

Zakażenie HPV i jego związek z nowotworami złośliwymi

HPV infection and HPV-related malignancies

Заражение вирусом бородавки человека и его связь со злокачественными

новообразованиями

¹ Katedra Ginekologii i Położnictwa CMUJ w Krakowie, ul. Kopernika 23, 31-501 Kraków, tel.: 12 424 85 60, faks: 12 424 85 84

² Northwestern University, 633 Clark Street, Evanston, IL 60208 Evanston, tel.: +18474913741, Chicago, USA

³ Centrum Onkologii, Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie Oddział w Krakowie, ul. Garncarska 11, 31-115 Kraków, tel.: 12 422 99 00

⁴ Katedra Biochemii Lekarskiej CMUJ w Krakowie, ul. Kopernika 7, 30-105 Kraków, tel.: 12 424 70 00

Correspondence to: Katedra Ginekologii i Położnictwa, Klinika Ginekologii, Położnictwa i Onkologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, ul. Kopernika 23, 31-501 Kraków, tel.: 12 424 85 60, faks: 12 424 85 84, e-mail: jach@cm-uj.krakow.pl

Source of financing: Department own sources

Streszczenie

Zakażenie HPV jest najczęstszą chorobą przenoszoną drogą płciową. Rocznie rozpoznaje się około 5 500 000 nowych zakażeń. Spośród 100 typów wirusów HPV 40 określa się mianem genitalnych z uwagi na ich preferencyjne występowanie w nabłonku okolic sromu, pochwy, szyjki macicy, penisa i okolicy anogenitalnej. Przetrwale zakażenie wywołane przez typy 16., 18., 31., 33., 35., 39., 45., 51., 52., 56., 58., 59. wiąże się z wysokim ryzykiem rozwoju raka, przy czym typ 16. jest wykrywany w 50-55% przypadków inwazyjnego raka szyjki macicy. Pewne rozpoznanie zakażenia HPV w każdym stadium cyklu życiowego wirusa zapewniają molekularne metody wirusologiczne, a oznaczenie DNA HPV nabiera znaczenia jako procedura uzupełniająca badanie cytologiczne. Obiecujące możliwości diagnostyczne rozpoznania przetrwałego zakażenia HPV niesie ze sobą test oparty na wykrywaniu aktywnych onkogenów E6 i E7 wirusów HPV poprzez analizę transkryptów mRNA. Pozwala on określić nie tylko obecność, ale również aktywność wirusa, w tym rozpoczęcie transkrypcji, czyli najwcześniejszy etap karcinogenezy. Ma zastosowanie również wśród kobiet zakażonych typami wirusów HPV nienależącymi do grupy wysokoonkogennych. Przeważająca większość przypadków raka sromu, pochwy oraz odbytu związana jest z zakażeniem wirusem HPV. Częstość występowania nowotworów okolicy płciowo-odbytniczej znacząco zwiększyła się w ostatnich latach. Z uwagi na stały wzrost liczby zakażeń HPV należy w przyszłości spodziewać się diagnozowania większej liczby przypadków raków okolicy anogenitalnej i ich zmian prekursorowych. Dlatego też obecne badania epidemiologiczne koncentrują się na włączeniu testowania HPV (DNA HPV, mRNA HPV oraz genów wczesnych HPV) do programu masowych badań skryningowych raka szyjki macicy.

Słowa kluczowe: zakażenie HPV, rak, typ HPV, śródnabłonkowa neoplazja, pozasztykowe zakażenie HPV

Summary

Human papillomavirus (HPV) infection is the most frequent sexually transmitted disease. According to current estimates, there are about 5 500 000 new infections diagnosed annually. Among about 100 known types of HPV, 40 are designed as genital due to their preferential affinity to vulvar, vaginal, cervical, penile and anogenital epithelium. Chronic infection with types 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 and 59 is associated with an elevated risk of malignant transformation, whereby the type 16 is detected in 50-55% of cases of invasive cervical cancer. Certain diagnosis of HPV infection at every stage of viral life cycle is provided by molecular virological techniques, while detection of viral DNA gains a novel significance as an adjunct to cytological study. Promising diagnostic potential in the setting of chronic HPV infections is associated with the test based on analysis of mRNA transcripts, enabling detection of active oncogenes E6 and E7 of the virus. This enables not only to confirm the presence of virus as such, but also to determine its activity gauged by initiation of transcription, i.e. the earliest phase of carcinogenesis. This is most useful the management of women infected by non-highly oncogenic HPV types. Most vulvar, vaginal and anal cancers are associated with HPV infection.

Recently, the incidence of anogenital malignancies is increasing significantly. In view of continuously increasing number of HPV infections, it is reasonable to expect an increased number of anogenital malignancies and precursor lesions thereof, being diagnosed in the near future. Therefore, current epidemiological studies focus on inclusion of HPV testing (HPV DNA, HPV mRNA and early HPV genes) into large-scale screening programs for cervical cancer.

Key words: HPV infection, cancer, HPV type, intraepithelial neoplasia, extracervical HPV infection

Содержание

Заражение вирусом бородавки человека (сокращенное название на английском языке – ХПВ) является наиболее частой болезнью, которая передается половым путем. Ежегодно распознается около 5,5 млн. новых заболеваний. Среди 100 видов вируса ХПВ 40 определяется как генитальные принимая во внимание факт их проявления главным образом в эпителии, области вульвы, влагалища, шейки матки, мужского полового члена и аногенитальной области. Сохранившееся долгое время заражение вызванное вирусом вида 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 связано с большим риском развития рака, при чем вид 16 обнаруживается у 50-55% случаев инвазивного рака шейки матки. Определенное обнаружение заражения ХПВ в каждой стадии жизненного цикла гарантируют молекулярные вирусологические методы, а определение ДНК ХПВ приобретает значение в качестве процедуры дополняющей цитологическое исследование. Обещающие диагностические возможности распознавания долго сохранившегося заражения ХПВ содержит тест основанный на открытии активных онкогенов Э6 и Э7 вирусов ХПВ путем анализа транскрипций мРНА. Это дает возможность определения не только наличия, но также активности вируса, в том числе начала транскрипции или самой ранней стадии канцерогенеза. Упомянутый метод применяется также среди женщин заражаемых разными видами вируса ХПВ, которые не принадлежат к группе высокоонкогенных. Преобладающее большинство случаев рака вульвы, влагалища и заднего прохода связано с заражением вирусом ХПВ. Частота появления новообразований в половой области и заднем проходе значительно увеличилась в последнее время. В связи с постоянно увеличивающимся количеством заражений ХПВ следует в будущем ожидать диагностирования большого количества случаев новообразований в аногенитальной области и их предвестниковых изменений. Поэтому также проводимые в настоящее время эпидемиологические исследования концентрируются на включении тестов ХПВ, ДНК ХПВ, мРНА ХПВ и ранних генов ХПВ в программах массовых скрининговых исследований рака шейки матки.

Ключевые слова: заражение ХПВ, рак, вид ХПВ, эндотелиальная неоплазия, внешнее заражение ХПВ

WSTĘP

Dzisiaj już nikt na świecie nie kwestionuje roli przewlekłego zakażenia onkogennymi typami HR HPV (*high-risk human papillomavirus*) nie tylko w samej inicjacji śród nabłonkowej neoplazji (*cervical intraepithelial neoplasia*, CIN), ale także w progresji zmian neoplastycznych, które w efekcie prowadzą do powstania przedinwazyjnego, a następnie inwazyjnego raka szyjki macicy. Znaczną część wiedzy o biologii wirusa brodawczaka ludzkiego, jak również o molekularnym mechanizmie prowadzącym do rozwoju śród nabłonkowej neoplazji szyjki macicy potrafimy obecnie wykorzystać w praktyce. Wyraża się to między innymi we wprowadzeniu szczepień profilaktycznych przeciwko zakażeniu HPV oraz w próbach modyfikacji dotychczas obowiązujących algorytmów postępowania w standardzie wykrywania śród nabłonkowej neoplazji szyjki macicy u kobiet z nieprawidłowym wynikiem badania cytologicznego, zwłaszcza w przypadku najczęściej formułowanego nieprawidłowego wyniku, jakim jest ASC. W Wielkiej Brytanii w latach 2003-2004 na 4 miliony wykonanych badań cytologicznych ASC-US stanowiło 3,8%. Dla porównania rozpoznania SIL było około 1,2%. Pamiętając, że około 20% wymazów ocenionych jako ASC współlistnieje ze zmianą patologiczną szyjki macicy różnego stopnia łącznie z rakiem⁽¹⁾, należy podkreślić, że niekorzystna wartość predykcyjna rozpoznania ASC-US jest

INTRODUCTION

Nowadays nobody calls into question the role of chronic infection by oncogenic types of HPV (high-risk HPV), not only in initiation of cervical intraepithelial neoplasia (CIN), but also in progression of malignant lesions which result in the development of preinvasive and ultimately – invasive cervical cancer. Much of the knowledge concerning HPV biology, as well as molecular mechanism leading to the development of CIN within the uterine cervix, we are able now to put into practice. An example thereof is the introduction of preventive vaccination against HPV and current attempts at modification of algorithms of standard management of CIN in women with abnormal result of cytological study, particularly in the case of the most frequent pathological finding – atypical squamous cells (ASC). In Great Britain, since 2003 thru 2004, out of 4 millions of cytological studies performed, the rate of ASC-US (undetermined significance) was 3.8%, compared with 1.2% of squamous intraepithelial neoplasia (SIL). Noteworthy is that while about 20% of smears interpreted as ASC may coexist with a cervical pathology of varying degree, including frank cancer⁽¹⁾, unfavorable predictive value of ASC-US is debatable if such a diagnosis is not accompanied by a positive molecular test for the presence of DNA HR HPV. Algorithm of diagnostic management of women with ASC-US, agreed

jednak wątpliwa, jeżeli rozpoznaniu temu nie towarzyszy dodatni wynik molekularnego testu na obecność DNA HR HPV. W rekomendowanym między innymi przez uczestników Konferencji Bethesda 2001 algorytmie postępowania diagnostycznego u kobiet z ASC-US zaleca się wykonanie certyfikowanego testu na obecność DNA HR HPV⁽²⁾. Pozytywny wynik badania wirusologicznego jest wskazaniem do wykonania kolposkopii, w celu rozważenia decyzji o pobraniu wycinków celowanych. Niekorzystne znaczenie prognostyczne jednoznacznie wiąże się z obecnością nie incydentalnego, ale przetrwałego zakażenia wywołanego onkogennymi typami HPV.

