

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Chemijos fakultetas

Biochemijos studijų programos IV kurso studentė

Ugnė KULIEŠIŪTĖ

Bakalauro baigiamasis darbas

**Žmogaus papilomos viruso infekcijos bei genotipų paplitimo
tyrimai**

Darbo vadovė:

dokt. Vaida Simanavičienė

Vilnius 2016

Žmogaus papilomos viruso infekcijos bei genotipų paplitimo tyrimai

Darbas atliktas

Vilniaus universiteto Biotechnologijos institute, Imunologijos ir ląstelės biologijos skyriuje

Ugnė Kuliešiūtė

.....

Darbo vadovė:

dokt. Vaida Simanavičienė

.....

TURINYS

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS	5
ĮVADAS	7
1. LITERATŪROS APŽVALGA	9
1.1. Žmogaus papilomos virusų istorija	9
1.2. ŽPV klasifikacija.....	9
1.3. Viruso struktūra.....	10
1.4. Viruso baltymai.....	11
1.5. Viruso infekcijos ciklas.....	13
1.6. ŽPV integracija į šeimininko genomą.....	15
1.7. ŽPV sukeltos ligos	16
1.7.1. Gimdos kaklelio vėžys	16
1.7.2. ŽPV sąsajos su galvos ir kaklo vėžiu	19
1.8. Vakcinos prieš ŽPV	20
1.9. Metodai taikomi ŽPV aptikimui	21
1.9.1. ŽPV nustatymas polimerazinės grandininės reakcijos metodu	22
1.9.2. Kiti metodai ŽPV nustatymui.....	22
2. MEDŽIAGOS IR METODAI	24
2.1. Medžiagos	24
2.1.1. Rinkiniai	24
2.1.2. Pradmenų sistemos	25
2.1.3. Teigiamos kontrolės	25
2.1.4. Klinikiniai mėginiai.....	26
2.2. Įranga	26
2.3. Tyrimo metodai.....	27
2.3.1. DNR išskyrimas	27

2.3.2. DNR koncentracijos nustatymas	28
2.3.3. Polimerazinė grandininė reakcija (PGR).....	28
2.3.4. Dauginė PGR reakcija	30
2.3.5. Elektroforezė	31
2.3.6. Statistinė analizė.....	32
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	33
3.1. Bendros ŽPV infekcijos nustatymas	34
3.2. ŽPV paplitimas įvairiose amžiaus grupėse	35
3.3. ŽPV infekcijos paplitimo ryšys su kontraceptinių preparatų vartojimu	38
3.4. ŽPV genotipų nustatymas	40
3.5. ŽPV genotipų paplitimo ir kontraceptinių preparatų vartojimo ryšio nustatymas.....	43
3.6. ŽPV ir kiti rizikos veiksniai	44
3.6.1. ŽPV ir gimdymų skaičius.....	44
3.6.2. ŽPV ir rūkymas	46
IŠVADOS	48
SANTRAUKA	49
SUMMARY	50
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	51

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

APC – antigeną pristatanti ląstelė (angl. *Antigen-presenting cell*)
AT-kPGR - Atvirkštinės transkripcijos kiekybinė polimerazinė grandininė reakcija
bp – bazių poros
BSA - Jaučio serumo albuminas (angl. *bovine serum albumin*)
CIN - Displazija arba intraepitelinė gimdos kaklelio neoplazija
CIN1 - Neryški displazija arba intraepitelinė gimdos kaklelio neoplazija
CIN2 - Vidutinė displazija arba intraepitelinė gimdos kaklelio neoplazija
CIN3 - Ryški displazija arba intraepitelinė gimdos kaklelio neoplazija
DNR – deoksiribonukleorūgštis
dNTP – deoksiribonukleotidas
EDTA – etilendiamintetraacto rūgštis
EGF - epidermio augimo faktoriaus (angl. *epidermal growth factor*)
GKV - gimdos kaklelio vėžys
HNSCC - galvos ir kaklo plokščiųjų ląstelių karcinoma (angl. *head and neck squamous cell carcinoma*)
HSIL - žymūs plokščiųialąsteliniai intraepiteliniai pokyčiai
iRNR – informacinė ribonukleino rūgštis
LCR – lokusą kontroliuojantis regionas (angl. *locus control region*)
LSIL - nežymūs plokščiųialąsteliniai intraepiteliniai pokyčiai
LSMU – Lietuvos sveikatos mokslo universitetas
OSCC - burnos ertmės plokščiųjų ląstelių karcinoma (angl. *oral cavity squamous cell carcinoma*)
p53 – protoonkogenas 53
Pap – citologinis gimdos kaklelio tyrimas (angl. *Papanicolaou (Pap) test*)
PGR – polimerazinė grandininė reakcija
pRb - retinoblastomos baltymas
PSO – Pasaulinė sveikatos organizacija (angl. *World Health Organization*)
PV - Papilomos virusas
SCC – plokščiųjų ląstelių karcinoma (angl. *squamous cell carcinoma*)
SKT - Sudėtinės kontraceptinės tabletės

TAE - Tris-acetato-EDTA buferinis tirpalas

TZ - transformacijos zona

ŽPV - Žmogaus papilomos virusas

IVADAS

Žmogaus papilomos virusas žinomas kaip gimdos kaklelio vėžį sukeliantis veiksnys. Ši, dažnai pirminių požymių nesukelianti infekcija, persistudama moters gimdos kaklelio ertmėje sukelia net 99% gimdos kaklelio vėžio atvejų. Pasaulinės sveikatos organizacijos (angl. *World Health Organization*) duomenimis ŽPV – viena dažniausių virusinių infekcijų, aptinkamų moters reprodukciname trakte, tad yra itin svarbu tyrinėti šio viruso paplitimą moterų populiacijoje. Tačiau šis mažas (8000 bp), apvalkalėlio neturintis, dvigrandine žiedine DNR pasižymintis virusas infekuoja ne tik moters, bet ir vyro organizmą. Priklausomai nuo viruso genotipo, lytiniu keliu plintanti infekcija dažniausiai nustatoma vyrų ir moterų lytiniuose organuose kaip nepiktybines papilomas bei karpas sukelianti infekcija. ŽPV taip pat identifikuojamas kaip kancerogeninis veiksnys ne tik lytinių organų, bet ir galvos bei kaklo vėžio atvejais. Didžiausiu paplitimu nustatomi 16 ir 18 onkogeniniai ŽPV tipai.

Siekiant mažinti ŽPV paplitimo imtasi įvairių prevencinių priemonių, skatinama vengti rizikos faktorių, atliekami tyrimai siekiant įvertinti atskirų veiksmų ryšį su ŽPV infekcija. Šiuo metu sukurtos trys profilaktinės vakcinos, kurių parinkimui bei tobulinimui reikalingi populiaciniai bendros infekcijos paplitimo bei atskirų genotipų paplitimo tyrimai įvairiuose regionuose.

ŽPV paplitimas Lietuvoje yra vienas didžiausių Rytų Europos regione. Infekcijos dažnis Lietuvoje viršija bendrą Europos vidurkį ir yra vienas pirmaujančių tarp Europos valstybių. Didelis mirštamumas nuo ŽPV infekcijos sukulto gimdos kaklelio vėžio šalyje (vidutiniškai 615 atvejų kasmet) skatina atlikti kuo daugiau tyrimų siekiant informuoti visuomenę, raginti imtis profilaktinių priemonių bei ugdyti prevenciją.

Lietuvoje yra atliktų ŽPV infekcijos paplitimo tyrimų tarp moterų urogenitalinių nuograndų mėginių, tačiau nėra paskelbta jokių tyrimų rezultatų, informuojančių apie ŽPV viruso paplitimą tarp sveikų moterų ir vyrų burnos mėginių. Siekiant sukaupti kuo daugiau žinių apie ŽPV infekcijos paplitimą, šiame darbe atlikome tyrimus apie bendros ŽPV infekcijos bei onkogeninių genotipų paplitimą tarp moterų ir vyrų grupių. Taip pat pirmą kartą Lietuvoje buvo tiriamas rizikos veiksmų (sudėtinių kontraceptinių priemonių vartojimas, rūkymas ir gimdymų skaičius) ir ŽPV infekcijos paplitimo ryšys.

DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI

Darbo tikslas:

Nustatyti žmogaus papilomos viruso (ŽPV) infekciją bei genotipus moterų urogenitalinių nuograndų bei vyrų ir moterų burnos epitelio ląstelių mėginiuose.

Darbo uždaviniai:

1. Išgryninti DNR iš moterų urogenitalinių nuograndų ir moterų bei vyrų burnos epitelio ląstelių mėginių.
2. Bendrąją ŽPV infekciją nustatančiomis PGR sistemomis ištirti ŽPV infekcijos paplitimą moterų urogenitalinių nuograndų mėginiuose bei moterų ir vyrų burnos epitelio ląstelių mėginiuose.
3. Įvertinti ŽPV infekcijos paplitimą skirtingose amžiaus grupėse.
4. Dauginėmis PGR sistemomis ištirti ŽPV genotipų paplitimą ŽPV teigiamuose mėginiuose.
5. Įvertinti bendros ŽPV infekcijos bei genotipų paplitimo ryšį su sudėtinių kontraceptinių preparatų vartojimu.
6. Įvertinti ŽPV infekcijos paplitimo ir kitų rizikos veiksnių (rūkymas ir gimdymų skaičius) ryšį moterų urogenitalinių nuograndų mėginiuose.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Žmogaus papilomos virusų istorija

Papilomos virusų (PV) šeima žinoma kaip įvairius odos pažeidimus, karpas ar navikus sukeliantys virusai. Šių virusų tyrimų istorija prasidėjo nuo karpų, žinomų nuo senovės graikų bei romėnų laikų ir aprašytų Hipokrato darbuose (460-377 pr. Kr.), tyrimų. Iki pat XIX a. pagrindine karpų susidarymo priežastimi buvo laikoma sifilio bei gonorėjos susirgimai (David, 2007). Nuomonė pasikeitė 1930 m. Richard Shope identifikavus pirmąją šeimos atstovą – amerikinių triušų papilomos virusą (angl. *Cottontail Rabbit Papillomavirus*, CRPV). Taigi 1930-ieji istoriškai laikomi papilomos virusų atradimo metais (Syrjanen ir Syrjanen, 2008).

Papilomos virusas buvo rastas įvairiose stuburinių rūšyse bei žmoguje. Siekiant identifikuoti kriterijus, nulemiančius virusinės infekcijos eigą, buvo atliekami tolesni tyrimai (Klein ir kt., 2007). Žmogaus papilomos virusas (ŽPV) tapo itin aktualus XIX a. antroje pusėje – XX a. pirmoje pusėje, pastebėjus karpų perdavimo tendenciją, užsikrėtimo nuo kito asmens galimybę. Identifikavus virusinę genitalinių bei odos paviršiaus karpų kilmę, Harald Sur Hausen pirmąkart suformulavo hipotezę apie ŽPV onkogeninį potencialą gimdos kaklelio vėžiui (Syrjanen ir Syrjanen, 2008).

1.2. ŽPV klasifikacija

Sukaupus daugiau žinių bei atlikus išsamesnius tyrimus pradėtas viruso klasifikavimas, kuris pasirodė esantis gana sudėtingas. Virusas nesukelia nuoseklaus humoralinio imuninio atsako nei žmogaus, nei kitų žinduolių organizme, todėl neįmanoma sudaryti viruso taksonomijos serologiniu pagrindu (King ir kt., 2011). Klasifikaciją palengvino savybė, jog visi žinomi atstovai yra griežtai šeiminiškai specifiniai ir *Papillomaviridae* šeimos virusai buvo suskirstyti į 29 gentis. Žmogaus papilomos virusas priskiriamas penkioms gentims: *alpha*, *beta*, *gamma*, *mu* ir *nu*. Likusioms 24-ioms gentims priskirti išskirtinai gyvūnų papilomos virusų atstovai (King ir kt., 2011).

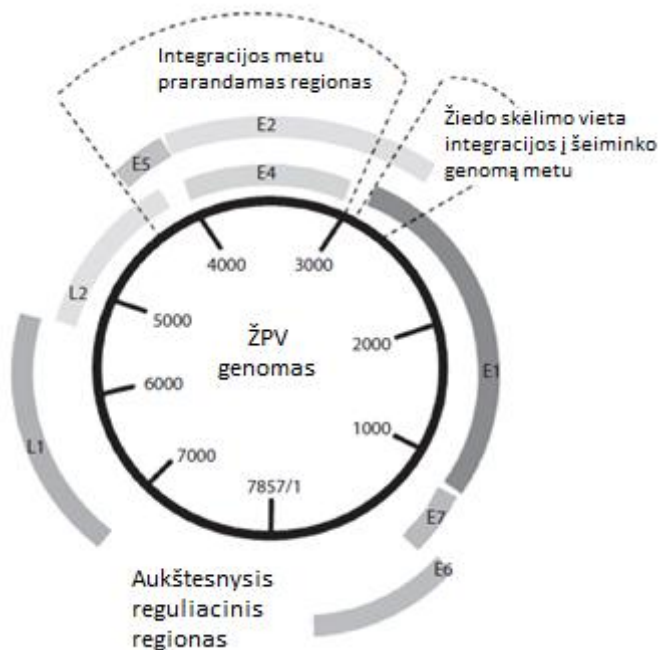
Remiantis viruso DNR nukleotidų sekos tarpusavio skirtumais *Papillomaviridae* šeimos virusai suskirstyti į 5 taksonomines kategorijas: gentis, rūšis, tipas, potipis ir variantas. Stambiausios kategorijos, genties, atstovų nukleotidų sekos tarpusavyje skiriasi 40-55%, rūšies rango viduje 30-40%, to paties tipo atstovai pasižymi 10-25% skirtumu. Subtipai pasižymi 2-10% skirtumu. Virusų variantas – smulkiausia taksonominė kategorija, paremta mažesniu nei 2% nukleotidų sekos skirtumu.

Atsižvelgiant į viruso sukeltus padarinius ląstelėje bei bendrai organizme, virusas suskirstytas į aukštos ir žemos rizikos grupes. Žemos rizikos grupei priklausantys virusų tipai sukelia pirmines nepiktybines karpas, gimdos gleivinės žaizdes, retais atvejais šio tipo virusai randami supiktybėjusiuose augliuose. Įvairiuose bendrosios populiacijos tyrimuose dažniausiai aptinkami 6 bei 11 žemos rizikos grupės virusų tipai, randami įvairiose genitalinėse karpose. Šiai rizikos grupei taip pat priskiriami ir rečiau randami ŽPV 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 bei 81 tipai. Aukštos rizikos grupei priskiriami tipai, infekuotoje ląstelėje sukeliantys įvairius struktūrinius pakitimus, neretai lemiančius vėžinio darinio formavimąsi. Pavojingiausiais laikomi ŽPV 16, 18, 31, 45 tipai yra potencialūs gimdos kaklelio vėžio sukėlėjai, randami net 80% ligos atvejų. Trylika aukštos rizikos virusų tipų, ŽPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 ir 66, laikomi pirminiais gimdos kaklelio vėžio rizikos veiksniais (Haedicke ir kt., 2013), dar trys ŽPV tipai (68, 73 ir 82) laikomi kaip galbūt kancerogeniniais (Burk ir kt., 2013).

1.3. Virusų struktūra

Žmogaus papilomos virusas žinomas kaip nedidelis, dvigrandinę žiedinę DNR turintis virusas, besidauginantis epitelinio audinio ląstelių branduoliuose. Genomą sudaro apytiksliai 8000 bp (įvairiais šaltiniais varijuoja nuo 7000 iki 8000 bp) ilgio grandinė, kompaktiškai susitelkusi į chromatininę struktūrą (Knipe ir kt., 2013). Genomą, pavaizduotą 1-ame paveiksle, sudaro sudėtiniais promotoriais reguliuojami šeši reguliaciniai bei du struktūriniai genai, kurie, priklausomai nuo aktyvacijos momento viruso infekcijos cikle, suskirstyti į ankstyvuosius (E) bei vėlyvuosius (L). Ankstyvųjų baltymų grupei priskiriami 6 baltymai (E1, E2, E4, E5, E6, E7) iš kurių 3 (E5, E6, E7) pasižymi onkogeninėmis savybėmis, skatina viruso replikaciją ir transkripciją. Du vėlyvieji viruso genai (L1 ir L2) formuoja išorinę viruso kapsidę (Scheurer ir kt., 2005).

Viruso kapsidė sudaryta iš 72 L1 baltymo kapsomerų (pentamerų), kurių kiekvieną sudaro 55 kDa molekulinės masės monomerai, tarpusavyje sujungti disulfidinėmis jungtimis, būtinomis struktūros tvirtumui užtikrinti (Klein ir kt., 2007). Mažesnis ir kintantis L2 baltymo kopijų skaičius jungiasi prie struktūros formuojant vidinę kapsidės dangalą dalį (Fernandes ir kt., 2013).



1 pav. ŽPV genomas ir jo sritys (Gupta, 2014).

1.4. Viruso baltymai

E1 baltymas yra vienintelis papildomas viruso koduojamas baltymas, pasižymintis helikaziniu aktyvumu. Prisikabinęs prie viruso replikacijos pradžios taško šis fermentas inicijuoja virusinės DNR replikacijos procesą (Hebner ir Laimins, 2006; Scheurer ir kt., 2005).

E2 baltymas pasižymi keliomis funkcijomis: jis reguliuoja kitų viruso genų raišką, kadangi, priklausomai nuo prisijungimo srities lokusą kontroliuojančiame regione (*locus control region*, LCR), fermentas gali veikti kaip transkripciją skatinantis arba ribojantis veiksnys. Taip pat yra svarbus veiksnys virusinės DNR genomo paskirstyme, virusinę DNR perduodant dukterinėms šeimininko ląstelėms mitozinio dalijimosi metu (Knipe ir kt., 2013; Gupta, 2014).

E4 baltymo vaidmuo dar nėra pilnai išaiškintas, veikla siejama su virusinės DNR padauginimu ir virusinio genomo išlaisvinimo iš kapsidės procesu (Gupta, 2014; Ramirez-Fort ir kt., 2014).

