



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ**

**ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΠΡΩΚΤΙΚΩΝ ΕΠΙΧΡΙΣΜΑΤΩΝ ΜΕ ΤΗ  
ΧΡΗΣΗ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ ΣΕ ΓΥΝΑΙΚΕΣ ΜΕ ΗΡV  
ΛΟΙΜΩΞΗ ΤΡΑΧΗΛΟΥ ΜΗΤΡΑΣ**

**ΒΑΛΑΡΗ ΟΛΓΑ  
ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2013**





**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ**

**ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΠΡΩΚΤΙΚΩΝ ΕΠΙΧΡΙΣΜΑΤΩΝ ΜΕ ΤΗ  
ΧΡΗΣΗ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ ΣΕ ΓΥΝΑΙΚΕΣ ΜΕ ΗΡV  
ΛΟΙΜΩΞΗ ΤΡΑΧΗΛΟΥ ΜΗΤΡΑΣ**

**ΒΑΛΑΡΗ ΟΛΓΑ  
ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2013**



Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα. Ν5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2  
(Νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)



Στην κόρη μου Αλίκη-Αικατερίνη  
στη θεία μου Ειρήνη Βρεττού  
και στους γονείς μου





## Πρόλογος

Το 1943 ο Γεώργιος Παπανικολάου μετά του καθηγητή γυναικολογίας Έρμπερτ Τράουστ ανακοίνωσε τη μονογραφία υπό τον τίτλο «*Διάγνωση του καρκίνου της μήτρας μέσω των κολπικών επιχρισμάτων*» (*Diagnosis of Uterine Cancer by the Vaginal Smear*). Η δημοσίευση της εργασίας αυτής ήταν επόμενο να κεντρίσει το παγκόσμιο ιατρικό ενδιαφέρον και να προκαλέσει την άμεση δοκιμαστική χρησιμοποίηση της μεθόδου σε διάφορα νοσοκομεία.

Από τότε και μέχρι της ημέρας μας πολλοί ερευνητές παγκοσμίως μελέτησαν τις αλλοιώσεις του κατώτερου γεννητικού συστήματος τα αίτια που τις προκαλούν και φυσικά τον καρκίνο τραχήλου μήτρας.

Η συγκεκριμένη έρευνα που αποτελεί την διδακτορική μου διατριβή πηγαινει ένα βήμα παραπάνω και ασχολείται με τη μελέτη πρωκτικών επιχρισμάτων με την χρήση μοριακών δεικτών σε γυναίκες με HPV λοίμωξη τραχήλου μήτρας.

Το θέμα της διατριβής ήταν αποκλειστική ιδέα του κ. Γεωργίου Κολιόπουλου Λέκτορα Μαιευτικής Γυναικολογίας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Αν και λόγω της μετακίνησης του δεν αποτελεί πλέον μέλος της τριμελούς επιτροπής μου θέλω να τον ευχαριστήσω για την τόσο προοδευτική ιδέα της έρευνάς μου, για τις γνώσεις που μου μετέδωσε και για τη συμπαράστασή του για την ολοκλήρωση της μελέτης.

Επίσης ευχαριστώ θερμά τον καθηγητή μου κ. Ευάγγελο Παρασκευαΐδη που από την πρώτη ημέρα συνεργασίας μας με συμπεριέλαβε στην επιστημονική του ομάδα με πολύ αγάπη, για την υπομονή του και επιμονή του στην εκπαίδευσή μου. Ευχαριστώ από καρδιάς τον καθηγητή κ. Μηνά Πασχόπουλο Μηνά που το χαμογελό του και τα τόσα καλά του λόγια αποτέλεσαν για μένα τα πιο δυνατά όπλα για να έχω θάρρος να μην απογοητεύομαι και να αντιμετωπίζω τις όποιες δυσκολίες εμφανίστηκαν τα τρία αυτά χρόνια έως ότου ολοκληρώσω την διατριβή. Αισθάνομαι υποχρεωμένη στον καθηγητή κ. Πέτρο Καρακίτσο. Από την αρχή αυτής της έρευνας με φιλοξένησε στο εργαστήριό του στο Αττικό Νοσοκομείο και φρόντισε για την εκπαίδευσή μου πάνω στις μοριακές τεχνικές. Θέλω να τον συγχαρώ για το άψογο επιστημονικό προσωπικό του εργαστηρίου του και για την προθυμία χωρίς κανένα προσωπικό τους όφελος.

Την διατριβή μου θέλω να την αφιερώσω σε τρία αγαπημένα μου πρόσωπα. Το πρώτο είναι η κόρη μου Αλίκη -Αικατερίνη, που έκλεψε αρκετό από το προσωπικό

μας χρόνο μα με μόνο σκοπό την εκπόνηση αυτού του έργου. Το δεύτερο είναι η εκλειπούσα θεία μου Ειρήνη Βρεττού η οποία πίστευε τόσο πολύ σε εμένα και μου έδινε δύναμη να συνεχίζω τον αγώνα της ζωής με αξιοπρέπεια. Και τέλος στους γονείς μου που αποτελούν την ασπίδα μου και μέχρι σήμερα είναι πάντα δίπλα μου.

Όπως είπε και ο αρχαίος ημών φιλόσοφος Αριστοτέλης «Ο κατασκευαστής δεν μπορεί να είναι ούτε ο μόνος, ούτε ο καλύτερος κριτής του έργου του.» Γι' αυτό σας παραθέτω με ταπεινότητα το ερευνητικό μου αυτό έργο, ευελπιστώ να το βρείτε επιστημονικά ενδιαφέρον και να το αγαπήσετε όσο εγώ.

Με εκτίμηση

Όλγα.Π. Βαλάρη

BSc Βιοχημικός, MSc in Applied Microbiology

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Πρόλογος	9
 <b>ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	
Εισαγωγή	13
Στοιχεία Ανατομίας	14
Το γυναικείο γεννητικό σύστημα	14
Το Πρωκτικό κανάλι	15
Ιός των ανθρωπίνων θηλωμάτων HPV	16
Δομή του HPV	17
Περιγραφή γονιδιώματος	17
Ταξινόμηση του HPV	18
Πολλαπλασιασμός HPV ιών	20
Βιολογική σημασία της HPV λοίμωξης	21
Μέθοδοι ανίχνευσης του HPV	22
Μέθοδοι που βασίζονται στον υβριδισμό	22
Κυτταρομετρία ροής	23
Μέθοδοι που βασίζονται στην ενίσχυση νουκλεϊκών οξέων	23
Τεχνικές PCR με υβριδισμό	23
Τεχνικές ανοσοκυτταροχημείας και ανοσοϊστοχημείας	24
Κλινική σημασία της HPV λοίμωξης στο γεννητικό σύστημα	24
Η κλινική σημασία της HPV λοίμωξης του πρωκτού	27

<b>ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	<b>35</b>
Σκοπός	35
Υλικό και μέθοδοι	36
Αποτελέσματα	45
Συζήτηση	52
Συμπεράσματα	58
Περίληψη στα Ελληνικά	59
Περίληψη στα Αγγλικά	61
Βιβλιογραφία	63

## ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### Εισαγωγή

Η Γυναικολογία- Μαιευτική αποτελεί ένα από τους πιο αξιόλογους τομείς της Ιατρικής, η μελέτη και η εξέλιξη της ξεκινάει από την Αρχαία Ελληνική ιστορία. Κατά την Κλασική περίοδο ο Ιπποκράτης επινοώντας διάφορες μαιευτικές, χειρουργικές επεμβάσεις ανέτρεψε τα μέχρι τότε δεδομένα και έφερε την επιστημονική επανάσταση στον τομέα της Μαιευτικής-Γυναικολογίας. Ο μεταγενέστερος Αριστοτέλης αποτέλεσε τον κυριότερο εκπρόσωπο της μετά-ιπποκρατικής περιόδου ασχολήθηκε ιδιαίτερα με την ανατομία του γυναικείου γεννητικού συστήματος και θέσπισε την αμφίχειρη εξέταση. Το αποκορύφωμα της Μαιευτικής-Γυναικολογίας σημειώνεται κατά την Ελληνορωμαϊκή περίοδο όπου το γυναικολογικό κολποσκόπιο χρησιμοποιείται ευρέως, προτείνεται η αντισύλληψη με απόφραξη του στομίου της μήτρας με βαμβάκι εμποτισμένο με αλοιφές ενώ οι παθήσεις της μήτρας θεραπεύονται με έγχυση τοπικών ουσιών με την χρήση ειδικής σύριγγας. Με αφετηρία λοιπόν την Αρχαία Ελλάδα η Μαιευτική και Γυναικολογία εξελίχθηκε σταδιακά μέσα από τους αιώνες δίνοντας πάντοτε έμφαση στην γυναικεία ύπαρξη.

