

Ocena wystąpienia czynników ryzyka zakażenia wirusem brodawczaka ludzkiego (HPV) oraz stopnia jego onkogenności wśród mieszkanek wsi

Evaluation of risk factors presence in human papilloma virus (HPV) infection and its oncogenity in rural region

Dagmara Nawarra-Karowicz¹, Urszula Kowalska-Koprek², Agata Karowicz-Bilińska³

Obecność DNA wirusa brodawczaka ludzkiego można wykryć w ponad 90% przypadków raka szyjki macicy. Progresja zmian dysplastycznych związana jest z występowaniem dodatkowych czynników, nasilających ten proces.

Cel: celem pracy była ocena występowania czynników ryzyka zakażenia wirusem brodawczaka ludzkiego, ocena występowania infekcji HPV oraz jego onkogenności w środowisku wiejskim.

Materiał i metody: Badaniami objęto rejon gminy Słubice w latach 2002–2003, badaną grupę stanowiło 200 kobiet w wieku 18–65 lat. Wykonano rozmaz cytologiczny z tarczy i kanału szyjki macicy oraz badanie na obecność HPV metodą PCR. Na podstawie wywiadu oceniono obecność klasycznych czynników ryzyka zakażenia HPV.

Wyniki i wnioski: Liczba wyników wskazujących na infekcję HPV wynosiła 4%. Na podstawie badania PCR u 50% zakażonych wykryto wysokoonkogenne szczepy, w 37,5% niskoonkogenne HPV, w 12,5% uzyskano wynik negatywny. Stwierdzono, że istnieje związek pomiędzy występowaniem zakażenia szczepami HPV o wysokiej onkogenności a paleniem papierosów, zwiększoną liczbą partnerów seksualnych oraz byłych partnerek seksualnych partnera.

Słowa kluczowe: HPV, rak szyjki macicy, czynniki ryzyka, rozpoznawanie

(Przegląd Menopauzalny 2005; 4: 22–31)

¹ NZOZ SANUS w Słubicach; dyrektor NZOZ: Dagmara Nawarra-Karowicz

² Klinika Patologii Ciąży Uniwersytetu Medycznego w Łodzi;
kierownik Kliniki: prof. dr hab. Urszula Kowalska-Koprek

³ Pracownia Fizjopatologii Narządu Rodnego Kliniki Patologii Ciąży Uniwersytetu Medycznego w Łodzi;
kierownik Kliniki: prof. dr hab. Urszula Kowalska-Koprek, kierownik Katedry: prof. dr hab. Jacek Suzin



Wstęp

Problem infekcji wirusem brodawczaka ludzkiego (*human papilloma virus* – HPV) wiąże się bezpośrednio z wystąpieniem raka szyjki macicy [1]. Coraz więcej dowodów wskazujących na rolę zakażenia wirusem brodawczaka ludzkiego w rozwoju raka szyjki macicy zapowiada możliwość zapobiegania, wczesnego wykrywania i identyfikacji kobiet, które są obciążone ryzykiem rozwoju tej choroby i tym samym na ukierunkowanie dalszej szybkiej diagnostyki [2]. Na świecie co roku wykrywa się ok. 0,5 mln nowych przypadków raka szyjki macicy [3]. W Polsce rak szyjki macicy zajmuje pod względem zachorowalności na nowotwory złośliwe II miejsce po raku sutka. Współczynnik zachorowalności wynosił 15,1, a umieralności 7,2 [4]. Średni czas transformacji z fazy dysplazji małego stopnia do dysplazji dużego stopnia trwa ok. 9 lat, a progresja z dysplazji dużego stopnia do raka inwazyjnego trwa od 3 mies. do 2 lat [5]. Zidentyfikowano ok. 100 typów HPV. Typy wirusa o powinowactwie do narządów płciowych można podzielić na grupy, biorąc pod uwagę prawdopodobieństwo rozwoju określonych chorób szyjki macicy, w przypadku zakażeniem konkretnym typem wirusa [6, 7]. Wirusy o małej onkogenności (typ 6, 11, 42, 43, 44) powodują rozwój łagodnych kłykcin. Wirusy o dużej onkogenności typ (16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52, 58) wykrywa się w 99,7% przypadków raka szyjki macicy [8, 9]. Proteina HIV – E7 i E6 łączy się z białkami regulatorowymi komórki p53, odblokowuje cykl komórkowy, co prowadzi do niestabilności genetycznej komórki. Neoplazja rozwija się najczęściej na styku nabłonków gruczołowego i płaskiego [10]. Rzadko jednak stwierdza się cechy infekcji wirusowej w obrazie cytologicznym w raku szyjki macicy, pomimo obecności infekcji wirusem i to szczepami onkogennymi, ze względu na znaczne odmłodzenie komórek [11]. Wczesne wykrycie infekcji wirusem HPV pozwala na zmniejszenie zagrożenia wystąpieniem raka szyjki macicy. Wyizolowanie wysokoonkogenego szczepu metodami molekularnymi – PCR, która opiera się na zasadzie uzyskania licznych kopii poszukiwanych sekwencji DNA, przy wykorzystaniu zgodnych primerów i oligomerów, pozwala na dokładną ocenę zagrożenia i podjęcie odpowiedniego leczenia. W ok. 90% przypadków zakażeń HPV dochodzi do eliminacji wirusa z organizmu przez układ immunologiczny i po upływie 2 lat nie wykrywa się HPV. Utrzymanie DNA wirusa w organizmie jest dowodem na zakażenie typem dużego ryzyka, co wiąże się ze znacznym ryzykiem rozwoju dysplazji dużego stopnia, a w końcu raka szyjki. Infekcja wirusem może przejść w fazę latentną i w przypadku osłabienia odporności organizmu może się ujawnić ponownie [11].

Czynnikami sprzyjającymi infekcji HPV są wiek, leki immunosupresyjne, ciąża, palenie tytoniu, stosowanie antykoncepcji hormonalnej, niedobory witaminowe,

współistniejące zakażenia (np. chlamydia, HIV, HS VII). Ryzyko zależy również od liczby partnerów oraz od wczesnego rozpoczęcia życia seksualnego. Od chwili rozpowszechnienia badania cytologicznego w Stanach Zjednoczonych, umieralność na raka szyjki macicy zmniejszyła się o 75%, obserwuje się natomiast wzrost zachorowalności wśród młodych kobiet [1]. Pomimo prowadzonych badań nad skutecznością leczenia infekcji HPV za pomocą różnych preparatów, w tym również przeciwwirusowych, wyniki leczenia zachowawczego często są niezadowolające.