WIRUS HPV

Wirusy HPV (*human papillomaviruses*) są małymi wirusami DNA składającymi się z kulistego genomu zbudowanego z około 8000 par zasad otoczonego ikozahedralnym kapsydem wirusowym zbudowanym z dwóch białek: L1 i L2 (rys. 1). Dotychczas zidentyfikowano molekularnie ponad 100 typów HPV, spośród których ponad 40 określa się mianem typów genitalnych, z uwagi na ich preferencyjne występowanie w nabłonku wielowarstwowym błon śluzowych i skóry sromu, pochwy, szyjki macicy, penisa i okolicy anogenitalnej. Sporadycznie typy te zakażają inne rejony ciała. Najczęściej występujące typy genitalnych HPV przedstawiono w tabeli 1.

Genitalne typy HPV można podzielić na trzy podgrupy: 1) wirusy wysokiego ryzyka (*high-risk*) lub karcinogenne, związane z wysokim względnym ryzykiem rozwoju raka szyjki macicy, 2) wirusy niskiego ryzyka (*low-risk*), związane z rozwojem łagodnych nabłonkowych zmian proliferacyjnych w okolicy płciowej, ale nie z rakiem inwazyjnym szyjki macicy, oraz 3) grupę sześciu typów wirusów kwalifikowanych jako „prawdopodobnie karcinogenne”, gdyż istnieją niepełne dane dotyczące ich związku z rakiem szyjki macicy^(3,4).

Wirusy brodawczaka ludzkiego o wysokim potencjale onkogenym (*high-risk human papillomavirus*, HR HPV) są przekazywane z osoby na osobę w trakcie kontaktu seksualnego i powodują powstawanie niewidocznych zmian dysplastycznych w obrębie narządu płciowego. Do zakażenia dochodzi również

upon by participants of the 2001 Bethesda Conference, performance of certified test for the presence of DNA HR HPV is recommended⁽²⁾. Positive result of virological study is an indication for colposcopy in order to obtain guided samples. Unfavorable prognostic significance is unequivocally associated with the presence of a chronic (not incidental) infection by oncogenic HPV.

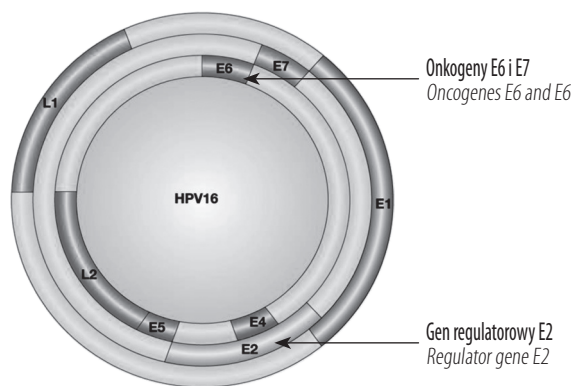
HPV VIRUS

Human papillomavirus is a small DNA virus, composed of a spherical genome consisting of about 8000 pairs of bases, surrounded by icosahedral viral capsid made up of 2 proteins: L1 and L2 (fig. 1). To date, molecular survey enabled identification of over 100 types of HPV, thereof over 40 are defined as genital, due to their preferential affinity to squamous epithelium of mucous membranes and skin within the vulva, uterine cervix, penis and anogenital area. Only sporadically do these viral types infest other body areas. Most common types of genital HPV are presented in table 1.

Genital HPV may be subdivided into 3 subgroups: 1) high-risk or carcinogenic, associated with high relative risk of development of cervical cancer, 2) low-risk, associated with the development of benign epithelial proliferative lesions in the genital area (but not invasive cervical cancer) and 3) a family of 6 viral types classified as “probably carcinogenic” as convincing evidence on their correlation with cervical cancer is lacking^(3,4).

HPV with high oncogenic potential (high-risk HPV, HR HPV) are transferred from person to person during sexual intercourse and cause invisible dysplastic lesions within the genital organs. Infection may also result from intercourse without penetration, which is very popular among young people. As these HPV subtypes usually do not cause any serious disease, infected persons do not report for treatment. HR HPV are thus very widespread in the general population. It is estimated that over 80% of people acquire HR HPV infection at some point of their life.

In spite of their widespread presence, most HR HPV infections are transient, as long as host’s efficient immune system (mainly cell-dependent) is able to control the infection, usually within up to 18 months. Nevertheless, in a small proportion of infected persons, these viruses may cause chronic infection.



Rys. 1. Schemat organizacji genomu HPV (DNA)
Fig. 1. Scheme of organization of HPV genome

Klasyfikacja Classification	Typy HPV HPV types
Wysokiego ryzyka lub karcinogenne High-risk or carcinogenic	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59.
Prawdopodobnie karcinogenne Probably carcinogenic	26, 53, 66, 68, 73, 82.
Niskiego ryzyka (<i>low-risk</i>) Low-risk	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, 89.

Tabela 1. Klasyfikacja genitalnych typów HPV
Table 1. Classification of genital HPV types

	Częstość występowania (na 100 000) <i>Prevalence (per 100 000)</i>	Zasięg DNA HPV (%) <i>Penetration of HPV DNA (%)</i>	HPV 16 wśród HPV+ (%) <i>Proportion of HPV 16 among HPV+ (%)</i>
Srom <i>Vulva</i> VIN3 <i>VIN3</i> Brodawkakowo-bazaloidalny <i>Papillary-basaloid</i> Płaskonabłonkowy <i>Squamous cell</i>	0,0-3,5	72-100 75-100 2-23	65-93 NA 71
Pochwa <i>Vagina</i> VaIN <i>VaIN</i> Płaskonabłonkowy <i>Squamous cell</i>	0,0-1,5	82-100 64-91	67-75 70-88
Penis <i>Penis</i> PIN <i>PIN</i> Brodawkakowo-bazaloidalny <i>Papillary-basaloid</i> Płaskonabłonkowy <i>Squamous cell</i>	0,0-3,7	90 46-100 31-35	41 60-88 60-75
Odbyt <i>Anus</i> AIN <i>AIN</i> Płaskonabłonkowy <i>Squamous cell</i>	0,1-28 M/0,0-2,2 K <i>0.1-28 M/0.0-2.2 W</i>	NA >80	NA 76
Jama ustna, gardło, migdałki <i>Oral cavity, throat, tonsils</i>	0,3-21,5 M/0,0-2,8 K <i>0.3-21.5 M/0.0-2.8 W</i>	33-72	72-87
HPV+ – osoby z DNA HPV-dodatnim testem; AIN – <i>anal intraepithelial neoplasia</i> ; PIN – <i>penile intraepithelial neoplasia</i> ; VaIN – <i>vaginal intraepithelial neoplasia</i> ; VIN – <i>vulvar intraepithelial neoplasia</i> HPV+ – persons with a positive result of HPV DNA test; AIN – <i>anal intraepithelial neoplasia</i> ; PIN – <i>penile intraepithelial neoplasia</i> ; VaIN – <i>vaginal intraepithelial neoplasia</i> ; VIN – <i>vulvar intraepithelial neoplasia</i>			

Tabela 2. Epidemiologiczne cechy HPV i raków innych niż rak szyjki macicy

Table 2. Epidemiological features of HPV and tumors other than cervical cancer

podczas niepenetracyjnych kontaktów seksualnych, bardzo rozpowszechnionych wśród młodych ludzi. Ponieważ te typy HPV nie powodują zazwyczaj poważnej choroby, osoby zakażone nie zgłaszają się do leczenia. Wirusy HPV o wysokim potencjale onkogennym (HR HPV) są z tego względu bardzo rozpowszechnione w populacji ogólnej – szacuje się, że ponad 80% ludzi nabywa zakażenie HR HPV na którymś etapie swojego życia.

Pomimo dużego rozpowszechnienia większość zakażeń wirusami HPV o wysokim potencjale onkogennym ma charakter przejściowy, gdyż sprawny układ immunologiczny (głównie komórkowy) osoby zakażonej zwalcza je, maksymalnie do 18 miesięcy. Niemniej jednak u niewielkiego odsetka osób zakażonych wirusy te spowodują tzw. przewlekłe zakażenie. W szczególnych regionach nabłonkowych szyjki macicy, takich jak strefa przekształceń, gdzie odbywa się proces metaplastji płaskonabłonkowej przy udziale niezróżnicowanych i niedojrzałych komórek rezerwowych, wrażliwych na egzogenne i endogenne czynniki onkogenne, w tym także na przewlekłe zakażenie HPV, może dojść do progresji zmian neoplastycznych do dysplazji oraz raka szyjki macicy. Rak szyjki macicy dotyka rocznie około 500 000 kobiet w skali światowej i jest przyczyną około 250 000 zgonów. Jest to drugi najczęstszy nowotwór złośliwy wśród kobiet. Praktycznie

In particular epithelial areas of uterine cervix, e.g. transitional zone, where planoepithelial metaplasia takes place involving non-differentiated and immature reserve cells, susceptible to exo- and endogenous oncogenic factors, including also chronic HPV infection, this may result in malignant transformation, leading to dysplasia and frank cervical cancer. Every year, cervical cancer affects about 500 000 women worldwide and causes about 250 000 deaths. This is the second most frequent malignancy in the females. In fact, nearly each case of cervical cancer (99.7%) is associated with the presence of HR HPV.

Current strategy aiming at cervical cancer control is essentially a double-track one, based on preventive vaccinations against defined HPV types and early detection by cytological screening tests. Unfortunately, vaccinations do not protect against all highly oncogenic HPV types, therefore not providing complete protection against cervical cancer. High cost of preventive vaccination constitute an effective barrier to implementation of large-scale vaccination programs in developing countries, where the incidence of cervical cancer is highest. In developed countries, e.g. Great Britain, the incidence of cervical cancer remains very low, as a result of cervical cancer screening program introduced 20 years ago. In Poland, a structured, national program of cervical cancer prevention by cytological

każdemu przypadkowi raka szyjki macicy (99,7%) towarzyszą wirusy HPV o wysokim potencjale onkogenym.