## 1. Στοιχεία Ανατομίας

### 1.1 Το γυναικείο γεννητικό σύστημα

Το γυναικείο γεννητικό σύστημα αποτελείται από την πυελική κοιλότητα τα έξω γεννητικά όργανα και τα έσω . Πυελική κοιλότητα ονομάζεται ο χώρος που περιβάλλεται από την οστέινη πύελο της γυναίκας και το ιερό οστό και την απόληξη αυτού του κόκκυγα στο πίσω μέρος. Ανάλογα με την θέση τους τα γυναικεία γεννητικά όργανα διακρίνονται σε εξωτερικά και εσωτερικά. Τα έξω γεννητικά όργανα περιλαμβάνουν το εφήβαιο, μικρά και μεγάλα χείλη, τον πρόδρομο του κόλπου και τον παρθενικό υμένα. Τα έσω γεννητικά όργανα βρίσκονται μέσα στην ελάσσονα πύελο και περιλαμβάνουν τον κόλπο, την μήτρα τις σάλπιγγες και τις ωοθήκες. Η μήτρα είναι κοίλο μυώδες όργανο και σκοπός του είναι η υποδοχή εμφύτευση και ανάπτυξη του γονιμοποιημένου σπέρματος. Διακρίνεται ανατομικά σε τρία μέρη τον πυθμένα το σώμα και τον τράχηλο.

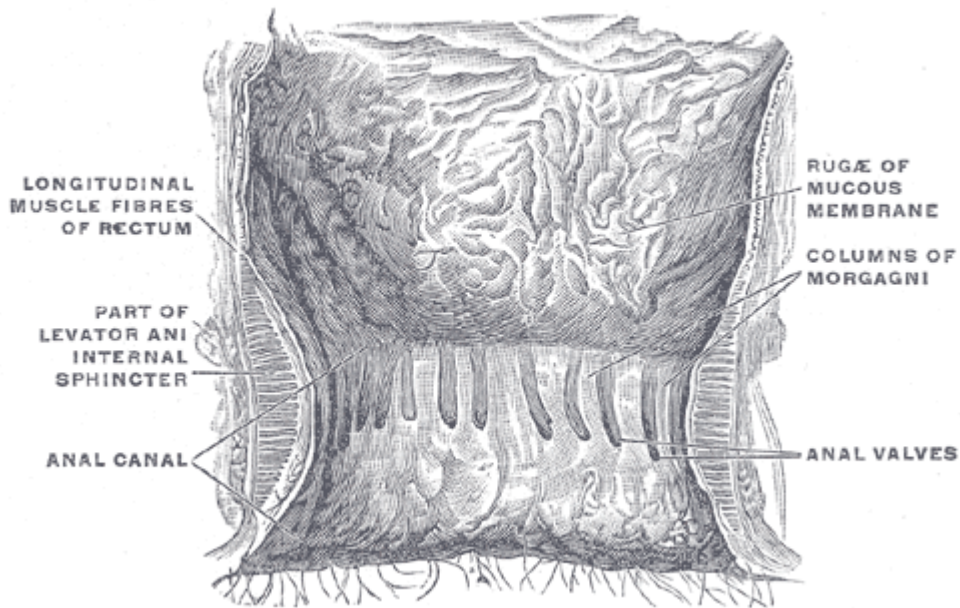
Ο τράχηλος είναι το κατώτερο μέρος της μήτρας έχει μήκος 2.5 εκ περίπου και στην ώριμη γυναίκα αποτελεί το 1/3 του συνολικού μήκους του οργάνου. Το σχήμα του τραχήλου είναι κυλινδρικό και διαιρείται σε 2 μοίρες. Την υπερκολεϊκή μοίρα η οποία μέσω του έσω στομίου της μήτρας επικοινωνεί με το σώμα και η ενδοκολεϊκή μοίρα η οποία μέσω του έξω στομίου επικοινωνεί με τον κόλπο. Η εξωτερική επιφάνεια του ενδοκολπικού τμήματος του τραχήλου καλύπτεται από πλακώδες επιθήλιο ενώ ο ενδοτράχηλος επενδύεται από κυλινδρικό. Η περιοχή του τραχηλικού βλεννογόνου όπου το πλακώδες επιθήλιο εναλλάσσεται με το κυλινδρικό ονομάζεται ζώνη μετάπλασης [1,2]

## *1.2 Το Πρωκτικό κανάλι*

Το πρωκτικό κανάλι είναι το τελικό τμήμα του γαστρεντερικού συστήματος το οποίο βρίσκεται ανάμεσα στον πρωκτό στο περίνεο προς τα κάτω και το ορθό προς τα πάνω. Έχει κατεύθυνση προς τα κάτω και πίσω, γι' αυτό και κατά την εισαγωγή του πρωκτοσκοπίου το όργανο πρέπει να έχει κατεύθυνση προς τον ομφαλό.

Το πρωκτικό κανάλι είναι εντελώς εξωπεριτοναϊκό. Το μήκος του είναι 3-5 εκατοστά.. Το πρωκτικό επιθήλιο στο κατώτερο 1/3 είναι πολύστοιβο πλακώδες. Κερατινοποιημένο είναι μόνο το κατώτερο τμήμα αυτού (κάτω από τη λευκή γραμμή του Hilton), ενώ ιδρωτοποιούς και σμηγματογόνους αδένες και θυλάκους τριχών φέρει μόνο εκτός του πρωκτικού ανοίγματος. Στα ανώτερα 2/3 του πρωκτικού καναλιού το επιθήλιο είναι αδενικό μονόστοιβο κυλινδρικό. Στο κυλινδρικό επιθήλιο παρατηρούνται οι 5-10 επιμήκεις πτυχές, οι πρωκτικές κολώνες που καταλήγουν στις πρωκτικές βαλβίδες προς τα κάτω. Το πλακώδες χωρίζεται από το κυλινδρικό επιθήλιο με την οδοντωτή γραμμή. Το πρωκτικό κανάλι για 1-2 εκατοστά άνωθεν της οδοντωτής γραμμής λέγεται ζώνη μετάπλασης όπου κατ' αντιστοιχία με τη ζώνη μετάπλασης του τραχήλου της μήτρας παρατηρείται μετάπλαση του αδενικού επιθηλίου σε πλακώδες και θεωρείται η πλέον ευάλωτη περιοχή του πρωκτικού καναλιού στην καρκινογόνο δράση του HPV [1,2].

### Εικόνα 1. Το Πρωκτικό κανάλι



### 2. Ιος των ανθρωπίνων θηλωμάτων (HPV)

Ο ιός του θηλώματος (Papilloma) ανήκει στην οικογένεια Papovaviridae. Εδώ και περίπου έναν αιώνα έχουν ξεκινήσει οι μελέτες για τους papilloma ιούς.

Πιθανολογείται ότι η πρώτη μελέτη πραγματοποιήθηκε το 1896 στην Αγγλία η οποία αναφέρει ύπαρξη HPV στις μυρμηγκιές των σκύλων. Μία πιο σημαντική ανακάλυψη για τον HPV που απέδειξε την συσχέτιση του με την δημιουργία καρκινικών αλλοιώσεων πραγματοποιήθηκε το 1930 και 1934 από τους Shope και Rous αντίστοιχα. Κατ' αρχάς η επιτυχής μετάδοση σε κουνέλια από το Shope έδωσε στον μεταγενέστερο Rous την δυνατότητα να αποδείξει ότι μερικές από τις κονδυλωματώδεις βλάβες των κονίκλων εξαλλάσσονται σε επιθηλιακά καρκινώματα.