Cel pracy

Celem pracy jest ocena częstości występowania infekcji wirusem brodawczaka ludzkiego w populacji polskiej mieszkającej na wsi. Ocena ryzyka zakażenia szczepami wysokoonkogennymi wirusa brodawczaka ludzkiego z uwzględnieniem czynników ryzyka tzw. *klasyczne fińskie*, jakimi są palenie papierosów, wiek rozpoczęcia życia seksualnego, liczba partnerów, styl życia, warunki socjoekonomiczne, obecność towarzyszących chorób przewlekłych, wykształcenie, średnia częstotliwość wizyt u lekarza ginekologa, aktywność seksualna, liczba przebytych porodów, występowanie infekcji dróg rodnych oraz zmian na szyjce macicy, BMI.

Materiał i metody

Badaniami objęto kobiety w wieku 18–65 lat, zamieszkałe w rejonie gminy Słubice na przełomie 2002 i 2003 r., utrzymujące się z pracy w rolnictwie, ubezpieczone w KRUS. U każdej kobiety wykonano rozmaz cytologiczny z tarczy i kanału szyjki macicy. Badanie cytologiczne pobierano szczoteczką typu cytobrush. Preparaty cytologiczne utrwalano natychmiast cytofixem, a następnie barwiono w sposób rutynowy hematoksyliną i eozyną.

Materiał był oceniany początkowo w systemie Papanicolaou w pracowni histopatologicznej w Płocku, a następnie poddany weryfikacji w Pracowni Histopatologicznej I Katedry Ginekologii i Położnictwa UM w Łodzi i oceniony w systemie Bethesda.

Przy niezgodnościach wyników następowało ponowne pobranie materiału z szyjki macicy i ponowna ocena w systemie Bethesda. W wybranych na podstawie uzyskanych wyników badania cytologicznego przypadkach, gdzie podejrzewano infekcję wirusem brodawczaka ludzkiego, wykonano badanie metodą molekularną w kierunku zakażenia tym wirusem.

Do kobiet tych wysłano imienne zaproszenia na badania kontrolne. Ponownie pobierano materiał z szyjki macicy do badania na obecność DNA HPV metodą PCR. Badania wykonano z dwóch niezależnych materiałów z szyjki macicy – pobranego jak posiew oraz rozmazu na



szkiełko (nieutralnego), które aż do wykonania oznaczenia przechowywane były w temp. -70°C .

Do oznaczenia onkogenności wirusów wykorzystano molekularną metodę PCR, polegającą na uzyskaniu licznych kopii wirusa za pomocą zgodnych primerów i oligomerów. Cały cykl składa się z denaturacji, hybrydyzacji, syntezy DNA. Efektem końcowym tego procesu jest podwojenie ilości poszukiwanego DNA. Ilość syntezowanych fragmentów narasta wykładniczo jak $2n$, gdzie n to liczba cykli. Identyfikacja DNA wirusa następuje przy wykorzystaniu metody kolorometrycznej. Ocena światła następuje poprzez dodanie substratu chemifluorescencyjnego, reagującego z fosfatazą alkaliczną. Pomiaru natężenia światła dokonuje się za pomocą luminometru i wyraża się w jednostkach RLU (*relative light units*). Badania wykonano techniką PCR, posługując się zestawem PCR Human Papilloma Virus Typing Set (TaKaRa – Japonia) w Pracowni Biologii Molekularnej Zakładu Patomorfologii Klinicznej Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi. Wszystkie pacjentki badanej grupy wypełniały ankietę, zachowując anonimowość oraz wyraziły zgodę na użycie tej ankiety do badań naukowych.

Analiza statystyczna

Uzyskane wyniki opracowano za pomocą odpowiednich metod analizy statystycznej stosując program CSS Statistica (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA). Dla parametrów ciągłych, czyli parametrów wyrażonych w skali przedziałowej, obliczono wartości średnie i odchylenie standardowe. Poziom istotności przyjęto jako $p < 0,05$. Porównania dwóch grup niezależnych w przypadku rozkładów normalnych wykonano testem t-Studenta dla prób niezależnych. W przypadku braku spełnienia założeń o normalności rozkładów, porównanie między niezależnymi grupami wykonano testem Manna-Whitney'a dla prób niezależnych.

W analizie parametrów wyrażonych w skali nominalnej stosowano test χ^2 , a w przypadku braku warunków do jego zastosowania (mała liczebność grup) – test dokładny Fishera. Celem oceny zależności między cechami obliczano współczynnik korelacji rang Spearmana (ρ).

Wyniki

Poddano ocenie wybrane parametry jakościowe i ilościowe, mogące mieć wpływ na wzrost ryzyka zachorowania na raka szyjki macicy, a więc te, które związane były z częstszym stwierdzaniem infekcji wirusami brodawczaka ludzkiego, a szczególnie ich typów o wysokiej onkogenności. Uzyskane wyniki po przeprowadzeniu analizy statystycznej przedstawiono w tabelach.

Wśród 200 kobiet populacji wiejskiej infekcję wirusem brodawczaka ludzkiego podejrzewano na podstawie badania cytologicznego w 2,5% (5 kobiet).

Poddając ponownej ocenie cytologicznej podejrzany materiał w ośrodku referencyjnym stwierdzono wyniki fałszywie ujemne w ocenie cytologicznej populacji wiejskiej, co powiększyło grupę poddaną dalszej diagnostyce do 3,5% (7 kobiet) (tab. I).

Na podstawie przeprowadzonego badania weryfikującego poprzednie przesiewowe badanie cytologiczne wyodrębniono wśród kobiet osoby podejrzane o zakażenie wirusem brodawczaka ludzkiego. Kobiety te zostały poddane badaniu na obecność wirusa brodawczaka ludzkiego wykonanego techniką PCR z oceną onkogenności szczepu wirusa. Onkogenność wirusów brodawczaka ludzkiego została oceniana jako wysoka lub niska. W 1 przypadku badanie PCR nie potwierdziło sugerowanej w wyniku badania cytologicznego infekcji wirusem brodawczaka ludzkiego. Uzyskane wyniki przedstawiono w tab. II.

Tab. III przedstawia zależność pomiędzy wykształceniem kobiet poddanych badaniu a częstością infekcji szczepami wirusa brodawczaka ludzkiego zarówno o niskiej, jak i wysokiej onkogenności.

