

0304 - 12260

Mes H

Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
Wydział Lekarski

Robert Jach

**Modulacja immunologiczna a przebieg śródnabłonkowej
neoplazji szyjki macicy z towarzyszącą infekcją wirusem
ludzkiego brodawczaka.**

Praca doktorska

Bibl. Medyczna CM UJ



1816020094

Promotor:

Prof. dr hab. n. med. Antoni Basta

Pracę wykonano w:

Katedra i Klinika Ginekologii i Onkologii
Collegium Medicum
Uniwersytetu Jagiellońskiego
ul. Kopernika 23, 31 – 501 Kraków.

Kierownik jednostki:

Prof. dr hab. n. med. Antoni Basta

KRAKÓW 2002

Składam serdeczne podziękowania
Panu **Prof. dr hab. med. Antoniemu Baście**
za umożliwienie powstania pracy i cenną pomoc merytoryczną.

SPIS TREŚCI

1.	WSTĘP	5
1.1.	Śródnabłonkowa neoplazja szyjki macicy (Cervical Intraepithelial Neoplasia-CIN) – występowanie, etiopatogeneza i rozwój.....	5
1.2.	Rola infekcji HPV w etiopatogenezie raka szyjki macicy.....	11
1.3.	CIN1 i CIN2 z towarzyszącą infekcją HPV a stan układu immunologicznego organizmu.....	17
1.3.1.	Odporność przeciwwirusowa.....	17
1.3.2.	Odporność przeciwnowotworowa.....	23
1.3.3.	Humoralna odpowiedź na infekcję HPV i CIN.....	24
1.3.4.	Komórkowa odpowiedź na HPV i CIN.....	25
1.4.	Postępowanie terapeutyczne w CIN 1 i CIN 2 z towarzyszącą infekcją HPV.....	30
2.	CEL PRACY	35
3.	MATERIAŁ I METODY	36
3.1.	Badanie cytologiczne.....	39
3.2.	Badanie kolposkopowe.....	39
3.3.	Hybrydyzacja DNA HPV.....	40
3.4.	Badanie immunologiczne.....	41
3.5.	Metodyka podawania Iscadrou QuS i Intronu A.....	42
3.6.	Metody statystyczne.....	43
4.	WYNIKI	45
4.1.	Zachowanie się CIN1 i CIN2.....	45
4.2.	Zachowanie się infekcji HPV.....	54

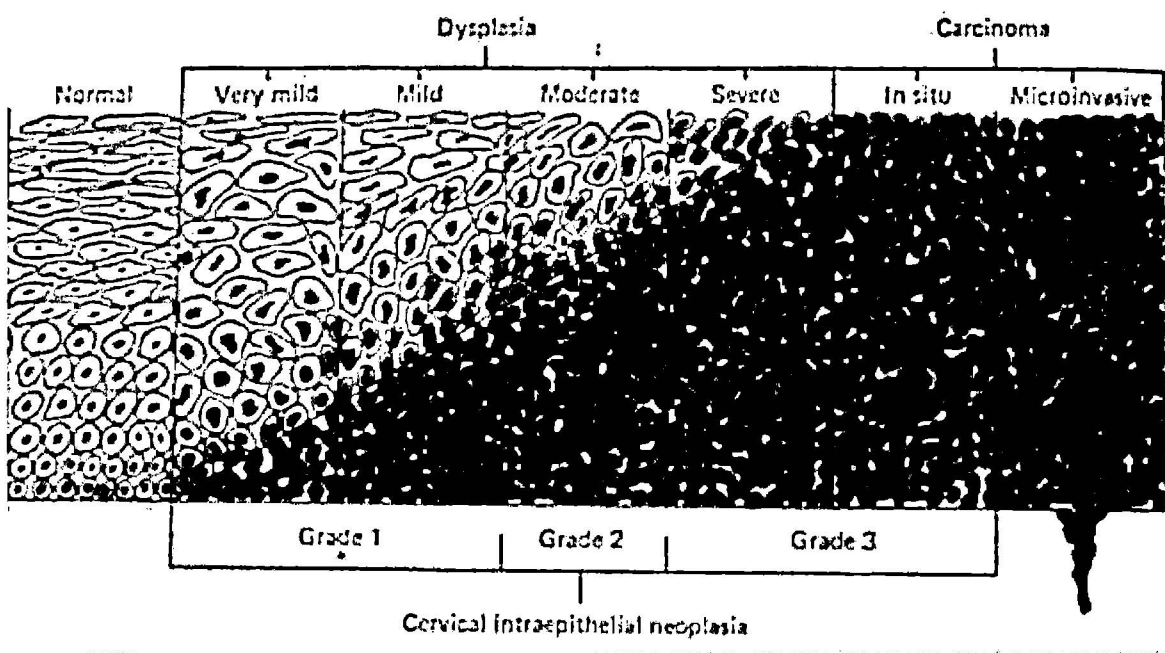
4.3.	Zachowanie się komórek koilocytarnych.....	56
4.4.	Badania immunologiczne.....	58
4.4.1.	Limfocyty T (CD3+).....	58
4.4.2.	Limfocyty Th (CD4+).....	63
4.4.3.	Limfocyty Ts (CD8+).....	66
4.4.4.	Indeks CD4+/CD8+.....	69
4.4.5.	Limfocyty B (CD19+).....	71
4.4.6.	Komórki NK (CD56+/CD3-).....	74
4.4.7.	Związek pomiędzy analizowanymi czynnikami a remisją CIN1 i CIN2 określony przy pomocy modelu regresji logistycznej.....	78
5.	OMÓWIENIE WYNIKÓW. Dyskusja.....	80
6.	Wnioski.....	91
7.	Streszczenie.....	92
8.	Piśmiennictwo.....	98

1. WSTĘP

1.1. Śródnabłonkowa neoplazja szyjki macicy (Cervical Intraepithelial Neoplasia- CIN) – występowanie, etiopatogeneza i rozwój.

Śródnabłonkowa neoplazja szyjki macicy to pojęcie wprowadzone w 1968 roku przez R.M. Richarta (66,81) dla zmian płaskonabłonkowych szyjki macicy ograniczonych do śródnabłonka w miejsce dotychczas stosowanego określenia dysplazja i rak in situ.

W zależności od nasilenia zmian w komórkach oraz grubości warstwy nabłonka, której te zmiany dotyczą, wyróżniono CIN1 i CIN2 obejmujące 1/3 do 1/2 grubości nabłonka i odpowiadające lekkiej i umiarkowanej dysplazji oraz CIN 3 obejmującą całą grubość nabłonka i odpowiadającą ciężkiej dysplazji i rakowi przedinwazyjnemu (carcinoma in situ).



Ryc. 1. Schemat śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy (CIN) wg Richarta

Zaproponowana przez Richarta klasyfikacja histologiczna w większym stopniu, niż poprzednie klasyfikacje uwzględnia aktualne dane na temat rozwoju karcinogenezy i biologię tego procesu w obrębie szyjki macicy. CIN1 i CIN2 w dużym odsetku, bo od 30 do 50% przypadków, może ulec samoistnej remisji, a tylko kilkanaście procent tych zmian ulega progresji (3,40,59,66,81). Natomiast CIN3 to zmiany, które rzadko ulegają całkowitej remisji, a w 40% do 60% ulegają progresji do raka inwazyjnego (3,40,59,66).

Podział CIN zaproponowany przez Richarta koreluje z obrazami kolposkopowymi, tj. grupą obrazów kolposkopowych charakterystycznych dla CIN1 i CIN2 oraz z grupą obrazów charakterystycznych dla CIN3. Obrazy kolposkopowe w carcinoma in situ i dysplazji dużego stopnia są trudne do odróżnienia, a w większości przypadków wręcz identyczne. Zmiany morfologiczne charakterystyczne dla dysplazji dużego stopnia i raka in situ zajmują całą grubość nabłonka, a różnią się jedynie stopniem zaburzenia dojrzewania komórek. Stąd nierzadko nie jest możliwe ustalenie ścisłej granicy pomiędzy tymi zmianami, również w badaniu mikroskopowym.

Wprowadzenie klasyfikacji CIN opartej na lepszym poznaniu procesu karcinogenezy w obrębie szyjki macicy przyczyniło się do bardziej konserwatywnego postępowania terapeutycznego, co szczególnie jest istotne dla kobiet młodych, które mają w planie prokreację. Biorąc pod uwagę, że średnia wieku kobiet z CIN1 i CIN2 wynosi 27,5 – 29 lat, a z CIN3 32, 1 lat, to ciąża i poród nie są w tym okresie zjawiskami rzadkimi (3,40,59,66).

Podobny trend, jak w modyfikacji terminologii histologicznej uwzględniający wyniki badań i osiągnięcia w zakresie morfogenezy raka szyjki macicy odnotowujemy

także w klasyfikacji obrazów cytologicznych. Dowodem tego jest nowa klasyfikacja obrazów cytologicznych zaproponowana przez Narodowy Instytut Raka w Bethesda (USA) (86). Zgodnie z tą klasyfikacją zmiany morfologiczne w rozmazie cytologicznym związane z infekcją HPV oraz zmiany cytologiczne określane jako III i IV grupa według Papanicolau zastąpiono określeniem – płaskonabłonkowe zmiany śród nabłonkowe (Squamous Intraepithelial Lesions-SIL). Zgodnie z tą klasyfikacją wyróżniono dwa stopnie płaskonabłonkowych zmian śród nabłonkowych: płaskonabłonkowe zmiany śród nabłonkowe małego stopnia (Low Grade Squamous Intraepithelial Lesions LG-SIL), do której zalicza się zmiany morfologiczne charakterystyczne dla infekcji HPV i dysplazji małego stopnia oraz płaskonabłonkowe zmiany śród nabłonkowe dużego stopnia (High Grade Squamous Intraepithelial Lesions HG-SIL), do których zaliczono zmiany morfologiczne charakterystyczne dla dysplazji średniego i dużego stopnia, a także zmiany sklasyfikowane według podziału Papanicolau jako grupa IV (86). Chociaż można mieć zastrzeżenia, co do połączenia dysplazji średniego stopnia, która nie jest zmianą stabilną z dysplazją dużego stopnia i carcinoma in situ w jedną grupę, to połączenie zmian morfologicznych charakterystycznych dla infekcji HPV i lekkiej dysplazji w jedną grupę LG-SIL uwzględnia dotychczasowe wyniki badań dotyczące roli infekcji HPV w procesie karcinogenezy. Ukazuje także biologiczną ciągłość procesu zmian morfologicznych charakterystycznych dla infekcji HPV do zmian dysplastycznych. Potwierdzeniem tego są nierzadko trudności w zróżnicowaniu kolposkopowym, cytologicznym, a nawet histologicznym zmian morfologicznych charakterystycznych dla subklinicznej infekcji HPV i CIN, a zwłaszcza CIN1. Według wielu autorów subkliniczna infekcja HPV i CIN wydają się być kontynuacją tego samego procesu (7,31,57,61,62,63,64).

Infekcja HPV, zwłaszcza HPV o średnim i wysokim potencjale onkogennym, tj. HPV typ 16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,66 i 68 jest ważnym, ale nie jedynym czynnikiem indukującym powstawanie komórki zmienionej nowotworowo (7,8,29,83,22,82,92,56). Dane epidemiologiczne wskazują, że proces karcinogenezy w obrębie szyjki macicy częściej występuje u kobiet, które wcześnie, tj. w wieku kilkunastu lat rozpoczęły życie płciowe i współżyły z wieloma partnerami oraz u kobiet, których partnerzy seksualni współżyją z wieloma kobietami (7,20,34,55,56).

Jeśli kobieta w wieku kilkunastu lat miała więcej, niż 2 partnerów seksualnych, to zdaniem Ferenczy'ego (25) należy zaliczyć ją do grupy kobiet o wysokim ryzyku wystąpienia śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy. Duża liczba partnerów seksualnych stwarza bowiem większą możliwość przeniesienia infekcji drogą płciową, w tym infekcji HPV, na działanie których wrażliwy jest nabłonek szyjki macicy, zwłaszcza w okresie młodzieńczym (80). Basta (7) wykazał, że u kobiet do 25 roku życia zmianom CIN w 91,2% przypadków towarzyszyła infekcja HPV. Copleson (20) badając 270 dziewczynek w wieku 12-17 lat, które rozpoczęły już życie seksualne, stwierdził w 40% przypadków zmiany w nabłonku szyjki macicy, które określił jako atypową strefę przekształceń. Według Stafla (76) okres pokwitania i wczesnej młodości jest jednym z okresów, w których dochodzi do zapoczątkowania procesów karcinogenezy szyjki macicy. Także Syrjänen (80) nie spotkał ani jednego przypadku dysplazji u kobiet do 20 roku życia bez współistniejącej infekcji HPV. Kolejnym czynnikiem, którego obecność w sposób istotny zwiększa ryzyko karcinogenezy w obrębie szyjki macicy jest nałogowe palenie tytoniu, na co wskazuje wiele danych epidemiologicznych oraz laboratoryjnych, potwierdzających wysokie stężenie nikotyny i jej metabolitów-

kotyliny oraz węglowodorów aromatycznych w śluzie szyjkowym (7,35,75).

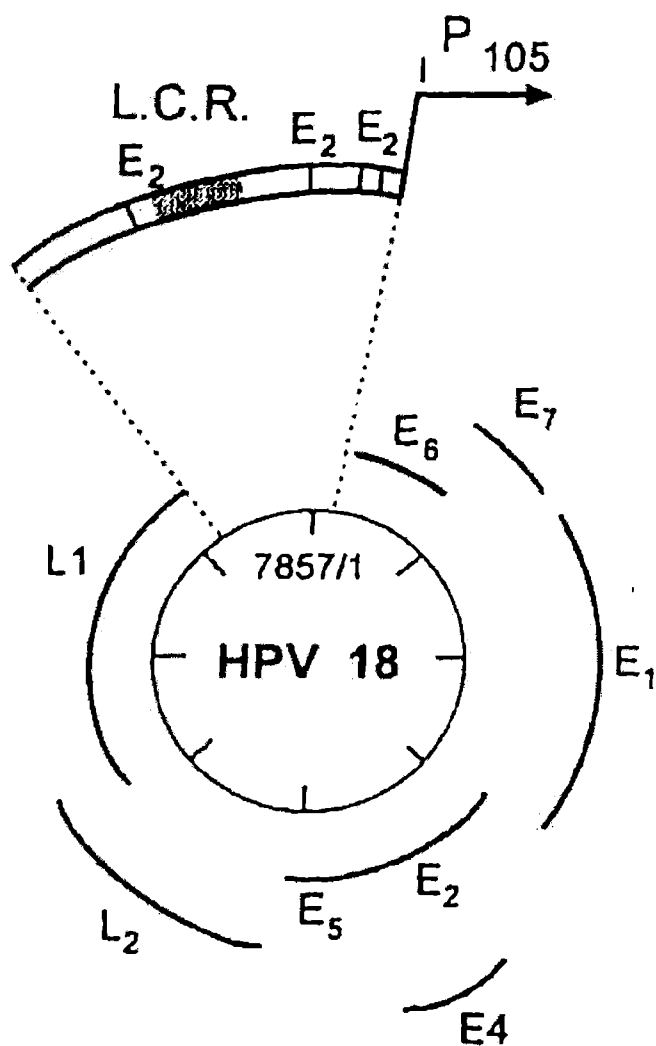
Substancje te prawdopodobnie działają jako kofaktory karcinogenezy zainicjowanej przez HPV o wysokim potencjale onkogennym. Chociaż badania epidemiologiczne nie wykazały, aby hormonalne środki antykoncepcyjne były niezależnym czynnikiem ryzyka rozwoju śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy, to połączenie antykoncepcji hormonalnej z paleniem tytoniu staje się statystycznie wysoce istotnym czynnikiem ryzyka rozwoju neoplazji w obrębie tego narządu (79).

Następnym czynnikiem, którego znaczenie w rozwoju procesu karcinogenezy w obrębie szyjki macicy trudno przecenić to niedobór oxydoreduktantów a w szczególności retinoidów (witaminy A). Retinoidy są czynnikami ochronnymi warunkującymi prawidłowe różnicowanie i dojrzewanie komórek rezerwowych w kierunku komórek nabłonka wielowarstwowego płaskiego w procesie metaplazji płaskonabłonkowej szyjki macicy (7). Badania przeprowadzone w naszej Klinice wskazują na zwiększone ryzyko rozwoju raka szyjki macicy u kobiet z obniżonym poziomem retinoidów w surowicy krwi (7). Obserwacje kliniczno-epidemiologiczne znalazły potwierdzenie w badaniach eksperymentalnych, w których stwierdzono, że retinoidy hamują ekspresję wirusowego E6 i E7 (22). Basta (7) oceniając ryzyko rozwoju raka szyjki macicy testem wielokrotnej regresji logistycznej wykazał interakcję pomiędzy obniżeniem stężenia retinoidów i nałogowym paleniem tytoniu. W grupie kobiet, u których stwierdzono występowanie obu tych czynników, ryzyko rozwoju raka szyjki macicy radykalnie wzrastało. Analiza występowania CIN i raka inwazyjnego szyjki macicy w zależności od liczby najbardziej prawdopodobnych czynników ryzyka wykazała, że nasilenie procesu karcinogenezy koreluje ze wzrostem liczby tych czynników (8).

Nasuwa to przypuszczenie, że dopiero równoczesne współdziałanie lub następujące po sobie działanie wielu czynników doprowadza do zrealizowania pełnego procesu karcinogenezy, łącznie z wystąpieniem inwazji. Te dane korelują z obserwacjami klinicznymi i epidemiologicznymi rozwoju procesu karcinogenezy w obrębie szyjki macicy, która w znakomitej większości rozwija się wieloetapowo poprzez poszczególne stopnie CIN do raka inwazyjnego.

1.2. Rola infekcji wirusowych w etiopatogenezie raka szyjki macicy.

Rozwój biologii molekularnej i związane z tym udoskonolenie metod diagnostycznych w wirusologii pozwoliły na ustalenie bardziej ścisłych związków między niektórymi nowotworami a infekcjami wirusowymi. W badaniach nad karcinogenezą raka szyjki macicy najwięcej uwagi w ostatnich kilkunastu latach poświęca się roli wirusów ludzkiego brodawczaka (Human Papillomavirus – HPV) w tym procesie.



Ryc. 2. Schemat budowy DNA HIV.

HPV są małymi kolistymi wirusami DNA należącymi do rodziny Papowa.

Materiałem genetycznym jest kolisty, dwuniciowy łańcuch DNA o długości około 8 000 par zasad, w skład którego wchodzi region genów wczesnych (E) i późnych (L) oddzielonych regionem kontrolnym (LCR- long control region). Cząsteczka wirionu składa się z 72 kapsomerów o budowie pentamerycznej i ma średnicę 40 - 55 nm. HPV stanowi heterogenną grupę wirusów. Do chwili obecnej wykryto ponad 100 podtypów ludzkich wirusów papilloma różniących się antygenowo. Około 30 z nich cechuje się powinowactwem do nabłonek dolnego odcinka narządów płciowych kobiet, tj. szyjki macicy, pochwy i sromu, jak również męskich zewnętrznych narządów płciowych (7,55,6,4,71,17,32,41,13,8,83,82,15).

Z tego HPV typy 6,11,34,42,43,44,53,54,55,57,59,61,62,54,67,68,70 uważa się za wirusy o niskim potencjale onkogennym, z którymi wiąże się powstawanie zmian łagodnych o charakterze brodawczaków (papilloma) i kłykcin kończystych (condylomata acuminata) oraz zmian przednowotworowych o charakterze śródnabłonkowej neoplazji o niskim stopniu zaawansowania (7,8). Natomiast HPV typ 16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,66,69 to grupa wirusów o średnim i wysokim potencjale onkogennym, którym przypisuje się udział w powstawaniu śródnabłonkowej neoplazji dużego stopnia i raka inwazyjnego szyjki macicy, jak również sromu i pochwy (7,55,6,4,71,17,32,41,13,8,83,82,15).

Basta (8) wyróżnia cztery postacie infekcji HPV w obrębie szyjki macicy, tj. postać: 1) utajoną, 2) subkliniczną, 3) klinicznie jawną i 4) towarzyszącą CIN i rakowi inwazyjnemu.

Zgodnie z danymi piśmiennictwa, odsetek kobiet z infekcją HPV waha się od 6 do 20% (7,55,6,4,71,17,32,41,13,8,83,82,15). Ta rozpiętość zależy najprawdopodobniej od zastosowanej metody diagnostycznej, sposobu pobierania

materiału biologicznego do badań i rodzaju tego materiału, wieku kobiet, ich stanu hormonalnego oraz od tego, czy są to kobiety ciężarne, czy nieciężarne (7,55,6,4,71,17,32,41,13,8,83,82,15). W największym odsetku infekcja HPV dotyczy kobiet młodych, tj. pomiędzy 18 a 30 rokiem życia (59,7,55,71,31,82,20,80,76,75,35). Średnia wieku kobiet z subkliniczną infekcją HPV wynosi według różnych autorów od 18 – 24 lat (59,7,55,71,31,82,20,80,76,75,35). Znacznie częściej infekcja HPV dotyczy kobiet, które wcześniej rozpoczęły współżycie płciowe, miały wielu partnerów seksualnych, pochodzą z grup społecznych o niskim statusie socjoekonomicznym, przyjmują środki immunosupresyjne lub u których stwierdza się defekty i zaburzenia układu immunologicznego (80,76,75,35). A więc model epidemiologiczny kobiet z infekcją HPV jest podobny do modelu epidemiologicznego kobiet z CIN i rakiem inwazyjnym szyjki macicy.

Infekcja HPV zaliczana jest do chorób przenoszonych drogą płciową (Sexually Transmitted Disease - STD) i aktualnie uważana jest za jedną z najczęstszych chorób przenoszonych tą drogą. Istnieje również możliwość infekcji wertykalnej, tj. z matki na płód w trakcie porodu, co może przyczynić się do zmiany dotychczasowych poglądów na to zakażenie (59,7,55,71,31,82,20,80,76,75,35). Wirusy HPV wykazują powinowactwo do komórek warstwy podstawnej (bazalnej) nabłonka szyjki macicy. Strefa transformacji, w której zachodzą dynamiczne procesy metaplastji płaskonabłonkowej, szczególnie narażona na mikrourazy, jak np. podczas stosunku płciowego, stanowi doskonałe miejsce kontaktu wirusów papilloma z warstwą podstawną nabłonka. Właśnie w warstwie podstawnej i przypodstawnej komórek nabłonka wielowarstwowego płaskiego rozpoczyna się proces transkrypcji i pozachromosomalnej replikacji wirusa. Cykl replikacyjny wirusa papilloma jest ściśle skorelowany z dojrzewaniem keratynocyta, tj. czasem,

jaki jest potrzebny do przejścia niezróżnicowanej komórki warstwy podstawnej do warstwy powierzchniowej. Białka kapsydu wirusowego wytwarzane są tylko w komórkach zróżnicowanych terminalnie. Tak replikowane cząsteczki wirusa mogą infekować sąsiednie rejony dolnego odcinka narządu płciowego lub narządy płciowe partnerów seksualnych. Niestety, nie ma możliwości śledzenia onkogenego działania HPV za pomocą klasycznych metod mikrobiologicznych. Niemożliwe jest namnażanie i wzrost HPV in vitro w hodowli, gdyż jego wirion nie ulega podziałowi, a do replikacji konieczny jest kwas nukleinowy, do którego produkcji niezbędny jest udział rybosomów komórek gospodarza. Z tego powodu dane dotyczące związku infekcji wirusem HPV a procesem karcinogenezy pochodzą przede wszystkim z wieloletnich analiz epidemiologicznych i badań klinicznych. Badania te dowodzą podobieństwa modelu epidemiologicznego infekcji HPV i raka szyjki macicy (59,7,55,71,31,82,20,80,76,75,35). Niższa o kilka lat średnia wieku kobiet z izolowaną subkliniczną infekcją HPV od średniej wieku kobiet z CIN, a o kilkanaście od średniej wieku kobiet z rakiem inwazyjnym, koreluje z wieloetapowym i dość długotrwałym w większości przypadków modelem procesu karcinogenezy w obrębie szyjki macicy.

Wyniki badań kolposkopowych, cytologicznych, a nawet histologicznych wykazują podobieństwo zmian morfologicznych subklinicznej infekcji HPV z CIN, a zwłaszcza z CIN1 i CIN2 (7,8). Obserwacje kliniczne subklinicznej infekcji HPV wykazały, że w około 10 – 12% ulega ona progresji do CIN (59,7,55,71,31,82,20,80,76,75,35). Wyższy odsetek progresji CIN1 i CIN2 z towarzyszącą infekcją HPV typ 16/18 w porównaniu do progresji tych zmian bez infekcji HPV lub z towarzyszącą infekcją HPV o niskim potencjale onkogenym oraz stwierdzenie wirusa tego samego typu, tj. HPV 16/18 w węzłach chłonnych i pierwotnej zmianie

nowotworowej w obrębie szyjki macicy także dowodzi, że współistnienie infekcji HPV typ 16/18 i raka szyjki macicy nie jest przypadkowe (7,71,31,82,20,34,80). Również obserwacje kliniczne wskazują, że konserwatywne postępowanie chirurgiczne w przypadkach CIN z towarzyszącą infekcją HPV o wysokim potencjale onkogennym częściej, aniżeli w przypadkach współistnienia infekcji HPV o niskim potencjale onkogennym prowadzi do wznowy procesu śród nabłonkowej neoplazji (59,7,55,71,31,82,20,80,76,75,35). W badaniach laboratoryjnych, jak i in vivo zaobserwowano, że HPV infekując niedojrzałe komórki rezerwowe w obrębie strefy transformacji zaburza ich dojrzewanie i proces różnicowania (59,7,55,71,31,82,20,80,76,75,35). Obecność HPV typ 16/18 oraz ich transkryptorów E6 i E7 stwierdzono w ponad 80% przypadków raka szyjki macicy, co sugeruje ich bezpośredni udział w karcynogenezie (59,7,55,71,31,82, 20,80,76,75,35).