Obecnie strategia zwalczania raka szyjki macicy przebiega dwutorowo: poprzez szczepienia profilaktyczne przeciwko określonym typom HPV oraz poprzez cytologiczne badania przesiewowe. Niestety, szczepienia nie zabezpieczają przed zakażeniem wszystkimi typami wysoce onkogenych wirusów HPV i dlatego nie stanowią pełnego zabezpieczenia przed zachorowaniem na raka szyjki macicy. Wysokie koszty szczepienia profilaktycznego stanowią barierę przed wprowadzeniem powszechnych programów szczepiennych w krajach rozwijających się, w których częstość występowania raka szyjki macicy jest największa. W krajach rozwiniętych, takich jak Wielka Brytania, częstość występowania raka szyjki macicy utrzymywana jest na bardzo niskim poziomie, dzięki wprowadzonemu 20 lat temu programowi skryningu raka szyjki macicy. W Polsce zorganizowany powszechny program profilaktyki raka szyjki macicy z użyciem cytologii został wprowadzony w 2006 roku. W trakcie skryningu cytologicznego wykrywa się nieprawidłowości cytologiczne w komórkach pobranych z powierzchni szyjki macicy przy pomocy rozmazu cytologicznego. Skryning cytologiczny jest skuteczny w zmniejszeniu zachorowania na raka szyjki macicy w takich krajach jak Wielka Brytania, niemniej wymaga stworzenia sieci wysoko wyszkolonych cytologów, a odsetek wyników fałszywie ujemnych badania cytologicznego jest wysoki (sięga 20%). W krajach zachodnich szczepienia profilaktyczne prowadzone są wraz ze skryningiem cytologicznym (od 2008 roku). Powszechnie uważa się, że szczepienia te znacząco zredukują częstość występowania zakażeń pewnymi typami wirusów HPV o wysokim potencjale onkogenym w ogólnej populacji i dlatego w najbliższej przyszłości będzie potrzebny szybszy, mniej kosztowny i zarazem efektywniejszy model skryningu raka szyjki macicy. Obecne wysiłki naukowe zogniskowane są na zastosowaniu w badaniach skryningowych biomarkerów.

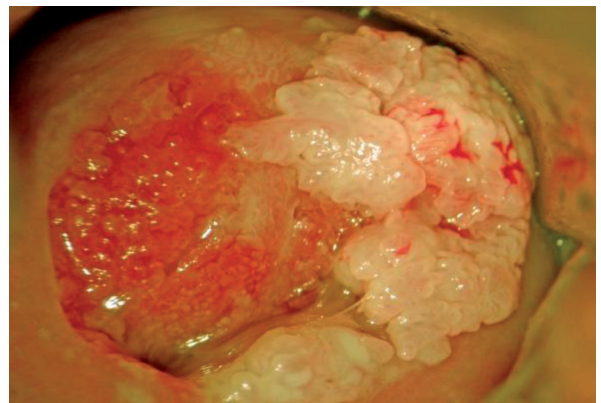
ROZPOZNAWANIE ZAKAŻENIA HPV

Wiadomo, że zmiany morfologiczne wykrywane w trakcie badania cytologicznego rozmazów pochwowych szyjki macicy charakterystyczne dla subklinicznej infekcji HPV (*subclinical papillomavirus infection*, SPI) są trudne do odróżnienia od zmian morfologicznych charakterystycznych dla LSIL. Wiąże się to z faktem, że SPI i CIN są kontynuacją tego samego procesu⁽⁵⁾. Basta na podstawie 20-letnich badań nad infekcją HPV w obrębie szyjki macicy i jej związkiem z karcinogenezą podał własny podział zakażeń HPV i określił znaczenie kolposkopii w ich wykrywaniu⁽⁶⁾. Podział wg Basty wyróżnia zmiany: a) klinicznie jawne – zmiany brodawczakowate (rys. 2-4) oraz ogniska leukoplakii (rys. 5), b) subkliniczne – widoczne tylko w badaniu kolposkopowym i morfologicznym (do cytologicznych kryteriów zakażenia HPV zaliczają się następujące obrazy cytologiczne: dyskretna anizocytoza, *cracked cells*, komórki bezjądrzaste, komórki wielojądrzaste powierzchniowe oraz komórki z niedojrzałą metaplastją), c) utajone – zakażenie HPV możliwe jest do wykrycia tylko przy pomocy technik biologii

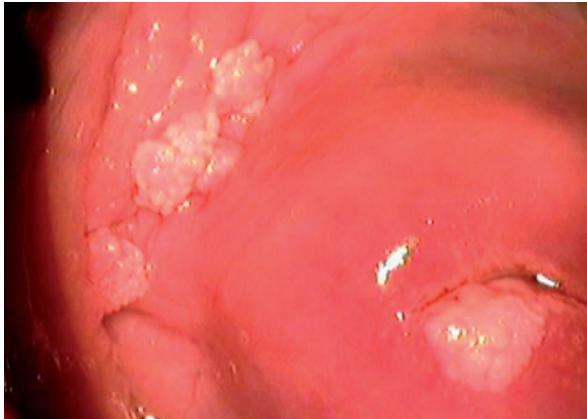
screening studies was introduced in 2006. Cytological screening may detect abnormalities in cells collected from cervical surface by smear technique. Cytological screening effectively reduced the prevalence of cervical cancer in such countries as Great Britain, but it requires creation of network of well trained cytologists, while the proportion of false-negative results of cytological study is high and may even reach 20%. In Western countries, preventive vaccinations are carried out concomitantly with cytological screening since 2008. In general opinion, such vaccinations may significantly reduce the incidence of infections by certain HPV types with high oncogenic potential in general population, therefore a more rapid, less expensive and more effective model of cervical cancer screening will be needed in near future. Current research is focused on the use of biomarkers in screening tests.

DIAGNOSIS OF HPV INFECTION

As is known, morphological alterations detected during cytological study of cervical smears, which are characteristic for subclinical HPV infection (*subclinical papillomavirus infection*, SPI) are hard to differentiate from morphological lesions characteristic for low-grade squamous intraepithelial lesion (LSIL). This is associated with the fact that both SPI and cervical intraepithelial neoplasia (CIN) are phases of the same process⁽⁵⁾. Basta, based on his 20-year-long studies in HPV cervical infection and its relation to carcinogenesis, proposed an own classification of HPV infections and defined the role of colposcopy in their detection⁽⁶⁾. Basta's classification marks out: a) clinically manifest lesions (*papillomatous lesions*) (fig. 2-4) and foci of leukoplakia (fig. 5), b) subclinical lesions, visualized only by colposcopic or cytological studies (cytological criteria of HPV infection include the following cytological findings: discrete anisocytosis, *cracked cells*, cells with no nucleus, superficial polynuclear cells and cells featuring immature metaplasia), c) occult HPV infection, detectable only using molecular techniques, and d) HPV infection coexisting with CIN or invasive cervical cancer.



Rys. 2. Typowy brodawczak płaskonabłonkowy. Charakterystyczna brodawczakowata powierzchnia w obrębie strefy transformacji
Fig. 2. Typical appearance of planoepithelial papilloma. Characteristic papillary surface within the transformation zone



Rys. 3. Typowy brodawczak płaskonabłonkowy w obrębie strefy T i sklepień pochwy

Fig. 3. Typical planoepithelial papilloma at the T-zone and vaginal fornices

molekularnej, oraz d) współistniejące z śródnabłonkową neoplazją lub rakiem inwazyjnym szyjki macicy.

Pewne rozpoznanie zakażenia HPV w każdym stadium cyklu życiowego wirusa zapewniają molekularne metody wirusologiczne:

- 1) amplifikacja wyodrębnionego fragmentu DNA HPV (ang. *polymerase chain reaction*, PCR);
- 2) hybrydacja kwasów nukleinowych (Dot blot, Southern blot), umożliwiającą wykrycie całego genomu wirusa;
- 3) hybrydacja *in situ*, pozwalającą na wykrycie HPV i jego lokalizację w komórce (czułość około 100 kopii HPV na komórkę);
- 4) Hybrid Capture System (ViraPap/ViraType), NucliSENS (bioMérieux) – metoda pozwalająca na wykrycie wirusowych transkryptów (mRNA E6/E7 typów 16./18., 31., 33. i 45.); test oparty jest na wykrywaniu aktywnych onkogenów E6 i E7 wirusów HPV poprzez analizę transkryptów mRNA przy użyciu techniki NASBA (*nucleic acid sequence-based amplification*), co umożliwia określenie aktywności wirusa (stwierdzenie przewlekłego zakażenia HPV, rozpoczęcie transkrypcji, a więc najwcześniejszego etapu karcinogenezy);
- 5) Hybrid Capture 2 (HC2) (Digene Qiagen).

Według danych IARC (Międzynarodowej Agencji Badań nad Rakiem z siedzibą w Lyonie) i amerykańskiego NCI (Narodowego Instytutu Raka) częstość występowania DNA HPV wśród kobiet z prawidłowymi wynikami badania cytologicznego waha się od 7,9% w Europie do 22,1% w Afryce. Dlatego w wielu krajach rozpoczęto badania kliniczne i skryningowe programy pilotażowe z wykorzystaniem oznaczenia DNA HPV. Przykładowo w USA traktuje się oznaczenie DNA HPV jako uzupełnienie cytologii u kobiet po 30. roku życia. Badanie to ma wyższą czułość i wysoką ujemną wartość predykcijną (*negative predictive value*, NPV) w porównaniu z cytologią (>99% vs 96%). Z kolei czułość DNA HPV w porównaniu z cytologią wynosi 96-98% vs 53-73%⁽⁷⁾. Obecnie w USA jedynym dopuszczonym do stosowania klinicznego testem na obecność HPV jest badanie Hybrid Capture 2 (HC2), które wykrywa obecność jednego lub kilku spośród 13 onkogennych typów HPV. HC2 ma obecnie zastosowanie w dwóch przypadkach, mianowicie



Rys. 4. Olbrzymie kłykiciny kończyste (Buschkego-Loewensteina)

Fig. 4. Giant condylomata acuminata (Buschke-Loewenstein tumor)

Certain diagnosis of HPV infection at every phase of viral life cycle is possible using molecular virological techniques:

- 1) amplification of isolated DNA segment of HPV (polymerase chain reaction, PCR);
- 2) hybridization of nucleic acids (Dot blot, Southern blot), enabling detection of the entire viral genome;
- 3) *in situ* hybridization, enabling detection of HPV and its location in the cell (sensitivity threshold: 100 HPV copies per cell);
- 4) Hybrid Capture System (ViraPap/ViraType), NucliSENS (bioMérieux) – a technique enabling detection of viral transcripts (mRNA E6/E7 of viral types 16/18, 31, 33 and 45); the test relies in detection of active HPV oncogenes E6/E7 by analysis of mRNA transcripts using the NASBA technique (nucleic acid sequence-based amplification), enabling determination of viral activity (diagnosis of chronic HPV infection, initiation of transcription and thus the earliest phase of carcinogenesis);
- 5) Hybrid Capture 2 (HC2) (Digene Qiagen).

