

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Agnė Šepetienė

**INTRAEPITELINIAI GIMDOS KAKLELIO POKYČIAI
IR ŽMOGAUS PAPILOMOS VIRUSO INTEGRACIJA**

Daktaro disertacija
Biomedicinos mokslai, medicina (07B)

Vilnius, 2011

Disertacija parengta 2004–2008 metais Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Akušerijos ir Ginekologijos klinikoje bei Vilniaus universiteto Onkologijos instituto Mokslinių tyrimų centre

Disertacijos vadovė

prof. dr. Gražina Drąsutienė (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 07B)

Mokslinės konsultantės:

prof. dr. Janina Didžiapetrienė (Vilniaus universiteto Onkologijos institutas, biomedicinos mokslai, medicina – 07B)

dr. Živilė Gudlevičienė (Vilniaus universiteto Onkologijos institutas, biomedicinos mokslai, medicina – 07B)

Kalbos redaktorė – Gražina Pruskuvienė

TURINYS

SANTRUMPOS.....	5
1. ĮVADAS.....	6
1.1. Problemos aktualumas.....	6
1.2. Darbo tikslas ir uždaviniai.....	8
1.3. Darbo naujumas.....	9
1.4. Praktinė nauda.....	9
1.5. Hipotezės.....	9
2. LITERATŪROS APŽVALGA.....	10
2.1. Virusų vaidmuo kancerogenezeje.....	10
2.2. ŽPV klasifikacija.....	11
2.3. ŽPV perdavimo keliai, paplitimas ir infekcijos eiga.....	14
2.4. ŽPV genomas.....	20
2.5. ŽPV replikacija šeimininko ląstelėje ir ŽPV gyvavimociklas.....	22
2.6. ŽPV sąlygota kancerogenezė.....	23
2.7. ŽPV diagnostikos ir jo sukeltų intraepitelinių gimdos kaklelio pokyčių nustatymo metodai.....	27
2.7.1. ŽPV infekcijos molekulinės diagnostikos metodai.....	28
2.7.2. ŽPV integracijos į gimdos kaklelio ląsteles nustatymo metodai.....	30
2.8. ŽPV integracijos į gimdos kaklelio ląstelių genomą mechanizmas bei integracijos reikšmė intraepitelinės gimdos kaklelio neoplazijos progresijai.....	31
3. TYRIMO MEDŽIAGA IR METODAI.....	38
3.1. Moterų kvietimas dalyvauti tyrime ir jų ištyrimas.....	38
3.2. Kolposkopijos atlikimas.....	38
3.3. ŽPV ir jo tipų nustatymo metodai.....	42
3.4. 16 tipo ŽPV E2 geno iškritos nustatymo metodai.....	46
3.5. ŽPV mRNR nustatymo metodai.....	47
3.6. Statistiniai metodai.....	49
4. REZULTATAI.....	50
4.1. Moterų infekuotumas ŽPV.....	50
4.1.1. Infekuotumas ŽPV pagal tirtų moterų amžių.....	50
4.1.2. Moterų infekuotumo ŽPV analizė pagal citologinę diagnozę.....	52
4.1.3. Moterų infekuotumo ŽPV analizė pagal histologinę diagnozę.....	53

4.2. ŽPV tipų identifikavimas.....	55
4.2.1. 16 tipo ŽPV paplitimas pagal moterų amžių	58
4.2.2. 16 tipo ŽPV paplitimas esant įvairaus laipsnio intraepitelinių gimdos kaklelio pokyčių.....	59
4.3. 16 tipo ŽPV E2 geno iškritos analizė	61
4.4. Tiriamųjų stebėseną.....	65
4.4.1. Infekuotumo ŽPV dinamika	65
4.4.2. Intraepitelinių gimdos kaklelio pokyčių dinamika pagal E2 geno iškritą ir ŽPV mRNR.....	68
5. REZULTATŲ APTARIMAS.....	71
5.1. ŽPV ir jo tipų paplitimas esant įvairaus laipsnio intraepitelinių gimdos kaklelio pokyčių.....	72
5.2. 16 tipo ŽPV integracija į gimdos kaklelio epitelio ląstelių genomą	73
5.3. Intraepitelinių gimdos kaklelio pokyčių progresija ir ŽPV testo pritaikymo galimybės.....	78
5.4. Citologinio ir histologinio tyrimo neatitikimo priežastys.....	81
6. IŠVADOS	84
7. PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS.....	85
8. PADĖKOS	86
9. LITERATŪROS SĄRAŠAS	87
10. PUBLIKACIJOS.....	98
11. PRANEŠIMAI LIETUVOJE IR UŽSIENYJE.....	99
12. PRIEDAI.....	100

SANTRUMPOS

AGC – atipinės liaukinio epitelio ląstelės
AGUS – nenustatytos svarbos atipinės liaukinio epitelio ląstelės
ASC–H – atipinės plokščiojo epitelio ląstelės, kai negalima paneigti HSIL
ASCUS – nenustatytos svarbos atipinės plokščiojo epitelio ląstelės
ASR – atvirasis skaitymo rėmelis
CIN – displazija arba intraepitelinė gimdos kaklelio neoplazija
CIN I – lengva displazija
CIN II – vidutinė displazija
CIN III/CIS – sunki displazija
LCR – ilgasis kontrolinis regionas
DNR – deoksiribonukleorūgštis
E2, E4, E5, E6, E7 – ankstyvieji viruso genai
HC2 – hibrido pagavimo reakcija
HHV–8 – 8 tipo *herpes* virusai
HLA – žmogaus limfocitų antigenų kompleksas
HSIL – didelio laipsnio plokščiojo epitelio intraepiteliniai pokyčiai
HTLV–1 – žmogaus T limfocitų virusas
L1 ir L2 – vėlyvieji viruso kapsidės genai
LSIL – nedidelio laipsnio plokščiojo epitelio intraepiteliniai pokyčiai
mRNR – informacinė ribonukleorūgštis
p16 ir *p21* – onkogenai
p16INK4a – baltymas
p53, *pRb* – genai navikų slopikliai
Pap – *Papanicolaou* būdu dažytas tepinėlis
PGR – polimerazės grandininė reakcija
ŽPV – žmogaus papilomos virusas

1. ĮVADAS

1.1. Problemos aktualumas

Žmogaus papilomos viruso (ŽPV) infekcija vaidina svarbų vaidmenį intraepitelinių gimdos kaklelio pokyčių ir vėžio patogenezėje. Už šios krypties mokslinius tyrinėjimus profesoriui Haroldui zur Hausenui (Harold zur Hausen) 2008 metais įteikta Nobelio premija. Šis tyrėjas išskyrė ŽPV iš gimdos kaklelio vėžio biopsijos mėginių ir nustatė priežastinius ryšius tarp ŽPV ir gimdos kaklelio vėžio, kurie duoda pagrindo teigti, kad ŽPV yra vienas pagrindinių intraepitelinių gimdos kaklelio pokyčių ir vėžio rizikos veiksnių [1]. Tarp daugiau nei 200 papilomos virusų tipų apie 120 infekuoja žmogų, o apie 20 yra tiesiogiai susiję su gimdos kaklelio vėžiu. Įvairių tipų virusai tarpusavyje skiriasi klinicine raiška, tropizmu audiniui bei onkogeniniu potencialu [2, 3]. ŽPV nustatomas net iki 100 proc. sergančių gimdos kaklelio vėžiu moterų (apie 100 proc. esant gimdos kaklelio plokščialąstelinei karcinomai, apie 80 proc. sergant adenokarcinoma); 16 ir 18 tipų ŽPV identifikuojamas 91 proc. atvejų esant sunkiai displazijai (CIN III/CIS) ir tik nuo 5 proc. iki 16 proc. – sveikoms moterims [4-6]. Iš pastarųjų nuo 3 iki 10 proc. (priklausomai nuo populiacijos) yra šios infekcijos nešiotojos. Jei jų gimdos kaklelyje ilgą laiką persistuoja ŽPV infekcija, gali pradėti vystytis intraepiteliniai gimdos kaklelio ląstelių pokyčiai ir vėžys [2, 4, 5]. Rizika užsikrėsti ŽPV per gyvenimą yra apie 80 proc., tačiau daugeliui infekuotųjų klinikinių pažeidimo požymių nenustatoma, nes virusas pasišalina savaimė [7, 8]. Daugelis jaunų ir vidutinio amžiaus moterų yra trumpalaikės infekcijos nešiotojos, o infekuotumo ŽPV trukmė nustatoma pagal tai, kiek laiko virusas randamas gimdos kaklelio epitelyje.

Išsamus ŽPV paplitimo tyrimas (atliktas Katalonijos onkologijos institute), kurio visuminės metaanalizės duomenis 2007 metais paskelbė Pasaulinės sveikatos organizacija [6], parodė, kad tarp 157 897 įtrauktų į tyrimą moterų, kurioms nekonstatuota citologinių pokyčių *Papanicolaou* (*Pap*) tepinėlyje, 10,4 proc. (95% PI: 10,2÷10,7) gimdos kaklelio mėginiuose identifiukuota ŽPV DNR. Didelis infekuotumas ŽPV yra ekonomiškai atsilikusiose šalyse. Labiausiai ši infekcija paplitusi tarp Afrikos moterų, ypač Rytų Afrikos, o mažiausiai – tarp Pietryčių Azijos moterų. Panašūs rezultatai gauti ir Tarptautinio vėžio tyrinėjimų centro atliktame

tyrime. Buvo ištirta 15 613 15–74 metų amžiaus moterų iš 11 šalių ir atlikta visuminė metaanalizė. Šis tyrimas turi privalumų, nes mėginams atrinkti, ištirti bei rizikos veiksniams įvertinti visose šalyse buvo naudojamas tas pats protokolas. Bendrasis suderintas pagal tiriamųjų amžių ŽPV paplitimas siekė 10,5 proc. [2].

Lietuvoje ŽPV tyrimai, aiškinantis jo vaidmenį gimdos kaklelio kancerogenezėje, pradėti apie 1999 metus. M. Kliučinskas ir bendraautoriai nagrinėjo ŽPV paplisti bei išlikti darančius įtaką veiksnius ir jų sąsają su intraepiteliniais gimdos kaklelio pokyčiais. Nustatyta, kad tirtų moterų infekuotumas didelės vėžio rizikos grupės virusais siekė 25,1 proc.; miesto moterys dažniau infekuotos ŽPV, palyginti su kaimo moterimis [9, 10].

Vilniaus universiteto Onkologijos institute tyrinėta ŽPV, jo tipų bei variantų reikšmė gimdos kaklelio vėžio rizikai. Nustatytas didelis ŽPV infekcijos paplitimas tarp Lietuvos moterų, sergančių gimdos kaklelio vėžiu – ŽPV infekcija identifikuota 92,0 proc. atvejų; tarp sveikų moterų – 23,6 proc. atvejų ($p < 0,0001$). Moterims, sergančioms gimdos kaklelio vėžiu, dažniausiai identifikuotas 16 tipo ŽPV ir šio tipo E6 genetinis L83V variantas [11].

Lietuvoje nustatytas ženkliai didesnis ŽPV paplitimas, palyginti su ŽPV paplitimo vidurkiu pasaulyje ar Europoje. Šiaurės Europos regione, kuriam priklauso Lietuva, apie 8 proc. bendrosios populiacijos moterų infekuotos ŽPV. Tad ir sergamumo gimdos kaklelio vėžiu bei mirtingumo nuo jo rodikliai yra didesni, palyginti su Europos rodiklių vidurkiu. Europos Sąjungos šalyse sergamumo gimdos kaklelio vėžiu vidurkis yra 11,9 atvejai 100 000 moterų, Lietuvoje – nuo 20 iki 26 atvejų 100 000 moterų. Lietuva, Latvija bei Estija, pagal mirtingumo pokyčių tendencijas išsiskiria iš kitų Europos šalių [3].

Siekiant sumažinti sergamumą šios lokalizacijos vėžiu bei mirtingumą nuo jo, būtina plėtoti ir tobulinti atrankinės patikros dėl gimdos kaklelio patologijos programas. Lietuvoje Valstybinė patikros dėl gimdos kaklelio patologijos programa pradėta 2004 metais. Turint omeny patikros programas, dar svarbiau tampa įvairiais aspektais tirti ŽPV. Didelį vaidmenį gimdos kaklelio kancerogenezėje vaidina viruso apkrova ląstelėje, ilgalaikė viruso persistencija, infekuotumas daugelio tipų ŽPV. Pastaruoju metu, analizuojant ŽPV vaidmenį gimdos kaklelio kancerogenezėje, vis didesnis dėmesys kreipiamas taip pat į molekulinis žymenis, tokius kaip viruso

aktyvumo žymenys: ŽPV mRNR, genų (pvz., *p16*) raiškos ar DNR metilinimo pokyčiai. Molekuliniai viruso aktyvumo žymenys pradėti tyrinėti ir Lietuvoje [12].

ŽPV genomo integracija į šeimininko ląsteles, sutrikusi E6/E7 genų raiškos reguliacija bei tolesnių genetinių pokyčių kaupimasis sąlygoja sunkios intraepitelinės neoplazijos bei gimdos kaklelio vėžio išsivystymą [13]. Manoma, kad nustatytos integruotos formos ŽPV gali būti vertingas žymuo numatant ligos progresiją. Nors integruotos formos ŽPV nustatomos daugiau nei 40 proc. moterų, kurioms yra CIN III/CIS pokyčių, aktyvi integruotų formų transkripcija nustatoma tik 15 proc. tokių moterų, o aktyvūs integruoti transkriptai turėtų didesnę prognozinę vertę.

Daug diskutuojama apie virusų kiekio ir sunkios displazijos tiesioginę sąsają. Nėra aišku, ar padidėjusi intraepitelinės gimdos kaklelio neoplazijos (CIN) progresijos rizika priklauso nuo šeimininko imlumo infekcijai, ar nuo įvairių tipų ŽPV tarpusavio sąveikos, ar atskirai nuo kiekvieno tipo ŽPV poveikio, tačiau duomenys, gauti tiriant sąsajas tarp ŽPV integracijos į gimdos kaklelio epitelio ląstelių genomą ir intraepitelinių gimdos kaklelio pokyčių progresijos, nėra vienareikšmiai. Nėra vieningos nuomonės, ar ŽPV integracija yra ankstyvasis (nesant intraepitelinių gimdos kaklelio pokyčių) ar vėlyvasis (esant sunkiai displazijai ar gimdos kaklelio vėžiui) įvykis gimdos kaklelio kancerogenezeje.

1.2. Darbo tikslas ir uždaviniai

Darbo tikslas – nustatyti, kaip 16 tipo ŽPV DNR integracijos į gimdos kaklelio epitelio ląstelių genomą laipsnis (ŽPV E2 geno iškrita) susijęs su intraepiteliniais gimdos kaklelio pokyčiais.

Šiam tikslui pasiekti buvo sprendžiami **tokie uždaviniai**:

1. Ištirti moterų infekuotumą ŽPV, esant įvairaus laipsnio intraepitelinių gimdos kaklelio pokyčių.
2. Identifikuoti ŽPV tipus.
3. Nustatyti didelės onkogeninės rizikos 16 tipo ŽPV integracijos laipsnį esant intraepitelinių gimdos kaklelio pokyčių.
4. Įvertinti viruso aktyvumą tiriant ŽPV mRNR (stebėsenos metu, t.y. praėjus pusės–vienerių metų laikotarpiui).

1.3. Darbo naujumas

Atlikus ŽPV DNR integracijos į gimdos kaklelio epitelio ląsteles tyrimus gauta naujų duomenų.

- Įrodyta, kad 16 tipo ŽPV integracija į gimdos kaklelio epitelio ląstelių genomą yra ankstyvasis gimdos kaklelio kancerogenezės įvykis.
- Nustatyta, kad esant intraepitelinių gimdos kaklelio pokyčių vyravo II laipsnio 16 tipo ŽPV integracija.
- ŽPV mRNR raiška yra susijusi viruso persistencija gimdos kaklelio epitelio ląstelėse.

1.4. Praktinė nauda

Atlikti tyrimai svarbūs gerinant patikros dėl gimdos kaklelio patologijos programas. Derinant *Pap* testą ir ŽPV DNR bei kitus biologinius ŽPV žymenis (E2 geno iškrita, mRNR), galima atrinkti infekuotas ŽPV moteris, kurioms dar nėra klinikinių patologijos požymių, tačiau kurios priklauso didelės rizikos susirgti gimdos kaklelio vėžiu grupei.

1.5. Hipotezės

1. Integruotos formos 16 tipo ŽPV, esant mažo laipsnio arba net nesant intraepitelinių gimdos kaklelio pokyčių, rodo, kad viruso integracija yra ankstyvasis kancerogenezės įvykis.

2. Virusų integracijos pobūdis (III laipsnio integracija ar episominės formos virusas) nėra susijęs su intraepitelinių gimdos kaklelio pokyčių laipsniu.

2. LITERATŪROS APŽVALGA

2.1. Virusų vaidmuo kancerogenezėje

Per 15–20 proc. žmogaus navikų yra susiję su virusais. Kai kurių žmogaus navikų virusų onkogeninis aktyvumas jau įrodytas, tačiau tikslūs onkogenezės molekuliniai mechanizmai dar nežinomi. Nepaisant to, kad prielaidos apie galimą infekcinę vėžio etiologiją buvo paskelbtos daugiau kaip prieš šimtą metų, prirėkė daug laiko, kol jos buvo patvirtintos eksperimentiškai. Anksčiausiai buvo patvirtinti duomenys apie gyvūnų navikus, sukeltus virusų [14]. Įrodymų apie žmogaus navikų sąsają su virusais reikėjo laukti žymiai ilgiau. Tik 1980 metų pradžioje pavyko išskirti virusų iš žmogaus navikinių audinių [15].

Žmogaus navikų ir virusinės infekcijos priežastingumo ryšius nustatyti sunku dėl tam tikrų priežasčių. Pirmiausia infekcijų sukėlėjai, kurie, kaip manoma, yra susiję su žmogaus navikais, dažniausiai paplitę tiek aplinkoje, tiek gyvuose organizmuose, tarp jų ir žmogaus. Tik maža dalis infekuotų asmenų suserga vėžiu. Periodas, per kurį nuo infekcijos pradžios išsivysto piktybinis navikas, gali trukti kelis dešimtmečius. Navikai būna vienakloniai, o tai nėra sisteminės infekcijos požymis. Kai kurie cheminiai ir fiziniai kancerogenai irgi gali būti siejami su tos pačios rūšies navikais [16].

Tyrinėjant virusų vaidmenį formuojantis tam tikros lokalizacijos vėžiui, nustatyta, kad vieni jų gali tiesiogiai skatinti ląstelės proliferaciją, jų onkobaitymams keičiant ląstelės genų, susijusių su ląstelės proliferacija ir metabolizmu, veiklą. Virusai gali dalyvauti kancerogenezėje ir netiesiogiai. Dauguma jų yra prokancerogenai, jie metabolizuojami ląstelėje ir tampa tikraisiais kancerogenais. Susidaro DNR ir kancerogeno junginiai (DNR aduktai), vyksta protoonkogenų bei naviką slopinančių genų mutacijos. Tokia ląstelės DNR pažaida ištaisoma arba, išlikus pokyčiams, ląstelė tampa inicijuota. Inicijuotą ląstelę paveikus promotoriui (kuris nėra genotoksiškas), ląstelė virsta navikine. Navikinė ląstelė, paveikta mutotos geninės informacijos, nesidiferencijuoja, proliferuoja ir metastazuoja (vyksta progresija) [17].

Žmogaus imunodeficitu virusas (ŽIV), netiesiogiai dalyvaudamas kancerogenezėje, ženkliai padidina riziką susirgti B-ląstelių limfomomis, Kaposi

sarkoma, nemelanominiu odos vėžiu. Kitos virusinės infekcijos (*herpes* grupės virusai) gali indukuoti šeimininko ląstelės DNR mutacijas, sukelti kitų ląstelėje persistuojančių virusų dauginimąsi.

Papilomos virusų infekcija yra tiesiogiai susijusi su kancerogeneze, kadangi virusinė DNR persistuoja supiktybėjusioje ląstelėje ir yra genetiškai aktyvi [18]. Virusai dažniausiai atlieka tik inicijuojamąjį vaidmenį, reikalingos papildomos ląstelės genų mutacijos tam, kad pasireikštų virusų transformuojamasis onkogeninis potencialas [19].

Žinoma, kad ląstelės gyvavimo ciklas kontroliuojamas jos genų ir šie procesai tiksliai reguliuojami. Ląstelės turi tiksliai apibrėžtą gyvavimo laikotarpį ir jų žūtis yra iš anksto užprogramuota (apoptozė) [20]. Piktybinių ląstelių gyvavimo trukmė, kitaip nei normalių, nepriklauso nuo šios kontrolės. Tokios ląstelės nekontroliuojamai dalijasi. Jos nedalyvauja apoptozės procesuose, dėl ko šiuo atžvilgiu tampa nemirtingos (imortalizacija). Kancerogenezės procese dalyvauja daugelis ląstelės genų: onkogenai, navikų genai slopikliai, ląstelės ciklą reguliuojantys genai. Virusiniai genai, sąveikaudami su ląstelės genais, stimuliuoja nekontroliuojamą ląstelių proliferaciją, dėl ko vystosi navikai [19].

Iš pateiktos šiaame poskyryje trumpos literatūros apžvalgos matyti, kad virusai dalyvauja įvairių lokalizacijų navikų kancerogenezėje.

2.2. ŽPV klasifikacija

Iki 1970 metų papildomos virusai buvo žinomi tik kaip gerybinių odos ligų – karpų sukėlėjai. Kadangi karpas sukeldavo tik kosmetinę problemą, o ne grėsmę viuomenės sveikatai, papildomos virusai mokslinio susidomėjimo, kaip galintys sukelti gleivinių, taip pat ir gimdos kaklelio neoplaziją, nesulaukė. Tik 1980 metais identifikuoti ŽPV esant įvairiems gleivinių pažeidimams (intraepiteliniai gimdos kaklelio pokyčiai, gimdos kaklelio vėžys) bei lytinių takų ir gerklų karpoms. Tai davė impulsą tolesniems papildomos virusų tyrinėjimams [21, 22]. Šiuo metu nustatyta daugiau nei 200 papildomos virusų tipų. Maždaug 100 tipų ŽPV visiškai iširtas genomas ir atlikta išsami nukleotidų sekų analizė. ŽPV skirstomi į tipus polimerazės grandininės reakcijos (PGR) būdu ištiriant amplikonų sekas, kurios tiksliai leidžia nustatyti ŽPV tipus [23]. ŽPV tipo apibrėžimas keitėsi kelis kartus kartu keičiantis

techninėms tyrimų galimybėms bei virusų klasifikacijai. Šiuo metu ŽPV tipas apibrėžiamas kaip genomai, kurio L1 genų seka mažiausiai 10 proc. skiriasi nuo kito tipo ŽPV. Papildomos virusų tipai nustatomi genų analizės būdu, todėl vartojamas terminas „genotipas“.

1950–1960 metais elektroniniu mikroskopu bei nukleorūgščių analizės būdu identifikuoti papildomos virusai ir poliomos virusai. Nustatyta, kad šios dvi grupės virusų turi panašią kapsidės sandarą ir dvigubos grandinės žiedinį, kovalentiškai uždara DNR genomą. Todėl jie buvo sujungti į bendrą *Papovaviridae* šeimą. 1980 metais atskleista, jog šių virusų grupių panašumai nėra tokie dideli, kad juos vertėtų sujungti į vieną šeimą. Visų poliomos virusų geno dydis 5 kb, o papildomos virusų – apie 8 kb. Poliomos virusai turi du transkripcijos vienetus, nuo kurių vyksta transkripcija abiem kryptimis, o papildomos virusų transkripcija vyksta tik viena kryptimi. Ir, svarbiausia, šių virusų grupių nukleotidų ar aminorūgščių sekų panašumas nėra pakankamas. Ir tik visai neseniai papildomos virusų šeima (*Papillomaviridae*) oficialiai pripažinta ir pateikta Tarptautinėje virusų taksonomijos klasifikacijoje [24, 25].

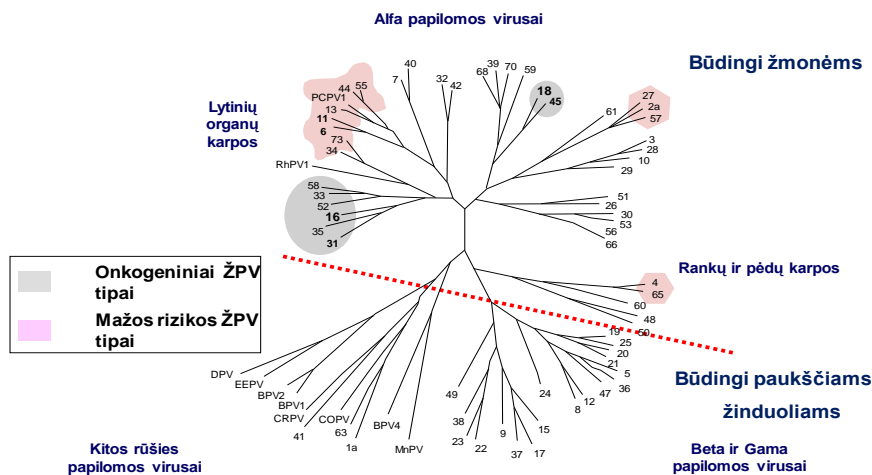
Terminas subtipai naudojamas atskirti ŽPV tipus, kurių L1 nukleotidų sekos nuo žinomo tipo ŽPV skiriasi 2–10 proc.; variantu vadinami ŽVP, kurių nukleotidų sekos skiriasi 2 proc. Moderniosios taksonomijos tikslas – nustatyti ryšį tarp virusų evoliucijos ir jų bendrųjų fenotipo bruožų, nes skirtingų tipų ŽPV, sukeltys panašius pažeidimus, kartais tik mažai tarpusavyje susiję (t.y. gali būti skirtingose evoliucinio medžio šakose) [26].

Naujausioje taksonomijoje labiau filogenetiškai susiję papildomos virusų tipai grupuojami gentimis, o smulkiau – rūšimis. Žinomi žmogaus ir gyvūnų papildomos virusai sudaro 16 genčių, kurios žymimos graikiškomis raidėmis. Penkios iš šių genčių apima išskirtinai ŽPV ir kai kuriuos papildomos virusus, infekuojančius beždžiones, o kitos gentys apima tipus virusų, infekuojančių įvairius žinduolius ir paukščius [24]. Kliniškai svarbiausia gentis yra *alfa* papildomos virusai. Jie apima visus ŽPV tipus, susijusius su lytinių organų odos ar gleivinių pažeidimais. Terminas rūšis nėra plačiai naudojamas mokslinėje literatūroje, tačiau Tarptautinėje virusų taksonomijos klasifikacijoje virusai skirstomi į rūšis pagal skirtingas jų biologines savybes. Remiantis virusų geno sekų analize, visa *alfa* papildomos virusų gentis sudaryta iš 15 rūšių. Kiekvienos rūšies ŽPV tipai skiriasi vienas nuo kito tam tikrais

ypatumais. Remiantis epidemiologiniais metaanalizės tyrimų duomenimis, pagal onkogeninę riziką susirgti gimdos kaklelio vėžiu ŽPV tipai skirstomi į:

- didelės rizikos: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82;
- galbūt didelės rizikos: 26, 53, 66;
- mažos rizikos: 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, CP6108;
- nenustatytos rizikos: 34, 57, 83 [27, 28].

Beta papilomos virusai apima visų tipų ŽPV, susijusius su *epidermodisplasia verruciformis* – tai genetiškai predisponuota odos neoplazinė liga. *Beta* papilomos virusų ir *gamma* papilomos genčių virusai sukelia besimptomes infekcijas ar mažo laipsnio gerybinius odos pažeidimus. Šių genčių virusai plačiai paplitę ir tarp jų yra daugybė ŽPV tipų, kurie dar nėra aprašyti. 1, 41 ir 63 tipų ŽPV neturi jokio ryšio su anksčiau aprašytais gentimis ir sudaro dvi atskiras gentis. Visų kitų genčių papilomos virusai randami tarp paukščių ir žinduolių [25]. Papilomos virusų filogenetinis medis pateiktas 1 paveiksle.



1 pav. Papilomos virusų filogenetinis medis, adaptuota pagal de Villiers EM, ir kt. [29]

Iš šiame poskyryje pateiktų literatūros duomenų matyti, kad yra daugybė papilomos virusų, kurie gali infekuoti paukščius, gyvūnus, žmogų ir sukelti įvairius pažeidimus.

2.3. ŽPV perdavimo keliai, paplitimas ir infekcijos eiga

ŽPV infekcija yra dažniausiai lytiniu keliu plintanti infekcija. ŽPV infekuota apie 80 proc. lytiškai aktyvios populiacijos. Apie 291 mln. moterų pasaulyje infekuota ŽPV kažkuriuo gyvenimo etapu [30]. Ši infekcija dažniausiai perduodama kontakto būdu per infekuotus lytinius takus ar išangę. ŽPV infekcijos rizika priklauso nuo lytinio gyvenimo ypatumų. Reikšmingi lytinio gyvenimo veiksniai – *lytinių partnerių skaičius*. Veiksmingas ŽPV plitimo prevencijos būdas – lytinis gyvenimas su vienu partneriu. Tiriant moteris, turėjusias tik vieną, bet infekuotą lytinį partnerį, konstatuota, kad po pirmųjų lytinių santykių ŽPV infekuoti 48 mėn. laikotarpiu tampa 70 proc. asmenų [30, 31]. Pradėjus lytinį gyvenimą *lytinių partnerių kaita* didina riziką užsikrėsti ŽPV. Kitas veiksnys – *lytinio gyvenimo pradžia*. Kuo ankstesniame amžiuje pradedami lytiniai santykiai, tuo didesnė užsikrėtimo ŽPV rizika [32]. *Ankstyvos lytinio gyvenimo pradžios* įtaka ŽPV infekcijai plisti gali būti siejama su biologiniais gimdos kaklelio kitimais paauglystėje. Gimdos kaklelio gleivinė paauglystėje lengvai pažeidžiama ir imli lytiškai plintančiai infekcijai. Tai sąlygoja didelę riziką ŽPV pasiekti bazinių ląstelių sluoksnį ir infekcijai persistuoti [33]. Ankstyvi lytiniai santykiai, pirmasis gimdymas, esant labai jauno amžiaus, lytinių partnerių kaita, kitos lytiškai plintančios ligos, moterų, kurių vyrai infekuoti ŽPV, – visa tai, manoma, turi įtakos užsikrėsti ŽPV, kurie linkę persistuoti ir ateityje sukelti gimdos kaklelio vėžį [32]. Nustatyta, kad ankstyva lytinių santykių pradžia, paplitusi ekonomiškai silpnose šalyse, kur ankstyvi lytiniai santykiai dažnai baigiasi gimdymu esant labai jauno amžiaus, sąlygoja endogeninių estrogenų padidėjimą kraujyje (nėštumo metu estrogenų kiekis padidėja 3–8 kartus) [34, 35]. Žinoma, kad paauglių gimdos kaklelio anatomija skiriasi nuo suaugusių. Paauglių gimdos kaklelio transformacijos zona yra gimdos kaklelio išorinėje dalyje (egzocervikse), joje mažai gaminama apsauginių gleivių, be to, vietinis imuninis atsakas veikia silpniau nei suaugusių. Transformacijos zona yra jautri hormoniniais pokyčiams, o tai sudaro palankias sąlygas ŽPV išsiskverbti į ją, ten persistuoti bei sukelti transformacijos zonos neoplaziją [33]. Todėl pirmasis gimdymas ir ŽPV infekcija labiau susiję ne su trauma, o su steroidinių hormonų pokyčiais. Didelis estrogenų receptorių jautrumas ir jų poveikis gimdos kaklelio transformacijos zonoje gali sinergistiškai veikti su ŽPV

onkobaltymais, sumažindami citotoksinių citokinų kiekį, o tai mažina ląstelės imuninį atsaką ir ŽPV neišnyksta, o persistuoja [34, 35].

Barjerinės kontracepcijos priemonės sumažina riziką užsikrėsti ŽPV, tačiau rizika vis tiek išlieka [35, 36].

ŽPV perdavimo keliai. Yra horizontalusis ir vertikalusis. *Horizontaliuoju keliu* ŽPV infekcija perduodama per bet kokį lytinių organų–odos ar burnos gleivinės kontaktą. Tai reiškia, kad virusas gali būti perduodamas nuo vieno organų kitiems, nuo burnos gleivinės – lytiniams organams, nuo rankų odos – lytiniams organams [31, 37]. Virusui perduoti nėra būtinas lytinis aktas. 24 mėnesius tiriant merginas, dar neturėjusias lytinių santykių, ŽPV infekcija nustatyta 15,3 proc. atveju. ŽPV infekcija perduodama per viršutinius odos ar gleivinių sluoksnių ląsteles [31, 36].

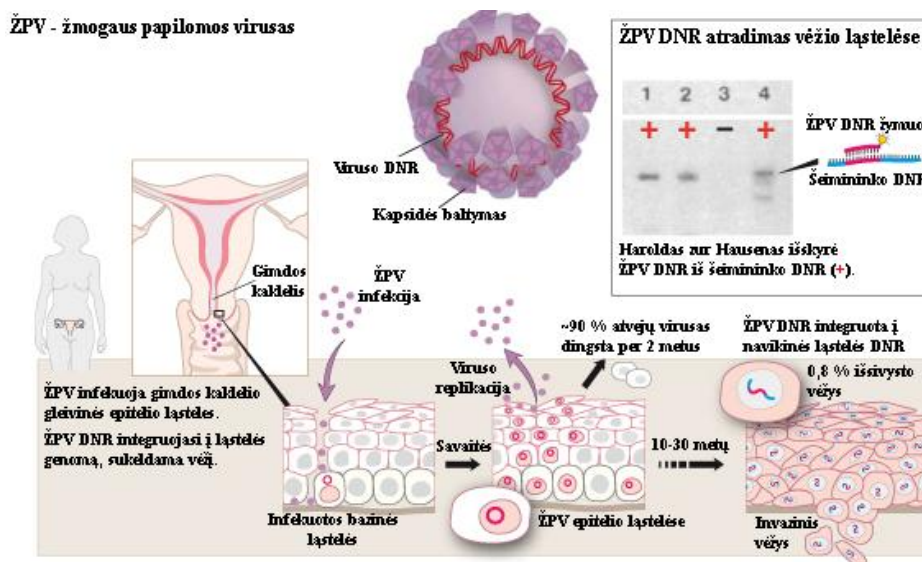
ŽPV gali būti perduotas ir *vertikaliuoju būdu*: motina perduoda ŽPV naujagimiui gimdymo metu. Mažiau nei 5 proc. moterų, infekuotų ŽPV, perduoda infekciją naujagimiui, infekuodamos jų burnos ertmę ar išorinius lytinius organus. Tačiau naujagimiams ŽPV infekcija dažniausiai gali išnykti savaime. Dažniausiai naujagimiai užkrečiami 6 ir 11 tipų ŽPV, kurie sukelia 90 proc. karpų. Naujagimių kvėpavimo takų užkrėtimas ŽPV įvyksta gimdymo metu. Tuomet ŽPV infekcija gali sukelti grįžtamąją respiratorinę papilomatozę – būklę, kai reikia skubaus chirurginio gydymo, nes ŽPV sukeltos papilomos gali tapti kvėpavimo takų obstrukcijos ir – labai retai – (1–3 proc. atveju) staigios naujagimių mirties priežastimi [38].

