

VILNIAUS UNIVERSITETAS

VAIDA SIMANAVIČIENĖ

ŽMOGAUS PAPILOMOS VIRUSO MOLEKULINĖ DIAGNOSTIKA IR  
PAPLITIMO TYRIMAI

Daktaro disertacija

Technologijos mokslai, chemijos inžinerija (05T)

Vilnius, 2017

Disertacija rengta 2011 – 2016 metais Vilniaus universitete, Biotechnologijos institute.

Mokslinė vadovė – prof. dr. Aurelija Žvirblienė (Vilniaus universitetas, technologijos mokslai, chemijos inžinerija – 05 T).

## TURINYS

SANTRUMPOS .....	5
ĮVADAS .....	7
MOKSLINIS NAUJUMAS .....	10
GINAMIEJI TEIGINIAI .....	11
1. LITERATŪROS APŽVALGA .....	12
1.1. ŽPV klasifikacija .....	12
1.2. ŽPV struktūra .....	14
1.2.1. ŽPV genomai .....	14
1.2.2. ŽPV baltymai .....	15
1.3. ŽPV infekcijos ciklas .....	17
1.4. ŽPV sukeltos ligos .....	19
1.4.1. Gimdos kaklelio vėžys .....	20
1.4.2. Anogenitalinės srities karpos .....	22
1.4.3. Anogenitalinės srities vėžys .....	23
1.4.4. Galvos ir kaklo srities vėžys .....	23
1.5. Gimdos kaklelio vėžio rizikos veiksniai .....	24
1.6. Epigenetiniai ŽPV geno pokyčiai .....	26
1.7. Imuninės sistemos atsakas į ŽPV .....	27
1.8. Vakcinų prieš ŽPV infekciją .....	28
1.9. ŽPV infekcijos nustatymo metodai .....	29
1.9.1. Citologiniai ŽPV infekcijos nustatymo metodai .....	29
1.9.2. Serologiniai ŽPV nustatymo metodai .....	30
1.9.3. Su ŽPV infekcija susiję ląstelių žymenys .....	30
1.9.4. <i>In situ</i> hibridizacija .....	32
1.9.5. Polimerazės grandininė reakcija (PGR) .....	32
2. MEDŽIAGOS IR METODAI .....	35
2.1. Medžiagos .....	35
2.1.1. Terpės ir tirpalai .....	36
2.1.2. Rinkiniai .....	37
2.1.3. Pradmenų sistemos .....	38
2.1.4. HeLa, CaSki ir CHO ląstelių linijos .....	41
2.1.5. pTZ57R plazmidė, λ DNR ir <i>E. coli</i> ląstelės .....	41
2.1.6. Klinikiniai mėginiai .....	42
2.1.7. Įranga .....	42
2.2. Tyrimo metodai .....	43
2.2.1. HeLa, CaSki ir CHO ląstelių atšildymas ir auginimas .....	43
2.2.2. Klinikinių mėginių rinkimas ir DNR gryninimas .....	44
2.2.3. DNR ir RNR koncentracijos matavimas .....	44
2.2.4. Polimerazinė grandininė reakcija (PGR) .....	45
2.2.5. Dauginė polimerazinė grandininė reakcija .....	45
2.2.6. DNR elektroforezė .....	46
2.2.7. Bisulfitinė DNR modifikacija ir DNR sekoskaita .....	46
2.2.8. RNR gryninimo metodas naudotas p16 <sup>INK4A</sup> raiškos tyrimui .....	46
2.2.9. DNR gryninimo metodas naudotas p16 <sup>INK4A</sup> RNR raiškos tyrimui .....	47
2.2.10. Kiekybinė polimerazinė grandininė reakcija (kPGR) .....	48
2.2.11. RNR elektroforezė .....	48
2.2.12. Kopijinės DNR (kDNR) sintezė .....	49
2.2.13. DNR fragmentų išskyrimas iš agarozės gelio .....	49

2.2.14. Kompetentinių <i>E.coli</i> ląstelių paruošimas.....	49
2.2.15. DNR susiuvimas.....	50
2.2.16. <i>E.coli</i> kompetentinių ląstelių transformacija.....	50
2.2.17. Plazmidžių linearizacija, karpant restriktaze FastDigest SapI (LguI).....	51
2.2.18. DNR išsodinimas.....	51
2.2.19. Transkripcija <i>in vitro</i> .....	51
2.2.20. RNR išsodinimas.....	52
2.2.21. Statistinė analizė.....	52
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS .....	54
3.1. PGR sistemų optimizavimas .....	54
3.1.1. Bendrąją ŽPV infekciją nustatančių PGR sistemų optimizavimas .....	55
3.1.2. Dauginių PGR sistemų optimizavimas.....	60
3.2. Klinikinių mėginių tyrimai .....	62
3.2.1. ŽPV infekcijos dažnis moterų grupėse su žinoma citologine ir histologine diagnoze.....	62
3.2.2. ŽPV genotipų nustatymas klinikiniuose mėginiuose .....	67
3.2.3. Kelių ŽPV genotipų infekcijos dažnis moterų pogrupiuose su žinoma citologine ir histologine diagnoze .....	73
3.2.4. ŽPV infekcijos dažnis gerklų vėžiu sergančių asmenų grupėje .....	77
3.3. ŽPV DNR metilinimo tyrimai .....	78
3.3.1. ŽPV 16 genotipo DNR metilinimo tyrimai .....	79
3.3.2. ŽPV 18 genotipo DNR metilinimo tyrimai .....	84
3.3.3. ŽPV 51 genotipo DNR metilinimo tyrimai .....	86
3.4. Žymens p16 <sup>INK4A</sup> raiškos tyrimai kiekybinės PGR metodu.....	88
3.4.1. AT-kPGR sistemos, skirtos p16 <sup>INK4A</sup> RNR raiškos tyrimams, sukūrimas ir optimizavimas .....	89
3.4.2. p16 <sup>INK4A</sup> RNR raiškos tyrimai klinikiniuose mėginiuose .....	92
3.4.3. p16 <sup>INK4A</sup> RNR raiškos sąsajos su bendra ŽPV infekcija ir ŽPV genotipais .....	94
3.5. ŽPV paplitimas sveikų asmenų urogenitalinių nuograndų ir burnos epitelio mėginiuose bei ŽPV infekcijos sąsajos su rizikos veiksniais .....	97
3.5.1. ŽPV infekcijos dažnis moterų ir vyrų klinikiniuose mėginiuose .....	98
3.5.2. ŽPV infekcijos dažnis skirtingo amžiaus asmenų grupėse .....	100
3.5.3. ŽPV genotipų dažnis moterų ir vyrų klinikiniuose mėginiuose.....	103
3.5.4. Sąsajos tarp ŽPV infekcijos dažnio ir sudėtinių kontraceptinių tablečių vartojimo .....	105
3.5.5. Sąsajos tarp ŽPV genotipų dažnio ir sudėtinių kontraceptinių tablečių vartojimo .....	107
3.5.6. Sąsajos tarp ŽPV infekcijos paplitimo ir gimdymo .....	108
3.5.7. Sąsajos tarp ŽPV infekcijos dažnio ir rūkymo .....	109
IŠVADOS .....	112
Disertacijos tema paskelbtų publikacijų sąrašas.....	114
LITERATŪROS SĄRAŠAS .....	115
Pranešimai mokslinėse konferencijose .....	129
PADĖKA .....	130

## SANTRUMPOS

- AD – adenocarcinoma (*liet.* adenokarcinoma, gimdos kaklelio vėžio tipas)
- AGC – atypical glandular cells (*liet.* atipinės liaukinio epitelio ląstelės)
- ASCUS – atypical squamous cells of undetermined significance (*liet.* nenustatytos svarbos atipinės plokščiojo epitelio ląstelės)
- AT-kPGR – atvirkštinės transkriptazės kiekybinės PGR metodas
- ATP – adozino trifosfatas, ląstelių energijos šaltinis
- Brd4 – bromodomeną turintis ląstelės baltymas
- bs – bazių poros
- BSA – bovine serum albumin (*liet.* jaučio serumo albuminas)
- Ca – cervical cancer (*liet.* gimdos kaklelio vėžys)
- Cdc6 – ląstelės dalijimąsi kontroliuojančio baltymo 6 homologas
- CDKN2A – nuo ciklinų priklausomos kinazės inhibitorių 2A koduojantis genas
- cdk4 – nuo ciklinų priklausoma kinazė 4
- CIN – cervical intraepithelial neoplasia (*liet.* histologiniai pakitimai, vadinami cervikalinėmis intraepitelinėmis neoplazijomis)
- CIN 1 – cervical intraepithelial neoplasia 1 (*liet.* 1 laipsnio cervikalinė intraepitelinė neoplazija)
- CIN 2 – cervical intraepithelial neoplasia 2 (*liet.* 2 laipsnio cervikalinė intraepitelinė neoplazija)
- CIN 3 – cervical intraepithelial neoplasia 3 (*liet.* 3 laipsnio cervikalinė intraepitelinė neoplazija)
- CIS – carcinoma *in situ* (*liet.* karcinoma *in situ*, tai priešvėžinė būklė)
- E1, E2, E4, E5, E6 ir E7 – papilomos viruso baltymai
- E2F – transkripcijos faktorius, dalyvaujantis ląstelės ciklo reguliavime
- ES – Europos Sąjunga
- FDA – Food and Drug Administration (*liet.* Maisto ir vaistų akreditavimo valdyba)
- GP5+/GP6+ – pradmenų rinkinys naudojamas ŽPV nustatymui PGR metodu
- GSK – Belgijos kompanija GlaxoSmithKline, kuri sukūrė rekombinantinę ŽPV vakciną Cervarix
- h – tarptautinis valandos simbolis
- HSIL – high-grade squamous intraepithelial lesion (*liet.* didelio laipsnio plokščiojo epitelio intraepiteliniai pokyčiai)
- kPGR – kiekybinė polimerazinė grandininė reakcija
- L1 ir L2 – papilomos viruso kapsidės baltymai
- LCR – long control region (*liet.* ilgasis kontrolinis regionas, esantis ŽPV genome)

LSIL – low-grade squamous intraepithelial lesion (*liet.* nedidelio laipsnio plokščiojo epitelio intraepiteliniai pokyčiai)

LSMU – Lietuvos sveikatos mokslų universitetas

Mcm5 – baltymas, dalyvaujantis DNR replikacijos reguliacijoje

Mdm2 – baltymas, veikiantis kaip baltymo p53 inhibitorius

min – tarptautinis minutės simbolis

MM-1, MM-2, MM-3, MM-4 – dauginės PGR sistemos ŽPV genotipavimui

MN – transmembraninis baltymas, aptinkamas pakitusiose, vėžinėse ląstelėse

MSD – JAV firma Merck Sharp & Dohme, kuri sukūrė rekombinantinę ŽPV vakciną Gardasil

nt – nukleotidai

NVI – Nacionalinio vėžio institutas

p16<sup>INK4A</sup> – baltymas, specifiskai indukuojamas, įvykus ląstelių onkogeninei transformacijai

p53 – baltymas, dalyvaujantis ląstelės ciklo reguliavime

PAP – The Papanicolaou test (*liet.* citologinis gimdos kaklelio tyrimas)

PGMY09/11 – pradmenų rinkinys naudojamas ŽPV nustatymui PGR metodu

PI – pasikliauties intervalas, naudojamas statistikoje (angl. CI – *confidence interval*)

pRb – retinoblastomos baltymas, kuris yra ląstelės ciklo reguliatorius

PSO – Pasaulio sveikatos organizacija

PV – Paillomavirus (*liet.* papilomos virusas)

s – tarptautinis sekundės simbolis

SCC – squamous cell carcinoma (*liet.* plokščialąstelinis gimdos kaklelio vėžio tipas)

ŠS – šansų santykis, naudojamas statistikoje (angl. OR – *odds ratio*)

ŽPV – žmogaus papilomos virusas

## ĮVADAS

Žmogaus papilomos virusas (ŽPV) – tai dvigrandę žiedinę DNR turintis virusas, kuris infekuoja žmogaus ir gyvūnų epitelinio audinio ląsteles. Kai kurie viruso genotipai sukelia odos ir gleivinių lėtinius uždegimus, kiti – karpas, treči – anogenitalinių sričių bei gerklų vėžinius susirgimus, iš kurių labiausiai paplitęs yra gimdos kaklelio vėžys. Kasmet pasaulyje nustatoma apie pusę milijono naujų šio tipo vėžio atvejų. Yra žinoma, kad apie 70 % moterų per savo gyvenimą užsikrečia ŽPV. Daugelio tyrimų duomenimis, onkogeniniai ŽPV genotipai randami iki 99 % moterų, sergančių gimdos kaklelio vėžiu, mėginiuose. Lietuva pagal sergamumą gimdos kaklelio vėžiu ir mirtingumą nuo šios ligos pirmauja tarp ES šalių. Kas savaitę nuo gimdos kaklelio vėžio Lietuvoje miršta vidutiniškai 5 moterys.

ŽPV infekcijai gydyti nėra sukurta jokių vaistų. Dažniausiai ŽPV infekcija praeina savaime per 1–3 metus. Vakcinacija yra vienintelis būdas apsisaugoti nuo ŽPV infekcijos, tačiau ji veiksminga tada, kai žmogus dar nėra infekuotas virusu. Todėl ypatingai svarbi yra ankstyva ŽPV diagnostika, kuri leistų prognozuoti infekcijos eigą. Šiuo metu gimdos kaklelio vėžio diagnostikai naudojamas citologinis tyrimas (PAP testas), kuriuo nustatomos pakitusios epitelinės ląstelės, tačiau šiuo tyrimu ŽPV infekcija nėra nustatoma. ŽPV infekcijai nustatyti laboratorinėje medicinoje vis dažniau naudojami DNR pagausinimo metodai (PGR). Šie metodai yra pakankamai jautrūs, specifiški ir leidžia identifikuoti ŽPV genotipus.

Skirtingų viruso genotipų DNR sekos yra labai heterogeniškos, todėl kuriant PGR sistemas yra neįmanoma parinkti pradmenų porų, kurios leistų nustatyti bent 50 % žinomų ŽPV genotipų viename mėginyje. Todėl svarbu tobulinti esamas bei kurti naujas ŽPV nustatymo PGR sistemas.

Šiame disertaciniame darbe buvo sukurtos naujos ir optimizuotos anksčiau aprašytos PGR sistemos ŽPV nustatymui bei genotipavimui. Šių molekulinė metodų efektyvumas buvo įvertintas, tiriant didelį skaičių klinikinių mėginių. Naudojant šias PGR sistemas, buvo iširtas ŽPV infekcijos bei atskirų ŽPV genotipų paplitimas tam tikrose Lietuvos moterų ir vyrų

grupėse. Tokie viruso paplitimo tyrimai yra svarbūs, planuojant prevencines priemones prieš ŽPV infekciją ir gimdos kaklelio vėžį.

ŽPV yra svarbiausias gimdos kaklelio vėžį sukeliantis veiksnys, tačiau vėžio vystymesi svarbų vaidmenį atlieka ir kiti rizikos veiksniai (sudėtinių kontraceptinių priemonių vartojimas, rūkymas, gimdymų skaičius ir kt.), todėl tikslinga tirti ŽPV infekcijos paplitimo ir rizikos veiksnių ryšį. Šie rizikos veiksniai gali nulemti, ar ŽPV infekcija išnyks savaime, ar formosis ląstelių piktybiniai pakitimai. Taip pat gimdos kaklelio vėžiui išsivystyti įtakos gali turėti ir genetiniai bei epigenetiniai ląstelės bei viruso pokyčiai. Identifikuoti karcinogenezės procese dalyvaujančių ląstelės baltymų raiškos bei epigenetiniai aukštos rizikos ŽPV genomų pokyčiai gali būti naudojami kaip ŽPV inicijuotos karcinogenezės žymenys.

Šis mokslinis darbas yra tarpdisciplininis, jame apjungiami įvairūs biotechnologiniai ir biomedicininiai aspektai: molekulinų metodų kūrimas, jų taikymas ŽPV paplitimo tyrimams bei rizikos veiksnių, susijusių su ŽPV infekcija, tyrimai.

**Darbo tikslas:** molekuliniais metodais ištirti ŽPV infekcijos ir ŽPV genotipų paplitimą Lietuvoje ir nustatyti tam tikrų rizikos veiksnių bei karcinogenezės žymenų sąsajas su ŽPV infekcija.

**Darbo uždaviniai:**

1. Sukurti ir optimizuoti PGR sistemas, skirtas bendros ŽPV infekcijos nustatymui bei ŽPV genotipavimui.
2. Ištirti ŽPV infekcijos ir genotipų paplitimą tarp Lietuvos moterų su intraepiteliniais gimdos kaklelio pakitimais, tiriant urogenitalinių nuograndų klinikinius mėginius su žinoma citologine ir histologine diagnoze.
3. Ištirti ŽPV 16, 18 ir 51 genotipų pasirinktų DNR sričių metilinimo dažnį ir įvertinti jų koreliaciją su intraepitelinių gimdos kaklelio pakitimų laipsniu.



4. Ištirti ląstelių žymens p16<sup>INK4A</sup> RNR raišką gimdos kaklelio mėginiuose ir nustatyti RNR raiškos lygio koreliaciją su intraepiteliniais gimdos kaklelio pakitimais ir ŽPV genotipais.
5. Ištirti ŽPV infekcijos ir genotipų dažnį atsitiktinai surinktų sveikų moterų urogenitalinių nuograndų ir burnos epitelio ląstelių mėginiuose.
6. Ištirti ŽPV infekcijos ir genotipų dažnį atsitiktinai surinktų sveikų vyrų burnos epitelio mėginiuose.
7. Nustatyti potencialių rizikos veiksnių (sudėtinių kontraceptinių priemonių vartojimas, rūkymas, gimdymų skaičius) ir ŽPV infekcijos bei genotipų paplitimo ryšį.

Dalis tyrimų buvo atlikti, vykdant Lietuvos Valstybinio mokslo ir studijų fondo (LVMSF) ir Lietuvos Mokslo Tarybos (LMT) finansuojamą Aukštųjų technologijų plėtros programos projektą „Naujų diagnostikos sistemų, skirtų žmogaus papilomos viruso infekcijos ir jos sukulto vėžio laboratorinei diagnostikai, kūrimas“ (B-45/2009, AUT-16/2010).

## MOKSLINIS NAUJUMAS

Atliktas tyrimas yra tarpdisciplininis, jis apima molekulinį metodų kūrimą ir optimizavimą bei šių metodų pritaikymą klinikinių mėginių tyrimams.

Darbo metu naujai optimizavome dvi bendrąją ŽPV infekciją aptinkančias PGR sistemas (GP5+/GP6+ ir PGMY09/11) ir keturias ŽPV genotipavimo PGR sistemas (MM-1, MM-2, MM-3, MM-4), aptinkančias 16 atskirų aukštos rizikos ŽPV genotipų. Bendradarbiaudami su „Thermo Fisher Scientific Baltics“ sukūrėme naują aukštos rizikos ŽPV genotipų infekciją aptinkančią HR\_HPVPGR sistemą ir įvertinome jos efektyvumą, tiriant klinikinius mėginius.

Naudodami sukurtas ir optimizuotas PGR sistemas, atlikome didžiausią Lietuvoje bendros ŽPV infekcijos ir 16 aukštos rizikos ŽPV genotipų paplitimo tyrimą tarp moterų grupių su žinoma citologine ir histologine gimdos kaklelio pakitimų diagnoze. Nustatėme, kad tarp Lietuvos moterų plačiausiai paplitęs onkogeninis ŽPV 16 genotipas. Priešingai nei kitose šalyse, kur antras pagal paplitimą yra ŽPV 18 genotipas, Lietuvoje dominuoja kiti onkogeniniai ŽPV genotipai – ŽPV 31, 33, 56.

Pirmą kartą ištyrėme ŽPV 51 genotipo L1 3' ir LCR DNR sričių metilinimo dažnį klinikiniuose mėginiuose ir palyginome jį su ŽPV 16 ir ŽPV 18 metilinimo profiliu. Nustatėme, kad ŽPV 51 L1'3 srities metilinimas yra dažnesnis nei LCR regiono metilinimas. Be to, ŽPV 51 metilinimo dažnis koreliavo su gimdos kaklelio pakitimų laipsniu. Tokie epigenetiniai aukštos rizikos ŽPV genomų pokyčiai gali būti naudojami kaip ŽPV inicijuotos karcinogenezės žymenys.

Sukūrėme ir optimizavome kiekybinės PGR metodą p16<sup>INK4A</sup> RNR raiškos nustatymui ir ištyrėme šio žymens raiškos sąsajas su gimdos kaklelio pakitimų laipsniu. Nustatyta padidėjusi p16<sup>INK4A</sup> RNR raiška gimdos kaklelio mėginiuose su citologiniais ir histologiniais pakitimais gali būti panaudota kaip aktyvios ŽPV infekcijos žymuo.

Pirmą kartą Lietuvoje ištyrėme ŽPV infekcijos ir genotipų paplitimą sveikų, neturinčių ŽPV infekcijai būdingų požymių, moterų ir vyrų burnos epitelio mėginiuose. Nustatėme, kad vyrų burnos mėginiuose ŽPV infekcija paplitusi du kartus dažniau, negu moterų burnos mėginiuose.

Pirmą kartą Lietuvoje ištyrėme sudėtinių kontraceptinių priemonių (SKT) vartojimo, rūkymo ir gimdymų skaičiaus sąsajas su ŽPV infekcijos ir genotipų paplitimu. Mūsų gauti rezultatai parodė, kad net ir trumpalaikis SKT vartojimas padidina ŽPV infekcijos tikimybę.

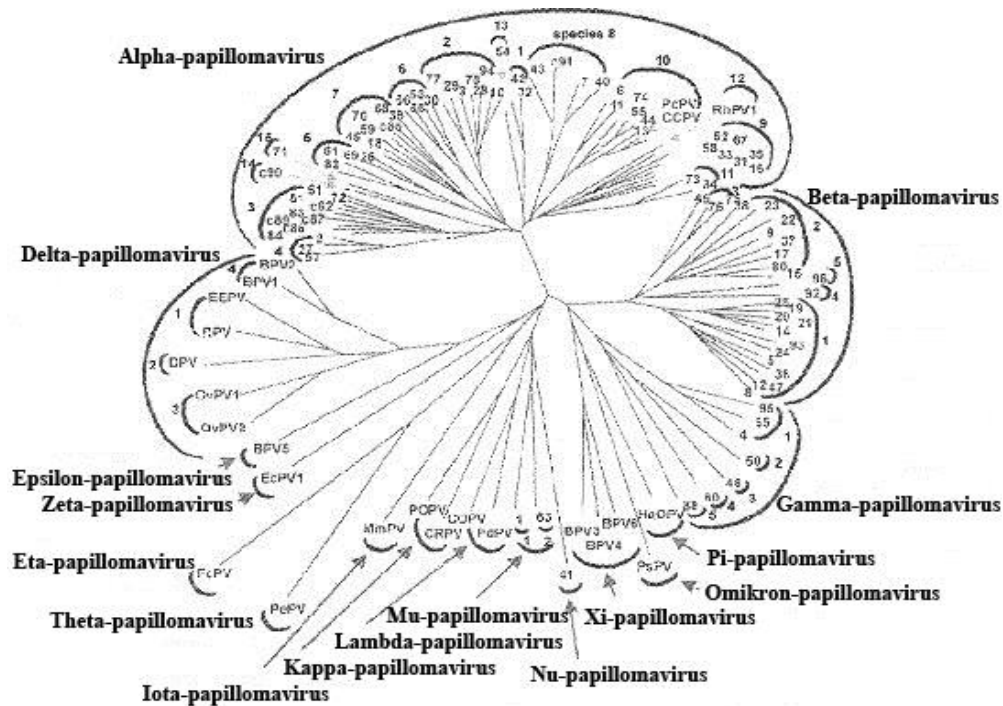
### **GINAMIEJI TEIGINIAI**

1. Sukurtieji molekuliniai metodai tinka ŽPV nustatymui ir genotipavimui klinikiniuose mėginiuose.
2. ŽPV infekcijos ir aukštos rizikos ŽPV 16 genotipo dažnis koreliuoja su intraepitelinių gimdos kaklelio pakitimų laipsniu.
3. Metilinimo dažnis aukštos rizikos ŽPV 16, 18 ir 51 genotipų L1 3' DNR regione koreliuoja su intraepitelinių gimdos kaklelio pakitimų laipsniu.
4. p16<sup>INK4A</sup> RNR raiškos lygis koreliuoja su intraepitelinių gimdos kaklelio pakitimų laipsniu.
5. ŽPV infekcija labiau paplitusi tarp vyrų burnos mėginių lyginant su moterų burnos mėginiais.
6. Sudėtinių kontraceptinių tablečių vartojimas didina ŽPV infekcijos dažnį.

## 1. LITERATŪROS APŽVALGA

### 1.1. ŽPV klasifikacija

Papilomos virusai (PV) – tai didelė, pasižyminti plačia įvairove virusų grupė. Šie virusai aptinkami žinduolių ir paukščių organizmuose. PV tipai yra specifiniai ne tik rūšiai, bet ir organui bei audiniui. Pirmieji PV tipai buvo išgryninti iš žmogaus karpų audinio Žmogaus vėžio virusų etiologijos tyrimų laboratorijoje ir Pastero institute prieš beveik keturiasdešimt metų (Orth ir kt., 1977). Virusų klasifikacija remiasi tarptautinio virusų taksonomijos komiteto kriterijais, kurie išskiria taksonomijos lygius: šeima, gentis, rūšis, genotipas, subtipas ir variantas (Villiers ir kt., 2004). PV priklauso *Papillomaviridae* šeimai, kurioje išskiriama 30 genčių. Gentys pavadintos graikiškomis raidėmis, tačiau šiuo metu genčių yra daugiau nei raidžių abėcėlėje, todėl Graikų abėcėlė naudojama antrą kartą, tik šiuo atveju pavadinime pridedamas „dvo“ priešdėlis (graikiškai „antrą kartą“), pavyzdžiui Dyodelta-PV. Yra žinoma daugiau negu 200 viruso tipų, iš kurių 150 infekuoja žmogaus ląsteles ir yra vadinami žmogaus papilomos virusais (ŽPV). Daugiau nei 60 tipų aptinkami kitų žinduolių, paukščių bei roplių organizmuose. Išskiriamos penkios ŽPV gentys, iš kurių klinikiniu požiūriu svarbiausi yra Alfa papilomos virusai. Dauguma šios genties viruso tipų plinta lytiniu keliu ir sukelia gleivinių ir genitalijų pažeidimus. Dalis Alfa genties viruso tipų sukelia odos karpas (Bernard ir kt., 2010). PV klasifikacija remiasi nukleotidų sekų skirtumais viruso kapsidės geno L1 sekoje. Skirtingų genčių viruso genotipai yra labai variabilūs, jų panašumas yra mažesnis nei 60 %. Virusų tipas priskiriamas naujam genotipui, jei jo L1 geno seka skiriasi daugiau nei 10 % nuo kitų žinomų genotipų. Subtipai išskiriami esant 2–10 % L1 geno sekos skirtumams, o viruso variantai – esant mažiau nei 2 % skirtumų (Villiers ir kt., 2004). Pirmajame paveiksle pateikiamas 118 PV filogenetinis medis, sudarytas panaudojant *Treeview* kompiuterinę programą Glasgow universitete (Villiers ir kt., 2004). Pirmojoje lentelėje nurodoma 16 geriausiai ištirtų PV genčių, jų infekuojami šeimininkai bei sukelti pažeidimai (Villiers ir kt., 2004).



**1 pav.** 118 PV filogenetinis medis, sudarytas Glasgow universitete naudojant Treeview kompiuterinę programą. Skaiciais yra nurodyti PV tipai (Villiers ir kt., 2004).

**1 lentelė.** Geriausiai ištirtos PV gentys, jų šeimnininkai ir sukeliama pažeidimai (Villiers ir kt., 2004).

Nr.	PV gentys	Biologinės savybės
1.	Alfa-papilomavirusai	Infekuoja žmogų ir primatus, sukelia gerybinius ir piktybinius odos ir gleivinių navikus.
2.	Beta-papilomavirusai	Infekuoja žmogų, sukelia odos ir gleivinių ligas, infekcija ilgai būna latentinėje formoje, suaktyvėja nusilpus imuninei sistemai.
3.	Gama-papilomavirusai	Infekuoja žmogų, sukelia žaizdas odoje.
4.	Delta-papilomavirusai	Infekcijos sukelia nagų ir raginio audinio pažeidimus, fibropapilomatozes. Galimas tarprūšinis infekcijos perdavimas.
5.	Epsilon-papilomavirusai	Infekuoja karves, sukelia žaizdas odoje.
6.	Zeta-papilomavirusai	Infekuoja arklius, sukelia žaizdas odoje.
7.	Eta-papilomavirusai	Infekuoja paukščius, sukelia žaizdas odoje.
8.	Theta-papilomavirusai	Infekuoja paukščius, sukelia žaizdas odoje.
9.	Iota-papilomavirusai	Infekuoja graužikus, sukelia žaizdas odoje.
10.	Kappa-papilomavirusai	Infekuoja triušius, sukelia žaizdas odoje.
11.	Lambda-papilomavirusai	Infekuoja galvijus, sukelia žaizdas odoje.
12.	Mu-papilomavirusai	Infekuoja žmogų, sukelia žaizdas odoje.
13.	Nu-papilomavirusai	Infekuoja žmogų, sukelia odos žaizdas, gerybinius ir piktybinius epitelio ar gleivinių navikus.
14.	Xi-papilomavirusai	Infekuoja karves, sukelia žaizdas odoje ir gleivinėje.
15.	Omikron-papilomavirusai	Infekuoja banginius, sukelia genitalines karpas.
16.	Pi-papilomavirusai	Infekuoja žiurkėnus, sukelia žaizdas odoje ir gleivinėje.

Klinikiniu požiūriu ŽPV genotipai klasifikuojami pagal onkogeninį potencialą. Išskiriami didelės, vidutinės ir mažos vėžio rizikos ŽPV genotipai. Virusų tipų klasifikacija pagal onkogeninį potencialą pateikiama 2 lentelėje.

**2 lentelė.** Dažniausiai pasitaikančių ŽPV genotipų klasifikacija (Villiers ir kt., 2004).

<b>Didelės rizikos ŽPV genotipai</b>	<b>Vidutinės rizikos ŽPV genotipai</b>	<b>Mažos rizikos ŽPV genotipai</b>
16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82	26, 50, 53, 55	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72, 81

Didelės rizikos ŽPV genotipai sukelia gimdos kaklelio vėžį, vidutinės rizikos genotipai vienodu dažnumu nustatomi tiek sveikuose tiek vėžiniuose audiniuose, o mažos rizikos genotipai sukelia nepiktybines odos ir lytinių takų gleivinių karpas (Munoz ir kt., 2003). Labiausiai paplitęs visame pasaulyje ir dažniausiai sukeliantis gimdos kaklelio vėžį yra ŽPV 16 genotipas. Antrasis pagal paplitimą tarp gimdos kaklelio vėžio atvejų yra ŽPV 18 genotipas (Clifford ir kt., 2005; Bosch ir kt., 2008; Hammer ir kt., 2015). Iš viso 15 ŽPV genotipų yra priskiriami onkogeniniams (didelės rizikos) ir 3 potencialiai onkogeniniams (vidutinės rizikos). Iš mažos rizikos grupės plačiausiai paplitę ŽPV 6 ir 11 genotipai. Kitų tipų paplitimas skiriasi įvairiuose geografiniuose regionuose (Gearheart ir kt., 2011; de Sanjose ir kt., 2010).

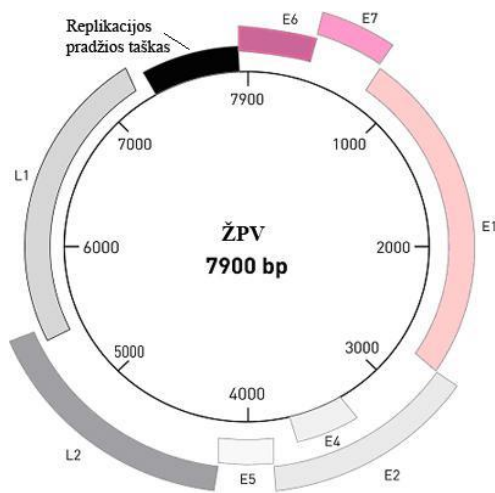
## **1.2. ŽPV struktūra**

ŽPV yra nedidelis apie 52–55 nm diametro dydžio virusas, sudarytas iš dvigrandės žiedinės DNR (apie 8 kb dydžio) ir kapsidės apvalkalo. Virusų genomai suskirstyti į tris regionus: ankstyvųjų genų regionas, vėlyvųjų genų regionas ir ilgasis kontrolinis regionas (*angl. long control region, LCR*).

### **1.2.1. ŽPV genomai**

Viruso genome yra aštuoni savo sekomis persidengiantys genai. Ankstyvieji genai yra E1, E2, E4, E5, E6 ir E7, o vėlyvieji – L1 ir L2 genai

(Favre ir kt., 1975; Zheng ir Baker, 2006). Ankstyvųjų genų regionas užima apie 50 % viruso genomo. Viruso genomo struktūra pateikta 2-ame paveiksle.



**2 pav.** ŽPV genomo struktūra (Prendiville ir Davies, 2004).

DNR replikacijoje ir transkripcijoje dalyvauja E1, E2 ir E4 genų koduojami baltymai. E5, E6 ir E7 yra onkogenai, kurie stimuliuoja ląstelės augimą. Vėlyvųjų genų regionas užima apie 40 % viruso genomo. Vėlyvieji L1 ir L2 genai koduoja struktūrinius kapsidės baltymus (Zheng ir Baker, 2006; Bernard, 2002). Ilgasis kontrolinis regionas užima apie 10 % genomo. Jame yra replikacijos pradžios taškas, transkripcijos faktorių prisirišimo sritys, bei ankstyvasis ir vėlyvasis promotoriai (Ozbun ir Meyers, 1998; Bernard, 2002).

### 1.2.2. ŽPV baltymai

E1 ir E2 baltymai yra pagrindiniai transkripcijos ir replikacijos reguliatoriai. Jie jungiasi ir suformuoja kompleksą su replikacijos pradžios tašku viruso genome. E1 yra nuo ATP priklausoma helikazė, kuri prieš replikaciją išvynioja viruso DNR (Mohr ir kt., 1990). E2 baltymas palengvina E1 baltymo prisirišimą prie replikacijos pradžios taško. Jis taip pat pririša viruso genomą prie ląstelės branduolio per bromodomeną turintį ląstelės baltymą – 4 (Brd4). Tokiu būdu ląstelėms dalijantis virusas paskirstomas į

dukterines ląsteles (McBride ir kt., 2004). E2 baltymas prisirišdamas prie ŽPV genomo promotorinės sekos, neigiamai reguliuoja onkogenų E6 ir E7 raišką. Tačiau įsiterpus viruso DNR į šeimininko ląstelės genomą, E2 geno DNR seka prarandama, taip sukeliama E6 ir E7 genų raiškos padidėjimas (McBride, 2013).

E4 baltymo intensyviausia raiška vyksta vėlyvojoje viruso infekcijos fazėje. Šio baltymo didžiausi kiekiai nustatomi viršutiniuose epitelio sluoksniuose. E4 baltymas suardydamas ląstelės keratino sluoksnį dalyvauja viruso plitime (Bryan ir Brown, 2001; Bryan ir Brown, 2000; Doorbar, 2013).

E5 yra nedidelis, hidrofobinis baltymas, kuris sutrikdo daugelio ląstelės membranos baltymų funkcijas (Bravo ir Alonso, 2004). Baltymas E5 veikia ir kaip onkogenas. Yra žinoma, kad virusui įsiterpus į šeimininko genomą, prasideda intensyvi E6 ir E7 genų raiška. Sąveikaudami su ląstelės baltymais, jie skatina ląstelių proliferaciją ir vėžio vystymąsi. Virus integracijos metu E5 geno seka yra prarandama, tačiau manoma, kad baltymas E5 kartu su E6 ir E7 baltymais skatina vėžio vystymąsi virusui esant ir episomų pavidalu (Venuti ir kt., 2011).

Aukštos rizikos ŽPV tipų baltymai E6 ir E7 yra onkobaltymai, kurie sukelia ląstelių piktybėjimą. Svarbiausia E6 baltymo funkcija yra jungtis ir kartu su ląstelės ubikvitino ligaze inaktyvuoti baltymą p53, kuris yra ląstelės ciklo reguliatorius. Tuomet sutrinka ląstelės ciklo reguliacija, skatinamas chromosominis nestabilumas bei kancerogenezės procesas (Rolfe ir kt., 1995; Kelley ir kt., 2005). Kita svarbi baltymo E6 funkcija yra aktyvinti telomerazę infekuotose ląstelėse ir taip padidinti telomerų ilgį epitelinėse ląstelėse. Yra nustatyta ir kitų ląstelės baltymų, kuriuos veikia baltymas E6, taip trukdydamas normaliai ląstelės baltymų veiklai (Wallace ir Galloway, 2015).

Pagrindinė E7 baltymo funkcija yra jungtis ir inaktyvinti pRb šeimos baltymus, kurie yra ląstelės ciklo reguliatoriai. E7 baltymas taip pat aktyvina ląstelių telomerazę, todėl infekuotos ląstelės gali neribotai dalintis (Nishimura ir kt., 2006; Yim ir Park, 2005).



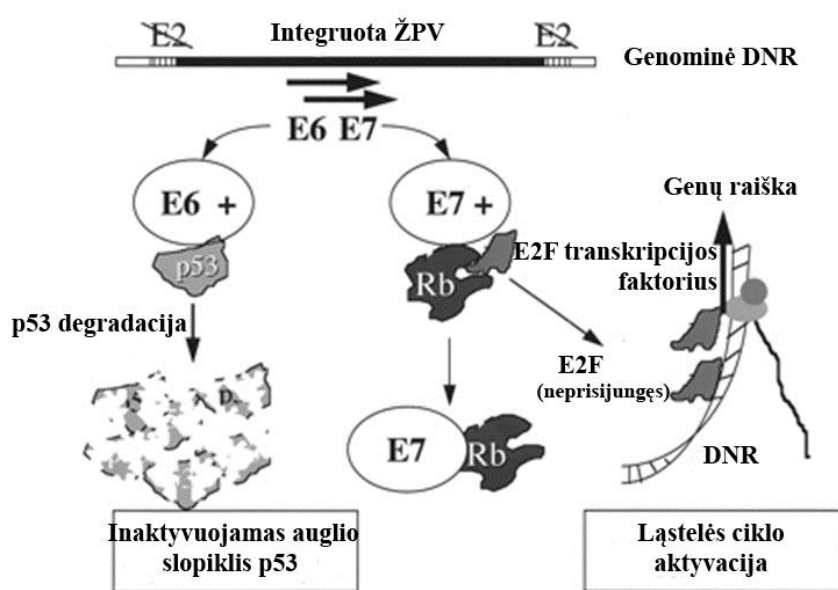
Vėlyvieji baltymai L1 ir L2 formuoja viruso kapsidę. L1 genas koduoja didįjį kapsidės baltymą, o L2 mažąjį. Jų raiška vyksta vėlai viruso gyvenimo cikle diferencijuotose epitelio ląstelėse. Šių baltymų amino rūgščių sekos yra konservatyvios tarp skirtingų PV tipų, todėl kapsidės baltymai yra tinkami vakcinų kūrimui (Buck ir kt., 2013; Wang ir Roden, 2013).

### 1.3. ŽPV infekcijos ciklas

Žmogaus papilomos viruso infekcijos ciklas vyksta kartu su šeimininko epitelinių ląstelių diferenciacija. Infekcija prasideda nuo viruso DNR patekimo į šeimininko epitelio bazinės ląsteles per gleivinės įbrėžimus. Virusas į ląstelės vidų patenka endocitozės būdu, sąveikaujant kapsidės baltymui L1 su ląstelės paviršiuje esančiu heparano sulfatu (Giroglou ir kt., 2001). Viruso patekimas į ląstelę užtrunka 1–3 dienas. ŽPV patekus į šeimininko ląstelę, prasideda ankstyvųjų baltymų E1 ir E2 raiška, kurie dalyvauja viruso DNR replikacijoje. Šiame etape virusas yra episomų pavidalu. Baltymas E1 jungiasi su ATP helikaze ir inicijuoja DNR replikaciją. E2 baltymas palaiko E1 baltymo susijungimą su DNR bei prisijungdamas prie ŽPV promotoriaus slopina onkogenų E6 ir E7 raišką. Šiame etape virusas egzistuoja latentinėje infekcijos stadijoje. Ląstelėje palaikomas žemas viruso DNR kopijų skaičius – nuo 20 iki 100 genomo kopijų. Virusų padauginime dalyvauja šeimininko ląstelės baltymai, nes virusas nekoduoja DNR replikacijai reikalingų baltymų. Dalijantis epitelio ląstelėms, virusas patenka į dukterines ląsteles. Visiškai diferencijuotose epitelio ląstelėse viruso DNR kopijų skaičius stipriai padidėja. Vyksta intensyvesnė onkogenų E5, E6 ir E7 raiška. Taip pat prasideda vėlyvųjų kapsidės baltymus koduojančių genų raiška ir viruso genomo padengimas kapsidės L1 ir L2 baltymais. Virusas, pasiekęs paviršinį, visiškai diferencijuotų epitelio ląstelių sluoksnį, gali būti perduotas kitiems šeimininkams (Pyeon ir kt., 2009).

Ilgą laiką ŽPV būna ląstelėje episomų pavidalu ir tik visiškai diferencijuotose ląstelėse gali integruotis į šeimininko genomą. Vėžinėse ląstelėse virusas aptinkamas tiek integruotas į šeimininko genomą, tiek

episomų pavidalu. Esant ŽPV 16 tipo infekcijai, 70 % vėžio atvejų yra su integruota ŽPV DNR į epitelio ląstelių genomą, 20 % atvejų randama tiek su integruota tiek su episomine geno forma ir 10 % atvejų būna tik su episomine forma. ŽPV 18 genotipas vėžinėse ląstelėse dažniausiai aptinkamas tik integruotas į šeimininko genomą (Steenbergen ir kt., 2005). Apie 15–30 % vėžio atvejų virusas randamas tik episomų pavidalu (Pannone ir kt., 2011). Integracija prasideda, kai E2 geno sekoje atsiranda trūkis. Šio proceso metu ŽPV praranda dalį savo geno (prarandami E2, E1, L1 ir L2 genai). Iš 7904 bazių porų į šeimininko genomą įsiterpia 3091 bazių poros, onkogenai E6 ir E7 beveik visada integruojasi (Steenbergen ir kt., 2005). Praradus E2 geno seką, E6 ir E7 genų raiška nebeslopinama. Tokia ląstelė pati pradeda gaminti šiuos baltymus. ŽPV onkogenų E6 ir E7 poveikis ląstelei pavaizduotas 3 paveiksle.



**3 pav.** ŽPV onkogenų E6 ir E7 poveikis ląstelės gyvenimo ciklui (<https://pharmaceuticalintelligence.com>).

E6 baltymas jungiasi su ląstelės ciklo reguliatoriumi p53 ir jį inaktyvuoja. Normaliomis sąlygomis ląstelėje šio baltymo aptinkami nedideli kiekiai, nes baltymas Mdm2 jį ubikvitilina, taip pažymėdamas sunaikinimui proteosomoje. Atsiradus ląstelėje DNR pažeidimų, baltymas p53 yra

fosforilinas, tokia baltymo fosforilinta forma nėra atpažįstama baltymo Mdm2 ir ciklo reguliatoriaus p53 kiekis stipriai padidėja. Prasideda įvairių genų, dalyvaujančių ląstelės cikle ir apoptozėje, raiška. ŽPV baltymui E6 prisijungus prie p53, jis tampa neaktyvus. Tuomet net ir esant DNR pažeidoms, ląstelė ir toliau dalinasi, o apoptozė nevyksta (Moody ir Laimins, 2010). Aukštos rizikos ŽPV tipų E6 baltymas aktyvina telomerazės geno raišką. Vykstant telomerų galų ilginimui, vėžinės ląstelės gali neribotai dalintis (Howie ir kt., 2009).

ŽPV baltymas E7 jungiasi su ląstelės ciklą reguliuojančiu retinoblastomos (pRb) baltymu. Tuomet baltymas pRb nebereguliuoja E2F transkripcijos faktoriaus, kuris yra atsakingas už ląstelės cikle dalyvaujančių baltymų raišką. Tokios nekontroliuojamos ląstelės nebežūsta, o pradeda greitai ir netvarkingai dalintis. Visų ŽPV genotipų baltymas E7 jungiasi su pRb, tačiau aukštos rizikos virusų genotipų baltymai pasižymi didesniu giminingumu (Pyeon ir kt., 2009; Moody ir Laimins, 2010).

#### **1.4. ŽPV sukeltos ligos**

ŽPV sukelia įvairius piktybinius ir nepiktybinius odos, viršutinių kvėpavimo takų bei lytinių organų gleivinių pažeidimus (genitalijų, odos, gerklės ir gerklų karpas, makštys, varpos, išangės, gimdos kaklelio, tonzilių bei liežuvio vėžį). Virusas aptinkamas tiek moterų, tiek vyrų organizmo epiteliniame ląstelių sluoksnyje. Dažniausiai ŽPV užsikrečiama lytinių santykių metu, bet ŽPV gali būti perduodamas ir gimdymo metu vaikui, taip pat kontaktiniu būdu per odos ir gleivinių mikrotraumas. Didelė ŽPV genotipų dalis nesukelia jokių pakitimų ir per kelis mėnesius infekcija praeina savaime. Apie 90 % ŽPV infekcijos atvejų praeina per 2 metus ir tik nedidelė dalis vystosi iki vėžio (Franco ir kt., 1999; Gomes ir Santos, 2007). Hausen H, de Villiers EM ir Gissmann L buvo pirmieji mokslininkai paskelbę apie ŽPV ir gimdos kaklelio vėžio sąsają (Hausen ir kt., 1981). 2009 metais už šį atradimą buvo suteikta Nobelio premija.