Geny E6 i E7 wirusa papilloma kodują białka określane jako onkoproteiny (83). W większości zmian przednowotworowych wirusowe DNA występuje w formie pozachromosomalnej. Integracja wirusowego DNA z genomem komórki gospodarza następuje zwykle w obrębie otwartych ramek odczytu E1 i E2. (open reading frame) i zaburza regulację promotorów HPV, co prowadzi do wzrostu ekspresji genów E6 i E7. W badaniach in vitro wykazano, że onkoproteina E6 wiąże się z białkiem p53, które jest komórkowym inhibitorem karcynogenezy, inaktywując go (83). Natomiast onkoproteina E7 wykazuje duże powinowactwo do białka hamującego rozwój retinoblastoma (pRB), powodując rozbięcie kompleksu pRB- E2F i uwalniając czynnik transkrypcyjny E2F. Ekspresja jednego lub obu genów wirusów E6 i E7 może doprowadzić do zaburzenia regulacji cyklu komórkowego i zainicjować proces neoplazji (41,13,8,83,82).

Jednak ta ekspresja, choć konieczna do zainicjowania procesu transformacji nowotworowej komórki, wydaje się niewystarczająca do rozwoju guza. Świadczyć o tym może:

- 1) fakt, że nie w każdym przypadku infekcja HPV o wysokim potencjale onkogennym prowadzi do transformacji nowotworowej,
- 2) różnie długi okres czasu od wystąpienia infekcji do rozpoczęcia transformacji nowotworowej,
- 3) obserwowanie nie tylko progresji, ale także remisji CIN z towarzyszącą infekcją HPV typ 16/18.

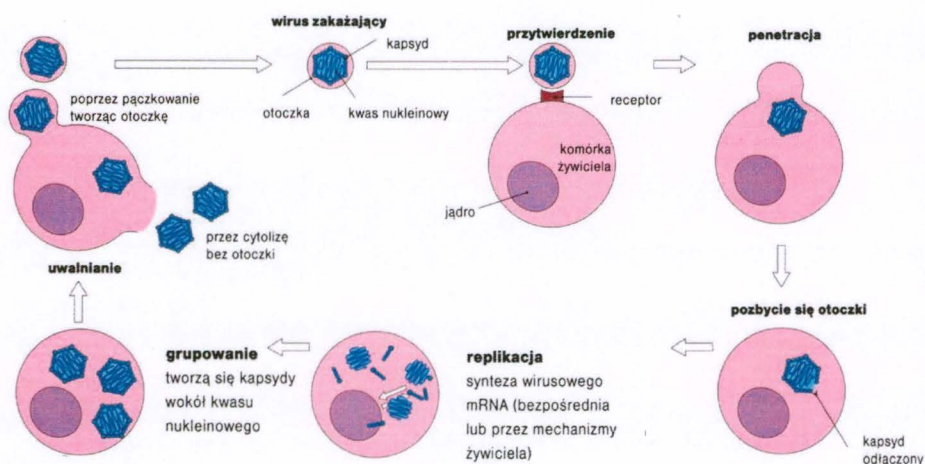
Może to przemawiać za istnieniem wewnątrzkomórkowych mechanizmów kontroli ekspresji genów E6 i E7 oraz niezbędnych dodatkowych czynników do rozwoju raka w obrębie szyjki macicy. Dotychczasowe badania wskazują, że takimi czynnikami mogą być wymienione powyżej nałogowe palenie tytoniu, niedobór czynników oxydoredukcyjnych, a zwłaszcza retinoidów (witaminy A), a także zaburzenia układu immunologicznego, uwarunkowania genetyczne i inne, bliżej jeszcze nieokreślone czynniki (59,7,55,71,31,82,20,80,76,75,35).

1.3. CIN1 i CIN2 z towarzyszącą infekcją HPV a stan układu immunologicznego organizmu.

1.3.1. Odporność przeciwwirusowa.

Wirusy są bezwzględnyimi pasożytami wewnątrzkomórkowymi angażującymi systemy biochemiczne komórek gospodarza dla uruchomienia syntezy białek i metabolizmu cukrów.

Typowy przebieg zakażenia komórki wirusami o płaskonabłonkowym tropizmie, w tym HPV wg Roitta i wsp. (67) obrazuje Ryc 3.



Ryc. 3. Schemat przebiegu zakażenia wirusowego.

Wirusy wiążą się z komórką gospodarza poprzez swoje receptory. Po wnikięciu do komórki wirus pozbywa się otoczki, kwas nukleinowy zostaje uwolniony i dochodzi do transkrypcji i następnej syntezy białek wirusowych. Genom wirusa ulega replikacji, tworzą się potomne cząstki wirusa (wiriony), które ulegają uwolnieniu do otoczenia, powodując zakażenie sąsiednich komórek

i tkanek. Szczegóły tego procesu zależą od rodzaju wirusa oraz od stanu metabolicznego komórek gospodarza.

We wczesnym okresie zakażenia wirusowego często ma miejsce pewnego rodzaju wyścig pomiędzy wirusem a układem obronnym gospodarza. Pierwszą linię obrony przeciwko inwazji wirusów stanowi integralność powierzchni ciała.

Jeśli zostanie naruszona dochodzi do aktywacji wczesnych, wrodzonych (nieswoistych) mechanizmów obrony, takich, jak: interferon (IFN), naturalne komórki cytotoksyczne, komórki zabijające (natural killers- NK) i makrofagi.

Zgodnie z wynikami badań niektórych autorów (67) IFN stymuluje hamowanie replikacji wirusa. W zależności od źródła pochodzenia i miejsca kodowania chromosomalnego wyróżnia się trzy rodzaje interferonów:

- IFN α (leukocytarny) kodowany przez rodzinę 20 genów na chromosomie 9
- IFN β (fibroblastyczny) kodowany przez pojedynczy gen na chromosomie 9
- IFN γ (immunologiczny) kodowany przez pojedynczy gen na chromosomie 12.

Po zakażeniu wirusem komórka uruchamia wytwarzanie IFN α/β , które pobudzają mechanizmy przeciwwirusowe w komórkach sąsiednich, chroniąc je przed zakażeniem (Ryc. 3). IFN aktywują liczne geny, w tym dwa o bezpośredniej aktywności przeciwwirusowej: kinazę białkową o masie 67 kD, która hamuje fosforylację w miejscach e i F-2 i blokuje translację białek oraz syntetazę 2',5'-oligoadenyłową, która aktywuje nieczynną endonukleazę biorącą udział w degradacji wirusowego RNA.

Istnieją również inne, bardziej swoiste mechanizmy przeciwwirusowe. Na przykład IFN γ wzmacnia skuteczność nabytej odpowiedzi immunologicznej poprzez zwiększenie ekspresji cząsteczek głównego układu zgodności tkankowej (Major

Histocompatibility Complex- MHC) klasy I i II, a także jest silnym aktywatorem makrofagów i komórek NK.

Dotychczasowe wyniki badań (13,19,24,27) wskazują, że komórki NK są cytotoksyczne w stosunku do komórek zakażonych wirusem.

W ciągu dwóch dni od zakażenia pojawiają się aktywne komórki NK. Są to głównie komórki efektorowe przeciw wirusom opryszczki (Herpes Simplex Virus- HSV), HPV i wirusom cytomagalii (Cytomegalo Virus- CMV). Wciąż nie jest jasne, jakie cząsteczki powierzchniowe komórki zakażonej wirusem rozpoznają komórki NK. Niektóre wirusy mogą hamować ekspresję antygenów powierzchniowych klasy I. Jest to prawdopodobnie strategia ominięcia rozpoznania przez limfocyty T. IFN γ pobudza komórki NK doprowadzając do ich gromadzenia się i wzrostu aktywności w miejscu zakażenia. Komórki NK są również jednym z głównych mediatorów cytotoksyczności komórkowej zależnej od przeciwciał (Antibody- Dependent Cell Cytotoxicity- ADCC).

Przeciwciała i układ dopełniacza ograniczają rozprzestrzenianie się wirusa oraz powtórne zakażenie. Zakażenie powoduje uruchomienie odpowiedzi nabytej (swoistej) obejmującej pojawienie się cytotoksycznych limfocytów T, limfocytów wspomagających (lymphocyte T- helper – Th) i przeciwciał antywirusowych (67,69). Przeciwciała zapobiegają przenoszeniu się wirusa przez bezpośredni kontakt na sąsiednie komórki i są szczególnie ważne w ograniczaniu szerzenia się infekcji poprzez krwioobieg. Na błonach śluzowych wzrasta produkcja immunoglobuliny A (IgA), co chroni przed reinfekcją. Przeciwciała mogą powstać przeciw każdemu z białek wirusowych pojawiających się w zakażonej komórce. Największe znaczenie w kontroli zakażenia posiadają przeciwciała skierowane

przeciw glikoproteinom otoczki wirionu lub białkom powierzchniowym zakażonej komórki (73,82,83,89).

Dopełniacz (complement - C) może uszkadzać otoczkę wirionu w procesie lizy wirusa. Jednakże dopełniacz, poza udziałem w wiązaniu wolnych cząsteczek wirusa, nie ma istotnego znaczenia dla obrony przeciwwirusowej, gdyż osobnicy z niedoborami dopełniacza nie wykazują skłonności do ciężkich zakażeń wirusowych (67).

Ważną rolę w odporności przeciwwirusowej odgrywają limfocyty T.

Grasiczozależna odpowiedź humoralna wymaga obecności limfocytów wspomagających (limfocyty Th CD4+) dla zmiany klas i dojrzewania powinowactwa przeciwciał. Ponadto limfocyty CD4+ są niezbędne dla indukcji cytotoksycznych limfocytów T CD8+, a także pojawienia się i aktywacji makrofagów w miejscu zakażenia wirusowego (16,28,47,69).

Restrykcyjne wobec cząsteczek MHC klasy I limfocyty cytotoksyczne CD8+ gromadzą się w miejscach replikacji wirusa i niszczą zakażone nim komórki.

Ponieważ większość komórek organizmu wykazuje ekspresję cząsteczek MHC I, jest to ważny mechanizm identyfikacji i eliminacji komórek zakażonych wirusem.

Praktycznie każde białko wirusowe może zostać przetworzone w cytoplazmie do peptydów, które zostają następnie przetransportowane do siateczki

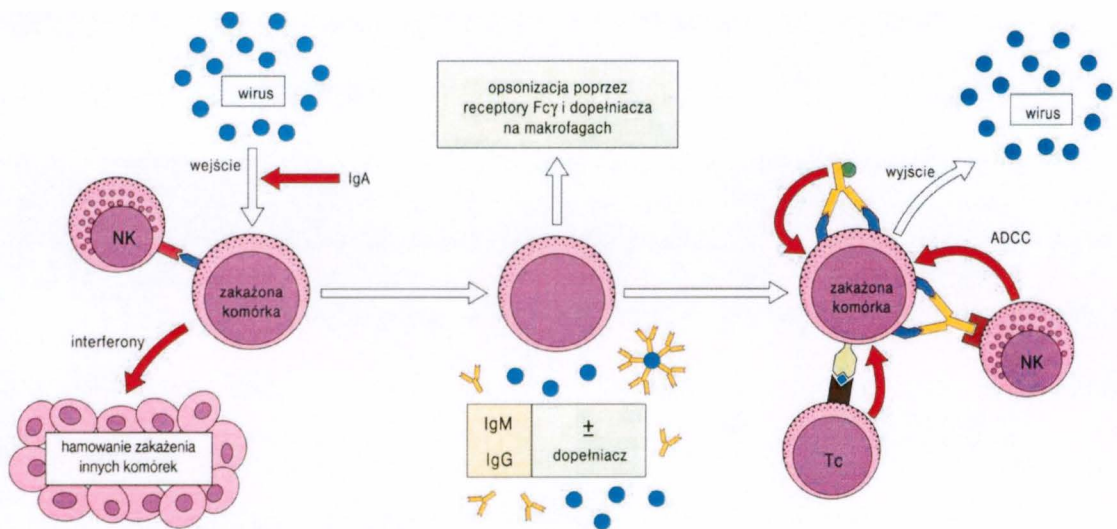
śródpłazmatycznej i połączone z cząsteczkami MHC klasy I. Jest to szczególnie

korzystne dla gospodarza, ponieważ pozwala na szybkie wykrycie białek

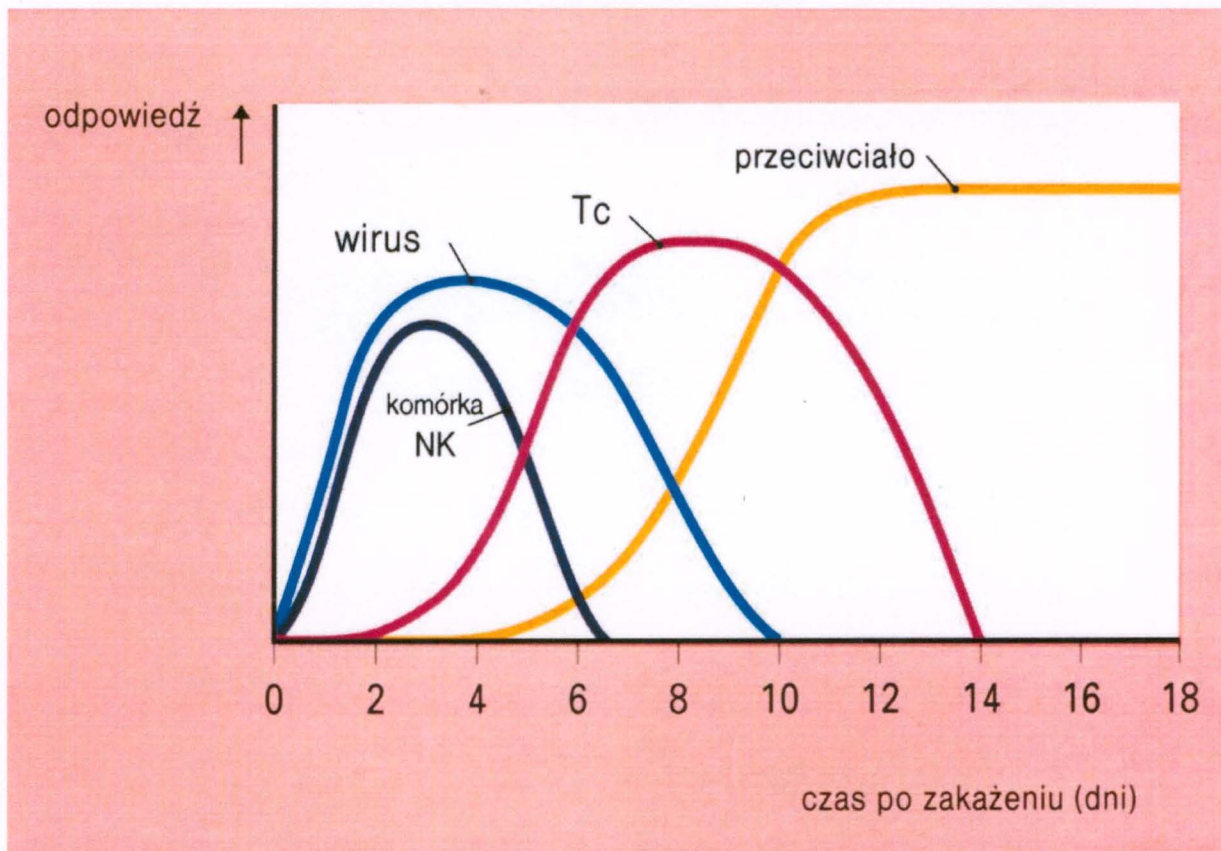
wirusowych mających wczesną ekspresję w cyklu replikacji, umożliwiając ich

rozpoznanie przez limfocyty T dużo wcześniej, zanim dojdzie do powstania

nowych cząstek potomnych wirusa (47,69).



Ryc. 4. Schemat ilustrujący mechanizmy obronne organizmu na zakażenie wirusowe.



Ryc. 5. Schemat kinetyki indukcji mechanizmów obronnych przeciwko zakażeniom wirusowym.

Limfocyty CD4+ są główną populacją komórek efektorowych w odpowiedzi immunologicznej na zakażenie komórek nabłonka przez wirus HSV i jedną z ważniejszych w infekcji HPV. W tym przypadku w reakcji nadwrażliwości typu opóźnionego dochodzi do napływu makrofagów i przyspieszenia eliminacji wirusa (67). Kluczowymi cytokinami w tej reakcji są IFN γ i czynnik martwicy guza (Tumor Necrosis Factor- TNF).

Mechanizmy obrony przeciwwirusowej i kinetykę ich indukcji wg Roitta i wsp. obrazuje Ryc.4 i 5 (67).

1.3.2. Odporność przeciwnowotworowa.

Nadzór immunologiczny jest pojęciem, które oznacza zapobieganie rozwojowi większości nowotworów drogą wczesnej destrukcji atypowych komórek przez układ odpornościowy gospodarza (67). Nadzór ten jest jednak bardziej skuteczny przeciw wirusom niż komórkom nowotworowym. Przeciwnowotworowa odpowiedź immunologiczna została więc przyjęta za zjawisko wczesne, prowadzące do zniszczenia większości nowotworów przed ich manifestacją kliniczną. Odpowiedź immunologiczna jest szczególnie ważna w prewencji rozsiewu wirusów onkogennych (zakażenie wirusem Epstein- Barr- EBV, HPV i innymi), natomiast nadzór nad nowotworami jest stosunkowo mało skuteczny. Osobnicy, którzy zostali zakażeni wirusem EBV są nosicielami wirusa przez całe życie i wykazują silną odpowiedź cytotoksyczną T (Tc) wobec wirusa. Nowotwory, w tym zwłaszcza wczesne etapy nowotworzenia, jak np. CIN, posiadają liczne mechanizmy unikania odpowiedzi immunologicznej (67). Najbardziej oczywistym jest brak immunogenności guza. Przyczyną może być nie sam brak potencjalnych antygenów nowotworowych, ale to, że komórki nowotworowe są mało aktywne jako komórki prezentujące antygen (Antigen Presenting Cells- APC). Częsteczką białka B7 obecna na wyspecjalizowanych APC uważana jest obecnie za kluczowy bodziec dodatkowy, który działa poprzez swój przeciwcceptor CD28 obecny na powierzchni limfocytu. W warunkach doświadczalnych wykazano, że prezentacja kompleksów MHC - antygen peptydowy receptorowi limfocytu T przy braku kostymulacji B7 może prowadzić do anergii (12).

1.3.3. Humoralna odpowiedź na infekcję HPV i CIN.

Ze względu na cykl replikacyjny wirusa HPV, w którym formowanie kapsydu zachodzi w powierzchniowych warstwach nabłonka, zaś białka wczesne obecne są w jego różnicujących się pokładach jedynie w niewielkiej ilości (z wyjątkiem białka E4), rozpoznanie swoistych epitopów przez limfocyty B jest znacznie utrudnione w porównaniu z infekcjami wirusowymi przebiegającymi z wiremią (92). Dlatego znaczny odsetek pacjentek HPV - pozytywnych (20- 50%) nie wykazuje obecności przeciwciał anty - HPV. Pojawienie się przeciwciał jest na ogół związane z przedłużającym się okresem infekcji (brodawczaki nawrotowe) oraz najprawdopodobniej z uwolnieniem się antygenów wirusowych wraz z rozpadem komórek guza (raka szyjki macicy). Nie stwierdzono korelacji pomiędzy poziomem przeciwciał a dalszym rozwojem infekcji HPV w aspekcie progresji lub regresji zmian (74). Jak wykazują badania na zwierzętach, obecność przeciwciał neutralizujących może znamienne przyczyniać się do ograniczenia infekcji niektórymi rodzajami wirusa brodawczaka, np brodawczakami zwierzęcymi (Cotton - tail Rabbit Papilloma Virus - CRPV) oraz HPV. Udział odpowiedzi humoralnej w zwalczaniu istniejącej infekcji jest jednak niewielki (74).

1.3.4. Komórkowa odpowiedź na HPV i CIN.

Podstawowym mechanizmem aferentego ramienia odpowiedzi komórkowej jest prezentacja antygeny przez wyspecjalizowane komórki prezentujące antygen APC (*antigen presenting cells*). W obrębie komórek nabłonkowych taką rolę w drodze MHC II zależnej pełnią komórki Langerhansa. Stanowią one małą populację (3-8%) dendrytycznych komórek z charakterystycznymi organellami komórkowymi, zwanymi ziarnistościami Birbecka (26). Są to komórki pochodzące ze szpiku kostnego, które migrują do skóry i nabłonka (84). Obniżenie liczby komórek Langerhansa powodować może wystąpienie miejscowego deficytu odpornościowego związanego ze zmniejszeniem się aktywacji limfocytów T. Szczególnie duża liczba tych komórek w obrębie szyjki macicy występuje w obrębie strefy regeneracji. Badania Morrisa i wsp. (53) oraz McArdla i wsp. (49) wykazały drastyczne obniżenie się liczby komórek Langerhansa w obrębie nabłonka płaskiego szyjki macicy w przebiegu infekcji HPV i śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy (CIN) (52,85).

Komórki prezentujące antygen (APC), w tym także komórki Langerhansa, przetwarzają sfagocytowany antygen pochodzenia zewnątrzkomórkowego.

W obrębie endosomów dochodzi do połączenia antygeny z cząsteczkami MHC-II. Cząstki MHC-II trafiają do endosomów poprzez aparat Golgiego z miejsca ich powstawania tj. retikulum endoplazmatycznego. Do połączenia dochodzi w drodze dysocjacji łańcucha niezmiennego (*invariant chain*) od cząsteczki MHC-II (w warunkach niskiego pH endosomów), co umożliwia przyłączenie w to miejsce (łańcuchy α, β MHC-II) peptydu antygenowego. Następnie kompleks: MHC-II -

antygen transportowany jest do powierzchni błony komórkowej, gdzie ulega prezentacji limfocytom T posiadającym receptor α, β (T cell receptor- TCR). Prezentacja ta stymuluje powstawanie subpopulacji limfocytów pomocniczych CD4+ T helper (Th) , wytwarzających cytokiny. Wśród cytokin wytwarzanych przez komórki CD4+ można wyróżnić dwie grupy. Limfocyty Th1 produkują preferencyjnie interleukinę 2 (IL2) i IFN γ , natomiast limfocyty Th2 interleukinę 4 i interleukinę 10 (IL 4 i IL10). Cytokiny pierwszej grupy stymulują preferencyjnie cytotoksyczne limfocyty (cytotoxic lymphocyte- CTL), natomiast w stosunku do APC, IFN γ aktywuje makrofagi. Z kolei IL-4 i IL-10 stymulują preferencyjnie limfocyty B, powodując ich ostateczne różnicowanie w kierunku plazmocytów, produkujących przeciwciała (69).

Z uwagi na wewnątrzkomórkową lokalizację infekcji HPV w mechanizmie obronności organizmu preferowana wydaje się być MHC-II zależna stymulacja Th1.

W licznych badaniach wykazano, że w obszarach CIN i raka szyjki macicy dochodzi do zwiększenia ekspresji MHC-II (77). Zjawisko to nazywane MHC-II *up regulation*, którego mechanizm oraz rola nie zostały jak dotąd ostatecznie wyjaśnione. Jedną z hipotez opisujących to zjawisko przedstawił w 1993 Nickloff (58). Zauważył on, że również komórki nabłonkowe mogą pełnić rolę "nieprofesjonalnych" komórek prezentujących antygeny w drodze MHC-II. Takie wzmoczenie prezentacji antygenów limfocytom Th miałyby zwiększać prawdopodobieństwo regresji obszarów CIN MHC - II pozytywnych. Jednakże wzmoczona prezentacja powodować może rozwinięcie się tolerancji immunologicznej (prawdopodobnie na skutek braku cząsteczek kostymulujących). Powstały w ten sposób stan anergii limfocytów T pogłębiałby deficyt odporności

wywołany obniżoną liczbą komórek Langerhansa, przez co MHC - II miałyby tendencje do wzrostu ekspresji (zjawisko *up-regulation*).

Peptydy pochodzące z syntezy wewnątrzkomórkowej (np. białka wirusowe) ulegają prezentacji na drodze MHC-I zależnej. Po powstaniu w komórce antygenów peptydowych dochodzi do ich aktywnego transportu w obecności TAP - 1 i TAP - 2 (*transporter in antigen processing*) do retikulum endoplazmatycznego, gdzie zachodzi ich połączenie z łańcuchem ciężkim cząsteczki MHC - I.

Stabilizacja powstałego kompleksu antygen - łańcuch ciężki MHC - I ma miejsce po przyłączeniu cząsteczki $\beta 2$ - mikroglobuliny przy jednoczesnej glikozylacji łańcucha ciężkiego. Kompleks taki jest następnie transportowany poprzez aparat Golgiego do błony komórkowej, gdzie ulega prezentacji limfocytom TCD8+ (limfocyty cytotoksyczne/supresorowe) posiadającym receptor α, β TCR (74,67).