Virusas taip pat gali būti perduodamas per įvairius instrumentus: pvz., chirurgines pirštines, biopsines žnyplės [31, 37]. Vaikystėje išorinių lytinių organų papilomos dažnai susijusios su lytine prievarta. Nuo 4 iki 8 metų amžiaus vaikų, kuriems nustatomos išorinių lytinių organų karpos, atžvilgiu lytinės prievartos rizikos rodiklis siekia 2,9 kartų, o vaikų nuo 8 iki 12 metų – 12,1 karto [39].

ŽPV paplitimas tarp moterų, neturinčių intraepitelinį gimdos kaklelio pokyčių. Nustatyta, kad ir bendrasis ŽPV paplitimas ir amžiui specifinis ŽPV, ir specifinių tipų ŽPV paplitimas skiriasi priklausomai nuo geografinio regiono [40]. Tarptautinio vėžio tyrimo centro duomenimis, moterims, kurioms citologiniame tepinėlyje nenustatyta jokių pokyčių, ŽPV identifikuojama apie 10 proc. atveju. Šis procentas gali skirtis priklausomai nuo geografinio regiono. Pavyzdžiui, Šiaurės Amerikoje ŽPV nustatomas 11 proc., Europoje ir Azijoje – po 8 proc., Pietų Amerikoje – 20 proc., Afrikoje – 22 proc. tokių moterų. Amžiui specifinis ŽPV

paplitimas nuolat didelis tarp jaunų moterų ir palaipsniui mažėja didėjant amžiui. Afrikos, Europos, Amerikos šalyse ŽPV paplitimas vėl ryškiai padidėja moterims po menopauzės, o Azijoje ŽPV paplitimas tarp įvairių amžiaus grupių išlieka beveik vienodas. Tai susiję su lytiniu aktyvumu ir infekcijos perdavimu tarp jaunų moterų, taip pat su susilpnėjusiu imunitetu vyresniame amžiuje bei vėl aktyvesniu lytiniu gyvenimu [31].

ŽPV infekcijos eiga. Apie 80 proc. moterų ŽPV infekcija yra praeinanti savaime. Daugumai moterų, infekuotų ŽPV, virusas išnyksta po 6–12 mėn. [7]. Daugelio kohortinių tyrimų duomenimis, moterims, kurių imuninė sistema nenusilpusi, ŽPV buvimo gimdos kaklelio ląstelėse trukmė – 1 metai. Ilgiausiai gimdos kaklelyje išlieka 16 tipo ŽPV – iki 2 metų [7]. Daliai moterų (apie 20 proc.) ŽPV infekcija išlieka, persistuoja ir sukelia intraepitelinius gimdos kaklelio pokyčius, kurie negydamt progresuoja į invazinį gimdos kaklelio vėžį [36]. Vidutinis moterų, sergančių invaziniu gimdos kaklelio vėžiu, amžius – 50 metų, o moterų, kurioms nustatyti žymūs gimdos kaklelio epitelio pakitimai – 28 metai. Tai rodo, jog nuo CIN III/CIS iki invazinio gimdos kaklelio vėžio išsivystymo yra gana ilgas periodas [7] (2 pav.).



2 pav. ŽPV infekcijos eiga, adaptuota pagal Rohl A. [41]

ŽPV ir gimdos kaklelio vėžys. ŽPV infekcija – svarbus gimdos kaklelio vėžio rizikos veiksnys. Nepaisant daugelyje pasaulio šalių vykdomų patikros programų, gimdos kaklelio vėžys pasaulyje yra antroje vietoje moterų sergamumo onkologinėmis ligomis struktūroje. 2002 metais pasaulyje diagnozuota 493 tūkst. naujų gimdos kaklelio vėžio atvejų ir 274 tūkst. moterų tais metais mirė nuo šio vėžio. Taip yra dėl to, kad daugeliui moterų ekonomiškai silpnose šalyse neprieinama patikra dėl gimdos kaklelio vėžio, kurią vykdant galima ženkliai sumažinti sergamumą gimdos kaklelio vėžiu ir mirtingumą nuo jo [31]. Gimdos kaklelio vėžys ekonomiškai silpnose šalyse sudaro apie 15 proc. visų vėžio atvejų. Šiose šalyse gimdos kaklelio vėžio atsiradimo rizika per gyvenimą (angl. *cumulative life time risk*) svyruoja nuo 1,5 iki 3,0 proc.; ekonomiškai stipriose šalyse naujų gimdos kaklelio vėžio atvejų nustatoma 3,6 proc., o gimdos kaklelio vėžio išsivystymo tikimybė – 0,8 proc. moterims iki 65 m. amžiaus. Mažiausias sergamumas yra Europoje (ypač Vakarų Europos šalyse), Šiaurės Amerikoje ir Japonijoje – mažiau nei 15/100 000. Sergamumas gimdos kaklelio vėžiu ypač didelis Lotynų Amerikoje – amžiaus standartizuotas sergamumo rodiklis – 33,5/100 000, Karibuose – 33,5/100 000, Afrikoje – 31,0/100 000, Pietinėje Azijoje – 18,3/100 000. Ekonomiškai silpnose šalyse daug invazinio gimdos kaklelio vėžio atvejų nustatoma dėl blogų socialinių ekonominių sąlygų bei prastai vykdomos patikros programos. Tikėtina, kad gimdos kaklelio vėžio atvejų 2020 metais padaugės iki 40 proc. pasaulyje (56 proc. ekonomiškai silpnose šalyse ir 11 proc. ekonomiškai stipriose pasaulio šalyse) [31]. Pažymėtina, kad pasaulyje yra didelis mirtingumas nuo gimdos kaklelio vėžio. Penkerių metų gimdos kaklelio vėžiu sergančių moterų išgyvenamumo dažnis ekonomiškai stipriose šalyse siekia 73 proc. JAV ir 63 proc. Europoje. Ši liga tokia aktuali kaip tuberkuliozė ar AIDS (angl. *acquired immune deficiency syndrome*) [31]. 16 ir 18 tipų ŽPV sukelia apie 70 proc. visų gimdos kaklelio vėžio atvejų [37]. Kiekvienais metais Amerikos vėžio draugija įvertina naujai diagnozuotų gimdos kaklelio vėžio atvejų skaičių, moterų sergamumą gimdos kaklelio vėžiu bei mirtingumą nuo jo, taip pat išgyvenamumą ir palygina su buvusiais duomenimis, kaupiamais Tarptautiniame vėžio tyrinėjimų centre bei Šiaurės Amerikos asociacijos Vėžio registro centre.

Sergančiosioms gimdos kaklelio vėžio ŽPV nustatoma 99,7 proc. atvejų Dažniausiai pasitaiko šie ŽPV tipai: 16, 18, 45, 31, 33, 35, 52, 58. Šių tipų virusai

sukelia apie 90 proc. gimdos kaklelio vėžio. Minėtų tipų ŽPV nustatomi ir esant didelio laipsnio intraepiteliniams gimdos kaklelio pokyčiams (HSIL). 18 tipo ŽPV daugiau susiję su adenokarcinoma (sudaro 30 proc. visų esant adenokarcinomai randamų ŽPV tipų). 16, 18 ir 45 tipų ŽPV adenokarcinomos atvejais nustatoma apie 85 proc. Gimdos kaklelio adenokarcinoma priklauso tam histologiniam tipui, kuri sunku nustatyti įprastais patikros metodais, naudojant *Pap* tepinėlių. Moterys, kurių *Pap* tepinėlyje nenustatyta jokių pokyčių, tačiau kurios yra infekuotos 16 ar 18 tipų ŽPV, CIN III/CIS išsivystymo per 10 metų rizika apie 20 proc., o moterų, kurios infekuotos kitų onkogeninių tipų ŽPV, CIN III/CIS išsivystymo rizika siekia apie 5 proc. [42–44]. Būtina pažymėti, kad didesnė rizika atsirasti intraepiteliniams pokyčiams gimdos kaklelyje ar formotis gimdos kaklelio vėžiui priklauso nuo moterų imuninės būklės bei nuo jų lytinio gyvenimo ypatumų. Kai kurių tyrimų duomenys rodo, jog du trečdaliai CIN atvejų atsiranda po 2 metų nuo to momento, kai pirmą kartą nustatoma ŽPV infekcija. Tai prieštarauja nuomonei, kad būtinas ilgas periodas nuo ŽPV infekcijos atsiradimo iki didelio laipsnio ikvėžinių pakitimų (CIN II, CIN III/CIS) nustatymo, nes kartais nežymūs gimdos kaklelio pokyčiai jaunos moterims greitai progresuoja iki didelio laipsnio gimdos kaklelio gleivinės pakitimų [31].

Kitos ŽPV sukeltos ligos. Be gimdos kaklelio vėžio, tiek moterims, tiek vyrams ŽPV yra susijęs su burnos ertmės, ryklės, stemplės, gerklų bei išangės vėžiu (1 lent.).

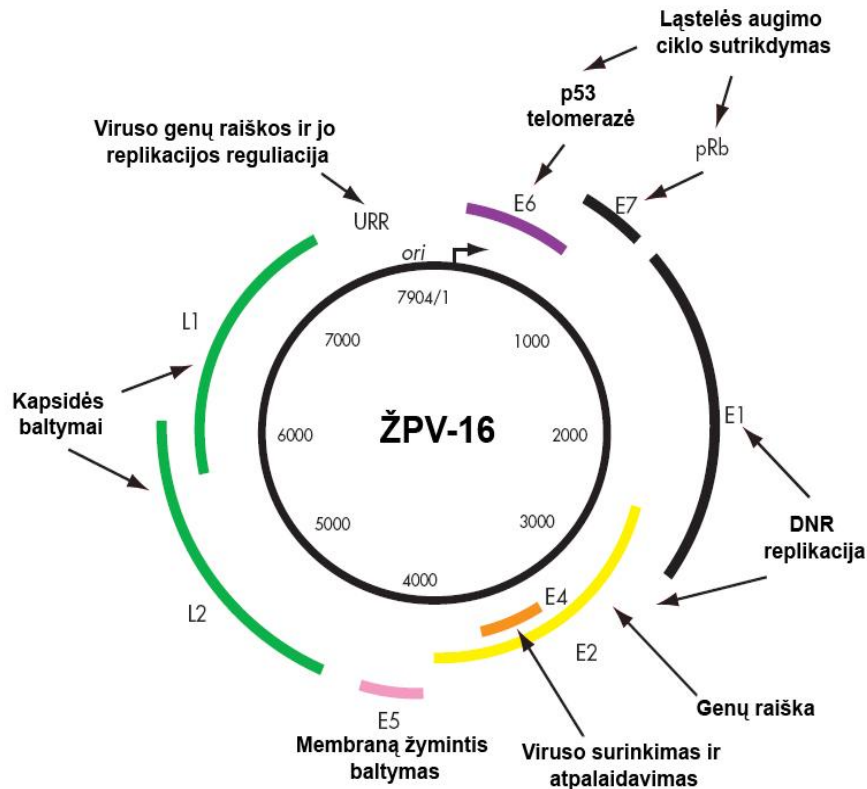
1 lentelė. ŽPV paplitimas, nustatytas tarp sergančiųjų vėžiu, pasaulyje [45]

Vėžio lokalizacija	ŽPV paplitimas, atvejų skaičius	16 ir 18 tipų ŽPV, atvejų skaičius	Vėžio atvejų, susijusių su ŽPV, skaičius
Gimdos kaklelis	100 00	70 00	492 800
Varpa	40 00	63 00	10 500
Makštis	40 00	80 00	16 000
Išangė	90 00	92 00	27 300
Burna	3 00	95 00	8 200
			561 100

Sergant ryklės vėžiu, ŽPV infekcija nustatoma apie 35 proc. atvejų [31, 39]. Kai kurie onkogeninių tipų ŽPV sukelia varpos, vulvos ir makšties vėžį. Kitų neonkogeninių tipų ŽPV (6 bei 11 tipų ŽPV) sukelia daugiau nei 90 proc. nepiktybinių su ŽPV susijusių ligų, tokių kaip išorinių lytinių organų karpos ir juvenilinė grįžtamoji respiratorinė papilomatozė [31, 38]. Vulvos vėžys, susijęs su ŽPV infekcija, nustatomas jauname amžiuje, prieš tai buvus ilgalaikei vulvos intraepitelinei neoplazijai CIN II/III, o sklerozuojantis plokščialąstelinis vulvos vėžys būdingas vyresnio amžiaus moterims ir susijęs su lėtinėmis degeneracinėmis epitelio būklėmis, tokiomis kaip *lichen sclerosus*. Makšties vėžys apie 90 proc. susijęs su 16 tipo ŽPV, daugeliu atveju prieš tai būna makšties intraepitelinė neoplazija [31]. Varpos vėžys yra retas, sudarantis 0,5 proc. atvejų tarp vyrų, sergančių onkologinėmis ligomis, struktūroje. Žydų tautybės vyrai ypač retai serga varpos vėžiu. Nustatyta, jog cirkumcizija (apyvarpės apipjaustymas) ženkliai sumažina varpos vėžio išsivystymo riziką, taip pat apsaugo ir nuo kitų lytiškai plintančių ligų, tokių kaip ŽIV. Taip apsaugomos moterys nuo ŽPV infekcijos pernešimo, dėl ko mažėja ir gimdos kaklelio vėžio išsivystymo rizika [46]. Išangės ir išangės kanalo epitelis panašus į gimdos kaklelio kanalo epitelį. Išangės vėžys dvigubai dažnesnis moterims nei vyrams, tačiau išangės vėžys dažnas tarp homoseksualių vyrų. 85–95 proc. atvejų homoseksualams vyrams randamas 16 tipo ŽPV; kiti šios lokalizacijos vėžio rizikos veiksniai – ŽIV infekcija, rūkymas, dažni analiniai santykiai bei lytinių partnerių kaita [37, 47, 48]. Todėl svarstomos berniukų ir vyrų skiepijimo galimybės [47].

Iš šiame poskyryje pateiktos literatūros apžvalgos matyti, kad ŽPV infekuoja gleivines ir odą, labiau paplitęs tarp jaunų asmenų, gali būti perduodamas įvairiais būdais bei yra susijęs su daugeliu žmogaus navikų.

2.4. ŽPV genomas



3 pav. ŽPV genomo sandara, adaptuota pagal Park TW, ir kt. [49]

ŽPV yra DNR virusas, neturintis apvalkalėlio, jo DNR žiedinės formos, dvigubai susisukusi. ŽPV genomas (3 pav.) skirstomas į 3 regionus: ankstyvųjų genų (E1–E7), vėlyvųjų genų (L1 ir L2) ir ilgojo kontrolinio regiono (LCR). Ankstyvųjų ir vėlyvųjų genų regionai yra baltymus koduojantys, o LCR baltymų nekoduoja. LCR turi keletą surišančių vietų daugeliui transkripcijos slopintojų ir aktyvintojų. L1 – kapsidės baltymas pastovus skirtingoms papildomos virusų rūšims. L2 koduojamas baltymas turi daugiau sekų variacijų nei L1 baltymas, todėl antikūnai prieš L2 baltymą yra antigenų šaltinis specifiniams ŽPV tipų antikūnams [50].

E1 ir E2 koduoja baltymus, kurie būtini DNR replikuotis ir viruso gyvenimo ciklui užbaigti [51]. E2 koduoja 2 baltymus: vieną, kuris slopina ankstyvojo regiono transkripciją, ir kitą, kuris suaktyvina ankstyvojo regiono transkripciją. Daugelyje atvejų su ŽPV susijusio gimdos kaklelio vėžio E2 baltymo iškrita yra skiriamasis ŽPV integracijos į ląstelės genomą ženklas. E4 baltymas gaminamas vėlyvoje infekcijos stadijose, kai visiškai susiformuoja virionai, ir jis nepasižymi

transformuojančiomis savybėmis, tačiau manoma, kad turi įtakos virusui subrešti ir replikuotis. E4 baltymas suardo citoplazmos citokeratiną keratinocituose ir taip išlaisvina virionus iš infekuotos ląstelės [52]. E5 gimdos kaklelio vėžio ląstelėse dažna atvirojo skaitymo rėmelio (ASR) iškrita (nuo šios vietos dažnai prasideda viruso amplifikacija), rodanti, kad E5 nėra būtinas piktybinės ląstelės transformacijai palaikyti. E5 sąveikauja su įvairiais transmembraniniais baltymais, tokiais kaip epiderminio augimo veiksnys, kolonijas stimuliuojančio veiksnio-1 receptoriai. Tiriant 16 tipo ŽPV infekuotas ląsteles, nustatyta, kad E5 baltymas pasižymi silpnomis transformuojančiomis savybėmis [37].

E6, E7 genų produktai – svarbiausi kancerogenezeje. Jie koduoja onkobaltymus, kurie užtikrina viruso replikaciją bei ląstelės, kurioje yra ŽPV DNR, imortalizaciją ir transformaciją. Šie genų produktai reikalingi transformuotam fenotipui palaikyti, ląstelės ciklo kontrolei bei apoptozei sutrikdyti. ŽPV E6 ir E7 ypatumai priklauso nuo viruso tipų [53, 54]. Didelės rizikos ŽPV E6 baltymas sąveikauja su E7 baltymu imortalizuodamas žmogaus ląsteles. Įterpus E6 geną į kai kurias žmogaus ląsteles, galima jas imortalizuoti ir be E7 pagalbos. Didelės rizikos ŽPV E6 sąveikauja su *ras* onkogeno imortalizuodamas graužikų ląsteles. Svarbiausia E6 savybė yra ta, kad ląstelinis p53 gali prisijungti prie E6. Ši sąveika sukelia p53 suirimą [55]. Manoma, kad E6 sąveika su p53 yra viena iš pagrindinių chromosominio nestabilumo ląstelėse priežasčių. Chromosomų nestabilumas, kurį sukelia E6, matyt, yra pagrindinis rizikos veiksnys progresuojant intraepiteliniams pokyčiams iki vėžio. Didelės rizikos tipų ŽPV E7 baltymai gali jungtis su retinoblastomos baltymu pRb; mažos rizikos ŽPV E7 baltymas jungiasi su pRb 10 kartų silpnesniu ryšiu. Susidarius kompleksui E7/pRb, išlaisvintas transkripcijos veiksnys E2F aktyvina su ląstelės proliferacija susijusius genus. Didelės rizikos tipų ŽPV E7 baltymai gali jungtis ir su kitais baltymais, tokiais kaip p107, p130, proteinkinaze p33, CDK2 ir ciklinu A. Didelės rizikos tipų ŽPV E7 baltymas gali sutrikdyti p53 indukuojamą ciklo sustabdymą G1 fazėje DNR pažaidos metu. Tai siejama su E7 sukeliomomis chromosomų aberacijomis [56].

Apibendrinant šiame poskyryje pateiktus literatūros duomenis matyti, kad gimdos kaklelio vėžio kancerogenezeje itin svarbus vaidmuo tenka E6 ir E7 genų produktams.

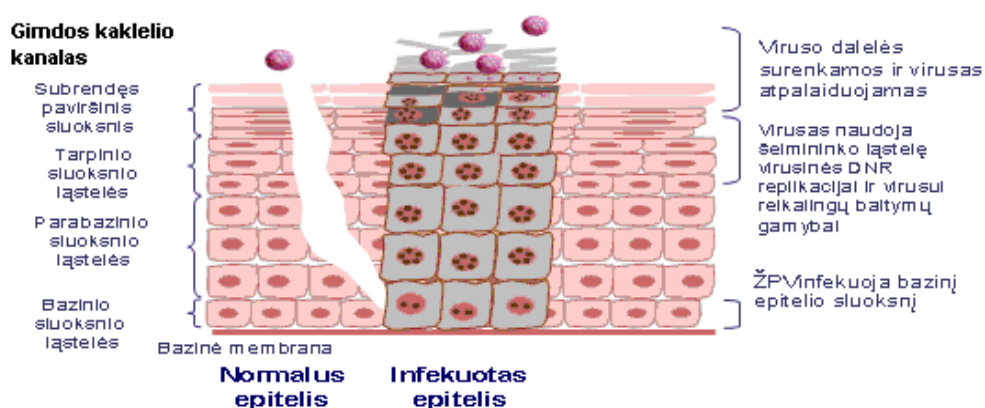
2.5. ŽPV replikacija šeimininko ląstelėje ir ŽPV gyvavimo ciklas

Esant ŽPV infekcijai vienintelė viruso paskirtis yra replikuotis ir gaminti palikuonis – virionus. Kai kuriais atvejais gimdos kaklelio vėžys gali atsirasti, kai slopinamas viruso replikacijos procesas. ŽPV infekcijos metu viruso replikacijos ciklas glaudžiai susijęs su šeimininko epitelio ląstelėmis. ŽPV genomas negali gaminti DNR polimerazės, todėl reikia šeimininko ląstelės, kuri užtikrintų ŽPV replikaciją [37]. Kadangi ŽPV yra epiteliotropinis virusas, jis infekuojama tik epitelio paviršių, atakuoja gimdos kaklelio parabazines ir bazines ląsteles. Kad virusas pasiektų šias ląsteles, reikia paviršinio epitelio pažeidimo – traumos. Gimdos kaklelio transformacijos zona yra labai palanki ŽPV virusui daugintis, kadangi čia yra daug nesubrendusių, metaplazavusių ląstelių, o tai yra palankus taikynys virusui. Infekuotos bazinio epitelio ląstelės yra mitotiškai aktyvios – jose ŽPV yra geros sąlygos daugintis [44]. Virusų genomas netenka savo apvalkalėlio (kapsidės baltymų) ir perduodamas ląstelės branduoliui, kuriame jis yra neintegruotas, žiedinės episomos formos. Virusų infekuotos bazinio sluoksnio ląstelės pasidalija, viruso genomas replikuojasi ir tolygiai pasiskirsto dukterinėse šeimininko ląstelėse. Tačiau nauja viruso gamyba šiose ląstelėse slopinama ir infekuotos ŽPV ląstelės plinta į viršutinius epitelio sluoksnius. Neinfekuotame epitelyje įvyksta visiška ląstelių diferenciacija [50]. Ankstyvųjų genų E6 ir E7 gamyba yra minimali bei griežtai kontroliuojama, o E6/E7 transkriptai mRNR yra retai nustatomi [37], kas siejama su latentine infekcija, kuri nepasireiškia kliniškai [44].

ŽPV viruso gamyba priklauso nuo ląstelės fermentų ir kitų ląstelės sudėtyje esančių veiksnių, ląstelės elementų, būtinų ŽPV genomo replikacijai. Virusų gaminami E6, E7 onkobaltymai stimuliuoja viršutinio sluoksnio infekuotų ląstelių dauginimąsi. Taip užtikrinamas pastovus ląstelės replikacijos mechanizmas ir tokia ląstelė išgyvena tol, kol replikuojamas viruso genomas.

Kai virusas pasidaugina ląstelėje iki tūkstančių kartų, tuomet vyksta tolesnis viruso surinkimas – viruso apvalkalo (kapsidės) (L1 ir L2) sintezė. Ši stadija daugiausia kontroliuojama E2 baltymo, kuris paprastai slopina ir E6 ir E7 onkobaltymų gamybą, sutrikdydamas transkripcijos veiksnio prisijungimą prie ankstyvojo viruso aktyvintojo. Dėl sumažėjusios ŽPV E6 ir E7 genų gamybos palaikoma visavertė viruso replikacijos būklė ir ląstelė visiškai užbaigia savo

diferenciacijos procesą. Surenkami nauji virionai ir jie išlaisvinami į aplinką kartu su atsinaujinančiomis epitelio ląstelėmis [31, 50]. Latentinė ŽPV infekcija gali progresuoti į produktyvią virusinę infekciją, kai gaminami dideli viruso dalelių kiekiai. Priežastys nėra visiškai aiškios, tačiau žinoma, kad ankstyvieji genai aktyvina viruso DNR amplifikaciją. Kai infekuotas keratinocitas patenka į diferencijuotą aplinką, sutrinka normalus ląstelės ciklas, vyksta gausi E6 ir E7 genų gamyba [37]. Kai šeiminko ląstelė subręsta ir pasiekia epitelio paviršių, vėlyvieji viruso genai gamina viruso kapsidės baltymus ir virionas visiškai suformuojamas. Infekuotos plokščiojo epitelio ląstelės, pasiekusios epitelio paviršių, deskvamuoja ir, padedant viruso E4 ASR, atpalaiduojamas ir išskiriamas į aplinką didelis kiekis virionų [44]. *In vivo* šis infekcijos ciklas apima 2–3 savaites, tiek laiko užtenka baziniams keratinocitams diferencijuotis ir pasiekti epitelio paviršių [37, 57]. Ketvirtajame paveiksle pateiktas ŽPV gyvavimo gimdos kaklelio epitelio ciklas.



4 pav. ŽPV gyvavimo gimdos kaklelio epitelio ciklas, adaptuota pagal Frazer IH, ir kt. [57]

Iš pateiktų duomenų matyti, kad ŽPV dauginimosi ciklas yra glaudžiai susijęs su ląstelės gyvavimo ciklu.

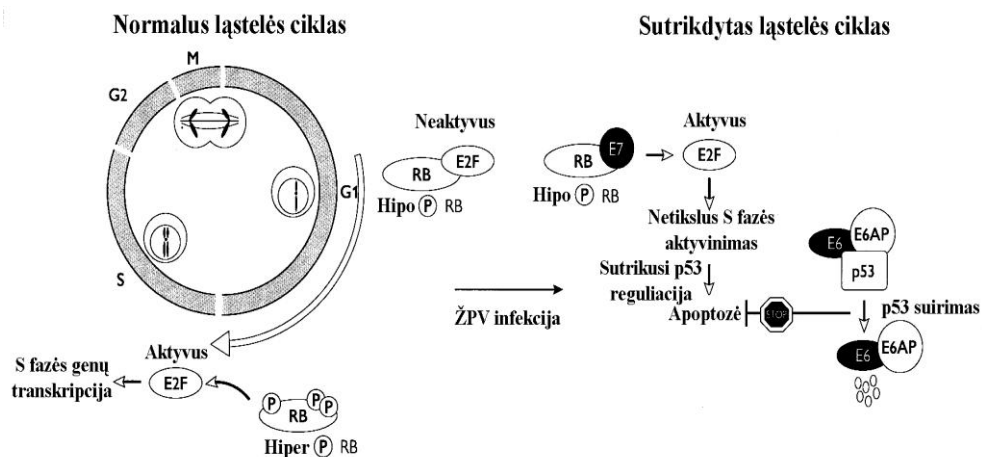
2.6. ŽPV sąlygota kancerogenezė

Ląstelių augimas susideda iš daugybės fazių, kurios sudaro ląstelės ciklą. Ląstelės S fazėje ląstelės genomai pasidvigubina ir susidaro 2 identiškos jos kopijos.

Mitozės metu ląstelė pasidalija į dvi dukterines ląsteles. Tai įvyksta M fazėje. S ir M fazės atskirtos G1 ir G2 fazių. Perėjimas iš vienos fazės į kitą yra reguliuojamas daugybės baltymų. Tai užtikrina, kad ląstelės dalijimasis įvyksta tik tuomet, kai ląstelės augimo sąlygos yra palankios. Rb baltymas yra svarbus kontroliuojant ląstelės proliferaciją, kadangi jis reguliuoja aktyvumą daugelio transkripcijos veiksnių (pvz., E2F), kurie reikalingi baltymų, stimuliuojančių ląstelės perėjimą iš G1 į S fazę, gamybai ir ląstelės genomo replikacijai. Ar ląstelės genomas replikuosis, ar ne, priklauso nuo Rb fosforilavimo būklės [58]. Jei ląstelės augimo sąlygos palankios, Rb hiperfosforilacija įvyksta, tuomet atpalaiduojamas E2F veiksnys, kuris stimuliuoja baltymų, leidžiančių ląstelei pereiti į S fazę, gamybą. Kai ląstelės augimo sąlygos nėra palankios, Rb būna hipofosforilintos būklės ir E2F veiksnys glaudžiai prisijungia prie Rb, dėl to ląstelės genomo replikacija neįvyksta [31]. ŽPV infekuotų ląstelių perėjimas į S fazę priklauso nuo to, ar E7 suriša Rb ir atpalaiduoja E2F [59]. Rb funkcija priklauso nuo E7, kuris stimuliuoja Rb baltymą suirti. [60].

Dėl nenumatyto S fazės (esant DNR pažaidoms) aktyvinimo turėtų būti skatinama ląstelės apoptozė, bet ji yra slopinama E6, kuris slopina tokius proapoptozinius baltymus, kaip p53 ir BakE6 baltymai, skatina stimuliuojančio apoptozę veiksnio suirimą, formuodamas kompleksą su ląstelės baltymu (E6 – AP), kuris suardo p53 ir BakE6 [61].

Normalios ląstelės dėl vadinamojo senėjimo reiškinio nustoja dalytis. Nustatyta, kad pasiekusių šią stadiją ląstelių chromosomų galinės struktūros telomeros yra sutrumpėjusios iki ~ 5 Kb. Telomerų ilgis yra svarbus žymuo, norint nustatyti ląstelių dalijimosi potencialą. Dažnai vėžinės ląstelės pasižymi aktyvia telomerase – fermentu prailginančiu telomeras iki tokio ilgio, kuris leidžia ląstelėms toliau dalytis. Taigi vėžinės ląstelės gali dalytis neribotai – įgyja nemirtingumą. ŽPV sudėtyje esantis E6 aktyvina telomerase, todėl dėl ŽPV infekcijos taip pat vystosi infekuotų ląstelių nemirtingumas [62]. Kooperuojantis E6 ir E7 sutrikdoma ląstelės ciklo kontrolė ir suardoma normali epitelio ląstelių diferenciacija. Virusas, naudodamasis ląstelės replikacijos sistema, persistuoja proliferuojančiose ląstelėse tol, kol jos būna reikalingos viruso genomui visiškai amplifikuotis [31] (5 pav.).

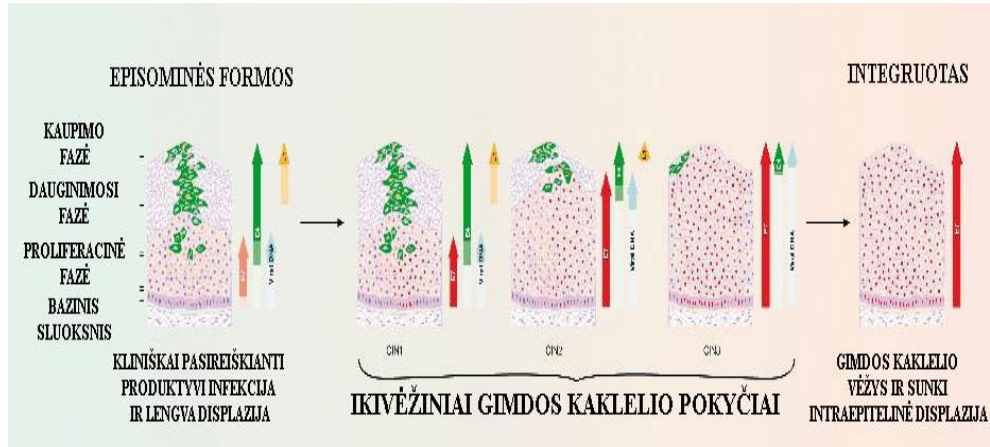


5 pav. Sutrikusi ląstelės ciklo kontrolės reguliacija ir ląstelės E6, E7 onkobaltymų gamyba, adaptuota pagal Stern PL, ir kt. [31]

ŽPV, paveikdamas gimdos kaklelio epitelio ląsteles taip, kad jos replikuotų tik viruso genomą, sukuria ląstelėms palankią aplinką proliferuoti ir infekuotoms ląstelėms išgyventi, suardydamas du svarbius genų slopiklius: *p53* ir *Rb*. *p53* labai svarbus, nes, pažeidus ląstelės genomą, įprastomis sąlygomis jis sukelia ląstelės apoptozę arba ištaiso genetinį ląstelės defektą. Veikiant E6 baltymui ir sutrikus *p53* geno funkcijai, atsiranda ir kaupiasi ląstelės DNR mutacijos. Jei atsiranda onkogeninės mutacijos ir jos nepašalinamos, vyksta ląstelės imortalizacija ir jos virsmas piktybine [63]. E7 taip pat gali prisidėti prie ŽPV infekuotų ląstelių genetinio nestabilumo sutrikdydamas normalią centrosomų – struktūrų, reikalingų diploidiniam chromosomų rinkinio pasidalijimui, replikaciją. Taigi vykstant nuolatinei E6 ir E7 gamybai, ląstelė įgyja struktūrinių chromosomų pokyčių, tokių kaip translokacijos, delecijos, amplifikacijos, chromosomų skaičiaus pakitimai, aneuploidija [31].

Daugybės tipų ŽPV nustatomi gimdos kaklelyje, tačiau iš jų tik keliolikos tipų ŽPV sukelia gimdos kaklelio vėžį. Nėra didelių skirtumų tarp šių virusų struktūros, kas galėtų paaiškinti jų onkogeniškumo skirtumą. Skirtumai yra tik dėl E6 ir E7 genų funkcijos, ypač tarp mažos rizikos tipų ŽPV ir didelės rizikos tipų ŽPV grupių: mažos rizikos tipų ŽPV E6 baltymai neinicijuoja *p53* suirimo, jų E6 geno produktas neaktyvina fermento telomerazės, E7 baltymai suriša *Rb*, tačiau silpniau, nei tai padaro mažos rizikos tipų ŽPV baltymai, todėl nesuardo *Rb*, taip pat nėra įrodymų, jog mažos rizikos tipų ŽPV E7 baltymas suardo ląstelės centrosomas [31, 62].

Genomo integracija ir sutrikusi E6/E7 genų raiškos reguliacija bei tolesnių genetinių pokyčių kaupimasis sąlygoja sunkios intraepitelinės neoplazijos bei gimdos kaklelio vėžio išsivystymą [12] (6 pav.)