E5 – vienas iš trijų viruso onkogeninių baltymų. Jo raiška vyksta viruso infekcijos ciklo produktyviosios stadijos metu, kai sąveikaudamas su transkripcijos faktoriais c-Jun ir c-Fos (faktoriai, dalyvaujantys p53 baltymo degradacijoje nuo ubikvitino priklausomu keliu) skatina mitozinį ląstelės ciklą, palaiko ląstelės dalijimąsi. Taip pat sąveikaudamas su epidermio augimo faktoriaus (EGF) receptoriais galimai kliudo auglio vystymąsi stabdančių baltymų veiklai ir inicijuoja kitų dviejų onkogeninių baltymų E6 bei E7 raišką (Klein ir kt., 2007).

E6 ir E7 genai užtikrina replikacinį virusinio genomo pastovumą, kadangi jungdamiesi su ląsteliniams baltymams ir kontroliuodami jų aktyvumą geba reguliuoti ir išlaikyti mitozinį ląstelės ciklą. Aukštos rizikos tipo ŽPV E6 baltymai inaktyvuoja ląstelės baltymus p53, kurie yra auglio slopikliai ir yra atsakingi už neatstatomus DNR pažeidimus turinčių ląstelių apoptozę. E6 baltymai gali blokuoti supresorinio baltymo transkripciją, skatinti represorinių promotorių veiklą arba sudarant sudėtinius kompleksus skatinti baltymo skaidymą. Pastarasis procesas būdingas aukštos rizikos ŽPV tipams, kuomet, dalyvaujant papildomiems ląsteliniams baltymams, p53 baltymas pažymimas nuo ubikvitino priklausomam degradacijos procesui. E6 baltymas taip pat žinomas kaip veiksnys, aktyvuojantis telomerazę. Šio proceso metu yra stabdomas telomerų trumpėjimas ir ląstelės gali neribotai dalintis (Klein ir kt., 2007).

E7 geno koduojami baltymai jungiasi prie ląstelės ciklo pradžią kontroliuojančio retinoblastomos baltymo (pRb) ar jo homologų (p107, p130), dar vadinamų kišeniniais baltymais. Retinoblastomos šeimos baltymai atlieka pagrindinį vaidmenį ląstelės ciklo reguliacijoje, stabdo ląstelės perėjimą iš G1 ciklo fazės į S fazę. E7 geno produktams prisijungus prie pRb, p107 ar p130 baltymų, šie destabilizuojami nuo proteasomų priklausomu keliu, praranda aktyvumą ir gebėjimą reguliuoti E2F šeimos transkripcijos faktorius, kurie yra tiesiogiai atsakingi už mitozinį ląstelės ciklo reguliavimą (jungiasi su ląstelės promotoriais ir kontroliuoja ląstelės DNR sintezę). Taip ląstelė skatinama pakartotinai dalyvauti S fazėje, nenutraukiamai dalintis. Taip pat E7 baltymas padidina ir E2F transkripcijos faktoriais reguliuojamos nuo ciklino priklausomos kinazės – 2 (cdk2) raišką. Cdk2 reguliuoja S fazės trukmę, o šios kinazės aktyvumo reguliavimas siejamas su ciklinais A ir E, taip pat su kompleksų tarp cdk2 ir cdk slopiklių (p21/Cip1, p27/Kip1) susidarymu. E7 inaktyvuoja minėtus slopiklius, sudaro kompleksus su ciklinais A ir E ir tokiu būdu apsaugo

ląstelę nuo mitozinio aktyvumo praradimo. E7 baltymo jungimasis su retinoblastomos baltymais taip pat gali inicijuoti padidėjusią p53 baltymo raišką, tuomet E6 baltymo gebėjimas reguliuoti p53 baltymo kiekį ir palaikyti mitozinį aktyvumą yra itin svarbus (Klein ir kt., 2007).

L1 ir L2 baltymai formuoja virusinę kapsidę. L1 baltymas svarbus kapsidės jungimuisi su ląstelės paviršiaus receptoriais bei kovai su imuniniu atsaku. L2 baltymas atsakingas už viriono jungimąsi su šeimininko ląstelės receptoriumi, dalyvauja virusinės DNR pristatyme į replikacijos centrą (Scheurer ir kt., 2005).

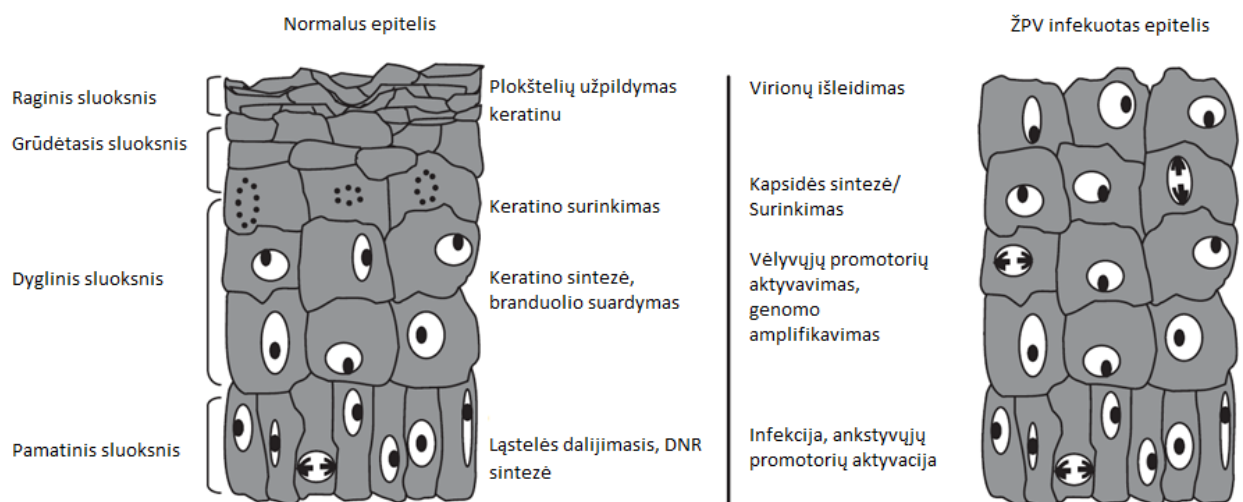
1.5. Virusų infekcijos ciklas

Viruso patekimo į šeimininko ląstelę mechanizmas yra gana painus ir iki šiol pilnai nepaaiškintas. Manoma, kad be įvairių keratinocito paviršiuje esančių receptorių svarbus vaidmuo tenka heparano sulfatui, esančiam pamatinės membranos paviršiuje. Teigiama, jog būtent jis palengvina ŽPV dalelės patekimą į ląstelę (Ramirez-Fort ir kt., 2014). Modelinėmis sistemomis pademonstruota, jog viruso patekimui į ląstelę prireikia apytiksliai 1 – 3 dienų (Knipe ir kt., 2013). Endocitozės būdu patekęs į ląstelės vidų, virusas migruoja branduolio link, vėlyvojoje endosomoje suardoma viruso kapsidė ir laisva viruso genetinė medžiaga, lydimą struktūrinio baltymo L2, migruoja į infekuotos ląstelės branduolį (Allen ir kt., 2010).

Branduolyje pradedamas episominėje formoje esančios virusinės DNR replikacijos procesas. Replikacijai reikalingas transkripcijos baltymas E1, kuris formuodamas heksamerą jungiasi su ATPaze ir dėl savo helikazinių savybių yra nepakeičiamas veiksnys DNR replikacijos iniciacijai. Produktiviai E1 baltymo veiklai taip pat svarbus E2 baltymas, palaikantis E1 baltymo susijungimą su viruso DNR. Virusas egzistuoja latentinėje infekcijos stadijoje, infekuotoje ląstelėje palaikomas gana žemas viruso genomo kopijų skaičius, vidutiniškai 20 – 50. Procesu metu infekuotose parabazalinio sluoksnio ląstelėse vykdoma ankstyvųjų baltymų raiška (E1, E2, E6 ir E7). Dalinantis infekuotai ląstelei episominės viruso DNR kopijos pastoviu kiekiu perduodamos kiekvienai dukterinei ląstelei, mažoji dukterinių ląstelių dalis nesidiferencijuoja, lieka tame pačiame epitelio sluoksnyje. Dauguma apatiniuose epitelio sluoksniuose esančių ląstelių diferencijuoja ir kyla epiteliu aukštyn, kur bus vykdoma intensyvesnė viruso DNR amplifikacija (2-as paveikslas).

Diferencijuotoje, epitelio kylančioje ląstelėje prarandamas mitozinis aktyvumas, nebesintetiniami viruso DNR replikacijai būtini fermentai ir substratai (Klein ir kt., 2007). Tuomet keičiasi genų raiška, aktyvuojamas vėlyvasis promotorius, atsakingas už padidintą E1, E2, E4, E5 baltymų raišką ir sukuriamas naujas replikacijos mechanizmas, reikalingas produktyvios fazės palaikymui ir viruso DNR sintezei (Hebner ir kt., 2006). Aukštesniuose epitelio sluoksniuose vegetatyvinio gyvenimo ciklo metu svarbus onkogeninis E5 viruso baltymas, kuris apsaugo endosomas nuo rūgštėjimo, reguliuoja epidermio augimo faktorius ir palaiko replikacijai reikalingą aplinką (Ramirez-Fort ir kt., 2014). Taip pat vyksta intensyvesnė baltymų E6 ir E7, kurie blokuoja supresinius auglio augimo baltymus p53 ir pRb, raiška, išlaikomas mitozinis aktyvumas ir vykdoma intensyvi ŽPV genomo amplifikacija. Visa paviršinio sluoksninio epitelio ertmė užsipildo ŽPV turinčiomis ląstelėmis (Ramirez-Fort ir kt., 2014).

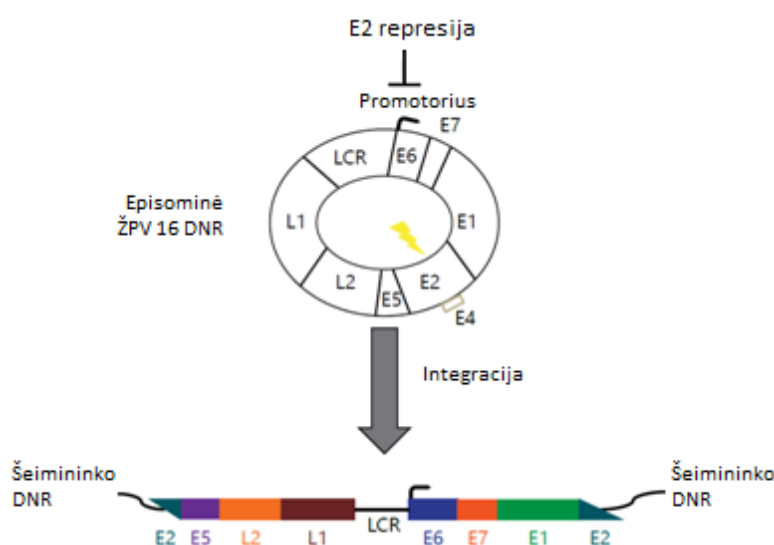
Paskutinioji ląstelės diferenciacijos stadija lemia virusinių promotorių persijungimą (Knipe ir kt., 2013). Virusas nustoja daugintis, toliau aktyvuojama viruso struktūrinių baltymų L1 ir L2 raiška ir vykdomas viruso genomo supakavimas į naujai suformuotą kapsidę (Ramirez-Fort ir kt., 2014). Remiantis viena naujesnių hipotezių, viriono išleidimas siejamas su E4 baltymu. Manoma, jog viršutiniuose epitelio sluoksniuose šis baltymas suardo keratino struktūrą ir trukdo tinkamam raginio sluoksnio surinkimui (Ramirez-Fort ir kt., 2014). Virusinio ciklo pabaigoje į kapsides supakuoti virusai išnešami į apikalinį epitelio paviršių ir išleidžiami iš ląstelės.



2 pav. Epitelio ląstelių diferenciacijos skirtumai normalaus ir ŽPV infekuoto epitelio atvejais (Hebner ir Laimins, 2006).

1.6. ŽPV integracija į šeimininko genomą

Vienas iš vėžio atvejų, susijusių su ŽPV infekcija, siejamas su virusinio genomo integracija į šeimininko DNR. Plokščiųjų ląstelių karcinomos (angl. *squamous cell carcinoma*, SCC) atvejais aptikus virusą, ŽPV 16 būna integruotas į šeimininko genomą 50-80% atvejų, o ŽPV 18 – beveik visada (Groves ir Coleman, 2015). Episominės viruso DNR integracija vyksta tik aukštesniuose epitelio sluoksniuose, pilnai diferencijuotose ląstelėse, atsitiktinėse šeimininko DNR srityse.



3 pav. Virusinio genomo integracija į šeimininko DNR (Ramirez-Fort ir kt., 2014).

3-iaame paveiksle vaizduojamas integracijos procesas inicijuojamas viruso genome suardžius E2 baltymo, atsakingo už onkogeninių baltymų E6 ir E7 raišką, atvirą skaitymo rėmelį (Ramirez-Fort ir kt., 2014). Rėmelio suardymas užlaiko onkogeninių baltymų raišką, virusinė DNR integruojama į šeimininko DNR. Galimi įvairūs integracijos variantai integruojant vieną ar, gimdos kaklelio SCC atveju, kelias viruso DNR kopijas (Groves ir Coleman, 2015). Integracijos proceso metu dažnai iškerpami arba suardomi E2 ir L2, taip pat E4 bei E5 virusinių baltymų regionai, tačiau onkogeninių baltymų E6 ir E7 regionai lieka išsaugoti. Linijinėje DNR šių genų transkripcijos nebereguliuoja E2 baltymas, raiška reguliuojama ilgojo kontrolinio regiono promotoriumi (Groves ir Coleman, 2015). Eliminavus nuo E2 priklausančią ankstyvojo promotoriaus transkripciją, didinama E6 ir E7 baltymų raiška, todėl infekcija progresuoja ir inicijuoja ląstelių supiktybėjimą.

1.7. ŽPV sukeltos ligos

Žmogaus papilomos virusas – lytiniu keliu plintanti infekcija, būdinga tiek moters, tiek vyro organizmui. Dažniausiai infekcija nustatoma lytiniuose organuose. Virusui patekus į organizmą, net 90% infekcijos atvejų šeimininko imuninė sistema pati susitvarko su virusu. Įvairių tyrimų duomenimis, priklausomai nuo tipo, organizmui išsivalyti vidutiniškai prireikia 8 – 16 mėnesių nuo aukštos rizikos ŽPV tipų ir 4 – 8 mėnesių nuo žemos rizikos viruso tipų (Giuliano ir kt., 2002; Brown ir kt., 2005). Tačiau per daugelį metų virusas tapo evoliuciškai prisitaikęs ir gebantis apeiti šeimininko imuninę sistemą.

Infekuodamas epitelio ląsteles, ŽPV sukelia mažas pažaidas ir išvengia priešūždegiminio organizmo atsako. Virusas neinfekuoja ir nesidaugina epitelijoje esančiose antigeną pristatančiose ląstelėse (angl. *Antigen-presenting cell*, APC), nesukelia infekuotos ląstelės lizės, taigi APC negali apgaubti virionų ir pristatyti jų kilmės antigenų šeimininko imuninei sistemai. Taip pat, ankstyvųjų virusinių baltymų sintezė vykdoma epitelio ląstelės branduolyje, kuris yra sunkiai pasiekiamas šeimininko imuninei sistemai, o paskutiniąją infekcinio ciklo stadiją – imunogeninių požymių turinčios kapsidės surinkimas – vyksta tik pilnai diferencijuotuose keratinocituose. Taip virusas išvengia Langerhanso ląstelių, esančių proksimalinėje (esančio arčiau pamatinės membranos) epitelio dalyje, atsako. Atliekant tyrimus surenkama vis daugiau informacijos, jog viruso koduojami baltymai gali tiesiogiai trukdyti šeimininko imuniniam atsakui (Tindle, 2002; Klein ir kt., 2007).

Vykstant pilnam infekcijos ciklui, priklausomai nuo viruso tipo, ŽPV gali sukelti įvairius epitelio bei gleivinės sluoksnio pakitimus, nepiktybines papilomas bei karpas ar tapti vėžinio susirgimo priežastimi. Žmogaus organizme ŽPV infekcija identifikuojama kaip kancerogeninis veiksnys šešiams vėžio tipams: gimdos kaklelio, varpos, vulvos, makšties, išangės bei burnos ir ryklės, įskaitant liežuvio bei tonzilių pamatines sritis.