According to IARC data (International Agency for Research on Cancer) based in Lyon and of the American NCI (National Cancer Institute), the incidence of HPV DNA in women with unremarkable cytological study ranges from 7.9% in Europe to 22.1% in Africa. Therefore, several countries initiated clinical trials and pilot screening programs using HPV DNA typing. In the USA, HPV DNA typing is considered an adjunct to cytology in women over 30. This test has superior sensitivity and a high negative predictive value (NPV) as compared with cytology (>99% vs. 96%). On the other hand, sensitivity of HPV DNA assay as compared with cytology is as high as 96-98% vs. 53-73%⁽⁷⁾. Currently in the USA, the only HPV test registered for clinical use is the HC2 assay, detecting one or several out of 13 oncogenic HPV types. HC2 is now used essentially in two situations: as a second-look test in the case of abnormal cytological findings (ASC-US) and in primary screening for cervical cancer combined with cytological smear in women over 30⁽⁸⁾. Recent years produced novel and promising diagnostic possibilities in the field of detection of chronic HPV

jako drugi test w przypadku nieprawidłowego wyniku badania cytologicznego – ASC-US, oraz w pierwotnym skryningu raka szyjki macicy w połączeniu z rozmazem cytologicznym dla kobiet powyżej 30. roku życia⁽⁸⁾. Ostatnie lata przyniosły nowe, obiecujące możliwości diagnostyczne rozpoznania przetrwałego zakażenia HPV HR bez konieczności dwukrotnych oznaczeń w odstępie 6-12 miesięcy. Dostępny jest już bowiem test oznaczający w materiale pobranym z szyjki macicy obecność mRNA HPV HR. Technika ta oparta jest na detekcji transkryptorów mRNA genów E6 i E7 HPV 16, 18, 31, 33 i 45. Dodatni wynik testu nie tylko pozwala na identyfikację obecności jednego lub kilku najczęściej spotykanych typów HPV wysokiego ryzyka, ale również poprzez rozpoznanie przepisywania genów wirusowych w obrębie keratynocytu i syntezę onkoprotein stanowi pewny dowód na rozpoczęcie procesu karcinogenezy na najwcześniejszym jak dotąd możliwym etapie. Wiele przeprowadzonych badań klinicznych przypisuje temu testowi molekularnemu dwukrotnie wyższą pozytywną wartość predykcyjną (PPV) w porównaniu z klasycznymi już metodami detekcji DNA HPV opartymi na technice hybrydyzacji czy reakcji polimerazy łańcuchowej. Według Moldena i wsp. PPV dla testu opartego na detekcji mRNA E6 i E7 użytego do wykrycia zmian CIN2-3 wynosi 37,5% w porównaniu z 15,4% dla PCR⁽⁹⁾.

Wielu badaczy i niektóre towarzystwa naukowe, np. Amerykańskie Kolegium Położników i Ginekologów (American College of Obstetricians and Gynecologists, ACOG), skłaniają się do wykorzystania diagnostyki molekularnej HPV jako testu wstępnego, którego wynik będzie stanowił podstawę kwalifikacji do pobrania wymazu cytologicznego. Argumentem za takim postępowaniem skryningowym miałyby być wyższa czułość i negatywna wartość prognostyczna (*negative predictive value*, NPV) diagnostyki molekularnej HPV w porównaniu z wyższą swoistością dodatniej wartości predykcyjnej cytodiagnostyki. Trwają intensywne badania nad poszukiwaniem innych, konkurencyjnych dla cytodiagnostyki metod pozwalających wykryć zmiany przedrakowe. Wysiłki badaczy koncentrują się na

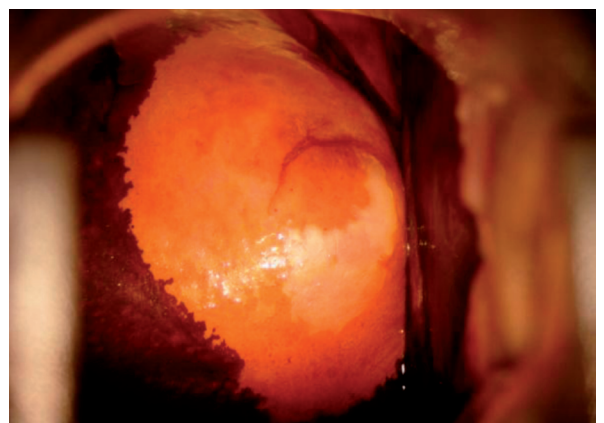
HR infection obviating the need of a repeat test 6-12 months apart. A test is available, enabling typing of mRNA HR HPV in samples collected from the uterine cervix. This technique is based on detection of mRNA transcriptors of genes E6 and E7 of HPV types 16, 18, 31, 33 and 45. Positive result of the test not only enables confirmation of one or several of the most common HR HPV, but also, by detection of viral genes' transcription within the keratinocyte and synthesis of oncoproteins, provides a certain proof enabling detection of carcinogenetic process at the earliest phase possible hitherto. Several clinical studies performed to date ascribe this test a two-fold higher positive predictive value (PPV) than already classic techniques of HPV DNA detection based on hybridization or polymerase chain reaction. According to Molden et al., PPV for tests based on detection of E6/E7 mRNA used to detect CIN2-3 lesions is 37.5% vs. 15.4% for PCR⁽⁹⁾.

Many investigators and some scientific societies, e.g. the American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG) are inclined towards using molecular diagnosis of HPV as an initial screening test, where the result would be an indication for cytological smear. The rationale for this screening strategy relies in higher sensitivity and negative prognostic value (NPV) of molecular diagnostics as compared with higher specificity of positive predictive value of cytological diagnostics.

Intense studies are underway, searching for other techniques alternatives for cytology, enabling detection of precancerous lesions. Investigators' efforts focus on application of assessment of HPV DNA and mRNA, as well as biophysical techniques, e.g. optoelectronics, spectroscopy and photodynamics.

INTRACELLULAR CONTENT OF HPV mRNA FOR E6 AND E7 GENES

Currently available tests for HPV are used to detect DNA of oncogenic HPV types in cervical smears. Within 5-10 years, without adequate treatment, a small proportion of women infected



Rys. 5. Kolpofotografia. Po lewej: ognisko leukoplakii na tylnej wardze ectocervix, lekko wyniosłe, widoczne już przed próbą z kwasem octowym.

Po prawej: (po teście Schillera) brak żółtawego zabarwienia keratozy i musztardowy kolor wokół zmiany sugerują zakażenie HPV

Fig. 5. Colpophotography. Left: focus of leukoplakia on the posterior lip of ectocervix – slightly elevated lesion, visible already prior to the acetic acid test (AAT). Right: lack of yellowish pigmentation typical of keratosis and mustard-like perilesional pigmentation, suggesting HPV infection (after Schiller test)

zastosowaniu oceny DNA i mRNA HPV oraz metod biofizycznych, w rodzaju optoelektroniki, spektroskopii i fotodynamiki.

WEWNĄTRZKOMÓRKOWA ZAWARTOŚĆ mRNA GENÓW E6 I E7 WIRUSA BRODAWCZAKA LUDZKIEGO

Obecnie testy HPV stosowane są do wykrywania DNA onkogennych typów HPV w wymazach z szyjki macicy. W przeciągu 5 do 10 lat u małego odsetka kobiet zakażonych wysoce onkogennymi typami wirusów HPV i u niektórych zarażonych typami o niskim potencjale onkogennym nastąpi progresja zmian śród nabłonkowych do zmian wysokiego stopnia (HSIL) lub nawet raka szyjki macicy, jeżeli nie wdroży się odpowiedniego leczenia⁽¹⁰⁾.

Molekularne przełączenie (*switch*) do rozwoju śród nabłonkowej neoplazji szyjki macicy i ostatecznie raka szyjki macicy polega na nieustannej ekspresji genów E6 i E7 onkogennych typów HPV^(3,11). Ekspresja ta zapoczątkowuje kaskadę zdarzeń, która skutkuje utratą aktywności supresorów guza i dysregulacją cyklu komórkowego.

Chociaż wykrywanie DNA HPV jest biologicznie uzasadnione, to wykrywanie DNA HPV o wysokim potencjale onkogenym traci swoją moc, gdyż wykrywa zdarzenia molekularne na zbyt wczesnym etapie. Jeżeli choroba u 100% zakażonych kobiet HPV o wysokim potencjale onkogenym implikowałaby progresję do raka szyjki macicy, to wówczas typowanie DNA HPV o wysokim potencjale onkogenym należałoby uznać za „złoty standard” skryningu raka szyjki macicy. Jakkolwiek ponad 99% raków szyjki macicy zawiera materiał genetyczny HPV o wysokim potencjale onkogenym, to jednak tylko niewielki odsetek kobiet zakażonych HPV o wysokim potencjale onkogenym zachoruje na raka szyjki macicy⁽¹⁰⁾. Ostatnie badania wykazały, że zmiany dużego stopnia w obrębie nabłonków szyjki macicy mogą rozwijać się również u kobiet zakażonych typami wirusów HPV nienależącymi do grupy wysoko onkogennych⁽¹⁰⁾. Jednak również w tych przypadkach koniecznym warunkiem rozwoju zmian nabłonkowych dużego stopnia jest zwiększona ekspresja mRNA E6 i E7. W celu potwierdzenia tej hipotezy niezbędne są dalsze prospektywne badania na dużą skalę.

Chociaż nie ma prospektywnych badań, wysoce prawdopodobne jest, że test na obecność mRNA E6 i E7 będzie przydatny w ocenie naturalnego przebiegu zmian chorobowych u pacjentek z HPV-zależnymi zmianami w obrębie szyjki macicy i będzie służyć jako „drugi marker” dla pacjentek DNA HPV-pozytywnych. Może mieć to największe zastosowanie w skryningu młodych kobiet, a zatem w kohorcie, w obrębie której częstość występowania DNA HPV może sięgać 20%. W każdym razie test na obecność mRNA E6 i E7 wydaje się mieć potencjalne zastosowanie w połączeniu z badaniem cytologicznym w programach skryningowych lub nawet może być pierwotnym narzędziem skryningowym. Całkowita czułość tego testu u kobiet ze zmianami HSIL we wstępnych badaniach retrospektywnych wynosi 83,3%. Ocena HPV przy pomocy hybrydyzacji fluorescencyjnej *in situ* (FISH) może również identyfikować pacjentki z ujemnym wynikiem rozmazu

by HR HPV and in some infected by HPV with low oncogenic potential, will experience progression of intraepithelial lesions to high-grade squamous intraepithelial lesions (HSIL) or even to frank cervical cancer⁽¹⁰⁾.

