

VILNIUS UNIVERSITY

Rūta Kurtinaitienė

**RISK FACTORS AND DIAGNOSTIC METHODS OF HIGH GRADE
CERVICAL SQUAMOUS INTRAEPITHELIAL LESIONS**

**Summary of doctoral dissertation
Biomedical sciences, medicine (07B)**

Vilnius, 2009

The dissertation was prepared at Medical Faculty in Obstetric and Gynaecological Clinic of Vilnius University from 2005 to 2009.

Scientific supervisor:

Assoc. Prof. Dr. Aurelija Vaitkuvienė (Vilnius University, biomedical science, medicine-07B)

Scientific consultants:

Prof. Dr. Osvaldas Rukšėnas (Vilnius University, biomedical science, biophysics- B02)

Prof. Dr. Gražina Stanislava Drašutienė (Vilnius University, biomedical science, medicine- 07B)

Dissertation will be defended in the Medicine Research Council of Vilnius university:

Chairman

Assoc. Prof. Audronė Arlauskienė (Vilnius University, biomedical science, medicine – 07B)

Members:

Prof. Dr. Habil. Žilvinas Padaiga (Kaunas University of Medicine, biomedical science, public health – 10B)

Dr. Mykolas Mauricas (Vilnius University Institute of Immunology, biomedical science, biology - 01B)

Assoc. Prof. Renata Rizgelienė (Vilnius University, biomedical science , medicine – 07B)

Dr. Živilė Gudlevičienė (Vilnius University Institute of Oncology, biomedical science, medicine – 07B)

Opponents:

Assoc. Prof. Vladas Gintautas (Kaunas University of medicine, biomedical science, medicine – 07B)

Dr. Habil. Laima Plešnienė (Vilnius University Institute of Oncology, biomedical science, medicine- 07B)

The dissertation will be defended at the open session of the Medicine Research Council on February 3, 2010 at 14.00 and will take place in the Aula at the Vilnius University Faculty of Medicine.

Adress: M. K. Čiurlionio 21, LT- 03101, Vilnius, Lietuva.

The summary of the doctoral dissertation was sent on December 30 , 2009.

The dissertation is available in the library of Vilnius university.

Vilniaus Universitetas

Rūta Kurtinaitienė

**GIMDOS KAKLELIO RYŠKIŲ INTRAEPITELINIŲ 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 Vaitkuviene (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, medicina-07B)

Moksliniai konsultantai:

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

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

Disertacija ginama Vilniaus universiteto medicinos mokslo krypties taryboje:

Pirmininkė

Doc. dr. Audronė Arlauskienė (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, medicina-07B)

Nariai:

Prof. habil. dr. Žilvinas Padaiga (Kauno medicinos universitetas, biomedicinos mokslai, visuomenės sveikata -10B)

Dr. Mykolas Mauricas (Vilniaus universiteto Imunologijos institutas, biomedicinos mokslai, biologija - 01B)

Doc. dr. Renata Rizgelienė (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai , medicina 07B)

Dr. Živilė Gudlevičienė (Vilniaus universiteto onkologijos institutas, biomedicinos mokslai, medicina 07B)

Oponentai:

Habil.dr. Laima Plėšnienė (Vilniaus universitetas onkologijos institutas, biomedicinos mokslai, medicina- 07B)

Doc. dr. Vladas Gintautas (Kauno medicinos universitetas, biomedicinos mokslai, medicina- 07B)

Disertacija bus ginama viešame Medicinos mokslo krypties tarybos posėdyje, kuris įvyks 2010 m. vasario 3 d. 14 val. Vilniaus Universiteto Medicinos fakulteto didžiojoje auditorijoje.

Adresas: M. K. Čiurlionio 21, LT- 03101, Vilnius, Lietuva.

Disertacijos santrauka išsiuntinėta 2009 m. gruodžio mėn. 30 d.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto bibliotekoje.

INTRODUCTION

The incidence rate of cervical cancer has shown it to be the second leading disease among other malignant tumours, whereas it is the third which accounts for female cancer mortality in the world (Arbyn, Raifu et al. 2007; Ferlay, Autier et al. 2007). Referring to the 2005 data of WHO, the cervical cancer incidence rate in Lithuania was of 27.4 per 100 000 of the population, while its mortality incidence rate was of 11.8 per 100 000 of the population (World Health Organization. 2008). The indicated numbers are considerably higher than the average European indexes.

80% of cervical cancer cases have been diagnosed in developing countries due to the fact that secondary preventive care is not properly financed there. Therefore, such countries have to assign a high priority to primary preventive care if they aim at reducing the number of cervical cancer incidence.

Primary and secondary cervical cancer prevention would significantly reduce the incidence of cervical cancer. The primary prevention includes possessing comprehensive knowledge of cervical cancer risk factors and their elimination or reduction. First, it concerns the knowledge women have about papillomavirus and the ways of reducing this infection incidence (avoiding situations in which it is more likely to catch the virus, vaccination against it, etc.).

The secondary prevention comprises diagnosis of pre-cancerous pathology and early stage cervical cancer (Lorincz, Castle et al. 2002), applying such cytological research methods as *Papanicolaou* (Pap test) test. All the countries which carry out cervical screening programme use the method of Pap test; however, in order to make this screening effective and available, there has to be an organized screening system all over the country. Apparently, cervical screening is likely to succeed just in case of an operating and well organized system of testing. These are the following elements that ensure success of well organized screening:

1. Public health promotion;
2. Well coordinated work of Health Care Centres (well established rapport between Primary Health Care Centres, Cancer Registry and Pathology laboratory);
3. Quality assurance of medical services by establishing close control;

If the above mentioned elements are not properly introduced and the activities are not coordinated, the screening programme is unlikely to succeed and it is difficult to expect positive outcomes since coherent system is an essential prerequisite for Pap test. At present, the absence of both centralized call system and system of taking Pap tests are the causes of ineffective screening programme. Thus, the countries which are not able to implement a well organized screening system could better do with *lab off* methods which could help in deciding on further observation and treatment. Due to this, the diagnosis *at the point of care* could allow us not to take decisions on further observation/treatment tactics but to take a biopsy at once not waiting for Pap test results.

Low sensitivity of cytological smear and specificity HSIL (High Grade Intraepithelial Lesion) (CIN2+) of HPV test in diagnostics necessitates searching for new diagnostic methods in cervical screening (Cuzick, Clavel et al. 2006; Koliopoulos, Arbyn et al. 2007). The sensitivity range of Pap test method in CIN diagnostics varies between 30–80%, whereas the range of its specificity varies between 14–97% (Munk, Kjaer et al. 1998; Nanda, McCrory et al. 2000; Arbyn, Sankaranarayanan et al. 2008). Profound range differences exhibit the fact that a large part of tests are assessed as being incorrectly positive or incorrectly negative. This observation encourages looking for new testing methods which were more precise and would facilitate the diagnostics of cervical intraepithelial changes. As a result such new technologies and methods as automated cervical smear analyzer, HPV detection employing the PCR or hybrid capture (HC) methods or the most recent researches into cell cervical cancer (p16, Ki-67, bcl-2, p53) and HPV E6/E7 mRNR have emerged (Lie and Kristensen 2008; Nam, Kim et al. 2008). Liquid based cytology (LBC) provides better opportunities for such optical and proteomic diagnostic methods since the supernatants accumulate much substance which characterizes the features of epithelial proliferation. The metabolic products include substances which can be detected by employing the method of fluorescence spectroscopy. The wide excitation zone of fluorescence spectra visualization would allow creating the so called “electronic Pap test” which can be a highly informative screening method in diagnosing cervical pathologies. Stationary laboratory devices could be used for this purpose. The precision of new methods is likely to be higher than of those used at present. Optical technologies have a wide range of potential applications in clinical practice. Immediate diagnostics of cervical intraepithelial lesions *at the point of*

care which does not require additional patient's visits could save time and resources. This is of special importance in economically weak and developing countries. The search of new, prompt, sensitive, not expensive and non invasive diagnostic methods would allow us to diagnose HSIL during the first patient's visit to a gynaecologist, whereas the self screening method being available to every woman would encourage her to seek a gynaecologist's help immediately. Obviously, the focus of attention on improvement of diagnostic methods should go together with public health promotion on cervical cancer risk factors, their prevention possibilities and encouragement of women to undertake regular visits their gynaecologist.

