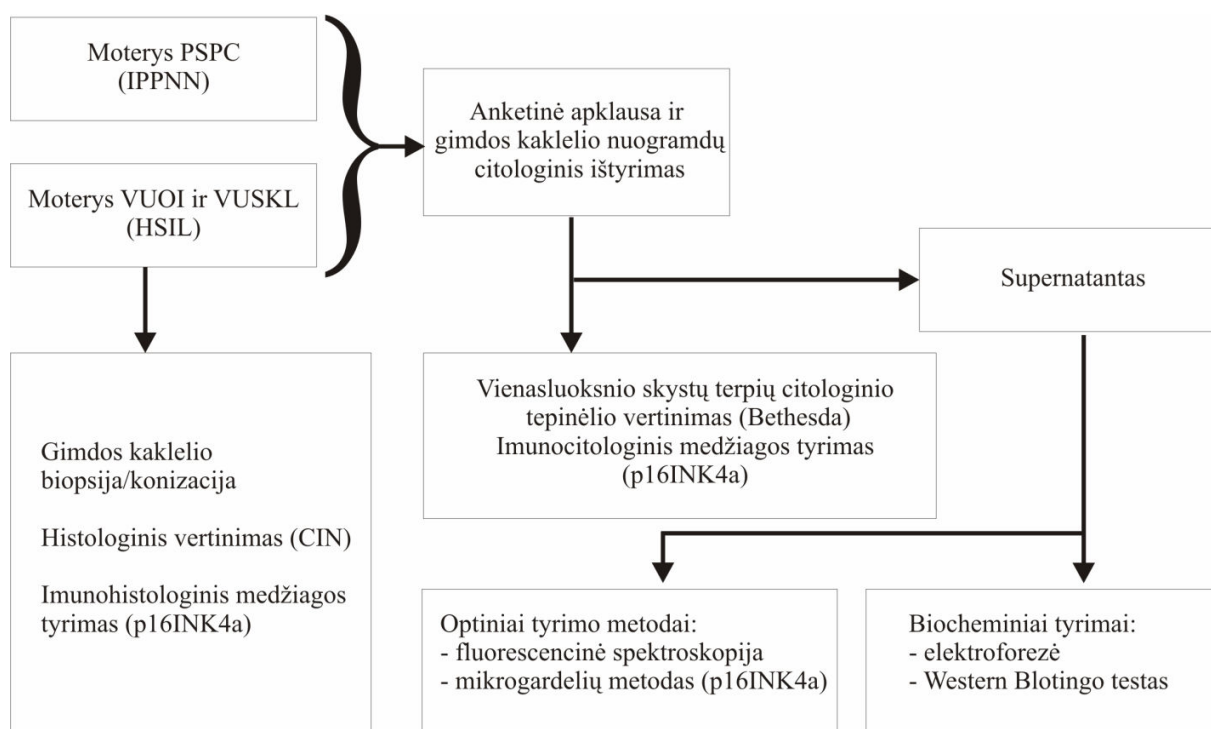
Tradicinio Pap tepinėlio jautrumas yra 30-80 proc., vidutiniškai 60 proc. Kai vidutiniai Pap tepinėlio metodo jautrumo rodikliai kontrolinėje grupėje (p_{tir}) imami už pagrindą, nuo jautrumo rodiklio dydžio pasirinkimo tiriamojoje grupėje (p_{kontr}) priklauso mūsų tiriamojo objekto imtis (N).

Tiriamosios grupės dydžiui įvertinti pasirinkome keletą įverčių, prognozuodami, jog mūsų tyrimų metodų jautrumas bus 15, 17 arba 20 proc. didesnis, tiriamosios ir kontrolinės grupės N reikšmių santykis 1:4, studijos jėga – 0,8, o statistinio patikimumo koeficientas $\alpha=0,05$. Atlikti skaičiavimai parodė, kad prognozuojant 15 proc. didesnę mūsų tyrimų jautrumą, norint gauti patikimus tyrimų rezultatus, reikia iširti 78 moteris, sergančias HSIL. Kai tyrimų jautrumas prognozuojamas 17 proc. didesnis, patikimiems tyrimų rezultatams gauti reikia iširti 60 moterų, o prognozuojant 20 proc. didesnę tyrimų jautrumą, mūsų tiriamojoje grupėje pakaktų tik 43 moterų (1 lentelė).

1 lentelė. Tiriamosios ir kontrolinės grupių imties pasirinkimas priklausomai nuo tyrimo metodo jautrumo rodiklių

Grupė	Tiriamosios ir kontrolinės grupių N rodikliai priklausomai nuo prognozuojamų jautrumo rodiklių		
	Didesnis 15 proc.: $p_{tir} = 0,75$ $p_{kontr} = 0,60$	Didesnis 17 proc.: $p_{tir} = 0,77$ $p_{kontr} = 0,60$	Didesnis 20 proc.: $p_{tir} = 0,80$ $p_{kontr} = 0,60$
Patikima tiriamosios grupės (HSIL) imtis	78	60	43
Kontrolinės (IPPNN) grupės imtis	312	240	172

Moteryų klinikinių tyrimų schema grafiškai pavaizduota 7 paveikslėlyje.



7 pav. Moterų apklausos, gimdos kaklelio nuograndų bei biopsinės medžiagos paėmimo ir jų laboratorinės analizės įvairiais tyrimo metodais schema

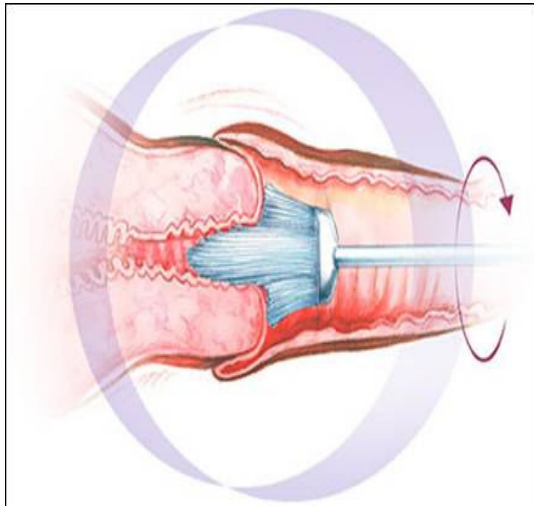
Schemoje matyti, kad visos tirtos moterys buvo apklausiamos ir visoms buvo atliekamas gimdos kaklelio nuograndų citologinis tyrimas į skystą terpę.

4.2.1. Citologinis gimdos kaklelio nuograndų tyrimas Pap tepinėlio metodu

Gimdos kaklelio nuograndų mėginys buvo imamas, griežtai prisilaikant metodikos reikalavimų. Makštis praplečiama steriliais plėtikliais, gimdos kaklelis nuplaunamas sterilaus fiziologinio tirpalo srove. Po to steriliūs PapetteTM šluotelės (Wallach, Orange, CT) viršūnė lengvai įspaudžiama į gimdos kaklelio žiotis ir sukama pagal laikrodžio rodyklę ratu 360 laipsnių (8 ir 9 pav.). Sukamojo judesio metu šluotelės šereliai nugranda paviršinius gimdos kaklelio audinių sluoksnius ir gleives. Nuograndomis aplipusi šluotelė atsargiai ištraukiama lauk, nusukama nuo kotelio ir panardinama į mėgintuvėlį su skysta buferine terpe. Mėgintuvėlis kelis kartus supurtomas, kad nuograndos nuo šepetėlio nusiplautų į buferinį tirpalą. Po to mėgintuvėlis buvo gabenamas į Vilniaus Patologijos centrą tolimesniems mėginio tyrimams.



8 pav. PapetteTM šluotelė gimdos kaklelio nuograndų mėginiui paimti



9 pav. Gimdos kaklelio nuograndų paėmimas Papette™ šluotele

Patologijos centre buferinė mėginio terpė pirmiausia buvo centrifuguojama. Viršutinė skystoji centrifugato dalis, t.y. supernatantas, buvo naudojamas įvairiems tyrimams biocheminiais ir optiniais metodais, o apatinė tirštoji mėginio dalis buvo nusiurbama, iš jos ruošiamas vienasluoksnis citologinis tepinėlis.

Ruošiant tepinėlį, pirmiausia densitometru buvo matuojamas ląstelių titras (tankis) nusiurbtoje terpeje. Priklausomai nuo ląstelių kiekio mėginyje, densitometras automatiškai apskaičiuodavo ir pateikdavo ekrane išvadas, kiek PapSpin fiksuojamojo skysčio reikia įpilti į mėginį papildomai (dažniausiai nuo 0,2 iki 5,0 ml). Kai ląstelių kiekis mėginyje būdavo per mažas, fiksuojamojo skysčio iš viso nebuvo pilama. Toliau 2 ml paruošto mėginio buvo supilami į specialų megapiltuvėlį, į jį įstatomas objektyvinis stiklelis. Megapiltuvėlis centrifuguojamas 5 minutes Shandon Cytospin 4 centrifuga 1250 aps/min greičiu. Centrifuguojant mėginio ląstelės užnešamos ant objektyvino stiklelio, o skystis nuteka į piltuvėlį. Baigus centrifigavimą objektyvinis stiklelis iš megapiltuvėlio išimamas nedelsiant, ant jo susidaręs plonasluoksnis apnašas (tepinėlis) tuoj pat fiksuojamas Shandon PapSpin Collection Fluid fiksatoriumi. Po to tepinėlis 10 minučių buvo fiksuojamas 95 proc. etanoliumi ir dažomas standartiniu Papanicolaou metodu.

Vienasluoksniu Pap tepinėlio citologinio tyrimo rezultatai vertinami standartizuotai pagal Bethesda sistemą [Gimdos kaklelio ir makšties citologinių radinių terminija, JAV Nacionalinio vėžio instituto rekomendacijos, 2001] (Nayar and Solomon 2004).

4.2.2. Gimdos kaklelio biopsinės medžiagos histologinis tyrimas

Visos moterys, kurioms Pap tepinėlio citologinio tyrimo metodu buvo diagnozuojama HSIL, būdavo nukreipiamos į Vilniaus universiteto Onkologijos institutą arba VU Santariškių klinikų Ginekologijos skyrių gimdos kaklelio audinių biopsijai ir tolimesniam gydymui.

Gimdos kaklelio audinių biopsija arba konizacija buvo atliekama tik stacionaro sąlygomis diatermine kilpa. Biopsijai buvo naudojama mažoji kilpa.

Gimdos kaklelio konizacija buvo atliekama plačiąja kilpa, apimant visą pakitusių audinių sritį ir vienu kilpos pasukimu išpjaunant vientisą kūgį.

Biopsinė medžiaga arba konizatas buvo talpinami į 10 proc. formalino tirpalą ir siunčiami į Vilniaus patologijos centrą histologiniam tyrimui. Patologijos centre histologiniai audinių preparatai buvo ruošiami standartizuotai. Pirmiausia iš formaline fiksuotų audinių imami tam tikro dydžio tiriamosios medžiagos gabaliukai ir pagal standartinę programą apdorojami Shandon Pathcentre procesoriumi, t.y. fisuojami, dehidratuojami, skaidrinami ir impregnuojami standinamąja medžiaga. Impregnuoti audiniai buvo tvirtinami parafino bloke specialių parafininių blokų įrenginiu, 3 mikronų pjūviai daromi rotaciniu pusiau automatiniu mikrotomu Leica. Tiriamosios medžiagos mikropjūviai buvo perkeliama ant objektyvinio stikliuko ir dažomi hematoksilino-eozino būdu pagal standartinę metodiką. Paruošti histologiniai preparatai buvo uždengiami dengiamaisiais stikleliais, naudojant specialias terpes.

Gimdos kaklelio biopsinės medžiagos histologinio tyrimo rezultatai buvo vertinami pagal PSO 2003 metais patvirtintą krūtų ir moters genitalijų piktybinių navikų klasifikaciją bei gimdos kaklelio intraepitelinės neoplazijos (CIN) 3 laipsnių sistemą (CIN - angl. *Cervical Intraepithelial Neoplasia*).

4.2.3. Imunocheminiai baltymo p16INK4a tyrimo metodai

Baltymui p16INK4a nustatyti buvo taikomi imunohistocheminiai ir imunocitocheminiai metodai.

Imunohistocheminiai biopsinės medžiagos tyrimai buvo atliekami taip pat Vilniaus patologijos centre. Tyrimui buvo atrenkami reprezentatyviausių audinių gabaliukų parafino blokai, daromi 2 mikronų pjūviai ir ruošiami preparatai. Pirmiausia buvo atliekama deparafinizacija, po to mikrobanginiu histoprosesoriumi pagal patvirtintą standartinę metodiką buvo atstatomi audinio antigenai. Toliau baltymo p16INK4a išryškimas buvo atliekamas pagal patvirtintą standartinę seką, panaudojus CINtec[®] histologinį rinkinį (DAKO Cytomation, Glostrup, DK, Denmark) pagal protokolą:

- peroksido blokingas,
- Ak inkubacija,
- vizualizacija specialiu vizualizacijos tirpalu,
- veikimas DAB chromogeno substrato tirpalu,
- dažymas Mejerio hematoksilinu,
- plovimas amonio ir distiliuotu vandeniu,
- dehidratacija.

Paruošti preparatai buvo tiriami mikroskopiškai.

Imunocitocheminiu metodu baltymas p16INK4a buvo nustatomas naudojant tuos pačius vienasluoksnius gimdos kaklelio nuograndų tepinėlius, nudažytus Papanicolaou metodu. Iš viso ištirti 32 mėginiai. Tyrimams naudotas antikūnų rinkinys citologiniams mėginiams dažyti p16^{INK4a} CINtec[®] (DAKO Cytomation, Glostrup, DK, Denmark), griežtai prisilaikant gamintojo nurodytos tyrimo metodikos. Pirmiausia tepinėliai buvo blankinami pagal patvirtintą standartinę metodiką ir mikrobanginiu histoprosesoriumi atstatomi tepinėlio ląstelių antigenai. Po to tepinėliai buvo apdorojami tokiu pat metodu ir tokia pat seka kaip ir histologiniai biopsijos preparatai (peroksido blokingas, Ak inkubacija, vizualizacija specialiu vizualizacijos tirpalu, veikimas DAB chromogeno substrato tirpalu, dažymas Mejerio hematoksilinu, plovimas amonio ir distiliuotu vandeniu, dehidratacija).

Tyrimo rezultatai buvo vertinami pusiau kiekybiškai. Kai nusidažiusių ląstelių iš viso nebuvo aptinkama arba silpnas citoplazminis nusidažymas (vertinamas ženklu \pm) buvo registruojamas tik pavienėse ląstelėse (iki 5 proc.), tyrimo rezultatas vertintas kaip p16 neigiamas. Teigiami atsakymai (p16 teigiamas) pagal nusidažiusių ląstelių kiekybinius procentinius rodiklius buvo skirstomi į kelias grupes: 5-25 proc.(+) nusidažiusių ląstelių, 25-75 proc.(++) ir >75 proc. (+++). Kuo daugiau tepinėlyje aptinkama nusidažiusių ląstelių, tuo didesni baltymo p16INK4a kiekybiniai rodikliai.

4.3. Optiniai tyrimo metodai

4.3.1. Supernatanto tyrimai liuminescenciniu spektrofotometru

„Perkin Elmer LS 50B“

Visoms moterims, kurioms buvo imami gimdos kaklelio nuograndų mėginiai skystų terpių citologiniams tyrimams, buvo atlikta supernatantinės medžiagos spektrinė analizė. Iš viso ištirta 459 moterų supernatantų mėginiai. Tyrimai atlikti Vilniaus Universiteto Onkologijos Instituto Biomedicininės fizikos laboratorijoje.

Supernatanto fluorescencija buvo matuojama kvarcinėje kiuvetėje, į kurią būdavo įpilama 2 ml tiriamojo mėginio. Matavimai atlikti liuminescenciniu spektrofotometru „Perkin Elmer LS 50B“. Tyrime buvo taikyti tokie parametrai: žadinimo spektrinis plyšys 10 nm, emisijos spektrinis plyšys 5 nm, registravimo greitis 200 nm/min, registravimo žingsnis 0,5 nm.

Kiekvieno mėginio fluorescencijos spektrai buvo matuojami naudojant tris žadinimo bangos ilgius: 290 nm, 300 nm ir 310 nm. Spektrai buvo užrašomi juostoje pradedant bangos ilgiu 330 nm ir baigiant 550 nm, kadangi užrašant spektrus nuo mažesnio bangos ilgio gali būti registruojama ir žadinimo šaltinio spinduliuotė.

Visi mėginiai optiniu metodu buvo ištiriami per savaitę nuo gimdos kaklelio nuograndų paėmimo dienos. Iki tyrimo mėginiai laikomi šaldytuve +4° C temperatūroje.

Optinių tyrimų rezultatai tolimesnei analizei buvo tinkami ne visi. Tik 181 mėginio spektrai buvo informatyvūs, 292 fluorescencijos spektrai statistinei analizei buvo

netinkami: 101 mėginio (39,3 proc.), taikant sužadimą 290 nm ilgio bangomis; 93 mėginių (36,2 proc.), taikant sužadimą 300 nm ir 98 mėginių (38,1 proc.) – žadinant 310 nm banga. Dažniausia netinkamumo priežastis - netinkamas mėginių paruošimas fluorescenciniam tyrimui. Jų spektrai iš karto skyrėsi nuo kitų savo mažu intensyvumu, dažnai buvo matomas tik pašalinis triukšmas.

Taikant sužadimą 290 nm bangomis, ištirti 89 sveikų moterų supernatantų mėginiai ir 29 sergančių . Taikant sužadimą 300 nm bangomis, ištirti 92 sveikų ir 30 sergančių moterų supernatantų mėginiai, ir taikant sužadimui 310 nm bangas ištirti atitinkamai 87 ir 30 supernatantų mėginiai.

Tinkami analizei tyrimų duomenys buvo grupuojami pagal 3 požymius.

1. Pagal Pap tepinėlio citologinio tyrimo rezultatus (diagnozė).
2. Pagal biopsinės medžiagos histologinio tyrimo rezultatus.

Visi biopsiniai mėginiai buvo suskirstyti į 2 grupes: CIN2/CIN3/CIS mėginiai ir IPPNN mėginiai. Pastaroji IPPNN grupė susidarė dėl to, kad biopsinių mėginių histologinis tyrimas nepatvirtino Pap tepinėlio citologinio tyrimo rezultatų. Kai pagal Pap testą diagnozė iš karto buvo nustatoma IPPNN, tokiais atvejais moterims biopsinis tyrimas iš viso nebuvo atliekamas.

3. Pagal baltymo p16INK4a imunohistocheminių ir imunocitocheminių tyrimų rezultatus, pagal kuriuos mėginius buvo galima suskirstyti į dvi grupes: p16 teigiami ir p16 neigiami.

4.3.2. Sužadimas 355 nm ilgio banga portatyviniu lietuvišku mikrolazeriu STA-01 su spektrometru „AvaSpec-2048TEC-USB2, Avantes“

Tyrimai atlikti Vilniaus Universiteto Taikomųjų mokslų instituto (VU TMI) buvusiam Biomedicininų ir informacinių technologijų skyriuje ir Biomedicininų technologijų

sektoriuje. Tyrimams naudotas diodinio kaupinimo mikrolazeris STA-01 generuojantis Nd(YAG) spinduliuotės trečią harmoniką (UAB „STANDA“). Sužadavimo spinduliuotė įrenginyje yra leidžiama per filtrą UFS-1, kuris praleidžia tik 355 nm ilgio bangas, t.y. sulaiko pirmąją ir antrąją lazerio harmonikas ir palieka tik trečiąją. Dviejų gijų šviesolaidis buvo panaudojamas eksperimente: viena gija sužadimas nukreipiamas į



10 pav. Supernatantas transportiniame mėgintuvėlyje

bandinį, o kita gija sužadintos mėginio vietos fluorescencinis atsakas perduodamas į spektrometrą.

Prieš tyrimą UV-FS kvarco plokštelės buvo nuvalomos ir dezinfekuojamos spiritu, kad neliktų jokių riebalinių dėmelių, dulkių ar kitokių akimi matomų nešvarumų, kurie gali sukelti optinį triukšmą. Šaldytuve laikytas supernatantas transportiniame mėgintuvėlyje paprastai turėdavo tipišką išvaizdą – viršutinė dalis būdavo skaidri, o apačioje susikaupdavo ląstelių ir gleivių nuosėdos (10 pav.).

Iš kiekvieno supernatanto mėginio atskiru švirkštu iš dugno buvo įsiurbiami truputį medžiagos, užlašinama ant kvarco plokštelės ir džiovinama kambario temperatūroje 1,5–2 valandas. Lašo skersmuo 7-12 mm. Naudojant labiau kokybiškas kitos rūšies kvarco plokšteles, džiūvimo procesas trunka 20-30 minučių. Lazerio spinduliuotė nukreipiama šviesolaidžiu į tiriamąjį mėginį, patalpintą 1-3 mm atstumu, kampas tarp kvarco plokštelės plokštumos ir lazerio spindulio krypties 60-85 laipsniai. Liuminescencijos šviesa buvo surenkama to paties šviesolaidžio kita gija ir perduodama į spektrometrą. Liuminescencijos rinkimo integracijos laikas 50 ms, vidurkinimas 20 kartų, registruojama zona nuo 350 iki 900 nm. Tyrimas buvo vykdomas tamsiame kambaryje papildomai apsaugant tiriamosios medžiagos tiriamosios medžiagos vietą nuo indikatorių ir monitoriaus šviesos bei dulkių patekimo. Fluorescencija registruojama nuo kvarco plokštelės paviršiaus iš 3 taškų, kadangi supernatanto nuosėdos ant kvarco pasiskirsto heterogeniškai, o lazeriu apšviečiamo ploto skersmuo yra tik apie 2 mm, t.y. daug mažesnis nei nuosėdų lašo parametrai.

Iki pradedant mūsų darbą, metodikos parengimo tikslu buvo ištirti 57 supernatantų mėginiai VU Taikomųjų mokslų institute tikslingai sukurtu lietuvišku portatyviniu 355 nm bangų ilgio mikrolazeriu STA-01 su spektrometru „AvaSpec-2048TEC-USB2, Avantes“. Dalis mėginių panaudota diagnostinės metodikos kūrimui.

Ši pilotinė studija parodė, kad žadinimas 355nm banga yra tinkamas, gerai skiriami patologiniai ir sveikų moterų supernatanto mėginiai. Pagrindinio tyrimo metu ištyrėme 11 supernatanto mėginių, kurių citologinis atsakymas buvo IPPNN ir 7 supernatanto mėginius, kurių citologinis įvertinimas buvo HSIL.

Vėliau spektrinių tyrimų duomenys buvo išgryninami, pašalinant optinį triukšmą kylantį iš kvarco plokštelės, t.y. iš bendro spektro atimamas kvarco spektras ir padauginama iš proporcingumo koeficiento. Proporcingumo koeficientas nustatomas pagal maksimalias smailių reikšmes, esančias 370-380 nm bangų juostoje. Smailės susidaro tiek kvarco, tiek mėginių spektruose. Smailių dalis, esanti virš 800 nm ribos, buvo derinama su nuline padala. Spektro parametrai vertinti nuo 380-390 iki 900 nm ilgio bangų juostoje.

4.3.3. Spektrinių tyrimų rezultatų vertinimas

Priklausomai nuo žadinimo bangos ilgio (290, 300 ir 310 nm bei 355 nm), spektrų analizė atliekama pagal Gauso arba Lorencio metodus (Pelikán, 1994).

Gausinė funkcija rodo, kad sistema yra chaoso būsenoje, joje visos dalelės sąveikauja, linijos plotį nulemia šiluminiai virpesiai (koreguoti molekulinės savitųjų virpesių). Lorencio funkcija taikoma tada, kada linijos plotį nulemia vidinės molekulinės savybės: spektrinės linijos pusplotis susietas su sužadintos būsenos gyvavimo trukme. Jei eksperimento duomenis geriau aprašo Lorencio funkcijos artinys, tai galima teigti, kad skystyje esančių molekulių savybės mažai priklauso nuo jų apsupties.

Žadinant 355 nm ilgio bangomis, tiriamasis mėginys būdavo išdžiovinamas, todėl apsuptis turėjo didesnės įtakos molekulinės spinduliniams šuoliams, molekulė buvo trikdoma labiau (atstumai tarp molekulių ir aplinkos mažesni). Vis dėlto medicininėje diagnostikoje nėra svarbu, koks yra sąveikos mechanizmas. Svarbiausias tyrimo tikslas buvo nustatyti, ar pagal supernatanto spektrinio tyrimo rezultatus galima diagnozuoti

patologinius pokyčius, t.y. patikimai atskirti IPPNN ir HSIL atvejus, taip pat parinkti geriausiai tinkantį aprašymo modelį.

Tyrimai *in vitro* sumažina tikimybę pažeisti audinius. Ši aplinkybė yra vienas iš metodo *in vitro* privalumų. Mėginys ištiriamas greitai, parenkamas fluorescencijos neslopinantis konservatas ir nesunkiai apsaugoma nuo šviesos įtakos. Ultravioletinė spinduliuotė gyviems organizmams yra pavojinga dėl galimo baltymų ir DNR struktūros pažeidimų, ypač trumpinant bangos ilgį, kuomet labai didėja spinduliuotės kvanto energija.

Suskirsčius tiriamąsias moteris į grupes pagal histologinę diagnozę, didžiausi spektrinių parametrų skirtumai buvo nustatyti žadinant 290 nm ilgio bangomis, t.y. trumpiausiomis bangomis iš visų mūsų taikytų. Naudojant žadinimui šio ilgio bangas, visas grupes galima atskirti didžiausiu statistiniu patikimumu lyginant su analogiškais žadinimų 300 ir 310 nm duomenimis. Sektų išvada, kad taikant ilgesnes žadinimo bangas, tyrimo rezultatai turėtų būti mažiau patikimi. Vis dėlto mūsų tyrimuose taikant žadinimą 355 nm bangomis ir vertinant autofluorescenciją 405-424 nm (elastinas) emisijoje gautas geriausias rezultatas atskiriant HSIL (CIN 2+) nuo IPPNN ($p=0,0003$). Žadinimas ilgesnėmis bangomis yra mažiau pavojingas gyviems audiniams, todėl tokį žadinimą būtų galima taikyti ir žmogui *in vivo*. Tai būtų patogu ir todėl, kad tėvyninis mikrolazeris yra nedidelių matmenų ir nešiojamas, tyrimus būtų galima atlikti prie „pacientės lovos“ arba pirmo apsilankymo pas gydytoją metu. Be to šis lazeris sukurtas ND YAG kristalo pagrindu, todėl jo žadinimo bangos ilgį ateityje galima būtų keisti (galima realizuoti žadinimą taip pat ir 270 nm ilgio ir 532nm bangomis).

Mūsų tyrimuose, žadinant 355 nm bangomis, buvo taikytas Gauso metodas ir atlikta fluorescencijos intensyvumo kreivės aproksimacija Gauso skirstiniais. Skirstiniai iš kiekvieno mėginio buvo grupuojami į 8 kategorijas (komponentus) pagal smailės maksimumo vietą bangų ilgio skalėje: 405-424 nm, 424-445 nm, 445-476 nm, 476-515 nm, 515-650 nm, 650-695 nm, 695-805 nm.

Kadangi kiekvieno mėginio spektrai buvo matuojami 3 taškuose, todėl prieš lyginant abiejų grupių rodiklius buvo apskaičiuojamas rodiklio SPP (santykinis pikų plotas) vidurkis atskirai kiekvienai Gauso kategorijai. SPP – tai kiekvienos kategorijos ploto po

komponento kreive santykis su bendru plotu po visa eksperimentine kreive, t.y. kiekvienos kategorijos plotas dalijamas iš bendro ploto.

Santykiniai pikų plotų rodikliai apskaičiuojami pagal formulę: $SPP_{ik} = \frac{APP_{ik}}{BP_k}$,

kur APP_{ik} – skirstinio kategorijos piko plotas absoliučiais skaičiais,

BP_k – bendras plotas po visa mėginio kreive, t.y. visų Gauso kategorijų komponentų suma.

Pasitaikydavo, kad fluorescencija iš vieno mėginio taško (arba dviejų iš trijų tirtų) būdavo silpna, o triukšmo lygmuo labai didelis. Tokiais atvejais vidurkis būdavo skaičiuojamas iš dviejų (arba vienos) SPP vertės. Jei į vieną kategoriją patekdavo kelios smailės, jų plotai būdavo sudedami.

Žadinant 290 nm, 300 nm ir 310 nm bangomis, dalis smailių buvo labai ištįsusio pavidalo ir labiau atitiko Lorencio modelį (pagal eksperimento duomenis $r^2 > 0,99$), todėl spektro kreivių aproksimacija ir jų analizė buvo atliekama pagal Lorencio pasiūlytą metodą.

Atlikta tiriamosios ir kontrolinės grupės moterų spektrinių tyrimų rodiklių lyginamoji analizė, ieškota skirtumų.

Lyginimui pasirinkti 3 kriterijai:

1. Absoliutūs pikų plotai (APP) kiekvienoje Gauso kategorijoje arba kiekviename Lorencio kreivių integrale.

2. Bendri plotai (BP) po visa išmatuota kreive (mėginio visų kreivių komponentų suma).

3. Daryta prielaida, kad visi mėginiai buvo ruošiami vienodomis sąlygomis ir metodais. Šią prielaidą remia keli kriterijai. Visų pirma, gimdos kaklelio nuograndos Pap tepinėliui buvo imamos standartizuotai, o netinkami mėginiai atmesti. Mėginių spektroskopija taip pat buvo atliekama standartizuotai. Lyginamajai tiriamosios ir kontrolinės grupės moterų duomenų analizei buvo imami tik SPP rodikliai ir taip sumažinama spektrų amplitudės įtaka, nes intensyvumai absoliučiais vienetais smarkiai svyravo.

Tyrimų rezultatų lyginimas pagal apskaičiuotus plotų po kreive santykinis rodiklis atliktas pagal Mann-Whitney, kai patikimumo lygmuo $p=0,05$.

Optinio tyrimo metodo tikslumas vertinamas pagal plotą po ROC kreive (AUC).

290, 300,310 nm sužadavimo autofluorescencijos spektrų vizualizacijai, transformuojant 3D (trijų dimensijų) raišką į plokštumą, naudotas MathCad matematinės analizės paketas.

4.4. Žmogaus papilomos viruso DNR nustymas ir biocheminiai proteominiai supernatanto tyrimai

Biocheminiai proteominiai supernatanto tyrimai ir žmogaus papilomos viruso DNR nustymas buvo atliekama tik hospitalizuotoms moterims, kurioms Pap tepinėlio metodu jau buvo diagnozuota HSIL ir jos nukreiptos arba kreipėsi pačios į stacionarą gimdos kaklelio kolposkopijai ir biosijai arba konizacijai.

Prieš biopsijos (arba konizacijos) procedūrą joms pakartotinai Papette šepetėliu standartiniu būdu buvo imami gimdos kaklelio nuograndų mėginiai, tačiau nuograndos nuskalaujamos ne buferyje, o 0,9 proc. NaCl tirpale be konservantų ir inhibitorių (20 ml). Paruoštas mėginys fiziologiniame tirpale tuoj pat gabenamas į Vilniaus patologijos centrą konteineryje šaldytuve ($+4^{\circ}\text{C}$) ir iki tyrimo laikomas ne aukštesnėje kaip $+4^{\circ}\text{C}$ temperatūroje, stengiantis išvengti baltymų degradacijos.

Metodikos parengimo tikslu, buvo ištirti 34 pacienčių supernatanto mėginiai su standartine konservuojančia terpe. Tačiau terpės pagrindą sudaro alkoholis, kuris denatūruoja baltymą, todėl elektroforetiniame gelyje nustatydavome baltymo p16 šliūžes, o mikrogadelėmis pavyko nustatyti tik foninį švytėjimą. Todėl tolimesniems tyrimams pasirinkta 0,9 proc. NaCl tirpalas be konservantų ir inhibitorių (20 ml).

Gimdos kaklelio biopsinė medžiaga šioms moterims buvo imama ir tiriama pagal aukščiau aprašytą metodiką, baltymas p16INK4a imunohistocheminiu metodu nustatomas biopsinės medžiagos histologiniuose preparatuose, naudojant antikūnų rinkinį histologiniams mėginiams dažyti p16^{INK4a} CINtec[®] (DAKO Cytomation, Glostrup, DK,

Denmark), griežtai prisilaikant standartinių reikalavimų. Tyrimo rezultatai buvo vertinami pagal tą pačią aukščiau aprašytą metodiką.