6 pav. Žymenų raiška gimdos kaklelio epitelyje, adaptuota pagal Doorbar J, ir kt. [12]

Gausi ŽPV infekcija skirstoma į keturias fazes, kuriose vyksta viruso skirtingų baltymų gamyba. Virusų genų raiška prasideda esant lengvai displazijai ir galiausiai įvyksta gausi infekuotų virionų gamyba. Sutrikusi genų raiška labiausiai pasireiškia ten, kur yra intraepitelinių gimdos kaklelio pokyčių – CIN I–CIN III/CIS. Galiausiai neoplazinė progresija apibūdinama padidėjusiu E7 gamybos kiekiu bei sumažėjusia E4 bei L1 gamyba.

Gimdos kaklelio vėžys – galutinė ŽPV infekcijos išdava, dažnai jam atsirasti prireikia net 10 metų. Daugelio autorių atliktų tyrimų duomenys rodo, jog didelės rizikos tipų ŽPV tipų baltymai, veikiantys kartu, imortalizuoja šeimininko ląstelę, tačiau tai nėra pakankama priežastis, kad jie sukeltų visišką ląstelės transformaciją į navikinę. Manoma, kad tam reikia papildomų genetinių veiksnių. Pats virusas sukelia ląstelės genetinį nestabilumą. Kai infekcija persistuoja, padidėja tikimybė, kad atsiras daug mutacijų, kurios sukels ląstelės imortalizaciją, transformaciją, ir galiausiai – metastazes. Toliau daugėja baltymų (E6 ir E7), dėl ko vystosi viruso DNR integracija į ląstelės chromosomas. Kiti veiksniai, padidinantys onkogeninių mutacijų riziką: rūkymas, sudėtinės kontraceptinės tabletės, naudojamos ilgą laiką. Todėl šiuo metu taikomi nauji ligos prevencijos būdai, veikiantys būtent E6 ir E7 onkobaltymus (kuriama gydomoji vakcina) [59].

Apibendrinant šiame poskyryje pateiktus literatūros duomenis matyti, kad ŽPV sukeltas ląstelės kancerogenezės mechanizmas yra viena paskui kitą einančių procesų grandinė: ląstelės imortalizacija, transformacija, apoptozės bei ląstelės diferenciacijos slopinimas, mutacijų kaupimasis (genetinio nestabilumo priežastis ir pasekmė) ir galiausiai gimdos kaklelio vėžio atsiradimas.

2.7. ŽPV ir jo sukeltų intraepitelinį gimdos kaklelio pokyčių nustatymo metodai

Iki XX amžiaus devintojo dešimtmečio pagrindiniai ŽPV infekcijos diagnostikos kriterijai buvo klinikiniai požymiai bei citologiniai pakitimai ŽPV infekuotose vietose. Dažniausiai ŽPV infekcija sukelia akimi nematomus pažeidimus, o daliai ŽPV infekuotųjų pasireiškia anogenitalinės srities pažeidimai (karpos, kondilomos) [64]. Apibendrintos ŽPV infekcijos diagnostinių tyrimų charakteristikos pateikiamos 2 lentelėje.

2 lentelė. ŽPV diagnostikos ir ŽPV sukeltų intraepitelinį gimdos kaklelio pakitimų nustatymo metodai, adaptuota pagal Johnson K. [65]

Metodas	Jautrumas, %	Specifiškumas, %	Pranašumai	Trūkumai
Apžiūra naudojant acto rūgštį	Vidutinis	Žemas	Lengvai ir greitai atliekama	Nustatomos tik matomos karpos, pakitę gimdos kaklelio epitelio plotai
Kolposkopija	Žemas	Žemas	Nustatomi akimi nematomi pažeidimai	Žemas specifiškumas, nenustatomi tipai
<i>Papanicolaou</i> tepinėlis	Vidutinis	Aukštas	Nebrangus	Vidutinis jautrumas, nenustatomi tipai
ŽPV DNR nustatymas	Aukštas	Vidutinis	Nustatomas ŽPV, atskiri ŽPV tipai	Brangus, specifiškumas vidutinis

Dažniausiai taikomų ŽPV infekcijos diagnostikos metodų jautrumas yra žemas. Todėl diagnozuojant ŽPV šie metodai gali būti tik pagalbiniai. Esant patologiniam kolposkopiniam vaizdui, serologiškai nustačius antikūnus prieš onkogenus E6, E7, o citologiniame tepinėlyje – ląstelių koilocitų, galima diagnozuoti

subklinikinę ŽPV infekciją. ŽPV infekcijai diagnozuoti taikomi jautrūs (galintys kuo tiksliau nustatyti infekuotus asmenis), specifiški (galintys kuo tiksliau nustatyti sveikus asmenis), lengvai atliekami, bet brangūs metodai, paremti ŽPV DNR nustatymu [66, 67].

2.7.1. ŽPV infekcijos molekulinės diagnostikos metodai

Serologinių tyrimų tikslumas, nustatant ŽPV, yra ribotas. Kadangi humoralinis imuninis atsakas (antikūnai prieš ŽPV L1 kapsidės antigeną) išlieka daug metų, serologinis metodas, nustatant ŽPV antikūnus, nėra tinkamas atskirti esamą ar buvusią infekciją. Todėl tiksli ŽPV infekcijos diagnozė remiasi viruso nukleorūgščių nustatymu.

Šiuo metu pagrindinės ŽPV DNR nustatymo technologijos yra *Hybrid Capture 2* (HC2) ir PGR. Nors naudojant šias technologijas ŽPV DNR nustatymo technika yra skirtinga, tačiau visų jų pagrindas – ŽPV specifinių pradmenų ar zondų hibridinimo reakcijos su ŽPV taikiniaisiais organizme. Signalo pagausinimo metodams priskiriamas HC2 metodas taikomas klinikinėje praktikoje, PGR naudojama vykdant mokslinius tyrimus.

HC2 esmė – zondas, komplementarus viruso genomo DNR. Tai svarbu, nes ŽPV infekcijos ar ŽPV integracijos į ląstelės genomą metu ŽPV gali prarasti E2, E4, L2 genus ir dalį L1 geno. Zondas leidžia nustatyti, ar jo atpažįstama ŽPV genomo sritis nėra prarasta. HC metodo principas – tai nukleorūgščių hibridizacijos tyrimas *in vitro*, kuriam būdinga signalo amplifikacija, naudojant chemiliuminescencines plokšteles. Skystųjų terpių *Pap* tepinėlyje esanti ŽPV DNR jungiasi su komplementariomis RNR bazių poromis tiriamajame tirpale. Virusų DNR jungiasi su virusui specifiniais RNR žymenimis, sudarydami hibridus. Tuomet RNR–DNR hibridai jungiasi su kietos fazės paviršiumi ir juos „sugauna“ antikūnai, kurie yra saviti šiems RNR–DNR nukleorūgščių hibridams. Galiausiai RNR–DNR hibridai nustatomi žymėtais antikūnais, susijungusiais su šarmine fosfataze. Vyksta chemiliuminescencinė reakcija, kai amplifikuoti produktai švyti ir gali būti išmatuoti liumenometru santykiniais šviesos vienetais. Kuo stipresnis švytėjimas, tuo didesnis kiekis DNR–RNR molekulių. Šiuo metodu nustatoma aštuoniolika ŽPV tipų gimdos kaklelio mėginiuose. Metodo jautrumas yra 94 proc. Tai yra standartizuotas metodas,

turintis Europos (*pranc.* Conformité Européene, CE) ir Amerikos (*angl.* Food and Drug Administration, FDA) kokybės sertifikatus [68]. Šiuo metodu galima nustatyti mažos rizikos (6, 11, 42, 43 ir 44) bei didelės rizikos (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 56, 58, 59 ir 68) tipų ŽPV. HC2 metodo jautrumas ir specifiškumas artimas PGR metodo jautrumui ir specifiškumui. Jis tinkamas naudoti didelės apimties profilaktinėse programose [69].

PGR yra perspektyvus metodas ir manoma, kad ateityje tai bus pagrindinis metodas ŽPV nustatyti, nes padidins analitinį tyrimo jautrumą, įgalins tiksliai identifikuoti ŽPV tipus, dėl to galima bus peržiūrėti ar sukurti naujus moterų, esant patologinių citologinių radinių, stebėjimo algoritmus. ŽPV integracijai nustatyti plačiausiai naudojamas tikslinės amplifikacijos metodas PGR, kurio tikslas – nukleorūgščių padauginimas tiriamojoje medžiagoje. PGR yra ciklinė ir kiekvieną jos ciklą sudaro 3 etapai: DNR denatūravimas, pradmenys prijungimas ir pradmenys pratęsimas. Šiuo metodu galima nustatyti ŽPV DNR, ŽPV tipus, atskirų genų raišką, ŽPV integracijos į ląstelės genomą žymenį – E2 geno iškritą. PGR – jautrus metodas, kurio metu naudojami trumpi DNR pradmenys. Pagrindiniai plačiausiai naudojami pradmenys ŽPV DNR nustatyti yra MY09/MY11 ir GP5,+/GP6+. Šie pradmenys dažniausiai ŽPV L1 geno srityje atpažįsta komplementarią seką. Kai kurios laboratorijos naudoja savo pagamintus reagentus. Tokie reagentai neturi europinio CE kokybės patvirtinimo, neturi klinikinių duomenų apie rinkinio jautrumą, nestandartizuoti, tyrimo rezultatas priklauso nuo operatoriaus kruopštumo ir profesionalumo [70].

Kitas, naujesnis ŽPV infekcijos bei integracijos nustatymo būdas yra realaus laiko PGR. Atliekant realaus laiko PGR naudojami viruso tipui specifiniai ar plataus spektro pradmenys, kurie jungiasi su fluorescuojančiais žymenimis ir galima stebėti produkto pagausinimą realiu laiku, tiesiogiai vykstant reakcijai. Kiekvieno ciklo metu vertinamas amplifikuojamojo produkto kiekis, kuris priklauso nuo tiriamojo geno raiškos ar to geno pradinės koncentracijos. Galima nustatyti ir atskirų onkogenų E6, E7 raišką, integruotus transkriptus (E6, E7 mRNR), nustatyti jų kiekį, E2 geno iškritą. [67, 71].

2.7.2. ŽPV integracijos į gimdos kaklelio ląsteles nustatymo metodai

ŽPV integracijos į gimdos kaklelio ląsteles nustatymo metodai yra naudojami siekiant įvertinti integracijos dažnį gimdos kaklelio vėžio atvejais bei išsiaiškinti, kokioje intraepitelinė pokyčių progresijos stadijoje integracija įvyksta.

Metodai integracijai nustatyti skirstomi taip:

- metodai, kuriais nustatoma viruso–šeimininko ląstelės susiliejimo transkriptai, t.y. transkripciškai aktyvūs (surinkti) viruso integrantai. Tarp tokių metodų yra ŽPV onkogenų transkriptų amplifikacija ir mRNR nustatymas [72];
- metodai, kuriais nustatoma integruota viruso DNR pagal jos transkripcinę būklę. Tarp tokių metodų yra kiekybinė realaus laiko PGR, iškritos vietų PGR ir kiti.

Gimdos kaklelio vėžio atveju pastovus integracijos dažnis identifikuojamas taikant bet kurį didelės rizikos tipų ŽPV integracijos nustatymo metodą. Taip yra todėl, kad navikinėse ląstelėse, kuriose yra integruoti didelės rizikos tipų ŽPV, integrantai yra transkripciškai aktyvūs, o esant ikivėžiniams gimdos kaklelio pokyčiams, integrantai transkripciškai aktyvūs ne visada. Esant infektuotumui mažos rizikos tipų ŽPV, nustatoma 15 proc. visiškai selektyvių viruso integrantų HSIL ir LSIL atvejais. Didelės rizikos tipų ŽPV integracijos dažnis abiem SIL atvejais yra ženkliai didesnis [59, 73]. Esant HSIL pakitimui gali įvykti didelės rizikos tipų ŽPV integracija į ląstelę, tačiau viruso–šeimininko transkriptų (viruso–ląstelės nukleotidų susiliejimo sekų) gali ir nebūti. Nustatyta, jog viruso integrantuose yra E2 geno ASR iškrita, todėl panašu, kad „selektyviojo viruso tipas“ yra latentinės būklės tol, kol pradeda veikti papildomi aplinkos veiksniai, didinantys viruso transkripcinį aktyvumą ir sąlygojantys visišką viruso integrantų selekciją. Reikia pažymėti, kad didelės rizikos tipų ŽPV integracija ir integrantų selekcija gali būti 2 nepriklausomi ir lygiavertės svarbos veiksniai progresuojant intraepitelinei gimdos kaklelio neoplazijai [73].

Manoma, kad nustatytos integruotos formos ŽPV gali būti vertingas žymuo numatant ligos progresavimo pobūdį. Tačiau yra keletas problemų. Pirmą, identifikuoti nedidelį kiekį integruotų formų ŽPV, esant dideliame bendram episominių formų ŽPV skaičiui, yra techniškai sunku, nes tik eksfoliuotos ląstelės tinkamos tirti. Antra, kadangi integruotas genomai dažnai yra transkripciškai

neaktyvus ar toks greitai tampa po integracijos, tuomet integruotų formų nustatymas gali turėti ribotą prognozinę vertę. Nors ŽPV integruotos formos nustatomos daugiau nei 40 proc. moterų, kurioms yra CIN III/CIS pokyčių, aktyvi integruotų formų transkripcija nustatoma tik 15 proc. tokių moterų. Aktyvių integruotų transkriptų nustatymas turėtų didesnę prognozinę vertę.

Įrodyta, kad gimdos kaklelio keratinocituose integruotosios formos ŽPV išryškėja sumažėjus E2 gaminančių episominių formų ŽPV skaičiui. Daugelio atliktų tyrimų duomenimis, nustatyti E2 iškritą eksfoliuotose ląstelėse yra ženkliai techniškai paprastesnis būdas bei vertingesnis intraepitelinės progresijos žymuo ŽPV infekuotoms moterims [74].

Apibendrinant šiame poskyryje pateiktus literatūros duomenis matyti, kad ŽPV ir jos tipams identifikuoti bei integracijos būklei nustatyti dažniausiai taikomas nukleorūgščių amplifikacijos metodas.

2.8. ŽPV integracijos į gimdos kaklelio ląstelių genomą mechanizmas bei integracijos reikšmė intraepitelinės gimdos kaklelio neoplazijos progresijai

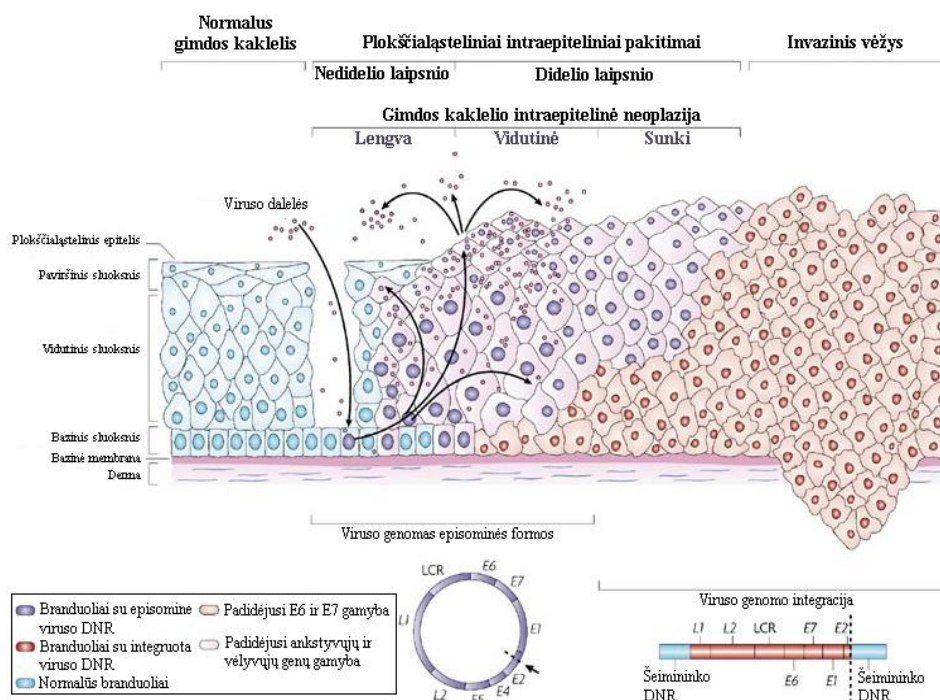
Virusų kiekis (viruso kopijų skaičius/ μ l, nustatomas realaus laiko PGR) yra siejamas su gimdos kaklelio ikivėžinių pakitimų progresija. Moterims, kurioms identifikuoti didelės rizikos tipų ŽPV ir intraepiteliniai pokyčiai *Pap* tepinėliuose, dažniau nustatomas didelis virusų kiekis. Tačiau, nustatant virusų kiekį, ląstelių skaičius mėginyje nėra standartizuotas, todėl sudėtinga įvertinti tyrimo reikšmę, o kartu ir gimdos kaklelio vėžio išsivystymo riziką [75, 76]. Daug diskutuojama apie virusų kiekio ir sunkios intraepitelinės neoplazijos tiesioginę sąsają. Ankstesnių tyrimų rezultatai rodo, kad nėra sąsajos tarp didesnio virusų kiekio ir LSIL ar HSIL pokyčių [75]. Taip pat atliktų ilgalaikių, didelės apimties tyrimų metu nenustatyta jokios tiesioginės sąsajos tarp virusų kiekio ir infekcijos trukmės, virusų išnykimo iš organizmo laiko ir intraepitelinės neoplazijos progresijos [76]. Tai galima paaiškinti keliomis priežastimis. Kadangi integruotų didelės rizikos tipų ŽPV formų paplitimas susijęs su intraepitelinių gimdos kaklelio pokyčių progresija, natūralu, kad daugėjant integruotų formų nustatomas mažesnis virusų kiekis. Užsikrėtimas naujų tipų ŽPV taip pat gali būti susijęs su virusų kiekio ir CIN pokyčiais. Yra duomenų apie sąsają tarp virusų kiekio ir intraepitelinių pokyčių progresijos, kuri priklauso nuo ŽPV tipo.

Pavyzdžiui, virusų kiekis, esant infekuotumui 16 tipo ŽPV, didėja, progresuojant intraepiteliniams pokyčiams, kitap nei esant infekuotumui 18 tipo ŽPV, kadangi, esant infekuotumui šio tipo virusais, rečiau nustatomi citologiniai pokyčiai *Pap* tepinėliuose [75]. Todėl tam tikro tipo ŽPV virusų kiekio nustatymas, kai iš karto žinoma ir virusų integracijos būseną, gali būti naudingas vertinant intraepitelinės gimdos kaklelio neoplazijos progresiją ateiityje [76]. Manoma, jog infekcija daugelio tipų ŽPV susijusi su ŽPV persistencija, taigi ir su ikivėžinių gimdos kaklelio epitelio ląstelių pakitimų progresija. Tačiau dar nėra aišku, ar padidėjusi CIN progresijos rizika priklauso nuo šeimininko imlumo, ar nuo įvairių tipų ŽPV tarpusavio sąveikos, ar atskirai nuo kiekvieno tipo ŽPV poveikio [25]. Didžiulis dėmesys skiriamas naujiems tyrimams, kurių tikslas – nustatyti didelės rizikos tipų ŽPV integraciją į gimdos kaklelio ląstelių genomą, kadangi integracija gali turėti įtakos intraepitelinių gimdos kaklelio pokyčių progresijai. Yra duomenų, kad ŽPV integracija į ląstelių chromosomas vaidina svarbų vaidmenį kancerogenezeje, todėl, nustatius ŽPV integraciją, ateiityje yra didesnė galimybė formuotis gimdos kaklelio vėžiui [51].

Ikinavikiniuose gimdos kaklelio audiniuose ŽPV DNR paprastai yra episominės (neintegruotos į ląstelės DNR) būklės, o navikiniuose – ŽPV DNR gali būti ir integruotos, ir episominės formos, nors pažymėtina, kad dažnesnė integracija yra esant gimdos kaklelio vėžiui, susijusiam su 18 tipo ŽPV nei su 16 tipo ŽPV. Kai yra CIN I pažeidimų, ŽPV genomai ląstelėje būna episominės formos, o nuo genomo ŽPV transkribuota mRNR apima išskirtinai tik viruso nukleotidų sekas. Susidaro episominiai transkriptai. Gimdos kaklelio vėžio atveju viruso genomai dažniausiai būna integruoti į ląstelių chromosomas, o integracijos metu transkribuojama mRNR, kurios sudėtyje yra ir viruso E6, E7 onkogenų, ir ląstelės nukleotidų sekos. Formuojasi integruoti transkriptai [77]. Pažymėtina, kad gauti integruoti transkriptai yra stabilesni nei tie, kurie gauti iš episominės virusinės DNR. Integruotų, episominių ar abiejų formų paplitimas eksfoliuotose gimdos kaklelio ląstelėse priklauso nuo intraepitelinių gimdos kaklelio pokyčių laipsnio, ŽPV tipo ar metodo, kuriuo nustatoma viruso būklė (integruotas ar ne) [78].

Iki šiol nėra vieningos nuomonės, ar integracija yra ankstyvasis, ar vėlyvasis įvykis gimdos kaklelio kancerogenezeje. Vieni autoriai pažymi, jog tai ankstyvasis kancerogenezės įvykis, susijęs su LSIL progresija į HSIL [76, 79, 80] (7 pav.), kiti mano, jog tai – vėlyvasis įvykis, susijęs su HSIL progresija į invazinį gimdos kaklelio

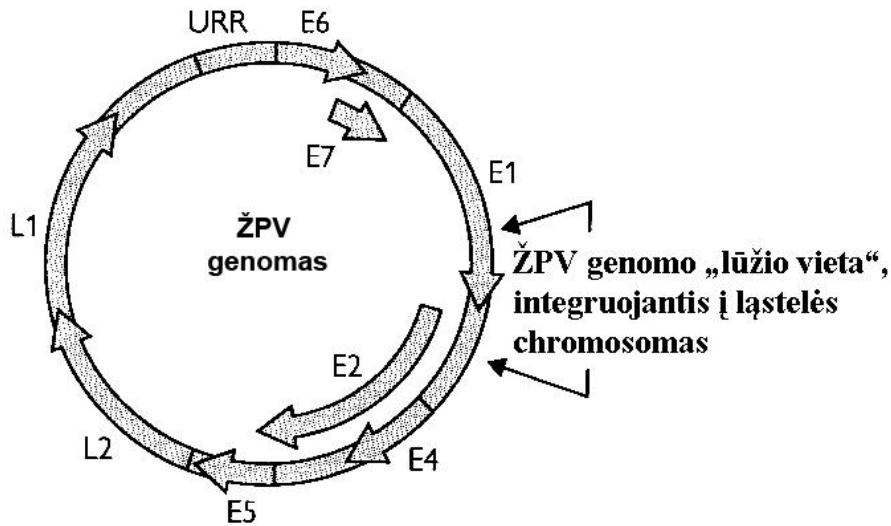
vėžį [77, 81]. Manoma, jog įvairių autorių požiūriai yra skirtingi, matyt, iš dalies dėl naudotų integracijos nustatymo metodų [80]. Anksčiau ŽPV integracija buvo laikoma vėlyvučiu įvykiu kancerogenezeje, nes ankstesnių atliktų tyrimų metu integruotos formos ŽPV retai kada buvo nustatomos esant intraepiteliniams gimdos kaklelio pokyčiams, dažniausiai šios formos buvo nustatomos tik invazinio vėžio atveju. Tačiau kai viruso būklė (integruotas ar ne) nustatoma pagal amplifikuojamo E2 geno ilgį PGR reakcijos būdu, 16 tipo ŽPV E2 geno iškritos nustatymo dažnis yra vienodas ir moterims, kurioms nustatyti CINIII pokyčiai, ir toms, kurioms yra invazinis vėžys [81]. Septintame paveiksle parodytas ŽPV DNR integruotų ir mišrių formų pasiskirstymas priklausomai nuo gimdos kaklelio epitelio pažeidimo laipsnio.



7 pav. ŽPV DNR integruotos ir mišrios formos priklausomai nuo gimdos kaklelio epitelio pažeidimo laipsnio, adaptuota pagal Woodman CBJ, ir kt. [59]

Nors ir ne taip dažnai, tačiau integruotos formos ŽPV (nustačius E2 iškritą PGR būdu) taip pat nustatomos ir sveikoms moterims bei toms, kurioms yra CIN I. Kitaip nei esant infekuotumui 16 tipo ŽPV, esant infekuotumui 18 tipo ŽPV ir CIN III/CIS pokyčių, invazinio gimdos kaklelio vėžio atvejais beveik visada nustatomos integruotos formos ŽPV, o episominės – labai retai.

ŽPV DNR integracijos metu viruso genomas dažniausiai nutrūksta E1/E2 regione (8 pav.).



8 pav. ŽPV genomo „lūžio vieta“ integruojantis į ląstelės chromosomas, adaptuota pagal Stern PL. ir kt. [31]

E2 geno, koduojančio baltymus, kurie slopina E6 ir E7 regionų transkripciją, iškrita sąlygoja nekontroliuojamai padidėjusią E6 ir E7 onkogeninių baltymų raišką, dėl to ląstelės transformuojasi, greičiau dauginasi ir duoda pradžią navikui formotis. Virusų integracija yra susijusi su tam tikra genomo segmentų iškrita ir su iš eilės einančių sekų transkripcija (nurašymu) iš integruoto LCR E1 taip pat E2 genų iškrita, kaip ir ŽPV DNR sekų nurašymas, skatina E6 ir E7 transkripciją. Pasirodo, kad nuolatinė E6 ir E7 genų gamyba būtina palaikyti piktybinį ląstelės fenotipą, taip pat svarbi ląstelės genetiniams bei epigenetiniams veiksniams, kurie reikalingi navikui formotis [82]. ŽPV integracija į šeimininko genomą susijusi su intraepitelinio gimdos kaklelio pokyčių progresija nuo polikloninės iki monokloninės intraepitelinės gimdos kaklelio neoplazijos būklės (CIN) [31, 79]. Ekspresuojant integruotiems ŽPV onkogenams, susidaro sąlygos navikinėms ląstelėms daugintis [83]. Integracija, atsiradusi dėl virusinės infekcijos, nustatoma apie 90 proc. gimdos kaklelio vėžio atveju. Šis mechanizmas dar nėra aiškus, tačiau žinoma, jog yra tendencija integracijai vykti tam tikrose trapiose chromosomų vietose. Integracija nėra normali didelės rizikos tipų ŽPV gyvenimo ciklo dalis. Jai būdinga tam tikrų viruso genų, būtinų viruso sintezei, iškrita. Nepaisant to, kad ląstelių, į kurių genomą integruotas

virusas, transkriptuose gali reikštis įvairios viruso genomo dalių iškritos, nustatyta ir nuolatinė tam tikrų genų iškrita. Ypač dažnai identifikuojama viruso E2 geno, kuris gali slopinti integruoto viruso promotorių transkripciją, iškrita [56]. Kaip minėta anksčiau, integracija sąlygoja padidėjusią E6 ir E7 onkogenų raišką. ŽPV genomo sudėtyje esančių E6 ir E7 genų produktų vaidmuo yra svarbiausias kancerogenezeje. Šie genai koduoja baltymus, kurie užtikrina viruso replikaciją, ląstelės imortalizaciją ir transformaciją. Jie reikalingi transformuotam fenotipui palaikyti, ląstelės ciklo kontrolei bei apoptozei sutrikdyti. Virusų baltymai, susijungdami su naviko slopiklių genų išskiriamais produktais (pRb, p53), juos suardo [56]. Normali naviko slopiklio baltymo p53 funkcija – aktyvinti transkripcijos genus, tokius kaip *p21* (CIP/WAF1) ar GADD45, ir taip uždelsti ląstelės perėjimą į S fazę, kol DNR ištaisymas (reparacija) dar nepasibaigęs. Todėl kai E6 onkogenas inaktyvina naviko slopiklio baltymą p53, sutrinka ląstelės ciklas ir susidaro palanki galimybė ląstelės mutacijoms. E7 onkogenas, susijungdamas su naviko slopikliu genu *pRb*, atlieka papildomą funkciją kancerogenezeje. Susijungimo metu atsipalaiduoja transkripcijos veiksnys E2F, kuris aktyvina genų, stimuliuojančių DNR sintezę ląstelėje, raišką. Jei ta pati ląstelė, kuri prieš tai buvo paveikta E6 onkogeno ir nebėra apsaugota naviko slopiklio geno *p53*, išgyvena ir pereina į S fazę esant neištaisyta DNR, dėl E7 onkogeno poveikio gali replikuotis ŽPV DNR [67, 84, 85].

Šios minėtos savybės yra būdingos tik didelės rizikos tipų ŽPV, dėl to, matyt, galima paaiškinti skirtingą vėžio išsivystymo riziką, susijusią su skirtingais mažos rizikos tipų ŽPV ir didelės rizikos tipų ŽPV tipais. E6 ir E7 onkogenų raiška bazinio epitelio ląstelių viduje, trunkanti ilgą laiką, sąlygoja padidėjusią šių ląstelių supiktybėjimo riziką – slopinama ląstelių diferenciacija ir padidėja chromosomų nestabilumo tikimybė, todėl galima ląstelės piktybinė transformacija. Daugelyje gimdos kaklelio vėžio atvejų nekontroliuojama viruso onkogenų raiška (ir šeimininko genomo mutacija) pasireiškia tose ląstelėse, kuriose dalis viruso genomo yra integruota į šeimininko DNR. Daugelis atliktų klinikinių tyrimų yra skirti nustatyti didelės rizikos tipų ŽPV integracijos dažniui gimdos kaklelio navikuose bei išaiškinti, ar integracija įvyksta tam tikroje displazijos progresijos stadijoje. Daugiausia analizuota tik 16 ir 18 tipų ŽPV integracija, kadangi šių tipų virusai dažniausiai yra navikuose [72, 81].

ŽPV integracijos dažnis vėžio atveju visada yra didelis. Esant 18 tipo ŽPV – 100 proc., 16 tipo ŽPV – siekia 80 proc. [76], o esant įvairiems intraepiteliniams gimdos kaklelio gleivinės pokyčiams integracijos dažnis yra skirtingas [44].

Invaziniam gimdos kaklelio vėžiui ir intraepiteliniams gimdos kaklelio pokyčiams, susijusiems su didelės rizikos tipų ŽPV infekcija, paprastai būdinga ŽPV DNR integracija į šeimininko ląstelės chromosomas.

Skiriami transkripciškai neaktyvūs „latentiniai“ ir visiškai selektyvūs (surinkti) integrantai. Atliktų tyrimų rezultatai rodo, kad pagrindinis skirtumas tarp LSIL ir HSIL yra erdvinis viruso onkogenų gamybos pasiskirstymas. Esant LSIL pakitimų, onkogenų gamyba slopinama baziniame epitelio sluoksnyje, esant HSIL pakitimų, viruso onkogenų gamyba vyksta per visą epitelio storį ir yra tik nedidelė dalis transkripciškai aktyvių viruso integrantų. Transkripciškai aktyvūs viruso integrantai stimuliuoja gimdos kaklelio kancerogenezę didindami E6 ir E7 gamybą esant HSIL pakitimų, dideliais kiekiais sukelia genominių nestabilumą bei mutacijų atsiradimą, dėl to ląstelė tampa navikine. Jei ląstelių populiacijoje episominės formos ŽPV išnyksta dėl sutrikusios erdvinės viruso episominių formų onkogenų gamybos, prarandama viruso onkobaltymų antiapoptozinė funkcija, taigi ląstelėse, kuriose yra tik episominės formos virusų, gali įvykti apoptozė [86]. Todėl tik tose ląstelėse, kuriose vyksta E6 ir E7 gamyba, vėliau atsiranda latentiniai integrantai dėl episominių viruso formų išnykimo. Pagrindinė priežastis, dėl ko įvyksta integrantų selekcija, yra integrantų sugebėjimas palaikyti E6 ir E7 gamybą ir slopinti apoptozę. Toliau daugėja ląstelių klonų dėl selekcijos integrantų, kurie gamina didelį E6 ir E7 kiekį. Kancerogenezės modelyje, kuriame išnyksta episominės viruso formos, didelės rizikos tipų ŽPV integracija yra intraepitelinių gimdos kaklelio pokyčių progresiją lemiantis ir ją prognozuojantis įvykis, o nesant latentinių integrantų, vyksta intraepitelinių pokyčių regresija.

Manoma, kad viena pagrindinių priežasčių, dėl ko įvyksta gimdos kaklelio kancerogenezė, yra uždaras viruso integrantų gamybos ratas. *Cis*-veikiančios molekulės gali veikti viruso integrantų *trans*-veikiančias molekules, šeimininko ląstelės sekos gali veikti *trans*-veikiančius šeimininko slopiklius ar viruso E2. Vėlesni integracijos įvykiai gali būti atsparūs E2 sukeltam transkripcijos slopinimui ir integrantų selekcijai, tuomet jau nebūtinai episominių viruso formų išnykimas. Kai kuriais gimdos kaklelio vėžio atvejais vėžio ląstelių linijose yra didelės rizikos tipų

ŽPV integrantų, atsparių E2 poveikiui. Taip galima būtų paaiškinti kai kuriuos greitos intraepitelinio gimdos kaklelio pokyčių progresijos iki vėžio atvejus, nustatomus kliniškai.

Esant 16 tipo ŽPV infekcijai, apie 12,5 proc. gimdos kaklelio vėžio atvejų esama viruso transkriptų, kurių kilmė – išskirtinai episominės formos didelės rizikos tipų ŽPV [59, 83].

Apibendrinant šiame poskyryje pateiktus literatūros duomenis matyti, kad ŽPV integracija į gimdos kaklelio epitelio ląstelių genomą yra svarbi, įvyksta transformuojantis ląstelei ir sąlygoja ikivėžinių pokyčių progresiją iki gimdos kaklelio vėžio.

Iš literatūros apžvalgos išplaukia apibendrinamoji išvada, liudijanti apie didelės rizikos tipų ŽPV integracijos svarbą esant įvairaus laipsnio intraepiteliniam gimdos kaklelio pokyčiams. Viena vertus, būtina įrodyti, kokio laipsnio pokyčiams esant prasideda didelės rizikos tipų ŽPV integracija. Kita vertus, svarbu taip pat nustatyti, kaip elgiasi virusas esant ilgalaikiai aktyviai infekcijai. Tokiu žymeniu galėtų būti integruotų transkriptų mRNR.