Na skutek aktywacji limfocytów CD8+ powstają limfocyty cytotoksyczne wykazujące bezpośrednie działanie lityczne wymierzone w komórkę prezentującą antygen w połączeniu z MHC - I. Prawidłowy nabłonek szyjki macicy wykazuje jednorodną ekspresję MHC - I na powierzchni keratynocytów. W około 40% przypadków CIN dochodzi do utraty ekspresji indywidualnych alleli ludzkich antygenów leukocytarnych (Human Leukocyte Antigen - HLA). W nowotworach i stanach przednowotworowych związanych z HPV antygeny wirusa spełniają prawdopodobnie funkcje antygenów specyficznych dla guza prezentowanych przez różne determinanty HLA I (77). Hilders i wsp. (36) sugerują, że produkt HLA-A2 może pełnić funkcje restrykcyjne dla peptydów E6 i E7 HPV 16. Komórki nowotworowe nie wykazujące ekspresji specyficznego elementu restrykcyjnego dla prezentacji antygeny (w przypadku raka szyjki macicy- E6/E7) mogą uniknąć lizy wywołanej przez CTL, gdyż limfocyty TCD8+ rozpoznają antygen jedynie

w kontekście HLA-I. Z drugiej strony natomiast całkowita utrata ekspresji HLA-I może prowadzić do wzrostu wrażliwości komórek nowotworowych na lityczne działanie komórek NK. Mechanizm, w jakim dochodzi do obniżenia ekspresji MHC-I w obrębie zmian nowotworowych związanych z HPV, nie jest wyjaśniony.

Dominującym typem limfocytów w szyjce macicy są limfocyty T, co potwierdza szczególną rolę śródnabłonkowej odpowiedzi komórkowej w reakcji na infekcję HPV (47). W przebiegu infekcji HPV oraz w CIN i raku szyjki macicy bezwzględna liczba śródnabłonkowych limfocytów T ulega istotnemu zmniejszeniu.

Dochodzi również do obniżenia stosunku liczby subpopulacji limfocytów CD4+/CD8+ . Stosunek ten w prawidłowym nabłonku szyjki macicy wynosi około 3.21± 0.33 (15), natomiast w przebiegu CIN ulega obniżeniu do 1.72 lub nawet poniżej 1. Ta zmiana proporcji może odzwierciedlać naturalną obronę komórkową lub być indeksem jej upośledzenia.

W przebiegu spontanicznej regresji brodawczaków i kłykcin wykazano jedynie nieznaczny wzrost liczby komórek NK (26,84,53,49,52). Mechanizmy tej samoistnej regresji nie są znane, jednak postuluje się, że w trakcie tego procesu wytwarza się pętla sprzężenia zwrotnego pomiędzy keratynocytami MHC-II(+) a limfocytami TCD4+. Subpopulacja Th1 tych limfocytów poprzez produkcję IFN γ i IL-2 wzmacnia zwrótnie prezentację antygenów w drodze zależnej od MHC - II poprzez nasilenie ekspresji MHC - II. Dodatkową cytokiną mogącą powodować MHC - II *up-regulation* jest TNF α , produkowany przez infiltrujące podścielisko śluzówki makrofagi (26,84,53,49,52).

Zatem rozregulowanie funkcji limfocytów, wśród których znaczenie
kluczowe wydają się pełnić cytokiny, leży u podstaw aspektu immunologicznego
infekcji HPV i CIN.

1.4. Postępowanie w CIN 1 i CIN 2 z towarzyszącą infekcją HPV.

Postępowanie w przypadkach CIN1 i CIN2 jest bardzo zróżnicowane i w większości ośrodków nie uwzględnia się w tym procesie faktu towarzyszącej tym zmianom infekcji HPV (8,21,24).

Aktualnie, zgodnie z zaleceniami Międzynarodowej Federacji Kolposkopii i Patofizjologii Szyjki Macicy, w przypadkach zmian o charakterze CIN1 i CIN2 winno prowadzić się ścisłą obserwację cytologiczno- kolposkopową przez okres 6 – 12 miesięcy. W razie współistnienia infekcji bakteryjno- grzybiczej należy prowadzić leczenie tych infekcji. Zwykle w trakcie tej kilku do kilkunastomiesięcznej obserwacji remisji ulega od 40 – 60% przypadków CIN1 i 30 – 40% CIN2 (8,21). U kobiet, u których zmiany CIN1 i CIN2 utrzymują się lub ulegają progresji do CIN wyższego stopnia, w wielu ośrodkach wykonuje się konizację chirurgiczną zimnym nożem lub laserem CO2 (21). U kobiet młodych, mających plany prokreacyjne zaleca się metody mniej inwazyjne, do których należą metody destrukcji tkanek, tj. kriokoagulację i waporyzację laserem CO2 (7,8). Stosowanie tych metod nawet w zmianach CIN o niskim stopniu zaawansowania, tj. CIN1 i CIN2 ma szereg ograniczeń. Zgodnie z doświadczeniami naszej Kliniki: 1) zmiana o charakterze CIN1 i CIN2 musi być zlokalizowana na tarczy części pochwowej szyjki macicy i w całości widoczna w obrazie kolposkopowym, 2) wyskrobiny z kanału szyjki macicy winny być wolne od zmian dysplastycznych, 3) zmiany dysplastyczne nie powinny tapetować gruczołów szyjkowych oraz 4) musi być pewność, że pacjentka będzie uczestniczyć w następnych po leczeniu cytologiczno - kolposkopowych badaniach kontrolnych.

W ostatnich latach w przypadkach zmian kolposkopowo – cytologicznych podejrzanych o CIN coraz szerzej jest stosowane tzw. wycięcie zmiany pętlą elektryczną (Loop Electrosurgical Excision Procedure- LEEP). Technika ta, obok znaczenia diagnostycznego, ma w dużym odsetku także znaczenie terapeutyczne. Skutecznie więc zastępuje bardziej inwazyjną w tych stanach konizację. Istnieją także sposoby leczenia zachowawczego tych zmian, zwłaszcza u kobiet młodych. Jedną z możliwości leczenia zachowawczego zmian o charakterze CIN1 i CIN2 z towarzyszącą infekcją HPV jest opracowana w naszej klinice terapia tetracykliną w połączeniu z witaminą A (7).

W obrębie szyjki macicy dojrzałych płciowo kobiet zachodzą procesy metaplastyki płaskonabłonkowej, tj. dojrzewanie i różnicowanie się niezróżnicowanych komórek rezerwowych w kierunku nabłonka wielowarstwowego płaskiego (45). Istotną rolę w tym procesie odgrywają retinoidy. Ich niedobór może prowadzić do zaburzenia tego procesu w sposób bezpośredni lub na skutek większej podatności tych komórek na zewnątrzpochodne czynniki karcinogenne, prowadząc do atypowej metaplastyki (7). Retinoidy są więc czynnikiem ochronnym w procesie karcinogenezy szyjki macicy.

Inną możliwością mogą być próby modulacji mechanizmów immunologicznych (93). Immunoterapia ma długą historię, ale rzadko jest leczeniem z wyboru. Próby jej stosowania mają miejsce w zaawansowanych już, końcowych stadiach choroby nowotworowej, jako rodzaj terapii wspomagającej, często już leczenie paliatywne. Ostatnio jednak coraz częściej odnotowuje się próby jej wprowadzania na wczesnych, często jeszcze przedklinicznych etapach nowotworzenia (70,91). Immunoterapię można podzielić na czynną i bierną, swoistą i nieswoistą oraz kombinowaną.

- 1) Do czynnej swoistej immunoterapii należą szczepionki z komórek nowotworowych, ekstraktów komórkowych, oczyszczonych lub rekombinowanych antygenów lub epitopów, które nie wyszły jeszcze z etapu eksperymentalnego.
- 2) Do biernej, swoistej immunoterapii zaliczamy podawanie przeciwciał samych lub związanych z lekami, prolekami, toksynami lub radioizotopami, przeciwciała dwuswoiste, komórki T.
- 3) Do czynnej nieswoistej immunoterapii oprócz BCG, *Corynebacterium parvum* czy levamizolu należy Iscador QuS. Iscador QuS jest wyciągiem z jemioli, zawierającym lektyny mające działanie immunopotencjalizujące, wzmacniające odpowiedź typu komórkowego jak i humoralnego.
- 4) Do biernej nieswoistej immunoterapii zalicza się komórki LAK oraz cytokiny, w tym głównie interferony (IFN), czynnik martwicy guza (TNF), interleukinę drugą (IL - 2).

Próby zastosowania tych ostatnich rodzajów immunostymulacji a zwłaszcza Iscadoru QuS i IFN zaczynają budzić ponowne zainteresowanie.

Iscador QuS jest sfermentowanym wyciągiem z jemioli hodowanej na dębie zawierającym liczne lektyny. Preparat ten wprowadzony został przez Rudolfa Steinera jako wspomagające leczenie nowotworów złośliwych w latach dwudziestych. Działanie lektyn jemioli znane jest w przemyśle farmaceutycznym od ponad 70 lat. W 1971 roku Nienhaus i Leroi (74) wykazali, że powtarzalne dootrzewnowe iniekcje Iscadoru indukowały powiększenie grasicy u myszy. Rentea i wsp. (74) wykazali wśród klonów CD-1 myszy, że wpływ na efekt troficzny grasicy utrzymywał się przez dłuższy okres czasu oraz że wiązał się on ze zwiększoną proliferacją korowych tymocytów. Bloksma i wsp. i Kwaja i wsp. (74) wykazali, że preparaty jemioli mogą być dobrym czynnikiem wzmacniającym

reakcję nadwrażliwości typu późnego na SRBC (sheep red blood cells - erytrocyty baranie). Rentea i wsp. i Bloksma i wsp.(74) w swoich badaniach sugerują, że Iscador może wzmacniać produkcję przeciwciał, głównie klasy IgG oraz IgE. Spreafico (74) badał niespecyficzną cytotoksyczność makrofagów otrzewnowych po leczeniu przez 5 dni dootrzewnowymi iniekcjami Iscadorem klonu myszy CD2F₁. W 72 godziny po zakończeniu leczenia uległa wzmocnieniu aktywność cytotoksyczna makrofagów wyrażająca się zahamowaniem wychwytu docelowych komórek białaczkowych L 1210 Ha. W badaniach klinicznych poddano ocenie działanie preparatu Iscador QuS w zaawansowanym raku sutka u kobiet otrzymujących chemioterapię. Chociaż nie udowodniono działania przeciwnowotworowego, to wydaje się, że poprawiał jakość życia tych kobiet (33).

Próba zastosowania Iscadoru QuS w bardzo wczesnych stadiach procesu nowotworowego wydaje się być interesująca. Być może, że pozwoli na zmniejszenie liczby progresji i zwiększenie remisji, zwłaszcza w przypadkach, w których może mieć znaczenie poprawa stanu immunologicznego.

Także ludzki rekombinowany interferon alfa (Intron A), któremu przypisuje się działanie przeciwwirusowe i przeciwproliferacyjne oraz modulujące różnicowanie się komórek limfocytarnych i funkcje immunologiczne budzi zainteresowanie w leczeniu wczesnych etapów nowotworzenia (74).

IFN alfa może aktywować układ monocytu/makrofagi i stymulować układ do produkcji interleukiny 1 (IL-1), cytokiny będącej kluczowym mediatorem procesu zapalnego (74).

W przypadku pacjentek z chorobą nowotworową lub w przypadku infekcji HPV mamy do czynienia ze zmniejszoną liczbą i aktywnością komórek NK.

Zastosowanie IFN w przypadkach CIN z towarzyszącą infekcją HPV poprzez aktywację komórek NK może przyczyniać się do niszczenia komórek zainfekowanych wirusem HPV jak i zmienionych dysplastycznie. Dlatego też modulacja układu immunologicznego przez Iscador QuS i IFN może zwiększać odsetek regresji CIN1 i CIN2 z towarzyszącą infekcją HPV.

2. CELEM PRACY JEST:

- a/. Określenie wpływu Iscadoru QuS oraz Intronu A na zachowanie się wybranych parametrów układu immunologicznego u kobiet z CIN1 i CIN2 oraz towarzyszącą infekcją HPV.

- b/. Ocena wpływu preparatu Iscador QuS i ludzkiego rekombinowanego interferonu alfa (Intron A) na przebieg CIN 1 i CIN 2 z towarzyszącą infekcją HPV.

3. MATERIAŁ I METODY

Materiał badawczy stanowiło 96 kobiet w wieku 18 – 52 lata, z CIN1 (50 kobiet) i CIN2 (46 kobiet) oraz z towarzyszącą infekcją HPV, diagnozowanych i leczonych w Klinice Ginekologii i Onkologii CM UJ w latach 1996 – 2000 (Tabela 1,2,3,4).

Tab. 1. Materiał badawczy.

Grupa	N	CIN1	CIN2	Test Chi ²
A	35	18 (51,4%)	17 (48,6%)	NS
B	30	15 (50%)	15 (50%)	
K	31	17 (54,8%)	14 (45,2%)	

A – grupa kobiet z CIN1 i CIN2 zakwalifikowana do leczenia Iscadorem QuS

B – grupa kobiet z CIN1 i CIN2 zakwalifikowana do leczenia Intronem A

K – grupa kontrolna

Rozpoznanie stopnia zaawansowania CIN ustalono na podstawie badania kolposkopowego, cytologicznego oraz histologicznego wycinka celowanego i materiału uzyskanego poprzez wyłóżeczkowanie kanału szyjki macicy. Badanie histologiczne wykonano w Katedrze Patomorfologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego (Kierownik: Prof. dr hab. med. Jerzy Stachura). Natomiast obecność infekcji HPV zdiagnozowano przy pomocy testu Hybrid Capture 1 i Hybrid Capture 2 w Pracowni Diagnostyki Cytologicznej i Molekularnej naszej Kliniki.

Kobiety te nie przebyły w przeszłości chorób nowotworowych. Na podstawie wywiadu, ogólnego badania fizykalnego i ginekologicznego oraz badań dodatkowych wykluczono u nich zaburzenia czynności wątroby oraz nerek, jak również nie stwierdzono zmian anatomicznych w obrębie narządu płciowego.

Tab. 2. Wiek badanych kobiet.

Grupa	n	wiek		Test Chi ²
		x + SD	min - max	
A	35	30,6 + 10,3	18 - 51	NS
B	30	32,3 + 11,0	19 - 50	
K	31	28,6 + 9,6	18 - 52	
RAZEM	96	30,4 + 10,4	18 - 52	

Tab. 3. Towarzysząca CIN1 i CIN2 infekcja HPV o niskim (NP) i wysokim (WP) potencjale onkogennym.

Grupa	n	HPV				Test Chi ²
		NP	WP	NP + WP	Razem	
A	35	24 (68,6%)	8 (22,9%)	3 (8,5%)	100%	NS
B	30	22 (73,3%)	7 (23,3%)	1 (3,4%)	100%	
K	31	20 (64,5%)	9 (29,0%)	2 (6,5%)	100%	

Tab. 4. Obecność komórek koilocytarnych w rozmazach cytologicznych kobiet w poszczególnych grupach.

Grupa	n	Koilocytoza		Test Chi ²
		NIE	TAK	
A	35	16 (45,7%)	19 (54,3%V)	NS
B	30	13 (43,3%)	17 (56,7%)	
K	31	17 (54,8%)	14 (45,2%)	

U wszystkich kobiet przed rozpoczęciem badania oceniono stan układu immunologicznego na podstawie rozkładu odsetkowego populacji limfocytów, tj. limfocytów T (CD3, CD4, CD8), stosunku CD4/CD8, limfocytów B (CD19) oraz naturalnych komórek zabijających (natural killers- NK) (CD56+/CD3-).

Kobiety te podzielono według doboru losowego na trzy grupy (Tabela 1).

Grupa 35 kobiet (grupa A) otrzymywała w iniekcji podskórnej Iscador QuS dwa razy w tygodniu przez okres 3 miesięcy. Następną grupą liczącą 30 kobiet (grupa B) otrzymywała Intron A dwa razy w tygodniu w iniekcji do szyjki macicy przez okres 3 miesięcy. Grupę kontrolną stanowiło 31 kobiet (grupa K), które poddano obserwacji cytologiczno - kolposkopowej bez leczenia.

W grupach badanych, jak i kontrolnej zachowanie się CIN monitorowano cytologicznie - kolposkopowo co 3 miesiące. W przypadkach wyników badania cytologiczno - kolposkopowego wskazujących na progresję zmiany pobierano ponownie wycinek do badania histopatologicznego. W przypadkach remisji zmian, kobiety te w dalszym ciągu podlegały kontroli cytologiczno - kolposkopowej przez okres nie krótszy niż 21 miesięcy.

Po zakończeniu obserwacji, tj. po 24 miesiącach u wszystkich kobiet, zarówno grup badanych, jak i kontrolnej, obok oceny cytologicznej i kolposkopowej, wykonano powtórne badanie w kierunku infekcji HPV, jak również oceniono stan układu immunologicznego tymi samymi metodami. Uzyskane wyniki opracowano statystycznie.

3.1. Badanie cytologiczne.

Materiał do badania cytologicznego uzyskiwano aspirując treść ze sklepień pochwy i kanału szyjki macicy przy użyciu szklanych aspiratorów. Nabłonki z powierzchni części pochwowej ścierano przy pomocy szpatułki. Materiał rozprowadzano na szkiełku podstawowym i utrwalano w mieszaninie 96% alkoholu etylowego z eterem przez około 20 minut, a następnie preparaty barwiono metodą Papanicolau w modyfikacji Krupińskiego (94). Równocześnie z oceną onkologiczną w każdym przypadku dokonano oceny cytohormonalnej oraz w kierunku infekcji, w tym infekcji HPV.

3.2. Badanie kolposkopowe.

Badanie kolposkopowe szyjki macicy przeprowadzono przy użyciu kolposkopu firmy *Leisegang* stosując próbę z 3% roztworem kwasu octowego oraz próbę Schillera. Obrazy podejrzane o CIN1 i CIN2 oraz typowe dla infekcji HPV dokumentowano na kolorowej odwracalnej taśmie małoobrazkowej o czułości 200 DIN, Superia Fuji, przy pomocy kamery fotograficznej firmy *Leica* wyposażonej w błyskową lampę elektronową i/lub przy pomocy kamery cyfrowej firmy *SANYO* przekazującej obraz do komputera wyposażonego w procesor Pentium II firmy *Intel* i kartę graficzną, uzyskując obraz cyfrowy. W przypadkach uzasadnionych, tj. progresji CIN pod kontrolą kolposkopii pobierano wycinek do badania histopatologicznego.

3.3. Hybrydyzacja DNA HPV.

Ocenę infekcji HPV wykonywano przy pomocy testu Hybrid Capture System I i II (firmy DIGENE). Materiałem do tego oznaczenia była treść pobrana z tarczy i kanału części pochwowej szyjki macicy przy użyciu Digene Specimen Collection Kit.

Główne etapy tego procesu to:

- 1) Denaturacja pobranego materiału biologicznego,
- 2) Hybrydyzacja denaturowanego DNA sondami RNA specyficznymi dla grup HPV o niskim potencjale onkogennym, tj. 6/11/42/43/44 i HPV o wysokim potencjale onkogennym tj. 16/18/31/33/35/39/45/52/56/ 58/59/68,
- 3) Związywanie powstałego hybrydu DNA-RNA z przeciwciałem monoklonalnym skierowanym przeciwko temu hybrydowi,
- 4) Dodanie do kompleksu hybryda DNA-RNA- przeciwciała monoklonalne, przeciwciała znakowanego fosfataza alkaliczną,
- 5) Odczytanie wyników w luminometrze. Wynik jest podawany we względnych jednostkach światła (relative light unit- RLU). Natężenie światła jest proporcjonalne do ilości wirusowego DNA. Czulość metody wynosi 10 pg/ml.

3.4. Badanie immunologiczne.

Wpływ Iscadoru QuS i Intronu A na układ immunologiczny oceniono przy pomocy cytofluorometrii przepływowej. Oceniono odsetek komórek CD3 odpowiadającym populacji limfocytów T, limfocyty CD4 T_h, CD8 T_s, stosunek CD4+/CD8+, komórki CD19 (limfocyty B) oraz CD56+/CD3- (komórki NK) przy użyciu testu *Simultest IMK - lymphocyte* firmy Becton Dickinson. Badania te wykonano przed rozpoczęciem i po zakończeniu leczenia.

W tym celu u każdej kobiety pobrano na czczo 10 ml krwi żyłnej do probówki ze środkiem przeciwkrzepliwym (cytrynian sodu).

Próbkę umieszczano w cytofluorometrze przepływowym i oceniano rozkład odsetkowy limfocytów.

Metoda ta polega na oświetlaniu pojedynczo przepływających komórek światłem laserowym i pomiarze rozproszonego na nich światła oraz emitowanej przez nie fluorescencji. Następnie dokonywano analizy danych w komputerze, a wyniki przedstawiono w postaci histogramu kropkowego (dot plot), obrazującego rozkład ilości komórek w zależności od intensywności fluorescencji i intensywności światła rozproszonego w określonym kierunku. Na wykresie kropkowym każdemu punktowi odpowiada jedna komórka. Na osiach zaznaczono dwa parametry: FSC (wielkość komórek) na osi x, SCC (struktura wewnętrzna) na osi y.

3.5. Metodyka podawania Iscadoru QuS i Intronu A.

Iscador QuS firmy Hiscia Weleda (Szwajcaria) jest sfermentowanym wodnym wyciągiem z jemioli *Viscum album* hodowanej na dębie, w postaci ampulek do wstrzyknięć podskórnych zawierających 0.01, 0.1, 1, 2 i 5 mg leku, w tym lektyn jemioli (mistletoe lectins- ML) i wiskotoksyn (viscotoxin- VT). Kobiety grupy A po przeszkoleniu wykonywały samodzielnie dwa razy w tygodniu iniekcje podskórne preparatu Iscador QuS we wzrastających dawkach od 0,001 do 5,0 mg.

Schemat podawania Iscadoru QuS (IQuS)

Pierwsze 2 tygodnie -	0.01 mg IQuS 2 x w tygodniu s.c.
2 tygodnie -	0.1 mg IQuS 2 x w tygodniu s.c.
2 tygodnie-	1.0 mg IQuS 2 x w tygodniu s.c
2 tygodnie-	2.0 mg IQuS 2 x w tygodniu s.c
2 tygodnie-	5.0 mg IQuS 2 x w tygodniu s.c
2 tygodnie-	5.0 mg IQuS 2 x w tygodniu s.c

Intron A (Schering- Plough, USA) jest jednorodnym białkiem o wysokim stopniu czystości wynoszącym około 95%. W 1 mg białka tego preparatu znajduje się 250 mln j.m. czystego interferonu alfa. Interferon alfa zawiera 166 aminokwasów i w odróżnieniu od innych interferonów w pozycji 24 posiada argininę. Otrzymywany jest drogą rekombinacji DNA z klonu *E. coli*, który posiada plazmid hybrydyzowany z ludzkim genem interferonu alfa-2b wyizolowanym

z leukocytów. Aktywność preparatu Intron A wyrażana jest w jednostkach międzynarodowych (IU). Przy czym 10 mln IU odpowiada 0.05 mg białka interferonu alfa-2b.

Rekombinowany IFN alfa ma krótki okres półtrwania w surowicy; wynosi on około 4 – 5 godzin.

Po podaniu podskórnym lub domięśniowym szczytowe stężenie leku w surowicy występuje po upływie 4-7 godzin.

Kobiety grupy B otrzymywały Intron A w dawce 3 mln. IU 2 razy w tygodniu w iniekcjach doszyjkowych przez okres 3 miesięcy.

Wszystkie kobiety, zarówno grupy A, jak i B poinformowano o możliwości wystąpienia najczęstszych, ewentualnych objawów ubocznych, a efekt ich wystąpienia odnotowano w protokole badawczym.

Na przeprowadzenie badania klinicznego uzyskano akceptację Komisji Etycznej Senatu UJ ds. Badań Klinicznych.

3.6. Metody statystyczne.

Wiek kobiet w grupach badanych i kontrolnej porównano testem nieparametrycznym Kruskal - Wallisa. Obecność koilocytozy, rozkład HPV o niskim i wysokim potencjale onkogennym, zachowanie się CIN1 i CIN2 (remisja, stan stacjonarny, progresja) w grupach badanych, tj. otrzymujących Iscador QuS i Intron A oraz w grupie kontrolnej, tj. bez leczenia porównano testem niezależności Chi². Rozkład odsetkowy limfocytów CD3, CD4, CD8, CD4/CD8, CD19, CD56+/CD3- w grupach badanych oraz kontrolnej, przed i po leczeniu/obserwacji klinicznej porównano testem Friedmana.

Dla porównania odsetka limfocytów w grupach badanych z grupą kontrolną po zakończeniu leczenia zastosowano test U Manna - Whitney'a i Kruskal - Wallisa. Jeśli test Kruskal- Wallisa wykazywał statystycznie znamienne zróżnicowanie pomiędzy analizowanymi wartościami w grupach badanych i kontrolnej, przeprowadzano drugi test post hoc sposobem wielokrotnych porównań Tukey'a. Natomiast związek pomiędzy poziomem limfocytów, rodzajem podawanego preparatu (Iscador QuS vs Intron A) a zachowaniem się CIN oceniono przy pomocy modelu wielowymiarowej regresji logistycznej posługując się wzorem:

$$y = \frac{\exp(b_0 + b_1x_1 + \dots + b_mx_n)}{1 + \exp(b_0 + b_1x_1 + \dots + b_mx_n)}$$

W modelu regresji jako zmienne zależne przyjęto wynik: remisja lub stan stacjonarny i progresja CIN, a jako zmienne niezależne wprowadzono: leczenie lub bez leczenia oraz odsetki limfocytów uzyskane po zakończeniu leczenia lub obserwacji klinicznej (grupa kontrolna). Algorytm regresji logistycznej w wyniku obliczeń sprowadza uzyskany model regresji do możliwości interpretacji i regresji liniowej, w której wielkość współczynników regresji b jest interpretowana jako wielkość wpływu danego czynnika na zmienną zależną.