#### 1.4.1. Gimdos kaklelio vėžys

Gimdos kaklelio vėžys yra antras pagal dažnį vėžys (po krūties vėžio) tarp moterų Europos Sąjungos (ES) šalyse. Kiekvienais metais ES šalyse nustatoma apie 33 tūkst. naujų gimdos kaklelio vėžio atvejų, apie 15 tūkst. moterų ES kasmet miršta nuo šios ligos ([www.ecdc.europa](http://www.ecdc.europa)). Lietuvoje kasmet nustatoma gimdos kaklelio pokyčių daugiau kaip 5 tūkst. moterų, iš jų apie 615 vystosi vėžys. Sergamumas ir mirštamumas nuo šio tipo vėžio Lietuvoje yra vienas didžiausių ES ([www.hpvcentre.net](http://www.hpvcentre.net)).

Apie 40 ŽPV tipų infekuoja lytinių organų gleivinę. Jais užsikrečiama lytinių santykių metu. Apie 15 ŽPV tipų yra siejami su gimdos kaklelio vėžio išsivystymu. Literatūros duomenimis, 99 % gimdos kaklelio vėžio atvejų yra aptinkama ŽPV infekcija (Gearheart ir kt., 2011). Pasaulio sveikatos organizacijos (PSO) duomenimis, pasaulyje kasmet nuo gimdos kaklelio vėžio miršta daugiau nei 270 000 moterų ([www.who.int](http://www.who.int)). Lietuvoje gimdos kaklelio vėžys yra trečias pagal paplitimą tarp moterų ir pirmas tarp 15–44 metų moterų (Bruni ir kt., 2015).

Virusas organizme išlieka (persistuoja) skirtingą laiką, priklausomai nuo tipo. Vėliau infekcija gali išnykti. Mažos rizikos ŽPV genotipai persistuoja apie 4–5 mėnesius. Labiausiai paplitęs ir onkogeniškiausias ŽPV 16 genotipas gali išbūti organizme iki 16 mėnesių, nesukeldamas jokių ląstelių pakitimų, o vėliau išnykti. Kiti didelės rizikos ŽPV genotipai vidutiniškai organizme išbūna 8 mėnesius (Gearheart ir kt., 2011). Imuninei sistemai nepajėgus susidoroti su infekcija, per kelis metus gali išsivystyti ląstelių pakitimai ir vėžys. Šis procesas trunka 10–15 metų (Walboomers ir Jacobs, 1999; Gomes ir Santos, 2007). Plokščialastelinės gimdos kaklelio karcinomos atveju dažniausiai aptinkami ŽPV 16 ir į jį filogenetiškai panašūs genotipai. Adenokarcinomos atveju dažniausiai aptinkamas ŽPV 18 genotipas.

ŽPV virusas dažniausiai aptinkamas tarp 20–24 metų seksualiai aktyvių moterų. Gimdos kaklelio vėžys labiausiai paplitęs tarp 45–55 metų moterų (Gearheart ir kt., 2011; Bruni ir kt., 2015).

Išskiriami šie citologiniai gimdos kaklelio pokyčiai:

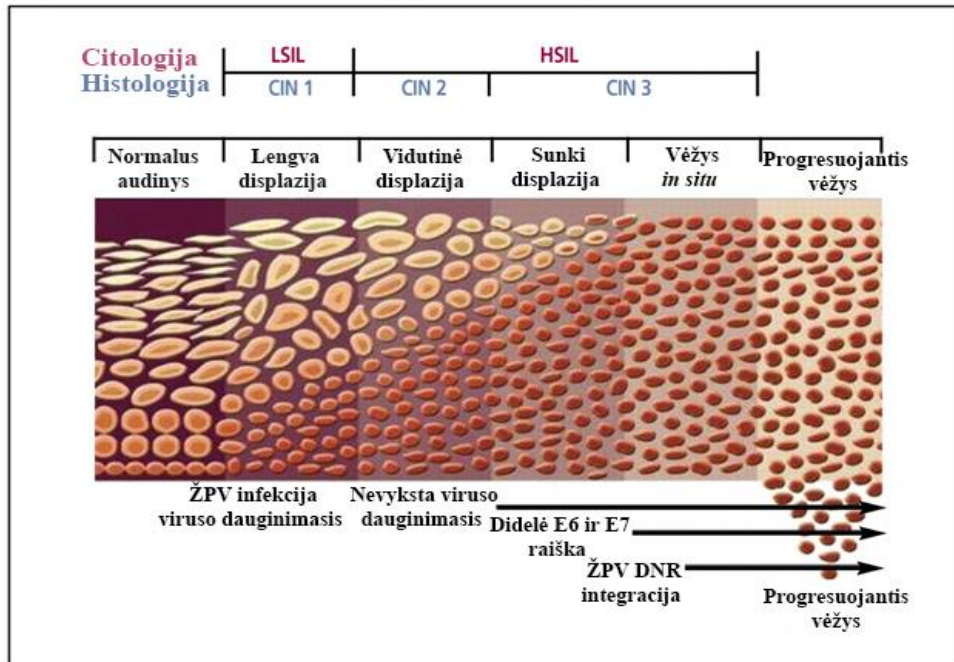
- 1) ASCUS – tai nenustatytos reikšmės atipinės plokščiojo epitelio ląstelės. Ląstelių pokyčiai yra minimalūs, kuriuos gali sukelti ne tik ŽPV infekcija, bet ir kiti veiksniai (<http://www.cancer.gov>).
- 2) LSIL – tai nedideli ląstelių dydžio ir formos pokyčiai, sukelti ŽPV infekcijos. Daugumai moterų šie pokyčiai išnyksta savaime per 3 metus. Tačiau 15–25 % moterų šie pokyčiai progresuoja iki žymių plokščialąstelinų intraepitelinų pokyčių (HSIL) (<http://www.cancer.gov>).
- 3) HSIL – tai žymūs ląstelių dydžio ir formos pokyčiai, sukelti ŽPV infekcijos. Didžioji dalis negydomų šių pokyčių progresuoja iki vėžio (<http://www.cancer.gov>).

Skiriami du gimdos kaklelio vėžio tipai: plokščialąstelinis vėžys (SCC) ir adenokarcinoma (AD). SCC išsivysto iš daugiasluoksnių plokščiojo epitelio ląstelių. Šis vėžio tipas sudaro 80–90 % gimdos kaklelio vėžio atvejų. Adenokarcinoma išsivysto iš liaukinių epitelio ląstelių. Jis sudaro 10–20 % gimdos kaklelio vėžio atvejų (Saslow ir kt., 2012; <http://www.cancer.gov>).

ŽPV infekcija sukelia įvairaus laipsnio histologinius daugiasluoksnių plokščiojo epitelio pakitimus, vadinamus cervikalinėmis intraepitelinėmis neoplazijomis (CIN). CIN apibrėžiamas kaip sutrikęs epitelio augimas ir vystymasis. Jam būdingi mikroskopiniai, neuždegiminiai proliferacijos židiniai (Safaeian ir kt., 2007). Skiriami keturi displazijos laipsniai:

1. CIN 1 – lengva displazija, kai 1/3 gimdos kaklelio epitelinių ląstelių yra pakitusios.
2. CIN 2 – vidutinė displazija, kai 2/3 gimdos kaklelio epitelinių ląstelių yra pakitusios.
3. CIN 3 – sunki displazija, kai visiškai sutrinka ląstelių dauginimasis, ir beveik visos gimdos kaklelio epitelio ląstelės yra pakitusios.
4. CIS – karcinoma *in situ*, tai priešvėžinė būklė, kuri apima gimdos kaklelio paviršinių epitelinių ląstelių sluoksnį, tačiau neplinta į gretimus audinius (<http://www.cancer.gov>).

Citologiniai ir histologiniai gimdos kaklelio gleivinės epitelio pokyčiai pavaizduoti 4 paveiksle.



**4 pav.** ŽPV sukelti gimdos kaklelio ląstelių pokyčiai (CIN – cervikalinė intraepitelinė neoplazija; HSIL – žymūs ląstelių dydžio ir formos pokyčiai; LSIL – nedideli ląstelių dydžio ir formos pokyčiai) (Lowy ir Schiller, 2006).

CIN 1 yra siejama su ŽPV infekcija, kuri 60 % visų atvejų pranyksta savaime. CIN 2 ir CIN 3 yra priešvėžinė stadija, kuri išnyksta savaime tik 30–40 % atvejų, o negydant dažnai progresuoja iki vėžio. CIN 1 gali progresuoti į CIN 3 per kelis ar kelioliką metų, o CIN 3 į CIS per 5–10 metų (Holowaty ir kt., 1999).

#### 1.4.2. Anogenitalinės srities karpas

Mažos rizikos ŽPV genotipai yra susiję su gerybinėmis papilomomis ir odos karpomis. Plačiausiai paplitę žemos rizikos ŽPV genotipai yra 6 ir 11. PSO duomenimis, šie genotipai sukelia net 90–100 % vyrų ir moterų genitalijų karpų. Šie virusai plinta tiesioginio kontakto su infekuotu asmeniu metu. Užsikrėtus šiais ŽPV genotipais, karpas išauga po 2–3 mėnesių. Jos retai vystosi į onkologines ligas. Apie 20–30 % tokių karpų praeina savaime be gydymo. Negydomos karpas ilgainiui gali pradėti didėti ir plisti. Susilpnėjus

imuninei sistemai, karpos labai išryškėja. Tokios karpos gydomos jas pašalinant medikamentų pagalba arba chirurginio gydymo būdu. Koks bus pasirinktas būdas priklauso nuo karpų rūšies bei jų išplitimo laipsnio. Tačiau gydymas neužtikrina visiško ŽPV ir karpų išnaikinimo, 20–30 % atvejų karpos atsinaujina (McMillan ir kt., 2012; Handsfield, 2011).

#### 1.4.3. Anogenitalinės srities vėžys

ŽPV gali sukelti ne tik gimdos kaklelio vėžį, bet ir kitų anogenitalinių sričių (vulvos, varpos, išangės) vėžį. Vulvos vėžys pasitaiko daug rečiau nei gimdos kaklelio vėžys, o vaginos vėžys dar retesnis ir už vulvos onkologinius susirgimus (McMillan ir kt., 2012). Varpos vėžys taip pat yra retas, sudaro apie 0,5 % visų vėžių nustatomų tarp vyrų. Esant išangės vėžiui, ŽPV nustatomas 88–94 % atvejų, vaginos vėžiui – 40–65 %, vulvos – 40–90 %, o varpos – 40–50 % atvejų ([www.cdc.gov](http://www.cdc.gov)).

#### 1.4.4. Galvos ir kaklo srities vėžys

Galvos ir kaklo vėžiui priskiriamos burnos ertmės, ryklės, nosiaryklės ir gerklų karcinomos. Tai šeštas pagal paplitimą onkologinis susirgimas žmogaus organizme (Zandberg ir kt., 2013). Šiuose vėžio tipuose ŽPV aptinkamas 23–35 % atvejų. Didžiausias ŽPV paplitimas randamas ryklės vėžio atvejais (36 %), šiek tiek mažiau burnos ertmės ir ryklės karcinomų atvejais (24 %) (Kreimer ir kt., 2005). Kaip ir gimdos kaklelio vėžio atvejais, dažniausiai aptinkamas ŽPV 16 genotipas (68–87 %). Taip pat randami ir kiti aukštos rizikos ŽPV genotipai: 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52, 56, 58, 59 ir 68 (Zandberg ir kt., 2013). Žemos rizikos ŽPV genotipai (ŽPV 6, 11 ir kt.) gali sukelti papilomatozę kvėpavimo takų gleivinėje. Papilomos gali užkimšti kvėpavimo takus, įsiskverbti į plaučius ir sukelti kvėpavimo nepakankamumą. Lyginant infekcijos paplitimą tarp moterų ir vyrų, sergančių galvos ir kaklo vėžiu, apie tris kartus dažniau ŽPV randamas tarp vyrų (Zandberg ir kt., 2013; Giuliano ir kt., 2015). Galvos ir kaklo vėžiu taip pat dažniau serga vyrai, vyresni nei 50 metų. ŽPV gali būti užsikrečiama lytinių oraliųjų santykių metu. Tyrimai rodo,

kad pastaraisiais metais galvos ir kaklo vėžio atvejų mažėja, tačiau su ŽPV infekcija susijusių šio tipo vėžio susirgimų daugėja. Be ŽPV, pagrindiniais šio tipo vėžio išsivystymo rizikos veiksniais laikomi rūkymas ir suvartojamo alkoholio kiekis (Farsi ir kt., 2015).

### **1.5. Gimdos kaklelio vėžio rizikos veiksniai**

Epidemiologinės studijos parodė, kad nors ŽPV infekcija ir yra svarbiausias veiksnys sukeliantis gimdos kaklelio vėžį, tačiau šiame kancerogenezės procese svarbų vaidmenį atlieka ir kiti įvairūs rizikos veiksniai. Išskiriami šie rizikos veiksniai: sudėtinių kontraceptinių priemonių vartojimas, tabako rūkymas, didelis gimdymų skaičius, turėtų per gyvenimą seksualinių partnerių skaičius, kitos lytinių takų infekcijos. Visa tai lemia, ar ŽPV infekcija išnyks savaime, ar formosis gerybiniai gimdos kaklelio pakitimai, ar ląstelės supiktybės ir išsivystys vėžys (Castellsague ir Munoz, 2003).

Duomenys apie ŽPV infekcijos ir gimdos kaklelio vėžio sąsajas su ilgalaikiu kontraceptinių priemonių vartojimu prieštaringi. Vienų tyrimų duomenimis, sudėtinių kontraceptinių priemonių vartojimas ir vartojimo laikas nepadidina gimdos kaklelio vėžio rizikos (Castle ir kt., 2002, 2005; Jensen ir kt., 2013). Kiti tyrimai parodė, kad šių preparatų vartojimas padidina gimdos kaklelio vėžio išsivystymo tikimybę (Castle ir kt., 2002, 2005; Wang ir kt., 2009; Castellsague ir kt., 2006; Appleby ir kt., 2007). Nustatytas ŽPV infekcijos ryšys su ilgalaikiu sudėtinių kontraceptinių tablečių vartojimu (ilgiau nei 5 metai) (Ley ir kt., 1991; Kjaer ir kt., 1997; Marks ir kt., 2011). Manoma, kad šios kontraceptinės priemonės gali daryti poveikį nuo ŽPV priklausomui karcinogenezės procesui. Taip pat vartojant šiuos preparatus atsiranda gleivinės pokyčių, kurie padidina riziką užsikrėsti nauja ŽPV infekcija arba prailgina viruso buvimo laiką organizme. Didesnis ŽPV infekcijų atvejų skaičius tarp moterų vartojančių sudėtines kontraceptines tabletes siejamas ir su moterų lytiniais hormonais. Tyrimai rodo, kad lytiniai hormonai stimuliuoja ŽPV onkogenų raišką ląstelių linijose, veikia gimdos kaklelio vietinį imuninį



atsaką ir skatina ląstelių proliferaciją (Mitrani-Rosenbaum ir kt., 1989; Mittal ir kt., 1993; Delvenne ir kt., 2007; Gariglio ir kt., 2009).

Ilgalaikis ir intensyvus rūkymas taip pat didina gimdos kaklelio vėžio išsivystymo riziką. Nustatyta, kad tabako metabolitai patenka ir tiesiogiai veikia gimdos kaklelio gleivinę. Šios medžiagos slopina vietinį imuninį atsaką gimdos kaklelio ląstelėse ir gali prisidėti prie ilgesnio viruso gyvavimo ląstelėje ir piktybinės ląstelių transformacijos (Yang ir kt., 1996; Prokopczyk ir kt., 2009). Manoma, kad rūkymas yra svarbiausias, nepriklausantis nuo ŽPV infekcijos, rizikos veiksnys, sukeliantis didelio laipsnio gimdos kaklelio pakitimus (Adam ir kt. 2000). Nustojus rūkyti, dažnai išnyksta ir gimdos kaklelio pažeidimai (Castellsague ir Munoz, 2003).

Asmenys, turintys daug seksualinių partnerių arba turintys lytinius santykius su partneriu, kuris turėjo daug seksualinių partnerių, turi didesnę riziką užsikrėsti ŽPV (Peyton ir kt. 2001). Ankstyva lytinio gyvenimo pradžia taip pat didina tikimybę užsikrėsti ŽPV infekcija, nes paauglystėje gimdos kaklelio epitelyje gaminamas mažas apsauginių gleivių kiekis, todėl gleivinė yra jautresnė ir lengviau pažeidžiama lytiškai plintančių infekcijų (Bosch ir kt. 2002). Taip pat daugelis autorių mano, kad kuo anksčiau prasideda moterų lytinis gyvenimas, tuo daugiau lytinių partnerių ji sutinka per gyvenimą ir tuo didesnė tikimybė užsikrėsti ŽPV (Bayo ir kt., 2002).

Nustatyta sąsaja ir su gimdymų skaičiumi ir gimdos kaklelio vėžio atsiradimu. Moterys, infekuotos ŽPV ir turėjusios 7 ir daugiau gimdymų, turi 4 kartus didesnę riziką susirgti gimdos kaklelio vėžiu už moteris, kurios yra infekuotos ŽPV, tačiau negimdžiusios (Munoz ir kt., 2002). Padidėjusi rizika gali būti dėl didesnio hormonų kiekio ir susilpnėjusio imuniteto (Appleby ir kt., 2006). Gimdos kaklelio piktybiniai pakitimai vystosi toje vietoje, kur gimdymo metu buvo pažeistas gimdos kaklelis (Castle, 2004; Williams ir kt., 2011).

Lytiniu keliu perduodamos infekcijos (Citomegalo virusas, 2, 6 ir 7 tipo žmogaus herpes virusai, *Chlamydia trachomatis* bakterija) taip pat siejamos su didesne gimdos kaklelio išsivystymo rizika. Manoma, kad šios infekcijos yra

susijusios su ilgesniu ŽPV infekcijos išsilaikymu organizme (Dias ir Sousa, 2013; Wohlmeister ir kt., 2016; Chan ir kt., 2001).

Svarbūs kancerogenezės rizikos veiksniai yra ŽPV onkogeniškumo laipsnis, viruso kopijų skaičius, kelių ŽPV genotipų ko-infekcija. Plačiausiai paplitę aukštos rizikos ŽPV genotipai ŽPV 16 ir 18 sukelia piktybiškesnes ir greičiau progresuojančias onkologines ligas (Baseman ir Koutsky, 2005). Ligos sunkumas tiesiogiai priklauso ir nuo viruso kiekio organizme. Yra žinoma, kad ŽPV 16 genotipas gali pasiekti daug didesnę kopijų skaičių už kitų virusų genotipus (Swan ir kt., 1999). Infekcija kelių genotipų ŽPV virusais taip pat didina gimdos kaklelio vėžio riziką. Dažniausiai pasitaiko dviejų ŽPV genotipų ko-infekcija, tačiau randami ir trys, keturi ar net penki ŽPV genotipai viename mėginyje (Quint ir kt., 2001; Li ir kt., 2016).

### **1.6. Epigenetiniai ŽPV genomo pokyčiai**

Epidemiologiniai ir molekuliniai tyrimai parodė, kad gimdos kaklelio vėžio išsivystymui įtakos turi ir genetiniai bei epigenetiniai veiksniai (Lazo, 1999). Dažniausiai genų raiška yra reguliuojama DNR metilinimo būdu. Šio proceso metu metilo grupė yra prijungiama prie citozino bazės, fermento DNR metiltransferazės pagalba. Tokia modifikuota bazė trukdo vyksti genų raiškai, neleisdama prisijungti transkripcijoje dalyvaujantiems baltymams arba pakeisdama chromatino struktūrą. Pastarųjų metų daugelis tyrimų parodė ryšį tarp DNR metilinimo ir įvairių ligų, tarp jų ir vėžio (Kulis ir Esteller, 2010).

ŽPV ilgajame kontroliniame regione (LCR) yra ankstyvųjų genų pratorių sekos, tarp jų ir onkogenų E6 ir E7, transkripcijos stipriklių prisijungimo sritys bei DNR replikacijos pradžios seka (Burd, 2003). Šios srities DNR metilinimas gali būti vienas iš E6 ir E7 genų raiškos reguliavimo būdų. Keletas tyrimų parodė, kad ŽPV 16 tipo LCR srities DNR metilinimo dažnis didėja esant sunkesniems gimdos kaklelio pakitimams (Ding ir kt., 2009; Hong ir kt., 2008; Kalantari ir kt., 2004). Vėžio atveju ŽPV 16 tipo DNR sekos dažnai integruojasi į šeimininko genomą tandeminiais pasikartojimais, kurie yra DNR metilinimo taikiniai (Daniel ir kt., 1995). Manoma, kad toks

ŽPV DNR metilinimas yra kaip šeimininko gynybos mechanizmas prieš svetimą integruotą DNR. Tačiau DNR metilinimas buvo aptiktas ir tarp sveikų asmenų (Ding ir kt., 2009; Hong ir kt., 2008; Kalantari ir kt., 2004). ŽPV 18 tipo atveju DNR metilinimas LCR srityje nebuvo aptiktas (Turan ir kt., 2006; Badal ir kt., 2004).

Kita sritis tiriama kaip DNR metilinimo taikynys yra kapsidės baltymą koduojantis genas L1, esantis prieš LCR sritį. Nustatyta, kad ŽPV 16 ir 18 tipų L1 geno metilinimo dažnis koreliuoja su gimdos kaklelio pakitimų laipsniu (Kalantari ir kt., 2004; Turan ir kt., 2006; Badal ir kt., 2004; Bryant ir kt., 2014). Manoma, kad šios srities metilinimas yra ŽPV integracijos į šeimininko genomą rezultatas (Kalantari ir kt., 2004; Bryant ir kt., 2014; Kalantari ir kt., 2008; Van Tine ir kt., 2004; Kalantari ir kt., 2010).

Paskelbta nedaug duomenų apie kitų ŽPV tipų metilinimo tyrimus. Buvo analizuoti ŽPV 31, 33, 45, 52, 58 genotipai. Juose didesnis metilinimo dažnis aptiktas L1 geno srityje, lyginant su LCR. Kituose aukštos rizikos ŽPV tipuose DNR metilinimas nėra tirtas (Murakami ir kt., 2013; Vasiljevic ir kt., 2014). Žemos rizikos ŽPV tipų (6 ir 11) genomai yra nemetilinti (Ure ir Forslund, 2012; Gall ir kt., 2011). Iki šiol nėra žinoma kaip ląstelių DNR metiltransferazės atpažįsta ŽPV DNR sekas ir koks DNR metilinimo vaidmuo ŽPV infekcijos ciklui.

### **1.7. Imuninės sistemos atsakas į ŽPV**

Daugumai asmenų po ŽPV infekcijos išsivysto stiprus ląstelinis imunitetas, kuris pašalina ląstelių pokyčius, atsiradusius dėl ŽPV. Daliai asmenų išsivysto ir humoralinis imuninis atsakas, kurio metu pasigamina antikūnai prieš viruso kapsidės L1 baltymą. Tačiau antikūnų kiekis dažniausiai būna labai mažas, o atsakas pavėluotas. Taip yra, nes L1 baltymai pradami gaminti tik vėlyvoje infekcijos stadijoje pilnai diferencijuotose epitelio ląstelėse, todėl sunkiai pasiekiami organizmo imuninei sistemai (O'Brien ir Campo, 2003).

ŽPV turi keletą būdų, kaip išvengti pilnaverčio imuninio atsako. ŽPV infekuoja gleivinės ląsteles, o vietinis gleivinių imunitetas nėra toks stiprus ir veiksmingas kaip sisteminis imuninis atsakas. Be to, gleivinių imunitetas yra trumpalaikis, nesusidaro ilgalaikė atmintis, todėl gali įvykti pakartotiniai užsikrėtimai. Taip pat ŽPV infekcijos metu yra gaminami tik nesekretuojami baltymai, jų raiška yra silpna ir vyksta tik organizmo ląstelių branduolyje. Silpnai aktyvinamas yra ir įgimtas imunitetas, nes virusai slopina priešvirusinių citokinų gamybą (Kanodia ir kt., 2007).

Tyrimai su gyvūnais parodė, kad antikūnai gali apsaugoti nuo ŽPV infekcijos, nors organizme infekcijos metu susidaro tik nedideli jų kiekiai. Suleidus vakciną prieš ŽPV, pasigamina daug didesnis antikūnų kiekis nei natūralios infekcijos metu. Virus patekimas į ląsteles vyksta lėtai (mažiausiai 12–14 valandų), todėl po vakcinacijos pasigaminę antikūnai spėja užblokuoti viruso patekimą į ląsteles (Sapp ir Day, 2009).

### **1.8. Vakcinos prieš ŽPV infekciją**

Siekiant apsisaugoti nuo ŽPV buvo sukurtos trys vakcinos. Pirmoji 2006 m. Gardasil vakcina buvo sukurta JAV firmos Merck Sharp & Dohme (MSD). Vakcina apsaugo prieš keturis ŽPV tipus: 16, 18, 6 ir 11. Antroji Cervarix vakcina buvo sukurta 2009 m., Belgijos kompanijos GlaxoSmithKline (GSK). Ši vakcina apsaugo prieš 2 tipus: 16 ir 18. Naujausia Gardasil 9 vakcina sukurta 2014 metais tos pačios JAV kompanijos Merck Sharp & Dohme. Vakcina apsaugo prieš 9 ŽPV tipus (6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52, 58) (Bosch ir kt., 2016). Visos vakcinos sukurtos panaudojant L1 baltymą, kuris formuoja virusą primenančias daleles. Imunizuojant šiomis vakcinomis, pasigamina dideli antikūnų kiekiai (Kjaer ir kt., 2009; Paavonen ir kt., 2009). Tyrimai rodo, kad vakcinos prieš ŽPV suteikia ilgalaikę apsaugą. Nuo pirmosios vakcinos sukūrimo praėjo dešimt metų, visą šį laikotarpį apsauga išlieka. Koks ilgiausias vakcinos veiksmingumo laikas, nėra žinoma (Lehtinen ir Dillner, 2013). Įvairiose šalyse rekomenduojamas įvairus amžius, kada atlikti

vakcinaciją. Neatsižvelgiant į šiuos skirtumus, vakcinaciją reikėtų atlikti prieš prasidedant moters lytiniam gyvenimui (Campo ir Roden, 2010).

### **1.9. ŽPV infekcijos nustatymo metodai**

ŽPV infekcijos nustatymui yra sukurta įvairių citologiniais ir molekulinės biologijos metodais paremtų reagentų rinkinių. Tarpusavyje metodai skiriasi savo specifiškumu ir jautrumu. Tyrimo tikslumui turi įtakos ir mėginio paėmimo metodas, ir vieta, iš kurios paimama medžiaga.

#### **1.9.1. Citologiniai ŽPV infekcijos nustatymo metodai**

Gimdos kaklelio epitelinių ląstelių pokyčiai nustatomi trijų tipų citologiniais metodais: citologiniu tepinėliu (PAP), skystųjų terpių citologinis tyrimas ir kolposkopija su biopsija. 1940 m. PAP testą pasiūlė JAV profesorius G. Papanicolaou. Atliekant testą, specialiu šepetėliu yra paimamos epitelinės ląstelės nuo gimdos kaklelio paviršiaus. Mikroskopu nustatomos jau pakitusios epitelio ląstelės. Priešvėžinėse ląstelėse vyksta daug morfologinių pokyčių, kuriuos padeda aptikti šis testas dar prieš susergant vėžiu (Castle ir kt., 2009). Nuo 2004 m. Lietuvoje vykdoma gimdos kaklelio patologijos atrankinės patikros programa. Programos tikslas – sumažinti sergamumą ir mirtingumą nuo gimdos kaklelio vėžio. Pagal šią programą nemokamai pasitikrinti gali 25–60 m. moterys vieną kartą per trejus metus.

Skystųjų terpių citologinis tyrimas atliekamas nuplaunant gimdos kaklelio ląsteles nuo paėmėjų specialiose terpėse. Tokioje terpėje ląstelės yra atskiriamos nuo gleivių, kraujo ir bakterijų, todėl tepinėlis tampa daug kokybiškesnis, o specialistui lengviau jį vertinti. Dar vienas skystos terpės tyrimo privalumas yra tas, kad iš likusių ląstelių terpėje galima atlikti ŽPV DNR tyrimą (Wilson, 2016). Ruošiant paprastą tepinėlį dalis ląstelių lieka ant paėmėjo, dalis pažeidžiamos, yra daug priemaišų, todėl tyrėjams būna sunku iširti ląsteles, o atsakymas dažnai būna netikslus (Murphy ir kt., 2003).

Kolposkopija yra gimdos kaklelio apžiūrėjimas specialiu optiniu prietaisu – kolposkopu. Prietaisas vaizdą didina 15–50 kartų. Šis metodas

padeda nustatyti tikslią pokyčių vietą, išplitimo laipsnį bei parinkti biopsijos vietą.

Citologiniais metodais nustatomos jau pakitusios epitelinės ląstelės, tačiau ŽPV infekcija nėra nustatoma. Šie metodai yra paplitę ir naudojami gydytojų ginekologų. Tačiau jie yra gana žemo jautrumo ir specifiškumo, bei neidentifikuoja ŽPV genotipų. Nustatyta, kad šiais metodais diagnozuojant vėžinius pakitimus gaunama apie 30 % klaidingai teigiamų rezultatų ir 15–50 % klaidingai neigiamų rezultatų (Castle ir kt., 2009).

### 1.9.2. Serologiniai ŽPV nustatymo metodai

Serologiniais ŽPV nustatymo metodais yra aptinkami antikūnai prieš ŽPV. Antikūnai gali būti aptinkami daugelį metų, todėl taikant serologinius metodus nenustatomas infekcijos laikas. Šių metodų jautrumas ir specifiškumas yra žemas, jais neidentifikuojamas ŽPV genotipas. Jie nėra naudojami ŽPV diagnostikai, tačiau metodai yra tinkami norint įvertinti ŽPV ar vakcinos sukeltą humoralinį imuninį atsaką ar atliekant seroepidemiologinius ŽPV tyrimus (Dillner, 1999; Molijn ir kt., 2005).

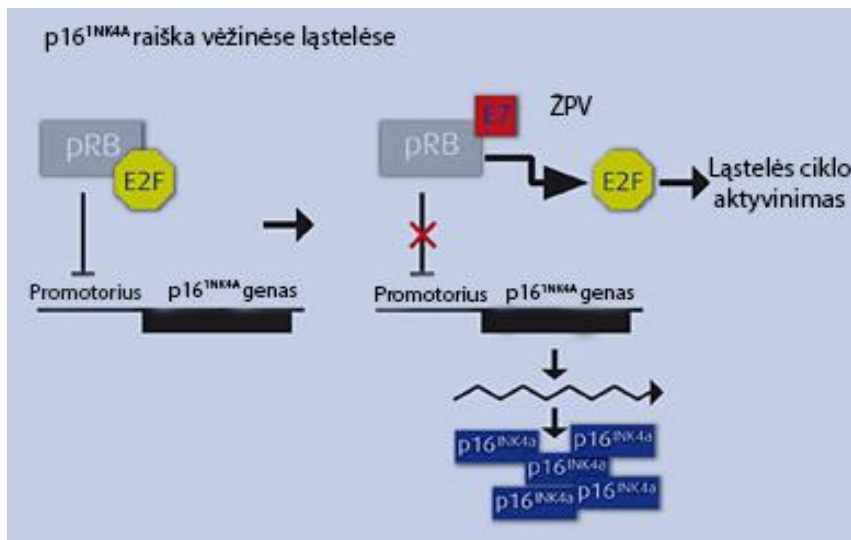
### 1.9.3. Su ŽPV infekcija susiję ląstelių žymenys

Pastaruoju metu intensyviai ieškoma ląstelių žymenų, kurie leistų aptikti dėl ŽPV infekcijos pakitusias ląsteles. Daugiausia tyrimų buvo atlikta su Cdc6, Mcm5, MN ir p16<sup>INK4A</sup> baltymais. Cdc6 ir Mcm5 dalyvauja ląstelės DNR replikacijoje. Vėžinėse ląstelėse šių baltymų raiška suintensyvėja, tačiau jų diagnostinė vertė nedidelė, nes jų raiška vyksta ir normaliose ląstelėse. Baltymas MN yra transmembraninis glikoproteinas, turintis karboanhidrazės domeną. Šis baltymas randamas vėžinėse gimdos kaklelio ląstelėse, tačiau aptinkamas ir kai kuriose normaliose organizmo ląstelėse (Cudzik ir kt., 2006, Murphy ir kt., 2003).

Baltymas p16<sup>INK4A</sup> yra perspektyviausias gimdos kaklelio vėžio diagnostikos žymuo. p16<sup>INK4A</sup> yra vėžio slopiklis, jo raiška suintensyvėja, įvykus ŽPV sukeltai onkogeninei ląstelių transformacijai. Virus E7 baltymas

inaktyvina reguliacinį pRb baltymą. Tuomet prasideda transkripcijos faktoriaus E2F raiška, kuris aktyvina CDKN2A geno raišką. Šio geno koduojamas baltymas ir yra p16<sup>INK4A</sup> (Regauer ir Reich, 2007).

Normaliose ląstelėse baltymas p16<sup>INK4A</sup> inhibuoja cdk4/6 ciklino D komplekso veikimą, todėl baltymas pRb nėra fosforilinamas. Tuomet pRb jungiasi su transkripcijos faktoriumi E2F, kuris yra atsakingas už ląstelės cikle dalyvaujančių baltymų raišką. Infekuotose ląstelėse ŽPV baltymas E7 suardo pRb baltymą, neleidamas jungtis su transkripcijos faktoriumi E2F. Tokios ląstelės pradeda greitai ir netvarkingai dalintis, jose prasideda intensyvi p16<sup>INK4A</sup> baltymo raiška (Ishikawa ir kt., 2006). Baltymo p16<sup>INK4A</sup> raiškos padidėjimas pavaizduotas 5 paveiksle.



**5 pav.** Baltymo p16<sup>INK4A</sup> raiškos pokyčiai ląstelėje, susiję su ŽPV infekcija ([www.perunavitacomeprima.org](http://www.perunavitacomeprima.org)).

Dėl intensyvios p16<sup>INK4A</sup> raiškos, baltymas gali būti naudojamas kaip gimdos kaklelio intraepitelinų pokyčių žymuo. Nustatyta, kad nedideli pakitimai (CIN), kuriuose aptinkama nedidelė p16<sup>INK4A</sup> raiška, dažniau progresuoja į didesnio laipsnio CIN pakitimus (Kalof ir kt., 2006, Ishikawa ir kt., 2006). Taip pat p16<sup>INK4A</sup> raiška yra mažesnė, esant žemos rizikos ŽPV infekcijai. Be to, manoma, kad skirtingose gimdos kaklelio neoplazijos stadijose p16<sup>INK4A</sup> raiška taip pat gali būti skirtingo lygio (Agoff ir kt., 2003).

ŽPV diagnostikos tikslais šio baltymo raišką patogu tirti imunohistocheminiu metodu, kuris yra nesudėtingas ir nereikalauja brangios įrangos.

#### 1.9.4. *In situ* hibridizacija

*In situ* hibridizacijos metodai paremti žymėtų zondų ir ŽPV DNR sąveika. Dažniausiai diagnostinėse laboratorijose naudojamas JAV pagamintas prietaisas „The hybrid Capture II system“, (Digene Corp., JAV) ([www.digene.com](http://www.digene.com)). Šioje sistemoje naudojami pažymėti RNR zondai, kurie jungiasi su taikiniu ŽPV DNR. Sąveikos signalui matuoti naudojami monokloniniai antikūnai ir chemiliuminescencinis substratas. Zondai yra dviejų rūšių: vienu nustatomi žemos rizikos ŽPV genotipai (6, 11, 42, 43 ir 44), kitu – aukštos rizikos genotipai (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 ir 68). Sistema yra patvirtinta FDA ir yra naudojama įvairiose šalyse. „The Hybrid Capture II“ metodas turi keletą trūkumų: nors aukštos ir žemos rizikos ŽPV genotipai atskiriami, tačiau jie neidentifikuojami. Taip pat metodo jautrumas yra gana žemas – ŽPV nustatymo riba yra 5000 kopijų (Dunne ir kt., 2007; Bozzetti ir kt. 2000; Lorincz, 1996).

#### 1.9.5. Polimerazės grandininė reakcija (PGR)

ŽPV infekcijos nustatymui daugelis diagnostinių ir mokslinių laboratorijų naudoja PGR metodą. Aptikus viruso DNR tiriamame mėginyje, PGR metodu galima nustatyti ir ŽPV genotipą. ŽPV tipo nustatymas padeda prognozuoti vėžio atsiradimo riziką, parenkant stebėjimo ir gydymo planą. Taip pat ŽPV tipų paplitimo nustatymas svarbus kuriant vakcinas.

Nukleorūgščių amplifikacijos reakcijos išsiskiria iš kitų diagnostikos metodų savo jautrumu ir specifiškumu. PGR metodu galima aptikti 5 – 10 viruso DNR kopijas (Gravitt ir kt., 2000). 15–20 % moterų, kurioms nebuvo rasta citologinių pakitimų PAP testu, gali būti aptikti aukštos rizikos ŽPV genotipai PGR metodu (Jacobs ir kt., 1999).

ŽPV nustatymui yra naudojami konservatyvūs L1 ir E genų sekų fragmentai. Atlikus daugelio ŽPV DNR sekų palyginimą, nustatytas didelis



heterogeniškumas. Nėra net 15–20 nukleotidų sekos, kuri būtų vienoda tarp visų viruso tipų. Todėl naudojant bendrą ŽPV infekciją nustatančius PGR metodus mėginyje aptinkama tik apie 20 – 50 ŽPV tipų. Šiuo metu yra sukurtos ir dažniausiai įvairiose mokslinėse ir diagnostinėse laboratorijose naudojamos kelios PGR pradmenų sistemos.

1990 m. buvo sukurta GP5 ir GP6 pradmenų sistema, kuria aptinkama 11 ŽPV tipų, tačiau atskiri ŽPV genotipai nėra identifikuojami (Snijders ir kt., 1990). Pradmenys yra komplementarūs L1 geno sekai. Po penkerių metų šių pradmenų sistema buvo modifikuota, prie 3' galo pridodant po tris nukleotidus, taip stabilizuojant pradmenų ir DNR kompleksą (GP5+/GP6+). Šis pradmenų patobulinimas leido aptikti apie 35 skirtingus ŽPV genotipus viename mėginyje (Husman ir kt., 1995). Po trylikos metų GP5+/GP6+ pradmenys buvo modifikuoti dar kartą, siekiant efektyviau nustatyti tam tikrus genotipus. Kai kurie pradmenų nukleotidai buvo pakeisti inozinu, kuris gali sudaryti porą su bet kuriuo nukleotidu ir sistema papildyta didesniu kiekiu pradmenų (8 tiesioginiai ir 2 grįžtamieji). Su šia pradmenų sistema efektyviau nustatomi šie genotipai: 30, 39, 42, 44, 51, 52, 53, 68, 73, 82 (Schmitt ir kt., 2008). Naudojant visas šias PGR pradmenų sistemas yra gaunami 150 bp ilgio DNR fragmentai.

Dar viena pradmenų sistema buvo sukurta 1993 m. Sistemą sudaro vienas tiesioginis CP-I ir du grįžtamieji CP-II<sub>G</sub> ir CP-II<sub>S</sub> pradmenys. Pradmenys yra komplementarūs E1 geno sekai. Aptinkama apie 30 skirtingų ŽPV genotipų, o PGR fragmentų ilgis yra 188 bp (Tieben ir kt., 1993).

1999 m. Švedijoje buvo sukurtas dar vienas pradmenų rinkinys (FAP59/64). Pradmenys yra komplementarūs ŽPV L1 geno sekai. Nustatoma apie 20 skirtingų ŽPV genotipų. PGR produkto ilgis 480 bp (Forslund ir kt., 1999).

1998 m. buvo sukurtas šešių pradmenų rinkinys (spf1/ spf2). Pradmenys yra komplementarūs ŽPV L1 geno sekai. Šiuose pradmenyse kai kurie nukleotidai yra pakeisti inoziniais, kad sudarytų porą su ypač variabiliais viruso

nukleotidais. Autorių duomenimis nustatoma apie 43 skirtingi ŽPV genotipai. PGR produkto ilgis 65 bp (Kleter ir kt., 1998).

1992 m. buvo sukurta 2 pradmenų sistema (MY09/11). Su jais aptinkama apie 30 skirtingų ŽPV tipų. Pradmenys komplementarūs ŽPV L1 geno sekai (Bauer ir kt., 1992). 2000 metais ši sistema buvo modifikuota. Vietoje dviejų pradmenų buvo sukurtas 18 pradmenų rinkinys (PGMY09/11). Sistema sudaryta iš 5 tiesioginių ir 13 grįžtamųjų pradmenų. Ši modifikacija leido padidinti sistemos jautrumą ir specifiškumą. Pradmenys yra komplementarūs L1 geno sekai. Autoriai teigia, kad su ja aptinkama apie 40 skirtingų ŽPV genotipų. PGR produkto ilgis 450 bp (Gravitt ir kt., 2000).

Siekiant nustatyti viruso DNR kopijų skaičių mėginyje, yra naudojama kiekybinė PGR (kPGR). Šiuo metodu yra stebima tiesioginė koreliacija tarp pradinio viruso kiekio mėginyje ir kiekio konkrečiame dauginimo cikle. kPGR metodas turi ir prognostinę reikšmę, nes didėjant viruso DNR kopijų skaičiui, didėja ir vėžio rizika (Ylitalo ir kt., 2000). Nors šis metodas yra specifiškas ir jautrus, tačiau jį yra sudėtinga pritaikyti rutininiam mėginių tikrinimui, nes jam reikalingi brangūs reagentai ir įranga (Biedermann ir kt., 2004).

Aptikus ŽPV infekciją, būtina nustatyti ir viruso genotipą. Virusų genotipų identifikavimas yra svarbus ankstyvajai ŽPV diagnostikai, vėžio prevencijai, epidemiologijai, vakcinų kūrimui. Esant didelės rizikos ŽPV genotipui, padidėja rizika išsivystyti gimdos kaklelio vėžiui (Sotlar ir kt., 2004).

Klinikinės laboratorijos dažniausiai naudoja pačių sukurtas genotipavimo PGR sistemas, kuriose derina pradmenis specifiškus įvairiems ŽPV genotipams. Gaunamų PGR produktų ilgiai turėtų skirtis bent 20 bp (Nishiwaki ir kt., 2008). ŽPV genotipai gali būti nustatomi naudojant ir kPGR metodą (Strauss ir kt., 2000; Cubie ir kt., 2001). Tačiau ŽPV diagnostikoje pritaikyti kPGR metodą yra sudėtinga, nes naudojami ne tik skirtingi pradmenys, bet ir zondai, kuriems reikalingos PGR sąlygos gali skirtis. Todėl metodo optimizavimas dažnai būna sudėtingas, reikalaujantis daug laiko ir darbo sąnaudų (Hart ir kt., 2001).

## 2. MEDŽIAGOS IR METODAI

### 2.1. Medžiagos

25mM MgCl<sub>2</sub>, agarozė, dATP, dTTP, dGTP, dCTP, dUTP, DNR dažas – 6x Orange Loading Dye Solution, 6x Loading Dye, DNR endonukleazė (DNazė I), DNR molekulinės masės standartai – O'GeneRuler™ Low Range, O'GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder, GeneRuler™ 1kb DNA Ladder Plus, Fast Digest restrikcijos endonukleazių buferininis tirpalas, glikogenas (20 mg/μl), Hot Start PGR buferinis tirpalas (10x), IPTG (izopropil-beta-D-tiogalaktopiranozidazė), jaučio serumo albuminas (BSA), Maxima™ Probe qPCR MasterMix (2x) mišinys, Maxima™ Hot Start *Taq* DNR polimerazė, Poly(A), proteinazė K (20 mg/ml), ribonukleazių inhibitorius – RiboLock™ Rnase Inhibitor, RNR dažas – 2x RNA Loading Dye, RNR molekulinės masės standartas – RiboRuler™ High Range RNA Ladder, SapI restrikcijos endonukleazė, sterilus, be nukleazių vanduo, T4 DNR ligazė ir buferinis tirpalas, uracil – DNR glikozilazė (Thermo Fisher Scientific Baltics, Lietuva).

8-oksichinolinas, cinko chloridas, gentamicino sulfatas, izopropanolis, ksileno cianolis, laurilo sarkozilas, L-glutaminas, ličio chloridas (LiCl), metanolis, saponinas, tartrazinas, Tri-(hidroksimetil)-aminometanas (Tris) (Sigma, JAV).

Amonio acetatas (CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>), chloroformas, dimetilsulfoksidas (DMSO), etidžio bromidas, fenolis (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>OH), glicerolis, kalcio chloridas (CaCl<sub>2</sub>), kalio chloridas (KCl), kalio divandenilio fosfatas (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), natrio acetatas (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>), natrio chloridas (NaCl), natrio citratas (NaH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>), natrio hidrofosfatas (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), natrio hidroksidas (NaOH), (Roth, Vokietija).

Ampicilinas (AppliChem, Vokietija).

Betainas, etilendiamintetraacto rūgštis (EDTA) (Fluka, Vokietija).

Druskos rūgštis (HCl) (VWR International, Anglija).

Etanolis 96 % (Vilniaus degtinė, Lietuva).

Fetalinis veršiuko serumas (FS) (Biochrom, Vokietija).

Guanidino tiocianatas ( $\text{NH}_2\text{C}(\text{NH})\text{NH}_2\text{CHNS}$ ) (Serva, Vokietija).

### 2.1.1. Terpės ir tirpalai

#### Urogenitalinių nuograndų ir burnos mėginių transportavimo terpės:

Urogenitalinių nuograndų mėginių transportavimo terpė (22 % etanolis, 3 % metanolis, 18 % izopropanolis, 100 mM natrio acetatas, 150 mM natrio chloridas, 5 mM EDTA; 0,005 % saponinas, 0,2 % cinko chloridas).

BD SurePath – urogenitalinių nuograndų mėginių transportavimo terpė (BD Bioscience, JAV).

Cymol – burnos epitelinių ląstelių transportavimo terpė (Copan, Italija).