3. TYRIMO MEDŽIAGA IR METODAI

3.1. Moterų kvietimas dalyvauti tyrime ir jų ištyrimas

Į tyrimą įtraukta 253 18–70-ies metų amžiaus moterys, kurioms pirminės patikros metu jau buvo nustatyta gimdos kaklelio patologija tiriant įprastinį *Pap* tepinėlių: atipinės nenustatytos svarbos plokščiojo epitelio ląstelės (ASCUS), atipinės plokščiojo epitelio ląstelės, kai negalima paneigti HSIL (ASC–H), nedidelio laipsnio plokščiojo epitelio intraepiteliniai pokyčiai (LSIL) ar didelio laipsnio plokščiojo epitelio intraepiteliniai pokyčiai (HSIL) bei atipinės liaukinio epitelio ląstelės (AGC).

Sutikusios dalyvauti tyrime moterys pasirašė Asmens informavimo formą (1 priedas) bei Informuotojo asmens sutikimo formą (2 priedas). Tyrimo protokolą, Asmens informavimo forma bei Informuotojo asmens sutikimo forma patvirtinti Lietuvos bioetikos komiteto (gautas leidimas atlikti biomedicininį tyrimą, 2008.02.29 Nr.15; 3 priedas). Nėščios moterys į tyrimą nebuvo įtraukiamos. Visoms į tyrimą įtrauktoms moterims buvo atliekama kolposkopija (t.y. gimdos kaklelio apžiūra optiniu prietaisu – kolposkopu) ir gimdos kaklelio biopsija (17 moterų biopsijos atsisakė).

Ginekologinės apžiūros metu, nuvalius gleives, iš gimdos kaklelio transformacijos zonos buvo imamas mėginys bendrajam infekuotumui ŽPV ir ŽPV tipams nustatyti bei 16 tipo ŽPV E2 geno integracijos laipsniui įvertinti. Infekuotumo dėl ŽPV 16 tipo viruso identifikavimo ir E2 geno iškritos tyrimai buvo atliekami Vilniaus universiteto Onkologijos institute, gimdos kaklelio biopsinės medžiagos tyrimai – Valstybiniame patologijos centre.

3.2. Kolposkopijos atlikimas

Pagrindinis kolposkopijos tikslas – nustatyti labiausiai pažeistą vietą ir atlikti biopsiją, kiti tikslai – nustatyti pokyčius plokščiojo ir liaukinio epitelio jungties srityje, įvertinti, ar kolposkopija yra pakankamai informatyvi, siekiant ir nustatyti neoplazinio pažeidimo plotą, formą, kontūrus, lokalizaciją ir išplitimą. Buvo atliekama paprastoji ir išplėstinė kolposkopija. Paprastoji kolposkopija buvo

atliekama pašalinus gleives nuo tiriamojo paviršiaus, buvo vertinama gleivinės spalva, reljefas, epitelijų ribos, kraujagyslių forma ir išsidėstymas, apžiūrima apatinė gimdos kaklelio kanalo dalis. Išplėstinės kolposkopijos metu gimdos kaklelis buvo suvilgomas 3 proc. acto rūgšties tirpalu, kuris tirpsta ir skaidrina gleives, išryškina smulkius įdubimus, epitelijų ribas, liaukų ištekamųjų latakų angas, cilindrinio epitelio plotus. Netipiškai pakitęs epitelis paburksta ir išbąla, spenelinė struktūra tampa reljefiškesnė. Išplėstinės kolposkopijos metu buvo atliekamas Šilerio mėginys, naudojant liugolio tirpalą. Šio tyrimo metu įvertinamas plokščiojo epitelio subrendimo laipsnis bei epitelio plotai, kuriuose nėra glikogeno, todėl šie plotai jodu nenusidažo (matomas lygus, rūgšties išbalintas epitelis, punktacija, mozaika, keratozė, karcinoma). Subrendęs daugiasluoksnis plokščiasis epitelis dažosi tolygiai rudai (turi glikogeno). Tikroji erozija, cilindrinis epitelis liugolio tirpalu nesidažo [87].

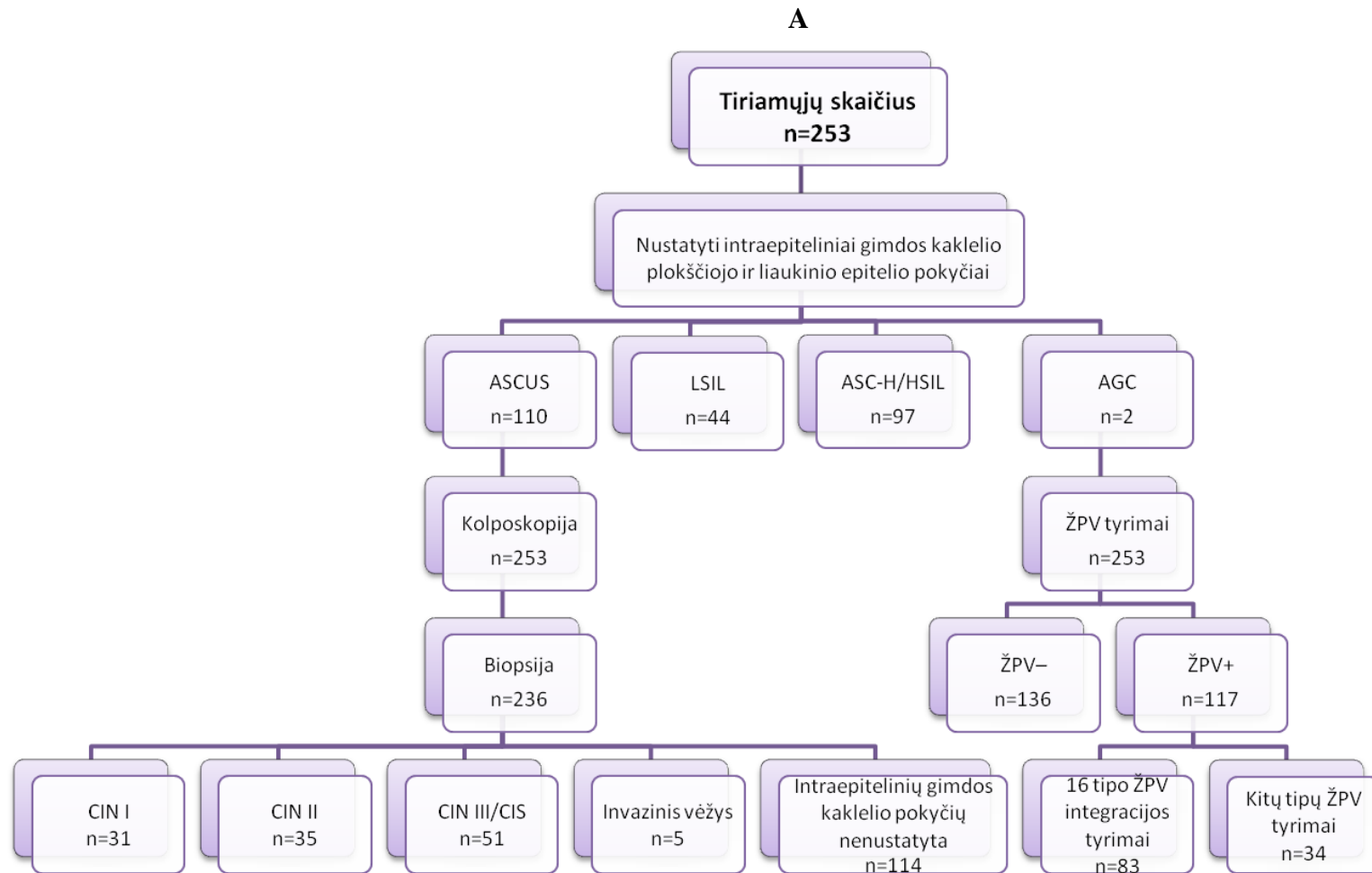
Kolposkopijos vertinimo kriterijai: epitelio paviršius, epitelijų jungtis, liaukų buvimas ir jų forma, kraujagyslių piešinys, reakcija į 3 proc. acto rūgšties tirpalą, reakcija į liugolio tirpalą, pakitusių audinių ribos. Kolposkopiniai vaizdai buvo vertinami pagal Amerikos kolposkopijos ir gimdos kaklelio patologijos draugijos klasifikaciją (Barselona, 2002). Pagal šią klasifikaciją kolposkopiniai vaizdai yra tokie:

- | | |
|--|--|
| <p>I. Normalūs kolposkopijos vaizdai:</p> <ul style="list-style-type: none"> • originalus plokščiasis epitelis; • stulpinis epitelis; • transformacijos zona. <p>II. Nenormalūs kolposkopijos vaizdai:</p> <ul style="list-style-type: none"> • lygus, acto rūgšties išbalintas epitelis; • grubus, acto rūgšties išbalintas epitelis; • švelni mozaika; • grubi mozaika; • švelni punktacija; • grubi punktacija; • iš dalies jodu nusidažęs epitelis; • jodu nenusidažęs epitelis; • netipinės kraujagyslės; • dideli pokyčiai. | <p>III. Kolposkopijos vaizdai, kuriais remiantis galima įtarti invazinį vėžį.</p> <p>IV. Neinformatyvi kolposkopija:</p> <ul style="list-style-type: none"> • plokščiojo ir stulpinio epitelijų jungtis nematoma; • ryškus uždegimas, ryški atrofija, trauma; • gimdos kaklelis nematomas. <p>V. Įvairūs pažeidimų vaizdai:</p> <ul style="list-style-type: none"> • kondilomos; • keratozė; • erozija; • uždegimas; • atrofija; • deciduožė; • polipai. |
|--|--|

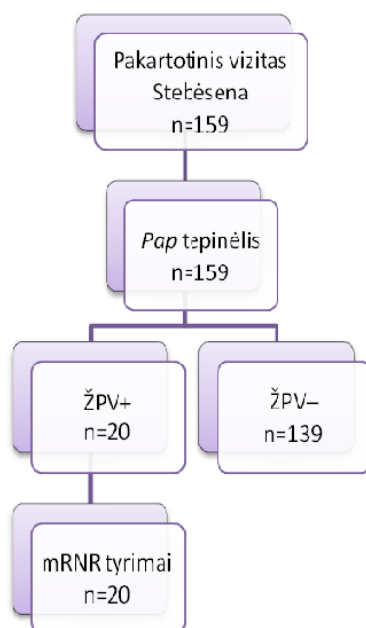
Tikslinė biopsija, kontroliuojant kolposkopu, buvo atliekama ambulatoriškai elektros kilpa, nuskausminus lidokaino tirpalu. Moterys, kurioms histologinio tyrimo atsakymas buvo CIN II, CIN III/CIS, pasiūstos į stacionarą chirurginiam gydymui – joms buvo atliekama konusinė biopsija, o dviem, kurioms *Pap* tepinėlyje nustatyta ASC – gimdos kaklelio kanalo tyrimas bei endomeriumo (gimdos gleivinės biopsija). Moterys, kurioms pirminio vizito metu nustatyta ŽPV infekcija, taip pat moterys, kurioms histologiškai patvirtinta gimdos kaklelio neoplazija (CIN I–CIN III/CIS) buvo kvieštos pakartotinio vizito praėjus 6 mėn.

Tos, kurioms pirminio vizito metu nenustatyta ŽPV infekcijos, bei tos, kurioms biopsijos mėginių histologinio tyrimo rezultatai nerodė intraepitelinių gimdos kaklelio pokyčių, paliktos stebėti vadovaujantis moterų, kurioms aptikta gimdos kaklelio patologinių citologinių ir histologinių pokyčių, priežiūros algoritmais. Antrojo vizito metu buvo atliekamas įprastas *Pap* tepinėlis (nuvalius gleives nuo gimdos kaklelio kanalo šepetėliu paimama medžiaga iš egzocervikso ir endocervikso – šepetėlis įkišamas į gimdos kaklelio kanalą ir vieną kartą pasukamas $\frac{1}{4}$ arba $\frac{1}{2}$ kaklelio paviršiaus, paimta medžiaga piešiamuoju judesiu paskleidžiama objektiniame stiklėlyje dalyje. Paruoštas tepinėlis nedelsiant fiksuojamas aeroliniu fiksiatoriumi purškama iš 25–30 cm atstumo (2–3 paspaudimai), palaukiama, kol nudžius bei kartojamas tyrimas dėl infekuotumo ŽPV. Moterys, kurioms pakartotinio tyrimo metu buvo nustatyta ŽPV infekcija, buvo tiriamos dėl viruso aktyvumo, t.y. paimta medžiagos iš gimdos kaklelio kitam ŽPV integracijos žymeniui – mRNR (angl. *messenger RNA*) nustatyti.

Detali tyrimų schema pateikta 9 paveiksle.



B



9 pav. Moterų ištyrimo schema: A – pirminis vizitas, B – stebėseną

ASCUS – atipinės nenustatytos svarbos plokščiojo epitelio ląstelės, ASC-H – atipinės plokščiojo epitelio ląstelės, kai negalima paneigti HSIL, LSIL – nedidelio laipsnio plokščiojo epitelio intraepiteliniai pokyčiai, HSIL – didelio laipsnio plokščiojo epitelio intraepiteliniai pokyčiai, AGC – atipinės liaukinio epitelio ląstelės, CIN I – lengva displazija, CIN II – vidutinė displazija, CIN III/CIS – sunki displazija, ŽPV+ – infekuotumas ŽPV, ŽPV– – nėra ŽPV infekcijos.

3.3. ŽPV ir jo tipų nustatymo metodai

ŽPV bei jo tipų nustatymas. Medžiaga infekuotumui ŽPV nustatyti (gimdos kaklelio ląstelės) buvo imama steriliu šepetėliu, kurio galas pamerkiamas į 2 ml PBS (angl. *phosphate buffered saline*) buferinio tirpalo. Iš tiriamosios medžiagos buvo išskiriama DNR ir atliekami ŽPV tyrimai. DNR išskirti naudotas komercinis *Sorpoclean* DNR išskyrimo rinkinys (AB „SORPO diagnostics“, Lietuva), DNR buvo išskiriama pagal gamintojo rekomendacijas.

Ląstelių lizė:

- mėginiai tiriami kambario temperatūroje (20-25⁰C);
- į 1,5 ml centrifuginį mėgintuvėlį įpilama 20 μl proteinazės K tirpalo, 200 μl mėginio ir 200 μl lizės tirpalo;

- sumaišoma vorteksuojant 10 s, siekiant gauti homogeninį tirpalą;
- inkubuojama 10 min. 56⁰C vandens vonelėje.

Lizato filtravimas per kolonėlę:

- į mėginį įpilama 230 µl etanolio (96-100%);
- mišinys atsargiai perkeliamas ant kolonėlės, esančios 2 ml mėgintuvėlyje, uždaromas dangtelis ir centrifuguojama 1 min. 6000xg;
- kolonėlė perdedama į švarų 2 ml mėgintuvėlį.

DNR išgryninimas:

- į kolonėlę įpilama 500 µl praskiesto plovimo tirpalo-1, centrifuguojama 1 min. 6000xg;
- pašalinamas mėgintuvėlis su filtratu, kolonėlė perkeliama į švarų 2 ml mėgintuvėlį, įpilama 500 µl praskiesto plovimo tirpalo-2, centrifuguojama maksimaliu greičiu (20000xg) 3 min.;
- pašalinamas mėgintuvėlis su filtratu, kolonėlė perkeliama į naują 1,5 ml mėgintuvėlį.

DNR išplovimas:

- į kolonėlę įpilama 100 µl išplovimo buferinio tirpalo, pašildyto iki 70⁰C ir inkubuojama 2 min. kambario temperatūroje, centrifuguojama 6000xg 1 min.;
- antrą kartą kartojamas išplovimas, nekeičiant apatinio mėgintuvėlio;
- PGR atlikti naudojama 5 µl išskirtos DNR.

PGR reakcijos ypatumai. PGR atlikta 50 µl tūrio PGR reakcijos mišinyje, ŽPV nustatyti buvo naudojami bendri MY09/11 pradmenys ir *Taq DNA Polymerase and dNTP Set* (AB Fermentas, Lietuva) rinkinys. PGR mišinio sudėtyje yra 10 mM Tri-HCl (pH 8,8), 50 mM KCl 0,08 %, Nonidet P40, 1,5 mM MgCl₂, 200 nM kiekvieno dNTP, 50 pmol kiekvieno pradmens ir 0,5 U Taq DNA polimerazės (rekombinantinė). PGR buvo atliekama naudojant personalinį termociklerį (Eppendorff, Vokietija).

PGR ciklą ŽPV nustatyti sudaro:

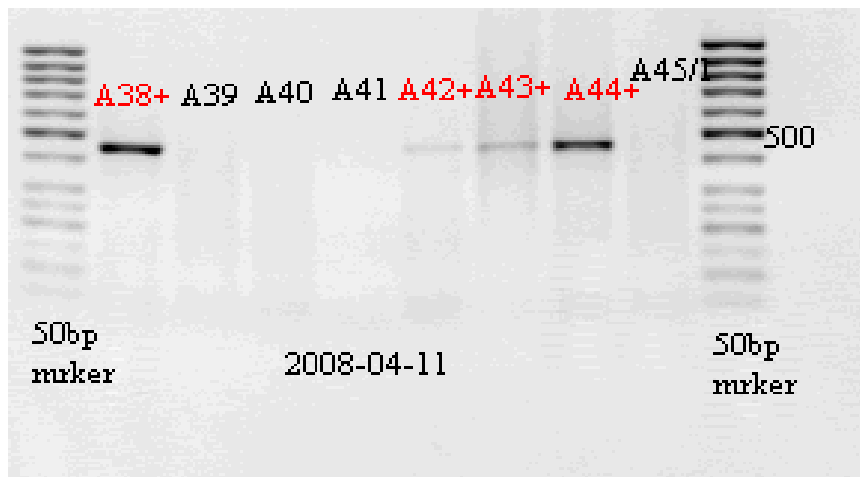
- | | | |
|---|---|----------|
| 95°C 3 min. – pradinis denatūravimo ciklas; | } | 40 ciklų |
| 95°C 1 min.– denatūravimas; | | |
| 55°C 1 min. 30 s – pradmens prijungimas; | | |
| 72°C 1 min. – pradmens pratęsimas; | | |
| 72°C 10 min. – galutinis pradmens pratęsimo ciklas. | | |

Siekiant įsitikinti, ar visuose mėginiuose tikrai yra amplifikuojama DNR, prieš atliekant PGR buvo tikrinama, ar visuose mėginiuose yra β globino geno (amplifikacija su β globino geno pradmenimis, 3 lent.).

3 lentelė. β -globino genui nustatyti naudotų pradmenų sekos

β -globino pradmuo	Seka (5'→3')	Amplifikuojamasis produktas (bp)
PC03	5'→ACACAACACTGTGTTCACTAGC	110 bp
PC04	5'→CCACTTGCACCTACTTCAAC	

Kiekviena PGR reakcija buvo atliekama naudojant teigiamą ir neigiamą kontrolę. Teigiamai kontrolei atlikti buvo naudojamos SiHa ir HeLa ląstelės, neigiamai kontrolei – mėginiai, neturintys DNR (su dejonizuotu vandeniu). Amplifikuoti PGR produktai buvo analizuojami panaudojant elektroforezę. Elektroforezė buvo atliekama 1,5 proc. agarozės gelyje, dažytame etidžio bromidu. Elektroforezei atlikti buvo imta 6 μ l amplifikacijos produkto, po elektroforezės etidžio bromidu dažyti produktai analizuoti transiliumatoriuje naudojant UV šviesos šaltinį (312 nm) (Herolab, Vokietija) (10 pav.).



10 pav. ŽPV identifikavimas gimdos kaklelio mėginiuose

Pastaba: Raudonai pažymėti ŽPV teigiami mėginiai, juodai – ŽPV neigiami.

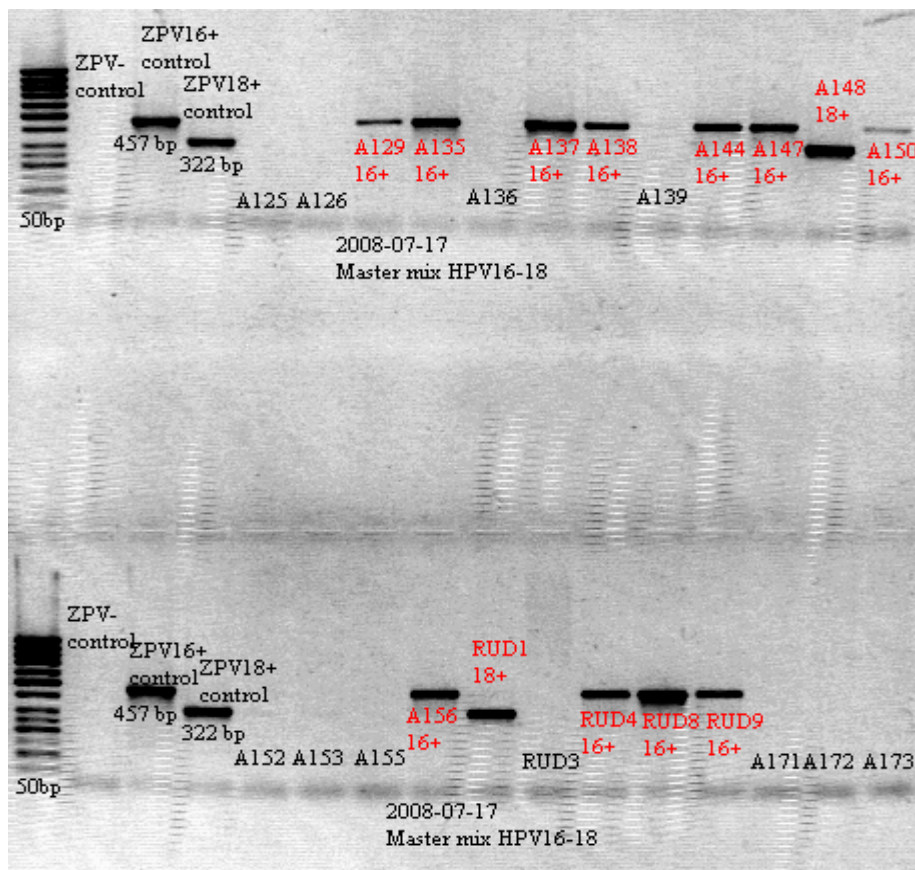
ŽPV amplifikuojasi ties 450 bp.

ŽVP tipų nustatymas. PGR atlikti buvo naudojama 50 µl tūrio PGR reakcijos mišiniai, naudoti komerciniai rinkiniai (AB „SORPO diagnostics“, Lietuva).

PGR ciklą ŽPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 59 tipams nustatyti pagal gamintojo rekomendacijas sudaro:

- 95°C 7 min. – pradinis denatūravimo ciklas;
 - 94°C 30 s – denatūravimas;
 - 56°C 45 s – pradmens prijungimas;
 - 72°C 45 s – pradmens pratęsimas;
- } 35 ciklai
- 72°C 2 min. – galutinis pradmens pratęsimo ciklas.

Nustatant ŽPV tipus gautų PGR produktų elektroforezė parodyta 11 paveiksle.



11 pav. 16 ir 18 tipų ŽPV identifikavimas gimdos kaklelio mėginiuose

Pastaba: Raudonai pažymėti 16 ir 18 tipų ŽPV teigiami mėginiai, juodai – 16 ir 18 tipų ŽPV neigiami mėginiai.

Jei, atlikus PGR reakciją 16 ir 18 tipų ŽPV nustatyti, šie tipai nebuvo identifikuoti, tuomet mėginys buvo tiriamas dėl infekuotumo didelės ir mažos rizikos grupių ŽPV. Tam tikslui naudotas komercinis *Seeplex HPV 4 ACE Screening* rinkinys (Seegene inc., Korėja). Buvo nustatomas infekuotumas didelės (35, 51, 56, 58, 66, 67, 70 tipų) ir mažos (42, 43, 47 tipų) rizikos ŽPV [88]. Rinkinys patogus naudoti, nes vienos reakcijos metu nustatomas infekuotumas didelės ir mažos rizikos grupių virusais, tos pačios reakcijos metu atliekama vidinė ir išorinė mėginio kontrolė.

3.4. 16 tipo ŽPV E2 geno iškritos nustatymo metodai

16 tipo ŽPV E2 geno iškritai nustatyti buvo atliekama PGR naudojant 3 skirtingas pradmenų poras, amplifikuojančias 3 geno fragmentus. Pradmenų sekos parodytos 4 lentelėje.

4 lentelė. ŽPV E2 geno iškritai nustatyti naudotos pradmenų sekos

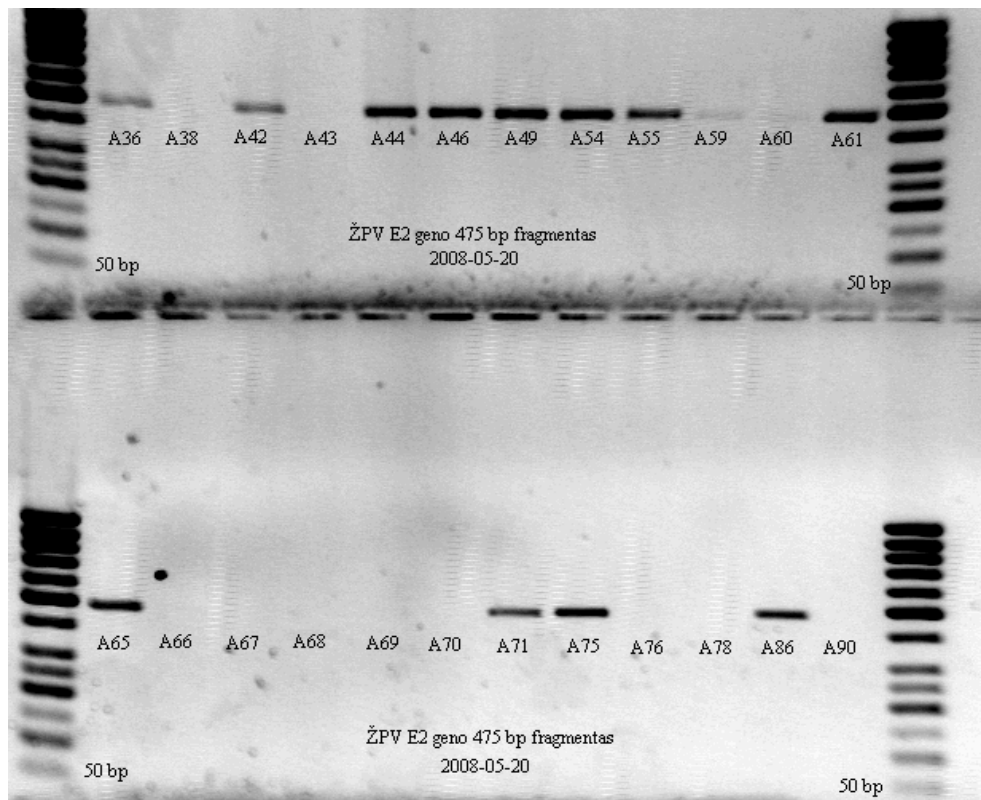
E2 geno fragmentas	Pradmenų seka	Nukleotidų pozicija	Amplifikuoto produkto ilgis
Amplimeras A 1 fragmentas	A1 5'-AGGACGAGGACAAGGAAAA-3' A2 5'-ACTTGACCCTCTACCACAGTTACT-3'	nt 2735–2753 nt 3187–3210	475 bp
Amplimeras B 2 fragmentas	B1 5'-TTGTGAAGAAGCATCAGTAACT-3' B2 5'-TAAAGTATTAGCATCACCTT-3'	nt 3172–3193 nt 3630–3649	477 bp
Amplimeras C 3 fragmentas	C1, 5'-GTAATAGTAACACTACACCCATA-3' C2, 5'-GGATGCAGTATCAAGATTTGTT-3'	nt 3597–3618 nt 3853–3873	276 bp

PGR ciklą ŽPV E2 geno iškritai nustatyti sudaro:

95°C 4 min. – pradinis denatūravimo ciklas;	}	40 ciklų
95°C 1 min. – denatūravimas;		
58°C 2 min. – pradmens prijungimas;		
72°C 1,5 min. – pradmens pratęsimas;		
72°C 7 min. – galutinis pradmens pratęsimo ciklas.		

Amplifikuoti PGR produktai buvo analizuojami naudojant elektroforezę. Elektroforezė buvo atliekama 1,5 proc. agarozės gelyje, dažytame etidžio bromidu. Elektroforezei buvo imta 6 µl amplifikacijos produkto, naudotas 1xTAE buferinis tirpalas su etidžio bromidu, 50 bp DNR žymė. Po elektroforezės etidžio bromidu dažyti produktai analizuoti transiliumatoriuje naudojant UV šviesos šaltinį (320 nm).

12-ajame paveiksle parodyta 16 tipo ŽPV E2 geno atskirų fragmentų amplifikacija.



12 pav. 16 tipo ŽPV E2 geno atskirų fragmentų amplifikacija

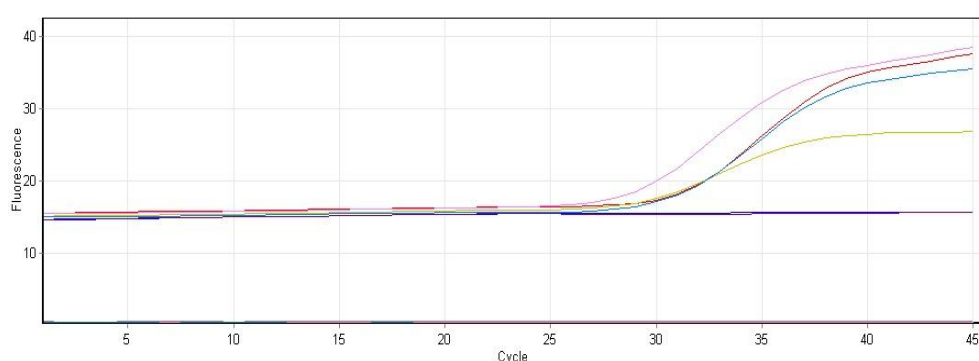
3.5. ŽPV mRNR nustatymo metodai

RNR išskirti buvo naudojamas komercinis *All Prep DNA/RNA* rinkinys (Qiagen, Vokietija). Išskyrimas atliktas pagal gamintojo rekomendacijas:

- Homogenizuotas lizatas perkeliamas ant *AllPrep DNA* kolonėlės ir centrifuguojamas 30 s $\geq 8000 \times g$ (≥ 10000 rpm).

- *AllPrep DNA* kolonėlė perkeliama į naują 2 ml mėgintuvėlį ir laikoma kambario temperatūroje (15-25⁰).
- Pridedama 1 tūris 70 proc. etanolio.
- Perkeliama daugiau nei 700 μl mėginio, taip pat ir visas susiformavęs precipitatas į *RNeasy* kolonėlę, esančią 2 ml mėgintuvėlyje, centrifuguojama 15 s $\geq 8000 \times g$ (≥ 10000 rpm). Pašalinamas supernatantas.
- Pridedama 700 μl *RWI* buferio į *RNeasy* kolonėlę, centrifuguojama 15 s $\geq 8000 \times g$ (≥ 10000 rpm) siekiant išplauti kolonėlės membraną; pašalinamas supernatantas.
- Pridedama 500 μl *RPE* buferio į *RNeasy* kolonėlę, centrifuguojama 15 s $\geq 8000 \times g$ (≥ 10000 rpm), siekiant išplauti kolonėlės membraną; pašalinamas supernatantas.
- Pridedama 500 μl *RPE* buferio į *RNeasy* kolonėlę, centrifuguojama 2 min. $\geq 8000 \times g$ (≥ 10000 rpm). Ilgas centrifugavimas išdžiovina kolonėlės membraną, taip užtikrinama, kad nelieka etanolio.
- *RNeasy* kolonėlė įdedama į naują surenkamąjį 2 ml mėgintuvėlį; centrifuguojama visu greičiu 1 min.
- *RNeasy* kolonėlė įdedama į naują surenkamąjį 1,5 ml mėgintuvėlį, pridedama 30-50 μl *RNase*-free vandens, centrifuguojama 1 min. $\geq 8000 \times g$ (≥ 10000 rpm).
- Išskirta RNR naudojama tolesniems tyrimams.

PGR reakcija ŽPV mRNR nustatyti atlikta naudojant realaus laiko PGR aparatą *Rotor-Gene 6000* (Corbett Research, Australija). Atliekant realaus laiko PGR amplifikuojamasis produktas matomas kompiuterio ekrane (13 pav.).



13 pav. ŽPV mRNR amplifikacija

3.6. Statistiniai metodai

Duomenys analizuoti pagal amžiaus grupes, diagnozuotus intraepitelinius gimdos kaklelio pokyčius (citologinę ir histologinę diagnozę), infekuotumą ŽPV ir atskirų tipų ŽPV bei 16 tipo ŽPV E2 geno integraciją (E2 geno iškritus fragmentus) bei mRNR. Visi tirti požymiai yra kokybiniai, dėl to duomenys analizuoti dažnių lentelių pavidalu. Jose pateikti atskirų požymių kategorijų dažniai n ir atitinkamos jų proporcijos (%). Hipotezei apie dviejų kokybinių požymių nepriklausomumą tikrinti buvo naudotas χ^2 (chi kvadrato), o esant mažam stebėjimų skaičiui – tikslusis Fišerio testas. χ^2 kriterijus yra vienas iš populiariausių kriterijų, naudojamų hipotezėms apie kokybinių požymių nepriklausomumą ar populiacijų homogeniškumą tikrinti. Kai kokybiniai požymiai yra ranginiai, χ^2 testo į ranginių kintamųjų kategorijų išdėstymą dažnių lentelėje neatsižvelgiama, dėl to ranginių kintamųjų nepriklausomumui įvertinti disertacijoje buvo naudotas Mantel-Haenszel χ^2 testas, kitaip dar vadinamas Cochran-Mantel-Haenszel testu. Jis leidžia įvertinti tiesinę priklausomybę tarp ranginių kintamųjų, t.y., ar, dažnėjant vieno kintamojo aukštesnio rango kategorijoms, kitas kintamasis taip pat turi tendenciją įgyti aukštesnio (mažesnio) rango reikšmes.

Pasikliautiniai intervalai skaičiuoti pagal formulę:

Kairysis intervalo rėžis

$$P_L = \hat{P} - z_{\alpha/2} \sqrt{\frac{\hat{P}(1-\hat{P})}{n}} = \hat{P} - 1.96 \sqrt{\frac{\hat{P}(1-\hat{P})}{n}}$$

Dešinysis intervalo rėžis

$$P_R = \hat{P} + z_{\alpha/2} \sqrt{\frac{\hat{P}(1-\hat{P})}{n}} = \hat{P} + 1.96 \sqrt{\frac{\hat{P}(1-\hat{P})}{n}}$$

$z_{\alpha/2}$ – standartinio normaliojo skirstinio $1-\alpha/2$ lygmens kvantilis, \hat{P} – įvertinta proporcija.