Also, rapid development of nanomedicine raises high expectations. Thus, the most recent studies in microarray technologies open new possibilities for clinicians to better understand the pathology processes and to detect them at an early stage (Tomizaki, Usui et al. 2005; Eisenstein 2006). The most significant advantage of the microarray method is that such devices allow interpreting hundreds of patients' tests at the same time and receive information about the interaction of selected protean-marker and the influence of different oncogenetic factors. Also, these methods could be applied in cervical pathology prevention as self screening tests.

During the last decade, considerable attention was devoted to optical diagnostic methods. Their non invasive character, high sensitivity and diagnostic resolution in comparison with usual diagnostic methods (nuclear magnetic resonance, computer tomography or sonoscopy) may account for their popularity (Hillemanns, Weingandt et al. 2000). Furthermore, optical methods are effective in detecting morphological and biochemical cervical epithelial lesions without invasive surgery and at once. This is so called at *the point of care*.

Other recent studies in cervical diagnostics include reflectance spectroscopy (Freeberg, Benedet et al. 2007; Redden Weber, Schwarz et al. 2008), fluorescence spectroscopy (Brookner, Utzinger et al. 1999; Mitchell, Cantor et al. 1999; Chang, Dawood et al. 2002; Brookner, Utzinger et al. 2003; Freeberg, Benedet et al. 2007), Raman scattering spectroscopy (Drezek, Brookner et al. 2001; Kanter, Vargis et al. 2009) and confocal microscopy (Shim, Song et al. 2000). Among these non invasive diagnostic methods, the method of fluorescence spectroscopy has been considered as the most promising one due to the fact that it has rather high levels of sensitivity (75) and specificity (80%). Two data

meta-analyses have indicated that fluorescence spectroscopy is a significantly more sensitive diagnostic method in comparison with Pap test and colposcopy methods (Mitchell, Cantor et al. 1999). Interest in these methods is also stimulated by their non invasive character, high sensitivity and diagnostic resolution in comparison with applying the usual diagnostic methods – nuclear magnetic resonance, computer tomography or ultrasonography (Hillemanns, Weingandt et al. 2000). Moreover, not only fluorescence but also other optical tissue or secretion parameters as reflection, scattering and absorption can be taken into account.

Optical technologies have a wide range of potential applications in clinical practice. Immediate diagnostics of cervical intraepithelial lesions at the point of care which does not require additional patient's visits could save time and resources. This is of special importance in economically weak and developing countries. The search of new, prompt, sensitive, not expensive and non invasive diagnostic methods would allow us to diagnose HSIL during the first patient's visit to a gynaecologist, whereas the self screening method being available to every woman would encourage her to seek a gynaecologist's help immediately. Obviously, the focus of attention on improvement of diagnostic methods should go together with public health promotion on cervical cancer risk factors, their prevention possibilities and encouragement of women to undertake regular visits to their gynaecologist.

The present research has undertaken a demanding task of searching for new cell diagnostic methods in order to identify HSIL while incorporating supernatant samples in preventive cervical cancer screening. To carry out this task, optical and biochemical research methods were employed. Moreover, in order to identify HSIL risk factors, a systematic women survey was conducted. In addition to that, a questionnaire survey was carried out with the aim to find out how much women with permanent residence in Vilnius know about cervical cancer risk factors, the cervical cancer prevention programme run in Lithuania, and to find out women's visit regularity to their gynaecologist.

The Aim of the Study

The aim of the study is to find the effective direct screening methods of high grade cervical squamous intraepithelial lesions and to optimize them considering the established risk factors.

The Objectives of the Study

The following objectives of the study have been set out:

1. To investigate the correlation between social and medicine risk factors and pre-cancerous conditions while employing detailed questionnaire surveys.
2. To apply direct cell diagnostic methods to cervical liquid-based (supernatant) testing.
3. To establish the parameter differences of supernatant autofluorescence spectre which could enable to diagnose high grade cervical squamous intraepithelial lesions, i.e. to distinguish pre-cancerous conditions from non malignant cervical intraepithelial lesions.
4. To evaluate the reliability of microarray method in diagnosing p16INK4a in high grade cervical intraepithelial lesions.

Claims to be defended

Consistent with the research results, the following claims are defended:

- The major HSIL risk factors include rejection to be vaccinated against flu, life in villages and other rural areas, neglected pathological changes and/or negligent cervix treatment in the past and women's lack of education (just primary or basic). This allows asserting that they are low indexes of social maturity and they prevent successful implementation of the screening programme. Moreover, they imply the need of special preventive methods application to the risk groups.
- Mobile autofluorescence spectrometry and shining proteomic markings on microarray are potential diagnostic methods of high grade cervical squamous intraepithelial neoplasia which could be applied to risk group women in areas of non organized cervical screening.

The Scientific Significance and Practical Value of the Study

- An original questionnaire was designed to perform questionnaire survey according to which, the replies of women-respondents allows distinguishing the risk HSIL factors. On the basis of the questionnaire survey data, the level of being informed about HPV and cervical cancer screening programme in Lithuania was determined. There are not many researches of cervical pathology correlation with demographical, social and educational factors published in Lithuania. Taking into account the research data, there is a possibility to increase the efficiency of the cervical cancer screening programme in Lithuania considering the pre-cancerous HSIL (CIN2+) women risk groups. Having applied more precise and direct HSIL (CIN2+) selection methods to low social maturity risk group, it is likely to obtain more successful outcomes of cervical cancer prevention, thus the cervical cancer morbidity incidence and mortality rates would decrease.
- The performed spectroscopic and biochemical tests of cervical Pap test supernatant and their comparative analysis indicated that these methods are superior to the methods employed at present. The findings of spectroscopic fluorescence tests were compared to the findings of cytological and histological tests. There was established the sensitivity and specificity of differentiating WNL (within normal limits) cases from HSIL (CIN2+), i.e. the differentiation when cytological findings confirm the absence of high grade cervical squamous intraepithelial lesion or malignant tumour (WNL) and when there are pathological cases of high grade cervical squamous intraepithelial lesion. The supernatant fluorescence spectre tests were performed in Lithuania for the first time.
- The conducted search of protein p16INK4a in supernatant employing the microarray method was not observed in scientific literature. The practical value of the study: Taking into account the microarray testing method, it becomes possible to create a test which could be applied to women's self screening, and in case of pathology they could turn to the gynaecologist immediately.

The Study objects

This is a prospective case-control study carried out in 2007–2008. It consisted of two stages and comprises the results of women who were diagnosed with HSIL or WNL (No Intraepithelial Lesions or Malignant Tumours) applying the usual cytological Pap method. First, the women who met the selection criteria and agreed to participate in the study replied to the questions presented in the questionnaire. Afterwards, the gynaecological exam was performed during which cervical cytological liquid-based smear test was performed. 459 women participated in the initial study, and 285 of them who fulfilled the study inclusion criteria were incorporated in further analysis.

