

Infekuotumas atskirų žmogaus papilomos tipų virusais esant intraepitelinių gimdos kaklelio pokyčių*

Živilė Gudlevičienė¹, Agnė Šepetienė^{2,3}, Janina Didžiapetrienė^{1,4}, Konstantinas Povilas Valuckas¹, Giedrė Smailytė¹, Gražina Drąsutienė², Rūta Jolanta Nadišauskienė⁵

¹Vilniaus universiteto Onkologijos institutas, ²Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Akušerijos ir ginekologijos klinika,

³Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikos, ⁴Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Vidaus ligų, šeimos medicinos ir onkologijos klinika, ⁵Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Medicinos akademijos Akušerijos ir ginekologijos klinika

Raktažodžiai: intraepiteliniai gimdos kaklelio pokyčiai, infekuotumas atskirų tipų ŽPV.

Santrauka. Įvadas. Lietuvoje 2004 m. pradėjus vykdyti moterų patikros dėl gimdos kaklelio patologijos programą, 2008 m. sergamumo gimdos kaklelio vėžiu rodikliai stabilizavosi. 2006 m. diagnozuoti 508 nauji atvejai, 2007 m. – 485. ŽPV infekcija yra svarbus ir gimdos kaklelio vėžio, ir ikivėžinės patologijos rizikos veiksnys. Formuojantis vėžiui, didelę įtaką turi ne tik infekuotumas virusu, bet ir konkretūs viruso tipai. Esant infekuotumui 16 ar 18 tipų virusais, ikivėžiniai pokyčiai progresuoja greičiau. Iki šiol Lietuvoje buvo atliekami ŽPV paplitimo ir rizikos veiksnių tyrimai, o mažiau dėmesio skiriama ŽPV tipų identifikavimui. Šio tyrimo tikslas – nustatyti infekuotumą ŽPV ir identifiкуoti jo tipus esant įvairaus laipsnio intraepitelinių gimdos kaklelio pokyčių.

Tyrimo medžiaga ir metodai. Į tyrimą įtrauktos 246 moterys, kurioms citologinio tyrimo metu nustatyta įvairaus laipsnio intraepitelinių gimdos kaklelio pokyčių (ASCUS, LSIL, HSIL). Visoms moterims polimerazės grandininės reakcijos (PGR) metodu buvo nustatyta, kurio tipo – 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 59 ŽPV jos infekuotos.

Rezultatai. Atlikus infekuotumo ŽPV tyrimus, nustatyta, kad, esant gimdos kaklelio citologinių pokyčių, ŽPV infekuota 45,5 proc. moterų. Didžiausias infekuotumas ŽPV tų moterų, kurioms citologinio tyrimo metu diagnozuota HSIL (62,1 proc.), o histologinio tyrimo metu – CIN2 (86,7 proc.). Atlikus ŽPV tipų identifikavimo tyrimus, nustatyta, kad daugiausia moterų buvo infekuotos 16 tipo (64,3 proc.), mažiau – 18 tipo (5,4 proc.) ir 33 tipo ŽPV (4,5 proc.). Remiantis citologine diagnoze, 16 tipo ŽPV dažniausiai identifiкуotas moterims, esant HSIL (77,8 proc.), o esant ASCUS, šio tipo virusas rastas rečiau (50,0 proc.).

Įsivada. ŽPV infekuota 45,5 proc. moterų, kurioms nustatyta intraepitelinių gimdos kaklelio pokyčių; didžiausias infekuotumas ŽPV, vyraujant 16 jo tipui, yra HSIL (citologinis tyrimas) ir CIN2 (histologinis tyrimas) atveju.

Įvadas

Sergamumas gimdos kaklelio vėžiu ir mirtingumas nuo jo Lietuvoje pastaraisiais dešimtmečiais didėjo ir viršijo Europos vidurkį. Pažymėtina, kad Europos Sąjungos šalyse sergamumo gimdos kaklelio vėžiu vidurkis yra 11,9 atvejo 100 tūkstančių moterų (1). Sergamumas Lietuvoje pradėjo didėti nuo 1992 m.: 1998–1999 m. buvo 17,4 atvejo 100 tūkstančių moterų, o 2004 m. pasiekė 31,1 atvejo 100 tūkstančių moterų. 2004 m. pradėjus vykdyti patikros dėl gimdos kaklelio patologijos programą, 2008 m. sergamumo rodikliai stabilizavosi ir netgi užfiksuotos mažėjimo

tendencijos. 2005 m. diagnozuota 500 naujų atvejų (standartizuotasis rodiklis – 27,4), 2006 m. – 508 (standartizuotasis rodiklis – 28,0), o 2007 m. – 485 atvejai (standartizuotasis rodiklis 26,9) (2). Pažymėtina, kad 2004 m. antrojoje pusėje, pradėjus vykdyti patikros dėl gimdos kaklelio patologijos programą, daugiau nei anksčiau diagnozuota ikivėžinės gimdos kaklelio patologijos. Neabejojama dėl žmogaus papilomos viruso (ŽPV), kaip pagrindinio rizikos veiksnio gimdos kaklelio kancerogenezeje vaidmens (3–5). Gimdos kaklelio vėžio atveju ŽPV pasaulyje identifiкуojamas net iki 100 proc., o sveikoms moterims, kurioms

Correspondence to Ž. Gudlevičienė, Institute of Oncology, Vilnius University, P. Baublio 3b, 08406 Vilnius, Lithuania
E-mail: zivile.gudleviciene@gmail.com

Adresas susirašinėti: Ž. Gudlevičienė, VU Onkologijos institutas, P. Baublio 3b, 08406 Vilnius
El. paštas: zivile.gudleviciene@gmail.com