Disertacijoje buvo taikytas logistinės regresijos modelis. Naudojant šį modelį buvo vertinama, ar citologinė dinamika priklauso nuo 16 tipo ŽPV E2 geno iškritus ir pacientės amžiaus.

Tikrinant hipotezes $p < 0,05$ buvo laikoma statistiškai reikšmingu. Tyrimo statistinė analizė atlikta, naudojant SPSS 13 ir Excel programinę įrangą.

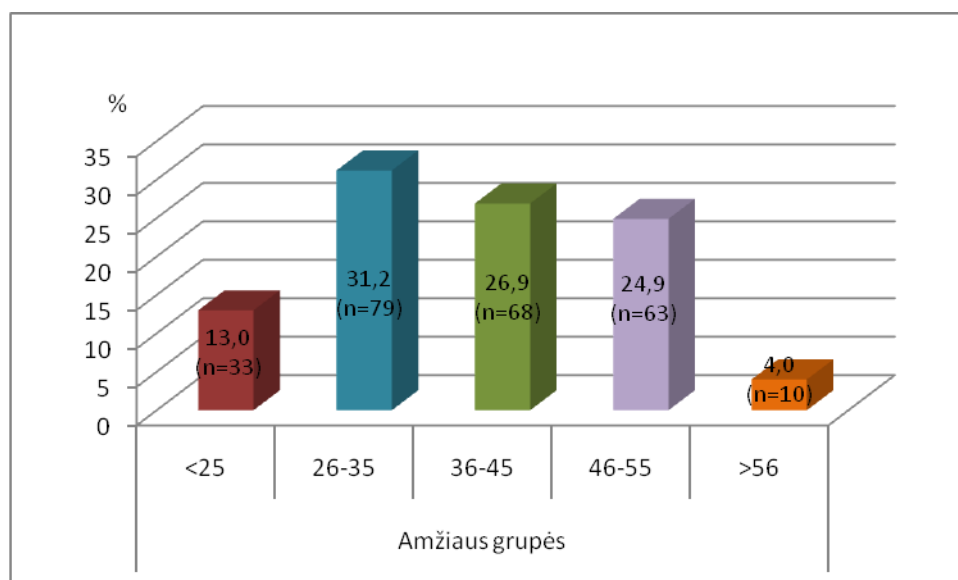
4. REZULTATAI

4.1. Moterų infekuotumas ŽPV

Į tyrimą įtrauktos 253 moterys, kurioms, atlikus *Pap* tyrimą, nustatyti įvairaus laipsnio intraepiteliniai gimdos kaklelio pokyčiai (nuo ASCUS iki HSIL). Tyrime dalyvaujančios moterys pagal amžių suskirstytos į grupes. Visoms moterims buvo paimta medžiaga infekuotumui ŽPV, jo tipams bei 16 tipo ŽPV E2 geno iškritai nustatyti. Tiriamosioms atlikta kolposkopija ir biopsija. Tiriant biopsinę medžiagą ir nustatčius CIN II–III moterys pasiūstos gydytis į stacionarą.

4.1.1. Infekuotumas ŽPV pagal tirtų moterų amžių

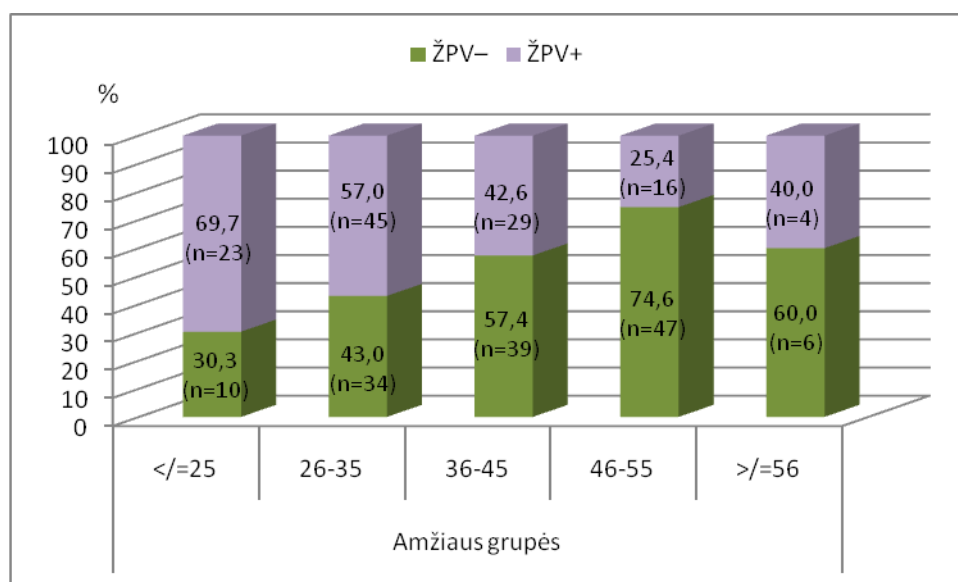
Tirtųjų amžiaus vidurkis yra 37,9 metai (nuo 18 iki 70 metų, SD=10,48). Visos moterys pagal amžių buvo suskirstytos į 5 grupes: I amžiaus grupė – 25 metų ir jaunesnės, II amžiaus grupė – 26–35 metų, III amžiaus grupė – 36–45 metų, IV amžiaus grupė – 46–55 metų, V amžiaus grupė – 56 metų ir vyresnės. Didžiausią grupę sudarė 26–35 metų amžiaus moterys. Moterų pasiskirstymas pagal amžiaus grupes parodytas 14 paveiksle.



14 pav. Moterų pasiskirstymas pagal amžiaus grupes

Pastaba. *n* – tiriamųjų skaičius.

Kaip jau buvo minėta, visoms tyrime dalyvavusioms moterims atliktas ŽPV testas. Nustatyta, kad tarp 253 tirtųjų ŽPV identifikuota 117 moterų, t.y. 46,3 proc. moterų buvo infekuotos (95% PI: 40,10÷52,39). Konstatuoti statistiškai reikšmingi infekuotumo ŽPV skirtumai analizuojant moterų infekuotumą ŽPV pagal atskiras amžiaus grupes (naudojant χ^2 testą $p=0,0002$, naudojant Mantel-Haenszel χ^2 testą $p<0,0001$). Dažniausiai ŽPV infekcija, esant intraepitelinių gimdos kaklelio pokyčių, nustatyta 25 metų amžiaus ir jaunesnėms moterims: ŽPV teigiamas testas buvo 23 moterų, ŽPV neigiamas – 10, t.y. atitinkamai 69,7 ir 30,3 proc. atvejų. Pakankamai dažnai ŽPV infekcija nustatyta ir antroje amžiaus grupėje, t.y. 26–35 m. moterims: jų infekuotumas ŽPV siekė 57,0 proc. (45 moterys iš 79). 36–45 ir 46–55 metų moterų amžiaus grupėse infekuotumas ŽPV mažesnis ir siekė atitinkamai 42,6 ir 25,4 proc. (15 pav.). Vyresnių nei 56 metai moterų buvo tik 10 ir 4 jų buvo infekuotos.



15 pav. Infekuotumo ŽPV analizė pagal amžiaus grupes

Pastaba. *n* – tiriamųjų skaičius.

Atsižvelgiant į tai, kad, nustatčius *Pap* tepinėlyje intraepitelinių gimdos kaklelio pokyčių, būtina pagal nustatytus algoritmus atlikti histologinį tyrimą, moterų infekuotumas ŽPV analizuotas remiantis ir citologine, ir histologine diagnozėmis. Pažymėtina, kad, įvertinus ŽPV tyrimų rezultatus pagal citologinę ir histologinę diagnozę, yra didesnė tikimybė, esant intraepitelinių gimdos kaklelio pokyčių, numatyti riziką minėtiems pokyčiams progresuoti.

4.1.2. Moterų infekuotumo ŽPV analizė pagal citologinę diagnozę

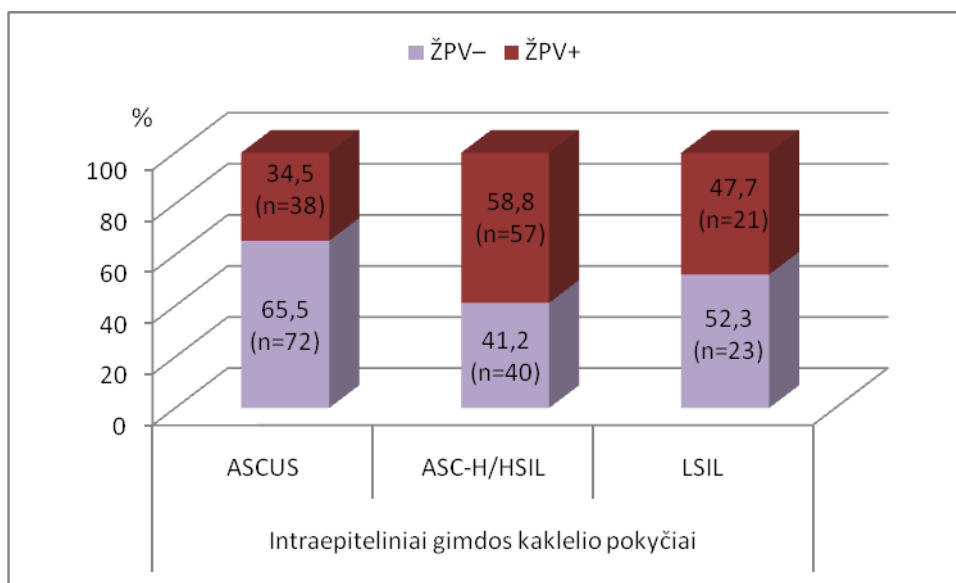
Tarp 253 moterų, įtrauktų į tyrimą, ASCUS diagnozuota 110 moterų, ASC-H/HSIL – 97, LSIL – 44 ir AGC – 2 moterims, atitinkamai 43,1; 30,8; 17,4 ir 0,8 proc. (5 lent.).

5 lentelė. ŽPV infekuotumas pagal citologinę diagnozę

Histologinė diagnozė	Infekuotumas ŽPV				Iš viso, n
	neinfekuotos ŽPV		infekuotos ŽPV		
	n	%	n	%	
ASCUS	72	65,5	38	34,5	110
ASC-H/HSIL	40	41,2	57	58,8	97
LSIL	23	52,3	21	47,7	44
AGC	1	50,0	1	50,0	2
Iš viso	136	53,7	117	46,9	253

Pastaba. ASCUS – atipinės nenustatytos svarbos plokščiojo epitelio ląstelės, ASC-H – atipinės plokščiojo epitelio ląstelės, kai negalima paneigti HSIL, LSIL – nedidelio laipsnio plokščiojo epitelio intraepiteliniai pokyčiai, HSIL – didelio laipsnio plokščiojo epitelio intraepiteliniai pokyčiai, AGC – atipinės liaukinio epitelio ląstelės.

Didžiausias infekuotumas ŽPV buvo tų moterų, kurioms citologiniu tyrimu nustatyta ASC-H/HSIL (58,8 proc.), beveik dvigubai mažesnis infekuotumas buvo ASCUS atveju (34,5 proc.) (16 pav.). AGC nustatyta tik 2 atvejais. Nustatyti statistiškai reikšmingi infekuotumo ŽPV skirtumai priklausomai nuo citologinės diagnozės ($p=0,00006$).



16 pav. ŽPV infekuotumo analizė pagal citologinę diagnozę

Pastaba. *ASCUS* – atipinės nenustatytos svarbos plokščiojo epitelio ląstelės, *ASC-H* – atipinės plokščiojo epitelio ląstelės, kai negalima paneigti *HSIL*, *HSIL* – didelio laipsnio plokščiojo epitelio intraepiteliniai pokyčiai, *LSIL* – nedidelio laipsnio plokščiojo epitelio intraepiteliniai pokyčiai, *ŽPV+* – infekuotos *ŽPV* moterys, *ŽPV-* – neinfekuotos *ŽPV* moterys, *n* – tiriamųjų skaičius.

4.1.3. Moterų infekuotumo ŽPV analizė pagal histologinę diagnozę

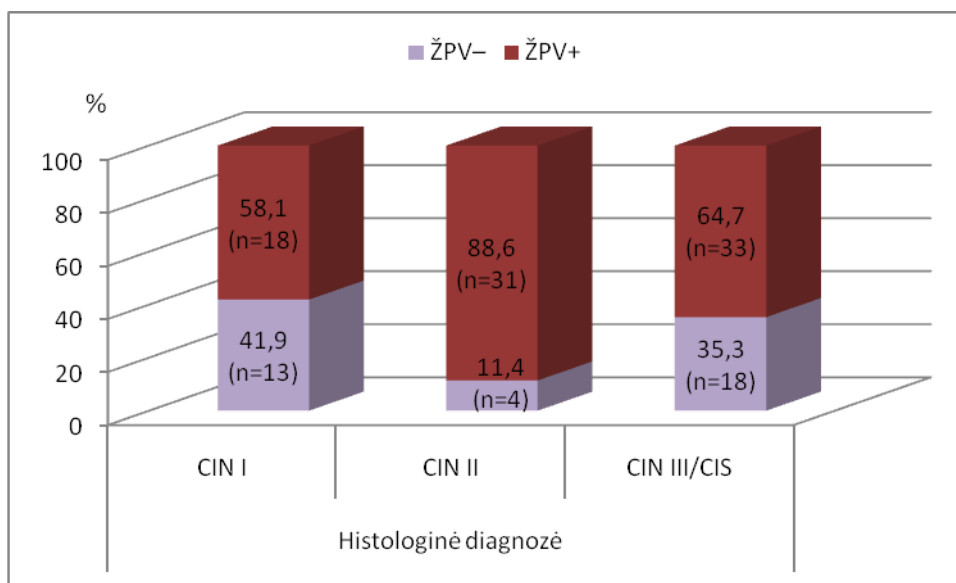
Iš 253 įtrauktų į tyrimą moterų histologinis tyrimas atliktas 236-ioms, nes 17 moterų atsisakė biopsijos. Displazija nepatvirtinta histologinių tyrimų 48,3 proc. (n=114) atvejų. CIN I, CIN II, CIN III/CIS ir invazinis vėžys nustatyti atitinkamai 13,1 (n=31), 14,8 (n=35), 21,6 (n=51) ir 2,1 proc. (n=5) atvejų.

6 lentelė. Moterų infekuotumas ŽPV pagal histologinę diagnozę

Histologinė diagnozė	Infekuotumas ŽPV				Iš viso, n
	neinfekuotos ŽPV		infekuotos ŽPV		
	n	%	n	%	
Displazija yra nepatvirtinta histologiniu tyrimu (norma)	85	74,6	29	25,4	114
CIN I	13	41,9	18	58,1	31
CIN II	4	11,4	31	88,6	35
CIN III/CIS	18	35,3	33	64,7	51
Invazinis vėžys	3	60,0	2	40,0	5
Iš viso	123	52,1	113	47,9	236

Pastaba. *CIN I – lengva displazija, CIN II – vidutinė displazija, CIN III/CIS – sunki displazija.*

Didžiausias infekuotumas ŽPV buvo tų moterų, kurioms diagnozuota CIN II (88,6 proc.) bei CIN III/CIS (64,7 proc.) (6 lent. ir 17 pav.). Invazinis vėžys nustatytas 5 moterims, tarp kurių 2 – infekuotos ŽPV. Tarp moterų, kurioms displazija nepatvirtinta histologiniu tyrimu infekuotumas ŽPV yra 25,4 proc. (n=29) atvejų. Kaip jau minėta, 17 moterų histologinis tyrimas nebuvo atliktas, nes jos atsisakė biopsijos; jų infekuotumas siekia 23,5 proc. (n=4) atvejų. Pažymėtina, kad esant sunkesnei gimdos kaklelio displazijai – CIN II ir CIN III/CIS – ŽPV nustatytas dažniau negu esant CIN I ($p < 0,0001$).



17 pav. ŽPV infektuotumo analizė pagal histologinę diagnozę

Pastaba. *CIN I* – lengva displazija, *CIN II* – vidutinė displazija, *CIN III/CIS* – sunki displazija, *ŽPV+* – infekuotos ŽPV moterys, *ŽPV-* – neinfekuotos ŽPV moterys, *n* – tiriamųjų skaičius.

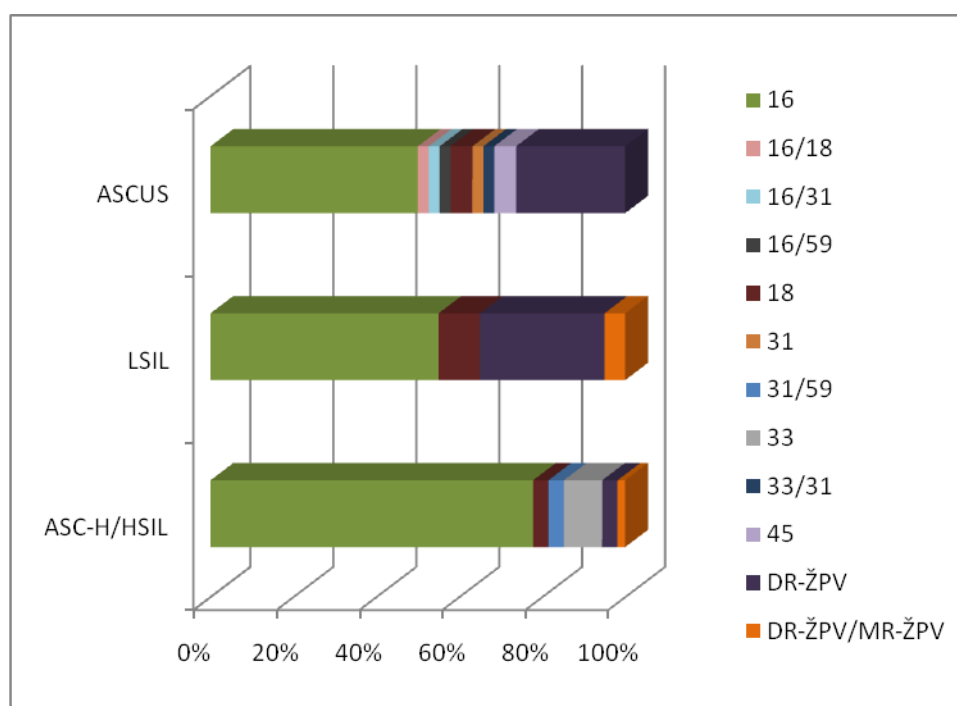
4.2. ŽPV tipų identifikavimas

Identifikuojant ŽPV tipus nustatyta, jog dauguma moterų infekuotos 16 tipo ŽPV – 68,4 proc. (80 moterų iš 117) (95% PI: 62,13÷78,42), o 18 tipo ŽPV – tik 5,1 proc. moterų (6 atvejai). Pavieniais atvejais nustatyti 31, 33 ir 45 tipų ŽPV. Konstatuota ir dviguba infekcija: 16 ir 18, 16 ir 31, 16 ir 59, 31 ir 33 bei 31 ir 59 tipų ŽPV. 16 tipo ŽPV kartu su kito tipo ŽPV 71,1 proc. moterų (n=83). 15,3 proc. (n=18) atvejų ŽPV tipas, panaudojus *SORPO diagnostics* rinkinį, nenustatytas.

7 lentelė. ŽPV tipų pasiskirstymas

ŽPV tipas	Infekuotumas ŽPV	
	dažnis	procentas
16	80	68,4
18	6	5,1
16 ir 18	1	0,9
16 ir 31	1	0,9
16 ir 59	1	0,9
31	1	0,9
31 ir 59	2	1,7
33	4	3,4
31 ir 33	1	0,9
45	2	1,7
DR-ŽPV	13	11,0
DR/MR-ŽPV	2	1,7
Nepatikslintas	3	2,6
Iš viso	117	100,0

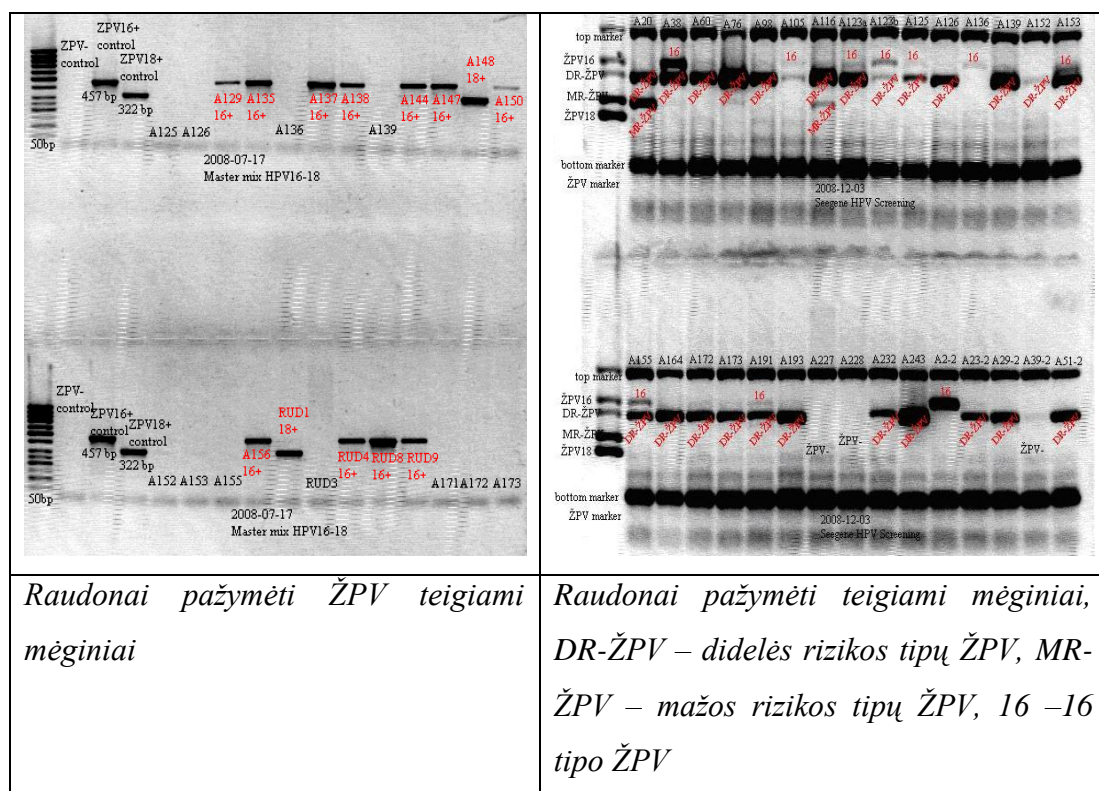
Pastaba. DR-ŽPV – didelės rizikos ŽPV, MR-ŽPV – mažos rizikos ŽPV.



18 pav. Moterų infekuotumo atskirų tipų ŽPV analizė pagal citologinę diagnozę

Pastaba. ASCUS – atipinės nenustatytos svarbos plokščiojo epitelio ląstelės, LSIL – nedidelio laipsnio plokščiojo epitelio intraepiteliniai pokyčiai, HSIL – didelio laipsnio plokščiojo epitelio intraepiteliniai pokyčiai, DR-ŽPV – didelės rizikos ŽPV, MR-ŽPV – mažos rizikos ŽPV.

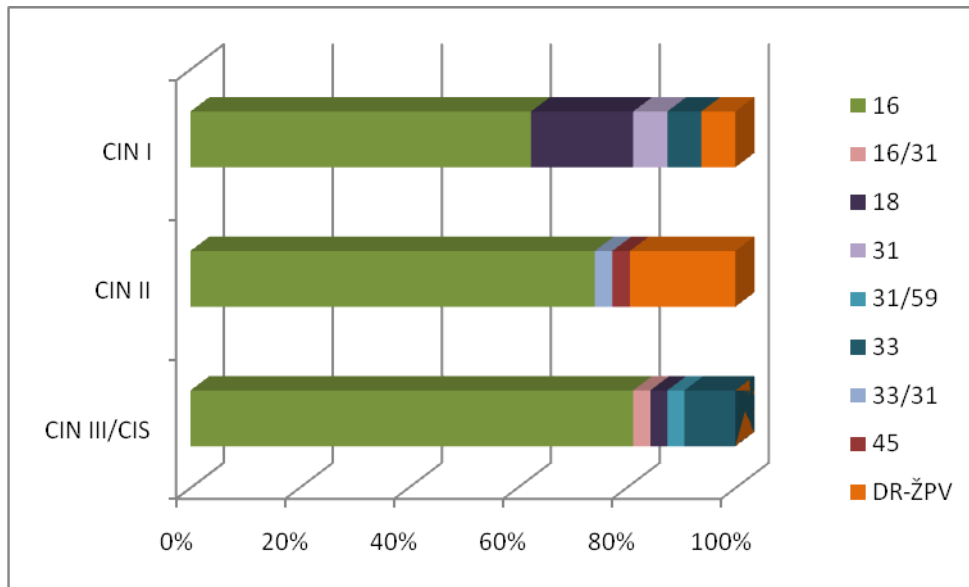
Jei PGR metu, panaudojus minėtą rinkinį (specifinius 16, 18, 31, 45 ir 59 tipų ŽPV pradmenis), viruso tipo identifikuoti nepavykdavo, buvo atliekamos papildomos PGR, siekiant nustatyti, ar esama infekotumo didelės ar mažos rizikos grupės ŽPV (naudotas rinkinys *Seeplex HPV4 ACE Screening, Seegene Ltd., Korėja*). 11 proc. tirtųjų (13 iš 117) buvo identifikuoti didelės vėžio rizikos tipų ŽPV, 2 moterims – ir didelės, ir mažos rizikos ŽPV; 3 atvejais, panaudojus abu rinkinius, ŽPV tipas neidentifikuotas (7 lent.). 18 paveiksle parodyta, kokių tipų ŽPV identifikuoti esant ASCUS, LSIL bei HSIL citologinių pokyčių. 19 paveiksle pateiktos nuotraukos, kuriose matyti ŽPV tipų identifikavimas naudojant du skirtingus rinkinius. Kairėje nuotraukoje naudotas *SORPO diagnostics* rinkinys 16 ir 18 tipų ŽPV identifikuoti, dešinėje – *Seegene* rinkinys, skirtas suskirstyti virusus į didelės, mažos rizikos grupes bei kartu identifikuoti minėtų 16 ir 18 tipų ŽPV.



19 pav. ŽPV tipų nustatymas ir vizualizavimas elektroforezės metodu

Atsižvelgiant į tai, kad 16 tipo ŽPV dažniausiai identifikuojamas esant intraepitelinį gimdos kaklelio pokyčių (tai rodo ir mūsų duomenys), detaliau buvo tyrinėtas šio tipo viruso vaidmuo kancerogenezėje.

Panašūs rezultatai gauti analizuojant atskirų tipų ŽPV spektrą pagal histologinę diagnozę (20 pav.).

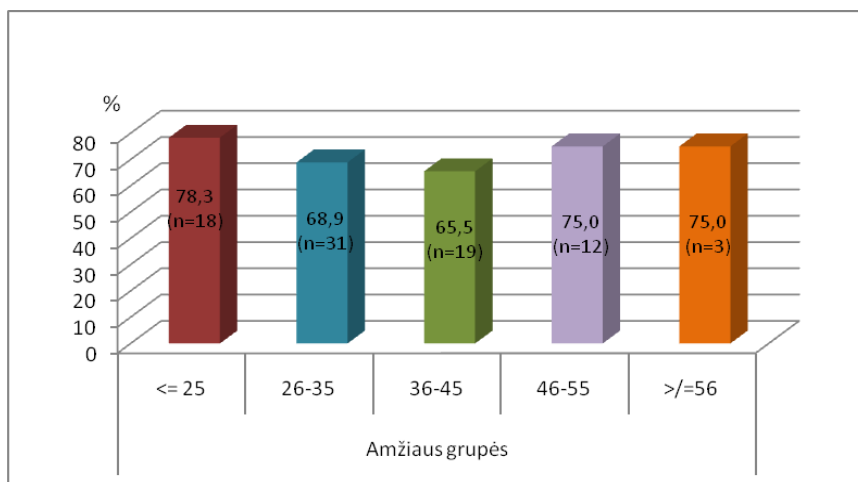


20 pav. Moterų infekuotumo atskirų tipų ŽPV analizė pagal histologinę diagnozę

Pastaba. *CIN I* – lengva displazija, *CIN II* – vidutinė displazija, *CIN III/CIS* – sunki displazija.

4.2.1. 16 tipo ŽPV paplitimas pagal moterų amžių

Analizuojant gautus rezultatus pagal moterų amžių, nustatyta, kad infekuotumas 16 tipo ŽPV bei 16 tipo derinio su kitų tipų ŽPV abiejose grupėse buvo panašus (21 pav.). Statistiškai reikšmingų skirtumų tarp infekuotumo 16 tipo ŽPV amžiaus grupėse nenustatyta (naudojant χ^2 testą $p = 0,9633$, naudojant Mantel-Haenszel χ^2 testą $p = 0,852$).

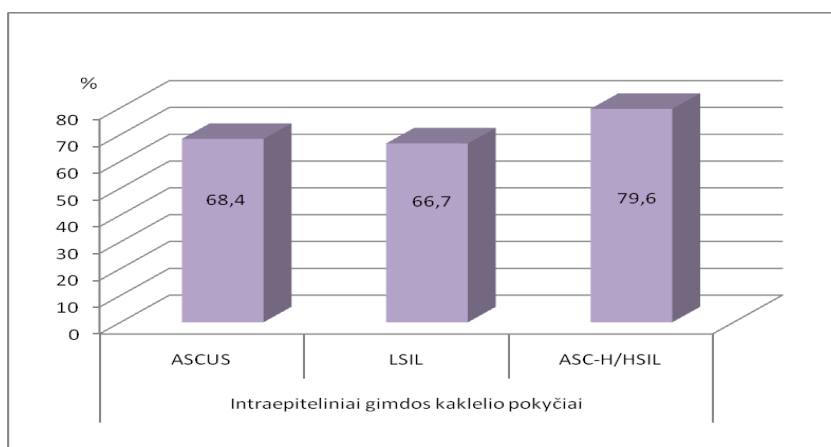


21 pav. Infekuotumo 16 tipo ŽPV pasiskirstymas pagal amžiaus grupes

Pastaba. *n* – tiriamųjų skaičius.

4.2.2. 16 tipo ŽPV paplitimas esant įvairaus laipsnio intraepitelinių gimdos kaklelio pokyčių

Analizė pagal citologinę diagnozę. 16 tipo ŽPV buvo identifikuotas esant visų kategorijų citologinių pokyčių. Esant ASCUS šis virusas nustatytas 68,4 proc. atveju, LSIL – 66,7 proc. ASC-H/HSIL atveju šio tipo virusas buvo identifikuotas dažniau, net 79,6 proc. (χ^2 testo $p=0,0005$, Mantel-Haenszel χ^2 testo $p=0,0001$) (22 pav.). AGC atvejais buvo tik 2 infekuotos 16 tipo ŽPV moterys.



22 pav. Infekuotumo 16 tipo ŽPV pasiskirstymas pagal citologinius pokyčius

Pastaba. *ASCUS* – atipinės nenustatytos svarbos plokščiojo epitelio ląstelės, *LSIL* – nedidelio laipsnio plokščiojo epitelio intraepiteliniai pokyčiai, *HSIL* – didelio laipsnio plokščiojo epitelio intraepiteliniai pokyčiai.

Analizė pagal histologinę diagnozę. Esant CIN I pokyčių 16 tipo ŽPV identifikuotas buvo 62,5 proc. (10 moterų iš 16 infekuotų ŽPV) atvejų, esant CIN II pokyčiams – 74,2 proc. (23 moterų iš 31 infekuotų ŽPV), esant CIN III/CIS – 84,4 proc. (27 moterų iš 32 infekuotų ŽPV) (χ^2 testo $p=0,221$, Mantel-Haenszel χ^2 testo $p=0,06$). Taigi rečiau šio tipo virusas nustatytas esant CIN I ir tais atvejais, kai histologinis tyrimas nepatvirtino citologinio tyrimo rezultatų ir patologijos nenustatyta (8 lentelė).

8 lentelė. Moterų infekuotumo 16 bei kitų tipų ŽPV vertinimas pagal histologiją

Histologinė diagnozė	Infekuotumas ŽPV				Iš viso, n
	16 tipo ŽPV		kitų tipų ŽPV		
	n	%	n	%	
Displazija, nepatvirtinta histologiniu tyrimu	19	65,5	10	34,5	29
CIN I	10	62,5	6	37,5	16
CIN II	23	74,2	8	25,8	31
CIN III/CIS	27	84,4	5	15,6	32
Invazinis vėžys	2	100,0	0	0	2
Iš viso	83	72,8	31	27,2	114

Pastaba. *CIN I – lengva displazija, CIN II – vidutinė displazija, CIN III/CIS – sunki displazija.*

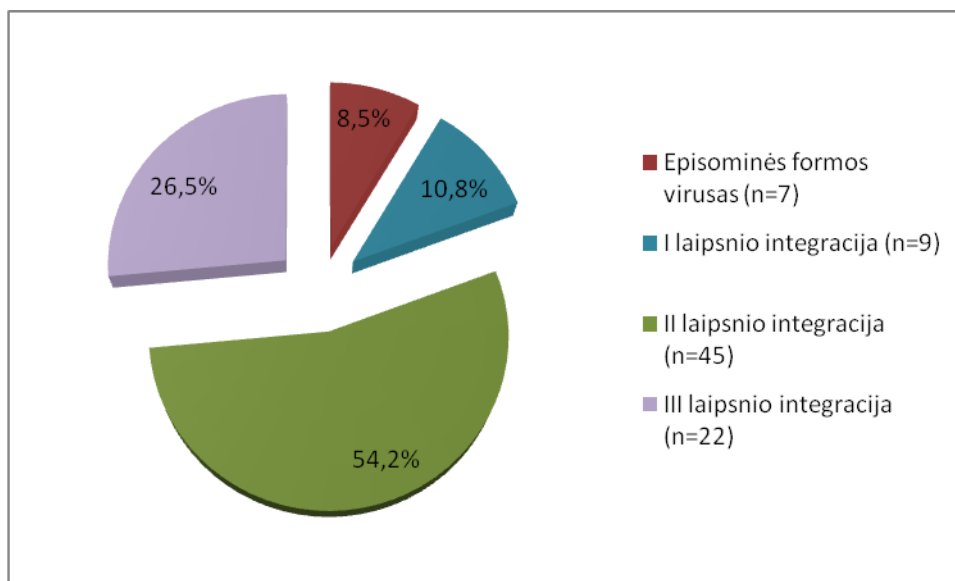
Išanalizavus gautus rezultatus pagal intraepitelinius gimdos kaklelio citologinius bei histologinius pokyčius, nustatyta, kad infekuotumo 16 tipo ŽPV pasiskirstymas abiem atvejais išliko panašus (atitinkamai $p=0,1204$ ir $p=0,222$).