#### Ląstelių ir *E.coli* bakterijų augimui naudojamos terpės ir tirpalai:

Agarizuota LB terpė (pH = 7) (1 % peptono, 0,5 % mielių ekstrakto, 0,5 % NaCl, 2 % agaro).

LB terpė (pH = 7) (1 % peptono, 0,5 % mielių ekstrakto, 0,5 % NaCl).

Ląstelių auginimo terpė (RPMI-1640 terpė su 2 mM L-glutamino, 200 µg/ml gentamicino, 10 % FS).

Neseruminė terpė (RPMI-1640 terpė su 2 mM L-glutamino, 200 µg/ml gentamicino).

Fosfatinis buferinis tirpalas (PBS) (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1,8 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH = 7,2).

Tripsino tirpalas (0,05 % tripsino, 0,02 % EDTA, PBS, pH 7,2).

Fiziologinis tirpalas (0,15 M NaCl).

#### *E.coli* kompetentinių ląstelių ruošimui naudoti tirpalai:

$\text{CaCl}_2$  tirpalas (5 mM Tris-HCl (pH = 7,4–8,0), 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 100 mM  $\text{CaCl}_2$ ).

NaCl tirpalas (5 mM Tris-HCl (pH = 7,4–8,0), 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 100 mM NaCl).

#### DNR elektroforezės tirpalai:

Tris acetatinis elektroforezės buferinis tirpalas (TAE) (40 mM Tris, 20 mM acto rūgštis, 1 mM EDTA, pH 8,0)

Agarozės tirpalai (1–2 % agarozės TAE buferiniame tirpale)

Etidžio bromido tirpalas (10 mg/ml)

RNR ir DNR gryninimo tirpalai:

Ličio chlorido tirpalas (0,1 M LiCl tirpalas TE buferiniame tirpale)

LysSol tirpalas (4 M guanidino tiocianatas, 25 mM natrio citratas pH 7, 0,5 % laurilo sarkozilas)

NaSol tirpalas (2 M natrio acetatas pH 4,0)

SepSol (vandeniu prisotintas fenolio tirpalas, turintis 0,1 % 8-oksichinolino, sumaišytas su chloroformu, santykiu 5:1)

TE buferinis tirpalas (10 mM Tris, 1 mM EDTA)

### 2.1.2. Rinkiniai

DNR gryninimo iš klinikinių mėginių rinkiniai:

*Sorpo clean<sup>TM</sup> Genomic DNA Extraction Module* (UAB Sorpo, Lietuva)

*GeneJET<sup>TM</sup> Genomic DNA Purification Kit* ir *MagJET Genomic DNA Kit* (Thermo Fisher Scientific Baltics, Lietuva).

DNR fragmentų po PGR reakcijos gryninimo rinkiniai:

*DNA Extraction Kit, GeneJET<sup>TM</sup> PCR Purification Kit* ir *Gene JET Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit* (Thermo Fisher Scientific Baltics, Lietuva).

DNR fragmentų įterpimo į vektorių rinkinys:

*CloneJET<sup>TM</sup> PCR Cloning Kit* (Thermo Fisher Scientific Baltics, Lietuva).

Plazmidžių gryninimo rinkinys:

*GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (Thermo Fisher Scientific Baltics, Lietuva).

kDNR sintezės nuo RNR rinkiniai:

*Maxima First Strand cDNR Synthesis Kit for RT-qPCR* ir *RevertAid<sup>TM</sup> Premium First Strand cDNA Synthesis Kit* (Thermo Fisher Scientific Baltics, Lietuva).

DNR metilinimo nustatymo rinkinys:

*DNA Methylation-Gold Kit* (Zymo Research, JAV).

### 2.1.3. Pradmenų sistemos

Darbe naudoti pradmenys buvo susintetinti ir gauti iš *Metabion International AG* (Vokietija). GP5+/GP6+ ir PGMY09/11 sistemų pradmenys buvo pasirinkti remiantis literatūros duomenimis (Husman ir kt., 1995; Gravitt ir kt., 2000). HR\_HPВ sistemos pradmenys buvo sukurti bendradarbiaujant UAB „Thermo Fisher Scientific Baltics“ (dr. V. Pependikytė) ir VU Biotechnologijos institutui, vykdant LMT finansuojamą projektą „ŽPV diagnostika“ (Simanaviciene ir kt., 2015). Minėtų PGR sistemų amplifikuojama ŽPV vieta ir PGR produktų ilgiai nurodyti 3 lentelėje.

**3 lentelė.** ŽPV infekciją nustatančių PGR sistemų apibūdinimas.

Pradmenys	Amplifikuojama ŽPV genomo vieta	PGR produkto ilgis (bp)	Nuoroda
GP5+/GP6+	L1	150	Husman ir kt., 1995
PGMY09/11	L1	450	Gravitt ir kt., 2000
HR_HPВ	L1	430	Naujai sukurta pradmenų sistema (Simanaviciene ir kt., 2015)

Dauginėse PGR sistemose buvo naudojama 16 pradmenų porų, su kuriomis nustatoma 16 aukštos rizikos ŽPV tipų. Visi pradmenys pasirinkti remiantis literatūros duomenimis ir sugrupuoti į keturias daugines PGR sistemas (Pependikyte ir kt., 2008). Nustatomi ŽPV genotipai pateikti 4 lentelėje.

**4 lentelė.** Dauginių PGR sistemų apibūdinimas

Dauginės PGR sistemos	ŽPV genotipai	PGR produkto ilgis, bp
ŽPV MM-1	ŽPV 16	481
	ŽPV 18	346
	ŽPV 39	253
	ŽPV 58	152
ŽPV-MM-2	ŽPV 52	541
	ŽPV 33	422
	ŽPV 56	354
	ŽPV 31	287
ŽPV-MM-3	ŽPV 35	448
	ŽPV 68	357
	ŽPV 59	239
	ŽPV 45	175
ŽPV-MM-4	ŽPV 82	623
	ŽPV 73	424
	ŽPV 66	301
	ŽPV 51	247

Pradmenys ir zondai, naudoti p16<sup>INK4A</sup> RNR raiškos tyrimuose, pateikiami 5 ir 6 lentelėse. Visi pradmenys ir zondai buvo sukurti bendradarbiaujant UAB „Thermo Fisher Scientific Baltics” (dr. V. Pependikytė) ir VU Biotechnologijos institutui, vykdam projektą „ŽPV diagnostika“, naudojant Primer3 programą (<http://biotools.umassmed.edu>) (Simanaviciene ir kt., 2011).

**5 lentelė.** p16<sup>INK4A</sup> genui specifiniai pradmenys.

Pradmenys	PGR produkto ilgis (bp)	Pradmenų sekos, 5'-3'
Inkfor-3/Inkrev-3	294	GGGTCGGGTAGAGGAGGTG CTCCTCAGCCAGGTCCAC
Ink4for-1/Ink4rev-1	140	AATAAATCATAAGCCCAACGCACCGAATAG AATAAATCATAAACGGGTGCGGTGAGAGTG
Ink4for-2/Ink4rev-2	147	AATAAATCATAAGAGGCCGATCCAGGTCAT AATAAATCATAAACAGCGTGTCCAGGAAG

**6 lentelė.** Zondai, naudoti kPGR reakcijoje, skirtoje tirti p16<sup>INK4A</sup> RNR raišką.

Zondai	Zondų sekos, 5'-3'
Inkprobe-1	FAM-GAGTGGCGGAGCTGCTGCTC-TAMRA
Inkprobe-2	FAM-CACTCTACCCGACCCGTGCAC-TAMRA
Integrinas	JOE-AATCTTGGTCCTCACACTCCCTTGC-TAMRA
GAPDH	JOE-CCAACCTTAGCACCCCTGGCC-TAMRA

ŽPV tyrimams naudoti vidinių kontrolių genams ( $\beta$  globino genas, prostatos specifinio geno 5 egzonas, integrinas, GAPDH) specifiniai pradmenys, pateikiami 7 lentelėje. Pradmenys buvo sukurti bendradarbiaujant UAB „Thermo Fisher Scientific Baltics” (dr. V. Pependikytė) ir VU Biotechnologijos institutui, vykdant projektą „ŽPV diagnostika“, naudojant Primer3 programą (<http://biotools.umassmed.edu>) (Simanaviciene ir kt., 2015, Simanaviciene ir kt., 2011).

**7 lentelė.** Vidinių kontrolių genams specifiniai pradmenys.

Pradmenys	PGR produkto ilgis (bp)	Pradmenų sekos, 5'-3'
IC(435)F IC(1238)R	803	TCTCTCTTCTCCAAAGCTG GTCCAGTCCCTCTCCTTACT
$\beta$ -gloF/ $\beta$ -gloR1	650	AACTGTTGCTTTATAGGATTTT AGGAGCTTATTGATAACCTC
$\beta$ -gloF/ $\beta$ -gloR2	850	AACTGTTGCTTTATAGGATTTT ATTGACAAGAACAGTTTGAC
Integrinas	120	GGGTCGGGTAGAGGAGGTG CTCCTCAGCCAGGTCCAC
GAPDH	200	AATAAATCATAAGCCCAACGCACCGAATAG AATAAATCATAAACGGGTTCGGGTGAGAGTG

ŽPV DNR metilinimo tyrimuose naudoti pradmenys pateikiami 8 lentelėje. ŽPV 16 ir 18 genotipų 3' L1 ir LCR DNR regionams amplifikuoti buvo naudojama po 3 poras pradmenų, kurios pasirinktos pagal literatūros duomenis (Kalantari ir kt., 2004; Badal ir kt., 2004). ŽPV 51 genotipo tyrimams buvo naudotos 4 poros pradmenų, kurie sukurti naudojant MethPrimer Design programą (<http://www.urogene.org/methprimer/>) (Simanaviciene ir kt., 2015).

**8 lentelė.** ŽPV 16, 18 ir 51 genotipų L1 ir LCR regionų DNR amplifikacijai naudoti pradmenys.

Pradmenys	ŽPV genomo vieta (nt)	PGR produkto dydis (bp)	Pradmenų sekos, 5'-3'
16msp3F	7049-7078	541	AAGTAGGATTGAAGGTAAATTTAAATTTA
16msp3R	7590-7560		AACAAACAATACAAATCAAAAAACAAAAA
16msp4F	7465-7493	125	TATGTTTTTTTGGTATAAAATGTGTTTTT
16msp4R	7732-7703		TAAATTAATTTAAACAAACCAAAAATATAT
16msp5F	7748-7777	267	TAAGGTTTAAATTTTTAAGGTTAATTAAT



16msp5R	115-86		ATCCTAAAACATTACAATTCTCTTTTAATA
18msp6F	6847-6871	339	TTATTAGTTTGGTGGATATATATTG
18msp6R	7186-7161		AAAACATACAAACACAACAATAAATA
18msp10F	7282-7293	465	TAAAATATGTTTTGTGGTTTTGTG
18msp10R	7747-7721		ATAATTATACAAACCAAATATACAAT
18msp8F	7753-7781	333	TGTTTAATATTTTGTTTATTTTAATATG
18msp8R	186-161		TATCTTACAATAAAAATATTCAATTCC
51msp1F	6848-6874	216	AATATAAATTTTGGGATGTTGATTTAA
51msp1R	7064-7038		ATTCACAAACATACAAAACTAACATA
51msp2F	7139-7165	186	TGTATGTATGAGTTATGTATGTTTATT
51msp2R	7354-7326		ACTACAAAATATAACTAAATAACACAAAT
51msp3F	7325-7353	314	TATTTGTGTTATTTAGTTATATTTTGTAG
51msp3R	7639-7553		ATACCAAAAATACATACCTATAAACA
51msp4F	7668-7696	331	AGGTAAATATTATGTTTTTAGTGTTAA
51msp4R	99-72		CATAATATTCAACTATACTTTTACCACT

#### 2.1.4. HeLa, CaSki ir CHO ląstelių linijos

Įvairiuose ŽPV tyrimo etapuose buvo naudojama DNR, išgryninta iš HeLa (ATCC NR. CCL-2) ir CaSki (ATCC NR. CRL-1550) ląstelių linijų. HeLa ir CaSki yra gimdos kaklelio vėžio ląstelių linijos su į genomą integruota atitinkamai ŽPV 18 ir 16 genotipų DNR. Šios ląstelių linijos auginamos ir saugomos VU Biotechnologijos institute, Imunologijos ir ląstelės biologijos skyriuje.

Iš kiniško žiurkėno kiaušidžių ląstelių linijos CHO (ATCC NR. CCL-61) išskirta RNR buvo naudojama p16<sup>INK4A</sup> ir integrino geno transkriptų skiedimui kPGR reakcijoje, siekiant išvengti titravimo paklaidų. Ląstelių linija saugoma VU Biotechnologijos instituto, Imunologijos ir ląstelės biologijos skyriuje.

#### 2.1.5. pTZ57R plazmidė, λ DNR ir *E.coli* ląstelės

pTZ57R plazmidė gauta iš „Thermo Fisher Scientific Baltics“. Į plazmides buvo įklonuoti DNR fragmentai, gauti amplifikuojant p16<sup>INK4A</sup> ir integrino genų DNR. Nuo plazmidžių su integruotais DNR fragmentais buvo sintetinami RNR transkriptai, kurie buvo naudojami p16<sup>INK4A</sup> RNR raiškos

tyrimuose. p16<sup>INK4A</sup> ir integrino RNR fragmentų sukūrimui buvo naudojamos *E.coli* DH10B kamienas.

Teigiama kontrole klinikinių mėginių ŽPV genotipavimo tyrimuose buvo naudota  $\lambda$  (lambda) DNR su įklonuotais atitinkamų ŽPV genotipų DNR sekomis, kuri gauta iš „Thermo Fisher Scientific Baltics“.

#### 2.1.6. Klinikiniai mėginiai

Urogenitalinių nuograndų mėginiai su žinoma citologine ir histologine diagnoze bei gerklų vėžio epitelinių ląstelių mėginiai buvo gauti iš Nacionalinio vėžio instituto (NVI). Tyrime dalyvaujantys asmenys pasirašė Asmens informavimo ir Informuoto asmens sutikimo formas. Lietuvos bioetikos komiteto leidimas atlikti tyrimą gautas 2009-06-03, Nr. 158200-6-062-16. Tyrime dalyvaujantiems asmenims buvo imamos plokščiojo epitelio ląstelės nuo gimdos kaklelio sienelių bei gerklų pažeidimų.

Kita urogenitalinių nuograndų ir burnos epitelio ląstelių mėginių grupė buvo surinkta Lietuvos sveikatos mokslų universitete (LSMU) iš sveikų asmenų, dalyvaujančių LSMU Endokrinologijos instituto vykdomame projekte „Hormoninės kontracepcijos poveikis metaboliniams, androgenų koncentracijos, kraujo krešumo parametrų, psichologiniams bei seksualinės funkcijos pokyčiams moters organizme“ bei iš atsitiktinių moterų, atėjusių ginekologo konsultacijai. Tyrime dalyvavo 18–40 metų amžiaus sveikos moterys, nesergančios lėtinėmis neinfekcinėmis ir lėtinėmis ar ūminėmis infekcinėmis ligomis. LSMU buvo surinkti ir atsitiktinių, tyrime dalyvauti pakviestų vyrų, burnos epitelio ląstelių mėginiai (18–40 metų amžiaus). Visi tiriamieji pasirašė Asmens informavimo ir Informuoto asmens sutikimo formas. Kauno regioninio biomedicinos tyrimų etikos komiteto leidimas atlikti biomedicininį tyrimą gautas 2013-02-11, Nr. B-2-14.

#### 2.1.7. Įranga

Centrifuga 4524R (Eppendorf, Vokietija)

Centrifugos: J2-21, J2-6 (Beckman, JAV)

Diuro indai (Biocane 47, JAV)  
DNR elektroforezės aparatai (Cleaver, UK; Sigma, UK)  
Gradientinis termocikleris (Eppendorf, Vokietija)  
Inversinis mikroskopas (Olympus, Japonija)  
Laminariniai boksai (Gelaire, Prancūzija; Labgard, JAV; Thermo Scientific, JAV)  
Ląstelių skaičiavimo kamera (Sigma, JAV)  
Mėgintuvėlių maišyklė (VortexGenie, JAV)  
Mėgintuvėlių termostatas (Hettich, Vokietija; Eppendorf, Vokietija)  
Mini centrifuga (Eppendorf, Vokietija)  
Purtyklė (Certomat, Prancūzija)  
Realaus laiko termocikleris *Rotor-Gene 6000* (Corbett Research, Vokietija)  
Spektrofotometras *NanoDrop* (Thermo Scientific, JAV)  
Svarstyklės (Ohaus Scout Pro, JAV)  
Termocikleris (Applied Biosystems, JAV; Biometra, Vokietija)  
Termostatas (Mettler, Vokietija)  
Transiluminatorius (“ULTRA-LUM”, JAV)  
Vandens termostatas (MLW, Vokietija)

## 2.2. Tyrimo metodai

### 2.2.1. HeLa, CaSki ir CHO ląstelių atšildymas ir auginimas

Ampulė su užšaldytais ląstelėmis atšildoma kambario temperatūroje ir jos turinys supilamas į 10 ml DMEM terpę be serumo. Ląstelės centrifuguojamos 5 min, esant 1000 aps./min greičiui. Nucentrifuguotos ląstelės perkeliama į auginimo terpę, suskaičiuojamos naudojant ląstelių skaičiavimo kamerą ir užsėjamos į auginimo indus. Ląstelės skaičiuojamos pagal pateiktą formulę: ląstelių kiekis =  $(B \times V \times A \times 10^6) / (15 \times 4)$ , kur B – suskaičiuotų ląstelių skaičius skaičiavimo kameroje, A – mėginio skiedimas kartais, V – mėginio tūris. Užsėjamų ląstelių tankis:  $1 \times 10^5 - 5 \times 10^5$  ląstelių/ml. Toliau ląstelės auginamos 5 % CO<sub>2</sub> inkubatoriuje, 37 °C temperatūroje. Ląstelės persėjamos kas 2–4 dienas, naudojant tripsiną. Nuo ląstelių augimo

terpė nupilama, ląstelės praplaunamos 10 ml fiziologinio tirpalo. Fiziologinis tirpalas nupilamas ir užpilama 5 ml tripsino tirpalo. Šis tirpalas laikomas kelias minutes, kol stebint mikroskopu, pasirodo ląstelių slinkimo požymiai. Ant ląstelių suspensijos užpilama 10 ml augimo terpės ir centrifuguojama 5 min, esant 1000 aps./min greičiui. Nucentrifuguotos ląstelės suspenduojamos augimo terpėje, suskaičiuojamos ir persėjamos į kitus augimo indus.

### 2.2.2. Klinikinių mėginių rinkimas ir DNR gryninimas

Gimdos kaklelio ir gerklų epitelinės ląstelės surinktos NVI buvo imamos šluotele, kurios galvutė dedama į mūsų paruoštą transportavimo terpę (22 % etanolis, 3 % metanolis, 18 % izopropanolis, 100 mM natrio acetatas, 150 mM natrio chloridas, 5 mM EDTA; 0,005 % saponinas, 0,2 % cinko chloridas). LSMU gimdos kaklelio epitelinių ląstelių paėmimui buvo naudojama komercinė transportavimo terpė (BD SurePath, BD Bioscience). Burnos epitelinės ląstelės buvo imamos specialiu šepetėliu, kuris įmerkiamas į komercinę transportavimo terpę (Cymol, Copan).

DNR gryninimui iš urogenitalinių nuograndų, gerklų navikų bei burnos epitelinių ląstelių ėminių buvo naudojami šie komerciniai rinkiniai: „Sorpo clean™ Genomic DNA Extraction Module“ (UAB „Sorpo“, Lietuva), „GeneJET™ Genomic DNA Purification Kit“ (Thermo Fisher Scientific Baltics, Lietuva), „MagJET Genomic DNA Kit“ (Thermo Fisher Scientific Baltics, Lietuva). DNR gryninimui iš HeLa ir CaSki ląstelių buvo naudojamas „GeneJET™ Genomic DNA Purification Kit“ (Thermo Fisher Scientific Baltics, Lietuva) komercinis rinkinys. DNR gryninimas atliekamas pagal gamintojų pateiktus protokolus.

### 2.2.3. DNR ir RNR koncentracijos matavimas

Išgrynintos DNR ir RNR koncentracija ir grynumas matuojamas naudojant spektrofotometrą NanoDrop (Thermo Scientific, JAV). Kontroliniam matavimui naudojamas sterilus be nukleazių vanduo. Ant kiuvetės lašinama 1 µl mėginio tūrio. Matavimas atliekamas esant 260 ir 280

nm bangos ilgių sugerties intensyvumui. Kompiuterinė programa pateikia mėginio DNR ir RNR koncentraciją (ng/μl) ir sugerties intensyvumo santykį esant 260 ir 280 nm bangos ilgiams. Tuo būdu nustatomas DNR ir RNR grynumas.

#### 2.2.4. Polimerazinė grandininė reakcija (PGR)

PGR metodas buvo naudojamas nustatyti bendrąją ŽPV infekciją, DNR pagausinimui po bisulfitinės modifikacijos, bei *E.coli* rekombinantinių klonų patikrinimui p16<sup>INK4A</sup> RNR raiškos tyrime. Į PGR reakcijos mišinį dedamas 10x koncentruotas Hot Start PGR buferinis tirpalas, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM dNTP/dUTP tirpalo, 1 v/μl uracil-DNR glikozilazė, 5 v/μl Hot Start DNR polimerazė, atitinkami pradmenys, vidinės kontrolės genams specifiniai pradmenys, reakcijos priedai (betainas, DMSO, BSA), 2 % tartrazinas, 0,4 % ksileno cianolis ir sterilus, be nukleazių vanduo iki galutinio 22 μl PGR mišinio tūrio. Į PGR reakcijos mišinį dedama 3 μl tiriamos DNR tirpalo. Reakcija vykdoma „Applied Biosystems” DNR amplifikatoriuje pagal optimalias sąlygas. Visų darbe naudotų PGR reakcijų optimalūs komponentai ir reakcijų sąlygos nurodytos 3.1., 3.3. ir 3.4.1. skyreliuose.

#### 2.2.5. Dauginė polimerazinė grandininė reakcija

Dauginė PGR buvo naudojama 16 aukštos rizikos ŽPV genotipų nustatymui. Buvo naudojamos 4 optimizuotos dauginės PGR sistemos (MM-1, MM-2, MM-3, MM-4), kuriomis nustatomi šie ŽPV genotipai: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82 (Pependikyte ir kt., 2008). Į PGR reakcijos mišinį dedamas 10x koncentruotas Hot Start PGR buferinis tirpalas (1x galutinė koncentracija), 25 mM MgCl<sub>2</sub> (3 mM galutinė koncentracija), 2 mM dNTP/dUTP tirpalo (0,2 mM galutinė koncentracija), 1 v/μl uracil-DNR glikozilazė (0,01 v/μl galutinė koncentracija), 5 v/μl Hot Start DNR polimerazė (1,25 v reakcijoje), ŽPV genotipams komplementarūs pradmenys, priedai (betainas, BSA), 2 % tartrazinas (galutinė koncentracija 0,03 %), 0,4 % ksileno cianolis (galutinė koncentracija 0,004 %) ir sterilus, be nukleazių vanduo iki

galutinio 22 µl PGR mišinio tūrio. Į reakciją dedama 3 µl DNR tirpalo, išgryninto iš klinikinių mėginių. Visų genotipavimo PGR reakcijų optimalūs komponentai ir reakcijų sąlygos nurodytos 3.1.2. skyrelyje.

#### 2.2.6. DNR elektroforezė

Priklausomai nuo eksperimento, DNR elektroforezė buvo vykdoma 1–2 % agarozės geliuose. Į pasiruošto gelio šulinėlius įnešama po 12 µl PGR reakcijos produkto. Elektroforezė vykdoma apie 45 min, naudojant 10 V/cm įtampą. DNR fragmentų analizei naudoti „O‘GeneRuler™ 50 bp DNR“ ir „O‘GeneRuler™ Low Range“ (Thermo Fisher Baltics, Lietuva) fragmentų ilgio standartai. Po elektroforezės agarozės geliai analizuojami transiluminatoriaus („ULTRA-LUM“) aparatu ultravioletinėje šviesoje (320 nm).

#### 2.2.7. Bisulfitinė DNR modifikacija ir DNR sekoskaita

DNR mėginių, išskirtų iš gimdos kaklelio urogenitalinių nuograndų, bisulfitinė modifikacija buvo atliekama naudojant „DNA Methylation-Gold Kit“ (Zymo Research, JAV) rinkinį, pagal gamintojo rekomendacijas. Modifikuota DNR laikoma -20 °C temperatūroje. Toliau atliekamas tiriamųjų ŽPV DNR fragmentų padauginimas. PGR komponentai ir sąlygos nurodytos 3.3. skyrelyje. Gautų PGR produktų seka nustatoma atliekant DNR sekoskaitą VU Biotechnologijos instituto DNR sekoskaitos centre, naudojant „BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit“ (Thermo Fisher Scientific Baltics, Lietuva) rinkinį ir „3730xl DNA Analyzer“ (Thermo Fisher Scientific, JAV) sekoskaitos aparatą.

#### 2.2.8. RNR gryninimo metodas naudotas p16<sup>INK4A</sup> raiškos tyrimui

RNR iš urogenitalinių nuograndų ėminių buvo išgryninta naudojant anksčiau aprašytą metodą (Chomczynski ir Sacchi, 1987). Pateikiamas aprašymas:

1. Į mėgintuvėlį su urogenitalinių nuograndų ląstelėmis įpilama 400 µl LysSol tirpalo ir 50 µl sterilaus, be nukleazių vandens. Maišoma 5 min kambario temperatūroje.
2. Įpilama 50 µl NaSol tirpalo ir gerai sumaišoma.
3. Įpilama 500 µl SepSol tirpalo, maišoma 4–5 min kambario temperatūroje ir dedama 15 min į ledo vonią.
4. Mėgintuvėlis su RNR ir tirpalais centrifuguojamas 12000 x g greičiu 15 min, 4 °C temperatūroje.
5. Viršutinis sluoksnis pernešamas į naują mėgintuvėlį, įpilamas lygus tūris chloroformo, maišoma 5 s ant maišyklės, centrifuguojama 12000 x g greičiu 5 min, 4 °C temperatūroje.
6. Viršutinis sluoksnis pernešamas į naują mėgintuvėlį, pilama 5 M amonio acetato tirpalo iki galutinės 0,25 M koncentracijos, 2,5 tūrio etanolio ir 3 µl glikogeno, viskas sumaišoma. Toks tirpalas paliekamas -20 °C temperatūroje 10–12 h, arba -70 °C temperatūroje 1 h. Šiame etape yra išsodinama RNR. Mėgintuvėlyje esanti likusi interfazė ir organinė fazė naudojama DNR gryninimui.
7. Po inkubacijos RNR centrifuguojama esant 12000 x g greičiui 20 min, 4 °C temperatūroje.
8. RNR praplaunama 200–300 µl 75 % etanoliu, centrifuguojama esant 12000 x g 10 min, 4 °C temperatūroje. Nusiurbiamas plovimo tirpalas.
9. RNR nuosėdos džiovinamos 65 °C temperatūroje 1–2 min ir tirpinamos steriliame be nukleazių vandenyje (15 µl). RNR laikoma -70 °C temperatūroje.

#### 2.2.9. DNR gryninimo metodas naudotas p16<sup>INK4A</sup> RNR raiškos tyrimui

Į mėgintuvėlį su organine faze ir interfaze (RNR gryninimo 6 etapas) įpilama 100 µl 2M LiCl. Maišoma 10–15 min kambario temperatūroje. Centrifuguojama 12000 x g greičiu 5 min, 4 °C temperatūroje. Supernatantas nupilamas ir užpilami 2 tūriai etanolio. Mėgintuvėlis paliekamas per naktį -20 °C temperatūroje. Centrifuguojama 12000 x g greičiu 10 min, 4 °C

temperatūroje. Supernatantas pašalinamas, o DNR nuosėdos ištirpinamos 20 µl TE buferiniame tirpale (Chomczynski ir Sacchi, 1987).

#### 2.2.10. Kiekybinė polimerazinė grandininė reakcija (kPGR)

Kiekybinė PGR buvo naudojama siekiant nustatyti p16<sup>INK4A</sup> geno raišką klinikiniuose mėginiuose. Į PGR mišinį dedama Maxima<sup>TM</sup> Probe qPCR MasterMix (Thermo Fisher Scientific Baltics, Lietuva) mišinys iki galutinės 1x koncentracijos, p16<sup>INK4A</sup> DNR komplementarūs pradmenys Ink4for-2 ir Ink4rev-2 iki 0,4 µM koncentracijos, Ink4-2 zondas iki 0,25 µM koncentracijos, vidinei kontrolei integrinui specifiniai pradmenys iki 0,2 µM koncentracijos, integrino zondas iki 0,15 µM koncentracijos, uracil-DNR glikozilazė iki 0,01 v/µl koncentracijos, sterilus vanduo be nukleazių iki 23 µl galutinio tūrio ir 2 µl kDNR, susintetinta nuo RNR, išskirtos iš urogenitalinių nuograndų mėginių. Reakcija vykdoma šiuo režimu: 50 °C – 2 min (kryžminių reakcijų prevencija), 95 °C – 7 min (Hot Start *Taq* polimerazės aktyvacija), 40 ciklų DNR amplifikacijai: 95 °C – 30 s; 55 °C – 20 s (pradmenų prilydymas); 72 °C – 20 s. kPGR atliekamas naudojant *Rotor-Gene 6000* (Corbett Research, Australija) amplifikatorių.

#### 2.2.11. RNR elektroforezė

Prieš vykdant RNR elektroforezę, vonelė ir sudedamosios dalys gerai išplaunamos ir inkubuojamos 0,2 M NaOH tirpale 10 min. RNR elektroforezė atliekama 1 % agarozės gelyje su esančiu 1–0,2 µg/ml etidžio bromidu. Į pasiruošto gelio šulinėlius įnešama 2 µl išgrynintos RNR su sumaišytu 2 µl RNR dažu „2x RNA Loading Dye“ (Thermo Fisher Scientific Baltics, Lietuva). RNR fragmentų analizei naudoti „RiboRuler High Range“ (Thermo Fisher Scientific Baltics, Lietuva) fragmentų ilgio standartai, kuris prieš RNR elektroforezę inkubuojamas +70 °C temperatūroje 10 min ir po to 1–2 min atšaldomas ledo vonioje. Elektroforezė vykdoma apie 45 min, naudojant 10 V/cm įtampą. Po elektroforezės agarozės geliai analizuojami



transiliuminatoriaus („ULTRA-LUM“) aparatu ultravioletinėje šviesoje (320 nm).

#### 2.2.12. Kopijinės DNR (kDNR) sintezė

Siekiant padauginti p16<sup>INK4A</sup> ir integrino DNR fragmentus kPGR metodu, nuo išskirtos totalinės RNR iš klinikinių mėginių ir sukurtų p16<sup>INK4A</sup> ir integrino RNR transkriptų buvo sintetinama kDNR. kDNR sintezei naudoti šie komerciniai rinkiniai: „RevertAid<sup>TM</sup> Premium First Strand cDNA Synthesis Kit“ ir „First Strand cDNR Synthesis Kit for RT-qPCR“ (Thermo Fisher Scientific Baltics, Lietuva). kDNR sintezės reakcija vykdyta pagal gamintojo rekomendacijas. Vykiant kDNR sintezę nuo totalinės RNR, į reakcijos mišinį įnešta po 2 µg RNR.

#### 2.2.13. DNR fragmentų išskyrimas iš agarozės gelio

Iš agarozės gelio buvo išskiriami, padauginti su specifiniais pradmenimis, p16<sup>INK4A</sup> ir integrino DNR fragmentai, kurie toliau buvo įterpti į pTZ57R/T vektorius. Paruošiamas 1% agarozės gelis su plačiais šulinėliais (1,5 cm). Į agarozės šulinėlius įnešama PGR metodu padaugintos DNR nuo HeLa ląstelių genomo ir atliekama elektroforezė kaip nurodyta 2.2.6. skyrelyje. Po UV šviesa pažymima vieta gelyje, kurioje yra reikalingas DNR fragmentas. Pažymėta agarozės juostelė išpjaunama ir DNR fragmentai išskiriami naudojant „DNA Extraction Kit“ (Thermo Fisher Scientific Baltics, Lietuva) rinkinį. DNR gryninimas atliekamas pagal gamintojo pateiktas rekomendacijas.

#### 2.2.14. Kompetentinių *E.coli* ląstelių paruošimas

Kompetentinės *E.coli* ląstelės buvo naudojamos vektorių pTZ57R/T, su įterptais p16<sup>INK4A</sup> ir integrino DNR fragmentais, transformacijai. *E. coli* DH10B kolonija inkubuojama 5 ml LB terpės per naktį 37 °C temperatūroje. Ryte kultūra skiedžiama 50–100 kartų ta pačia terpe ir auginama 2–2,5 h purtyklėje, 37 °C temperatūroje (kol ląstelių kultūros tankis pasiekia 0,6

optinio vieneto prie 550nm bangos ilgio). Tolesnės procedūros atliekamos ledo vonioje. Ląstelės centrifuguojamos 10 min, esant 3000 aps./min greičiui, 4 °C temperatūroje. Supernatantas nupilamas, o ląstelės užpilamos 2,5 ml NaCl tirpalu. Centrifuguojama tomis pačiomis sąlygomis. Supernatantas nupilamas, ląstelės užpilamos 2,5 ml CaCl<sub>2</sub> ir laikomos 30 min lede. Toliau ląstelės centrifuguojamos tomis pačiomis sąlygomis. Supernatantas pašalinamas, o ląstelės suspenduojamos likusiame terpės laše ir naudojamos transformacijai (Ausubel ir kt., 1999; Sambrook ir Russell, 2001).

#### 2.2.15. DNR susiuvimas

p16<sup>INK4A</sup> ir integrino DNR fragmentai buvo įterpti į pTZ57R/T vektorius, siekiant sukurti p16<sup>INK4A</sup> ir integrino RNR fragmentus. DNR susiuvimo reakcija atliekama naudojant „InsTAclone PCR Cloning Kit“ (Thermo Fisher Scientific Baltics, Lietuva) rinkinį, pagal gamintojo rekomendacijas. Reakcijos mišinį sudaro: vektorius pTZ57R/T (0,165 µg/3 µl), DNR ligazės buferinis tirpalas 5x (6 µl), DNR (p16<sup>INK4A</sup> atveju 0,025 µg, integrino – 0,02 µg), T4 DNR ligazė (1 µl), sterilus vanduo be nukleazių, iki galutinio 30 µl tūrio. Susiuvimo reakcija vykdoma 1–2 h kambario temperatūroje arba 4 °C temperatūroje per naktį. DNR susiuvimo mišiniu transformuojamos paruoštos kompetentinės *E.coli* ląstelės.

#### 2.2.16. *E.coli* kompetentinių ląstelių transformacija

Vektorius pTZ57R/T, su įterptais p16<sup>INK4A</sup> ir integrino DNR fragmentais buvo transformuojamas į paruoštas *E.coli* kompetentines ląsteles. Į mėgintuvėlį įpilama 50 µl paruoštų kompetentinių *E.coli* ląstelių suspensijos ir 2,5–3 µl liguotos DNR tirpalo (apie 100 ng). Mišinys laikomas lede 30 min, po to 2 min 42 °C temperatūroje ir 2 min atšaldomas lede. Mišinys užpilamas 1 ml LB terpės ir inkubuojamas 2 h 37 °C temperatūroje. Ląstelės centrifuguojamos 2 min 5000 aps./min greičiu. Supernatantas nupilamas. Ląstelės išsėjamos ant agarizuotos LB terpės su ampicilinu (100 µg/ml). Lėkštelės laikomos 37 °C temperatūroje per naktį (Ausubel ir kt., 1999; Sambrook ir Russell, 2001).

Užaugusios ląstelės naudojamos plazmidžių išskyrimui su „GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit“ (Thermo Fisher Scientific Baltics, Lietuva) pagal gamintojo rekomendacijas.

#### 2.2.17. Plazmidžių linearizacija, karpant restriktaze FastDigest SapI (LguI)

Išgrynintos pTZ57R/T plazmidės, su įterptais p16<sup>INK4A</sup> ir integrino DNR fragmentais, kerpamos FastDigest SapI (LguI) restriktaze (Thermo Fisher Scientific Baltics, Lietuva). Restriktazinė analizė atliekama FastDigest buferiniame tirpale. Karpymui naudojama 2 µl SapI restriktazės, 2 µg plazmidinės DNR (plazmidės dydis 2797 bp), 5 µl FastDigest buferinio tirpalo, pridedant vandens iki 50 µl bendro tūrio. Reakcija vykdoma 1 h 37 °C temperatūroje. Po karpymo restriktazė išveiklinama inkubuojant reakcijos mišinį 5 min 65 °C temperatūroje.

#### 2.2.18. DNR išsodinimas

Į mišinį po pTZ57R/T plazmidės karpymo įpilama sterilaus vandens be nukleazių iki 500 µl tūrio. Dedamas lygus tūris fenolio (pH 7,5–8) ir chloroformo mišinio (500 µl). Centrifuguojama 5 min, esant 5000 aps./min greičiui. Viršutinė vandens frakcija nusiurbiamą. Pilamas lygus tūris chloroformo (500 µl). Centrifuguojama tomis pačiomis sąlygomis. Viršutinė vandens frakcija nusiurbiamą. Dedama 1/10 tūrio (50 µl) 3 M natrio acetato (pH 5,5) ir 1 ml etanolio. Laikoma per naktį -20 °C temperatūroje. Mišinys centrifuguojamas 20 min, esant 12000 aps./min greičiui, 4 °C temperatūroje. Supernatantas nusiurbiamas, o sukarpyta ir išsodinta plazmidinė DNR užpilama 11 µl DEPC valytu vandeniu (Ausubel ir kt., 1999).

#### 2.2.19. Transkripcija *in vitro*

Sukarpytos pTZ57R/T plazmidės naudojamos DNR transkripcijai *in vitro*, siekiant sukurti p16<sup>INK4A</sup> ir integrino RNR fragmentus. Transkripcija atliekama naudojant „Transcript AID™ T7 High Yield Transcription Kit“ (Thermo Fisher Scientific Baltics, Lietuva) rinkinį, pagal gamintojo

rekomendacijas. Transkripcijai naudojama apie 1  $\mu\text{g}$  sukarpytos ir išsodintos plazmidinės DNR. Reakcijai naudojami šie komponentai: Transcript AID™ buferinis tirpalas, dNTP mišinys, Transcript AID™ fermentų mišinys, DEPC valytas vanduo. Bendras transkripcijos mišinio tūris 20  $\mu\text{l}$ . Transkripcija vykdoma 2 h, 37 °C temperatūroje. Siekiant pašalinti plazmidinę DNR, į reakcijos mišinį dedama 2  $\mu\text{l}$  DNazės I (Thermo Fisher Scientific Baltics, Lietuva) ir inkubuojama 15 min 4 °C temperatūroje. DNazės I išveiklinama į mišinį įdedant 2  $\mu\text{l}$  0,5 M EDTA (pH 8), inkubuojama 10 min 65 °C temperatūroje.

#### 2.2.20. RNR išsodinimas

Į pTZ57R/T plazmidės transkripcijos reakcijos mišinį dedama 115  $\mu\text{l}$  sterilaus vandens be nukleazijų ir 15  $\mu\text{l}$  3 M natrio acetato (pH 5,2), viskas sumaišoma. Pilamas lygus tūris fenolio/chloroformo (1:1) mišinio. Centrifuguojama 5 min, esant 5000 aps./min greičiui. Viršutinė vandeninė fazė nusiurbama. Du kartus pilamas lygus tūris chloroformo. Viršutinė vandens fazė nusiurbama. Įpilami du tūriai etanolio. Per naktį lailoma -20 °C temperatūroje. Centrifuguojama 20 min, esant 10000 aps./min greičiui, 4 °C temperatūroje. RNR nuosėdos tirpinamos 20  $\mu\text{l}$  vandens (Ausubel ir kt., 1999).

#### 2.2.21. Statistinė analizė

Statistinei analizei naudotos Microsoft Excel 2010, SPSS 22.0 ir Statistica 8 programos. PGR sistemų palyginimui buvo paskaičiuotas  $\kappa$  koeficientas (kappa). Kai  $\kappa$  koeficiento reikšmė gauta nuo 0,81 iki 1, sistemų atitikimas vertintas kaip puikus, nuo 0,61 iki 0,8 – geras, nuo 0,41 iki 0,6 – vidutinis, nuo 0,21 iki 0,4 – ribinis ir mažiau kaip 0,2 – blogas.

ŽPV paplitimo skirtumai tarp skirtingų grupių buvo vertinti naudojant Chi-kvadrato testą ( $\chi^2$ ). Siekiant įvertinti ryšį tarp gimdos kaklelio pakitimų ir ŽPV infekcijos bei genotipų buvo skaičiuojams šansų santykis (ŠS) su 95 % pasikliauties intervalais (PI). DNR metilinimo tyrimuose, siekiant palyginti DNR taikinių metilinimo dažnį tarp skirtingų grupių, buvo naudojamas Fišerio

tikslusis testas. p16<sup>INK4A</sup> RNR raiškos tyrime buvo skaičiuojamas aritmetinis vidurkis ir standartinis nuokrypis. Tolydaus kintamojo normalumo prielaida tikrinta naudojant Kolmogorov-Smirnov testą. Kintamiesiems netenkinant pasiskirstymo normalumo sąlygos, buvo taikomi neparametriniai metodai: Kruskal-Wallis ir Mann-Whitney U. Skirtumai tarp grupių laikyti statistiškai reikšmingais, kai reikšmingumo lygmuo  $p < 0,05$ .

### 3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

ŽPV infekcija sukelia odos ir gleivinių pažeidimus bei vėžį. Gimdos kaklelio vėžio atveju iki 100 % biopsijos mėginių randama ŽPV infekcija. Gydomo nuo ŽPV infekcijos nėra, todėl ŽPV infekcijos ir genotipų identifikavimas, vėžio rizikos veiksnių ryšio nustatymas bei vėžio žymenų tyrimai yra labai svarbūs prognozuojant vėžio išsivystymą bei kuriant vakcinas.

Šio tyrimo metu buvo sukurtos naujos bei parinktos ir naujai optimizuotos literatūroje aprašytos PGR sistemos, skirtos nustatyti bendrąją ŽPV infekciją ir atskirus ŽPV genotipus. Taikant šias PGR sistemas buvo tiriamas ŽPV infekcijos ir genotipų paplitimas tam tikrose Lietuvos moterų ir vyrų grupėse. Taip pat buvo ištirtas ŽPV infekcijos paplitimo ir rizikos veiksnių ryšys (sudėtinių kontraceptinių priemonių vartojimas, rūkymas, gimdymų skaičius). ŽPV infekcijos sukulto gimdos kaklelio vėžio tyrime buvo ištirti potencialūs gimdos kaklelio vėžio žymenys (p16<sup>INK4A</sup> RNR raiška, ŽPV DNR metilinimas) ir įvertinta jų diagnostinė vertė.

#### 3.1. PGR sistemų optimizavimas

Klinikinių mėginių tyrimui pasirinkome dvi literatūroje aprašytas bendros ŽPV infekcijos PGR sistemas: GP5+/GP6+ ir PGMY09/11 (Gravitt ir kt., 2000; Husman ir kt., 1995) ir jas optimizavome, padidindami jų efektyvumą. Taip pat patobulinome ir optimizavome anksčiau aprašytas daugines ŽPV genotipavimo PGR sistemas (MM-1, MM-2, MM-3, MM-4), skirtas atskirų ŽPV genotipų identifikavimui (Pependikyte ir kt., 2008), sukurdami papildomas pradmenų poras ŽPV 73 ir ŽPV 82 genotipų nustatymui. Vykdydami LMT finansuojamą projektą „ŽPV diagnostika“ ir bendradarbiaudami šiame projekte su UAB „Thermo Fisher Scientific Baltics“ (dr. V.Pependikyte), sukūrėme naują aukštos rizikos ŽPV infekcijos nustatymo PGR sistemą (HR\_HP) ir įvertinome jos efektyvumą tirdami klinikinius mėginius (Simanaviciene ir kt., 2015).

Visoms PGR sistemoms buvo nustatyti šie optimalūs parametrai:

1. Nustatoma pradmenų prilydymo temperatūra, panaudojant gradientinę PGR.
2. Parenkamos tinkamiausios pradmenų koncentracijos.
3. Nustatoma tinkamiausia *Taq* polimerazės koncentracija.
4. Patikrinama priedų įtaka PGR efektyvumui (betainas, BSA, DMSO, glicerolis).
5. Parenkamas tinkamiausios vidinės kontrolės genas, komplementarūs pradmenys ir jų koncentracijos.

Bendros ŽPV infekcijos nustatymo PGR sistemų optimizavimui buvo naudoda DNR, išgryninta iš HeLa ląstelių. Šiose ląstelėse yra integruotos ŽPV 18 genotipo DNR sekos. Genotipavimo PGR sistemų optimizacijai naudojome  $\lambda$  DNR, kurioje įklonuotos atitinkamų genotipų DNR sekos (gauta iš „Thermo Fisher Scientific Baltics“).

### 3.1.1. Bendrąją ŽPV infekciją nustatančių PGR sistemų optimizavimas

ŽPV genotipų genomai yra labai heterogeniški, todėl siekiant nustatyti kuo daugiau genotipų, labai svarbi yra PGR sistemų optimizacija. Optimizuojant yra parenkami tinkamiausi reagentai, jų koncentracijos bei reakcijos sąlygos. Visi GP5+/GP6+ ir PGMY09/11 PGR sistemose patikrinti parametrai pateikiami 9 lentelėje. Patikrinus visus 9 lentelėje pateiktus GP5+/GP6+ ir PGMY09/11 PGR sistemų komponentus, buvo atrinkti tinkamiausi, kurie pateikiami 10 lentelėje. Jie buvo naudojami klinikinių mėginių tyrimams.