* The full-length article in English can be found at <http://medicina.kmu.lt>

nerasta intraepitelinių pokyčių gimdos kaklelyje, bendrasis infekuotumo vidurkis yra 10,4 proc. (6). Tačiau infekuotumas ŽPV varijuoja priklausomai nuo geografinio regiono. ŽPV yra viena labiausiai paplitusių lytiniu keliu plintančių infekcijų. Apie 630 milijonų žmonių pasaulyje yra infekuoti ŽPV ir net 75–80 proc. lytiškai aktyvių asmenų kuriuo nors metu būna apsikrėtę šiuo virusu (7). Nors yra skirtumų pagal geografinius regionus, dažniausiai identifikuojami 16 ir 18 tipų ŽPV. 16 tipo ŽPV paplitęs labiausiai ir nustatomas apie 50–55 proc. visų gimdos kaklelio vėžio atvejų. Šio tipo virusas, kaip ir 18 bei 45 tipų ŽPV, turi svarbią reikšmę persistuojant infekcijai ir transformuojantis ląstelėms (6, 8). Didžiausias infekuotumas ŽPV nustatomas jaunoms moterims, jos dažniausiai infekuotos įvairių tipų virusais. Nustatytas spontaninis ir staigus infekuotumo mažėjimas vidutinio amžiaus moterų grupėje ir antrasis infekuotumo padidėjimas pomenopauziniu laikotarpiu (5). Intraepitelinių gimdos kaklelio pokyčių atsiranda praėjus keletui metų nuo užsikrėtimo virusu, t. y. vidutinio amžiaus moterims, iki prasidedant gimdos kaklelio vėžiui, progresuoja lėtai (2–12 metų), todėl juos galima anksti diagnozuoti ir gydyti. Pokyčiams progresuoti iki vėžio įtakos turi ne tik infekuotumas virusu, bet ir konkretūs viruso tipai. Esant infekuotumui didelės vėžio rizikos 16 ar 18 tipų virusais, pokyčiai progresuoja greičiau nei esant infekuotumui kitų tipų (pvz., 31, 33 ir kt.) virusais (9–11). Taigi, infekuotumas ŽPV bei onkogeninių tipų ŽPV yra svarbūs gimdos kaklelio vėžio rizikos veiksniai, bet ir jie nėra vieninteliai. Intraepitelinių pokyčių progresavimo rizikai nustatyti svarbu ir moters amžius, ir gimdos kaklelio pažeidimo plotas, kiti vėžio rizikos veiksniai (pvz., rūkymas). Ankstesni tyrimai parodė, kad vėžys paprastai vystosi, kai CIN 3 pažeidimo plotas apėmęs ne tik paviršinį epitelį, bet pažeidęs ir endocervikines liaukas (12, 13). Kai buvo sukurti jautrūs molekuliniai tyrimo metodai, pokyčių progresijai įvertinti tiriami keletas molekuliniai žymenų – tai viruso kiekis organizme, ŽPV E2 geno integracija, viruso aktyvumo žymenys (ŽPV mRNR), genų (pvz., *p16*) raiškos ar DNR metilinimo pokyčiai (14) ir kt. Šio tyrimo tikslas – nustatyti moterų infekuotumą ŽPV ir identifikuoti jo tipus esant įvairaus laipsnio intraepitelinių gimdos kaklelio pokyčių.

Tyrimo medžiaga ir metodai

Moterų kvietimas dalyvauti tyrime ir jų ištyrimas

Į tyrimą įtrauktos 246 moterys 18–70 metų amžiaus, kurioms pirminės patikros metu jau buvo nustatyta gimdos kaklelio patologija (įprastiniame PAP tepinėlyje aptikta ASCUS, ASC–H, LSIL ar HSIL).

Moterys pakartotinai kviestos atvykti į Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikų Konsultacinę polikliniką (tyrimo laikotarpis – nuo 2008 03 01 iki 2008 07 31). Sutikusios dalyvauti tyrime moterys pasirašė kvietimą dalyvauti tyrime bei informuoto asmens sutikimo formą. Tyrimo protokolais, kvietimas dalyvauti tyrime bei informuoto asmens sutikimo forma patvirtinti Lietuvos bioetikos komiteto (gautas leidimas atlikti biomedicininį tyrimą, 2008 02 29 Nr. 15.). Nėščios moterys į tyrimą nebuvo įtraukiamos. Vizito pas ginekologą metu moterims buvo atliekama ginekologinė apžiūra, kolposkopija ir biopsija bei paimama medžiaga ŽPV tyrimui atlikti. Tos moterys, kurioms ginekologinės apžiūros metu buvo nustatyta ryškių uždegiminių arba atrofinių gimdos kaklelio pokyčių, buvo gydytos vaistais nuo uždegimo ar joms vietiškai skirtas hormoninis gydymas estrogenais. Visoms moterims po gydymo buvo kartojamas citologinis tyrimas (PAP testas). Vilniaus universiteto Onkologijos institute, panaudojus polimerazės grandininę reakciją (PGR), buvo nustatomas visų tiriamų moterų infekuotumas ŽPV, identifikuojami atskiri ŽPV tipai.

ŽPV bei atskirų jo tipų (6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 59) nustatymas

Medžiaga ŽPV infekuotumui nustatyti (nubrauktos nuo gimdos kaklelio epitelio ląstelės) buvo imama steriliu šepetėliu ir perkeliama į 1 ml PBS buferinio tirpalo. Laboratorijoje iš tiriamosios medžiagos buvo išskiriama DNR ir atliekami ŽPV tyrimai. Tiriamoji DNR buvo išskiriama iš nešaldytos medžiagos ir saugoma –20°C temperatūroje.

ŽPV tipui identifikuoti tiriamoji medžiaga ruošta keliais etapais. Pirmiausia buvo išskiriama tiriamoji DNR. Tam naudotas komercinis „*Sorpoclean*“ DNR išskyrimo rinkinys (AB „SORPO diagnostics“, Lietuva). DNR buvo išskiriama pagal gamintojo rekomendacijas.

PGR atlikimo metodika. PGR, siekiant nustatyti ŽPV, buvo atliekama naudojant 50 µl tūrio mišinio, kurį sudarė 45 µl komercinio „*HPV Master Mix 'o*“ (AB „SORPO diagnostics“, Lietuva) ir 5 µl tiriamosios DNR. PGR atlikta pagal gamintojo rekomendacijas. Prieš atliekant PGR ŽPV nustatyti, buvo patikrinama išskirtoji DNR, t. y. žiūrima, ar visuose mėginiuose yra β-globino geno (15). Kiekviena PGR ŽPV nustatyti buvo atliekama naudojant teigiamą ir neigiamą kontrolę. Teigiamai kontrolei naudotos SiHa ir HeLa ląstelės, neigiamai kontrolei – mėginiai, neturintys DNR (su dejonizuotu vandeniu).