1.7.1. Gimdos kaklelio vėžys

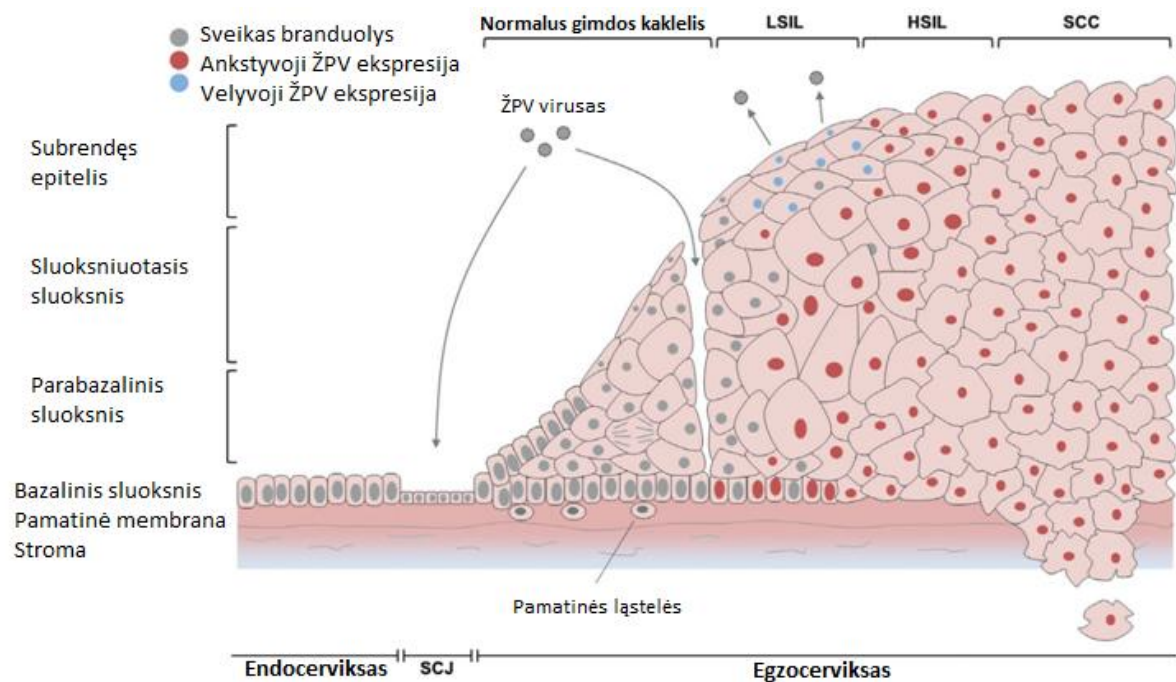
Šiomis dienomis aktualiausia problema laikoma viruso infekcija moters lytiniuose organuose, kadangi 10 – 15% infekcijos atvejų ŽPV infekcija persistuoja ir aukštos rizikos viruso tipas tampa pagrindiniu ano-genitalinių vėžio formų išsivystymo faktoriumi (Groves ir Coleman, 2015). Pavojingiausiu išskiriamas gimdos kaklelio vėžys (GKV), kuris yra ketvirtas dažniausias piktybinis darinys žmogaus organizme, apimantis 12% visų moterų

vėžio atvejų. Net 50% tokio vėžio atvejų kasmet baigiasi mirtimi (Groves ir Coleman, 2015). Paplitimu išsiskiria didžiausiu onkogeniškumu pasižymintis ŽPV 16 tipas, sukeliantis daugiau nei 50% visų gimdos kaklelio vėžio atvejų, antrą vietą užima 18 viruso tipas, sukeliantis apie 15% vėžio atvejų (Clifford ir kt., 2003; Smith ir kt., 2007).

Lietuvoje 2012 m. duomenimis GKV yra trečias pagal dažnumą onkogeninis susirgimas moters organizme, kasmet diagnozuojama apie 615 naujų ligos atvejų. ŽPV paplitimas Lietuvoje yra pirmaujantis tarp Europos valstybių. Tų pačių metų statistinės analizės duomenimis Lietuvoje dažniausiai nustatomas 16 viruso tipas (5,7% normalios gimdos kaklelio citologijos atveju, 6,7% nežymių plokščialąstelių intraepiteliniai pokyčiai atveju (LSIL), 48,3% žymių plokščialąstelių intraepiteliniai pokyčiai atveju (HSIL), 56,5% GKV atveju). Paplitimu pasižymi ir 39, 31 onkogeniniai ŽPV genotipai (Bruni ir kt., 2015).

Gimdos kaklelio vėžys atsiranda kaklelio transformacijos zonoje (TZ), esančioje išorinėje kaklelio sluoksniuotojo epitelio ir vidinės kaklelio ertmės stulpinio epitelio sandūroje. Mikrotraumų metu suardomas pamatinis epitelinis barjeras ir, vykstant gimdos kaklelio gleivinės sluoksnio pokyčiams, sukuriamą palanki aplinka patogenų invazijoms, palankios sąlygos ŽPV infekcijai (Fernandes ir kt., 2013).

Nacionalinio vėžio instituto (angl. *National Cancer Institute*, JAV) nomenklatūroje yra išskiriami du pagrindiniai gimdos kaklelio vėžio tipai: plokščiųjų ląstelių karcinoma (angl. *squamous cell carcinoma*, SCC) ir adenokarcinoma. Didžioji dalis (80-90%) vėžio atvejų vystosi plokščiosiose ląstelėse iš prekursorinių darinių, klasifikuojamų į tris displazijos arba intraepitelinės gimdos kaklelio neoplazijos (CIN) atvejus (CIN1,2,3). Neoplazija, dar vadinama displazija, – sutrikęs epitelio augimas ir raida. Proceso metu padidėja pamatinio sluoksnio aktyvumas, tačiau patologinis procesas nepereina už epitelio pamatinės membranos ribų (Groves ir Coleman, 2015). ŽPV infekcija sukelia laipsnines neoplazijas, kurios pagal stiprumą skirstomos į nedidelio (CIN1), vidutinio (CIN2) ir didelio laipsnio neoplazijas (CIN3). CIN3 paprastai progresuoja į invazinį gimdos kaklelio vėžį (Ostor ir kt., 1993). Šis skirstymas atitinka naujesnę Bethesdos sistemą, turinčią du pagrindinius ranginius vienetus: LSIL ir HSIL. Nežymūs plokščialąsteliniai intraepiteliniai pokyčiai (LSIL) atitinka CIN1, žymūs plokščialąsteliniai intraepiteliniai pokyčiai (HSIL) - CIN2,3 ir *carcinoma in situ*. Plokščiųjų ląstelių karcinoma progresuoja ląstelėms prasiskverbus pro pamatinę epitelio membraną ir infekavus po ja esančią stromą, procesas pateiktas 4-ame paveiksle.



4 pav. ŽPV infekcijos sukeltas neoplazijos procesas gimdos kaklelio epitelyje (Groves ir Coleman, 2015).

1.7.1.1. Gimdos kaklelio vėžio rizikos veiksniai

Pagrindiniu rizikos veiksniu gimdos kaklelio vėžiui laikoma ŽPV infekcija, nustatoma 99-100% vėžio atveju (Frazer, 2004). Aukštos rizikos ŽPV tipų sukeltos infekcijos progresavimą iki vėžio spartina ir rizikos faktoriais taip pat laikomi hormoninių kontraceptinių preparatų vartojimas, gimdymų skaičius, lytinių partnerių skaičius, rūkymas, ankstyva lytinio gyvenimo pradžia (Castellsague ir kt., 2006).

Kontraceptinių preparatų vartojimas laikomas vienu svarbiausiu rizikos veiksnių. Dalis tyrimų šią sąsają aiškina asociacija su didesniu lytinių partnerių skaičiumi bei barjerinių preparatų (prezervatyvų) nenaudojimu, ko pasekoje padidėja rizika užsikrėsti ŽPV (Gadducci ir kt., 2011). Tačiau kaip rodo detalesni tyrimai, kontraceptiniai preparatai gali turėti ir tiesioginę įtaką padidėjusiai GKV rizikai organizme sukeldami hormonų kiekio padidėjimą (Gariglio ir kt., 2009). Sudėtinių kontraceptinių tablečių (SKT) sudėtis pagrįsta hormonų estrogenų ir progestinų santykio bei dozės variacijomis. TZ zonoje, kurioje ir vystosi vėžiniai navikai, palyginus su normaliu sluoksniuotuoju epiteliu yra daugiau estrogeno bei testosterono receptorinių ląstelių. TZ zona estrogeno hormonams yra pati jautriausia gimdos kaklelio vieta. Estrogenas stimuliuoja onkogeninių viruso baltymų (E6, E7) raišką, skatina ląstelių proliferaciją, stabdo apoptozę, hormonų metabolitai sukelia DNR pažeidimus (Gariglio ir

kt., 2009). Įvairūs tyrimai rodo, jog ilgalaikis (>5 m.) kontraceptinių preparatų (SKT) vartojimas ŽPV teigiamu atveju gimdos kaklelio riziką padidina iki 4 kartų (Castellsague ir kt., 2002; Luhn ir kt., 2013).

Gimdymų skaičius taip pat asocijuojamas su padidėjusia rizika, kadangi nėštumo metu didėja plokščiųjų ląstelių skaičius transformacijos zonoje (Munoz ir kt., 2002; Gariglio ir kt., 2009). Nėštumo metu vykstantys hormoninio balanso pokyčiai motinos organizme (estrogeno ir progesterono kiekio padidėjimas) gali atsiliepti imuniniam atsakui į aukštos rizikos ŽPV tipą, padidinti infekcijos persistavimą ar spartinti progresavimą. Tyrimų duomenimis nėštumų ir gimdymų skaičius tiesiogiai koreliuoja su didėjančia gimdos kaklelio vėžio rizika. (Munoz ir kt., 2002; Castellsague ir kt., 2006). Lyginant nėštumo neturėjusias moteris su 2-4 kartus gimdžiusiomis, rizika padidėja 2-3 kartus, lyginant negimdžiusias su >7 gimdymus turėjusiomis moterimis, rizika išauga iki 3-4 kartų. (Munoz ir kt., 2002).

Rūkymo poveikio vertinimas, pagrįstas populiaciniais tyrimais, rodo, jog ŽPV infekcija 2-5 kartus dažnesnė rūkančių ar praeityje rūkiusių moterų tarpe, lyginant su nerūkančiomis (Gariglio ir kt., 2009; Holland, 2015). Rūkančių moterų organizmui išsivalyti nuo ŽPV prireikia daugiau laiko (Fonseca-Moutinho, 2011; Holland, 2015), rūkymas taip pat didina ŽPV persistencijos riziką (Gadducci ir kt., 2011). Ryšys aiškinamas tabako sudėtyje esančių kancerogeninių medžiagų (pvz. nitrozaminų), alkilinančių DNR grandinę, tiesioginiu poveikiu kancerogenezei procesui (Gariglio ir kt., 2009). Kituose tyrimuose teigiama, jog rūkymas skatina kancerogenezę blokuodamas ląstelinį imunitetą prieš ŽPV infekciją (Gadducci ir kt., 2011).

1.7.2. ŽPV sąsajos su galvos ir kaklo vėžiu

Galvos ir kaklo plokščiųjų epitelio ląstelių karcinomų (angl. *head and neck squamous cell carcinoma*, HNSCC) grupei priskiriamos burnos ertmės, nosiaryklės, burninės ryklės, gerklų ir gerklinės ryklės karcinomos. HNSCC grupei priklauso 3-4% visų Šiaurės Amerikoje bei Europoje diagnozuojamų vėžio atvejų, tai šeštas pagal dažnumą piktybinis auglys žmogaus organizme (Zandberg ir kt., 2013). HNSCC vėžys diagnozuojamas jau kiek daugiau nei 60 metų, per kuriuos piktybinių navikų susidarymo atvejų burnos ertmėje ir burninėje ryklėje jaunų asmenų tarpe (<40 m.) nuolat didėja (Salem, 2010). ŽPV virusas bendrai aptinkamas 23-35% visų HNSCC grupės biopsijų, dauguma ŽPV teigiamų vėžio atvejų kyla iš burninės ryklės, kur ŽPV fiksuojamas net 45-90% paplitimu, dažniausiai

tonzilių, pamatinėje liežuvio ertmėje (Zandberg ir kt., 2013). Platesni sisteminiai apžvalginiai tyrimai rodo, jog ŽPV DNR paplitimas galvos ir kaklo vėžinių susirgimų atveju yra didesnis burninės ryklės (36%) nei burnos ertmės (24%) ar gerklų (24%) plokščiųjų ląstelių karcinomose (Kreimer ir kt., 2005).

Su ŽPV susijusio vėžinio darinio formavimasis galvos ir kaklo ertmėje yra artimas gimdos kaklelyje vykstančiam onkogeniniam procesui (Salem, 2010). Augliuose dažniausiai aptinkamas tas pats ŽPV 16 viruso tipas, randamas 68-87% paplitimu, taip pat fiksuojami ŽPV 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52, 56, 58, 59 ir 68 tipai (Zandberg ir kt., 2013). Burnos ertmės plokščiųjų ląstelių (angl. *oral cavity squamous cell carcinoma*, OCSCC) vėžio atveju ŽPV aptinkamas vidutiniškai 16-17% paplitimu (Mirghani ir kt., 2015). ŽPV infekcija burnoje taip pat išsiskiria ryškiu paplitimo skirtumu tarp vyrų ir moterų, vyrų populiacijoje aptinkama apie 3 kartus dažniau nei moterų (Zandberg ir kt., 2013; Euromap 2014, Giuliano ir kt., 2015).

Pagrindiniais rizikos faktoriais galvos ir kaklo vėžio atveju laikomi rūkymas bei suvartojamo alkoholio kiekis, tačiau didėjančiam ŽPV infekcijos plitimui burnos ertmėje vis svarbesniu rizikos faktoriumi laikomas oralinio lytinio akto propagavimas. Tyrimų duomenimis bendras galvos ir kaklo vėžio paplitimas pastaraisiais dešimtmečiais mažėja, tačiau su ŽPV susijusių galvos ir kaklo vėžinių susirgimų procentas didėja (Farsi ir kt., 2015). Paplitimo pokyčiai aiškinami seksualinio elgesio pokyčiais, didėjančiu oralinių lytinių santykių propagavimu.

1.8. Vakcinosis prieš ŽPV

Siekiant išvengti ŽPV infekcijos sukeltų padarinių skatinama vengti rizikos faktorių, alkoholio bei cigarečių vartojimo, svarbiausia vengti atsitiktinių lytinių santykių, propaguoti prezervatyvų naudojimą. Prevencija vykdoma skatinant moteris atlikti citologinį gimdos kaklelio tyrimą (angl. *Papanicolaou (Pap) test*), reikalui esant atlikti tolesnius tyrimus. Tyrimais nustatomi tik jau esami ląstelės pakitimai, todėl norint apsaugoti organizmą nuo infekcijos, buvo sukurtos ir FDA (angl. *U.S. Food and Drugs Administration*) patvirtintos trys profilaktinės vakcinos. Keturvalentė Gardasil[®] vakcina (2006 m.) skirta 10-26 metų amžiaus moterų grupei, imunizuojanti prieš 16, 18, 6 ir 11 ŽPV tipus. Dvivalentė Cervarix[®] vakcina (2009 m.) patvirtinta 10-15 amžiaus moterims, skirta apsaugai nuo 16 ir 18 viruso tipų infekcijos. Naujausia devynvalentė Gardasil 9[®] vakcina (2014 m.) yra pirma vakcina nuo

ŽPV, tinkama tiek moterims (9 - 25 m.), tiek vyrams (9 - 15 m.), skirta prevencijai prieš ŽPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 ir 58 tipus (Bosch ir kt., 2015).

Vakcinų veikimas pagrįstas imuninio atsako iššaukimu prieš viruso antigenų turinčias virusines daleles, atsaką sustiprinant sudėtyje esančiais adjuvantais (Schiller ir kt., 2012). Virusinių dalelių sudėtyje nėra viruso DNR, todėl vakcinos yra saugios ir negali sukelti virusinės infekcijos. Vakcinos sudėtyje esantis atitinkamo viruso tipo L1 baltymas spontaniškai formuoja išorinį ŽPV viruso kapsidės kiautą primenančią virusinę dalelę ir iššaukia organizmo imuninį atsaką (Lehtinen ir Dillner, 2013).

Sukaupus pakankamai statistinės informacijos nuo pirmųjų divalentės ir keturvalentės vakcinų patvirtinimo metų, matomas teigiamas vakcinų poveikis (Lehtinen ir Dillner, 2013). JAV Nacionalinių sveikatos ir mitybos tyrimų apklausų (angl. *National health and nutrition examination surveys*) duomenimis, pradėjus taikyti prevencines vakcinas nuo ŽPV, žymiai sumažėjo ŽPV 6, 11, 16 ir 18 tipų paplitimai, ŽPV paplitimas gimdos kaklelio ertmėje sumažėjo kiek daugiau nei dvigubai, nuo 11,5% (2003 - 2006 m.) iki 5,1% (2007 - 2010 m.) 14-16 m. moterų grupėje (Markowitz ir kt., 2013). Remiantis tyrimų duomenimis, profilaktinė ŽPV vakcina suteikia ilgalaikę, bent 10 metų organizmo apsaugą, tačiau atsižvelgiant į sąlyginai trumpą periodą nuo pirmos ŽPV vakcinos sukūrimo, kol kas sunku tinkamai įvertinti maksimalų vakcinos veiksmingumo laikotarpį (Lehtinen ir Dillner, 2013). Pirmieji duomenys apie naujausios devynvalentės vakcinos veiksmingumą yra daug žadantys, patvirtinantys tokį patį veiksmingumą, kaip ir keturvalentės vakcinos, taip pat net 95% veiksmingumą prieš vakciną papildžiusius aukštos rizikos viruso tipus (Joura ir kt., 2015).

Atkreipus visuomenės dėmesį į galimybę imunizuoti organizmą sukurtomis vakcinomis ir taip išvengti dažniausiai aptinkamų onkogeninių ŽPV viruso tipų sukeltų infekcijos padarinių, skatinant moteris reguliariai tikrintis, būtų galima efektyviai kontroliuoti su ŽPV susijusių susirgimų skaičių (Dahiya ir kt., 2015; Frazer, 2004).

1.9. Metodai taikomi ŽPV aptikimui

Žmogaus papildomos viruso infekcija aptinkama įvariais metodais: mėginyje nustatant viruso DNR, iRNR transkriptus ar intensyviau transliuojamus virusinius E6/E7 baltymus (Allen ir kt., 2010). Gimdos kaklelio mėginiai dažniausiai tikrinami pritaikius virusinės DNR ir RNR aptikimo metodus, taikant įvairias polimerazinės grandininės reakcijos (PGR) metodo technikas. Onkogeniniai baltymai nustatomi hibridizacijos metodais. Burnos,

galvos ir kaklo auglių mėginiai dažniau tikrinami baltymų lygmenyje, taikant imunohistocheminius analizės metodus, pagrįstus baltymo-antikūno sąveikos analize.