**9 lentelė.** PGR sistemų GP5+/GP6+ ir PGMY09/11 optimizacijoje patikrinti parametrai.

OPTIMIZACIJOS PARAMETRAI	PGR SISTEMOS	
	GP5+/GP6+	PGMY09/11
<b>Pradmenų prilydymo temperatūra</b>	37–59 °C	48–60 °C
<b>ŽPV nustatymo pradmenų koncentracija</b>	0,1–1 $\mu$ M	0,15–0,5 $\mu$ M

<b>Taq polimerazės koncentracija</b>	0,5 v; 1 v; 1,5 v; 2 v	1 v; 1,5 v; 1,75 v; 2 v
<b>Priedai ir jų koncentracijos</b>	1) Betainas (0,5–1 M) 2) DMSO 4 % 3) Betainas 1 M + DMSO 4 % 4) BSA (1–15 µg) 5) Betainas (1 M; 0,75 M; 0,5 M) + BSA (2 µg; 5 µg; 7,5 µg) 6) DMSO 4 % + 10 µg BSA 7) 7 % glicerolis + 15 µg BSA	1) Betainas (0,5–1 M); 2) DMSO 4 % 3) Betainas 1 M + DMSO 4 % 4) BSA (1–15 µg) 5) Betainas (1 M; 0,75 M; 0,5 M) + BSA (2 µg; 5 µg; 7,5 µg) 6) Betainas 1 M + DMSO 4 % + 10 µg BSA
<b>Vidinės kontrolės genų pradmenys</b>	1) β-gloF/R 2) PSA (IC 119+IC 992) 3) PSA (IC 435+IC 1238) 4) PSA (IC 119+IC 1238)	1) β-gloF/R 2) PSA (IC 119+IC 992) 3) PSA (IC 435+IC 1238) 4) PSA (IC 119+IC 1238)
<b>Vidinės kontrolės genų pradmenų koncentracija</b>	1) β-globF/R (0,1–0,5 µM) 2) PSA (IC 119+IC 992) (0,2–3 µM) 3) PSA (IC 435+IC 1238) (0,2–3 µM) 4) PSA (IC 119+IC 1238) (0,2–3 µM)	1) β-globF/R (0,1–0,5 µM) 2) PSA (IC 119+IC 992) (0,05–0,3 µM) 3) PSA (IC 435+IC 1238) (0,05–0,3 µM) 4) PSA (IC 119+IC 1238) (0,3 µM)

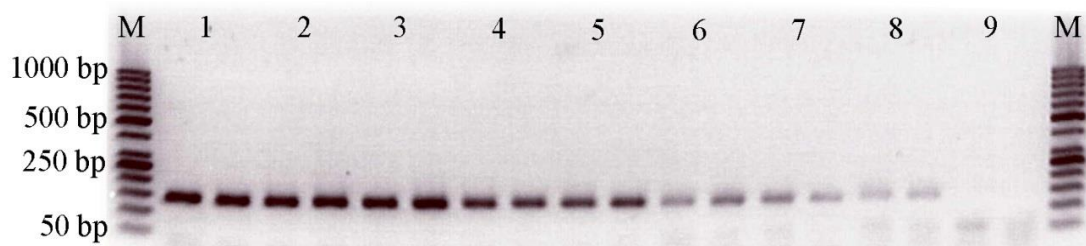
**10 lentelė.** PGR sistemų GP5+/GP6+ ir PGMY tinkamiausi parametrai.

OPTIMIZACIJOS PARAMETRAI	PGR SISTEMOS	
	GP5+/GP6+	PGMY09/11
<b>Pradmenų prilydymo temperatūra</b>	50 °C	55 °C
<b>Pradmenų koncentracija</b>	0,5 µM	0,15 µM
<b>Taq polimerazės koncentracija</b>	1 v	2 v
<b>Priedai</b>	BSA 5 µg	BSA 1 µg
<b>Vidinės kontrolės pradmenys</b>	β-gloF/R1	PSA (IC 435+IC 1238)
<b>Vidinės kontrolės pradmenų koncentracija</b>	0,3 µM	0,1 µM

PGR GP5+/GP6+ sistemoje naudojama viena pradmenų pora. Padauginto produkto ilgis yra 150 bp (6 pav.). Amplifikacija vykdoma šiuo režimu: 50 °C – 2 min (kryžminių reakcijų prevencija), 95 °C – 6 min (Hot Start Taq polimerazės aktyvacija), 40 ciklų DNR amplifikacijai: 95 °C – 30 s; 50 °C – 1 min (pradmenų prilydymas); 72 °C – 30 s, galutinis ciklas: 72 °C – 2 min. Vidinės kontrolės amplifikacijai pasirinkti β globino genui specifiški pradmenys (Simanavičienė ir kt., 2015). Parinkus optimalius PGR GP5+/GP6+ pradmenų sistemos parametrus, patikrintas ir sistemos jautrumas. Į reakciją buvo dedamas žinomas, iš HeLa ląstelių išgrynintos, DNR kopijų skaičius.



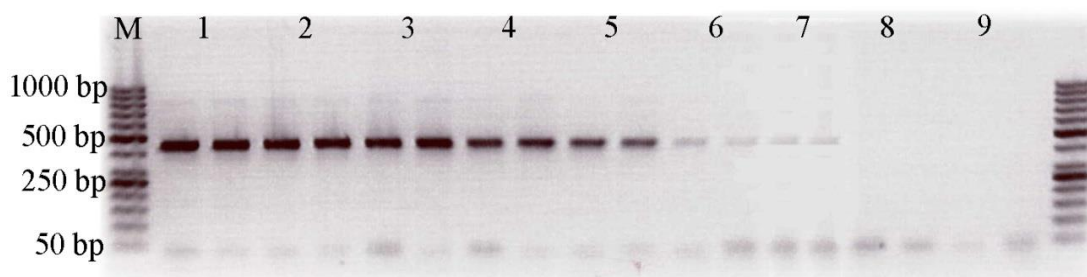
Patikrinta nuo  $10^3$  iki 1 HeLa genomo kopijos ir nustatytas mažiausias DNR kiekis, kuris aptinkamas PGR. Kiekvienos koncentracijos mėginys pakartotas du kartus. Pagal pateikiamą mokslinėje literatūroje informaciją, HeLa ląstelių genome gali būti įsiterpę 10–50 ŽPV 18 genotipo DNR kopijų (Macville ir kt., 1999). Nustatėme, kad PGR GP5+/GP6+ pradmenų sistemos jautrumas yra 1 HeLa DNR kopija (10–50 viruso genomo kopijų).



**6 pav.** ŽPV PGR GP5+/GP6+ pradmenų sistemos produktų analizė agarozės gelyje. 1-8 takeliai skirtingas HeLa DNR kopijų skaičius: 1)  $10^3$ , 2) 500, 3) 250, 4) 100; 5) 50; 6) 10; 7) 5; 8) 1 HeLa DNR kopija, 9) neigiama kontrolė. M – DNR fragmentų ilgio standartas (O'GeneRuler™ 50 bp DNA, Thermo Fisher Baltics, Lietuva).

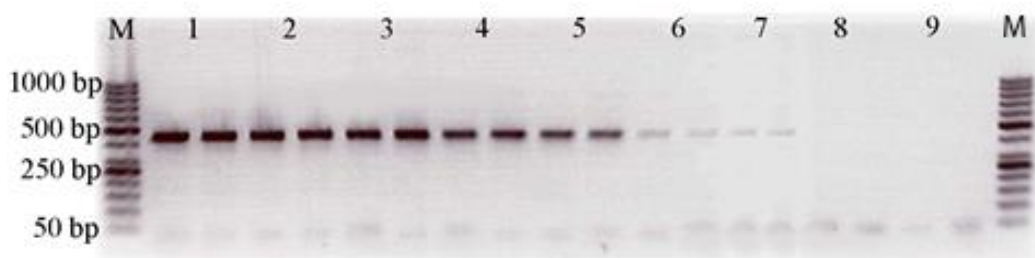
PGR PGMY09/11 pradmenų sistemoje naudojama 18 pradmenų (5 tiesioginiai ir 13 grįžtamųjų pradmenų). Padauginto produkto ilgis yra 450 bp (7 pav.). Amplifikacija vykdoma šiuo režimu: 50 °C – 2 min, 95 °C – 7 min (Hot Start *Taq* polimerazės aktyvacija), 40 ciklų DNR amplifikacijai: 95 °C – 30 s; 55 °C – 30 s (pradmenų prilydymo temperatūra), 72 °C – 30 s, galutinis ciklas: 72 °C – 2 min. Vidinio geno amplifikacijai naudoti PSA (prostato specifinio geno 5 egzonas) genui komplementarūs pradmenys (IC 435 + IC 1238) (Simanaviciene ir kt., 2015).

Toliau buvo patikrintas šios PGR sistemos jautrumas. Nustatyta, kad šia PGR sistema aptinkamos 5 HeLa genomo kopijos (50–250 ŽPV DNR kopijos).



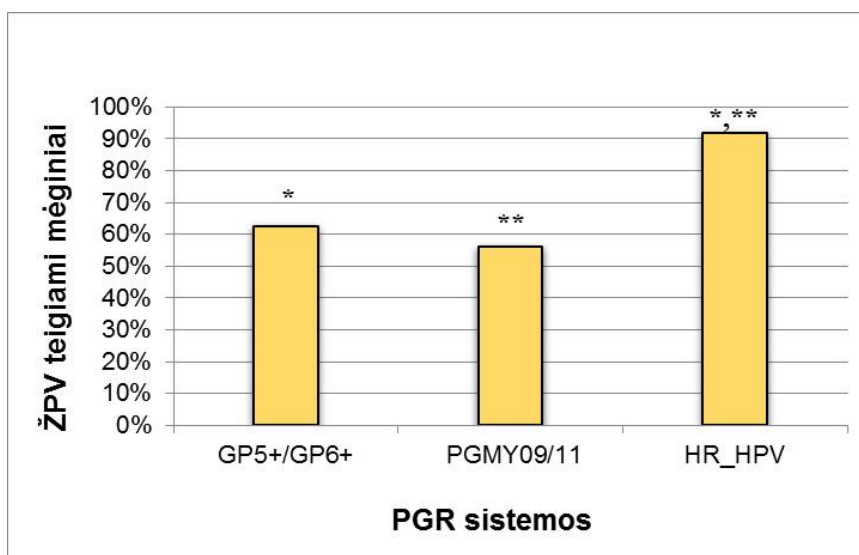
**7 pav.** ŽPV PGR PGMY09/11 pradmenų sistemos produktų analizė agarozės gelyje. 1-8 takeliai skirtingas HeLa DNR kopijų skaičius: 1)  $10^3$ , 2) 500, 3) 250, 4) 100; 5) 50; 6) 10; 7) 5; 8) 1 HeLa DNR kopija, 9 – PGR neigiama kontrolė. M – DNR fragmentų ilgio standartas (O‘GeneRuler™ 50 bp DNA, Thermo Fisher Baltics, Lietuva).

UAB „Thermo Fisher Scientific Baltics“ ir VU Biotechnologijos institutui vykdant LMT finansuojamą projektą „ŽPV diagnostika“, 2009–2011 metais buvo sukonstruoti pradmenys ir sukurta nauja PGR sistema, skirta visų šiuo metu žinomų didelės rizikos ŽPV genotipų nustatymui viename mėginyje (HR\_HP V PGR). Šioje naujoje PGR sistemoje naudojama 19 pradmenų (13 tiesioginių ir 6 grįžtamieji pradmenys). Su ja nustatoma 16 aukštos rizikos genotipų bendra ŽPV infekcija, bei šių genotipų variantai. Amplifikacijai naudoti šie komponentai: Maxima™ Hot Start PGR buferinis tirpalas (1x),  $MgCl_2$  (3 mM), dNTP/dUTP mišinys (0,2 mM), Maxima™ Hot Start *Taq* DNR polimerazė (1,25 v), Uracil DNR glikozilazė (0,01 v/μl), BSA (7,5 μg), betainas (0,3 M), 19 pradmenų mišinys (0,3 μM), vidinės kontrolės β globino genui specifiški pradmenys (0,1 μM) ir vanduo iki galutinio 25 μl reakcijos tūrio. Amplifikacija vykdoma šiuo režimu: 50 °C – 2 min, 95 °C – 7 min (Hot Start *Taq* polimerazės aktyvacija), 5 ciklai DNR amplifikacijai: 95 °C – 30 s; 60 °C – 30 s (pradmenų prilydymo temperatūra), 72 °C – 60 s, 5 ciklai DNR amplifikacijai: 95 °C – 30 s; 55 °C – 30 s (pradmenų prilydymo temperatūra), 72 °C – 60 s, 25 ciklai DNR amplifikacijai: 95 °C – 30 s; 50 °C – 30 s (pradmenų prilydymo temperatūra), 72 °C – 60 s. PGR HR\_HP V pradmenų sistemos padauginto produkto ilgis yra 430 bp. Naudojant HeLa ląsteles, buvo įvertintas šios naujai sukurtos PGR sistemos jautrumas. Su šia sistema aptinkamos 5 HeLa genomo kopijos (50–250 ŽPV DNR kopijos) (8 pav.).



**8 pav.** ŽPV PGR HR\_HPВ pradmenų sistemos produktų analizė agarozės gelyje. 1-8 takeliai skirtingas HeLa DNR kopijų skaičius: 1)  $10^3$ , 2) 500, 3) 250, 4) 100; 5) 50; 6) 10; 7) 5; 8) 1 HeLa DNR kopija, 9 – PGR neigiama kontrolė. M – DNR fragmentų ilgio standartas.

HR\_HPВ PGR sistemos efektyvumas buvo įvertintas, tiriant klinikinius mėginius ir lyginant gautus rezultatus su rezultatais, gautais optimizuotomis PGR sistemomis GP5+/GP6+ ir PGMY09/11. Iš viso buvo ištirti 108 moterų urogenitalinių nuograndų mėginiai, kurioms nustatyta gimdos kaklelio cervikalinė trečio laipsnio intraepitelinė neoplazija (CIN 3/CIS) arba vėžys. Su GP5+/GP6+ PGR sistema buvo nustatyti 62,6 % ŽPV teigiami mėginiai, su PGMY09/11 – 56,1 %, o su HR\_HPВ – 91,6 %. Lyginant nustatytą ŽPV teigiamų mėginių skaičių su HR\_HPВ PGR sistema ir GP5+/GP6+ bei PGMY09/11 PGR sistemomis, nustatytas statistiškai patikimas skirtumas ( $p < 0,001$ ). Rezultatai pateikti 9 paveiksle.



**9 pav.** GP5+/GP6+, PGMY09/11 ir HR\_HPВ PGR sistemų palyginimas, tiriant moterų urogenitalinių nuograndų mėginius, kurioms nustatytas gimdos kaklelio CIN 3/CIS arba vėžys.

\*,\*\*  $p < 0,001$ , remiantis  $\chi^2$  testu.

Siekiant palyginti visų tirtų PGR sistemų nustatomų ŽPV teigiamų mėginių sutapimą, buvo skaičiuojamas  $\kappa$  koeficientas. Tarp GP5+/GP6+ ir HR\_HPВ  $\kappa$  koeficientas lygus 0,2, o tarp PGMY09/11 ir HR\_HPВ  $\kappa$  koeficientas  $< 0,2$ . Gauta  $\kappa$  koeficiento reikšmė yra žema, nes PGR sistemos nustato skirtingus viruso genotipus. GP5+/GP6+ ir PGMY09/11 PGR sistemos nustato apie 40 tiek mažos, tiek aukštos rizikos ŽPV genotipų. Tuo tarpu HR\_HPВ sistema nustato 16 aukštos rizikos ŽPV genotipų bei didesnę jų variantų skaičių, kurie tarpusavyje gali skirtis iki 2 %. Su HR\_HPВ sistema nustatyti 29,9 % ŽPV teigiami mėginiai, kurių neaptiko GP5+/GP6+ sistema ir 36,4 % teigiami mėginiai, kurių neaptiko PGMY09/11 sistema. Taigi, atlikti tyrimai parodė, kad naujai sukurta HR\_HPВ PGR sistema žymiai efektyviau nustato aukštos rizikos ŽPV genotipus, nei anksčiau sukurtos GP5+/GP6+ ir PGMY09/11 PGR sistemos. Todėl tikslinga klinikinių mėginių tyrimams taikyti šią PGR sistemą, kuri nustato aukštos rizikos ŽPV genotipus ir jų variantus, nes būtent jie sukelia gimdos kaklelio vėžį.

### 3.1.2. Dauginių PGR sistemų optimizavimas

Nustačius ŽPV infekciją mėginyje, svarbu atlikti ŽPV genotipavimą ir įvertinti ar tai mažos ar didelės rizikos viruso genotipas. Tam tikslui buvo optimizuotos 4 dauginės PGR sistemos, anksčiau sukurtos 16 atskirų ŽPV genotipų identifikavimui: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 6, 11 (Pependikyte ir kt., 2008). Anksčiau publikuotose sistemose buvo nustatomi du žemos rizikos ŽPV genotipai (6 ir 11), mūsų patobulintoje sistemoje, vietoj šiems genotipams specifinių pradmenų, naudojome naujai sukurtus pradmenis komplementarius potencialiai onkogeniniams ŽPV 73 ir 82 genotipams (Simanaviciene ir kt., 2015). Visi pradmenys sugrupuoti į 4 dauginės PGR sistemas. Tarpusavyje PGR produktų dydžiai skyrėsi daugiau kaip 50 bp, todėl juos galima identifikuoti agarozės gelyje. Pradmenys yra komplementarūs viruso L1 ir E2 genų sekoms. Optimizacijoje buvo naudojama  $\lambda$  DNR su įterptomis atitinkamų genotipų DNR sekomis (gauta iš „Thermo

Fisher Scientific Baltics”). Dauginės PGR sistemos buvo optimizuojamos pagal pateiktus parametrus:

- 1) Nustatoma optimali pradmenų prilydymo temperatūra: 55–70 °C.
- 2) Nustatomos optimalios pradmenų koncentracijos: 0,1–0,3 μM.
- 3) Parenkama tinkamiausia Hot Start *Taq* polimerazės koncentracija: 1–1,75v.
- 4) Patikrinta priedų įtaka PGR efektyvumui:
  - a) Betainas – 0,5–1,5 M
  - b) BSA–1–15 μg
  - c) DMSO 4 %
  - d) Betainas (0,4–1,2 M) + BSA (1–15 μg)
  - e) DMSO 4 % + BSA (3 μg; 10 μg)
  - f) Glicerolis 7 % + BSA 15 μg

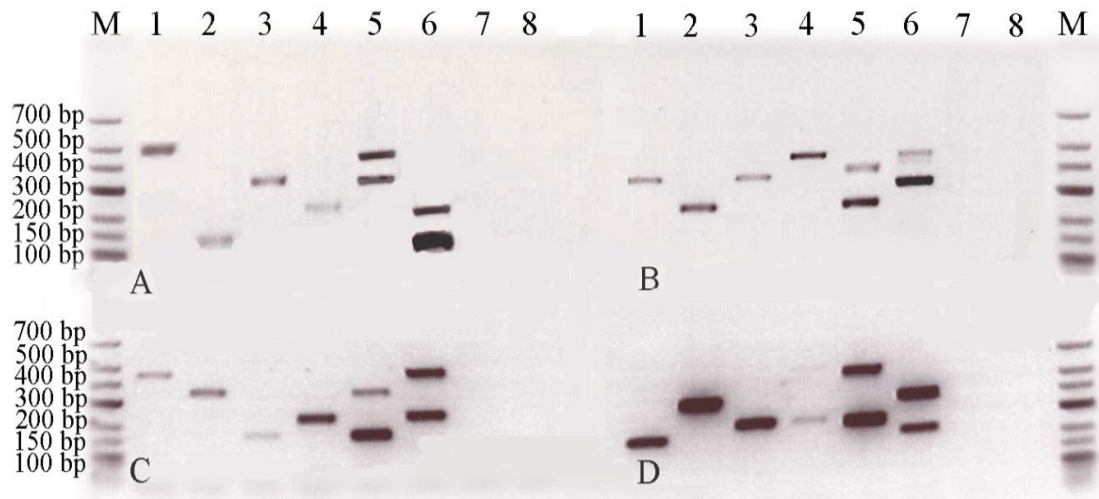
Nustatyti optimalūs dauginių PGR sistemų parametrai pateikti 11 lentelėje.

**11 lentelė.** Dauginių PGR sistemų optimalūs parametrai.

OPTIMIZACIJOS PARAMETRAI	DAUGINĖS PGR SISTEMOS			
	MM-1	MM-2	MM-3	MM-4
<b>Pradmenų prilydymo temperatūra</b>	72 °C; 62 °C; 56 °C	72 °C; 62 °C; 56 °C	72 °C; 62 °C; 56 °C	72 °C; 62 °C; 56 °C
<b>Pradmenų koncentracija</b>	0,3 μM	0,3 μM	0,2 μM	0,2 μM
<b><i>Taq</i> polimerazės koncentracija</b>	1 v	1 v	1 v	1 v
<b>Priedai</b>	BSA 5 μg	BSA 5 μg	BSA 5 μg; Betainas 0,5M	BSA 5 μg

Kadangi dauginėse sistemose naudojama 16 pradmenų porų, jų lydimosi temperatūra skiriasi. Siekiant padidinti sistemų jautrumą ir specifiškumą, buvo taikomas kelių žingsnių PGR režimas: 50 °C – 2 min (kryžminių reakcijų prevencija), 95 °C – 7 min (Hot Start *Taq* polimerazės aktyvacija), 4 ciklai DNR amplifikacijai: 95 °C – 30 s; 72 °C – 30 s (pradmenų prilydymo temperatūra), 4 ciklai DNR amplifikacijai: 95 °C – 30 s; 62 °C – 30 s; 72 °C – 30 s, 25 ciklai DNR amplifikacijai: 95 °C – 30 s; 56 °C – 30 s; 72 °C –

30 s, 72 °C – 5 min (galutinis ciklas). Dauginių PGR sistemų produktai, po λ DNR ir ŽPV teigiamų klinikinių mėginių amplifikacijos, pateikiami 10 paveiksle.



**10 pav.** PGR produktai gauti su dauginėmis PGR sistemos. **A** – MM-1; **B** – MM-2; **C** – MM-3; **D** – MM-4. 1-8 agarozės gelio takeliuose gauti PGR produktai: 1, 2, 3, 4) ŽPV teigiami klinikiniai mėginiai; 5, 6) λ DNR su įterptais ŽPV genotipų DNR fragmentais; 7, 8) PGR neigiama kontrolė. M – DNR fragmentų ilgio standartas (O'GeneRuler™ Low Range).

Patikrinus dauginių PGR sistemų amplifikaciją su λ DNR ir ŽPV teigiamais klinikiniais mėginiais, nespecifiniai amplifikacijos signalai nebuvo stebimi.

### 3.2. Klinikinių mėginių tyrimai

#### 3.2.1. ŽPV infekcijos dažnis moterų grupėse su žinoma citologine ir histologine diagnoze

Naudojant optimizuotas PGR sistemas, ŽPV infekcija buvo iširta didelės grupės moterų (n = 824), kurioms nustatyta tiksli gimdos kaklelio pokyčių citologinė ir histologinė diagnozė, urogenitalinių nuograndų mėginiuose. Klinikiniai mėginiai buvo surinkti Nacionaliniame vėžio institute, ten pat patvirtinta citologinė ir histologinė diagnozė. Mėginiai buvo renkami vadovaujantis Lietuvos bioetikos komiteto leidimu atlikti tyrimą (2009-06-03, Nr. 158200-6-062-16). Visos tiriamosios moterys pasirašė Informuoto asmens sutikimo formą. Mėginiai suskirstyti į dvi grupes: tiriamoji grupė, kurioje buvo

547 mėginiai su įvairaus laipsnio intraepiteliniais gimdos kaklelio pakitimais, ir kontrolinė grupė, kurioje buvo 277 sveikų moterų mėginiai. Visi mėginiai iširti trimis bendrąją ŽPV infekciją nustatančiomis PGR sistemomis: GP5+/GP6+, PGMY09/11 ir HR\_HP.V.

Iš viso 437 mėginiuose iš 824 (53,0 %) buvo aptikta ŽPV infekcija bent su viena PGR sistema. Tiriamojoje grupėje buvo nustatyti 67,6 % ŽPV teigiami mėginiai, o kontrolinėje grupėje – 24,2 % ŽPV teigiami mėginiai (12 lentelė). Skirtumas tarp abiejų grupių yra statistiškai patikimas ( $p < 0,0001$ ). Taip pat nustatytas stiprus ryšys tarp ŽPV infekcijos ir intraepitelinių gimdos kaklelio pakitimų ( $\chi^2 = 6,6$ , 95 % PI 4,7–9,1,  $p < 0,0001$ ). Tiriamojoje grupėje su GP5+/GP6+ sistema buvo nustatyti 297 (54,3 %) ŽPV teigiami mėginiai, su PGMY09/11 – 279 ŽPV teigiami mėginiai (51,0 %), o su HR\_HP.V – 299 ŽPV teigiami mėginiai (54,7 %). Kontrolinėje grupėje su atitinkamomis PGR sistemomis buvo nustatyti 36 (13,0 %), 51 (18,4 %) ir 29 (10,5 %) ŽPV teigiami mėginiai (11 pav.). Lyginant naujai sukurtą HR\_HP.V PGR sistemą su literatūroje jau aprašytomis GP5+/GP6+ ir PGMY09/11 PGR sistemomis, su naujais HR\_HP.V PGR sistema ŽPV infekcija buvo nustatyta didesniame skaičiuje mėginių – net 21 mėginyje kitos dvi PGR sistemos ŽPV infekcijos neaptiko. Tai patvirtina naujosios HR\_HP.V PGR sistemos, kuri nustato aukštos rizikos ŽPV genotipus ir jų variantus, efektyvumą, nes būtent aukštos rizikos ŽPV genotipai yra pagrindiniai gimdos kaklelio vėžio rizikos veiksniai.

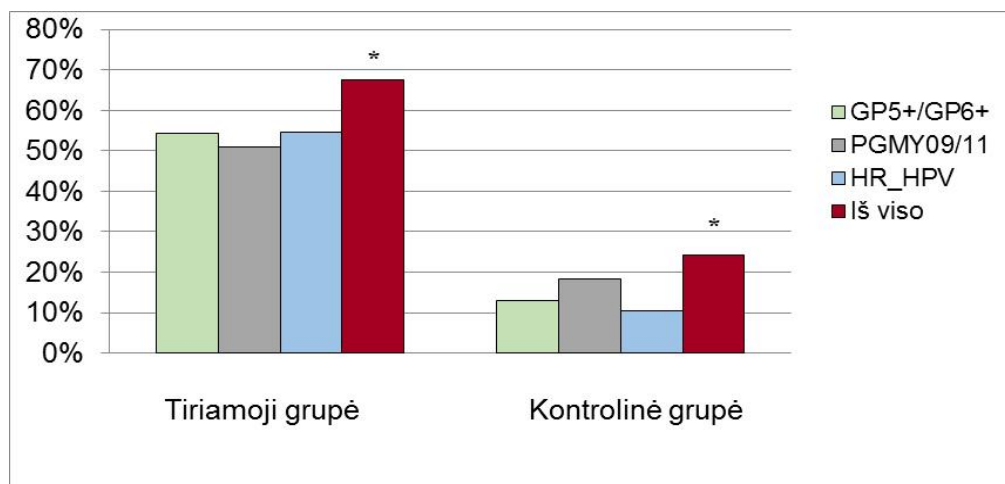
Mūsų tyrime sveikų moterų grupėje nustatytas ŽPV infekcijos dažnis (24,2 %) yra panašus į anksčiau Lietuvoje atliktų tyrimų duomenis. Ankstesniuose tyrimuose aptikta 26,7 % (Gudleviciene ir kt., 2005) ir 23,6 % (Gudleviciene ir kt., 2006) ŽPV teigiamų mėginių tarp sveikų moterų. ŽPV infekcijos paplitimas tarp sveikų Lietuvos moterų yra gana aukštas, lyginant su kitų šalių duomenimis: Afrikoje nustatyta 22,1 % ŽPV teigiamų mėginių, Centrinėje Amerikoje ir Meksikoje – 20,4 %, Šiaurės Amerikoje – 11,3 %, Europoje 8,1 %, Azijoje – 8 % (De Sanjose ir kt., 2007). Dalį skirtumų gali lemti mėginio paėmimo metodas, ŽPV infekcijos nustatymo metodas bei mėginio tipas (Gravitt ir kt., 2007). Tačiau net ir atsižvelgiant į šiuos galimus

skirtumus, mūsų tyrimas parodė didelį ŽPV infekcijos paplitimą tiek tarp sveikų, tiek tarp gimdos kaklelio pakitimų turinčių Lietuvos moterų.

**12 lentelė.** ŽPV infekcijos paplitimas tiriamojoje (moterys su intraepiteliniais gimdos kaklelio pakitimais) ir kontrolinėje (sveikos moterys) grupėse.

ŽPV infekcija	Tiriamoji grupė		Kontrolinė grupė		ŠS, 95 % PI
	n	%	n	%	
ŽPV neigiamas	177	32,4	210	75,8	6,6 (4,7–9,1)*
ŽPV teigiamas	370	67,6	67	24,2	
Iš viso	547	100,0	277	100,0	

\*  $p < 0,0001$ , remiantis  $\chi^2$  testu.



**11 pav.** ŽPV infekcijos paplitimas tiriamojoje (moterys su intraepiteliniais gimdos kaklelio pakitimais) ir kontrolinėje (sveikos moterys) grupėse, nustatytas su skirtingomis PGR sistemomis.

\*  $p < 0,0001$ , remiantis  $\chi^2$  testu.

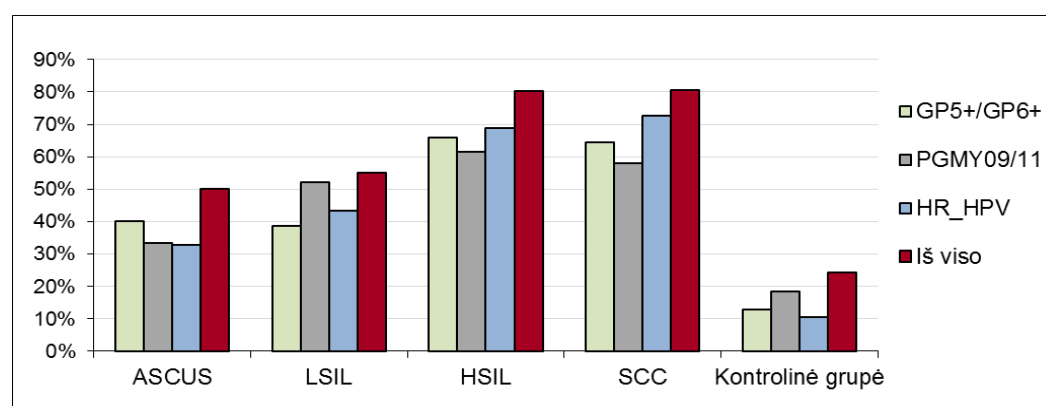
Siekiant iširti ŽPV infekcijos ir citologinių pakitimų ryšį, tiriamosios grupės mėginiai buvo išskirstyti į 4 pogrūpius pagal citologinę gimdos kaklelio pokyčių diagnozę: ASCUS – nenustatytos svarbos atipinės plokščiojo epitelio ląstelės ( $n = 174$ ), LSIL – nedidelio laipsnio plokščiojo epitelio intraepiteliniai pokyčiai ( $n = 67$ ), HSIL – didelio laipsnio plokščiojo epitelio intraepiteliniai pokyčiai ( $n = 244$ ) ir plokščialąstelinė karcinoma (SCC) ( $n = 62$ ). SCC pogrūpyje taip pat buvo priskirtas 1 atipinės liaukinio epitelio ląstelės (AGC) ir 1 adenokarcinomos *in situ* diagnozės mėginys. ŽPV infekcijos dažnis koreliavo su citologinių pakitimų laipsniu ( $p < 0,0001$ ). ASCUS pogrūpyje nustatyta 50,0 % ŽPV teigiamų mėginių, LSIL – 55,2 %, HSIL – 80,3 % ir SCC –



80,6 % ŽPV teigiamų mėginių. ASCUS ir LSIL pogrupiuose didžiausią ŽPV teigiamų mėginių kiekį aptiko GP5+/GP6+ (atitinkamai 40,2 % ir 38,8 %) ir PGMY09/11 (atitinkamai 33,3 % ir 52,2 %) PGR sistemos. Didelį ląstelių pakitimo laipsnį turinčiuose HSIL ir SCC pogrupiuose daugiausiai ŽPV teigiamų mėginių nustatė naujai sukurta aukštos rizikos ŽPV genotipus aptinkanti HR\_HPVS sistema: HSIL pogrupyje nustatyta 68,9 %, o SCC pogrupyje – 72,6 % ŽPV teigiamų mėginių. Duomenys apie ŽPV infekcijos dažnį moterų pogrupiuose su nustatyta citologine diagnoze pateikiami 13 lentelėje. Statistiškai patikimi skirtumai gauti tarp ASCUS ir HSIL ( $p < 0,0001$ ), ASCUS ir SCC ( $p < 0,0001$ ), LSIL ir HSIL ( $p < 0,0001$ ), LSIL ir SCC ( $p < 0,001$ ) pogrupių. Taip pat statistiškai patikimi skirtumai gauti tarp sveikų moterų (kontrolinė grupė) ir visų pogrupių su citologiniais pakitimais ( $p < 0,0001$ ). Duomenys apie ŽPV dažnį mėginiuose, suskirstytuose pagal citologinę diagnozę, bei tyrimams naudotų trijų PGR sistemų efektyvumą apibendrinti 12 paveiksle.

**13 lentelė.** ŽPV infekcijos paplitimas tarp mėginių su žinoma citologine diagnoze.

ŽPV infekcija	Citologinė diagnozė							
	ASCUS		LSIL		HSIL		SCC	
	n	%	n	%	n	%	n	%
ŽPV neigiamas	87	50,0	30	44,8	48	19,7	12	19,4
ŽPV teigiamas	87	50,0	37	55,2	196	80,3	50	80,6
Iš viso	174	100,0	67	100,0	244	100,0	62	100,0



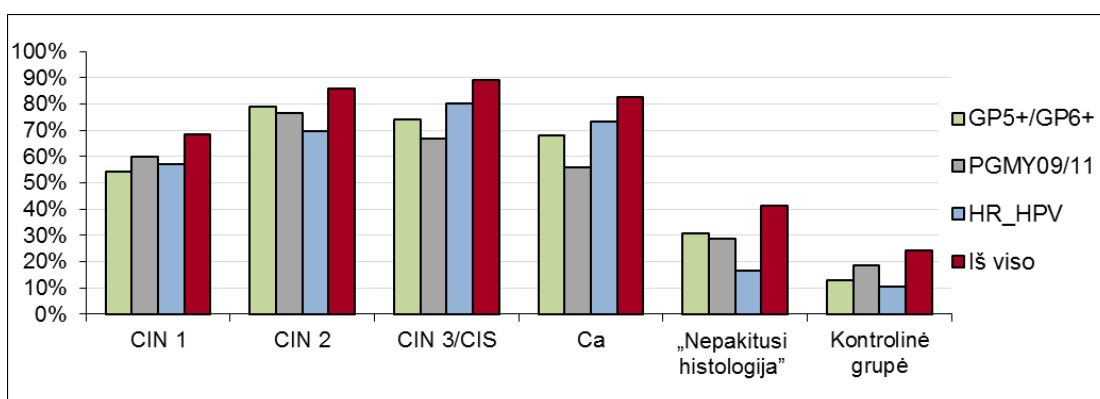
**12 pav.** ŽPV infekcijos dažnis mėginiuose, suskirstytuose pagal gimdos kaklelio pokyčių citologinę diagnozę, nustatytas trimis skirtingomis PGR sistemomis.

Toliau buvo ištirtas ŽPV infekcijos ir histologinių gimdos kaklelio pakitimų ryšys. Pagal žinomą histologinę diagnozę mėginiai buvo išskirstyti į 5 pogrupius: CIN 1 – lengva displazija (n = 35), CIN 2 – vidutinė displazija (n = 43), CIN 3/CIS – sunki displazija arba karcinoma *in situ* (n = 157), Ca – gimdos kaklelio vėžys (n = 75) ir „Nepakitusi histologija“ – citologiniai pakitimai nepatvirtinti histologiniu tyrimu (n = 133). Gimdos kaklelio vėžio pogrupyje (Ca) buvo 70 mėginių, kuriems nustatyta plokščialąstelinė karcinoma (SCC) ir 5 mėginiai, kuriems patvirtinta adenokarcinoma (AD). ŽPV infekcijos dažnis koreliavo su histologinių pakitimų laipsniu ( $p < 0,0001$ ). Didžiausias ŽPV infekcijos dažnis nustatytas CIN 2, CIN 3/CIS ir gimdos kaklelio vėžio pogrupiuose (atitinkamai 86,0 %, 89,2 % ir 82,7 %). CIN 3/CIS ir Ca pogrupiuose didžiausią ŽPV teigiamų mėginių kiekį aptiko naujai sukurta HR\_HP V PGR sistema (atitinkamai 80,3 % ir 73,3 %). Mažiausiai ŽPV teigiamų mėginių nustatyta CIN 1 (68,6 %) ir „Nepakitusios histologijos“ pogrupiuose (41,4 %). Šiuose pogrupiuose didesnę ŽPV teigiamų mėginių skaičių aptiko aukštos ir žemos rizikos tipus aptinkančios GP5+/GP6+ ir PGM Y09/11 PGR sistemos. Duomenys apie ŽPV infekcijos dažnį pogrupiuose su skirtinga histologine diagnoze ir PGR sistemų efektyvumą pateikiami 13 paveiksle. Statistiškai patikimi skirtumai gauti tarp visų pogrupių su histologiniais pakitimais, lyginant juos su sveikų moterų grupe (kontrolinė grupė) ir „Nepakitusios histologijos“ pogrupiu ( $p < 0,01$ ), taip pat tarp CIN 1 ir CIN 3/CIS pogrupių ( $p < 0,01$ ). Lyginant sveikų moterų grupę su moterų, sergančių gimdos kaklelio vėžiu, pogrupiu, nustatytas stiprus ryšys tarp ŽPV infekcijos ir gimdos kaklelio vėžio ( $\chi^2 = 14,95$ , 95% PI 7,7–28,9,  $p < 0,0001$ ). Duomenys apie ŽPV infekcijos dažnį grupėse su histologine diagnoze apibendrinti 14 lentelėje.

**14 lentelė.** ŽPV infekcijos ir genotipų dažnis mėginiuose, suskirstytuose pagal histologinę diagnozę.

ŽPV infekcija	Histologinė diagnozė									
	CIN 1		CIN 2		CIN 3/CIS		Ca		„Nepakitusi histologija“	
	n	% <sup>a</sup>	n	% <sup>a</sup>	n	% <sup>a</sup>	n	% <sup>a</sup>	n	% <sup>a</sup>
ŽPV-neigiamas	11	31,4	6	14,0	17	10,8	13	17,3	78	58,6
ŽPV-teigiamas	24	68,6	37	86,0	140	89,2	62	82,7	55	41,4
Iš viso	35	100,0	43	100,0	157	100,0	75	100,0	133	100,0

<sup>a</sup> ŽPV genotipų paplitimo procentai skaičiuoti nuo bendro ŽPV teigiamų mėginių skaičiaus.



**13 pav.** ŽPV infekcijos dažnis mėginiuose su žinoma histologine diagnoze, nustatytas trimis skirtingomis PGR sistemomis.

Mūsų tyrime nustatytas didelis ŽPV infekcijos dažnis gimdos kaklelio vėžio atveju (82,7 %) yra panašus į kitų šalių pateikiamus rezultatus (Jarell ir kt., 1992; Agoff ir kt., 2003). Įvairiuose tyrimuose nustatomas ŽPV infekcijos dažnis gimdos kaklelio vėžio mėginiuose varijuoja nuo 79 % iki 95 %, priklausomai nuo regiono (Smith ir kt., 2007).

### 3.2.2. ŽPV genotipų nustatymas klinikiniuose mėginiuose

Siekiant nustatyti labiausiai paplitusius ŽPV tipus, visuose ŽPV teigiamuose mėginiuose (n = 437) buvo atliekamas viruso genotipų nustatymas, panaudojant optimizuotas keturias daugines PGR sistemas (MM-1, MM-2, MM-3, MM-4). Su šiomis sistemomis identifikuojama 16 aukštos rizikos ŽPV genotipų (ŽPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 73 ir 82). Iš 437 ŽPV teigiamų mėginių, 94 mėginiuose (21,5 %) nebuvo nustatytas joks ŽPV genotipas: 71 (19,2 %) iš grupės su citologiniais

pakitimais ir 23 (34,3 %) iš sveikų moterų grupės. Tai rodo, kad šios moterys gali būti infekuotos žemos rizikos ŽPV genotipais, kurie nėra nustatomi šiomis dauginėmis PGR sistemomis.

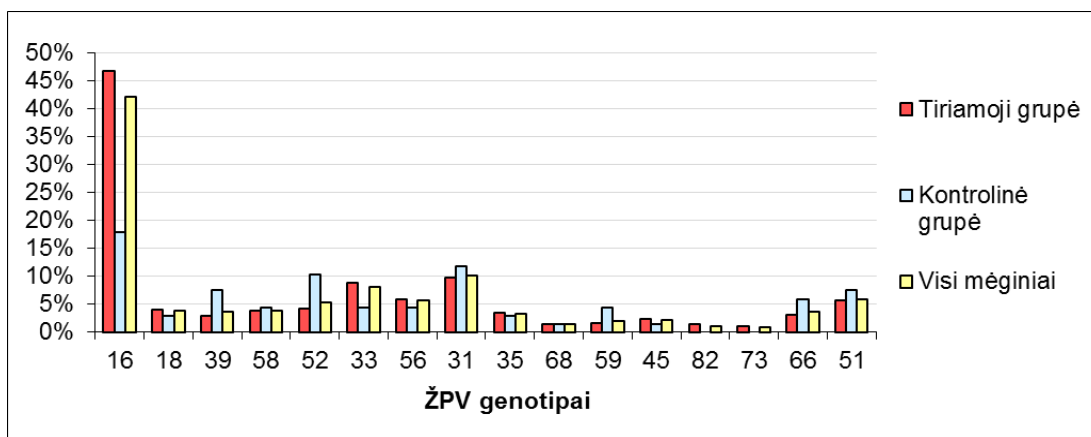
Labiausiai paplitęs buvo ŽPV 16 genotipas, nustatytas 185 mėginiuose iš tirtų 437 (42,3 %) ( $p < 0,0001$ ). Toliau pagal paplitimą buvo šie genotipai: ŽPV 31 (10,1 %), ŽPV 33 (8,2 %) ir ŽPV 56 (5,7 %). ŽPV 18 genotipas nustatytas tik 3,9 % ŽPV teigiamų mėginių. ŽPV 16 genotipas buvo labiausiai paplitęs abiejose moterų grupėse: tiek tiriamojoje, t.y., moterų su intraepiteliniais gimdos kaklelio pakitimais (46,8 % ŽPV 16 teigiamų mėginių), tiek kontrolinėje, t.y., sveikų moterų grupėse (17,9 % ŽPV 16 teigiamų mėginių) (15 lentelė). Taip pat buvo nustatytas statistiškai patikimas ryšys tarp ŽPV 16 genotipo ir gimdos kaklelio pakitimų ( $\text{ŠS} = 4,03$ , 95 % PI 2,0–7,7,  $p < 0,0001$ ). Duomenys apie visų tirtų 16 ŽPV genotipų dažnį tiriamojoje ir kontrolinėje grupėse pateikiami 14 paveiksle.

**15 lentelė.** ŽPV genotipų paplitimas tiriamojoje (moterys su intraepiteliniais gimdos kaklelio pakitimais) ir kontrolinėje (sveikos moterys) grupėse.

ŽPV genotipas	Tiriamoji grupė		Kontrolinė grupė		ŠS, 95 % PI
	n	% <sup>a</sup>	n	% <sup>a</sup>	
ŽPV 16	173	46,8	12	17,9	4,03 (2,08–7,76) *
ŽPV 18	15	4,1	2	3,0	
ŽPV 39	11	3,0	5	7,5	
ŽPV 58	14	3,8	3	4,5	
ŽPV 31	36	9,7	8	11,9	
ŽPV 33	33	8,9	3	4,5	
ŽPV 52	16	4,3	7	10,4	
ŽPV 56	22	5,9	3	4,5	
ŽPV 59	6	1,6	3	4,5	
ŽPV 68	5	1,4	1	1,5	
ŽPV 35	13	3,5	2	3,0	
ŽPV 45	9	2,4	1	1,5	
ŽPV 66	12	3,2	4	5,9	
ŽPV 51	21	5,7	5	7,5	
ŽPV 73	4	1,1	0	0,0	
ŽPV 82	5	1,4	0	0,0	
Nenustatytas ŽPV genotipas	71	19,2	23	34,3	

<sup>a</sup> ŽPV genotipų paplitimo procentai skaičiuoti nuo bendro ŽPV teigiamų mėginių skaičiaus.

\*  $p < 0,001$ , remiantis  $\chi^2$  testu.



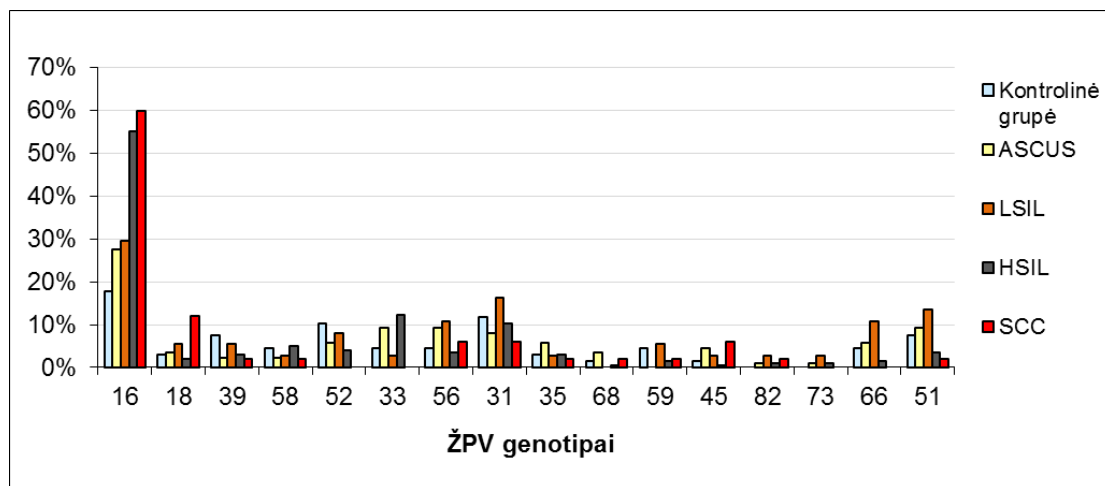
**14 pav.** ŽPV genotipų dažnis tiriamojoje ir kontrolinėje grupėse.