Mėginiai, kuriuose buvo nustatytas ŽPV, buvo tiriami toliau: atliekamos kelios PGR virusų tipams

nustatyti, naudoti komerciniai „HPV 16,18 Master Mix“, „HPV 31, 33, 59 Master Mix“ bei „HPV 6, 11, 45 Master Mix“ rinkiniai (AB „SORPO diagnostics“, Lietuva). PGR atlikta pagal gamintojo rekomendacijas. Jei, atlikus tris reakcijas ŽPV tipui nustatyti, tipo identifikuoti nepavykdavo, tuomet mėginys buvo tiriamas dėl infekuotumo didelės (HR) ir mažos (LR) rizikos grupių ŽPV. Tam tikslui naudotas komercinis „Seeplex HPV4 ACE Screening“ rinkinys (Seegene Inc., Korėja), buvo nustatomas infekuotumas didelės (HR, 35, 51, 56, 58, 66, 67, 70 ŽPV tipai) arba mažos (LR, 42, 43, 44 ŽPV tipai) rizikos ŽPV (16). Rinkinys patogus naudoti, nes vienos reakcijos metu nustatomas infekuotumas didelės arba mažos rizikos grupių virusais, infekuotumas konkrečiais 16 ir 18 tipų virusais, kartu atliekama vidinė ir išorinė mėginio kontrolė.

PGR produktų vizualizacija naudojant elektroforezę. Amplifikuoti PGR produktai buvo analizuojami naudojant elektroforezę. Elektroforezė buvo atliekama agarozės 2 proc. gelyje, dažytame etidžio bromidu. Po elektroforezės etidžio bromidu dažyti produktai analizuoti transiliumatoriuje naudojant UV šviesos šaltinį (320 nm).

Statistinės analizės metodai

Duomenims analizuoti buvo naudojamas statistinės analizės paketas SPSS (version 15.0, SPSS Inc. Chicago, IL, JAV). Tiriamosios analizuotos pagal amžių, diagnozuotus intraepitelininius gimdos kaklelio pokyčius (citologinę ir histologinę diagnozę), infekuotumą ŽPV bei atskirų tipų ŽPV. Skirtumai tarp grupių vertinti taikant chi kvadrato (χ^2) kintamųjų arba Fišerio tikslųjį testą. Visos išvados yra statistiškai reikšmingos, jei reikšmingumo lygmuo $p < 0,05$.

Rezultatai

Nuo 2008 m. kovo 1 d. iki 2008 m. liepos 31 d. į tyrimą įtrauktos 246 moterys, kurioms, atlikus citologinį tyrimą, nustatyta įvairaus laipsnio intraepitelininių gimdos kaklelio pokyčių (nuo ASCUS iki HSIL). Tirtųjų moterų amžiaus vidurkis – 37,9 metų (nuo 18 iki 70 metų, SD=10,53). Visos moterys pagal amžių buvo suskirstytos į penkias grupes. Moterų pasiskirstymas pagal amžiaus grupes pateikiamas 1 paveiksle.

Infekuotumo ŽPV tyrimų duomenys

Atlikus ŽPV tyrimus PGR metodu, nustatyta, kad ŽPV buvo infekuota 45,5 proc. moterų (112 iš 246). Įvertinus infekuotumą ŽPV pagal amžiaus grupes, nustatyta, kad dažniausiai ŽPV buvo infekuotos jaunos iki 25 metų moterys – net 66,7 proc. Vėliau, su amžiumi infekuotumas mažėjo ir mažiausias buvo

1 lentelė. Moterų, kurioms diagnozuota intraepitelininių gimdos kaklelio pokyčių, infekuotumas ŽPV pagal amžiaus grupes

Amžiaus grupė	Infekuotumas ŽPV				Iš viso atvejų
	neigiamas		teigiamas		
	atv.	proc.	atv.	proc.	
<25 metų	11	33,3	22	66,7	33
26–35 metų	30	40,5	44	59,5	74
36–45 metų	42	61,8	26	38,2	68
46–55 metų	46	75,4	15	24,6	61
>56 metų	5	50,0	5	50,0	10
Iš viso	134	54,5	112	45,5	246

2 lentelė. Moterų infekuotumas ŽPV pagal citologinę diagnozę

Citologinis tyrimas	Infekuotumas ŽPV				Iš viso atvejų
	neigiamas		teigiamas		
	atv.	proc.	atv.	proc.	
AGC	1	50,0	1	50,0	2
ASC-H	5	83,3	1	16,7	6
ASCUS	70	65,4	37	34,6	107
LSIL	25	56,8	19	43,2	44
HSIL	33	37,9	54	62,1	87
Iš viso	134	54,5	112	45,5	246

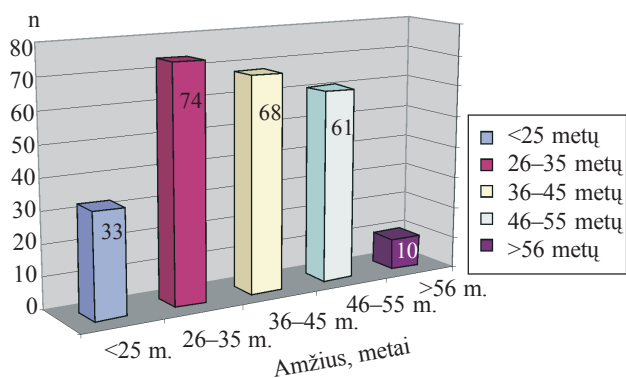
Skirtumams tarp grupių vertinti naudotas Fišerio tikslusis testas, $\chi^2=45,41$, $p=0,00006$.

46–55 metų moterų (24,6 proc.). Antrasis ŽPV infekuotumo padidėjimas nustatytas vyresnėms nei 50 metų moterims (šios amžiaus grupės moterų mūsų tyrime buvo tik 10) (1 lentelė).