Την δεκαετία του 1970 ο Γερμανός ιολόγος Harald zur Hausen και η ομάδα του ανακάλυψαν και παρουσίασαν με μελέτες την ετερογένεια της οικογένειας HPV (100



διαφορετικά στελέχη) καθώς και την πιθανή συσχέτιση του ιού με τα επιθηλιακά καρκινώματα, χρησιμοποιώντας την τεχνική του υβριδισμού [3].

Το 1980 και για όλη την δεκαετία η έρευνα για τον ιό HPV εντατικοποιήθηκε. Το 1980-82 απομονώθηκαν 2 νέοι τύποι HPV από θηλώματα του γεννητικού συστήματος ο HPV 6 και 11, ενώ από βιοψίες καρκίνου τραχήλου της μήτρας απομονώθηκαν οι τύποι 16 και 18. Το 1990 ο ιός ενοχοποιείται ως το κυριότερο αίτιο για την δημιουργία προκαρκινικών και καρκινικών αλλοιώσεων στον τράχηλο της μήτρας [4]. Οι μελέτες των προηγούμενων ετών βοήθησαν την παρασκευή εμβολίων ώστε σήμερα να είναι δυνατή η αποτελεσματική πρόληψη και η αντιμετώπιση ενδοεπιθηλιακών αλλοιώσεων και του καρκίνου τραχήλου μήτρας.

### *2.1 Δομή του HPV*

Ο ιός των ανθρωπίνων θηλωμάτων έχει μέγεθος 52-55nm, είναι επομένως ένας μικρός σε μέγεθος ιός. Αποτελείται από κλειστό κυκλικό δίκλωνο DNA το οποίο περιβάλλεται από κυβοειδές εικοσαεδρικό πρωτεϊνικό καψίδιο των 72 καψομεριδίων. Το ιικό DNA είναι συνδεδεμένο με ιστόνες κυτταρικής προέλευσης και έχει τη μορφή μικρού χρωμοσώματος όπως συμβαίνει και στα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας των ιών Papovα. Το συνολικό μέγεθος του HPV γονιδιώματος αποτελείται από 8.000 ζεύγη βάσεων (λόγος G/C περίπου 42%) και μοριακό βάρος 5.2. 106 daltons . Ως ιός στερείται κυτταρικής μεμβράνης και αυτό τον κάνει ανθεκτικό σε υψηλές, χαμηλές θερμοκρασίες καθώς και σε λιποδιαλυτικές ουσίες.

### *2.2 Περιγραφή γονιδιώματος*

Όπως έχει ήδη αναφερθεί το ιικό γονιδίωμα αποτελείται από δίκλωνο κυκλικό μόριο DNA. Οι γονιδιακές περιοχές που κωδικοποιούνται και εκφράζονται σε πρωτείνες

(ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης) παρουσιάζονται στην μια από τις δυο αλυσίδες του DNA του ιού. Επομένως η συμπληρωματική αλυσίδα δεν περιλαμβάνει ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης ή οι εκεί γονιδιακές περιοχές κωδικοποιούν βραχέα τμήματα. Λειτουργικά το ιικό γονιδίωμα διαιρείται σε τρεις ακόλουθες περιοχές:

**Πρώιμη περιοχή:** Early (E) phase 4,5 kb περιλαμβάνει 8 γονίδια E1-E8. Τα γονίδια αυτά εκφράζονται αμέσως μετά την είσοδο του HPV στο κύτταρο ξενιστή και κωδικοποιούν πρωτείνες υπεύθυνες για την αντιγραφή του ιού και την εξαλλαγή των κυττάρων.

**Όψιμη περιοχή:** Late (L) phase 2,5kb περιλαμβάνει 2 γονίδια L1 και L2. Είναι υπεύθυνα για την κωδικοποίηση δομικών πρωτεϊνών που

Μη κωδική ρυθμιστική περιοχή: Upstream Reading Regulator (URR) ρυθμίζει την αντιγραφή και μεταγραφή του DNA [5].

### 2.3 Ταξινόμηση του HPV

Σε συνέδριο που πραγματοποιήθηκε στην Alabama της Αμερικής το 1978 ορίστηκε η ονοματολογία του HPV ιού. Εκεί τέθηκαν κανόνες σύμφωνα με τους οποίους κάθε καινούργιος ιικός τύπος θα διέφερε από τους ήδη αναγνωρισμένους κατά περισσότερο από 50%. Αργότερα το 1995 σε συνέδριο στον Καναδά καθορίστηκε ότι για τον προσδιορισμό κάθε καινούργιου ιού θα πρέπει να υπάρχει διαφορά στο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης L1 πάνω από 10% σε σχέση με τους προϋπάρχοντες. Για την ταυτοποίησή τους έχουν χρησιμοποιηθεί ιδιαίτερα ευαίσθητες μοριακές τεχνικές χαρακτηριστική μεταξύ αυτών η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR).

Οι HPV ιοί παρουσιάζουν εξειδικευμένο επιθηλιοτροπισμό δηλαδή προσβάλλουν επιθήλια ορισμένων περιοχών του ανθρώπινου σώματος όπως του κατώτερου

γεννητικού συστήματος, της ουρήθρας, του δέρματος, της ρινικής και παραρινικής κοιλότητας, του στόματος του οισοφάγου και του λάρυγγος. Συγκεκριμένα στις γυναίκες ο οπίσθιος θόλος του κόλπου, η ζώνη μετάπλασης του τραχήλου της μήτρας καθώς και οι παρακείμενοι ιστοί είναι οι πιο συχνές περιοχές όπου εντοπίζεται μια τέτοιου είδους βλάβη.

Οι HPV ιοί διακρίνονται σε υποομάδες βάση δύο χαρακτηριστικών: τη σύνθεση του γενετικού τους υλικού και την ικανότητα τους να προκαλούν ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία και πιθανόν ογκογόνο μετασχηματισμό.

Α. Με βάση τη σύνθεση του γενετικού υλικού οι HPV τύποι διακρίνονται σε 4 υποομάδες.

Η πρώτη ομάδα αντιπροσωπεύει τύπους HPV που προσβάλουν το κατώτερο γεννητικό σύστημα. Αντιπροσωπεύει την μεγαλύτερη ομάδα HPV μια και ανήκουν σε αυτή πάνω από 40 τύποι με κύριο τον HPV 16.

Η δεύτερη ομάδα περιλαμβάνει τύπους HPV που σχετίζονται με μυρμηκιοειδής επιδερμοδυσπλασίες. Ο πιο συνηθής τύπος είναι ο HPV 5.

Στην τρίτη ομάδα περιλαμβάνονται τύποι που προκαλούν δερματικές αλλοιώσεις. Ο HPV 4 είναι ένας από αυτούς.

Η τέταρτη και τελευταία ομάδα περιλαμβάνει διαφορετικούς τύπους της οικογένειας HPV με μικρή συγγένεια μεταξύ τους για παράδειγμα HPV 1,63,41 κ.λ.π.

B. Οι HPV γονότυποι διαφέρουν ως προς την ικανότητα να προκαλούν ογκογόνο μετασχηματισμό και με βάση αυτή την ικανότητά τους διακρίνονται σε δύο κατηγορίες:

Πρώτη κατηγορία: Περιλαμβάνει στελέχη HPV χαμηλού κινδύνου (low risk) HPV 6,11,42,43,44,54,61,62,71,72,81,83,84 και 89. Οι τύποι αυτοί ανιχνεύονται στα εξωφυτικά οξυτενή κονδυλώματα (condyloma acuminatum) σε επίπεδα κονδυλώματα (condyloma planum) και σε χαμηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις του πλακώδες επιθηλίου (LgSIL).