1.9.1. ŽPV nustatymas polimerazinės grandininės reakcijos metodu

Taikomoje metodikoje jautrumu išsiskiria polimerazinė grandininė reakcija (PGR) bei jos variacijos. Metodo jautrumas, pagrįstas ieškomos medžiagos DNR padauginimu, sudaro galimybę analizuoti mažu virusinės genetinės medžiagos kiekiu pasižyminčius mėginius. Metodo variacijos, priklausomai nuo parinktų pradmenų, leidžia aptikti konkretų viruso tipą ar bendrą viruso infekciją. Bendros infekcijos nustatymui dažnai naudojami PGMY09/11 bei GP5+/6+ pradmenys, amplifikuojantys L1 virusinio genomo regioną. PGMY09/11 pradmenys sukurti patobulinius MY09/MY11 pradmenų jautrumą bei specifiškumą parinkus nukleotidų rinkinį pagal tą patį L1 jungimosi regioną (Coutlee ir kt., 2002). PGMY09/11 sistema sudaryta iš penkių tiesioginių pradmenų ir trylikos grįžtamųjų pradmenų rinkinio. Tai aštuoniolikos pradmenų mišinys, nustatantis apie 40 aukštos ir žemos rizikos ŽPV tipų. (Gravitt ir kt., 2000). GP5+/GP6+ pradmenys sukurti patobulinius pirminius GP5/6 pradmenis, prailginus 3' sekos galą 3-5 nukleotidais, taip pasiektas didesnis pradmenų – taikinio stabilumas bei efektyvesnis amplifikacijos procesas (Jacobs ir kt., 1995). GP5+/GP6+ pradmenys yra komplementarūs viruso L1 geno sekai. Kaip ir PGMY09/11 pradmenimis, jais nustatoma apie 40 ŽPV tipų.

Atvirkštinės transkripcijos kiekybinė PGR (AT-kPGR) plačiai taikoma E6/E7 onkogeninių viruso baltymų iRNR amplifikacijai ir aptikimui. Metodas yra aukšto jautrumo, leidžia nustatyti ne tik bendrą virusinę infekciją, tačiau ir jos kiekį, amplifikuotų kopijų skaičių (Allen ir kt., 2010).

1.9.2. Kiti metodai ŽPV nustatymui

In situ hibridizacijos (ISH) metodas, priklausomai nuo parinkto komplementaraus zondo, gali būti taikomas tiek viruso DNR, tiek onkogeninių baltymų iRNR aptikimui. Infekcijos nustatymui taip pat taikomas nukleorūgščių hibridizacijos metodas naudojant įvairius specifiskus zondus, aptinkančius bendrą infekciją arba tam tikrą viruso DNR fragmentą. Imunocheminė baltymų analizė taikoma mėginius tikrinant baltymų lygmenyje, dažniausiai E6/E7 virusinių baltymų nustatymui. Metodo specifiškumą užtikrina

taikiniams specifinių antikūnų naudojimas. Kolorimetrinės reakcijos metu vizualiai stebimi pokyčiai, nustatomi ieškomi baltymai bei įvertinama jų lokalizacija ląstelėje. Metodas dažnai taikomas siekiant įvertinti ŽPV teigiamuose vėžiniuose audiniuose intensyvia raiška pasižyminčio p16 baltymo kiekį (McCance, 2002; Allen ir kt., 2010).

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Medžiagos

25 mM MgCl₂ (Thermo Fisher Scientific Baltics, Lietuva)

Agarozė (Thermo Fisher Scientific Baltics, Lietuva)

Vanduo be nukleazių (H₂O) (Thermo Fisher Scientific Baltics, Lietuva)

Betainas (Fluka, Vokietija)

dATP, dTTP, dGTP, dCTP, dUTP (Thermo Fisher Scientific Baltics, Lietuva)

DNR molekulinės masės standartai – O'GeneRuler™ Low Range, O'GeneRuler™ 50 bp Etidžio bromidas (ROTH, Vokietija)

Hot Start PGR buferinis tirpalas (10x) (Thermo Fisher Scientific Baltics, Lietuva)

Jaučio serumo albuminas (BSA) (Thermo Fisher Scientific Baltics, Lietuva)

Ksilencianolis (Sigma, Vokietija)

Maxima™ Hot Start Green PGR buferinis tirpalas (5x) (Thermo Fisher Scientific Baltics, Lietuva)

Maxima™ Hot Start *Taq* DNR polimerazė (Thermo Fisher Scientific Baltics, Lietuva)

Proteinazė K (20 mg/ml) (Thermo Fisher Scientific Baltics, Lietuva)

RNazė A (10 mg/ml) (Thermo Fisher Scientific Baltics, Lietuva)

TAE (Tris-acetate-EDTA) buferinis tirpalas (Thermo Fisher Scientific Baltics, Lietuva)

Tartrazinas (Sigma, Vokietija)

Uracil – DNR glikozilazė (Thermo Fisher Scientific Baltics, Lietuva)

2.1.1. Rinkiniai

GeneJet™ Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific Baltics, Lietuva) ir MagJET Genomic DNA Kit komercinis rinkinys (Thermo Fisher Scientific Baltics, Lietuva).

2.1.2. Pradmenų sistemos

Bendrą ŽPV infekciją nustatančių PGR sistemų pradmenys pateikti 1-oje lentelėje. Naudotos GP5+/GP6+ ir PGMY09/11 sistemos detalčiau aprašytos 1.9.1. skyrelyje. HR_HPВ sistema buvo naujai sukurta bendradarbiaujant UAB „Thermo Fisher Scientific Baltics“ ir VU Biotechnologijos institutui, vykdant LMT finansuojamą projektą „ŽPV diagnostika“ (2009-2011). Šioje sistemoje naudojama 19 pradmenų, su kuriais aptinkama 16 aukštos rizikos ŽPV tipų (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 66, 73, 82) bei jų variantai (Simanaviciene ir kt., 2014). PGR sistemų vidinei kontrolei naudoti žmogaus β -globino geno (β -gloF; β -gloR) ir prostatos specifinio geno 5 egzono pradmenys (IC 435; IC 1238).

1 lentelė. Bendrą ŽPV infekciją nustatančių PGR sistemų pradmenys.

Pradmenų sistema	Amplifikuojama ŽPV geno seka	PGR produkto ilgis (bp)	Pradmenų skaičius reakcijos mišinyje
GP5+/GP6+	L1	150	2
PGMY09/11	L1	450	18
HR_HPВ	L1	400-430	19

Dauginėse genotipavimo PGR sistemose naudojama 16 pradmenų porų, nustatančių 16 aukštos rizikos ŽPV tipų. Pasirinkti pradmenys sugrupuoti į keturias PGR sistemas: MM1, MM2, MM3 ir MM4. Kiekviena sistema nustatomi ŽPV tipai pateikti 2-oje lentelėje.

2 lentelė. Dauginėmis PGR sistemomis nustatomi ŽPV tipai.

PGR sistema	Nustatomi ŽPV tipai
ŽPV-MM-1	16, 18, 39, 58
ŽPV-MM-2	52, 33, 56, 31
ŽPV-MM-3	35, 68, 59, 45
ŽPV-MM-4	66, 51, 73, 82

2.1.3. Teigiamos kontrolės

Bendrą ŽPV infekciją nustatančių PGR reakcijų metu kaip teigiama kontrolė buvo naudojama išgryninta HeLa ląstelių DNR, kuriose integruotas 18 ŽPV tipas (HeLa ląstelės auginamos ir DNR išskiriama VU Biotechnologijos instituto Imunologijos ir ląstelės

biologijos skyriuje). Kaip teigiama dauginių PGR sistemų kontrolė buvo naudojama λ DNR su įterptomis atitinkamų genotipų DNR sekomis (gauta iš UAB „Thermo Fisher Scientific Baltics“, Lietuva).

2.1.4. Klinikiniai mėginiai

Klinikiniai urogenitalinių nuograndų ir burnos epitelio mėginiai surinkti iš atsitiktinių moterų, atėjusių ginekologo konsultacijai į Lietuvos sveikatos mokslų universitetą (LSMU), taip pat moterų, dalyvavusių LSMU Endokrinologijos institute vykdomame tyrime „Hormoninės kontracepcijos poveikis metaboliniams, androgenų koncentracijos, kraujo krešumo parametrų, psichologiniams bei seksualinės funkcijos pokyčiams moters organizme“. Tyrime dalyvavo sveikos moterys (18-40 metų amžiaus), nesergančios gretutinėmis ligomis: lėtinėmis neinfekcinėmis ligomis ir lėtinėmis arba ūminėmis infekcinėmis ligomis. Moterys kreipėsi ginekologo konsultacijai dėl kontracepcijos metodo pasirinkimo ar profilaktiniam patikrinimui. Tiriamosios užpildė „Bendrąsias moterų anketas“. Visos moterys suskirstytos į atskiras grupes: sudėtines kontraceptines tabletes (SKT) vartojančios moterys (6 mėnesius), sudėtinių kontraceptinių tablečių nevartojančios moterys (6 ir daugiau mėnesių) (SKT-kontrolinė grupė) ir atsitiktinės moterys, atėjusios ginekologo konsultacijai. Moterų urogenitalinių nuograndų ir burnos epitelio mėginiai surinkti iš tų pačių moterų. Vyrų burnos epitelio ląstelių mėginiai rinkti iš atsitiktinių asmenų (18-40 metų amžiaus), pakviestų dalyvauti tyrime.

Tyrime dalyvavę asmenys pasirašė „Asmens informavimo“ ir „Informuoto asmens sutikimo formas“. Mėginiai surinkti gavus patvirtintą Kauno regioninio biomedicinos tyrimų etikos komiteto leidimą atlikti biomedicininį tyrimą (2013-02-11, Nr.B-2-14).

Urogenitalinių nuograndų mėginiai rinkti šluotele, imant gimdos kaklelio sienelių plokščiojo epitelio ląsteles. Mėginiai rinkti į SurePath terpę (BD Bioscience, JAV). Burnos epitelio mėginiai rinkti šepetėliu imant burnos plokščiojo epitelio ląsteles, mėginiai rinkti į Cymol terpę (Copan, Italija).

2.2. Įranga

DNR elektroforezės aparatai (Cleaver, UK; Sigma, UK)

Mėgintuvėlių maišyklė (VortexGenie, JAV)

Mini centrifuga (Eppendorf, Vokietija)
 Purtyklė (Certomat, Prancūzija)
 Šaldytuvai -20 °C, +4 °C
 Spektrofotometras NanoDrop (Thermo Scientific, JAV)
 Svarstyklės (Ohaus Scout Pro, JAV)
 Termocikleris (Applied Biosystems, JAV; Biometra, Vokietija)
 Termomikseris (Eppendorf, Vokietija)
 Termostatas (Mettler, Vokietija)
 Transiliuminatorius (ULTRA-LUM, JAV)
 Vienkanaliai dozatoriai 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl, 10000 µl (Eppendorf, Vokietija; Gilson, JAV; Rainin, JAV)
 Vienkartiniai antgaliai dozatoriams 200 µl, 1 ml, 10 ml (Nerbe Plus, Vokietija)
 Vienkartiniai antgaliai su filtrais dozatoriams 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl (StarLab, Vokietija)
 Elektros šaltinis elektroforezei (Biometra, Vokietija);
 Mėgintuvėlių šildymo įrenginys (Hettich, Vokietija);
 Centrifūga 4524R (Eppendorf, Vokietija)
 Laminarinis boksas „MSC-Advantage™“ (Thermo Scientific)
 J2-6 centrifuga (Beckman, JAV)
 J2-21 centrifuga, JA-14 (Beckman, JAV)
 Plastikiniai plonasieniai PGR mėgintuvėliai 0,1 ml, 0,2 ml, 0,5 ml (Corbett Research, Vokietija; Nerbe Plus, Vokietija; BrandTech, UK)
 Plastikiniai mėgintuvėliai 1,5 ml, 2 ml (Eppendorf, Vokietija)

2.3. Tyrimo metodai

2.3.1. DNR išskyrimas

DNR iš burnos epitelio ląstelių mėginių išskyrimui naudotas komercinis „GeneJet™ Genomic DNA Purification Kit“ (Thermo Fisher Scientific Baltics, Lietuva) rinkinys. Urogenitalinių nuograndų mėginių gryninimui naudotas „MagJET Genomic DNA Kit“ komercinis rinkinys (Thermo Fisher Scientific Baltics, Lietuva). Gryninimas atliekamas pagal gamintojo pateiktas rekomendacijas.

2.3.2. DNR koncentracijos nustatymas

Išgrynintos DNR koncentracija ir grynumas matuojamas NanoDrop (Thermo Scientific, JAV) spektrofotometru. Matavimo kontrolei naudojamas sterilus vanduo. Ant kiuvetės užlašinami 1 µl mėginio, pasirinkus 260 ir 280 nm bangos ilgį matuojamas sugerties intensyvumas. Integruota kompiuterinė programa pateikia DNR koncentraciją (ng/µl) bei sugerties intensyvumo santykį esant pasirinktiems bangos ilgiams.

2.3.3. Polimerazinė grandininė reakcija (PGR)

Amplifikacijos mišinių komponentai: Hot Start PGR buferinis tirpalas, Maxima™ Hot Start Green PGR buferinis tirpalas, MgCl₂, dNTP/dUTP tirpalas, Maxima™ Hot Start DNR polimerazė, Uracil DNR glikozilazė, BSA, betainas, ksilencianolis, tartrazinas, atitinkamų sistemų pradmenys (GP5+/GP6+, PGMY09/11, HR_HPV) ir distiliuotas vanduo iki galutinio bendro 25 µl mėginio tūrio. Vidinei PGR kontrolei naudojama žmogaus β-globino genas (β-gloF; β-gloR) ir prostatos specifinio geno 5 egzonas (IC 435; IC 1238). Komponentų koncentracijos atskiroms sistemoms pateikti 3-ioje lentelėje. Teigiamai kontrolei naudojama išgryninta 18 ŽPV tipų turinčių HeLa ląstelių DNR. Tikrinant klinikinius mėginius naudojama 3 µl išgrynintos DNR tirpalo ir 22 µl PGR sistemos mišinio. Reakcija vykdoma „Applied Biosystems” DNR amplifikatoriuje pagal pasirinktas optimalias sąlygas, pateiktas 4 – 6 lentelėse. PGR reakcijos produktai analizuojami 1,5% agarozės gelyje, panaudojant O‘GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific Baltics, Lietuva).

3 lentelė. PGR sistemų komponentų kiekiai ir koncentracijos.

Reagentas	PGR sistema		
	PGMY09/11	GP5+/6+	HR ŽPV
	Reagento koncentracija	Reagento koncentracija	Reagento koncentracija
Maxima™ Hot start buferis (10x)	-	1x	1x
Maxima™ Hot Start Green PCR buffer (5x)	1x	-	-
MgCl ₂ (25mM)	-	3 mM	3 mM
dNTP/dUTP (2mM)	0,2 mM	0,2 mM	0,2 mM
Uracil DNR glikozilazė (1 v/μl)	0,01 v/μl	0,01 v/μl	0,01 v/μl
Hot Start polimerazė (5 v/μl)	2 v/μl	1 v/μl	1,25 v/μl
Pradmuo (gp6rev) (10 μM)	-	0,5 μM	-
Pradmuo (gp5forw) (10 μM)	-	0,5 μM	-
HR HPV pradmenų mišinys (5 μM)	-	-	0,3 μM
PGMY09/11 pradmenų mišinys (1 μM)	1,5 pmol/μl	-	-
β -gloF (10 μM)	-	0,3 mM	0,1 μM
β -gloR ₁ (10 μM)	-	0,3 mM	-
β -glo R ₂ (10 μM)	-	-	0,1 μM
IC (435) (10 μM)	0,1 mM	-	-
IC (1238) (10 μM)	0,1 mM	-	-
BSA (20 mg/ml)	1 μg	5 μg	7,5 μg
Ksilencianolis 0,4%	-	0,004%	0,004%
Tartrazinas 2%	-	0,03%	0,03%

4 lentelė. PGMY09/11 sistemos vykdymo sąlygos.

Nr.	Etapas	Temperatūra, °C	Trukmė, min	Ciklų skaičius
1.	Kryžminių reakcijų prevencija	50	2	1
2.	Hot Start Taq polimerazės aktyvacija	95	7	1
3.	Denatūracija	95	0,5	40
4.	Pradmenų prilydymas	55	0,5	
5.	DNR amplifikacija	72	0,5	
6.	Papildoma DNR amplifikacija	74	2	1

5 lentelė. GP5+/GP6+ sistemos vykdymo sąlygos.

Nr.	Etapas	Temperatūra, °C	Trukmė, min	Ciklų skaičius
1.	Kryžminių reakcijų prevencija	50	2	1
2.	Hot Start Taq polimerazės aktyvacija	95	6	1
3.	Denatūracija	95	0,5	40
4.	Pradmenų prilydymas	50	1	
5.	DNR amplifikacija	72	0,5	

6 lentelė. HR ŽPV sistemos vykdymo sąlygos.

Nr.	Etapas	Temperatūra, °C	Trukmė, min	Ciklų skaičius
1.	Kryžminių reakcijų prevencija	50	2	1
2.	Hot Start Taq polimerazės aktyvacija	95	7	1
3.	Denatūracija	95	0,5	5
4.	Pradmenų prilydymas	60	0,5	
5.	DNR amplifikacija	72	1	
6.	Denatūracija	95	0,5	5
7.	Pradmenų prilydymas	55	0,5	
8.	DNR amplifikacija	72	1	
9.	Denatūracija	95	0,5	5
10.	Pradmenų prilydymas	50	0,5	
11.	DNR amplifikacija	72	1	

2.3.4. Dauginė PGR reakcija

ŽPV viruso genotipui nustatyti naudojamos 4 VU Biotechnologijos institute, Imunologijos ir ląstelės biologijos skyriuje paruoštos dauginės PGR sistemos: MM-1, MM-2, MM-3, MM-4. Sistemoje naudojami pradmenys aptinka šešiolika aukštos rizikos ŽPV viruso tipų. Amplifikacijos mišinio komponentai: Maxima™ Hot Start buferis, dNTP/dUTP, MgCl₂, atitinkamų sistemų pradmenys, Hot Start polimerazė, Uracil DNR glikozilazė, BSA, Betainas, Ksilencianolis, Tartrazinas ir distiliuotas vanduo iki galutinio bendro 25 µl mėginio tūrio (7-a lentelė). Kaip teigiama kontrolė buvo naudojama λ DNR su įterptomis atitinkamų genotipų DNR sekomis. Tikrinant klinikinius mėginius naudojama 3 µl išgrynintos DNR tirpalo ir 22 µl PGR sistemos mišinio. Reakcija vykdoma „Applied Biosystems” DNR amplifikatoriuje pagal pasirinktas optimalias sąlygas (8-a lentelė). PGR reakcijos produktai analizuojami 1,5% agarozės gelyje, panaudojant O‘GeneRuler™ 50 bp DNR žymenį (Thermo Fisher Scientific Baltics, Lietuva).