Molecular switch onto pathways leading to the development of intraepithelial neoplasia of uterine cervix and ultimately cervical cancer consists in a continuous expression of E6 and E7 genes by oncogenic HPV types^(3,11). This expression is initiated by a cascade of events, resulting in loss of activity of suppressor genes and complete dysregulation of cell cycle.

While detection of HPV DNA is biologically justified, the search for HR HPV DNA is less obvious because it detects molecular events at an excessively early stage. If 100% of women infected by HR HPV would progress to cervical cancer, then typing of HR HPV should be considered a “golden standard” in cervical cancer screening. Although genetic material of HR HPV is present in over 99% cases of cervical cancer, only a small proportion of women infected with HR HPV actually develop cervical cancer⁽¹⁰⁾. Recent studies have demonstrated that high-grade lesions within cervical epithelium may also develop in women infected by HPV types not belonging to the HR family⁽¹⁰⁾. But also in these cases, a *sine qua non* condition for the development of high-grade epithelial lesions is overexpression of E6/E7 mRNA. In order to confirm this hypothesis, further large-scale prospective studies are warranted.

While no prospective studies are available, it is highly probable that the test for presence of E6/E7 mRNA will be useful to monitor the natural course of disease in patients with HPV-dependent cervical lesions, serving as “second marker” in patients HPV DNA-positives. This may be most useful in screening young women, where the incidence of HPV DNA may reach 20%. Anyway, the test detecting E6/E7 mRNA appears to have a potential role when combined with cytological tests in the scope of screening tests or even may become the primary screening tool. Total sensitivity of this test in women with HSIL lesions in preliminary retrospective trials is 83.3%. Assessment of HPV using fluorescent *in situ* hybridization (FISH) may also identify patients with a negative result of cytological smear, where the process of transformation to precancerous cells is already underway.

SPREAD OF HPV AND DISTRIBUTION OF PARTICULAR HPV TYPES

HPV type 16 is the most common variant encountered in cervical lesions worldwide. Increasing relative proportion of this viral type varies from 2-4% in normal cervical smears to 50-55% in invasive cervical cancer, highlights clinical significance of infection by this viral type. The same phenomenon, although somewhat less intense, is seen in the case of the second most frequent viral type present in cervical lesions, i.e. the HPV 18. In women with invasive cervical cancer, the commonest types of HPV are in decreasing order: 16, 18, 33, 45, 51 and 58. HPV types 16, 18 and 45 are most often present in cervical adenocarcinoma. Geographical differences in prevalence of particular HPV types within the uterine cervix have negligible practical significance.

cytologicznego, u których obecny jest już proces transformacji do komórek przednowotworowych.

ROZPRZESTRZENIENIE HPV I DYSTRYBUCJA POSZCZEGÓLNYCH TYPÓW HPV

W skali światowej najbardziej rozpowszechnionym typem wirusa brodawczaka ludzkiego w zmianach w obrębie szyjki macicy jest HPV typ 16. Wzrost względnego odsetka występowania tego typu wirusa od 2-4% wśród prawidłowych rozmazów cytologicznych do 50-55% w inwazyjnym raku szyjki macicy podkreśla znaczenie kliniczne zakażenia tym typem wirusa. To samo zjawisko, ale na niższym poziomie obserwuje się dla kolejnego wirusa w częstotliwości występowania w zmianach w obrębie szyjki macicy, tzn. HPV 18. U kobiet z inwazyjnym rakiem szyjki macicy najczęściej występującymi typami HPV są w kolejności typy: 16., 18., 33., 45., 51. i 58. HPV 16., 18. i 45. są trzema najczęściej występującymi typami w raku gruczołowym szyjki macicy. Różnice geograficzne odpowiednich typów HPV w obrębie szyjki macicy mają mniejsze znaczenie praktyczne.

PRZEBIEG ZAKAŻENIA HPV

Obecnie uważa się, że zakażenie HPV jest najczęstszą chorobą przenoszoną drogą płciową. Rocznie rozpoznaje się około 5 500 000 nowych zakażeń, a według danych szacunkowych WHO na świecie żyje około 630 000 000 ludzi zakażonych wirusem brodawczaka ludzkiego (<http://www.who.int/vaccines/en/hpvrd.shtml/shtml>). W wielu populacjach (wiekowych, społecznych, ekonomicznych) ponad połowa aktywnych seksualnie kobiet i prawdopodobnie mężczyzn w równym procencie jest zainfekowana wirusem HPV w pewnym momencie życia. Zjawisko to jest szczególnie rozpowszechnione wśród seksualnie aktywnych adolescentek i młodych kobiet. Badania nad rozpowszechnieniem zakażenia HPV w tej grupie kobiet wykazały, że około 20-25% kobiet jest HPV DNA-dodatnich⁽¹²⁾. Po 2-3 latach obserwacji skumulowany odsetek HPV-dodatnich kobiet wynosił 59-82%^(13,14). W jednym z badań 20% młodych kobiet uległo zakażeniu HPV w ciągu 12 miesięcy od inicjacji seksualnej⁽¹³⁾. Większość zakażeń HPV u młodych kobiet ma charakter przejściowy lub samoograniczający się. Zaledwie u 10-20% zakażonych kobiet dojdzie do przewlekłego zakażenia i pozbywania się wirusa w ciągu kolejnych 24 miesięcy⁽¹²⁾. W rezultacie częstość występowania zakażenia osiąga szczyt wśród kobiet przed 20. rokiem życia i ulega dramatycznemu zmniejszeniu się u kobiet powyżej 30. roku życia. W badaniach polskich autorów (Basta) odsetek kobiet z infekcją HPV (DNA-pozytywnych) wynosił 12%, natomiast w grupie kobiet ciężarnych – 13,2%⁽⁶⁾. Wzrost częstości zakażenia wśród kobiet ciężarnych można częściowo tłumaczyć zwiększeniem ekspresji receptora steroidowego w keratynocytach zakażonych HPV. Typy HPV o niskim potencjale onkogennym są przyczyną kłykcin kończystych (brodawek płciowych) dolnego odcinka dróg rodnych. Zmiany te w czasie ciąży zwykle ulegają gwałtownej progresji. Odpowiedzialne za to są prawdopodobnie zmiany hormonalne zachodzące w czasie ciąży, ale podkreśla się również znaczenie immunosupresyjnego działania jednostki

CLINICAL COURSE OF HPV INFECTION

Nowadays, HPV infection is considered the most frequent sexually transmitted disease. Worldwide, there are about 5.5 million new infections every year and, according to WHO estimates, 630 millions people harbor HPV infection (<http://www/who.int/vaccines/en/hpvrd.shtml/shtml>). In many populations (defined by age and socioeconomic status), over half of sexually active women and probably a similar proportion of men, are infected with HPV at some point of their lives. Specially widespread is this phenomenon among sexually active adolescents and young adults. Studies on prevalence of HPV infection in this group of women revealed that 20-25% of them is HPV DNA-positive⁽¹²⁾. After 2-3 years of follow-up, cumulative proportion of HPV-positive women was 59-82%^(13,14). One study showed that 20% of young women acquired HPV infection within the first 12 months after sexual initiation⁽¹³⁾. Most HPV infections in young females are transient or self-limiting. Merely 10-20% of infected women will develop chronic infection, ultimately eliminating the virus within the next 24 months⁽¹²⁾. As a result, HPV infection peaks in women under 20 and undergoes dramatic reduction in those over 30. In Polish authors' studies (Basta), the proportion of HPV DNA-positive women was 12% in general population, rising to 13.2% among pregnant women⁽⁶⁾. Such an increased prevalence of HPV infection in pregnant women may be partly explained by enhanced expression of steroid receptor in HPV-infected keratinocytes. HPV types of low oncogenic potential cause condyloma acuminatum (acuminate warts or genital warts) of lower segment of genital tract. Such lesions usually show dramatic progression during pregnancy. Responsible are probably hormonal alterations occurring during pregnancy, but the role of immunosuppressive effect of the maternal-fetal-placental unit is also highlighted. Concerning HR HPV infections, no significant acceleration of development of epithelial lesions was noticed⁽¹⁵⁾. Chronicity of infection is the single most important risk factor, deciding if an infected woman will develop clinically significant sequels in the form of intraepithelial neoplasia. Only those women who experienced chronic HPV infection of the "high-risk" type, present an increased incidence of CIN2/3 and invasive cervical cancer⁽¹²⁾. Time of progression from HPV infection to development of CIN2/3 in the setting of chronic infection is variable, whereby most cases take place during the first few years⁽¹⁴⁾. This may explain increasingly frequent detection of invasive forms of cervical cancer in very young women. In these authors' material, there are 6 cases of invasive cervical cancer in women under 25. Unfortunately, biological determinants of chronicity of HPV infection are poorly understood. There are data suggesting that infection with HPV type 16 persists longer than that caused by other HPV types. Coinfection with *Chlamydia trachomatis* increases and use of condoms reduces duration of HPV infection⁽¹²⁾. Noteworthy are also other cofactors of carcinogenesis within the uterine cervix, e.g. multiple childbirths, tobacco smoking, hormonal contraception, nutritional deficits (mainly antioxidants and vitamins) and immune disorders (disproportion and dysfunction of lymphocytes T, Th1/Th2, NK, role of cytoki-

matczyno-łożyskowej. W odniesieniu do zakażenia wysokimi typami onkogennymi HPV nie zaobserwowano gwałtownego przyspieszenia rozwoju zmian nabłonkowych⁽¹⁵⁾.