Δεύτερη κατηγορία: Περιλαμβάνει στελέχη HPV υψηλού κινδύνου (high risk) HPV 16,18 26,31,33,35,39,45,51,53,56,58,59,66,68,70,73,82 και 85. Οι παραπάνω τύποι ανιχνεύονται σε υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις του πλακώδους επιθηλίου και επίσης στις περισσότερες περιπτώσεις καρκίνου τραχήλου της μήτρας [6].

#### 2.4 Πολλαπλασιασμός των HPV ιών

Ο HPV είναι ένας DNA ιός. Ο πολλαπλασιασμός του λοιπόν ακολουθεί τους γενικούς κανόνες πολλαπλασιασμού όλων των DNA ιών. Γενικά ο HPV ιός προσκολλάται στο κύτταρο ξενιστή και το γενετικό του υλικό ενσωματώνεται στο γενετικό υλικό του κυττάρου ξενιστή. Το κύτταρο ξενιστής πολλαπλασιάζεται και έτσι αυξάνεται και η μιτωτική δραστηριότητα του ιού. Το γενετικό υλικό ιού ενεργοποιείται, αντιγράφεται, μεταγράφεται, μεταφράζεται και έτσι δημιουργούνται ιικές πρωτεΐνες που οδηγούν στην σύνθεση ιών στο κύτταρο ξενιστή. Οι νέοι ιοί απελευθερώνονται προκαλώντας συνήθως την καταστροφή του κυττάρου-ξενιστή. Τον κανόνα αυτό ακολουθούν οι υψηλού κινδύνου ιοί HPV (high risk). Στην περίπτωση πολλαπλασιασμού χαμηλού κινδύνου HPV ιού (low risk) το γενετικό υλικό

του ιού δεν ενσωματώνεται στο γενετικό υλικό του κυττάρου ξενιστή αλλά παραμένει ως επίσωμα. Η αντιγραφή των ιών είναι απόλυτα ταυτισμένη με τους μηχανισμούς διαφοροποίησης του κυττάρου ξενιστή ενώ οι αλλοιώσεις που προκύπτουν από την μιτωτική δραστηριότητα τους εξαρτώνται από την περιοχή του σώματος και τον τύπο του HPV.

### *2.5 Βιολογική σημασία της HPV λοίμωξης και ογκογένεση.*

Η μόλυνση του επιθηλίου από τους διάφορους τύπους HPV λοίμωξης δεν συνέπεται και απαραίτητα εκδήλωση της νόσου. Στις περισσότερες των περιπτώσεων ο ιός παραμένει ως επίσωμα που σημαίνει ότι θα περάσει αρκετά μεγάλο διάστημα μέχρι την εκδήλωση της νόσου. Είναι δυνατό βέβαια και να μην εκδηλωθεί ποτέ η νόσος. Γενικά η κλινική εκδήλωση της λοίμωξης ή όχι εξαρτάται απόλυτα από την δράση του HPV ιού και της ανοσολογικής απόκρισης του οργανισμού που έχει προσβληθεί. Ο χρόνος επώασης του ιού όσο αφορά την εκδήλωση των κονδυλωμάτων κυμαίνεται από 6 εβδομάδες έως 8 μήνες ενώ για την εκδήλωση καρκίνου απαιτούνται συνήθως πάνω από δέκα χρόνια. Στην περίπτωση που υψηλού κινδύνου HPV ιοί (ογκογόνοι) έχουν προκαλέσει την μόλυνση και οι μηχανισμοί άμυνας του οργανισμού δεν λειτουργούν τότε εμφανίζονται προκαρκινικές αλλοιώσεις. Το γενετικό υλικό του high risk HPV έχει ενσωματωθεί με το γενετικό υλικό του κυττάρου ξενιστή και παρατηρείται υπερέκφραση των γονιδίων E6 και E7 υπεύθυνα για την σύνθεση των αντίστοιχων ογκοπρωτεϊνών. Η καταστολή της λειτουργίας της p53 πρωτεΐνης από την E6 και τα σύμπλοκα που σχηματίζει η E7 με τις κυτταρικές πρωτεΐνες έχουν ως αποτέλεσμα την απορρύθμιση του κυτταρικού κύκλου [7].

### 3. Μέθοδοι ανίχνευσης του HPV

Τις τελευταίες δεκαετίες και ουσιαστικά από το 1970 έως σήμερα έχουν αναπτυχθεί πολλές μοριακές τεχνικές με σκοπό την ανίχνευση και τυποποίηση των διαφόρων τύπων του ιού HPV. Οι πιο παλιές τεχνικές βασίζονταν στον υβριδισμό, οι μεταγενέστερες στην ενίσχυση των νουκλεικών οξέων ενώ οι πιο πρόσφατες σε συνδιασμό και των δυο. Συνοπτικά αναφέρονται οι μέθοδοι ανίχνευσης ξεκινώντας από τις προγενέστερες.

#### 3.1 Μέθοδοι που βασίζονται στον υβριδισμό

**Southern blot:** Βασίζεται στον υβριδισμό. Το προς ανάλυση κυτταρικό DNA απομονώνεται είτε από βιοψία είτε από τραχηλικό επίχρισμα. Το DNA κόβεται με τη βοήθεια περιοριστικών ενζύμων σε τμήματα, διαχωρίζεται με ηλεκτροφόρηση και η υβριδοποίηση του πραγματοποιείται με ραδιενεργό ή σημασμένο ανιχνευτή.

**Dot blot:** Παρόμοια της southern blot. Η διαφορά τους βασίζεται στο ότι δεν χρησιμοποιείται ηλεκτροφόρηση και η υβριδοποίηση πραγματοποιείται με ένα μείγμα DNA ανιχνευτών.

**Υβριδισμός in situ:** Το προς μελέτη κυτταρικό επίχρισμα υφίσταται πρωτεόλυση και το DNA απομονώνεται. Ακολουθεί προσθήκη ιχνηθέτη ενώ οι αλληλουχίες του υβριδίου που προκύπτει ανιχνεύονται με τη χρήση ραδιενεργής σήμανσης.

**Hybrid capture:** Εξέλιξη της προηγούμενης μεθόδου. Το DNA που έχει απομονωθεί αποδιατάσσεται και αναμειγύεται με ιχνηθέτες RNA μονόκλωνους προερχόμενους από 18 διαφορετικούς HPV τύπους. Ο υβριδισμός που ακολουθεί έχει ως αποτέλεσμα να δημιουργηθούν τόσο DNA όσο και RNA υβρίδια. Τα υβρίδια αυτά

ακίνητοποιούνται με τη βοήθεια μονόκλωνων αντισωμάτων και η ανίχνευση γίνεται με χημειοφωταύγεια.

### *3.2. Κυτταρομετρία ροής*

Ο συνδιασμός της προσπίπτουσας ακτινοβολίας με την παραγόμενη φθορίζουσα ανιχνεύει την υπερέκφραση των γονιδίων (mRNA) E6 και E7.

### *3.3 Μέθοδοι που βασίζονται στην ενίσχυση των νουκλεϊκών οξέων*

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR: Με τη μέθοδο αυτή είναι δυνατή η παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA με τη χρήση ενός αυτόματου θερμικού κυκλοποιητή. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για 30-40 κύκλους ενώ σε κάθε κύκλο η ποσότητα του DNA διπλασιάζεται. Για την ανίχνευση του HPV DNA χρησιμοποιούνται γενικοί και ειδικοί εκκινητές. Παρόμοιες μέθοδοι είναι οι ακόλουθες: Multiplex PCR, In situ και Real Time PCR, Sequencing.

Στην κατηγορία αυτή ανήκει και η μεθοδος NASBA (Nucleic Acid Sequence based Amplification) . Βασίζεται στην PCR ωστόσο παρουσιάζουν κάποιες διαφορές. Στην NASBA είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί ως «καλούπι» RNA ενώ η δημιουργία πολλαπλών αντιγράφων πραγματοποιείται σε σταθερή θερμοκρασία.