Zakażenie wirusem brodawczaka ludzkiego stwierdzono u 4 kobiet z wykształceniem podstawowym, co stanowiło 57,1% liczebności grupy, u której stwierdzono cechy infekcji wirusem brodawczaka ludzkiego. U kobiet z wykształceniem zawodowym częstość występowania zakażenia wirusem brodawczaka ludzkiego oceniono na 42,8% (3 kobiety). Nie stwierdzono przypadków infekcji wirusem brodawczaka ludzkiego w innych grupach wykształcenia, ponieważ nie były one reprezentowane (tab. III). Wszystkie przypadki zakażenia wirusem brodawczaka ludzkiego o wysokiej onkogenności w tej grupie kobiet dotyczyły osób z wykształceniem podstawowym, a niskiej onkogenności z wykształceniem zawodowym.

Ocenie poddano również występowanie różnych czynników ryzyka wystąpienia zakażenia wirusem brodawczaka ludzkiego. Najważniejszym z nich wg obserwacji wielu autorów jest nikotynizm. Za czynnik ryzyka wystąpienia infekcji wirusem brodawczaka ludzkiego przyjęto palenie więcej niż 15 papierosów w ciągu doby.

Wśród 7 kobiet, u których stwierdzono występowanie wirusa brodawczaka ludzkiego 3 nie paliły papierosów, 4 kobiety paliły 15 lub więcej papierosów w ciągu doby, średnio $11,88 \pm 11,01$. U kobiet, u których stwierdzono infekcję wirusem o wysokiej onkogenności tylko 1 nie była palaczką. Wśród 3 kobiet zakażonych wirusem brodawczaka ludzkiego o niskim ryzyku onkogenności, 1 paliła nałogowo papierosy.

Średnia liczba palonych papierosów na dobę u kobiet z wysoko onkogennymi HPV wynosiła $20,00 \pm 14,14$ ($n=4$). Średnia liczba wypalanych papierosów na dobę u kobiet z nisko onkogennymi HPV wynosiła $5,00 \pm 4,66$ ($n=3$).



Wśród kobiet, u których nie potwierdzono w badaniu cytologicznym cech infekcji wirusem brodawczaka ludzkiego średnia liczba wypalanych papierosów w populacji wiejskiej wynosiła $10,91 \pm 6,23$ ($p=0,63$) (tab. IV).

Oceniono również warunki sanitarne, opierając się na możliwości korzystania z prysznicy w warunkach domowych. Stwierdzono, że nie u wszystkich kobiet warunki higieniczne spełniały założone wymagania – obecność łazienki z prysznicem i ciepłą wodą bieżącą, u 2 kobiet zakażonych wirusem brodawczaka ludzkiego o wysokim ryzyku onkogenezy oraz u 1 wirusem o niskim ryzyku onkogenezy warunki sanitarne były oceniane jako złe.

W tab. V przedstawiono wybrane czynniki, mogące mieć wpływ na częstość występowania infekcji wirusem brodawczaka ludzkiego w badanej populacji. Pod uwagę wzięto wiek, wzrost, masę ciała oraz uzyskaną wartość wskaźnika BMI.

Średnia wieku w grupie kobiet zakażonych mieszkających na wsi wynosiła 42 lata. Tylko 1 pacjentka była w wieku 26 lat i była najmłodsza w tej grupie. Wszystkie kobiety populacji wiejskiej zakażone wirusem brodawczaka ludzkiego o wysokim ryzyku onkogenezy były w wieku powyżej 50. roku życia.

Stwierdzono, że wystąpiła dodatnia korelacja pomiędzy zakażeniem wirusem brodawczaka ludzkiego o wysokiej onkogenności w stosunku do zakażenia wirusem o niskiej onkogenności i średnim wiekiem mieszkanek mieszanek wsi ($p=0,001$). Stwierdzono, że średnia masa ciała kobiet z wysoko- i niskoonkogennymi szczepami wirusa o wysokim ryzyku onkogenezy wynosiła $73,00 \pm 6,27$ kg ($n=4$), średnia masa ciała kobiet z niskoonkogennymi i szczepami wynosiła $62,67 \pm 4,62$ kg ($n=3$). Średnia wartość masy ciała kobiet zakażonych HPV w tej populacji wynosiła $67,25 \pm 7,94$ kg ($n=7$). Nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie pomiędzy średnią masą ciała kobiet z wysoko- i niskoonkogennymi typami HPV ($p=0,062$).

Oceniając wzrost badanych kobiet stwierdzono, że w grupie z wysoko- i niskoonkogennymi HPV średni wzrost wynosił $159,00 \pm 6,83$ cm ($n=4$), z niskoonkogennymi HPV wynosił $160,00 \pm 6,24$ cm ($n=3$). Ogółem średni wzrost kobiet w tej grupie wynosił $159,75 \pm 5,68$ cm ($n=7$).

Nie stwierdzono korelacji pomiędzy wzrostem onkogenności wirusów HPV (nisko- vs wysoko- i niskoonkogenne) a wzrostem pacjentek ($p=0,85$). Na podstawie wzrostu oraz masy ciała wyliczono dla tych pacjentek wskaźnik masy ciała. Prawidłowe wartości współczynnika masy ciała oraz infekcję szczepami wirusa brodawczaka ludzkiego o niskim ryzyku onkogenezy stwierdzono w 2 przypadkach (28,5%). U 2 otyłych kobiet (BMI powyżej 30) stwierdzono zakażenie szczepami wirusa brodawczaka ludzkiego o wysokim ryzyku onkogenezy.

Średnia wartość BMI kobiet z zakażeniem wysoko- i niskoonkogennymi HPV wynosiła $29,00 \pm 3,65$ ($n=4$), u ko-

biet z niskoonkogennymi HPV wynosiła $24,67 \pm 3,79$ ($n=3$). Ogółem średnia wartość BMI kobiet z potwierdzoną infekcją HPV wynosiła $26,5 \pm 4,21$ ($n=7$). Stwierdzono brak różnic istotnych statystycznie pomiędzy średnimi BMI kobiet z wysoko- i niskoonkogennymi typami wirusa brodawczaka ludzkiego ($p=0,19$).

Oceniono również wiek, w jakim wystąpiła pierwsza w życiu miesiączka i stwierdzono brak nieprawidłowości w wieku wystąpienia *menarche*. Średni wiek wystąpienia *menarche* wynosił 13 lat ($12,75 \pm 0,71$ lat). Średni wiek wystąpienia *menarche* u kobiet z wysoko- i niskoonkogennymi HPV wynosił $13,00 \pm 0,82$ lat ($n=4$), z niskoonkogennymi HPV wynosił $12,33 \pm 0,58$ lat ($n=3$) ($p=0,28$).