4. WYNIKI

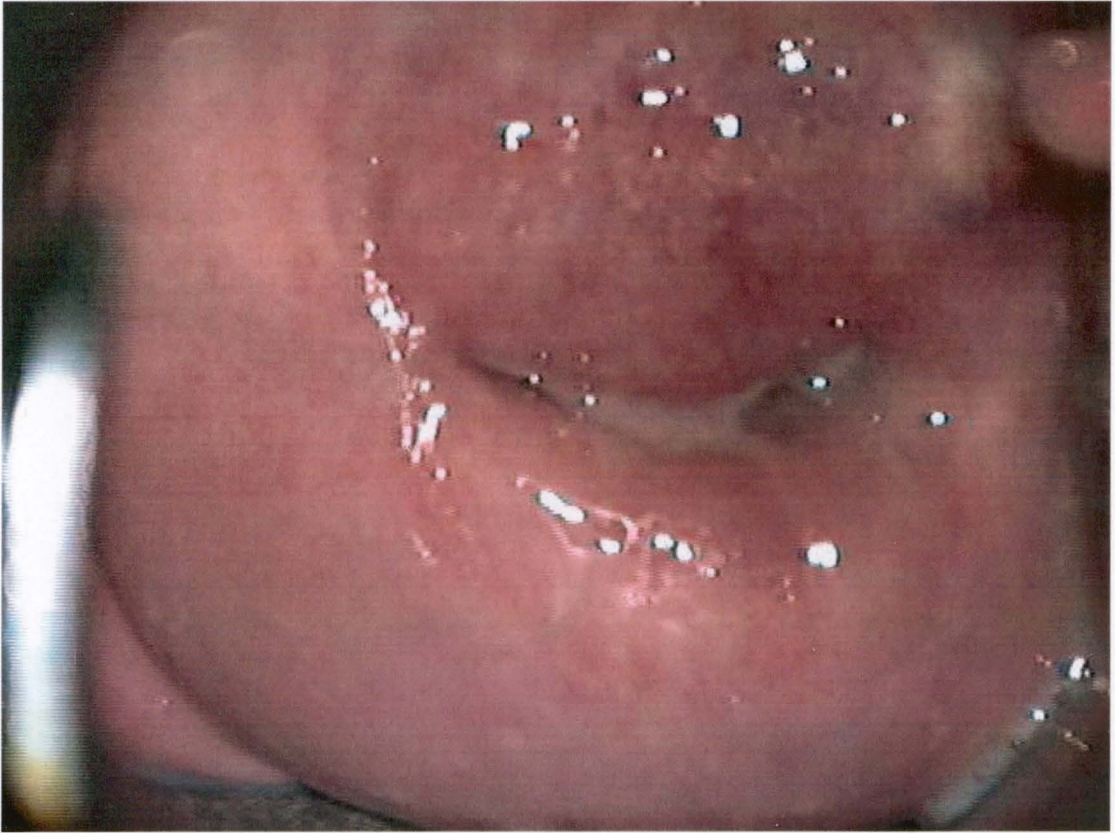
4.1. Zachowanie się CIN1 i CIN2.

Porównanie zachowania się CIN1 i CIN2 u kobiet w grupach badanych z grupą kontrolną (Tab. 5) wykazały, że w grupie badanej otrzymującej Iscador QuS (grupa A) remisja CIN dotyczyła 21 (60%) przypadków, a więc występowała w wyższym odsetku, niż w grupie kontrolnej (grupa K), w której to remisja CIN dotyczyła 16 (51,6%) przypadków (Ryc. 6 i 7).

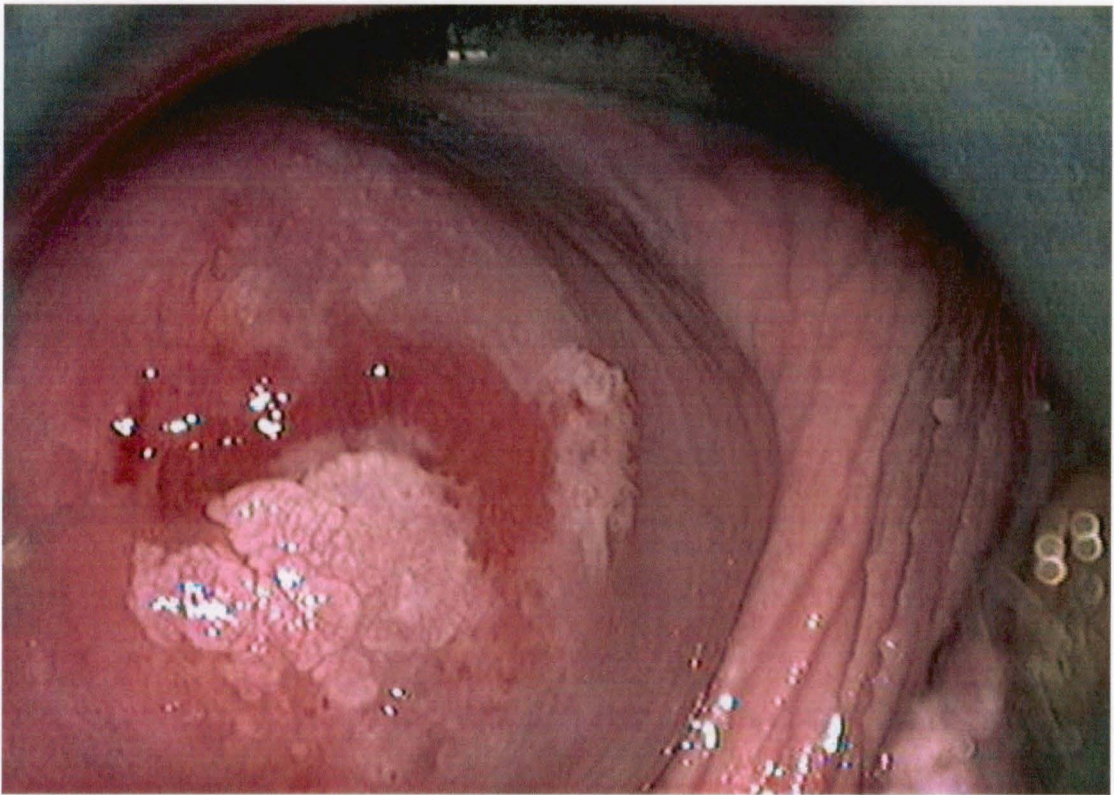


Ryc. 6. Kolpofotografia. Obraz tarczy części pochwowej szyjki macicy po próbie z kwasem octowym. W ujściu zewnętrznym mętny śluz. Na dolnej wardze wtórne zmniejszenie przejrzystości i mozaika. Na górnej wardze delikatne wtórne zmniejszenie przejrzystości. Histologicznie CIN1. W badaniu Hybrid Capture II infekcja wirusem HPV o wysokim potencjale onkogennym.

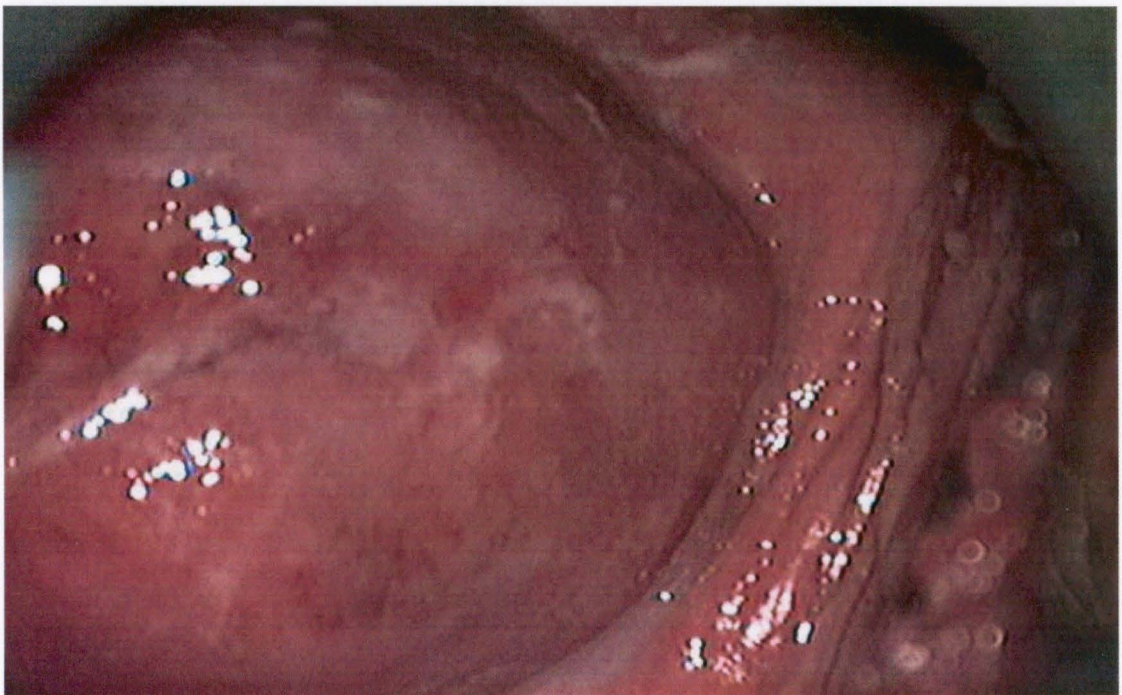
Różnice te nie były jednak statystycznie istotne. W grupie kobiet badanych otrzymujących Intron A (grupa B) remisja CIN dotyczyła 24 (80%) kobiet i była statystycznie istotnie wyższa w porównaniu z grupą kontrolną oraz grupą A.



Ryc. 7. Kolpofotografia. Obraz tarczy części pochwowej szyjki macicy tej samej pacjentki, co na ryc.6, po leczeniu Iscadorem QuS. Widoczny wtórny nabłonek wielowarstwowy płaski wnikający do kanału szyjki macicy. W ujściu zewnętrznym mętny śluz. Cytologicznie grupa II. Nie stwierdza się obecności HPV.



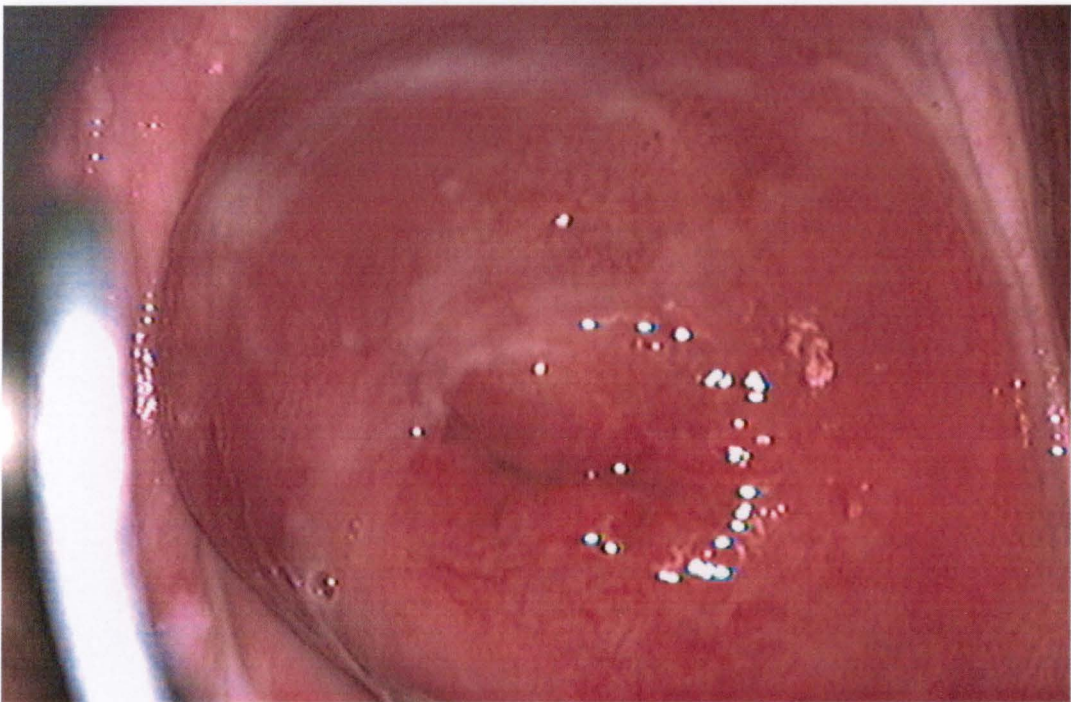
Ryc. 8. Kolpofotografia. Obraz kolposkopowe tarczy części pochwowej szyjki macicy. Na górnej wardze widoczny rąbek ektopii gruczołowej oraz drobne ognisko wtórnego zmniejszenia przejrzystości. Na dolnej wardze obraz wtórnego zmniejszenia przejrzystości oraz wstępny wzrost brodawczakowaty. Histologicznie CIN2. W badaniu Hybrid Capture II infekcja HPV o wysokim potencjale onkogennym.



Ryc. 9. Kolpofotografia. Obraz kolposkopowy tarczy części pochwowej szyjki macicy tej samej pacjentki, co na ryc.8. po leczeniu Intronem A. Tarcza części pochwowej pokryta wtórnym nabłonkiem wielowarstwowym płaskim wnikającym do kanału szyjki macicy. Próba octowa ujemna. Cytologicznie grupa II. Nie stwierdza się obecności HPV.



Ryc. 10. Kolpofotografia. Obraz kolposkopowy tarczy części pochwowej szyjki macicy. Na górnej wardze między godziną 12 a 1 ognisko wtórne zmniejszenia przejrzystości w formie odmiany punkcikowania. W obrębie ujścia zewnętrznego rąbek strefy regeneracji. Histologicznie CIN2. W badaniu Hybrid Capture II infekcja HPV o wysokim potencjale onkogennym.



Ryc. 11. Kolpofotografia. Obraz kolposkopowe tarczy części pochwowej szyjki macicy tej samej pacjentki, co na ryc.10, po leczeniu Intronem A. Tarcza części pochwowej pokryta nabłonkiem wielowarstwowym płaskim. Wokół ujścia rąbek strefy regeneracji oraz naczynia krwawiaste. Cytologicznie grupa II. Nie stwierdza się obecności HPV.

Zmiany CIN jako proces stacjonarny, tj. utrzymujące się przez okres leczenia (obserwacji klinicznej), dotyczyły 10 (28,6%) przypadków grupy A oraz w podobnym odsetku tj. 9 (29%) przypadków w grupie kontrolnej.

W grupie kobiet otrzymujących Intron A (grupa B) odsetek utrzymujących się zmian CIN jako proces stacjonarny dotyczył 6 (20,0%) przypadków i był statystycznie istotnie niższy, zarówno w porównaniu z grupą kontrolną, jak i grupą A.

Progresja CIN1 i CIN2 do CIN wyższego stopnia dotyczyła 4 (11,4%) przypadków w grupie A, a więc w nieco niższym, lecz statystycznie nieistotnym odsetku w porównaniu z grupą kontrolną (grupa K), w której progresja CIN dotyczyła 6 (19,4%) przypadków (Ryc. 12 i 13). Natomiast nie stwierdzono żadnego przypadku progresji w grupie leczonej Intronem A (Tab. 5).



Ryc. 12. Kolpofotografia. Obraz kolposkopowy tarczy części pochwowej szyjki macicy. Na godz. 3-5 ogniska wtórne, dyskretne zmniejszenia przejrzystości w formie mozaiki. Histologicznie- CIN1. W badaniu Hybrid Capture II- HPV o wysokim potencjale onkogennym.



Ryc. 13. Kolpofotografia. Obraz kolposkopowy tarczy części pochwowej szyjki macicy tej samej pacjentki, co na ryc. 12, po 12 miesiącach od zakończenia leczeniem Iscadorem QuS. Progresja do CIN3. Na godz. 1-5 wybitne zmniejszenie przejrzystości nabłonka w formie mozaiki. Histologicznie- CIN3. W badaniu Hybrid Capture II- HPV o wysokim potencjale onkogennym.

Tab. 5. Zachowanie się CIN1 i CIN2 w grupach badanych i w grupie kontrolnej po zakończeniu leczenia i obserwacji klinicznej.

Grupa	N	CIN1 i CIN2			Chi2
		Remisja	Stan stacjonarny	Progresja	
A	35	21 (60,0%)	10 (28,6%)	4 (11,4%)	NS
K	31	16 (51,6%)	9 (29,0%)	6 (19,4%)	
B	30	24 (80,0%)	6 (20,0%)	0	P≤0.05
K	31	16 (51,6%)	9 (29,0%)	6 (19,4%)	
A	35	21 (60,0%)	10 (28,6%)	4 (19,4%)	P≤0,05
B	30	24 (80,0%)	6 (20,0%)	0	

Remisję CIN w zależności od stopnia jej zaawansowania, obrazuje Tabela 6. W grupie kobiet otrzymujących Iscador QuS remisja CIN1 dotyczyła 14 (77,8%) przypadków, w grupie kobiet otrzymujących interferon alfa w 13 (86,7%) przypadków, a w grupie kontrolnej w 11 (64,7%) przypadków. Różnica pomiędzy grupami badanymi i kontrolną była statystycznie istotna. Remisja CIN2 w grupie leczonej Iscadorem QuS dotyczyła 7 (41,2%) kobiet, w grupie kontrolnej dotyczyła 5 (35,7%) przypadków, natomiast w grupie leczonej Intronem A remisja dotyczyła 11 (73,3%) przypadków i była statystycznie istotnie wyższa w porównaniu z grupą kontrolną i grupą badaną A (Tab. 6).

Tab. 6. Remisja CIN1 i CIN2 w grupach badanych i w grupie kontrolnej.

Grupa	CIN1		CIN2		Chi2
	N	Remisja	N	Remisja	
A	18	14 (77,8%)	17	7 (41,2%)	P≤0,05
K	17	11 (64,7%)	14	5 (35,7%)	
B	15	13 (86,7%)	15	11(73,3%)	P≤0,05
K	17	11 (64,7%)	14	5 (35,7%)	

Remisję CIN1 i CIN2 w zależności od potencjału onkogenego towarzyszącego tym zmianom HPV obrazuje tabela 6A. W grupie kobiet otrzymujących Iscador QuS w przypadkach, gdy zmianom CIN1 i CIN2 towarzyszyła infekcja HPV o niskim potencjale onkogenym remisja dotyczyła 62,5% kobiet, a stan stacjonarny i progresja 37,5% kobiet. W tej samej grupie, gdy z CIN1 i CIN2 współistniała infekcja HPV o wysokim potencjale onkogenym w 54,5% przypadków miała miejsce remisja zmian, a w 45,5% przypadków zmiana utrzymywała się jako stan stacjonarny lub ulegała progresji do CIN wyższego stopnia. W grupie B tj. kobiet otrzymujących Intron A w przypadkach CIN1 i CIN2 z towarzyszącą infekcją HPV o niskim potencjale onkogenym remisja dotyczyła 81,8% przypadków, a stan stacjonarny 18,2%. W przypadkach, gdy zmianom CIN1 i CIN2 towarzyszyła infekcja HPV o wysokim potencjale onkogenym remisja dotyczyła 75% przypadków a u 25% kobiet zmiany utrzymywały się jako stan stacjonarny. W grupie kontrolnej w przypadkach CIN1 i CIN2 i infekcji HPV o niskim potencjale onkogenym w 70% przypadków miała miejsce remisja, a u 30% kobiet zmiany utrzymywały się jako proces stacjonarny lub ulegały progresji do CIN wyższego stopnia. W tej grupie kobiet, gdy zmiany CIN1 i CIN2 współistniały z infekcją HPV o wysokim potencjale onkogenym remisja dotyczyła 18,2% przypadków, a stan stacjonarny lub progresja 81,8% przypadków.

Tab. 6A. Zachowanie się CIN1 i CIN2 w grupach badanych i w grupie kontrolnej po zakończeniu leczenia i obserwacji klinicznej w zależności od typu wirusa HPV.

Grupa	N	Typ HPV	Remisja	Progresja i stan stacjonarny	Razem
A	35	Np	15 (62,5%)	9 (37,5%)	24 (100%)
		Wp	6 (54,5%)	5 (45,5%)	11 (100%)
B	30	Np	18 (81,8%)	4 (18,2%)	22 (100%)
		Wp	6 (75,0%)	2 (25,0%)*	18 (100%)
K	31	Np	14 (70,0%)	6 (30,0%)	20 (100%)
		Wp	2 (18,2%)	9 (81,8%)	11 (100%)

Np.- niski potencjał onkogenny

Wp- wysoki potencjał onkogenny

* Do grupy HPV o wysokim potencjale onkogennym włączono także przypadki, w których występowała infekcja HPV zarówno o niskim jak i wysokim potencjale onkogennym.

4.2. Zachowanie się infekcji HPV.

Porównanie infekcji HPV o niskim i o wysokim potencjale onkogenym towarzyszącej zmianom CIN1 i CIN2 przed i po zakończeniu leczenia /obserwacji klinicznej/ w grupach badanych i kontrolnej pokazało, że w grupie kobiet otrzymujących Iscador QuS infekcja HPV o niskim potencjale onkogenym, towarzysząca CIN przed leczeniem dotyczyła 24 (68,6%) kobiet, o wysokim potencjale onkogenym 8 (22,9%) kobiet i u 3 (8,5%) kobiet współistniała infekcja HPV o niskim i o wysokim potencjale onkogenym. Po zakończeniu leczenia Iscadorem QuS infekcja HPV dotyczyła 10 (28,6%) kobiet, w tym HPV o niskim potencjale onkogenym u 5 (14,3%) kobiet, o wysokim potencjale onkogenym u 4 (11,4%) kobiet oraz o niskim i wysokim potencjale onkogenym u 1 kobiety. Nie stwierdzono infekcji HPV u 75% kobiet. Remisja infekcji HPV po leczeniu była statystycznie znamienne (Tab. 7).

W grupie B przed rozpoczęciem leczenia Intronem A infekcja HPV o niskim potencjale onkogenym dotyczyła 22 (73,3%) kobiet, o wysokim potencjale onkogenym 7 (23,3%) kobiet oraz łącznie o wysokim i niskim potencjale onkogenym- 1 (3,4%) kobiety. Po zakończeniu leczenia infekcję HPV stwierdzono u 6 (20,0%) kobiet, z tego u 4 (13,3%) o niskim potencjale onkogenym i u 2 (6,7%) o wysokim potencjale onkogenym. U 24 (80%) kobiet powtórne badanie po zakończeniu leczenia nie wykazało obecności infekcji HPV. Różnice w rozkładzie odsetkowym HPV przed i po zakończeniu leczenia były statystycznie znamienne (Tab. 7).

W grupie kontrolnej przed rozpoczęciem obserwacji klinicznej obecność HPV

o niskim potencjale onkogennym stwierdzono u 20 (64,5%) kobiet, o wysokim potencjale onkogennym u 9 (29%) kobiet oraz o niskim i wysokim potencjale onkogennym u 2 (6,5%) kobiet. Po zakończeniu obserwacji klinicznej u 14 (45,2%) kobiet nie stwierdzono infekcji HPV. Infekcja HPV nadal utrzymywała się u 17 (54,8%) kobiet, w tym o niskim potencjale onkogennym u 8 (25,8%) kobiet, o wysokim potencjale onkogennym u 7 (22,6%) kobiet oraz łącznie o niskim i wysokim potencjale onkogennym u 2 (6,4%) kobiet. Odsetek remisji infekcji HPV po zakończeniu obserwacji klinicznej bez leczenia była także statystycznie znamienne przy poziomie istotności $p < 0,001$. (Tab. 7)

Tab. 7. Infekcja HPV w grupach badanych i kontrolnej przed rozpoczęciem leczenia (obserwacji klinicznej) i po jej zakończeniu.

Grupa	Badanie	N	HPV				Test Chi ²
			Np	Wp	Np+ Wp	Σ HPV	
A	I	35	24 (68,6%)	8 (22,9%)	3 (8,5%)	35 (100%)	P≤0.001
	II		5 (14,3%)	4 (11,4%)	1 (2,9%)	10 (28,6%)	
B	I	30	20 (66,7%)	9 (30,0%)	1 (3,3%)	30 (100%)	P≤0.001
	II		4 (13,3%)	2 (6,7%)	0	6 (20%)	
K	I	31	20 (64,5%)	9 (29,0%)	2 (6,5%)	31(100%)	P≤0.001
	II		8 (25,8%)	7 (22,6%)	2 (6,4%)	17 (54,8%)	

I- przed leczeniem (obserwacją kliniczną)

II- po zakończeniu leczenia (obserwacji klinicznej)

Np- infekcja HPV o niskim potencjale onkogennym

Wp- infekcja HPV o wysokim potencjale onkogennym

Porównanie odsetka remisji infekcji HPV w grupach badanych i kontrolnej wykazało, że w grupie A otrzymujących Iscador QuS remisja HPV dotyczyła



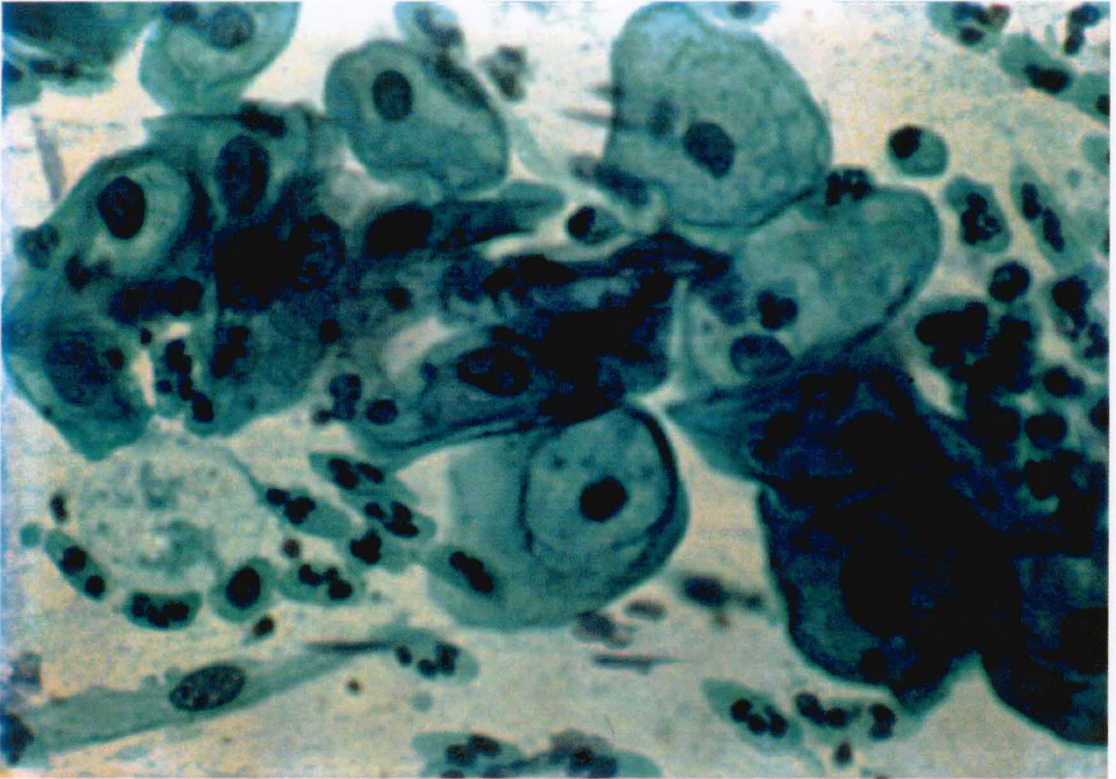
25 (71,4%) przypadków, w grupie B otrzymujących Interferon alfa 22 (73,3%) przypadków, a więc w statystycznie istotnie wyższym odsetku, niż w grupie kontrolnej (14 (45,2%) przypadków) (Tab. 8).