Przewlekłość zakażenia jest pojedynczym, najważniejszym czynnikiem decydującym, czy u zainfekowanej kobiety dojdzie do klinicznie istotnych następstw w postaci śród nabłonkowego nowotworzenia. Tylko kobiety, u których wystąpiło przewlekłe zakażenie HPV typami „wysokiego ryzyka”, mają zwiększone ryzyko zachorowania na CIN2/3 i inwazyjnego raka szyjki macicy⁽¹²⁾. Czas progresji od zakażenia HPV do rozwoju CIN2/3 wśród nosicieli przewlekłych jest różnorodny, przy czym znacząca część przypadków rozwija się w ciągu pierwszych lat⁽¹⁴⁾. Tłumaczy to spotykane coraz częściej występowanie inwazyjnej postaci raka szyjki macicy wśród kobiet bardzo młodych. We własnym materiale autorów mamy 6 przypadków inwazyjnej postaci raka szyjki macicy u kobiet przed 25. rokiem życia. Niestety, biologiczne determinanty przewlekłości zakażenia HPV nie są dobrze scharakteryzowane. Istnieją pewne dane sugerujące, że zakażenie HPV 16 utrzymuje się dłużej niż zakażenie innymi typami HPV, zakażenie *Chlamydia trachomatis* zwiększa, a stosowanie prezerwatyw zmniejsza przewlekłość zakażenia HPV⁽¹²⁾. Należy zwrócić uwagę również na kofaktory karcinogenezy w obrębie szyjki macicy, a mianowicie: wysoką rodność, palenie papierosów, hormonalne środki antykoncepcyjne, niedobory diety (antyoksydanty, witaminy A, E, C) oraz immunologiczne (dysproporcje i dysfunkcje limfocytów T, Th1/Th2, komórek NK, rola cytokin, śluzówkowy kompleks immunologiczny – CMI) promujące proces nowotworowy w obrębie szyjki macicy. Obserwacje epidemiologiczno-kliniczne wspierają badania *in vitro*, w których wykazano, że onkoproteina E6 wiąże się z białkiem p53, które jest komórkowym inhibitorem karcinogenezy, inaktywując go. Może ona też aktywować telomerazę, tj. enzym odpowiadający za syntezę powtarzających się krótkich sekwencji DNA w końcowych odcinkach chromosomu, co ma umożliwiać niekontrolowany podział komórek.

Onkoproteina E7 wykazuje z kolei powinowactwo do białka hamującego rozwój *retinoblastoma* (pRB), powodując rozbitcie tego kompleksu i uwalniając czynnik transkrypcyjny E2F⁽¹¹⁾.

ROLA ZAKAŻENIA HPV W ROZWOJU CIN I RAKA SZYJKI MACICY

Dowodów epidemiologicznych wiążących karcinogenne wirusy „wysokiego ryzyka” z rakiem szyjki macicy dostarczają badania serii przypadków kobiet chorych na raka szyjki macicy. W jednej z największych takich serii badań zidentyfikowano DNA wirusów HPV „wysokiego ryzyka” w ponad 99% spośród 1000 przypadków inwazyjnego raka szyjki macicy zebranych w 22 krajach na świecie⁽¹⁶⁾. Rozkład typów HPV związanych z rakiem szyjki macicy na świecie zbadano w niedawnej metaanalizie obejmującej łącznie około 10 000 przypadków⁽¹⁷⁾. Osiem najczęściej występujących typów to w kolejności występowania: HPV 16, 18, 45, 31, 33, 52, 58, i 35. Te typy wirusów są odpowiedzialne łącznie za około 90% przypadków raka szyjki macicy, w skali globalnej. Dalsze dowody pochodzą z badań typu *case-control*, które pozwalają na ocenę względnego ryzyka rozwoju raka szyjki macicy w powiązaniu z poszczególnym typem HPV. W największym

nes and cell-mediated immunity – CMI – within mucous membranes), promoting neoplasia within the uterine cervix. Epidemiological-clinical surveys support *in vitro* studies, indicating that oncoprotein E6 binds with the p53 protein, a well known cellular inhibitor of carcinogenesis, resulting in its inhibition. It may also activate telomerase, i.e. the enzyme responsible for synthesis of repetitive short sequences of DNA in final segments of chromosomes, thus enabling non-controlled cellular proliferation.

On the other hand, oncoprotein E7 shows affinity to retinoblastoma-inhibiting protein (pRB), splitting this complex and releasing transcription factor E2F⁽¹¹⁾.

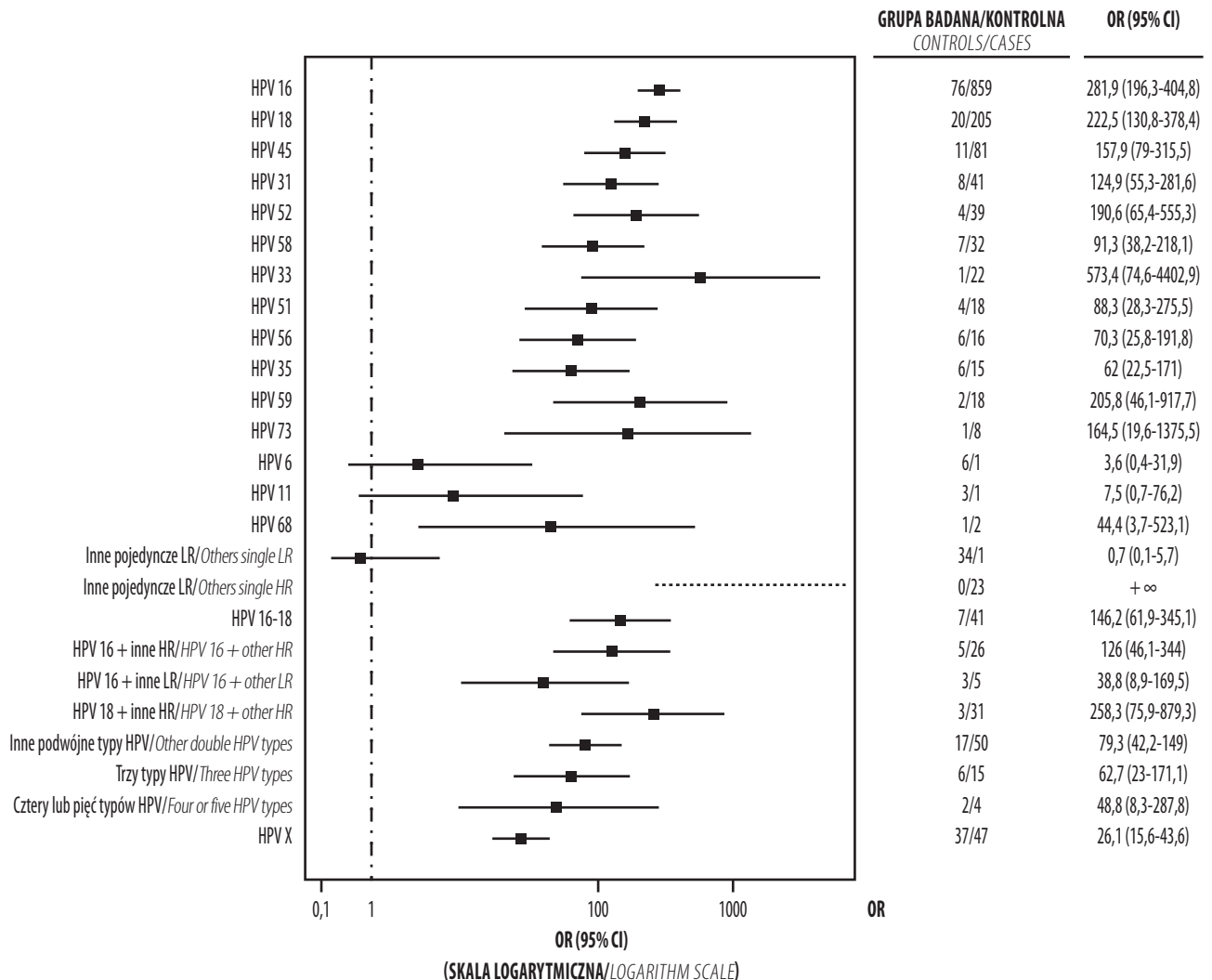
ROLE OF HPV INFECTION IN THE DEVELOPMENT OF CIN AND CERVICAL CANCER

Epidemiological evidence associating high-risk oncogenic viruses with cervical cancer is supplied by studies of women affected with this condition. One of the largest series published to date, DNA of “high-risk” HPV was identified in over 99% out of 1000 cases of invasive cervical cancer recruited in 22 countries worldwide⁽¹⁶⁾. Distribution of HPV types correlated with cervical cancer worldwide was studied in a recent meta-analysis encompassing over 10 000 cases⁽¹⁷⁾. Eight most common HPV types are (in descending order): 16, 18, 45, 31, 33, 52, 58 and 35. These viral types are responsible for about 90% of cervical cancer cases on a global scale. Further evidence is derived from case-control trials, enabling assessment of relative risk of development of cervical cancer in correlation with particular HPV types. The largest of these trials integrated data from 11 case-control studies performed in different countries but using the same methodology for HPV typing⁽¹⁸⁾. This study was based on a patient population of nearly 2500 women with cervical cancer and about 2500 women in the control group. A outstandingly high hazard ratio was obtained for development of cervical cancer in women infected with HR HPV (fig. 6). Proportions of planoepithelial and adenomatous cancers associated with HPV types 16 and 18 were 70% and 86%, respectively⁽¹⁷⁾. Precursor lesions for cervical cancer, i.e. CIN2/3, as well as histologically related lesions in the vulvar (VIN), penile (PIN) and anal (AIN) areas, are also frequently associated with HR HPV infection⁽¹⁹⁾. Meta-analysis of correlation between HPV and CIN2/3 leads to the following conclusion: HR HPV DNA may be detected in 84% of lesions of the CIN2/3 type⁽²⁰⁾. Both prospective and retrospective cohort studies demonstrated that in HPV DNA-positive women the risk of subsequent development of CIN2/3 during follow-up is higher than in HPV DNA-negative ones⁽¹⁰⁾. Authors of some long-term observational studies demonstrated that this risk is especially high in patients infected by HPV types 16 and 18, as compared with other “high-risk” HPV types⁽¹⁰⁾.

HPV AT EXTRACERVICAL LOCATIONS

HPV infection may also cause:

- cancers of vulva, anus, penis (as well as precursor lesions thereof, i.e. VIN, VaIN, AIN and PIN);



Rys. 6. Zależne od typu HPV ilorazy szans (OR) i 95% przedział ufności (CI) dla raka szyjki macicy (płaskonabłonkowego i gruczolowego). Pacjentki z ujemnym wynikiem HPV DNA stanowiły grupę odniesienia. OR są adiustowane dla kraju pochodzenia oraz wieku badanych kobiet. HR: high-risk; LR: low-risk. HPV typ X oznacza brak sprecyzowanego typu (np. próbki były dodatnie w systemie GP5+/6+, ale nie ulegały hybrydyzacji z żadnym spośród 33 typów w próbce)⁽¹²⁾

Fig. 6. Odds ratios (OR) and 95% confidence interval (95% CI) for squamous cell and adenomatous cervical cancer. HPV DNA-negative patients constituted the control group. OR adjusted for country of origin and age. HR – high-risk; LR – low-risk; HPV type X – non-defined HPV type (e.g. samples proved positive when assessed by GP5+/6+ system but did not undergo hybridization with any of the 33 types present in sample)⁽¹²⁾

z takich badań opracowano dane z 11 badań typu *case-control* – choć pochodziły one z różnych krajów, stosowano w nich tę samą metodologię oceny HPV⁽¹⁸⁾. Opracowanie to dotyczyło blisko 2500 kobiet z rakiem szyjki macicy oraz 2500 kobiet stanowiących grupę kontrolną. Odnotowano niezwykle wysoki iloraz szans rozwoju raka szyjki macicy dla kobiet zakażonych wirusami HPV typu „wysokiego ryzyka” (rys. 6).