Gimdos kaklelio nuograndų mėginiai fiziologiniame tirpale Valstybiniame Patologijos centre buvo centrifuguojami +4°C temperatūroje. Ląstelių ir kitų forminių elementų nuosėdos mėgintuvėlio dugne buvo naudojamos pakartotiniam vienasluoksniams Pap tepinėliui paruošti. Tepinėlis buvo dažomas standartiniu Pap metodu ir vertinamas pagal Bethesda 2001 m. klasifikaciją (metodikos aprašymą žr. aukščiau).

Likusi po centrifugavimo skystoji dalis (supernatantas) buvo tiriamas šiuolaikiniais tyrimo metodais. Pirmiausia supernatantas buvo dalijamas į dvi dalis. Viena jo dalis buvo panaudota žmogaus papilomos viruso DNR nustatymui polimerazės grandininės reakcijos (PGR) metodu, kita – baltymo p16INK4a raiškos nustatymui mikrogardelių ir biocheminiais proteominiais metodais.

Visi mėginiai, kurie buvo imti į 0,9 proc. NaCl tirpalą buvo ištiriami per vieną dieną, bandant išvengti baltymų degradacijos.

4.4.1. Žmogaus papilomos viruso DNR nustatymas

Žmogaus papilomos viruso DNR buvo nustatoma naudojant QIAamp MinElute Virus Spin Kit (Qiagen) rinkinį ir automatinį QIAcube (Qiagen) nukleorūgščių išskyrimo aparatą. Išskirta DNR buvo amplifikuojama polimerazės grandininės reakcijos (PGR) metodu, naudojant PCR System 9700 (Applied Biosystems) termociklerį ir HPV4 ACE Screening (Seegene) rinkinį, specifiskai atpažįstantį ŽVP-16 ir ŽPV-18 tipus bei nespecifiškai atpažįstantį aukštos (iš viso 11 tipų) ir žemos rizikos (iš viso 5 tipai) žmogaus papilomos virusų tipus. Susidarę amplifikuoti produktai buvo supilami į 2 proc. agarozės gelį, nudažomi etidžio bromidu ir tiriami transiliuminoriuje, naudojant UV šaltinį.

4.4.2. Mikrogardelių metodas

Tyrimams mikrogardelių ir biocheminiais proteominiais metodais buvo naudojama antroji supernatanto dalis (fiziologinio tirpalo pagrindu). Šis supernatantas buvo dar kartą

centrifuguojamas (11 000 aps/min), tyrimams naudota tik mėgintuvėlio apačioje susikaupusi tirštesnė gleivinga terpė. Viršutinioji skystesnė dalis likdavo nepanaudota.

Visi biocheminiai proteominiai tyrimai buvo atlikti Vilniaus UAB „Biotechpharma“ laboratorijoje ir MA Fizikos Instituto Funkcinių nanomedžiagų skyriuje.

Mokslinėje literatūroje aptinkama daug informacijos apie mikrogardelių (mikrobiolustų) tyrimo metodo panaudojimą įvairiose medicinos srityse. Mums kilo mintis pritaikyti mikrogardelių metodą supernatanto mėginių tyrimams. Jei būtų įrodyta, kad baltymo p16INK4a nustatymas supernatanto mėginiuose mikrogardelių metodu yra patikimas tyrimo būdas, tai ateityje pažangi molekulinio lygmens HSIL diagnostika galėtų būti prieinama kiekvienai moteriai. Gal būtų galima paruošti specialius savityros testus (pvz., panašiai kaip plačiai naudojami nėštumo testai), kad moteris pati pagal instrukcijos reikalavimus galėtų testą atlikti pati. Baltymo p16INK4a žymens atradimas nuoplovų mėginyje labai palengvintų gimdos kaklelio vėžio savalaikę diagnostiką toms moterims, kurios nesilanko ginekologijos kabinetuose ir priskiriamos HSIL rizikos grupei.

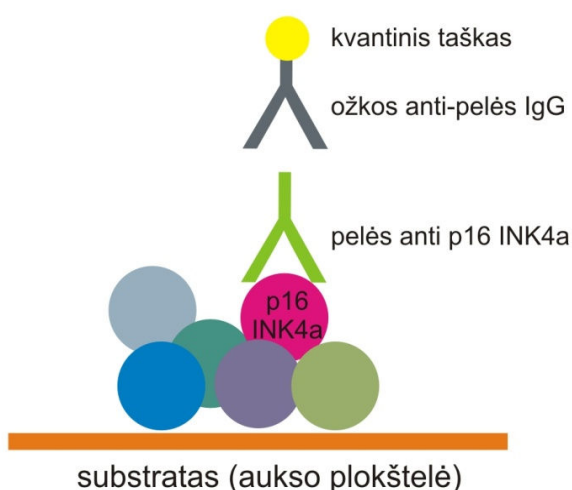
Mikrogardelėms ant aukso paviršiaus pagaminti buvo naudojami kompaktiniai diskai (KODAK, su 24 karatų Au danga), kurie sukarpomi į pageidaujamo dydžio lustus. Viršutinis polimerinis sluoksnis pašalinamas, pamerkiant diską 2-3 minutėms į koncentruotą azoto rūgštį. Po to lustas labai kruopščiai nuplaunamas dejonizuotu vandeniu, išdžiovinamas azoto dujomis ir iš karto naudojamas eksperimentui. Pirmiausia ant švaraus auksinio lusto paviršiaus, naudojant specialų invertuotą polidimetilsiloksaninį (PDMS) mikrospaudą, buvo sukuriamas metoksi(trietilenglikol)undekantioliu mikrorraštas, sudarytas iš taisyklingai išdėstytų 75 μm x 75 μm dydžio kvadratėlių, nutolusių vienas nuo kito per 75 μm. Tiolis akimirksniu sureaguoja su auksu ir tokiu būdu suformuoja baltymams atsparią gardele, o ploteliai, kur anspaudas nesilietė su Au paviršiumi, užpildomi tiolių mišiniu (20 mol proc. Karboksi (heksaetilenglikol) pentadekanetioli (HS-(CH₂)₁₅-EG₆-CO₂H) ir 80 mol proc. hidroksi (trietilenglikol) undekanetioli (HS-(CH₂)₁₁-EG₃-OH)), pamerkiant anspauduotą lustą į mišinio 20 μM tirpalą etanolyje ne trumpiau nei 12 val. Susidariusių ant aukso SSM (savaime susirenkančių monosluoksnių) karboksilinės grupės aktyvuojamos iki *N*-sukcinimido

esterio, lustą 25 minutėms pamerkiant į šviežiai paruoštą *N*-hidroksisukcinimido (NHS) (0,025 M) ir *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N*-etilkarbodiimido (EDC) 0,1 M vandeninį tirpalą.

Po aktyvavimo stadijos toliau sekė baltymų iš pacientės mėginio imobilizavimas ant SSM substrato. Ši procedūra atliekama plastikinėje Petri lėkštelėje. Ant lusto užlašinama apie 200 µl šviežio tiriamojo mėginio (paimto tą pačią dieną), lėkštelė uždengiama ir paliekama kambario temperatūroje 1 val. Tada lustas gausiai nuplaunamas buferiu (pH 7,5). Nesureagavusios esterinės grupės blokuojamos glikol-*mono*-amino tirpalu 30 min. ir vėl nuplaunama. Po to pelės monokloniniu antikūnu (MsmAb, Abcam[®]) atliekama baltymo p16^{INK4a} imunodetekcija.

Pirminio antikūno inkubacija trunka 1 valandą. MsmAb prisijungimas (antigeno-antikūno kompleksas) detektuojamas naudojant kvantinių taškų ir ožkos F(ab')₂ antipelės IgG antrinio antikūno konjugatus (inkubacija trunka 15 min.). Supernatanto baltymų imobilizavimo ant SSM substrato schema pateikiama 11 paveikslėlyje.

Mėginys tiriamas fluorescenciniu mikroskopu (Olympus BX51): fluorescuojantys laukai parodo, kur ir kiek ant lusto paviršiaus yra baltymo p16^{INK4a} (santykinais).



11 pav. Supernatanto baltymų imobilizavimo ant SSM substrato grafinė išraiška

Taigi žymenį p16^{INK4a} atpažįsta pelės anti-p16^{INK4a} antikūnas, o jų sąveika vizualizuojama fluorescenciniu mikroskopu, naudojant kvantiniais taškais žymėtą antipelės imunoglobuliną (angl. *antimouse IgG-quantum dot conjugate*). Kvantiniai taškai yra puslaidininkinės nanodalelės, kurios dėl savo puikios emisijos išeigos ir fotostabilumo vis dažniau naudojamos kaip alternatyva įprastiniams organiniams dažikliams. Mūsų tyrimuose buvo naudojami kvantiniai taškai kurių emisijos maksimumas yra ties 655 m. Pagrindinis nanovaizdinimo tikslas - atskirti patloginį audinį nuo sveiko. Patologijos atpažinimo klausimas turi būti išspręstas dar pirminėje ląstelių mutacijos stadijoje, todėl tarp šiuolaikinių diagnostikos metodų vis plačiau taikomos nanotechnologijos, gebančios vizualizuoti pavienes ląsteles ar net molekulinis pokyčius ne tik *ex vivo* ar *in vitro*, bet ir *in vivo*. Nanotechnologijos suteikia galimybę toliau tobulinti diagnostikos metodus. Vienas iš privalumų – tai didelių informacijos srautų apdorojimas, įgalinantis didelių plotų vaizdinimą (*screening*). Tai galimybė kai iš vieno mėginio galima nustatyti keletą ligų arba vienu metu tiriant daug mėginių patvirtinti vieną diagnozę.

4.4.3. Dvidimensinės elektroforezės ir Western bloto metodas

Baltymų molekulių išskyrimas, jų išrūšiavimas ir kiekybinis įvertinimas mūsų klinikiniuose diagnostiniuose tyrimuose suteikia labai daug informacijos. Būtent todėl baltymų tyrimui mes naudojome elektroforezės ir Western bloto metodus.

Dvidimensinė elektroforezė buvo atliekama pagal Laemmli pasiūlytą metodą (1970). Metodo esmė – baltymų elektroforezinis frakcionavimas poliakrilamidiniame gelyje, kitaip vad. natrio dodecylsulfato - poliakrilamido gelelektroforezė. Sutrumpintai šis tyrimo metodas vadinamas SDS-PAGE (angl. *Sodium Dodecyl Sulphate – Polyacrilamide Gel Electrophoresis*). Naudojant šį metodą, galima frakcionuoti ir lyginti sudėtingus medžiagų mišinius, įvertinti baltymų švarumą ir fizines baltymų charakteristikas, pvz., baltymų molekulinę masę, krūvį, izoelektrinį tašką. Frakcionuoti baltymai vienoje elektroforezinėje sistemoje pagal baltymų izoelektrinį tašką vėliau gali būti skirstomi kitoje elektroforezinėje sistemoje pagal molekulinę masę.

Imunoblotas, kitaip vad. Western blotas, yra vienas iš imunocheminės analizės metodų. Western bloto metodu galima išskirti vieną norimą baltymą iš mišinio, panaudojant specifinį antikūną. Metodas leidžia nustatyti, ar mėginyje yra tiriamojo baltymo ir kiek jo yra tiriamuoju momentu.

Tiriant SDS-PAGE metodu, kiekvienam takeliui poliakrilamido gelyje (PAG) užnešama po 20–25 µl supernatanto. Po to baltymų molekulės denatūruojamos ir joms suteikiamas neigiamas krūvis. Vėliau molekulės gelyje išskirstomos, naudojant elektrinį lauką. Skirtingų rūšių baltymai identifikuojami pagal išsidėstymą skalėje, o jų kiekybiniai rodikliai (koncentracija) nustatomi pernešus baltymus ant nitroceliuliozinės (PVDF) membranos (90 min. baltymai veikiami 0,6-1 A srove). Po elektropernašos, siekiant užblokuoti visą paviršių, membrana 60 minučių plaunama 5 proc. neriebaus pieno miltelių tirpalu fosfatiniame buferyje (PBS, 10 mM). Norint iš mišinio išskirti tiriamą baltymą (mūsų atveju p16INK4a), naudojamas specifinis antikūnas. Ant membranos užpilama pirminio pelės monokloninio antikūno p16^{INK4a} (Abcam), susidaro baltymo p16INK4a ir antikūno p16^{INK4a} pirminis kompleksas. Pirminis kompleksas yra veikiamas antriniu antikūnu, kuris yra prisijungęs fermentą. Fermentas padeda išryškinti visą susidariusį kompleksą. Jei ant membranos būdavo baltymo p16INK4a, 15 kDa regione išryškėdavo kelios (dvi-keturi) juostelės.

Tyrimas SDS-PAGE metodu ir baltymų aptikimas specifiniais antikūnais Western bloto būdu yra tarsi vieno tyrimo metodo du etapai. SDS-PAGE metodu baltymas aptinkamas, o Western bloto technika leidžia aptiktus baltymus identifikuoti ir įvertinti pusiau kiekybiniu būdu.

Western bloto reakcija pastaruosiu metu labai plačiai naudojama medicinoje, nustatant antikūnus prieš virusus, tokius kaip ŽIV, tymų, hepatito B ir C ir kt.

4.5. Statistinė duomenų analizė

Pacientų tyrimo duomenys registruoti statistinėje duomenų bazėje (Microsoft Access), kur įrašytas tiriamojo subjekto identifikacijos kodas, demografiniai duomenys, citologinio tyrimo duomenys, histologinio tyrimo duomenys, optinių ir proteominių

tyrimų rezultatai. Spektrinio tyrimo duomenys kaupiti spektroskopinių tyrimų duomenų bazėje, kurioje greta spektro duomenų įrašytas tik pacientų identifikacijos kodas. Naudojant įrašų jungimo procedūras buvo paruošti duomenys statistinei lyginamajai tiriamųjų ir kontrolinės grupės moterų duomenų analizei.

Taikant vienaveiksnės ir daugiaveiksnės logistinės sąlyginės regresijos metodą, galėjome nustatyti, kurie požymiai labiausiai susiję su gimdos kaklelio ryškių intraepitelinių pakitimų rizika.

Santykinis ryšys tarp rizikos faktoriaus veikimo ir tiriamos patologijos buvo apskaičiuojamas kiekvienam analizuojamam požymiui pagal šansų santykio rodiklius (*OR-odds ratio*) ir jų 95 proc. pasikliautuosius intervalus.

Statistinio rodiklio *p* reikšmės vertintos taip: $p < 0,05$ - statistiškai reikšminga; $p < 0,01$ - labai reikšminga; $p < 0,001$ - ypač reikšminga; $p > 0,05$ - statistikai nereikšminga.

Apdorojant tyrimo rezultatus statistiškai, buvo apskaičiuota kiekvieno tyrimo metodo jautrumas, specifiškumas, teigiama ir neigiama prognozinės vertės, spektrų metodo tikslumas, vertintas ROC (angl. *Receiver operator characteristic curves*) kreivės apibrėžtas grafinis plotas.

Jautrumas - rodiklis, apibūdinantis diagnostikos metodo *tikslumą* ir rodantis tikimybę, kad sergančio žmogaus tyrimo duomenys patvirtina ligą.

Specifiškumas - rodiklis, apibūdinantis diagnostikos metodo *tikslumą* ir rodantis tikimybę, kad sveiko žmogaus tyrimo duomenys patvirtina, jog jis yra tikrai sveikas.

Prognozinė teigiamo testo vertė - tikimybė, kad žmogus serga, jei diagnostinis metodas yra teigiamas. Tai sergančių asmenų, kurių testas yra teigiamas, ir visų tirtų asmenų, kurių testas yra teigiamas, *santykis*.

Prognozinė neigiamo testo vertė - tikimybė, kad žmogus sveikas, jei diagnostinis testas yra neigiamas. Tai sveikų asmenų, kurių testas yra neigiamas ir visų tirtų asmenų, kurių testas neigiamas, *santykis*.

Prognozinės ROC kreivės parodo bet kurio tyrimo metodo tikslumą ir jo vertę. Diagnostinio tyrimo metodo tikslumas vertinamas pagal plotą po ROC kreive: metodo

tikslumas vertinamas kaip labai geras, jei plotas 0,90-1,0, geras - 0,80-0,90, vidutiniškas – 0,70-0,80, mažai tikslus–0,60-0,70 ir netikslus – 0,50 -0,60.

5. TYRIMO REZULTATAI

5.1. Pirmosios anketinės apklausos rezultatai

Pirmoji anketinė moterų apklausa buvo atlikta 2006 m. kovo-gegužės mėnesiais dar prieš pradėdant klinikinius tyrimus. Apklausos tikslas - išaiškinti moterų lankymosi pas ginekologus dažnį, jų žinias apie Lietuvoje vykdomą gimdos kaklelio patikros programą, taip pat žinias apie ŽPV, kaip pagrindinį gimdos kaklelio vėžio rizikos faktorių. Iš viso apklausėme 1825 moteris. Kadangi mus ypač domino moterys, kurios pagal amžių turėtų patekti į gimdos kaklelio patikros kontingentą, visos anketos, kuriose nebuvo nurodytas moters amžius, buvo eliminuotos. Taigi išsamiai analizei tiko 1797 anketos, kuriose buvo atsakymas į klausimą apie respondentės amžių. Šių anketų atsakymų išsamumas į kitus klausimus siekė 98-99 proc. Klausimyno tinkamumas buvo tikrinamas pagal tris klausimus: ar girdėjo apie prevencijos programą, ar žino apie ŽPV, ar žino apie onkogeninius ŽPV tipus. Anketos tinkamumo koeficientas (Cronbach alfa) pagal šiuos klausimus - 0,689. Skaičiavimai buvo atlikti naudojant programas STATA ir SPSS. Bendras respondenčių amžiaus vidurkis – 32 metai (95 proc. PI 31,5-32,6). Didžioji respondenčių dalis buvo moterys nuo 30 iki 60 metų, jos sudarė beveik pusę mūsų apklaustų moterų (48,6 proc.). Apklaustųjų pasiskirstymas pagal amžių pateikiamas 2 lentelėje.

2 lentelė. Moterų pasiskirstymas pagal amžių

Amžius	N	Proc.
< 25 m.	762	42,4
25-29 m.	162	9,0
30-60 m.	873	48,6
Iš viso	1797	100,0

Net 1018 respondenčių (56,6 proc.) buvo susijusios su medicina, t.y. jos arba studijavo medicinos mokslus, arba dirbo medicinos srityje, ir tik 779 respondentės (43,4 proc.) su medicina jokių ryšių neturėjo. Ši aplinkybė galėjo turėti įtakos moterų žinioms apie patikros programą ir ŽPV, taigi ir atsakymams į anketos klausimus. Ir iš tikrųjų, - net devynios moterys iš dešimties (89,96 proc.), susijusios su medicina, žinojo apie gimdos

kaklelio patikros programą, tuo tarpu kai nesusijusios su medicina moterys apie patikros programą iš dešimties žinojo tik 7-8 (76,38 proc.; $p < 0,05$).

Nebaigtą aukštąjį išsilavinimą turėjo didžioji mūsų apklaustų moterų dalis, jos sudarė 60,3 proc. visų apklaustųjų (lentelė 3).

3 lentelė. Moterų pasiskirstymas pagal išsilavinimą

Išsilavinimas	N	Proc.
Aukštasis	280	15,6
Nebaigtas aukštasis	1084	60,3
Vidurinis	202	11,2
Pagrindinis	156	8,7
Neatsakė į klausimą	75	4,2
Iš viso	1797	100,0

Iš visų 1797 apklaustųjų moterų apie Lietuvoje vykdomą gimdos kaklelio patikros programą žinojo 1508 respondentės (83,9 proc.). Įdomu tai, kad moterų žinios nepriklausė nuo išsilavinimo (4 lentelė). Tiek aukštąjį, tiek žemesnįjį išsilavinimą turinčių moterų žinių rodikliai buvo beveik vienodi (atitinkamai žinojo 84,8 ir 85,7 proc.), vidutinių rodiklių skirtumas statistiškai nepatikimas ($p = 0,53$).

4 lentelė. Moterų išsilavinimo ir žinių apie gimdos kaklelio vėžio patikros programą tarpusavio ryšys

Išsilavinimas	Žinojo apie programą				p (pagal Chi-Square testą)
	Taip	Proc.	Ne	Proc.	
Aukštasis	240	86,0	39	14,0	> 0,05
Nebaigtas aukštasis	907	83,7	176	16,3	
Vidurinis	166	83,0	34	17,0	
Pagrindinis	138	88,5	18	11,5	
Neatsakė į klausimą 346 moterys	-	-	-	-	

Mes tyrėme, koks egzistuoja ryšys tarp moterų žinių apie ŽPV ir informuotumo apie patikros programą. Buvo galima tikėtis, kad besidominčios gimdos kaklelio vėžio rizikos

veiksniais moterys labiau domisi ir GKV prevencijos priemonėmis, t.y. gimdos kaklelio vėžio patikros programa. Mūsų tyrimų duomenys pateikiami 5 lentelėje.

5 lentelė. Moterų žinių apie ŽPV ir gimdos kaklelio patikros programą tarpusavio ryšys

Žinojo apie ŽPV	Žinojo apie patikros programą				p (pagal Chi-Square testą)
	Taip	Proc.	Ne	Proc.	
Taip	1081	90,4	115	9,6	< 0,000
Ne	413	71,6	164	28,4	
Neatsakė į klausimą 303 moterys	-	-	-	-	

Lentelėje pateikti duomenys rodo, kad mūsų prognozės pasitvirtino. Moterys, kurios žinojo apie ŽPV, daugiau žinojo ir apie patikros programą ($p=0,000$). Tik 9,6 proc. respondenčių, žinojusių apie žmogaus papilomos virusą kaip GKV rizikos veiksnį, nežinojo apie Lietuvoje vykdomą patikros programą.

Visai kitokie rodikliai yra tais atvejais, kai moterys nieko nežinojo apie virusą, - beveik kas trečia iš jų (28,4 proc.) nieko nežinojo ir apie patikros programą.

Kitas mus dominantis klausimas buvo išaiškinti, ar turima informacija apie gimdos kaklelio patikros programą skatina moteris apsilankyti pas gydytoją ginekologą. Taigi mes ieškojome ryšio tarp moterų žinių apie programą ir jų lankymosi pas ginekologus dažnio.

Beveik pusė apklaustųjų - 882 moterys (49,1 proc.) atsakė, kad lankosi pas gydytojus ginekologus reguliariai. Iš jų 90,9 proc. žinojo apie patikros programą, ir tik 9,1 proc. moterų apie patikros programą nieko nebuvo girdėjusios ($p=0,000$). Šie mūsų tyrimų duomenys patvirtina, kad informacija apie gimdos kaklelio patikros programą moterims yra svarbus skatinamasis veiksnys profilaktiškai patikrinti ginekologijos kabinetuose, o profilaktiniai patikrinimai yra geriausia GKV prevencijos bei ankstyvos gimdos kaklelio patologijos diagnostikos priemonė. Tai turėtų nepamiršti visų prevencinių programų organizatoriai. Vis dėlto tarp nesilankančių pas gydytojus moterų 3 iš keturių (77,7 proc.) taip pat žinojo apie Lietuvoje vykdomą gimdos kaklelio patikros programą (6 lentelė).

6 lentelė. Moterų žinių apie patikros programą ir lankymosi dažnio pas ginekologą ryšys

Žinojo apie programą	Lankosi pas ginekologą				p (pagal Chi-Square testą)
	Reguliariai		Nereguliariai/Nesilanko		
	N	Proc.	N	Proc.	
Taip	802	90,9	706	77,7	< 0,000
Ne	80	9,1	202	22,3	
Neatsakė į klausimą 7 moterys	-	-	-	-	

Iš visų 1797 apklaustųjų, tiek žinančių apie patikros programą, tiek nežinančių, 908 moterys (50,5 proc.) pas ginekologą lankydavosi tik tuomet, kai turėdavo nusiskundimų, arba nesilankydavo visiškai (atitinkamai 39,7 ir 10,8 proc.).

Dar vienas mus dominantis klausimas buvo išaiškinti, kokią įtaką moterų požiūriui į profilaktinius patikrinimus turi jų išsilavinimas. Tyrimų duomenys pateikiami 7 lentelėje.

7 lentelė. Moterų išsilavinimo ir lankymosi dažnio pas gydytojus ryšys

Išsilavinimas	N	Lankosi pas gydytoją akušerį ginekologą				p (pagal Chi-Square testą)
		reguliariai		nereguliariai/nesilanko		
		N	Proc.	N	Proc.	
Aukštasis	279	155	55,6	124	44,4	<0,000
Nebaigtas aukštasis	1083	480	44,3	603	55,7	
Vidurinis	202	102	50,5	100	49,5	
Pagrindinis	156	110	70,5	46	29,5	
Neatsakė į klausimą	77	-	-	-		

Pastaba: Procentai apskaičiuoti pagal moterų, turinčių tokį patį išsilavinimą, kiekybinius rodiklius.

Pagal mūsų apklausos duomenis, turinčios vidurinį arba pagrindinį išsilavinimą moterys pas gydytoją akušerį ginekologą reguliariai tikrinosi dažniau nei turinčios aukštąjį arba nebaigtą aukštąjį (p <0,000).

Net 44,4 proc. moterų, turinčių aukštąjį išsilavinimą ir 55,7 proc. turinčių nebaigtą aukštąjį teigė, kad pas gydytoją akušerį ginekologą visiškai nesilanko arba lankosi tik atsiradus nusiskundimų, tuo tarpu kai dauguma pagrindinio išsilavinimo moterų (70,5 proc.) pas gydytoją lankydavosi reguliariai.

Apklausiamos moterys buvo prašomos pareikšti savo nuomonę dėl tyrimo Pap tepinėlio metodu. Į klausimą, kada reikėtų pirmą kartą atlikti tyrimą Pap tepinėlio metodu, 983 moterys (54,7 proc.) atsakė, kad tai padaryti reikėtų po metų nuo lytinių santykių pradžios. Tarp šių moterų 589 respondentės (57,86 proc.) buvo susijusios su medicina ir 394 (50,58 proc.) su medicina nesusijusios.

Į klausimą, kada reikia pakartoti Pap tepinėlio tyrimą, jei pirmuoju tyrimu praeityje patologinių pokyčių nebuvo aptikta, 1036 respondentės (57,65 proc.) atsakė, kad tepinėlį pakartoti reikia po vienerių metų. Pagal atsakymą į šį klausimą taip pat pirmavo medikės, - taip teigė 609 su medicina susijusios respondentės (59,82 proc.). Tarp nesusijusių su medicina respondenčių analogiškos nuomonės buvo 54,81 proc. (427 moterys).

Žmogaus papildomos virusą kaip pagrindinį gimdos kaklelio vėžio rizikos faktorių įvardijo 833 apklaustos moterys (46,7 proc.), iš jų 547 buvo medikės (53,73 proc.). Nesusijusių su medicina moterų buvo 286 (36,71 proc.). Rodiklių skirtumas statistiškai patikimas, $p < 0,05$. 1572 repondentės (87,5 proc.) žinojo, kad ŽPV yra lytiniu keliu perduodama infekcija.

Kai moterys žinojo, kad ŽPV yra viena iš pagrindinių gimdos kaklelio vėžio priežasčių, mums rūpėjo išaiškinti, ar jų turima informacija skatina jas plačiau domėtis ŽPV tipais ir skiepais nuo ŽPV, dažniau apsilankyti ginekologijos kabinetuose, taip pat dalyvauti GKV patikros programoje. Apklaustas moteris mes santykinai suskirstėme į dvi grupes. Viena grupę sudarė moterys, kurios iki apklausos turėjo informacijos apie ŽPV, kitą – nieko nežinančios respondentės. Abiejų grupių moterų apklausos rodikliai buvo lyginami tarpusavyje.

Moterys, kurios žinojo, kad ŽPV yra gimdos kaklelio vėžio rizikos veiksnys, turėjo daugiau informacijos ir apie Lietuvoje vykdomą gimdos kaklelio patikros programą, vis

dėlto jų informuotumas apie ŽPV neturėjo įtakos reguliariam lankymuisi pas ginekologą (ŠS = 0,95; 95 proc. PI 0,79–1,67).

Abiejų grupių moterų amžius taip pat neturėjo įtakos pasitikrinimų dažniui (8 lentelė).

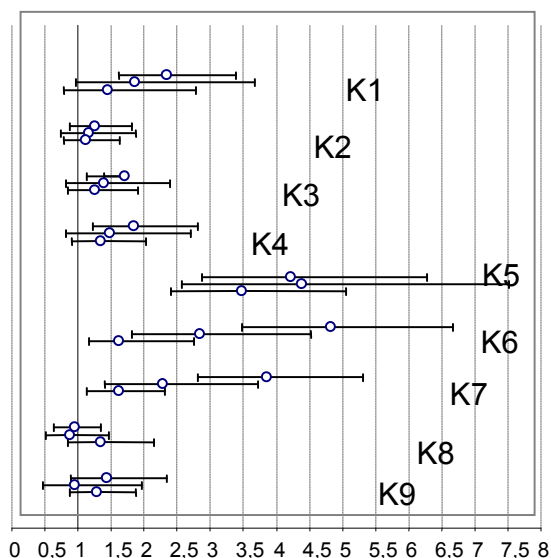
8 lentelė. Moterų informuotumo apie ŽPV įtaka profilaktinių pasitikrinimų dažniui ir pageidavimui pasiskiepyti

Klausimas	Atsakymas	Žinios apie ŽPV		Šansų santykis
		Žino	Nežino	
Ar girdėjote apie GKV patikros programą?	Taip	724	97	1,79 (1,36–2,36)
	Ne	757	182	
K2. Ar lankotės pas gydytoją akušerį ginekologą reguliariai?	Taip	403	340	0,95 (0,78–1,67)
	Ne	459	369	
K3. Ar atlikote Pap po 1 metų nuo lytinio gyvenimo pradžios?	Taip	688	133	1,50 (1,17–1,93)
	Ne	719	209	
K4. Ar atliekate Pap tepinėlio tyrimus kas 3 metai?	Taip	186	586	1,5 (1,18–1,95)
	Ne	147	703	
K5. Ar žinote apie onkogeninius ŽPV tipus?	Taip	703	147	3,78 (2,99–4,76)
	Ne	456	360	
K6. Ar žinote, kad ŽPV sukelia lyties organų karpas?	Taip	486	332	2,75 (2,26–3,36)
	Ne	326	613	
K7. Ar girdėjote apie ŽPV vakciną?	Taip	597	217	2,46 (1,99–3,02)
	Ne	495	442	
K8. Ar norėtumėte pasiskiepyti šia vakcina?	Taip	156	667	1,05 (0,87–1,34)
	Ne	172	770	
K9. Ar norėtumėte pasiskiepyti, jei išlaidas kompensuotų valstybė?	Taip	705	113	1,36 (1,04–1,78)
	Ne	773	169	

Lentelėje pateikti duomenys rodo, kad žinančios apie ŽPV moterys atlieka Pap tepinėlio tyrimus po metų nuo pirmųjų lytinių santykių (ŠS = 1,50; 95 proc. PI 1,17–1,93), yra linkusios reguliariai pasitikrinti pas gydytoją akušerį ginekologą (ŠS = 0,95; 95 proc. PI

0,78–1,67), jos daugiau žino ir apie onkogeninius ŽPV tipus (ŠS = 3,78; 95 proc. PI 2,99–4,76), o tai, matyt, skatina domėtis ir vakcinomis nuo ŽPV (ŠS = 2,46; 95 proc. PI 1,99–3,02). Vis dėlto pasiskiepyti nuo ŽPV moterys pageidautų, jei išlaidos būtų kompensuojamos valstybės (ŠS = 1,36; 95 proc. PI 1,04–1,78).

12 paveikslėlyje grafiškai pavaizduotas moterų amžiaus rodiklių ryšys su atsakymais į anketos klausimus (pagal ŠS ir pasikliautinius 95 proc. intervalus). Respondentės buvo suskirstytos pagal amžių į tris grupes: pirmoji grupė – moterys iki 25 metų, antroji – 25-29 metai ir trečioji – 30-60 metų.