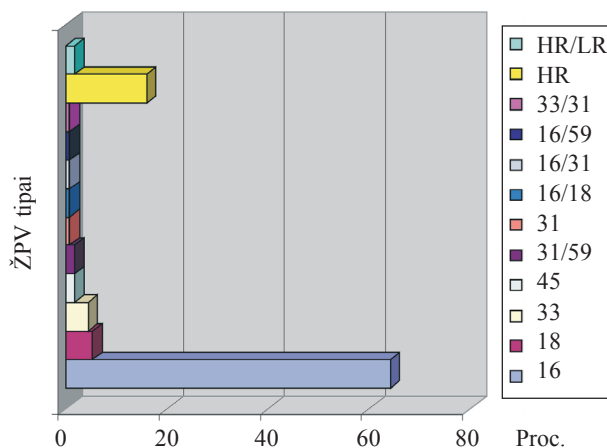
Atlikus tolesnę analizę, nustatyta, kad didžiausias infekuotumas ŽPV buvo tų moterų, kurioms citologiniu tyrimu nustatyta HSIL (62,1 proc.), beveik du kart mažesnis infekuotumas buvo ASCUS atveju (34,6 proc.) (2 lentelė). Įvertinus skirtumus tarp grupių, nustatyta statistiškai reikšmingų infekuotumo ŽPV skirtumų priklausomai nuo citologinės diagnozės: esant nedideliems pokyčiams (ASCUS), infekuotumas ŽPV buvo mažiausias, didėjant pokyčiams (LSIL), infekuotumas ŽPV didėjo, o didžiausias jis buvo esant HSIL ($p=0,00006$).

Rezultatai, gauti identifikuojant ŽPV tipus

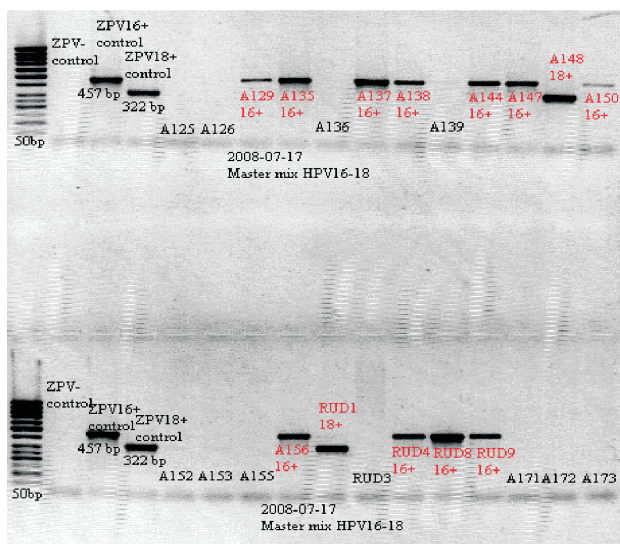
Pažymėtina, kad, nustatius ŽPV tipus, didžioji dauguma moterų buvo infekuotos 16 tipo ŽPV (64,3 proc.). Net 75 moterys buvo infekuotos šio tipo virusu, o trims iš jų nustatyta dviguba infekcija – moterys buvo infekuotos 16/18, 16/31 ar 16/59 tipų ŽPV. Tik apie 5 proc. moterų identifikuoti 18 (5,4 proc.) bei 33 (4,5 proc.) tipų ŽPV. Tarp kitų nustatytų tipų pavieniais atvejais buvo 31, 45 ir 59 tipo virusai arba dviguba



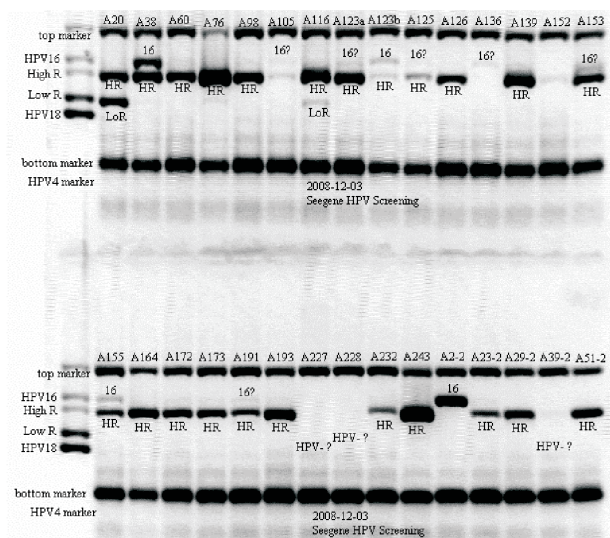
1 pav. Tiriamųjų moterų pasiskirstymas pagal amžių (vidurkis = 37,9, min. = 18, maks. = 70, ±SN = 10,53)



2 pav. Tirtų moterų infekuotumas įvairių tipų ŽPV
HR – didelės rizikos ŽPV tipai; LR – mažos rizikos ŽPV tipai.