Odsetki raków o typie histologicznym płaskonabłonkowym i gruczolowym powiązanych z HPV 16 i 18 wynosiły odpowiednio 70% i 86%⁽¹⁷⁾. Z zakażeniem HPV „wysokiego ryzyka” są także często związane zmiany prekursorowe raka szyjki macicy, tj. CIN2/3, jak również histologicznie podobne zmiany w obrębie sromu (VIN), penisa (PIN) i odbytu (AIN)⁽¹⁹⁾.

- genital warts (condylomata acuminata);
- recurrent respiratory papillomatosis (RRP) – benign lesions within upper respiratory tract, seen mainly in toddlers; an extremely rare condition but having a dramatic and burdensome clinical course;
- planoepithelial cancer of head and neck, e.g. oral cavity, larynx and pharynx.

VULVAR CANCER

Vulvar cancer constitutes 2.5-5.0% of all genital malignancies in the females. In Poland, the prevalence of this tumor is considered moderate. Usually affected are women in their

Wniosek płynący z metaanalizy związku HPV i CIN2/3 jest następujący: DNA HPV „wysokiego ryzyka” można wykryć w 84% przypadków zmian typu CIN2/3⁽²⁰⁾. Prospektywne i retrospektywne badania kohortowe wykazały, że u kobiet HPV DNA-dodatnich ryzyko następnego rozwoju CIN2/3 w trakcie obserwacji jest większe niż u kobiet HPV DNA-ujemnych⁽¹⁰⁾. Autorzy niektórych długoczasowych badań obserwacyjnych wykazali, że ryzyko to jest szczególnie wysokie dla kobiet zakażonych HPV typem 16. lub 18. w porównaniu z pozostałymi typami HPV „wysokiego ryzyka”⁽¹⁰⁾.

HPV W INNEJ LOKALIZACJI NIŻ SZYJKI MACICY

Zakażenie HPV może być również przyczyną:

- raka sromu, pochwy, odbytu i penisa (jak również ich zmian prekursorowych, tj. VIN, VaIN, AIN i PIN);
- kłykcin kończystych (brodawek płciowych) (*condylomata acuminata*);
- nawracającej brodawczakowatości dróg oddechowych (*recurrent respiratory papillomatosis*, RRP) – łagodnych zmian górnego odcinka dróg oddechowych, spotykanych głównie u niemowląt; jest to choroba rzadko występująca, jednak o dramatycznym i uciążliwym przebiegu;
- raka płaskonabłonkowego głowy i szyi, np. jamy ustnej, gardła i krtani.

RAK SROMU

Rak sromu stanowi 2,5-5% wszystkich nowotworów żeńskiego narządu rodowego. Polska należy do krajów o średnim występowaniu tego nowotworu. Najczęściej chorują kobiety między 60. a 70. rokiem życia. Z przeprowadzonych w ostatnich latach badań epidemiologicznych wynika, że częstość zachorowań na śródnabłonkową neoplazję i raka sromu wzrasta szczególnie u kobiet poniżej 50. roku życia. W modelu epidemiologicznym raka sromu u młodych kobiet dużą rolę odgrywają infekcje przenoszone drogą płciową (*sexually transmitted diseases*), szczególnie zakażenie wirusem HPV o wysokim potencjale onkogennym, tj. HPV 16, 18, 45, 56, 66 i 69. Podkreśla się także znaczenie nałogowego palenia tytoniu w tym procesie. U kobiet starszych rak sromu współlistnieje w wysokim odsetku z rozrostem płaskonabłonkowym i liszajem twardzinowym. Rak sromu u 60% kobiet rozwija się na wargach sromowych większych, w mniejszym odsetku w obrębie warg sromowych mniejszych, łechtaczki i spoidła tylnego. Metodą z wyboru w leczeniu raku sromu jest leczenie chirurgiczne. Napromienianie i chemioterapia są zwykle leczeniem uzupełniającym skojarzonym z leczeniem chirurgicznym. Śródnabłonkowa neoplazja sromu (*vulvar intraepithelial neoplasia*, VIN) i jej klasyfikacja pozostaje kontrowersyjna. Istnieją obecnie trzy systemy klasyfikacji VIN: 1) klasyfikacja WHO, trójstopniowa: VIN1-3, 2) klasyfikacja na wzór systemu Bethesda, dwustopniowa, wydzielająca VIN niskiego i wysokiego stopnia oraz 3) uaktualniona w 2004 roku klasyfikacja ISSVD (International Society for the Study of Vulvovaginal Disease), niestopniująca VIN. Częstość występowania VIN

6th and 7th decade. Recent epidemiological studies revealed an increasing incidence of intraepithelial neoplasia and vulvar cancer in women under 50. In the epidemiological model of vulvar cancer in young women, a significant role is played by sexually transmitted diseases, particularly those related to HPV with high oncogenic potential, i.e. HPC types 16, 18, 45, 56, 66 and 69. Noteworthy is also a significant role of addictive tobacco smoking in this process. In elderly women, vulvar cancer coexists with planoepithelial hyperplasia and lichen sclerosus. In about 60% of women, vulvar cancer develops on *labia majora*, in a lesser proportion on *labia minora*, clitoris and posterior commissure. The method of choice in the treatment of vulvar cancer is surgical excision. Radiotherapy and chemotherapy usually play a complimentary role as adjuncts to surgery. Vulvar intraepithelial neoplasia (VIN) and its classification remains controversial. Currently, there are three classification systems of VIN: 1) the three-tiered WHO classification (VIN1/2/3), 2) the two-tiered Bethesda-like classification, differentiating low- and high-grade VIN, and 3) the updated in 2004 ISSVD (International Society for the Study of Vulvovaginal Disease) classification, whereby VIN is not graded. In the past decades, the incidence of VIN increased visibly, while the incidence of invasive vulvar cancer remains stable or even decreased in some countries. For instance, in the USA the incidence of VIN3 (vulvar cancer *in situ*) increased by 411% since 1973 thru 2000, while that of invasive vulvar cancer increased by only 20% over the same timespan⁽²¹⁾.

Currently, two main types of vulvar cancer are distinguished:

1. Keratinizing squamous cell carcinoma (over 60% of cases) – seen mainly in elderly women, developing within chronic dermatoses of the vulva, such as lichen sclerosus. This type of cancer is not associated with HPV infection.
2. Condylomatous squamous cell carcinoma (with recognized precancerous conditions, e.g. VIN2/3) – seen mainly in younger women, whereby 75-100% of cases is associated with HPV types 16 and 31.

VAGINAL CANCER

Vaginal cancer constitutes less than 2% of all gynecologic malignancies. The prevalence thereof is estimated at 1 per 100 000 women. It usually affects elderly women, rarely developing in persons under 45. The tumor is seen more frequently in women subjected to hysterectomy for precancerous cervical lesions (CIN2/3) as a recurrence within the vaginal stump. From 65 to 90% of vaginal cancer cases are associated with HPV infection, mainly by HPV types 16 and 18.

ANAL CANCER

Anal cancer constitutes about 2% of digestive tract tumors. Its prevalence is estimated at 2.8 per 100 000 persons. According to historical data, females were more commonly affected, but current observations indicate an increasing incidence thereof in males. Over 80% of anal cancer cases are associated with HPV infection, mainly by HPV type 16.

uległa w ostatnich dekadach zwiększeniu, podczas gdy częstość raka inwazyjnego sromu utrzymuje się na tym samym poziomie lub nawet obniżyła się w niektórych krajach. I tak na przykład w USA występowanie VIN3 (raka sromu *in situ*) zwiększyło się o 411% pomiędzy 1973 a 2000 rokiem, podczas gdy częstość występowania raka inwazyjnego sromu zwiększyła się w tym samym czasie zaledwie o 20%⁽²¹⁾.

Obecnie wyróżnia się dwa typy raka sromu:

1. Keratynizujący (>60% przypadków) – spotykany głównie wśród starszych kobiet, rozwija się na podłożu przewlekłych dermatoz w obrębie sromu, takich jak np. liszaj twardzienny. Są to raki niezwiązane z zakażeniem HPV.
2. Kłykinowaty (z wyodrębnionymi zmianami przedrakowymi, którą jest na przykład śródnaślakowa neoplazja sromu VIN2/3) – ta odmiana raka sromu dotyczy kobiet młodszych, a 75 do 100% tych raków ma związek z zakażeniem HPV 16 i 31.

RAK POCHWY

Rak pochwy stanowi <2% wszystkich „ginekologicznych” raków. Częstość występowania tego schorzenia wynosi do 1/100 000. Częściej spotykany jest u kobiet starszych i rzadko występuje u osób poniżej 45. roku życia. Zazwyczaj dotyczy kobiet, które zostały poddane histerektomii z powodu zmian przedrakowych w obrębie szyjki macicy (CIN2/3), jako nawrót w obrębie kikutka pochwy. Od 65 do 90% przypadków raka pochwy wiąże się z zakażeniem HPV, głównie typami HPV 16 i 18.

RAK ODBYTU

Rak odbytu stanowi około 2% nowotworów złośliwych przewodu pokarmowego. Częstość występowania tego nowotworu szacuje się na 2,8/100 000. Historycznie stwierdzano go częściej u kobiet niż u mężczyzn, jednak obecnie obserwuje się zwiększenie częstości występowania tego raka u mężczyzn. Ponad 80% przypadków raka odbytu wiąże się z zakażeniem HPV, głównie typem HPV 16.

BRODAWKI PŁCIOWE (KŁYKINY KOŃCZYSTE)

Częstość występowania tego schorzenia wynosi około 350/100 000 (z różnym rozkładem statystycznym w różnych grupach wiekowych). Kłykiny kończyste spotyka się częściej wśród kobiet, niemniej obecnie obserwuje się wzrost zachorowalności u obu płci. Wszystkie przypadki kłykin kończystych mają związek z zakażeniem wirusami HPV, prawie wyłącznie typami o niskim potencjale onkogennym, tj. głównie HPV 6 i 11.

PODSUMOWANIE

Jeżeli zatem, jak przedstawiono powyżej, raki okolicy płciowo-odbytniczej (z wyjątkiem raka szyjki macicy) są tak rzadko spotykanymi nowotworami, to dlaczego przywiązuje się do nich obecnie tak dużą wagę?