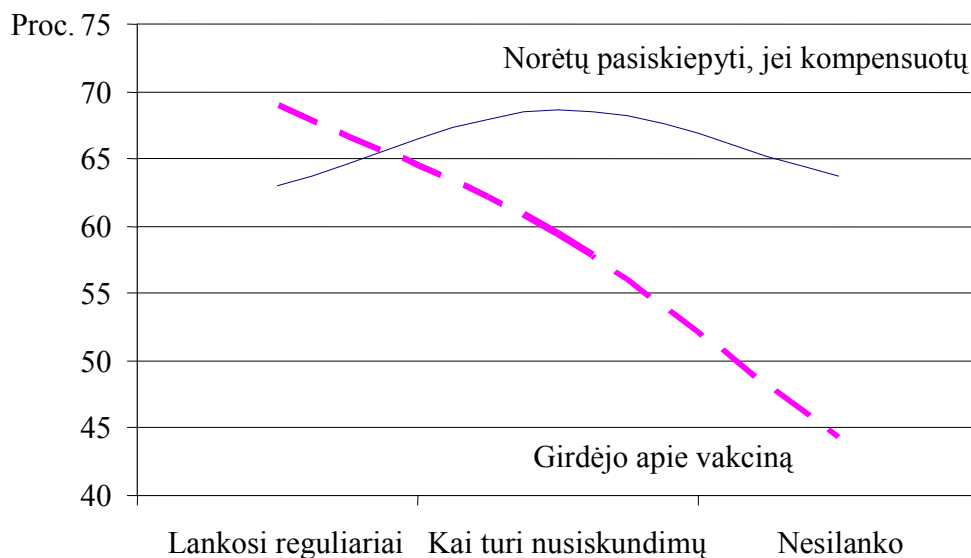


12 pav. Moterų amžiaus ir atsakymų į anketos klausimus tarpusavio ryšys pagal ŠS ir 95 proc. PI rodiklius (žemiausia linija – moterys iki 25 metų, vidurinė – 25-29 metų, viršutinė – 30-60 metų. K raide pažymėtas klausimo numeris, nurodytas lentelėje 8)

Grafike pateikti duomenys rodo, kad jaunesnių ir vyresnių moterų atsakymai ryškesnių skirtumų turi dažniausiai tik atsakant į 6-tą ir 7-tą klausimus (K6 ir K7). Tai klausimai apie onkogeninius ŽPV tipus ir lyties organų karpas. Jaunesnės respondentės labiau susipažinusios su naujausiomis žiniomis apie gimdos kaklelio vėžio rizikos veiksnius (ŠS = 4,82; 95 proc. PI 3,48–6,67). Informuotumo skirtumai tarp jaunų (iki 25 m.) ir vyresnių

moterų (30-60 m.), patenkančių į valstybinę gimdos kaklelio patikros programą, rodytų, kad visuomenės švietimas apie gimdos kaklelio vežio rizikos veiksnius prevencijos programoje yra nepakankamas.

Netikėtumas buvo tai, kad nesilankančios pas ginekologus moterys (>70 proc.) pageidavo pasiskiepyti nuo ŽPV. Tai rodo, kad dalis moterų, matyt, pervertina vakcinų reikšmę ir neįvertina reguliaraus tikrinimosi reikšmės kaip gimdos kaklelio piktybinio naviko profilaktikos priemonės (13 pav.).



13 pav. Moterų žinių apie vakcinas ir pageidavimo pasiskiepyti nuo ŽPV duomenų grafinė išraiška, atsižvelgiant į lankymosi pas ginekologą dažnio rodiklius.

5.2. Antroji anketinė apklausa

Antrą kartą anketiniu būdu moterys buvo apklaustos 2007-2008 metais. Anketa buvo sudaryta iš 42 klausimų (žiūr. Priedai). Iš viso apklaustos 459 moterys.

Analizei buvo atrinktos tik visiškai užpildytos anketos. Statistiniam duomenų apdorojimui 8 anketos buvo netinkamos, 451 anketa apdorojimui tinkama. Anketos analizuojamos poruotu pagal amžių atvejo-kontrolės tyrimu. Kiekvienam tiriamosios grupės individui parinkti analogiški pagal amžių individai iš kontrolinės grupės santykiu

1:4. Tai reiškia, kad kiekvienos moters rodikliai iš tiriamosios grupės buvo lyginami su analogiško amžiaus (± 3 metai imtinai) keturių kontrolinės grupės moterų rodikliais.

Anketinės apklausos duomenys apdoroti statistiškai vienaveiksnių sąlyginės logistinės regresinės analizės metodu. Ieškojome ryšio tarp įvairių rodiklių (9 lentelė).

9 lentelė. Antrosios anketinės moterų apklausos duomenys (absoliutiniai skaičiai, ŠS, 95 proc. PI ir p rodikliai)

Tiriamasis rodiklis	Tiriamoji grupė N=57	Kontrolinė grupė N=228	ŠS	95 proc. PI	p
Gyvenamoji vieta:					
miestas	42	202	1	1,36-6,02	0,005
kaimas, kaimo gyvenvietė	15	26	2,87		
Išsilavinimas:					
pradinis-spec.vidurinis	27	57	1	0,21-0,70	0,002
nebaigtas aukštasis, aukštasis	30	171	0,39		
Lytinio gyvenimo pradžia nuo 18 m.					
Taip	17	48	1,61	0,83-3,13	0,158
Ne	40	180	1		
Lytinių partnerių skaičius					
1	29	110	1	0,36-1,44	0,354
2-3	15	79	0,72	0,59-2,76	0,537
>3	13	39	1,27		
Vartoja geriamus kontraceptikus					
Taip	11	44	1	0,47-2,14	1,000
Ne	46	184	1		
Gimdos kaklelis anksčiau gydytas					
Taip	6	64	1	1,34-7,94	0,009
Ne	51	164	3,26		
Dalyvavo GK programoje					
Taip	14	66	1	0,63-2,51	0,499
Ne	43	162	1,27		
Skiepijosi nuo gripo					
Taip	2	54	1	2,03-36,63	0,003
Ne	55	174	8,63		
Vartoja imunitetą stiprinančius vaistus					
Taip	26	141	1	1,07-3,45	0,029
Ne	31	87	1,92		
Buvo svarbus įvykis					
Taip	35	112	1,74	0,93-3,25	0,080
Ne	22	116	1		
Dažnai serga peršalimo ligomis					
Taip	14	52	1,10	0,56-2,18	0,777
Ne	43	176	1		
Rūkymas					
Taip (rūko, rūkė)	17	67	1,02	0,55-1,90	0,949
Ne (nerūko)	40	161	1		
Stresas					
Taip	36	125	1,41	0,77-2,56	0,258
Ne	21	103	1		

Mėnesinių pradžia					
≤ 14 m.	35	172	1	1,04-3,65	0,037
>14 m.	22	56	1,94		
Gimdymų skaičius					
0	16	66	1	0,59-3,03	0,486
1	19	59	1,33	0,39-1,94	0,728
>1	22	103	0,87		
Psichofiziniai veiksniai darbe					
Taip	45	193	0,69	0,34-1,41	0,309
Ne	12	35	1		
Šeimos nariai sirgo vėžiu					
Taip	15	60	1	0,50-1,97	1,000
Ne	42	168	1		
Rūko šeimos nariai					
Taip	16	51	1,35	0,70-2,60	0,366
Ne	41	177	1		
Miega gerai					
Taip	46	170	1	0,34-1,44	0,338
Ne	11	58	0,70		
Gydyta nuo vėžio					
Taip	3	4	3,00	0,67-13,40	0,150
Ne	54	224	1		
Pirmojo gimdymo amžius					
≤ 23 m.	40	148	1		
24-26 m.	7	51	0,52	0,22-1,23	0,139
≥27 m.	10	29	1,26	0,55-2,90	0,577
Persileidimai					
Buvo	6	33	0,69	0,27-1,75	0,436
Nebuvo	51	195	1		
Abortų skaičius					
0	40	157	1		
1	12	39	1,16	0,57-2,39	0,681
>1	5	32	0,61	0,22-1,70	0,345

Remiantis mūsų tyrimų rezultatais, galima teigti, kad moterims susirgti HSIL turi įtakos labai daug veiksnių. Tai gyvenimas kaimo sąlygomis (ŠS = 2,87; 95 proc. PI 1,36-6,02; p=0,005), anksčiau negydytas gimdos kaklelis (ŠS = 3,26; 95 proc. PI 1,34-7,94; p=0,009), nesiskiepijimas nuo gripo (ŠS = 8,63; 95 proc. PI 2,03-36,63; p=0,003), prasidėjusios vėlesniame paauglystės amžiuje (po 14 metų) mėnesinės (ŠS = 1,94; 95 proc. PI 1,04-3,65; p=0,037), niekada vaistais nestiprintas imunitetas (ŠS = 1,92; 95 proc. PI 1,07-3,45; p=0,029) ir kt. Labiau išsilavinusioms moterims (turinčioms aukštąjį arba nebaigtą aukštąjį išsilavinimą) galimybė susirgti HSIL yra mažesnė (ŠS = 0,39; 95 proc. PI 0,21-0,70; p=0,002).

Tyrimų rezultatai taip pat buvo apdoroti ir daugiaveiksnės sąlyginės logistinės regresinės analizės metodu. Buvo vertinamas tarpusavio ryšys tarp įvairių rodiklių: gimdos kaklelio

ryškių intraepitelinių pakitimų, gyvenamosios vietos, išsilavinimo, lytinio gyvenimo pradžios, lytinių partnerių kaitos, geriamųjų kontraceptikų vartojimo, ankstesnės gimdos kaklelio patologijos gydymo, dalyvavimo gimdos kaklelio patikros programoje, skiepijimosi nuo gripo, imunitetą stiprinančių vaistų vartojimo, buvusių svarbių gyvenimo įvykių, streso, peršalimo ligų, rūkymo ir kt. (10 lentelė).

Kai kurie rodikliai, tokie kaip psichofiziniai veiksniai darbe, šeimos narių sirgimas vėžiu, gimdymų skaičius ir mėnesinių pradžia amžius, bendram modeliui buvo nereikšmingi, todėl buvo eliminuoti.

10 lentelė. Daugiaveiksnių sąlyginės logistinės regresijos analizės šansų santykių, 95 proc. pasikliautinių intervalų ir p rodikliai

Tiriamasis rodiklis	ŠS ^a	95 proc. PI	p
Gyvenamoji vieta:			
Miestas	1		
Kaimas, gyvenvietė	2,84	1,13-7,18	0,027
Išsilavinimas:			
Pradinis-spec.vidurinis	1		
Nebaigtas aukštasis, aukštasis	0,35	0,16-0,76	0,008
Lytinio gyvenimo pradžia nuo 18 m.			
Taip	1,87		
Ne	1	0,82-4,28	0,137
Lytinių partnerių skaičius			
1	1		
2-3	0,65	0,26-1,60	0,350
>3	1,95	0,72-5,30	0,190
Gimdos kaklelis anksčiau gydytas			
Taip	1		
Ne	3,41	1,20-9,67	0,021
Dalyvavo GK programoje			
Taip	1		
Ne	1,69	0,66-4,36	0,276
Skiepijosi nuo gripo			
Taip	1		
Ne	11,32	2,23-57,51	0,003
Vartoja imunitetą stiprinančius vaistus			
Taip	1		
Ne	1,80	0,87-3,72	0,115
Buvo svarbus įvykis			
Taip	2,00		
Ne	1	0,86-4,61	0,105
Rūkymas			

Taip (rūko, rūkė) Ne(nerūko)	0,78 1	0,33-1,81	0,558
Stresas Taip Ne	1,31 1	0,61-2,80	0,481
Miega gerai Taip Ne	1 0,44	0,16-1,18	0,103
Abortų skaičius 0 1 >1	1 0,69 0,45	0,27-1,75 0,14-1,48	0,442 0,189
Gydyta nuo vėžio Taip Ne	2,35 1	0,32-17,39	0,404
Psichofiziniai veiksniai darbe Taip Ne	0,81 1	0,34-1,90	0,623

Lentelėje pateikti duomenys rodo, kad egzistuoja statistiškai reikšmingas ryšys tarp ryškių intraepitelinių gimdos kaklelio pakitimų ir išsilavinimo, gyvenamosios vietos, ankstesnės gimdos kaklelio patologijos, skiepijimosi nuo gripo rodiklių.

Mažesnė tikimybė susirgti HSIL yra aukštesnio išsilavinimo moterims (nebaigtas aukštasis arba aukštasis išsilavinimas) nei analogiškai turinčioms žemesnį išsilavinimą ($\check{S}S=0,35$; 95 proc. PI 0,16-0,76; $p=0,008$). Moterys, kurioms praeityje nebuvo gydytas gimdos kaklelis turi didesnę riziką susirgti HSIL ($\check{S}S=3,41$; 95 proc. PI 1,20-9,67; $p=0,021$). Gyvenančios kaimo sąlygomis moterys turi beveik 3 kartus didesnę tikimybę susirgti HSIL nei gyvenančios miesto sąlygomis ($\check{S}S=2,84$; 95 proc. PI 1,13-7,18; $p=0,027$). Ir net 11 kartų didesnė galimybė susirgti HSIL yra moterims, kurios nė karto nesiskiepijo nuo gripo, lyginant su analogiškais pasiskiepijusių rodikliais ($\check{S}S=11,32$; 95 proc. PI 2,23-57,51; $p=0,003$).

Kitų tirtų veiksnių ryšys su gimdos kaklelio patologijos tikimybe statistiškai nebuvo reikšmingas.

Apklauso duomenų analizė rodo, kad kai kuriais atvejais gydytojas ginekologas gali stipriai sumažinti gimdos kaklelio vėžio rizikos veiksnius. Pirmiausia tai liečia HSIL rizikos veiksnių, kuris įvardijamas kaip anksčiau negydytas gimdos kaklelis. Tai galėtų

būti siejama su Pap tepinėliu mažu tikslumu ir dėl to jai laiku nebuvo diagnozuota gimdos kaklelio patologija. Taip pat moteris niekada anksčiau neatliko Pap tepinėlio, todėl nebuvo diagnozuota patologija. Kodėl ji neatliko Pap gali būti vėl dvi priežastys: jos neinformavo gydytojai (žinių stoka) arba ji sąmoningai vengė lankytis pas gydytojus ginekologus.

5.3. Laboratoriniai tyrimai

5.3.1. Gimdos kaklelio nuograndų citologinių tyrimų rezultatai

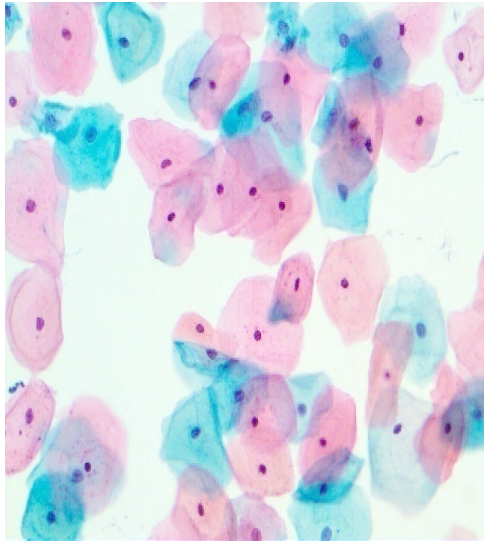
Visoms apklaustoms moterims buvo paimtos gimdos kaklelio nuograndos į skystą standartinę buferinę terpę (GynoPrep ir PapSpin), kurios iširtos vienasluoksniu citologinio Pap tepinėlio metodu.

Iš viso iširti 459 nuograndų citologiniai tepinėliai. Trims moterims iš keturių (73,4 proc.) citologinio tyrimo atsakymas buvo palankus, - intraepitelinių pakitimų arba piktybinio naviko joms nebuvo aptikta (diagnozė: IPPNN). Maždaug kas penkta moteris (18,8 proc.) turėjo įvairaus laipsnio intraepitelinių pokyčių, o 3,7 proc. tepinėlių citologiniam vertinimui buvo netinkami. Tirtų moterų pasiskirstymas pagal citologinio tyrimo rezultatus pateikiamas 11 lentelėje.

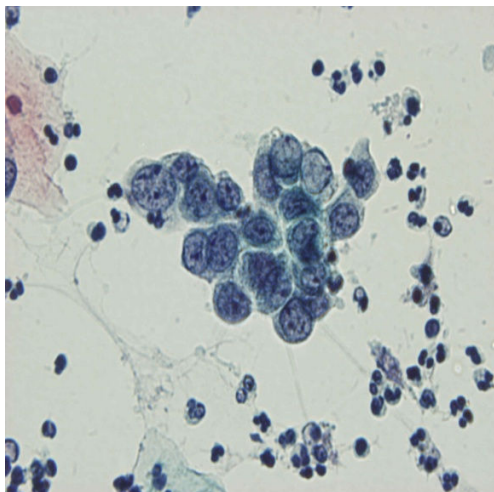
11 lentelė. Tirtų moterų pasiskirstymas pagal citologinių tepinėlių metodu diagnozuotą gimdos kaklelio patologiją

Diagnozė	N	Procentai
ASCUS	18	3,9
HSIL	69	15,0
LSIL	18	3,9
IPPNN	337	73,4
Netinkami vertinimui	17	3,7
Iš viso	459	100,0

Žemiau pateikiame dvi vienasluoksniu Pap tepinėlio mikroskopinio vaizdo nuotraukas. Vienoje iš jų (14 pav.) matyti sveikos moters vienasluoksniu citologinio tepinėlio mikroskopinis vaizdas, kitoje (15 pav.) – HSIL pakitimai.



14 pav. Sveikos moters vienasluoksniu citologinio tepinėlio mikroskopinis vaizdas. (Papanicolaou dažymo metodas, padidinimas x 40). Matyti egzocervikinės gimdos kaklelio srities plokščiojo epitelio ląstelės, smulkus ląstelių branduolys ir poligonalinės formos acidofilinės ir bazofilinės ląstelės.



15 pav. Sergančios HSIL moters vienasluoksniu citologinio tepinėlio mikroskopinis vaizdas. (Papanicolaou dažymo metodas, padidinimas x 40). Matyti ryškūs intraepiteliniai plokščialąsteliniai pakitimai uždegiminio eksudato fone, atipinių displazinių ląstelių kompleksas, stambūs polimorfiški branduoliai, mažas branduolio ir citoplazmos santykis, išsibarstę neutrofiliniai leukocitai.

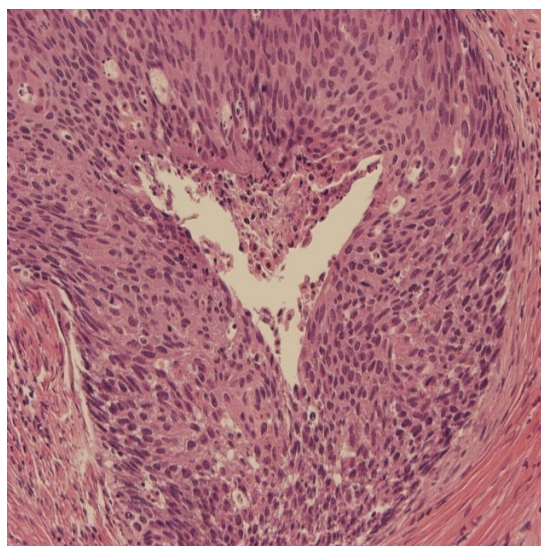
5.3.2. Gimdos kaklelio biopsinės medžiagos histologinių tyrimų rezultatai

Gimdos kaklelio biopsijos arba konizacijos procedūra buvo atlikta 107 moterims. Ištyrus histologinius preparatus, net 74 pacientėms (69,2 proc.) buvo diagnozuota CIN2+. Moterų pasiskirstymas pagal histologinių tyrimų diagnozę pateikiamas 12 lentelėje.

12 lentelė. Tirtų moterų pasiskirstymas pagal gimdos kaklelio biopsinės medžiagos histologinių tyrimų rezultatus

Histologinio tyrimo atsakymas	N	Procentai
Be pakeitimų	2	1,9
Cervicitas	24	22,4
CIN1	7	6,5
CIN2 ir daugiau	74	69,2
Iš viso	107	100,0

Pateikiame sergančios CIN3 moters gimdos kaklelio biopsinės medžiagos histologinio preparato mikroskopinio vaizdo nuotrauką (16 pav.).



16 pav. CIN3 plitimo endocervikine liauka mikroskopinis vaizdas (Hematoksilino eozino dažymo metodas, padidinimas x40).

Mes lyginome tų pačių moterų vienasluoksnių Pap tepinėlio citologinių tyrimų duomenis su biopsinės medžiagos tyrimų rezultatais. Iš 69 moterų, kurioms citologiniu Pap tepinėlio metodu buvo diagnozuota HSIL, 65 moterims (94,2proc.) histologiškai patvirtinta CIN2+ diagnozė, 3 pacientėms cervicitas, o 1 atveju - CIN1 diagnozė.

Kai citologiniu tyrimu buvo nustatyta LSIL diagnozė, gimdos kaklelio biopsinės medžiagos histologinis tyrimas net 4 atvejais parodė ryškius CIN2+ pakitimus.

20 pacienčių, kurioms citologiškai patologijos nebuvo aptikta (IPPNN), tačiau gydytojui ginekologui buvo kilę abejonių, biopsinės medžiagos histologiniais tyrimais nustatytos cervicito (13 atvejų), CIN1 (2 atvejai) ir net CIN2+ (4 atvejai) diagnozės (13 lentelė).

13 lentelė. Diagnozių, nustatytų histologiniais ir citologiniais tyrimo metodais, palyginimas

Citologinė diagnozė	ASCUS	HSIL	LSIL	Nėra pakitimų (IPPNN)	Netinkamas vertinimui	Iš viso
Be pakitimų				1	1	2
Cervicitas	7	3		13	1	24
CIN1		1	3	2	1	7
CIN2 +		65	4	4		72
Invazinė SCC		1				1
Iš viso	7	69	7	20	3	107

Diagnozės HSIL patvirtinimui etaloniniu testu laikomas biopsinės medžiagos histologinis tyrimas, vienasluoksniu skystų standartinių terpių Pap tepinelių citologinio tyrimo jautrumas yra 98,0 proc., specifiškumas – 48,4 proc. Tai reiškia, kad citologiniu tyrimu galima teisingai identifikuoti 98,0 proc. ligos atvejų ir teisingai įvardinti kaip nesergančius tik 48,4 proc. sveikų asmenų. Apskaičiuota prognozinė teigiamojo testo vertė yra 75,4 proc., prognozinė neigiamojo testo vertė – 93,8 proc. Vadinasi, jei citologinis testas teigiamas, tikimybė, kad asmuo serga, yra 75,4 proc., o jei citologinis testas neigiamas, tikimybė, kad asmuo sveikas, yra 93,8 proc.

5.3.3. Baltymo p16INK4a raiškos nustatymas imunocheminiais metodais

Baltymo p16INK4a raiška buvo nustatoma imunocheminiais metodais tiek gimdos kaklelio nuograndų tepinėliuose, tiek biopsinės medžiagos histologiniuose preparatuose. Stacionaro sąlygomis ištirta 14 moterų. Šioms moterims prieš biopsijos arba konizacijos procedūrą pakartotinai buvo imamos gimdos kaklelio nuograndos Pap tepinėliui paruošti.

Taigi stacionaro sąlygomis p16INK4a raiška moterims buvo nustatinėjama tiek imunohisto-, tiek imunocitocheminiu metodu.

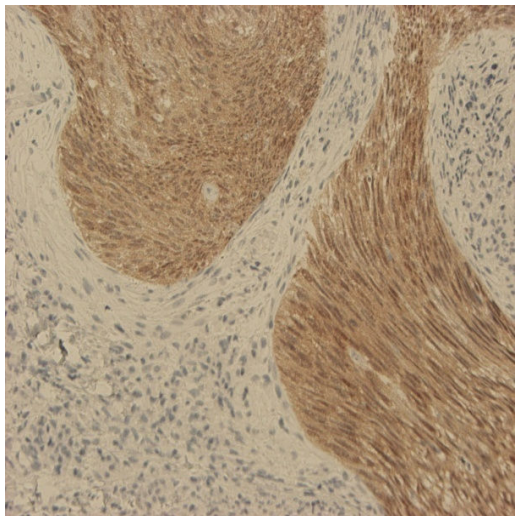
Iš gimdos kaklelio biopsinės medžiagos buvo ruošiami 2 mikronų storio preparatai imunohistocheminiams p16INK4a tyrimams. Šiems tyrimams buvo naudojamas specifinis p16^{INK4a} antikūnų rinkinys histologiniams mėginiams dažyti CINtec[®] (DAKO Cytomation, Glostrup, DK, Denmark) ir griežtai prisilaikoma metodikos reikalavimų.

Imunocitocheminiams tyrimams buvo naudotas specifinis p16^{INK4a} antikūnų rinkinys citologiniams mėginiams dažyti CINtec[®] (DAKO Cytomation, Glostrup, DK, Denmark), taip pat griežtai prisilaikant gamintojo nurodytos tyrimo metodikos.

Iš viso pagal standartinį imunocitocheminį metodą ištirti 33 Pap tepinėliai. Tarp jų buvo 13 tepinėlių, kurie citologiškai įvertinti kaip IPPNN, 14 tepinėlių, įvertintų HSIL pakitimais, 5 tepinėliai – LSIL ir 1 - ASCUS atvejis. Tiriant paruošus Pap tepinėlius imunocitochemiškai, ASCUS atvejo tepinėlis pasirodė esąs netinkamas vertinti, todėl iš tolimesnės analizės eliminuotas.

Histologinių preparatų ir citologinių Pap tepinėlių imunocheminių tyrimų rezultatai buvo vertinami pusiau kiekybiškai. Kai nusidažiusių ląstelių iš viso nebuvo aptinkama arba silpnas citoplazminis nusidažymas (vertinamas ženklu ±) buvo registruojamas tik pavienėse ląstelėse (iki 5 proc.), tyrimo rezultatas vertintas kaip p16 neigiamas. Teigiami atsakymai (p16 teigiamas) pagal nusidažiusių ląstelių kiekybinius procentinius rodiklius buvo skirstomi į kelias grupes: 5-25 proc.(+) nusidažiusių ląstelių, 25-75 proc.(++) ir >75 proc.(+++). Kuo daugiau tepinėlyje aptinkama nusidažiusių ląstelių, tuo didesni baltymo p16 kiekybiniai rodikliai.

17 paveikslėlyje pateikiame gimdos kaklelio biopsinės medžiagos imunohistocheminio preparato mikroskopinį vaizdą.



17 pav. Teigiama baltymo p16 reakcija CIN3 epitelio ląstelių branduoliuose ir citoplazmoje. (CIN3 epitelis iškloja endocervikinę liauką. Displaziniame epitelyje teigiama imunohistocheminė reakcija.

Mūsų imunocitocheminių tyrimų rezultatai ir jų ryšys su citologinės diagnostikos rodikliais pateikti 14 lentelėje.

14 lentelė. Baltymo p16INK4a raiškos ir citologinės diagnostikos rodiklių tarpusavio ryšys

p16INK4a testas	IPPNN	HSIL	LSIL	Iš viso
Neigiamas	12	1	2	15
Teigiamas	1	13	3	17
Iš viso	13	14	5	32

Lentelės duomenys labai akivaizdūs. Tarp baltymo p16INK4a rodiklių ir diagnostikos sunkumo laipsnio egzistuoja stiprus ryšys. Kai mėginiuose nebuvo aptinkama baltymo p16INK4a, tai ir citologinio tyrimo diagnostiką buvo IPPNN. Tik vienu HSIL atveju baltymo nebuvo aptikta. Ir priešingai, kai moterims buvo nustatomas teigiamas baltymo p16INK4a testas, tai ir diagnostiką dažniausiai buvo HSIL. Tik viena moteris neturėjo jokių patocitologinių pokyčių, nors baltymo testas buvo teigiamas.

Tarp gimdos kaklelio vėžio histologinio tyrimo duomenų ir baltymo p16INK4a raiškos rodiklių, nustatytų imunohistocheminiu būdu, taip pat aptiktas tiesioginis ryšys. Iš 12 moterų, kurioms nustatyta CIN 2+, net vienuolikai nustatytas teigiamas p16INK4a testas (15 lentelė).

15 lentelė. Baltymo p16 raiškos ir CIN sunkumo laipsnio tarpusavio ryšys

p16 testas	CIN1	CIN2	CIN3	Iš viso
Neigiamas			1	1
Teigiamas	1	3	8	13

Klinikinių tyrimų duomenys rodo, kad baltymo p16INK4a nustatymas gimdos kaklelio patologiją turinčioms moterims yra vertintinas tyrimo metodas. Mes apskaičiavome šio tyrimo metodo jautrumo, specifiškumo, teigiamos bei neigiamos prognozinės vertės rodiklius, diagnozuojant gimdos kaklelio intraepitelinę neoplaziją.

Mūsų statistiniai duomenys pateikiami 16 lentelėje.

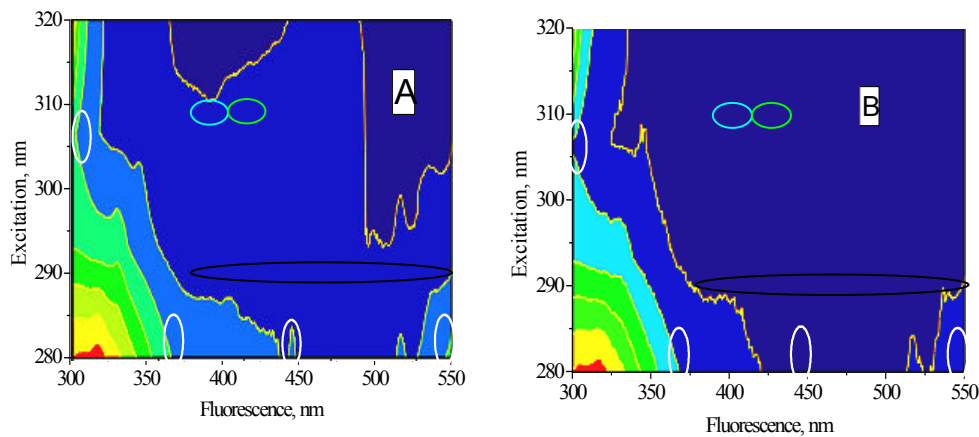
16 lentelė. Baltymo p16 tyrimo metodo jautrumo, specifiškumo, teigiamos ir neigiamos prognozinės vertės rodikliai diagnozuojant CIN (p reikšmės)

Diagnozė	Jautrumas (proc.)	Specifiškumas (proc.)	Teigiama prognozinė vertė	Neigiama prognozinė vertė
CIN 2+	87	92	93	85

Taigi kai citologinio tyrimo metodu buvo nustatyta CIN2+ diagnozė, baltymo p16INK4a tyrimo metodo jautrumas yra 87 proc., o teigiama prognozinė metodo vertė yra 93 proc. Tai reiškia, kad pagal baltymo p16INK4a tyrimo rezultatus (p16 teigiamas) teisingai galima diagnozuoti 93 proc. atvejų. Tyrimo metodo specifiškumas taip pat labai aukštas – 92 proc.

5.3.4. Nuograndų supernatanto tyrimų optiniais metodais rezultatai

Mūsų tirtų moterų, tiek tiriamosios grupės, tiek ir kontrolinės, supernatantų spektrai pirmiausia buvo palyginti grafiškai. 290,300 ir 310 nm fluorescencijos spektrai matematinio paketo MathCad pagalba buvo transformuojami į 3D plokštuminių vaizdą ir gaunamas taip vadinamas „elektroninis Pap tepinėlis“, kurio vaizdinė išraiška kliniciams grafiškai parodo skirtumus, bet nerodo tų skirtumų patikimumo (18 pav.). Paveikslėlyje parodytos sužadavimo-emisijos matricos IPPN ir HSIL grupių moterų supernatantų mėginiuose. Sveikų ir HSIL grupės supernatantų matricių besiskiriančios vietos pažymėtos baltos spalvos elipsėmis.