Detalesnis ŽPV genotipų paplitimas buvo analizuotas tarp pogrupių, suskirstytų pagal citologinę diagnozę (ASCUS, LSIL, HSIL, SCC). ŽPV 16 genotipo dažnis koreliavo su citologinių gimdos kaklelio pakitimų laipsniu ( $p < 0,0001$ ). Mažiausiai ŽPV 16 genotipo teigiamų mėginių nustatyta ASCUS pogrupyje (27,6 %), nežymiai daugiau LSIL pogrupyje (29,7 %), daugiau HSIL pogrupyje (55,1 %) ir daugiausiai vėžiniuose mėginiuose (60,0 %). Statistiškai reikšmingi skirtumai gauti tarp HSIL ir ASCUS ( $p < 0,0001$ ), HSIL ir LSIL ( $p < 0,01$ ), SCC ir ASCUS ( $p < 0,001$ ), SCC ir LSIL ( $p < 0,01$ ) pogrupių. Lyginant mėginius be citologinių pakitimų, ŽPV 16 statistiškai dažniau aptiktas HSIL (ŠS = 5,6, 95 % PI 2,84—11,16,  $p < 0,0001$ ) ir SCC (ŠS = 6,9, 95 % PI 2,96—15,97,  $p < 0,0001$ ) pogrupiuose. Kitų ŽPV genotipų paplitimas buvo panašus visuose pogrupiuose su citologiniais pakitimais. Duomenys apie ŽPV genotipų dažnį tarp pogrupių, suskirstytų pagal citologinę diagnozę, pateikiami 16 lentelėje ir 15 paveiksle.

**16 lentelė.** ŽPV genotipų paplitimas tarp mėginių su žinoma citologine diagnoze.

ŽPV genotipai	Citologinė diagnozė							
	ASCUS		LSIL		HSIL		SCC	
	n	% <sup>a</sup>	n	% <sup>a</sup>	n	% <sup>a</sup>	n	% <sup>a</sup>
ŽPV 16	24	27,6	11	29,7	108	55,1	30	60,0
ŽPV 18	3	3,4	2	5,4	4	2,0	6	12,0
ŽPV 39	2	2,3	2	5,4	6	3,1	1	2,0
ŽPV 58	2	2,3	1	2,7	10	5,1	1	2,0
ŽPV 31	7	8,0	6	16,2	20	10,2	3	6,0
ŽPV 33	8	9,2	1	2,7	24	12,2	0	0,0
ŽPV 52	5	5,7	3	8,1	8	4,1	0	0,0
ŽPV 56	8	9,2	4	10,8	7	3,6	3	6,0
ŽPV 59	0	0,0	2	5,4	3	1,5	1	2,0
ŽPV 68	3	3,4	0	0,0	1	0,5	1	2,0
ŽPV 35	5	5,7	1	2,7	6	3,1	1	2,0
ŽPV 45	4	4,6	1	2,7	1	0,5	3	6,0
ŽPV 66	5	5,7	4	10,8	3	1,5	0	0,0
ŽPV 51	8	9,2	5	13,5	7	3,6	1	2,0
ŽPV 73	1	1,1	1	2,7	2	1,0	0	0,0
ŽPV 82	1	1,1	1	2,7	2	1,0	1	2,0

<sup>a</sup> ŽPV genotipų paplitimo procentai skaičiuoti nuo bendro ŽPV teigiamų mėginių skaičiaus.



**15 pav.** ŽPV genotipų paplitimas tarp pogrupių, suskirstytų pagal citologinę diagnozę.

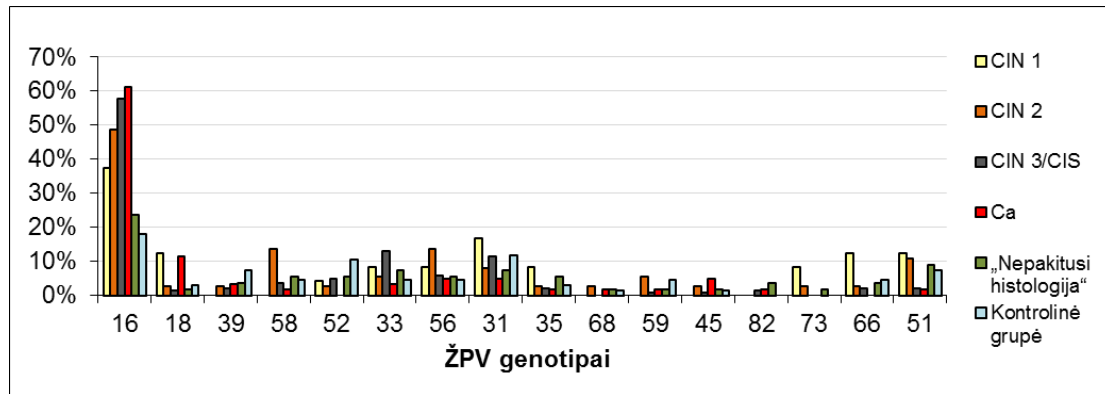
ŽPV genotipų paplitimas buvo analizuotas ir pogrupiuose, suskirstytuose pagal histologinę diagnozę (CIN 1, CIN 2, CIN 3/CIS, Ca ir „Nepakitusi histologija“). ŽPV 16 genotipo dažnis koreliavo su histologinių gimdos kaklelio pakitimų laipsniu ( $p < 0,0001$ ). ŽPV 16 genotipas CIN 1 pogrupyje nustatytas 37,5 % ŽPV teigiamų mėginių, CIN 2 – 48,6 %, CIN

3/CIS – 57,9 %, Ca – 61,3 % ir „Nepakitusios histologijos” pogrupyje – 23,6 %. Statistiškai patikimi skirtumai gauti tarp „Nepakitusios histologijos” ir CIN 2, CIN 3/CIS ir Ca pograpių (atitinkamai  $p < 0,05$ ,  $p < 0,0001$ ,  $p < 0,0001$ ), tarp CIN 1 ir Ca pograpių ( $p < 0,05$ ) ir tarp kontrolinės (sveikos moterys) ir CIN 2, CIN 3/CIS ir Ca pograpių ( $p < 0,001$ ). Lyginant kontrolinę grupę ir sergančiųjų gimdos kaklelio vėžiu pograpi, nustatytas stiprus ryšys tarp ŽPV 16 genotipo ir gimdos kaklelio vėžio ( $\text{ŠS} = 7,3$ , 95 % PI 3,24–16,26,  $p < 0,0001$ ). ŽPV 18 genotipas nustatytas tik 3,9 % ŽPV teigiamų mėginių, tačiau gimdos kaklelio vėžio pogrupyje tai buvo antras pagal dažnį ŽPV genotipas (11,3 %,  $p < 0,05$ ). Kitų genotipų paplitimas tarp pograpių, suskirstytų pagal histologinę diagnozę, buvo panašus ( $p > 0,05$ ). Duomenys apie visų tirtų ŽPV genotipų dažnį grupėse, suskirstytose pagal histologinę diagnozę, pateikiami 17 lentelėje ir 16 paveiksle.

**17 lentelė.** ŽPV genotipų dažnis mėginiuose, suskirstytuose pagal histologinę diagnozę.

ŽPV genotipas	Histologinė diagnozė									
	CIN 1		CIN 2		CIN 3/CIS		Ca		„Nepakitusi histologija“	
	n	% <sup>a</sup>	n	% <sup>a</sup>	n	% <sup>a</sup>	n	% <sup>a</sup>	n	% <sup>a</sup>
ŽPV 16	9	37,5	18	48,6	81	57,9	38	61,3	13	23,6
ŽPV 18	3	12,5	1	2,7	2	1,4	7	11,3	1	1,8
ŽPV 39	0	0,0	1	2,7	3	2,1	2	3,2	2	3,6
ŽPV 58	0	0,0	5	13,5	5	3,6	1	1,6	3	5,5
ŽPV 31	4	16,7	3	8,1	16	11,4	3	4,8	4	7,3
ŽPV 33	2	8,3	2	5,4	18	12,9	2	3,2	4	7,3
ŽPV 52	1	4,2	1	2,7	7	5,0	0	0,0	3	5,5
ŽPV 56	2	8,3	5	13,5	8	5,7	3	4,8	3	5,5
ŽPV 59	0	0,0	2	5,4	1	0,7	1	1,6	1	1,8
ŽPV 68	0	0,0	1	2,7	0	0,0	1	1,6	1	1,8
ŽPV 35	2	8,3	1	2,7	3	2,1	1	1,6	3	5,5
ŽPV 45	0	0,0	1	2,7	1	0,7	3	4,8	1	1,8
ŽPV 66	3	12,5	1	2,7	3	2,1	0	0,0	2	3,6
ŽPV 51	3	12,5	4	10,8	3	2,1	1	1,6	5	9,1
ŽPV 73	2	8,3	1	2,7	0	0,0	0	0,0	1	1,8
ŽPV 82	0	0,0	0	0,0	2	1,4	1	1,6	2	3,6

<sup>a</sup> ŽPV genotipų paplitimo procentai skaičiuoti nuo bendro ŽPV teigiamų mėginių skaičiaus.



**16 pav.** ŽPV genotipų paplitimas tarp pogrupių, suskirstytų pagal histologinę diagnozę.

Palyginus mūsų gautus ŽPV aukštos rizikos genotipų paplitimo rezultatus su anksčiau atliktu tyrimu Lietuvoje, buvo nustatytas didesnis ŽPV teigiamų mėginių skaičius. 2012 m. atliktame tyrime buvo nustatyta, kad 59 % urogenitalinių nuograndų mėginių su intraepiteliniais gimdos kaklelio pakitimais yra infekuoti aukštos rizikos ŽPV genotipais. ŽPV paplitimas tirtas „The Hybrid Capture II“ metodu, kuriuo nustatoma 13 aukštos rizikos ŽPV genotipų infekcija (Jariene ir kt. 2012). Mūsų tyrime analizuojant urogenitalinių nuograndų mėginius su intraepiteliniais gimdos kaklelio pakitimais buvo nustatyta, kad 80,8 % mėginių yra infekuoti vienu iš 16 nustatomų aukštos rizikos ŽPV genotipų. Minėtame tyrime buvo nustatyta, kad ŽPV 16, 18 ir 45 genotipai lėmė 62 % citologinių ir 68 % histologinių gimdos kaklelio pokyčių (Jariene ir kt. 2012). Mūsų tyrime nustatyta 53 % mėginių tiek su citologiniais, tiek ir su histologiniais pakitimais, kurie infekuoti ŽPV 16, 18 ir 45 genotipais.

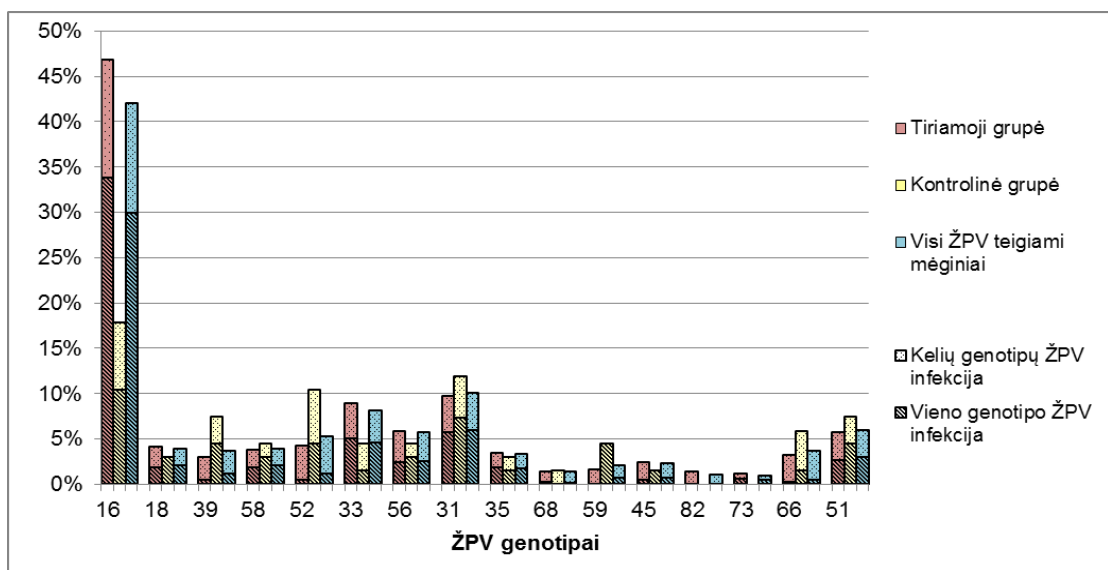
Pasaulyje ŽPV 16 yra dažniausiai aptinkamas ŽPV genotipas gimdos kaklelio vėžio atveju, o ŽPV 18 – antras pagal dažnumą (Smith ir kt., 2007). Ankstesni tyrimai parodė, kad ŽPV 16 ir 18 genotipai nustatomi apie 70 % gimdos kaklelio vėžio atvejų visame pasaulyje ir būtent šie ŽPV genotipai yra svarbiausi veiksniai, sukeliantys gimdos kaklelio vėžį (Bosch ir kt., 2008; Baseman ir Koutsky, 2005). Šie duomenys sutampa su mūsų tyrime gautais rezultatais. ŽPV 16 ir 18 genotipai buvo dažniausiai aptikti gimdos kaklelio



vėžio pogrupyje (72,6 %). ŽPV 16 genotipas buvo pats dažniausias visuose tirtuose pogrupiuose (42,3 % tarp visų tirtų ŽPV teigiamų mėginių). Šie rezultatai koreliuoja su mokslinėje literatūroje skelbiamais duomenimis apie ŽPV 16 genotipo paplitimą visame pasaulyje (Baseman ir Koutsky, 2005) bei Lietuvoje (Ambrasienė ir Pependikytė, 2008). Tačiau ŽPV 18 genotipo paplitimas (3,9 % tarp visų tirtų ŽPV teigiamų mėginių ir 11,3 % tarp gimdos kaklelio vėžio mėginių) mūsų tyrime buvo mažesnis, nei kitose šalyse. Europoje ŽPV 18 genotipas nustatytas 17,2 % gimdos kaklelio vėžio mėginių, Šiaurės Amerikoje – 22,1 %, Azijoje – 15,3 % (Pagliusi ir Aguado, 2004). Mūsų tyrime kitų aukštos rizikos ŽPV genotipų (31, 33, 56) paplitimas tarp visų ŽPV teigiamų mėginių buvo didesnis, nei ŽPV 18 genotipu. Atlikti tyrimai rodo ŽPV genotipų paplitimo geografinius skirtumus, todėl ŽPV infekuotus asmenis būtina tirti ne tik dėl ŽPV 16 ir 18 genotipų, bet taip pat ir dėl kitų aukštos rizikos genotipų. Tokie ŽPV paplitimo tyrimai skirtingose šalyse yra svarbūs, kuriant vakcinas bei planuojant prevencines programas prieš ŽPV.

### 3.2.3. Kelių ŽPV genotipų infekcijos dažnis moterų pogrupiuose su žinoma citologine ir histologine diagnoze

Moterys, turinčios gimdos kaklelio pakitimų, sukeltų ŽPV, gali būti užsikrėtusios dviem ar keliais ŽPV genotipais. Šiame tyrime 94 mėginiuose iš tirtų 437 (21,5 %) nustatėme kelis ŽPV genotipus viename mėginyje: daugiau negu vienas genotipas nustatytas 82 (22,2 %) mėginiuose su gimdos kaklelio pakitimais ir 12 (17,9 %) mėginių iš kontrolinės grupės (sveikos moterys) ( $p > 0,05$ ). ŽPV genotipų pasiskirstymas tarp visų ŽPV teigiamų mėginių demonstruojamas 17 paveiksle.



**17 pav.** Vieno ir kelių ŽPV genotipų infekcijos pasiskirstymas tarp ŽPV teigiamų mėginių tiriamojoje (moterys su gimdos kaklelio pakitimais) ir kontrolinėje (sveikos moterys) grupėse.

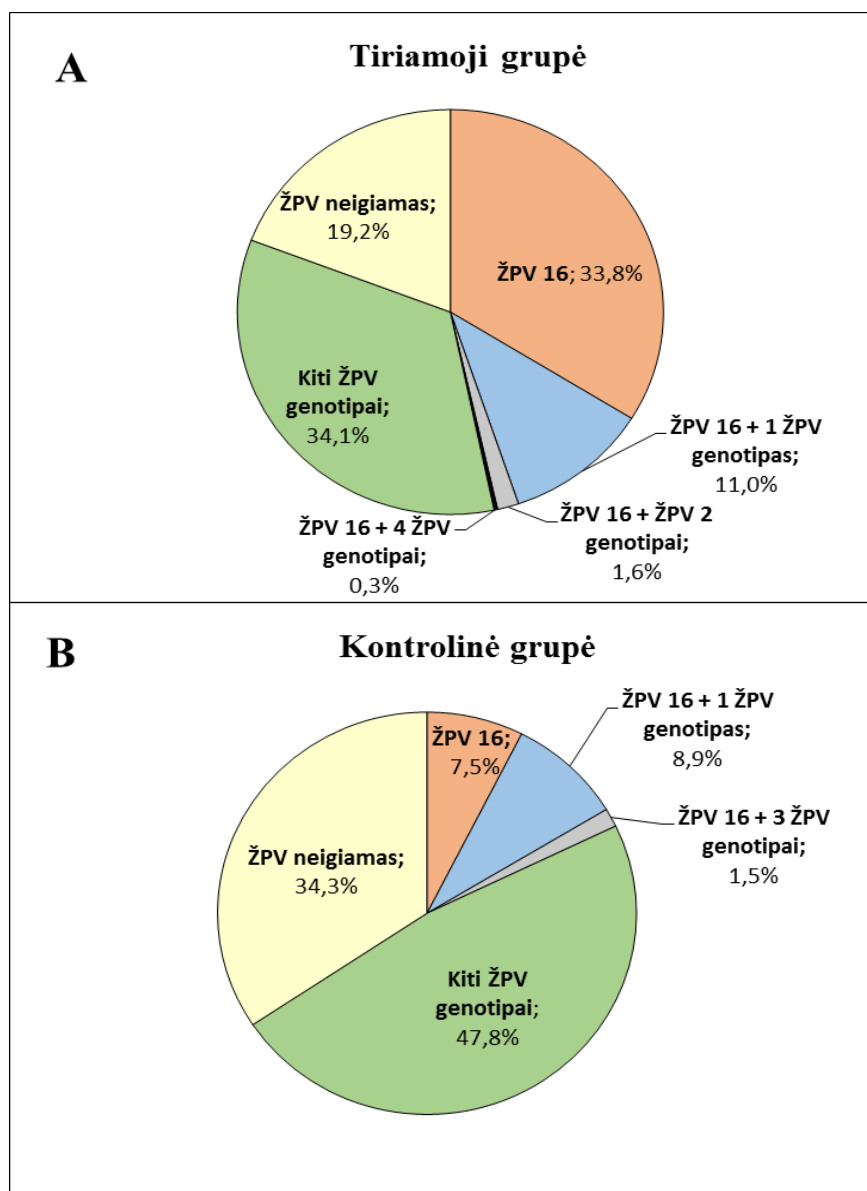
Pogrūpiuose, išskirtuose pagal citologinę diagnozę, daugiausiai kelių ŽPV genotipų infekcijos atvejų nustatyta LSIL pogrūpyje (37,8 %), o mažiausiai – sergančiųjų vėžiu pogrūpyje (18,0 %). Statistiškai patikimi skirtumai gauti tarp ASCUS ir HSIL ( $p < 0,01$ ), ASCUS ir SCC ( $p < 0,05$ ), LSIL ir HSIL ( $p < 0,05$ ), LSIL ir SCC ( $p < 0,05$ ) pogrūpių. Ta pati tendencija nustatyta ir pogrūpiuose, išskirtuose pagal histologinę diagnozę. Daugiausiai kelių ŽPV genotipų infekcijos atvejų nustatyta CIN 1 pogrūpyje (45,8 %), o mažiausiai – vėžio pogrūpyje (17,7 %). Statistiškai patikimi skirtumai nustatyti tarp CIN 1 ir CIN 3/CIS, Ca, „Nepakitusios histologijos“ ir sveikų moterų pogrūpių ( $p < 0,05$ ) (18 lentelė).

**18 lentelė.** ŽPV genotipų pasiskirstymas tarp pogrupių išskirtų pagal citologinę ir histologinę diagnozę.

ŽPV infekcija	Citologinė diagnozė									
	ASCUS		LSIL		HSIL		SCC		Kontrolinė grupė	
	n	% <sup>a</sup>	n	% <sup>a</sup>	n	% <sup>a</sup>	n	% <sup>a</sup>	n	% <sup>a</sup>
1 genotipas	37	42,5	15	40,5	131	66,8	32	64,0	32	47,8
2 genotipai	17	19,5	12	32,4	35	17,9	7	14,0	10	14,9
3 genotipai	1	1,1	2	5,4	2	1,0	2	4,0	1	1,5
4 genotipai	3	3,4	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	1,5
5 genotipai	0	0,0	0	0,0	1	0,5	0	0,0	0	0,0
Kelių genotipų ŽPV infekcija	21	24,1	14	37,8	38	19,4	9	18,0	12	17,9
ŽPV teigiami mėginiai	87	100,0	37	100,0	196	100,0	50	100,0	67	100,0
ŽPV infekcija	Histologinė diagnozė									
	CIN 1		CIN 2		CIN 3/CIS		Ca		„Nepakitusi histologija“	
	n	% <sup>a</sup>	n	% <sup>a</sup>	n	% <sup>a</sup>	n	% <sup>a</sup>	n	% <sup>a</sup>
1 genotipas	8	33,3	18	48,6	94	67,1	40	64,5	27	49,1
2 genotipai	10	41,7	9	24,3	28	20,0	9	14,5	8	14,5
3 genotipai	1	4,2	2	5,4	1	0,7	2	3,2	2	3,6
4 genotipai	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
5 genotipai	0	0,0	1	2,7	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Kelių genotipų ŽPV infekcija	11	45,8	12	32,4	29	20,7	11	17,7	10	18,2
ŽPV teigiami mėginiai	24	100,0	37	100,0	140	100,0	62	100,0	55	100,0

<sup>a</sup> ŽPV genotipų paplitimo procentai skaičiuoti nuo bendro ŽPV teigiamų mėginių skaičiaus.

Siekiant iširti sąsajas tarp ŽPV genotipų skaičiaus viename mėginyje ir rizikos išsivystyti didelio laipsnio gimdos kaklelio pakitimams ar vėžiui, buvo analizuojama, kokie ŽPV genotipai dažniausia aptinkami kelių ŽPV genotipų infekcijos atvejais tiriamojoje ir kontrolinėje grupėse. Kelių ŽPV genotipų infekcijos atvejais buvo aptikti visi tirti ŽPV genotipai. ŽPV 16 genotipas nustatytas dažniausiai tiek vieno tipo, tiek ir kelių ŽPV genotipų infekcijos atvejais. Tiriamojoje grupėje (mėginiai su gimdos kaklelio pakitimais) ŽPV 16 genotipas kartu su kitais genotipais nustatytas 48 mėginiuose iš tirtų 370 (13,0 %) (18 A pav.), o kontrolinėje grupėje (sveikos moterys) – 7 mėginiuose iš tirtų 67 (10,4 %) (18 B pav.).



**18 pav.** ŽPV 16 ir kitų genotipų infekcijos pasiskirstymas tarp tiriamosios (A) ir kontrolinės (B) grupių mėginių.

Literatūroje pateikiami rezultatai apie kelių ŽPV genotipų infekcijos dažnį yra panašūs į mūsų gautus duomenis (nustatyti keli ŽPV genotipai 27,4 % tirtų mėginių, kuriuose identifikuoti ŽPV genotipai). Kitų tyrimų duomenys rodo, kad apie trečdalyje mėginių yra randama kelių ŽPV genotipų infekcija (Zuna ir kt., 2007, Sotlar ir kt., 2004; Molijn ir kt., 2005). Dažniausiai aptinkama dviejų ŽPV genotipų infekcija, tačiau pasitaiko ir trys, keturi ar net penki ŽPV genotipai viename mėginyje. Tokia daugybinė ŽPV infekcija dar

labiau didina gimdos kaklelio vėžio išsivystymo riziką (Quint ir kt., 2001; Li ir kt., 2016).

#### 3.2.4. ŽPV infekcijos dažnis gerklų vėžiu sergančių asmenų grupėje

ŽPV infekuoja ne tik lytinių takų gleivinę, bet taip pat yra aptinkamas ir burnos gleivinėje, kur gali sukelti galvos ir kaklo sričių navikus. Įvairių tyrimų duomenimis, ŽPV aptinkamas 23–35 % šio tipo vėžio atvejų (Kreimer ir kt., 2005). Tai šeštas pagal paplitimą vėžio tipas žmogaus organizme (Zandberg ir kt., 2013). Literatūros duomenimis, pastaraisiais metais galvos ir kaklo onkologinių susirgimų mažėja, tačiau su ŽPV infekcija susijusių šio tipo vėžio susirgimų daugėja (Farsi ir kt., 2015).

Tyrimui buvo naudota DNR, išgryninta iš epitelinių ląstelių mėginių, kurie surinkti Nacionaliniame vėžio institute iš gerklų vėžiu sergančių pacientų. Visiems pacientams buvo imamos plokščiojo epitelio ląstelės nuo gerklų pažeidimų ir DNR gryninimas atliekamas panaudojant „Sorpo clean<sup>TM</sup> Genomic DNA Extraction Module“ (Sorpo, Lietuva) rinkinį.

Tyrimo patikrinti 43 gerklų vėžiu sergančių asmenų burnos epitelio ląstelių mėginiai. Iš viso buvo aptikti 9 ŽPV teigiami mėginiai (20,9 %). Su GP5+/GP6+ sistema nustatyti 7 ŽPV teigiami mėginiai, su PGMY09/11 – 1, o su HR\_HPVP – 4 mėginiai. Gauti rezultatai panašūs į kitų autorių Europoje atliktų tyrimų skelbiamus duomenis. 2005 m. buvo paskelbti apibendrinti duomenys apie gerklų vėžio mėginiuose nustatytą ŽPV infekciją skirtingose pasaulio dalyse: Europoje ŽPV infekcija nustatyta 21,3 % gerklų vėžio atvejų, Šiaurės Amerikoje – 13,8 %, Azijoje – 38,2 % (Kreimer ir kt., 2005).

ŽPV teigiami mėginiai toliau buvo genotipuojami. Nė vieno ŽPV genotipo nebuvo nustatyta 6 mėginiuose, likusiuose trijuose mėginiuose buvo aptikti ŽPV 31 (2 mėginiai), 58 (1 mėginys) ir 39 genotipai (1 mėginys). Viename iš mėginių aptikta dviejų ŽPV genotipų (ŽPV 31 ir 39) infekcija. Ne visuose mėginiuose buvo nustatyti ŽPV genotipai, nes mūsų užregistruoti teigiami bendros ŽPV infekcijos DNR signalai buvo silpni, todėl dauginės PGR sistemos galėjo būti nepakankamai jautrios ŽPV genotipų

identifikavimui. Įvairių tyrimų duomenimis, gerklų ir burnos vėžio atveju labiausiai paplitęs yra ŽPV 16 genotipas (Zandberg ir kt., 2013). Mūsų atliktame tyrime jis nebuvo nustatytas. Mūsų rasti ŽPV 31, 58 ir 39 genotipai taip pat aptinkami ir kitose šalyse, tiriant gerklų vėžio mėginius (Syrjanen, 2003).

### **3.3. ŽPV DNR metilinimo tyrimai**

Įvairūs tyrimai parodė, kad nors ŽPV infekcija ir yra svarbiausias veiksnys gimdos kaklelio vėžiui išsivystyti, tačiau įtakos gali turėti ir genetiniai bei epigenetiniai rizikos veiksniai. Pastarųjų metų daugelis tyrimų nustatė ryšį tarp DNR metilinimo ir įvairių ligų, tarp jų ir vėžio (Kulis ir Esteller, 2010). Dėl didelio ŽPV paplitimo ir gimdos kaklelio vėžio sergamumo Lietuvoje yra tikslinga tirti viruso genomo epigenetinius pokyčius. Identifikuoti epigenetiniai aukštos rizikos ŽPV genomų pokyčiai gali būti naudojami kaip ŽPV inicijuotos karcinogenezės žymenys.

Mūsų atlikto ŽPV DNR metilinimo tyrimo tikslas buvo ištirti koreliaciją tarp gimdos kaklelio pakitimų laipsnio ir ŽPV 16, 18 ir 51 genotipų DNR metilinimo dažnio. Apie ŽPV 16 ir 18 genotipų metilinimą yra paskelbta mokslinių duomenų, tačiau įvairiuose tyrimuose jie yra nevienareikšmiai (Ding ir kt., 2009; Hong ir kt., 2008; Kalantari ir kt., 2004; Turan ir kt., 2006; Badal ir kt., 2004; Van Tine ir kt., 2004; Kalantari ir kt., 2010). ŽPV 51 genotipo metilinimo tyrimai atlikti pirmą kartą.

Šiame tyrime buvo tiriami du viruso genomo regionai: kapsidės baltymą koduojančio geno L1 3' sritis ir ilgasis kontrolinis regionas (LCR). Metilinimas tirtas DNR bisulfitinės modifikacijos ir DNR sekoskaitos metodais. Iš viso ištirti 202 ŽPV infekciją turintys mėginiai (surinkti Nacionaliniame vėžio institute). Sėkminga bisulfitinė modifikacija buvo laikoma tada, kai po sekoskaitos visi citozinai buvo pakeisti į timidinus, išskyrus metilinimo taikinius CpG saleles. ŽPV DNR regionas buvo laikomas metilintu, jei nors vienas CpG taikinyss buvo metilintas tame regione. ŽPV 16 ir 18 genotipų metilinimo tyrimuose teigiama kontrolė buvo naudojama DNR išskirta iš

CaSki (ŽPV 16) ir HeLa (ŽPV 18) ląstelių. Visų mėginių sekoskaita buvo atliekama abiem (3' ir 5') DNR kryptimis.

DNR bisulfitinė modifikacija gali sukelti DNR fragmentaciją, todėl tiriamas ŽPV DNR rajonas buvo suskirstytas į mažesnes 3–4 sritis. Po bisulfitinės modifikacijos, 3 poros pradmenų buvo naudojamos amplifikuoti ŽPV 16 genotipo 3' L1 ir LCR DNR regionus (Kalantari ir kt., 2004). Tyrimui pasirinktas ŽPV 16 DNR regionas buvo suskirstytas į šias sritis: 7049–7590 nukleotidai (nt), 7465–7732 nt ir 7748–115 nt. ŽPV 18 genotipo 3' L1 ir LCR DNR regionams amplifikuoti taip pat buvo naudojamos 3 poros pradmenų (Badal ir kt., 2004). Tirtas ŽPV 18 DNR regionas buvo suskirstytas į šias sritis: 6847–7186 nt, 7282–7747 nt ir 7753–186 nt. ŽPV 51 genotipo DNR metilinimo tyrimams buvo naudojamos 4 pradmenų poros, komplementarios 3' L1 ir LCR DNR regionams. Sekoms specifiniai pradmenys buvo sukurti naudojant MethPrimer Design programą (<http://www.urogene.org>). Tirtas ŽPV 51 DNR regionas buvo suskirstytas į šias sritis: 6848–7064 nt, 7139–7354 nt, 7325–7639 nt ir 7668–99 nt.

Metilintų ŽPV 16, 18 ir 51 DNR sekų amplifikacijai buvo optimizuotas PGR metodas. PGR reakcijos mišinį sudarė šie komponentai: Hot Start PGR buferinis tirpalas, MgCl<sub>2</sub>, Hot Start *Taq* DNR polimerazė, dNTP, BSA, pradmenys ir be nukleazijų sterilus vanduo. PGR reakcija vykdyta 25 µl galutiniame tūryje: 22 µl PGR mišinio ir 3 µl DNR tirpalo po bisulfitinės modifikacijos. PGR buvo atliekama šiuo režimu: 94 °C – 5 min, 40 ciklų: 94 °C – 10 s, 54 °C – 30 s, 68 °C – 1 min, galutinis ciklas: 68 °C – 7 min.

### 3.3.1. ŽPV 16 genotipo DNR metilinimo tyrimai

Iš viso buvo ištirti 157 gimdos kaklelio mėginiai, kuriuose prieš tai buvo identifikuotas ŽPV 16 genotipas (žr. 3.2.2. skyrelyje). Visi mėginiai pagal histologinę diagnozę suskirstyti į 5 pogrupius: CIN 1 (n = 10), CIN 2 (n = 17), CIN 3/CIS (n = 70), Ca (n = 31) ir besimptomė ŽPV 16 infekcija (n = 29). Pasirinktame ŽPV 16 genomo regione buvo 17 CpG taikinių: 2 taikiniai 3' L1 geno srityje (ŽPV genomo sritis nuo 7136 nt iki 7145 nt) ir 15 taikinių LCR

regione (nuo 7270 nt iki 58 nt). LCR regionas dar buvo išskirtas į tris sritis: 4 taikiniai LCR 5' srityje (7270 nt – 7461 nt), 6 taikiniai geno stipriklio srityje (7535 nt – 7862 nt) ir 5 taikiniai promotoriaus srityje (31 nt – 58 nt) (19 lentelė).

**19 lentelė.** CpG sričių pozicijos ŽPV 16, 18 ir 51 genotipų L1 3', LCR 5', stipriklio ir promotoriaus regionuose.

ŽPV DNR regionas	ŽPV 16	ŽPV 18	ŽPV 51
	CpG, nt	CpG, nt	CpG, nt
L1 3'	7136, 7145	6916, 7011, 7038, 7041, 7062, 7068, 7090, 7110, 7116, 7122	6916, 6939, 6946, 6970, 6974, 6983, 7015, 7021
LCR 5'	7270, 7428, 7455, 7461	7316	7228, 7256, 7277, 7283
Stipriklis	7535, 7554, 7677, 7683, 7695, 7862	7460, 7466, 7511, 7573, 7575, 7586, 7597, 7631	7393, 7399, 7404, 7498, 7502, 7508, 7522, 7524, 7532, 7535, 7594
Promotorius	31, 37, 43, 52, 58	7824, 44, 50, 54, 60, 66	7762, 32, 48, 54

DNR metilinimas dažniau pasitaikė L1 3' ir promotoriaus regionuose lyginant su LCR 5' ir stipriklio sritimis. ŽPV 16 genotipo DNR metilinimo dažnis koreliavo su gimdos kaklelio pakitimų laipsniu. L1 3' srityje DNR metilinimo dažnis varijavo nuo 0 % CIN 1 iki 32,3 % gimdos kaklelio vėžio mėginiuose. LCR 5' ir stipriklio srityse metilinimo dažnis buvo nuo 0 % CIN 1 atveju iki 25,8 % vėžiniuose mėginiuose. Besimptomės infekcijos atveju metilinimo dažnis varijavo nuo 3,4 % L1 3', LCR 5' ir promotoriaus srityse iki 6,9 % stipriklio srityje. Statistiškai patikimas skirtumas po Bonferroni korekcijos buvo gautas L1 3' geno srityje tarp besimptomės ŽPV infekcijos ir gimdos kaklelio vėžinių mėginių ( $p < 0,01$ , 20 lentelė).

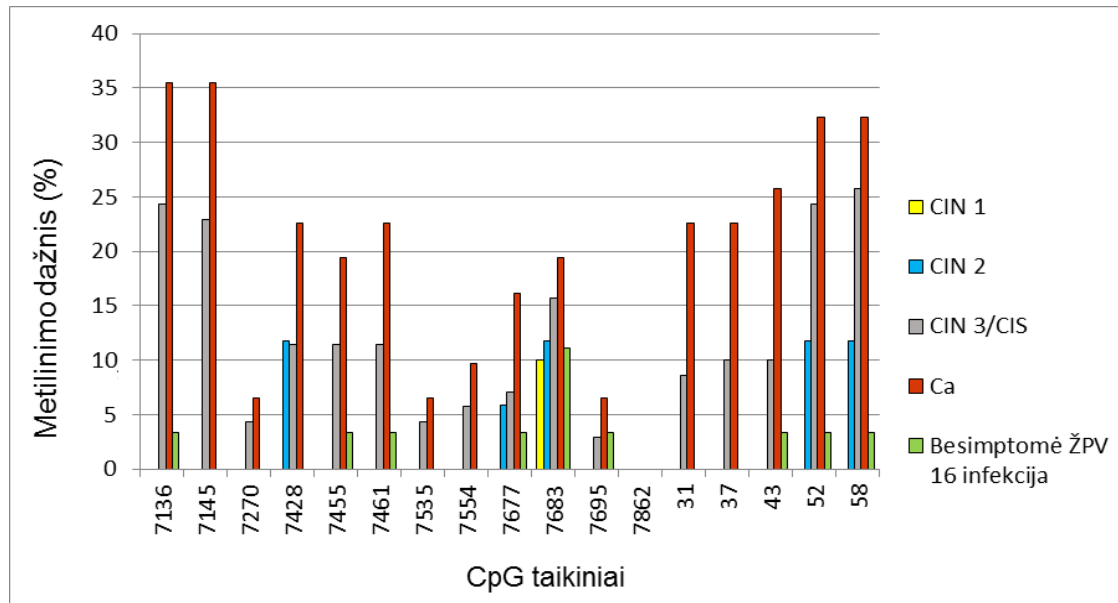


**20 lentelė.** ŽPV 16 genotipo DNR metilinimo dažnis L1 3', LCR 5', stipriklio ir promotoriaus regionuose.

ŽPV 16								
Grupė	L1 3'		LCR 5'		Stipriklis		Promotorius	
	ŽPV teig.	%	ŽPV teig.	%	ŽPV teig.	%	ŽPV teig.	%
CIN 1 (n = 10)	0	0	0	0	1	10	0	0
CIN 2 (n = 17)	1	5,9	2	11,8	3	17,6	2	11,8
CIN 3/CIS (n = 70)	17	24,3	10	14,3	16	22,9	18	25,7
Ca (n = 31)	11	35,5*	8	25,8	7	22,6	10	32,3
Besimptomė ŽPV 16 infekcija (n = 29)	1	3,4*	1	3,4	2	6,9	1	3,4

\* $p < 0,01$ , remiantis Fišerio tiksluoju testu.

Atskirų CpG taikinių metilinimo dažnis varijavo nuo 0 % besimptomės ŽPV 16 infekcijos atveju ir CIN 1 atveju iki 11,8 % CIN 2 pogrupiuose. Didesni metilinimo skirtumai buvo nustatyti CIN 3/CIS ir vėžio pogrupiuose. CpG taikinių metilinimo dažnis šiose grupėse varijavo nuo 0 % iki 35,5 %. Didžiausias metilinimo dažnis nustatytas 7136 ir 7145 nt pozicijoje vėžio atveju (35,5 %). Statistiškai patikimi metilinimo skirtumai nustatyti 7136 ir 7145 nt pozicijose tarp besimptomės ŽPV 16 infekcijos ir vėžinių mėginių ( $p < 0,01$ ). Keturiuose CpG pozicijose (7270, 7535, 7695, 7862 nt) metilinimo dažnis buvo žemas tarp visų tirtų mėginių. Besimptomės ŽPV 16 infekcijos atveju metilinimo dažnis buvo 0 %, o vėžio atveju – 6,5 %. Pozicijoje 7862 nt metilinimas nebuvo aptiktas nė viename iš tirtų mėginių. Visų kitų CpG taikinių metilinimo dažnis varijavo nuo 0 % iki 32,3 % tarp tirtų pogrupių, tačiau tarp jų statistiškai reikšmingų skirtumų nenustatyta (19 pav., 21 lentelė).



**19 pav.** ŽPV 16 genotipo CpG sričių metilinimo dažnis skirtinguose pogrupiuose su patvirtinta histologine diagnoze.

**21 lentelė.** ŽPV 16 genotipo CpG sričių metilinimo dažnis skirtinguose pogrupiuose su patvirtinta histologine diagnoze.

ŽPV 16										
CpG	CIN 1 (n = 10)		CIN 2 (n = 17)		CIN 3/CIS (n = 70)		Ca (n = 31)		Besimptomė ŽPV 16 infekcija (n = 29)	
	ŽPV teig.	%	ŽPV teig.	%	ŽPV teig.	%	ŽPV teig.	%	ŽPV teig.	%
7136	0	0	1	5,9	17	24,3	11	35,5*	1	3,4*
7145	0	0	1	5,9	16	22,9	11	35,5**	0	0**
7270	0	0	0	0	3	4,3	2	6,5	0	0
7428	0	0	2	11,8	8	11,4	7	22,6	0	0
7455	0	0	0	0	8	11,4	6	19,4	1	3,4
7461	0	0	0	0	8	11,4	7	22,6	1	3,4
7535	0	0	0	0	3	4,3	2	6,5	0	0
7554	0	0	0	0	4	5,7	3	9,7	0	0
7677	0	0	1	5,9	5	7,1	5	16,1	1	3,4
7683	1	10	2	11,8	11	15,7	6	19,4	2	11,1
7695	0	0	0	0	2	2,9	2	6,5	1	3,4
7862	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
31	0	0	0	0	6	8,6	7	22,6	0	0
37	0	0	0	0	7	10	7	22,6	0	0
43	0	0	0	0	7	10	8	25,8	1	3,4
52	0	0	2	11,8	17	24,3	10	32,3	1	3,4
58	0	0	2	11,8	18	25,7	10	32,3	1	3,4

\*,\*\*p < 0,01, remiantis Fišerio tiksluoju testu.

Teigiama kontrole naudota DNR, išskirta iš CaSki ląstelių linijos, kuri infekuota ŽPV 16 genotipu. Buvo įvertintas šios DNR metilinimo dažnis. Nustatyta, kad visi CpG taikiniai buvo metilinti tirtuose ŽPV 16 DNR regionuose.

Ankstesniuose tyrimuose taip pat buvo nustatytas teigiamas ryšys tarp metilinimo dažnio ŽPV 16 L1 geno srityje ir gimdos kaklelio pakitimų laipsnio (Kalantari ir kt., 2009; Fernandez ir kt., 2009; Brandsma ir kt., 2009; Sun ir kt., 2011; Mirabello ir kt., 2012). Tačiau ankstesnių publikacijų duomenys apie sąsajas tarp ŽPV 16 LCR regiono DNR metilinimo ir gimdos kaklelio pakitimų laipsnį yra nevienareikšmiai. Yra atliktų tyrimų, kurie nustatė sumažėjusį LCR regiono DNR metilinimo dažnį gimdos kaklelio mėginiuose su didelio laipsnio intraepiteliniais pakitimais (Ding ir kt., 2009; Badal ir kt., 2003; Xi ir kt., 2011; Mazumder ir kt., 2011; Snellenberg ir kt., 2012; Vinokurova ir kt., 2011; Bhattacharjee ir Sengupta; 2006). Nepaisant šių skirtumų, keletas mūsų gautų ir kitų autorių aprašytų rezultatų yra panašūs. Kitų publikacijų duomenimis stipriklio regione CpG taikinio esančio 7862 nt pozicijoje metilinimo dažnis yra labai nedidelis. Mūsų tyrime 7862 nt pozicijoje esantis CpG taikinyss buvo nemetilintas visuose tirtuose mėginiuose. Šioje pozicijoje esantis CpG taikinyss persikloja su viruso baltymo E2 prisijungimo sritimi. E2 baltymas prisijungdamas prie viruso genomo neleidžia vykti onkogenų E6 ir E7 raiškai. Taigi, šios srities metilinimas gali neleisti prisijungti E2 baltymui, todėl gali prasidėti ilgalaikė onkogenų E6 ir E7 raiška (Ding ir kt., 2009; Kalantari ir kt., 2004; Vinokurova ir Knebel, 2011; Bhattacharjee ir Sengupta, 2006).

Daugelyje ankstesnių tyrimų, taip pat ir mūsų, buvo nustatytas padidėjęs promotoriaus regiono metilinimo dažnis gimdos kaklelio vėžio mėginiuose, lyginant su mažesnio laipsnio pakitimais bei besimtomės ŽPV 16 infekcijos atvejais (Ding ir kt., 2009; Hong ir kt., 2008; Badal ir kt., 2003; Xi ir kt., 2011, Snellenberg ir kt., 2012; Bhattacharjee ir Sengupta, 2006; Piyathilake ir kt., 2011). ŽPV genomo promotoriaus seka turi dvi baltymo E2 prisijungimo sritis. Jei šios sritys yra metilintos, E2 baltymas nebegali prisijungti, todėl prasideda intensyvi E6 ir E7 onkogenų raiška (Thain ir kt., 1996). Manoma, kad

promotoriaus srities metilinimas gali būti naudojamas kaip progresuojančios karcinogenezės žymuo (Bhattacharjee ir Sengupta, 2006).

### 3.3.2. ŽPV 18 genotipo DNR metilinimo tyrimai

Iš viso ištirtas 21 gimdos kaklelio mėginys, kuriame prieš tai buvo identifikuotas ŽPV 18 genotipas (žr 3.2.2. skyrelyje). Visi mėginiai pagal histologinę diagnozę suskirstyti į 5 pogrupius: CIN 1 (n = 3), CIN 2 (n = 2), CIN 3/CIS (n = 2), Ca (n = 6) ir besimptomė ŽPV 18 infekcija (n = 8). Pasirinktuose ŽPV 18 genomo regionuose buvo 25 CpG taikiniai: 10 taikinių 3' L1 geno srityje (ŽPV 18 genomo sritis nuo 6916 nt iki 7122 nt), 1 taikiny LCR 5' srityje (7316 nt), 8 taikiniai stipriklio srityje (7460 nt – 7631 nt) ir 6 taikiniai promotoriaus srityje (7824 nt – 66 nt) (19 lentelė).