### *3.4 Τεχνικές PCR με υβριδισμό*

Οι τεχνικές που βασίζονται στο συνδιασμό PCR με υβριδισμό κατατάσσονται στις πιο σύγχρονες και στις πιο εξελιγμένες τεχνικές ανίχνευσης και τυποποίησης του HPV ιού. PCR –ELISA, Line blot hybridization, Reverse Line Blot hybridization, hybrid Capture 3ης γενιάς και HPV DNA μικροσυστοιχίες είναι ενδεικτικές μέθοδοι που ανήκουν σε αυτή την κατηγορία. HPV DNA μικροσυστοιχίες είναι είναι μια πολύ αξιόπιστη τεχνική η ειδικότητά της ανέρχεται στο 99% και η ευαισθησία της στο

100%. Η τεχνική βασίζεται σε μια υψηλής ευαισθησίας PCR και στην τεχνολογία των μικροσυστοιχιών μικρής πυκνότητας. Η μέθοδος αυτή ανιχνεύει είτε μονές είτε πολλαπλές μολύνσεις μέχρι 35 HPV γονοτύπων.

### *3.5. Τεχνικές ανοσοκυτταροχημείας και ανοσοϊστοχημείας*

Στις τεχνικές που βασίζονται στην ανοσοκυτταροχημεία και ανοσοϊστοχημεία βασίζεται η ανίχνευση της p53-Rb και p16ink 4A [8.9].

## **4. Κλινική σημασία της HPV λοίμωξης στο γεννητικό σύστημα**

Οι βασικές κλινικές εκδηλώσεις της μόλυνσης είναι τα κονδυλώματα, οι ενδοεπιθηλιακές νεοπλασίες αιδοίου (VIN), κόλπου (VAIN) και τραχήλου (CIN) και ο καρκίνος των ιδίων περιοχών. Ωστόσο οι περισσότερες λοιμώξεις από τον HPV στο γεννητικό σύστημα είναι υποκλινικές και αυτοπεριοριζόμενες.

Τα κονδυλώματα είναι καλοήθεις εξωφυτικοί όγκοι προκαλούμενοι από μόλυνση από τον HPV συνήθεστερα τύπο χαμηλού κινδύνου (κυρίως 6 & 11). Η πιθανότητα εμφάνισης κονδυλωμάτων σε κάποιο άτομο κατά τη διάρκεια της ζωής του υπολογίζεται σε 10%. Η μετάδοση γίνεται συνήθως μέσω σεξουαλικής επαφής και η εμφάνισή των κονδυλωμάτων παρατηρείται λίγες εβδομάδες ή μήνες μετά την απόκτηση του ιού. Αποτελούν κυρίως αισθητικό πρόβλημα και σπανιότερα λειτουργικό λόγω αιμορραγίας, ενώ η εξαλλαγή τους είναι εξαιρετικά ασυνήθιστη. Ένας επιπλέον κίνδυνος είναι η πρόκληση υποτροπιάζουσας θηλωμάτωσης του λάρυγγα λόγω μετάδοσης του ιού από μητέρα με κονδυλώματα στο νεογνό κατά τη διάρκεια φυσιολογικού τοκετού. Για τους παραπάνω λόγους καθώς και για την μείωση της πιθανότητας μετάδοσης στο σύντροφο συνιστάται η θεραπεία τους. Η θεραπεία των κονδυλωμάτων μπορεί να είναι φαρμακευτική (ποδοφυλλοτοξίνη,



μικουϊμόδη κα) και χειρουργική (κρυοθεραπεία, LASER εξάχνωση κα).

Οποιοσδήποτε τρόπος και αν επιλεγθεί, οι υποτροπές είναι συχνές με αποτέλεσμα να απαιτούνται επαναλαμβανόμενες συνεδρίες. Παρόλα αυτά οι περισσότεροι ασθενείς (80%) θα απαλλαγούν από τις βλάβες τους εντός ενός έτους [10].

Οι ενδοεπιθηλιακές νεοπλασίες που προκαλούνται από τον HPV στο γεννητικό σύστημα είναι ιστολογικές μεταβολές του επιθηλίου του τραχήλου κυρίως (CIN – Cervical Intraepithelial Neoplasia) και δευτερευόντως του αιδοίου (VIN – Vulvar Intraepithelial Neoplasia) και του κόλπου (VAIN – Vaginal Intraepithelial Neoplasia). Ιστολογικά οι αλλοιώσεις χαρακτηρίζονται από διαταραχή της βαθμιαίας και ομαλής ωριμάνσεως του πλακώδους επιθηλίου και την παρουσία δυσπλαστικών κυττάρων με διαταραχές του πυρήνα (δυσκαρύωση) και του κυτταροπλάσματος. Το CIN, το οποίο αναπτύσσεται συνήθως στη ζώνη μετάπλασης συμπεριλαμβάνει το CIN 1, CIN 2 και το CIN 3. Ιστολογικά στο CIN οι διαταραχές ωριμάνσεως του επιθηλίου εντοπίζονται στο κατώτερο τριτημόριο του πάχους του, ενώ στο CIN 2 και CIN 3 οι διαταραχές παρατηρούνται στα δύο τρίτα και σε ολόκληρο το πάχος του επιθηλίου αντιστοίχως. Το CIN 3 μπορεί να εξελιχθεί σε καρκίνο με τη διάσπαση της βασικής μεμβράνης. Ωστόσο οι CIN βλάβες δεν είναι δεδομένο ότι θα εξελιχθούν προς το χειρότερο. Από μελέτες των Ostor και McIndoe γνωρίζουμε ότι το CIN1 υποστρέφει χωρίς θεραπεία στην πλειονότητα των περιπτώσεων, ενώ το CIN3 θα εξελιχθεί σε καρκίνο σε ποσοστό 15-25%. Η όλη διαδικασία της εξέλιξης από την HPV λοίμωξη μέχρι την δημιουργία του διηθητικού καρκίνου απαιτεί συνήθως 10 και παραπάνω έτη [11, 12].

Ο συνδιασμός της σωστής λήψης του test Παπανικολάου με τη κολποσκόπηση δίνει την δυνατότητα έγκαιρης διάγνωσης και αντιμετώπισης. Η εφαρμογή σπάτουλας του Ayre για την λήψη δείγματος από τον εξωτράχηλο και ψήκτρας τύπου Broom για την ταυτόχρονη λήψη δείγματος από τον εξωτράχηλο και ενδοτράχηλο αποτελούν τις πιο

αποδεκτές τεχνικές τόσο για την λήψη συμβατικού όσο και υγρής φάσης test Παπανικολάου. Η κυτταρολογική διάγνωση θα πρέπει να δίδεται βάσει του συστήματος Bethesda [13].

Οι βασικές κατηγορίες του συστήματος αυτού είναι: Αρνητικό - Negative, Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance-ASCUS, Low Grade Squamous Intraepithelial Lesion-LSIL, High Grade Squamous Intraepithelial Lesion-HSIL, Atypical Glandular Cells-ACG, Διηθητικός Καρκίνος- Invasive Carcinoma.

Η κολποσκόπηση είναι η επισκόπηση του τραχήλου υπό μεγέθυνση με το κολποσκόπιο και τη χρήση διαλύματος οξικού οξέος. Αποτελεί το επόμενο βήμα στη διαγνωστική προσέγγιση του παθολογικού test Παπανικολάου, Η αξιολόγηση των κολποσκοπικών ευρημάτων προσφέρει εικόνα για την επιθηλιακή βλάβη και σωστή επιλογή των περιοχών από τις οποίες θα παρθούν βιοψίες. Τα περισσότερα συστήματα αξιολόγησης στηρίζονται στην εκτίμηση χρώματος, των ορίων, των αγγείων και της μορφολογίας της επιφάνειας της βλάβης. Όλες αυτές οι πληροφορίες σε συνδιασμό με το test Παπανικολάου επιτρέπουν στον θεράποντα ιατρό να αξιολογήσει τον βαθμό της ιστολογικής βλάβης και να προτείνει τον καταλληλότερο τρόπο αντιμετώπισης.