18 pav. Supernatantuose sužadintos fluorescencijos matricos: A - IPPNN, B - HSIL (spalvotos elipsės pažymi vietas, kurių parametrai 20 ir 21 lentelėse išryškinti spalvotu fonu, spalva parodo fluorescencijos intensyvumą, raudona-mėlyna kryptimi intensyvumas mažėja)

Esant 355 nm žadinimui ir autofluorescencijos emisijai 405-424 nm ruože (elastinas) gautas geriausias rezultatas atskiriant HSIL (CIN 2+) nuo IPPNN ($p=0,0003$), IPPNN šis komponentas stipriau išreikštas. Autofluorescencija 475-515 nm juostoje (lipidai: cholesterinas, dihidroergosterolis) yra svarbi HSIL, cervicito ir IPPNN grupių atskyrimui, tačiau geriausiai yra atskiriama nuo kitų IPPNN ($p=0,001$) grupė, kurioje šis komponentas silpniau išreikštas. 515 -650 nm (flavinai, antioksidantai) komponentas yra stipriausiai išreikštas IPPNN grupėse, lyginant su kitomis. Cervicitas skyrėsi nuo IPPNN 695-805nm stipriau išreikštu komponentu ($p=0.0002$) (17 lentelė).

17 lentelė. Supernatanto fluorescencijos SPP komponentų skirtumai žadinimas 355 nm (p reikšmės)

Komponentas nm	Cervicitas nuo kt.	HSIL (CIN2+) nuo kt.	IPPNN nuo kt.	Cervicitas nuo HSIL (CIN2+)	Cervicitas nuo IPPNN	HSIL (CIN2+) nuo IPPNN
405-424	0.593	0.008	0.003	0.393	0.129	0.0003
424-445	0.175	0.908	0.165	0.382	0.176	0.358
445-475	0.418	0.856	0.577	0.574	0.442	0.904
475-515	0.092	0.092	0.001	0.959	0.007	0.007
515-650	0.005	0.631	0.002	0.109	0.002	0.041
650-695	0.449	0.084	0.017	0.382	0.051	0.051
695-805	0.020	0.492	0.004	0.795	0.0002	0.139

* Mann-Withney testas

Iš visų lempinio spektroskopo žadinimų (290, 300, 310nm) didžiausias švytėjimo atsakų (emisijos) skirtumas tarp IPPNN ir HSIL(CIN 2+) grupių randamas esant emisijai virš 379 nm. Geriausias rezultatas lempiniu spektroskopu žadinant supernatantą 290nm banga ir autofluorescencijos (emisijos) ruože >379nm (kolagenas, estronas, elastinas). Patikimai šioje srityje atskiriamos abi citologinės grupės tiek IPPNN ir tiek HSIL(CIN 2+), tačiau IPPNN atskiriamas geriau, atitinkamai $p=0.001$ ir $p=0.008$. IPPNN žadinant 300nm banga patikimai atskiriama ir <342nm ($p=0.041$) ir 356-380 nm ($p=0.045$) emisijoje, o taip pat žadinant 310 nm ilgio banga ir autofluorescencijos ruože 342-402 nm ($p=0.046$) ir >444 ($p=0.023$). IPPNN skiriasi nuo kitų citologinių grupių esant žadinimui 300nm ir <342 nm emisijai (betakarotenai, estradiolis, triptofanas) ($p<0,05$).

HSIL(CIN 2+) patikimai skiriamas nuo kitų citologinių grupių esant sužadimui 310nm ilgio banga ir emisijai 342-402 nm ($p=0.016$) ir > 444 nm ($p=0.038$) ir žadinant 300 nm banga ir autofluorescencijai 342-356 nm ($p=0.049$). (18 lentelė).

18 lentelė. Supernatanto fluorescencijos SPP komponentų skirtumai (p reikšmės)

Komponentas, nm	p	CIN1 nuo kt.	Cevicitas nuo kt.	IPPNN nuo kt.	HSIL (CIN2+) nuo kt.	p16
Žadinimas 310 nm						
< 342	p=	0.479	0.160	0.595	0.403	0.224
342-402	p=	0.591	0.809	0.046	0.016	0.066
402-444	p=	0.101	0.050	0.626	0.481	0.181
> 444	p=	0.028	0.308	0.023	0.038	0.285
Žadinimas 300 nm						
< 342	p=	0.995	0.424	0.041	0.075	0.529
342-356	p=	0.472	0.692	0.089	0.049	0.145
356-380	p=	0.985	0.492	0.045	0.071	0.607
> 380	p=	0.404	0.384	0.473	0.595	0.512
Žadinimas 290 nm						
< 338	p=	0.692	0.083	0.066	0.300	0.955
338-353	p=	0.512	0.295	0.418	0.156	0.388
353-368	p=	0.905	0.214	0.117	0.390	0.766
368-379	p=	0.617	0.349	0.235	0.628	0.965
> 379	p=	0.721	0.064	0.001	0.008	0.211

* Mann-Withney testas

Nors supernatante, esant 290nm žadinimui rasti komponentai, kurie atspindi triptofano, neopterinio, NADH, keratino, kolageno IV ir VII spektrus, tačiau patikimų skirtumų vertinant patologinius ir nepatologinius mėginius nerasta. Esant sužadimui 355 nm taip pat rasti neopteriną, kolageną VII, NADH atspindintys komponentai, tačiau tarp šių komponentų skirtumo grupėse nerasta.

Suskirsčius moteris į dvi grupes pagal baltymo p16 raiškos kriterijus (p16 teigiami ir p16 neigiami), statistiškai patikimo supernatantų spektrinių rodiklių skirtumo neaptikome.

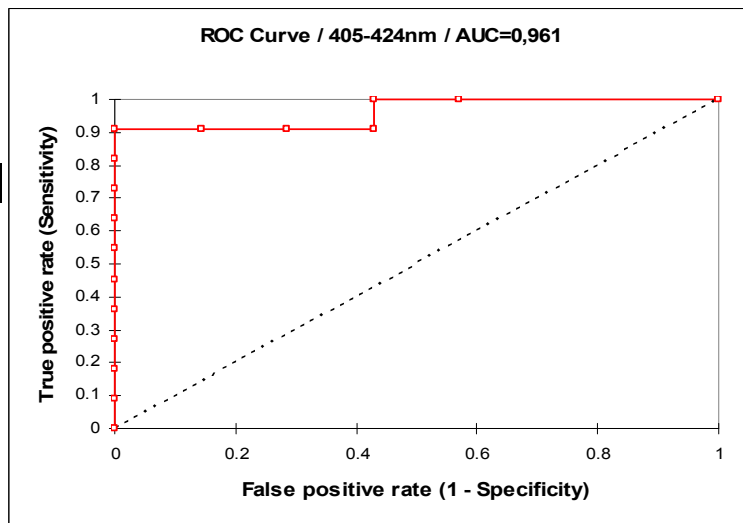
Žadinant 290 nm bangomis, išryškėja 3 skirtingos fluorescencijos sritys: 370 nm bangos švyti triptofanas, 440 nm švyti neopterinas, kolagenas VII ir kiti fluoroforai ir 540 nm bangos švyti flavinai.

Kai žadinama 300 nm bangomis, skirtumas aptinkamas ties 320 nm bangų fluorescencija, o žadinant 310 nm bangomis, tarp sveikų ir HSIL grupių jokių supernatanto spektrinių parametų skirtumų nebuvo nustatyta.

Žadinant 290-310 nm bangomis, didžiausias skirtumas tarp spektrų aptiktas 370-470 nm bangų zonoje. Žadinant 280 nm bangomis, didžiausi skirtumai nustatyti ties 425 nm, 440 nm, 360 nm ir 560 nm bangų spektrinėmis zonomis.

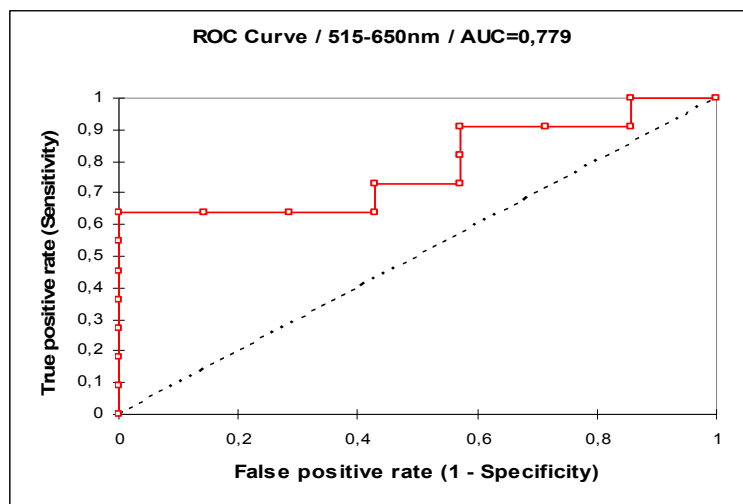
Optinių diagnostinių tyrimo metodų tikslumą vertinome pagal plotą po ROC kreive. Mokslinėje literatūroje plotas po ROC kreive dažniau įvardijamas kaip AUC (angl. *Area Under Curve*). Metodo tikslumas yra labai geras, jei plotas 0,90-1,0; geras – 0,80-0,90; vidutiniškas – 0,70-0,80; mažai tikslus – 0,60-0,70; netikslus – 0,50-0,60.

Mūsų tirtų supernatantų optinių rodiklių grafinė išraiška ROC kreivės pavidalu rodo, kad tiriant sveikų ir turinčių gimdos kaklelio patologiją (HSIL) moterų mėginius, šio tyrimo metodo tikslumas labai priklauso nuo tyrime taikomų žadinimo bangos ir emisijos parametų. Kai žadinama 355 nm bangomis, emisija 405-424 nm, metodo tikslumas yra labai geras, - ROC kreivės apibrėžtas plotas AUC yra 0,961 (žiūr. 19 pav.).



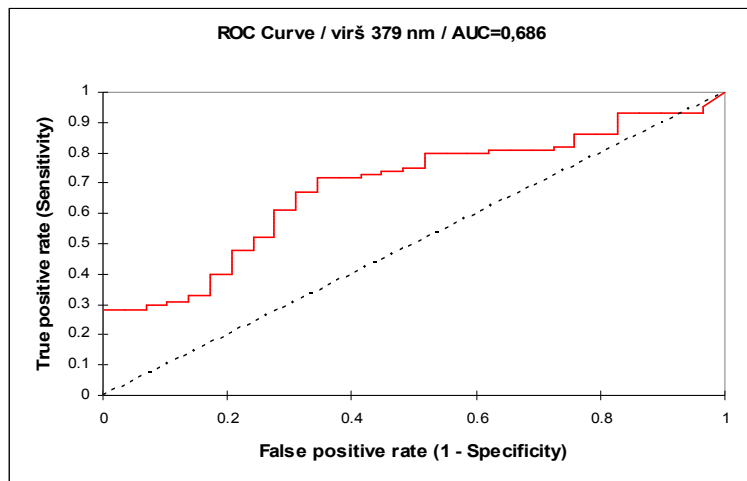
19 pav. Supernatanto optinių rodiklių ROC kreivė HSIL prognozėje (žadinimas 355 nm bangomis, emisija 405-424 nm , AUC=0,961)

Kai žadinama 355 nm bangomis, emisija 515-650 nm, tų pačių supernatantų mėginių optinių rodiklių ROC kreivės apibrėžtas plotas AUC yra 0,779, t.y. tyrimo metodo tikslumas diagnozuojant HSIL yra tik vidutiniškas (20 pav.).



20 pav. Supernatanto optinių rodiklių ROC kreivė HSIL prognozėje (žadinimas 355 nm bangomis, emisija 515-650 nm, AUC=0,779)

Kai žadinimui naudojamos 290 nm bangos, emisija >379 nm, tų pačių supernatantų mėginių optinių rodiklių ROC kreivės apibrėžtas plotas AUC yra tik 0,686, t.y. taikant nurodytus eksperimento parametrus tyrimo metodas yra mažai tikslus (21 pav.).



21 pav. Supernatanto optinių rodiklių ROC kreivė HSIL prognozėje (žadinimas 290 nm bangomis, emisija >379 nm, AUC=0,686)

Taigi remiantis mūsų tyrimų duomenimis, galima teigti, kad tiriant supernatantų mėginius optiniais metodais patikimiausia yra žadinti 355 nm ilgio bangomis portatyviniu lietuvišku mikrolazeriu STA-01 naudojant spektrometrą „AvaSpec-2048TEC-USB2, Avantes“, vertinant emisiją 405-424 nm bangų zonoje.

355nm bangų ilgio mikrolazeris, kurį galima panaudoti prie paciento lovos, t.y. už laboratorijos ribų, patikimiausiai skiria IPPNN ir HSIL grupes $p<0,001$ (AUC 0,96, Jautrumas 0,91, Specifiškumas 1.000) (19 lentelė).

Mažiau patikimai atskirti IPPNN ir HSIL (CIN2+) citologinių grupių supernatantus galima žadinant supernatantą 290nm laboratoriniu lempiniu spektroskopu >379 nm emisijos juostoje, $p<0,05$ (AUC 0,69, Jautrumas 0,72, Specifiškumas 0,65).

19 lentelė. Diagnostinės charakteristikos stacionaraus lempinio spektrometro (290nm) ir nešiojamo mikrolazerio (355nm) supernatanto atskiriant IPPNN ir HSIL (CIN2+) grupes supernatante

Žadinimas, nm Supernatanto	Kriterijus	SPP	Jautrumas	Specifiškumas	TPV	NPV	AUC	p
290 nm (skysto)	>379	0.021	0.716	0.655	0.863	0.432	0.686	<0.0001
355 nm (džiovinto)	405-424	0.033	0.909	1.00	1.00	0.875	0.961	<0.0001
	515-650	0.128	0.636	0.857	1.00	0.636	0.779	0.003

Taigi remiantis mūsų tyrimų duomenimis, galima teigti, kad gimdos kaklelio tepinėlio supernatantų mėginių patikimai optinei diagnostikai tinka 355 nm ilgio bangų portatyvinis lietuviškas mikrolazeris STA-01 su spektrometru „AvaSpec-2048TEC-USB2, Avantec“, emisijos spektro statistiniam vertinimui pasirenkant 405-424 nm bangų ruožo autofluorescenciją.

Taigi, remiantis mūsų tyrimų duomenimis, galima teigti, kad džiovinto gimdos kaklelio tepinėlio optinė diagnostika yra galima statistiniam vertinimui pasirenkant autofluorescencijos spektro ruožą ties 405-424 nm, fluorescenciją sužadinant 355 nm spinduliuote.

5.3.5. Žmogaus papilomos viruso DNR tyrimų rezultatai

Supernatantų mėginiuose žmogaus papilomos viruso DNR buvo išskiriama naudojant QIAamp MinElute Virus Spin Kit (Qiagen) rinkinį ir automatinį QIAcube (Qiagen) nukleorūgščių išskyrimo aparatą. Išskirta DNR buvo amplifikuojama polimerazės grandininės reakcijos (PGR) metodu, naudojant PCR System 9700 (Applied Biosystems) termociklerį ir HPV4 ACE Screening (Seegene) rinkinį. Šis rinkinys gali specifiškai atpažinti ŽVP-16 ir ŽPV-18 tipus bei nespecifiškai atpažinti dar 11 aukštos rizikos ir 5 žemos rizikos virusų tipus. Susidarę amplifikuoti produktai buvo supilami į 2 proc.

agarozės geli, nudažomi etidžio bromidu ir tiriami transiliuminatoriuje, naudojant UV šaltinį.

Žmogaus papilomos virusas PGR metodu buvo tiriamas moterims, kurios kreipėsi į stacionarą dėl nustatytų gimdos kaklelio pakitimų (HSIL) paprastu Pap metodu. Joms pakartotinai paimti gimdos kaklelio citologiniai tepinėliai į skystą terpę (0,9 proc. NaCl tirpalą). Iš viso ištirta 14 moterų supernatanto mėginiai. Stacionare papildomais tyrimais keturioms moterims HSIL diagnozė buvo atmesta. Visų šių 4 moterų supernatantų mėginiuose PGR reakcijos metodu viruso DNR neaptikta. Taigi nors ir labai mažas tyrimų skaičius, vis dėlto visais 4 atvejais, kai nenustatyta gimdos kaklelio patologija, nebuvo aptikta ir ŽPV infekcija.

Kitoms dešimčiai moterų histologinio tyrimo metodu buvo patvirtintos CIN2+ ir cervicito diagnozės. Ištyrus jų gimdos kaklelio nuograndų supernatantų mėginius, žmogaus papilomos viruso DNR aptikta šešioms moterims (60 proc.), iš jų 1 moteris turėjo cervicito diagnozę. Visoms moterims aptiktas aukštos rizikos grupei priklausantis ŽPV 16 tipas, vienu atveju ŽPV tipas nenustatytas.

Statistinės analizės metodu buvo nustatinėjama koreliacija tarp ŽPV infekcijos ir baltymo p16INK4a imunohistocheminių rodiklių. Kai ŽPV testas buvo teigiamas, keturiais atvejais iš 6 baltymo p16INK4a reakcija buvo taip pat teigiama. Aišku, dėl mažos tyrimų imties daryti kokių nors išvadų negalima, būtina sukaupti pakankamai klinikinės medžiagos.

5.3.6. Tyrimų mikrogardelių ir biocheminiais proteominiais metodais rezultatai

Biocheminiai proteominiai supernatanto tyrimai buvo atlikti tik toms moterims, kurios buvo hospitalizuotos gimdos kaklelio audinių biopsijai, išsamesniam tyrimui ir gydymui. Stacionaro sąlygomis šios moterys buvo tiriamos itin nuodugniai, kai kurie tyrimai buvo kartojami. Prieš biopsijos arba konizacijos procedūrą joms pakartotinai buvo imami standartiniu būdu gimdos kaklelio nuograndų mėginiai, tačiau nuograndos nuskalaujamos ne buferyje, o 0,9 proc. NaCl tirpale be jokių konservantų ir inhibitorių (20 ml). Nuograndų mėginiai buvo pakartotinai tiriami citologinio Pap tepinėlio metodu, atliekami

baltymo p16INK4a imunocitocheminiai tyrimai, o supernatante polimerazės grandininės reakcijos metodu nustatinėjama viruso DNR (žiūr. aukščiau), taip pat dalis supernatanto pakartotinai centrifuguojama ir tiriama mikrogardelių ir biocheminiais proteominiais metodais.

Biopsinės medžiagos histologiniai tyrimai diagnozes šiek tiek pakoregavo: 7 atvejais patvirtinta CIN 3/CIS, 1 – cervicitas, 2 – CIN2, 4 -IPPNN. Pastarosioms 4 moterims IPPNN diagnozę taip pat patvirtino ŽPV DNR testai bei imunocheminių tyrimų rezultatai (vėliau šios moterys į tolimesnę analizę neįtrauktos).

Iš likusių 10 moterų, kurioms histologiškai patvirtinta gimdos kaklelio patologija, viruso DNR testas buvo teigiamas 6 ligonėms, penkioms iš jų aptiktas aukštos rizikos grupės ŽPV 16 tipas.

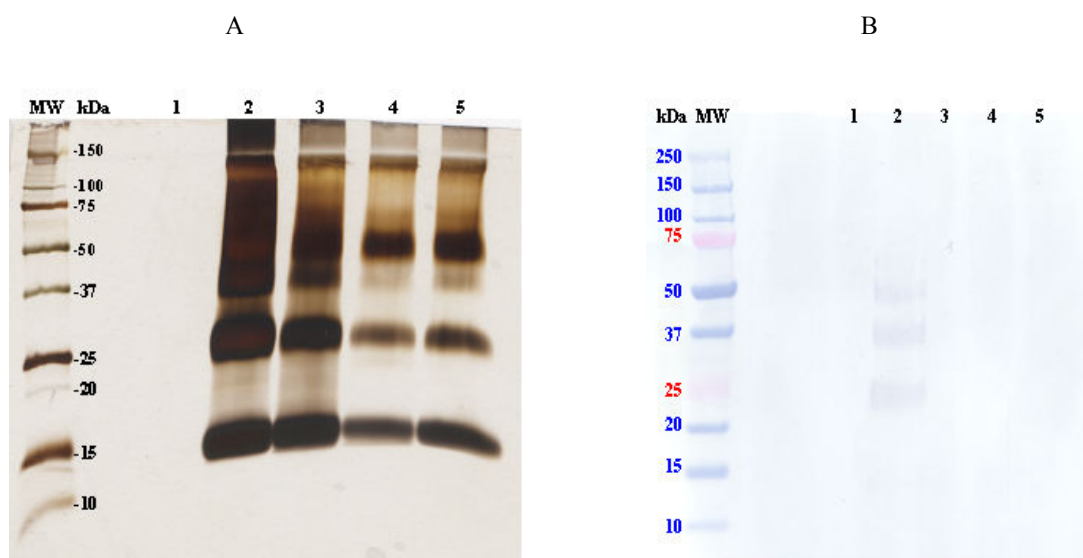
Hospitalizuotų moterų gimdos kaklelio nuograndų ir biopsinės medžiagos tyrimų rezultatai, gauti įvairiais metodais, buvo lyginami tarpusavyje. Siekiant supaprastinti toliau aprašomą rezultatų analizę, pateikiame šios grupės moterų suvestinius tyrimų rezultatus iš anksto (20 lentelė).

20 lentelė. Hospitalizuotų tiriamosios grupės moterų tyrimų rezultatų suvestinė

Mėginio Nr.	Citologinė diagnozė	Histologinė diagnozė	p16INK4a tyrimas mikrogardelių metodu	P16INK4a tyrimas elektroforezės metodu	P16INK4a tyrimas Western bloto metodu	p16INK4a tyrimas imunohistocheminiu metodu	ŽPV tipas
1	HSIL	CIS	++	+	+	++	16
2	HSIL	CIS	++	+	+	±	nežinomas
13	ASCUS	CIN3	–	–		±	16
14	HSIL	CIN3	–	–		+	16
15	HSIL	CIS	+	–		+	16
18	HSIL	CIN2	–	+	–	–	–
19	HSIL	Cervicitas	++	++	+	±	16
20	HSIL	CIN3	+	+	–	+++	–
21	HSIL	CIN3	–	+	–	++	–
22	HSIL	CIN2	+	+	–	+++	–

Remiantis lentelėje pateiktais duomenimis, galima daryti išvadą, kad histologinio tyrimo rezultatai beveik visada patvirtina citologiniu metodu nustatytą diagnozę. Tik ASCUS atveju histologiškai diagnozuotas CIN3 (mėginio Nr.13) ir vieno HSIL atveju – cervicitas (mėginio Nr.19). Beje, abiem šiais atvejais buvo nustatyta teigiama ŽPV reakcija. Citologinė ir histologinė diagnozės praktiškai sutampa su baltymo p16INK4a imunohistocheminio tyrimo duomenimis: nusidažiusių ląstelių buvo aptikta devyniuose iš dešimties mėginių.

Dvidimensinės elektroforezės metodu supernatanto baltymai pirmiausia buvo frakcionuoti pagal molekulinę masę (21A pav.). Juosta gelyje ties 15 kDa (skalės padala atitinka baltymo molekulinę masę) reiškia tikimybę, kad mėginyje gali būti baltymo p16INK4a. Tokiai prielaidai patikrinti (taip pat ir tyrimų rezultatams biolustų metodu patvirtinti) to paties mėginio tyrimas buvo tęsiamas Western bloto būdu (21B pav.). Western imunoblotas yra vienas iš imunocheminės analizės metodų, kuriuo galima išskirti vieną norimą baltymą iš mišinio, panaudojant specifinį antikūną. Metodus leidžia nustatyti, ar mėginyje yra tiriamojo baltymo ir kiek jo yra tiriamuoju momentu.



21 pav. Baltymo p16^{INK4a} nustatymas naudojant SDS-PAGE elektroforezės metodą (A) ir Western bloto metodą (B).

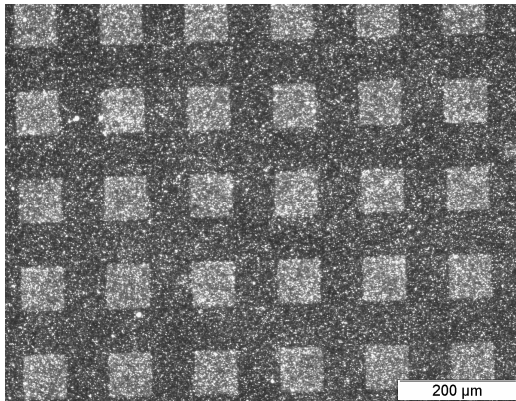
Pateiktoje nuotraukoje (A) matyti, kad ant gelio ties 15 kDa padala yra susidariusios baltymų elektroforezės žymės. Jos rodo, jog mėginyje yra baltymo p16INK4a (žr. juostos 2, 3, 4, 5). Toliau pagal Western bloto metodiką mėginys buvo veikiamas pelės monokloniniu anti-p16^{INK4a} antikūnu, susidarė antigeno-antikūno kompleksas, kuris gelyje virš 15 kDa suformavo 3 fragmentus (juosta 2). Pastarieji duomenys sutampa su duomenimis tų 3 atvejų, kai buvo gauti santykinai stiprūs fluorescencijos signalai, o foniniam p16^{INK4a} lygmeniui detektuoti pritrūko jautrumo.

Pagal gautus tyrimų rezultatus mes vertinome ir lyginome Pap tepinėlio metodą su visais mūsų darbe naudotais šiuolaikiškais molekulinio lygmens tyrimo metodais, kuriais remiantis būtų galima tiksliai nustatyti ryškius gimdos kaklelio intraepitelinius pokyčius pagal baltymo p16INK4a rodiklius.

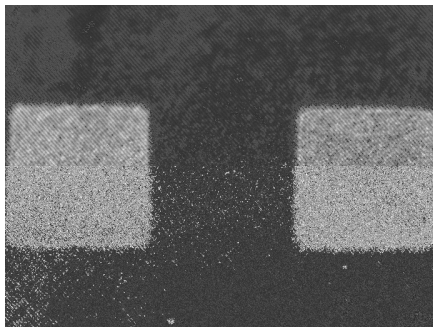
Mikrogardelių (biolustų) metodu pakartotinai nucentrifuguotuose supernatantų mėginiuose taip pat buvo ieškoma baltymo p16INK4a. Buvo kuriama originali tyrimo metodika. Tiriant mėginius, buvo stengiamasi minimizuoti pašalinius veiksnius, galinčius turėti įtakos tyrimo rezultatams, todėl tyrimams buvo naudojami tik tą pačią dieną paimti mėginiai, kurie nuo paėmimo momento iki eksperimento pradžios (2-3 val.) buvo laikomi +4°C temperatūroje. Taip buvo išvengta mėginio saugojimo sąlygų standartizavimo ir optimizavimo, baltymų degradacijos.

Tyrimai mikrogardelių metodu parodė, kad identifikuojant ryškesnio laipsnio CIN atvejus, supernatantų mėginiuose tirpus baltymo p16^{INK4a} fluorescencinė detekcija nėra pakankamai jautri. Trimis atvejais, kai jau buvo žinoma tiksli citologinė ir histologinė diagnozė, registruojami signalai buvo žemiau foninio lygio (mėginiai Nr.15, 20 ir 22), o keturiais atvejais fluorescencijos iš viso nebuvo aptikta (mėginiai Nr.13, 14, 18 ir 21). Iš šių minėtų 7 mėginių tik trijuose buvo nustatyta ŽPV infekcija ir tik trim iš dešimties tiriamosios grupės (HSIL/CIN2+) moterų mikrolustų metodu buvo nustatytas aukštas p16^{INK4a} raiškos lygmuo. Tas faktas perša išvadą, kad mikrolustams galėjo būti pasirinkta neadekvati mėginio paėmimo arba paruošimo metodologija.

22 paveikslėlyje pateikiame imobilizuoto baltymo p16^{INK4a} fluorescencijos vaizdą mikrogardelių domenuose



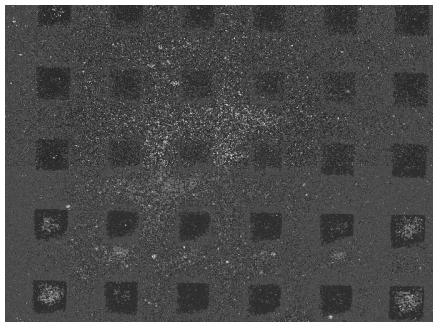
22 pav. Sergančios pacientės mėginio baltymo p16^{INK4a} imobilizacija biolusto duomenuose (fluorescencijos vaizdas, 10x2 s).



23 pav. Padidintas to paties mėginio kaip ir 22 paveikslėlyje fluorescencijos vaizdas (40x2 s)

Sveikų moterų nuograndų mėginių supernatantuose antikūnai baltymo p16^{INK4a} neišryškina, švytintys fluorescencijos laukai nesusidaro.

Sveikos moters supernatanto tyrimo mikrogardelių metodu fluorescencijos vaizdas pateikiamas 24 paveikslėlyje.



24 pav. Kontrolinis bandinys su sveikos pacientės supernatanto mėginiu (fluorescencijos vaizdas, 10x2 s)

Gimdos kaklelio nuograndų supernatantų mėginių tyrimai mikrogardelių metodu parodė, kad kitose medicinos srityse naudojamas biolustų metodas gali būti pritaikytas ir baltymo p16INK4a paieškai supernatantų mėginiuose. . p16^{INK4a} baltymo nustatymo supernatante gardelių metodika tikslumu nedaug skiriasi (2 iš 10 atvejų nesutapo) nuo p16^{INK4a} įvertinimo etaloniniu imunohistocheminiu metodu. Ar šis tyrimo metodas galėtų būti taikomas baltymo p16INK4a paieškai makšties ir gimdos kaklelio nuoplovų mėginiuose savitikros tikslu, atsakymą bus galima duoti tik surinkus pakankamai klinikinės medžiagos

6. REZULTATŲ APTARIMAS

Lietuvoje moterų sergamumo gimdos kaklelio vėžiu ir mirtingumo nuo jo rodikliai yra gerokai didesni nei Europos šalyse. Pastebimas jaunų (15–34 metų) moterų mirtingumo didėjimas nuo 1972 metų (Aleknavičienė B. 2002). 2002 m. diagnozuoti 462 nauji šio susirgimo atvejai, 2004 m. – 570 ir 2005 m. – 500 naujų atvejų (Vėžio registro duomenys 2003, 2004, 2005 m.).

Gimdos kaklelio vėžys yra vienas iš nedaugelio piktybinių navikų, kurį nesunku diagnozuoti ankstyvoje ikivėžinių pokyčių stadijoje, o laiku suteiktas gydymas 95 ir net 100 proc. užtikrina visišką pasveikimą (Kalliala, Anttila et al. 2005). Būtent todėl ankstyva diagnostika ir efektyvus gimdos kaklelio ikivėžinės patologijos išaiškinimas, taip pat moterų skatinimas aktyviau dalyvauti patikros programoje gali ženkliai pakeisti sergamumo ir mirtingumo nuo GKV rodiklius.

Profilaktinėse gimdos kaklelio patikrose daugiau nei 50 metų visame pasaulyje yra taikomas *Papanicolaou* (Pap tepinėlio) metodas. Vis dėlto šio metodo jautrumo ribos svyruoja tarp 30-80 proc., specifiškumo – tarp 14-97 proc. (Nanda, McCrory et al. 2000; Wiley, Monk et al. 2004; Arbyn, Sankaranarayanan et al. 2008), todėl nuolat ieškoma naujų diagnostikos būdų. Jau yra patobulinti žinomi tyrimo metodai, taip pat jau sukurti nauji alternatyvūs tyrimo būdai. Šiandien klinikinėje praktikoje taikomas skystų terpių citologinių tepinėlių metodas, automatinis gimdos kaklelio tepinėlių analizatorius, žmogaus papildomos viruso DNR nustatymas PGR ir HC (*hybrid capture*) metodais ir kt. Pastaruoju metu daug dėmesio skiriama gimdos kaklelio molekulinėms vėžinių žymenų paieškai (baltymo p16INK4a ir Ki-67) bei žmogaus papildomos viruso E6/E7 mRNR nustatymui (Lie and Kristensen 2008); (Anttila, Ronco et al. 2004; Kotaniemi-Talonen, Nieminen et al. 2005; Nieminen, Kotaniemi et al. 2005).

Vis dėlto problema, kaip sumažinti sergamumą gimdos kaklelio vėžiu, iki šiol neišspręsta. Aišku viena, kad reikia laiku diagnozuoti ikivėžines gimdos kaklelio būkles, o savalaikiai šios patologijos diagnostikai reikia, kad visos moterys savanoriškai reguliariai lankytųsi ginekologijos kabinetuose profilaktiniams patikrinimams. Tuo tarpu

daugelio šalių tyrėjai tvirtina, kad moterys nelinkusios lankytis pas ginekologus dėl didelio gėdos jausmo arba žinių stokos ir ateina į ginekologijos kabinetą dėl pastebėtų vėžio simptomų, kai liga jau būna toli pažengusi.