The Study Methods

The following methods were employed:

A questionnaire survey of women respondents (prepared under the supervision of Prof. Dr. J. Kurtinaitis, Head of Lithuanian Cancer Registry)

- The first questionnaire survey was carried out in order to find out how much women know about cervical cancer, its risk factors (HPV), prevention measures, and the national cervical screening programme run in Lithuania. The survey was conducted in Vilnius University Hospital *Santariškių klinikos*, at Mykolas Romeris University, Faculties of Medicine, Chemistry and Physics at Vilnius University, Faculty of Health Care at Vilnius College and at Vilnius Pedagogical University. 1825 women were the respondents of the survey.
- The second questionnaire survey was carried out with women residing in Vilnius who visited their gynaecologist in Primary health care centers (PHCC) in order to participate in the national cervical screening programme or they were self referrals because of pathological gynaecological changes they experienced. Cytological screening tests applying the Pap test method were performed to all the women. All in all, 459 women were the respondents of this survey. While employing the method of univariate and multivariate logistic regression, it was possible to distinguish which features are most distinctly related to high grade cervical squamous intraepithelial lesions. The ratio between the risk factor and the

pathology was calculated for each analyzed feature according to odds ratio (OR) and 95 % confidential intervals (CI).

Laboratory tests

- Pap test method. 459 cytological liquid-based cervical smear tests were performed. The smears were evaluated by an expert pathologist at National Pathology Centre (NPC) according to the Bethesda classification. The result of 337 (73, 4%) smears was negative, i.e. there were no intraepithelial lesions or malignant tumour (WNL), whereas 105 (18,8%) tests had intraepithelial lesions of different degrees, and 17 (3,7%) Pap tests proved to be unsuitable for cytological interpretation.
- Histological evaluation of cervical biopsy (NPC). 107 cervical biopsies/conizations in Vilnius University Hospital *Santariškių klinikos* (VUSKL) and the Institute of Oncology, Vilnius University (VUOI) were performed in HSIL cytology group. The results of histological examination of cervical biopsy tissues were evaluated according to World Health Organisation (WHO), a classification of women breast and genital malignant tumours confirmed in 2003, and according to three grade system of Cervical Intraepithelial Neoplasia (CIN). 74 (69, 2%) women were diagnosed with CIN2+.
- Expression of protein p16 INK4a identification. Immunohistochemical and immunocytochemical methods were employed to identify protein p16 INK4a (NPC).

Optical analysis methods

- Luminescence spectrophotometric analysis (the excitation wavelength was 290, 300, 310 nm) at Laser Study Centre, the Faculty of Physics at Vilnius University).
- The excitation wavelength 355nm was achieved by using Lithuanian micro laser STA-01 and spectrometer AvaSpac-2048TEC-USB2, Avantes. 459 samples of supernatant spectres were recorded.

Biochemical proteomic analysis

- Microarray method;

- Electrophoresis method;
- Western Blot test.

Statistical data analysis

- **Sample Size Group**

The size of the study group was determined by a premise that the applied optical methods will be more sensitive in HSIL diagnostics than the Pap test since the sensitivity of traditional Pap test ranges between 30–80%. Presuming that the sensitivity of the research of the employed methods will be 15, 17 or 20 % higher, the ratio of N meanings is estimated to be 1:4 of the case group and control group, the force of the study is estimated to be 0,8, the statistical reliability factor $\alpha=0,05$, several estimators have been chosen in order to frame the size of the sample group. The performed calculations indicated that if we estimate the present test to be 15 % more sensitive and expect to obtain reliable research data, 58 women suffering from HSIL have to be studied, whereas with the estimation of 17% – 60 women and consequently 20% – 43 women (table 1).

Table 1. The Sample Study Group and Control Group Framing according to Sensitivity of the Testing Method

Group	N indexes of the study group and control group according to the estimated sensitivity indexes		
	15% higher $p_{\text{study}} = 0,75$ $p_{\text{control}} = 0,60$	17% higher $p_{\text{study}} = 0,77$ $p_{\text{control}} = 0,60$	20% higher $p_{\text{study}} = 0,80$ $p_{\text{control}} = 0,60$
Reliable study group (HSIL) sample	78	60	43
Control (WNL) group sample	312	240	172

Women clinical research scheme is shown in Figure 1.

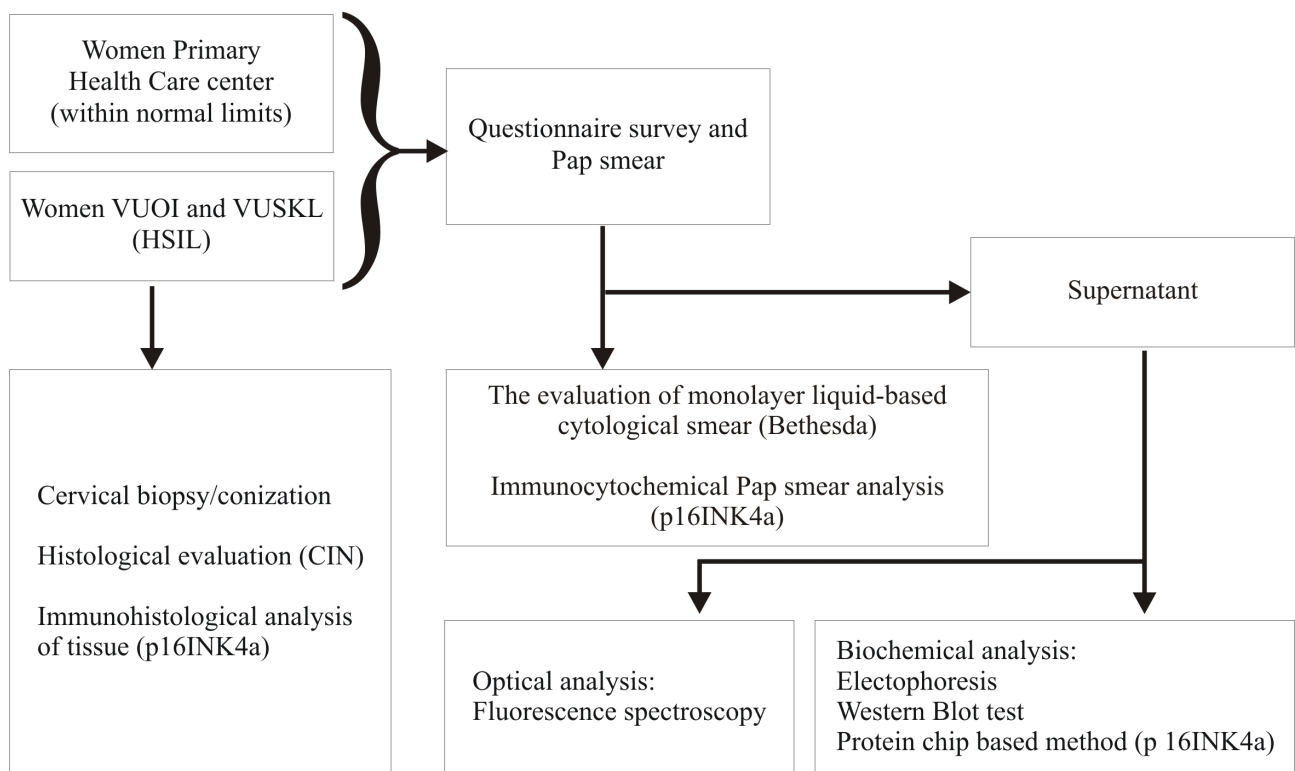


Figure 1. The Scheme of Women Survey, Cervical Biopsy Tissue Removal and their Laboratory Analyses Based on Different Research Methods.

The scheme indicates that all women under the investigation were questioned and they underwent cervical tissue cytological screening based on the Pap test. When the cytological screening confirmed the HSIL, the women were directed to perform biopsy and histological testing of cervical lesions. This biomedicine research was performed under the agreement of the Lithuanian Bioethics Committee.