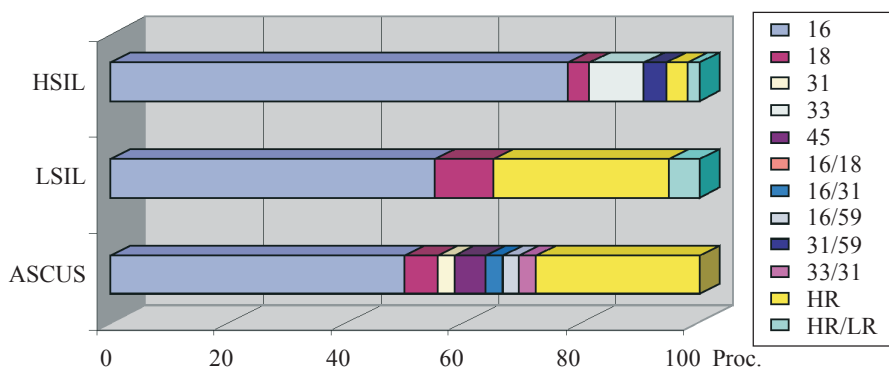


Raudonai pažymėti ŽPV teigiami mėginiai



HR – didelės rizikos tipų ŽPV, LoR – mažos rizikos tipų ŽPV, 16 – 16 tipo ŽPV

3 pav. ŽPV tipų nustatymas ir vizualizavimas elektroforezės metodu



4 pav. Moterų infekuotumas ŽPV tipais pagal citologinę diagnozę

infekcija – 31/59 tipo ŽPV ir 31/33 ŽPV (2 pav.). Nė viename mėginyje neidentifikuota 6 ir 11 tipų ŽPV. Jei PGR metu, panaudojus specifinius 16, 18, 31, 45, 59 tipų ŽPV pradmenis, viruso tipo identifikuoti nepavykdavo, buvo atliekamos papildomos PGR siekiant nustatyti, ar esama infekuotumo didelės ar mažos rizikos grupių ŽPV (naudotas rinkinys „*Seeplex HPV4 ACE Screening*“, „*Seegene Ltd.*“, Korėja). Daugumoje mėginių buvo identifikuoti didelės vėžio rizikos ŽPV (16,1 proc.). Dviem moterims buvo nustatyti mažos rizikos ŽPV, pažymėtina, kad kartu jos buvo infekuotos ir didelės rizikos grupių virusais. 3 paveiksle matomas ŽPV tipų identifikavimas naudojant du skirtingus rinkinius. Kairėje nuotraukoje naudotas „*SORPO diagnostics*“ rinkinys 16 ir 18 tipų ŽPV identifikuoti, dešinėje – „*Seegene*“ rinkinys, skirtas suskirstyti virusus į didelės, mažos rizikos grupes bei kartu 16 ir 18 tipų ŽPV tipams identifikuoti.

Analizuojant gautus rezultatus pagal tiriamųjų amžių, beveik visose amžiaus grupėse infekuotumas 16 tipo virusu buvo maždaug vienodas (nuo 60,0 iki 68,2 proc.), o tarp jaunų moterų (iki 25 metų) jis buvo nežymiai mažesnis (68,2 proc.) palyginus su vyresnio amžiaus moterų infekuotumu (60,0 proc.).

Remiantis citologine diagnoze, dažniausiai 16 tipo ŽPV buvo identifikuotas moterims, kurioms diagnozuota HSIL (77,8 proc.), o moterims, kurioms diagnozuota ASCUS, šio tipo virusas buvo identifikuotas rečiau (50,0 proc.) (4 pav.).

Pažymėtina, kad nė vienai tirtų moterų nebuvo identifikuotos mažos vėžio rizikos 6 ar 11 tipų ŽPV, nors dviem moterims buvo identifikuota dviguba ŽPV infekcija esant ir didelės, ir mažos vėžio rizikos tipų ŽPV.

Rezultatų aptarimas

ŽPV infekcija yra vienas svarbiausių gimdos kaklelio vėžio, taip pat ir ikivėžinės patologijos rizikos veiksnių (17). Epidemiologiniais tyrimais nustatyta, kad didžioji dauguma moterų (net iki 80 proc.) nors kartą gyvenime užsikrečia ŽPV (18). Išsamus ŽPV paplitimo tyrimas atliktas Katalonijos onkologijos instituto (angl. *Catalan Institute of Oncology, CIO*), o šios visuminės metaanalizės duomenis 2007 m. paskelbė Pasaulinės sveikatos organizacija (PSO) (19). Į metaanalizę buvo įtraukti 1999–2005 m. atlikti tyrimai. Iš viso juose dalyvavo 157 897 moterys, kurioms nerasta citologinių pokyčių PAP tepinėlyje. Nustatyta, kad 10,4 proc. (95 proc. PI: 10,2–10,7) šių moterų gimdos kaklelio mėginiuose identifikuota ŽPV DNR. Šis tyrimas taip pat parodė, kad didesnis infekuotumas ŽPV yra ekonomiškai atsilikusiose šalyse

(13,4 proc.; 95 proc. PI: 13,1–13,7) palyginus su infekuotumu išsivysčiusiose šalyse (8,4; 95 proc. PI: 8,3–8,6). Pasauliniu mastu nustatyta, kad daugiausia šia infekcija infekuotos Afrikos moterys (22,1 proc.; 95 proc. PI: 20,9–23,4), ypač Rytų Afrikos (31,6 proc.; 95 proc. PI: 29,5–33,8), o mažiausiai – Pietryčių Azijos (6,2 proc.; 95 proc. PI: 5,5–7,0) moterys. Panašūs duomenys gauti ir Tarptautinio vėžio tyrinėjimų centro (angl. *International Agency of Research on Cancer, IARC*) atlikto tyrimo. Ištirta 15–74 metų 15 613 moterų iš 11 šalių ir atlikta visuminė metaanalizė. Šis tyrimas turi privalumų, nes mėginiai atrinkti, ištirti bei rizikos veiksniams įvertinti visose šalyse buvo naudojamas tas pats protokolas. Mėginiai dėl ŽPV infekuotumo buvo tiriami centralizuotoje laboratorijoje, naudota PGR su bendrais ŽPV nustatyti skirtais pradmenimis GP5+/6+. Nustatytas bendras pagal amžių suderintas ŽPV DNR paplitimas siekė 10,5 proc. (95 proc. PI: 9,9–11,0) (20). Daugiau informacijos apie atliktus ŽPV tyrimus galima rasti PSO tinklalapyje: www.who.int/hpvcentre/en/.