Mes iškelėme sau uždavinį išaiškinti Lietuvos moterų turimą informaciją apie gimdos kaklelio vėžį ir jo rizikos veiksnius (ypač ŽPV), susieti juos su moters sveikatos, socialiniais ir ekonominiais rodikliais ir pabandyti paieškoti naujų tyrimo metodų, ypač molekulinės diagnostikos srityje, kuriais būtų galima diagnozuoti HSIL, panaudojant gimdos kaklelio tepinėlio supernatantinius mėginius. Šiam darbui pasirinkome optinius ir imunobiocheminius tyrimo metodus, kurių pagrindu ateityje būtų galima sukurti neinvazinius savikontrolės testus.

Darbas buvo vykdomas dviem etapais. Pirmojo etapo uždavinys buvo išaiškinti mūsų moterų žinias apie gimdos kaklelio vėžio rizikos veiksnius, žmogaus papilomos virusą ir Lietuvoje vykdomą gimdos kaklelio patikros programą, ir, svarbiausia, nustatyti, ar ši moterų turima informacija jas paskatina pasitikrinti ginekologijos kabinetuose profilaktiškai.

Buvo atliktos dvi apklaustos: pirmoji - 2006 m. kovo-gegužės mėnesiais, antroji 2007-2008 metais. Antroji apklausa vykdyta pagal specialiai tam tikslui paruoštą originalią specialisto epidemiologo parengtą anketą, detalizuojant klausimus pagal mus dominančius būsimus atsakymus. (Syrjanen, Shabalova et al. 2009).

Atsakymuose turėjo būti pateikiamos ne tik moterų žinios apie gimdos kaklelio vėžio rizikos veiksnius bei Lietuvoje vykdomą patikros programą, bet ir apie moterų socialinius demografinius duomenis, ginekologinę anamnezę, seksualinio gyvenimo ypatumus, taip pat stresą, patiriamą namuose arba darbe, žalingus įpročius (rūkymą), lėtines ligas, imunitetą stimuliuojančių arba slopinančių vaistų vartojimą, vakcinaciją nuo gripo ir kt.

Per pirmąją apklausą anketas užpildė 1825 moterys. Kadangi mus ypač domino moterys, kurios pagal amžiaus rodiklius turėjo patekti į gimdos kaklelio patikros kontingentą, visos anketos, kuriose nebuvo nurodytas moters amžius, buvo eliminuotos. Taigi išsamiai analizei tiko 1797 anketos.

Apklaustos būdu mums pavyko išaiškinti, kad apie gimdos kaklelio vėžį ir jo rizikos veiksnius daugiau informacijos turi labiau išsilavinusios moterys, ypač kurių darbas yra susijęs su medicina. Vis dėlto moterų išsilavinimas ir turima informacija jų neskatina apsilankyti pas ginekologus profilaktiniam patikrinimui. Priešingai, žemesnio išsilavinimo moterys, mūsų duomenimis, reguliariai pas ginekologus tikrindavosi dažniau (nors taip pat nepakankamai dažnai) nei turinčios aukštąjį arba nebaigtą aukštąjį išsilavinimą.

Dauguma moterų (83,9 proc.) žinojo apie Lietuvoje vykdomą valstybinę gimdos kaklelio patikros programą, ir ši turima informacija nepriklausė nuo išsilavinimo, bet žemesnio išsilavinimo moterys neturėjo informacijos apie patikros tvarką. Turint omenyje, kad būtent žemesnio išsilavinimo moterys dažniau tikrindavosi profilaktiškai, bet turėjo mažiau informacijos apie patikros tvarką, galima teigti, kad informaciją apie gimdos kaklelio vėžio rizikos veiksnius ir valstybinę patikros programą Lietuvoje suteikia ne ginekologas.

Vis dėlto mus labiausiai dominantis atsakymas į klausimą, ar žinojimas apie valstybinę patikros programą paskatina moteris profilaktiškai pasitikrinti dėl gimdos kaklelio vėžio, gerokai nuvylė, - tik 49,1 proc. moterų atsakė, kad lankosi pas ginekologus gana reguliariai. Daugiau nei pusė moterų, turinčių aukštąjį arba nebaigtą aukštąjį išsilavinimą, atsakė, kad pas ginekologus arba visiškai nesilanko, arba lankosi tik atsiradus nusiskundimų. Nežiūrint to, nesilankančios pas ginekologus moterys labai pageidavo pasiskiepyti nuo ŽPV, ypač jei už vakciną būtų kompensuojama. Tai rodo, kad Lietuvos moterys pervertina vakcinacijos reikšmę ir visiškai neįvertina reguliaraus profilaktinio pasitikrinimo reikšmės kaip pagrindinės gimdos kaklelio vėžio profilaktikos priemonės. Tai rodo, kad šalyje trūksta patvirtintos sveikatos švietimo programos, informuojančios apie valstybės finansuojamas ligų prevencijos programas.

Antrą kartą buvo apklausiamos visos moterys, kurios atvyko pasitikrinti profilaktiškai pagal valstybinę gimdos kaklelio patikros programą. Iš viso apklaustos 459 moterys. Duomenų analizei buvo atrinktos tik visiškai užpildytos anketos (statistiniam duomenų apdorojimui 8 anketos buvo netinkamos). Visos šios moterys taip pat buvo ištirtos dėl

gimdos kaklelio patologijos įprastinės ginekologinės apžiūros būdu, visoms paimtas gimdos kaklelio nuograndų mėginys, kuris buvo tiriamas skystų terpių Pap tepinėlio metodu. Iki šiol Lietuvoje buvo taikomas tik tyrimas įprastiniu Pap metodu, kai gimdos kaklelio nuograndos iš karto yra perkeliamos ant objektyvinio stiklelio.

Pagal Pap tepinėlio tyrimo duomenis visos moterys buvo suskirstytos į dvi grupes: tiriamąją (sergančiųjų HSIL(CIN2+)) ir kontrolinę (sveikų). Abiejose grupėse moterys buvo suskirstytos pagal amžių į pogrupius. Kiekvienam tiriamosios grupės individui parinkti identiški pagal amžių individai iš kontrolinės grupės santykiu 1:4. Tai reiškia, kad tiriamosios grupės moterų vidutiniai rodikliai buvo lyginami su analogiško amžiaus (± 3 metai imtinai) keturis kartus didesnės kontrolinės grupės moterų rodikliais.

Aptikus Pap tepinėlyje kokių nors citopatologinių pokyčių, moterys buvo siunčiamos į stacionarą gimdos kaklelio audinių biopsijai ir išsamesniam tyrimui bei gydymui. Biopsinės medžiagos mėginiai ištirti 107 moterims. Taigi mūsų surinkti apklausos duomenys, taip pat citologinių ir histologinių tyrimų rezultatai bei supernatantų tyrimų įvairiais metodais sukaupta informacinė medžiaga mums sudarė galimybę lyginti įvairius rodiklius tarpusavyje, nustatyti jų tarpusavio ryšį ir, svarbiausia, atskirti fiziologinės normos rodiklius nuo analogiškų rodiklių, būdingų patologijai. Mes bandėme surasti modernius, bet praktiškai įgyvendinamus tyrimo metodus, kuriais būtų galima laiku diagnozuoti gimdos kaklelio patologiją nustatytoms anketiniu tyrimu padidintos rizikos sirgti HSIL (CIN2+) moterų grupėms.

Tiriamosios ir kontrolinės grupės moterų anketinių ir klinikinių tyrimų duomenų analizė parodė, kad tarp rizikos veiksnių ir intraepitelinių gimdos kaklelio pokyčių rodiklių egzistuoja statistiškai patikimas ryšys atsižvelgiant į moterų amžių, išsilavinimą, gyvenamąją vietą, buvusią gimdos kaklelio patologiją ir kt.

Mūsų tyrimai parodė, kad galima skirti dvi HSIL rizikos veiksnių grupes: socialinius ir medicininius.

Socialinių veiksnių grupei priklausytų žemas moters išsilavinimas ir gyvenimas kaimo sąlygomis. Mūsų tyrimų rezultatai patvirtina kitų autorių nuomonę, kad didesnė rizika susirgti HSIL yra gyvenančioms kaime moterims ir turinčioms žemą išsilavinimą.

Žemesnis išsilavinimas ir gyvenimas kaimo sąlygomis neturėjo įtakos mūsų tirtų moterų informuotumui apie ŽPV kaip pagrindinį gimdos kaklelio vėžio rizikos faktorių ir apie Lietuvoje vykdomą gimdos kaklelio patikros programą. Žemas išsilavinimas, gyvenimas kaime ir gyvenvietėse nurodo jų blogesnį gyvenimo lygį ir žemesnę socialinę visuomenės brandą. Tyrimais patvirtinta, kad tarp viduriniojo ir žemesniojo išsilavinimo moterų ŽPV paplitimas yra didesnis, o tikimybė susirgti HSIL kaimo ir kaimiškų gyvenviečių moterims beveik 3 kartus didesnė nei miestietėms (ŠS = 2,84; 95 proc. PI 1,13-7,18; p=0,027). Šis ryšys tarp išsilavinimo ir HSIL gali būti susietas su didesniu ŽPV paplitimu tarp viduriniojo ir žemesniojo išsilavinimo moterų. Tai patvirtina 1998-2002m. atliktas dviejų etapų prospektyvinis kohortinis tyrimas Lietuvoje. Didelės rizikos ŽPV paplitimo riziką didina žemas (vidurinis ar žemesnis) moters išsilavinimas (ŠS- 1,43, 95% PI=1,01-2,04) (Kliucinskas, Nadisauskiene et al. 2006).

Visuomenės socialinė branda apibrėžiama keletu kriterijų: visuomenės išsilavinimas ir ekonominis lygis, pasaulėžiūra, dvasinių ir materialinių vertybių skalė, taip pat sugebėjimas priimti naujienas mokslo ir ekonomikos srityje, tolerancija (pvz., kitataučių, kitatikių atžvilgiu ir kt.), dalyvavimas politiniame šalies gyvenime.

Apie visuomenės socialinę brandą galima spręsti pagal tai, kaip sugebama tradicines vertybes, tokias kaip tvirta šeima, dvasinės ir religinės vertybės, sujungti su moderniomis, šiuolaikiškomis. Dvasiniai ir etiniai pasiekimai bei socialinis kultūrinis paveldas turėtų būti kombinuojami su ekonominiais, politiniais ir moksliniais pasiekimais bei technologiniais laimėjimais. Brandžios visuomenės pagrindinis rodiklis yra tos visuomenės sugebėjimas priimti mokslo ir technikos naujoves, sugebėjimas tas naujoves pritaikyti savo gyvenime. Taigi kai Lietuvos pilietės žino apie vykdomą gimdos kaklelio patikros programą, bet nelinkusios apsilankyti pas ginekologus profilaktiniam patikrinimui, tai rodo, kad mūsų moterų nuomonė apie tokias patikras yra archaiška, nepasikeitusi per daugelį dešimtmečių, kuomet nebuvo patikros programų ir nesusiformavo įgūdis lankytis pas gydytojus ginekologus profilaktiniam pasitikrinimui. Todėl moterys arba neskuba kreiptis į gydytoją, arba iš viso uždelsia iki nepagydomų ligos stadijų.

Pagal mūsų duomenis, gimdos kaklelio patologijos dažnis turi atvirkštinį ryšį su moters išsilavinimo rodikliu. Nebaigtą aukštąjį ir aukštąjį išsilavinimą turinčioms moterims tikimybė susirgti HSIL yra mažesnė nei žemesnio išsilavinimo pacientėms (ŠS = 0,35; 95 proc. PI 0,16-0,76; p=0,008).

Pastaruoju metu Lietuvoje susidariusi didelė socialinė atskirtis verčia manyti, kad moterims teikiama ginekologinė pagalba, tikriausiai, taip pat yra nevienodos kokybės. Pagal atsakymą į anketos klausimą apie lankymosi pas ginekologus dažnį, žemesnio išsilavinimo moterys linkusios į ginekologus kreiptis statistiškai dažniau nei turinčios aukštąjį išsilavinimą, vis dėlto jos statistiškai patikimai dažniau sirgo ikivėžinėmis gimdos kaklelio ligomis. Medicininė statistika rodo, kad labiau pasiturinčios moterys pasirenka privačius akušerius ginekologus. Pavyzdžiui, Vilniaus regione per 2005-2007 metus iš 12952 tyrimų Pap tepinėlio metodu, 8901 testų atlikta privačiose gydymo įstaigose (t.y. už valstybinės programos rėmų).

Kai kurie egzogeniniai GKV rizikos veiksniai priklauso grynai nuo pačių žmonių gyvenimo būdo. Moteris pati gali koreguoti tokius rizikos veiksnius, kaip hormoninių kontraceptikų vartojimas, rūkymas, lytinio gyvenimo pradžia ir ypatumai, partnerių kaita, lytiniu keliu platinama infekcija, nėštumų skaičius ir kt.

Turintys aukštąjį išsilavinimą vyrai ir moterys beveik du kartus rečiau rūko, rečiau vartoja stiprius alkoholinius gėrimus (Kalėdienė ir bendraaut., 1999). Pasaulinės sveikatos organizacijos 2005 metų duomenimis, Lietuvoje rūkė 9,8 proc. moterų. Šis procentas pastaraisiais metais smarkiai auga, rūkymas labai plinta tarp nepilnamečių. Rūkymo rodiklių koreliaciją su gimdos kaklelio displazijos dažniu autoriai vertina nevienodai. Mūsų tyrimuose patikimo ryšio neaptikta, vis dėlto tokioms netikėtoms išvadoms galėjo turėti įtakos nedidelis mūsų tirtų moterų rūkymo stažas. Kiti autoriai nustatė, kad rizika numirti nuo GKV rūkančioms moterims yra dvigubai didesnė (ŠS=2,0; 95 proc. PI 1,23-2,91) nei niekada nerūkiusioms, o moterims, kurios rūkyti pradėjo iki 20 metų amžiaus, tikimybė susirgti gimdos kaklelio vėžiu yra dar didesnė (ŠS = 3,2) (Odongua, Chae et al. 2007).

Kontraceptines tabletes ekonomiškai išsivysčiusiose šalyse nuolat vartoja 30-50 proc. moterų. Lietuvoje šią kontraceptinę priemonę pasirenka tik apie 5,5 proc. vaisingo amžiaus moterų, norinčių išvengti nepageidaujamo nėštumo (Stankevičius H., Klimas V., 2000). Mūsų tirtos tik 55 moterys (23,9 proc.) teigė vartojusios geriamuosius kontraceptikus, gal todėl mes nenustatėme patikimo ryšio tarp kontraceptikų vartojimo ir HSIL rodiklių.

Kai kurie autoriai skelbia neaptikę ryšio tarp kontraceptikų vartojimo stažo, ŽPV ir GKV (Flores, Bishai et al. 2008). Tiesioginę geriamųjų kontraceptikų įtaką HSIL išsivystymui sunku nustatyti. Tikriausiai gimdos kaklelio displazija labiau susijusi su aktyvesniu lytiniu gyvenimu, kadangi ši patologija dažniau aptinkama moterims, naudojančioms geriamuosius kontraceptikus, kurių sudėtyje daug estrogenų. Hormoninės kontracepcijos priemonės sukelia stulpinio epitelio eritemą ir edemą. Tai sudaro palankesnes sąlygas virusinei invazijai.

Dabar paauglėms skiriami kontraceptikai, kuriuose estrogenų koncentracija yra labai maža. Kai kontraceptikai skiriami gydymo tikslais (pvz., dėl anovuliacijos, gausių kraujavimų), jie slopina hiperestremiją ir subrandina atsparų transformacijos zonos epitelį, kurio ląstelės atsispiria ŽPV invazijai. Manoma, kad būtent todėl užsienio autorių straipsniuose vėlyvos menarche rodikliai daugiaveiksniėje statistinėje analizėje nepasitvirtina, nes paauglių mėnesinių ciklas paprasčiausiai yra laiku koreguojamas, sutrikimai išgydomi.

Mūsų darbe atlikta vienaveiksniė logistinė regresijos analizė parodė, kad moterims, kurių mėnesinės prasidėjo vėliau nei 14 m. amžiaus ($\text{ŠS}=1,89$, 95% PI: 1,07-3,33, $p=0,028$), turėjo didesnę galimybę susirgti HSIL. Tačiau daugiaveiksniėje logistinės regresijos analizėje šio veiksnio įtaka yra nežymi. Vienmomentinis tyrimas parodė, kad tos moterys, kurios neužilgo po menarches turi pirmuosius lytinius santykius yra didesnė rizika užsikrėsti ŽPV infekcija ir turėti gimdos kaklelio neoplaziją (Shew, Fortenberry et al. 1994; Kahn, Rosenthal et al. 2002; Collins, Mazloomzadeh et al. 2005). Aiškinama tuo, kad jaunų merginų gimdos kaklelio transformacijos zona yra didelė, „išsivertusi“ į išorę,

todėl ŽPV nesunku pasiekti gimdos kaklelio epitelinio bazinę membraną ir sukelti ląstelių metaplaziją.

Tyrimais nustatyta, kad paauglės, pradėjusios lytinius santykius neužilgo po pirmųjų menarche, turi didesnę riziką užsikrėsti ŽPV infekcija, o vėliau ir susirgti gimdos kaklelio vėžiu (Kahn, Rosenthal et al. 2002; Collins, Mazloomzadeh et al. 2005).

Aiškinama tuo, kad jaunų merginų gimdos kaklelio transformacijos zona yra didelė, liaukinis ir nesubrendęs stulpinis epitelis „išviręs“ į makštį, todėl žmogaus papilomos virusui nesunku patekti į plono gimdos kaklelio epitelio pamatinį sluoksnį ir jį infekuoti.

Kai lytiniai santykiai pradami iki pirmųjų menarche, rizika susirgti gimdos kaklelio vėžiu išauga iki 26:1. Jei lytinis gyvenimas pradamas nuo 16 metų, rizika susirgti GKV šiek tiek sumažėja - 16:1, o jei lytinis gyvenimas pradamas nuo 20 metų, santykinė rizika sumažėja iki 1:1 (Canavan and Doshi 2000; Lacey, Frisch et al. 2001).

Pastaraisiais metais pasirodė prieštaringų pranešimų, kuriuose nagrinėjama sąsaja tarp menarchės pradžios, moters užsikrėtimo ŽPV infekcija amžiaus ir CIN atsiradimo (Castle, Walker et al. 2005; Collins, Mazloomzadeh et al. 2005; Vaccarella, Herrero et al. 2006). Ankstesnių metų pranešimuose kai kurie autoriai teigė, kad menarche amžius ir ŽPV infekcija yra CIN rizikos faktoriai. Kiti autoriai nurodo, kad CIN atsirasti turi įtakos pirmųjų lytinių santykių amžius ir gimdymų skaičius, bet geriamųjų kontraceptikų vartojimas ir moters amžius pirmojo gimdymo metu nėra įvardijami kaip reikšmingi CIN2 rizikos faktoriai (Hildesheim, Herrero et al. 2001; Castle, Walker et al. 2005; Herrero, Castle et al. 2005).

Mes savo tyrimuose patikimo ryšio tarp lytinio gyvenimo pradžios, lytinių partnerių skaičiaus ir HSIL susirgimų dažnio nenustatėme.

Medicininiais rizikos veiksniais priklauso nesiskiepijimas nuo gripo ir negydyta ankstesnė gimdos kaklelio patologija. Mūsų tyrimas teigia, kad nė karto nesiskiepijusios nuo gripo moterys turi 11 kartų didesnę galimybę susirgti HSIL nei pasiskiepijusios (ŠS = 11,32; 95 proc. PI 2,23-57,51; p=0,003). Šį reiškinį aiškina gripo vakcinos imunostimuliaciniu veikimu, nes vakcina nuo gripo, kaip ir nuo ŽPV, veikia tuo pačiu principu, t.y. per tą patį IgG (Giannini, Hanon et al. 2006). Tačiau studijų, kuriose būtų

nagrinėjama panaši problema, neradome. Tai galėtų būti tolimesnių darbų kryptis. Kadangi klausėme tik apie skiepimąsi gripo vakcina, tai nežinome, galbūt panašius rodiklius gautume jei būtume klausę apie buvusią vakcinaciją hepatito B, C vakcina ir kt. Šis veiksnys gali būti siejamas su vienaveiksmėje analizėje rastu imunitetą stimuliuojančių priemonių nenaudojimu, apibendrinus - imunoprofilaktikos stoka.

Stresas darbe, šeimoje yra vienas iš rizikos veiksnių susirgti HSIL. Nors mes savo darbe ryšio tarp HSIL ir streso patiriame namuose ar darbe nenustatėme, remiantis kitų autorių atliktos studijos hipoteze, kad dažniau patiriamas stresas yra susijęs su silpnesniu T ląstelių atsaku į ŽPV (Fang, Miller et al. 2008).

Buvo manoma, kad ŽPV infekcija sukelia tik tranzitorinius minimalius gimdos kaklelio epitelio pokyčius (Grenko, Abendroth et al. 2000; Stoler and Schiffman 2001; Woodman, Collins et al. 2003). Vis dėlto kai ŽPV infekcija negydoma, virusas gali persistuoti ilgus metus ir po 10 arba daugiau metų sukelti CIN3 ir net invazinį vėžį. Literatūroje aptinkama duomenų, kad apie 10 proc. CIN1 atvejų ir 20 proc. CIN2 progresuoja į CIN3, o CIN3 nemažiau kaip 12 proc. atvejų transformuojasi į vėžį (Arends, Buckley et al. 1998; zur Hausen 2002; Woodman, Collins et al. 2003). ŽPV infekcijos persistencijai didelės reikšmės turi bendras organizmo imunitetas, jo sugebėjimas išsivalyti nuo infekcinio užkrato. Mūsų tirtos moterys, kurios atsakė, kad niekada nebuvo skiepytos nuo gripo, turėjo didesnę riziką susirgti HSIL. Tai paaiškinama gripo vakcinacijos jau minėtu imunostimuliaciniu veikimu. Mūsų atlikta analizė vienaveiksmės logistinės regresijos metodu taip pat patvirtino, kad imunitetas turi įtakos atsirasti HSIL, nes vartojančios imunostimuliantus moterys statistiškai patikimai mažiau sirgo HSIL ($p=0,029$).

Mes taip pat nustatėme, kad didesnė rizika susirgti HSIL yra toms moterims, kurioms anksčiau nebuvo gydytas gimdos kaklelis ($\text{ŠS} = 3,41$; 95 proc. PI 1,20-9,67; $p=0,021$). Kai kurie autoriai pateikia duomenis, kad moterys, kurios niekada nebuvo iširtos Pap tepinėlio metodu, turi dvigubai didesnę riziką numirti nuo GKV nei iširtosios ($\text{ŠS}=2,0$; 95 proc. PI 1,37-1,81). Nustatyta ir kita įdomi koreliacija, kai moterys, kurioms niekada nebuvo atliktas Pap testas, turėjo didesnę riziką susirgti GKV nei tos, kurioms Pap

tepinėlio metodu buvo nustatyta IPPNN diagnozė ($\check{S}S=1,21$; 95 proc. PI 1,0-1,25) (Odongua, Chae et al. 2007; Lee, Wark et al. 2008).

Taigi remiantis mūsų tyrimų duomenimis, galima daryti išvadą, kad papildomų imunitetą stimuliuojančių medikamentų nevartojimas ir gimdos kaklelio negydymas yra medicininiai rizikos veiksniai susirgti HSIL, susiję su sveikatos švietimo stoka.

Abortų ir gimdymų skaičius nors ir siejamas su gimdos kaklelio ryškiais intraepiteliniais pokyčiais (Evans, Krivchenia et al. 2002; Munoz, Franceschi et al. 2002), tačiau mes savo darbe šio ryšio nenustatėme. Galbūt todėl, kad yra nedidelis gimdymų skaičius bendroje populiacijoje- 2005m. 1000 gyventojų teko 9 gimdymai (World Health Organization. 2008). Mūsų tyrime dalyvavusios moterys vidutiniškai buvo gimdžiusios 2 kartus.

Kitų socialinių bei medicininių veiksnių patikimo ryšio su HSIL dažnio rodikliais mums nepavyko nustatyti, nors literatūroje aptinkami kontroversiški teiginiai.

Visoms 459 moterims buvo atlikti gimdos kaklelio nuograndų laboratoriniai tyrimai Pap tepinėlio metodu. Mes savo tyrimuose taikėme skystų terpių Pap tepinėlio metodą (PapSpin ir GynoPrep). Iki šių metų Lietuvoje buvo taikomas tik įprastinis Pap tepinėlio metodas, kai nuograndos nuo gimdos kaklelio yra pernešamos tiesiai ant objektyvinio stiklelio. Įprastinis metodas turi trūkumų, kadangi nuograndos gali būti paimtos aktyvaus uždegimo fone, tepinėlio sluoksnis gali būti storas, kraujingas arba užterštas pašalinėmis medžiagomis, jame gali susidaryti artefaktai dėl džiovavimo patalpos sąlygomis. Visų šių klaidų galima išvengti naudojant skystų terpių Pap tepinėlio metodą.

Daugumai moterų citologiniu testu patologijos nebuvo aptikta, o 107 moterys buvo nusiųstos į stacionarą gimdos kaklelio audinių biopsijai. Biopsinės medžiagos histologinis tyrimas yra vertinamas kaip „auksinis standartas“, kuriuo remiantis arba atmetama, arba patvirtinama gimdos kaklelio patologija. Kai etaloninis testas yra biopsinės medžiagos histologinis tyrimas, mūsų skystų terpių citologinio tyrimo metodo (tiriant ekspertui) jautrumas yra 98,0 proc., specifiškumas 48,4 proc., teigiama prognozinė vertė 75,4 proc., neigiama prognozinė vertė 93,8 proc., o netinkamų vertinti tepinėlių 3,7 proc. Tai gana aukšti rodikliai, vis dėlto reikia nepamiršti, kad buvo

kryptingai atrinkta sergančiųjų pacienčių grupė, todėl vertinti kaip populiacinio ar geresnio nei įprastinis Pap tepinėlis testo negalima. 2008m. Valstybinio patologijos centro citopatologijos skyriaus metinėje ataskaitoje yra pateikiama, kad Pap testo jautrumas 61 proc., o specifiškumas 92 proc., o netinkamų vertinti tepinėlių yra 6,2 proc.

Turint tai omenyje, mes negalime teigti, kad skystų terpių citologijos (STC) metodika yra žymiai vertingesnė už įprastinį Pap testą. Dėl STC tyrimo metodo pastaruoju metu yra daug diskutuojama. Yra nuomonių, kad skystų terpių metodas, nederinant jo su papildomais tyrimais, pavyzdžiui, ŽPV nustatymu, nėra jautresnis nei įprastinis Pap testas (Ronco, Segnan et al. 2006; Arbyn, Bergeron et al. 2008). Vis dėlto autoriai teigia, kad taikant skystų terpių metodiką, Pap tepinėlio tyrimo jautrumas išaugo nuo 65 iki 80 proc., tačiau specifiškumas sumažėjo nuo 95 iki 75 proc.

Biopsinės medžiagos histologinis tyrimas, nors ir yra etaloninis būdas diagnozuoti gimdos kaklelio neoplazijas, vis dėlto yra invazinis metodas, reikalaujantis specialių sąlygų. Mes lyginome citologinių tepinėlių ir histologinių preparatų imunocheminių tyrimų rezultatus. Mūsų tikslas buvo išaiškinti, ar galima pasikliauti imunocitocheminių tyrimų rezultatais, apsieinant be biopsijos procedūros ir imunohistocheminių tyrimų. Preparatuose buvo ieškoma DR ŽPV ir išgyvenamumo susirgus GKV žymens - baltymo p16^{INK4a}.

Imunocitocheminio tyrimo rezultatai parodė, kad tarp baltymo p16INK4a rodiklių ir diagnozės sunkumo laipsnio egzistuoja stiprus ryšys. Kai tepinėliuose nebuvo aptinkama baltymo p16INK4a, tai ir citologinio tyrimo diagnozė buvo IPPNN. Tik vienu HSIL atveju baltymo p16 nebuvo aptikta. Ir priešingai, kai moterims buvo nustatomas teigiamas baltymo p16INK4a testas, tai ir diagnozė dažniausiai buvo HSIL. Vis dėlto viena moteris neturėjo jokių patocitologinių pokyčių, nors baltymo testas buvo teigiamas.

Gimdos kaklelio biopsinės medžiagos imunohistocheminiais tyrimais taip pat nustatėme, kad tarp histologinio tyrimo duomenų ir baltymo p16INK4a raiškos rodiklių egzistuoja tiesioginis ryšys. Iš 14 moterų, sirgusių GKV, net trylikai nustatytas teigiamas p16INK4a testas. Taigi mūsų imunohistocheminiai tyrimai pakartojo imunocitocheminių tyrimų

rezultatus. Vadinasi, imunocitocheminio tyrimo rezultatais galima pasikliauti. Kai Pap tepinėlio metodu buvo nustatyta CIN2+ diagnozė, baltymo p16INK4a tyrimo metodo jautrumas yra 87 proc., o teigiama prognozė 93 proc. Tai reiškia, kad pagal baltymo p16INK4a tyrimo rezultatus (p16 teigiamas) teisingai galima diagnozuoti 93 proc. atvejų. Metodo specifiškumas taip pat labai aukštas – 92 proc.

Remdamiesi mūsų tyrimų duomenimis, galime teigti, kad baltymo p16INK4a nustatymas imunocitocheminiu metodu gimdos kaklelio neoplazijai aptikti yra labai vertintinas ir šiuolaikiškas tyrimo metodas. Šis metodas gali pakeisti daug sudėtingesnę imunohistocheminį tyrimą.

Daugiau nei 90 proc. gimdos kaklelio vėžio atvejų būtų galima išvengti, jei moterys dalyvautų prevencijos programoje. Vis dėlto dalyvavimas šioje programoje nė vienoje šalyje nėra šimtaprocentinis. Lietuvoje per pirmuosius trejus patikros metus Pap tepinėlio tyrimams atvyko tik 44 proc. moterų, 2008 m.- 55 proc., kitose EU šalyse šis procentas svyruoja nuo 10 iki 79 proc. JAV Nacionalinio sveikatos instituto duomenimis, net 50-60 proc. moterų sąmoningai ignoruoja patikros programą ir joje nedalyvauja. Neįtikėtina, bet labai daug moterų savo nedalyvavimą patikros programoje pateisina tuo, kad patiria gėdą ir jaučiasi nemaloniai, kai jas apžiūri ginekologas, taip pat prastomis susisiekimo sąlygomis, informacijos apie patikros programą stoka, laiko trūkumu ir kt. Ypač ginekologinių apžiūrų bijo ir vengia jaunos moterys (Branoff, Santi et al. 1997; Fitch, Greenberg et al. 1998). Taigi faktinė situacija yra tokia, kad didžiausias gimdos kaklelio vėžio rizikos veiksnys yra pačių moterų nenoras reguliariai lankytis pas ginekologą ir nesuvokimas, kad profilaktiniai patikrinimai yra itin svarbūs ankstyvai GKV ankstyvai diagnostikai. Turint visa tai omenyje, reikia galvoti apie naujų savityros metodų sukūrimą, kai būtų ištiriami gimdos kaklelio ir makšties tepinio medžiagos ar nuoplovų mėginiai, eliminuojant ginekologo dalyvavimą. Būtų galima paruošti specialius testus, kad moteris pati juos galėtų atlikti pati. Nuoplovose būtų ieškoma ne tik vėžinių displastinių ląstelių, bet, svarbiausia, būtų tiesiogiai įvertinami ikivėžio/vėžio žymenys. Iktivėžio ir vėžio žymenų paieškos ir jų nustatymas šiuolaikiniais diagnostikos metodais įgauna vis didesnę pagreitį. Vėžio žymenys dažniausiai yra baltyminės molekulės,

enzimai bei amino rūgštys, kuriuos produkuoja vėžinės ląstelės. Šie markeriai gali būti aptinkami citologiniuose ir histologiniuose vėžio preparatuose, kraujyje, limfoje, kaulų čiulpuose, šlapime, ascito skystyje ir kt. Žymenų tyrimai suteikia galimybę studijuoti vėžinio proceso ir progresijos mechanizmus (Gray and Herrington 2004; Syrjanen 2005; Yim and Park 2006), tačiau klinacistams žymenų rodikliai yra svarbūs tuo, kad jie gali būti panaudojami kaip kriterijai, diagnozuojant ankstyvą patologiją ir stebint gydymo bei ligos eigą, ypač atokiems gydymo rezultatams įvertinti.