Uważa się, że zmiany te są silnie związane z zakażeniem HPV, którego częstość występowania stale się zwiększa. Ma to związek

GENITAL WARTS (CONDYLOMATA ACUMINATA)

The incidence of this condition is estimated roughly at 350 per 100 000 persons (with varying statistical distribution in particular age groups). Genital warts are seen more often in women, although recent data indicate an increasing incidence thereof in both genders. All cases of genital warts are associated with HPV infection, nearly exclusively with HPV types 6 and 11, characterized by low oncogenic potential.

SUMMATION

So, if as presented above, malignancy of the anogenital area (with the exception of cervical cancer) is such a rare occurrence, then why do they focus so much attention nowadays?

In general opinion, these lesions closely correlate with HPV infection, and the incidence thereof is steadily increasing. This is associated with younger age at which first sexual intercourse takes place and increased number of sexual partners. Therefore, in the future increased numbers of these malignancies and their precursor lesions (mainly VIN and AIN) will come to medical attention. Scientific and epidemiological evidence confirms an increasing incidence of anogenital diseases. Prevalence of VIN doubled during the past decade. In the USA, the incidence of VIN3 soared by 400% between 1973 and 2000. On the other hand, that of invasive vulvar cancer increased by 20% in the same timespan. Although the rate of increase for vulvar cancer is currently slow, a similar dramatic increase may take place in the future. Similar trends were observed in other countries too. Of particular importance is an increasing incidence thereof in young women. In Great Britain, the proportion of women under 50 with invasive vulvar cancer doubled between 1975 and 2004, increasing from 6% to 11%.

Nearly 90% of lesions diagnosed as VIN2/3, VaIN2/3 and AIN2/3 contain HPV DNA of highly oncogenic types, mainly HPV type 16. Frequently, multifocal infection within lower genital tract is present. Lesions may manifest at the same time (synchronous presentation) and may be caused by identical HPV types (46% of cases) or by different viral types (54% of cases).

Anterior commissure of labia is an interesting issue and is still a matter of debate whether it is predisposed to the development of vulvar cancer in younger women. According to Hampl et al.⁽²²⁾, mean age of women with vulvar cancer dramatically decreased, particularly during the past decade. In 1989, only 11% of vulvar cancer cases concerned women under 50, while at present this proportion is 40%, while 25% thereof are women under 40. Such an increased proportion of young women correlates with increasing frequency of location of these tumors within the anterior commissure, rising from 19% to 37%. This is a disturbing trend, as lesions located in this part of vulva may be easily overlooked during a routine gynecologic examination. These tumors are usually diagnosed at an advanced clinical stage, when urethra has already been infiltrated. A possible explanation of this phenomenon may be an earlier sexual initiation of young women, who frequently engage in penetration-less intercourses, conducive to infection of young and sensitive epithelium in this body area.

z obniżeniem wieku pierwszego stosunku seksualnego i zwiększoną liczbą partnerów seksualnych. W związku z tym w przyszłości należy spodziewać się diagnozowania większej liczby przypadków tych raków i ich zmian prekursorowych: VIN (*vaginal intraepithelial neoplasia*) oraz AIN (*anal intraepithelial neoplasia*).

Istnieją dowody naukowe i epidemiologiczne na zjawisko zwiększania się liczby chorób okolicy płciowo-odbytniczej. Odsetek VIN uległ zdwojeniu w ciągu ostatniej dekady. W USA częstość występowania VIN3 wzrosła o ponad 400% pomiędzy 1973 a 2000 rokiem, z kolei częstość występowania inwazyjnego raka sromu wzrosła o 20%. Chociaż wzrost częstości występowania w odniesieniu do raka sromu jest znacznie wolniejszy, to może nastąpić podobny wzrost w przyszłości. Podobne trendy zaobserwowano również w innych krajach. Szczególnie istotny jest wzrost zachorowalności wśród kobiet młodych. W Wielkiej Brytanii proporcja kobiet poniżej 50. roku życia z inwazyjnym rakiem sromu uległa podwojeniu pomiędzy 1975 a 2004 rokiem – wzrost z 6% do 11%.

Około 90% zmian o charakterze VIN2/3, VaIN2/3 oraz AIN2/3 zawiera DNA HPV o wysokim potencjale onkogennym, głównie HPV 16. Często występuje zakażenie wieloogniskowe w obrębie dolnego odcinka narządu płciowego. Zmiany mogą manifestować się w tym samym czasie (występowanie synchroniczne) i być spowodowane przez identyczne typy wirusów HPV (w 46% przypadków) lub różne typy wirusów (54% przypadków).

Ciekawe zagadnienie stanowi problem spoidła przedniego warg sromowych – trwa dyskusja, czy jest ono miejscem predysponowanym do rozwoju raka sromu u młodych kobiet. Według Hampl i wsp.⁽²²⁾ średnia wieku kobiet z rakiem sromu uległa dramatycznemu obniżeniu, szczególnie w ciągu ostatniej dekady. W 1989 roku tylko 11% raków sromu dotyczyło kobiet poniżej 50. roku życia, obecnie odsetek ten wynosi 40%, a 25% to kobiety przed 40. rokiem życia. Temu zwiększonemu odsetkowi młodych kobiet towarzyszy wzrost lokalizacji guzów w obrębie przedniego spoidła warg sromowych z 19% do 37%. Jest to niepokojący trend, gdyż zmiany zlokalizowane w tej części sromu mogą być przeoczone podczas rutynowego badania ginekologicznego, a diagnoza stawiana jest najczęściej w zaawansowanych stadiach, zazwyczaj na etapie nacieczenia cewki moczowej. Jednym z możliwych wyjaśnień tego trendu może być wcześniejszy debiut seksualny młodych kobiet, które często rozpoczynają praktyki niepenetracyjne, sprzyjające infekcjom młodego wrażliwego nabłonka w tej części ciała.

PIŚMIENNICTWO:

BIBLIOGRAPHY:

1. Cuzick J., Mayrand M.H., Ronco G. i wsp.: Chapter 10: New dimensions in cervical cancer screening. *Vaccine* 2006; 24 supl. 3: S90-S97.
2. ASC ACOG Cervical Cytology Screening. *Practice Bulletin* 2003; 102: 417-427.
3. Snijders P.J., van den Brule A.J., Meijer C.J.: The clinical relevance of human papillomavirus testing: relationship between analytical and clinical sensitivity. *J. Pathol.* 2003; 201: 1-6.
4. Iftner T., Villa L.L.: Chapter 12: Human papillomavirus technologies. *J. Natl Cancer Inst. Monogr.* 2003; (31): 80-88.

5. Jach R., Basta A., Szczudrawa A.: Wpływ leczenia Iscadorrem QuS i interferonem alfa (Intron A) na przebieg śród-nabłonkowej neoplazji szyjki macicy (CIN1 i CIN2) z towarzyszącą infekcją wirusem ludzkiego brodawczaka (HPV). *Ginekol. Pol.* 2003; 74: 729-735.
6. Basta A.: Znaczenie infekcji wirusowej (HPV) oraz obniżonego poziomu witaminy A w surowicy krwi, jak i niektórych czynników osobniczych i środowiskowych w morfogenezie raka szyjki macicy. Rozprawa habilitacyjna. Akademia Medyczna im. M. Kopernika, Kraków 1990.
7. Cuzick J., Szarewski A., Cubie H. i wsp.: Management of women who test positive for high-risk types of human papillomavirus: the HART study. *Lancet* 2003; 362: 1871-1876.
8. New Device Approval: Digene Hybrid Capture 2 High-Risk HPV DNA Test – P890064 S009 A004. U.S. Food and Drug Administration, Center for Devices and Radiological Health, Rockville, MD 2003.
9. Molden T., Nygård J.F., Kraus I. i wsp.: Predicting CIN2+ when detecting HPV mRNA and DNA by PreTect HPV-proofer and consensus PCR: a 2-year follow-up of women with ASCUS or LSIL Pap smear. *Int. J. Cancer* 2005; 114: 973-976.
10. Clifford G.M., Smith J.S., Plummer M. i wsp.: Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br. J. Cancer* 2003; 88: 63-73.
11. Khan M.J., Castle P.E., Lorincz A.T. i wsp.: The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. *J. Natl Cancer Inst.* 2005; 97: 1072-1079.
12. Clifford G.M., Rana R.K., Franceschi S. i wsp.: Human papillomavirus genotype distribution in low-grade cervical lesions: comparison by geographic region and with cervical cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2005; 14: 1157-1164.
13. Grc M., Husnjak K., Bozikov J. i wsp.: Evaluation of genital human papillomavirus infections by polymerase chain reaction among Croatian women. *Anticancer Res.* 2001; 21: 579-584.
14. Castle P.E., Solomon D., Schiffman M., Wheeler C.M.: Human papillomavirus type 16 infections and 2-year absolute risk of cervical precancer in women with equivocal or mild cytologic abnormalities. *J. Natl Cancer Inst.* 2005; 97: 1066-1071.
15. Jach R., Radoń-Pokracka M., Kolawa W. i wsp.: Rak szyjki macicy w przebiegu ciąży. Trudności diagnostyczne i powikłania. *Curr. Gynecol. Oncol.* 2010; 8: 112-122.
16. Molijn A., Kleter B., Quint W., van Doorn L.J.: Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *J. Clin. Virol.* 2005; 32 supl. 1: S43-S51.
17. Gravitt P.E., Jamshidi R.: Diagnosis and management of oncogenic cervical human papillomavirus infection. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 2005; 19: 439-458.
18. Jacobs M.V., Snijders P.J., Voorhorst F.J. i wsp.: Reliable high risk HPV DNA testing by polymerase chain reaction: an intermethod and intramethod comparison. *J. Clin. Pathol.* 1999; 52: 498-503.
19. Quint W.G., Pagliusi S.R., Lelie N. i wsp.: World Health Organization Human Papillomavirus DNA International Collaborative Study Group: Results of the first World Health Organization international collaborative study of detection of human papillomavirus DNA. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44: 571-579.
20. Muñoz N., Bosch F.X., Castellsagué X. i wsp.: Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *Int. J. Cancer* 2004; 111: 278-285.
21. Judson P.L., Habermann E.B., Baxter N.N. i wsp.: Trends in the incidence of invasive and *in situ* vulvar carcinoma. *Obstet. Gynecol.* 2006; 107: 1018-1022.
22. Hampl M., Deckers-Figiel S., Hampl J.A. i wsp.: New aspects of vulvar cancer: changes in localization and age of onset. *Gynecol. Oncol.* 2008; 109: 340-345.