Lietuvoje ŽPV tyrimai, siekiant įvertinti jo vaidmenį gimdos kaklelio kancerogenezeje, pradėti 1999 m. M. Kliučinskas ir bendraautorai nagrinėjo ŽPV paplitimui bei išlikimui įtaką turinčius veiksnius ir jų sąsają su gimdos kaklelio intraepiteliniais pokyčiais (21, 22). Į tyrimą buvo įtrauktos sveikos moterys, atėjusios profilaktiškai pasitikrinti pas ginekologą. Šių tyrimų metu konkretūs viruso tipai nebuvo identifikuojami, tirtas tik infekuotumas didelės vėžio rizikos grupės virusais, (naudotas Hybrid Capture 2 metodas). Nustatyta, kad tirtų moterų infekuotumas didelės vėžio rizikos grupės virusais siekė 25,1 proc. Šių tyrimų metu nustatyta, kad miesto moterys dažniau buvo infekuotos virusu palyginus su kaimo (27,0 vs 11,1 proc., $p < 0,05$). Vilniaus universiteto Onkologijos institute 2004–2005 m. tyrinėta ŽPV, jo tipų bei jų variantų reikšmė gimdos kaklelio vėžio rizikai (23, 24). Nustatytas didelis ŽPV infekcijos paplitimas tarp Lietuvos moterų, sergančių gimdos kaklelio vėžiu – ŽPV infekcija tarp jų identifikuota 92,0 proc., o tarp sveikų moterų – 23,6 proc. ($p < 0,0001$). Šio tyrimo metu jau buvo nustatyti virusų tipai. Pažymėtina, kad tarp tirtų moterų tik nedidelei daliai buvo diagnozuota intraepitelinių gimdos kaklelio pokyčių. Lietuvoje atliktų tyrimų metu nustatytas žymiai didesnis ŽPV paplitimas palyginus su ŽPV paplitimo pasaulyje arba Europoje vidurkiu (25). Taigi, sergamumo gimdos kaklelio vėžiu bei mirtingumo nuo jo rodikliai yra didesni palyginus su Europos rodiklių vidurkiu.

Siekiant sumažinti sergamumą šios lokalizacijos vėžiu bei mirtingumą nuo jo, būtina plėtoti ir tobulinti

atrankinės patikros dėl gimdos kaklelio patologijos programos. Žinoma, kad šios programos neveiksminingos arba mažai veiksmingos gimdos kaklelio adenokarcinomų atvejais (26). Pažymėtina, kad nauja pirminės profilaktikos priemonė – ŽPV vakcina, apsauganti daugiausia nuo 16 ir 18 tipų ŽPV, yra pakankamai veiksminga ir šios histologinės formos vėžio prevencijai. Mergaičių ir jaunų moterų vakcinacija jau taikoma kai kuriose šalyse, nors vis dar vyksta aktyvios diskusijos, kurios amžiaus grupės mergaites ar moteris vakcinuoti, ar reikalinga vakcinuoti berniukus. Tačiau tyrimais įrodyta, kad vakcina veiksmingiausia, kai skiepijama iki užsikrėtimo vakcinos sudėtyje esančių tipų ŽPV, todėl prioritetiniu laikomas mergaičių ir jaunų moterų skiepijimas (27, 28.). Taigi, dar didesnę svarbą įgauna ŽPV tyrimai patikros programose ir esant ikivėžinei patologijai. Nustatyta, kad, esant įvairaus laipsnio ikivėžiniams pokyčiams, infekuotumas ŽPV žymiai didesnis ir priklauso nuo intraepitelinių pokyčių laipsnio. Įvairių tyrimų metu nustatyta, kad jis gali būti nuo 50 proc. esant ASCUS ir daugiau kaip 80 proc. esant HSIL, ypač jei HSIL patvirtinta atlikus histologinį tyrimą ir nustatyta CIN2 arba CIN3 (6). Tyrimų duomenimis, moterims, kurioms yra įvairaus laipsnio intraepitelinių pokyčių, kaip ir moterims, kurioms citologiniu tyrimu nenustatyta pokyčių, pasireiškia infekuotumo sumažėjimas (apie 35 gyvenimo metus) ir antrasis pakilimas didėjant amžiui (apie 50 gyvenimo metus) (29). Mūsų atlikto tyrimo duomenimis, esant įvairaus laipsnio intraepitelinių gimdos kaklelio pokyčių (nuo ASCUS iki HSIL), ŽPV buvo infekuota 45,5 proc. moterų. Didžiausias infekuotumas ŽPV nustatytas jaunosms iki 25 metų moterims (66,7 proc. atveju). Taigi, šie rezultatai rodo, kad Lietuvos moterys, kurioms yra citologinių pokyčių gimdos kaklelio gleivinėje, dažniau infekuotos ŽPV, palyginus su moterų infekuotumo vidurkiu pasaulyje. Tiesa, kai kurie autoriai teigia, kad, esant HSIL, o tuo atveju dažniausiai progresuoja į vėžį, jei pacientės negydomos, ŽPV gali būti net iki 85,0 proc. atveju (30).

Tiriant ŽPV tipų paplitimą pasaulyje, buvo atlikta metaanalizė (įtrauktos 6 978 moterys) ir nustatyta, kad HSIL atveju dažniausiai nustatytas 16 tipo ŽPV. Šio tipo paplitimas pasaulyje varijuoja nuo 51,8 proc. (95 proc. PI: 50,1–53,5) Europoje iki 33,3 proc. (95 proc. PI: 20,4–48,4) Okeanijoje: bendrasis šio tipo paplitimas, esant HSIL, yra 45,4 proc. Kitų tipų paplitimo svyravimai nežymūs – tai dažniausiai priklauso nuo geografinės zonos. Nors yra nedidelių ŽPV paplitimo svyravimų pagal geografinius regionus, dažniausiai identifikuojami 16, 18, 33, 45, 31, 58, 52 ir 35 tipų ŽPV (30, 31). Mūsų tyrimo duomenys (didžioji

dauguma moterų buvo infekuotos 16 (64,3 proc.), 18 (5,4 proc.) bei 33 (4,5 proc.) tipų ŽPV), viena vertus, atitinka kitų autorių duomenis, antra vertus, infekuotumas ŽPV didesnis palyginus su Europos ar pasaulio vidurkiu.

Gimdos kaklelio vėžio patikros pagrindinis metodas daugelyje šalių yra gimdos kaklelio citologinis tyrimas, t. y. PAP testas. Tačiau citologinis tyrimas turi trūkumų: mažas jautrumas, kuris CIN 2/3 atvejais siekia 50–60 proc. Atliekant šį tyrimą, tyrimo rezultatui įtaką gali daryti ir subjektyvios priežastys: neteisingas tepinėlio paėmimas ir paruošimas (5–10 proc.), neteisinga laboratorijos interpretacija, dėl to galima perdėta ikivėžinių ligų diagnostika, o su tuo yra susijęs netikslingas gydymas.

ŽPV DNR testo jautrumas yra didesnis palyginus su citologiniu tyrimu (ŽPV DNR 66–100 proc., citologijos 44–78 proc.), tačiau šio testo specifiskumas mažesnis (61–96 proc.) palyginus su citologinio tyrimo specifiskumu (91–96 proc.) (32).