Skystų terpių Pap tepinėlio metodas yra pranašesnis tuo, kad likusi po centrifugavimo gimdos kaklelio nuograndų mėginio skystoji dalis (supernatantas) puikiai tinka papildomiems tyrimams optiniais ir molekuliniais proteominiais metodais, ieškant žymenų, ir suteikia labai daug vertingos informacijos, padedančios aptikti patologiją.

Lietuvoje iki šiol supernatantų tyrimai, ieškant gimdos kaklelio neoplazijos žymenų, nebuvo vykdomi. Mes supernatantų mėginiuose ieškojome žymens p16INK4a. Šį žymenį pasirinkome ne atsitiktinai. Šis žymuo yra pripažintas didelės rizikos ŽPV infekcijos žymeniu. Baltymas p16INK4a buvo nustatinėjamas optiniais metodais, taip pat biocheminiais proteominiais būdais. Sergančių HSIL moterų supernatantų mėginiuose galima aptikti ir įvairių kitų vėžio žymenų. Mums, pavyzdžiui, pavyko aptikti 405-420 nm ruožo fluorescenciją. Esant 355nm žadinimui ir atsakui 405-424 nm diapazone autofluorescencija geriausiai atskiriama IPPNN grupė ($p=0,0003$). Šioje juostoje ir yra būdinga autofluorescencija elastinui, estronui, tirpiam kolageniui. Deja, šiame fluorescencijos ruože negalėjome HSIL atskirti nuo uždegimo.

Elastinas taip pat kaip ir elastino peptidai yra potencialūs metastatinių procesų inhibitoriai, eksperimentiniuose navikų modeliuose. Tirpus elastinas ir elastino degradacijos produktai tokie kaip elastino peptidai indukuoja vėžinių ląstelių judėjimą tarpininkaujant 67 kDa elastino receptoriui. Yra nuomonių, kad elastino degradacijos produktai gali stimuliuoti ekspresiją MMP-2 ir MT1-MMP taip pat kaip TIMP-2 padidindami vėžinių ląstelių degradaciją (Chang, Cartwright et al. 2009).

Syrjanen ir bendraautoriai, iš 13 reikšmingų CIN2+ diagnostikai žymenų gautų atlikus vienaveiksnę logistinę regresijos analizę, daugiaveiksne analize patvirtino tik tris:

1. VEGF-C (angiogenezę atspindintis žymuo);
2. LR67 (Laminino receptorius);
3. PCNA (proliferacijos žymuo);

Išgyvenamumo, susirgus gimdos kaklelio vėžiu, prognostiniai žymenys yra:

1. TIMP-2 (metaloproteinazės);
2. mm2₃ (metastatinis žymuo);
3. p16^{INK4A} (regulatorius ląstelės ciklo);

(Syrjanen 2009).

Kadangi visų 13 žymenų panaudojimas CIN diagnostikoje būtų sudėtingas ir brangus, užtektų naudoti tik du, t.y. invaziją atspindintį žymenį LR6₇ ir angiogenezę VEGF-C. Jei naudotume šiuos žymenis patikroje teorinis testo specifiškumas ir teigiama prognostinė vertė galėtų siekti 100%. Teorinė todėl, kad šie žymenys rasti jau esant CIN, todėl nežinia kokie būtų rodikliai naudojant bendroje populiacijoje (patikroje). Tačiau žiūrint į ateitį molekuliniai žymenys bus naudojami patikroje (Crum, Abbott et al. 2003).

Yra du pagrindiniai požymiai apibrėžiantys piktybinį naviką, tai invazyvumas ir sugebėjimas plisti (metasatzuoti) į kitus organus.

Vėžinių ląstelių patekimo pro pamatinę plėvelę (invazija) yra trys pagrindiniai žingsniai:

1. Vėžinių ląstelių sąveika su specifiniais pamatinės plėvelės paviršiaus receptoriais.
2. Pamatinės plėvelės suskaidymas išskirtais proteolitiniais fermentais.
3. Vėžinių ląstelių migracija į gretimus audinius, patekimas į kraują, limfą ir metastazuojant į kitas organizmo vietas (Liotta, Steeg et al. 1991).

Kadangi ŽPV yra pagrindinis gimdos kaklelio vėžio ir ikivėžinių būklių veiksnys, tai viruso infekuotų ir ryškiai neoplastiškai pakitusių ląstelių patekimas pro bazinę membraną ir sąlygoja invazinio proceso vystymąsi.

IV tipo kolagenas sudaro ne skaidulas, o lakštus. Tai svarbus pamatinės plėvelės komponentas. Kolagenas aptinkamas tik tarpląsteliniam užpilde. Kolageno tinklas kaip armatūra sutvirtina lamininą, kuris yra pagrindinis pamatinės plėvelės komponentas.

Struktūrinių komponentų ir antioksidantų sumažėjimas, lipidų padidėjimas esant CIN2+, lytinių hormonų, jų pirmtakų ir metabolitų dalyvavimas CIN 2+ raidoje patvirtina

gimdos kaklelio tepinėlio supernatanto autofluorescencijos spektrų komponentų skirtumus-esant IPPNN, uždegimui ir ikivėžinei būklei.(Chang, Cartwright et al. 2009).

Mūsų atliktame supernatanto fluorescencijos tyrime, ikivėžiniuose audiniuose pakitę apykaitos procesai atsispindi ir autofluorescencijos spektruose, lyginant juos su nepakitusiais. Tai ir lemia autofluorescencijos metodo tinkamumą taikyti ikivėžinių pakitimų diagnostikai.

Fluorescuojančios biologinės molekulės yra labai sudėtingos, jas sudaro keletas pagrindinių komponentų. Audinių fluorescencijos spektrai dažniausiai yra šių komponentų suma. Pagrindiniai gimdos kaklelio audinių chromoforai yra NADH, elastinas, FAD ir kolagenas. Amino rūgštis triptofanas, esanti daugelio baltymų sudėtyje ir daugiausiai aptinkama mitochondrijose, dominuoja fluorescencijos spektruose, kai žadinama trumpesnėmis nei 300 nm bangomis. Kolagenas ir elastinas, esantys jungiamajame audinyje, pasižymi fluorescencijos maksimumais atitinkamai ties 390 ir 410 nm. Nikotindinukleotido (NADH), esančio ląstelės citoplazmoje ir mitochondrijose, fluorescencijos maksimumas ties 470 nm, žadinant 355 nm, o porfirinų grupės pigmentų - ties 610-635 nm ir 670 nm. Karotinoidai, flavinadenindinukleotidas (FAD), keratinas pasižymi melsva fluorescencija, esant sužadanimui 337 nm bangomis.

Optiniu metodu buvo ištirti 459 moterų supernatantų mėginiai. Kiekvieno mėginio fluorescencijos spektrai buvo matuojami laboratoriniu spektrometru naudojant tris žadinimo bangos ilgius: 290 nm, 300 nm ir 310 nm. Spektrai buvo užrašomi nuo 330 iki 550 nm juostoje. Optinių tyrimų rezultatai tolimesnei analizei buvo tinkami ne visi. Tik 181 mėginio spektrinio tyrimo duomenys atitiko visus reikalavimus (iš viso 543 spektrai). 57 supernatantų mėginių buvo ištirti VU Taikomųjų mokslų institute tikslingai sukurtu lietuvišku portatyviniu 355 nm bangų ilgio mikrolazeriu STA-01 su spektrometru „AvaSpec-2048TEC-USB2, Avantes“. Dalis mėginių panaudota diagnostinės metodikos kūrimui, o 18 išdžiovintų mėginių ši metodika pritaikyta.

Sunku patikimai atskirti IPPNN ir HSIL (CIN2+) citologinių grupių supernatantus, žadinant 290 nm lempiniu spektroskopu >379nm emisijos juostoje ($p < 0,05$; AUC 0,69, Jautrumas 0,72, Specifiškumas 0,65- žemi rodikliai).

Mikrolazeris, kurį galima panaudoti prie paciento lovos, t.y. už laboratorijos ribų, esant 355nm žadinimui, patikimiausiai skiria išdžiovintose supernatanto nuosėdose IPPNN ir HSIL grupes ($p < 0,001$; AUC 0,96, Jautrumas 0,91, Specifiškumas 1,000).

Ultravioletinė spinduliuotė gyviems organizmams yra pavojinga dėl galimo baltymų ir DNR struktūros pažeidimų. Kuo trumpesnės bangos, tuo pažeidimo pavojus didesnis, nes trumpėjant bangoms, adekvačiai didėja spinduliuotės kvanto energija. Žinant, kad žadinimas ilgesnėmis bangomis yra mažiau pavojingas gyviems audiniams, 337nm ir 365 nm bangos yra taikomos tiriant gyvuosius audinius (Palsson, Stenram et al. 2006). Tyrimams naudoti mikrolazerį STA-01 būtų patogiu ir todėl, kad tėvyninis mikrolazeris su spektrometru yra nedidelių matmenų ir portabilus, tyrimus būtų galima atlikti tiesiogiai prie paciento, pirmojo apsilankymo pas gydytoją metu. Be to šis lazeris yra sukurtas ND YAG kristalo pagrindu, todėl jo žadinimo bangos ilgį galima būtų keisti, pvz., žadinti 266, 532nm nm bangomis.

Pažangiausi šviesos diodai (šviestukai) yra šiuolaikinių technologijų produktas, skleidžiantys daugelio bangų ilgio šviesą. Juos visus galima įkomponuoti į miniatiūrinius prietaisus, tinkamus klinikiniam tiesioginiam naudojimui paciento apžiūros metu, arba mikroskopo optinėje sistemoje. Diodai švyti silpniau bei skleidžia platesnio ruožo šviesą, todėl abu šviesos šaltiniai yra įvairiai derinami siekiant mažų apimčių ir tinkamo apšvitinimo.

Gimdos kaklelio nuograndų supernatante yra matoma ląstelių švytinčia citoplazma ir švytinčių apvalkalų, bei gleivių. Šie elementai išdžiovinto supernatanto nuosėdų mėginyje sudaro fluorescencijos šaltinį. Taigi fluorescencinės spektroskopijos metodu galima vertinti ne tik epitelio ląsteles, bet ir kitus šluotele surinktus gimdos kaklelio paviršiaus molekulinis fluorescuojančius elementus. Optinis supernatanto tyrimas gali papildyti citologinio tyrimo duomenis, fluorescencinė spektroskopija gali būti taikoma pacientės tyrimo vietoje dar iki citologinio ištyrimo.

Tobulinant gimdos kaklelio vėžio diagnostiką, toliau ieškoma genų ir baltymų, kurie gali veikti kaip biologiniai žymenys ir vaidinti tam tikrą vaidmenį naviko progresavime. Navikinių darinių diagnozavimas ir tikslus naviko ribų nustatymas susijęs su fluoroforų

koncentracijų pokyčiais (triptofano, porfirino), struktūriniais pakitimais (kolagenas, elastinas), kvėpavimo grandinės aktyvumu (NADH, flavinai) arba visų šių pokyčių deriniais (Van Dam J, Bjorkman DJ., 1996).

Yra 2 pagrindiniai audinių fluoroforai - NADH ir kolagenas. Šios dvi medžiagos yra rekomenduojamos naudoti kiekybiniam biomarkerių fluorescencijos vertinimui, diagnozuojant gimdos kaklelio displaziją in vivo (Georgakoudi, Levitt et al. 2005).

Gimdos kaklelio diagnostika optiniais metodais, užsienio klinikose taikoma jau keletą dešimtmečių. Mūsų atlikti supernatanto autofluorescencijos spektrometriniai tyrimai yra pirmieji mums žinomi bandymai pritaikyti šį metodą skystiniam tepinėliui (Vaitkuvienė, Auksorius et al. 2004). Anksčiau VU Medžiagotyros institute tirta sauso tepinėlio fluorescencija gimdos kaklelio kitimams neštumo ir gimdymo metu įvertinti, su mūsų autofluorescencijos supernatante tyrimu (Vaitkuvienė, Kurilcik et al. 2007) publikuota ir skystinio tepinėlio supernatanto absorbcijos tyrimo infraraudonoju sužadinimu medžiaga (Walsh, Singh et al. 2008).

Įvertinant mūsų tyrimų duomenis, galime teigti, kad supernatantų analizė, taikant žadinimą 355 nm bangomis lietuvišku portatyviniu mikrolazeriu STA-01 su spektrometru „AvaSpec-2048TEC-USB2, Avantes“, yra perspektyvus tyrimo metodas, taikytinas gimdos kaklelio patologijos tiesioginei diagnostikai „prie paciento lovos“ ir citologijos laboratorijoje lygiagrečiai su mikroskopija.

Vis dėlto reikia nepamiršti, kad tiriant supernatantų mėginius optiniais metodais būtina atsižvelgti į kai kurias žinomas aplinkybes. Visų pirma, skenuojant praskiestų gleivių mėginius ir ištyrus perdavimo-skvarbos (*transmission*) spektrus (registracija 1 nm žingsniu 250-700 nm bangų srityje), nustatyta, kad baltymams būdinga stipri absorbcija-sugertis žemiau 300 nm bangų ribos. Regimojoje spektro dalyje absorbcijos-sugerties juostų neaptinkama, tačiau skvarbos spektras monotoniškai mažėja trumpėjant bangai. Tiriant 337 nm lazeriniu žadinimu pro gleives prasiskverbia tik 40 proc. pradinės spinduliuotės. Ši kliūtis atsiranda sugerties tyrimuose.

Antra, kai praskiestų gleivių fluorescencijos sužadinimo-emisijos matrica (EEM) registruojama spektrofluorimetru (žadinimas 250-550 nm bangomis kas 10 nm, emisija

registruojama kas 5 nm), stipriausia fluorescencija užfiksuojama ties triptofano juosta (sužadinimas 280 nm, emisija 340 nm), mažesni intensyvumai aptinkami ties NADH (atitinkamai 350/450) ir FAD (atitinkamai 280/340) juostomis. Mūsų atlikti supernatanto EEM patvirtina šiuos duomenis (Vaitkuvienė, Kurilcik et al. 2007).

NADH fluorescencija gyvuose displastiniuose audiniuose yra intensyvesnė nei sveikuose. Pastebėta, kad displastiniuose gimdos kaklelio audiniuose yra sumažėjusi autofluorescencija kolageno ir suintensyvėjusi NADH (Drezek, Sokolov et al. 2001; Georgakoudi, Jacobson et al. 2002). Mes tyrėmė negyvus audinius, todėl NADH fluorescencijos skirtumų IPPNN ir HSIL (CIN2+) grupėse neradome galutinėje 18 tyrimų serijoje, nors mokomojo bandymo metu jie nustatyti (Vaitkuvienė, Kurilcik et al. 2007).

Mikrogardelių ir elektroforezės metodais, taip pat Western bloto testu buvo ištirti dešimties moterų supernatantų mėginiai. Moterims Pap tepinėlio metodu jau buvo diagnozuota HSIL, o ištyrus jų biopsinę medžiagą histologiškai patvirtinta CIN 2+ diagnozė.

Mikrogardelių (biolustų) metodu supernatantų mėginiuose taip pat buvo ieškoma žymens p16^{INK4a}. Pagrindinis šio tyrimo tikslas – patikrinti mikrobiolustų technologijomis paremto metodo tinkamumą markerio p16^{INK4a} detekcijai citologinio mėginio supernatante. Fiziologinis tirpalas gimdos kaklelio nuograndų nuskalavimui buvo pasirinktas tam, kad būtų išvengta baltymų degradacijos. Yra žinoma, kad terpės alkoholio pagrindu baltymų išlaikymui nėra tinkamos.

Tiriant mėginius, buvo stengiamasi minimizuoti pašalinius veiksnius, galinčius turėti įtakos tyrimo rezultatams. Tyrimai parodė, kad identifikuojant sunkesnio laipsnio CIN atvejus, supernatantų mėginiuose tirpus baltymo p16^{INK4a} fluorescencinė detekcija nėra pakankamai jautri. Trijuose supernatantų mėginiuose, kai jau buvo žinoma tiksli citologinė ir histologinė diagnozė, užregistruoti signalai buvo žemiau foninio lygio, o keturiais atvejais fluorescencijos iš viso nebuvo aptikta. Iš šių 7 mėginių tik trijuose buvo aptikta ŽPV infekcija. Tik trijuose mėginiuose mikrolustų metodu buvo nustatytas aukštas p16^{INK4a} raiškos lygmuo. Tokius tyrimo rezultatus paaiškinti sunku, nes visi kiti patologinės situacijos duomenys buvo panašūs ir jau žinomi, o baltymo p16^{INK4a}

imobilizacija ir vaizdinimas buvo atliekami identiškais sąlygomis. Gali būti, kad mūsų tyrimuose mikrolustų metodu buvo pasirinkta neadekvati mėginio paėmimo arba paruošimo metodika. Tyrimuose mikrogardelių metodu baltymas p16INK4a buvo aptiktas 6 moterims iš 10 (60 proc.), iš jų 3 užregistruoti labai silpni signalai. Nežiūrint to, galima drąsiai teigti, kad biolustų metodą galima taikyti supernatantų mėginiams tirti vėžinių žymenų nustatymo tikslu (pvz., baltymo p16INK4a).

Šiuo metu gimdos kaklelio vėžio diagnostikai taikomi metodai turi akivaizdžių trūkumų. Visa tai skatina ieškoti naujų biomarkerių, tobulinti jau esamus patikros testus arba kurti naujus, remiantis moderniomis technologijomis. Baltymų mikrolustų technologijos gali pasitarnauti vystant analizės metodikas kiekybinei vieno ar kelių iš karto biomarkerių detekcijai arba lyginamajai daugelio mėginių viename bandinyje analizei. Dėl šių galimybių biolustų technologijos turi privalumų prieš kitus metodus, naudojamus biomarkerių tyrimuose, pavyzdžiui, masių spektrometrija, 2-D elektroforezė, 2-D Western blotas ir ELISA. Įvairių baltyminių skysčių tyrimas mikrolustų metodu yra pranašesnis už analogišką audinių tyrimą. Pastarasis suteikia galimybę atlikti tik pusiau kiekybinę baltymų analizę, tuo tarpu kai baltymų mikrolustų technologijos tinka analizuoti sudėtingiems mėginiams (ląstelių lizatai, serumas, plazma) ir juose kiekybiškai įvertinti iš karto viso rinkinio biomarkerių koncentracijų santykinis pokyčius. Lustų technologijomis paremti metodai pasižymi dideliu jautrumu ir atsikartojamumu, todėl jie leistų praplėsti klinikinės diagnostikos galimybes ir kokybę, kartu sumažinant ir tyrimų kaštus.

Visų baltymų biolusto konstravimo etapų standartizavimas yra vienas iš didžiausių iššūkių, norint pritaikyti šį metodą klinikinuose tyrimuose. Eksperimentų pakopų sąlygų suvienodinimas ir valdymas visų parametru, turinčių įtakos rezultatams, leistų lyginti skirtingų laboratorijų arba net atskirų mėginių duomenų rodiklius, to paties mėginio domenais, taip pat eksperimentus, atliktus skirtingu laiku ir t.t. (Aguilar-Mahecha, Hassan et al. 2006). Jau yra žinoma, kad net mėginių paėmimo protokolo kai kurie niuansai gali turėti įtakos rezultatams, pavyzdžiui, Papette šepetėlių palikus nuskalavimo terpėje ilgesnį laiką, aptinkamos didesnės p16^{INK4a} koncentracijos.

Kad ir kokie kuklūs yra mūsų tyrimai mikrolustų technologijomis, jie patvirtina, kad supernatantas tinka papildomiems optiniams ir molekuliniais tyrimams. Lustų formatas yra tinkamas baltymo p16^{INK4a} analizei kompleksiniuose biologiniuose tirpaluose. Būtinai tolimesni bandymai, taikant pakoreguotą supernatanto mėginio paruošimo schemą, būtina įvertinti foninę baltymo p16^{INK4a} koncentraciją, padidinti mikrolustais paremtos detekcijos jautrumą ir patikimumą. Tikimasi, kad mikrolustais paremtos technologijos bus tinkamos ultrajautriai, sudėtingai, labai specifinei detekcijai baltymų, kurių ląstelėse yra maži kiekiai. Sudėtinė kelių baltymų kiekybinė analizė labai praplėstų klinikinės diagnostikos galimybes ir padėtų suprasti daugelio susirgimų mechanizmus. Taip pat šios technologijos suteiktų galimybę sukurti naujus gimdos kaklelio patologijos testavimo būdus.

Į klausimą, ar šis tyrimo metodas galėtų būti taikomas baltymo p16INK4a paieškai makšties ir gimdos kaklelio nuoplovų mėginiuose savitikros tikslu, atsakymą bus galima duoti tik surinkus pakankamai klinikinės medžiagos, nors vilčių yra jau dabar.

Supernatanto biocheminė proteominė analizė šiuolaikiškais molekulinio lygmens elektroforezės ir Western bloto metodais buvo atlikta tik keturiolikai moterų. Moterys buvo tiriamos stacionaro sąlygomis, visoms pakartotinai buvo imami gimdos kaklelio nuograndų mėginiai, tačiau nuograndos nuskalaujamos ne buferyje, o 0,9 proc. NaCl tirpale be jokių konservantų ir inhibitorių, kad vėliau nuograndų mėginių supernatantus būtų galima tirti proteominiais metodais. Šiems tyrimams buvo naudojamas 2 kartus centrifuguotas supernatantas. Moterys jau buvo ištirtos dėl ŽPV. Virusų DNR testas buvo teigiamas 6 ligonėms, penkioms iš jų aptiktas aukštos rizikos grupės ŽPV 16 tipas.

Dvidimensinės elektroforezės metodu supernatanto baltymai pirmiausia buvo frakcionuoti pagal molekulinę masę (žiūr. 25A pav.). Susidariusi baltymų juosta gelyje ties 15 skalės padala reiškė, kad mėginyje gali būti baltymo p16INK4a. Tokiai prielaidai patvirtinti mėginio tyrimas buvo tęsiamas Western bloto metodu, panaudojant specifinį antikūną (žiūr. 25B pav.). Pagal Western bloto metodiką mėginys buvo veikiamas pelės monokloniniu anti-p16^{INK4a} antikūnu. Kai mėginyje būdavo baltymo p16INK4a,

susidarydavo antigeno-antikūno kompleksas, kuris gelyje virš 15 kDa suformuodavo 3 fragmentus.

Žemas gimdos kaklelio atrankoje stebimas citologinio testo jautrumas ir ŽPV testo specifiškumas verčia ieškoti naujų tikslių tyrimo metodų gimdos kaklelio patikrai.

Atlikti tyrimai kitų autorių rodo, kad p16 INK4a baltymo nustatymą ląstelėje kombinuojant su *Hybrid capture* metodu, kuris nustato ŽPV infekciją, galima pasiekti jautrumą 91,8 proc. (95% PI, 79,1-100) ir specifiškumą 86,0 proc. (95% PI, 82,0-89,0) CIN2+ diagnostikoje (Balasubramanian, Hughes et al. 2009). Taip pat nurodoma, kad šis žymuo ypatingai gerai koreliuoja su ŽPV 16 ir 58 tipu ($p=0,007$) (Nam, Kim et al. 2008). Kitų autorių nuomone, bet kurio tipo okogeninis ŽPV koreliuoja su p16 INK4a nustatymu ląstelėje (Fujii, Saito et al. 2008). Mūsų atliktoje studijoje taip pat gavome gerą koreliaciją tarp šio baltymo ir ŽPV 16 tipo. Tai patvirtina ir kiti autoriai, kurie nurodo, kad ŽPV infekcijos nustatymas ir p16 INK4a superekspresija ląstelėje yra patvirtinantys HSIL diagnozę faktoriai (Lakshmi, Rema et al. 2009).

Kinijoje atliktas tyrimas ($n=1356$) parodė, kad daug dėmesio skiriama šiam žymeniui ir manoma, kad šis žymuo ateityje gali būti panaudotas gimdos kaklelio patikroje. Šioms Pacientėms atlikta skystų terpių citologija (ThinPrep) ir paimta tamponu išskyros nuo gimdos kaklelio. Rezultatai sulyginami, pasirodė, kad STC tepinėlio jautrumas diagnozuojant gimdos kaklelio displaziją ir gimdos kaklelio vėžį buvo atitinkamai 82,93 proc. ir 88,11 proc. Tuo tarpu p16 INK4a žymuo nustatytas ELISA metodu su gimdos kaklelio patologija siejosi 87,80 proc. ir 92,43 proc. atitinkamai. Palyginus gautus rezultatus, gautas statistiškai patikimas skirtumas ($p < 0.001$) (Ding, Zou et al. 2008).

Metaanalizė 61 straipsnio, kurie išnagrinėjo šio žymens jautrumą ir specifiškumą padarė išvadą, kad p16 INK4a žymuo labai gerai siejasi su citologine ir histologine patologija. Tarp IPPNN tik 12 proc. (95% PI, 7-17 proc.) buvo teigiamas, tuo tarpu esant HSIL jis buvo teigiamas 89 proc. (95% PI, 84-95 proc.). Lyginant su histologine diagnoze 68 proc. CIN2 (95% PI, 44-92 proc.) ir 82 proc. CIN3 (95% PI, 72-92 proc.) atvejais buvo teigiamas (Tsoumpou, Arbyn et al. 2009).

Esant p16 ir aukštos rizikos ŽPV rekomenduojama atlikti biopsiją (Ordi, Garcia et al. 2009).

Taip pat randamas tiesioginis ryšys tarp aukštos rizikos ŽPV viruso krūvio (kiekio) ir p16 kiekio ląstelėje (Sung, Kim et al. 2009). Todėl galbūt dėl to mes negavome pakankamai aukštos sąsajos tarp citologinių pakitimų ir p16 baltymo nustatymo mikrogardelių metodu.

Neabejotinai CIN progresijos rizikai numatyti reikalingi papildomi molekuliniai testai-žymenys, kurie leistų nustatyti CIN laipsnį (Kruse, Baak et al. 2002; Baak 2006; Dehn, Torkko et al. 2007).

Taigi šiuolaikišku molekulinio lygmens tyrimu mums pavyko aptikti supernatante žymenį p16 INK4a. Kai pabandėme palyginti proteominių tyrimų duomenis su kitų tyrimo metodų rezultatais, pastebėjome, kad elektroforezės rodikliai labiau sutampa su mikrogardelių tyrimų duomenimis. Ypač pažymėtini tie trys atvejai, kai buvo gauti santykinai stiprūs žymens fluorescencijos signalai, o foniniam p16^{INK4a} lygmeniui detektuoti pritrūko jautrumo. Taigi ir biocheminiais proteominiais tyrimais buvo patvirtinta, kad supernatanto mėginiai tinka vėžio diagnostiniams tyrimams. Tačiau tikslinga atlikti didesnės imties tyrimus, kurie patvirtintų, kad šį testą galima pritaikyti gimdos kaklelio intraepitelinių pokyčių diagnostikoje.

Tolimesni eksperimentai, su pakoreguota mėginio paruošimo schema, yra reikalingi, kuriais būtų įvertinta aiški foninė baltymo p16^{INK4a} koncentracija, padidintas mikrolustais paremtos detekcijos jautrumas ir patikimumas. Režiumuojant galima pasakyti, kad baltymų lustų formatas yra tinkamas p16^{INK4a} analizei kompleksiniuose biologiniuose tirpaluose. Tikimasi, kad mikrolustais paremtos technologijos bus tinkamos ultrajautriai, sudėtingai, labai specifinei detekcijai baltymų, kurių ląstelėse yra palyginti maži kiekiai. Šios technologijos yra neabejotinai svarbi ir aktuali tyrimų sritis, kadangi biožymenų prognozuojamoji vertė dažnai yra gana abejotina, todėl sudėtinė kelių baltymų kiekybinė analizė labai praplėstų klinikinės diagnostikos galimybes ir padėtų suprasti daugelio susirgimų mechanizmus.

Būtina prisiminti, kad už programos rėmų lieka socialiai pažeidžiama moterų grupė - nedraustos moterys. Neturinčios socialinio draudimo moterys apie profilaktinę patikrą neinformuojamos, joms neteikiama valstybės garantuota galimybė pasitikrinti profilaktiškai. Įvairių šalių statistikos duomenimis, būtent socialiai nedraustos moterys turi didžiausią riziką susirgti GKV.

Klausimas, kaip sumažinti Lietuvos moterų sergamumą gimdos kaklelio vėžiu, turi būti sprendžiamas kompleksiskai, dalyvaujant įvairioms institucijoms.

Pirminė GKV prevencija yra visuomenės švietimas. Būtina aiškinti apie gimdos kaklelio vėžio rizikos faktorius, apie vykdomas patikros programas, apie apsisaugojimo nuo ŽPV infekcijos būdus patikros programose ir visuotino sveikatos švietimo programose. Antrinė prevencija – reguliari profilaktinė moterų patikra dėl gimdos kaklelio patologijos. Sėkmingai vykdančios gimdos kaklelio patikros programą šalys remiasi Pap testo rezultatais. Kad toks Pap testo metodas sėkmingai „veiktų“ Lietuvoje, reikia oportunistinę-atsitiktinę patikrą pakeisti organizuota patikra. Be organizuotos patikros vėžio prevencijos programa pasmerkta nesėkmei.

Organizuotos patikros sėkmė yra nulemiama šių pagrindinių elementų:

1. Visuomenės švietimas,
2. Sveikatos priežiūros įstaigų koordinuotas darbas: geras grįžtamas ryšys tarp PSPC, Vėžio registro centro, Patologijos centro ir kt.,
3. Medicininių paslaugų kokybės kontrolė.

Jei šie pagrindiniai reikalavimai nėra realizuojami ir veikla nekoordinuojama, tai sėkmingos patikros programos rezultatų tikėtis neverta. Tyrimas Pap tepinėlio testu reikalauja vieningos suderintos sistemos. Kai nėra organizuoto moterų pakvietimo ir vieningo gimdos kaklelio nuograndų paėmimo sistemos, patikros programa nėra efektyvi. Šiuo metu skurdžiose šalyse, kuriose neįmanoma įgyvendinti organizuotos programos, taikoma „*lab off*“ sistema, t.y. nelaboratorinis moterų tyrimas ir gydymas.

Vien medikų ir pavienių gydymo įstaigų pastangų sutramdyti vėžio plitimą Lietuvoje nepakanka. Reikia tobulinti pačią profilaktikos programą ir nuolat kontroliuoti jos įgyvendinimą. Šiuo metu Lietuvoje apie profilaktinį patikrinimą moterims pranešama tik

tada, kai ji pati ateina į pirminę sveikatos priežiūros įstaigą. Tokia „kvietimų sistema“ turėtų būti peržiūrėta ir patobulinta, remiantis Europos Šiaurės šalių patirtimi. Čia galeėtų aktyviai dalyvauti nepriklausomas Vėžio registro centras, kuriam reikėtų patikėti kvietimų ir moterų stebėsenos sistemų įgyvendinimą. Klausimas, kaip sumažinti Lietuvos moterų sergamumą gimdos kaklelio vėžiu, turi būti sprendžiamas kompleksiskai, dalyvaujant įvairioms institucijoms.

7. IŠVADOS

1. Anketinių apklausų būdu nustatyti svarbiausi tirtąjo regiono moterų gimdos kaklelio ryškių intraepitelinių pokyčių socialiniai rizikos (menkos socialinės brandos) veiksniai:

- nesiskiepijimas nuo gripo ($p=0,003$), žemesnis išsilavinimas ($p=0,008$), anksčiau negydyta gimdos kaklelio patologija ($p=0,021$); gyvenamoji vieta kaime arba kaimo gyvenvietėje ($p=0,027$);
- informuotumas apie ŽPV ir valstybinę gimdos kaklelio patikros programą neužtikrina aktyvaus moterų dalyvavimo joje ir pačios programos sėkmės.