Analizując wiek inicjacji seksualnej stwierdzono, że w 5 przypadkach rozpoczęcie współżycia płciowego nastąpiło przed ukończeniem 18. roku życia. Z 4 kobiet zakażonych wirusami o wysokim ryzyku onkogenności tylko 1 podjęła współżycie płciowe po ukończeniu 18 lat. Wśród kobiet, u których stwierdzono szczep wirusa o niskiej onkogenności w 2 przypadkach inicjacja seksualna nastąpiła przed ukończeniem 18. roku życia.

Stwierdzono, że średni wiek inicjacji seksualnej kobiet z infekcją szczepami wysoko- i niskoonkogennymi HPV wynosił $16,00 \pm 1,41$ lat ($n=4$), z niskoonkogennymi HPV $16,33 \pm 1,53$ lat ($n=3$).

Nie obserwowano korelacji pomiędzy różnymi typami onkogenności wirusów (nisko- vs wysoko- i niskoonkogenne) i wiekiem inicjacji seksualnej ($r=0,13$; $p=0,73$).

Trzy z kobiet zakażonych wysoko- i niskoonkogennymi szczepami wirusa brodawczaka ludzkiego miały w przeszłości stwierdzone nieprawidłowości w obrębie części pochwowej szyjki macicy. Obecność tego typu zmian na szyjce macicy stwierdzono w przeszłości u 1 kobiety zakażonej wirusem o niskiej onkogenności. Nie stwierdzono różnic w częstości rozpoznawania nadżerki części pochwowej szyjki macicy lub/i stanu zapalnego pomiędzy pacjentkami z wysoko- i niskoonkogennymi typami HPV.

Nie wystąpiła również korelacja pomiędzy wzrostem onkogenności wirusów HPV (nisko- vs wysoko- i niskoonkogenne) i obecnością lub brakiem obecności zmian na części pochwowej szyjki macicy i stanów zapalnych ($r=0,41$; $p=0,35$) (tab. V).

Na podstawie wywiadu poddano ocenie obecność czynników ryzyka zakażenia wirusem brodawczaka ludzkiego – liczby dotychczasowych partnerów seksualnych, kontaktów seksualnych w tygodniu, przebytych porodów oraz opiekę ginekologiczną wyrażoną w latach, jakie minęły od ostatniego badania ginekologicznego. Stwierdzono, że średnia liczba partnerów seksualnych w grupie kobiet zakażonych wirusem brodawczaka ludzkiego o wysokim ryzyku onkogenezy wahała się pomiędzy 3 a 4 partnerami. Średnia liczba partnerów seksualnych w grupie kobiet zakażonych wirusem brodawczaka ludzkiego o niskim ryzyku onkogenezy wynosiła do 2 partnerów. Ogółem średnia liczba dotych-



czasowych partnerów seksualnych wynosiła powyżej 2, ale nie więcej niż 3. Średnia liczba partnerów seksualnych kobiet z obecnością infekcji wysokoonkogennymi typami wirusa HPV była większa od średniej liczby partnerów seksualnych z zakażeniem niskoonkogennymi typami HPV ($p < 0,05$, $p = 0,045$). Średnia kontaktów seksualnych wśród kobiet zakażonych wirusem brodawczaka ludzkiego o wysokim ryzyku onkogenezy wynosiła raz w mies., a o niskim ryzyku onkogenezy do 2 razy w tyg. Ogółem średnia liczba kontaktów seksualnych w tygodniu wśród kobiet zakażonych wirusem brodawczaka ludzkiego wynosiła 2 do 3. Nie potwierdzono obecności zależności pomiędzy liczbą kontaktów seksualnych w tygodniu u kobiet z potwierdzoną infekcją wysokoonkogennym i niskoonkogennym HPV ($r = 0,41$ co odpowiada $p = 0,11$ i $r = 0,44$ co odpowiada $p = 0,12$).

W grupie kobiet, u których wykryto zakażenie wirusem o wysokim ryzyku onkogenezy czas, jaki minął od ostatniej kontroli ginekologicznej wynosił prawie 8 lat ($7,50 \pm 5,45$ mies.) ($n = 4$). Natomiast u kobiet zakażonych wirusem o niskim ryzyku onkogenezy czas, jaki minął od ostatniej kontroli ginekologicznej wynosił prawie cztery lata [$3,67 \pm 1,53$ mies. ($n = 3$)]. W całej grupie zakażonych średnia częstość badań kontrolnych wynosiła prawie 6 lat [$5,86 \pm 4,45$ mies. ($n = 8$)].

Nie stwierdzono korelacji pomiędzy wzrostem onkogenności wirusów HPV (nisko- vs wysokoonkogenne) i czasem od ostatniej wizyty u ginekologa ($p = 0,30$).

Liczba odbytych porodów wynosiła średnio ponad 3 (3,2), u kobiet z infekcją wysokoonkogennymi szczepami HPV wynosiła $4,25 \pm 0,50$ ($n = 4$), u kobiet z zakażeniem niskoonkogennymi szczepami HPV wynosiła $2,00 \pm 1,00$ ($n = 3$) (tab. VI).

W tab. VII przedstawiono liczbę dotychczasowych partnerek seksualnych aktualnego partnera a rodzaj onkogenności szczepów HPV.

Wśród kobiet zakażonych wirusem brodawczaka ludzkiego o wysokim ryzyku onkogenności stwierdzono w 1 przypadku pomiędzy 5 a 10 partnerekami w przeszłości, powyżej 10 a do 5 byłych partnerek stwierdzono u 2 aktualnych partnerów. Tylko 1 partner potwierdził posiadanie więcej niż 15 partnerek w przeszłości. Analizując liczbę byłych partnerek u aktualnych partnerów u kobiet zakażonych wirusem brodawczaka ludzkiego o niskim ryzyku onkogenezy w 2 przypadkach było to do 5 partnerek, w 1 między 5 a 10. Stwierdzono dodatnią korelację pomiędzy większą liczbą partnerek seksualnych obecnych partnerów kobiet z infekcją wysokoonkogennymi szczepami HPV ($\rho = 0,60$ co odpowiada $p < 0,02$) i mniejszą liczbą partnerek seksualnych obecnych partnerów kobiet z infekcją niskoonkogennymi szczepami HPV ($\rho = 0,67$; $p = 0,001$) (tab. VII).