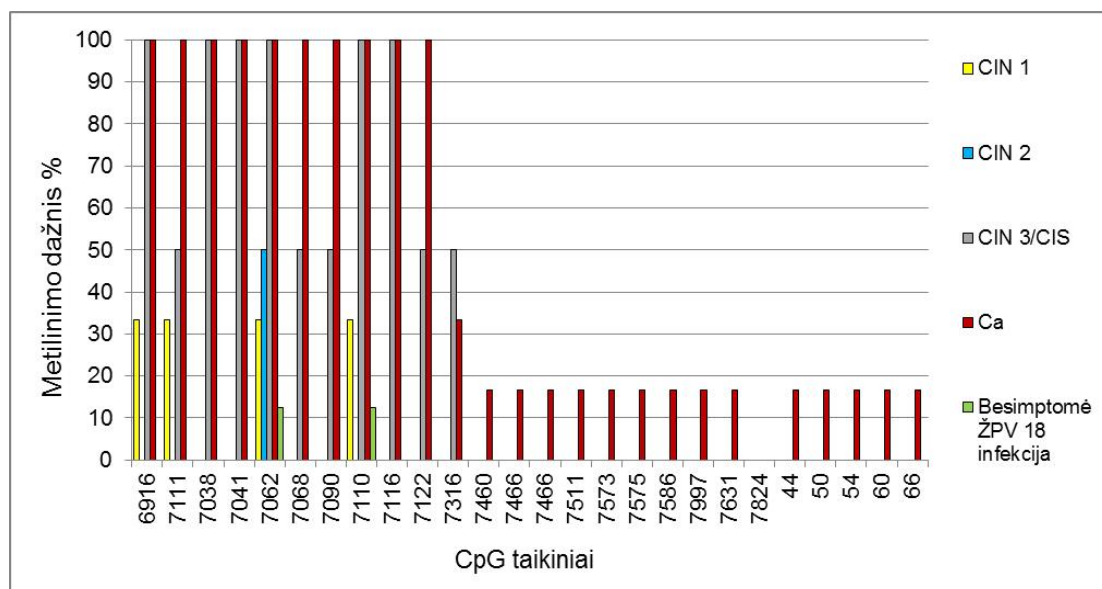
Didžiausias ŽPV 18 DNR metilinimo dažnis buvo nustatytas L1 3' geno srityje. CIN 3/CIS ir gimdos kaklelio vėžio atveju buvo metilinti visi CpG taikiniai L1 3' geno dalyje. Šioje srityje CIN 1 ir besimptomės infekcijos atvejais buvo metilintas tik vienas mėginys, o CIN 2 pogrupyje visi mėginiai buvo nemetilinti (22 lentelė).

**22 lentelė.** ŽPV 18 genotipo DNR metilinimo dažnis L1 3', LCR 5', stipriklio ir promotoriaus regionuose.

ŽPV 18								
Grupė	L1 3'		LCR 5'		Stipriklis		Promotorius	
	ŽPV teig.	%	ŽPV teig.	%	ŽPV teig.	%	ŽPV teig.	%
CIN 1 (n = 3)	1	33,3	0	0	0	0	0	0
CIN 2 (n = 2)	0	0	0	0	0	0	0	0
CIN 3/CIS (n = 2)	2	100	1	50	0	0	0	0
Ca (n = 6)	6	100	2	33,3	1	16,7	1	16,7
Besimptomė ŽPV 18 infekcija (n = 8)	1	12,5	0	0	0	0	0	0

LCR regione metilinimo dažnis buvo mažesnis nei L1 3' srityje. LCR 5' regione buvo metilintas tik vienas mėginys iš CIN 3/CIS pogrupio ir du mėginiai gimdos kaklelio vėžio pogrupyje. Stipriklio ir promotoriaus regionuose buvo metilintas tik vienas gimdos kaklelio vėžio mėginys. Kaip ir

ŽPV 16 genotipo atveju, LCR regione esantis 7824 nt pozicijoje CpG taikiny buvo nemetilintas visuose tirtuose mėginiuose (20 pav., 23 lentelė). Dėl mažo mėginių skaičiaus, statistškai reikšmingų skirtumų tarp CpG taikinių, lyginant skirtingus tyrimo pogrupius, nebuvo nustatyta ( $p > 0,05$ ).



**20 pav.** ŽPV 18 genotipo CpG sričių metilinimo dažnis skirtinguose pogrupiuose su patvirtinta histologine diagnoze.

**23 lentelė.** ŽPV 18 genotipo CpG sričių metilinimo dažnis skirtinguose pogrupiuose su patvirtinta histologine diagnoze.

CpG	CIN 1 (n = 3)		CIN 2 (n = 2)		CIN 3/CIS (n = 2)		Ca (n = 6)		Besimptomė ŽPV 18 infekcija (n = 8)	
	ŽPV teig.	%	ŽPV teig.	%	ŽPV teig.	%	ŽPV teig.	%	ŽPV teig.	%
6916	1	33,3	0	0	2	100	6	100	0	0
7111	1	33,3	0	0	1	50	6	100	0	0
7038	0	0	0	0	2	100	6	100	1	12,5
7041	0	0	0	0	2	100	6	100	1	12,5
7062	1	33,3	1	50	2	100	6	100	1	12,5
7068	0	0	0	0	1	50	6	100	0	0
7090	0	0	0	0	1	50	6	100	0	0
7110	1	33,3	0	0	2	100	6	100	1	12,5
7116	0	0	0	0	2	100	6	100	0	0
7122	0	0	0	0	1	50	6	100	0	0
7316	0	0	0	0	1	50	2	33,3	0	0
7460	0	0	0	0	1	50	0	0	0	0

7466	0	0	0	0	1	50	0	0	0	0
7466	0	0	0	0	1	50	0	0	0	0
7511	0	0	0	0	1	50	0	0	0	0
7573	0	0	0	0	1	50	0	0	0	0
7575	0	0	0	0	1	50	0	0	0	0
7586	0	0	0	0	1	50	0	0	0	0
7997	0	0	0	0	1	50	0	0	0	0
7631	0	0	0	0	1	50	0	0	0	0
7824	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
44	0	0	0	0	1	50	0	0	0	0
50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
54	0	0	0	0	1	50	0	0	0	0
60	0	0	0	0	1	50	0	0	0	0
66	0	0	0	0	1	50	0	0	0	0

DNR buvo išskirta ir iš HeLa ląstelių, kurios yra infekuotos ŽPV 18 genotipu ir ištirtas šios virusinės DNR metilinimas. Kaip ir klinikinių mėginių atveju, nustatyta, kad HeLa ląstelėse visi ŽPV 18 CpG taikiniai yra metilinti L1 3' ir LCR 5' DNR regionuose. Stipriklio ir promotoriaus srityse esantys CpG taikiniai nebuvo metilinti.

Gauti rezultatai sutampa su ankstesnių tyrimų duomenimis. Visuose atliktuose tyrimuose L1 3' geno dalyje ŽPV 18 DNR metilinimo dažnis viršijo 80 % gimdos kaklelio vėžio mėginiuose. Tuo tarpu LCR regione (kaip ir mūsų tyrime) ŽPV 18 DNR metilinimo dažnis yra labai žemas arba visi taikiniai yra nemetilinti (Turan ir kt., 2006; Badal ir kt., 2004; Fernandez ir kt., 2009).

### 3.3.3. ŽPV 51 genotipo DNR metilinimo tyrimai

Iš viso buvo ištirti 24 gimdos kaklelio mėginiai, kuriuose prieš tai buvo identifikuotas ŽPV 51 genotipas (žr 3.2.2. skyrelyje). Visi mėginiai pagal histologinę diagnozę suskirstyti į 5 pogrupius: CIN 1 (n = 6), CIN 2 (n = 4), CIN 3/CIS (n = 5), Ca (n = 1) ir besimptomė ŽPV 51 infekcija (n = 8). Pasirinktuose ŽPV 51 genomo regionuose buvo 27 CpG taikiniai: 8 taikiniai 3' L1 geno srityje (ŽPV 51 genomo sritis nuo 6916 nt iki 7021 nt), 4 taikiniai LCR 5' srityje (7228 nt – 7286 nt), 11 taikinių stipriklio srityje (7393 nt – 7594 nt) ir 4 taikiniai promotoriaus srityje (7762 nt – 54 nt) (19 lentelė).

ŽPV 51 genotipo metilinimo tyrimai buvo atliekami pirmą kartą, jokių duomenų iki tol nebuvo paskelbta. ŽPV 51 genotipo DNR metilinimas buvo nustatytas tik viename mėginyje, kuriame buvo histologiškai patvirtinta gimdos kaklelio vėžio diagnozė. Šiame mėginyje buvo metilinti visi CpG taikiniai, esantys ŽPV 51 L1 3' geno dalyje (6916 nt – 7021 nt). Visi kiti CpG taikiniai visuose tirtuose mėginiuose buvo nemetilinti. ŽPV 51 genotipo metilinimo rezultatai pateikiami 24 lentelėje.

**24 lentelė.** ŽPV 51 genotipo DNR metilinimo dažnis L1 3', LCR 5', stipriklio ir promotoriaus regionuose.

ŽPV 51								
Grupė	L1 3'		LCR 5'		Stipriklis		Promotorius	
	ŽPV teig.	%	ŽPV teig.	%	ŽPV teig.	%	ŽPV teig.	%
CIN 1 (n = 6)	0	0	0	0	0	0	0	0
CIN 2 (n = 4)	0	0	0	0	0	0	0	0
CIN 3/CIS (n = 5)	0	0	0	0	0	0	0	0
Ca (n = 1)	1	100	0	0	0	0	0	0
Besimptomė ŽPV 51 infekcija (n = 8)	0	0	0	0	0	0	0	0

Apibendrinant ŽPV DNR metilinimo tyrimo rezultatus, visų trijų tirtų onkogeninių ŽPV genotipų (ŽPV 16, 18, 51) DNR metilinimas dažniau nustatytas L1 3' geno sekoje nei LCR regione. Be to, visų trijų tirtų ŽPV genotipų DNR metilinimas yra dažnesnis gimdos kaklelio vėžio atveju nei besimptomės ŽPV infekcijos atveju. Kitų autorių duomenimis, aukštos rizikos ŽPV 31, 33, 45, 52 ir 58 genotipų DNR metilinimas taip pat buvo dažniau nustatytas L1 geno srityje nei LCR regione, o metilinimo dažnis koreliavo su gimdos kaklelio pakitimų laipsniu (Murakami ir kt., 2013; Vasiljevic ir kt., 2014; Wentzensen ir kt., 2012). Svarbu pažymėti, kad žemos rizikos ŽPV 6 ir 11 genotipų genomai yra visiškai nemetilinti (Ure ir Forslund, 2012; Gall ir kt., 2011).

Biologinis ŽPV L1 3' geno srities metilinimo ir gimdos kaklelio vėžio progresavimo ryšys yra nežinomas. Keletas tyrimų parodė, kad ŽPV L1 geno metilinimas yra susijęs su ŽPV integracija į ląstelės genomą (Kalantari ir kt.,

2004; Bryant ir kt., 2014; Kalantari ir kt., 2008; Van Tine ir kt., 2004). L1 baltymas nedalyvauja karcinogenezės procese, todėl ŽPV DNR metilinimas gali būti interpretuojamas kaip šeimininko gynybos mechanizmas prieš svetimą integruotą DNR (Doerfler ir kt., 2001; Sutter ir Doerfler, 1980). Pavyzdžiui, ląstelių linija CaSki turi tandemiais pasikartojimais integruotą ŽPV 16 genotipo DNR sekas, kurios yra puikus metilinimo taikynys. Tačiau tai nereiškia, kad ŽPV 16 genotipo genų raiška nevyksta. Kai kurie ŽPV genomai lieka nemetilinti, todėl ŽPV infekcija yra ir toliau palaikoma (Badal ir kt., 2003). Identifikuoti epigenetiniai aukštos rizikos ŽPV genomų pokyčiai gali būti naudojami kaip ŽPV inicijuotos karcinogenezės žymenys.

### **3.4. Žymens p16<sup>INK4A</sup> raiškos tyrimai kiekybinės PGR metodu**

Gimdos kaklelio epitelinių ląstelių pokyčiams diagnozuoti naudojamas citologinis tepinėlio tyrimas (PAP). Tačiau jo jautrumas ir specifiskumas yra gana žemi (Murphy ir kt., 2003). Taip pat nei citologinis testas, nei viruso genotipų nustatymas neparodo, ar gimdos kaklelio pakitimai progresuos ar ne (Cantor ir kt., 2003; Schiffman ir kt., 2007). Todėl yra aktualu sukurti metodus, kurie specifiskai ir tiksliai nustatytų gimdos kaklelio ląstelių pakitimus, susijusius su karcinogeneze.

Baltymas p16<sup>INK4A</sup> yra perspektyvus gimdos kaklelio ląstelių pakitimų vėžio diagnostinis žymuo. Šis baltymas yra vėžio slopiklis, kurio raiška padidėja, įvykus viruso sukeltai onkogeninei ląstelių transformacijai (Regauer ir Reich, 2007). Dėl intensyvios p16<sup>INK4A</sup> baltymo raiškos, jis gali būti naudojamas kaip gimdos kaklelio intraepitelinių pokyčių žymuo. Yra nustatyta, kad nedideli CIN pakitimai, kuriuose aptinkama padidėjusi p16<sup>INK4A</sup> baltymo raiška, dažniau vystosi į didesnio laipsnio CIN pakitimus (Kalof ir kt., 2006, Ishikawa ir kt., 2006). Be to, esant žemos rizikos ŽPV infekcijai, baltymo p16<sup>INK4A</sup> raiška yra mažesnė. Manoma, kad skirtingose gimdos kaklelio neoplazijos stadijose, p16<sup>INK4A</sup> raiška taip pat gali būti skirtingo lygio (Agoff ir kt., 2003).



Ankstesniuose kitų autorių tyimuose buvo analizuotas baltymo p16<sup>INK4A</sup> raiškos lygis pakitusiose gimdos kaklelio ląstelėse imunohistocheminės analizės metodu (Dijkstra ir kt., 2010; Ishikawa ir kt., 2006; Klaes ir kt., 2002). Tačiau publikuoti duomenys yra priešaringi. Paskelbtų duomenų skirtumai gali būti dėl nevienodų audinių fiksavimo metodų, skirtingo naudojamų antikūnų skiedimo bei nevienodo taikomų metodų jautrumo (Mulvany ir kt., 2008).

Mūsų atlikto tyrimo tikslas buvo ištirti p16<sup>INK4A</sup> RNR raišką atvirkštinės transkriptazės kiekybinės PGR metodu (AT-kPGR) gimdos kaklelio mėginiuose ir nustatyti RNR raiškos lygio koreliaciją su intraepiteliniais gimdos kaklelio ląstelių pakitimais.

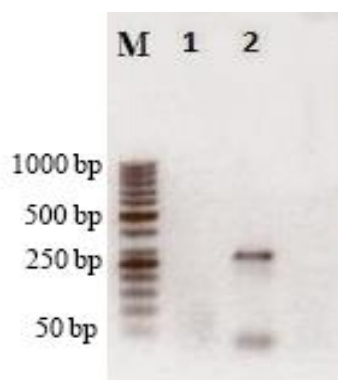
### 3.4.1. AT-kPGR sistemos, skirtos p16<sup>INK4A</sup> RNR raiškos tyrimams, sukūrimas ir optimizavimas

AT-kPGR sistemos sukūrimui ir optimizavimui buvo naudojama DNR išskirta iš HeLa ląstelių. Metodas buvo optimizuojamas pagal šiuos parametrus:

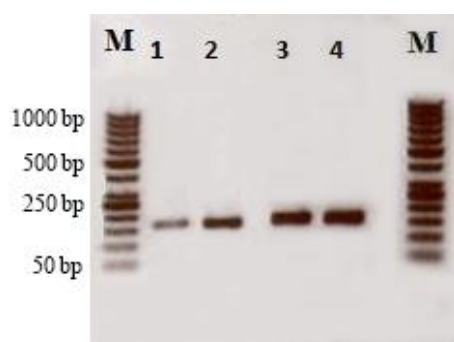
1. Parenkama tinkamiausia p16<sup>INK4A</sup> DNR sekai specifinė pradmenų pora.
2. Nustatoma pradmenų prilydymo temperatūra, panaudojant gradientinę PGR.
3. Parenkamas tinkamiausias PGR reakcijos buferinis tirpalas.
4. Parenkamas tinkamiausias vidinės kontrolės genas ir komplementarūs pradmenys.
5. Parenkamos tinkamiausios p16<sup>INK4A</sup> ir vidinės kontrolės genams specifinių pradmenų ir zondų koncentracijos.

Pirmajame optimizacijos etape buvo sukurti pradmenys ir parenkama tinkamiausia p16<sup>INK4A</sup> DNR sekai komplementarių pradmenų pora. Pradmenys sukurti naudojant Primer3 programą (<http://biotools.umassmed.edu>). Buvo įvertintos 3 pradmenų poros: Inkfor-3 ir Inkrev-3, Ink4for-1 ir Ink4rev-1, Ink4for-2 ir Ink4rev-2.

Naudojant Inkfor-3 ir Inkrev-3 pradmenų porą, gaunamas 294 bp dydžio PGR produktas, su Ink4for-1 ir Ink4rev-1 pradmenų pora gaunamas 140 bp ilgio PGR produktas, o su Ink4for-2 ir Ink4rev-2 pradmenų pora – 147 bp ilgio PGR produktas. Amplifikacijai naudoti šie komponentai: Maxima™ Hot Start PGR buferinis tirpalas (1x), MgCl<sub>2</sub> (3 mM), dNTP (0,2 mM), Maxima™ Hot Start *Taq* DNR polimerazė (1 v), betainas (1 M), pradmenys komplementarūs p16<sup>INK4A</sup> DNR sekai (0,4 μM) ir vanduo iki galutinio 25 μl reakcijos tūrio. Amplifikacija vykdoma šiuo režimu: 95 °C – 7 min (Hot Start *Taq* polimerazės aktyvacija), 35 ciklai DNR amplifikacijai: 95 °C – 30 s; 58 °C – 30 s (pradmenų prilydymas); 72 °C – 30 s, galutinis ciklas: 72 °C – 5 min. DNR elektroforezės rezultatai pateikiami 21 ir 22 paveiksluose.



**21 pav.** p16<sup>INK4A</sup> geno PGR produktas padaugintas su Inkfor-3 ir Inkrev-3 pradmenų pora (M raide pažymėtame takelyje DNR fragmentų ilgio standartas (O'GeneRuler™ 50 bp DNA, Thermo Fisher Scientific Baltics, Lietuva), 1,2 takeliuose su Inkfor-3 ir Inkrev-3 pradmenimis padaugintas p16<sup>INK4A</sup> geno fragmentas.



**22 pav.** p16<sup>INK4A</sup> geno PGR produktai padauginti su Ink4-1 ir Ink4-2 pradmenų poromis (M raide pažymėtame takelyje DNR fragmentų ilgio standartas (O'GeneRuler™ 50 bp DNA, Thermo Fisher Baltics, Lietuva), 1,2 takeliuose PGR produktas gautas su Ink4-1 pradmenimis, 3,4 takeliuose PGR produktas gautas su Ink4-2 pradmenimis).

Iš pateiktų DNR elektroforezės nuotraukų matyti, kad efektyviausiai amplifikacija vyko naudojant Ink4for-2 ir Ink4rev-2 pradmenų porą (Ink4-2). Ši pradmenų pora buvo pasirinkta tolimesniam AT-kPGR sistemos sukūrimui ir optimizavimui.

Kitame optimizacijos etape buvo parenkama optimali pradmenų prilydymo temperatūra, tinkamiausias buferinis tirpalas, vidinės kontrolės genas ir komplementarūs pradmenys bei nustatomos tinkamiausios naudotų pradmenų ir zondų koncentracijos. Visi patikrinti ir pasirinkti parametrai pateikiami 25 lentelėje.

**25 lentelė.** p16<sup>INK4A</sup> AT-kPGR sistemos optimizacijos metu patikrinti ir atrinkti tinkamiausi parametrai.

OPTIMIZACIJOS PARAMETRAI	PATIKRINTOS REAKCIJOS SĄLYGOS	OPTIMALIOS REAKCIJOS SĄLYGOS
<b>Pradmenų prilydymo temperatūra</b>	55–69 °C	55 °C
<b>Buferinis tirpalas</b>	1) Maxima™ Hot Start PGR buferinis tirpalas (10x) 2) Maxima™ Probe qPCR MasterMix (2x)	Maxima™ Probe qPCR MasterMix (2x)
<b>Vidinės kontrolės genas</b>	1) GAPDH 2) Integrinas	Integrinas
<b>Ink4-2 pradmenų koncentracija</b>	0,3–0,4 μM	0,4 μM
<b>Integrinui specifinių pradmenų koncentracija</b>	0,2–0,3 μM	0,2 μM
<b>Ink4-2 zondo koncentracija</b>	0,2–0,25 μM	0,25 μM
<b>Integrino zondo koncentracija</b>	0,15–0,25 μM	0,15 μM

Patikrinus visus optimizacijos parametrus, buvo atrinkti tinkamiausi: Ink4-2 pradmenų koncentracija – 0,4 μM, Ink4-2 zondo koncentracija – 0,25 μM, vidinės kontrolės genas – integrinas, bei integrinui specifinių pradmenų koncentracija – 0,2 μM, integrino zondo koncentracija – 0,15 μM. kPGR reakcija vykdymui pasirinktas optimalus režimas: 95 °C – 7 min (Hot Start *Taq* polimerazės aktyvacija), 40 ciklų DNR amplifikacijai: 95 °C – 30 s; 55 °C – 20 s (pradmenų prilydymas); 72 °C – 20 s.

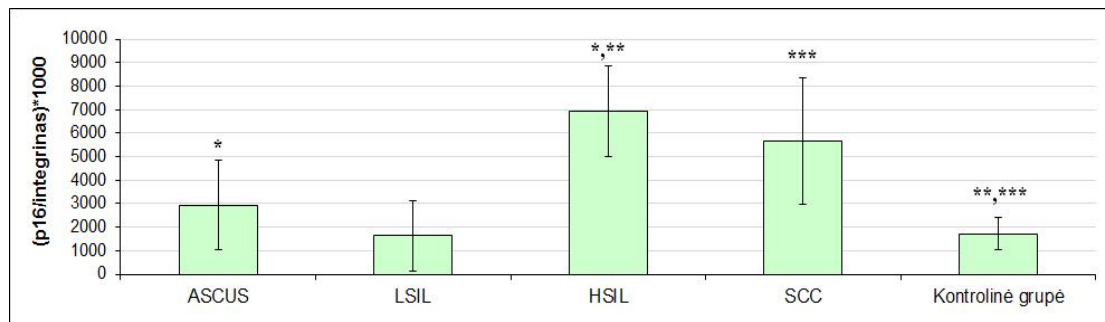
Parinkus optimalias kPGR sąlygas, toliau buvo kuriami p16<sup>INK4A</sup> ir vidinės kontrolės integrino RNR fragmentai, kurie buvo naudojami, siekiant nustatyti p16<sup>INK4A</sup> RNR kopijų skaičių klinikiniuose mėginiuose. Pirmajame darbo etape buvo išskirta DNR iš HeLa ląstelių. Naudojant p16<sup>INK4A</sup> DNR specifiskus Ink4-2 pradmenis ir integrinui komplementarius pradmenis, PGR metodu buvo padauginti p16<sup>INK4A</sup> ir integrino geno DNR fragmentai ir įklonuoti į plazmidę pTZ57R/T. Toliau plazmidė buvo kerpama su SapI (LguI) restrikcijos endonukleaze ir atliekamas DNR nurašymas *in vitro*, naudojant „Transcript AIT™ T7 High Yield Transcription Kit“ (Thermo Fisher Scientific Baltics, Lietuva) rinkinį. Nuo pasigamintų p16<sup>INK4A</sup> ir integrino RNR transkriptų buvo susintetinta kopijinė DNR (kDNR), kuri panaudota standartinių kreivių sukūrimui, vykdant AT-kPGR reakciją. Detalus naudotų metodų aprašymas pateiktas 2.2. skyriuje.

#### 3.4.2. p16<sup>INK4A</sup> RNR raiškos tyrimai klinikiniuose mėginiuose

Iš Nacionalinio vėžio instituto buvo gauti ir išanalizuoti 567 gimdos kaklelio urogenitalinių nuograndų mėginiai su patvirtinta citologine ir/arba histologine diagnoze. Iš visų tirtų mėginių buvo išskirta RNR ir DNR. Siekiant iš to paties mėginio išskirti RNR ir DNR, buvo naudojamas anksčiau aprašytas metodas (Chomczynski ir Sacchi, 1987) (žr. 2.2.8. ir 2.2.9. skyreliuose). RNR naudota p16<sup>INK4A</sup> raiškai ištirti, o DNR – bendrai ŽPV infekcijai ir viruso genotipui nustatyti. Išskirta RNR buvo verčiama į kDNR ir saugoma -70 °C. Naudojant naujai sukurtą ir optimizuotą AT-kPGR sistemą, buvo analizuojama p16<sup>INK4A</sup> RNR raiška. Standartinių kreivių sukūrimui p16<sup>INK4A</sup> ir integrino RNR transkriptai buvo skiedžiami nuo 10<sup>7</sup> kopijų/reakcijoje iki 10 kopijų. Kiekvienas skiedimas buvo pakartojamas 2 kartus. Teigiama kontrole AT-kPGR reakcijoje buvo naudojama kDNR, susintetinta nuo RNR, išgrynintos iš HeLa ląstelių linijos. Visi klinikiniai mėginiai buvo ištirti mažiausiai 2 kartus. Analizuojant rezultatus, nustatytas p16<sup>INK4A</sup> geno kopijų skaičius buvo dalinamas iš vidinės kontrolės integrino kopijų skaičiaus ir padaugintas iš

pasirinkto koeficiento ( $\times 1000$ ). Iš tų pačių mėginių išgryninta DNR buvo naudojama bendros ŽPV infekcijos ir ŽPV genotipų nustatymui.

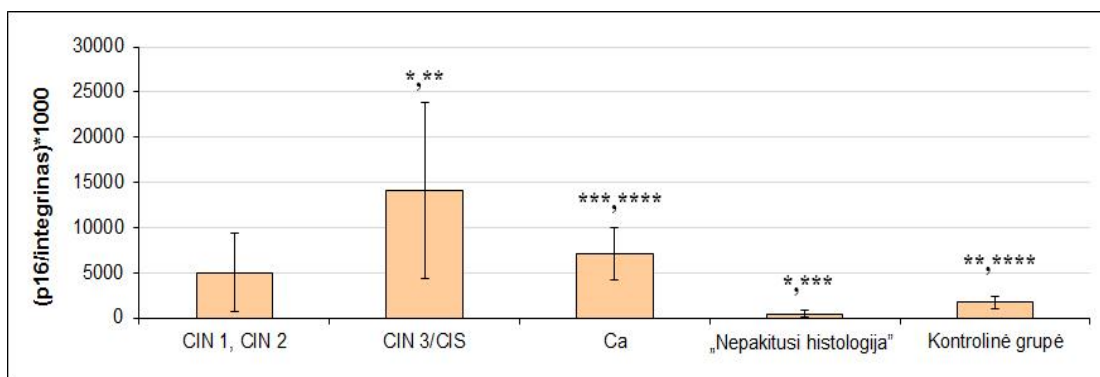
Visi urogenitalinių nuograndų mėginiai su žinoma citologine diagnoze ( $n = 348$ ) buvo suskirstyti į penkis pogrupius: ASCUS ( $n = 62$ ), LSIL ( $n = 21$ ), HSIL ( $n = 158$ ), SCC ( $n = 44$ ) ir kontrolinė grupė – mėginiai be citologinių ir histologinių pakitimų ( $n = 63$ ). Didžiausias p16<sup>INK4A</sup> RNR raiškos lygis nustatytas HSIL pogrupyje (RNR kopijų vidurkis 6941), o mažiausias – LSIL ir kontroliniuose pogrupiuose (atitinkamai RNR kopijų vidurkis 1624 ir 1710) (23 pav.). Statistiškai reikšmingi skirtumai gauti tarp HSIL ir ASCUS bei kontrolinės grupės, bei tarp SCC ir kontrolinės grupės ( $p < 0,05$ ).



**23 pav.** p16<sup>INK4A</sup> RNR kopijų skaičius (vidurkinės reikšmės ir 95 % PI) mėginiuose, suskirstytuose į pogrupius pagal citologinę diagnozę.

\*, \*\*, \*\*\*  $p < 0,05$ , remiantis Kruskal-Wallis testu (lyginamos grupės: \* ASCUS ir HSIL; \*\* HSIL ir kontrolinė grupė; \*\*\* SCC ir kontrolinė grupė).

Mėginiai su žinoma histologine diagnoze ( $n = 264$ ), buvo suskirstyti į 5 pogrupius: CIN 1/CIN 2 ( $n = 15$ ), CIN 3/CIS ( $n = 111$ ), Ca ( $n = 54$ ), „Nepakitusi histologija“ ( $n = 21$ ) ir kontrolinė grupė – mėginiai be citologinių ir histologinių pakitimų ( $n = 63$ ). Didžiausias p16<sup>INK4A</sup> RNR raiškos lygis nustatytas CIN 3/CIS pogrupyje (RNR kopijų vidurkis 14065), o mažiausias – „Nepakitusios histologijos“ ir kontrolinėje grupėje (RNR kopijų vidurkis atitinkamai 449 ir 1710) (24 pav.). Statistiškai reikšmingi skirtumai gauti tarp dviejų mėginių pogrupių su gimdos kaklelio pakitimais (CIN 3/CIS ir Ca) ir dviejų pogrupių be pakitimų („Nepakitusi histologija“ bei kontrolinė grupė) ( $p < 0,05$ ).



**24 pav.** p16<sup>INK4A</sup> RNR kopijų skaičius (vidurkinės reikšmės ir 95 % PI) mėginiuose, suskirstytuose į pogrupius pagal histologinę diagnozę.

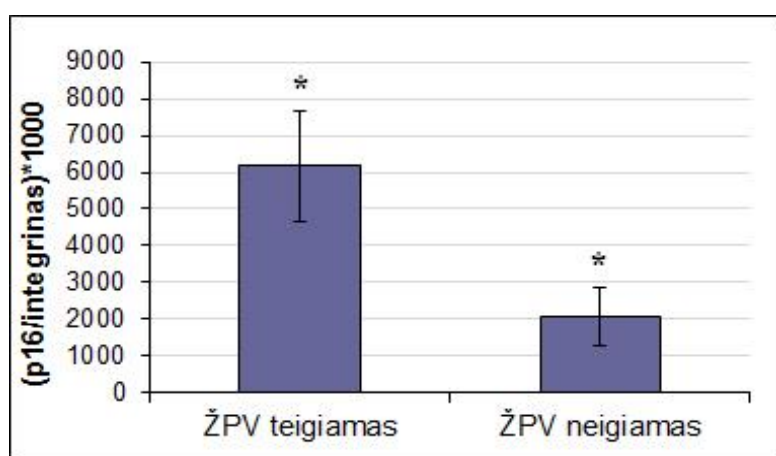
\*, \*\*, \*\*\*, \*\*\*\* p < 0,05, remiantis Kruskal-Wallis testu (lyginamos grupės: \* CIN3/ CIS ir „Nepakitusi histologija“; \*\* CIN3/ CIS ir kontrolinė grupė; \*\*\* Ca ir „Nepakitusi histologija“; \*\*\*\* Ca ir kontrolinė grupė).

Gauti rezultatai rodo, kad p16<sup>INK4A</sup> RNR raiška koreliuoja su citologiniais ir histologiniais gimdos kaklelio pakitimais. Šie rezultatai sutampa su anksčiau atliktų tyrimų paskelbtais duomenimis, kur p16<sup>INK4A</sup> baltymo raiška buvo nustatoma imunocitocheminės analizės būdu (Dijkstra ir kt., 2010; Hu ir kt., 2005; Ishikawa ir kt., 2006; Keating ir kt., 2001; Klaes ir kt., 2002). Nepakitusiose ląstelėse baltymo p16<sup>INK4A</sup> raiška nedidelė, tačiau esant ŽPV baltymo E7 raiškai, didėja ir baltymo p16<sup>INK4A</sup> raiška. Tokia padidėjusi p16<sup>INK4A</sup> RNR raiška gali būti panaudota kaip aktyvios ŽPV infekcijos žymuo. Mūsų tyrimas taip pat parodė, kad p16<sup>INK4A</sup> RNR raiškos lygis yra žemesnis vėžiniuose mėginiuose, lyginant su HSIL ir CIN 3/CIS mėginiais. Tai rodo, kad ląstelėje vykstantys procesai, kurie reguliuoja p16<sup>INK4A</sup> raišką, gali būti sutrikdyti progresuojant vėžiui (Saito ir Kiyono, 2007). Toks baltymo p16<sup>INK4A</sup> raiškos sumažėjimas vėžio atveju gali rodyti klaidingai neigiamus rezultatus, taikant imunodetekcijos metodus.

### 3.4.3. p16<sup>INK4A</sup> RNR raiškos sąsajos su bendra ŽPV infekcija ir ŽPV genotipais

Kadangi gimdos kaklelio ląstelių onkogeninę transformaciją lemia ŽPV infekcija, ištyrėme sąsajas tarp p16<sup>INK4A</sup> RNR raiškos lygio ir aukštos rizikos ŽPV genotipų infekcijos. Iš visų tirtų 567 gimdos kaklelio urogenitalinių nuograndų mėginių buvo išskirta DNR ir nustatyta bendra ŽPV infekcija,

naudojant anksčiau optimizuotas PGMY09/11 ir GP5+/GP6+ PGR sistemas (žr. 3.1.1. skyrelyje). Iš tirtų 567 mėginių teigiamus vidinės kontrolės signalus (pagal  $\beta$ -globino ir PSA genus) parodė 337 mėginiai: 275 mėginiai su pakitimais (tiriamoji grupė) ir 62 mėginiai be pakitimų (kontrolinė grupė). Likusieji mėginiai, neparodę vidinės kontrolės PGR signalo, nebuvo įtraukti į statistinę analizę. Tiriamojoje grupėje iš viso buvo identifikuoti 196 ŽPV teigiami mėginiai (71,3 %), o kontrolinėje – 5 ŽPV teigiami mėginiai (8,1 %). Tiriamojoje grupėje ištyrus  $p16^{INK4A}$  RNR raišką, nustatyta, kad tarp ŽPV teigiamų mėginių  $p16^{INK4A}$  RNR kopijų skaičiaus vidurkis yra 6170, o ŽPV neigiamų mėginių grupėje – 2078 (25 pav). Šis skirtumas buvo statistiškai reikšmingas ( $p < 0,001$ ).



**25 pav.**  $p16^{INK4A}$  RNR kopijų skaičius (vidurkinės reikšmės ir 95 % PI) mėginiuose, kuriuose nustatyta (ŽPV teigiami) arba nenustatyta (ŽPV neigiami) bendra ŽPV infekcija.

\*  $p < 0,001$ , remiantis Mann-Whitney U testu.

ŽPV teigiami mėginiai ( $n = 201$ ) toliau buvo genotipuojami naudojant anksčiau optimizuotas 4 daugines PGR sistemas, kurios nustato 16 aukštos rizikos ŽPV genotipų (ŽPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 73 ir 82) (žr. 3.1.2. skyrelyje). Daugiausiai buvo nustatyta ŽPV 16 teigiamų mėginių (37,3 %). Nė viename iš tirtų mėginių nebuvo nustatyta šių ŽPV genotipų: ŽPV 58, 59, 68, 73 ir 82. Du ir daugiau genotipų viename mėginyje nustatyta 34 mėginiuose (16,9 %). Nei vieno ŽPV genotipo nepavyko nustatyti

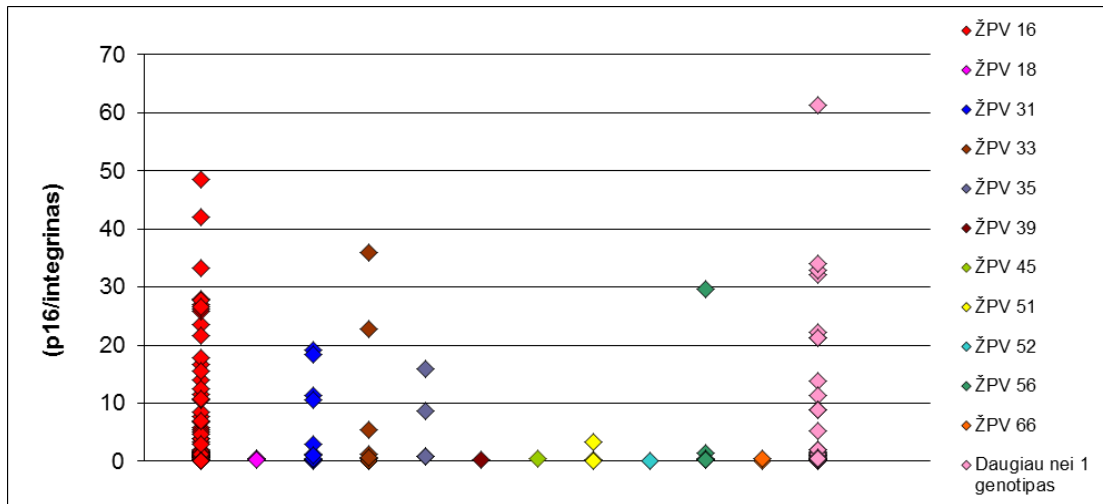
47 mėginiuose (23,4 %). Šie mėginiai gali būti infekuoti žemos rizikos ŽPV genotipais.

Lyginant p16<sup>INK4A</sup> RNR raiškos lygį mėginiuose, kuriuose nustatyti skirtingi aukštos rizikos ŽPV genotipai, koreliacijos tarp konkretaus ŽPV genotipo ir p16<sup>INK4A</sup> RNR raiškos lygio nerasta (26 lentelė, 26 pav.). Daugumoje mėginių, su skirtingais ŽPV genotipais, p16<sup>INK4A</sup> RNR kopijų skaičiaus vidurkiai buvo panašūs, pvz.: ŽPV 16 – 7054, ŽPV 31 – 5959, ŽPV 33 – 7409. Panašus p16<sup>INK4A</sup> RNR kopijų skaičius ŽPV 16, 31, 33, 35, 56 bei kelių ŽPV genotipų infekcijų atvejais rodo, kad aukštos rizikos ŽPV genotipai gali paveikti infekuotos ląstelės ciklą panašiais ar tokiais pat molekuliniais mechanizmais.

**26 lentelė.** p16<sup>INK4A</sup> RNR raiškos lygis mėginiuose, infekuotuose aukštos rizikos ŽPV genotipais.

ŽPV genotipas	Ištirtų mėginių skaičius	p16 <sup>INK4A</sup> RNR kopijų skaičius (vidurkis)
ŽPV 16	75	7054
ŽPV 18	3	415
ŽPV 31	11	5959
ŽPV 33	9	7409
ŽPV 35	4	6498
ŽPV 39	1	298
ŽPV 45	1	503
ŽPV 51	3	1201
ŽPV 52	1	33
ŽPV 56	5	6429
ŽPV 66	2	209
Daugiau nei 1 genotipas	34	8458





**26 pav.** Aukštos rizikos ŽPV genotipų ir p16<sup>INK4A</sup> RNR raiškos koreliacijos analizė.

Iš mūsų atlikto p16<sup>INK4A</sup> RNR raiškos tyrimo galima daryti išvadą, kad ŽPV onkogeninis potencialas, o ne konkretus aukštos rizikos ŽPV genotipas yra pagrindinis ląstelės ciklo reguliavimo ir gimdos kaklelio ląstelių pakitimus sukiantis veiksnys.

### **3.5. ŽPV paplitimas sveikų asmenų urogenitalinių nuograndų ir burnos epitelio mėginiuose bei ŽPV infekcijos sąsajos su rizikos veiksniais**

ŽPV aptinkamas ne tik lytinių takų, bet taip pat ir burnos gleivinėje, kur gali sukelti galvos ir kaklo sričių navikus. ŽPV gali būti randamas tiek sveikoje, tiek vėžinėje burnos ertmės gleivinėje. Įvairių tyrimų duomenimis, ŽPV paplitimas skirtingo amžiaus ir skirtingose šalyse gyvenančių asmenų burnos mėginiuose skiriasi. Aptinkamų ŽPV infekcijos atvejų skaičius tarp sveikų asmenų varijuoja nuo 0 % iki 81,1 %. Rezultatų skirtumai yra dėl tyrimui pasirinktos populiacijos, ištirtų mėginių skaičiaus, pasirinktų tyrimo metodų (Castro ir Bussoloti, 2006; Terai ir Takagi, 2001).

Manoma, kad dažniausiai ŽPV į burnos gleivinę patenka oralinių lytinių santykių metu, tačiau apie 20% atvejų ŽPV gali būti perduotas nėštumo metu iš motinos vaisiui arba virusas perduodamas gimdymo metu (Pannone ir kt., 2011). Yra paskelbta duomenų, kad ŽPV infekcija aptinkama ir vaikų burnos

gleivinėje (Sinal ir Woods, 2005; Durzynska ir kt., 2010). Tokie duomenys rodo svarbų burnos gleivinės vaidmenį ŽPV infekcijos kelyje.

Dėl didelio ŽPV paplitimo tarp moterų urogenitalinių mėginių bei didelio sergamumo gimdos kaklelio vėžiu Lietuvoje svarbu įvertinti ŽPV infekcijos paplitimą sveikų asmenų burnos mėginiuose. Iki šiol ŽPV paplitimas sveikų asmenų burnos mėginiuose Lietuvoje nebuvo tirtas.

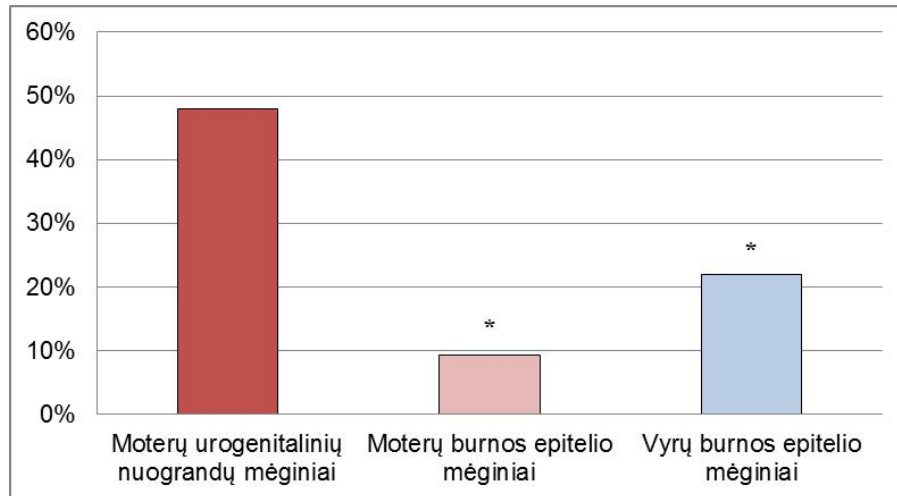
Šiame darbo etape buvo tiriamas ŽPV infekcijos ir atskirų ŽPV genotipų dažnis sveikų moterų ir vyrų burnos epitelio ėminiuose, bei tų pačių moterų urogenitalinių nuograndų mėginiuose. Tyrime naudotos anksčiau sukurtos ir naujai optimizuotos bendrąją ŽPV infekciją aptinkančios PGR sistemos (GP5+GP6+, PGMY09/11 ir HR\_HPВ) (žr. 3.1.1. skyrelyje) bei genotipus nustatančios dauginės PGR sistemos (MM-1, MM-2, MM-3, MM-4) (žr. 3.1.2. skyrelyje).

Iš viso buvo ištirti 657 klinikiniai mėginiai, kurie buvo suskirstyti į tris grupes: moterų urogenitalinių nuograndų mėginiai (n = 249), moterų burnos epitelio ląstelių mėginiai (n = 249) ir vyrų burnos epitelio ląstelių mėginiai (n = 159). Urogenitalinių nuograndų ir burnos mėginių tyrime dalyvavo tos pačios moterys. Ši moterų grupė išskirstyta dar į tris pogrupius: moterys, kurios 6 mėnesius vartojo sudėtines kontraceptines tabletes (SKT, n = 67), moterys kurios nevartojo sudėtinių kontraceptinių tablečių (SKT kontrolinė, n = 57) ir atsitiktinių moterų, atėjusių ginekologo konsultacijai, grupė („atsitiktinės moterys”, n = 125).

### 3.5.1. ŽPV infekcijos dažnis moterų ir vyrų klinikiniuose mėginiuose

Visi moterų ir vyrų mėginiai buvo patikrinti trijomis bendrą ŽPV infekciją nustatančiomis PGR sistemomis (GP5+GP6+, PGMY09/11 ir HR\_HPВ). Mėginys buvo laikomas ŽPV teigiamu, jei bent viena sistema buvo nustatyta ŽPV DNR. Ištyrus moterų urogenitalinių nuograndų mėginius (n = 249), tarp jų buvo nustatyta 119 ŽPV teigiamų mėginių (47,8 %). Ištyrus moterų ir vyrų burnos epitelio mėginius, tarp moterų burnos mėginių (n = 249)

buvo rasti 23 ŽPV teigiami mėginiai (9,2 %), tarp vyrų burnos mėginių (n = 159) buvo rasti 35 ŽPV teigiami mėginiai (22,0 %) (27 pav.).



**27 pav.** Bendros ŽPV infekcijos dažnis moterų urogenitaliniuose ir burnos mėginiuose (n = 249) bei vyrų burnos mėginiuose (n = 159).

\* $p < 0,001$ , remiantis  $\chi^2$  testu.