2. Nustatyti supernatanto autofluorescencijos žadinimo ir emisijos parametrai, kurie tinka atskirti gimdos kaklelio ikivėžinę būklę (HSIL/CIN2+) nuo sveikos (IPPNN) mobiliu spektrometru.

3. Supernatanto mėginio fluorescencijos 405-424 nm juostoje, sužadinus 355 nm banga, tyrimas yra tinkamiausias optinis metodas skirti ryškius gimdos kaklelio intraepitelinius pokyčius (HSIL/CIN2+) nuo sveikų (IPPNN) ($p<0,001$; AUC 0,96; jautrumas 0,91; specifiškumas 1,00). Šiems tyrimams sukurtas mobilus įrenginys, panaudojantis mikrolazerį STA-01 ir spektrometrą AvaSpec-2048TEC.

4. Mikrogardelių metodika yra tinkama perspektyvi p16INK4a baltymo nustatymui gimdos kaklelio nuograndų supernatante.

8. REKOMENDACIJOS

1. Šalintini rastieji medicininiai gimdos kaklelio vėžio rizikos veiksniai susiję su imunitetu, reikėtų užtikrinti vakcinaciją nuo gripo ir imunitetą palaikančių priemonių prieinamumą žemo socialinio brandumo grupėms.
2. Kol Lietuvoje nėra organizuotos gimdos kaklelio vėžio patikros bei profilaktinės vakcinacijos nuo ŽPV, didelės rizikos sirgti gimdos kaklelio vėžiu grupių patikrai reikėtų pritaikyti moterims patrauklius, bei ekonomiškai efektyvius modernios molekulinės diagnostikos metodus, jų tarpe ir pagrįstus šviesos efektais.
3. Tęsti mikrolazerinio spektroskopu STA-01 diagnostinius klinikinius tyrimus, kurti diagnostinį algoritmą, išplėsti sužadinimo bangų diapazoną.
4. Tobulinti gimdos kaklelio vėžio biologinių žymenų paiešką švytinčių mikrogardelių metodu.
5. Gimdos kaklelio vėžio prevencijos programos pirminės profilaktikos grandis turėtų būti papildyta edukacine dalimi. Būtina tobulinti visuomenės sveikatos švietimą užtikrinant sistemingą žinių pateikimą viems visuomenės sluoksniams.
6. Būtina informuoti visuomenę apie gimdos kaklelio vėžio rizikos veiksnius, jų prevenciją, ankstyvąją vėžio diagnostiką ir gydymo metodus. Būtina įtikinti visuomenę, kad gimdos kaklelio profilaktinė patikra yra svarbiausias veiksnys užtikrinant ankstyvą GKV diagnostiką. Sveikatos priežiūros specialistus, sveikatos apsaugos organizatorius, švietimo ir socialinius darbuotojus būtina supažindinti su naujausių technologijų diagnostinėmis galimybėmis ir jų pritaikymu prevencinėje medicinoje, siekiant užtikrinti efektyvią ir ankstyvą gimdos kaklelio patologijos diagnostiką ir savalaikį gydymą.

9. LITERATŪROS SARAŠAS

- Ackermann, B. L., J. E. Hale, et al. (2006). "The role of mass spectrometry in biomarker discovery and measurement." Curr Drug Metab 7(5): 525-539.
- Af Klinteberg, C., I. Wang-Nordman, et al. (1997). Laser-induced fluorescence studies of premalignant and benign lesions in the female genital tract Proc. SPIE Vol. 3197, p. 34-40, Optical Biopsies and Microscopic Techniques II, Irving J. Bigio; Katarina Svanberg; Herbert Schneckenburger; Jan Slavik; Pierre M. Viallet; Eds. (SPIE Homepage)
- Agoff, S. N., P. Lin, et al. (2003). "p16(INK4a) expression correlates with degree of cervical neoplasia: a comparison with Ki-67 expression and detection of high-risk HPV types." Mod Pathol 16(7): 665-673.
- Aguilar-Mahecha, A., S. Hassan, et al. (2006). "Microarrays as validation strategies in clinical samples: tissue and protein microarrays." OMICS 10(3): 311-326.
- Aleknavičienė B., S. G., Elaawar B., Kurtinaitis J. (2002). "Cervical cancer: recent trends of incidence and mortality in Lithuania " Medicina (Kaunas) 38((2)): 223–230.
- Androphy, E. J., N. L. Hubbert, et al. (1987). "Identification of the HPV-16 E6 protein from transformed mouse cells and human cervical carcinoma cell lines." EMBO J 6(4): 989-992.
- Angenendt, P. (2005). "Progress in protein and antibody microarray technology." Drug Discov Today 10(7): 503-511.
- Anttila, A., G. Ronco, et al. (2004). "Cervical cancer screening programmes and policies in 18 European countries." Br J Cancer 91(5): 935-941.
- Appleby, P., V. Beral, et al. (2007). "Cervical cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data for 16,573 women with cervical cancer and 35,509 women without cervical cancer from 24 epidemiological studies." Lancet 370(9599): 1609-1621.
- Arbyn, M., C. Bergeron, et al. (2008). "Liquid compared with conventional cervical cytology: a systematic review and meta-analysis." Obstet Gynecol 111(1): 167-177.

- Arbyn, M., A. O. Raifu, et al. (2007). "Burden of cervical cancer in Europe: estimates for 2004." Ann Oncol 18(10): 1708-1715.
- Arbyn, M., R. Sankaranarayanan, et al. (2008). "Pooled analysis of the accuracy of five cervical cancer screening tests assessed in eleven studies in Africa and India." Int J Cancer 123(1): 153-160.
- Arends, M. J., C. H. Buckley, et al. (1998). "Aetiology, pathogenesis, and pathology of cervical neoplasia." J Clin Pathol 51(2): 96-103.
- Arias-Pulido, H., C. L. Peyton, et al. (2006). "Human papillomavirus type 16 integration in cervical carcinoma in situ and in invasive cervical cancer." J Clin Microbiol 44(5): 1755-1762.
- Baak, J. P. (2006). "Quantitative histopathological analysis of CIN sections." Cell Oncol 28(1-2): 63-65; author reply 61-62.
- Bae, S. M., C. H. Lee, et al. (2005). "Two-dimensional gel analysis of protein expression profile in squamous cervical cancer patients." Gynecol Oncol 99(1): 26-35.
- Baer, H., S. Allen, et al. (2000). "Knowledge of human papillomavirus infection among young adult men and women: implications for health education and research." J Community Health 25(1): 67-78.
- Balasubramanian, A., J. Hughes, et al. (2009). "Evaluation of an ELISA for p16INK4a as a screening test for cervical cancer." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 18(11): 3008-3017.
- Basil, C. F., Y. Zhao, et al. (2006). "Common cancer biomarkers." Cancer Res 66(6): 2953-2961.
- Bibbo, M., W. J. Klump, et al. (2002). "Procedure for immunocytochemical detection of P16INK4A antigen in thin-layer, liquid-based specimens." Acta Cytol 46(1): 25-29.
- Bonventre, J. V. (2008). "Urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a marker of acute kidney injury in critically ill children." Nat Clin Pract Nephrol 4(2): 78-79.
- Bonventre, J. V. (2009). "Kidney injury molecule-1 (KIM-1): a urinary biomarker and much more." Nephrol Dial Transplant.

- Bosch, F. X. and N. Munoz (2002). "The viral etiology of cervical cancer." Virus Research 89: 183-190.
- Brake, T. and P. F. Lambert (2005). "Estrogen contributes to the onset, persistence, and malignant progression of cervical cancer in a human papillomavirus-transgenic mouse model." Proc Natl Acad Sci U S A 102(7): 2490-2495.
- Branoff, R., K. Santi, et al. (1997). "A family practice residency cervical screening project: perceived screening barriers." Fam Med 29(2): 119-123.
- Brookner, C., U. Utzinger, et al. (2003). "Effects of biographical variables on cervical fluorescence emission spectra." J Biomed Opt 8(3): 479-483.
- Brookner, C. K., U. Utzinger, et al. (1999). "Cervical fluorescence of normal women." Lasers Surg Med 24(1): 29-37.
- Bulkmans, N. W., J. Berkhof, et al. (2007). "High-risk HPV type-specific clearance rates in cervical screening." Br J Cancer 96(9): 1419-1424.
- Burger, M. P., H. Hollema, et al. (1993). "Cigarette smoking and human papillomavirus in patients with reported cervical cytological abnormality." BMJ 306(6880): 749-752.
- Canavan, T. P. and N. R. Doshi (2000). "Cervical cancer." Am Fam Physician 61(5): 1369-1376.
- Cappiello, G., A. R. Garbuglia, et al. (1997). "HIV infection increases the risk of squamous intra-epithelial lesions in women with HPV infection: an analysis of HPV genotypes. DIANAIDS Collaborative Study Group." Int J Cancer 72(6): 982-986.
- Castellsague, X., F. X. Bosch, et al. (2002). "Environmental co-factors in HPV carcinogenesis." Virus Res 89(2): 191-199.
- Castellsague, X., A. Ghaffari, et al. (1997). "Prevalence of penile human papillomavirus DNA in husbands of women with and without cervical neoplasia: a study in Spain and Colombia." J Infect Dis 176(2): 353-361.

- Castle, P. E. and A. R. Giuliano (2003). "Chapter 4: Genital tract infections, cervical inflammation, and antioxidant nutrients--assessing their roles as human papillomavirus cofactors." J Natl Cancer Inst Monogr(31): 29-34.
- Castle, P. E., S. Wacholder, et al. (2002). "A prospective study of high-grade cervical neoplasia risk among human papillomavirus-infected women." J Natl Cancer Inst 94(18): 1406-1414.
- Castle, P. E., J. L. Walker, et al. (2005). "Hormonal contraceptive use, pregnancy and parity, and the risk of cervical intraepithelial neoplasia 3 among oncogenic HPV DNA-positive women with equivocal or mildly abnormal cytology." Int J Cancer 117(6): 1007-1012.
- Chang, S. K., M. Y. Dawood, et al. (2002). "Fluorescence spectroscopy for cervical precancer detection: Is there variance across the menstrual cycle?" J Biomed Opt 7(4): 595-602.
- Chang, V. T., P. S. Cartwright, et al. (2009). "Quantitative physiology of the precancerous cervix in vivo through optical spectroscopy." Neoplasia 11(4): 325-332.
- Choe, L. H., B. G. Werner, et al. (2006). "Two-dimensional protein electrophoresis: from molecular pathway discovery to biomarker discovery in neurological disorders." NeuroRx 3(3): 327-335.
- Clavel, C., M. Masure, et al. (2001). "Human papillomavirus testing in primary screening for the detection of high-grade cervical lesions: a study of 7932 women." Br J Cancer 84(12): 1616-1623.
- Clifford, G. M., S. Gallus, et al. (2005). "Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis." Lancet 366(9490): 991-998.
- Cole, A. M. (2006). "Innate host defense of human vaginal and cervical mucosae." Curr Top Microbiol Immunol 306: 199-230.

- Colgan, T. J., C. M. McLachlin, et al. (2004). "Results of the implementation of liquid-based cytology-SurePath in the Ontario screening program." Cancer 102(6): 362-367.
- Collins, S. I., S. Mazloomzadeh, et al. (2005). "Proximity of first intercourse to menarche and the risk of human papillomavirus infection: a longitudinal study." Int J Cancer 114(3): 498-500.
- Crum, C. P., D. W. Abbott, et al. (2003). "Cervical cancer screening: from the Papanicolaou smear to the vaccine era." J Clin Oncol 21(10 Suppl): 224s-230s.
- Cubie, H. A., A. L. Seagar, et al. (2000). "A longitudinal study of HPV detection and cervical pathology in HIV infected women." Sex Transm Infect 76(4): 257-261.
- Davey, E., J. d'Assuncao, et al. (2007). "Accuracy of reading liquid based cytology slides using the ThinPrep Imager compared with conventional cytology: prospective study." BMJ 335(7609): 31.
- Dehn, D., K. C. Torkko, et al. (2007). "Human papillomavirus testing and molecular markers of cervical dysplasia and carcinoma." Cancer 111(1): 1-14.
- Deshpande, S. S. (2001). "Principles and applications of luminescence spectroscopy." Crit Rev Food Sci Nutr 41(3): 155-224.
- Dillner, J., M. Rebolj, et al. (2008). "Long term predictive values of cytology and human papillomavirus testing in cervical cancer screening: joint European cohort study." BMJ 337: a1754.
- Ding, L., X. J. Zou, et al. (2008). "ELISA test to detect CDKN2A (p16(INK4a)) expression in exfoliative cells: a new screening tool for cervical cancer." Mol Diagn Ther 12(6): 395-400.
- Doyle, B., C. O'Farrell, et al. (2006). "Liquid-based cytology improves productivity in cervical cytology screening." Cytopathology 17(2): 60-64.
- Doniger, J., S. Muralidhar, et al. (1999). "Human cytomegalovirus and human herpesvirus 6 genes that transform and transactivate." Clin Microbiol Rev 12(3): 367-382.

- Drezek, R., C. Brookner, et al. (2001). "Autofluorescence microscopy of fresh cervical-tissue sections reveals alterations in tissue biochemistry with dysplasia." Photochem Photobiol 73(6): 636-641.
- Drezek, R., K. Sokolov, et al. (2001). "Understanding the contributions of NADH and collagen to cervical tissue fluorescence spectra: modeling, measurements, and implications." J Biomed Opt 6(4): 385-396.
- Duerr, A., B. Kieke, et al. (2001). "Human papillomavirus-associated cervical cytologic abnormalities among women with or at risk of infection with human immunodeficiency virus." Am J Obstet Gynecol 184(4): 584-590.
- Eisenstein, M. (2006). "Protein arrays: growing pains." Nature 444(7121): 959-962.
- el-Aawar, B. (2002). "[Evaluation of diagnostic methods and characteristics of patients operated on for cervical cancer in Lithuania, 1998-2000]." Medicina (Kaunas) 38(6): 597-610.
- Elbaz, Y., N. Tayer, et al. (2005). "Substrate-induced tryptophan fluorescence changes in EmrE, the smallest ion-coupled multidrug transporter." Biochemistry 44(19): 7369-7377.
- Ellerbrock, T. V., M. A. Chiasson, et al. (2000). "Incidence of cervical squamous intraepithelial lesions in HIV-infected women." JAMA 283(8): 1031-1037.
- Escobar, P. F., J. L. Belinson, et al. (2004). "Diagnostic efficacy of optical coherence tomography in the management of preinvasive and invasive cancer of uterine cervix and vulva." Int J Gynecol Cancer 14(3): 470-474.
- Evans, M. I., E. L. Krivchenia, et al. (2002). "Screening." Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 16(5): 645-657.
- Fahey, J. V., T. M. Schaefer, et al. (2005). "Secretion of cytokines and chemokines by polarized human epithelial cells from the female reproductive tract." Hum Reprod 20(6): 1439-1446.
- Fairley, C. K., A. G. Sheil, et al. (1994). "The risk of ano-genital malignancies in dialysis and transplant patients." Clin Nephrol 41(2): 101-105.

- Fang, C. Y., S. M. Miller, et al. (2008). "Perceived stress is associated with impaired T-cell response to HPV16 in women with cervical dysplasia." Ann Behav Med 35(1): 87-96.
- Felker, G. M., J. W. Petersen, et al. (2006). "Natriuretic peptides in the diagnosis and management of heart failure." CMAJ 175(6): 611-617.
- Ferlay, J., P. Autier, et al. (2007). "Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006." Ann Oncol 18(3): 581-592.
- Fitch, M. I., M. Greenberg, et al. (1998). "Exploring the barriers to cervical screening in an urban Canadian setting." Cancer Nurs 21(6): 441-449.
- Flores, Y. N., D. M. Bishai, et al. (2008). "Risk factors for cervical cancer among HPV positive women in Mexico." Salud Publica Mex 50(1): 49-58.
- Fujii, T., M. Saito, et al. (2008). "Ancillary testing of liquid-based cytology specimens for identification of patients at high risk of cervical cancer." Virchows Arch 453(6): 545-555.
- Fujimoto, J., H. Sakaguchi, et al. (2000). "Clinical implications of expression of interleukin 8 related to angiogenesis in uterine cervical cancers." Cancer Res 60(10): 2632-2635.
- Gallwas, J. K. S., S. H., et al. (2009). "Optical coherence tomography as a non-invasive imaging technique for examination of cervical tissue." Medical Laser Application 24(2): 128.
- Gao, W. M., R. Kuick, et al. (2005). "Distinctive serum protein profiles involving abundant proteins in lung cancer patients based upon antibody microarray analysis." BMC Cancer 5: 110.
- Gavryushin, V., E. Auksorius, et al. (2002). "The role of neopterin in the fluorescence investigations of biotissue pathology." Lithuanian J Phys 42: 111-118.
- Georgakoudi, I., B. C. Jacobson, et al. (2002). "NAD(P)H and collagen as in vivo quantitative fluorescent biomarkers of epithelial precancerous changes." Cancer Res 62(3): 682-687.

- Georgakoudi, I., J. Levitt, et al. (2005). "Intrinsic fluorescence changes associated with apoptosis of human epithelial keratinocytes." Gynecol Oncol 99(3 Suppl 1): S54-57.
- Georganopoulou, D. G., L. Chang, et al. (2005). "Nanoparticle-based detection in cerebral spinal fluid of a soluble pathogenic biomarker for Alzheimer's disease." Proc Natl Acad Sci U S A 102(7): 2273-2276.
- Gerhardt, C. A., K. Pong, et al. (2000). "Adolescents' knowledge of human papillomavirus and cervical dysplasia." J Pediatr Adolesc Gynecol 13(1): 15-20.
- Giannini, S. L., E. Hanon, et al. (2006). "Enhanced humoral and memory B cellular immunity using HPV16/18 L1 VLP vaccine formulated with the MPL/aluminium salt combination (AS04) compared to aluminium salt only." Vaccine 24(33-34): 5937-5949.
- Gillison, M. L., W. M. Koch, et al. (2000). "Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers." J Natl Cancer Inst 92(9): 709-720.
- Giorgi-Rossi, P., N. Segnan, et al. (2007). "The impact of new technologies in cervical cancer screening: results of the recruitment phase of a large randomised controlled trial from a public health perspective." Int J Cancer 121(12): 2729-2734.
- Gray, L. J. and C. S. Herrington (2004). "Molecular markers for the prediction of progression of CIN lesions." Int J Gynecol Pathol 23(2): 95-96.
- Gravitt, P. E. and P. E. Castle (2001). "Chlamydia trachomatis and cervical squamous cell carcinoma." JAMA 285(13): 1703-1704; author reply 1705-1706.
- Grenko, R. T., C. S. Abendroth, et al. (2000). "Variance in the interpretation of cervical biopsy specimens obtained for atypical squamous cells of undetermined significance." Am J Clin Pathol 114(5): 735-740.
- Gudleviciene, Z., J. Didziapetriene, et al. (2005). "[Investigation of human papillomavirus, its types and variants]." Medicina (Kaunas) 41(11): 910-915.

- Gunnell, A. S., T. N. Tran, et al. (2006). "Synergy between cigarette smoking and human papillomavirus type 16 in cervical cancer in situ development." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 15(11): 2141-2147.
- Gustafsson, U. P., E. McLaughlin, et al. (2003). In-vivo fluorescence and reflectance imaging of human cervical tissue. Medical Imaging 2003: Physiology and Function: Methods, Systems, and Applications, San Diego, CA, USA, SPIE.
- Haab, B. B. (2005). "Antibody arrays in cancer research." Mol Cell Proteomics 4(4): 377-383.
- Hakama, M., T. Luostarinen, et al. (2000). "Joint effect of HPV16 with Chlamydia trachomatis and smoking on risk of cervical cancer: antagonism or misclassification (Nordic countries)." Cancer Causes Control 11(9): 783-790.
- Hammes, L. S., R. R. Tekmal, et al. (2007). "Macrophages, inflammation and risk of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) progression--clinicopathological correlation." Gynecol Oncol 105(1): 157-165.
- Haverkos, H. W. (2004). "Viruses, chemicals and co-carcinogenesis." Oncogene 23(38): 6492-6499.
- Haverkos, H. W., G. Soon, et al. (2003). "Cigarette smoking and cervical cancer: Part I: a meta-analysis." Biomed Pharmacother 57(2): 67-77.
- Hawes, S. E., C. W. Critchlow, et al. (2003). "Increased risk of high-grade cervical squamous intraepithelial lesions and invasive cervical cancer among African women with human immunodeficiency virus type 1 and 2 infections." J Infect Dis 188(4): 555-563.
- Heard, I., J. M. Tassie, et al. (2000). "Increased risk of cervical disease among human immunodeficiency virus-infected women with severe immunosuppression and high human papillomavirus load(1)." Obstet Gynecol 96(3): 403-409.
- Heintzelman, D. L., R. Lotan, et al. (2000). "Characterization of the autofluorescence of polymorphonuclear leukocytes, mononuclear leukocytes and cervical epithelial cancer cells for improved spectroscopic discrimination of inflammation from dysplasia." Photochem Photobiol 71(3): 327-332.

- Herrero, R., P. E. Castle, et al. (2005). "Epidemiologic profile of type-specific human papillomavirus infection and cervical neoplasia in Guanacaste, Costa Rica." J Infect Dis 191(11): 1796-1807.
- Hewitt, S. M., J. Dear, et al. (2004). "Discovery of protein biomarkers for renal diseases." J Am Soc Nephrol 15(7): 1677-1689.
- Hildesheim, A., R. Herrero, et al. (2001). "HPV co-factors related to the development of cervical cancer: results from a population-based study in Costa Rica." Br J Cancer 84(9): 1219-1226.
- Hillemanns, P., H. Weingandt, et al. (2000). "Photodetection of cervical intraepithelial neoplasia using 5-aminolevulinic acid-induced porphyrin fluorescence." Cancer 88(10): 2275-2282.
- Holcomb, K., M. Maiman, et al. (1998). "Rapid progression to invasive cervix cancer in a woman infected with the human immunodeficiency virus." Obstet Gynecol 91(5 Pt 2): 848-850.
- Howley, P. M. (2006). "Warts, cancer and ubiquitylation: lessons from the papillomaviruses." Trans Am Clin Climatol Assoc 117: 113-126; discussion 126-117.
- Hwang, L. Y., Y. Ma, et al. (2009). "Factors that influence the rate of epithelial maturation in the cervix in healthy young women." J Adolesc Health 44(2): 103-110.
- IARC (2005). Cervix Cancer Screening. Lyon.
- Imafuku, Y., G. S. Omenn, et al. (2004). "Proteomics approaches to identify tumor antigen directed autoantibodies as cancer biomarkers." Dis Markers 20(3): 149-153.
- Yim, E. K. and J. S. Park (2006). "Role of proteomics in translational research in cervical cancer." Expert Rev Proteomics 3(1): 21-36.
- Ylitalo, N., P. Sorensen, et al. (1999). "Smoking and oral contraceptives as risk factors for cervical carcinoma in situ." Int J Cancer 81(3): 357-365.

- Yugawa, T. and T. Kiyono (2009). "Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses: novel functions of E6 and E7 oncoproteins." Rev Med Virol 19(2): 97-113.
- Jubelirer, S. J., M. F. Blanton, et al. (1996). "Assessment of knowledge, attitudes, and behaviors relative to cervical cancer and the Pap smear among adolescent girls in West Virginia." J Cancer Educ 11(4): 230-232.
- Kahn, J. A., S. L. Rosenthal, et al. (2002). "The interval between menarche and age of first sexual intercourse as a risk factor for subsequent HPV infection in adolescent and young adult women." J Pediatr 141(5): 718-723.
- Kayes, O., H. U. Ahmed, et al. (2007). "Molecular and genetic pathways in penile cancer." Lancet Oncol 8(5): 420-429.
- Kalliala, I., A. Anttila, et al. (2005). "Risk of cervical and other cancers after treatment of cervical intraepithelial neoplasia: retrospective cohort study." BMJ 331(7526): 1183-1185.
- Karlsson, R., M. Jonsson, et al. (1995). "Lifetime number of partners as the only independent risk factor for human papillomavirus infection: a population-based study." Sex Transm Dis 22(2): 119-127.
- Kashanchi, F., J. Araujo, et al. (1997). "Human herpesvirus 6 (HHV-6) ORF-1 transactivating gene exhibits malignant transforming activity and its protein binds to p53." Oncogene 14(3): 359-367.
- Keating, J. T., T. Ince, et al. (2001). "Surrogate biomarkers of HPV infection in cervical neoplasia screening and diagnosis." Adv Anat Pathol 8(2): 83-92.
- Kyrgiou, M., I. Tsoumpou, et al. (2006). "The up-to-date evidence on colposcopy practice and treatment of cervical intraepithelial neoplasia: the Cochrane colposcopy & cervical cytopathology collaborative group (C5 group) approach." Cancer Treat Rev 32(7): 516-523.
- Kjaer, S. K., A. J. C. van den Brule, et al. (2002). "Type specific persistence of high risk human papillomavirus (HPV) as indicator of high grade cervical squamous

- intraepithelial lesions in young women: population based prospective follow up study." BMJ 325(7364): 572-.
- Klaes, R., A. Benner, et al. (2002). "p16INK4a immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia." Am J Surg Pathol 26(11): 1389-1399.
- Klaes, R., T. Friedrich, et al. (2001). "Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri." Int J Cancer 92(2): 276-284.
- Kliucinskas, M., R. J. Nadisauskiene, et al. (2006). "Prevalence and risk factors of HPV infection among high-risk rural and urban Lithuanian women." Gynecol Obstet Invest 62(3): 173-180.
- Kolch, W., C. Neususs, et al. (2005). "Capillary electrophoresis-mass spectrometry as a powerful tool in clinical diagnosis and biomarker discovery." Mass Spectrom Rev 24(6): 959-977.
- Koskela, P., T. Anttila, et al. (2000). "Chlamydia trachomatis infection as a risk factor for invasive cervical cancer." Int J Cancer 85(1): 35-39.
- Koskinen, W. J., R. W. Chen, et al. (2003). "Prevalence and physical status of human papillomavirus in squamous cell carcinomas of the head and neck." Int J Cancer 107(3): 401-406.
- Kotaniemi-Talonen, L., P. Nieminen, et al. (2005). "Routine cervical screening with primary HPV testing and cytology triage protocol in a randomised setting." Br J Cancer 93(8): 862-867.
- Koutsky, L. A. and D. M. Harper (2006). "Chapter 13: Current findings from prophylactic HPV vaccine trials." Vaccine 24 Suppl 3: S3/114-121.
- Koutsky, L. A., K. K. Holmes, et al. (1992). "A cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to papillomavirus infection." N Engl J Med 327(18): 1272-1278.

- Kruse, A. J., J. P. Baak, et al. (2002). "Evaluation of MIB-1-positive cell clusters as a diagnostic marker for cervical intraepithelial neoplasia." Am J Surg Pathol 26(11): 1501-1507.
- Lacey, J. V., Jr., M. Frisch, et al. (2001). "Associations between smoking and adenocarcinomas and squamous cell carcinomas of the uterine cervix (United States)." Cancer Causes Control 12(2): 153-161.
- Lakshmi, S., P. Rema, et al. (2009). "p16ink4a is a surrogate marker for high-risk and malignant cervical lesions in the presence of human papillomavirus." Pathobiology 76(3): 141-148.
- Larsen, L. P. and F. Olesen (1998). "Women's knowledge of and attitude towards organized cervical smear screening." Acta Obstet Gynecol Scand 77(10): 988-996.
- Lee, H. J., A. W. Wark, et al. (2008). "Microarray methods for protein biomarker detection." Analyst 133(8): 975-983.
- Lie, A. K. and G. Kristensen (2008). "Human papillomavirus E6/E7 mRNA testing as a predictive marker for cervical carcinoma." Expert Rev Mol Diagn 8(4): 405-415.
- Lieberman, J. A., A. B. Moscicki, et al. (2008). "Determination of cytokine protein levels in cervical mucus samples from young women by a multiplex immunoassay method and assessment of correlates." Clin Vaccine Immunol 15(1): 49-54.
- Lin, Y. W., H. C. Lai, et al. (2006). "Plasma proteomic profiling for detecting and differentiating in situ and invasive carcinomas of the uterine cervix." Int J Gynecol Cancer 16(3): 1216-1224.
- Liotta, L. A., P. S. Steeg, et al. (1991). "Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation." Cell 64(2): 327-336.
- Lorincz, A. T., P. E. Castle, et al. (2002). "Viral load of human papillomavirus and risk of CIN3 or cervical cancer." Lancet 360(9328): 228-229.
- Lu, X., T. Toki, et al. (1998). "Expression of p21WAF1/CIP1 in adenocarcinoma of the uterine cervix: a possible immunohistochemical marker of a favorable prognosis." Cancer 82(12): 2409-2417.

- Madeleine, M. M., T. Anttila, et al. (2007). "Risk of cervical cancer associated with Chlamydia trachomatis antibodies by histology, HPV type and HPV cofactors." Int J Cancer 120(3): 650-655.
- Mai, V. (2000). "Working toward an organized approach for the prevention of cervical cancer." Ontario Medical Review 22-25.
- Maiman, M., R. G. Fruchter, et al. (1997). "Cervical cancer as an AIDS-defining illness." Obstet Gynecol 89(1): 76-80.
- Maiman, M., R. G. Fruchter, et al. (1998). "Prevalence, risk factors, and accuracy of cytologic screening for cervical intraepithelial neoplasia in women with the human immunodeficiency virus." Gynecol Oncol 68(3): 233-239.
- Marin, N. M., A. Milbourne, et al. (2005). "Diffuse reflectance patterns in cervical spectroscopy." Gynecol Oncol 99(3 Suppl 1): S116-120.
- Masson, S., R. Latini, et al. (2006). "Direct comparison of B-type natriuretic peptide (BNP) and amino-terminal proBNP in a large population of patients with chronic and symptomatic heart failure: the Valsartan Heart Failure (Val-HeFT) data." Clin Chem 52(8): 1528-1538.
- Mattoon, D., G. Michaud, et al. (2005). "Biomarker discovery using protein microarray technology platforms: antibody-antigen complex profiling." Expert Rev Proteomics 2(6): 879-889.
- Meter, R. A., C. R. Wira, et al. (2005). "Secretion of monocyte chemotactic protein-1 by human uterine epithelium directs monocyte migration in culture." Fertil Steril 84(1): 191-201.
- Mikaelsdottir, E. K., K. R. Benediksdottir, et al. (2003). "HPV subtypes and immunological parameters of cervical cancer in Iceland during two time periods, 1958-1960 and 1995-1996." Gynecol Oncol 89(1): 22-30.
- Milde-Langosch, K., S. Riethdorf, et al. (2001). "Expression of cyclin-dependent kinase inhibitors p16MTS1, p21WAF1, and p27KIP1 in HPV-positive and HPV-negative cervical adenocarcinomas." Virchows Arch 439(1): 55-61.

- Mitchell, M. F., S. B. Cantor, et al. (1999). "Screening for squamous intraepithelial lesions with fluorescence spectroscopy." Obstet Gynecol 94(5 Pt 2): 889-896.
- Mitchell, M. F., S. B. Cantor, et al. (1999). "Fluorescence spectroscopy for diagnosis of squamous intraepithelial lesions of the cervix." Obstet Gynecol 93(3): 462-470.
- Monsonogo, J., A. Autillo-Touati, et al. (2001). "Liquid-based cytology for primary cervical cancer screening: a multi-centre study." Br J Cancer 84(3): 360-366.
- Moreno, V., F. X. Bosch, et al. (2002). "Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study." Lancet 359(9312): 1085-1092.
- Munger, K., A. Baldwin, et al. (2004). "Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis." J Virol 78(21): 11451-11460.
- Munk, C., S. K. Kjaer, et al. (1998). "Cervical cancer screening: knowledge of own screening status among women aged 20-29 years." Acta Obstet Gynecol Scand 77(9): 917-922.
- Munoz, N., F. X. Bosch, et al. (2004). "Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective." Int J Cancer 111(2): 278-285.
- Munoz, N., F. X. Bosch, et al. (2003). "Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer." N Engl J Med 348(6): 518-527.
- Munoz, N., X. Castellsague, et al. (2006). "Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer." Vaccine 24 Suppl 3: S3/1-10.
- Munoz, N., S. Franceschi, et al. (2002). "Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study." Lancet 359(9312): 1093-1101.
- Murphy, N., M. Ring, et al. (2003). "p16INK4A as a marker for cervical dyskaryosis: CIN and cGIN in cervical biopsies and ThinPrep smears." J Clin Pathol 56(1): 56-63.