W poniższej tabeli przedstawiono zależność pomiędzy zachorowalnością na wybrane choroby internistyczne: nadciśnienie tętnicze, cukrzycę, przewlekłą

obturacyjną chorobę płuc (POChP) u kobiet, u których wykryto zakażenie wirusami brodawczaka ludzkiego, a wysoką lub niską onkogennością tych wirusów.

Nadciśnienie tętnicze do wartości ciśnienia skurczowego 180 i rozkurczowego 110 stwierdzono w 2 przypadkach. U 2 kobiet grupy zakażonej wirusami brodawczaka ludzkiego o wysokim ryzyku onkogenezy stwierdzono cukrzycę i u 2 POChP.

Wśród kobiet zakażonych wirusami brodawczaka ludzkiego o niskim ryzyku onkogenezy nie stwierdzono żadnych chorób internistycznych. Stwierdzono dodatnią korelację pomiędzy występowaniem nadciśnienia tętniczego u kobiet z infekcją wysokoonkogennymi typami HPV i jej brak u kobiet z infekcją niskoonkogennymi szczepami HPV ($r = 0,45$; $p = 0,042$). POChP rozpoznano u 3 kobiet spośród 14 z infekcją wysokoonkogennymi typami HPV, natomiast u żadnej spośród 7 pacjentek z infekcją niskoonkogennym wirusem HPV ($p = 0,1$) (tab. VIII). Oceniono również występowanie chorób nowotworowych w rodzinie kobiet zakażonych wirusami o wysokim ryzyku onkogenezy. W pierwszej linii choroby nowotworowe stwierdzano w 2 przypadkach oraz w 1 przypadku w drugiej linii. W 1 z tych przypadków obciążony wywiad stwierdzono zarówno w pierwszej, jak i w drugiej linii pokrewieństwa. U 1 kobiety zakażonej wirusem brodawczaka ludzkiego o niskim ryzyku onkogenności stwierdzono występowanie chorób nowotworowych w pierwszej linii w 1 przypadku. Nie stwierdzono korelacji pomiędzy wywiadem nowotworowym wśród krewnych I i II stopnia a onkogennością wirusów HPV (nisko- vs wysokoonkogenne) ($r = 0,35$; $p = 0,12$) (tab. IX).

Dyskusja

Problem infekcji wirusem brodawczaka ludzkiego wiąże się bezpośrednio z możliwością wystąpienia raka szyjki macicy. Odkrycie czynnika etiologicznego, jakim jest HPV stało się przełomem w dotychczasowym rozumieniu tego problemu, z którym spotykają się lekarze. W ostatnich dekadach w krajach rozwiniętych śmiertelność w następstwie raka szyjki macicy systematycznie spada, jednak w krajach rozwijających się nie obserwuje się podobnej tendencji. Tak więc nadal rak szyjki macicy znajduje się na czele listy nowotworów złośliwych u kobiet [13].

Zaobserwowano również obniżenie się średniej wieku chorych, która w latach 60. wynosiła 45 lat, w latach 70. 41 lat, w latach 90. 38 lat, a w chwili obecnej 35 lat [14]. Wśród czynników ryzyka wiele jest wspólnych zarówno dla raka gruczołowego szyjki macicy, jak i raka płaskonabłonkowego [15]. Wymienić tu należy kontakty z licznymi partnerami płciowymi, wczesny początek życia płciowego, infekcje onkogennymi szczepami wirusa HPV, stosowanie doustnych środków antykoncepcyjnych [16].



Zmiany w zachorowalności i śmiertelności z powodu raka płaskonabłonkowego szyjki macicy obserwowane w ostatnich latach należy wiązać przede wszystkim z upowszechnieniem profilaktyki – zastosowaniem przesiewowych, masowych badań cytologicznych.

Jedyną metodą diagnostyczną, która daje pewną odpowiedź na pytanie, jakim typem wirusa jest zakażona pacjentka jest wykonanie badania techniką PCR (*polymerase chain reaction*). Technika PCR zatem właściwie pokazuje naturalny proces replikacji DNA, a narastają-

cy wykładniczo przyrost ilości produktu stanowi najważniejszą zaletę tej metody.

W przeprowadzonych badaniach diagnozowano wirusy grup niskiego i wysokiego ryzyka za pomocą uznanych za najprecyzyjniejsze zestawów *Human Papillomavirus Typing Set* produkcji japońskiej. Tej metody używali w prowadzonych badaniach również inni autorzy [17].

W prawie wszystkich przypadkach rozpoznania w przesiewowym badaniu cytologicznym cech infekcji

Tab. I. Wyniki badań cytologicznych przeprowadzonych w porównywanych grupach

Grupa badana	Badanie wstępne				Badanie weryfikacyjne				Ogółem	
	ujemne		dodatnie		ujemne		dodatnie		n	%
	n	%	n	%	n	%	n	%		
populacja wiejska	195	97,5	5	2,5	192	96,0	8	4,0	200	100

Tab. II. Wynik badania w kierunku obecności DNA wirusa brodawczaka ludzkiego oraz jego onkogenności u kobiet z podejrzeniem tej infekcji w badaniu cytologicznym

Badana grupa	Szczepki o wysokim ryzyku onkogenności		Szczepki o niskim ryzyku onkogenności		Wyniki ujemne		Ogółem	
	n	%	n	%	n	%	n	%
populacja wiejska	4	50,0	3	37,5	1	12,5	8	100

Tab. III. Wykształcenie a onkogenność szczepów HPV

Wykształcenie	Liczba badanych kobiet		Liczba kobiet z infekcją HPV wysokoonkogennym		Liczba kobiet z infekcją HPV niskoonkogennym	
	n	%	n	%	n	%
podstawowe	99	49,5	4	2	0	0
zawodowe	101	50,5	0	0	3	1,5
średnie	0	0	0	0	0	0
wyższe	0	0	0	0	0	0
razem	200	100	4	2	3	1,5

Tab. IV. Nikotynizm a zakażenie wirusem brodawczaka ludzkiego

Wykształcenie	Liczba kobiet bez cech infekcji HPV		Liczba kobiet z infekcją HPV wysokoonkogennym		Liczba kobiet z infekcją HPV niskoonkogennym		Liczba kobiet badanych	
	n	%	n	%	n	%	n	%
niepalące	163	81,5	1	0,5	2	1,0	168	84,0
palące	30	15,0	3	1,5	1	1,0	32	16,0
razem	193	96,5	4	2	3	2,0	200	100