Tyrimė dalyvaujančioms moterims nebuvo nustatomi citologiniai ar histologiniai gimdos kaklelio pakitimai, todėl nebuvo išskiriamos grupės pagal gimdos kaklelio pakitimus. Šioje grupėje buvo tiriamos atsitiktinės moterys, kurios gali būti sveikos arba turėti citologinių gimdos kaklelio pakitimų. Lyginant gautus rezultatus su anksčiau Lietuvoje atliktu tyrimu, kuriame buvo tiriamos taip pat atsitiktinės moterys, atėjusios ginekologo konsultacijai, buvo nustatytas žymiai aukštesnis ŽPV teigiamų mėginių skaičius. Mūsų tyrimė nustatyta 47,8 %, o 2006 m. atliktame tyrimė 25,1 % ŽPV teigiami mėginiai (Kliucinskas ir kt., 2006). Šio darbo metu nustatytas ŽPV infekcijos dažnis yra panašus į anksčiau Lietuvoje atliktų tyrimų duomenis, kuriuose buvo tiriami moterų urogenitalinių nuograndų mėginiai su nustatytais citologiniais pakitimais (45,5 %) (Gudlevičienė ir kt., 2010). Lyginant gautus rezultatus su mūsų anksčiau atliktu tyrimu, kuriame tyrėme ŽPV infekcijos dažnį moterų grupėse su tikslia citologine ir histologine diagnoze (žr. 3.2.1. skyrelyje), dabartiniame tyrimė nustatytas ŽPV infekcijos dažnis yra mažesnis, nei moterų grupėje su citologiniais pakitimais (67,6 %), tačiau didesnis nei sveikų moterų grupėje (24,2 %). Lyginant mūsų gautus rezultatus su kitų šalių ŽPV paplitimo

duomenimis, ŽPV infekcijos dažnis tarp atsitiktinai pasirinktų moterų Lietuvoje yra didesnis, nei kitose šalyse: Danijoje buvo nustatyta 33,4 % ŽPV teigiamų mėginių (Rebolj ir kt., 2014), o Estijoje – 36,8 % (Uuskula ir kt., 2010).

ŽPV infekcijos dažnis tirtuose moterų (9,2 %) ir vyrų (22,0 %) burnos epitelio mėginiuose statistiškai reikšmingai skyrėsi ( $p < 0,001$ ). Tokie rezultatai rodo, kad vyrai gali būti viruso nešiotojai ir tai gali būti svarbus veiksnys ŽPV infekcijos cikle.

ŽPV paplitimas burnos mėginiuose Lietuvoje iki šiol nebuvo tiriamas, toks tyrimas buvo atliekamas pirmą kartą. Lyginant su kitų šalių duomenimis, mūsų nustatytas ŽPV infekcijos dažnis vyrų burnos mėginiuose Lietuvoje yra aukštesnis, nei kitose šalyse. Suomijoje vyrų burnos epitelio mėginiuose buvo nustatyta 18,3 % ŽPV teigiamų mėginių (Kero ir kt., 2012), Italijoje – 14,5 % (Montaldo ir kt., 2007), Didžiojoje Britanijoje – 3,9 % (Kujan ir kt., 2006). Tuo tarpu mūsų nustatytas ŽPV infekcijos dažnis moterų burnos epitelio mėginiuose yra žemesnis nei Suomijoje (17,2 %) (Kero ir kt., 2011), Italijoje (21,1 %) (Montaldo ir kt., 2007) bei Didžiojoje Britanijoje (12,5 %) (Kujan ir kt., 2006), tačiau aukštesnis nei Ispanijoje (8,5 %) (Canadas ir kt., 2004). Visų atliktų tyrimų bendra tendencija yra panaši: ŽPV infekcija dažniau nustatoma vyrų burnos epitelio mėginiuose nei moterų.

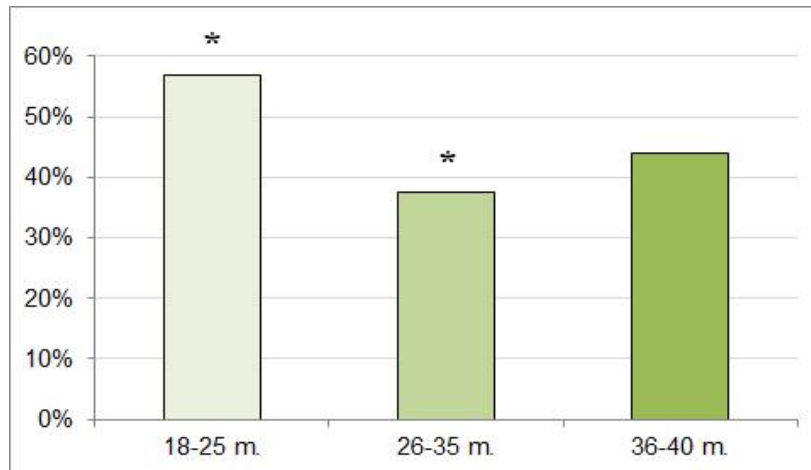
Burnos epitelio tyrimai rodo, kad burnos epitelis ir seilės gali vaidinti svarbų vaidmenį ŽPV plitimo kelyje, todėl svarbu tirti ne tik gimdos kaklelio epitelio mėginius, bet taip pat ir burnos epitelio mėginius. Neinvaziniai burnos epitelio tyrimai yra paprasti, patogūs ir neskausmingi pacientams. Toks tyrimas gali būti naudingas prognozuojant galvos ir kaklo vėžio atsiradimą, be to apsaugotų nuo žalos, kuri gali įvykti, jei nebus laiku nustatytas ŽPV, ypač kai yra padidėjusi rizika vėžiui išsivystyti (tabako ir alkoholio vartojimas ir kt.).

### 3.5.2. ŽPV infekcijos dažnis skirtingo amžiaus asmenų grupėse

Siekiant įvertinti ŽPV infekcijos dažnį skirtingose amžiaus grupėse, tiriamųjų buvo paprašyta nurodyti savo amžių. Iš tyrime dalyvavusių 657

asmenų, savo amžių nurodė 637 tiriamieji. Šių asmenų mėginiai buvo panaudoti ŽPV paplitimo analizei pagal amžiaus grupes: moterų urogenitalinių nuograndų ir burnos epitelio mėginių buvo 241, o vyrų burnos epitelio mėginių – 155. Iš viso buvo išskirtos 3 amžiaus grupės: 18–25 m. (n = 111), 26–36 m. (n = 115) ir 36–40 m. (n = 23).

Moterų urogenitalinių nuograndų mėginiuose daugiausiai ŽPV infekcijos atvejų buvo nustatyta jauniausių moterų grupėje (18–25 m., 56,8 %), o mažiausiai - vidurinėje amžiaus grupėje (26–36 m., 37,4 %) ( $p < 0,001$ ). Vyriausių moterų tarpe (36–40 m.) nustatyta 43,4 % ŽPV teigiamų mėginių. ŽPV dažnis skirtingo amžiaus moterų urogenitalinių nuograndų mėginių grupėse pateikiamas 28 paveiksle.



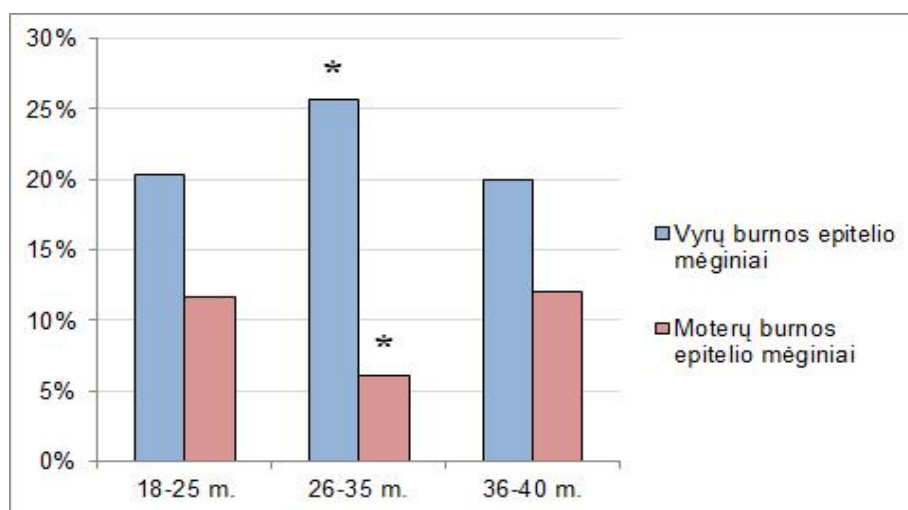
**28 pav.** ŽPV paplitimas skirtingo amžiaus moterų urogenitalinių nuograndų mėginiuose.

\* $p < 0,001$ , remiantis  $\chi^2$  testu.

Panaši ŽPV paplitimo tendencija aprašoma ir mokslinėje literatūroje (Bruni ir kt., 2016; Gearheart ir kt., 2011). Daugiausiai ŽPV infekcijos atvejų nustatoma jaunesnių moterų (iki 25 m.) amžiaus grupėje. Vėliau – iki 35 m. – ŽPV infekcijos dažnis mažėja, o vyresniame amžiuje vėl padidėja, ypač menopauzės laikotarpiu (Bruni ir kt., 2016). Didelis ŽPV infekcijos dažnis jaunų moterų grupėje paaiškinamas tuo, kad jaunų moterų epitelyje gaminamas mažas apsauginių gleivių kiekis, todėl šiuo laikotarpiu gleivinė yra jautresnė lytiškai plintančioms infekcijoms (Bosch ir kt. 2002). Priežastys, kodėl ŽPV

infekcijos dažnis yra didesnis tarp vyresnio amžiaus moterų, nėra iki galo žinomas. Manoma, kad vyresniame amžiuje gali dar kartą suaktyvėti prieš tai įgyta ŽPV infekcija, t.y., ŽPV kopijų skaičius gali sumažėti iki tokio lygio, kad jo nepavyksta aptikti, o vėliau virusas gali suaktyvėti ir vėl būti aptinkamas. Organizmo sugebėjimas visiškai sunaikinti ŽPV infekciją priklauso nuo imuninės sistemos, lytinių hormonų lygio bei lytinių takų gleivinės epitelio funkcijų (Brown ir Weaver, 2013; Gravitt ir kt., 2012).

Moterų burnos epitelio mėginiuose didžiausias ŽPV infekcijos dažnis nustatytas vyriausių moterų amžiaus grupėje (36–40 m., 13,0 %). Tačiau tarp visų moterų amžiaus grupių statistiškai reikšmingo skirtumo nebuvo nustatyta. Tarp vyrų burnos epitelio mėginių didžiausias viruso paplitimas nustatytas vidutinio amžiaus grupėje (26–35 m., 25,7 %). Tarp vyrų amžiaus grupių taip pat nenustatytas statistiškai reikšmingas skirtumas. Tačiau lyginant vidutinio amžiaus moterų (6,1 %) ir vyrų grupes (25,7 %), nustatytas statistiškai reikšmingas skirtumas ( $p < 0,05$ ). Duomenys apie ŽPV paplitimą tarp vyrų ir moterų burnos epitelio mėginių skirtingose amžiaus grupėse pateikiami 29 paveiksle.



**29 pav.** ŽPV dažnis vyrų ir moterų burnos epitelio mėginiuose skirtingose amžiaus grupėse.

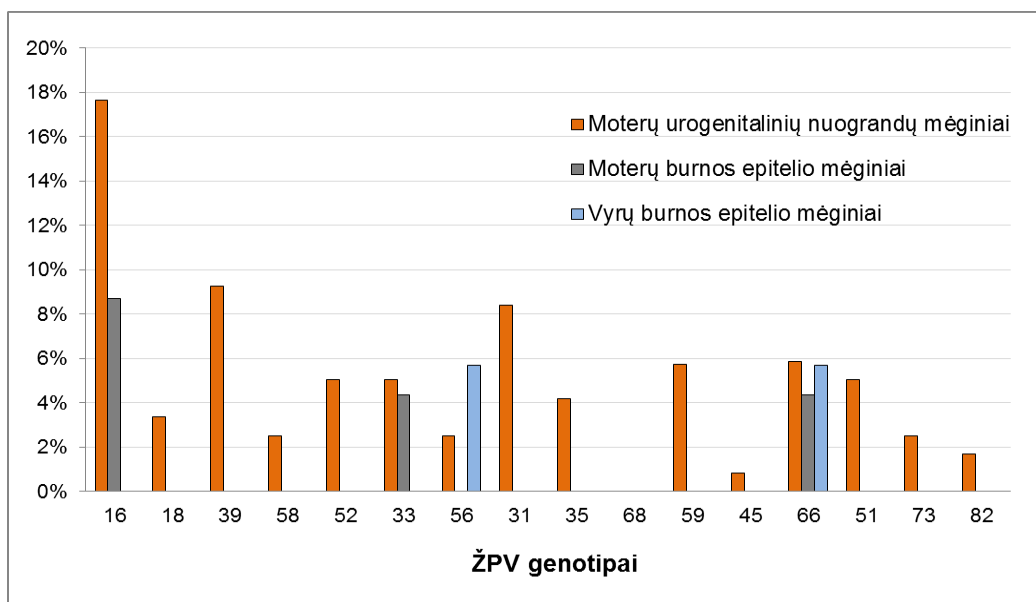
\* $p < 0,05$ , remiantis  $\chi^2$  testu.

Mūsų tyrime nustatytas ŽPV infekcijos dažnis skirtingose amžiaus grupėse yra didesnis, lyginant su kitų autorių duomenimis. JAV ŽPV paplitimas sveikų moterų ir vyrų burnos mėginiuose buvo atitinkamai 7,8 % ir 15,2 % (D'Souza ir kt., 2014). Kitame JAV atliktame populiaciniame tyrime bendras 30–34 m. amžiaus moterų ir vyrų nustatytas ŽPV dažnis burnos epitelio mėginiuose yra 7,9 % (Gillison ir kt., 2012).

### 3.5.3. ŽPV genotipų dažnis moterų ir vyrų klinikiniuose mėginiuose

Aptikus ŽPV infekciją, būtina nustatyti ir viruso genotipą. Nustačius aukštos rizikos ŽPV genotipą, padidėja rizika išsivystyti ne tik gimdos kaklelio, bet ir kitų vietų (anogenitalinių sričių, galvos ir kaklo) vėžiui. Šiame tyrime visi bendrą ŽPV infekciją parodę mėginiai toliau buvo genotipuojami, naudojant optimizuotas keturias daugines PGR sistemas, kurios nustato 16 aukštos rizikos ŽPV genotipų (MM-1, MM-2, MM-3, MM-4).

Moterų urogenitalinių nuograndų mėginių grupėje, ŽPV genotipai buvo nustatyti 71 mėginyje iš tirtų 119 ŽPV teigiamų mėginių. Moterų burnos epitelio mėginiuose genotipai identifikuoti 2 mėginiuose iš tirtų 23 ŽPV teigiamų mėginių, o vyrų grupėje – 4 mėginiuose iš tirtų 35. Urogenitalinių nuograndų mėginių grupėje daugiausia nustatyta ŽPV 16 genotipo atvejų (17,7 %) ( $p < 0,05$ ). Toliau pagal paplitimą genotipai išsidėstė taip: ŽPV 39 – 9,2 %, ŽPV 31 – 8,4 %, ŽPV 66 – 5,9 %, ŽPV 59 – 5,7 %, ŽPV 52 – 5,0 %, ŽPV 33 – 5,0 %, ŽPV 51 – 5,0 %, ŽPV 35 – 4,0 %, ŽPV 18 – 3,4 %, ŽPV 58 – 2,5 %, ŽPV 56 – 2,5 %, ŽPV 73 – 2,5 %, ŽPV 18 – 1,7 %, ŽPV 45 – 0,8 %. Moterų burnos epitelio mėginiuose identifikuoti 3 genotipai (16, 33, 66), o vyrų – 2 genotipai (56, 66). ŽPV genotipų paplitimas tarp moterų ir vyrų grupių pateikiamas 30 paveiksle.



**30 pav.** 16 ŽPV genotipų dažnis tirtuose vyrų ir moterų klinikiuose mėginiuose, kuriuose prieš tai nustatyta ŽPV infekcija.

Gauti rezultatai sutampa su literatūroje pateikiamais duomenimis, kad visame pasaulyje labiausiai paplitęs yra ŽPV 16 genotipas. Nustatytas ŽPV 16 genotipo paplitimas (17,7 %) yra pavojingai aukštas, lyginant su visame pasaulyje pateikiamu šio tipo paplitimu (19,1 %), kuris aptinkamas jau esant nedideliems gimdos kaklelio citologiniams pokyčiams (Bruni ir kt., 2015), tuo tarpu mūsų tyrime dalyvavo moterys, kurios neturėjo jokių nusiskundimų. Po ŽPV 16 genotipo dažniausiai buvo aptikti 39 (9,2 %), 31 (8,4 %) ir 66 (5,9 %) genotipai. Europoje šie genotipai taip pat patenka į dažniausiai nustatomų ŽPV genotipų sąrašą, tačiau mūsų tyrime nustatytas paplitimo dažnis yra aukštesnis lyginant su Europos vidurkiu (ŽPV 39 – 0,8 %, ŽPV 31 – 2,3 %, ŽPV 66 – 0,8 %) (Bruni ir kt., 2015). ŽPV 18 genotipas, kuris literatūroje aprašomas kaip dažniausiai kartu su ŽPV 16 genotipu sukeliantis gimdos kaklelio vėžį, mūsų tyrime nustatytas tik 3,4 % ŽPV teigiamų mėginių.

Moterų urogenitalinių nuograndų ir burnos epitelio mėginiai buvo surinkti iš tų pačių moterų, todėl buvo paraleliai analizuojamas ŽPV infekcijos dažnis tų pačių moterų burnos ir gimdos kaklelio gleivinės mėginiuose. Iš 126 urogenitalinių nuograndų ir burnos ŽPV teigiamų mėginių, 16 mėginių (12,7 %) nustatyta ŽPV infekcija abiejų tipų mėginiuose. Atsikartojantys ŽPV



genotipai burnos ir gimdos kaklelio mėginiuose nustatyti tik vienu atveju: aptikta dviguba ŽPV 16 ir 33 infekcija. Detalesnės genotipų atsikartojamumo analizės nepavyko atlikti, nes burnos mėginiuose ŽPV genotipai nustatyti tik dviejuose mėginiuose. Kituose mėginiuose nepavyko nustatyti genotipų galimai dėl dviejų priežasčių: arba burnos epitelio mėginiai infekuoti žemos rizikos genotipais (o mūsų dauginės PGR sistemos nustato tik aukštos rizikos genotipus), arba dauginių PGR sistemų jautrumas buvo per mažas aptikti infekciją. Pagrindinė problema dirbant su burnos mėginiais yra ta, kad paimamas medžiagos kiekis yra nedidelis, be to, viruso kiekis burnos gleivinėje taip pat dažnai būna mažas. Žemą genotipų atsikartojamumą gimdos kaklelio ir burnos mėginiuose patvirtina ir kiti tyrimai (Tatar ir kt., 2014; Liu ir kt., 2015).

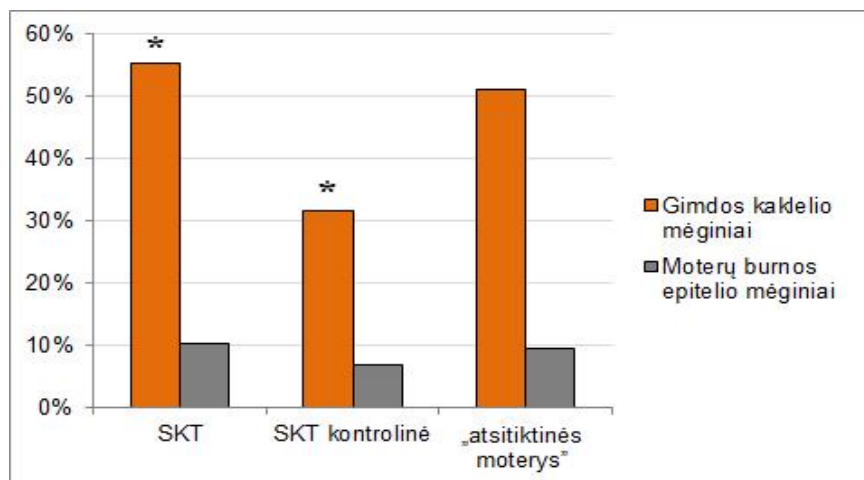
#### 3.5.4. Sąsajos tarp ŽPV infekcijos dažnio ir sudėtinių kontraceptinių tablečių vartojimo

Manoma, kad vienas iš svarbių ŽPV infekcijos paplitimo ir gimdos kaklelio vėžio išsivystymo rizikos veiksnių yra sudėtinių kontraceptinių tablečių (SKT) vartojimas. Įvairūs tyrimai parodė sąsajas tarp ilgalaikio SKT vartojimo (> 5 m.) ir ŽPV infekcijos dažnio (Ley ir kt., 1991; Kjaer ir kt., 1997; Marks ir kt., 2011). Iki šiol Lietuvoje panašūs tyrimai nebuvo atlikti. Dėl didelio ŽPV infekcijos paplitimo Lietuvoje ir didelio SKT populiarumo tokie tyrimai itin aktualūs. Lietuvoje SKT vartojimas yra aukštas: PSO duomenimis Lietuva patenka į antrą pagal dažnumą SKT vartojimo dažnį (< 20,5 %; vertinimo skalė: ≤ 2,7 %; < 6,6 %; < 12,4 %; < 20,5 %; ≥ 25 %). Todėl svarbu ištirti SKT poveikį ŽPV paplitimui.

Šiame tyrime tyrėme sąsajas tarp trumpalaikio (6 mėn.) SKT vartojimo ir ŽPV infekcijos dažnio. Visi moterų urogenitalinių nuograndų ir burnos mėginiai buvo išskirstyti į tris grupes: moterys, kurios 6 mėnesius vartojo sudėtines kontraceptines tabletes (SKT, n = 67), moterys kurios nevartojo sudėtinių kontraceptinių tablečių (SKT kontrolinė, n = 57) ir atsiktinių

moterų, atėjusių ginekologo konsultacijai, grupė („atsitiktinės moterys”, n = 125).

Didžiausias ŽPV infekcijos dažnis nustatytas SKT vartojančių moterų urogenitalinių nuograndų mėginiuose (55,2 % ŽPV teigiamų mėginių). Mažiausiai ŽPV infekcijos atvejų nustatyta SKT nevartojusių moterų grupėje (31,6 %) (SKT kontrolinė). Atsitiktinių moterų grupėje nustatyta 51,2 % ŽPV teigiamų mėginių. Tarp SKT vartojusių ir nevartojusių moterų grupių nustatytas statistiškai reikšmingas skirtumas ( $p < 0,05$ ). Burnos epitelio mėginiuose statistiškai reikšmingo skirtumo nenustatyta. Visose grupėse rastas panašus ŽPV teigiamų mėginių skaičius (SKT – 10,4 %, SKT kontrolinė grupė – 7,0 %, „atsitiktinės moterys” – 9,6 %). Duomenys apie ŽPV infekcijos dažnį SKT vartojančių, nevartojančių ir atsitiktinių moterų grupėse pateikiamas 31 paveiksle.



**31 pav.** Bendros ŽPV infekcijos dažnis SKT vartojančių, nevartojančių ir atsitiktinių moterų grupėse.

\* $p < 0,05$ , remiantis  $\chi^2$  testu.

Didesnis ŽPV infekcijos paplitimas SKT vartojančių moterų grupėje gali būti dėl gleivinės pokyčių, kuri tampa imlesnė naujoms infekcijoms bei prailgina jau esamos ŽPV infekcijos buvimo laiką organizme. Tyrimai parodė, kad SKT pagreitina gimdos kaklelio gleivinės brendimą ir ji tampa imlesnė infekcijoms (Gariglio ir kt., 2009). Didesnis ŽPV infekcijos dažnis tarp moterų

vartojančių SKT siejamas ir su moterų lytiniais hormonais. Šie hormonai gali stimuliuoti ŽPV onkogenų raišką, veikti gimdos kaklelio vietinį imuninį atsaką ir skatinti ląstelių proliferaciją (Mitrani-Rosenbaum ir kt., 1989; Mittal ir kt., 1993; Delvenne ir kt., 2007; Gariglio ir kt., 2009).

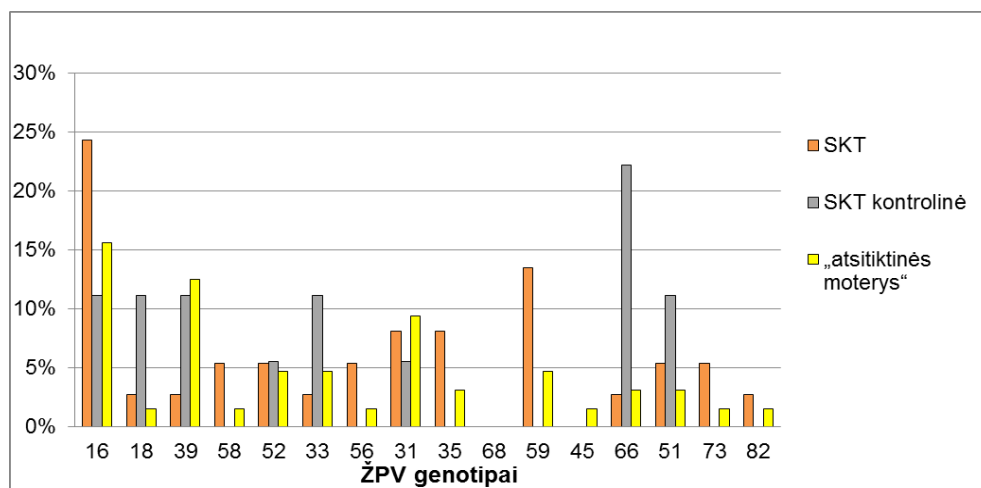
Literatūroje pateikti duomenys apie SKT ir ŽPV infekcijos sąsajas yra gana prieštaringi. Yra tyrimų, kurie neparodė jokio ryšio tarp SKT vartojimo ir ŽPV infekcijos paplitimo (Green ir kt., 2003). Tačiau daugelis tyrimų parodė sąsajas tarp ilgalaikio SKT vartojimo (> 5 m.) ir didesnio ŽPV infekcijos dažnio (Ley ir kt., 1991; Kjaer ir kt., 1997; Marks ir kt., 2011; Luhn ir kt., 2013). Kitų tyrimų duomenimis, trumpalaikis SKT vartojimas laikomas ≤ 5 m. Vieni tyrimai parodė ŽPV infekcijos paplitimo ryšį su trumpalaikiu SKT vartojimu (≤ 5 m.) (Rousseau ir kt., 2000; Kjaer ir kt., 1997), kiti ryšio neparodė (Deacon ir kt., 2000; Moreno ir kt., 2002). Tyrimų duomenimis vartojant SKT 15 ir daugiau metų, padidėja gimdos kaklelio vėžio rizika (Roura ir kt., 2016). Mūsų tyrimo duomenimis, net ir trumpalaikis (6 mėn.) SKT vartojimas padidina ŽPV infekcijos atvejų skaičių, todėl galima teigti, kad SKT vartojimas yra svarbus ŽPV infekcijos paplitimo rizikos veiksnys.

### 3.5.5. Sąsajos tarp ŽPV genotipų dažnio ir sudėtinių kontraceptinių tablečių vartojimo

Nustatius sąsajas tarp bendros ŽPV infekcijos ir SKT vartojimo, toliau buvo tiriamas ryšys tarp ŽPV genotipų ir šių preparatų naudojimo. Moterys, kurių urogenitalinių nuograndų mėginiai buvo ŽPV teigiami, buvo suskirstytos į šias grupes: moterys, kurios vartojo sudėtines kontraceptines tabletes (SKT, n = 37), moterys kurios nevartojo sudėtinių kontraceptinių tablečių (SKT kontrolinė, n = 18) ir atsitiktinės moterys, atėjusios ginekologo konsultacijai („atsitiktinės moterys“, n = 64).

SKT vartojančių moterų grupėje ŽPV genotipai buvo nustatyti 24 mėginiuose iš tirtų 37 ŽPV teigiamų mėginių (64,9 %), SKT kontrolinėje – 12 iš tirtų 18 ŽPV teigiamų mėginių (66,7 %), „atsitiktinių moterų“ grupėje – 32 iš tirtų 64 ŽPV teigiamų mėginių (50 %). Visose tirtose grupėse daugiausiai

aptikta ŽPV 16 genotipo teigiamų mėginių. SKT grupėje nustatyta 24,3 % ŽPV 16 teigiamų mėginių, SKT kontrolinėje grupėje – 11,1 %, „atsitiktinių moterų” grupėje – 15,6 % ŽPV 16 teigiamų mėginių. Lyginant ŽPV 16 ir kitų genotipų pasiskirstymą tarp grupių, statistiškai reikšmingo skirtumo nenustatyta ( $p > 0,05$ ). ŽPV genotipų pasiskirstymas tarp moterų urogenitalinių nuogrاندų mėginių grupių pateikiamas 32 paveiksle.



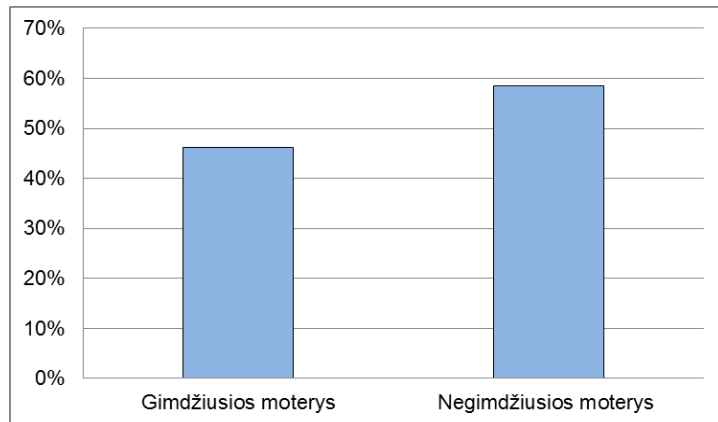
**32 pav.** ŽPV genotipų pasiskirstymas SKT vartojančių, nevartojančių ir atsitiktinių moterų urogenitalinių nuogrاندų mėginiuose.

Gauti rezultatai rodo, kad ŽPV genotipai tarp grupių yra pasiskirstę tolygiai, todėl galima daryti išvadą, kad SKT vartojimas padidina bendros ŽPV infekcijos riziką, tačiau nepadidina konkretaus genotipo paplitimo dažnio

### 3.5.6. Šąsajos tarp ŽPV infekcijos paplitimo ir gimdymo

Siekiant nustatyti šąsajas tarp bendros ŽPV infekcijos dažnio ir gimdymo, buvo iširti 66 moterų urogenitalinių nuogrاندų mėginiai. Informaciją apie gimdymą gavome iš moterų užpildytos „Bendrosios moterų anketos“. Tyrime dalyvavo 13 gimdžiusių ir 53 negimdžiusios moterys. ŽPV infekcija nustatyta 6 gimdžiusioms moterims (46,2 %) ir 31 negimdžiusiai moteriai (58,5 %) ( $p > 0,05$ ). ŽPV infekcijos paplitimo rezultatai tarp tirtų grupių pateikiami 33 paveiksle. Literatūroje pateikiami duomenys apie ŽPV paplitimą tarp gimdžiusių ir negimdžiusių moterų yra prieštaringi. Vieni

tyrimai parodė statistiškai reikšmingą ŽPV paplitimo skirtumą tarp šių grupių (Castellsague ir kt., 2002; Jensen ir kt., 2013), kiti reikšmingo skirtumo nenustatė (Bardina ir kt., 2008).



**33 pav.** ŽPV infekcijos dažnis gimdžiusių ir negimdžiusių moterų grupėse.

Siekiant įvertinti sąsajas tarp gimdymų skaičiaus ir ŽPV infekcijos dažnio, gimdžiusios moterys buvo suskirstytos į dvi grupes: vieną ( $n = 10$ ) ir du kartus ( $n = 3$ ) gimdžiusios moterys. Vieną kartą gimdžiusių moterų tarpe nustatyti 3 ŽPV teigiami mėginiai (30,0 %), o du kartus gimdžiusių moterų tarpe visi trys tirti mėginiai buvo ŽPV teigiami (100 %). Dėl mažo mėginių skaičiaus statistiškai reikšmingas skirtumas nenustatytas ( $p > 0,05$ ). Literatūros duomenimis, ŽPV infekcijos rizika didėja, didėjant gimdymų skaičiui (Munoz ir kt., 2002; Jensen ir kt., 2013; Castellsague ir kt., 2002). Padidėjusi rizika manoma yra dėl didesnio hormonų kiekio ir susilpnėjusio imuniteto (Appleby ir kt., 2006).

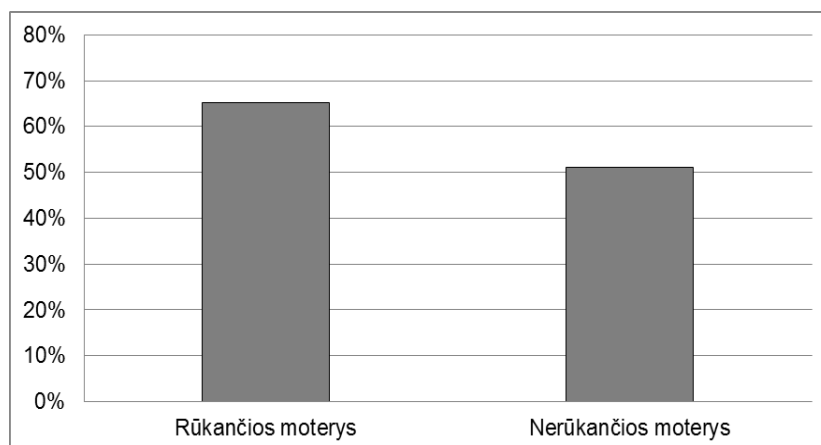
### 3.5.7. Sąsajos tarp ŽPV infekcijos dažnio ir rūkymo

Siekiant nustatyti sąsajas tarp ŽPV infekcijos ir rūkymo, ištyrėme 66 moterų urogenitalinių nuograndų mėginius. Duomenis apie rūkymą gavome iš moterų užpildytos „Bendrosios moterų anketos“. Visi mėginiai buvo suskirstyti į dvi grupes: rūkančių ( $n = 23$ ) ir nerūkančių ( $n = 43$ ) moterų. Rūkančių moterų grupėje buvo nustatyta 15 ŽPV teigiamų mėginių (65,2 %), o nerūkančių – 22 (51,2 %). Statistiškai reikšmingas skirtumas tarp grupių nenustatytas

( $p > 0,05$ ). ŽPV infekcijos paplitimo rezultatai tarp rūkančių ir nerūkančių moterų pateikiami 34 paveiksle.

Lyginant ŽPV infekcijos dažnį tarp moterų, surūkančių skirtingą cigarečių skaičių per dieną, mėginiai buvo suskirstyti į dvi grupes: moterys surūkančios 1–6 cigaretes per dieną ( $n = 12$ ) ir moterys surūkančios daugiau kaip 6 cigaretes per dieną ( $n = 11$ ). Moterų, surūkančių 1–6 cigaretes grupėje aptikti 6 ŽPV teigiami mėginiai (50,0 %), o daugiau kaip 6 cigaretes surūkančių moterų grupėje aptikti 9 ŽPV teigiami mėginiai (81,8 %). Dėl mažo mėginių skaičiaus statistiškai reikšmingas skirtumas tarp grupių nenustatytas ( $p > 0,05$ ).

Dauguma literatūroje pateiktų duomenų apie ŽPV infekcijos didesnę paplitimą tarp rūkančių moterų yra statistiškai patikimi (Kliucinskas ir kt., 2006; Castellsague ir kt., 2002; Xi ir kt., 2009). Taip pat įvairūs tyrimai parodė teigiamą ryšį tarp rūkymo ir gimdos kaklelio pakitimų išsivystymo (Castellsague ir kt., 2002; Holland ir kt., 2015). Rūkančių moterų tarpe tabako produktai yra randami ir gimdos kaklelio gleivinėje. Manoma, kad jie pažeidžia gleivinės ląstelių DNR ir taip skatina vėžio vystymąsi. Rūkymas taip pat slopina imuninę sistemą, todėl organizmui yra sunkiau kovoti su ŽPV infekcija (Yang ir kt., 1996; Prokopczyk ir kt., 2009).



**34 pav.** ŽPV infekcijos paplitimo rezultatai tarp rūkančių ir nerūkančių moterų.

Apibendrinant mūsų atliktus ŽPV paplitimo ir rizikos veiksnių tyrimus, galime teigti, kad kancerogenezės procese svarbų vaidmenį atlieka ne tik ŽPV infekcija, bet ir papildomi rizikos veiksniai. Ypatingai svarbus rizikos veiksnys yra sudėtinių kontraceptinių tablečių vartojimas. Taip pat turi įtakos rūkymas bei gimdymų skaičius. Šie veiksniai veikia lytinių hormonų kiekį bei silpnina imuninį atsaką. Esant ŽPV infekcijai, tai gali skatinti ląstelių piktybėjimą ir vėžio vystymąsi.

## IŠVADOS

1. Sukurta nauja PGR sistema (HR\_HPВ), skirta aukštos rizikos ŽPV genotipų nustatymui viename mėginyje. Optimizuotos dvi literatūroje aprašytos bendros ŽPV infekcijos PGR sistemos (GP5+/GP6+ ir PGMY09/11) ir dauginės PGR sistemos (MM-1, MM-2, MM-3, MM-4), skirtos 16 aukštos rizikos ŽPV genotipų identifikavimui.
2. ŽPV infekcijos ir ŽPV genotipų dažnis ištirtas 824 moterų su žinoma gimdos kaklelio pakitimų citologine ir histologine diagnoze urogenitaliniuose mėginiuose. Nustatyta, kad ŽPV infekcijos dažnis koreliuoja su intraepitelinių gimdos kaklelio pakitimų laipsniu. Tarp aukštos rizikos ŽPV genotipų labiausiai paplitęs yra ŽPV 16 (identifikuotas 42,3 % ŽPV teigiamų mėginių), mažiau paplitę ŽPV 31 (10,1 %), ŽPV 33 (8,2 %) ir ŽPV 56 (5,7 %) genotipai. Skirtingai nei kitose šalyse, ŽPV 18 dažnis yra nedidelis – šis genotipas identifikuotas tik 3,9 % ŽPV teigiamų mėginių.
3. Ištirtas aukštos rizikos ŽPV 16, 18 ir 51 genotipų L1 3' ir LCR DNR regionų metilinimo dažnis. ŽPV 51 DNR metilinimo tyrimas atliktas pirmą kartą. Visų trijų tirtų ŽPV genotipų DNR metilinimas dažniau nustatytas ŽPV L1 3' geno sekoje nei LCR regione. Metilinimo dažnis koreliuoja su intraepitelinių gimdos kaklelio pakitimų laipsniu.
4. Paruoštas AT-kPGR metodas potencialaus vėžinio žymens p16<sup>INK4A</sup> RNR raiškos tyrimui ir šiuo metodu ištirtas p16<sup>INK4A</sup> RNR raiškos lygis 567 urogenitalinių nuograndų mėginiuose. Nustatyta, kad p16<sup>INK4A</sup> RNR raiškos lygis koreliuoja su intraepitelinių gimdos kaklelio pakitimų laipsniu. Nerasta koreliacijos tarp konkretaus ŽPV genotipo ir p16<sup>INK4A</sup> RNR raiškos lygio, kas rodo, kad ŽPV onkogeninis potencialas, o ne konkretus ŽPV genotipas yra pagrindinis ląstelės ciklo reguliavimo pakitimus sukeliantis veiksnys.
5. Ištirtas bendros ŽPV infekcijos ir genotipų dažnis 249 atsitiktinai surinktų sveikų moterų urogenitalinių nuograndų ir burnos epitelio mėginiuose. Urogenitalinių nuograndų mėginiuose nustatytas aukštas ŽPV infekcijos



dažnis (47,8 % visų mėginių), tarp jų dažniausiai identifikuotas ŽPV 16 genotipas. ŽPV infekcijos dažnis moterų burnos epitelio mėginiuose sudarė 9,2 %.

6. Ištirtas ŽPV infekcijos ir genotipų dažnis 159 atsitiktinai surinktų sveikų vyrų burnos epitelio mėginiuose. Nustatytas ŽPV infekcijos dažnis vyrų burnos mėginiuose (22 %) yra aukštesnis lyginant su moterų burnos mėginiais (9,2 %) ( $p < 0,001$ ).
7. Ištirtos sąsajos tarp įvairių rizikos veiksnių ir ŽPV infekcijos dažnio. Sudėtines kontraceptines tabletes vartojančių moterų grupėje nustatytas didesnis bendros ŽPV infekcijos dažnis (55,2 %), lyginant su nevartojančiųjų moterų grupe (31,6 %) ( $p < 0,05$ ). Abiejose grupėse labiausiai paplitęs ŽPV 16 genotipas. Nenustatyta statistiškai reikšmingų sąsajų tarp ŽPV infekcijos ir rūkymo bei ŽPV infekcijos ir gimdymų skaičiaus.

### **Disertacijos tema paskelbtų publikacijų sąrašas**

1. **Simanaviciene V**, Popendikyte V, Gudleviciene Z, Zvirbliene A. Different DNA methylation pattern of HPV16, HPV18 and HPV51 genomes in asymptomatic HPV infection as compared to cervical neoplasia. *Virology*. 2015; 484:227-33.
2. **Simanaviciene V**, Gudleviciene Z, Popendikyte V, Dekaminaviciute D, Stumbryte A, Rubinaite V, Zvirbliene A. Studies on the prevalence of oncogenic HPV types among lithuanian woman with cervical pathology. *J Med Virol*. 2015; 87(3):461-71.
3. **Simanaviciene V**, Popendikyte V, Gudleviciene Z, Armalyte S, Kirkutyte A, Shikova E, Zvirbliene A. Studies on the expression of p16<sup>INK4a</sup> mRNA in cervical dysplasias. *J Biotechn Biotechn Equip*. 2011; 80-84.

### **Kitos publikacijos susijusios su disertacijos tema**

1. Gudleviciene Z, Kanopiene D, Stumbryte A, Bausyte R, Kirvelaitis E, **Simanaviciene V**, Zvirbliene A. Integration of human papillomavirus type 16 in cervical cancer cells. *Open Med*. 2015; 10:1–7.
2. Gudleviciene Z, Stumbryte A, Jukne G, **Simanaviciene V**, Zvirbliene A. Distribution of human papillomavirus type 16 variants in Lithuanian women with cervical cancer. *Medicina*. 2015; 51:328-35.
3. Lasickiene R, Gedvilaite A, Norkiene M, **Simanaviciene V**, Sezaite I, Dekaminaviciute D, Shikova E, Zvirbliene A. The use of recombinant pseudotype virus-like particles harbouring inserted target antigen to generate antibodies against cellular marker p16INK4A. *ScientificWorldJournal*. 2012, 10.1100/2012/263737.

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Adam E, Berkova Z, Daxnerova Z, Icenogle J, Reeves WC, Kaufman RH. Papillomavirus detection: Demographic and behavioral characteristics influencing the identification of cervical disease. *Am J Obstet Gynecol.* 2000; 182:257–64.
2. Agoff SN, Lin P, Morihara J, Mao C, Kiviat NB, Koutsky LA. p16(INK4a) expression correlates with degree of cervical neoplasia: a comparison with Ki-67 expression and detection of high-risk HPV types. *Mod Pathol.* 2003; 16:665–73.
3. Ambrasienė D, Popendikytė V. Žmogaus papilomos viruso tyrimai. *Laboratorinė medicina.* 2008; 2(38):78–88.
4. Appleby P, Beral V, Berrington de Gonzales A, Colin D, Franceschi S et al. Cervical carcinoma and reproductive factors: collaborative reanalysis of individual data on 16,563 women with cervical carcinoma and 33,542 women without cervical carcinoma from 25 epidemiological studies. *Int J Cancer.* 2006; 119:1108–24.
5. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE., Moore DD, Seidman JG et al. *Short protocols in molecular Biology.* 1999; New York: Wiley.
6. Badal S, Badal V, Calleja-Macias IE, Kalantari M, Chuang LSH et al. The human papillomavirus-18 genome is efficiently targeted by cellular DNA methylation. *Virology.* 2004; 324:483–92.
7. Badal V, Chuang LS, Tan EH, Badal S, Villa LL et al. CpG methylation of human papillomavirus type 16 DNA in cervical cancer cell lines and in clinical specimens: genomic hypomethylation correlates with carcinogenic progression. *J Virol.* 2003; 77: 6227–34.
8. Bayo S, Bosch FX, de Sanjose S, Munoz N, Combita AL et al. Risk factors of invasive cervical cancer in Mali. *Int. J. Epidemiol.* 2002; 31:202–9.
9. Bardina A, Vaccarella S, Clifford GM, Lissowska J, Rekosza et al. Human papillomavirus infection in women with and without cervical cancer in Warsaw, Poland, *European Journal Of Cancer.* 2008; 44:557–64.
10. Baseman JG and Koutsky LA. The epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virol.* 2005; 32(1):16–24.
11. Bauer HM, Greer CE, Manos MM. Determination of genital human papillomavirus infection using consensus PCR. Oxford University Press. 1992; 132–52.
12. Bernard HU, Burk RD, Chen Z, Doorslaer K, Hausen H, Villiers EM. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology.* 2010; 401:70–9.
13. Bernard HU. Gene expression of genital human papillomaviruses and considerations on potential antiviral approaches. *Antivir Ther.* 2002; 7(4): 219–37.
14. Bhattacharjee B, Sengupta S. CpG methylation of HPV16 LCR at E2 binding site proximal to P97 is associated with cervical cancer in presence of intact E2. *Virology.* 2006; 354:280–5.
15. Biedermann K, Dandachi N, Trattner M, Vogl G, Doppelmayr H et al. Comparison of Real-Time PCR Signal-Amplified In Situ Hybridization and Conventional PCR for Detection and Quantification of Human Papillomavirus in Archival Cervical Cancer Tissue. *J Clin Microbiol.* 2004; 42(8):3758–65.