Το CIN1 αντιμετωπίζεται συνήθως κατ' αρχήν συντηρητικά αφού υποστρέφει στην πλειονότητα των περιπτώσεων. Η θεραπεία του CIN2-3 συνίσταται σε καταστροφή (με LASER, διαθερμία, ψύξη) ή σε αφαίρεση της αλλοίωσης (κωνοειδής εκτομή). Στην πράξη η συνηθέστερη μέθοδος αντιμετώπισης είναι η κωνοειδής εκτομή με τη χρήση της ηλεκτροδιαθερμικής αγκύλης (Loop) [14].

Ο καρκίνος τραχήλου της μήτρας είναι το τελικό αποτέλεσμα της εξέλιξης του CIN3. Είναι ένας από τους συχνότερους γυναικολογικούς καρκίνους. Αποτελεί τη δεύτερη

αιτία θανάτου γυναικών από καρκίνο σε παγκόσμια κλίμακα και τη δεύτερη συχνότερη αιτία θανάτου σε νέες γυναίκες στο δυτικό κόσμο. Η μεγαλύτερη επίπτωση καρκίνου τραχήλου της μήτρας παρατηρείται σε ηλικίες μεταξύ 35-50 ετών. Συγκεκριμένα στις χώρες της ΕΕ καταγράφονται 34.000 νέες περιπτώσεις ετησίως και 16.000 θάνατοι [15, 16].

## **5. Η κλινική σημασία της HPV λοίμωξης του πρωκτού**

Η λοίμωξη του πρωκτού από τον HPV έχει διπλή κλινική σημασία:

Η πρώτη αφορά τις αλλοιώσεις που μπορεί να προκαλέσει ο ιός στο γεννητικό σύστημα τις οποίες μπορεί να προκαλέσει και στον πρωκτό και συγκεκριμένα τα οξυτενή κονδυλώματα, την ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία (AIN) και τον καρκίνο.

Η δεύτερη αφορά τη θεωρητική πιθανότητα να αποτελεί ο πρωκτός εστία παραμονής (reservoir) του ιού και από εκεί να προκαλεί επαναμόλυνση του τραχήλου της μήτρας μετά από θεραπεία για τραχηλική ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία (CIN) αυξάνοντας έτσι τον κίνδυνο υποτροπής.

### *5.1 AIN και καρκίνος πρωκτού*

Ο HPV ευθύνεται για το 90% των καρκίνων του πρωκτού (30.000 περιστατικά ετησίως) [15, 16]. Ο πρωκτός περιλαμβάνει ζώνη μετάπλασης παρόμοια με αυτή του τραχήλου κάνοντας το όργανο ευάλωτο στις καρκινογόνες ιδιότητες του ιού. Σε αντιστοιχία με τον τράχηλο, ο καρκίνος του πρωκτού έπεται της εμφάνισης της πρωκτικής ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας (anal intraepithelial neoplasia - AIN). Αν και τα δεδομένα για τη φυσική ιστορία του AIN είναι περιορισμένα θεωρείται ότι το AIN 1 συνήθως υποστρέφει ενώ το AIN 2-3 μπορεί να εξελιχθεί σε καρκίνο σε ένα μικρό

ποσοστό. Ο καρκίνος αυτός είναι σπάνιος αλλά η συχνότητά του αυξάνεται σε άνδρες και γυναίκες με την επίπτωσή του να έχει διπλασιαστεί από 10/1.000.000 το 1973 σε 20/1.000.000 το 2000. Η επίπτωση του καρκίνου του πρωκτού είναι ιδιαίτερα αυξημένη σε επιλεγμένες υποομάδες του πληθυσμού που συγκεντρώνουν ένα συνδυασμό παραγόντων κινδύνου (κάπνισμα, ηλικία>50, ιστορικό παθητικής πρωκτικής επαφής, ανοσοκαταστολή, HIV λοίμωξη, χρόνια φλεγμονή, ακτινοθεραπεία) [17].

Μια υποομάδα υψηλού κινδύνου αποτελούν οι HIV θετικοί ομοφυλόφιλοι άνδρες (men who have sex with men - MSM). Η επίπτωση του AIN σε αυτή την ομάδα είναι 40 φορές μεγαλύτερη αυτής του γενικού πληθυσμού. Ακόμα και οι HIV αρνητικοί MSM έχουν υψηλή επίπτωση πρωκτικών αλλοιώσεων [18,19]. Αυτός ο κίνδυνος οδήγησε στη δημιουργία κατευθυντήριων οδηγιών ελέγχου των MSM για την πρόληψη του καρκίνου του πρωκτού [20, 21].

Ωστόσο ο καρκίνος του πρωκτού δεν περιορίζεται στους MSM. Το 2010 στις ΗΠΑ καταγράφηκαν περίπου 5000 νέα περιστατικά εκ των οποίων τα περισσότερα (3000) αφορούσαν γυναίκες [22]. Επομένως ο καρκίνος του πρωκτού είναι συχνότερος στις γυναίκες από ότι στους άνδρες. Μελέτες έχουν δείξει ότι ο κίνδυνος για τις HIV θετικές γυναίκες είναι 7 φορές μεγαλύτερος από το γενικό πληθυσμό [18,19]. Έχει φανεί ότι γυναίκες με CIN έχουν αυξημένη επίπτωση AIN και 4-5 μεγαλύτερο κίνδυνο καρκίνου πρωκτού [23].

Οι αλλοιώσεις AIN σε αυτές τις γυναίκες μπορούν να ανιχνευθούν με διάφορα screening τεστ όπως η κυτταρολογία, το HPV τεστ και πιθανώς το mRNA τεστ. Το screening τεστ που χρησιμοποιείται συνήθως, κυρίως στους MSM όπου έχει επισήμως συσταθεί προληπτικός έλεγχος είναι η κυτταρολογία πρωκτού. Το

αποτέλεσμα της κυτταρολογίας πρωκτού δίδεται και αυτό με το σύστημα Bethesda όπως και η κυτταρολογία τραχήλου. Μέχρι τη δημοσίευση της δικής μας μελέτης δεν είχε εξεταστεί το HPV τεστ και το E6&7 mRNA τεστ σε πρωκτικό επίχρισμα σαν μέσο προληπτικού ελέγχου.

Ένα θετικό τεστ θα πρέπει να οδηγεί τη γυναίκα σε πρωκτοσκόπηση υψηλής ευκρίνειας (high resolution anoscopy) και βιοψία. Η high resolution anoscopy είναι η επισκόπηση του πρωκτικού σωλήνα διαμέσου πρωκτοσκοπίου υπό μεγέθυνση με το κολποσκόπιο και με εφαρμογή διαλύματος οξικού οξέος 3% όπως και στην κολποσκόπηση. Τα ευρήματα αξιολογούνται με τον ίδιο τρόπο όπως και την κολποσκόπηση. Παθολογικά ευρήματα επιβάλλουν κατευθυνόμενη βιοψία.

Αν διαγνωστεί AIN υψηλού βαθμού η ασθενής θα πρέπει να θεραπεύεται για να αποφευχθεί η ενδεχόμενη εξέλιξη της βλάβης σε καρκίνο. Η θεραπεία του AIN2-3 με φαρμακευτικές ή χειρουργικές μεθόδους. Η βασική φαρμακευτική μέθοδος είναι η τοπική εφαρμογή δι- ή τριχλωροξικού οξέος, μέθοδος η οποία ενδείκνυται για περιορισμένες βλάβες. Μεγαλύτερες βλάβες μπορούν να αντιμετωπιστούν με καταστροφικές χειρουργικές μεθόδους με κύριο εκπρόσωπο την υπερυθροπηξία (infrared coagulation –IRC), η οποία μπορεί να γίνει με τοπική αναισθησία.

Ιδιαίτερες εκτεταμένες, υποτροπιάζουσες, ή ύποπτες για διήθηση βλάβες αντιμετωπίζονται με χειρουργική αφαίρεση [10].