Tab. V. Wskaźniki antropometryczne a onkogenność szczepów HPV

Wartości średnie wskaźników antropometrycznych	Kobiety bez cech infekcji HPV	Kobiety z infekcją wysokoonkogennymi HPV	Kobiety z infekcją niskoonkogennymi HPV	Wartości średnie u ogółu kobiet badanych
wzrost w cm	167,0	159,0	160,0	166,5
masa ciała w kg	64,2	73,0	62,7	65,7
BMI	25	29,0	24,7	25,6
wiek	30	54	32,3	34,8
ogółem liczebność	193	4	3	200

Tab. VI. Wywiad ginekologiczny a onkogenność szczepów HPV

Wywiad ginekologiczny	Kobiety bez cech infekcji HPV	Kobiety z infekcją wysokoonkogennymi HPV	Kobiety z infekcją niskoonkogennymi HPV	Ogółem kobiet badanych
wiek wystąpienia <i>menarche</i>	13,5	13,0	12,5	13,4
inicjacja seksualna	17,0	16	16,3	16,9
zmiany zapalne szyjki	8	3	1	12
ogółem liczebność	193	4	3	200

Tab. VII. Zachowania ryzykowne a onkogenność szczepów HPV

Wywiad dotyczący ryzyka infekcji	Kobiety bez cech infekcji HPV	Kobiety z infekcją wysokoonkogennymi HPV	Kobiety z infekcją niskoonkogennymi HPV	Ogółem kobiet badanych
liczba partnerów seksualnych w przeszłości	1 do 2	3 do 4	2 do 3	2 do 3
liczba kontaktów seksualnych w tyg.	3 do 4	1/4	4 do 5	3 do 4
czas (w latach) od poprzedniego badania ginekologicznego	1,7	7,5	3,7	2,1
liczba odbytych porodów	3	>4	2	3
ogółem liczebność	193	4	3	200

Tab. VIII. Choroby internistyczne a onkogenność szczepów HPV

Choroby internistyczne	Kobiety bez cech infekcji HPV		Kobiety z infekcją wysokoonkogennymi HPV		Kobiety z infekcją niskoonkogennymi HPV		Ogółem kobiet badanych	
	N	%	N	%	N	%	N	%
nadciśnienie tętnicze	1	0,5	2	0,5	0	0	3	1,5
cukrzyca	1	0,5	2	0,5	1	0,5	4	2,0
POChP	6	3,0	2	1,0	0	0	8	4,0
ogółem liczebność	193	96,5	4	2	3	1,5	200	100



Tab. IX. Choroby nowotworowe w rodzinie a onkogenność szczepów HPV

Obciążenie chorobami nowotworowymi	Kobiety bez cech infekcji HPV		Kobiety z infekcją wysokoonkogennymi HPV		Kobiety z infekcją niskoonkogennymi HPV		Ogółem	
	N	%	N	%	N	%	N	%
w I linii pokrewieństwa	3	1,5	2	1,0	1	0,5	6	3,0
w II linii pokrewieństwa	13	6,5	1	0,5	0	0	14	7,0
ogółem	16	8,0	3	1,5	1	0,5	20	10,0
liczebność grup	193	96,5	4	2,0	3	1,5	200	100

wirusem brodawczaka ludzkiego, badaniem wykonanym techniką PCR potwierdzono obecność DNA tego wirusa. Uzyskano jedynie w 2 przypadkach wyniki fałszywie dodatnie, to znaczy brak było potwierdzenia infekcji wirusem brodawczaka ludzkiego pomimo cech tej infekcji stwierdzanej w badaniu cytologicznym. Obserwacje innych autorów potwierdziły wysoki odsetek infekcji wirusem o wysokim stopniu onkogenności wynoszący ok. 59%. W naszych badaniach odsetek tych zakażeń był podobny (66,6%). Ponieważ atypowe rozrosty gruczołowe, jak i zmiany rozrostowe nabłonka tarczy części pochwowej wywołane są zakażeniem wirusem HPV, należy wnosić, że diagnostyka powinna obejmować zarówno tarczę, jak i kanał szyjki macicy [15].

Ciągle prowadzone są badania nad tym, jaki wpływ mają czynniki środowiskowe, stan układu immunologicznego, czynników genetycznych na zakażenie HPV i rozwój raka szyjki macicy. Wyodrębniono już kilka czynników ryzyka, które mają wpływ na zakażenie wirusem brodawczaka ludzkiego, np. liczba partnerów seksualnych, przeszłość seksualna partnera, choroby współistniejące, palenie papierosów, wywiad ginekologiczny, obciążający wywiad rodzinny w kierunku chorób nowotworowych, warunki socjalno-bytowe. Na zwiększone ryzyko wpływa też, stosowanie doustnych środków antykoncepcyjnych i niedobory niektórych składników dietetycznych, jak np. β -karotenu, witaminy C (86,88). Jak twierdzi Bertram [18] pomimo ogólnie reprezentowanego poglądu, iż stosowanie terapii hormonalnej ułatwia zakażenie wirusami brodawczaka ludzkiego w jego badaniach nie potwierdzono wzrostu ryzyka powstania jawnego lub latentnego zakażenia tym wirusem, to samo stanowisko reprezentuje Moodley [19]. W przeprowadzonych badaniach poddano analizie wiele czynników mogących mieć wpływ na zwiększenie ryzyka zakażenia wirusem brodawczaka ludzkiego.

Cechy zakażenia wirusem brodawczaka ludzkiego w populacji wiejskiej stwierdzono u 4% ogółu badanych. Podobną częstość podaje w populacji holenderskiej Meijer [20].

Analizując jeden z najlepiej poznanych czynników wpływających na rozwój różnych nowotworów, jakim jest nikotynizm stwierdzono, że u kobiet nałogowo pa-

lących papierosy częściej wystąpiła infekcja szczepami wirusa brodawczaka ludzkiego o wysokim ryzyku onkogenezy. Jednocześnie badania przeprowadzone przez Shieldsa i wsp. [16] wskazują na aż 2-krotny wzrost ryzyka zakażenia wirusami brodawczaka ludzkiego u kobiet nałogowo palących papierosy. Również obserwacje Boulanger'a wskazują na ten sam ścisły związek w populacji kobiet francuskich [3].

Ryzyko zakażenia wysokoonkogennymi typami HPV zmiennie wzrasta u kobiet palących i jednocześnie mających wielu partnerów oraz częste kontakty seksualne [21].