- **The Contingent of Women under Investigation**

The case group women had to meet the following criteria:

- The HSIL diagnosis was confirmed by a cytological screening, which was further confirmed by histological testing of biopsy tissue as CIN2+ (confirmed CIN2, CIN3 or CIS pathology);
- Women’s voluntary agreement to participate in the study.

The control group was comprised of women who met the following criteria:

- Cytological screening did not detect any pathologies (WNL – Within Normal Limits);
- The age bracket was ± 3 years in comparison with the age of the case group.
- Women's voluntary agreement to participate in the study.

The women were excluded from the control group list if they did not meet the following criteria:

- Women's age differed from the average age of the case group more than ± 3 years;
- Women diagnosed with various other cervical cytological pathologies. If the control group women were diagnosed with HSIL or their biopsy tissue testing confirmed CIN2, CIN3, CIS, they were transferred to the case group;
- Pregnant women.

Therefore, after the initial study which included 459 women, just 285 women met the indicated criteria and were invited for further investigation in the study group.

Results of the Research

Results of the first questionnaire survey

Out of 1797 women who responded to the questionnaire about the cervical cancer screening programme ongoing in Lithuania, 1508 women (83,9 %) knew about it. The women's knowledge did not depend on the education they obtained. 9 out of 10 respondents who were related to medicine (89,96 %) had the information about this programme, whereas just 7–8 out of ten respondents who were not related to medicine had this information (76,38 %; $p < 0,05$). The respondents who knew about the HPV were likely to know about the ongoing screening programme ($p = 0,000$). Just 9,6 % of the respondents who knew about the human papillomavirus as a cervical cancer risk factor, did not know about the ongoing cervical screening programme in Lithuania.

Almost half of the respondents, i.e. 882 women (49,1%) replied that they visit their gynaecologist regularly. Among them, 90,9 % knew about the screening programme, and just 9,1 % of them did not know anything about it ($p = 0,000$). 908 respondents (50,5 %)

out of all 1797 respondents who knew about HPV and did not know about the programme visited the gynaecologist just if they had some complaints or did not visit the gynaecologist at all (39,7 % and 10,8 %, respectively). As the survey data suggest, those respondents who have secondary or basic education visited their gynaecologist more regularly than those respondents who have higher education or not completed higher education ($p=0,000$).

Results of the second questionnaire survey

Only fully filled in questionnaires were selected for further analysis. 8 questionnaires were not suitable for statistical processing, whereas 451 questionnaires were suitable for statistical processing. Case-control study matched by age was performed. Every study group member was provided with peer members from the control group in relation 1:4. The data were processed employing the method of univariate and multivariate logistic regression analysis.

After the univariate logistic regression analysis was performed, it proved that there are many factors that influence the risk for women to be diagnosed with HSIL. They include the following factors: living in rural areas (RR=2,87; 95% CI 1,36–6,02; $p=0,005$); women who did not have treatment of cervix earlier (RR=3,26; 95% CI 1,34–7,94; $p=0,009$); not being vaccinated against flu (RR =8,63; 95% CI 2,03–36,63; $p=0,003$); periods which started at late adolescence (after 14) (RR =1,94; 95% CI 1,04–3,65; $p=0,037$); immunity not stimulated with medicine (RR =1,92; 95% CI 1,07–3,45; $p=0,029$), etc. More educated women (with higher education or not completed higher education) face lower risk of developing cancer (RR =0,39; 95% CI 0,21–0,70; $p=0,002$). Nevertheless, after performing a multiple logistic regression analysis, just a few risk factors were taken into account as being reliable:

- There is a lower risk to develop HSIL for women with better education (with higher education or not completed higher education) than for those who have poor education (RR =0,35; 95% CI 0,16–0,76; $p=0,008$).
- Women who did not have treatment of cervix earlier run the greater risk of developing HSIL (RR =3,41; 95% CI 1,20–9,67; $p=0,021$).

- Women living in rural areas run the 3 times higher risk of developing HSIL than women living in urban areas (RR =2,84; 95% CI 1,13–7,18; p=0,027).
- Women who have never been vaccinated against flu run the 11 times higher risk in comparison with analogous rates of those who have been vaccinated (RR =11,32; 95% CI 1, 2,23–57,51; p=0,003).

Other factors related to cervical pathologies seemed to be not statistically significant in the multivariate analysis.

Laboratory test

In total, 459 liquid-based cytological smears have been examined. 337 smears have been reported as not containing any intraepithelial lesions or malignant tumours (WNL), whereas 105 (18,8 %) were reported as having intraepithelial lesions of different degree and 17 cases (3,7 %) were considered insufficient for cytological evaluation. The distribution of women under investigation according to the results of cytological tests is presented in Table 2.

Table 2. The distribution of women under investigation according to the diagnosed cervical pathology applying the method of liquid based cytology (GynoPrep and Pap Spin) smear.

Diagnosis	N	Percentage
ASCUS	18	3,9
HSIL	69	15,0
LSIL	18	3,9
WNL	337	73,4
Insufficient for evaluation	17	3,7
Total	459	100,0

Moreover, 107 women have undergone the procedure of cervical biopsy or conisation. The women distribution according to the diagnosis of histological tests is presented in Table 3.

Table 3. The distribution of women under investigation according to the cervical biopsy results of histological tests.

Results of histological test	N	Percentage
Without lesions	2	1,9
Cervicitis	24	22,4
CIN1	7	6,5
CIN2+	74	69,2
Total	107	100,0

The Pap test cytological results of the same women were compared with the results of biopsy tissue test. Accordingly, among the 68 women, who were diagnosed with HSIL applying the cytological Pap test, 65 women (94,2 %) were diagnosed with CIN2+ histologically, 3 women were diagnosed with cervicitis and there was one case of CIN1 diagnosis (Table 4).

Table 4. Comparison of histological and cytological diagnosis

Cytological diagnosis	Histological diagnosis					
	ASCUS	HSIL	LSIL	No lesions (WNL)	Insufficient for evaluation	Total
No lesions				1	1	2
Cervicitis	7	3		13	1	24
CIN1		1	3	2	1	7
CIN2+		65	4	4		72
Invasive SCC		1				1
Total	7	69	7	20	3	107

The sample test of HSIL diagnosis is histological test of biopsy tissue, whereas the cytological test sensitivity of monolayer standard liquid-based Pap test is 98,0 %, specificity is 48,4 %. The calculated predictive value of positive test makes 75,4 %, whereas the predictive value of negative test is 93,8 %. Due to the facts that the groups diagnosed with the aforementioned lesions were selected deliberately and that the cytological smears were evaluated by highly qualified cytologists, the possibility to

evaluate the sensitivity, specificity, PPV and NPV of the test as being populational should be eliminated.

Identification of protein p16INK4a expression

Altogether 32 Pap tests were tested according to the standard immunocytochemical method. The findings of immunocytochemical test and their relation to the indexes of cytological diagnosis are presented in Table 5.

Table 5. The correlation of protein p16INK4a expression and the indexes of cytological diagnosis

p16 test	WNL	HSIL	LSIL	Total
Negative	12	1	2	15
Positive	1	13	3	17
Total	13	14	5	32

The data presented in Table 5 are apparently obvious. There was established a high correlation between the indexes of protein p16 INK4a and the high grade of diagnosis. The direct correlation was also established between the histological testing findings of cervical cancer and the indexes of protein p16 INK4a expression which was identified employing the immunocytochemical method. Among 14 women who suffered CIN2+, 13 women were diagnosed with positive p16 INK4a test (Table 6)

Table 6. The correlation of protein p16INK4a expression and severity of CIN degree

p16 test	CIN1	CIN2	CIN3	Total
Negative			1	1
Positive	1	3	8	13

Correspondingly, if CIN2+ diagnosis was confirmed after cytological testing, the sensitivity of protein p16INK4a testing method is 87 % and positive predicted value of the method is 93%. Thus, it can be concluded that taking into account the findings of the protein p16 test accurate diagnosis of 93% of all cases is possible to establish. Also, the specificity of the testing method is high (92%).