Tab. 8. Porównanie remisji infekcji HPV po zakończeniu leczenia i obserwacji klinicznej w grupach kobiet leczonych i kontrolnej.

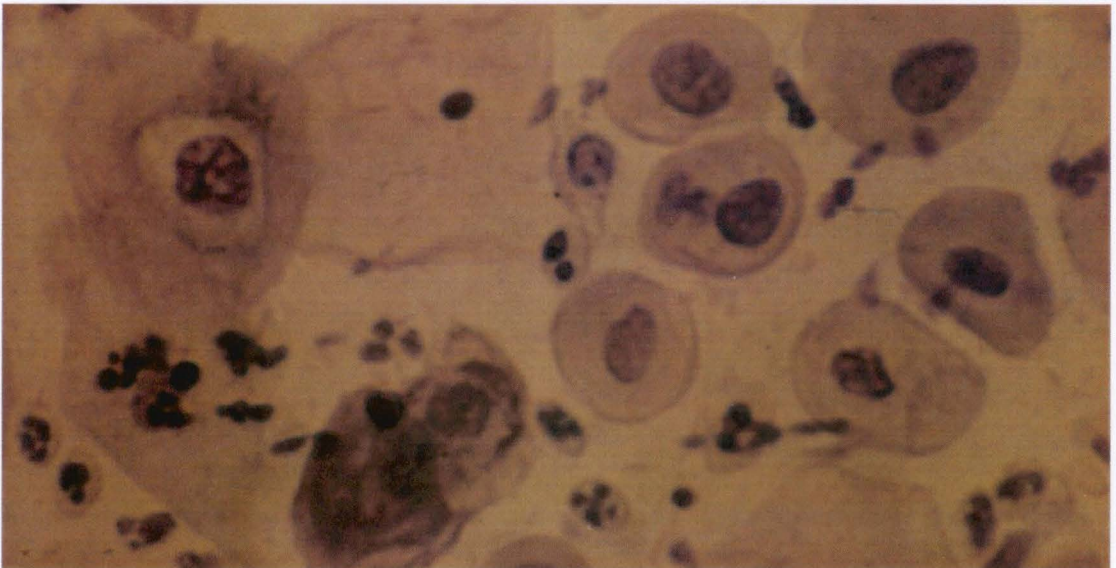
Grupa	HPV		Test Chi ²
	Remisja	Brak remisji	
A	25 (71,4%)	10 (28,6%)	P≤0,001
K	14 (45,2%)	17 (54,8%)	
B	24 (80,0%)	6 (20,0%)	P≤0,001
K	14 (45,2%)	17 (54,8%)	

4.3. Zachowanie się komórek koilocytarnych.

Porównanie obecności koilocytów w rozmazach cytologicznych w grupach kobiet badanych i kontrolnej przed i po leczeniu/obserwacji klinicznej/ wykazało, że w grupie A przed zastosowaniem leczenia Iscadorem QuS koilocytoza występowała w 19 (54,3%) przypadkach rozmazów cytologicznych, natomiast po leczeniu u 6 (17,1%) kobiet. W grupie B przed rozpoczęciem leczenia Intronem A komórki koilocytarne w rozmazach cytologicznych stwierdzono u 17 (56,7%) kobiet, natomiast po leczeniu tylko u 2 (6,7%) kobiet. W grupie kontrolnej na początku obserwacji klinicznej komórki koilocytarne stwierdzono u 16 (51,6%) kobiet, po jej zakończeniu u 7 (22,6%) kobiet. We wszystkich, więc grupach po leczeniu (obserwacji klinicznej) wystąpiło znamienne statystyczne obniżenie odsetka kobiet z obecnością koilocytozy w rozmazach cytologicznych (Tab. 9) oraz Ryc. 14 i 15.



Ryc. 14. Obraz cytologiczny. Widoczne dysplastyczne komórki warstwy pośredniej z cechami dysplazji małego stopnia oraz formy koilocytarne



Ryc. 15. Obraz cytologiczny. Widoczne dysplastyczne komórki z cechami dysplazji średniego stopnia oraz formy koilocytarne.

Tab. 9. Obecność komórek koilocytarnych w grupach badanych i kontrolnej przed i po leczeniu (obserwacji klinicznej).

Grupa	Bad.	N	Koilocyty		Test Chi ²
			Obecne	Brak	
A	I	35	19 (54,3%)	16 (45,7%)	P≤0.001
	II		6 (17,1%)	29 (82,9%)	
B	I	30	17 (56,7%)	13 (43,3%)	P≤0.001
	II		2 (6,7%)	28 (93,3%)	
K	I	31	16 (51,6%)	15 (48,4%)	P≤0.01
	II		7 (22,6%)	24 (77,4%)	

I- przed leczeniem (obserwacją kliniczną)

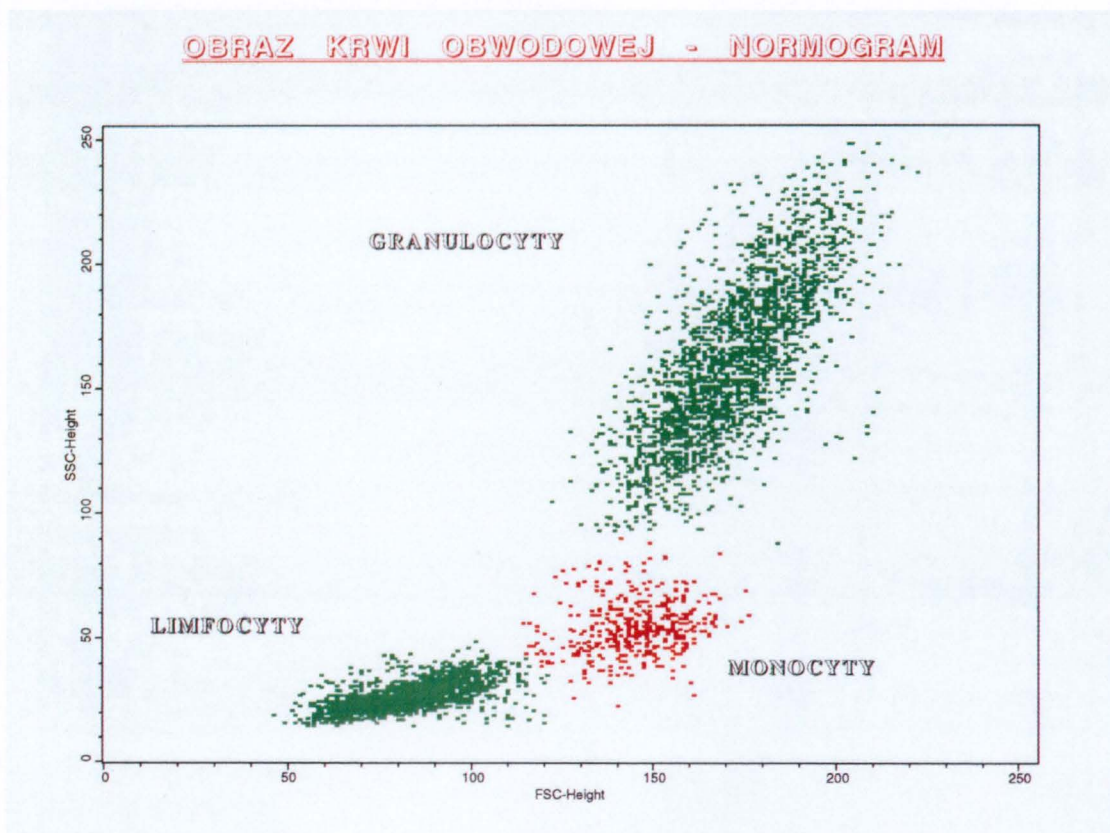
II- po zakończeniu leczenia (obserwacji klinicznej).

4.4. Badania immunologiczne.

4.4.1. Limfocyty T (CD3+).

Porównanie średnich odsetkowych wartości limfocytów CD3 w grupach badanych oraz kontrolnej przed i po leczeniu/obserwacji klinicznej/ (Tab. 10) wykazało, że przed rozpoczęciem leczenia średni odsetek limfocytów CD3 w grupie A wynosił 66,9 +/- 11,5%, w grupie B 69,3 +/- 8,6% i w grupie kontrolnej - K 67 +/- 8,5%. Po zakończeniu leczenia średni odsetek limfocytów CD3 w grupie leczonej Iscadorem QuS wynosił 72,9 +/- 7,1%, w grupie leczonej Intronem A 77,1 +/- 8,8%, a w grupie kontrolnej, poddanej tylko obserwacji klinicznej bez leczenia 72,6 +/- 5,9%. Zarówno w grupach badanych, w których stosowano Iscador QuS lub Intron A, jak i w kontrolnej wystąpił statystycznie istotny wzrost odsetka

limfocytów CD3 po leczeniu / obserwacji klinicznej w porównaniu do wartości sprzed leczenia (obserwacji klinicznej).



Ryc. 13. Obraz krwi obwodowej w badaniu cytofluorometrycznym.

Tab. 10. Średnie wartości odsetkowe limfocytów CD3 przed i po zakończeniu leczenia (obserwacji klinicznej).

Grupa	Badanie	N	CD3 [%]		Test Manna-Whitneya
			x ± SD	min - max	
A	I	35	66,9 ± 11,5	38 - 90	P≤0.001
	II		72,9 ± 7,1	49 - 85	
B	I	30	69,3 ± 8,6	44 - 81	P≤0.001
	II		77,1 ± 8,8	66 - 100	
K	I	31	67,0 ± 8,5	45 - 81	P≤0.001
	II		72,6 ± 5,9	61 - 88	

I- przed leczeniem (obserwacją kliniczną)

II- po zakończeniu leczenia (obserwacji klinicznej)

Ocena średnich wartości odsetkowych limfocytów CD3 po zakończeniu leczenia (obserwacji klinicznej) wykazała, że w grupie kobiet otrzymujących Iscador QuS (gr. A) przyrost bezwzględny limfocytów CD3 wynosił 5,6 +/- 5,2, a przyrost względny (indeks zmian) 9,0 +/- 9,2%. Przyrost ten był statystycznie istotnie niższy w porównaniu z grupą kobiet otrzymujących Intron A (gr. B), w której to przyrost bezwzględny limfocytów CD3 wynosił 10,2 +/- 12,1, a ich względny przyrost (indeks zmian) 18,7 +/- 25,1% oraz w stosunku do grupy kontrolnej (gr. K), w której przyrost bezwzględny wynosił 5,5 +/- 7,5, a względny (indeks zmian)- 9,7 +/- 14,8% (Tab. 11).

Tab. 11. Bezwzględne (Δ) i względne (index zmian-%) zmiany wartości limfocytów CD3 obserwowane w trakcie leczenia i obserwacji.

Badany parametr	Grupa	N	x +/- SD	min – max	Test Kruskal-Wallis'a
Δ CD3	A	35	5,6 ± 5,2	-6 – 20	NS
	K	31	5,5 ± 7,5	-6 – 31	
	B	30	10,2 ± 12,1	-6 – 36	P≤0.012
	K	31	5,5 ± 7,5	-6 – 31	
Indeks zmian [%]	A	35	9,0 ± 9,2	-8,1 – 40	NS
	K	31	9,7 ± 14,8	-8,1 – 68,8	
	B	30	18,7 ± 25,1	-8 – 94,7	P≤0.017
	K	31	9,7 ± 14,8	-8,1 – 68,8	

Porównanie zachowania się CIN1 i CIN2, zarówno w grupach badanych, jak i kontrolnej, w zależności od wartości odsetkowej populacji limfocytów CD3 przed rozpoczęciem leczenia (obserwacji klinicznej) wykazało, że w grupie kobiet, u których nastąpiła remisja zmiany, w 6 (9,8%) przypadkach odsetek limfocytów CD3 był poniżej normy i w 55 (90,2%) przypadkach w normie lub powyżej normy.

W grupie 25 kobiet, u których zmiany CIN1 i CIN2 utrzymywały się jako stan stacjonarny, w 10 (40%) przypadkach CD3 było poniżej normy, a w 15 (60%) przypadkach w normie i powyżej normy. W grupie kobiet, u których nastąpiła progresja zmiany CIN1 i CIN2 do CIN wyższego stopnia, w 8 (80%) przypadkach wartości odsetkowe limfocytów CD3 były poniżej normy, a w 2 (20%) przypadkach w normie i powyżej normy (Tab. 12).

Tab. 12. Zachowanie się CIN1 i CIN2 a wartości odsetkowe populacji limfocytów CD3 przed i po leczeniu (obserwacji klinicznej).

Czasokres badania	Zachowanie się CIN	N	Wartość odsetkowa CD3		Test Kruskal-Wallis'a
			<normy	W normie i powyżej	
I	Remisja	61	6 (9,8%)	55 (90,2%)	P≤0.001
	Proces stacjonarny	25	10 (40,0%)	15 (60,0%)	
	Progresja	10	8 (80,0%)	2 (20,0%)	
II	Remisja	61	1 (1,6%)	60 (98,4%)	P≤0.02
	Proces stacjonarny	25	2 (8,0%)	23 (92,0%)	
	Progresja	10	6 (60,0%)	4 (40,0%)	

I- przed leczeniem (obserwacją kliniczną)

II- po zakończeniu leczenia (obserwacji klinicznej)

Natomiast po zakończeniu leczenia (obserwacji klinicznej) obserwowano wzrost liczby kobiet z prawidłowymi wartościami odsetkowymi populacji limfocytów CD3, szczególnie w grupie kobiet z remisją CIN1 i CIN2 (98,4%). W tej grupie kobiet tylko w jednym przypadku wartość odsetkowa limfocytów CD3 była poniżej normy. W grupie 25 kobiet, u których zmiana utrzymywała się jako stan stacjonarny, w 2 (8,0%) przypadkach wartości odsetkowe CD3 były poniżej normy i w 23 (92,0%) w normie lub powyżej normy. W grupie 10 kobiet, u których wystąpiła progresja CIN1 i CIN2 do CIN wyższego stopnia, w 6 (60,0%)

przypadkach odsetkowa wartość CD3 była poniżej normy i w 4 (40,0%) w normie lub powyżej (Tab. 12).

4.4.2. Limfocyty Th (CD4+).

Porównanie średnich odsetkowych wartości limfocytów CD4 w grupach kobiet badanych i kontrolnej przed rozpoczęciem leczenia (obserwacji klinicznej) i po jego zakończeniu wykazało, że przed rozpoczęciem leczenia średni odsetek limfocytów CD4 w grupie A tj. leczonej Iscadorem QuS wynosił $32 \pm 9,6\%$, w grupie B (leczonej Intronem A) $33,9 \pm 6,7\%$ i w grupie kontrolnej $32,9 \pm 8,5\%$. Po zakończeniu leczenia średni odsetek limfocytów CD4 w grupie A wzrósł do $38,8 \pm 8,6\%$, w grupie B do $40,1 \pm 6,6\%$, a w grupie kontrolnej, poddanej obserwacji klinicznej bez leczenia, do $38,1 \pm 7,7\%$. Zarówno w grupach badanych, jak i w kontrolnej, wzrost odsetka limfocytów CD4 po zakończeniu leczenia (obserwacji klinicznej) w porównaniu z wartościami sprzed leczenia (obserwacji klinicznej) był statystycznie istotny (Tab. 13).

Tab. 13. Średnie wartości odsetkowe limfocytów CD4 przed i po zakończeniu leczenia i obserwacji klinicznej.

Grupa	Badanie	N	CD4 [%]		Test Manna Whitney'a
			$x \pm SD$	Min – max	
A	I	35	$32,0 \pm 9,6$	18 – 54	P \leq 0.001
	II		$38,8 \pm 8,6$	21 – 53	
B	I	30	$33,9 \pm 6,7$	25 – 47	P \leq 0.001
	II		$40,1 \pm 6,6$	27 – 53	
K	I	31	$32,9 \pm 8,5$	18 – 54	P \leq 0.001
	II		$38,1 \pm 7,7$	26 – 53	

I- przed leczeniem (obserwacją kliniczną)

II- po zakończeniu leczenia (obserwacji klinicznej).

Przyrost bezwzględny limfocytów w grupie kobiet otrzymujących Iscador QuS (gr. A) wynosił $6,8 \pm 5,4$, w grupie B, tj. otrzymującej Intron A- $6,2 \pm 7,5$ i w grupie kontrolnej (grupa K) - $5,1 \pm 5,3$. Natomiast względny przyrost wartości limfocytów CD4 w grupie A wynosił $25,3 \pm 22,7$, w grupie B- $21,4 \pm$ i w grupie K - $18,7 \pm 21,4$. Wartości zarówno względnego, jak i bezwzględnego (indeks zmian wyrażony w %) przyrostu limfocytów CD4, pomiędzy grupami badanymi A i B, jak i pomiędzy grupami badanymi i porównawczą były nieistotne statystycznie (Tab. 14).

Tab. 14. Bezwzględne (Δ) i względne (indeks zmian-%) zmiany wartości limfocytów CD4 obserwowane w trakcie leczenia i obserwacji.

Badany parametr	Grupa	N	$x \pm SD$	min – max	Test Kruskal-Wallis'a
$\Delta CD4$	A	35	$6,8 \pm 5,4$	-1 – 22	NS
	K	31	$5,1 \pm 5,3$	-2 – 20	
	B	30	$6,2 \pm 7,5$	-5 – 24	NS
	K	31	$5,1 \pm 5,3$	-2 – 20	
Indeks zmian [%]	A	35	$25,3 \pm 22,7$	-3,2 - 78,9	NS
	K	31	$18,7 \pm 21,4$	-6,9 - 78,9	
	B	30	$21,4 \pm 27,3$	-12,1 – 96b	NS
	K	31	$18,7 \pm 21,4$	-6,9 - 78,9	

Porównanie zachowania się CIN1 i CIN2, zarówno w grupach badanych, jak i kontrolnej w zależności od wartości odsetkowej populacji limfocytów CD4 przed i po leczeniu/obserwacji klinicznej wykazało, że przed rozpoczęciem leczenia (obserwacji klinicznej) w grupie kobiet, u których nastąpiła remisja zmiany, w 28 (45,9%) przypadkach odsetek limfocytów CD4 był poniżej normy, a w 33 (54,1%) w normie i powyżej normy. W grupie 25 kobiet, u których zmiany CIN1 i CIN2 utrzymywały się jako stan stacjonarny, w 14 (56,0%) przypadkach

CD4 było poniżej normy, a w 11 (44,0%) przypadkach w normie i powyżej normy. W grupie kobiet, u których nastąpiła progresja zmiany CIN1 i CIN2 do CIN wyższego stopnia, w 8 (80%) przypadkach wartości odsetkowe limfocytów CD4 były poniżej normy, a w 2 (20%) przypadkach w normie i powyżej normy (Tab. 15).

Po zakończeniu leczenia (obserwacji klinicznej) w grupie kobiet, u których nastąpiła remisja CIN1 i CIN2, w 53 (86,9%) przypadkach wartości odsetkowe populacji limfocytów CD4 były w normie lub powyżej normy, a w 8 (13,1%) poniżej normy. W grupie 25 kobiet, gdzie zmiana utrzymywała się jako stan stacjonarny, w 7 (28,0%) przypadkach wartości odsetkowe CD4 były powyżej normy i w 18 (72,0%) w normie lub powyżej normy. W grupie 10 kobiet, u których wystąpiła progresja CIN1 i CIN2 do CIN wyższego stopnia w 8 (80,0%) przypadkach odsetkowa wartość CD4 była poniżej normy i w 2 (20,0%) w normie lub powyżej normy (Tab. 15).

Tab. 15. Zachowanie się CIN1 i CIN2 a wartości odsetkowe populacji limfocytów CD4 przed i po leczeniu i obserwacji klinicznej

Czasokres badania	Zachowanie się CIN	N	Wartość odsetkowa CD4		Test Kruskal – Wallis'a
			<Normy	W normie i powyżej	
Zachowanie się CD4 przed leczeniem (obserwacją kliniczną)	Remisja	61	28 (45,9%)	33 (44,1%)	P≤0,05
	Proces stacjonarny	25	14 (56,0%)	11 (44,0%)	
	Progresja	10	8 (80,0%)	2 (20,0%)	
Zachowanie się CD4 po leczeniu (obserwacji klinicznej)	Remisja	61	8 (13,1%)	53 (86,9%)	P≤0.001
	Proces stacjonarny	25	7 (28,0%)	18 (72,0%)	
	Progresja	10	8 (80,0%)	2 (20,0%)	

4.4.3. Limfocyty Ts (CD8+).

Średnie odsetkowe wartości limfocytów CD8 przed rozpoczęciem leczenia (obserwacji klinicznej) w grupie A, tj. leczonej Iscadorem QuS wynosiły 35,0 +/- 8,2%, w grupie B tj. leczonej Intronem A 33,8 +/- 5,6% i w grupie kontrolnej 36,0 +/- 6,4%. Po zakończeniu leczenia (obserwacji klinicznej) średni odsetek limfocytów CD8 w grupie A wzrósł do 36,0 +/- 3,1%, w grupie B do 34,3 +/- 5,6%, a w grupie kontrolnej, poddanej obserwacji klinicznej bez leczenia uległ obniżeniu do 35,1 +/- 4,8%. Zarówno w grupach badanych, jak i w kontrolnej różnice w odsetku limfocytów CD8 przed rozpoczęciem leczenia (obserwacji klinicznej) i po ich zakończeniu nie były istotne statystycznie (Tab. 16).

Tab. 16. Średnie wartości odsetkowe limfocytów CD8 przed i po zakończeniu leczenia i obserwacji klinicznej.

Grupa	Badanie	N	CD8 [%]		Test Friedmana
			x ± SD	Min – max	
A	I	35	35,0 ± 8,2	20 – 55	NS
	II		36,0 ± 3,1	24 – 50	
B	I	30	33,8 ± 5,6	26 – 50	NS
	II		34,3 ± 5,6	26 – 50	
K	I	31	36,0 ± 6,4	23 – 50	NS
	II		35,1 ± 4,8	45	

I- przed leczeniem (obserwacją kliniczną)

II- po zakończeniu leczenia (obserwacji klinicznej).

Ocena bezwzględnych jak i względnych zmian wartości limfocytów CD8 wykazała w grupie kobiet otrzymujących Iscador QuS (gr. A) ich przyrost bezwzględny o $1,0 \pm 8,2$, a względny przyrost (indeks zmian) wynosił $7,0 \pm 25,9\%$. W grupie kobiet otrzymujących Intron A (gr. B) przyrost bezwzględny limfocytów CD8 wynosił $0,5 \pm 4,6$, a ich względny przyrost (indeks zmian) wynosił $2,4 \pm 14,3\%$, w grupie kontrolnej (gr. K), nastąpił spadek wartości bezwzględnych i względnych (indeks zmian) odpowiednio o $0,9 \pm 5,6$ oraz o $0,6 \pm 15,3\%$. Różnice w bezwzględnych i względnych zmianach wartości limfocytów CD8 pomiędzy grupami badanymi A i B i grupą kontrolną były nieistotne statystycznie (Tab. 17).

Tab. 17. Bezwzględne (Δ) i względne (index zmian-%) zmiany wartości limfocytów CD8 obserwowane w trakcie leczenia i obserwacji.