4.3. 16 tipo ŽPV E2 geno iškritos analizė

Dėl 16 tipo ŽPV E2 geno iškritos tirtos 83 moterys. 16 tipo ŽPV E2 geno integracijos pobūdis buvo vertintas atsižvelgiant į integracijos laipsnį:

- nėra integracijos (episominės formos virusas) – amplifikavosi visi trys 16 tipo ŽPV E2 geno fragmentai;
- I laipsnio integracija – nustatyta vieno E2 geno fragmento iškrita;
- II laipsnio integracija – nustatyta dviejų E2 geno fragmentų iškrita;
- III laipsnio integracija (visiška viruso integracija) – nustatyta visų trijų E2 geno fragmentų iškrita.

Tiriant 16 tipo ŽPV E2 geno atskirus fragmentus, 10,8 proc. atvejų (9 iš 83) nustatyta I laipsnio, 54,2 proc. atvejų (45 iš 83) – II laipsnio ir 26,5 proc. (22 iš 83) – III laipsnio integracija, o episominės formos 16 tipo ŽPV – 8,5 proc. (7 moterys iš 83) atvejų ($p=0,0006$) (23 pav.).



23 pav. 16 tipo ŽPV E2 geno iškritos pasiskirstymas pagal integracijos laipsnį
Pastaba. *n* – tiriamųjų skaičius.

Analizė pagal citologinę diagnozę. Esant ASCUS citologinių pokyčių dažniausiai buvo identifikuota II laipsnio – 50 proc. (13 moterų iš 26) bei III laipsnio 16 tipo ŽPV E2 geno integracija – 42,2 proc. (11 moterų iš 26) atvejų. Episominės formos 16 tipo ŽPV nustatyta tik 1 moteriai. Panašūs rezultatai gauti ir LSIL bei

HSIL atvejais. Esant LSIL dažniausiai buvo identifikuota II laipsnio viruso integracija – 58,3 proc. (7 iš 12); III laipsnio viruso integracija – 33,3 proc. (4 iš 12) atveju. Episominės formos ŽPV LSIL atveju nebuvo nustatyta. HSIL atveju dažniausiai buvo identifikuota II laipsnio – 55,8 proc. (24 iš 43); rečiau – III laipsnio viruso integracija – 16,2 proc. atveju (7 iš 43). Pažymėtina, kad esant HSIL, 14,0 proc. atveju buvo identifikuotos ir episominės formos ŽPV (6 iš 43) (9 lent.). Nustatyti statistiškai reikšmingi skirtumai grupėse (χ^2 testo $p=0,0295$, Mantel-Haenszel χ^2 testo $p=0,0086$). ASC-H ir AGC atvejais buvo tik 2 moterys, kurioms 16 tipo ŽPV integracija – atitinkamai I ir II laipsnio.

9 lentelė. 16 tipo ŽPV integracijos (E2 geno iškrita) pobūdžio įvertinimas pagal citologinę diagnozę

Citologinė diagnozė	16 tipo ŽPV integracijos pobūdis	Integracijos dažnis	Procentas
ASCUS	episominės formos ŽPV	1	3,9
	I laipsnio integracija	1	3,9
	II laipsnio integracija	13	50,0
	III laipsnio (visiška viruso integracija)	11	42,2
Iš viso		26	100
LSIL	I laipsnio integracija	1	8,4
	II laipsnio integracija	7	58,3
	III laipsnio (visiška viruso integracija)	4	33,3
Iš viso		12	100
ASC-H/HSIL	episominės formos ŽPV	6	14,0
	I laipsnio integracija	6	14,0
	II laipsnio integracija	24	55,8
	III laipsnio (visiška viruso integracija)	7	16,2
Iš viso		43	100

Pastaba. ASCUS – atipinės nenustatytos svarbos plokščiojo epitelio ląstelės, LSIL – nedidelio laipsnio plokščiojo epitelio intraepiteliniai pokyčiai, HSIL – didelio laipsnio plokščiojo epitelio intraepiteliniai pokyčiai.

Analizė pagal histologinę diagnozę. Nepaisant nedidelio tyrimų skaičiaus, atskirų histologinių kategorijų atvejais (CIN I, CIN II ir CIN III/CIS) vyravo II laipsnio viruso integracija, tačiau skirtumai nebuvo statistiškai reikšmingi (Fisherio tikslusis testas $p=0,2521$). Pažymėtina, kad ir tais atvejais, kai ištyrus biopsijos medžiagą nebuvo patvirtinti intraepiteliniai gimdos kaklelio pokyčiai, 8 moterims iš 20 nustatyta III laipsnio viruso integracija. Episominės formos 16 tipo ŽPV nustatytos pavieniais atvejais esant CIN I bei nenustatytos displazijos atvejais (10 lent.).

10 lentelė. 16 tipo ŽPV integracijos (E2 geno iškrita) pobūdžio įvertinimas pagal histologinę diagnozę

Histologinė diagnozė	Integracijos pobūdis	Integracijos dažnis	Procentas
Nenustatyta displazijos	episominės formos ŽPV	1	5,0
	II laipsnio integracija	11	55,0
	III laipsnio (visiška viruso integracija)	8	40,0
Bendrasis skaičius		20	100
CIN I	episominės formos ŽPV	1	10,0
	II laipsnio integracija	6	60,0
	III laipsnio (visiška viruso integracija)	3	30,0
Bendrasis skaičius		10	100
CIN II	I laipsnio integracija	4	18,2
	II laipsnio integracija	12	54,6
	III laipsnio (visiška viruso integracija)	6	27,3
Bendrasis skaičius		22	100
CIN III/CIS	episominės formos ŽPV	5	19,2
	I laipsnio integracija	5	19,2
	II laipsnio integracija	14	50,1
	III laipsnio (visiška viruso integracija)	3	11,5
Bendrasis skaičius		27	100
Invazinis vėžys	II laipsnio integracija	2	100
Bendrasis skaičius		2	100

Pastaba. *CIN I – lengva displazija, CIN II – vidutinė displazija, CIN III/CIS – sunki displazija.*

11 lentelė. Citologinio ir histologinio tyrimų rezultatai ir infekuotumas ŽPV esant intraepitelinių gimdos kaklelio pokyčių

Citologinis tyrimas	Histologinis tyrimas	ŽPV teigiamas	ŽPV neigiamas	Iš viso n(%)
AGC n=2	invazinis vėžys	1	0	1
	pokyčių nenustatyta	0	1	1
ASCUS n=110	CIN I	6	6	12(10,1)
	CIN II	8	1	9
	CIN III/CIS	3	0	3
	pokyčių nenustatyta	17	53	70(63,6)
	biopsija neatlikta	4	12	16
LSIL n=44	CIN I	8	4	12(27,3)
	CIN II	7	0	7
	CIN III/CIS	1	1	2
	pokyčių nenustatyta	5	17	22(50,0)
	biopsija neatlikta	0	1	1
ASC– H/HSIL n=97	CIN I	4	2	6
	CIN II	16	3	19(19,6)
	CIN III/CIS	29	17	46(47,4)
	pokyčių nenustatyta	7	15	22(22,7)
	invazinis vėžys	1	3	4
Iš viso n=253		117	136	253

Pastaba. ASCUS – atipinės nenustatytos svarbos plokščiojo epitelio ląstelės, ASC-H – atipinės plokščiojo epitelio ląstelės, kai negalima paneigti HSIL, LSIL – nedidelio laipsnio plokščiojo epitelio intraepiteliniai pokyčiai, HSIL – didelio laipsnio plokščiojo epitelio intraepiteliniai pokyčiai, AGC – atipinės liaukinio epitelio ląstelės, CIN I – lengva displazija, CIN II – vidutinė displazija, CIN III/CIS – sunki displazija.

Pažymėtina, kad, atlikus histologinį tyrimą, esant ASCUS citologinei diagnozei, daugumai moterų (70 moterų) nebuvo nustatyta jokių pokyčių gimdos kaklelio epitelio ląstelėse: 17 jų buvo infekuotos ŽPV, 9 identifikuotas 16 tipo ŽPV. Atlikus histologinį tyrimą, esant LSIL, 12 moterų buvo nustatyta CIN I, 7 – CIN II, 2

– CIN III/CIS. 22 moteriai pokyčių gimdos kaklelyje nenustatyta: 5 jų buvo infekuotos ŽPV, o 3 infekuotos 16 tipo ŽPV. Esant ASC-H/HSIL citologinei diagnozei 46 moterims buvo diagnozuota sunki displazija, t.y. CIN III/CIS, 19 moterų – CIN II. Lengva displazija CIN I nustatyta 6 moterims. 22 moterims pokyčių gimdos kaklelio epitelio ląstelėse iš viso nenustatyta: 7 jų buvo identifikuotas ŽPV ir net 5 – 16 tipo ŽPV. Moterys, kurioms buvo identifikuotas ŽPV, bet citologinių radinių nepatvirtino histologinis tyrimas, yra stebimos toliau (11 lent.).

4.4. Tiriamųjų stebėseną

4.4.1. Infekuotumo ŽPV dinamika

Iš 253 į tyrimą įtrauktų moterų 159 moterys atvyko pasitikrinti praėjus pusės–vienerių metų laikotarpiui. Pažymėtina, kad iš 136 moterų, kurios tyrimo pradžioje nebuvo infekuotos ŽPV, per šį laikotarpį ŽPV užsikrėtė tik 6 (4,4 proc.) ir 40 (29,4 proc.) moterų ŽPV infekcijos pakartotinio tyrimo metu nenustatyta. 90 (66,2 proc.) moterų dėl infekuotumo ŽPV pakartotinai netirtos, kadangi daugelis jų buvo gydytos arba neatvyko pasitikrinti.

Iš 117 moterų, kurioms tyrimo pradžioje nustatyta ŽPV infekcija, pakartotinio tyrimo metu ŽPV infekcija išliko 23 (19,7 proc.) ir net 90 (76,9 proc.) moterų ŽPV išnyko. Dauguma šių moterų buvo gydytos, matyt, dėl to joms ŽPV infekcija pakartotinio tyrimo metu nebuvo nustatyta (12 lent.).

12 lentelė. Infekuotumo ŽPV dinamika

Pradinis ŽPV testas	Pakartotinis ŽPV testas*	Infekuotumas ŽPV	
		n	%
Neigiamas	Neigiamas	40	29,4
	Teigiamas	6	4,4
	Netirta	90	66,2
Iš viso		136	100
Teigiamas	Neigiamas	90	76,9
	Teigiamas	23	19,7
	Netirta	4	3,4
Iš viso		117	100

* ŽPV testas kartotas praėjus pusės–vienerių metų laikotarpiui.

Analizė pagal citologinę diagnozę. Tiriant pakartotinai atvykusias moteris, iš 110, kurioms buvo ASCUS pokyčių, citologinė diagnozė pasikeitė net 50 moterų: citologiniai pokyčiai išnyko 41,8 proc. (n=46) atvejų ir 2 (1,8 proc.) moterims pakartotinio tyrimo metu nustatyta ASCUS, 1 – LSIL, 3 – ASC–H/HSIL. Iš pastarųjų 3 moterų 2 atsisakė atlikti biopsiją, todėl diagnozė nebuvo patikslinta histologiniu tyrimu, o 1 moteriai biopsija neatlikta, nes atliekant joms kolposkopiją patologijos nerasta. Pažymėtina, kad net 58 (52,7 proc.) moterys pakartotinai pasitikrinti neatvyko.

Iš 97 moterų, kurių pirminė citologinė diagnozė buvo ASC–H/HSIL, 79,4 proc. (n=77) atvejų diagnozė pasikeitė. Intraepiteliniai gimdos kaklelio gleivinės pokyčiai visai išnyko 77,3 proc. (n=75) atvejų, nes dauguma moterų buvo gydytos; 2 moterims diagnozuota ASCUS, matyt, dėl to, kad buvo pašalintas ne visas pažeistas audinys (pašalinto audinio kraštuose išliko patologinių pokyčių); 4 moterims išliko ASC-H/HSIL (viena iš jų po inkstų transplantacijos nuolat vartoja imunosupresantus, kita – infekuota ŽIV, dar dviem minėti pokyčiai išliko, matyt, dėl to, kad tiriant biopsijos medžiagą buvo nustatyta CIN I, o moterys nebuvo pasiūstos gydytis į stacionarą. 10 moterų (16,5 proc.) neatlikti citologiniai tyrimai, kadangi jos neatvyko pakartotinio vizito.

Iš 44 moterų, kurioms pirminė citologinė diagnozė buvo LSIL, 26 moterims (40,3 proc.) citologiniai pokyčiai išnyko, 3 moterims diagnozuota ASCUS. Pažymėtina, kad pastarosios pirminio vizito metu atsisakė biopsijos. Ir net 15 moterų, kurioms buvo nustatyta LSIL, pakartotinio vizito neatvyko (13 lent.).

13 lentelė. Intraepitelinį gimdos kaklelio pokyčių dinamika

Diagnozė		Pokytis, n
pradinė	pakartotinė*	
ASCUS (n=110)	norma	46
	ASCUS	2
	LSIL	1
	ASC-H/HSIL	3
	netirta	58
ASC-H/HSIL (n=97)	norma	75
	ASCUS	2
	ASC-H/HSIL	4
	netirta	16
AGC (n=2)	norma	1
	netirta	1
LSIL (n=44)	norma	26
	ASCUS	3
	netirta	15

*Pakartotinė – praėjus pusės–vienerių metų laikotarpiui.

Pastaba. ASCUS – atipinės nenustatytos svarbos plokščiojo epitelio ląstelės, ASC-H – atipinės plokščiojo epitelio ląstelės, kai negalima paneigti HSIL, LSIL – nedidelio laipsnio plokščiojo epitelio intraepiteliniai pokyčiai, HSIL – didelio laipsnio plokščiojo epitelio intraepiteliniai pokyčiai, AGC – atipinės liaukinio epitelio ląstelės.

Analizė pagal histologinę diagnozę. Tarp 159 atvykusiųjų pakartotinai pasitikrinti praėjus pusės–vienerių metų laikotarpiui 15 moterų, remiantis citologine diagnoze, atlikta biopsija ir histologinis tyrimas. 7 moterims konstatuotas ligos progresavimas:

- norma → CIN I (1 moteriai);
- norma → CIN II (1 moteriai);
- norma → CIN III/CIS (2 moterims);
- CIN I → CIN II (1 moteriai);
- CIN I → CIN III/CIS (2 moterims).

Logistinė analizė buvo panaudota siekiant nustatyti ŽPV infekcijos eigą.

Nustatyta, jog:

- tikimybė, kad ŽPV išnyks, jei pirmojo tiriamųjų vizito metu buvo nustatyta ŽPV infekcija, yra 4 kartus didesnė nei tikimybė, kad ŽPV išliks. Tikimybė, kad ŽPV išnyks, jei pirmojo vizito metu moteris buvo infekuota, yra 0,80, o tikimybė, kad ŽPV išliks – 0,20.
- tikimybė, nesant infekuotumo ŽPV, užsikrėsti šiuo virusu yra 6,67.

4.4.2. Intraepitelinė gimdos kaklelio pokyčių dinamika pagal E2 geno iškritą ir ŽPV mRNR

Įvertinta intraepitelinė gimdos kaklelio pokyčių dinamika pagal 16 tipo ŽPV E2 geno integracijos laipsnį. Pažymėtina, kad daugumai moterų, esant įvairaus laipsnio intraepitelinė gimdos kaklelio pokyčių ir integruotų formų virusų, pokyčiai išnyko (CIN II, CIN III/CIS buvo gydytos). Trim atvejais, kai biopsijos metu nebuvo nustatyta displazijos, tačiau konstatuota 16 tipo ŽPV II laipsnio integracija, pokyčiai progresavo.

7 moterims, kurioms buvo konstatuotas episominės formos ŽPV, intraepiteliniai gimdos kaklelio pokyčiai išnyko arba liga stabilizavosi. Pažymėtina, kad 1 moteriai esant CIN I histologinei diagnozei ir episominės formos virusui pokyčiai regresavo savaime (14 lent.).

14 lentelė. Intraepitelinų gimdos kaklelio pokyčių dinamika pagal 16 tipo ŽPV E2 geno integracijos laipsnį

Histologinė diagnozė	Integracijos pobūdis	Integracijos dažnis	Išėtis
Nenustatyta displazijos	episominės formos ŽPV	1	stabilizacija
	II laipsnio	11	8 stabilizacija
			1 progresija (CIN I)
			1 progresija (CIN II)
	III laipsnio	8	stabilizacija
CIN I	episominės formos ŽPV	1	regresija
	II laipsnio	6	5 regresija
			1 stabilizacija (CIN I)
	III laipsnio	3	2 regresija
1 stabilizacija (CIN I)			
CIN II	I laipsnio	4	regresija
	II laipsnio	12	regresija
	III laipsnio	6	regresija
CIN III/CIS	episominės formos ŽPV	5	4 regresija
			regresija/stabilizacija (CIN II)
	I laipsnio	5	regresija
	II laipsnio	14	regresija
III laipsnio	3	regresija	
Invazinis vėžys	II laipsnio	2	–
Bendras skaičius			83

Pastaba. CIN I – lengva displazija, CIN II – vidutinė displazija, CIN III/CIS – sunki displazija.

Moterims, kurioms pakartotinio vizito metu nustatyta ŽPV infekcija, tirtos dėl ŽPV mRNR. Tarp 20 tirtųjų 10 nustatyta 16 tipo ŽPV ir mRNR (95% PI:29,93÷70,07), kas rodo tebesitęsiančią aktyvią ŽPV infekciją (15 lentelė).

15 lentelė. Intraepitelinų gimdos kaklelio pokyčių įvertinimas pagal 16 tipo ŽPV integraciją ir mRNR žymenį

Eil. Nr.	Pradinis citologinis/histologinis tyrimas	16 tipo ŽPV integracijos pobūdis	Pakartotinis citologinis/histologinis tyrimas	Pokytis
1.	ASCUS/norma	II laipsnio	LSIL/CIN I	progresija/ stabilizacija
2.	LSIL/norma	III laipsnio	norma	regresija
3.	ASCUS/norma	episominės formos ŽPV	ASCUS/CIN II	progresija
4.	HSIL/CIN III/CIS	II laipsnio	norma	regresija
5.	ASCUS/CIN II	I laipsnio	HSIL/CIN II	stabilizacija
6.	HSIL/CIN III/CIS	episominės formos ŽPV	LSIL/CIN III/CIS	stabilizacija
7.	ASCUS/norma	II laipsnio	LSIL/CIN I	progresija
8.	ASCUS/norma	II laipsnio	HSIL/CIN III/CIS	progresija
9.	ASCUS/CIN III/CIS	II laipsnio	norma	regresija
10.	ASCUS/CIS II	I laipsnio	norma	regresija

Pastaba. ASCUS – atipinės nenustatytos svarbos plokščiojo epitelio ląstelės, LSIL – nedidelio laipsnio plokščiojo epitelio intraepiteliniai pokyčiai, HSIL – didelio laipsnio plokščiojo epitelio intraepiteliniai pokyčiai, CIN I – lengva displazija, CIN II – vidutinė displazija, CIN III/CIS – sunki displazija.

Įvertinus gautus rezultatus, matyti, kad 7 moterims konstatuota ligos stabilizacija ar regresija (pastarosios buvo gydytos); 3 – liga progresavo (pažymėtina, kad šios 3 moterys nebuvo gydytos vadovaujantis moterų, kurioms aptikta gimdos kaklelio patologių citologinių ir histologinių pokyčių, priežiūros algoritmais, o tik stebėtos). Galima daryti prielaidą, kad viruso aktyvumo įvertinimas pagal 16 tipo ŽPV integracijos laipsnį ir mRNR žymenį rodo tendenciją intraepiteliniams gimdos kaklelio pokyčiams progresuoti, kai biopsijos metu nepatvirtinama displazija. Taigi,

16 tipo ŽPV integracijos laipsnio ir mRNR įvertinimas gali būti papildomi žymenys siekiant atrinkti moteris, kurias, atliekant stebėseną, reikia dažniau tikrinti ir laiku pradėti gydyti.

5. REZULTATŲ APTARIMAS

Prielaida, kad ŽPV infekcija vaidina svarbų vaidmenį formuojantis gimdos kaklelio vėžiui, buvo padaryta apie 1970 metus. Tai davė impulsą detaliau nagrinėti ŽPV sukkelto gimdos kaklelio vėžio atsiradimo mechanizmą. Kaip jau buvo minėta, 2008 metais Nobelio premija už medicinos srities pasiekimus įteikta Haroldui zur Hausenui, kuris 1983 metais išskyrė ŽPV iš gimdos kaklelio vėžio biopsijos mėginių ir nustatė priežastinius ryšius tarp ŽPV ir gimdos kaklelio vėžio.

Lietuvoje ŽPV paplitimo tyrimai, aiškinantis jo vaidmenį gimdos kaklelio kancerogenezėje, pradėti apie 1999 metus. M. Kliučinskas ir bendraautoriai nagrinėjo veiksnius, darančius įtaką ŽPV paplisti bei išlikti ir ŽPV sąsają, esant infekcijai, su intraepiteliniais gimdos kaklelio pokyčiais [9, 10]. Į tyrimą buvo įtrauktos sveikos moterys, atėjusios profilaktiškai pasitikrinti pas ginekologą. Šių tyrimų metu konkretūs viruso tipai nebuvo identifikuojami, tirtas tik infekuotumas didelės vėžio rizikos tipų ŽPV, naudotas *HC2* metodas. Konstatuota, kad tirtų moterų infekuotumas minėtos grupės virusais siekė 25,1 proc., miesto moterys dažniau infekuotos ŽPV, palyginti su kaimo (27,0 vs 11,1 proc., $p < 0,05$). 2010 metais Kauno medicinos universiteto klinikose (dabar Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, Medicinos akademijos klinikos) atliktas tyrimas [89] siekiant įvertinti infekuotumą ŽPV esant įvairaus laipsnio intraepitelinių gimdos kaklelio pokyčių. Tyrimo rezultatai parodė, kad infekuotumas ŽPV esant ASCUS/ASC-H/AGUS buvo 32,3–36,4 proc., LSIL – 44,8–55,1 proc. ir HSIL – 62,2–87,8 proc. Vilniaus universiteto Onkologijos institute tyrinėta ŽPV, jo tipų bei jų variantų reikšmė gimdos kaklelio vėžio rizikai [11, 90]. Nustatytas didelis ŽPV infekcijos paplitimas tarp Lietuvos moterų, sergančių gimdos kaklelio vėžiu – ŽPV infekcija tarp jų identifikuota 92,0 proc. atvejų, o tarp sveikų moterų – 23,6 proc. atvejų ($p < 0,0001$). Šio tyrimo metu jau buvo identifikuojami atskiri virusų tipai – dažniausiai nustatyta 16 tipo ŽPV. Lietuvoje atliktų tyrimų metu nustatytas ženkliai didesnis ŽPV paplitimas, palyginti su ŽPV paplitimo pasaulyje ar Europoje vidurkiu [91]. Tad ir sergamumo gimdos kaklelio vėžiu bei mirtingumo nuo

jo rodikliai yra didesni, palyginti su Europos rodiklių vidurkiu. Lietuvoje taip pat nagrinėtas ŽPV paplitimas ligoniams, sergantiems gerklų papilomatoze [92].

Siekiant sumažinti sergamumą šios lokalizacijos vėžiu bei mirtingumą nuo jo, būtina plėtoti ir tobulinti atrankinės patikros dėl gimdos kaklelio patologijos programas. Žinoma, kad šios programos neveiksmingos arba mažai veiksmingos gimdos kaklelio adenokarcinomų atvejais. Pažymėtina, kad nauja pirminės profilaktikos priemonė – ŽPV vakcina, apsauganti daugiausia nuo 16 ir 18 tipų ŽPV, diegiama į praktiką kaip šios histologinės formos vėžio prevencijos priemonė. Mergaičių ir jaunų moterų vakcinacija jau atliekama kai kuriose šalyse, nors vis dar vyksta aktyvios diskusijos, kurios amžiaus grupės mergaites ar moteris vakcinuoti, ar reikia vakcinuoti berniukus. Tyrimais įrodyta, kad vakcina veiksmingiausia, kai skiepijama iki užsikrėtimo vakcinosis sudėtyje esančių tipų ŽPV, todėl prioritetiniu laikomas mergaičių ir jaunų moterų skiepijimas [84]. Taigi dar didesnę svarbą įgyja ŽPV tyrimai vykdant patikros programas ir esant intraepitelinėms gimdos kaklelio pokyčiams.

5.1. ŽPV ir jo tipų paplitimas esant įvairaus laipsnio intraepitelinėms gimdos kaklelio pokyčiams

Tiriant infekuotumą ŽPV, esant intraepitelinėms gimdos kaklelio pokyčiams, nustatyta, kad infekuotumas ŽPV priklauso nuo pokyčių laipsnio. Įvairių autorių duomenimis, šis virusas nustatomas apie 50 proc. esant ASCUS, per 80 proc. esant HSIL, ypač jei HSIL patvirtinta atlikus histologinį tyrimą ir nustatyta CIN II ar CIN III/CIS [85]. Yra duomenų, kad moterų, kurioms nustatyta įvairaus laipsnio intraepitelinėms gimdos kaklelio pokyčiams, kaip ir moterų, kurioms citologiniu tyrimu pokyčių nenustatyta, infekuotumas mažėja 35 metų amžiaus grupėje, o jo antrasis pakilimas konstatuojamas apie 50 metus [7, 93, 94]. Mūsų atlikto tyrimo duomenimis, esant intraepitelinėms gimdos kaklelio pokyčiams nuo ASCUS iki HSIL ŽPV buvo infekuota 46,3 proc. moterų. Didžiausias infekuotumas ŽPV nustatytas tarp jaunų iki 25 metų moterų (69,7 proc.). Išanalizavus mūsų gautus rezultatus pagal histologinę diagnozę, nustatytas didesnis moterų infekuotumas ŽPV esant CIN II (88,6 proc.) negu esant CIN I (58,1 proc.) ar CIN III/CIS/CIS (64,7 proc.) ($p < 0,0001$). Tačiau žinoma, kad ŽPV infekcija gali iš organizmo pašalinti ir

savaime, o kai kurių autorių duomenimis, pokyčiai ląstelėse gali išlikti net iki 6 mėnesių, nors virusas jau gali būti pašalinęs iš organizmo [85, 95]. Tai, matyt, galėjo turėti įtakos ir mūsų rezultatams, nes esant CIN III/CIS infekuotumas ŽPV buvo mažesnis nei esant CIN II. Pažymėtina, kad literatūroje infekuotumas ŽPV, esant CIN II ir CIN III/CIS, pateikiamas kartu ir lyginama su ŽPV infekuotumu esant CIN I. Šiame darbe CIN II ir CIN III/CIS išskirta į dvi grupes.

Tiriant ŽPV tipų paplitimą pasaulyje buvo atlikta metaanalizė (įtraukta 6 978 moterys) ir nustatyta, kad HSIL atveju dažniausiai nustatytas 16 tipo ŽPV. Šio tipo ŽPV paplitimas svyruoja nuo 51,8 proc. (95% PI: 50,1–53,5) Europoje iki 33,3 proc. (95% PI: 20,4–48,4) Okeanijoje; bendrasis šio tipo paplitimas esant HSIL yra 45,4 proc. Kitų tipų paplitimo svyravimai nėra ženklūs, tai dažniausiai priklauso nuo geografinės zonos. Nors yra nedidelių ŽPV paplitimo svyravimų pagal geografinius regionus, dažniausiai identifikuojami 16, 18, 33, 45, 31, 58, 52 ir 35 tipų ŽPV [96, 97]. Mūsų tyrimo duomenimis, dauguma tiriamųjų moterų buvo infekuotos 16 tipo ŽPV (68,4 proc.).

Taigi mūsų gauti infekuotumo ŽPV ir atskirų jų tipų paplitimo rezultatai, viena vertus, patvirtina kitų autorių duomenis, antra vertus, mūsų nustatytas infekuotumas ŽPV didesnis, palyginti su Europos ar pasaulio vidurkiu [3, 98].

5.2. 16 tipo ŽPV integracija į gimdos kaklelio epitelio ląstelių genomą

Kalbant apie ŽPV vaidmenį gimdos kaklelio kancerogenezėje, turima omeny ne tik ŽPV infekcija, onkogeninių tipų ŽPV, čia svarbią rolę vaidina ir virusų kiekis ląstelėje bei ilgalaikė viruso persistencija, infekuotumas daugelio tipų ŽPV, moters imuninės bei antioksidacinės sistemų būklė [99, 100]. Analizuojant ŽPV, kaip pagrindinio gimdos kaklelio vėžio išsivystymo rizikos veiksnio, svarbą, vis didesnis dėmesys kreipiamas į molekulinis žymenis, tokius kaip viruso aktyvumo žymenys (ŽPV mRNR), genų (pvz., *p16*) raiškos, DNR metilinimo pokyčiai, ŽPV E2 geno iškrita. ŽPV E2 geno iškrita reiškia viruso DNR dalies integraciją į šeimininko ląstelės genomą bei, kaip manoma, sąlygoja greitesnę intraepitelinių gimdos kaklelio pokyčių progresijos nuo mažo laipsnio iki didelio laipsnio intraepitelinių gimdos kaklelio pokyčių bei invazinio gimdos kaklelio vėžio išsivystymo tikimybę [56, 72, 101].

Manoma, kad ŽPV DNR integracijos metu viruso genomas dažniausiai nutrūksta E1/E2 regione. E2 geno, koduojančio baltymus, kurie slopina E6 ir E7 regiono transkripciją, iškrita sąlygoja nekontroliuojamai padidėjusią E6 ir E7 onkogeninių baltymų raišką, dėl to ląstelės transformuojasi, greičiau dauginasi ir duoda pradžią navikui formuotis. ŽPV integracija į šeimininko genomą susijusi su intraepitelinių gimdos kaklelio pokyčių progresija nuo polikloninės iki monokloninės intraepitelinės gimdos kaklelio neoplazijos būklės (CIN) [102]. Veikiant integruotiems ŽPV onkogenams susidaro sąlygos navikinėms ląstelėms daugintis [103]. Integracijos mechanizmas iki šiol nėra aiškus. ŽPV, kitaip nei retrovirusai, nesintetina integrazės, todėl integracija nėra normali ŽPV gyvavimo ciklo dalis. Tačiau žinoma, kad integracijos pradžia būtina viruso ir šeimininko dvigubos DNR grandinės lūžimas. Žinoma, kad integracijos dažnis didėja didėjant DNR dvigubos grandinės lūžių skaičiui, didėjant didelės rizikos ŽPV E6 ir E7 onkogenų gamybai ar ASR būdingų lūžtančių vietų gamybai [54].

Apie ŽPV integracijos ryšį su intraepitelinių gimdos kaklelio pokyčių laipsniu literatūroje skirtingi autoriai nurodo skirtingus duomenis. Vienu literatūros autorių duomenimis, ŽPV integracija – ankstyvasis kancerogenezės įvykis [5, 76, 79, 81, 104], kitų autorių duomenimis, ji dažniau nustatoma esant jau didelio laipsnio intraepiteliniams pokyčiams [37, 67, 77, 81, 101, 102, 105]. Tačiau neabejojama dėl ŽPV integracijos reikšmės gimdos kaklelio pokyčiams progresuoti [37, 67, 77, 81]. Visiška viruso integracija nustatoma apie 90 proc. gimdos kaklelio vėžio atvejų. Dažniausia su onkogeninių tipų ŽPV integracija [106]. ŽPV viruso integracija nustatoma gimdos kaklelio vėžio atveju siekia 100 proc. esant infekuotumui 18 tipo ŽPV ir 80 proc. esant infekuotumui 16 tipo ŽPV. Tačiau yra mažiau žinoma apie tai, kaip integracijos dažnis susijęs su intraepitelinių gimdos kaklelio pokyčių laipsniu [59].

Didelės rizikos tipų ŽPV integruojantis į šeimininko ląstelės genomą, suardomas viruso E2 reguliacinis baltymas, dėl to prarandama viruso onkogenų gamybos neigiama grįžtamoji kontrolė. Manoma, kad E2 geno iškrita yra esminis įvykis intraepitelinės gimdos kaklelio neoplazijos patogenezėje ir potencialus ligos progresijos žymuo. Tačiau tiriant mėginius moterų, turėjusių tik vieną lytinį kontaktą gyvenime, dažnai rasta E2 geno iškrita, ir tai rodo, kad integracija įvyksta jau infekcijos pradžioje. Be to, E2 geno iškrita buvo dažnesnė moterims, infekuotoms 18

tipo ŽPV nei infekuotoms 16 tipo ŽPV. Šia ankstyva viruso integracija 18 tipo ŽPV infekuotoms moterims, pasireiškiančia sumažėjusiu virusų kiekiu esant E2 geno iškritai, galima paaiškinti, kodėl moterims, infekuotoms minėto tipo virusu, kuris, kaip žinia, dažnai sukelia gimdos kaklelio adenokarcinomą, dažnai būna tokie nedideli citologiniai pokyčiai (*Pap* tepinėliuose) ir todėl dažnai neįvertinami juos slepiantys žymūs histologiniai gimdos kaklelio gleivinės pakitimai [51].

Kinijoje atliktas tyrimas, siekiant nustatyti ŽPV infekcijos ir ŽPV genotipų paplitimą bei 16 tipo ŽPV integracijos dažnį esant intraepitelinių gimdos kaklelio pokyčių vėžio atveju. Tarp 16 tipo ŽPV infekuotų moterų integracija nustatyta 40 proc. atvejų esant LSIL, 88,9 proc. atvejų esant HSIL pakitimams, 86,4 proc. atvejų esant invaziniam vėžiui. Nustatyta tiesioginė sąsaja tarp 16 tipo ŽPV integracijos ir intraepitelinių gimdos kaklelio pokyčių laipsnio. Didelės rizikos tipų ŽPV infekcija ir viruso integracija yra dažnesnė esant didesnio laipsnio intraepitelinių gimdos kaklelio pokyčių. Todėl 16 tipo ŽPV integracija gali būti svarbiu žymeniu siekiant nustatyti intraepitelinių gimdos kaklelio pokyčių potencialią progresiją ir vystymąsi į gimdos kaklelio invazinį vėžį [107].