The Findings of Liquid-based Cytological Smears Supernatant Applying Optical Methods

When we have 355 nm excitation and fluorescence is 405–424 nm (elastin), the best result in emission was obtained while separating HSIL (CIN2+) from WNL ($p=0,0003$). Autofluorescence 475–515 nm (lipids: cholesterol, dihydro-ergosterol, riboflavin) is of major importance while separating HSIL, cervicitis and WNL groups, though WNL ($p=0,001$) is the easiest to separate.

Taking into account all lamp spectroscopy excitations (290, 300, 310), the highest response (emission) difference between WNL and HSIL (CIN2+) groups is observed when emission is over 379 nm. The best result is achieved using lamp spectroscopy in exciting supernatant with 290 nm wavelength and when autofluorescence (emission) >379 nm (collagen, estrone, elastin). Both cytological groups WNL and HSIL (CIN2+) yield reliable results while separating them, although WNL is separated more effectively $p=0,001$ and $p=0,008$, respectively.

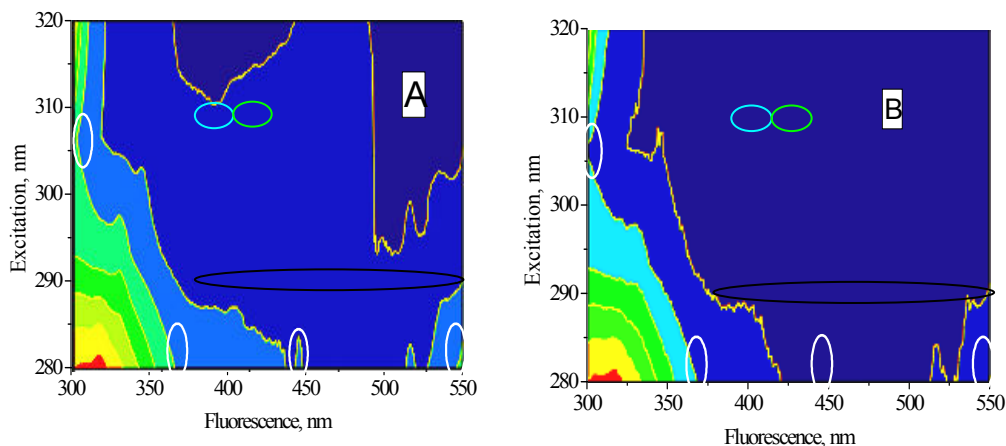


Figure 2. The matrix of fluorescence excitation in supernatants: A-WNL, B-HSIL (the coloured ellipses mark the places where parameters were different in WNL and HSIL (CIN2+) groups).

Thus, taking into account the research findings, it is possible to claim that while employing optical methods in the supernatant sample tests, the portable Lithuanian micro laser STA-01 together with spectrometer *AvaSpec-2048TEC-USB2 Avantes* in 405–424

wavelength emission turned out to be the most reliable in 355 nm wave excitation. Table 7 provides diagnostic characteristics of spectrometer lamp (290 nm) and portable micro laser.

Table 7. Diagnostic characteristics of stationary spectrometer (290 nm) and portable micro laser (355 nm) supernatant separating WNL and HSIL (CIN2+) groups in supernatant.

Excitation, nm Supernatant form	Criterion	SPP	Sensitivity	Specificity	TPV	NPV	AUC	p
290 nm (liquid-base)	>379	0.021	0.716	0.655	0.863	0.432	0.686	<0.0001
355 nm (dried)	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

The Findings of Protein Chip and Biochemical-Proteomic Methods

The findings obtained by liquid-based cytological smear and biopsy tissue tests of hospitalized women, which were obtained employing a set of different methods, were compared and their arbitrary indexes were statistically processed. The summary of this analysis is presented in Table 8.

Table 8. The summary of the results obtained for the hospitalized women group

Sample No.	Cytological diagnosis	Histological diagnosis	P16 detection by the protein chip method	Electrophoresis	Western blot	p16 identification employing immunohistochemical method	HPV type
1	HSIL	CIS	++	+	+	++	16
2	HSIL	CIS	++	+	+	±	Not identified
13	ASCUS	CIN3	—	—		±	16
14	HSIL	CIN3	—	—		+	16
15	HSIL	CIS	+	—		+	16
18	HSIL	CIN2	—	+	—	—	—
19	HSIL	Cervicitis	++	++	+	±	16
20	HSIL	CIN3	+	+	—	+++	—
21	HSIL	CIN3	—	+	—	++	—
22	HSIL	CIN2	+	+	—	+++	—

One of the goals of this study was to explore the applicability of the protein chip (microarray) method for detection of protein p16 INK4a in repeatedly centrifuged supernatant samples. Protein chip-based analysis indicated that while identification of more severe CIN cases was possible, the fluorescence detection of soluble protein p16INK4a via antibody p16^{INK4a} in supernatant samples generally was not sensitive enough. Most likely, this due to the fact that this test has not been standardized yet and it certainly depends upon technical factors such as brush rinsing time, the amount of the collected tissue, etc. Another explanation is the specificity of the commercially available quantum dot-secondary antibody conjugate, which was employed in this study for detection of the anti-p16^{INK4a}. Namely, the antibody is attached to the quantum dot without a biocompatible spacer, a design that might influence the specific and nonspecific binding to the microstructured surface of the chip.

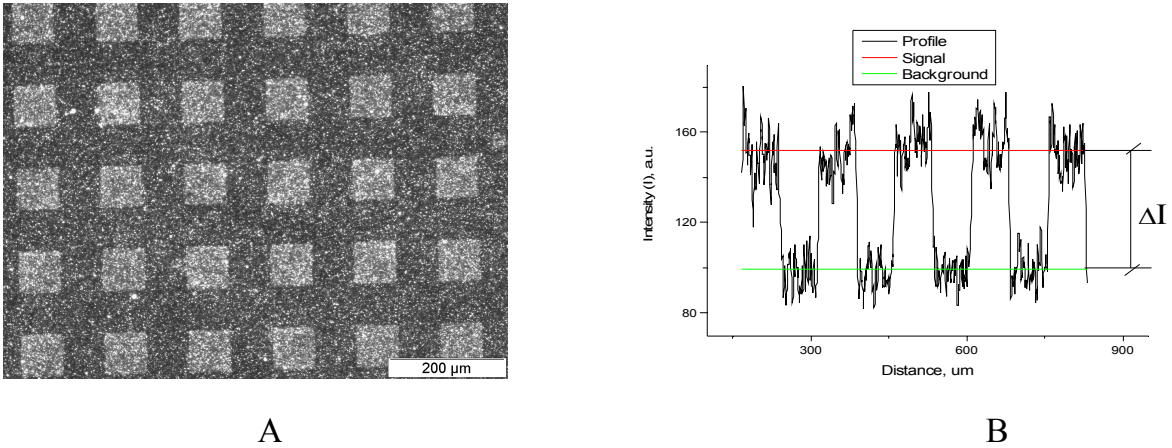


Figure 3. Fluorescence microscopy analysis of the protein chip for detection of p16^{INK4a}. Protein p16^{INK4a} was recognized by mouse monoclonal antibody and then visualized by goat F(ab')₂ anti-mouse IgG-QD conjugate. A. Fluorescence image (10x objective). B. Fluorescence signal intensity profile.