Badany parametr	Grupa	N	$x \pm SD$	min – max	Test Kruskal-Wallis'a
$\Delta CD8$	A	35	$1,0 \pm 8,2$	-20 - 16	NS
	K	31	$-0,9 \pm 5,6$	-17 - 7	
	B	30	$0,5 \pm 4,6$	-9 - 8	NS
	K	31	$-0,9 \pm 5,6$	-17 - 7	
Indeks zmian [%]	A	35	$7,0 \pm 25,9$	-40,8 - 80,0	NS
	K	31	$-0,6 \pm 15,3$	-36 - 30	
	B	30	$2,4 \pm 14,3$	-24 - 30,43	NS
	K	31	$-0,6 \pm 15,3$	-36 - 30	

Porównanie zachowania się CIN1 i CIN2, zarówno w grupach badanych, jak i kontrolnej w zależności od wartości odsetkowej populacji limfocytów CD8 przed rozpoczęciem leczenia (obserwacji klinicznej) wykazało, że w grupie kobiet, u których nastąpiła remisja zmiany, w 8 (13,1%) przypadkach odsetek limfocytów

CD8 był poniżej normy i w 53 (86,9%) w normie i powyżej normy. W grupie 25 kobiet, u których zmiany CIN1 i CIN2 utrzymywały się jako stan stacjonarny, w 1 przypadku CD8 było poniżej normy, a w 24 (96,0%) przypadkach w normie i powyżej normy. W grupie kobiet, u których nastąpiła progresja zmiany CIN1 i CIN2 do CIN wyższego stopnia, w 1 przypadku wartości odsetkowe limfocytów CD8 były poniżej normy, a w 9 (90,0%) przypadkach w normie i powyżej normy (Tab. 18).

Natomiast po zakończeniu leczenia (obserwacji klinicznej) w grupie 61 kobiet, u których nastąpiła remisja CIN1 i CIN2, w 4 (6,6%) przypadkach wartość odsetkowa CD8 była poniżej normy, a w 57 (93,4%) w normie lub powyżej normy. W grupie 25 kobiet, gdzie zmiana utrzymywała się jako stan stacjonarny, w 3 (12,0%) przypadkach wartości odsetkowe CD8 były powyżej normy i w 22 (88,0%) w normie lub powyżej normy. W grupie 10 kobiet, u których wystąpiła progresja CIN1 i CIN2 do CIN wyższego stopnia u 2 (20%) kobiet wartości odsetkowe CD8 były poniżej normy i u 8 (80%) kobiet w normie lub powyżej normy (Tab. 18).

Tab. 18. Zachowanie się CIN1 i CIN2 a wartości odsetkowe populacji limfocytów CD8 przed i po leczeniu i obserwacji klinicznej

Czasokres badania	Zachowanie się CIN	N	Wartość odsetkowa CD8		Test Chi ²
			<normy	W normie i powyżej	
Zachowanie się CD8 przed leczeniem (obserwacją kliniczną)	Remisja	61	8 (13,1%)	53 (86,9%)	NS
	Proces stacjonarny	25	1 (4,0%)	24 (96,0%)	
	Progresja	10	1 (10,0%)	9 (90,0%)	
Zachowanie się CD8 po leczeniu (obserwacji klinicznej)	Remisja	61	4 (6,6%)	57 (93,4%)	NS
	Proces stacjonarny	25	3 (12,0%)	22 (88,0%)	
	Progresja	10	2 (20%)	8 (80,0%)	

4.4.4. Indeks CD4+/CD8+.

Przeprowadzona analiza średnich wartości indeksu CD4/CD8 w grupach badanych i kontrolnej przed i po leczeniu (obserwacji klinicznej) wykazała, że przed rozpoczęciem leczenia średnia wartość CD4/CD8 w grupie kobiet leczonych Iscadorem QuS (grupa A) wynosiła $0,94 \pm 0,37\%$, w grupie kobiet leczonych Intronem A (grupa B) $1,01 \pm 0,3\%$ i w grupie kontrolnej (grupa K) $0,93 \pm 0,35\%$. Po zakończeniu leczenia (obserwacji klinicznej) średnia wartość indeksu CD4/CD8 w grupie kobiet leczonych Iscadorem QuS (grupa A) wzrosła do $1,08 \pm 0,36\%$, w grupie kobiet leczonych Intronem A (grupa B) wzrosła do $1,15 \pm 0,24\%$, a w grupie kontrolnej (grupa K), tj. poddanej obserwacji klinicznej bez leczenia do $1,08 \pm 0,31\%$. Zarówno w grupach badanych, jak i w kontrolnej nastąpił statystycznie istotny wzrost wartości CD4/CD8 po zakończeniu leczenia (obserwacji klinicznej) w porównaniu z tymi wartościami przed rozpoczęciem leczenia (obserwacji klinicznej) (Tab. 19).

Tab. 19. Średnie wartości indeksu CD4/CD8 przed i po zakończeniu leczenia i obserwacji klinicznej.

Grupa	Badanie	N	CD4/CD8		Test Friedmana
			$x \pm SD$	min – max	
A	I	35	$0,94 \pm 0,37$	0,50 - 1,90	$P \leq 0,009$
	II		$1,08 \pm 0,36$	0,40 - 2,00	
B	I	30	$1,01 \pm 0,30$	0,50 - 1,6	$P \leq 0,008$
	II		$1,15 \pm 0,24$	0,60 - 1,70	
K	I	31	$0,93 \pm 0,35$	0,50 - 1,6	$P \leq 0,009$
	II		$1,08 \pm 0,31$	0,60 - 1,70	

I- przed leczeniem (obserwacją kliniczną)

II- po zakończeniu leczenia (obserwacji klinicznej).

Natomiast oszacowanie bezwzględnej, jak i względnej zmiany wartości indeksu CD4/CD8 (Tab. 20) ujawniło, że w grupie kobiet otrzymujących Iscador QuS (gr. A) przyrost bezwzględny wynosił $0,14 \pm 0,31$, a względny przyrost (indeks zmian) $22,9 \pm 37,4\%$. W grupie kobiet otrzymujących Intron A (gr. B) przyrost bezwzględny CD4/CD8 wynosił $0,14 \pm 0,26$, a ich względny wzrost (indeks zmian) wynosił $20,3 \pm 32,4\%$, natomiast w grupie kontrolnej (gr. K) przyrost bezwzględny CD4/CD8 wynosił $0,14 \pm 0,26$, a ich wzrost względny (indeks zmian) wynosił $23,1 \pm 35,3\%$. Różnice w przyrostach stosunku CD4/CD8 oraz indeksu zmian limfocytów pomiędzy grupami badanymi i kontrolną nie były statystycznie istotne.

Tab. 20. Bezwzględne (Δ) i względne (index zmian-%) zmiany indeksu CD4/CD8 obserwowane w trakcie leczenia i obserwacji.

Badany parametr	Grupa	N	$x \pm SD$	min - max	Test Kruskal-Wallis'a
Δ CD4/CD8	A	35	$0,14 \pm 0,31$	-0,80 - 0,68	NS
	K	31	$0,14 \pm 0,26$	-0,30 - 0,90	
	B	30	$0,14 \pm 0,26$	-0,30 - 0,90	NS
	K	31	$0,14 \pm 0,26$	-0,30 - 0,90	
indeks zmian (%)	A	35	$22,9 \pm 37,4$	-50 - 106	NS
	K	31	$23,1 \pm 35,3$	-20 - 112,5	
	B	30	$20,3 \pm 32,4$	-20 - 112,5	NS
	K	31	$23,1 \pm 35,3$	-20 - 112,5	

4.4.5. Limfocyty B (CD19+).

Porównanie średnich odsetkowych wartości limfocytów CD19 w grupach badanych i kontrolnej przed i po leczeniu (obserwacji klinicznej) ujawniło, że przed rozpoczęciem leczenia i obserwacji klinicznej średni odsetek limfocytów CD19 w grupie A, tj. leczonej Iscadorem QuS wynosił $18,3 \pm 5,5\%$, w grupie B (leczonej Intronem A) $17,5 \pm 5,1\%$ i w grupie kontrolnej $18,1 \pm 5,7\%$. Po zakończeniu leczenia (obserwacji klinicznej) średnia wartość odsetkowa limfocytów CD19 w grupie kobiet otrzymujących Iscador QuS (grupa A) wzrosła do $19,8 \pm 6,1\%$, w grupie kobiet otrzymujących Intron A (grupa B) do $20,5 \pm 4,9\%$, a w grupie kontrolnej (grupa K), poddanej tylko obserwacji klinicznej bez leczenia, wzrosła do $21,4 \pm 5,7\%$. We wszystkich grupach wartości odsetkowe limfocytów CD19 po zakończeniu leczenia (obserwacji klinicznej) były statystycznie istotnie wyższe w porównaniu z wartościami odsetkowymi limfocytów CD19 przed rozpoczęciem leczenia (obserwacji klinicznej) (Tab. 21).

Tab. 21. Średnie odsetkowe wartości limfocytów CD19 przed i po leczeniu (obserwacji klinicznej).

Grupa	Badanie	N	CD19 [%]		Test Friedmana
			$x \pm SD$	min – max	
A	I	35	$18,3 \pm 5,5$	6 – 31	$P \leq 0,01$
	II		$19,8 \pm 6,1$	7 – 34	
B	I	30	$17,5 \pm 5,1$	9 – 30	$P \leq 0,001$
	II		$20,5 \pm 4,9$	12 – 30	
K	I	31	$18,1 \pm 5,7$	9 – 21	$P \leq 0,001$
	II		$21,4 \pm 5,7$	10 – 34	

I- przed leczeniem (obserwacją kliniczną)

II- po zakończeniu leczenia (obserwacji klinicznej).

Natomiast bezwzględny, jak i względny przyrost limfocytów CD19 w grupie kobiet otrzymujących Iscador QuS (gr. A) wynosił $1,5 \pm 3,4$, a ich względny przyrost (indeks zmian) wynosił $9,55 \pm 19,62\%$ i był statystycznie istotnie niższy w porównaniu z grupą kobiet otrzymujących Intron A (gr. B), w której to przyrost bezwzględny limfocytów CD19 wynosił $3,0 \pm 3,5$, a ich względny wzrost (indeks zmian) $21,75 \pm 30,11\%$ oraz w stosunku do grupy kontrolnej (gr. K), w której przyrost bezwzględny wynosił $3,3 \pm 3,9$, a ich wzrost względny (indeks zmian) wynosił $23,79 \pm 34,38\%$ (Tab. 22).

Tab. 22. Bezwzględne (Δ) i względne (indeks zmian-%) zmiany wartości limfocytów CD19 obserwowane w trakcie leczenia (obserwacji klinicznej)

Badany parametr	Grupa	N	$x \pm SD$	min – max	Test Manna-Whitney'a
Δ CD19	A	35	$1,5 \pm 3,4$	-4 – 14	$P \leq 0,001$
	B	30	$3,0 \pm 3,5$	-2 – 12	
	A	35	$1,5 \pm 3,4$	-4 – 14	$P \leq 0,001$
	K	31	$3,3 \pm 3,9$	-1 – 16	
	B	30	$3,0 \pm 3,5$	-2 – 12	NS
	K	31	$3,3 \pm 3,9$	-1 – 16	
indeks zmian [%]	A	35	$9,55 \pm 19,62$	-21,05 – 70,00	$P \leq 0,001$
	B	30	$21,75 \pm 30,11$	-10,53 – 133,33	
	A	35	$9,55 \pm 19,62$	-21,05 – 70,00	$P \leq 0,001$
	K	31	$23,79 \pm 34,38$	-6,25 – 133,33	
	B	30	$21,75 \pm 30,11$	-10,53 – 133,33	NS
	K	31	$23,79 \pm 34,38$	-6,25 – 133,33	

Obserwacja zachowania się CIN1 i CIN2, zarówno w grupach badanych, jak i kontrolnej w zależności od wartości odsetkowej populacji limfocytów CD19 przed rozpoczęciem leczenia (obserwacji klinicznej) wykazała, że w grupie 61 kobiet, u których nastąpiła remisja zmiany, w 2 (3,3%) przypadkach odsetek limfocytów CD19 był poniżej normy i w 59 (96,7%) w normie i powyżej normy. W grupie 25 kobiet, u których zmiany CIN1 i CIN2 utrzymywały się jako stan stacjonarny, w 4 (16,0%) przypadkach CD19 było poniżej normy, a w 21 (84,0%) przypadkach w normie i powyżej normy. W grupie 10 kobiet, u których nastąpiła progresja zmiany CIN1 i CIN2 do CIN wyższego stopnia, w 8 (80,0%) przypadkach wartości odsetkowe limfocytów CD19 były poniżej normy, a w 2 (20,0%) przypadkach w normie i powyżej normy (Tab. 23).

Tab. 23. Zachowanie się CIN1 i CIN2 a wartości odsetkowe populacji limfocytów CD19 przed i po leczeniu (obserwacji klinicznej).

Badanie	Zachowanie się CIN1 i CIN2	N	CD19		Test Chi ²
			<normy	W normie i powyżej	
I	Remisja	61	2 (3,3%)	59 (96,7%)	P≤0,01
	Proces stacjonarny	25	4 (16,0%)	21 (84,0%)	
	Progresja	10	8 (80,0%)	2 (20,0%)	
II	Remisja	61	1 (1,6%)	60 (98,4%)	NS
	Proces stacjonarny	25	2 (8,0%)	23 (92,0%)	
	Progresja	10	7 (70,0%)	3 (30,0%)	

I- przed leczeniem (obserwacją kliniczną)

II- po zakończeniu leczenia (obserwacji klinicznej)

Natomiast porównanie zachowania się CIN1 i CIN2, zarówno w grupach badanych, jak i kontrolnej w zależności od wartości odsetkowych populacji limfocytów CD19 wykonane po zakończeniu leczenia (obserwacji klinicznej) wykazało, że spośród 61 kobiet, u których nastąpiła remisja CIN1 i CIN2 w 1 przypadku wartość odsetkowa CD19 była poniżej normy, a w 60 (98,4%) w normie lub powyżej normy. W grupie 25 kobiet, gdzie zmiana utrzymywała się jako stan stacjonarny, w 2 (8,0%) przypadkach wartości odsetkowe CD19 były powyżej normy i w 23 (92,0%) w normie lub powyżej normy i w grupie 10 kobiet, u których wystąpiła progresja CIN1 i CIN2 do CIN wyższego stopnia, w 7 (70,0%) przypadkach odsetkowa wartość CD19 była poniżej normy i w 3 (30,0%) przypadkach w normie lub powyżej (Tab. 23).

4.4.6. Komórki NK (CD56+/CD3-).

Porównanie średnich odsetkowych wartości limfocytów CD56+/CD3 - w grupach badanych przed i po leczeniu (obserwacji klinicznej) wykazało, że przed rozpoczęciem leczenia średni odsetek limfocytów CD56+/CD3- w grupie A (leczonej Iscadorem QuS) wynosił 13,2 +/- 7,1%, w grupie B (leczonej Intronem A) 11,7 +/- 4,9% i w grupie kontrolnej 11,1 +/- 5,9%. Po zakończeniu leczenia (obserwacji klinicznej) średni odsetek limfocytów CD56+/CD3- w grupie A wzrósł do 16,9 +/- 7,9%, w grupie B do 14,3 +/- 4,8%, a w grupie kontrolnej, poddanej obserwacji klinicznej bez leczenia, do 13,4 +/- 6,4%. Zarówno w grupach badanych, jak i w kontrolnej, po zakończeniu leczenia (obserwacji klinicznej), wzrost odsetka limfocytów CD56+/CD3 - był statystycznie istotny w porównaniu do wyników przed rozpoczęciem leczenia (obserwacji klinicznej) - Tab. 24.

Tab. 24. Średnie wartości odsetkowe limfocytów CD56+/CD3- przed i po zakończeniu leczenia (obserwacji klinicznej).

Grupa	Badanie	N	CD56+/CD3- [%]		Test Friedmana
			$\bar{x} \pm SD$	Min - max	
A	I	35	13,2 ± 7,1	5 - 30	P ≤ 0.001
	II		16,9 ± 7,9	6 - 34	
B	I	30	11,7 ± 4,9	5 - 21	P ≤ 0.001
	II		14,3 ± 4,8	6 - 22	
K	I	31	11,1 ± 5,9	5 - 26	P ≤ 0.005
	II		13,4 ± 6,4	6 - 31	

I- przed leczeniem (obserwacją kliniczną)

II- po zakończeniu leczenia (obserwacji klinicznej)

Bezwzględny, jak i względny przyrost limfocytów CD56+/CD3- (Tab. 25) w grupie kobiet otrzymujących Iscador QuS (grupa A) wynosił odpowiednio 2,6 +/- 3,5 i 31,54 +/- 42,09%. W grupie kobiet otrzymujących Intron A (gr. B) przyrost bezwzględny limfocytów CD56+/CD3- wynosił 3,7 +/- 3,9, a ich względny wzrost (indeks zmian) wynosił 37,37 +/- 56,16%, a w grupie kontrolnej (grupa K), przyrost bezwzględny wynosił 2,3 +/- 3,4, a ich wzrost względny (indeks zmian) wynosił 29,02 +/- 40,83%. Różnice w badanych przyrostach limfocytów CD56+/CD3- pomiędzy grupami B i K nie były statystycznie istotne.

Tab. 26. Bezwzględne (Δ) i względne (index zmian-%) zmiany wartości limfocytów CD56+/CD3- obserwowane w trakcie leczenia (obserwacji klinicznej).

Badany parametr	Grupa	N	$x \pm SD$	min - max	Test Manna – Whitney'a
Δ CD56+/CD3-	A	35	$2,6 \pm 3,5$	-9 – 10	$P \leq 0,001$
	B	30	$3,7 \pm 3,9$	0 – 20	
	A	35	$2,6 \pm 3,5$	-9 – 10	NS
	K	31	$2,3 \pm 3,4$	-9 – 10	
	B	30	$3,7 \pm 3,9$	0 – 20	$P \leq 0,001$
	K	31	$2,3 \pm 3,4$	-9 – 10	
Indeks zmian [%]	A	35	$31,54 \pm 42,09$	-50 – 166,67	$P \leq 0,001$
	B	30	$37,37 \pm 56,16$	0 – 285,71	
	A	35	$31,54 \pm 42,09$	-50 – 166,67	NS
	K	31	$29,02 \pm 40,83$	-50 – 166,67	
	B	30	$37,37 \pm 56,16$	0 – 285,71	$P \leq 0,001$
	K	31	$29,02 \pm 40,83$	-50 – 166,67	

Obserwacja zachowania się CIN1 i CIN2, zarówno w grupach badanych, jak i kontrolnej w zależności od wartości odsetkowej populacji limfocytów CD56+/CD3- przed rozpoczęciem leczenia i obserwacji klinicznej wykazała, że w grupie 61 kobiet, u których nastąpiła remisja zmiany w 19 (31,1%) przypadkach odsetek limfocytów CD56+/CD3- był poniżej normy i w 42 (68,9%) w normie i powyżej normy. W grupie 25 kobiet, u których zmiany CIN1 i CIN2 utrzymywały się jako stan stacjonarny, w 12 (48,0%) przypadkach CD56+/CD3- było poniżej normy, a w 13 (52%) przypadkach w normie i powyżej normy. W grupie kobiet, u których nastąpiła progresja zmiany CIN1 i CIN2 do CIN wyższego stopnia, w 9 (90%) przypadkach wartości odsetkowe limfocytów CD56+/CD3- były poniżej normy, a w 1 przypadku w normie i powyżej normy (Tab. 26).

Porównanie zachowania się CIN1 i CIN2, zarówno w grupach badanych, jak i kontrolnej w zależności od wartości odsetkowych populacji limfocytów CD56+/CD3- uzyskane po zakończeniu leczenia (obserwacji klinicznej) pokazało, że spośród 61 kobiet, u których nastąpiła remisja CIN, w 3 (5,0%) przypadkach wartość odsetkowa CD56+/CD3- była poniżej normy, a w 58 (95,0%) w normie lub powyżej normy. W grupie 25 kobiet, gdzie zmiana utrzymywała się jako stan stacjonarny, w 8 (32,0%) przypadkach wartości odsetkowe CD56+/CD3- były powyżej normy i w 17 (68,0%) w normie lub powyżej normy. W grupie 10 kobiet, u których wystąpiła progresja CIN1 i CIN2 do CIN wyższego stopnia, w 9 (90,0%) przypadkach odsetkowa wartość CD56+/CD3- była poniżej normy i w 1 przypadku w normie lub powyżej normy. (Tab. 27).

Tab. 27. Zachowanie się CIN1 i CIN2 a wartości odsetkowe populacji limfocytów CD56+/CD3- przed i po leczeniu (obserwacji klinicznej).

Badanie	Zachowanie się CIN	n	CD56+/CD3-		Test Chi ²
			<normy	W normie i powyżej	
I	Remisja	61	19 (31,1%)	42 (68,9%)	P≤0.001
	Proces stacjonarny	25	12 (48,0%)	13 (52,0%)	
	Progresja	10	9 (90,0%)	1 (10,0%)	
II	Remisja	61	3 (5,0%)	58 (95,0%)	P≤0,001
	Proces stacjonarny	25	8 (32,0%)	17 (68,0%)	
	Progresja	10	9 (90,0%)	1 (10,0%)	

I- przed leczeniem (obserwacją kliniczną)

II- po zakończeniu leczenia (obserwacji klinicznej)

4.4.7. Związek pomiędzy analizowanymi czynnikami a remisją CIN1 i CIN2 określony przy pomocy modelu regresji logistycznej.

Natomiast ocena zależności remisji CIN1 i CIN2 od poziomu odsetkowego limfocytów oraz sposobu leczenia dokonana przy użyciu modelu regresji logistycznej (Tab. 28) wykazała w grupie kobiet otrzymujących Iscador QuS największą wartość współczynnika regresji dla CD4/CD8 – 2,49, CD8-0,0068, CD56+/CD3- - 0,064, CD4-0,017 i CD3-0,007.

Tab. 28. Związek pomiędzy analizowanymi czynnikami a remisją CIN1 i CIN2 określony przy pomocy modelu regresji logistycznej w grupie kobiet, u których nie stosowano żadnej terapii i z terapią Iscadorem QuS.

Czynnik	Współczynnik regresji <i>b</i>
CD4/CD8	2,490
CD8	0,068
CD56+/CD3-	0,064
CD4	0,017
CD3	0,007

W grupie kobiet leczonych Intronem A największą wartość dla współczynnika remisji CIN przy $p < 0,05$ uzyskano dla indeksu CD4/CD8-9,050, CD56+/CD3- - 0,167, CD8-0,166, CD3-0,143, terapii Intronem A- 0,118 i CD19- 0,037. (Tab. 29)

Tab. 29. Związek pomiędzy analizowanymi czynnikami a remisją CIN1 i CIN2 określony przy pomocy modelu regresji logistycznej w grupie kobiet, u których nie stosowano żadnej terapii i z terapią Intronem A.

Czynnik	Współczynnik regresji <i>b</i>
CD4/CD8	9,050
CD56+/CD3-	0,167
CD8	0,166
CD3	0,143
Leczenie	0,118
CD19	0,037

5. OMÓWIENIE WYNIKÓW. DYSKUSJA.

Wykrywanie i leczenie zmian o charakterze śród nabłonkowej neoplazji szyjki macicy (CIN) to obecnie jeden z głównych sposobów profilaktyki raka szyjki macicy. Takie postępowanie doprowadziło w wielu krajach Europy i w USA do znacznej redukcji występowania raka inwazyjnego szyjki macicy u kobiet. Obecnie jego częstość występowania udało się zredukować od ok. 60% w Anglii do 80% w Finlandii i Szwecji. W przypadkach CIN3, która w znacznym odsetku przypadków ulega progresji do raka inwazyjnego, w opinii większości autorów (32,21,14,13,63,8,82,92) nie należy zwlekać z podjęciem decyzji o leczeniu chirurgicznym. Wybór sposobu leczenia chirurgicznego w przypadkach CIN3 zależy od lokalizacji zmiany w obrębie szyjki macicy, wieku kobiety, chęci dalszej prokreacji, współistnienia innych zmian w obrębie macicy oraz świadomości leczonej o konieczności dalszej systematycznej kontroli. Najczęściej w tym stopniu zaawansowania CIN wykonuje się konizację chirurgiczną szyjki macicy (32,21,14,13,63,8,82,92).

Natomiast zmiany o charakterze CIN1 i CIN2 w znacznym odsetku, tj. w około 40 – 60% przypadków ulegają remisji (32,21,14,13,63,8,82,92). Zmiany morfologiczne zwłaszcza o charakterze CIN1 często są trudne do odróżnienia od zmian morfologicznych charakterystycznych dla subklinicznej infekcji HPV, infekcji, która w większości przypadków towarzyszy śród nabłonkowej neoplazji (32,21,14,13,63,8,82,92). Zgodnie z opinią wielu autorów (13,61,62,63), subkliniczna infekcja HPV i CIN są kontynuacją tego samego procesu. Badania spektrofotometryczne jąder komórek w CIN1 i CIN2 wykazują niezmienną,

a więc diploidalną zawartość chromosomów (80). Te dane, jak i obserwacje kliniczne (32,21,14,13,63,8,82,92) dowodzą, że CIN1 i CIN2 to w większości przypadków zmiany niestabilne, ulegające samoistnej remisji. Stąd chirurgiczne leczenie tych zmian, zwłaszcza u kobiet młodych (średnia wieku kobiet z CIN1 i CIN2 wynosi 28,5 lat) w większości przypadków jest więc niecelowe i może niewątpliwie ograniczać płodność (32,21,14,13,63,8,82,92).

Fakt, że zmiany CIN1 i CIN2 w najwyższym odsetku dotyczą kobiet młodych, tj. w okresie najwyższej prokreacji inspirowane do poszukiwania nowych, zachowawczych metod leczenia tych zmian nie wpływających na stan anatomiczno - czynnościowy szyjki macicy, a więc w niczym nie ograniczających funkcji prokreacyjnych narządu.

W grupie kobiet z CIN1 i CIN2 i infekcją HPV, które otrzymywały Iscador QuS (grupa A), remisja CIN dotyczyła 60% przypadków, a więc w nieco wyższym odsetku, niż w grupie kontrolnej (grupa K), w której to kobiety poddano obserwacji klinicznej bez leczenia, choć różnice te nie były statystycznie istotne. Natomiast w grupie kobiet otrzymujących Intron A (grupa B) remisja CIN1 i CIN2 była statystycznie istotnie wyższa w porównaniu z grupą kontrolną, jak i z grupą kobiet otrzymujących Iscador QuS (Tab. 5).