7 lentelė. Dauginių PGR sistemų komponentų kiekiai ir koncentracijos.

Reagentas	PGR sistema			
	MM1	MM2	MM3	MM4
	Reagento koncentracija	Reagento koncentracija	Reagento koncentracija	Reagento koncentracija
Maxima™ Hot Start buferis (10x)	1x	1x	1x	1x
dNTP/dUTP (2 mM)	0,2 mM	0,2 mM	0,2 mM	0,2 mM
MgCl ₂ (25 mM)	3 mM	3 mM	3 mM	3 mM
Pradmenys (12,5 µM)	0,3 µM	0,3 µM	0,2 µM	0,2 µM
Hot Start polimerazė (5 v/µl)	1,25 v/µl	1,25 v/µl	1,25 v/µl	1,25 v/µl
Uracil DNR glikozilazė (1 v/µl)	0,01 v/µl	0,01 v/µl	0,01 v/µl	0,01 v/µl
BSA (10 mg/ml)	5 µg	5 µg	5µg	5 µg
Betainas (5 M)	-	-	0,5 M	-
Ksilencianolis (0.4%)	0,004%	0,004%	0,004%	0,004%
Tartrazinas (2%)	0,03%	0,03%	0,03%	0,03%

8 lentelė. Dauginių PGR sistemų vykdymo sąlygos.

Nr.	Etapas	Temperatūra, °C	Trukmė, min	Ciklų skaičius
1.	Kryžminių reakcijų prevencija	50	2	1
2.	Hot Start Taq polimerazės aktyvacija	95	7	1
3.	Denatūracija	95	0,5	4
4.	Pradmenų prilydymas	72	0,5	
5.	DNR amplifikacija	72	0,5	
6.	Denatūracija	95	0,5	4
7.	Pradmenų prilydymas	62	0,5	
8.	DNR amplifikacija	72	0,5	
9.	Denatūracija	95	0,5	25
10.	Pradmenų prilydymas	56	0,5	
11.	DNR amplifikacija	72	0,5	
12.	Galutinis grandinės prailginimas	72	5	1

2.3.5. Elektroforezė

Surenkamas elektroforezės rėmelis, paruošiamas 1,5% agarozės tirpalas. Naudojamas TAE buferinis tirpalas. Į sustingusio gelio šulinėlius įnešama 12 µl mėginio. Amplifikacijos produktų ilgio identifikavimui naudojami O'GeneRuler™ 50 bp (Thermo

Fisher Scientific Baltics, Lietuva) ir O'GeneRuler™ Low Range (Thermo Fisher Scientific Baltics, Lietuva) DNR fragmentų ilgio standartai. Elektroforezė vykdoma taikant 10 V/cm įtampą. Geliai analizuojami transiliumatoriaus ("ULTRA-LUM") aparatu, apšvietus 320 nm ilgio UV spinduliais.

2.3.6. Statistinė analizė

Duomenys apdoroti kompiuterinėmis programomis „Microsoft Excell 2010“ ir STATISTICA10 (StatSoft). Taikytas chi-kvadrato (χ^2) testas. Statistiškai reikšmingas skirtumas laikomas kai $p < 0,05$.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Žmogaus papilomos virusas žinomas kaip viena dažniausių lytiniu keliu plintančių infekcijų. Virusui infekuojant epitelio bei gleivinės sluoksnio ląsteles tiek moters, tiek vyro organizme, priklausomai nuo genotipo, sukeliamos įvairios papilomos ar karpas. ŽPV taip pat pripažintas kaip kancerogeninis veiksnys, dažniausiai sukeliantis gimdos kaklelio vėžį. Lietuva pagal ŽPV paplitimą tarp moterų yra viena pirmaujančių valstybių Europoje. ŽPV infekcijos paplitimas tarp sveikų vyrų ir moterų burnos ertmės Lietuvoje nėra iki šiol tirtas. Dėl didelio gimdos kaklelio vėžio sergamumo Lietuvoje yra svarbu ištirti ne tik viruso paplitimą tarp moterų urogenitalinių nuograndų mėginių, bet taip pat ir infekcijos dažnį tarp moterų ir vyrų burnos ertminių. Vėžio išsivystymo tikimybę didina ir tokie rizikos veiksniai kaip sudėtinių kontraceptinių priemonių vartojimas, rūkymas, gimdymų skaičius, todėl svarbu ištirti ir šių veiksnių sąsajas su ŽPV infekcija.

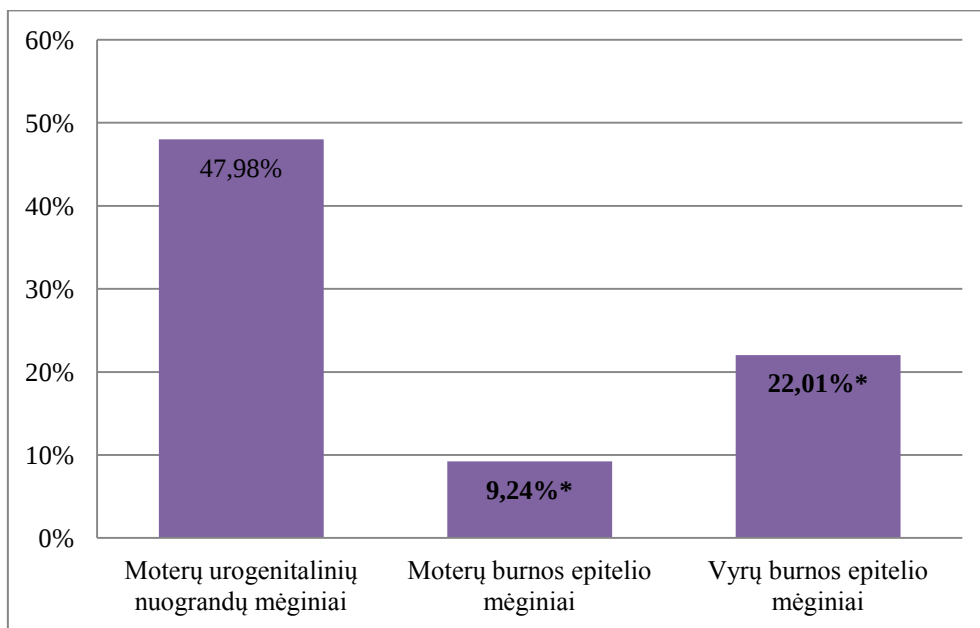
Darbo metu iš viso patikrinti 665 klinikiniai žmogaus mėginiai. Atlikus PGR reakciją, 9 mėginiai nerodė vidinės kontrolės amplifikacijos, todėl į statistinių duomenų analizę nebuvo įtraukti. Tyrime analizuoti 656 mėginiai, suskirstyti į tris pagrindines grupes: moterų urogenitalinių nuograndų mėginiai (N=248), moterų burnos epitelio mėginiai (N=249) ir vyrų burnos epitelio mėginiai (N=159). Moterų urogenitalinių nuograndų bei burnos epitelio mėginiai suskirstyti į: sudėtines kontraceptines tabletes (SKT) vartojančių, sudėtinių kontraceptinių tablečių nevartojančių (SKT kontrolinė grupė) bei į ginekologo konsultaciją atėjusių atsitiktinių moterų pogrupius, duomenys pateikti 1-oje lentelėje.

1 lentelė. ŽPV infekcijos paplitimas tarp tiriamųjų grupių.

			ŽPV infekcijos paplitimas	
Tiriamųjų grupės		N	N	%
Urogenitalinių nuograndų mėginiai	Iš viso	248	119	47,98
	SKT grupė	66	37	56,06
	SKT kontr.	57	18	31,58
	Atsitiktinės	125	64	51,20
Moterų burnos epitelio mėginiai	Iš viso	249	23	9,24
	SKT grupė	67	7	10,45
	SKT kontr.	57	4	7,02
	Atsitiktinės	125	12	9,60
Vyrų burnos epitelio mėginiai	Iš viso	159	35	22,01

3.1. Bendros ŽPV infekcijos nustatymas

Visi mėginiai patikrinti trimis bendrą ŽPV infekciją nustatančiomis sistemomis (PGMY09/11, GP5+/GP6+ ir HR_ŽPV). Mėginys buvo laikomas ŽPV teigiamu viruso DNR aptikus bent vieną iš naudotų PGR sistemų. Bendra viruso infekcija nustatyta 119 (47,98%) urogenitalinių nuograndų mėginiuose, 23 (9,24%) moterų burnos epitelio mėginiuose ir 35 (22,01%) vyrų burnos epitelio mėginiuose (1-as paveikslas).



1 pav. Bendros ŽPV infekcijos paplitimas tarp moterų urogenitalinių nuograndų ir moterų bei vyrų burnos mėginių.

* $p < 0,05$

Tyrime dalyvavusioms moterims nebuvo nustatomi citologiniai gimdos kaklelio pakitimai, todėl negalime išskirti tikslų su žinoma citologine diagnoze grupių. Tačiau nustatytas ŽPV infekcijos (47,98%) dažnis sutampa su anksčiau Lietuvoje darytu tyrimu, kur buvo tiriami intraepiteliniai gimdos kaklelio pokyčių turinčių moterų urogenitalinių nuograndų mėginiai (45,5%) (Gudlevičienė ir kt., 2010).

Tyrime aptikta daugiau ŽPV teigiamų mėginių nei Danijoje įvairia citologija pasižyminčių, profilaktinėje gimdos kaklelio patikroje dalyvaujančių moterų tarpe, kur nustatytas vidutinis 33,4% ŽPV paplitimas (Rebolj ir kt., 2014). Nustatytas ŽPV dažnis (47,98%) viršija ir Estijoje atsitiktinių moterų imtyje nustatytą 36,8% paplitimą (Uuskula ir kt., 2010). Tyrimo metu rastas viruso infekcijos dažnis yra stebėtinai didelis lyginant su paplitimu kaimyninių šalių normalia citologija pasižyminčių moterų tarpe. Latvijoje

infekcijos paplitimas siekia 8,0%, Lenkijoje 14,4%, Baltarusijoje - 23,6 % (Bruni ir kt., 2015).

Vertinant ŽPV infekcijos paplitimą burnos ertmėje, statistiškai reikšmingu skirtumu pasižymi infekcijos paplitimas moterų (9,24%) ir vyrų (22,01%) burnos epitelio mėginiuose ($p < 0,05$). ŽPV infekcijos paplitimas burnos epitelio mėginiuose Lietuvoje nustatomas pirmą kartą, kol kas nėra duomenų, su kuriais būtų galima rezultatus lyginti šalies viduje, tačiau rezultatai rodo, jog vyrai yra statistiškai svarbūs šios virusinės infekcijos plitimui. Pasaulinės sveikatos organizacijos (PSO) 2015 m. duomenimis ŽPV paplitimas sveikų asmenų burnos ertmėje varijuoja priklausomai nuo regiono bei tyrimo metų. Publikuotus Europos valstybių duomenis lyginant su šio tyrimo rezultatais, ŽPV paplitimas Lietuvos vyrų burnos ertmėje (22,01%) yra aukštesnis nei tyrimus pristačiusių valstybių (Suomijoje 18,3%, Italijoje 14,5%, Didžiojoje Britanijoje 3,9%). Tų pačių metų PSO duomenimis, ŽPV dažnis moterų burnos ertmėje Suomijoje (17,2%) ir Italijoje (21,1%) yra didesnis nei Lietuvos moterų (9,24%), tačiau mažesnis Ispanijoje (8,5%).

Bendra tendencija atitinka pateikiamą literatūroje: ŽPV infekcijos paplitimas yra dažnesnis tarp vyrų nei moterų (Sanders ir kt., 2012, Maura ir kt., 2012). Atlikto tyrimo duomenimis infekcijos paplitimas vyrų burnos epitelio mėginiuose (22,01%) yra beveik 2 kartus didesnis nei moterų burnos epitelio mėginiuose (9,24%).

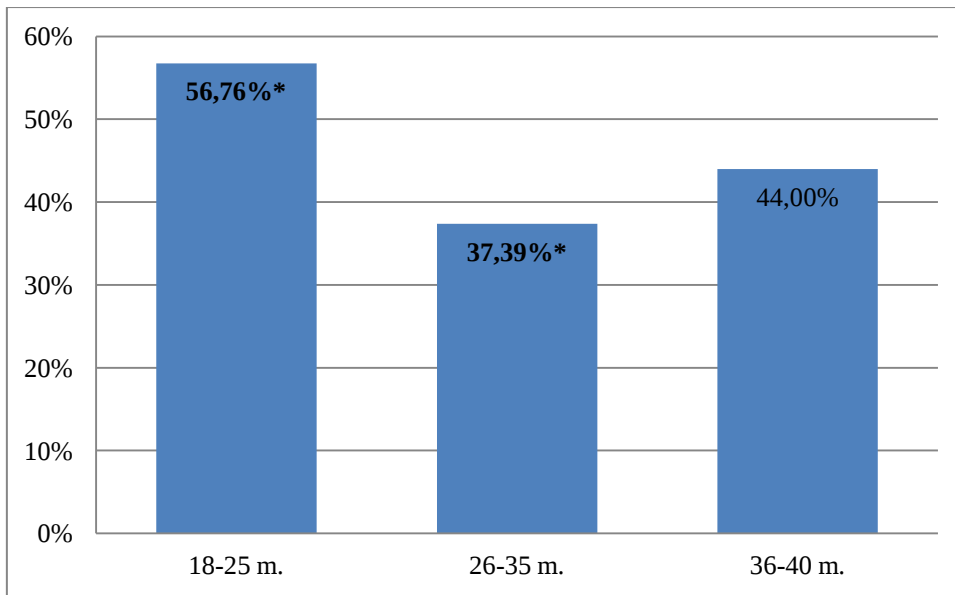
3.2. ŽPV paplitimas įvairiose amžiaus grupėse

Tyrime analizuojant 656 klinikinius žmogaus mėginius, atmetus duomenų apie amžių nepateikusių asmenų mėginius, statistinei analizei pagal amžių įtraukti 636 mėginiai. Atskirose grupėse analizuoti moterų urogenitalinių nuograndų mėginiai ($N=241$), moterų burnos epitelio mėginiai ($N=240$) ir vyrų burnos epitelio mėginiai ($N=155$) (2-a lentelė).

2 lentelė. ŽPV paplitimas pagal asmens amžių.

Amžius	Moterų urogenitalinių nuograndų mėginiai			Moterų burnos epitelio mėginiai			Vyrų burnos epitelio mėginiai		
	N	ŽPV infekcijos paplitimas		N	ŽPV infekcijos paplitimas		N	ŽPV infekcijos paplitimas	
		N	%		N	%		N	%
18	2	2	100,00	2	0	0,00	-	-	-
19	7	5	71,43	7	1	14,29	11	7	63,64
20	8	4	50,00	8	1	12,50	20	5	25,00
21	14	9	64,29	15	1	6,67	19	5	26,32
22	21	10	47,62	21	3	14,29	15	4	26,67
23	15	10	66,67	15	2	13,33	27	2	7,41
24	17	10	58,82	17	4	23,53	11	0	0,00
25	19	9	47,37	18	1	5,56	15	1	6,67
26	34	16	47,06	34	2	5,88	13	5	38,46
27	15	2	13,33	15	0	0,00	2	0	0,00
28	10	6	60,00	10	0	0,00	3	1	33,33
29	7	3	42,86	7	0	0,00	3	0	0,00
30	6	3	50,00	5	0	0,00	5	1	20,00
31	8	2	25,00	8	1	12,50	2	2	100,00
32	10	5	50,00	10	0	0,00	2	0	0,00
33	6	1	16,67	6	1	16,67	4	0	0,00
34	10	3	30,00	10	2	20,00	1	0	0,00
35	7	3	42,86	7	1	14,29	-	-	-
36	5	2	40,00	5	0	0,00	-	-	-
37	11	6	54,55	11	2	18,18	-	-	-
38	1	0	0,00	1	0	0,00	-	-	-
39	7	2	28,57	7	0	0,00	2	2	100,00
40	1	0	0,00	1	0	0,00	-	-	-
Viso	241	113	46,89	240	22	9,17	155	35	22,58

Detaliau analizuojant infekcijos paplitimą, išskirtos trys (18-25 m., 26-35 m., 36-40 m.) amžiaus grupės. Infekcijos paplitimas moterų urogenitalinių nuograndų mėginiuose pagal amžiaus grupę pateiktas 2-ame paveiksle.

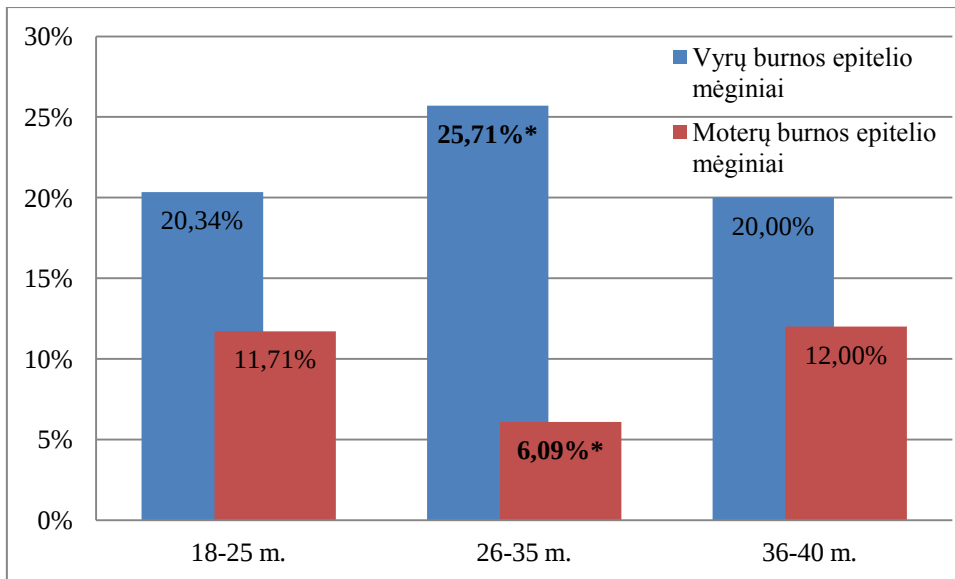


2 pav. ŽPV infekcijos paplitimas urogenitalinių nuograndų mėginiuose skirtingo amžiaus grupėse.