A typical fluorescence microscopy image of a protein chip containing proteins immobilized from healthy woman's supernatant is shown in Figure 4.

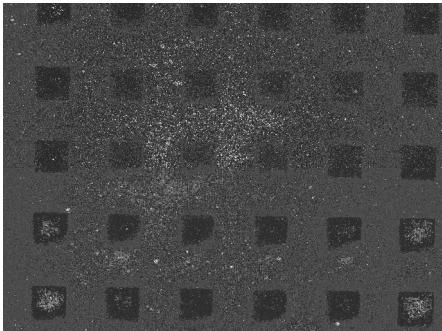


Figure 4. Fluorescence micrograph of a control experiment using a healthy woman's supernatant sample (10x objective)

Further on, by employing the method of **two-dimensional electrophoresis**, the proteins present in the supernatant were first fractioned according to their molecular mass (see Figure 3A). The distinctive stripe in the gel nearly 15 kDa (the graduation of the scale corresponds to the molecular mass of the protein) indicates a possibility that the sample may contain protein p16. To test this assumption (as well as to confirm the results of testing employing microarray method) the same sample was additionally analysed by Western blot method (Figure 3B).

CONCLUSIONS

1. The questionnaire surveys were aimed at distinguishing the major social risk (low social maturity) factors of severe cervical intraepithelial lesions:
 - Not getting vaccinated against flu ($p=0,003$), poor education ($p=0,008$), negligent treatment of cervix ($p=0,021$) and living in a village or other rural areas ($p=0,027$);
 - The differences in knowledge about the HPV and national cervical screening programme indicate that public education about cervical preventive measures is not effective.
2. The parameters of supernatant autofluorescence excitement and emission were established and they are considered to be reliable in diagnosing cervical pre-cancerous condition employing the mobile spectrometer.
3. Supernatant sample excitement by the 355 nm length of wave, emission 405–424 nm, using mobile micro laser STA-01 spectrometer *AvaSpec-2048TEC-USB2 Avantes* is the most appropriate optical method which enables to detect high grade cervical squamous intraepithelial lesions. WNL and HSIL groups are distinguished credibly: $p<0,001$ (AUC 0,96, sensitivity 0,91, specificity 1.000).
4. The protein chip for detection of p16 INK4a in supernatant samples is perspective method.

Summary

The established risk factors of high grade cervical squamous lesions are characteristic of the areas where there is not implemented organized cervical cancer screening, as well as where the groups of low social maturity live; this leads to greater risk of cervical pre-cancerous and cancer diseases. It is recommended to apply the diagnostic methods to such risk groups and these methods would enable the gynaecologist to plan treatment or observation tactics during the first visit. The researched methods – mobile spectrometry and shining proteomic markings on the microarray – are potential diagnostic methods which comply with the requirements of the risk group. Further extensive clinical research has to be undertaken in order to apply the methods for direct cervical diagnosis adopted in the present study.

List of original papers

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. Kurtinaitienė R., Drašutienė 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.
5. Kurtinaitienė R., Drašutienė G., Labanauskaitė I., Akelytė A., Drašutytė 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.
6. R. Kurtinaitienė, G. Drašutienė Vilniaus universitetų studentų žinios apie gimdos kaklelio vėžio rizikos veiksnius : [stendinis pranešimas] // Lietuvos akušerija ir ginekologija. - T. 10, Nr. 3 (2007), p. 275.

Gimdos kaklelio ryškių intraepitelinių pokyčių rizikos veiksniai ir diagnostikos metodai

Santrauka

Gimdos kaklelio vėžys (GKV) 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.

Pirminė ir antrinė gimdos kaklelio vėžio profilaktika stipriai sumažintų sergamumą GKV. Pirminei profilaktikai priskiriamas GKV rizikos veiksnių žinojimas, tų veiksnių eliminacija ir jų įtakos mažinimas. Pirmiausia, tai liečia visuomenės sveikatos švietimą: 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.

Žemas citologinio tepinėlio jautrumas ir ŽPV tyrimo specifiškumas ryškios intraepitelinės neoplazijos diagnostikoje verčia ieškoti naujų diagnostikos metodų gimdos kaklelio patikroje (Cuzick, Clavel et al. 2006; Koliopoulos, Arbyn et al. 2007).

Skystų terpių citologiniai tyrimai atveria platesnes galimybes ir kitiems diagnostikos metodams, tokiems kaip optiniai bei proteominiai, nes supernatantuose randama daug medžiagų, charakterizuojančių epitelio proliferacijos ypatybes. Tarp šių apykaitos produktų yra medžiagų, kurios gali būti aptiktos fluorescencinės spektroskopijos būdu (tiek natūralios švytinčios medžiagos, tiek švytintys žymenys).

Optinės technologijos turi didžiulį pritaikymo klinikinėje praktikoje potencialą. Gimdos kaklelio intraepitelinių pakitimų diagnostika ne laboratorijoje, o tiesiogiai prie paciento iš karto, vietoje (*point of care*), nereikalaujanti papildomų paciento vizitų, sutaupytų 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).

Įvertinus šią situaciją pasirinktos temos tikslams pasiekti reikėjo įvertinti Lietuvos moterų požiūrį į gimdos kaklelio vėžio profilaktiką bei, atsižvelgiant į rizikos veiksnius, ieškoti naujų diagnostikos būdų paspartinsiančių pacientės būklės įvertinimą.

Siekiant nustatyti HSIL (CIN2+) socialinius rizikos veiksnius vykdyta Rytų Lietuvos moterų apklausa. Taip pat anketinė apklausa buvo vykdoma, siekiant išaiškinti Vilniaus mieste gyvenančių moterų žinias apie pagrindinį gimdos kaklelio vėžio rizikos veiksnius, ŽPV, Lietuvoje vykdomą profilaktinę gimdos kaklelio vėžio patikros programą, nustatyti moterų lankymosi pas ginekologus dažnį. Mes išskėlėme sau uždavinį ieškoti naujų tiesioginių molekulinų diagnostikos metodų, kuriais būtų galima diagnozuoti HSIL, panaudojant profilaktinėje gimdos kaklelio vėžio patikroje gimdos kaklelio tepinėlio medžiagą, supernatantinius mėginius. Šiam darbui pasirinkome optinius ir biocheminius tyrimo metodus. Tyrėme savąją supernatanto fluorescenciją ir fluorescuojančius ikivėžinius žymenis.

Darbo tikslas

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

Darbo uždaviniai

1. Anketinių apklausų metodu iširti 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 intraepitelinus gimdos kaklelio pokyčius, t.y. atskirti ikivėžines būkles nuo sveikų gimdos kaklelio audinių.
4. Įvertinti mikrogardelių metodo tinkamumą diagnozuojant p16INK4a gimdos kaklelio nuograndų supernatante.

Ginami teiginiai

- 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.
- 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.

Darbo mokslinė ir praktinė vertė, naujovės

- Remiantis anketinės apklausos duomenimis, išaiškintas Vilniaus mieste gyvenančių moterų informuotumas apie ŽPV ir gimdos kaklelio vėžio patikros programą Lietuvoje. Darbu, 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.
- 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 intraepitelinų 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 intraepitelinų pakitimų preliminarią diagnostiką (galutinė diagnozė remiasi histologiniu tyrimu),
- spektroskopiniam tyrimui naudojamas prietaisas yra nešiojamas ir gali būti taikomas gydytojo darbo vietoje.
- 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.

Tyrimo medžiaga ir metodai

Studija atlikta 2007-2008m. Tai prospektyvinė atvejo kontrolės studija, kurią sudarė du etapai.