16. Bishop B, Dasgupta J, Klein M, Garcea RL, Christensen ND et al. Crystal structures of four types of human papillomavirus L1 capsid proteins: understanding the specificity of neutralizing monoclonal antibodies. *J Biol Chem.* 2007; 282:31803–11.
17. Bonito PD, Grasso F, Mochi S, Accardi L, Donà MG et al. Serum antibody response to Human papillomavirus (HPV) infections detected by a novel ELISA technique based on denatured recombinant HPV16 L1, L2, E4, E6 and E7 proteins. *Infect Agent Cancer.* 2006; 1:6.
18. Bosch FX, Burchell AN, Schiffman M, Giuliano AR, Sanjose S et al. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. *Vaccine.* 2008; 26:1–16.
19. Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJL, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol.* 2002; 55:244–65.
20. Bosch FX, Robles C, Diaz M, Arbyn M, Baussano I et al. HPV-FASTER: broadening the scope for prevention of HPV-related Cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 2016; (13):119–32.
21. Bozzetti M, Nonnenmacher B, Mielzinska I, Villa L, Lorincz A et al. Comparison between hybrid capture II and polymerase chain reaction results among women at low risk for cervical cancer. *Ann Epidemiol.* 2000; 10(7):466.
22. Brandsma JL, Sun Y, Lizardi PM, Tuck DP, Zeltermann D et al. Distinct human papillomavirus type 16 methylomes in cervical cells at different stages of premalignancy. *Virology.* 2009; 389:100–7.
23. Bravo IG, Alonso A. Mucosal human papillomaviruses encode four different E5 proteins whose chemistry and phylogeny correlate with malignant or benign growth. *J. Virol.* 2004; 78 (24):13613–26.
24. Bryan JT, Brown DR. Association of the human papillomavirus type 11 E1<sup>E4</sup> protein with cornified cell envelopes derived from infected genital epithelium. *Virology.* 2000; 277(2):262–269.
25. Bryan JT, Brown DR. Transmission of human papillomavirus type 11 infection by desquamated cornified cells. *Virology.* 2001; 281(1):35–42.
26. Bryant D, Onions T, Raybould R, Jones S, Tristram A et al. Increased methylation of Human Papillomavirus type 16 DNA correlates with viral integration in Vulval Intraepithelial Neoplasia. *J Clin Virol.* 2014; 61:393–9.
27. Brown DR, Weaver B. Human Papillomavirus in Older Women: New Infection or Reactivation? *J Infect Dis.* 2013; 207(2): 211–2.
28. Bruni L, Barrionuevo-Rosas L, Albero G, Aldea M, Serrano B et al. ICO Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre). Human Papillomavirus and Related Diseases in Lithuania. Summary Report; 2015-12-23.
29. Bruni L, Barrionuevo-Rosas L, Albero G, Aldea M, Serrano B et al. ICO Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre). Human Papillomavirus and Related Diseases in the World. Summary Report. 2016.
30. Buck CB, Day PM, Trus BL. The papillomavirus major capsid protein L1. *Virology.* 2013; 445(1-2):169–74.
31. Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev.* 2003; 16:1–17.

32. Campo MS, Roden BS. Papillomavirus Prophylactic Vaccines: Established Successes, New Approaches. *Virology*. 2010; 84(3):1214–20.
33. Cañadas MP, Bosch FX, Junquera ML, Ejarque M, Font R et al. Concordance of Prevalence of Human Papillomavirus DNA in Anogenital and Oral Infections in a High-Risk Population. *J Clin Microbiol*. 2004; 42(3):1330–2.
34. Cancer.gov. National Cancer Institute at the National Institutes of Health. Atnaujinta:2014. Adresas: <http://www.cancer.gov/types/cervical/pap-hpv-testing-fact-sheet>.
35. Cantor SB, Atkinson EN, Cardenas-Turanzas M, Benedet JL Follen M, MacAulay C. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a meta-analysis. *Acta Cytol*. 2005; 49(4):405–15.
36. Castellsague X, Bosch FX, Munoz N. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Res*. 2002; 89:191–9.
37. Castellsague X, Diaz M, Sanjose S, Munoz N, Herrero R et al. Worldwide Human Papillomavirus Etiology of Cervical. *J Natl Cancer Inst*. 2006; 98(5):303–15.
38. Castellsagué X, Munoz N. Cofactors in Human Papillomavirus Carcinogenesis – Role of Parity, Oral Contraceptives and Tobacco Smoking. *J Natl Cancer Inst*. 2003; 31:20–28.
39. Castle PE, Fetterman B, Poitras N, Lorey T, Shaber R, Kinney W. Five-year experience of human papillomavirus DNA and Papanicolaou test cotesting. *Obstet Gynecol*. 2009; 113:595–600.
40. Castle PE, Wacholder S, Lorincz AT, Scott DR, Sherman ME et al. A prospective study of high-grade cervical neoplasia risk among human papillomavirus-infected women. *J Natl Cancer Inst*. 2002; 94: 1406–14.
41. Castle PE, Wacholder S, Lorincz AT, Scott DR, Sherman ME et al. A prospective study of high-grade cervical neoplasia risk among human papillomavirus-infected women. *J Natl Cancer Inst*. 2002; 94:1406–14.
42. Castle PE, Walker JL, Schiffman M, Wheeler CM. Hormonal contraceptive use, pregnancy and parity, and the risk of cervical intraepithelial neoplasia 3 among oncogenic HPV DNA-positive women with equivocal or mildly abnormal cytology. *Int J Cancer*. 2005; 117:1007–12.
43. Castle PE. Beyond human papillomavirus: the cervix, exogenous secondary factors, and the development of cervical precancer and cancer. *J Low Genit Tract Dis*. 2004; 8:224–30.
44. Castro TP, Bussoloti Filho I. Prevalence of human papillomavirus (HPV) in oral cavity and oropharynx. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2006; 72(2):272–82.
45. Centers for Disease Control and Prevention. Human papillomavirus (HPV). Atnaujinta 2015 (<http://www.cdc.gov/std/hpv/default.htm>).
46. Chan PK, Chan MY, Li WW, Chan DP, Cheung JL, Cheng AF. Association of human beta-herpesviruses with the development of cervical cancer: bystanders or cofactors. *J Clin Pathol*. 2001; 54(1):48–53.
47. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987; 162(1):156–9.
48. Clifford GM, Gallus S, Herrero R, Munoz N, Snijders PJ 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; 366:991–8.

49. Cubie HA, Seagar AL, McGoogan E, Whitehead J, Brass A et al. Rapid real-time PCR to distinguish between human papillomavirus types 16 and 18. *J Clin Pathol Mol Pathol*. 2001; 54:24–9.
50. Cuzick J, Mayrand MH, Ronco G, Snijders P, Wardle J. New dimensions in cervical cancer screening. *Vaccine* 2006; 24(3):90–7.
51. D'Souza G, Kluz N, Wentz A, Youngfellow RM, Griffioen A et al. Oral human papillomavirus (HPV) infection among unvaccinated high-risk young adults. *Cancers*. 2014; 6:1691–704.
52. Daniel B, Mukherjee G, Seshadri L, Vallikad E, Krishna S. Changes in the physical state and expression of human papillomavirus type 16 in the progression of cervical intraepithelial neoplasia lesions analysed by PCR. *J Gen Virol*. 1995; 76:2589–93.
53. de Sanjosé S, Diaz M, Castellsagué X, Clifford G, Bruni L et al. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2007; 7:453–9.
54. de Sanjose S, Quint WG, Alemany L, Geraets DT, Klaustermeier JE et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol*. 2010; 11:1048–1056.
55. Deacon J, Evans CD, Yule R, Desai M, Binns W et al. Sexual behaviour and smoking as determinants of cervical HPV infection and of CIN3 among those infected: a case–control study nested within the Manchester cohort. *Br J Cancer*. 2000;83:1565–1572.
56. Delvenne P, Herman L, Kholod N, Caberg JH, Herfs M et al. Role of hormone cofactors in the human papillomavirus induced carcinogenesis of the uterine cervix. *Mol Cell Endocrinol*. 2007; 264:1–5.
57. Delvenne P, Herman L, Kholod N, Caberg JH, Herfs M et al. Role of hormone cofactors in the human papillomavirus-induced carcinogenesis of the uterine cervix. *Mol Cell Endocrinol*. 2007; 264:1–5.
58. Dijkstra MG; Heideman DAM; Roy de SC; Rozendaal L; Berkhof J et al. p16(INK4a) immunostaining as an alternative to histology review for reliable grading of cervical intraepithelial lesions. *J Clin Pathol*. 2010; 63(11):972–7.
59. Dillner, J. 1999. The serological response to papillomaviruses. *Semin Cancer Biol* 9: 423–30.
60. Ding DC, Chiang MH, Lai HC, Hsiung CA, Hsieh CY, Chu TY. Methylation of the long control region of HPV16 is related to the severity of cervicalneoplasia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2009; 147:215–20.
61. Doerfler W, Remus R, Müller K, Heller H, Hohlweg U, Schubbert R. The fate of foreign DNA in mammalian cells and organisms. *Dev Biol (Basel)*. 2001; 106:89–97.
62. Doorbar J. The E4 protein; structure, function and patterns of expression. *Virology*. 2013; 445(1-2):80–98.
63. Dunne EF, Unger ER, Sternberg M, McQuillan G, Swan DC et al. Prevalence of HPV infection among females in the United States. *JAMA*. 2007; 297(8):813–29.
64. Durzynska J, Bogalska JP, Kaczmarek M, Hanc T, Durda M et al. HPV genotypes in the oral cavity/oropharynx of children and adolescents: cross-sectional survey in Poland. *Eur J Pediatr*. 2010; 170(6):757–61.

65. European Centre for Disease Prevention and Control. Introduction of HPV vaccines in EU countries. Stockholm: ECDC; 2012. ([http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/20120905\\_GUI\\_HP\\_V\\_vaccine\\_update.pdf](http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/20120905_GUI_HP_V_vaccine_update.pdf))
66. Farsi NJ, El-Zein M, Gaied H, Lee YCA, Hashibe M et al. Sexual behaviours and head and neck cancer: A systematic review and meta-analysis. *Cancer Epidemiol.* 2015;39(6):1036–46.
67. Favre M, Orth G, Croissant O, Yaniv M. Human papillomavirus DNA: physical map. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1975; 72(12):4810–4.
68. Fernandez AF, Rosales C, Lopez-Nieva P, Grana O, Ballestar E et al. The dynamic DNA methylomes of double-stranded DNA viruses associated with human cancer. *Genome Res.* 2009; 19:438–51.
69. Forslund O, Antonsson A, Nordin P, Stenquist B, Hansson BG. A broad range of human papillomavirus types detected with a general PCR method suitable for analysis of cutaneous tumours and normal skin. *J Gen Virol.* 1999; (80):2437–43.
70. Franco EL, Villa LL, Sobrinho JP, Prado JM, Rousseau MC et al. Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. *J Infect Dis.* 1999; 180:1415–23.
71. Gall T, Kis A, Feher E, Gergely L, Szarka K. Virological failure of intralesional cidofovir therapy in recurrent respiratory papillomatosis is not associated with genetic or epigenetic changes of HPV11: Complete genome comparison of sequential isolates. *Antiviral Res.* 2011; 92:356–8.
72. Gariglio P, Gutierrez J, Cortes E, Vazquez J. The role of retinoid deficiency and estrogens as cofactors in cervical cancer. *Arch Med Res.* 2009; 40:449–65.
73. Gearheart PA, Randall TC, Buckley RM. Human Papillomavirus. *Atnaujinta:2011.01.27.Adresas:* <http://emedicine.medscape.com/article/219110-overview>.
74. Gillison ML, Broutian T, Pickard RK, Tong ZY, Xiao W et al. Prevalence of oral HPV infection in the United States, 2009–2010. *JAMA.* 2012; 307:693–703.
75. Giuliano AR, Nyitray AG, Kreimer AR, Campbel CMP, Goodman MT et al. EUROGIN 2014 roadmap: differences in human papillomavirus infection natural history, transmission and human papillomavirus-related cancer incidence by gender and anatomic site of infection. *Int J Cancer.* 2015;12:2752–60.
76. Gómez DT, Santos JL. Human papillomavirus infection and cervical cancer: pathogenesis and epidemiology. In: Méndez-Vilas A, editor. *Communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology.* 2007.p.680-8. <http://www.formatex.org/microbio/pdf/pages680-688.pdf>.
77. Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, Wheeler CM, Coutlee F et al. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol.* 2000; 38(1):357–61.

78. Gravitt PE, Rositch AF, Silver MI, Marks MA, Chang K et al. A Cohort Effect of the Sexual Revolution May Be Masking an Increase in Human Papillomavirus Detection at Menopause in the United States. *J Infect Dis.* 2012; doi: 10.1093/infdis/jis660.
79. Gravitt PE, van Doorn LJ, Quint W, Schiffman M, Hildesheim A, et al. Human papillomavirus (HPV) genotyping using paired exfoliated cervicovaginal cells and paraffin-embedded tissues to highlight difficulties in attributing HPV types to specific lesions. *J Clin Microbiol.* 2007; 45:3245–50.
80. Gudleviciene Z, Didziapetriene J, Ramael M, Uleckiene S, Valuckas KP. 2006. Human papillomavirus and p53 polymorphism in Lithuanian cervical cancer patients. *Gynecol Oncol.* 2006; 102:530–3.
81. Gudleviciene Z, Didziapetriene J, Suziedelis K, Lapkauskaite L. Investigation of human papillomavirus, its types and variants. *Medicina.* 2005; 41:910–5.
82. Gudlevičienė Ž, Šepetienė A, Didziapetrienė J, Valuckas KP, Smailytė G et al. Infekuotumas atskirų žmogaus papilomos tipų virusais esant intraepitelinių gimdos kaklelio pokyčių, *Medicina (Kaunas).* 2010; 46(9):616–23.
83. Hammer A, Rositch A, Qeadan F, Gravitt PE, Blaakaer J. Age-specific prevalence of HPV16/18 genotypes in cervical cancer: a systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer.* 2016; 138:2795–803.
84. Handsfield HH. Color atlas and synopsis of sexually transmitted diseases. 3rd ed. New York: McGrawHill Medical; 2011.
85. Hansson BG, Rosenquist K, Antonsson A, Wennerberg J, Schildt EB et al. Strong association between infection with human papillomavirus and oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: a population-based case-control study in southern Sweden. *Acta Otolaryngol.* 2005; 125(12):1337–44.
86. Hart KW, Williams OM, Thelwell N, Fiander AN, Brown T et al. Novel method for detection, typing, and quantification of human papillomavirus in clinical samples. *J Clin Microbiol.* 2001; 39:3204–12.
87. Holland AC. Smoking Is a Women's Health Issue Across the Life Cycle. *AWHONN.* 2015; 19(2):189–93.
88. Holowaty P, Miller AB, Rohan T, To T. Natural History of Dysplasia of the Uterine Cervix. *JNCI J Natl Cancer Inst.* 1999; 91(16):1420–1.
89. Hong D, Ye F, Lu W, HuY, Wan X et al. Methylation status of the longcontrol region of HPV16 in clinical cervical specimens. *MolMed Report.* 2008; 1:555–60.
90. Hu L, Guo M, He Z, Thornton J, McDaniel LS, Hughson MD. Human papillomavirus genotyping and p16INK4a expression in cervical intraepithelial neoplasia of adolescents. *Mod Pathol.* 2005; 18(2):267–73.
91. Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer. World Health Organization. *Atnaujinta:2015.* Adresas: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs380/en/>.
92. Human Papillomavirus and Related Diseases Report. Lithuania. 2016 (<http://www.hpvcentre.net/statistics/reports/LTU.pdf>).
93. Husman R, Walboomers MM, Adriaan JC, van den Brule, Chris JL et al. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol.* 1995; (76):1057–62.
94. Ishikawa M, Fujii T, Saito M, Nindly I, Ono A et al. Overexpression of p16INK4a as an indicator for human papillomavirus oncogenic activity in cervical squamous neoplasia. *Int J Gynecol Cancer.* 2006; 16:347–53.



95. Yang X, Jin G, Nakao Y, Rahimtula M, Pater MM, Pater A. Malignant transformation of HPV 16-immortalized human endocervical cells by cigarette smoke condensate and characterization of multistage carcinogenesis. *Int J Cancer*. 1996; 65:338–44.
96. Yim EK and Park JS. The Role of HPV E6 and E7 Oncoproteins in HPV-associated Cervical Carcinogenesis. *Cancer Res Treat*. 2005; 37(6):319–24.
97. Ylitalo N, Josefsson A, Melbye M, Sorensen P, Frisch M et al. A prospective study showing long-term infection with human papillomavirus 16 before the development of cervical carcinoma in situ. *Cancer Res*. 2000; 60(21): 6027–32.
98. Jacobs MV, Snijders PJ, Voorhorst FJ, Dillner J, Forslund O et al. Reliable high risk HPV DNA testing by polymerase chain reaction: an intermethod and intramethod comparison. *J Clin Pathol*. 1999; 52(7):498–503.
99. Jariene K, Vaitkieni D, Bartusevicius A, Tvarijonavičienė E, Minkauskienė M et al. Prevalence of human papillomavirus types 16, 18, and 45 in women with cervical intraepithelial changes: associations with colposcopic and histological findings. *Medicina (Kaunas)*. 2012;48(1):22-30.
100. Jarrell MA, Heintz N, Howard P, Collins C, Badger G et al. Squamous cell carcinoma of the cervix: HPV 16 and DNA ploidy as predictors of survival. *Gynecol Oncol*. 1992; 46:361–6.
101. Jensen KE, Schmiedel S, Norrild B, Frederiksen K, Iftner T, Kjaer SK. Parity as a cofactor for high-grade cervical disease among women with persistent human papillomavirus infection: a 13-year follow-up. *Br J Cancer*. 2013; 108(1): 234–9.
102. Kalantari M, Calleja-Macias IE, Tewari D, Hagmar B, Lie K et al. Conserved methylation patterns of human papillomavirus type 16 DNA in asymptomatic infection and cervical neoplasia. *J Virol*. 2004; 78:12762–72.
103. Kalantari M, Chase DM, Tewari KS, Bernard HU. Recombination of human papillomavirus-16 and host DNA in exfoliated cervical cells: a pilot study of L1 gene methylation and chromosomal integration as biomarkers of carcinogenic progression. *J Med Virol*. 2010; 82:311–20.
104. Kalantari M, Garcia-Carranca A, Morales-Vazquez CD, Zuna R, Montiel DP et al. Laser capture microdissection of cervical human papillomavirus infections: copy number of the virus in cancerous and normal tissue and heterogeneous DNA methylation. *Virology*. 2009; 390:261–7.
105. Kalantari M, Villa LL, Calleja-Macias IE, Bernard HU. Human Papillomavirus-16 and 18 in Penile Carcinomas: DNA Methylation, Chromosomal Recombination, and Genomic Variation. *Int J Cancer*. 2008; 123:1832–40.
106. Kalof AN, Cooper MD and K. p16INK4a Immunoexpression: Surrogate Marker of High-risk HPV and High-grade Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Anat Pathol*. 2006; 13:190–4.
107. Kanodia S, Fahey LM, Kast WM. Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response. *Curr Cancer Drug Targets*. 2007; 7(7):79–89.
108. Keating JT, Cviko A, Riethdorf S, Riethdorf L, Quade BJ et al. Ki-67, cyclin E, and p16INK4 are complimentary surrogate biomarkers for human papilloma virus-related cervical neoplasia. *Am J Surg Pathol*. 2001; 25(7):884–91.

109. Kelley ML, Keiger KE, Lee CJ, Huibregtse JM. The global transcriptional effects of the human papillomavirus E6 protein in cervical carcinoma cell lines are mediated by the E6AP ubiquitin ligase. *J. Virol.* 2005; 79 (6):3737–47.
110. Kero K, Rautava J, Syrjänen K, Grenman S, Syrjänen S. Human papillomavirus genotypes in male genitalia and their concordance among pregnant spouses participating in the Finnish Family HPV study. *J Sex Med.* 2011; 8(9):2522–31.
111. Kjaer SK, Sigurdsson K, Iversen OE, Hernandez-Avila M, Wheeler CM, Perez G. A pooled analysis of continued prophylactic efficacy of quadrivalent human papillomavirus (Types 6/11/16/18) vaccine against high-grade cervical and external genital lesions. *Cancer Prev Res (Phila.)*. 2009; 2:868–78.
112. Kjaer SK, van den Brule AJ, Bock JE, Poll PA et al. Determinants for genital human papillomavirus (HPV) infection in 1000 randomly chosen young Danish women with normal Pap smear: are there different risk profiles for oncogenic and nononcogenic HPV types? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1997; 6:799–805.
113. Klaes R, Benner A, Friedrich T, Ridder R, Herrington S et al. p16INK4a immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol.* 2002; 26(11):1389–99.
114. Kleter B, van Doorn LJ, ter Schegget J, Schrauwen L, van Krimpen K et al. Novel short-fragment PCR assay for highly sensitive broad-spectrum detection of anogenital human papillomaviruses. *Am J Pathol.* 1998; 153(6):1731–9.
115. 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.
116. Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005; 14:467–75.
117. Kujan O, Oliver RJ, Khattab A, Roberts SA, Thakker N, Sloan P. Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. *Oral Oncol.* 2006; 42(10):987–93.
118. Kulis M, Esteller M. DNA Methylation and Cancer. *Adv Genet.* 2010; 70:27–56.
119. Lazo PA. The molecular genetics of cervical carcinoma. *Br J Cancer.* 1999; 80:2008–18.
120. Lehtinen M ir Dillner J. Clinical trials of human papillomavirus vaccines and beyond. *Nat Rev ClinOncol.* 2013; 400(10):400–10.
121. Ley C, Bauer HM, Reingold A, Schiffman MH, Chambers JC et al. Determinants of genital human papillomavirus infection in young women. *J Natl Cancer Inst.* 1991; 83:997–1003.
122. Li J, Wang YY, Nan X, Tian XF et al. Prevalence of human papillomavirus genotypes among women with cervical lesions in the Shaanxi Province of China. *Genet Mol Res.* 2016; 15(1). doi: 10.4238/gmr.15017181.
123. Liu M, He Z, Zhang C, Liu F, Liu Y et al. Transmission of genital human papillomavirus infection in couples: a population-based cohort study in rural China. *Nat Scient Rep.* 2015; 5:1–10.
124. Lörincz AT. Hybrid Capture method for detection of human papillomavirus DNA in clinical specimens: a tool for clinical management of equivocal Pap smears and for population screening. *Obstet Gynaecol Res.* 1996; 22(6):629–36.

125. Lowy DR, Schiller JT. Prophylactic human papillomavirus vaccines. *J Clin Invest.* 2006; 116(5):1167–73.
126. Luhn P, Walker J, Schiffman M, Zuna RE, Dunn ST et al. Gynecologic Oncology The role of co-factors in the progression from human papillomavirus infection to cervical cancer. *Gynecologic Oncology.* 2013; 128(2):265–70.
127. Macville M, Schröck E, Padilla-Nash H, Keck C, Ghadimi M et al. Comprehensive and definitive molecular cytogenetic characterization of HeLa cells by spectral karyotyping. *Cancer Res.* 1999; 59(1):141–50.
128. Marinho-Dias J, Sousa H. Cytomegalovirus infection and cervical cancer: from past doubts to present questions. *Acta Med Port.* 2013; 26(2):154-60.
129. Marks M, Gravitt PE, Gupta SB, Liaw KL, Kim E et al. The association of hormonal contraceptive use and HPV prevalence. *Int J Cancer.* 2011; 128(12):2962–70.
130. Mazumder ID, Singh RK, Mitra S, Dutta S, Chakraborty C et al. Genetic and epigenetic changes of HPV16 in cervical cancer differentially regulate E6/E7 expression and associate with disease progression. *Gynecol Oncol.* 2011; 123:597–604.
131. McBride AA, McPhillips MG, Oliveira JG. Brd4: tethering, segregation and beyond. *Trends Microbiol.* 2004; 12(12):527–9.
132. McBride AA. The papillomavirus E2 proteins. *Virology.* 2013; 445(1-2):57–79.
133. McMillan A, Young H, Ogilvie M, Scot R, editors. *Clinical practice in sexually transmissible infections.* Philadelphia: W. B. Saunders; 2012.
134. *Medicine and Life Sciences Scientific Journal.* Inactivation of the human papillomavirus E6 or E7 gene in cervical carcinoma cells using a bacterialCRISPR/Cas. *Atnaujinta*:2014. (<https://pharmaceuticalintelligence.com/2014/10/24/inactivation-of-the-human-papillomavirus-e6-or-e7-gene-in-cervical-carcinoma-cells-using-a-bacterial-crisprcas/>).
135. Meijer CJ, Bosch FX. Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case–control study. *Lancet.* 2002; 359:1093–101.
136. Mirabello L, Schiffman M, Ghosh A, Rodriguez AC, Vasiljevic N et al. Elevated methylation of HPV16 DNA is associated with the development of high grade cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer.* 2012; 132:1412–22.
137. Mitrani-Rosenbaum S, Tsvieli R, Tur-Kaspa R. Oestrogen stimulates differential transcription of human papillomavirus type 16 in SiHa cervical carcinoma cells. *J Gen Virol.* 1989; 70 (8):2227–32.
138. Mittal R, Tsutsumi K, Pater A, Pater MM. Human papillomavirus type 16 expression in cervical keratinocytes: role of progesterone and glucocorticoid hormones. *Obstet Gynecol.* 1993; 81:5–12.
139. Mohr IJ, Clark R, Sun S, Androphy EJ, MacPherson P, Botchan MR. Targeting the E1 replication protein to the papillomavirus origin of replication by complex formation with the E2 transactivator. *Science.* 1990; 250(4988):1694–9.
140. Molijn A, Kleter B, Quint W, van Doorn LJ. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) in fections. *J Clin Virol.* 2005; 32(1):43–51.

141. Montaldo C, Mastinu A, Quartuccio M, Piras V, Denotti G et al. Detection and genotyping of human papillomavirus DNA in samples from healthy Sardinian patients: a preliminary study. *J Oral Pathol Med.* 2007; 36(8):482–7.
142. Moody CA, Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer.* 2010; 10(8):550-60.
143. Moreno V, Bosch FX, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV et al. Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case–control study. *Lancet.* 2002;359:1085–1092.
144. Mulvany NJ, Allen DG, Wilson SM. Diagnostic utility of p16INK4a: a reappraisal of its use in cervical biopsies. *Pathology.* 2008; 40(4):335-44.
145. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med.* 2003; 348:518–27.
146. Munoz N, Franceschi S, Bosetti C, Moreno V, Herrero R et al. Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer : the IARC multicentric case-control study. *Lancet.* 2002; 359:1093–101.
147. Murakami I, Fujii T, Dan K, Saito M, Ohno A, et al. Methylation of human papillomavirus-52 and -58 is a candidate biomarker in cervical neoplasia. *J Clin Virol.* 2013; 58:149–54.
148. Murphy N, Ring M, Killalea AG, Uhlmann V, O'Donovan M et al. p16INK4A as a marker for cervical dyskaryosis: CIN and cGIN in cervical biopsies and ThinPrep™ smears. *J Clin Pathol.* 2003; 56:56–63.
149. Narisawa-Saito M, Kiyono T. Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: roles of E6 and E7 proteins. *Cancer Sci.* 2007; 98(10):1505–11.
150. Nishimura A, Nakahara T, Ueno T, Sasaki K, Yoshida S et al. Requirement of E7 oncoprotein for viability of HeLa cells. *Microbes Infect.* 2006; 8 (4):984–93. Nishiwaki M, Yamamoto T, Tone S, Murai T, Ohkawara T et al. Genotyping of human papillomaviruses by a novel one-step typing method with multiplex PCR and clinical applications. *J Clin Microbiol.* 2008; 46(4):1161–8.
152. O'Brien PM, Saveria Campo M. Papillomaviruses: a correlation between immune evasion and oncogenicity? *Trends Microbiol.* 2003; 11:300–5.
153. Orth G, Favre M, Croissant O. Characterization of a new type of human papillomavirus that causes skin warts. *J Virol.* 1977; 24:108–120.
154. Ozbun MA, Meyers C. Temporal usage of multiple promoters during the life cycle of human papillomavirus type 31b. *J Virol.* 1998; 72(4):2715–22.
155. Paavonen J, Naud P, Salmeron J, Wheeler CM, Chow SN, Apter D. Efficacy of human papillomavirus (HPV)-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against cervical infection and precancer caused by oncogenic HPV types (PATRICIA): final analysis of a double-blind, randomised study in young women. *Lancet.* 2009; 374:301–14.
156. Pagliusi SR and Aguado MT. Efficacy and other milestones for human papillomavirus vaccine introduction. *Vaccine.* 2004; 23:569–78.
157. Pannone G, Santoro A, Papagerakis S, Muzio LL, Rosa GD, Bufo P. The role of Human Papillomavirus in the pathogenesis of Head & Neck Squamous Cell Carcinoma: an overview. *Infectious Agents and Cancer.* 2011; 6(4).

158. Peyton CL, Gravitt PE, Hunt WC, Hundley RS, Zhao M et al. Determinants of genital human papillomavirus detection in a US population. *J Infect Dis.* 2001; 183:1554.
159. Piyathilake CJ, Macaluso M, Alvarez RD, Chen M, Badiga S et al. A higher degree of methylation of the HPV16 E6 gene is associated with a lower likelihood of being diagnosed with cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer.* 2011; 117:957–63.
160. Pyeon D, Pearce SM, Lank SM, Ahlquist P, Lambert PF. Establishment of human papillomavirus infection requires cell cycle progression. *PLoS Pathog.* 2009;5:e1000318.
161. Popendikyte V, Gulbinovic I, Paulauskiene V, Paulauskas D. Detection and typing of high risk papillomavirus by Multiplex PCR. *Lietuvos akušerija ir ginekologija.* 2008; 4:348–52.
162. Prendiville W, Davies P. The Human Papillomavirus. In: Prendiville W, Davis P, eds. *The Health Professionals HPV Handbook: Human papillomavirus and cervical cancer.* Oxford: Taylor and Francis. 2004; 11–26.
163. Prokopczyk B, Sinha I, Trushin N, Freeman WM, Bayoumy K. Gene expression profiles in HPV-immortalized human cervical cells treated with the nicotine-derived carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. *Chem Biol Interact.* 2009; 177(3):173–80.
164. Quint WG, Scholte G, van Doorn LJ, Kleter B, Smits PH, Lindeman J. Comparative analysis of human papillomavirus infections in cervical scrapes and biopsy specimens by general SPF(10) PCR and HPV genotyping. *J Pathol.* 2001; 194(1):51–8.
165. Rebolj M, Preisler S, Ejegod DM, Rygaard C, Lynge E, Bonde J. Disagreement between Human Papillomavirus Assays: An Unexpected Challenge for the Choice of an Assay in Primary Cervical Screening. *PLoS One.* 2014; 9(1):1–12.
166. Regauer S, Reich O. CK17 and p16 expression patterns distinguish (atypical) immature squamous metaplasia from high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN III). *Histopathology.* 2007; 50(5):629–35.
167. Rolfe M, Beer-Romero P, Glass S, Eckstein J, Berdo I et al. Reconstitution of p53-ubiquitylation reactions from purified components: the role of human ubiquitin-conjugating enzyme UBC4 and E6-associated protein (E6AP). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92(8):3264–8.
168. Rommel O, Dillner J, Fligge C, Bergsdorf C, Wang X et al. Heparan sulfate proteoglycans interact exclusively with conformationally intact HPV L1 assemblies: basis for a virus-like particle ELISA. *J Med Virol.* 2005; 75:114–21.
169. Roura E, Travier N, Waterboer T, de Sanjosé S, Bosch FX et al. The Influence of Hormonal Factors on the Risk of Developing Cervical Cancer and Pre-Cancer: Results from the EPIC Cohort. *PLoS One.* 2016;11(1):e0147029. doi: 10.1371/journal.pone.0147029. eCollection 2016.
170. Rousseau MC, Franco EL, Villa LL, Sobrinho JP, Termini L et al. A cumulative case–control study of risk factor profiles for oncogenic and nononcogenic cervical human papillomavirus infections. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2000;9:469–476.
171. Safaeian M, Solomon D, Wacholder S, Schiffman M, Castle P. Risk of precancer and follow-up management strategies for women with human

- papillomavirusnegative atypical squamous cells of undetermined significance. *Obstet Gynecol.* 2007; 109(6):1325–31.
172. Sambrook J, Russell DW. 2001. *Molecular Cloning: A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
  173. Sapp M, Day PM: Structure, attachment and entry of polyoma - and papillomaviruses. *Virology.* 2009; 384:400–9.
  174. Saslow D, Solomon D, Lawson HW, et al. American Cancer Society, American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, and American Society for Clinical Pathology screening guidelines for the prevention and early detection of cervical cancer. *CA Cancer J Clin.* 2012; 62(3):147–72.
  175. Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet.* 2007; 370(9590):890–907.
  176. Schiller JT, Castellsague X, Villa LL, Hildesheim A. An update of prophylactic human papillomavirus L1 virus-like particle vaccine clinical trial results. *Vaccine.* 2008; 26(10):53–61.
  177. Schmitt M, Dondog B, Waterboer T, Pawlita M. Homogeneous amplification of genital human alpha papillomaviruses by PCR using novel broad-spectrum GP5+ and GP6+ primers. *J Clin Microbiol.* 2008; 46(3):1050–9.
  178. Simanaviciene V, Gudleviciene Z, Pependikyte V, Dekaminaviciute D, Stumbryte A et al. Studies on the prevalence of oncogenic HPV types among lithuanian woman with cervical pathology. *J Med Virol.* 2015; 87(3):461–71.
  179. Simanaviciene V, Pependikyte V, Gudleviciene Z, Armalyte S, Kirkutyte A et al. Studies on the expression of p16<sup>ink4a</sup> mRNA in cervical dysplasias. *J Biotechn Biotechn Equip.* 2011; 80–4.
  180. Simanaviciene V, Pependikyte V, Gudleviciene Z, Zvirbliene A. Different DNA methylation pattern of HPV16, HPV18 and HPV51 genomes in asymptomatic HPV infection as compared to cervical neoplasia. *Virology.* 2015; 484:227–33.
  181. Sinal SH, Woods CR. Human papillomavirus infections of the genital and respiratory tracts in young children. *Semin Pediatr Infect Dis.* 2005; 16:306–16.
  182. Syrjanen S. HPV infections and tonsillar carcinoma. *J Clin Pathol.* 2004; 57(5):449–55.
  183. Syrjanen S. Human papillomavirus infections and oral tumors. *Med Microbiol Immunol.* 2003; 192:123–8.
  184. Skiba D, Mehlhorn G, Fasching PA, Beckmann MW, Ackermann S. Prognostic significance of serum antibodies to HPV-16 L1 virus-like particles in patients with invasive cervical cancer. *Anticancer Res.* 2006; 26:4921–6.
  185. Smith JS, Lindsay L, Hoots B, Keys J, Franceschi S et al. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *Int J Cancer.* 2007; 121:621–32.
  186. Snellenberg S, Schutze DM, Claassen-Kramer D, Meijer CJ, Snijders PJ, Steenbergen RD. Methylation status of the E2 binding sites of HPV16 in cervical lesions determined with the Luminex(R) xMAP system. *Virology.* 2012; 422:357–65.
  187. Snijders JF, Brule JC, Schrijnemakers F J, Snow G, Meijer M, Walboomers MM. The Use of General Primers in the Polymerase Chain Reaction Permits the Detection of a Broad Spectrum of Human Papillomavirus Genotypes. *J Gen Virol.* 1990; 71:173–81.

188. Sotlar K, Diemer D, Dethleffs A, Hack Y, Stubner A et al. Detection and typing of human papilloma virus by e6 nested multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 2004; 42(7):3176–84.
189. Strauss S, Desselberger U, Gray JJ. Detection of genital and cutaneous human papillomavirus types: differences in the sensitivity of generic PCRs, and consequences for clinical virological diagnosis. *Br J Biomed Sci.* 2000; 57:221–5.
190. Sun C, Reimers LL, Burk RD. Methylation of HPV16 genome CpG sites is associated with cervix precancer and cancer. *Gynecol Oncol.* 2011; 121:59–63.
191. Sutter D, Doerfler W. Methylation of integrated adenovirus type 12 DNA sequences in transformed cells is inversely correlated with viral gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980; 77:253–6.
192. Swan DC, Tucker RA, Tortolero-Luna G, Mitchell MF, Wideroff L et al. Human papillomavirus (HPV) DNA copy number is dependent on grade of cervical disease and HPV type. *J Clin Microbiol.* 1999; 37(4):1030–4.
193. Tatar TZ, Kis A, Szabo E, Czompa L, Boda R et al. Prevalence of human papillomaviruses in the healthy oral mucosa of women with high-grade squamous intraepithelial lesion and of their partners as compared to healthy controls. *Oral Pathol Med.* 2014; 11:1–6.
194. Terai M, Takagi M. Human Papillomavirus in Oral Cavity. *Oral Med Pathol.* 2001; 6:1–12.
195. Thain A, Jenkins O, Clarke AR, Gaston K. CpG methylation directly inhibits binding of the human papillomavirus type 16 E2 protein to specific DNA sequences. *J Virol.* 1996; 70:7233–5.
196. Tieben LM, Schegget J, Minnaar RP, Bavinck JB, Berkhout JM et al. Detection of cutaneous and genital HPV types in clinical samples by PCR using consensus primers. *J Virol M.* 1993; (42):265–80.
197. Turan T, Kalantari M, Calleja-Macias IE, Cubie HA, Cuschieri K et al. Methylation of the human papillomavirus-18 L1 gene: A biomarker of neoplastic progression? *Virology.* 2006; 349:175–83.
198. Ure AE, Forslund O. Lack of Methylation in the Upstream Region of Human Papillomavirus Type 6 from Aerodigestive Tract Papillomas. *J Virol.* 2012; 86:13790–4.
199. Uuskula A, Kals M, Kosenkranius L, McNutt LA, DeHovitz J. Population-based type-specific prevalence of high-risk human papillomavirus infection in Estonia. *BMC Infectious Diseases.* 2010; 10(63):31–5.
200. Van Tine BA, Kappes JC, Banerjee NS, Knops J, Lai L et al. Clonal selection for transcriptionally active viral oncogenes during progression to cancer. *J Virol.* 2004; 78:11172–86.
201. Vasiljević N, Scibior-Bentkowska D, Brentnall A, Cuzick J, Lorincz A. A comparison of methylation levels in HPV18, HPV31 and HPV33 genomes reveals similar associations with cervical precancers. *J Clin Virol.* 2014; 59:161–6.
202. Venuti A, Paolini F, Nasir L, Corteggio A, Roperto S et al. Papillomavirus E5: the smallest oncoprotein with many functions. *Mol Cancer.* 2011; 10:140.
203. Villa , Ault LKA, Giuliano AR, Costa RL, et al. Immunologic responses following administration of a vaccine targeting human papillomavirus Types 6, 11, 16, and 18. *Vaccine.* 2006; 24:5571–83.

204. Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology*. 2004; 324(1):17–27.
205. Vinokurova S, von Knebel DM. Differential methylation of the HPV16 upstream regulatory region during epithelial differentiation and neoplastic transformation. *PLoS One*. 2011; 6:e24451.
206. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*. 1999; 189(1):12–9.
207. Wallace NA, Galloway DA. Novel Functions of the Human Papillomavirus E6 Oncoproteins. *Annu Rev Virol*. 2015; 2(1):403–23.
208. Wang JW, Roden RB. L2, the minor capsid protein of papillomavirus. *Virology*. 2013; 445(1-2):175–86.
209. Wang SS, Zuna RE, Wentzensen N, Dunn ST, Sherman ME et al. Human papillomavirus cofactors by disease progression and human papillomavirus types in the study to understand cervical cancer early endpoints and determinants. *Cancer Epidemiol Biomarkers*. 2009; 18: 113–20.
210. Wentzensen N, Sun C, Ghosh A, Kinney W, Mirabello L et al. Methylation of HPV18, HPV31, and HPV45 genomes and cervical intraepithelial neoplasia grade 3. *J Natl Cancer Inst*. 2012; 104:1738–49.
211. Williams VM, Filippova M, Soto U, Duerksen-Hughes PJ. HPV-DNA integration and carcinogenesis: putative roles for inflammation and oxidative stress. *Fut Virol*. 2011; 6:45–57.
212. Wilson A. Guidance on liquid-based cytology system conversion training: a secondary publication. *Cytopathology*. 2016;27(5):331-4.
213. Wohlmeister D, Vianna DR, Helfer VE, Gimenes F, Consolaro ME et al. Association of human papillomavirus and Chlamydia trachomatis with intraepithelial alterations in cervix samples. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2016; 111(2):106–13.
214. Xi LF, Jiang M, Shen Z, Hulbert A, Zhou XH et al. Inverse association between methylation of human papillomavirus type 16 DNA and risk of cervical intraepithelial neoplasia grades 2 or 3. *PLoS One* 2011; 6:e23897.
215. Xi LF, Koutsky LA, Castle PE, Edelstein ZR, Meyers C et al. Relationship Between Cigarette Smoking and Human Papilloma Virus Types 16 and 18 DNA Load. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009; 18:3490–6.
216. Zandberg DP, Bhargava R, Badin S, Cullen KJ, The Role of Human Papillomavirus in Nongenital Cancers The Role of Human Papillomavirus in Nongenital Cancers. *CA Cancer J Clin*. 2013;63:58–81.
217. Zheng ZM, Baker CC. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front Biosci*. 2006; 11(1):2286–302.
218. Zuna RE, Allen RA, Moore WE, Lu Y, Mattu R, Dunn ST. Distribution of HPV genotypes in 282 women with cervical lesions: evidence for three categories of intraepithelial lesions based on morphology and HPV type. *Mod Pathol*. 2007; 20:167–74.
219. zur Hausen H, de Villiers EM, Gissmann L. Papillomavirus infections and human genital cancer. *Gynecol Oncol*. 1981; 12(2):S124–8.



### **Pranešimai mokslinėse konferencijose**

1. 2016.06.28-30, „XIV<sup>th</sup> International Conference of Lithuanian Biochemical Society“, Druskininkai, Lietuva. „Different DNA methylation pattern of HPV16, HPV18 and HPV51 genomes in asymptomatic HPV infection as compared to cervical neoplasia“ (stendinis pranešimas).
2. 2015.12.10, LMA doktorantų ir jaunųjų mokslininkų konferencija, Vilnius, Lietuva. „Žmogaus papilomos viruso (ŽPV) paplitimo tyrimai ir ŽPV epigenetinių žymenų nustatymas klinikiniuose mėginiuose“, (žodinis pranešimas). **Laimėta 3 vieta už geriausią pranešimą.**
3. 2015.06.14-17, ESHRE, Lisabona, Portugalija. „A comparison of methylation levels in HPV16, HPV18 and HPV51 genomes in asymptomatic HPV infection and cervical neoplasia“, (stendinis pranešimas).
4. 2015.03.18-21, 16<sup>th</sup> World Congress on Human reproduction, Berlynas, Vokietija. „Studies on the prevalence of oncogenic HPV types among Lithuanian women with cervical pathology“, (stendinis pranešimas).
5. 2014.06.17-20, „XIII<sup>th</sup> International Conference of Lithuanian Biochemical Society“, Symposium „Young biochemistry“, Birštonas, Lietuva. „Studies on the prevalence of oncogenic HPV types among Lithuanian women with cervical pathology“, (žodinis pranešimas).
6. 2014.06.11-13, „Global Virus Network Conference“, Talinas, Estija. „Studies on the prevalence of oncogenic HPV types among Lithuanian women with cervical pathology“, (žodinis pranešimas).
7. 2012.04.11, V nacionalinė doktorantų mokslinė konferencija „Mokslas – sveikatai“, Kaunas, Lietuva. „Žmogaus papilomos viruso molekulinė diagnostika ir paplitimo tyrimai“, (žodinis pranešimas). **Pranešimas pripažintas geriausiu sekcijoje ir laimėtas „Thermo Fisher Scientific“ įsteigtas prizas.**

## PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju savo vadovei Aurelijai Žvirblienei už suteiktą galimybę atlikti šį įdomų darbą jos vadovaujamoje laboratorijoje, naudingus patarimus, idėjas, palaikymą ir skatinimą. Dėkoju Biotechnologijos instituto Imunologijos ir ląstelės biologijos skyriaus darbuotojams: Mildai Plečkaitytei, Dovilei Stravinskienei, Ritai Lasickienei, Indrei Dalgėdienei, Indrei Kučinskaitei-Kodzei, Aušrai Vaitiekaitei, Martynui Simanavičiui, Mildai Zilnytei bei studentams: Sandrai Armalytei, Ugnei Kuliešiūtei, Aistei Kirkutytei, Vilijai Rubinaitei už pagalbą atliekant darbus ir gerą darbo atmosferą.

Dėkoju UAB „Thermo Fisher Scientific“ darbuotojai dr. Violetai Pependikytei už išsamias konsultacijas, pateiktas naudingas žinias, komentarus ir pastabas. Taip pat dėkoju UAB „Thermo Fisher Scientific“ už galimybę pasinaudoti *Rotor-Gene 6000* termocikleriu.

Dėkoju Nacionalinio vėžio instituto darbuotojai dr. Živilei Gudlevičienei ir Lietuvos sveikatos mokslo universiteto darbuotojoms prof. Birutei Žilaitienei ir dr. Linai Mozūraitei už surinktus klinikinius mėginius.

Dėkoju Lietuvos Valstybinio mokslo ir studijų fondui (LVMSF) ir Lietuvos Mokslo Tarybai (LMT) už finansuojamą Aukštųjų technologijų plėtros programos projektą „Naujų diagnostikos sistemų, skirtų žmogaus papilomos viruso infekcijos ir jos sukulto vėžio laboratorinei diagnostikai, kūrimas,, (B-45/2009, AUT-16/2010).

Ypatingai dėkoju mamai už nuolatinį skatinimą, palaikymą ir neįkainojamą pagalbą. Taip pat dėkoju tėčiui, vyrui Tomui ir dukrytei Ugnei bei visiems artimiesiems už kantrybę, palaikymą ir supratingumą.