* $p < 0,05$

Statistinės analizės duomenimis infekcijos paplitimas statistiškai reikšmingai skiriasi tarp 18-25 m. ir 26-35 m. amžiaus grupių ($p > 0,05$). Rezultatai taip pat atitinka bendrą literatūroje publikuojamą tendenciją - ŽPV infekcijos paplitimas pasaulyje yra dažnesnis jaunesnių moterų tarpe ir turi tendenciją mažėti; antrasis dažnio padidėjimas fiksuojamas vyresnių, menopauzę turėjusių, moterų tarpe (Monsonogo ir kt., 2004; Bruni ir kt., 2015). Jaunų moterų tarpe (<25 m.) Europos regionas išsiskiria vienu didžiausiu ŽPV infekcijos paplitimu (>23%) pasaulyje (Forman ir kt., 2012). Lyginant nustatytą (56,76%) infekcijos dažnį su Pabaltijo regiono šalimis (Estija ir Latvija), atlikto tyrimo duomenimis ŽPV paplitimas jaunų moterų tarpe didesnis nei Estijoje, kur jis priklausomai nuo amžiaus grupės tarp atsitiktinių moterų varijuoja 44-46% ribose (18-20 m. - 44%, 21-25 m. - 46%) bei Latvijoje, kur paplitimas įvairia citologija pasižyminčių <25 m. amžiaus moterų grupėje siekia 21,6% (Uuskula ir kt., 2010; Bardina ir kt., 2008).

Detaliau analizuojant ŽPV paplitimą Lietuvos vyrų ir moterų burnos ertmėje, infekcijos paplitimas amžiaus grupėse pateiktas 3-iame paveiksle.



3 pav. ŽPV infekcijos paplitimas vyrų ir moterų burnos epitelio mėginiuose skirtingo amžiaus grupėse.

* $p < 0,05$

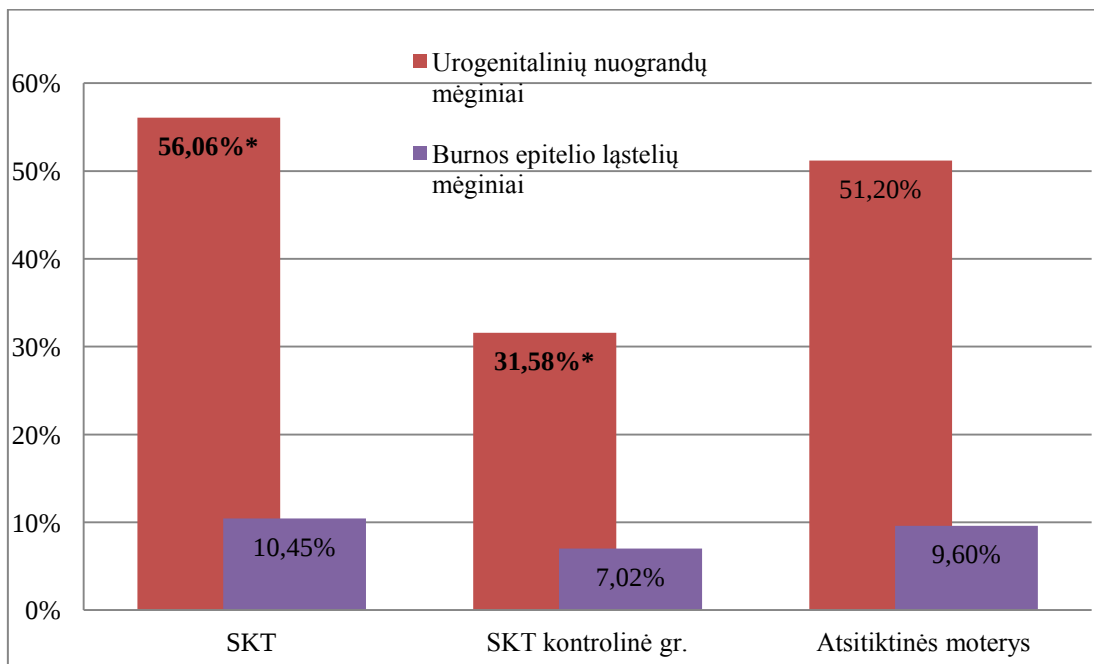
Didžiausiu ŽPV infekcijos paplitimu moterų tarpe nežymiai išsiskiria vyriausioji (36-40 m.) amžiaus grupė (12,00%). Infekcijos paplitimu vyrų tarpe gana dideliu skirtumu išsiskiria vidurinioji (26-35 m.) amžiaus grupė, paplitimas siekia 25,71%. Nustatytas dažnis atskirose amžiaus grupėse viršija didesnius populiacinius tyrimus, kurių duomenimis bendras ŽPV paplitimas sveikų (18–25 m.) vyrų ir moterų tarpe atitinkamai siekia 15,3% ir 7,8% (D’Souza ir kt., 2014). Amerikos populiaciniame tyrime fiksuotas bendras (vyrų ir moterų) ŽPV infekcijos dažnio pikas (7,9%) 30-34m. amžiaus grupėje (Gillison ir kt., 2012).

Statistinės analizės duomenimis infekcijos dažnio pasiskirstymas tarp amžiaus grupių nėra statistiškai reikšmingas nei moterų, nei vyrų grupėse ($P > 0,05$). Tačiau, 26-35 m. amžiaus grupėje ŽPV infekcijos paplitimas tarp vyrų (25,71%) ir moterų (6,09%) yra statistiškai reikšmingas ($p < 0,05$).

3.3. ŽPV infekcijos paplitimo ryšys su kontraceptinių preparatų vartojimu

Vienas iš pagrindinių rizikos veiksnių ŽPV infekcijos paplitimui yra kontraceptinių tablečių vartojimas. PSO duomenimis Lietuva patenka į regioną, kurio valstybėse per burną vartojamų kontraceptinių preparatų paplitimas yra $< 20,5\%$, pagal pateiktą vertinimo skalę ($\leq 2,7\%$; $< 6,6\%$; $< 12,4\%$; $< 20,5\%$; $\geq 25\%$) tai antras dažnumo

procentas. Analizuotas ŽPV infekcijos ryšys su trumpalaikiu (6 mėn.) sudėtinių kontraceptinių preparatų vartojimu Lietuvos moterų tarpe pateiktas 4-ame paveiksle. Urogenitalinių nuograndų mėginiuose kontraceptines tabletes vartojusių moterų grupėje (SKT) ŽPV paplitimas siekia 56,06%, kontraceptinių preparatų nevartojusioje moterų grupėje (SKT kontrolinė grupė) 31,58%, atsitiktinių moterų grupėje infekcijos paplitimas nustatytas 51,20% mėginių.



4 pav. ŽPV infekcijos paplitimas moterų urogenitalinių nuograndų ir burnos epitelio mėginiuose.

* $p < 0,05$

ŽPV paplitimas tarp kontraceptinius preparatus vartojančių ir nevartojančių moterų vertintas apskaičiavus p kriterijų. Bendros infekcijos paplitimas yra statistiškai reikšmingas urogenitalinių nuograndų mėginių grupėje tarp sudėtinius kontraceptinius preparatus vartojusių ir nevartojusių moterų ($p < 0,05$).

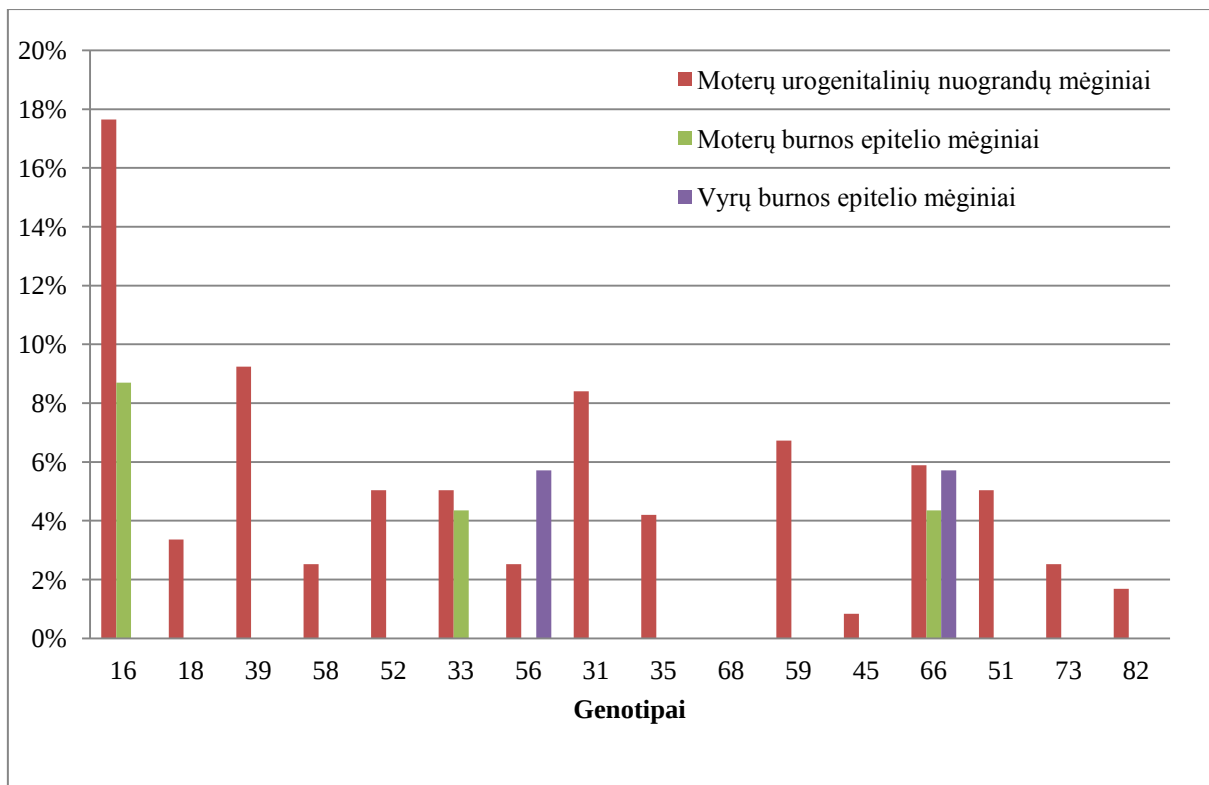
ŽPV paplitimo ryšį su kontraceptinių preparatų vartojimu paaiškina iškelta hipotezė, kad SKT sudaro prielaidas ŽPV onkogeniniam efektui pasireikšti būtent gimdos kaklelio gleivinėje. Kontraceptinių preparatų sudėtyje esančios medžiagos gali prisijungti prie ŽPV DNR ir arba padidinti, arba supresuoti tam tikrų genų transkripciją. Įvairūs tyrimai rodo, kad SKT (o taip pat ir kiti faktoriai, pavyzdžiui rūkymas) gali pagreitinti gimdos kaklelio brendimo procesą, dėl to padidėja ląstelių proliferacija ir galimas didesnis jautrumas virusinei infekcijai. Statistiniais tyrimais buvo parodyta, kad ilgalaikis SKT vartojimas gali lemti

gleivinės pokyčius, todėl sudaromos palankios sąlygos ilgesniam ŽPV persistavimui (Peck ir Norris, 2012).

Literatūroje pateikiami kontroversiški tyrimų duomenys susiję su SKT vartojimu. Nors dalis tyrimų nerodo jokio sąryšio tarp SKT vartojimo ir ŽPV infekcijos dažnio (Green ir kt., 2003), dauguma parodė ilgalaikio (>5-8 m.) kontraceptinių preparatų vartojimo įtaką didėjančiai ŽPV infekcijos paplitimo tendencijai (Castellsague ir kt., 2002; Luhn ir kt., 2013). Tačiau, atlikto tyrimo duomenimis net ir trumpalaikis (6 mėn.) sudėtinių kontraceptinių tablečių vartojimas turi statistiškai reikšmingą poveikį moters organizmui ir tampa svarbiu kriterijumi, didinančiu ŽPV infekcijos riziką gimdos kaklelio ertmėje.

3.4. ŽPV genotipų nustatymas

ŽPV genotipų, ypač – aukštos rizikos, identifikavimas turi svarbią reikšmę ankstyvajai diagnostikai bei ligų prevencijai, todėl visi bendrą ŽPV viruso infekcijos signalą parodę mėginiai (N=177) toliau analizuoti naudojant daugines genotipavimo PGR sistemas (MM-1, MM-2, MM-3, MM-4), nustatančias šešiolika aukštos rizikos ŽPV viruso tipų (16, 18, 39, 58, 52, 33, 56, 31, 35, 68, 59, 45, 66, 51, 73, 82) (5-as paveikslas). Septyniasdešimt viename (71/253) moterų urogenitalinių nuograndų mėginyje įvairiu paplitimo dažniu aptikti 15 viruso genotipų (16, 18, 39, 58, 52, 33, 56, 31, 35, 59, 45, 66, 51, 73, 82). Dviejuose (2/23) moterų burnos epitelio mėginiuose nustatyti trys genotipai (16, 33 ir 66), keturiuose (4/35) vyrų burnos epitelio mėginiuose aptikti du viruso genotipai (56 ir 66).



5 pav. Aukštos rizikos ŽPV genotipų paplitimas tarp tyrimo grupių.

Didžiausiu paplitimu išsiskyrė 16 viruso genotipas, nustatytas moterų urogenitalinių nuograndų (17,64%) bei burnos epitelio mėginiuose (8,70%). Šio genotipo paplitimas urogenitalinių nuograndų mėginių grupėje statistiškai reikšmingai skiriasi nuo kitų genotipų paplitimo ($p < 0,05$). Genotipų paplitimas gimdos kaklelio mėginiuose mažėjančiu paplitimu: 16 (17,65%), 39 (9,24%), 31 (8,40%), 66 (5,88%), 59 (6,72%), 52 (5,04%), 33 (5,04%), 51 (5,04%), 35 (4,02%), 18 (3,36%), 58 (2,52%), 56 (2,52%), 73 (2,52%), 82 (1,68%), 45 (0,84%). Tyrimo rezultatai sutampa su literatūroje pateiktais duomenimis, kad dažniausiai aptinkamas onkogeninis – ŽPV 16 tipas (Bruni ir kt., 2015).

Net aštuoni nustatyti genotipai (16, 52, 31, 51, 18, 58, 66, 39) įvardijami tarp dešimties onkogeninių ŽPV tipų, dažniausiai nustatomų normalia gimdos kaklelio citologija pasižyminčių moterų tarpe (Bruni ir kt., 2015). ŽPV 16 genotipo paplitimas (17,65%), nustatytas darbo metu, yra pavojingai aukštas, lyginant su pasauliniu mastu deklaruojamu 19,1% paplitimu, aptinkamu gimdos kaklelyje jau esant nežymių plokščiakąstelių intraepitelinį pokyčių atveju (Bruni ir kt., 2015).

Pagal paplitimą po ŽPV 16 genotipo tirtų moterų tarpe nustatyti 39 (9,24%), 31 (8,40%) ir 66 (5,88%). Kaimyninėse šalyse šie genotipai taip pat vieni iš dažniausiai pasitaikančių. Populiaciniame Estijos tyrime 39, 31 ir 66 genotipų paplitimas yra žemesnis,

nei mūsų nustatytas ir atitinkamai siekia 0,3%, 2,1% ir 2,8% moterų (Uuskula ir kt., 2010). Lenkijoje atliktų tyrimų duomenims 31 genotipo paplitimas yra taip pat mažesnis, normalios citologijos moterų atveju dažnis siekia 1,3% (Bardina ir kt., 2008). Baltarusijos moterų tarpe 39 ir 31 genotipai atitinkamai paplitę 0,6% ir 1,9% dažniu (Rogovskaya ir kt., 2013). Minėti genotipai patenka į dažniausiai Europoje nustatomų ŽPV genotipų sąrašą (39 – 0,8%, 31 – 2,3%, 66 – 0,8%), tačiau paplitimo dažnis, nustatytas tyrimo metu, viršija bendrą Europoje fiksuojamą vidurkį (39 (9,24% ir 0,8%), 31 (8,40% ir 2,3%), 66 (5,88% ir 0,8%)) (Bruni ir kt., 2010). ŽPV 18 tipas, kuris pasaulyje apibūdinamas, kaip dažniausiai kartu su ŽPV 16 tipu sukeliantis gimdos kaklelio vėžį, mūsų tyrime yra 10-oje pozicijoje iš 15-os nustatytų genotipų (3,36%).

Genotipavus moterų ir vyrų burnos epitelio mėginius, tirti genotipai nustatyti 2-uose moterų ir 4-uose vyrų bendrą ŽPV infekciją turėjusiuose mėginiuose. Moterų epitelio mėginiuose identifikuoti 16 (8,70%), 33 (4,35%) ir 66 (4,35%) genotipai, vyrų burnos epitelio mėginiuose - 56 (5,71%) ir 66 (5,71%). Nacionalinės sveikatos ir mitybos tyrimų apžvalgos (angl. *National Health and Nutrition Examination Survey*, NHANES) 2009-2010 m. duomenimis, JAV gyventojų tarpe ŽPV infekcija burnos ertmėje nustatyta 7,3% mėginių, didžiausiu paplitimu (14,5%) pasižymėjo 16 viruso tipas (Sanders ir kt., 2012). Publikacijos duomenys sutampa su atlikto darbo rezultatais, moterų burnos epitelio grupėje bendrą infekciją turėjo 9,24% tirtų mėginių, 16 viruso tipas identifikuotas 8,70% moterų.