Darbe buvo naudojami tokie tyrimo metodai:

Anketinė tiriamųjų moterų 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. Apklausa vykdyta Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikose, Mykolo Riomerio universitete, Vilniaus universiteto Medicinos ir Chemijos fakultetuose, Vilniaus kolegijos Sveikatos priežiūros fakultete, Vilniaus pedagoginiame universitete. Iš viso apklaustos 1825 moterys.
- Antroji anketinė apklausa buvo atlikta Vilniaus mieste ir Rytų Lietuvoje gyvenančioms moterims, kurios į ginekologus kreipėsi profilaktiškai pagal Lietuvoje vykdomą gimdos kaklelio patikros programą arba toms, kurios buvo

nukreiptos gydymui/biopsijai į stacionarą dėl patologiinių Pap tepinėlio radinių. Visoms joms buvo atlikti skystų terpių Pap citologiniai tyrimai. Iš viso apklaustos 459 moterys.

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. pasikliautinuosius intervalus

Laboratoriniai tyrimai

- gimdos kaklelio išskyrų citologinis tyrimas Pap tepinėlio metodu. Surinkta 459 citologiniai gimdos kaklelio tepinėliai į skystą terpę (GynoPrep ir PapSpin). Tepinėliai buvo vertinami remiantis 2001 metų Bethesdos klasifikaciją. Visi vienasluoksniai Pap tepinėliai vertinti citologo - eksperto Lietuvos Valstybiniame Patologijos centre (VPC).
- gimdos kaklelio biopsinės medžiagos histologinis tyrimas atliktas VPC. Tiriamoje HSIL citologijos įvertinimų grupėje moterims atliktos 107 gimdos kaklelio biopsijos/konizacijos. 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*).
- baltymo p16 INK4a raiškos nustatymas. Baltymui p16 INK4a nustatyti buvo taikomi imunohistocheminiai ir imunocitocheminiai metodai. 33 citologiniuose ir 14 histologiniuose mėginiuose atlikta p16INK4a baltymo paieška.

Optiniai tyrimo metodai

- laboratorinis liuminescencinis spektrofotometrinis tyrimas (sužadimas 290, 300, 310nm ilgio banga). Tyrimai atlikti Vilniaus Universiteto Onkologijos Instituto Biomedicininės fizikos laboratorijoje. užrašyti 459 mėginių supernatantų skystoje fazėje spektrai. Optinių tyrimų rezultatai tolimesnei analizei buvo tinkami ne visi. Tik 181 mėginio spektrinio tyrimo duomenys atitiko visus reikalavimus (iš viso 543 spektrai). Atlikta šių fluorescencijos spektrų aproksimacija Lorencio skirsniais. Supernatanto fluorescencijos komponentų skirtumai rasti Mann-Whitney testu (SPP kriterijus), kai patikimumo lygmuo $p=0,05$. Spektrų vizualizacijai, transformuojant 3D (trijų dimensijų) raišką į plokštumą, naudotas MathCad matematinės analizės paketas
- sužadimas lietuvišku 355 nm bangos ilgio mikrolazeriu STA-01, naudojant spektrometrą „AvaSpec-2048TEC-USB2, Avantes“. Metodo paieškų metu užrašyti 27 mėginių spektrai. Patvirtinus tyrimo metodiką 18 išdžiovinto supernatanto mėginių spektrai užrašyti Taikomųjų mokslų instituto Biomedicininų technologijų skyriuje (BTS TMI VU). Atlikta fluorescencijos intensyvumo kreivės aproksimacija Gauso skirstiniais. Lygintas parametras SPP (santykinis pikų plotas), Supernatanto fluorescencijos komponentų skirtumai rasti Mann-Whitney testu (SPP kriterijus) kai patikimumo lygmuo $p=0,05$.

Biocheminiai proteominiai tyrimai

- mikrogardelių metodas,
- elektroforezės metodas,
- Western bloto testas.

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

Biocheminiai proteominiai supernatanto tyrimai buvo atlikti tik toms moterims, kurioms buvo diagnozuota HSIL ir hospitalizuotos gimdos kaklelio audinių biopsijai, išsamesniam tyrimui ar gydymui. Iširta 10 supernatanto mėginių. Šioms moterims Pap tepinėlio citologinio tyrimo metodu jau buvo diagnozuota įvairaus laipsnio gimdos kaklelio patologija. 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 p16 imunocitocheminiai tyrimai, o supernatante polimerazės grandininės reakcijos metodu nustatinėjama ŽPV viruso DNR, taip pat dalis supernatanto pakartotinai centrifuguojama ir tiriama mikrogardelių ir biocheminiais proteominiais metodais.

Statistinė duomenų analizė

Statistinę visų spektrų analizę atlikta TMI BTS konsultuojant TMI Naujų medžiagų tyrimo skyriaus ir Filosofijos fakulteto Psichofiziologijos laboratorijos darbuotojams.

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.

Spektrų vizualizacijai, transformuojant 3D (trijų dimensijų) raišką į plokštumą, naudotas MathCad matematinės analizės paketas. Spektrų analizei naudota Mann-Whitney U testas.

Tiriamosios grupės dydžiui įvertinti pasirinkome keletą įverčių, prognozuodami, jog mūsų tyrimų metodų jautrumas bus 15, 17 arba 20 proc. didesnis už įprastinį Pap (jautrumo vidurkis 60 proc.) , tiriamosios ir kontrolinės grupės N reikšmių santykis 1:4, studijos jėga – 0,8, o statistinio patikimumo koeficientas $\alpha=0,05$.

Priklausomai nuo prognozuojamo metodo jautrumo nustatytas reikalingas imties dydis: 78-43 HSIL sergančių moterų.

Tiriamosios grupės moterys privalėjo atitikti tokius kriterijus:

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

Įtraukimo kriterijai:

- Citologiniu tyrimu gimdos kaklelio patologijos neaptikta – IPPNN;
- Amžius – ne daugiau kaip ± 3 metai imtinai, lyginant su tiriamosios grupės moterų amžiumi;

- Moters laisvanoriškas sutikimas dalyvauti tyrime.

Atmetimo kriterijai :

- 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 ir biopsinės medžiagos tyrimas patvirtindavo CIN2, CIN3, CIS diagnozes, šios pacientės būdavo perkeliamos į tiriamąją grupę);
- Neščios moterys.

Tyrimo rezultatai

Anketinė apklausa

Pirmosios anketinės apklausos rezultatai

Iš visų 1797 apklaustųjų moterų apie Lietuvoje vykdomą gimdos kaklelio patikros programą žinojo 1508 respondentės (83,9 proc.). Moterų žinios nepriklausė nuo išsilavinimo.

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 žinojo tik 7-8 iš dešimties (76,38 proc.; $p < 0,05$).

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 faktorių, nežinojo apie Lietuvoje vykdomą patikros programą.

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 ($p = 0,000$). 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.).

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

Antroji anketinė apklausa

Analizei buvo atrinktos tik visiškai užpildytos anketos. Statistiniam duomenų apdorojimui 8 anketos buvo netinkamos, 451 anketa apdorojimui tinkama.

Atliktas poruotas pagal amžių atvejo-kontrolės tyrimas.

Kiekvienam tiriamosios grupės individui parinkti identiški pagal amžių individai iš kontrolinės grupės santykiu 1:4. Duomenys apdoroti vienaveiksnių ir daugiaveiksnių logistinės regresinės analizės metodu.

Atlikus vienaveiksnių logistinę regresiją paaiškėjo, 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 vėžiu yra mažesnė (ŠS = 0,39; 95 proc. PI 0,21-0,70; $p=0,002$).