Nepaisant to, kad, daugelio autorių duomenimis, ŽPV genomo integracija į šeimininko ląstelės genomą sukelia navikinę gimdos kaklelio audinio transformaciją, kartais gimdos kaklelio vėžio atvejais 16 tipo ŽPV integracijos nenustatoma. Tai verčia manyti, kad šio viruso integracija nebūtinai sukelia intraepitelinių gimdos kaklelio pokyčių progresiją. Pažymėtina, kad esant infekuotumui 18 tipo ŽPV, šio viruso integracija konstatuota beveik visais tirtais gimdos kaklelio vėžio atvejais [51, 107]. 18 tipo ŽPV būdingas didesnis transformuojamasis aktyvumas *in vitro*, dėl to, matyt, esant 18 tipo ŽPV infekuotumui būdinga agresyvesnė ligos eiga. 16 bei 18 tipų ŽPV integracija tyrinėjama, tačiau duomenų apie kitų ŽPV tipų integracijos dažnį beveik nėra. Palygintas penkių dažniausiai nustatomų tipų – 16, 18, 31, 33 ir 45 ŽPV integracijos dažnis tiriant gimdos kaklelio mėginius (n=835) ir naudojant specifinį mRNR parentą PGR metodu (ŽPV onkogenų transkriptų amplifikacija). Dažniausiai, esant intraepitelinių gimdos kaklelio pokyčių, buvo nustatytos tik episominių formų virusai, o 62 proc. vėžio atvejų – integruoti viruso genomai. Atliktų tyrimų duomenimis, 16, 18 ir 45 tipų ŽPV buvo ženkliai dažniau integruotos formos nei 31 ir 33 tipų ŽPV. Pažymėtina, kad žymūs intraepiteliniai gimdos kaklelio pokyčiai ir jų progresija iki invazinio vėžio, esant infekuotumui 16, 18 ir 45 tipų ŽPV, įvyko per

ženkliai trumpesnę laiką nei eant infekuotumui 31 ir 33 tipų ŽPV. Šie duomenys leidžia manyti, jog onkogeninių ŽPV tipų integracija yra chromosomų nestabilumo dėl didelės rizikos ŽPV onkogenų E6, E7 sutrikusios raiškos reguliacijos rezultatas, o ne priežastis. Atskirų tipų ŽPV akivaizdžiai sukelia įvairios apimties chromosomų nestabilumą šeimininko ląstelių genomuose ir tai atsispindi jų integracijos dažnumu esant intraepitelinių gimdos kaklelio pokyčių bei lemia laiką, reikalingą CIN III/CIS progresijai, kurios rezultatu tampa gimdos kaklelio vėžys [82]. Kai kuriais CIN III/CIS atvejais, kai nustatytas infekuotumas 16 tipo ŽPV, integracija nenustatoma. Tai leidžia manyti, kad integracija, esant šio tipo virusui ne visada sąlygoja mažo laipsnio intraepitelinių pokyčių progresiją. Esant infekuotumui 18 tipo ŽPV, integracija nustatoma visais atvejais, todėl ir infekuotumas šio tipo ŽPV bei šio tipo viruso integracija į gimdos kaklelio ląstelių genomą turi lemiamą reikšmę intraepitelinių gimdos kaklelio pokyčių progresijai [108].

Mūsų tyrimo metu dėl integracijos (16 tipo ŽPV E2 geno iškritos) buvo tirtos 83 moterys. Tiriant 16 tipo ŽPV E2 geno atskirus fragmentus dažniausiai buvo nustatyta II laipsnio integracijos forma: II laipsnio E2 integracija nustatyta 54,2 proc. 16 tipo ŽPV infekuotų moterų (45 atvejai iš 83). III laipsnio E2 integracija nustatyta 26,5 proc. atvejų (22 moterys iš 83), I laipsnio – 10,8 proc. (9 moterys iš 83), episominės formos 16 tipo ŽPV – 8,5 proc. (7 moterys iš 83). Pažymėtina, kad viruso integracija nustatyta ir tyrime dalyvavusioms moterims, kurioms nediagnozuota intraepitelinių gimdos kaklelio pokyčių: III laipsnio integracija – 40,0 proc. atvejų, o II laipsnio integracijos forma – 55,0 proc. atvejų ir tik 5,0 proc. atvejų viruso integracijos nebuvo konstatuota. Tai atitinka literatūros duomenis, kadangi daugelis autorių nesutaria, kada įvyksta viruso integracija. Mūsų tyrimo duomenimis, ji įvyksta, matyt, dar labai anksti, net tada, kai dar nėra jokių intraepitelinių gimdos kaklelio pokyčių.

Yra duomenų, kad ŽPV DNR integracija lemia ne tik greitesnę intraepitelinių pokyčių progresiją, bet ir greitesnę pakartotinių intraepitelinių gimdos kaklelio pokyčių išsivystymą po taikyto gydymo [82]. Mūsų gauti duomenys neparodė tokios tendencijos, nes daugelis moterų, kurioms nustatyta didelio laipsnio intraepitelinių gimdos kaklelio pokyčių bei ŽPV DNR integracija, buvo gydytos, o po gydymo, matyti, stebėtos trumpą laiką.

Viruso būklė (integuotas ar ne) yra susijusi ir su moterų amžiumi. S. Kulmalos ir bendraautorių duomenimis, integruotų formų 16 tipo ŽPV kartu su episominių formų ŽPV konstatuota jaunoms moterims esant LSIL; išskirtinai tik integruotos formos ŽPV nustatyta esant HSIL ir tik vyresnėms moterims [79].

Vienų autorių duomenimis [51, 76, 81], ŽPV integracija į ląstelių genomą sąlygoja selektyvų ląstelių augimą ir HSIL atvejais daugiausia nustatomi integruotos formos virusai. Kitų autorių atliktų tyrimų duomenimis [51, 76], episominės formos 16 tipo ŽPV buvo nustatytos išskirtinai tik normaliuose *Pap* tepinėliuose arba *Pap* tepinėliuose, kuriuose buvo LSIL pokyčių ir nebuvo nustatyta esant HSIL pokyčių ar vėžio. Vis dėlto S. Kulmalos ir bendraautorių [79] atliktų tyrimų rezultatai parodė, kad esant normaliam *Pap* ar LSIL, nustatyta daugiausia mišrios ir nedidelėje dalyje mėginių tik integruotos formos ŽPV. Panaši ir mūsų tyrimo metu nustatyta tendencija esant LSIL: I ir II laipsnio integruotų formų virusai nustatyti 8 iš 12 moterų, likusioms 4 nustatytos III laipsnio viruso integracija, o episominių formų ŽPV visai nebuvo konstatuota. Šie rezultatai skiriasi nuo rezultatų tų autorių, kurie parodė išskirtinai episominių formų 16 tipo ŽPV buvimą esant normaliam *Pap* ar LSIL. Gallo ir kt. [109] bei Kulmala S. ir kt. [79] nustatė ankstyvąją 16 tipo ŽPV DNR integraciją atitinkamai 54 proc. ir 46 proc. atvejų. Mūsų tyrimo duomenimis, net nesant jokių histologinių pokyčių, III laipsnio viruso integracija nustatyta 8 iš 20 moterų (40 proc.), o esant CIN I pokyčių – 3 iš 10 (30 proc.). Tai leidžia manyti, kad integracijos procesas prasideda jau labai anksti. Cheung JLK. ir kt. [110], Gallo G. ir kt. [109], kaip ir Kulmala, nustatė 16 tipo ŽPV mišrias ir episomines formas esant gimdos kaklelio CIN I pokyčiams, o esant HSIL ar CIN III/CIS pokyčiams ar invaziniam gimdos kaklelio vėžiui, išskirtinai episominių formų virusų nebuvo nustatyta. Mūsų tyrimo duomenimis, episominės formos ŽPV, esant HSIL, nustatyta 6 (14 proc.) iš 43 moterų, esant CIN III/CIS – 5 (19,2 proc.) iš 27 moterų. S. Kulmalos ir bendraautorių duomenimis, esant HSIL/CIN III/CIS ar gimdos kaklelio vėžiui, nustatyta mažiau integruotų formų ir daugiau mišrių formų, palyginti su kitų autorių duomenimis [51, 76]. Tokie ir mūsų tyrimo duomenys: esant HSIL ar CIN III/CIS II laipsnio integracijos viruso formų nustatyta daugiausia – 24 (55,8 proc.) iš 43 ir 14 (50,1 proc.) iš 27. 16 tipo episominių formų ŽPV nebuvimas, esant didelio laipsnio gimdos kaklelio pokyčių, gali būti dėl selektyvinio ląstelių augimo,

t.y. išskirtinai ŽPV episominės formos, esant CIN III/CIS pažeidimų, išnyksta progresuojant intraepiteliniams pokyčiams [79].

Tačiau tai, kad vienoms moterims, infekuotoms ŽPV, kurių *Pap* tepinėlyje jau yra citologinių pokyčių, tačiau histologiškai jie nepatvirtinti, viruso integracija jau nustatyta, o kitoms, infekuotoms ŽPV, bet neturinčioms histologiškai patvirtintų gimdos kaklelio pakitimų, integracijos nenustatyta, leidžia manyti, kad toms, kurioms viruso integracija nustatyta dar esant mažo laipsnio intraepitelinių gimdos kaklelio pokyčių, šių pokyčių progresija virstant didelio laipsnio pokyčiais vyksta, matyt, greičiau nei toms, kurioms ji nenustatyta. Integracijos žymens (E2 geno iškritos) nustatymas leistų išskirti moteris į atskirą rizikos grupę, kurioje pakitimai progresuos greičiau.

5.3. Intraepitelinių gimdos kaklelio pokyčių progresija ir ŽPV testo pritaikymo galimybės

Kai kurie autoriai teigia, kad esant HSIL, kas dažniausiai išsivysto į vėžį, jei pacientės nėra gydomos, ŽPV gali siekti net 85,0 proc. atvejų [96]. Todėl svarbu įvertinti CIN progresijos riziką ir pritaikyti atitinkamus gydymo algoritmus*. CIN progresijos, įrodytos histologiškai atliekant biopsiją, dažnis pateiktas 16 lentelėje.

16 lentelė. Displazijos baigtys [95]

Displazijos laipsnis	Regresijos dažnis, %	Persistavimo dažnis, %	Progresavimo dažnis, %
CIN I	57	32	11
CIN II	43	35	22
CIN III/CIS	32	56	12

Pastaba. *CIN I* – lengva displazija, *CIN II* – vidutinė displazija, *CIN III/CIS* – sunki displazija.

* Šie algoritmai priklauso nuo esančios gimdos kaklelio intraepitelinės patologijos bei moterų individualių rizikos veiksnių. Įvairaus spektro intraepitelinių gimdos kaklelio pokyčių gydymas yra skirtingas ir gydymo algoritmai pateikti Amerikos kolposkopijos ir gimdos kaklelio patologijos draugijos rekomendacijose [111].

CIN I susijęs su mažos bei didelės (pastarosios dažniau) onkogeninės rizikos ŽPV infekcija. CIN II/CIN III/CIS išskirtinai susiję su didelės onkogeninės rizikos ŽPV. Esant šiems pažeidimams yra neužbaigtas viruso replikacijos ciklas. Vėlyvųjų genų gamybos arba nėra, arba ji ženkliai sumažėjusi, viruso DNR sekos gal būti integruotos į šeimininko ląstelės genomą bei yra sutrikusi E6 ir E7 onkogenų raiška – vyksta gausi onkogenų gamyba visame epitelyje. Esant CIN III/CIS pokyčiams visas gimdos kaklelio epitelio plotas yra užpildytas plonu sluoksniu proliferuojančių ląstelių, kurių citoplazmos subrendimas yra minimalus, branduoliams būdingos anomalijos, tokios kaip pleomorfizmas, hiperchromija, taip pat gausu atipinių mitozijų. Ši citologinė bei histologinė atipija atspindi chromosomų aneuploidiją (nenormalų chromosomų skaičių) bei genetinį nestabilumą, kuris kliniškai pasireiškia kaip CIN III/CIS, adenokarcinoma ar plokščialąstelinis gimdos kaklelio vėžys. Šis ląstelės geno chaosas yra priežastis, dėl ko nežymūs intraepiteliniai gimdos kaklelio pokyčiai tampa didelio laipsnio. Genetiškai nestabilūs pažeidimai progresuoja į didelio laipsnio, kadangi šeimininko genome atsiranda vis daugiau mutacijų, dėl to galiausiai išsivysto invazinis plokščialąstelinis gimdos kaklelio vėžys [51]. Atliekant mūsų tyrimą visos moterys, kurioms nustatyti CIN I pokyčiai, buvo stebimos toliau ir gydymas netaikytas, kadangi CIN I pokyčiai dažnai išnyksta savaime, o moterys, turinčios didelio laipsnio intraepitelinių gimdos kaklelio pokyčių – CIN II, CIN III/CIS, kurie, remiantis literatūra, dažnai progresuoja, buvo nedelsiant gydytos.

ŽPV DNR analizė kartu su citologiniu tyrimu naudojama optimizuoti interaepitelinių gimdos kaklelio pokyčių progresijos prognozę. Tiksliai nustatyti ŽPV tipą yra esminis dalykas skirstant pacientus į mažos ir didelės rizikos grupes. Daugelio tipų ŽPV buvimas organizme gali turėti įtakos padidėjusiai ligos progresijos rizikai. Kadangi tarp mūsų tyrime dalyvavusių moterų, infekuotų daugelio tipų ŽPV, buvo nedaug, o jų intraepitelinių gimdos kaklelio pokyčių laipsnis buvo labai įvairus, todėl daugelio tipų ŽPV įtakos intraepitelinių gimdos kaklelio pokyčių progresijai įvertinti negalėjome. ŽPV DNR testo jautrumas yra didesnis, palyginti su citologinio tyrimo jautrumu (ŽPV DNR testo jautrumas – 66–100 proc., citologinio tyrimo – 44–78 proc.), tačiau ŽPV DNR testo specifiškumas – mažesnis (61–96 proc.), palyginti su citologinio tyrimo specifiškumu (91–96 proc.) [99]. Pažymėtina, kad didelis ŽPV tyrimo jautrumas padidina skaičių moterų, kurioms yra mažo laipsnio citologinių

pokyčių, taigi jautresnis ar kiekybinis tyrimas gali būti efektyvesnis identifikuojant moteris, kurioms yra CIN progresijos rizika, pagerindamas tiek teigiamas, tiek neigiamas prognozes vertes [67]. Svarbu nustatyti didelės rizikos tipų ŽPV, kurie susiję su ženkliai padidėjusia gimdos kaklelio vėžio rizika. Jautresni tyrimai reikalingi įvertinti ŽPV genotipų spektrą. Tokių tyrimų tikslas – sužinoti maksimalią informaciją apie ŽPV paplitimą populiacijoje ir detalai stebėti infekcijos šaltinį. Pavyzdžiui, atliekant vakcinacijos tyrimus, tai padėtų nustatyti vakcinacijos veiksmingumą ir galimą kryžminį reaktyvumą su kitų tipų ŽPV [67].

Laboratorinis tyrimas dėl ŽPV infekcijos rekomenduojamas:

- esant neaiškiems *Pap* tyrimo rezultatams, kai nustatoma ASCUS ar įtariama LSIL;
- stebint moteris, kurių *Pap* testas teigiamas (t.y. ASCUS, LSIL, HSIL), tačiau joms atliktos kolposkopijos ir biopsijos medžiagos tyrimas patologijos nepatvirtino;
- stebint moteris ir prognozuojant rezultatus po CIN gydymo;
- vienas ar kartu su citologiniu tyrimu atlikti pirminei patikrai moterų, kurioms daugiau kaip 30 metų [99].

ŽPV tipų identifikavimas rekomenduojamas ir taikomas jau turint pirminės atrankos teigiamus rezultatus: atliekama identifikacija dažniausiai pasitaikančių didelės rizikos (16 ir 18) tipų ir kitų tipų ŽPV. Šie tyrimai svarbūs kuriant naujas polivalentes vakcinas, kurios apsaugotų ne tik nuo 16 ir 18, bet ir nuo kitų tipų ŽPV ateityje [99]. Taigi, kaip minėta, ŽPV tyrimas jautresnis nei citologinis testas ir kolposkopija. 2006 metais Amerikos kolposkopijos ir gimdos kaklelio patologijos draugija rekomendavo vykdant gimdos kaklelio vėžio patikrą naudoti ir ŽPV DNR testą. Derinant *Pap* testą, ŽPV DNR testą bei biologinius ŽPV žymenis galima būtų atrinkti moteris, kurioms dar nėra klinikinių požymių, tačiau kurios priklauso didelės rizikos susirgti gimdos kaklelio vėžiu grupei, parinkti racionalų intraepitelinių gimdos kaklelio pokyčių gydymo metodą, pagerinti gimdos kaklelio vėžio patikros bei profilaktikos veiksmingumą. Ieškoma naujų viruso aktyvumo ar integracijos žymenų, (pvz., mRNR, *E2* geno iškrita), padedančių identifikuoti moteris, kurioms yra intraepitelinių pokyčių progresavimo rizika.

ŽPV persistencijos nustatymas turi būti įtrauktas į diagnostikos algoritmus [67]. ŽPV infekcija laikoma persisituojančia, jei nuosekliai kartojant vieną paskui kitą

tyrimus, nustatomi identiškų tipų ŽPV. Šie metodai svarbūs paciento klinikinei stebėsenai, ypač po chirurginio gydymo. Mūsų atliktas pakartotinis moterų ištyrimas dėl ŽPV rodo, kad daugeliui moterų ŽPV pakartotinai nenustatytas, tik neaišku, ar virusas išnyko dėl taikyto gydymo. Kalbant apie nedidelę dalį moterų, kurioms ŽPV buvo konstatuotas pakartotinai, neaišku, ar virusas dar nepasišalino, ar jos užsikrėtė dar kartą.

Atradus jautrius ŽPV DNR nustatymo būdus, per paskutinius metus įvyko didelis perversmas ŽPV diagnostikoje. Tačiau reikalingi geri tarptautiniai kokybės kontrolės būdai norint palyginti įvairius diagnostinius metodus.

5.4. Citologinio ir histologinio tyrimo neatitikimų priežastys

Atsižvelgiant į tai, kad mūsų tyrimo metu išryškėjo neatitikimai tarp citologinės ir histologinės diagnozės, pateikiame galimas šių neatitikimų priežastis.

Vertinant citologinį *Pap* tyrimą, kaip ir daugumą kitų tyrimų, gali būti klaidingai teigiami ir klaidingai neigiami rezultatai. Konstatuoti atvejai, kai daliai moterų, kurioms diagnozuotas gimdos kaklelio vėžys, nebuvo nustatyta intraepitelinė gimdos kaklelio pokyčių tiriant *Pap* tepinėlių. Klaidingai neigiami *Pap* testo rezultatai, esant invaziniam vėžiui, svyruoja nuo 16 iki 82 proc. atvejų. Tai gali būti dėl netinkamo medžiagos paėmimo, transportavimo bei saugojimo ar laboratorijos interpretacijos klaidų (neatidžiai atlikta pakartotinė, esant normai, *Pap* tepinėlių peržiūra). Pakartotinai įvertinti klaidingai neigiamus citologinius rezultatus sudėtinga. Todėl intraepiteliniams gimdos kaklelio pokyčiams patvirtinti atliekamas histologinis biopsinės ar operacinės medžiagos ištyrimas vadovaujantis gimdos kaklelio patologijos diagnostikos ir stebėsenos algoritmais. Taigi citologinių klaidingai neigiamų rezultatų vertinimas nėra išsamus, nes moterims, kurioms atliekant *Pap* tyrimą nenustatyta pokyčių, nėra atliekama biopsija, kurios medžiagoje tiriant būtų patvirtinta citologiškai nedideliu nedideliu displazija. Įvairių autorių duomenimis, *Pap* tyrimo jautrumo vidurkis yra 49 proc. (30 – 80 proc.), specifškumo – 95 proc. (86 – 100 proc.). Nustatyta, kad esant mažo laipsnio bei didelio laipsnio plokščialąstelinėms intraepitelinėms pokyčiams koreliacijos *kappa* koeficientas dažniausiai nėra lygus 1, atskirų laboratorijų vertinimo interpretacijos skiriasi. Esant *kappa* koeficientui 0–0,2 sutarimas tarp skirtingų tyrėjų yra mažas (didelis interpretacijų

skirtumas), 0,2–0,4 – pakankamas, 0,4–0,6 – geras, 0,6–0,8 – labai geras, ir esant 0,8–1,0 – puikus. Pažymėtina, kad histologinis šių kategorijų patikimumas yra panašus: *kappa* koeficientas – 0,46 [112]. Vertinant citologinius tepinėlius dažniausiai tyrėjų nuomonės skiriasi esant ASCUS ir LSIL: pakartotinai tiriant tepinėlių pirminė LSIL išvada patvirtinama tik 43 proc. atvejų, o histologinio tyrimo metu nenustatoma displazijos net 33,3 proc. atvejų [113]. *Pap* tyrimo jautrumas esant HSIL ir jo koreliacija su CIN III/CIS svyruoja nuo 70 iki 80 proc., ASC-H atvejais histologinio tyrimo metu displazija (CIN II/CIN III/CIS) patvirtinama nuo 24 iki 94 proc. atvejų [114, 115].

Histologinio tyrimo neatitikimai dažniausiai pasitaiko esant CIN I: net 41 proc. CIN I atvejų patologų interpretuojama kaip “nėra displazijos”. Patologų nuomone, viena vertus, CIN I ir koilocitų buvimas susiję su ŽPV dauginimosi ciklu ląstelėje, o CIN III/CIS yra tikroji neoplazija, dažniausiai susijusi su viruso integracija į šeimininko DNR; CIN II diagnozė yra mažiau aiški. Kita vertus, tokie pakitimai kaip atrofija, nebrandi plokščialąstelinė metaplazija ar atipija dažnai susiję su uždegimu, dėl to gali būti klaidingai interpretuojami kaip CIN. Analizuojant įvairių patologijos laboratorijų rezultatus nustatyta, kad *kappa* koeficientas esant CIN II buvo 0,69 (95 proc. PI=0,64÷0,73), esant CIN III/CIS – 0,57 (95 proc. PI=0,51÷0,63). Taigi, patologų nuomone, nėra aiškiai apibrėžtos CIN II reikšmės gimdos kaklelio neoplazijos patogenezėje [115].

Esant ASCUS histologinė interpretacija dar sudėtingesnė. Histologinio tyrimo rezultatų interpretacija, patvirtinanti sunkią displaziją, būna tik apie 43 proc. atvejų; esant HSIL displazija patvirtinama vidutiniškai apie 47,1 proc., LSIL – 27,0 proc., ASCUS – 22,6 proc. [116]. Kitų autorių duomenimis, koreliacija tarp citologinio ir histologinio tyrimų nustatoma iki 82 proc. [117].

Citologinio ir histologinio tyrimo neatitikimams įtakos gali turėti netikslumai paimant, transportuojant bei saugant tiriamąją medžiagą. [112].

Atliekant biopsiją taip pat neįmanoma išvengti klaidų, kai biopsijos mėginio kraštuose yra displazinių pokyčių, nes ląstelės dažnai koaguliuoja ir patologui neįmanoma biopsinės medžiagos teisingai įvertinti; neteisingai gali būti parinkta ir biopsijos vieta.

Neatitikimus gali sąlygoti ir kolposkopijos tyrimas: šio tyrimo jautrumas 55–65 proc., specifiškumas 70–90 proc. Net 52 proc. atvejų kolposkopijos metu

nediagnozuojama patologijos – nepastebimi tikrieji pažeidimai, todėl biopsija paimama ne iš tos vietos [118].

Matyt, minėtos priežastys galėjo daryti įtaką ir mūsų tyrimo metu dideliame skaičiui histologiškai nepatvirtintos patologijos – 48,3 proc. atvejų (114 moterų iš 236): esant ASCUS, histologinio tyrimo metu nepatvirtinta displazijos 63,6 proc. atvejų, esant LSIL – 50,0 proc. ir esant HSIL – 22,7 proc.

6. IŠVADOS

1. Tarp tirtų moterų, kurioms nustatyta intraepitelinių gimdos kaklelio pokyčių, ŽPV infekuota 46,3 proc. (95% PI: 40,10÷52,39): 58,8 proc. atvejų – esant ASC-H/HSIL (atipinės plokščiojo epitelio ląstelės, kai negalima paneigti HSIL/didelio laipsnio plokščiojo epitelio intraepiteliniai pokyčiai), 34,5 proc. atvejų, esant ASCUS (atipinės nenustatytos svarbos plokščiojo epitelio ląstelės) ($p=0,00006$); pagal histologinę diagnozę infekuotumas ŽPV esant vidutinei bei sunkiai displazijai – atitinkamai 88,6 ir 64,7 proc. atvejų.

2. 71,1 proc. (95% PI: 62,13÷78,42) tirtų moterų buvo infekuotos 16 tipo ŽPV. Šio tipo ŽPV identifikuotas esant ASC-H/HSIL, 79,6 proc. atvejų, esant LSIL – 66,7 proc. ($p=0,0005$).

3. Tirtosioms moterims vyravo – 54,2 proc. – II laipsnio 16 tipo ŽPV E2 geno integracija į gimdos kaklelio epitelio ląsteles, III laipsnio integracija buvo 26,5 proc., I laipsnio – 10,8 proc. ir episominės formos ŽPV nustatyta 8,5 proc. atvejų ($p=0,0006$).

4. Nenustatyta statistiškai reikšmingo skirtumo tarp ŽPV E2 geno integracijos į gimdos kaklelio epitelio ląsteles pobūdžio ir intraepitelinių gimdos kaklelio pokyčių laipsnio tiek analizuojant gautus rezultatus pagal citologinę, tiek pagal histologinę diagnozes. Integruotų formų virusų buvimas net ir nesant intraepitelinių pokyčių ar esant nedidelio laipsnio pokyčiams rodo, kad 16 tipo ŽPV integracija yra ankstyvasis įvykis gimdos kaklelio kancerogenezeje.

5. ŽPV infekuotų moterų pakartotinio tyrimo metu 50 proc. (95% PI:29,93÷70,07) tirtųjų nustatyta mRNR raiška, kas rodo besitęsiančią aktyvią ŽPV infekciją.

7. PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS

1. Nustačius ŽPV integracijos žymenis (E2 geno iškrita bei mRNR), esant intraepitelinių gimdos kaklelio pokyčių, galima identifikuoti moteris, kurioms gimdos kaklelio vėžio rizika didesnė.

2. E2 geno iškritos nustatymas, kuris svarbus numatyti ligos progresavimo galimybę, yra techniškai lengviausias ir labiausiai prieinamas būdas viruso integracijos laipsniui įvertinti.

3. Atskirų tyrimo metodų derinimas ar sujungimas: skystoji terpė, kurią panaudojus atliekamas *Pap* tyrimas, vėliau gali būti panaudota ŽPV bei jo tipams nustatyti, o atliekant realaus laiko PGR reakcijas ir ŽPV onkogenų E6, E7, E2 iškritai bei mRNR identifikuoti. Taip galima sumažinti moterų papildomų vizitų skaičių bei išskirti į atskirą grupę moteris, kurių yra didesnė intraepitelinių gimdos kaklelio pokyčių progresijos ir vėžio išsivystymo rizika.

4. Remiantis vien citologinių ir histologinių tyrimų rezultatais ar identifikuojant ŽPV DNR, negalima atskirti, ar intraepiteliniai pokyčiai regresuos, persistuos ar progresuos, bei išsivystys gimdos kaklelio invazinis vėžys. Žymenys, rodantys viruso integraciją į ląstelės genomą, yra svarbūs diagnostiniu ir prognoziniu aspektu vertinant intraepitelinių gimdos kaklelio pokyčių progresiją bei parenkant atitinkamą moterų gydymo bei stebėjimo taktiką.

8. PADĖKOS

Prof. dr. GRAŽINAI DRAŠUTIENEI – padėjusiai vertingais patarimais, skatinusiai tęsti ir užbaigti pradėtus darbus, padėjusiai organizaciniais klausimais rengiant disertaciją.

Prof. dr. JANINAI DIDŽIAPETIENEI – atvedusiai mane į mokslo pasaulį, dalyvavusiai parenkant temą. Nuoširdžiai dėkoju už neįkainojamus patarimus rašant darbą, už begalinę dėmesį, kantrybę, aukotą savo laiką visais darbo rengimo etapais.

Dr. ŽIVILEI GUDLEVIČIENEI – labai daug padėjusiai atliekant darbą, už begalinę pagalbą, dėmesį ir kantrybę visais darbo rengimo bei straipsnių rašymo etapais, ypač už metodinę pagalbą, taip pat už nuoširdų moralinį palaikymą visais doktorantūros metais.

Gydytojoms ginekologėms: dr. Žanai Bumbulienei, Eglei Miluvienei, Ginai Opolskienei, Daivai Keršulytei, Vilmai Vasjanovai.

Santariškių II ginekologijos skyriaus kolektyvui – morališkai palaikiusiam ruošiantis ginti disertaciją.

Visai savo šeimai, netrukdžiusiai, o padėjusiai siekiant mokslo aukštumų.

Dėkojame Lietuvos valstybiniam mokslo ir studijų fondui, parėmusiam šį darbą (sutarties su fondu Nr. T-44/08).

9. LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. zur Hausen H. Papillomavirus infection – a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta*. 1996; 1288(2):F55-78.
2. Clifford GM, Gallus S, Herrero R, Muñoz N, Snijders PJ, Vaccarella S, et al. 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*. 2005; 366(9490):991-8.
3. Castellsague X, de Sanjose S, Aguado T, Louie KS, Bruni L, Munoz J, et al. HPV and cervical cancer in the World. 2007 Report. *Vaccine*. 2007; 25S:C1-26.
4. Howell-Jones R, Bailey A, Beddows A, Sargent A, de Silva N, Wilson G, et al. Multi-site study of HPV type-specific prevalence in women with cervical cancer, intraepithelial neoplasia and normal cytology, in England. *Br J Cancer*. 2010; 103(2):209–16.
5. de Sanjosé S, Diaz M, Castellsagué X, Clifford G, Bruni L, Muñoz N, et al. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2007; 7(7):453-9.
6. Bosch FX, de Sanjosé S. The epidemiology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Dis Markers*. 2007; 23(4):213-37.
7. Baseman JG, Koutsky LA. The epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virol*. 2005; 32 Suppl 1:S16-24.
8. Steben M, Duarte-Franco E. Human papillomavirus infection: epidemiology and pathophysiology. *Gynecol Oncol*. 2007; 107 (2 Suppl 1):S2-5.
9. Kliučinskas M, Nadišauskienė R, Padaiga Ž, Špukaitė T. Žmogaus papilomos viruso paplitimas tarp 18–35 metų Kauno moterų (Prevalence of human papillomavirus among 18-35 age Kaunas women). *Lietuvos akušerija ir ginekologija*. 1999; 2(1):19-22.
10. Kliucinskas M, Nadisauskiene RJ, Minkauskiene M. Prevalence and risk factors of HPV infection among high-risk rural and urban Lithuanian women. *Gynecol Obstet Invest*. 2006; 62(3):173-80.

11. Gudlevičienė Ž, Didžiapetrienė J, Sužiedėlis K, Lapkauskaitė L. Žmogaus papilomos viruso, jo tipų ir variantų tyrimai (Investigation of human papillomavirus, its types and variants). *Medicina*. 2005; 41(11):910-15.
12. Kurtinaitienė R. Gimdos kaklelio ryškių intraepitelinų pokyčių rizikos veiksniai ir diagnostikos metodai. Daktaro disertacija; 2010.
13. Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol*. 2005; 32(Suppl 1):S7-15.
14. Gross L. *Oncogenic viruses*. 3rd Ed. Oxford: Pergamon; 1983.
15. zur Hausen H, de Villiers EM, Gissmann L. Papillomavirus infections and human genital cancer. *Gynecol Oncol*. 1981; 12(2 Pt 2):S124-8.
16. Kaslow RA, Evans AS. *Epidemiological Concepts and Methods*. In: Evans AS, Kaslow RA, editors. *Viral infections of humans: epidemiology and control*. 4th Ed. New York and London: Plenum Medical Book Company; 1997. p. 3-58.
17. Arcos JC, Argus MF, Woo J. *Chemical Induction of Cancer: Modulation and Combination effects*. Boston: Birkhäuser; 1995. 748 p.
18. Hunt RC. *Oncogenic viruses*. *Microbiology and Immunology On-line* 2009. Available from: <http://pathmicro.med.sc.edu/lecture/retro.htm>.
19. Croce CM. *Oncogenes and Cancer*. *N Engl J Med*. 2008; 358(5):502-11.
20. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, et al. *Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009*. *Cell Death Differ*. 2009; 16(1):3–11.
21. Hong WK, Bast RC, Hait W, Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, et al. *Holland-Frei Cancer medicine*. 8th Ed. People's Medical Publishing House-USA; 2010. p. 960-961.
22. Kerksiek K. *A Virus in the Limelight – Papilloma and the Nobel Prize*. *Infection-research* 2009. Available from: http://www.infection-research.de/perspectives/detail/pressrelease/a_virus_in_the_limelight_papillomavirus_and_the_nobel_prize.
23. Schmitt M, Dondog B, Waterboer T, Pawlita M, Tommasino M, Gheit T. *Abundance of multiple high-risk human papillomavirus (HPV) infections found in cervical cells analyzed by use of an ultrasensitive HPV genotyping assay*. *J Clin Microbiol*. 2010; 48(1):143–9.

24. Lizano M, Berumen J, García-Carrancá A. HPV-related Carcinogenesis: basic concepts, viral types and variants. *Arch Med Res.* 2009; 40(6):428-34.
25. Bernard HU. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J Clin Virol.* 2005; 32(1):S1-6.
26. Gottschling M, Köhler A, Stockfleth E, Nindl I. Phylogenetic analysis of beta-papillomaviruses as inferred from nucleotide and amino acid sequence data. *Mol Phylogenet Evol.* 2007; 42(1):213-22.
27. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R., Castellsagué X, Shah KV, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med.* 2003; 348(6):518-27.
28. Schiffman M, Clifford G, Buonaguro FM. Classification of weakly carcinogenic human papillomavirus types: addressing the limits of epidemiology at the borderline. *Infect Agent Cancer.* 2009; 4:8.
29. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology.* 2004; 324(1):17-27.
30. Kahn JA. HPV vaccination for the prevention of cervical intraepithelial neoplasia. *N Engl J Med.* 2009; 361:271-8.
31. Stern PL, Kitchener HC. *Vaccines for the Prevention of Cervical Cancer.* Oxford University Press; 2009.
32. International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer. Cervical carcinoma and sexual behavior: collaborative reanalysis of individual data on 15,461 women with cervical carcinoma and 29,164 women without cervical carcinoma from 21 epidemiological studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009; 18(4):1060-9.
33. Louie KS, de Sanjose S, Diaz M, Castellsagué X, Herrero R, Meijer CJ, et al. Early age at first sexual intercourse and early pregnancy are risk factors for cervical cancer in developing countries. *Br J Cancer.* 2009; 100(7):1191–7.
34. Jabbour HN, Kelly RW, Fraser HM, Critchley HO. Endocrine regulation of menstruation. *Endocr Rev.* 2006; 27(1):17–46.
35. Hwang LY, Ma Y, Benningfield SM, Clayton L, Hanson EN, Jay J, et al. Factors that influence the rate of epithelial maturation in the cervix in healthy young women. *J Adolesc Health.* 2009; 44(2):103–10.