## 5.2 Ο πρωκτός ως *reservoir* HPV λοίμωξης

Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι μετά από κωνοειδή εκτομή μεγάλο ποσοστό των γυναικών θα είναι πλέον HPV αρνητικές όπως αυτό ορίζεται από ένα αρνητικό HPV τεστ 6-12 μήνες μετά την επέμβαση. Κάποιες από αυτές τις γυναίκες με τον καιρό θα ξαναγίνουν HPV θετικές. Αυτό μπορεί θεωρητικά τουλάχιστον να οφείλεται σε

επαναμόλυνση από σεξουαλικό σύντροφο ή επαναμόλυνση του τραχήλου από μία εξω-γεννητική δεξαμενή HPV όπως ο πρωκτός [24, 25]. Βεβαίως μπορεί απλά το αρχικό αρνητικό HPV τεστ να ήταν ψευδώς αρνητικό λόγω χαμηλού ιικού φορτίου αμέσως μετά τη θεραπεία.

Η θετικότητα στον HPV μετά την κωνοειδή εκτομή αυξάνει δραματικά τον κίνδυνο υποτροπής CIN2-3 [26-28]. Η υποτροπή CIN2-3 απαιτεί περαιτέρω θεραπεία με αυξημένη σωματική και ψυχολογική νοσηρότητα. Μία ενδεχόμενη δεύτερη κωνοειδής εκτομή μπορεί να οδηγήσει σε βράχυνση του τραχήλου και αρνητικές επιπτώσεις στην έκβαση μελλοντικών κυήσεων [29-30]. Μερικές φορές η επανάληψη της κωνοειδούς εκτομής δεν είναι τεχνικά δυνατή λόγω εξάλειψης του εξωτραχήλου οδηγώντας έτσι τις γυναίκες σε υστερεκτομία, μία επέμβαση με εμφανώς υψηλότερη νοσηρότητα.. Όχι μόνο η θεραπεία αλλά και η διάγνωση της υποτροπής μπορεί να είναι πρόκληση για τον γυναικολόγο καθώς πολλές από αυτές τις αλλοιώσεις είναι ενδοτραχηλικές και σε αυτές τις περιπτώσεις η κυτταρολογία και η κολποσκόπηση έχουν περιορισμένη ευαισθησία.

Καθώς ο HPV είναι εξαιρετικά μεταδοτικός (40% για κάθε επαφή χωρίς προφύλαξη) [31] και η αποτελεσματικότητα της φυσικής ανοσίας στην πρόληψη της επαναμόλυνσης από τον ίδιο τύπο περιορισμένη, η θεωρία της επαναμόλυνσης από κάποια εξω-γεννητική δεξαμενή όπως ο πρωκτός αποκτά μεγαλύτερη δημοτικότητα.. Μία μελέτη σε 2462 γυναίκες απέδειξε ότι η επαναμόλυνση από τον ίδιο τύπο μετά από αρχική αρνητικοποίηση είναι εφικτή και συσχετίζεται ισχυρά με την ύπαρξη καινούργιων σεξουαλικών συντρόφων [32].

Στα πλαίσια αυτής της διδακτορικής διατριβής κάναμε μία συστηματική ανασκόπηση της βιβλιογραφίας για άρθρα που εξετάζουν την πιθανότητα επαναμόλυνσης του γυναικείου γεννητικού συστήματος από εξω-γεννητικές θέσεις όπως ο πρωκτός.

Έγινε βιβλιογραφική έρευνα στο MEDLINE μέχρι το Φεβρουάριο 2012 με την ακόλουθη στρατηγική. ((Disease Reservoirs [MeSH Terms] OR reinfection [tw] OR recurrence [tw] OR “treatment failure” [tw]) AND (papillomaviridae [MeSH:NoExp] OR alphapapillomavirus [MeSH Terms] OR “DNA, viral” [MeSH Terms] OR Papillomavirus Infections [MeSH Terms] OR Tumor Virus Infections [MeSH Terms] OR “Cervix Uteri/virology” [MeSH Terms] OR “Oropharynx/virology” [MeSH Terms] OR “Anal canal/virology” [MeSH Terms] OR “Penis/virology” [MeSH Terms] OR condylomata acuminata [MeSH Terms] OR HPV [tw] OR “human papillomavirus” [tw] OR papillomaviridae [tw]) AND (anus neoplasms [MeSH Terms] OR penile diseases [MeSH Terms] OR Uterine Cervical Neoplasms [MeSH Terms] OR Uterine Cervical Dysplasia [MeSH Terms] OR Cervical Intraepithelial Neoplasia [MeSH Terms] OR ((cervix [tw] OR cervical [tw] OR vulva [tw] OR vulvar [tw] OR vagina [tw] OR vaginal [tw] OR anus [tw] OR anal [tw] OR oropharynx [tw] OR oropharyngeal [tw] OR penis [tw] OR penile [tw]) AND (cancer\* [tw] OR carcinoma OR adenocarcinoma OR neoplas\* [tw] OR dysplas\* [tw] OR dyskaryos\* [tw] OR squamous [tw] OR CIN [tw] OR VIN [tw] OR VAIN [tw] OR AIN [tw] OR PIN [tw] )))). Οι βιβλιογραφικές παραπομπές των άρθρων που αναγνωρίστηκαν εξετάστηκαν για συναφή μη αναγνωρισμένα άρθρα . Οι μελέτες που αναγνωρίστηκαν παραθέτονται στον πίνακα 1.

Πίνακας 1. Μελέτες αναφερόμενες στην παρουσία του HPV εκτός του γυναικείου γεννητικού συστήματος σε γυναίκες με τραχηλική HPV λοίμωξη ή στους συντρόφους τους (από Valari et al 2012)

**Table 1. Studies on HPV Presence at Extracervical Sites in Women with Cervical HPV Related Disease or their Partners**

Study	Site	HPV positivity rate	Type concordance to the cervix	Predictors	Population
Saini 2010	Oral cavity	5/70 (7%)	-	-	Malaysian women with cervical cancer (Mean age 55)
Peixoto 2011	Oral cavity	81/100 (81%)	-	Alcohol	Brazilian women with genital HPV lesions
Termine 2011	Oral cavity	14/98 (14.3%)	21%	None found	Italian women with genital HPV infection
Crawford 2011	Oral cavity	92/100 (92%)	88%	-	British women with abnormal cervical cytology (mean age 34)
Sanchez-Vargas 2010	Oral cavity	46/46 (100%)	-	Oral sex	Women with CIN in Mexico
Schneider A 1988	Penis	61/156 (39%)	87%	-	Partners of women with cervical HPV infection in Germany
Bleeker MC 2002	Penis	103/175 (59%)	-	-	Partners of women with CIN in the Netherlands
Rombaldi RL 2006	Penis	54/99 (54%)	-	Increased number of sexual partners	Partners of women with CIN in Brazil
Nicolaou SM 2005	Penis	38/50 (76%) (30/50 high risk types)	-	-	Partners of HPV infected women in Brazil
Bar-Am A 2007	Penis	13/74 (18%)	-	-	Partners of women with CIN3 in Israel
Benevolo 2008	Penis	27/77 (35%)	43%	-	Partners of women with CIN or HPV infection in Italy
Strand A 1995	Penis	18/25 (72%)	44%	-	Partners of women with SIL or high risk HPV in Sweden
Golijow 2005	Penis	77/112 (69%)	-	-	Partners of HPV infected women in Argentina
Gupta A 2006	Penis	20/30 (67%)			Male partners of women with cervical cancer in India
Park 2009	Anus	47/92 (51%)		None found	Women with lower genital tract intraepithelial neoplasia or cancer in the USA
Valari O 2011	Anus	109/235 (46%)	Complete 25% Partial 49%	Positive cervical HPV test	Women with referred for colposcopy in Greece
Crawford 2011	Anus	84/93 (90%)	Partial 81/93	-	British women with abnormal cervical cytology (mean age 34)

Δεν βρέθηκαν μελέτες οι οποίες να εξετάζουν άμεσα και να αποδεικνύουν το ενδεχόμενο της τραχηλικής επαναμόλυνσης από τον πρωκτό μετά από θεραπεία ή αυτόματη τοπική κάθαρση του ιού. Έμμεσα στοιχεία παρέχονται από μία προοπτική μελέτη στην οποία βρέθηκε 8-πλάσιος κίνδυνος τραχηλικής λοίμωξης μετά την ανίχνευση HPV στον πρωκτό [33]. Ωστόσο η ίδια μελέτη υπονοεί ότι η μετάδοση από τον πρωκτό στον τράχηλο (RR 8) είναι δυσκολότερη από την αντίστροφη μετάδοση (RR 20). Το αν ο τράχηλος μπορεί να επαναμολυνθεί μετά από θεραπεία από HPV



που μολύνει την πρωκτική περιοχή, είναι ένα σημαντικό κλινικό ερώτημα που προσπαθήσαμε να απαντήσουμε στη δική μας μελέτη.