Porównanie odsetka remisji w zależności od stopnia zaawansowania CIN wykazało, że odsetek remisji CIN1 zarówno w grupach kobiet otrzymujących Iscador QuS jak i Interferon alfa był statystycznie istotnie wyższy, niż w grupie kontrolnej (Tab. 6). Tak więc w przypadkach CIN1 zarówno Iscador QuS, jak i Intron A wykazują właściwości terapeutyczne. Natomiast w przypadkach CIN2 właściwości terapeutyczne Iscadoru QuS są słabo zaznaczone, podczas gdy stosowanie Intronu A prawie dwukrotnie zwiększało odsetek remisji w porównaniu

z grupą kontrolną (Tab. 6). Zastosowany w tych badaniach Iscador QuS (*Viscum album*), jest naturalnym wyciągiem z jemioli i zgodnie z dotychczasowymi wynikami badań wykazuje właściwości immunostymulujące (78,90,33,48,87,10,42). Iscador QuS zawiera głównie wiskuminy (lektyny jemioli- ML-I lub VAL) oraz wiskotoksyny. Kompleks białkowo - cukrowy lektyny może przylegać do powierzchni komórki i wchodzić w interakcję z syntetazą protein międzykomórkowych (78,90), co ma na tej drodze stymulować produkcję cytokin oraz aktywować leukocyty (33,48,87). Zgodnie z obserwacjami Beuth i wsp. (10) wiskuminy mogą również wpływać na procesy przerzutów i apoptozy. Natomiast wiskotoksyny, to również lektyny o podobnej strukturze molekularnej do wiskuminy, ale wydają się być bardziej toksyczne i indukują nekrozę komórkową (42). Jak więc wynika z wyników naszych badań wraz ze wzrostem stopnia zaawansowania CIN możliwości terapeutyczne Iscadoru QuS się zmniejszają. Natomiast prawie dwukrotnie wyższy odsetek remisji CIN2 w grupie kobiet, w której stosowano Intron A w porównaniu z grupą kontrolną wskazuje na prawdopodobnie inny mechanizm działania Intronu A. Dotychczasowe badania nad ludzkim rekombinowanym interferonem alfa (Intron A) wykazują na jego działanie przeciwwirusowe, hamujące proliferację, jak i wpływ na różnicowanie się komórek limfocytarnych.

W okresie obserwacji w grupie kobiet otrzymujących Intron A nie miała miejsca progresja CIN1 i CIN2 do CIN wyższego stopnia, a odsetek zmian CIN utrzymujących się jako proces stacjonarny był statystycznie istotnie niższy w porównaniu zarówno z grupą kontrolną, jak i grupą kobiet otrzymujących Iscador QuS (Tab. 5). Dowodzi to wpływu Interferonu alfa na hamowanie procesu śród nabłonkowej neoplazji szyjki macicy także z towarzyszącą infekcją HPV

o wysokim potencjale onkogennym.

Gonzales- Sanchez i wsp. (30) stosując interferon beta u kobiet z CIN1 i CIN2 uzyskali 79% przypadków remisji CIN1 oraz 70% dla CIN2, a więc nieco niższy odsetek w porównaniu z naszymi wynikami. Natomiast Mojana G. I wsp. (51) stosując ten sam rodzaj interferonu przez okres 3 miesięcy w zmianach śród nabłonkowych niskiego stopnia (low grade squamous intraepithelial lesions LG- SIL), a więc w zmianach charakterystycznych dla infekcji HPV i CIN1 uzyskali 72,9% remisji oraz 47,3% w zmianach śród nabłonkowych wysokiego stopnia (high grade squamous intraepithelial lesions HG-SIL).

Ważne znacznie może mieć wpływ stosowanego Iscadoru QuS i Interferonu alfa na zachowanie się infekcji HPV, której rola w procesie karcinogenezy szyjki macicy jest obecnie niekwestionowana.

Zgodnie z aktualną opinią wielu autorów (7,6,43,30,81,31,64) długotrwale utrzymująca się infekcja HPV, tzw. przewlekła infekcja HPV w obrębie szyjki macicy jest głównym czynnikiem prowadzącym do rozwoju CIN1 i CIN2.

Dokonana tą samą techniką powtórna ocena infekcji HPV po zakończeniu leczenia (obserwacji klinicznej) wykazała statystycznie istotny odsetek kobiet z brakiem wirusa papilloma, tak w grupach badanych, tj. otrzymujących Iscador QuS i Intron A, jak i w grupie kontrolnej (Tab.7). Dowodzi to możliwości samoistnej remisji infekcji HPV. Fakt, że odsetek remisji infekcji HPV był statystycznie wyższy w grupach kobiet otrzymujących Iscador QuS, a szczególnie Interferon alfa w porównaniu z grupą kontrolną świadczy o wpływie Iscadoru QuS na remisję HIV, a szczególnie przeciwwirusowych właściwości Intronu A (Tab. 8). Odsetek remisji zależał nie tylko od stopnia zaawansowania CIN, ale także od typu współistniejącej infekcji HPV. Był on wyraźnie wyższy w przypadkach CIN

z towarzyszącą infekcją HPV o niskim potencjale onkogennym. Natomiast proces stacjonarny i progresja CIN dotyczyły głównie CIN z towarzyszącą infekcją HPV o wysokim potencjale onkogennym (Tab. 6A). Dowodzi to znaczenia roli, jaką odgrywa infekcja HPV o wysokim potencjale onkogennym w procesie karcinogenezy w obrębie szyjki macicy.

Inni autorzy (83,22,82,92) stosując Intron A w leczeniu infekcji HPV uzyskali także statystycznie istotnie wyższy odsetek remisji w porównaniu z grupą kobiet bez leczenia czy otrzymującej placebo.

Pewne znaczenie w tym procesie ma stan immunologiczny organizmu a głównie obniżenie lokalnej odporności komórkowej (74,69,77,58). Układ immunologiczny organizmu jest w stanie tak zmodyfikować swe działanie, aby doszło do eliminacji zakażonych komórek. Oczywiście jest, że eliminacja karcinogennych wirusów, jak i komórek nimi zainfekowanych, będzie miała działanie przeciwnowotworowe. Także dotychczasowe obserwacje kliniczne oraz badania laboratoryjne i doświadczalne dostarczają wiele danych na temat znaczenia stanu immunologicznego dla przebiegu prawidłowego, procesu metaplastacji płaskonabłonkowej (23,37,30,27,51,60). Normalizacja lub wzmacnianie odporności lokalnej może mieć istotne znaczenie w zahamowaniu zmian morfologicznych spowodowanych infekcją HPV i rozwoju CIN.

Jednym z kluczowych zjawisk ramienia aferentnego w procesie obrony organizmu przed infekcją HPV jest prezentacja antygeny wyspecjalizowanym komórkom odpowiedzi typu komórkowego przez tzw. komórki prezentujące antygen APC (antigen presenting cells- APC). W obrębie nabłonka szyjki macicy APC to przede wszystkim komórki Langerhans. Klasyczne już doniesienia

w piśmiennictwie (74,26,84,53,49) wykazały znaczne obniżenie się liczby komórek Langerhansa w obrębie nabłonka płaskiego szyjki macicy w przebiegu infekcji HPV. Również późniejsze badania Morelliego i wsp. oraz Taya i wsp. (52,85) wykazały niemal całkowity brak podtypu S100 (+) komórek Langerhansa w późniejszych, bardziej zaawansowanych zmianach HPV zależnych, tj. CIN1 i CIN2 z towarzyszącą infekcją HPV.

Prezentacja antygeny wirusowego w drodze MHC-II zależnej stymuluje subpopulację limfocytów CD4+ (cluster differentiation - CD), tzw. limfocytów wspomagających – Th (T helper). W zależności od profilu cytokin produkowanych przez limfocyty CD4+ w odpowiedzi na stymulację antygenową wyodrębniono dwa podtypy tych komórek. Limfocyty Th1 produkują preferencyjnie interleukinę 2 (IL-2) oraz interferon gamma (IFN γ), zaś limfocyty Th2- interleukinę 4 i 10 (IL-4 i IL-10) (54).

IL-2 oraz IFN γ stymulują preferencyjnie cytotoksyczne limfocyty prekursorowe T CD8+ powodując rozwinięcie się ich aktywności cytotoksycznej poprzez powstanie puli limfocytów cytotoksycznych CTL (cytotoxic lymphocyte – CTL) wywierających działanie lityczne, skierowane bezpośrednio na komórkę prezentującą antygen w połączeniu z MHC-I, a z drugiej strony aktywują makrofagi i komórki NK poprzez stymulację prekursorowych limfocytów CD56+/CD3- (80,81). Natomiast produkowane przez Th2 IL-4 i IL-10 preferencyjnie stymulują limfocyty B- komórki CD19, powodując ich terminalne różnicowanie się do komórek plazmacycznych, produkujących przeciwciała (antibody - Ab). Z uwagi na wewnątrzkomórkową naturę infekcji HPV, dla jej eliminacji wydaje się istotniejsza MHC-II zależna preferencyjna stymulacja Th1.

Ocenę stopnia niedoboru immunologicznego w różnych schorzeniach, w tym

w CIN1 i CIN2 z towarzyszącą infekcją HPV można oprzeć na ocenie odsetkowej i ilościowej populacji limfocytów T w krwi obwodowej przy użyciu metod wykorzystujących przeciwciała monoklonalne w cytofluorometrii przepływowej. Należy jednak mieć na uwadze, że ocena taka wymaga wielkiej ostrożności w interpretacji wyników z uwagi na fakt, że na stan układu immunologicznego może mieć wpływ szereg czynników osobniczych jak i środowiskowych, takich jak stan ogólny, wiek kobiet, stan hormonalny, palenia papierosów, współistniejące infekcje czy procesy nowotworowe, a nawet liczba przebytych ciąż, jak i miejsce zamieszkania - ze względu na wpływ zewnętrznych czynników toksycznych.

W naszym badaniu podjęto próbę oceny ramienia eferentnego odpowiedzi immunologicznej organizmu na zmiany o charakterze CIN1 i CIN2 z towarzyszącą infekcją HPV, poprzez ocenę ilościową (wartości odsetkowych) a przez to, pośrednio, na zachowanie się ogólnej puli limfocytów T- CD3, limfocytów wspomagających - CD4, limfocytów supresorowych, cytotoksycznych – CD8, stosunku CD4/CD8, limfocytów B- CD19 oraz komórek NK- limfocytów CD56+/CD3-.

Wartości odsetkowe limfocytów T (CD3) przed rozpoczęciem leczenia (obserwacji klinicznej), zarówno w grupach poddanych leczeniu, jak i w grupie kontrolnej nie wykazywały istotnych różnic (Tab. 10). Po zakończeniu leczenia (obserwacji klinicznej) we wszystkich trzech grupach kobiet nastąpił statystycznie istotny wzrost odsetka tych limfocytów w porównaniu do wartości wyjściowych, przy czym przyrost ten, zarówno bezwzględny, jak i względny (indeks zmian) był największy i statystycznie znamienne w grupie kobiet leczonych Intronem A (Tab. 10). Jest to zgodne z wynikami badań innych autorów (Tay, Morris, Vayrynen) (53,85,89), według których dominującym typem limfocytów, zarówno w obrębie

prawidłowego nabłonka szyjki macicy, jak i w zmianach HPV- zależnych są limfocyty T (CD3). Potwierdza to znaczenie śródnabłonkowej odpowiedzi komórkowej w reakcji na infekcję. Jednocześnie, jak wykazali Tay i Gemignani (85,28), bezwzględna liczba śródnabłonkowych limfocytów T ulega znaczącemu obniżeniu w przebiegu CIN z towarzyszącą infekcją HPV.

Interesujące okazały się wyniki zestawienia zachowania się wartości odsetkowych CD3 w odniesieniu do zachowania się CIN1 i CIN2, tj. w przypadkach remisji, progresji, czy też stanu stacjonarnego. Remisja zmiany o charakterze CIN1 i CIN2 z towarzyszącą infekcją HPV nastąpiła w największym odsetku (90,2%) wśród kobiet, u których wartości wyjściowe, tj. przed rozpoczęciem leczenia (obserwacji klinicznej), odsetkowe limfocytów CD3 w surowicy krwi były w normie lub powyżej wartości prawidłowych. Podobnie też utrzymywanie się CIN1 i CIN2 jako procesu stacjonarnego stwierdzono częściej (60%) wśród kobiet z prawidłowym odsetkiem limfocytów T. Natomiast progresja CIN1 i CIN2 miała miejsce u tych kobiet, u których wyjściowa (przed rozpoczęciem leczenia (obserwacji klinicznej)) wartość odsetkowa limfocytów CD3 była obniżona (Tab. 12). W trakcie leczenia (obserwacji klinicznej) obserwowano wzrost odsetka kobiet z prawidłowymi wartościami odsetkowymi populacji limfocytów CD3, szczególnie w grupie kobiet z remisją CIN1 i CIN2 (98,4%). W grupie kobiet, u których doszło do progresji CIN1 i CIN2 do CIN wyższego stopnia, wartości odsetkowe CD3 były w większości przypadków obniżone (Tab., 12). Jak więc wynika z przeprowadzonych przez nas badań, ocena wartości odsetkowych limfocytów T mogłaby więc mieć znaczenie prognostyczne w aspekcie zachowania się CIN1 i CIN2 z towarzyszącą infekcją HPV. Fakt ten może więc przyczynić się do powstania nowego aspektu postrzegania procesu śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy niosąc wymierne

implikacje przy podejmowaniu decyzji klinicznych w trakcie ustalania strategii postępowania z CIN1 i CIN2 z towarzyszącą infekcją HPV. Obserwacje te mogą mieć istotne znaczenie dla praktyki klinicznej.

We wszystkich trzech grupach kobiet przed rozpoczęciem leczenia (obserwacji klinicznej) obserwowano zbliżone wartości odsetkowe limfocytów B (CD19). Po zakończeniu leczenia (obserwacji) stwierdzono zwiększoną liczbę kobiet z prawidłowymi wartościami odsetkowymi limfocytów CD19, przy czym remisja zmian o charakterze CIN1 i CIN2 w nieznacznie wyższym odsetku dotyczyła tych właśnie kobiet (Tab. 21, 23). Potwierdza to dotychczasowe spostrzeżenia o nikłej roli odpowiedzi humoralnej w procesie śród nabłonkowej neoplazji szyjki macicy (53,85,89,67). Może to być związane z niewielką antygenowością komórek dysplastycznych, na drodze MHC-I zależnej prezentacji komórkom efektorowym.

Średnie wartości odsetkowe limfocytów wspomagających Th (CD4+) przed rozpoczęciem leczenia (obserwacji klinicznej) były obniżone, jednak nie różniły się w statystycznie istotnym stopniu w grupach badanych i kontrolnej. Również bezwzględny i względny przyrost ich wartości po zakończeniu leczenia (obserwacji klinicznej) także nie różnił się w poszczególnych grupach kobiet. W grupie kobiet, u których doszło do remisji zmian CIN1 i CIN2 z towarzyszącą infekcją HPV wartości odsetkowe limfocytów CD4 ulegały normalizacji, przy czym w dość wysokim odsetku zaobserwowano obniżone wartości odsetkowe tych limfocytów we wszystkich trzech grupach kobiet przed rozpoczęciem leczenia (obserwacji klinicznej). W opinii niektórych autorów (46,68,73,89), długotrwała infekcja HPV prowadzi do wyczerpania się zasobów komórek odpornościowych, których organizm samodzielnie nie jest w stanie uzupełnić wystarczająco szybko.

W trakcie leczenia (obserwacji klinicznej) obserwowano również zmiany wartości odsetekowych populacji cytotoksycznych limfocytów Ts- CD8+. Remisja zmian o charakterze CIN1 i CIN2 z towarzyszącą infekcją HPV także częściej występowała w grupie kobiet z prawidłowymi wartościami odsetkowymi tych limfocytów. Przy czym znamiennej statystycznie normalizację i przyrost wartości bezwzględnych, jak i względnych CD8 obserwowano w grupach kobiet otrzymujących Iscador QuS i Intron A. Zmniejszenie liczby subpopulacji limfocytów CD3, a zwiększenie liczby CD8 uzyskali również w swoich badaniach Rytwiński i wsp. (68) oraz Selvaggi i wsp. (73) w grupie kobiet z rakiem szyjki macicy. Uważa się, że limfocyty T odpowiedzialne są w równym stopniu za procesy naprawcze zmian morfologicznych związanych z infekcją HPV, jak i za niszczenie i eliminację zakażonych czy zmienionych nowotworowo komórek (68,73,15,19).

Wielokrotnie obserwowane zmiany wzajemnego stosunku liczby subpopulacji limfocytów CD4 i CD8 z relatywną przewagą limfocytów CD8 uznawane są za wyraz upośledzonych mechanizmów odpowiedzi komórkowej w przebiegu zmian morfologicznych HPV zależnych (85,89,15,19). Stosunek CD4/CD8 w obrębie prawidłowego nabłonka szyjki macicy wynoszący według badań Carson i wsp. (15) 3.21 ± 0.33 ulega obniżeniu u kobiet z CIN do 1.72 lub nawet poniżej 1, według Tay i wsp. (85). W naszym badaniu średnia wartość stosunku CD4/CD8 wzrosła z 0,96, przed leczeniem (obserwacją kliniczną) do 1,44 po zakończeniu leczenia (obserwacji klinicznej) (Tab. 19). Największy odsetek remisji zmian o charakterze CIN1 i CIN2 stwierdzono w u kobiet, u których doszło do największej normalizacji proporcji CD4/CD8.

Zmiana dystrybucji subpopulacji limfocytów T w CIN1 i CIN2 z towarzyszącą infekcją HPV może odzwierciedlać naturalną obronę komórkową. Podobne

rezultaty do naszych w odniesieniu do populacji tych limfocytów uzyskała Kesič (38). Wynikiem zmniejszenia wartości, głównie limfocytów CD4 jest znamienne statystycznie zmniejszenie stosunku CD4/CD8. Również Vayrynen i wsp. (89) wykazał, że zmiany o charakterze CIN1 i CIN2 z towarzyszącą infekcją HPV najczęściej ulegają remisji w przypadkach, w których stosunek CD4/CD8 jest najwyższy, natomiast progresji częściej ulegają przypadki z najniższym indeksem CD4/CD8.

W przebiegu spontanicznej remisji zmian HPV zależnych szyjki macicy Bishop i Coleman (19,11) zauważyli jedynie nieznaczny wzrost liczby komórek NK (limfocytów CD56+/CD3-). Remisja CIN1 i CIN2 z towarzyszącą infekcją HPV w najwyższym odsetku wystąpiła u kobiet, u których wartość odsetkowa CD56+/CD3- była w granicach normy lub nieco podwyższona. W trakcie leczenia (obserwacji klinicznej) zauważono normalizację wartości odsetkowych CD56+/C3- w grupach kobiet otrzymujących Iscador QuS, jak i Intron A. Potwierdzenie zależności remisji CIN1 i CIN2 od poziomu odsetkowego limfocytów oraz sposobu leczenia tj. stosowania Intronu A wykazano także przy użyciu modelu regresji logistycznej (Tab. 28, 29).

6. WNIOSKI

1. Zastosowanie Iscadoru QuS a zwłaszcza Intronu A zwiększa odsetek remisji CIN1 i CIN2 z towarzyszącą infekcją HPV, także o wysokim potencjale onkogennym.
2. Na zachowanie się zmian CIN1 i CIN2 ma wpływ wyjściowy, tj. przed leczeniem (obserwacją kliniczną), poziom puli limfocytów CD3 w surowicy krwi. Prawidłowy ich wyjściowy poziom koreluje z wyższym odsetkiem remisji tych zmian a obniżony z wyższym odsetkiem progresji CIN1 i CIN2 do CIN wyższego stopnia. Stąd też ocena wartości odsetkowych limfocytów może mieć znaczenie prognostyczne w aspekcie zachowania się CIN1 i CIN2.
3. U kobiet ze zmianami CIN1 i CIN2 z towarzyszącą infekcją HPV obserwuje się obniżenie odporności komórkowej, której wyrazem jest:
 - Obniżenie odsetka subpopulacji limfocytów CD4 (Th- wspomagających)
 - Obniżenie stosunku limfocytów CD4/CD8 (Th/Ts- T helper/T supressor)
 - Obniżenie wartości odsetkowych limfocytów CD56+/CD3- czyli komórek NK (natular killers- NK).
4. Stosowanie leków immunomodulujących, a zwłaszcza Intronu A zwiększa odsetek kobiet z prawidłowymi wartościami odsetkowymi subpopulacji limfocytów T i komórek NK-, a więc komórek układu immunologicznego odpowiedzialnych za prawidłowe funkcjonowanie odpowiedzi typu komórkowego we wczesnych etapach procesu karcinogezey w obrębie szyjki macicy. Na tej drodze może hamować proces śród nabłonkowej neoplazji, a nawet przyczyniać się do jego regresji.

7. STRESZCZENIE

Śródnabłonkowa neoplazja szyjki macicy (Cervical Intraepithelial Neoplasia - CIN), a zwłaszcza CIN1 i CIN2 są najczęściej diagnozowanymi zmianami w obrębie szyjki macicy u kobiet młodych, to jest w okresie prokreacji. Zmianom tym w większości przypadków towarzyszy infekcja wirusem ludzkiego brodawczaka (Human Papilloma Virus- HPV).

Obecność HPV o wysokim potencjale onkogennym, a zwłaszcza typ 16 i 18 oraz ich transkryptorów E6 i E7 stwierdzono w ponad 80% przypadków raka szyjki macicy. W badaniach *in vitro* wykazano, że onkoproteina E6 wiąże się z białkiem p53, które jest komórkowym inhibitorem karcinogenezy, inaktywując go. Natomiast onkoproteina E7 wykazuje duże powinowactwo do białka hamującego rozwój retinoblastoma (pRB) powodując rozbieżność kompleksu pRB-E2F i uwalniając czynnik transkrypcyjny E2F. Jest to jedna z wielu możliwych dróg, która może prowadzić do transformacji nowotworowej.

Około 40 do 60% zmian o charakterze CIN1 i CIN2 ulega samoistnej regresji, lecz także od 15-30% ulega progresji do CIN wyższego stopnia. Panuje obecnie dość powszechny pogląd, że zmiany te, jeśli nie ulegną regresji w okresie 6-12 miesięcy, powinny być poddane leczeniu chirurgicznemu.

U kobiet młodych, pragnących jeszcze rodzić, celowe jest poszukiwanie nowych, niechirurgicznych sposobów leczenia tych zmian, które nie ograniczałyby procesu prokreacji. Jedną z takich możliwości może być próba modulacji mechanizmów immunologicznych.

Dotychczasowe dane w piśmiennictwie wskazują, że wyciąg z jemioli hodowanej na dębie zawierający liczne lektyny, znany jako Iscador QuS, a zwłaszcza ludzki

rekombinowany interferon alfa (Intron A) mają właściwości immunostymulujące. Temu drugiemu przypisuje się działanie przeciwwirusowe i przeciwproliferacyjne oraz modulujące różnicowanie się komórek limfocytarnych.

Stąd w obecnej pracy postanowiono określić wpływ preparatu Iscador QuS (firmy Hiscia-Weleda, Szwajcaria) i ludzkiego rekombinowanego interferonu alfa (Intron A firmy Schering- Plough/USA) na zachowanie się wybranych parametrów układu immunologicznego badanych kobiet oraz na przebieg CIN 1 i CIN 2 z towarzyszącą infekcją HPV.

Materiał badawczy stanowiło 96 kobiet w wieku 18 – 52 lata, z CIN1 (50 kobiet) i CIN2 (46) oraz z towarzyszącą infekcją HPV, diagnozowanych i leczonych w Klinice Ginekologii i Onkologii CM UJ w latach 1996 – 2000.

Rozpoznanie stopnia zaawansowania CIN ustalono na podstawie badania kolposkopowego, cytologicznego oraz histologicznego wycinka celowanego i materiału uzyskanego poprzez wyłżeczkowanie kanału szyjki macicy. Natomiast obecność infekcji HPV zdiagnozowano przy pomocy testu Hybrid Capture 1 i Hybrid Capture 2.

Wybrane subpopulacje limfocytów krwi obwodowej jako parametry układu immunologicznego oceniono przez zastosowanie przeciwciał monoklonalnych firmy Becton- Dickinson w cytofluorometrii przepływowej.

Kobiety te podzielono według doboru losowego na trzy grupy (Tabela 1,2,3,4). Grupa 35 kobiet (grupa A) otrzymywała w iniekcji podskórnej Iscador QuS dwa razy w tygodniu przez okres 3 miesięcy. Następną grupę liczącą 30 kobiet (grupa B) otrzymywała Intron A dwa razy w tygodniu w iniekcji do szyjki macicy przez okres 3 miesięcy. Grupę kontrolną stanowiło 31 kobiet (grupa K), które poddano obserwacji cytologiczno - kolposkopowej bez leczenia.

W grupach badanych, jak i kontrolnej zachowanie się CIN monitorowano cytologicznie - kolposkopowo co 3 miesiące. W przypadkach wyników badania cytologiczno - kolposkopowego wskazujących na progresję zmiany pobierano ponownie wycinek do badania histopatologicznego. W przypadkach remisji zmian, kobiety te w dalszym ciągu podlegały kontroli cytologiczno - kolposkopowej przez okres nie krótszy, niż 20 miesięcy.

Po zakończeniu obserwacji, tj. po 24 miesiącach u wszystkich kobiet, zarówno grup badanych, jak i kontrolnej, obok oceny cytologicznej i kolposkopowej, wykonano powtórne badanie w kierunku infekcji HPV, jak również oceniono stan układu immunologicznego tymi samymi metodami. Uzyskane wyniki opracowano statystycznie.