Išanalizavus bendrą ŽPV infekcijos paplitimo tendenciją vieno asmens gimdos kaklelio ir burnos ertmėje, 16 iš 127 (12,60%) moterų, turėjusių ŽPV, pasižymėjo infekcija abejose kūno ertmėse. Atlikus statistinę analizę, tų pačių genotipų koreliacija nenustatyta, atsikartojantys viruso genotipai (16 ir 33) nustatyti tik vienu atveju. Remiantis rezultatais galime daryti prielaidą, kad infekcijos perdavimas tarp burnos ir gimdos kaklelio ertmių veikiausiai vyksta oralinių santykių metu, o ne persiduoda organizmo viduje. Prielaidą patvirtina ir kiti ŽPV infekcijos tyrimai porų atveju, genotipų atsikartojamumas dažniau fiksuojamas vyrų lytiniuose organuose ir moters burnos ertmėje, nei tos pačios moters gimdos ir burnos ertmėse (Tatar ir kt., 2014; Liu ir kt., 2015).

Vertinant tyrimo rezultatus bendrai, infekcija urogenitaliniuose mėginiuose (47,09%) yra 4,6 kartų dažnesnė nei burnos ertmėje (10,22%). Rezultatai sutampa su NHANES publikuojama išvada, jog ŽPV infekcija gimdos kaklelio ertmėje (42,7%) yra gerokai dažnesnė nei burnos ertmėje (3,8%) (Sanders ir kt., 2012).

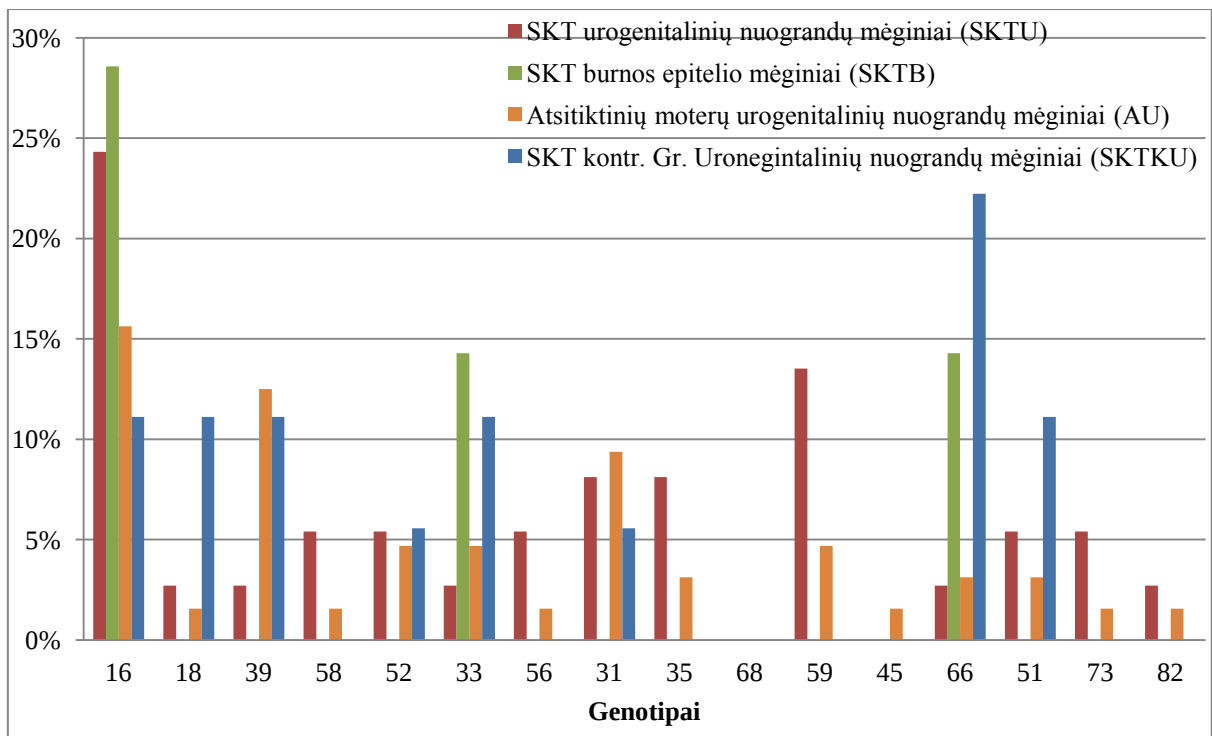
3.5. ŽPV genotipų paplitimo ir kontraceptinių preparatų vartojimo ryšio nustatymas

Siekiant nustatyti ŽPV genotipų paplitimo ryšį su SKT vartojimu, analizuoti šešių pogrupių bendrą infekcijos signalą parodę mėginiai (3 lentelė).

3 lentelė. ŽPV genotipų nustatymas moterų urogenitalinių nuograndų ir burnos mėginių pogrupiuose.

Tiriamųjų grupės		Mėginių skaičius, kuriuose nustatyta bendrą ŽPV infekcija (N)	Mėginių skaičius, kuriuose nustatyti tirti genotipai (N)
Urogenitalinių nuograndų mėginiai	SKT grupė	37	24
	SKT kontr.	18	12
	Atsitiktinės	64	32
Moterų burnos epitelio mėginiai	SKT grupė	7	2
	SKT kontr.	4	0
	Atsitiktinės	12	0

Genotipai nustatyti keturiose iš šešių analizuotų pogrupių: (24/37) SKT vartojančių moterų urogenitaliniuose mėginiuose, (2/7) SKT vartojančių moterų burnos epitelio mėginiuose, (12/18) SKT nevartojančių moterų urogenitalinių nuograndų mėginiuose (SKT kontr.) ir (32/64) atsitiktinių moterų urogenitalinių nuograndų mėginiuose. Didžiausiu paplitimu grupėse pasižymi 16 viruso tipas, atitinkamai aptiktas 24,32% ($p < 0,05$), 28,57%, ($p > 0,05$), 11,11% ($p < 0,05$), 15,63% ($p < 0,05$) mėginių. Genotipų pasiskirstymas tarp grupių pateikiamas 6-ame paveiksle.



6 pav. Tirtų genotipų paplitimas moterų mėginiuose.

Visi genotipai tarp SKT vartojančių ir SKT nevartojančių moterų urogenitalinių mėginių pasiskirstę tolygiai. Taigi, rezultatai leidžia daryti prielaidą, jog sudėtinių kontraceptinių tablečių vartojimas padidina bendrą ŽPV infekcijos riziką gimdos kaklelio ertmėje, tačiau nėra siejamas su konkrečių genotipų paplitimo dažniu.

3.6. ŽPV ir kiti rizikos veiksniai

Remiantis „Bendrosios moterų anketos“ duomenimis analizuotas bendros ŽPV infekcijos urogenitaliniuose mėginiuose ryšys su rūkymu bei gimdymų skaičiumi. Viso patikrinta 69 urogenitalinių nuograndų mėginiai, 3 iš jų po PGR reakcijos nerodė teigiamos kontrolės amplifikacijos, todėl į statistinę analizę įtraukti 66 mėginiai.

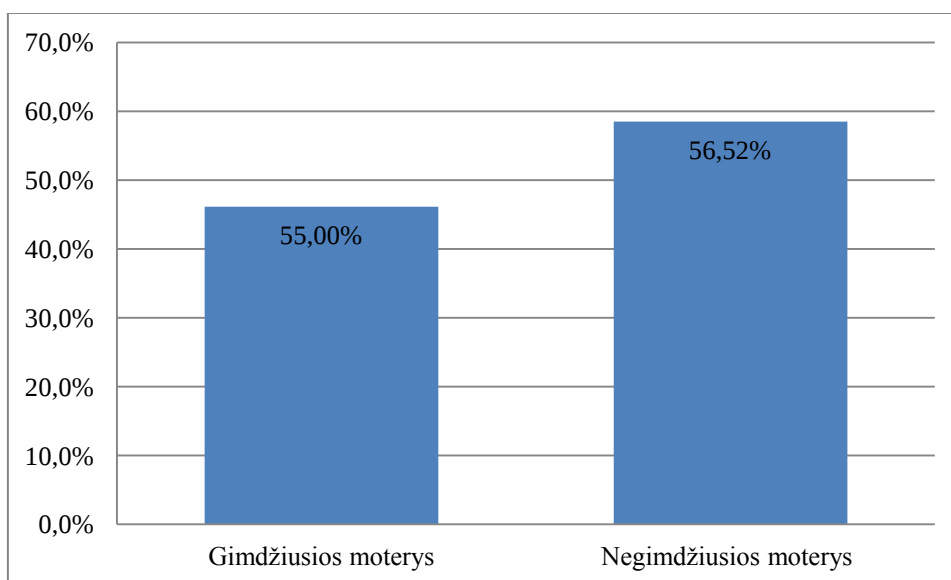
3.6.1. ŽPV ir gimdymų skaičius

Vertinant 66 moterų urogenitalinių nuograndų mėginius pagal praityje turėtų nėštumų skaičių, ŽPV infekcijos paplitimo rezultatai pateikti 4-oje lentelėje.

4 lentelė. ŽPV infekcijos paplitimas pagal buvusių nėštumų skaičių.

Tiriamosios		ŽPV infekcijos paplitimas		p reikšmė palyginus su kontroline grupe
Kategorijos	N	N	%	
Tiriamosios (Gimdžiusios)	13	6	46,15	0,5366
Kontrolinė gr. (Negimdžiusios)	53	31	58,49	-
Pagal gimdymų skaičių	Viso	66	37	56,06
	1	10	3	30,00
	2	3	3	100,00

Vertinant urogenitalinių nuograndų mėginius, ŽPV infekcija nustatyta 6/13 (46,15%) gimdžiusių ir 31/53 negimdžiusių (58,49%) moterų tarpe (7-as paveikslas).



7 pav. ŽPV infekcijos paplitimas tarp gimdžiusių ir negimdžiusių moterų.

Įvairiuose populiaciniuose tyrimuose pateikiamais duomenimis, rezultatai gana kontroversiški. Lenkijoje atliktų tyrimų duomenimis gimdymų skaičius neturi teigiamo ryšio su ŽPV paplitimu. Analizuoto tyrimo duomenimis ŽPV infekcijos dažnis negimdžiusių moterų tarpe (22,8%) yra didesnis nei 1-ą ar daugiau nei 2 kartus gimdžiusių moterų (14,5% ir 10,7%) (Bardina ir kt., 2008).

Siekiant įvertinti atliktame tyrime dalyvavusių moterų gimdymų skaičiaus ryšį su ŽPV infekcijos paplitimu, tiriamoji grupė suskirstyta į vieną (N=10) ir du kartus (N=3) gimdžiusių moterų pogrupius. Nustatytas 30,00% (3/10) ir 100% (3/3) infekcijos paplitimas atitinkamuose pogrupiuose. Dėl mažo mėginių skaičiaus, rezultatai neturi statistinio

reikšmingumo, tačiau atlikto tyrimo rezultatai sutampa su įvairių tyrimų duomenimis, teigiančiais, kad didėjantis gimdymų skaičius padidina ŽPV infekcijos paplitimo riziką (Castellsague ir kt., 2002; Munoz ir kt., 2002).

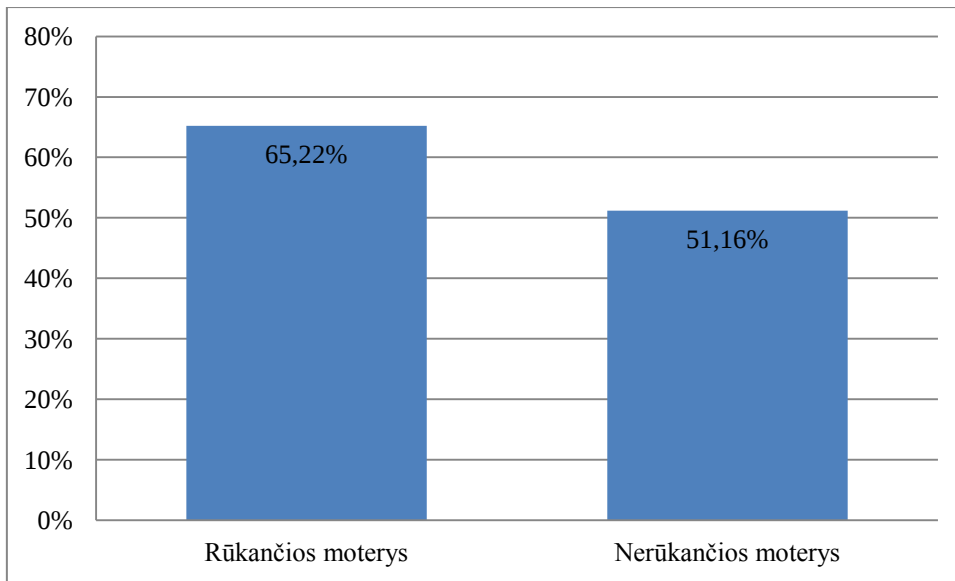
3.6.2. ŽPV ir rūkymas

2015 metų PSO duomenimis Lietuva patenka į procentiškai daugiausiai (>21%) rūkančių moterų pasaulio regioną, tad svarbu įvertinti ir rūkymo bei ŽPV infekcijos paplitimo ryšį. Vertinant 66 moterų urogenitalinių nuograndų mėginius pagal rūkymo istoriją, ŽPV infekcijos paplitimo rezultatai pateikti 5-oje lentelėje.

5 lentelė. ŽPV infekcijos paplitimas pagal rūkymo apklausos duomenis.

Tiriamosios		ŽPV infekcijos paplitimas			p reikšmė palyginus su kontroline grupe
Kategorijos	N	N	%		
Tiriamosios (Rūkančios)		23	15	65,22	1,0000
Kontrolinė gr. (Nerūkančios)		43	22	51,16	-
	Viso	66	37	56,06	-
Pagal surūkomų cigarečių kiekį per dieną	1 - 6	12	6	50,00	1,0000
	> 6	11	9	81,82	0,7879
	Viso	23	-	-	-
Pagal rūkymo trukmę (mėn.)	1 - 24	6	5	83,33	0,2044
	> 24	16	10	62,50	0,2266
	Viso	22	-	-	-

Atlikto tyrimo duomenimis, ŽPV infekcijos paplitimas tarp rūkančių moterų urogenitalinių nuograndų mėginių yra 65,22% (15/23), tarp nerūkančių paplitimas – 51,16% (22/43) (8-as paveikslas). Didžiausias, 81,82%, infekcijos paplitimas nustatytas daugiau nei 6 cigaretes per dieną surūkančių moterų grupėje.



8 pav. ŽPV infekcijos paplitimas tarp rūkančių ir nerūkančių moterų.

Skirtumas tarp ŽPV infekcijos dažnio rūkančių ir nerūkančių moterų grupių nėra statistiškai reikšmingas ($p > 0,05$) ir koreliuoja su Lenkijoje atlikto tyrimo duomenimis (taip pat nenustatytas statistiškai reikšmingas ryšys tarp ŽPV paplitimo ir rūkymo) (Bardina ir kt., 2008). Tačiau ŽPV infekcijos paplitimas rūkančių moterų tarpe yra 1,27 karto didesnis ir ši tendencija atitinka literatūroje pateikiamus duomenis, jog rūkymo faktorius yra vienas iš ŽPV infekciją skatinančių veiksnių (Castellsague ir kt., 2006; Gariglio ir kt., 2009; Holland, 2015).

IŠVADOS

1. DNR išgryninta iš 665 klinikinių mėginių.
2. PGR metodais moterų urogenitalinių nuograndų mėginiuose rasti 47,98% ŽPV teigiami mėginiai, moterų burnos mėginiuose – 9,24%, vyrų burnos mėginiuose – 22,01%. Nustatytas statistiškai patikimas ŽPV infekcijos paplitimo skirtumas tarp vyrų ir moterų burnos epitelio mėginių ($p < 0,05$).
3. Didžiausias ŽPV infekcijos paplitimas moterų urogenitaliniuose mėginiuose nustatytas 18-25 m. amžiaus grupėje, mažiausias 26-35 m. amžiaus grupėje ($p < 0,05$). Burnos epitelio mėginių grupėje nustatytas reikšmingas infekcijos dažnio skirtumas tarp 26 – 35 m. amžiaus vyrų ir moterų ($p < 0,05$).
4. Dauginėmis PGR sistemomis ištirta 16 onkogeninių ŽPV tipų paplitimas 177 klinikiniuose mėginiuose. Labiausiai paplitęs yra ŽPV 16 viruso genotipas.
5. Didesnis ŽPV bendros infekcijos ir ŽPV 16 genotipo paplitimas urogenitaliniuose nuograndų mėginiuose nustatytas tarp moterų vartojančių sudėtinės kontraceptines tabletes lyginant su nevartojančiomis ($p < 0,05$).
6. Moterų urogenitalinių nuograndų mėginiuose didesnis ŽPV bendros infekcijos paplitimas nustatytas rūkančiųjų moterų grupėje lyginant su nerūkančiomis ($p > 0,05$). ŽPV infekcijos paplitimas tarp gimdžiusių ir negimdžiusių moterų mėginių nesiskiria, tačiau didesnis ŽPV dažnis nustatytas tarp du kartus gimdžiusių moterų lyginant su gimdžiusiomis vieną kartą ($p > 0,05$).