36. Barr E, Sings HL. Prophylactic HPV vaccines: new interventions for cancer control. *Vaccine*. 2008; 26(49):6244-57.
37. Stanley M. Pathology and epidemiology of HPV infection in females. *Gynecologic Oncology*. 2010; 117(2):S5-S10.
38. Harman EM, Recurrent Respiratory Papillomatosis. Emedicine from WebMD 2008. Available from: <http://emedicine.medscape.com/article/302648-overview>.
39. Monk BJ, Tewari KS. The spectrum and clinical sequelae of human papillomavirus infection. *Gynecol Oncol*. 2007; 107 (2 Suppl 1):S6-13.
40. Girianelli VR, Azevedo E Silva G, Thuler LC. Factors associated with the risk of progression to precursor lesions or cervical cancer in women with negative cytologic findings. *Int J Gynaecol Obstet*. 2009; 107(3):228-31.
41. Rohl A, PictureOfThe.net 2008. Available from: <http://www.pictureofthe.net/image/a/na/li/english/pt/s/pn/Annika%20Rohl/>.
42. Castellsagué X, Díaz M, de Sanjosé S, Muñoz N, Herrero R, Franceschi S, et al. Worldwide human papillomavirus etiology of cervical adenocarcinoma and its cofactors: implications for screening and prevention. *J Natl Cancer Inst*. 2006; 98(5):303-15.
43. Dahlström LA, Ylitalo N, Sundström K, Palmgren J, Ploner A, Eloranta S, et al. Prospective study of human papillomavirus and risk of cervical adenocarcinoma. *Int J Cancer*. 2010; 127(8):1923-30.
44. Baussano I, Ronco G, Segnan N, French K, Garnett GP. HPV-16 infection and cervical cancer: Modeling the influence of duration of infection and praecancerous lesions. *Epidemics*. 2010; 2(1):21-28.
45. Parkin DM. The global health burden of infection – associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer*. 2006; 118(12): 3030-44.
46. Bosch FX, Albero G, Castellsagué X. Male circumcision, human papillomavirus and cervical cancer: from evidence to intervention. *J Fam Plann Reprod Health Care*. 2009; 35(1):5-7.
47. Müller EE, Chirwa TF, Lewis DA. Human papillomavirus (HPV) infection in heterosexual South African men attending sexual health services: associations between HPV and HIV serostatus. *Sex Transm Infect*. 2010; 86(3): 175-80.

48. Palefsky JM. Human papillomavirus-related disease in men: not just a women's issue. *J Adolesc Health*. 2010; 46(4 Suppl):S12-9.
49. Park TW, Fujiwara H, Wright TC. Molecular biology of cervical cancer and its precursors. *Cancer*. 1995; 76(10 Suppl):1902-13.
50. Peevor R, Fiander AN. Human papillomavirus (including vaccination). *Obstetrics, Gynaecology and Reproductive Medicine*. 2010; 20(10):295-299.
51. Collins SI, Constandinou-Williams C, Wen K, Young LS, Roberts S, Murray PG, et al. Disruption of the E2 Gene is a common and early event in the natural history of cervical human papillomavirus infection: a longitudinal cohort study. *Cancer Res*. 2009; 69(9):3828-32.
52. King LE, Fisk JC, Dornan ES, Donaldson MM, Melendy T, Morgan IM. Human papillomavirus E1 and E2 mediated DNA replication is not arrested by DNA damage signaling. *Virology*. 2010; 406(1):95-102.
53. Doeberitz MK, Vinokurova S. Host factors in HPV-related carcinogenesis: cellular mechanisms controlling HPV infections. *Arch Med Res*. 2009; 40(6):435-42.
54. Yu T, Ferber MJ, Cheung TH, Chung TK, Wong YF, Smith DI. The role of viral integration in the development of cervical cancer. *Cancer Genet Cytogenet*. 2005; 158(1):27-34.
55. Villa LL. Biology of genital human papillomaviruses. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*. 2006; 94(Suppl 1):S3-S7.
56. Tinelli A, Vergara D, Giuseppe L, Malvasi A, Casciaro S, Leo E, et al. Human papillomavirus genital infection in modern gynecology: genetic and genomic aspects. *European Clinics in Obstetrics and Gynaecology*. 2007; 3(1):1-6.
57. Frazer IH. Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. *Nat Rev Immunol*. 2004; 4(1):46-54.
58. Deligeoroglou E, Christopoulos P, Aravantinos L, Papadias K. Human papilloma virus molecular profile and mechanisms of cancerogenesis: a review. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2009; 30(2):128-32.
59. Woodman CBJ, Collins SI, Young LS. The natural history of cervical HPV infection: *Nat Rev Cancer*. 2007; 7(1):11-22.

60. Liu X, Dakic A, Zhang Y, Dai Y, Chen R, Schlegel R. HPV E6 protein interacts physically and functionally with the cellular telomerase complex. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009; 160(44):18780-5.
61. Zindy F, Eischen CM, Randle DH, Kamijo T, Cleveland JL, Sherr CJ, et al. Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev*. 1998; 12(15):2424-33.
62. Bens G. Papillomavirus Infections and Cancerogenesis of Squamous Cell and Basal Cell Carcinomas. In: Reichrath J. *Molecular Mechanisms of Basal Cell and Squamous Cell Carcinomas*. Springer; 2006.
63. Steenbergen RD, de Wilde J, Wilting SM, Brink AA, Snijders PJ, Meijer CJ. HPV-mediated transformation of the anogenital tract. *J Clin Virol*. 2005; 32 (Suppl 1):S25–33.
64. Kliučinskas M, Nadišauskienė RJ. Žmogaus papilomos viruso paplitimas. Kn.: *Gimdos kaklelio vėžio profilaktikos aktualijos*. Vilnius: Mokslo tyros institutas; 2005. p. 36-37.
65. Johnson K. Periodic health examination, 1995 update:1. Screening for human papillomavirus infection in asymptomatic women. Canadian Task Force on the Periodic Health Examination. *CMAJ*. 1995; 152(4):483-93.
66. Cibas ES, Zou KH, CrumCP, Kuo F. Using the rate of positive high-risk HPV test results for ASC-US together with the ASC-US/SIL ratio in evaluating the performance of cytopathologists. *Am J Clin Pathol*. 2008; 129(1):97-101.
67. Molijn A, Kleter B, Quint W, van Doorn LJ. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *J Clin Virol*. 2005; 32(Suppl 1):S43-51.
68. Vernick JP, Steigman CK. The HPV DNA virus hybrid capture assay: what is it – and where do we go from here? *MLO Med Lab Obs*. 2003; 35(3):8-10, 13; quiz 14-5.
69. Kulmala SM, Syrjänen S, Shabalova I, Petrovichev N, Kozachenko V, Podistov J, et al. Human papillomavirus testing with hybrid capture 2 assay and PCR as screening tools. *J. Clin Microbiol*. 2004; 42(6):2470-5.
70. Jurgelevičius V, Steponavičiūtė D. Polimerazės grandininė reakcija: principai ir taikymo sritys. *Laboratorinė medicina* 1999; 3:28-34.
71. Scheurer ME, Dillon LM, Chen Z, Follen M, Adler-Storthz K. Absolute quantitative real-time polymerase chain reaction for the measurement of human

papillomavirus E7 mRNA in cervical cytobrush specimens. *Infect Agent Cancer*. 2007; 2:8.

72. Arias-Pulido H, Peyton CL, Joste NE, Vargas H, Wheeler CM. Human papillomavirus type 16 integration in cervical carcinoma in situ and in invasive cervical cancer. *J Clin Microbiol*. 2006; 44(5):1755-62.

73. Van Tine BA, Kappes JC, Banerjee NS, Knops J, Lai L, Steenbergen RD, et al. Clonal selection for transcriptionally active viral oncogenes during progression to cancer. *J Virol*. 2004; 78(20):11172-86.

74. Park TC, Kim CJ, Koh YM, Lee KH, Yoon JH, Kim JH, et al. Human papillomavirus genotyping by the DNA chip in the cervical neoplasia. *DNA Cell Biol*. 2004; 23(2):119-25.

75. Longworth MS, Laimins LA. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2004;68(2):362-72.

76. Huang LW, Chao SL, Lee BH. Integration of human papillomavirus type-16 and type-18 is a very early event in cervical carcinogenesis. *J Clin Pathol*. 2008; 61(5):627-31.

77. Klaes R, Woerner SM, Ridder R, Wentzensen N, Duerst M, Schneider A, et al. Detection of high-risk cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer by amplification of transcripts derived from integrated papillomavirus oncogenes. *Cancer Res*. 1999; 59(24):6132-6.

78. Hoory T, Monie A, Gravitt P, Wu TC. Molecular epidemiology of human papillomavirus. *J Formos Med Assoc*. 2008; 107(3):198-217.

79. Kulmala SM, Syrjänen SM, Gyllensten UB, Shabalova IP, Petrovichev N, Tosi P, et al. Early integration of high copy HPV16 detectable in women with normal and low grade cervical cytology and histology. *J Clin Pathol*. 2006; 59(5):513-7.

80. Gammoh N, Isaacson E, Tomaić V, Jackson DJ, Doorbar J, Banks L. Inhibition of HPV-16 E7 oncogenic activity by HPV-16 E2. *Oncogene*. 2009; 28(23):2299-304.

81. Cheung JL, Lo KW, Cheung TH, Tang JW, Chan PK. Viral load, E2 gene disruption status, and lineage of human papillomavirus type 16 infection in cervical neoplasia. *J Infect Dis*. 2006; 194(12):1706-12.

82. Barzon L, Giorgi C, Buonaguro FM., Palù G; Italian Society for Virology. Guidelines of the Italian Society for Virology on HPV testing and vaccination for cervical cancer prevention. *Infect Agent Cancer*. 2008; 3:14.
83. Ruutu MP, Kulmala SM, Peitsaro P, Syrjänen SM. The performance of the HPV16 real-time PCR integration assay. *Clin Biochem*. 2008; 41(6):423-6.
84. Wright TC, Van Damme P, Schmitt HJ, Meheus A. Chapter 14: HPV vaccine introduction in industrialized countries. *Vaccine*. 2006; 24(Suppl 3): S3/122-31.
85. Monsonego J, Bosch FX, Coursaget P, Cox JT, Franco E, Frazer I, et al. Cervical cancer control, priorities and new directions. *Int J Cancer* 2004; 108(3): 329-33.
86. Herdman MT, Pett MR, Roberts I, Alazawi WO, Teschendorff AE, Zhang XY, et al. Interferon – beta treatment of cervical keratinocytes naturally infected with human papillomavirus 16 episomes promotes rapid reduction in episome numbers and emergence of latent integrants. *Carcinogenesis*. 2006; 27(11):2341-53.
87. Walker P, Dexeus S, De Palo G, Barrasso R, Campion M, Girardi F, et al. International terminology of colposcopy: an updated report from the International Federation for Cervical Pathology and Colposcopy. *Obstet Gynecol*. 2003; 101(1):175-7.
88. Manual for multiplex-PCR System for the screening of human papilloma virus (HPV). Available from: URL.: http://www.seegene.co.kr/en/see/HPV4A_030.php.
89. Jarienė K, Minkauskienė M, Nadišauskienė R, Kliučinskas M, Vaitkienė D. Didelės rizikos žmogaus papilomos viruso įtakoti gimdos kaklelio citologiniai pokyčiai bei sąsajos su histooginiais bei kolposkopiniais radiniais. *Lietuvos akušerija ir ginekologija*. 2010; 8(1):22-30.
90. Gudlevicienė Z, Didziapetriene J, Ramael M, Uleckiene S, Valuckas KP. Human papillomavirus and p53 polymorphism in Lithuanian cervical cancer patients. *Gynecol Oncol*. 2006; 102(3):530-3.
91. Maucort-Boulch D, Franceschi S, Plummer M; IARC HPV Prevalence Surveys Study Group. International correlation between human papillomavirus prevalence and cervical cancer incidence. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008;17(3):717-20.

92. Velyvyte D, Laiskonis A, Uloza V, Gozdicka-Jozefiak A. Prevalence of papillomavirus infection among patients with laryngeal papillomatosis and the effects of some risk factors on the persistence of papillomaviruses in the upper respiratory tract. *Medicina*. 2002; 38(5):499-504.
93. Bosch FX, Burchell AN, Schiffman M, Giuliano MR, de Sanjose S, Bruni L, et al. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. *Vaccine*. 2008; 26(Suppl 10):K1-16.
94. Franceschi S, Herrero R, Clifford GM, Snijders PJ, Arslan A, Anh PT, et al. Variations in the age-specific curves of human papillomavirus prevalence in women worldwide. *Int J Cancer*. 2006; 119(11):2677-84.
95. Parviainen ELK, Gaba ND. Gynecologic Cryosurgery. *Emedicine* 2010. Available from: <http://emedicine.medscape.com/article/269982-overview>.
96. Smith JS, Lindsay L, Hoots B, Keys J, Franceschi S, Winer R, et al. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *Int J Cancer*. 2007; 121(3):621-32.
97. Clifford GM, Smith JS, Aguado T, Franceschi S. Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer*. 2003; 89(1):101-5.
98. Nadišauskienė RJ, Kliučinskas M. Žmogaus papilomos virusas – pagrindinis gimdos kaklelio vėžio rizikos veiksnys. In: Didžiapetrienė J, Uleckienė S, Valuckas KP, Laurinavičius A, Nadišauskienė RJ, Cibas ES. Gimdos kaklelio vėžio profilaktikos aktualijos. Vilnius: VĮ Mokslotyros institutas; 2005. p. 22-34.
99. Cuzick J, Arbyn M, Sankaranarayanan R, Tsu V, Ronco G, Mayrand MH, et al. Overview of human papillomavirus-based and other novel options for cervical cancer screening in developed and developing countries. *Vaccine*. 2008; 26(Suppl 10):K29-41.
100. Ault KA. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections in the female genital tract. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2006; Suppl:40470.
101. Pett M, Coleman N. Integration of high-risk human papillomavirus: a key event in cervical carcinogenesis? *J Pathol*. 2007; 212(4):356-67.
102. Andersson S, Hansson B, Norman I, Gaberi V, Mints M, Hjerpe A, et al. Expression of E6/E7 mRNA from ‘high risk‘ human papillomavirus in relation to CIN grade, viral load and p16INK4a. *Int J Oncol*. 2006; 29(3):705-11.

103. Kraus I, Molden T, Holm R, Lie AK, Karlsen F, Kristensen GB, et al. Presence of E6 and E7 mRNA from human papillomavirus types 16, 18, 31, 33 and 45 in the majority of cervical carcinomas. *J Clin Microbiol.* 2006; 44(4):1310-7.
104. Huang LW, Hwang JL, Lin YH. Type-specific distribution of human papillomavirus in relation to grades of cervical neoplasia. *Int J Gynaecol Obstet.* 2006; 92(2):143-4.
105. Graham DA, Herrington CS. HPV-16 E2 gene disruption and sequence variation in CIN 3 lesions and invasive squamous cell carcinomas of the cervix: relation to numerical chromosome abnormalities. *Mol Pathol.* 2000; 53:201–6.
106. Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol.* 2002; 55(4):244-65.
107. Liu SS, Tsang PC, Chan KY, Cheung AN, Chan KK, Leung RC, et al. Distribution of six oncogenic types of human papillomavirus and type 16 integration analysis in Chinese women with cervical precancerous lesions and carcinomas. *Tumour Biol.* 2008; 29(2):105-13.
108. Hudelist G, Manavi M, Pischinger KI, Watkins-Riedel T, Singer CF, Kubista E, et al. Physical state and expression of HPV DNA in benign and dysplastic cervical tissue: different levels of viral integration are correlated with lesion grade. *Gynecol Oncol.* 2004 Mar; 92(3):873-80.
109. Gallo G, Bibbo M, Bagella L, Zamparelli A, Sansaverino F, Giovagnoli MR, et al. Study of viral integration of HPV–16 in young patients with LSIL. *J Clin Pathol.* 2003; 56(7):532-6.
110. Cheung JK, Cheung, TH, Ng CW, Yu MY, Wong MC, Siu SS, et al. Analysis of human papillomavirus type 18 load and integration status from low-grade cervical lesion to invasive Cervical Cancer. *J Clin Microbiol.* 2009; 47(2):287-93.
111. Consensus guidelines: 2006 Consensus Guidelines for the Management of Women with Abnormal Cervical Cancer Screening Tests. ASCCP. Available from: <http://www.asccp.org/consensus/cytological.shtml>.
112. Cibas ES, Rimienė J, Laurinavičius A. Gimdos kaklelio ir makšties citologija. In: Didžiapetrienė J, Uleckienė S, Valuckas KP, Laurinavičius A, Nadišauskienė RJ, Cibas ES. Gimdos kaklelio vėžio profilaktikos aktualijos. Vilnius: VĮ Mokslotyros institutas; 2005. p. 70-123.

113. Carta G, Di Stefano L, Catellani Perelli A, Toro G, Moscarini M. Colposcopy, cytology and histology in the diagnosis of squamous intraepithelial lesions of the cervix. *Clin Exp Obstet Gynecol.* 1999; 26(2):60-6.
114. Saslow D, Runowicz CD, Solomon D, Moscicki AB, Smith RA, Eyre HJ, et al. American Cancer Society guideline for the early detection of cervical neoplasia and cancer. *CA Cancer J Clin.* 2002; 52(6):342-62.
115. Dalla Palma P, Giorgi Rossi P, Collina G, Buccoliero AM, Ghiringhello B, Gilioli E, et al. The reproductibility of CIN diagnoses among different pathologists: data from histology reviews from a multicenter randomized study. *Am J. Clinical Pathol.* 2009; 132(1):125-32.
116. Stoler MH, Schiffman M; Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance-Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion Triage Study (ALTS) Group. Interobserver reproductibility of cervical cytologic and histologic interpretations: realistic estimates from the ASCUS-LSIL Triage Study. *JAMA,* 2001; 285(11):1500-5.
117. Benedet JL, Maticic JP, Bertrand MA. An analysis of 84244 patients from the British Columbia cytology-colposcopy program. *Gynecol Oncol.* 2004; 92(1):127-34.
118. Soutter WP, Diakomanolis E, Lyons D, Ghaem-Maghani S, Ajala T, Haidopoulos D, et al. Dynamic spectral imaging: improving colposcopy. *Clin Cancer Res.* 2009;15(5):1814-20.

10. PUBLIKACIJOS

Su disertacijos tematika susijusios publikacijos

Publikacijos leidiniuose, priklausančiuose ISI duomenų bazei

1. Gudlevičienė Ž, Šepetienė A, Didžiapetrienė J, Valuckas KP, Smailytė G, Drąsutienė G, Nadišauskienė RJ. Infekuotumas atskirų žmogaus papilomos tipų virusais esant intraepitelinių gimdos kaklelio pokyčių. *Medicina*. 2010; 46(9):616-23.
2. **Šepetiene A**, Gudleviciene Z, Bumbulienė Z, Drasutiene G, Didziapetriene J. State of HPV 16 integration in Lithuanian women with cervical neoplasia. *Central European Journal of Medicine*. 2011; 6(2) (in press).

Publikacijos Lietuvoje recenzuojamuose leidiniuose

3. **Šepetienė A**, Gudlevičienė Ž, Didžiapetrienė J, Drąsutienė G. Kancerogenės rizikos veiksnių, susijusių su žmogaus papilomos viruso infekcija, įtaka gimdos kaklelio intraepitelinių pokyčių progresavimui. *Sveikatos mokslai*. 2008; 5:1912–1017.
4. **Šepetienė A**, Gudlevičienė Ž, Bumbulienė Ž, Drąsutienė G, Didžiapetrienė J. 16 tipo žmogaus papilomos viruso integracijos nustatymo svarba moterims esant įvairaus laipsnio gimdos kaklelio plokščiojo epitelio ląstelių pokyčiams *Pap* tepinėlyje. *Sveikatos mokslai*. 2010; 6:3720-3725.
5. Gudleviciene Z, Smilgeviciute-Ivshin A, Vaitkuvienė A, **Šepetiene A**, Didziapetriene J. Human papillomavirus and other risk factors in Lithuanian cervical carcinoma patients. *Acta Medica Lithuanica*. 2010; 17(3-4):106-115.

Kitos publikacijos

Publikacijos leidiniuose, priklausančiuose ISI duomenų bazei

1. Bumbulienė Z, Alisauskas J, **Šepetiene A**. Prevalence of high-risk human papilloma virus infection in sexually active and non sexually active adolescents and young Lithuanian females. *Journal of Pediatric and Adolescent Gynecology*. 2010 (in press).

Publikacijos Lietuvoje recenzuojamuose leidiniuose

2. Gudlevičienė Ž, **Šepetienė A**. ŽPV vakcinės diegimas į praktiką Europoje. *Akušerija ir ginekologija*. 2010; 13(4):371-376.

11. PRANEŠIMAI LIETUVOJE IR UŽSIENYJE

1. Gudleviciene Z, **Sepetiene A**, Smailyte G, Didziapetriene J. Human Papilloma virus E2 gene disruption in intraepithelial cervical lesions. 12th IGCS (International Gynecologic Cancer Society) meeting, Bangkok (Thailand), 25-28 October 2008 (poster presentation).
2. Gudleviciene Z, **Sepetiene A**, Didziapetriene J, Valuckas KP, Smailyte G, Drasutiene G, Nadisauskiene RJ. Identification of human papillomavirus types in cervical intraepithelial lesions. 16th International meeting of ESGO (European Society of Gynaecological Oncology), Belgrade (Serbia), 11-14 October 2009 (poster presentation).
3. **Šepetienė A**. Žmogaus papilomos viruso rizikos veiksniai. Lietuvos Akušerių ir Ginekologų draugijos (LAGD) Lietuvos vaikų ir paauglių amžiaus ginekologijos sekcijos posėdis, Vilnius (Lietuva), 2009 m. sausio 30 (žodinis pranešimas).
4. **Šepetienė A**, Gudlevičienė Ž, Bumbulienė Ž, Kurtinaitienė R, Drasutienė G, Didziapetriene J. Role of HPV 16 integration in patients with various cytological changes of cervical epithelium in conventional *Pap* smear. 5th Baltic Congress of Oncology, Ryga (Latvia) (thesis in Supplement 2010 (10/1) ACTA CHIRURGICA Latviensis), 14-15 May 2010 (poster presentation).
5. **Šepetienė A**, Gudlevičienė Ž, Bumbulienė Ž, Kurtinaitienė R, Drasutienė G, Didziapetriene J. 16 tipo ŽPV integracijos reikšmė moterims su įvairiais gimdos kaklelio citologiniais pokyčiais įprastiniame tepinėlyje. 9-asis Lietuvos akušerių ir ginekologų draugijos (LAGD) suvažiavimas, Kaunas (Lietuva), 2010 m. rugsėjo 16–18 d. (stendinis pranešimas).

12. PRIEDAI

1 priedas

Vilniaus universiteto Onkologijos institutas,
Mokslinių tyrimų centras
VUL Santariškių klinikos

Vilnius
2008.01.14.

Asmens informavimo forma

Versija Nr. 1

Informacija dalyvaujantiems tyrime "**Žmogaus papilomos viruso (ŽPV) integruotų transkriptų (iRNR) ir ŽPV E2 geno nustatymo prognozinė reikšmė gimdos kaklelio intraepitelinių pokyčių progresijai**".

ŽPV yra labiausiai pasaulyje paplitusi lytiniu keliu perduodama infekcija. Moksliniais tyrimais įrodyta, kad 16 ir 18 onkogeniniai ŽPV tipai, 6 ir 11 tipai - dažniausiai sukelia išorinių lytinių organų karpas ir kondilomas. Ekonomiškai išsivysčiusiose šalyse daugiau nei 50 metų taikomos organizuotos patikros dėl gimdos kaklelio vėžio, atliekant įprastinį Pap tepinėlį (tiriami gimdos kaklelio ląstelių pakitimai). Tačiau šis metodas yra riboto jautrumo, jo neužtenka prognozuojant intraepitelinių pokyčių vystymosi eigą. Ieškoma jautresnių ir specifiskesnių diagnostikos metodų. ŽPV infekcija moterims virš 30 metų dažnai yra persistuojanti, t.y. ilgą laiką būnanti organizme, todėl svarbu žinoti, ar ŽPV jau išsiskverbė į gimdos kaklelio ląstelių genetinę medžiagą (integravosi), dėl ko yra didesnė ląstelių supiktybėjimo tikimybė nes integruoto viruso organizmas jau nebepašalins. Pasaulyje atliekami tyrimai ŽPV integracijai į ląstelių genomą nustatyti. Kadangi iki šiol nėra tokio žymens, kuris parodytų, kurie intraepiteliniai pakitimai regresuos ar progresuos, integracijos reikšmės progresijai nustatymas leistų išskirti moteris į atskirą rizikos susirgti gimdos kaklelio vėžiu grupę. Šios moterys būtų intensyviau stebimos (dažniau tikrinamos) ar būtų skiriamas chirurginis gydymas.

Informuojame Jus, kad tyrime dalyvaus du šimtai 30-60 m. amžiaus moterų, kurioms atėjus pasitikrinti profilaktiškai į Pirminį sveikatos priežiūros centrą (PSPC) pagal SAM patvirtintą Atrankinę sveikatos tikrinimo programą dėl gimdos kaklelio patologijos, įprastame PAP tepinėlyje nustatyti ikivėžiniai gimdos kaklelio ląstelių pakitimai 08.01-08.03 mėn. bei sutiks dalyvauti šiame tyrime ir pasirašys informuoto asmens sutikimo formą. Jus apžiūrės ginekologas, paims gimdos kaklelio epitelio ląstelių pokyčių nustatymui ir ŽPV bei jo integracijos ištyrimui, jus atsakysite į klausimus apie rūkymo įpročius.

Tyrimas yra naudingas Jums, nes būsite nemokamai ištirta dėl ŽPV infekuotumo, bus nustatyti ŽPV 6, 11, 16, 18 tipai, atliktas vienasluoksnis Pap tepinėlis, kuris yra jautresnis nei įprastas Pap tepinėlis. Taip pat Jums bus atlikta gimdos kaklelio kolposkopija (apžiūra mikroskopu) ir, esant reikalui, bus paimtas pakitusio audinio gabalėlis.

Atlikus šiuos tyrimus, bus aišku, ar Jums reikalingas tolimesnis intensyvus, ar chirurginis gydymas, Jūsų stebėjimas, ar toliau tik įprasta gimdos kaklelio patikra.

Atliekamas tyrimas nėra rizikingas ar žalingas Jums. Atlikus biopsiją, gali būti nežymios kraujingos išskyros kelias dienas. Po biopsinės medžiagos paėmimo prašytume 2 savaites neturėti lytinių santykių.

Už atliekamus tyrimus Jums papildomai mokėti nereikia. Jūs bet kada galėsite atsisakyti dalyvauti tyrime. Pažymime, kad atsisakymas dalyvauti tyrime niekaip neįtakos Jūsų tolimesnės priežiūros. Gautų tyrimų rezultatai bus saugomi specialioje anketoje ir tyrėjas asmeniškai paaiškins gautus rezultatus ir išvadas.

Jums sutikus, informuosime Jūsų šeimos gydytoją ar Jūsų akušerį ginekologą apie Jūsų sprendimą dalyvauti tyrime ir atliktų tyrimų rezultatus. Tyrimo duomenys bus konfidencialūs, Jūsų vardas ar pavardė nebus paminėti jokiuose dokumentuose, ataskaitose.

Iškilius neišskumams ar ieškant papildomos informacijos, prašome kreiptis į pagrindinius tyrėjus:

gyd. **Agnė Šepetienė**

darbo dienomis VUL SK konsultacinėje poliklinikoje +370 688 62150, Moters fiziologijos ir patologijos centras, II-ą ginekologijos skyrius (8-5) 2365253 (mob. tel. +370 69986086)

med. dr. gyd. **Živilė Gudlevičienė**

Vilniaus universiteto Onkologijos institutas, Mokslinių tyrimų centras +37052629667 (mob. Tel. +37068682417).

Iškilius klausimams dėl savo kaip dalyvio teisių galite kreiptis į Lietuvos bioetikos komiteto atsakingą darbuotoją telefonu: (8-5) 212 45 65.

2 priedas

INFORMUOTOJO ASMENS SUTIKIMO FORMA (Nr.1 versija)

Tyrimo pavadinimas:

"Žmogaus papilomos viruso (ŽPV) integruotų transkriptų (iRNR) ir ŽPV E2 geno iškritos nustatymo prognozinė reikšmė gimdos kaklelio intraepitelinių pokyčių progresijai".

Pacientės vardas, pavardė:.....

Adresas:.....

Aš perskaičiau pateiktą informaciją apie tyrimą, kuriame buvau pakviesta dalyvauti. Turėjau galimybę aptarti smulkmenas ir užduoti iškilusius klausimus. Gydantis gydytojas paaiškino tyrimo esmę bei tikslą ir aš suprantu, kas man yra siūloma.

Aš buvau informuota, kad negaliu dalyvauti tyrime jei esu nėščia. Aš suprantu, kad šis tyrimas yra svarbus gerinant medicinos žinias ir yra patvirtintas Lietuvos bioetikos komiteto.

Aš buvau informuota, kad planuojamame tyrime man bus atlikti specialūs tyrimai. Taip pat buvo paaiškinta ir apie galimą riziką.

Prireikus papildomos informacijos, susijusios su tyrimu, tyrėjams bus suteikta teisė susipažinti su mano asmens sveikatos istorija.

Suprantu, kad mano dalyvavimas tyrime ir mano individualūs tyrimo duomenys liks paslapyje. Pasinaudoti šiais duomenimis galės tik tyrėjų grupės nariai.

Esu informuota, kad atliekamas tyrimas neturi man žalingo poveikio. Man pažadėtas konfidencialumas bei gautų duomenų saugumas. Sutinku, kad man būtų atlikta ginekologinė apžiūra, tyrimai dėl žmogaus papilomos viruso infekcijos, žmogaus papilomos viruso tipų nustatymas, šio viruso išsiskverbimo (integracijos) į ląstelių genomą (genetinę medžiagą) žymenų nustatymas, Pap (onkocitologinis) tepinėlis (paimant ląsteles iš gimdos kaklelio) naudojant įprastas bei skystas terpes, kolposkopija (gimdos kaklelio apžiūra mikroskopu), bei jos metu radus pažeidimą, pakitusios gimdos kaklelio dalies tikslinė biopsija (pakitusio gimdos kaklelio audinio gabalėlio ištyrimas). Sąmoningai ir laisva valia sutinku dalyvauti tyrime, kuris man buvo išaiškintas.

.....
Savanorės vardas, pavardė (didžiosiomis raidėmis)

Savanorės parašas:

Aš, gydytantis gydytojas, patvirtinu, kad paaiškinau anksčiau paminėtai pacientei (savanorei) būsimą tyrimo esmę ir tikslą.

Gydantis gydytojas (vardas, pavardė, parašas):

Data:

Jeigu Jums iškilo problemų dėl šio tyrimo, prašome pranešti:

Pagrindinio tyrėjo vardas, pavardė, parašas:

Živilė Gudlevičienė tel.+37068682417

Agnė Šepetienė tel.+37069986086



LIETUVOS BIOETIKOS KOMITETAS

Juridinių asmenų registras, kodas 188710595, Didžioji g. 22, LT-01128 Vilnius, tel./ faks. (8 5) 212 4565, el. p. lbek@sam.lt, www.sam.lt/bioetika

LEIDIMAS ATLIKTI BIOMEDICININĮ TYRIMĄ

2008-02-29 Nr.: 15

Biomedicininio tyrimo pavadinimas:
Žmogaus papilomos viruso (ŽPV) integruotų transkriptų (iRNR) ir ŽPV-E2 geno išskirtos prognozė gimdos kaklelio intraepitelinių pokyčių progresijai

Protokolo Nr.: **1**
 Versijos Nr.: **1**
 Data: **2008 m. sausio 18 d.**

Asmens informavimo ir informuoto asmens sutikimo forma:
 Versija: **1**
 Data: **2008 m. sausio 14 d.**

Pagrindinis tyrėjas: **Med. dr. Živilė Gudlevičienė**
Gyd. Agnė Šepetienė

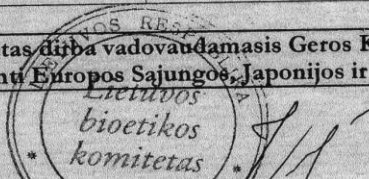
Biomedicininio tyrimo vieta:
 Įstaigos pavadinimas: **Vilniaus universiteto Onkologijos institutas,
 Mokslinių tyrimų centras**
 Įstaigos adresas: **Polocko g. 2, Vilnius**
 Įstaigos pavadinimas: **Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikos**
 Įstaigos adresas: **Santariškių g. 2, Vilnius**

Leidimas išduotas Lietuvos bioetikos komiteto posėdžio, įvykusio **2008 m. vasario 19 d.**, sprendimu.

Lietuvos bioetikos komiteto biomedicininių tyrimų ekspertų grupės nariai			
Nr.	Vardas, Pavardė	Veiklos sritis	Dalyvavo posėdyje
1	Gyd. Gintarė Breivienė	pediatrija	taip
2	Gyd. Vytautas Čepulis	onkologija	ne
3	Doc. Eugenijus Gefenas	bioetika	taip
4	Prof. Zita Liubarskienė	filosofija	taip
5	Prof. Andrius Narbekovas	teologija	taip
6	Prof. Algimantas Raugalė	pediatrija	taip
7	Doc. Krescentius Stoškus	filosofija	taip
8	Gyd. Vytautas Tutkus	mikrochirurgija	ne
9	Dalia Zeleckienė	teisė	ne

Lietuvos bioetikos komitetas dirba vadovaudamasis Geros Klinikinės Praktikos taisyklėmis, kurias siūloma priimti Europos Sąjungos, Japonijos ir JAV valdžios struktūroms

Vyriausioji specialistė,
 l. e. pirmininko pareigas



Ingrida Narušytė