Tačiau atlikus daugiaveiksnių logistinę regresijos analizę HSIL patikimi rizikos veiksniai išliko tik keli:

Mažesnė tikimybė susirgti HSIL yra aukštesnio išsilavinimo moterims (nebaigtas aukštasis arba aukštasis išsilavinimas) nei analogiškai turinčioms žemesnį išsilavinimą (ŠS=0,35; 95 proc. PI 0,16-0,76; $p=0,008$). Moterys, kurioms gimdos kaklelis anksčiau nebuvo gydytas turi didesnę riziką susirgti HSIL (ŠS=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 (ŠS=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 pasiskiepijusiu rodikliais (ŠS=11,32; 95 proc. PI 2,23-57,51; $p=0,003$). Kitų tirtų veiksnių ryšys su gimdos kaklelio patologijos tikimybe statistiškai nebuvo reikšmingas daugiaveiksnių analizėje.

Laboratoriniai tyrimai

Gimdos kaklelio biopsijos arba konizacijos procedūra buvo atlikta 107 moterims.

Iš viso ištirti 459 nuograndų citologiniai tepinėliai. 337 (73,4%) tepinėlių citologinis atsakymas buvo intraepitelinių pakitimų ar piktybinio naviko nėra (IPPNN) ir 105 (18,8 %) turėjo įvairaus laipsnio intraepitelinius pakitimus, 17 (3,7 %) atvejų buvo netinkami vertinti. Mes lyginome tų pačių moterų 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.

Baltymo p16 INK4a raiškos nustatymas. Iš viso pagal standartinį imunocitocheminį metodą ištirti 32 Pap tepinėliai. Mūsų imunocitocheminių tyrimų rezultatai ir jų ryšys su citologinės diagnozės rodikliais pateikti 1 lentelėje.

1 lentelė. Baltymo p16 INK4a raiškos ir citologinės diagnozės rodiklių tarpusavio ryšys

P16 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 p16 INK4a rodiklių ir diagnozės sunkumo laipsnio egzistuoja stiprus ryšys.

Tarp gimdos kaklelio vėžio histologinio tyrimo duomenų ir baltymo p16 INK4a raiškos rodiklių, nustatytų imunohistocheminiu būdu, taip pat aptiktas tiesioginis ryšys. Iš 12 moterų, sirgusių CIN2+, net vienuolikai nustatytas teigiamas p16 testas (2 lentelė).

2 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

Taigi kai citologinio tyrimo metodu buvo nustatyta CIN2+ diagnozė, baltymo p16 INK4a tyrimo metodo jautrumas yra 87 proc., o teigiama prognozinė metodo vertė yra 93 proc. Tai reiškia, kad pagal baltymo p16 tyrimo rezultatus (p16 teigiamas) teisingai galima diagnozuoti 93 proc. atvejų. Tyrimo metodo specifiskumas taip pat labai aukštas – 92 proc. (2 lentelė).

Nuograndų supernatanto tyrimų optiniais metodais rezultatai

Esant 355 nm žadinimui ir autofluorescencija 405-424 nm (elastinas) emisijoje gautas geriausias rezultatas atskiriant HSIL (CIN 2+) nuo IPPNN ($p=0,0003$). Autofluorescencija 475 -515 nm (lipidai: cholesterolinas, dihidroergosterolis, riboflavinai) yra svarbi HSIL, cervicito ir IPPNN grupių atskyrimui, tačiau geriausiai yra skiriama IPPNN ($p=0,001$).

Geriausias rezultatas lempinio spektroskopo žadinant supernatantą 290nm banga ir autofluorescencija (emisija) >379 nm (kolagenas, estronas, elastinas). Patikimai šioje srityje atskiriamos nuo visų kitų abi citologinės grupės tiek IPPNN ir tiek HSIL (CIN 2+), tačiau IPPNN atskiriamas geriau atitinkamai $p=0.001$ ir $p=0.008$.

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 su spektrometru „AvaSpec-2048TEC-USB2, Avantes“ ir 405-424 nm ilgio bangų emisijos juostoje. Pateikiama lentelė, kurioje atsispindi diagnostinės charakteristikos lempinio spektrometro ir nešiojamo mikrolazerio (3 lentelė).

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

Žadinimas, nm Supernatanto būklė	Kriterijus	SPP	Jautrumas	Specifiškumas	TPV	NPV	AUC	p
290 nm (skystas)	>379	0.021	0.716	0.655	0.863	0.432	0.686	<0.0001
355 nm (išdžiovintas)	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

Tyrimų mikrogardelių ir biocheminiais proteominiais metodais rezultatai

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. p16INK4a baltymo nustatymo supernatante gardelių metodika tikslumas nedaug skiriasi (2 iš 10 atvejų nesutapo) nuo p16^{INK4a} įvertinimo etaloniniu imunohistocheminiu metodu.

Išvados

1. Anketinių apklausų būdu nustatyti svarbiausi tirtojo 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. ($p < 0,001$; 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.

Apibendrinimas

Mūsų nustatyti gimdos kaklelio ryškių intraepitelinų pakitimų rizikos veiksniai yra būdingi regionams, kuriuose nėra įgyvendinta organizuota gimdos kaklelio vėžio patikra, egzistuoja žemos socialinės brandos grupės, pasižyminčios padidėjusia rizika sirgti gimdos kaklelio ikivėžinėmis ligomis ir vėžiu. Šioms rizikos grupėms rekomenduojama taikyti diagnostikos metodus, kurie leistų gydytojui patikimai numatyti gydymo ir stebėjimo taktiką jau pirmo apsilankymo metu. Mūsų ištirti metodai: mobili spektrometrija ir švytintys proteominiai žymenys ant mikrogardelių yra potencialūs diagnostikos metodai, atitinkantys šiuos reikalavimus. Mūsų darbe taikyti tyrimo metodai gali būti panaudoti tiesioginei gimdos kaklelio vėžio diagnostikai, reikalingi tolimesni išsamūs klinikiniai tyrimai.

References

- 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.
- 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.
- 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.
- Cuzick, J., C. Clavel, et al. (2006). "Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening." Int J Cancer **119**(5): 1095-1101.
- 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.
- Eisenstein, M. (2006). "Protein arrays: growing pains." Nature **444**(7121): 959-962.
- Ferlay, J., P. Autier, et al. (2007). "Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006." Ann Oncol **18**(3): 581-592.
- Freeberg, J. A., J. L. Benedet, et al. (2007). "The clinical effectiveness of fluorescence and reflectance spectroscopy for the in vivo diagnosis of cervical neoplasia: an analysis by phase of trial design." Gynecol Oncol **107**(1 Suppl 1): S270-280.
- Hillemanns, P., H. Weingandt, et al. (2000). "Photodetection of cervical intraepithelial neoplasia using 5-aminolevulinic acid-induced porphyrin fluorescence." Cancer **88**(10): 2275-2282.
- Kanter, E. M., E. Vargis, et al. (2009). "Application of Raman spectroscopy for cervical dysplasia diagnosis." J Biophotonics **2**(1-2): 81-90.

- Koliopoulos, G., M. Arbyn, et al. (2007). "Diagnostic accuracy of human papillomavirus testing in primary cervical screening: a systematic review and meta-analysis of non-randomized studies." Gynecol Oncol **104**(1): 232-246.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Redden Weber, C., R. A. Schwarz, et al. (2008). "Model-based analysis of reflectance and fluorescence spectra for in vivo detection of cervical dysplasia and cancer." J Biomed Opt **13**(6): 064016.
- 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.
- Tomizaki, K. Y., K. Usui, et al. (2005). "Protein-detecting microarrays: current accomplishments and requirements." ChemBiochem **6**(5): 782-799.
- World Health Organization. (2008). Atlas of health in Europe. Copenhagen, World Health Organization, Regional Office for Europe.