Žmogaus papilomos viruso infekcijos bei genotipų paplitimo tyrimai

SANTRAUKA

Žmogaus papilomos virusas (ŽPV) - lytiniu keliu plintanti infekcija, pavojinga tiek moters, tiek vyro organizmui. Pagal onkogeninį potencialą viruso tipai skirstomi į žemos ir aukštos rizikos grupes, pastarieji yra itin pavojingi, sukeliantys net 99% gimdos kaklelio vėžio atvejų. Aukštos rizikos ŽPV tipą užfiksavus burnos ertmėje didėja tikimybė susirgti galvos ir kaklo ertmės vėžiu. Lietuvoje sergamumams gimdos kaklelio vėžiu ir ŽPV paplitimas yra vienas didžiausių Europoje.

Darbo tikslas buvo ištirti bendros ŽPV infekcijos bei 16 onkogeninių viruso genotipų paplitimą Lietuvos moterų urogenitalinių nuograndų mėginiuose bei pirmą kartą Lietuvoje vyrų ir moterų burnos epitelio mėginiuose. Vyrų grupę sudarė sveiki atsitiktiniai vyrai (N=159, 18 - 40m.). Tyrime dalyvavo sveikos, dėl kontracepcijos metodo parinkimo ar profilaktinėje ginekologo apžiūroje dalyvavusios moterys (N=249, 18 – 40 m.). Iš tų pačių moterų surinkti urogenitalinių nuograndų ir burnos epitelio mėginiai suskirstyti į sudėtinės kontraceptines tabletes (SKT) vartojančių (N=67), SKT nevartojančių (N=57), bei atsitiktinių moterų (N=125) grupes.

Polimerazine grandinine reakcija (PGR) bendra ŽPV infekcija aptikta 47,98% urogenitalinių nuograndų mėginių, didžiausias ir mažiausias paplitimas nustatytas 18 – 25 m. ir 26 – 35 m. amžiaus grupėse atitinkamai ($p<0,05$). Didesnis ŽPV bendros infekcijos dažnis urogenitalinių nuograndų mėginiuose nustatytas tarp moterų, vartojančių sudėtinės kontraceptines tabletes, lyginant su nevartojančiomis ($p<0,05$). Įvertinus rūkymo bei gimdymo skaičiaus ryšį su ŽPV infekcijos paplitimu urogenitalinių nuograndų mėginiuose, reikšmingų skirtumų nenustatyta. Moterų ir vyrų burnos mėginiuose bendra ŽPV infekcija nustatyta atitinkamai 9,24% ir 22.01% ($p<0,05$), dažnis 26 – 35 m. amžiaus vyrų grupėje didesnis nei moterų ($p<0,05$). Rezultatai rodo, jog vyrai yra statistiškai svarbūs ŽPV infekcijos paplitime. Dauginėmis PGR sistemomis ištirtas 16 onkogeninių ŽPV tipų paplitimas, didžiausiu dažniu pasižymėjo pavojingiausias ŽPV 16 ($p<0,05$) bei 39, 31 ir 66 genotipai.

Studies on the prevalence of human papillomavirus infection and genotypes

SUMMARY

Human papillomavirus (HPV) is a sexually transmitted infection that puts both women and men at risk. The virus can be classified into groups of low risk and high risk according to its oncogenic potential with the later group being particularly dangerous and causing 99% of cervical cancers. When found in the oral cavity, high risk HPV is associated with higher risk of developing head and neck cancer. Lithuania is among the leading countries in Europe in cervical cancer morbidity and HPV incidence.

The aim of the study was to investigate the prevalence of HPV infection and the incidence of sixteen oncogenic viral genotypes among Lithuanians in the urogenital scrapings of women and, for the first time in Lithuania, in male and female oral epithelial samples. The male group was composed of random healthy subjects (N=159, 18 – 40 years old). The female group was composed of healthy women who had either attended a preventive gynecological examination or sought a gynaecologists' consultation for a contraceptive method of choice (N=249, 18 – 40 years old). Urogenital scrapings and oral epithelial samples collected were then divided into several groups: combined oral contraceptive pills (COCP) taking (N=67), COCP non-taking (N=57) and random (N=125).

HPV infection was found in 47,98% of urogenital scrapings samples using polymerase chain reaction (PCR), with the highest and lowest incidence found among 18 – 25 year olds and 26 – 35 year olds respectively ($p<0,05$). A higher HPV infection incidence was found in the urogenital scrapings of women taking COCPs when compared to those not taking them ($p<0,05$). No significant differences were found when evaluating the link between smoking or number of births and HPV infection in urogenital scrapings. HPV infection in female and male oral samples was found in 9,24% vs. 22,01% ($p<0,05$) of cases respectively, with the incidence among 26 – 35 year old men being greater than among women ($p<0,05$). These results imply that men are of statistical significance for the prevalence of HPV infection. Multiple PCR systems were used to analyse the incidence of sixteen oncogenic viral types with genotypes 16 ($p<0,05$), 39, 31 and 66 being the most frequent.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Allen CT, Lewis ST, El-Mofty SK, Haughey BH, Nussenbaum B, Human Papillomavirus and Oropharynx Cancer: Biology, Detection and clinical Implications, *Laryngoscope* 2010;120:1756-72.
2. Bardina A, Vaccarella S, Clifford GM, Lissowska J, Rekosza M, Bobkiewicz P, Kupryjan Czyka J, Krynicka R, Jonska-Gmyreka J, Danska-Bidzinska A, Snijders PJF, Meijer CJLM, Zatonska W, Franceschi S, Human papillomavirus infection in women with and without cervical cancer in Warsaw, Poland, *European Journal Of Cancer*, 2008;44:557–64.
3. Bosch FX, Robles C, Diaz M, Arbyn M, Baussano I, Clavel C, Ronco G, Dillner J, Lehtinen M, Petry KU, Poljak M, Kjaer SK, Meijer CJLM, Garland SM, Salmeron J, Castellsague X, Bruni L, de Sanjose S, Cuzick J, HPV-FASTER: broadening the scope for prevention of HPV-related Cancer, *Nature Reviews Clinical Oncology*, 2015;1-14.
4. Brown DR, Shew ML, Qadadri B, Neptune N, Vargas M, Tu W, A longitudinal study of genital human papillomavirus infection in a cohort of closely followed adolescent women, *J Infect Dis*, 2005;191:182–92.
5. Bruni L, Barrionuevo-Rosas L, Albero G, Aldea M, Serrano B, Valencia S, Brotons M, Mena M, Cosano R, Munoz J, Bosch FX, de Sanjose S, Castellsague X. ICO Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre). Human Papillomavirus and Related Diseases in the World. Summary Report 2015-12-23, [Žiūrėta 2016 05 10].
6. Bruni L, Diaz M, Castellsague X, Ferrer E, Bosch FX, de Sanjose S, Cervical Human Papillomavirus Prevalence in 5 Continents: Meta-Analysis of 1 Million Women with Normal Cytological Findings, *The Journal of Infectious Diseases*, 2010;202(12):1789–99.
7. Burk RD, Harari A, Chen Z, Human papillomavirus genome variants, *Virology*, 2013;445:232–43.
8. Castellsague X, Bosch FX, Munoz N, Environmental co-factors in HPV carcinogenesis, *Virus Research*, 2002;89:191-9, DOI:10.1093/jnci/djj067.
9. Castellsague X, Diaz M, Sanjose S, Munoz N, Herrero R, Franceschi S, Peeling RW, Ashley R, Smith JS, Snijders SJF, Meijer CJLM, Bosch X, Xavier F, Worldwide Human Papillomavirus Etiology of Cervical, *Journal of the National Cancer Institute*, 2006;98(5):303-15.
10. Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis, *Br J Cancer*, 2003;88:63–73.
11. Coutlee F, Gravitt P, Kornegay J, Hankins C, Richardson H, Lapointe N, Voyer H, The Canadian Women's HIV Study Group in France, Use of PGM1 Primers in L1 Consensus PCR Improves Detection of Human Papillomavirus DNA in Genital Samples, *Journal Of Clinical Microbiology*, 2002;40(3):902–7.
12. D'Souza G, Kluz N, Wentz A, Youngfellow RM, Griffioen A, Stammer E, Guo Y, Xiao W, Gillison ML, Oral human papillomavirus (HPV) infection among unvaccinated high-risk young adults, *Cancers* 2014;6:1691-704.
13. Dahiya N, Acharya AS, Bachani D, Goel MK, Strategies for reducing risk of cervical cancer in adolescents in developing countries – A review, *Indian Journal of Medical Specialities*, 2015;56:4-7.

14. Farsi NJ, El-Zein M, Gaied H, Lee YCA, Hashibe M, Nicolau B, Rousseau MC, Sexual behaviours and head and neck cancer: A systematic review and meta-analysis, *Cancer Epidemiology*, 2015;39(6):1036–46.
15. Fernandes JV, Galvao de Araujo JM, Araujo de Medeiros Fernandes TA, Biology and natural history of human papillomavirus infection, *Open Access Journal of Clinical Trials* 2013;5:1–12.
16. Forman D, de Martel C, Lacey CJ, Soerjomataram I, Lortet-Tieulent J, Bruni L, Vignat J, Ferlay J, Bray F, Plummer M, Franceschi S, Global burden of human papillomavirus and related diseases, *Vaccine*, 2012;30S:F12– F23.
17. Gadducci A, Barsotti C, Cosio S, Domenici L, Genazzani AR, Smoking habit , immune suppression , oral contraceptive use , and hormone replacement therapy use and cervical carcinogenesis : a review of the literature, *Gynecological Endocrinology*, 2011;27(8):597–604.
18. Gariglio P, Gutierrez J, Cortes E, Vazquez J, The Role of Retinoid Deficiency and Estrogens as Cofactors in Cervical Cancer, *Archives of Medical Research*, 2009;40:449-65.
19. Gillison ML, Broutian T, Pickard RKL, Tong ZY, Xiao W, Kahle L, Graubard BI, Chaturvedi AK, Prevalence of Oral HPV Infection in the United States 2009-2010, *American Medical Association*, 2012; E1-E11.
20. Giuliano AR, Harris R, Sedjo RL, Baldwin S, Roe D, Papenfuss MR, Incidence, prevalence, and clearance of type-specific human papillomavirus infections: The Young Women's Health Study, *J Infect Dis*, 2002;186: 462–9.
21. Giuliano AR, Nyitray AG, Kreimer AR, Campbel CMP, Goodman MT, Sudenga SL., Monson J ir Franceschi S, EUROGIN 2014 roadmap: Differences in human papillomavirus infection natural history, transmission and human papillomavirus-related cancer incidence by gender and anatomic site of infection, *International Journal of Cancer* 2015;12:2752-60.
22. Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, Wheeler CM, Coutle F, Hildesheim A, Schiffman MH, Scott DR, Apple RJ, Improved Amplification of Genital Human Papillomaviruses Improved Amplification of Genital Human Papillomaviruses, *Journal Of Clinical Microbiology*, 2000;38(1):357–61.
23. Green J, Berrington de Gonzalez A, Smith JS, Franceschi S, Appleby P, Plummer M, Beral V, Human papillomavirus infection and use of oral contraceptives, *British Journal of Cancer*, 2003;88:1713–20.
24. Groves IJ ir Nicholas C, Pathogenesis of human papillomavirus-associated mucosal disease, *Journal of Pathology* 2015;4:527-38.
25. Gudleviciene Z, Sepetiene A, Didziapetriene J, Valuckas KP, Smailytė G, Drasutienė G, Nadisauskiene RJ, Infekuotumas atskirų žmogaus papilomos tipų virusais esant intraepitelinių gimdos kaklelio pokyčių, *Medicina (Kaunas)* 2010;46(9):616-23.
26. Haedicke J, Iftner T, Human papillomaviruses and Cancer, *Radiotherapy and Oncology* 2013;108:397–402.
27. Hebner CM ir Laimins LA, Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity, *Review Medical Virology* 2006;16:83–9.
28. Holland AC, Smoking Is a Women's Health Issue Across the Life Cycle, *AWHONN* 2015;19(2):189-93.
29. Ian H. Frazer A, Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination, *Nature reviews. Immunology*, 2004;4(1):46-54, 2004.
30. Jacobs MV, De Roda Husman AM, Van Den Brule AJC, Snijders PJF, Meijer CJLM, Walboomers JMM, Group-Specific Differentiation between High- and Low-Risk Human Papillomavirus Genotypes by General Primer-Mediated PCR and Two

- Cocktails of Oligonucleotide Probes, *Journal Of Clinical Microbiology*, 1995;33(4):901–5/
31. Joura EA, Giuliano AR, Iversen OE, Bouchard C, Mao C, Mehlsen J, A 9-valent HPV vaccine against infection and intraepithelial neoplasia in women, *N Engl J Med* 2015;372(8):711–23.
 32. King AMQ, Adams MJ, Carstens EB ir Lefkowitz EJ, *Virus Taxonomy*, Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Academic Press is an imprint of Elsevier, London, 2011;1272psl, ISBN: 978-0-12-384684-6.
 33. Klein G, DiMaio D, Garcea RL, DiMaio D, *The Papillomaviruses*, Springer Science Business Media, New York 2007;434 psl, ISBN: 978-0-387-36523-7.
 34. Knipe DM, Howley P, *Fields Virology*, Lippincott Williams & Wilkins, Wolters Kluwer business, Philadelphia, 2013;2582psl, ISBN: 978-1-4511-0563-6.
 35. Kreimer AR, Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*, 2005;14(2):467–7.
 36. Lehtinen M ir Dillner J, Clinical trials of human papillomavirus vaccines and beyond, *Nature Review Clinical Oncology*, 2013;400(10):400-10.
 37. Liu M, He Z, Zhang C, Liu F, Liu Y, Li J, Xu Z, Wang Q, Hang D, Shen N, Pan Y, Guo C, Cai H, Ke Y, Transmission of genital human papillomavirus infection in couples: a population-based cohort study in rural China, *Nature Scientific Reports*, 2015;5:1-10.
 38. Luhn P, Walker J, Schiffman M, Zuna RE, Dunn ST, Gold MA, Smith K, Mathews C, Allen RA, Zhang R, Wang S, Wentzensen N, *Gynecologic Oncology The role of co-factors in the progression from human papillomavirus infection to cervical cancer*, *Gynecologic Oncology*, 2013;128(2):265–70.
 39. Markowitz LE, Hariri S, Lin C, Dunne EF, Steinau M, McQuillan G, Unger ER, Reduction in human papillomavirus (HPV) prevalence among young women following HPV vaccine introduction in the United States, *National Health and Nutrition Examination Surveys*, 2003-2010, *Journal of Infectious Diseases* 2013;208(3):385-93.
 40. McCance DJ, *Human Papillomaviruses*, Elsevier Science B. V, 2002;8:188-92.
 41. Mirghani H, Amenb F, Moreauc F, Lacau St Guily J, Do high-risk human papillomaviruses cause oral cavity squamous cell carcinoma?, *Oral Oncology*, 2015;51(3):229–36.
 42. Monsonego J, Bosch FX, Coursaget P, Cox JT, Franco E, Frazer I, Cervical cancer control, priorities and new directions [EUROGIN 2003 conclusions], *Int J Cancer* 2004; 108(3):329-33.
 43. Munoz N, Franceschi S, Bosetti C, Moreno V, Herrero R, Smith JS, Shah KV, Meijer CJML, Bosch FX, Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer : the IARC multicentric case-control study, *Lancet* 2002;359:1093–101.
 44. Ostor AG. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *Int J Gynecol Pathol*. 1993;12(2):186-92.
 45. Peck R ir Norris CW, Significant Risks of Oral Contraceptives (OCPs): Why This Drug Class Should Not Be Included in a Preventive Care Mandate, *The Linacre Quarterly*, 2012;79(1):41–56.
 46. Ramirez-Fort MK, Khan F, Rady PL, Tying SK, *The Biology of Human Papillomavirus: Bench to Bedside*, Current Problems in Dermatology, Molecular Biology and Pathogenesis 2014, 45:19–32.

47. 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, 2014;9(1):1-12.
48. Rogovskaya SI, Shabalova IP, Mikheeva IV, Minkina GN, Podzolkova NM, Shipulina OY, Sultanov SN, Kosenko IA, Brotons M, Buttmann M, Dartell M, Arbynk M, Syrjanen S, Polja M, Human Papillomavirus Prevalence and Type-Distribution , Cervical Cancer Screening Practices and Current Status of Vaccination Implementation in Russian Federation , the Western Countries of the former Soviet Union , Caucasus Region and Central Asia, Vaccine, 2913;31S:H46–H58.
49. Salem A, Dismissing links between HPV and aggressive tongue cancer in young patients, Annals of Oncology, 2010;21(1):13–17.
50. Sanders AE, Slade GD, Patton LL, National prevalence of oral HPV infection and related risk factors in the U . S . adult population, Oral Diseases, 2012;18:430–41.
51. Satya Prakash Gupta, Cancer-Causing Viruses and Their Inhibitors, Taylor & Francis Group, USA, 2014;501psl, ISBN: 978-1-4665-8978-0.
52. Scheurer ME, Tortolero-Luna G, Adler-Storthz K., Human papillomavirus infection: biology, epidemiology, and prevention, Int J Gynecol Cancer 2005;15:727–746.
53. Schillera JT, Castellsague X, Garland SM, A review of clinical trials of human papillomavirus prophylactic valcines, Vaccine 2012;30S:F123–F138.
54. Simanaviciene V, Gudleviciene Z, Popendikyte V, Dekaminaviciute D, Stumbryte A, Rubinaite V, Zvirbliene A, Studies on the Prevalence of Oncogenic HPV Types Among Lithuanian Women With Cervical Pathology, Journal of Medical Virology 2014;2-12.
55. Smith JS, Lindsay L, Hoots B, Human papil- lomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update, Int J Cancer, 2007;121:621–32.
56. Syrjanen S ir Syrjanen K, The History of Papillomavirus Research, Cent Eur J Public Health, Supplement 2008;16:S7–S41.
57. Tatar TZ, Kis A, Szabo E, Czompa L, Boda R, Tar I, Szarka K, 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.
58. Thz K. Human papillomavirus infection: biology, epidemiology, and prevention. International Journal of Gynecol Cancer 2005;15:727–46.
59. Tindle RW, Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer, Nature Reviews Cancer, 2002;2(1):1-7.
60. 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):31-35.
61. 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: A Cancer Journal for Clinicians, 2013;63:58-81.