- Nair, H. B., R. Luthra, et al. (2005). "Induction of aromatase expression in cervical carcinomas: effects of endogenous estrogen on cervical cancer cell proliferation." Cancer Res 65(23): 11164-11173.
- Nayar, R. and D. Solomon (2004). "Second edition of 'The Bethesda System for reporting cervical cytology' - atlas, website, and Bethesda interobserver reproducibility project." Cytojournal 1(1): 4.
- Nam, E. J., J. W. Kim, et al. (2008). "Expression of the p16 and Ki-67 in relation to the grade of cervical intraepithelial neoplasia and high-risk human papillomavirus infection." J Gynecol Oncol 19(3): 162-168.
- Nanda, K., D. C. McCrory, et al. (2000). "Accuracy of the Papanicolaou test in screening for and follow-up of cervical cytologic abnormalities: a systematic review." Ann Intern Med 132(10): 810-819.
- Negri, G., E. Egarter-Vigl, et al. (2003). "p16INK4a is a useful marker for the diagnosis of adenocarcinoma of the cervix uteri and its precursors: an immunohistochemical study with immunocytochemical correlations." Am J Surg Pathol 27(2): 187-193.
- Nettikadan, S., K. Radke, et al. (2006). "Detection and quantification of protein biomarkers from fewer than 10 cells." Mol Cell Proteomics 5(5): 895-901.
- Nguyen, H. H., T. R. Broker, et al. (2005). "Immune responses to human papillomavirus in genital tract of women with cervical cancer." Gynecol Oncol 96(2): 452-461.
- Nieminen, P., L. Kotaniemi, et al. (2005). "A randomised public-health trial on automation-assisted screening for cervical cancer in Finland: performance with 470,000 invitations." Int J Cancer 115(2): 307-311.
- Nobbenhuis, M. A., J. M. Walboomers, et al. (1999). "Relation of human papillomavirus status to cervical lesions and consequences for cervical-cancer screening: a prospective study." Lancet 354(9172): 20-25.
- Nugent, L. S. and K. Tamlyn-Leaman (1992). "The colposcopy experience: what do women know?" J Adv Nurs 17(4): 514-520.
- Odongua, N., Y. M. Chae, et al. (2007). "Associations between smoking, screening, and death caused by cervical cancer in Korean women." Yonsei Med J 48(2): 192-200.

- Okamoto, A., D. J. Demetrick, et al. (1994). "p16INK4 mutations and altered expression in human tumors and cell lines." Cold Spring Harb Symp Quant Biol 59: 49-57.
- Olaniyan, O. B. (2002). "Validity of colposcopy in the diagnosis of early cervical neoplasia--a review." Afr J Reprod Health 6(3): 59-69.
- Ordi, J., S. Garcia, et al. (2009). "p16 INK4a immunostaining identifies occult CIN lesions in HPV-positive women." Int J Gynecol Pathol 28(1): 90-97.
- Paavonen, J., D. Jenkins, et al. (2007). "Efficacy of a prophylactic adjuvanted bivalent L1 virus-like-particle vaccine against infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: an interim analysis of a phase III double-blind, randomised controlled trial." Lancet 369(9580): 2161-2170.
- Palsson, S., U. Stenram, et al. (2006). "Methods for detailed histopathological investigation and localization of biopsies from cervix uteri to improve the interpretation of autofluorescence data." J Environ Pathol Toxicol Oncol 25(1-2): 321-340.
- Parkin, D. M., F. Bray, et al. (2001). "Estimating the world cancer burden: Globocan 2000." Int J Cancer 94(2): 153-156.
- Parkin, D. M., F. Bray, et al. (2005). "Global cancer statistics, 2002." CA Cancer J Clin 55(2): 74-108.
- Pereira, D. B., M. H. Antoni, et al. (2003). "Life stress and cervical squamous intraepithelial lesions in women with human papillomavirus and human immunodeficiency virus." Psychosom Med 65(3): 427-434.
- Plummer, M., R. Herrero, et al. (2003). "Smoking and cervical cancer: pooled analysis of the IARC multi-centric case--control study." Cancer Causes Control 14(9): 805-814.
- Prokopczyk, B., N. Trushin, et al. (2001). "Human cervical tissue metabolizes the tobacco-specific nitrosamine, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, via alpha-hydroxylation and carbonyl reduction pathways." Carcinogenesis 22(1): 107-114.

- Psyrrri, A. and D. DiMaio (2008). "Human papillomavirus in cervical and head-and-neck cancer." Nat Clin Pract Oncol 5(1): 24-31.
- Quayle, A. J. (2002). "The innate and early immune response to pathogen challenge in the female genital tract and the pivotal role of epithelial cells." J Reprod Immunol 57(1-2): 61-79.
- Ralston Howe, E., Z. Li, et al. (2009). "Type-specific prevalence and persistence of human papillomavirus in women in the United States who are referred for typing as a component of cervical cancer screening." Am J Obstet Gynecol 200(3): 245 e241-247.
- Ramanujam, N., M. F. Mitchell, et al. (1996). "Cervical precancer detection using a multivariate statistical algorithm based on laser-induced fluorescence spectra at multiple excitation wavelengths." Photochem Photobiol 64(4): 720-735.
- Ramanujam, N., M. F. Mitchell, et al. (1996). "Spectroscopic diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) in vivo using laser-induced fluorescence spectra at multiple excitation wavelengths." Lasers Surg Med 19(1): 63-74.
- Ramanujam, N., M. F. Mitchell, et al. (1994). "In vivo diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia using 337-nm-excited laser-induced fluorescence." Proc Natl Acad Sci U S A 91(21): 10193-10197.
- Razzaque, A. (1990). "Oncogenic potential of human herpesvirus-6 DNA." Oncogene 5(9): 1365-1370.
- Remmink, A. J., J. M. Walboomers, et al. (1995). "The presence of persistent high-risk HPV genotypes in dysplastic cervical lesions is associated with progressive disease: natural history up to 36 months." Int J Cancer 61(3): 306-311.
- Rezza, G., M. Giuliani, et al. (1998). "Risk factors for cervical presence of human papillomavirus DNA among women at risk for HIV infection. DIANAIDS Collaborative Study Group." Epidemiol Infect 121(1): 173-177.
- Richards-Kortum, R., M. F. Mitchell, et al. (1994). "In vivo fluorescence spectroscopy: potential for non-invasive, automated diagnosis of cervical intraepithelial

- neoplasia and use as a surrogate endpoint biomarker." J Cell Biochem Suppl 19: 111-119.
- Richardson, H., G. Kelsall, et al. (2003). "The natural history of type-specific human papillomavirus infections in female university students." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 12(6): 485-490.
- Riley, R. R., S. Duensing, et al. (2003). "Dissection of human papillomavirus E6 and E7 function in transgenic mouse models of cervical carcinogenesis." Cancer Res 63(16): 4862-4871.
- Ronco, G., J. Cuzick, et al. (2007). "Accuracy of liquid based versus conventional cytology: overall results of new technologies for cervical cancer screening: randomised controlled trial." BMJ 335(7609): 28.
- Ronco, G., N. Segnan, et al. (2006). "Human papillomavirus testing and liquid-based cytology: results at recruitment from the new technologies for cervical cancer randomized controlled trial." J Natl Cancer Inst 98(11): 765-774.
- Saito, A., K. Ishi, et al. (1999). "[Relation between human papilloma virus DNA and expressions of p53 and p21 proteins in cervical lesions]." Rinsho Byori 47(12): 1177-1182.
- Sanchez-Carbayo, M. (2006). "Antibody arrays: technical considerations and clinical applications in cancer." Clin Chem 52(9): 1651-1659.
- Sanchez-Carbayo, M., N. D. Socci, et al. (2006). "Profiling bladder cancer using targeted antibody arrays." Am J Pathol 168(1): 93-103.
- Sanner, K., I. Wikstrom, et al. (2009). "Self-sampling of the vaginal fluid at home combined with high-risk HPV testing." Br J Cancer.
- Sano, T., T. Oyama, et al. (1998). "Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions." Am J Pathol 153(6): 1741-1748.
- Saqi, A., T. L. Pasha, et al. (2002). "Overexpression of p16INK4A in liquid-based specimens (SurePath) as marker of cervical dysplasia and neoplasia." Diagn Cytopathol 27(6): 365-370.

- Sawaya, G. F. and D. A. Grimes (1999). "New technologies in cervical cytology screening: a word of caution." Obstet Gynecol 94(2): 307-310.
- Schlecht, N. F., E. L. Franco, et al. (2001). "Repeatability of sexual history in longitudinal studies on HPV infection and cervical neoplasia: determinants of reporting error at follow-up interviews." J Epidemiol Biostat 6(5): 393-407.
- Schlecht, N. F., S. Kulaga, et al. (2001). "Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia." JAMA 286(24): 3106-3114.
- Schlecht, N. F., A. Trevisan, et al. (2003). "Viral load as a predictor of the risk of cervical intraepithelial neoplasia." Int J Cancer 103(4): 519-524.
- Schoppmann, S. F., P. Birner, et al. (2002). "Tumor-associated macrophages express lymphatic endothelial growth factors and are related to peritumoral lymphangiogenesis." Am J Pathol 161(3): 947-956.
- Sedman, S. A., M. S. Barbosa, et al. (1991). "The full-length E6 protein of human papillomavirus type 16 has transforming and trans-activating activities and cooperates with E7 to immortalize keratinocytes in culture." J Virol 65(9): 4860-4866.
- Shew, M. L., J. D. Fortenberry, et al. (1994). "Interval between menarche and first sexual intercourse, related to risk of human papillomavirus infection." J Pediatr 125(4): 661-666.
- Shim, M. G., L. M. Song, et al. (2000). "In vivo near-infrared Raman spectroscopy: demonstration of feasibility during clinical gastrointestinal endoscopy." Photochem Photobiol 72(1): 146-150.
- Silins, I., W. Ryd, et al. (2005). "Chlamydia trachomatis infection and persistence of human papillomavirus." Int J Cancer 116(1): 110-115.
- Syrjanen, K. (2009). Selected Papers on Gynaecologic Oncology. In honour of 70th birthday of Professor Peter Bosze. . Budapest, PressCon.
- Syrjanen, K., I. Shabalova, et al. (2009). "Persistent high-risk human papillomavirus infections and other end-point markers of progressive cervical disease among women prospectively followed up in the New Independent States of the Former

- Soviet Union and the Latin American Screening study cohorts." Int J Gynecol Cancer 19(5): 934-942.
- Syrjanen, K. J. (2005). "Immunohistochemistry in assessment of molecular pathogenesis of cervical carcinogenesis." Eur J Gynaecol Oncol 26(1): 5-19.
- Slattery, M. L., L. M. Robison, et al. (1989). "Cigarette smoking and exposure to passive smoke are risk factors for cervical cancer." JAMA 261(11): 1593-1598.
- Smith, J. S., C. Bosetti, et al. (2004). "Chlamydia trachomatis and invasive cervical cancer: a pooled analysis of the IARC multicentric case-control study." Int J Cancer 111(3): 431-439.
- Snijders, P. J., A. J. van den Brule, et al. (2003). "The clinical relevance of human papillomavirus testing: relationship between analytical and clinical sensitivity." J Pathol 201(1): 1-6.
- Sotiropoulou, S., Y. Sierra-Sastre, et al. (2008). "Biotemplated Nanostructured Materials" Chemistry of Materials 20(3): 821-834.
- Spitzer, M. (1998). "Cervical screening adjuncts: recent advances." Am J Obstet Gynecol 179(2): 544-556.
- Steenbergen, R. D., J. de Wilde, et al. (2005). "HPV-mediated transformation of the anogenital tract." J Clin Virol 32 Suppl 1: S25-33.
- Stoler, M. H. and M. Schiffman (2001). "Interobserver reproducibility of cervical cytologic and histologic interpretations: realistic estimates from the ASCUS-LSIL Triage Study." JAMA 285(11): 1500-1505.
- Sullivan, D. C. and M. Ferrari (2004). "Nanotechnology and tumor imaging: seizing an opportunity." Mol Imaging 3(4): 364-369.
- Sun, X. W., L. Kuhn, et al. (1997). "Human papillomavirus infection in women infected with the human immunodeficiency virus." N Engl J Med 337(19): 1343-1349.
- Sung, C. O., S. R. Kim, et al. (2009). "The use of p16(INK4A) immunocytochemistry in "Atypical squamous cells which cannot exclude HSIL" compared with "Atypical squamous cells of undetermined significance" in liquid-based cervical smears." Diagn Cytopathol.

- Szostek, S., B. Zawilinska, et al. (2009). "Herpesviruses as possible cofactors in HPV-16 - related oncogenesis." Acta Biochim Pol.
- Thomas, D. B., R. M. Ray, et al. (1996). "Prostitution, condom use, and invasive squamous cell cervical cancer in Thailand." Am J Epidemiol 143(8): 779-786.
- Tomizaki, K. Y., K. Usui, et al. (2005). "Protein-detecting microarrays: current accomplishments and requirements." Chembiochem 6(5): 782-799.
- Tsoumpou, I., M. Arbyn, et al. (2009). "p16(INK4a) immunostaining in cytological and histological specimens from the uterine cervix: a systematic review and meta-analysis." Cancer Treat Rev 35(3): 210-220.
- Vaccarella, S., R. Herrero, et al. (2006). "Reproductive factors, oral contraceptive use, and human papillomavirus infection: pooled analysis of the IARC HPV prevalence surveys." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 15(11): 2148-2153.
- Vaccarella, S., R. Herrero, et al. (2008). "Smoking and human papillomavirus infection: pooled analysis of the International Agency for Research on Cancer HPV Prevalence Surveys." Int J Epidemiol 37(3): 536-546.
- Vaitkuviene, A., S. Andersen-Engels, et al. (2005). Photo diagnosis of early pre cancer (LSIL) in genital tissue. Laser Florence 2004: A Window on the Laser Medicine World, SPIE.
- Vaitkuviene, A., E. Auksorius, et al. (2004). LIF analysis of cervical mucus and amniotic fluid for maturity monitoring in pregnancy, SPIE.
- Vaitkuviene, A., N. Kurilcik, et al. (2007). Diodes for liquid based cytology supernatant evaluation - photo Pap. Laser Florence 2007: A Window on the Laser Medicine World, SPIE.
- Viikki, M., E. Pukkala, et al. (2000). "Gynaecological infections as risk determinants of subsequent cervical neoplasia." Acta Oncol 39(1): 71-75.
- Vita, P., N. Kurilcik, et al. (2005). "Deep-ultraviolet light-emitting diodes for frequency domain measurements of fluorescence lifetime in basic biofluorophores." Applied Physics Letters 87(8): 084106-084103.

- Volgareva, G., L. Zavalishina, et al. (2004). "Protein p16 as a marker of dysplastic and neoplastic alterations in cervical epithelial cells." BMC Cancer 4: 58.
- Volgareva, G. M., L. E. Zavalishina, et al. (2002). "[Expression of the protein marker p16INK4a in the cervix uteri cancer]." Arkh Patol 64(1): 22-24.
- von Knebel Doeberitz, M., T. Oltersdorf, et al. (1988). "Correlation of modified human papilloma virus early gene expression with altered growth properties in C4-1 cervical carcinoma cells." Cancer Res 48(13): 3780-3786.
- Walboomers, J. M., M. V. Jacobs, et al. (1999). "Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide." J Pathol 189(1): 12-19.
- Wallin, K. L., F. Wiklund, et al. (2002). "A population-based prospective study of Chlamydia trachomatis infection and cervical carcinoma." Int J Cancer 101(4): 371-374.
- Walsh, M. J., M. N. Singh, et al. (2008). "FTIR Microspectroscopy Coupled with Two-Class Discrimination Segregates Markers Responsible for Inter- and Intra-Category Variance in Exfoliative Cervical Cytology." Biomark Insights 3: 179-189.
- Wiley, D. J., B. J. Monk, et al. (2004). "Cervical cancer screening." Curr Oncol Rep 6(6): 497-506.
- Winer, R. L., S. K. Lee, et al. (2003). "Genital human papillomavirus infection: incidence and risk factors in a cohort of female university students." Am J Epidemiol 157(3): 218-226.
- Winkelstein, W., Jr., S. T. Sacks, et al. (1977). "Correlations of incidence rates for selected cancers in the nine areas of the Third National Cancer Survey." Am J Epidemiol 105(5): 407-419.
- Wong, Y. F., T. H. Cheung, et al. (2004). "Protein profiling of cervical cancer by protein-biochips: proteomic scoring to discriminate cervical cancer from normal cervix." Cancer Lett 211(2): 227-234.
- Woodman, C. B., S. Collins, et al. (2003). "Human papillomavirus type 18 and rapidly progressing cervical intraepithelial neoplasia." Lancet 361(9351): 40-43.

- Woodman, C. B., S. Collins, et al. (2001). "Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: a longitudinal cohort study." Lancet 357(9271): 1831-1836.
- Woodman, C. B., S. I. Collins, et al. (2007). "The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues." Nat Rev Cancer 7(1): 11-22.
- World Health Organization. (2008). Atlas of health in Europe. Copenhagen, World Health Organization, Regional Office for Europe.
- Zangar, R. C., D. S. Daly, et al. (2006). "ELISA microarray technology as a high-throughput system for cancer biomarker validation." Expert Rev Proteomics 3(1): 37-44.
- Zangar, R. C., S. M. Varnum, et al. (2004). "A rational approach for discovering and validating cancer markers in very small samples using mass spectrometry and ELISA microarrays." Dis Markers 20(3): 135-148.
- Zhang, Y., S. Fan, et al. (2005). "BRCA1 interaction with human papillomavirus oncoproteins." J Biol Chem 280(39): 33165-33177.
- Zielinski, G. D., L. Rozendaal, et al. (2003). "HPV testing can reduce the number of follow-up visits in women treated for cervical intraepithelial neoplasia grade 3." Gynecol Oncol 91(1): 67-73.
- Zijlmans, H. J., G. J. Fleuren, et al. (2006). "The absence of CCL2 expression in cervical carcinoma is associated with increased survival and loss of heterozygosity at 17q11.2." J Pathol 208(4): 507-517.
- zur Hausen, H. (2001). "Cervical carcinoma and human papillomavirus: on the road to preventing a major human cancer." J Natl Cancer Inst 93(4): 252-253.
- zur Hausen, H. (2002). "Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application." Nat Rev Cancer 2(5): 342-350.
- Žilinskas, K., V. M. Čigrėjienė, et al. (2002). Gimdos kaklelio vėžio diagnostikos ir gydymo pagrindai. Vilnius, Vaistų žinios, UAB.

10. PUBLIKACIJOS DISERTACIJOS TEMA

STRAIPSNIAI

leidiniuose, įrašytuose į Mokslinės informacijos instituto (ISI) sąrašą

A.Vaitkuvienė, V.Gegzna, S.Juodkazis, S. Jursenas, S. Miasojedovas, R.Kurtinaitienė, J.Rimiene, J.Vaitkus „Fluorescence spectrum and decay measurement for HSIL vs NORMAL Cytology differentiation in liquid PAP smear supernatant“ LASER FLORENCE 2008: Selected Presentations at the International Laser Medicine Congress Florence (Italy), 31 October–1 November 2008 AIP Conference Proceedings Volume 1142, pp. 21-25.

A.Vaitkuvienė, V.Gegzna, R.Kurtinaitienė, J.Rimiene, J.Vaitkus. 355 nm Microlaser for autofluorescence diagnosis in PAPspin. Lasers Med Sc (2009) 24 (Suppl 1):S32.

STRAIPSNIAI

leidiniuose, esančiuose Lietuvos mokslo tarybos patvirtintose tarptautinėse duomenų bazėse

Kurtinaitienė R., Drąsutienė G., Apeikienė L., Ragauskytė A. Vilnius high school students' knowledge of cervical cancer risk factors. Acta Medica Lituanica, 2007, Vol.14. No 4. p. 291 -296.

Kurtinaitienė R., Drąsutienė G., Labanauskaitė I., Akelytė A., Drąsutytė L., „Vilniaus mieste gyvenančių moterų žinios apie gimdos kaklelio vėžio rizikos veiksnius ir patikros programą“. Medicinos teorija ir praktika, 2008, 14 tomas Nr. 4. p. 325 -330.

R. Kurtinaitienė, G. Drąsutienė Vilniaus universitetų studentų žinios apie gimdos kaklelio vėžio rizikos veiksnius : [stendinis pranešimas]. Lietuvos akušerija ir ginekologija. - T. 10, Nr. 3 (2007), p. 275.

STRAIPSNIAI KITUOSE LEIDINIUOSE

A. Vaitkuvienė, G. Kurilčik, P. Vitta, R. Kurtinaitienė, J. Rimienė, D. Fuchs, A. Lihachev, J. Spigulis. Light emitting diodes for liquid based cytology supernatant evaluation - photo-PAP // Proceedings of IALMS 2007 conference: Laser Florence the laser medicine world, Florence, Italy, 8-10th November, 2007 / editor: Leonardo Longo. Brno : Tribun ES, 2008, p. 88-100.

Pranešimai disertacijos tema:

A. Vaitkuvienė, R. Kurtinaitienė. Gyvų audinių ir išskyrų fotodiagnostika. Vilnius University, European Cervical Cancer Association. Tarptautiniai multidisciplininiai kursai. . Vilnius, 2007 m. sausio 24 d.

R. Kurtinaitienė, G. Drąsutienė. Vilniaus aukštųjų mokyklų studentų žinios apie gimdos kaklelio vėžio rizikos veiksnius. VIII Lietuvos akušerių ir ginekologų draugijos suvažiavimas. Panevėžys, 2007 m. rugsėjo 21-22 d.

Labanauskaitė I., Akelytė A., Kurtinaitienė R., Drąsutienė G. Vilniaus mieste gyvenančių moterų žinios apie gimdos kaklelio vėžio rizikos veiksnius, ŽPV bei organizuotą gimdos kaklelio patikros programą. VU MF studentų mokslinė draugija. Už šį darbą Lietuvos mokslo akademija skyrė pagyrimo raštą. Gegužės 8 d. 2008, Vilnius

A.Vaitkuvienė, N.Kurilčik, P.Vitta, R.Kurtinaitienė, J.Rimienė. D.Fuchs

Diodes for liquid based cytology supernatant evaluation- Photo Pap. 22-asis tarptautinis lazerinės medicinos kongresas. Florencija, 2008 m. Lapkričio 8-10d.

S. Miasoedovas, A.Vaitkuvienė, S.Juodkazis, S.Juršėnas, N. Kurilčik, R.Kurtinaitienė. Optical properties (EEM, fluorescence decay) of cervical smear supernatant. Tarptautinė konferencija „Photomedicine 2009: diagnosis and treatment“ and 2nd BALM Congress, Vilnius, 2009 m. rugsėjo 4-5 d.

A.Vaitkuvienė, V.Gegžna, R.Kurtinaitienė, J.Rimienė. Cervical smear supernatant auto fluorescence diagnosis for cancer screening. Tarptautinė konferencija „Photomedicine 2009: diagnosis and treatment“ and 2nd BALM Congress, Vilnius, 2009 m. rugsėjo 4-5d.

E.Brazdžiūtė, R.Kurtinaitienė, A.Vaitkuvienė Arborisation phenomenon in CIN diagnostics . Tarptautinė konferencija „Photomedicine 2009: diagnosis and treatment“ and 2nd BALM Congress. Vilnius, 2009 m. rugsėjo 4-5 d.

A.Vaitkuvienė, V.Gegžna, R.Kurtinaitienė, J.Rimienė, J.Vaitkus. 355 nm Microlaser for autofluorescence diagnosis in PAPspin. 23-asis tarptautinis lazerinės medicinos kongresas. Florencija, 2009 m. lapkričio 6-7d.

11. PRIEDAI

Padėka

Lietuvos Vėžio Registro vadovui šviesios atminties Profesoriui J.Kurtinaičiui, Profesoriui, akademikui V. A. Bumeliui, Profesoriui, akademikui J.Vaitkui, Profesorei dr. G. S. Drašutienei, Profesoriui dr. A. Laurinavičiui, Profesorei G. Kviškienei, Docentei dr. A.Vaitkuvienei ir Dr. R.Valiokui už nuoširdų palaikymą, paramą ir patarimus.

Valstybiniam mokslo ir studijų fondui ir Eurochip už paramą atliekant tyrimus.

Pirmosios apklausos anketa



Anketa – ką mes žinome apie gimdos kaklelio vėžio prevenciją

1. Ar žinote apie Lietuvoje vykdomą gimdos kaklelio patikros programą?

- Taip Ne

2. Kaip dažnai lankotės pas ginekologą:

- profilaktiškai kai turiu ginekologinių nusiskundimų nesilankau

3. Kaip manote, kada moteris pirmą kartą turėtų atlikti gimdos kaklelio citologinį tyrimą Pap tepinėlio metodu?

- Pradėjus lytinį gyvenimą Prieš kiekvieną nėštumą
 Po pirmo vaiko gimimo Sulaukus pilnametystės (18 metų)
 Kita (įrašyti) _____

4. Po kiek laiko kartoti Pap tepinėlio tyrimą, jei ankstesnio tyrimo atsakymas buvo normalus?

- Po 6 mėn. Po 1 metų Po 3 metų Kita _____

5. Pagrindinė gimdos kaklelio vėžio priežastis:

- Žmogaus papilomos virusas (ŽPV)
 Šeimyninė–genetinė predispozicija
 Ankstyvi lytiniai santykiai
 Kita (pabraukti): prasta higiena, genitalinės karpos, peroraliniai kontraceptikai, rūkymas

6. ŽPV gali būti perduodama per:

- Organizmo skysčius Oro lašeliais Lytiniu keliu

7. Ar ankščiau esate girdėję apie ŽPV?

- Taip Ne

8. Ar esate girdėjusi apie onkogeninius ŽPV tipus, kurie sukelia gimdos kaklelio vėžį?

- Taip Ne

9. Ar esate girdėjusi apie ŽPV, kurie sukelia lyties organų karpas?

- Taip Ne

10. Ar esate girdėjusi apie vakcinas nuo ŽPV?

- Taip Ne

11. Vakcina šiuo metu kainuoja apie 1200 Lt. Lietuvoje skiepijimas nėra kompensuojamas. Ar norėtumėte pasiskiepyti?

Taip Taip, jei kompensuotų valstybė Ne

12. Kokią pinigų sumą galėtumėte skirti vakcinai nuo ŽPV jei žinotumėte, kad tai sumažins riziką susirgti gimdos kaklelio vėžiu?

Iki 100lt iki600lt iki1200lt nežinau

Jūsų amžius _____

Jūsų išsilavinimas: a) aukštasis b) nebaigtas aukštasis c) aukštesnysis d) vidurinis e) pagrindinis

Jūsų užsiėmimo sritis su medicina susijusi su medicina nesusijusi

Dėkojame.

Antrosios apklausos anketa

Anketa Nr. _____

DATA ____ / ____ / ____ d.

Mėg. nr.

1.	Jūsų gimimo data	
2.	Gyvenamoji vieta	miestas ; kaimas; gyvenvietė; be nuolatinės gyvenamosios vietos;
3.	Šeimyninė padėtis	ištekęjusi; neištekęjusi;išsiskyrusi; gyvenate nesusituokę; našlė
4.	Išsilavinimas	pradinis (3 – 4 klasės); nebaigtas vidurinis (iki 9 klasės); spec. vidurinis ir vidurinis; nebaigtas aukštasis; aukštasis;
5.	Pirmos mėnesinės	nuo ____ metų
6.	Jei turite mėnesines(jei ne, pereikite prie 17 klausimo)	Ar mėnesinės reguliaros? Taip; Ne;
7.	Kaip gausiai kraujuojate mėnesinių metu?	negausiai; vidutiniškai; gausiai;
8.	Ar lytinio gyvenimo pradžia iki 18 metų?	Taip; Ne;
9.	Iki šiol turėjote lytinių partnerių:	1; 2-3; 4-10; daugiau;
10.	Pirmas gimdymas <i>amžius</i>	_____
11.	Persileidimų skaičius	_____
12.	Abortų skaičius	_____
13.	Paskutinis gimdymas <i>amžius</i>	_____
14.	Gimdymų skaičius	_____
15.	Ar buvo priešlaikinių gimdymų?	Taip; Ne;
16.	Kaip saugojatės nuo nepageidaujamo nėštumo?	nesisaugau visai; hormoninės tabletės(kiek mėnesių vartojate <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>); spiralė gimdoje (kiek mėnesių gimdoje <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>); prezervatyvai?; nutrauktas lytinis aktas?; kalendorinis metodas; farmatekso žvakutės;
17.	Menopauzė	_____ metų

18.	Ar vartojate pakaitinę hormonų terapiją?	Taip; Ne
19.	Kaip reguliariai lankotės pas ginekologą?	Savo iniciatyva 1-2 kartus per metus ; Kai turiu nusiskundimų ; kai reikalaujama patikrinti sveikatą ; Nesilankau ;
20.	Kada Jums pirmą kartą buvo atliktas onkocitologinis tepinėlis (PAP testas) ?	_____ amžius
21.	Kiek kartų Jums šis testas buvo atliktas ir kada paskutinį kartą?	_____ kartų atlikta amžius paskutinio tepinėlio metu _____
22.	Ar ankstesnio Pap tepinėlio atsakymas buvo normalus?	Taip; Ne; Nežinau
23.	Ar anksčiau buvo gydytas gimdos kaklelis?	Taip; Ne; Jei taip, tai prieš kiek laiko _____
24.	Ar esate anksčiau tirta dėl ŽPV (žmogaus papilomos viruso)?	Taip; Ne;
25.	Ar girdėjote apie Lietuvoje vykdomą gimdos kaklelio prevencijos programą? Ar dalyvavote?	Girdėjau Taip; Ne; Dalyvavau Taip; Ne
26.	Rūkote?	Taip Ne; Rūkiu anksčiau rūkau (rūkiu) nuo _____ metų amžiaus
27.	Ar rūko Jūsų šeimos nariai bute?	Taip Ne
28.	Ar Jūsų šeimos nariai sirgo vėžiu?	Seneliai ; Tėvai Broliai ar seserys
29.	Ar esate gydyta(-oma) nuo vėžinių susirgimų (ne ginekologinių)?	Taip Ne
30.	Ar dažnai sergate peršalimo ligomis (pvz., gripu, bronchitu, ausų, gerklės uždegimu)?	Taip; Ne Jei taip, tai kiek kartų per metus: _____
31.	Ar skiepijotės nuo gripo	Taip; Ne
32.	Ar sergate autoimunine (pvz., reumatoidiniu artritu, sisteminė raudonąja vilklige, autoimuniniu tiroiditu) ar alergine (bronchine astma, atopiniu dermatitu, alerginiu rinitu (šienlige)) liga?	Taip Ne; Jei taip, tai kokio: _____
33.	Ar sergate cukriniu diabetu?	Taip; Ne

34.	Ar vartojate imunitetą stiprinančius vaistus (vitaminai, maisto papildai ir kt.)?	Taip; Ne;
35.	Ar naktį miegate gerai?	Taip; Ne; vartoju miegui vaistus ;
36.	Svarbūs įvykiai Jūsų gyvenime pastaruoju metu	Pakeičiau darbą ; netekau darbo; padidėjo atsakomybė darbe; šeimos nariai išvažiavo į užsienį; mirė tėvai; mirė broliai, seserys ; žuvo vaikai
37.	Su kokiais psichofiziologiniais veiksniais susiduriate darbe?	Sunkus fizinis darbas, darbas, reikalaujantis dėmesio; darbas su kompiuteriu; emocinė įtampa darbe; darbas pamainomis; naktinis darbas; stovimas darbas; tolimas vaikščiojimas (virš 5 km per dieną)
38.	Ar patiriate šeimoje stresą ar didelę įtampą?	nepatiriu; retkarčiais; dažnai
39.	Įvertinkite Jūsų gyvenimo sąlygas:	geros; patenkinamos; nepatenkinamos;
40.	Namų ruošos darbai:	sunkūs lengvi;
41.	Ar trūksta lėšų buities reikmėms?	dažnai; retkarčiais; niekada;
42.	Vyro išsilavinimas	pradinis nebaigtas vidurinis spec. vidurinis ir vidurinis nebaigtas aukštasis aukštasis