Do zakażenia wysokoonkogennymi szczepami wirusa brodawczaka ludzkiego dochodzi najczęściej w wieku 20–29 lat. Jak podaje Karube kobiety, u których wykryto zakażenie wirusami brodawczaka ludzkiego o szczególnie wysokim ryzyku onkogenezy (typ 16) były młodsze od grupy kobiet, u których wynik badania był negatywny [22]. Jednakże w badaniach przeprowadzonych w Wielkiej Brytanii w ostatnich latach stwierdzono wysoki odsetek zakażeń w grupie kobiet w wieku poniżej 25 lat – dotyczyło to ponad 18% badanej populacji, a w wieku 40 i więcej lat częstość zakażeń zmalała do 3% [23]. Wśród badanych kobiet, u których potwierdzono zakażenie wysokoonkogennymi szczepami wirusa średnia wieku była wyższa, co może sugerować przetrwanie zakażenia. Średnia wieku kobiet niezakażonych wirusem brodawczaka ludzkiego była niższa w stosunku do kobiet, u których stwierdzono infekcję HPV co różni się od obserwacji ww. badaczy.

Analizując wybrane cechy antropometryczne, jak wzrost, masę ciała i wynikający z nich współczynnik masy ciała stwierdzono, że kobiety zakażone wirusami brodawczaka ludzkiego o wysokim ryzyku onkogenezy są wyższe i mają wyższe wartości BMI niż kobiety zakażone wirusami o niskim ryzyku onkogenezy. Oceniono również jakość opieki medycznej na podstawie częstości wizyt kontrolnych u lekarza ginekologa i stwierdzono, iż częstość wizyt ginekologicznych nie ma istotnego znaczenia dla zakażenia HPV. W większości publikacji oceniających wpływ różnych czynników na częstość zakażeń wirusem brodawczaka ludzkiego podkreślana jest rola wczesnej inicjacji seksualnej oraz dużej liczby part-



nerów. Powoduje to wzrost ryzyka zakażenia tym wirusem oraz rozwoju raka szyjki macicy [11, 16, 21].

Jak wynika z przeprowadzonych badań, wczesna inicjacja seksualna nie miała wpływu na wzrost ryzyka zakażenia wysokoonkogennymi szczepami wirusa brodawczaka ludzkiego w porównywanych populacjach. Obserwacja ta różni się od danych uzyskanych przez innych autorów [16, 21, 24]. Również wczesne rozpoczęcie współżycia płciowego jest przez badaczy analizujących populacje Wenezueli i Stanów Zjednoczonych uznane za ważny czynnik ryzyka rozwoju raka szyjki macicy na tle zakażenia HPV [24].

Liczba partnerów seksualnych miała decydujący wpływ na wzrost ryzyka zakażeniem, zarówno szczepami o wysokim, jak i niskim ryzyku onkogenezy. W badaniach Branca [11] potwierdzono nie tylko silny związek pomiędzy zakażeniem onkogennymi szczepami wirusa brodawczaka ludzkiego a dużą liczbą partnerów seksualnych, lecz również aktywnością seksualną wyrażoną w częstotliwości kontaktów seksualnych w tygodniu. Uzyskane wyniki potwierdzają tę tezę wskazując, na to że częstość współżycia ma wpływ na zwiększenie ryzyka zakażenia zarówno szczepami o wysokiej, jak i niskiej onkogenności.

Według badań Bekkers i wsp. [1] ryzyko zakażenia wirusem brodawczaka ludzkiego u kobiet rozpoczynających współżycie seksualne sięga aż 50% w czasie 2 lat aktywności seksualnej.

Na podkreślenie zasługuje fakt, że współistnienie zakażenia *Chlamydia trachomatis* zwiększa ryzyko zachorowania na raka szyjki macicy [25, 26]. Z faktu tego można wysnuć wnioski o sensowności prowadzenia rozszerzonej diagnostyki, również w kierunku tego rodzaju zakażenia przenoszonego drogą płciową. Niejakkie zdziwienie może budzić obserwacja Hinkulą [27], wg którego ryzyko zachorowania na raka szyjki macicy wzrasta wraz z liczbą odbytych porodów u kobiet,

u których stwierdzono współistnienie zakażenia HPV i *Chlamydia trachomatis*. W naszych obserwacjach liczba odbytych porodów nie korelowała ze zwiększonym ryzykiem zakażenia HPV. Podsumowując badania, należy przychylić się do poglądów reprezentowanych przez Fehra i wsp., którzy twierdzą, iż jedynym prawidłowym sposobem postępowania zapobiegawczego jest wprowadzenie kombinacji dwóch metod diagnostycznych – badania rozmazu cytologicznego z tarczy i kanału szyjki macicy oraz badania w kierunku obecności wirusa brodawczaka ludzkiego wykonanego techniką genetyczną – PCR [27]. Ten sam pogląd prezentuje również Clavel [28], sugerując konieczność wykonywania badania PCR jedynie w kierunku HPV o wysokim ryzyku onkogenezy. Wykrycie badaniem PCR latentnej infekcji wysokoonkogennymi szczepami wirusa brodawczaka ludzkiego jest wg niektórych autorów najlepszym wskaźnikiem predykcyjnym ryzyka zachorowania na raka szyjki macicy [6, 7, 9, 11, 16].

Niektórzy autorzy sugerują rozszerzenie tego schematu diagnostycznego o badanie kolposkopowe, które niestety dla pacjentek na wsi było badaniem zupełnie niedostępnym. Większość autorów jednak jest zgodna, że przesiewowe badania cytologiczne powinny w przyszłości być zastąpione rutynowo wykonywanymi badaniami w kierunku obecności zakażenia wirusami brodawczaka ludzkiego o wysokim ryzyku onkogenezy [17, 20, 23, 28].

Wniosek

Potwierdzono związek pomiędzy występowaniem zakażenia szczepami HPV o wysokiej onkogenności a obecnością niektórych czynników ryzyka, w szczególności paleniem papierosów i dużą liczbą partnerów seksualnych oraz byłych partnerek seksualnych partnera.