Laboratorinis tyrimas dėl ŽPV infekcijos rekomenduojamas:

- Esant neaiškiems PAP tyrimo rezultatams: kai nustatoma ASCUS arba įtariama LSIL.
- Stebint moteris, kurių PAP testas teigiamas (t. y. ASCUS, LSIL, HSIL), tačiau, atlikus kolposkopijos ir biopsijos medžiagos tyrimą, patologija nepatvirtinta.
- Stebint moteris ir prognozuojant rezultatus po CIN gydymo.
- Vienas arba kartu su citologiniu tyrimu pirminei patikrai moterų, kurioms daugiau kaip 30 metų (32).

Kaip minėta, vien citologinės atrankos metu sunkiai diagnozuojama adenokarcinoma, kuri laikoma agresyvesniu, greitesniu metastazavimu ir blogesne prognoze pasižyminčiu naviku nei plokščialąstelinė karcinoma (33). Adenokarcinomos ląstelės sunkiai pasiekiamos šepetėliu, kuris naudojamas atliekant PAP tyrimą. Tokiais atvejais aptikus 18 tipo ŽPV, galima įtarti adenokarcinomą.

ŽPV tipų identifikavimas rekomenduojamas ir taikomas jau turint pirminės atrankos teigiamus rezultatus: identifikuojami dažniausiai pasitaikantys didelės rizikos (16 ir 18) ir kitų tipų ŽPV (32). Šie tyrimai svarbūs kuriant naujas polivalentes vakcinas, kurios apsaugotų ne tik nuo 16 ir 18, bet ir nuo kitų tipų ŽPV (32). Taigi, ŽPV tyrimas jautresnis nei citologinis testas ir kolposkopija. 2006 m. Amerikos kolposkopijos ir gimdos kaklelio patologijos draugija rekomendavo gimdos kaklelio vėžio patikrai naudoti ir ŽPV DNR testą. Derinant PAP testą, ŽPV DNR testą

bei biologinius ŽPV žymenis galima būtų atrinkti moteris, užsikrėtusias ŽPV, kurioms dar nėra klinikinių požymių, tačiau jos priklauso didelės rizikos gimdos kaklelio vėžio grupei, parinkti racionalų gimdos kaklelio intraepitelinių pokyčių gydymo metodą, pagerinti gimdos kaklelio vėžio patikros bei profilaktikos veiksmingumą. Ieškoma naujų viruso aktyvumo ar integracijos žymenų (pvz., mRNR, E2 geno iškrita), padedančių identifikuoti moteris, kurioms yra intraepitelinių pokyčių progresavimo rizika.

Išvada

Šio tyrimo metu nustatyta, kad ŽPV infekuota 45,5 proc. tirtų moterų, kurioms buvo intraepitelinių gimdos kaklelio pokyčių; didžiausias infekuotumas ŽPV, vyraujant 16 jo tipui, buvo HSIL ir CIN2 atvejais.

Padėka

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

Prevalence of human papillomavirus types in cervical intraepithelial lesions

Živilė Gudlevičienė¹, Agnė Šepetienė^{2,3}, Janina Didžiapetrienė^{1,4}, Konstantinas Povilas Valuckas¹, Giedrė Smailytė¹, Gražina Drąsutienė², Rūta Jolanta Nadišauskienė⁵

¹Institute of Oncology, Vilnius University, ²Clinic of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Vilnius University,

³Vilnius University Hospital Santariškių Klinikos, ⁴Clinic of Internal Medicine, General Practice and Oncology,

Faculty of Medicine, Vilnius University, ⁵Department of Obstetrics and Gynecology, Medical Academy,

Lithuanian University of Health Sciences, Lithuania

Key words: cervical intraepithelial lesions; prevalence of human papillomavirus types.

Summary. *Background.* Since the implementation of the cervical cancer screening program in Lithuania in 2004, cervical cancer incidence rates have stabilized during a 4-year period: in 2006 and 2007, 508 and 485 new cases, respectively, were diagnosed. Human papillomavirus (HPV) infection is one of the main risk factors for cervical cancer and development of intraepithelial lesions. However, not only HPV, but also HPV type, is a very important factor for malignant transformation. Cervical intraepithelial lesions with HPV 16 and 18 more frequently progress to cancer. To date, in Lithuania, studies only on HPV prevalence and risk factors have been carried out, and less attention has been paid to the identification of HPV types. The aim of this study was to identify the most common HPV types in women with various cytological lesions.

Material and methods. A total of 246 women with various cytological lesions (atypical squamous cells of undetermined significance [ASCUS], low-grade squamous intraepithelial lesion [LSIL], and high-grade squamous intraepithelial lesion [HSIL]) were included into the study. All the women were screened for HPV infections followed by HPV typing for types 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, and 59. Polymerase chain reaction was used.

Results. Less than half (45.5%) of women with cytological lesions were infected with HPV. The highest prevalence of HPV was detected in women with HSILs (62.1%) and CIN2 (86.7%). HPV typing revealed that the most frequent type was HPV 16 (64.3%); HPV 18 and HPV 33 accounted for 5.4% and 4.5% of cases, respectively. Based on cytologic diagnosis, HPV 16 was more frequently found in women with HSILs than women with ASCUS (77.8% vs. 50.0%).

Conclusions. The prevalence of HPV infection in women with cytological lesions was 45.5%. The highest prevalence of HPV was detected in women with HSILs (cytologic investigation) and CIN2 (histologic investigation). HPV 16 is the most common type in women with various cervical intraepithelial lesions.