W grupie kobiet z CIN1 i CIN2 i infekcją HPV, które otrzymywały Iscador QuS (grupa A) remisja CIN wystąpiła w nieco wyższym, lecz statystycznie nieistotnym odsetku, niż w grupie kontrolnej (grupa K), w której to kobiety poddano obserwacji klinicznej bez leczenia. W grupie kobiet otrzymujących Intron A (grupa B) remisja CIN dotyczyła 80% przypadków, a więc była statystycznie istotnie wyższa w porównaniu z grupą kontrolną, jak i z grupą kobiet otrzymujących Iscador QuS.

W okresie obserwacji w grupie kobiet otrzymujących Intron A nie miała miejsca progresja CIN1 i CIN2 do CIN wyższego stopnia, a odsetek zmian CIN utrzymujących się jako proces stacjonarny był statystycznie istotnie niższy w porównaniu zarówno z grupą kontrolną, jak i grupą kobiet otrzymujących Iscador QuS. Ocena infekcji HPV po zakończeniu leczenia (obserwacji klinicznej) wykazała statystycznie istotny odsetek kobiet z brakiem wirusa papilloma, tak

w grupach badanych, tj. otrzymujących Iscador QuS i Intron A, jak i w grupie kontrolnej. Remisja dotyczyła zarówno HPV o niskim, jak i wysokim potencjale onkogennym. Remisja CIN z towarzyszącą infekcją HPV o wysokim potencjale onkogennym w najwyższym odsetku miała miejsce w grupie kobiet otrzymujących Intron A.

Po zakończeniu leczenia (obserwacji klinicznej) we wszystkich trzech grupach kobiet nastąpił statystycznie istotny wzrost odsetka limfocytów T (CD3+) w porównaniu do wartości wyjściowych, przy czym przyrost ten, zarówno bezwzględny, jak i względny (indeks zmian) był największy i statystycznie znamieny w grupie kobiet leczonych Intronem A.

Interesujące okazało się porównanie wyjściowych, tj. ocenionych przed leczeniem wartości odsetkowych CD3 w odniesieniu do zachowania się CIN1 i CIN2, tj. remisji, progresji lub utrzymywania się tych zmian jako proces stacjonarny. Remisja zmiany o charakterze CIN1 i CIN2 z towarzyszącą infekcją HPV nastąpiła w największym odsetku (90,2%) wśród kobiet, u których wyjściowe wartości odsetkowe limfocytów CD3 w surowicy krwi były w granicach normy. Podobnie też utrzymywanie się CIN1 i CIN2 jako proces stacjonarny stwierdzono częściej (60%) wśród kobiet z prawidłowym odsetkiem limfocytów T. Natomiast progresja CIN1 i CIN2 miała miejsce u tych kobiet, u których wyjściowa (przed rozpoczęciem leczenia (obserwacji klinicznej)) wartość odsetkowa limfocytów CD3 była obniżona. W trakcie leczenia (obserwacji klinicznej) obserwowano wzrost odsetka kobiet z prawidłowymi wartościami odsetkowymi populacji limfocytów CD3. Wzrost odsetka kobiet z prawidłowymi wartościami odsetkowymi populacji limfocytów korelował z remisją CIN1 i CIN2. W grupie kobiet, u których

doszło do progresji CIN1 i CIN2 do CIN wyższego stopnia, wartości odsetkowe CD3 były w większości przypadków poniżej normy.

Mniej wyraźne, lecz również o podobnym charakterze zmiany w wartościach odsetkowych zaobserwowano w pozostałych subpopulacjach ocenianych parametrów układu immunologicznego.

Ocena zależności remisji CIN1 i CIN2 od poziomu odsetkowego limfocytów oraz sposobu leczenia dokonana przy użyciu modelu regresji logistycznej wykazała w grupie kobiet otrzymujących Iscador QuS największą wartość współczynnika regresji B dla CD4/CD8, CD8, CD56+/CD3-, CD4 i CD3. W grupie kobiet leczonych Intronem A statystycznie istotną wartość dla współczynnika remisji CIN przy $p < 0,05$ uzyskano dla indeksu CD4/CD8, CD56+/CD3-, CD8, CD3, terapią Intronem A i CD19. A więc związek pomiędzy leczeniem Intronem A a remisją CIN1 i CIN2 oceniany przy pomocy modelu regresji logistycznej, był statystycznie istotny.

W podsumowaniu należy stwierdzić, że: zastosowanie Iscadoru QuS, a zwłaszcza Intronu A zwiększa odsetek remisji CIN1 i CIN2 z towarzyszącą infekcją HPV, także o wysokim potencjale onkogennym.

Na zachowanie się zmian CIN1 i CIN2 ma wpływ poziom puli limfocytów CD3 w surowicy krwi. Prawidłowy ich poziom koreluje z wyższym odsetkiem remisji tych zmian, a obniżony z wyższym odsetkiem progresji CIN1 i CIN2 do CIN wyższego stopnia. Stąd też ocena wartości odsetkowych limfocytów może mieć znaczenie prognostyczne w aspekcie zachowania się CIN1 i CIN2.

U kobiet ze zmianami CIN1 i CIN2 z towarzyszącą infekcją HPV obserwuje się obniżenie odporności komórkowej, której wyrazem jest:

- Obniżenie odsetka subpopulacji limfocytów CD4 (T helper- wspomagających)

- Obniżenie stosunku limfocytów CD4/CD8 (Th/Ts- T helper/T supressor)
- Obniżenie wartości odsetkowych limfocytów CD56+/CD3- czyli komórek NK (natural killers- NK)

Stosowanie leków immunomodulujących, a zwłaszcza Intronu A, zwiększa odsetek kobiet z prawidłowymi wartościami odsetkowymi subpopulacji limfocytów T i komórek NK-, a więc komórek układu immunologicznego odpowiedzialnych za prawidłowe funkcjonowanie odpowiedzi typu komórkowego we wczesnych etapach procesu karcinogenezy w obrębie szyjki macicy i na tej drodze może hamować ten proces, a nawet przyczyniać się do jego regresji.

8. PIŚMIENNICTWO

1. Ali S, Astley S.B., Sheldon T.A., et al.: Detection and measurement of DNA adducts in the cervix of smokers and non-smokers. *Int. J. Gynecol. Cancer*, 1994, 4:188-193.
2. Arends M.J., Benton E.C., McLaren K.M., et al.: Renal allograft recipients with high susceptibility to cutaneous malignancy have an increased prevalence of human papillomavirus DNA in skin tumours and a greater risk of anogenital malignancy. *Br. J. Cancer*, 1997, 75:722-728.
3. Arends M.J., Buckley C.H., Wells M.: Aetiology, pathogenesis and pathology of cervical neoplasia. *Journal of Clinical Pathology*, 1998, 51(2), 96-103.
4. Arends M.J, Donaldson Y.K., Duvall E., et al.: HPV 18 associates with more advanced cervical neoplasia than HPV 16. *Hum. Pathol.*, 1993, 24:432-437.
5. Arends M.J., Donaldson Y.K., Duvall E., et al.: HPV in full thickness cervical biopsies: high prevalence in CIN2 and CIN3 detected by a sensitive PCR method., *J. Pathol.* 1991, 165:301-309.
6. Arends M.J., Wyllie A.H., Bird C.C.: Papillomaviruses and human cancer. *Human Pathology*, 1990, 21:686-698.
7. 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. *Biblioteka Collegium Medicum UJ, Kraków*, 1990.
8. Basta A.: Rola infekcji wirusowych w etiopatogenezie raka szyjki macicy. *Rak Szyjki Macicy. Red. J. Markowskiej. PZWL*, 1999, 89-111.

9. Benton E.C., Arends M.J.: Human papillomavirus in the immunosuppressed.
In: Lacey C, ed. Papillomavirus review: Current research on papillomaviruses.
Leeds, Leeds University Press, 1996, 271-279.
10. Beuth J., Ko H.L., Gabius H.J., Pulverer G.: Influence of treatment with the immunomodulatory effective dose of beta-galactoside- specific lectin from mistletoe on tumor colonization in BALB/c-mice for two experimental model systems. *In Vivo*, 1991, 5(1):29-32.
11. Bishop P.E., McMillan A., Fletscher S.: An immunohistochemical study on spontaneous regression of condylomata acuminata. *Genitourin* 1990;66,79-81.
12. Boon T., Cerottini J.C., Van den Eynde B., et al.: Tumor antigens recognised by T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.*, 1994, 12:337-366.
13. Bosch F.X., Rohan T., Schneider A., et al.: Papillomavirus research update: highlights of the Barcelona HPV 2000 international papillomavirus conference. *J. Clin. Pathol.*, 2001, 54:163-175.
14. Buentner K.M., Ferenczy A.: Therapeutic approaches to genital warts.
Am. J. Med., 1997, 102:28-37.
15. Carson L.F., Twiggs L.B., Fokushima M., Ostrow R.S., Faras A.J., Okagaki T.: Human genital papilloma infections: An evaluation of immunologic competence in the genital neoplasia- papilloma syndrome. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1986, 155, 784-789.
16. Cason J., Kambo P.K., Best J.M., McCance D.J. 1992: Detection of antibodies to a linear epitope on the major capsid protein of human papillomavirus type 16 in sera from patients with cervical intraepithelial neoplasia and children. *Int. J. Cancer*, 50, 349-355.

17. Choo K.B., Pan C.C., Han S.H.: Integration of human papillomavirus type 16 into cellular DNA of cervical carcinoma: Preferential deletion of the E2 gene and invariable retention of the long control region and the E6/E7 open reading frames. *Virology*, 1987, 161:259-261.
18. Coffman R.I., Seymour B.W., Leberman D.A.: The role of helper T cell products in mouse B cell differentiation and isotype regulation. *Immunol. Rev.*, 1988, 102, 5-28.
19. Coleman N., Birley H.D.L., Renton A.N., Hanna N.F., Rytait B. K., Byrne M., Taylor-Robinson D., Stanley M.A.: Immunological events in regressing genital warts. *Am. J. Clin. Pathol.*, 1994, 102, 768-774.
20. Coppleson M.: Epidemiology and etiology of carcinoma of the cervix uteri. *Br. J. Hosp. Med.*, 1969, 2, 960.
21. Cox J.T.: Management of cervical intraepithelial neoplasia. *Lancet*, 1999, 353:857-895.
22. Darwiche N., De Luca L. M.: Differentiation and prevention of malignant transformation. W: *Intraepithelial Neoplasia of the Lower Genital Tract.* (red. Luesley D., Jordan J., Richart R.M., Churchill Livingstone, London, 1995, 24, 309-324.
23. De Aloyso D., Miliffi L., Ianicelli T., et al.: Intramuscular interferon- beta treatment of cervical intraepithelial neoplasia II associated with human papillomavirus infection. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, 1994, 73(5):420-424.
24. DiSaia P. J., Creasman W.T.: *Ginekologia Onkologiczna.* Red. wydania polskiego Sikorski R.J., Czelej, Lublin, 1998, 27-28.

25. Ferenczy A.: Current understanding of the epidemiology and etiology of cervical neoplasia as related to appropriate screening strategies. Abstract V World Congress of International Federation for Cervical Pathology and Colposcopy. Tokyo, 1984.
26. Figueora J. Caorsi I.: An ultrastructural and morphometric study of Langerhans' cells in normal human ectocervix. *J. Anat.*, 1981, 131, 669-682.
27. Garzetti G.G., Ciavatti A., Romanini C., Goteri G. et al.: Interferon alpha 2b treatment of cervical intraepithelial neoplasia grade 2: modulation of natural killer cell. *Gynecologic and Obstetrics Investigation*, 1994, 37(3):204-209.
28. Gemingnani M., Maiman M., Fruchter R.G., Arrasita C.D., Gibbon D., Ellison T.: CD4 lymphocytes in women with invasive and pinvasive cervical neoplasia. *Gynecol. Oncol.*, 1995, 59, 364-369.
29. Gissmann L.: Human papillomavirus and cervical cancer: molecular biology and possible mechanisms in cell transformation. VI World Congress of Cervical Pathology and Colposcopy, Sao Paulo, 1987, 13.
30. Gonzales-Sanchez J.L., Martinez-Chequer J.C., Hernandez-Celaya M.E. et al.: Randomized placebo - controlled evaluation of intramuscular interferon beta treatment of recurrent human papillomavirus. *Obstetrics and Gynecology*, 2001, 97(4):621-624.
31. Grubb G. S. Humanpapillomavirus and neoplasia. *Epidemiological consideration. Int. Epidemiol.*, 1986, 15, 1.
32. Guerrero E., Shah K.V.: Polymerase chain reaction in HPV diagnosis. In: Lacey C. *Papillomavirus reviews: current research on papillomaviruses*. Leeds, Leeds University Press, 1996, 175-180.

33. Hajto T., Lanzrein C.: Natural killer and antibody - dependent cell- mediated cytotoxicity activates and large granular lymphocyte frequencies in *Viscum album* – treated breast cancer patients. *Oncology*, 1986, 43:93-97.
34. Harris R.W.C., Brinton L.A., Cowdell R.H., Skegg D.C.G., Vassey M.P., Doll R.: Characteristics of women with dysplasia or carcinoma in situ of the cervix uteri. *Br. J. Cancer*, 1980, 42, 359.
35. Hellberg D., Nilsson S., Haley N. J., Hoffman D., Wynder E.: Smoking and cervical intraepithelial neoplasia: Nicotine and cotinine in serum and cervical mucus in smokers and nonsmokers. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1988, 158, 910.
36. Hilders C.G.J.M., Houbiers J.G.A., Ravenswaay Claasen van H.H., Velhuizen R.W., Fleuren G.J.: The association between HLA- expression and infiltration of immune cells in cervical carcinoma. *Lab. Invest.*, 1993, 69, 651-659.
37. Katesmark M., Coulter-Smith S., Reynolds K., Lawton F. A pilot study of the efficacy and tolerability of intralesional recombinant human beta - interferons in cervical intraepithelial neoplasia. *Annals of the Academy of Medicine, Singapore*; 1999, 28(6):775-777.
38. Kesic V., Sulovic V., Bujko M i wsp. T lymphocytes in non-malignant, premalignant and malignant changes of the cervix. *Eur. J. Gynec. Oncol.*, 1990, 11, 191-194.
39. Khare S., Tang S.C., Pater M.M., et al.: Cofactors with HPV in infection and oncogenesis. W: Lacey C, ed. *Papillomavirus review: current research on papillomaviruses*. Leeds, Leeds University Press, 1996, 239-246.
40. Kiviat N.: Natural history of cervical neoplasia. Overview and update. *American Journal of Obsetetrics and Gynecology*, 1996, 175(4), 1099-1104.

41. Klimek R.: Rak – przyczyna, uwarunkowania, samoobrona. PZWN, Warszawa, 1985.
42. Krupiński L.: Własna modyfikacja metody Papanicolaou. Przegl. Metod., Akademia Medyczna, Kraków, 1967.
43. Kurman R.J., Schiffman M.H., Lancaster W.D., et al.: Analysis of individual papillomavirus types in cervical neoplasia: A possible role for type 18 in rapid progression. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1988, 159:293-296.
44. Kuttan G., Vasudevan D.M., Kuttan R.: Isolation and identification of a tumour reducing component from mistletoe extract (Iscaador). *Cancer Let.*, 1988, 41:307-314.
45. Lorincz A.T., Reid R., Jenson A.B., et al.: Human papillomavirus infection of the cervix: Relative risk association of 15 common anogenital types. *Obstet. Gynecol.*, 1992, 79:328-337.
46. Luesley D., Blomfield P., Dunn J., et al.: Cigarette smoking and histological outcome in women with mildly dyskariotic cervical smears. *Br. J. Obstet. Gynecol.*, 1994, 101:49-52.
47. Madej J.: Kolposkopia. PZWL, Warszawa, 1982.
48. Majewski S.: Perspektywy zapobiegania i leczenia nowotworów indukowanych przez wirusy onkogenne. *Klinika*, 1995, 3, 63-66.
49. Malejczyk J., Malejczyk M., Urbański A. i wsp.: Constitutive release of IL-6 by human papillomavirus type 16 (HPV 16) harboring keratinocytes: A mechanism augmenting the NK-cell-mediated lysis of HPV-bearing neoplastic cells. *Cell Immunol.*, 1991, 136, 155-164.

50. Mannel DN, Becker H, Gundt A, Kist A, Franz H. Induction of tumor necrosis factor expression by lectin from *Viscum album*. *Cancer Immunol. Immunother.*, 1991, 33:177-182.
51. McArdle J.P., Muller H.K.: Quantitative assessment of Langerhans' cells in human intraepithelial neoplasia and wart virus infection. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1986, 154, 509-515.
52. McGhee J.R., Strober W., Fujihashi K., Kiyono H.: T cell and cytokine regulation of mucosal antibody responses with emphasis on intraepithelial lymphocytes helper functions. *W: Advances in host defence mechanisms*. Red-Gallin J.I., Fauci A.S., Raven Press, New York, 1994.
53. Mojana G., Carinelli S, Borroni R., Buonaguidi A., Luzzu A., Milesi M. The diagnosis and therapy of HPV- associated genital lesions: the role of systemic beta- interferon treatment. *Minerva Ginecologica*, 1995, 47(1-2):31-37.
54. Morelli A.E., Sananes C., DiPaola G., Parede A., Fainboim L.: Relationship between types of human papillomavirus and Langerhans' cells in cervical condyloma and intraepithelial neoplasia. *Am. J. Clin. Pathol.*, 1993, 99, 200-206.
55. Morris H.H.B., Gatter K.C., Sykes G., Casemore V., Mason D.Y.: Langerhans' cells in human cervical epithelium: effects of wart virus infection and intraepithelial neoplasia. *Br. J. Obstet. Gynecol.* 1983;90, 412-420.
56. Mossman T.R., Coffman R.L.: Th1 and Th2 cells: different pattern of cytokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.*, 1989, 7, 145-173.

57. Munoz N, Bosch FX. Current views on the epidemiology of HPV and cervical cancer. W: Lacey C. Papillomavirus reviews: current research on papillomaviruses. Leeds, Leeds University Press, 1996:227-237.
58. Munoz N., Bosch X., Kalder J. M.: Does human papillomavirus cause cervical cancer? The state of the epidemiological evidence. *British J. Cancer*, 1998, 57, 1-5.
59. Nelson J.H. jr., Averette H.E., Richart R.M.: Dysplasia, carcinoma in situ, and early invasive cervical carcinoma. *Am. Cancer Soc.*, 1986, 30, 603.
60. Nickloff B.J., Mitra R.S., Green J., Zheng X-G, Shmizu Y., Thompson C.: Accessory cell function of keratinocytes for superantigens. 1993, 150, 2148-2159.
61. Ostor A.G.: Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: A critical review. *Int. J. Gynecol. Pathol.*, 1993, 12:186-192.
62. Penna C., Fallani M.G., Gordigiani R., Sonni L., Taddei G.L., Marchionni M.: Intralesional beta- interferon treatment of cervical intraepithelial neoplasia associated with human papillomavirus infection. *Tumori*. 1994, 80(2):146-150.
63. Reid R. Stanhope C.R., Herschman B.R., Booth E., Phibbs G.D., Smith J. P.: Genital warts and cervical cancer. I. Evidence of an association between subclinical papillomavirus infection and cervical malignancie. *Cancer*, 1982, 50, 377.
64. Reid R., Crum C.H.P, Herschman B.R., Fu Y.S., Braun L., Shah K.V., Argonow S.J., Stanhope R.: Genital warts and cervical cancer. III. Subclinical papillomavirus infection and cervical neoplasia are linked by a spectrum of continuous morphologic and biologic change. *Cancer*, 1984, 53, 943.

65. Reid R., Crum C.H.P., Herschman B.R., Fu Y.S., Braun L., Shah K.V., Argonow S.J., Stanhope R.: Genital warts and cervical cancer. V. The tissue basis of colposcopic change. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1984, 149, 293.
66. Richart R.: HPV meeting summary. Third International conference on Human Papillomavirus and Squamous Carcinoma. Chicago, 1988, Focus on Human Papillomavirus. 1989, 1, 6.
67. Richart R.M.: Influence of diagnostic and therapeutic procedures on the distribution of cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer*, 1966, 19, 1635-39.
68. Richart R.M.: Natural history of cervical neoplasia. *Clin. Obstet. Gynecol.*, 1968, 10:748-784.
69. Roitt I., Brostoff J., Male D.: *Immunologia*. PZWL, WM Słotwinski Verlag Warszawa, 1998, wydanie drugie.
70. Rytwiński K., Cofalik A.: Ocena zależności pomiędzy wybranymi parametrami immunologicznymi i leukocytozą a rokowaniem w raku szyjki macicy I i III stopnia w ponad 2- letniej obserwacji. *Nowotwory*, 1984, 34, 297-304.
71. Sandor M., Gajewski T., Thorson J., Kemp J.D., Fitch F.W., Hoover G.: CD4+ murine T cell clones that express high level of immunoglobulin binding belong to the interleukin 4- producing T helper cell type 2 subset. *J. Exp. Med.*, 1990, 171, 2171-2176.
72. Sasson I.M., Haley N.J., Hoffmann D., et al.: Cigarette smoking and neoplasia of the uterine cervix: smoke continues in cervical mucus. *N. Engl. J. Med.*, 1985, 312-315.
73. Schiffman M.H., Bauer H.M., Hoover R.N., et al.: Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *J. Nat. Cancer Inst.*, 1993, 85:958-964.

74. Schiffman M.H., Bauer H.M., Lorincz A.T., et al.: Comparison of Southern blot hybridisation and polymerase chain reaction methods for the detection of human papillomavirus DNA. *J. Clin. Microbiol.*, 1991, 29:573-577.
75. Selvaggi L., Vicino M., Loverro G. i wsp.: Lymphocyte subpopulation in patients with cervical cancer. *Eur. J. Gynecol. Oncol.*, 1994, 15, 46-49.
76. Sikorski M.: *Human Papillomavirus w ginekologii*. Alfa Medica Press, 1998.
77. Smith G.L., Goldberg C.D., Runnowicz H.O.: Cigarette Smoking and Cervical Cancer. *The Female Patients*, 1993, 3, 28-32.
78. Staffl A.: Cervicography screening. Abstracts V World Congress International Federation for Cervical Pathology and Colposcopy. Tokyo, 1984.
79. Stern P.L., Duggan-Keen M.: MHC expression in the natural history of cervical cancer. W: *Human papillomavirus and cervical cancer - biology and immunology*. Redc: Stern P.L., Stanley M.A., 1994, Oxford University Press, Oxford.
80. Stirpe F., Sandvig K., Olsens S., Pihl A.: Action of viscumin, a toxic lectin from mistletoe, on cells in culture. *J. Biol. Chem.*, 1982, 257(22):13271-13277.
81. Swan S.H., Pettiti D.B.: A review of problems of bias and confounding in epidemiologic studies of cervical neoplasia and oral contraceptive use. *Am. J. Epidemiol.*, 1982, 115, 10.
82. Syrjanen K.: Condylomatous lesions in dysplastic and neoplastic epithelium of the uterine cervix. *Surg. Gynecol. Obstet.*, 1980, 150.
83. Syrjanen K.: Natural history of low grade SIL lesions. *EUROGIN 1994: Expert Consensus Conference*, 10-17.
84. Syrjanen K.: Pathogenesis of HPV infection. W: *Cervical Pathology and Colposcopy*. 9th World Congress (red. Chanen W., Atkinson K.) Nonduzzi Ed. *Inter. Proc. Di Bologna*, 1996, 205-215.

85. Szkoda T.M., Liwińska B., Kantach M.: Ludzkie wirusy Papilloma. Budowa, patogeneza, diagnostyka. *Post. Mikrobiol.*, 1995, 34, 187-191.
86. Tamaki K., Stingl G., Katz S.: The origin of Langerhans' cells. *J. Invest. Dermatol.*, 1980, 74, 309-311.
87. Tay S.K., Jenkins D., Maddox P., Campion M., Singer A.: Subpopulation of Langerhans' cells in cervical neoplasia. *Br. J. Obstet. Gynecol.*, 1987, 94, 10-15.
88. The 1988 Bethesda system for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses. *JAMA*, 1989, 262, 913-914.
89. Timoshenko A.V., Gabius H.J.: Efficient induction of superoxide release from human neutrophils by the galactoside- specific lectin from *Viscum album*. *Biol. Chem. Hoppe Seyler*, 1993, 374:237-243.
90. Van den Brule A.J.C., Snijders P.J.F., Meijer C.J.L.M., et al.: PCR based detection of genital HPV genotypes: an update and future perspectives. In: Lacey C. *Papillomavirus reviews: current research on papillomaviruses*. Leeds, Leeds University Press, 1996:181-188.
91. Vayrnen M., Syrjanen K., Castren O., Saarikoski S.: Immunophenotypes of lymphocytes in prospectively followed-up human papillomavirus lesions of the cervix. *Genitourin. Med.*, 1985, 61, 190-196.
92. Walzel H., Jonas L., Rosin T., Brock J.: Relationship between internalization kinetics and cytotoxicity of mistletoe lectin 1 to L1210 leukaemia cells. *Folia Biol.*, Praha, 1990, 36:181-188.

93. Warwick A.P., Redman C.W.E., Jones P.W., et al.: Progression of cervical intraepithelial neoplasia to cervical cancer: interactions of cytochrome P450 CYP2D6 EM and glutathione S-transferase GSTM1 null genotypes and cigarette smoking. Br. J. Cancer, 1994, 70:704-708.
94. Zur Hausen H.: Human Pathogene Papillomaviruses. Springer Verlag. New York, 1994, 1, 1-288.