Summary

Objectives: *The presence of human papilloma virus DNA-chain is observed in more than 90% cases of cervical cancer. The progress of neoplasia formation is depended on some known risk factors. Design. The aim of this study was to find the presence of human papilloma virus infection the presence of risk factors of infection and to evaluate the group of high or low risk of neoplasia formation viruses in rural region of Poland.*

Material and methods: *The study was conducted in Slubice region in 2002-2003. The study group consisted of 200 women in age of 18-65. The Pap-smears were done and the samples for PCR method of HPV-infection diagnosis from the uterine cervix. The presence of HPV-infection risk factors was estimated.*

Results and conclusion: *We found 4% abnormal results of cervical cytology and in 3.5% of DNA HPV presence in PCR method. 50% of infected woman had HPV of high risk of neoplasia and 37.5 % of low risk, in one case the PCR result was negative. We found the correlation between high risk HPV infection and cigarette smoking, high rate of sexual relationships and previous sexual relationships of the partner.*

Key words: *HPV, carcinoma colli uteri, risk factors, diagnosis*



Piśmiennictwo

1. Bekkers RL, Massuger LF, Bulten J, et al. *Epidemiological and clinical aspects of human papillomavirus detection in the prevention of cervical cancer*. Rev Med Virol 2004; 14 (2): 95-105.
2. Bosch FX, Rohan T, Schneider A, et al. *Papillomavirus research update: highlights of the Barcelona HPV 2000 international papillomavirus conference*. J Clin Pathol 2001; 54: 163-75.
3. Boulanger JC, Sevestre H, Bauville E, et al. *Epidemiology of HPV infection*. Gynecol Obstet Fertil 2004; 32 (3): 218-23.
4. Ejsmoncka-Ambroziak A, Wilczyńska-Zajac A, Kijańczyk M. *Cytodiagnostyka raka szyjki macicy – skuteczność profilaktyki biernej*. Gin Pol 2000; 71: 1158-63.
5. Elfgrén K, Kalantari M, Moberger B, et al. *A population-based five-year follow-up study of cervical human papillomavirus infection*. Am J Obstet Gynecol 2000; 183: 561-7.
6. Ylitalo N, Sorensen P, Josefsson AM, et al. *Consistent high viral load of human papillomavirus 16 and risk of cervical carcinoma in situ: a tested case-control study*. Lancet 2000; 355: 2194-8.
7. Villa LL, Sichero L, Rahal P, et al. *Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia*. J Gen Virol 2000; 81: 2959-68.
8. Agoff SN, Lin Q, Morihara J. *p16 INK 4a expression correlates with degree of cervical neoplasia: a comparison with Ki 67 expression and detection of high-risk HPV type*. Mod Pathol 2003; 16: 665-73.
9. Bergeron C, Jeannel D, Poveda J, et al. *Human papillomavirus testing in women with mild cytologic atypia*. Obstet Gynecol. 2000; 95: 821-27.
10. Winer RL, Lee SK, Hughes JP, et al. *Genital human papillomavirus infection: incidence and risk factors in a cohort of female university students*. Am J Epidemiol 2003; 157: 218-26.
11. Branca M, Costa S, Mariani L, et al. *Assessment of risk factors and human papillomavirus (HPV) related pathogenic mechanisms of CIN in HIV-positive and HIV-negative women. Study design and baseline data of the HPV-Pathogen ISS study*. Eur J Gynaecol Oncol 2004; 25 (6): 689-98.
12. Jones BA, Novis DA. *Follow-up of abnormal gynecologic cytology: a college of American pathologists Q-probes study of 16132 cases from 306 laboratories*. Arch Pathol Lab Med 2000; 124: 665-71.
13. Zur Hausen H. *Cervical carcinoma and human papillomavirus: on the road to preventing a major human cancer*. J Natl Cancer Inst 2001; 93: 252-3.
14. Castle PE, Hiller SL, Rabe LK, et al. *An association of cervical inflammation with high-grade cervical neoplasia in women infected with oncogenic human papillomavirus (HPV)*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2001; 10: 1021-7.
15. Olszak A. *Badania nad korelacją rozrostów nabłonka wielowarstwowego płaskiego i gruczołowego szyjki macicy w aspekcie zakażenia HPV*. Rozprawa doktorska, Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi 2004.
16. Shields TS, Brinton LA, Burk RD, et al. *A case-control study of risk factors for invasive cervical cancer among U. S. women exposed to oncogenic types of human papillomavirus*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2004; 13 (10): 1574-82.
17. Cubie H, Seagar A, McGoogan E, et al. *Rapid real time PCR to distinguish between high risk human papillomavirus types 16 and 18*. Mal Pathol 2001; 54: 24-9.
18. Bertram CC. *Evidence for practice: oral contraception and risk of cervical cancer*. J Am Acad Nurse Pract. 2004; 16 (10): 455-61.
19. Moodley J. *Combined oral contraceptives and cervical cancer*. Curr Opin Obstet Gynecol 2004; 16 (1): 27-9.
20. Meijer CJLM, Walboomers JMM. *Cervical cytology after 2000: where to go?* J Clin Pathol 2000; 53: 41-3.
21. Sierra-Torres CH, Tying SA, Au WW. *Risk contribution of sexual behavior and cigarette smoking to cervical neoplasia*. Int J Gynecol Cancer 2003; 13 (5): 617-25.
22. Karube A, Sasaki M, Tanaka H, et al. *Human papillomavirus type 16 infection and the early onset of cervical cancer*. Biochem Biophys Res Commun 2004; 323 (2): 621-4.
23. Peto J, Gilham C, Deacon J, et al. *Human HPV infection and neoplasia in a large population-based prospective study: the Manchester cohort*. Br J Cancer 2004; 31; 91 (5): 942-53.
24. Au WW. *Life style, environmental and genetic susceptibility to cervical cancer*. Toxicology 2004 20; 198 (1-3): 117-20.
25. Anttila T, Saiku P, Koskela P, et al. *Serotypes of Chlamydia trachomatis and risk for development of cervical squamous cell carcinoma*. JAMA 2001; 285: 47-51.
26. Claas EC, Melchers WJ, Niesters HG, et al. *Infections of the cervix uteri with human papillomavirus and Chlamydia trachomatis*. J Med Virol 1992; 37: 54-7.
27. Hinkula M, Pukkala E, Kyronen P, et al. *A population-based study on the risk of cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia among grand multiparous women in Finland*. Br J Cancer 2004; 90 (5): 1025-9.
28. Fehr MK, Welti S. *Human papillomavirus testing in cervical cancer screening*. Gynacol Geburtshilfliche Rundsch 2004; 44 (3): 131-37.
29. Clavel C, Cucherousset J, Lorenzato M, et al. *Negative human papillomavirus testing in normal smears selects a population at low risk for developing high-grade cervical lesions*. Br J Cancer 2004; 90 (9): 1803-80.

Adres do korespondencji

prof. dr hab. n. med. **Urszula Kowalska-Koprek**
Klinika Patologii Cięży
I Katedra Ginekologii i Położnictwa
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
ul Wileńska 37
94-029 Łódź