Literatūra

1. Castellsague X, de Sanjose S, Aguado T, Louie KS, Bruni L, Munoz J, et al. HPV and cervical cancer in the world. 2007 Report. *Vaccine* 2007;25(Suppl 3):C1-26.
2. Lietuvos vėžio registras. (Lithuanian Can Registry.) Available from: URL: http://www.vuoi.lt/index.php?114_6970586
3. Hoory T, Monie A, Gravitt P, Wu TC. Molecular epidemiology of human papillomavirus. *J Formos Med Assoc* 2008;107(3):198-217.
4. Longworth MS, Laimins LA. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol Mol Biol Rev* 2004;68(2):362-72.
5. Monsonego J, Bosch FX, Coursaget P, Cox JT, Franco E, Frazer I, et al. Cervical cancer control, priorities and new

- directions [EUROGIN 2003 conclusions]. *Int J Cancer* 2004; 108(3):329-33.
6. Bosch FX, Burchell AN, Schiffman M, Giuliano MR, de Sanjose S, Bruni L, et al. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. *Vaccine* 2008;26(Suppl 10): K1-16.
 7. Medeiros LR, Hilgert JB, Zanini RR, Berwanger O, Bozzetti MC, Mylius LC. Vertical transmission of human papillomavirus: a systematic quantitative review. *Cad Saude Publica* 2005; 21(4):1006-15.
 8. Ault KA. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections in the female genital tract. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2006;Suppl:40470.
 9. Plummer M, Schiffman M, Castle PE, Maucort-Boulch D, Wheeler CM; ALTS Group. A 2-year prospective study of human papillomavirus persistence among women with a cytological diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance or low-grade squamous intraepithelial lesion. *J Infect Dis* 2007;195(11):1582-9.
 10. Castle PE, Solomon D, Schiffman M, Wheeler CM. Human papillomavirus type 16 infections and 2-year absolute risk of cervical precancer in women with equivocal or mild cytologic abnormalities. *J Natl Cancer Inst* 2005;97(14):1066-71.
 11. Khan MJ, Castle PE, Lorincz AT, Wacholder S, Sherman M, Scott DR, et al. The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. *J Natl Cancer Inst* 2005;97(14):1072-9.
 12. Ostör AG. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *Int J Gynecol Pathol* 1993;12(2):186-92.
 13. Al-Nafussi AI, Hughes DE. Histological features of CIN3 and their value in predicting invasive microinvasive squamous carcinoma. *J Clin Pathol* 1994;47(9):799-804.
 14. Gravitt PE, Coutlée F, Iftner T, Sellors JW, Quint WG, Wheeler CM. New technologies in cervical cancer screening. *Vaccine* 2008;26(Suppl 10):K42-52.
 15. Ireng LM, Robert A, Gala JL. Quantitative assessment of human β -globin gene expression in vitro by TaqMan real-time reverse transcription-PCR: comparison with competitive reverse transcription-PCR and application to mutations or deletions in noncoding regions. *Clin Chem* 2005;51:2395-6.
 16. Manual for multiplex-PCR System for the screening of human papilloma virus (HPV). Available from: URL: http://www.see.gene.co.kr/en/download/manual1_hpv4ace.pdf
 17. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Human papillomaviruses. Vol. 90. Lyon: World Health Organization International Agency for Research on Cancer; 2007.
 18. Castellsagué X. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecol Oncol* 2008;110(3 Suppl 2):S4-7.
 19. de Sanjosé S, Diaz M, Castellsagué X, Clifford G, Bruni L, Muñoz N, et al. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2007;7(7): 453-9.
 20. Clifford GM, Gallus S, Herrero R, Muñoz N, Snijders PJ, Vaccarella S, et al.; IARC HPV Prevalence Surveys Study Group. Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. *Lancet* 2005;366(9490):991-8.
 21. Kliučinskas M, Nadišauskienė RJ, Padaiga Ž, Špukaitė T. Žmogaus papiloma viruso paplitimas tarp 18–35 metų Kauno moterų. (Prevalence of human papillomavirus among 18–35-year-old Kaunas women.) *Lietuvos akušerija ir ginekologija* 1999;2(1):19-22.
 22. Kliučinskas M, 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.
 23. Gudlevičienė Ž, Didžiapetrienė J, Sužiedėlis K, Lapkauskaitė L. Žmogaus papilomos viruso, jo tipų ir variantų tyrimai. (Investigation of human papillomavirus, its types and variants.) *Medicina (Kaunas)* 2005;41(11):910-5.
 24. Gudlevičienė Ž, Ramael M, Didžiapetrienė J, Uleckienė S, Valuckas KP. Human papillomavirus and p53 polymorphism in Lithuanian cervical carcinoma patients. *Oncology Gynecology* 2006;102:530-3.
 25. Maucort-Boulch D, Franceschi S, Plummer M; IARC HPV Prevalence surveys study group. International correlation between human papillomavirus prevalence and cervical cancer incidence. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008;17(3): 717-20.
 26. Myers E, Huh WK, Wright JD, Smith JS. The current and future role of screening in the era of HPV vaccination. *Gynecol Oncol* 2008;109(Suppl 2):S31-9.
 27. Wright TC, Van Damme P, Schmitt HJ, Meheus A. Chapter 14: HPV vaccine introduction in industrialized countries. *Vaccine* 2006;24(Suppl 3):S3/122-31.
 28. Schiller JT, Castellsagué X, Villa LL, Hildesheim A. An update of prophylactic human papillomavirus L1 virus-like particle vaccine clinical trial results. *Vaccine* 2008;26(Suppl 10): K53-61.
 29. Franceschi S, Herrero R, Clifford GM, Snijders PJ, Arslan A, Anh PT, et al. Variations in the age-specific curves of human papillomavirus prevalence in women worldwide. *Int J Cancer* 2006;119(11):2677-84.
 30. Smith JS, Lindsay L, Hoots B, Keys J, Franceschi S, Winer R, et al. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *Int J Cancer* 2007;121(3):621-32.
 31. Clifford GM, Smith JS, Aguado T, Franceschi S. Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer* 2003;89(1): 101-5.
 32. Cuzick J, Arbyn M, Sankaranarayanan R, Tsu V, Ronco G, Mayrand MH, et al. Overview of human papillomavirus-based and other novel options for cervical cancer screening in developed and developing countries. *Vaccine* 2008;26(Suppl 10): K29-41.
 33. Hildesheim A, Hadjimichael O, Schwartz PE, Wheeler CM, Barnes W, Lowell DM, et al. Risk factors for rapid-onset cervical cancer. *Am J Obstet Gynecol* 1999;180(3 Pt 1):571-7.

Straipsnis gautas 2009 09 08, priimtas 2010 09 06
Received 8 September 2009, accepted 6 September 2010