Παρά την έλλειψη άμεσων στοιχείων βρέθηκαν πολλές μελέτες που παρείχαν στοιχεία όπως ποσοστό θετικότητας, συσχέτιση τύπων και προβλεπτικούς παράγοντες για πρωκτική HPV λοίμωξη που εμμέσως θα μπορούσαν να αποσαφηνίσουν το θέμα [24, 25, 35-37].

- HPV Θετικότητα στον πρωκτό

Σε μία μελέτη που διεξήχθη σε μεγάλο δείγμα του γενικού πληθυσμού ανιχνεύθηκε πρωκτική HPV μόλυνση σε ποσοστό 27% και τραχηλική σε παρόμοιο ποσοστό (29%) [34]. Η θετικότητα στον πρωκτό στον ειδικό πληθυσμό των γυναικών που προσέρχονται στο ιατρείο κολποσκόπησης λόγω HPV αλλοιώσεων στο γεννητικό σύστημα λογικά θα πρέπει να είναι υψηλότερη.

- Συνάφεια τύπων με τον τράχηλο

Σε μία μελέτη γενικού πληθυσμού η πρωκτική HPV λοίμωξη οφειλόταν κυρίως σε μη-ογκογόνα στελέχη όπως οι τύποι 84 και 62 με τον τύπο 16 να ανιχνεύεται σε μια μειονότητα (7%) των μολυσμένων ατόμων. Στην ίδια μελέτη οι γυναίκες που ήταν θετικές στον ιό και στον τράχηλο και στον πρωκτό παρουσίαζαν απόλυτη ταύτιση των τύπων στις δύο ανατομικές περιοχές στο 26% (46/178) και μερική ταύτιση στο 53% (95/178) [34]. Ο υψηλός βαθμός ταύτισης υποδηλώνει μια κοινή πηγή μόλυνσης για τον πρωκτό και τον τράχηλο.

### 5.3 Παράγοντες κινδύνου για πρωκτική HPV λοίμωξη

Αρχικά υπήρχε η άποψη ότι οι πρωκτική συνουσία ευθунεται για την απόκτηση του ιού στον πρωκτό. Η πρωκτική επαφή μεταξύ ανδρών και γυναικών είναι συχνή σεξουαλική πρακτική και αναφέρεται από το 36% των γυναικών ηλικίας 25-44 στις ΗΠΑ [35]. Φαίνεται όμως ότι η πρωκτική συνουσία δεν είναι η αποκλειστική αιτία της μόλυνσης του πρωκτού. Αρκετές μελέτες δεν έχουν καταφέρει να δείξουν στατιστικώς σημαντική συσχέτιση μεταξύ πρωκτικών επαφών και HPV λοίμωξης [24, 25, 36]. Η πρωκτική λοίμωξη φαίνεται να είναι πιο συχνή σε γυναίκες με ανιχνεύσιμη λοίμωξη στο αιδοίο παρά στον τράχηλο. Αυτό υποδηλώνει ότι η ανατομική γειτονία είναι σημαντική για την διασπορά της λοίμωξης.

Κάποια φυλογενετικά είδη (alpha3/alpha15 and alpha1/alpha8/alpha10 τύποι) φαίνεται να έχουν μεγαλύτερη τάση να προκαλούν πρωκτική μόλυνση σε σχέση με άλλους [33]. Έχει παρατηρηθεί μια ανάστροφη σχέση ανάμεσα στην ηλικία και την πιθανότητα παρουσίας HPV στον πρωκτό στο γενικό πληθυσμό. Επομένως η νεαρή ηλικία θα μπορούσε να θεωρηθεί ως ένας επιπλέον παράγοντας κινδύνου[34].

## ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### Σκοπός

Ο σκοπός της μελέτης ήταν πολλαπλός:

- να διερευνήσει κατά πόσον είναι εφικτή η εξέταση για HPV σχετιζόμενους βιοδείκτες σε πρωκτικά επιχρίσματα,
- να αξιολογήσει τη διαγνωστική ακρίβεια (ευαισθησία, ειδικότητα) των βιοδεικτών για την ανίχνευση AIN.
- να αναγνωρίσει παράγοντες κινδύνου για την παρουσία HPV στον πρωκτό και
- να παράσχει πληροφορίες σχετικές με την κλινική σημασία της πρωκτικής HPV λοίμωξης στις γυναίκες που προσέρχονται στο ιατρείο κολποσκόπησης λόγω HPV σχετιζόμενων αλλοιώσεων του κατώτερου γεννητικού συστήματος

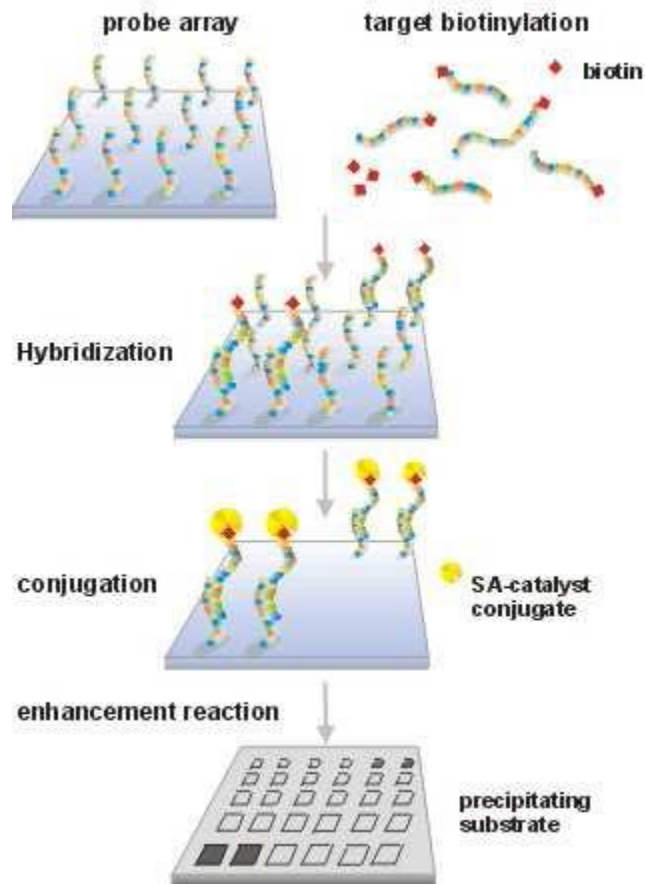
## Υλικό και Μέθοδοι

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων στο τμήμα Γυναικολογίας από το Σεπτέμβριο 2009 μέχρι τον Αύγουστο 2012. Ο πληθυσμός της μελέτης αφορούσε γυναίκες που προσέρχονταν στο ιατρείο κολποσκόπησης και θεωρούνταν κατάλληλες για να συμπεριληφθούν μόνο αν ήταν τουλάχιστον 18 ετών και είχαν πιθανή ή επιβεβαιωμένη HPV σχετιζόμενη παθολογία του τραχήλου, του κόλπου ή του αιδοίου. Υπήρξε ειδική μέριμνα για να συμπεριληφθούν όλα τα περιστατικά καρκίνου τραχήλου και αιδοίου, CIN2-3, υψηλόβαθμου VIN και οξυτενών κονδυλωμάτων πριν τη θεραπεία τους. Συμπεριλήφθησαν ακόμα κάποιες από τις γυναίκες με χαμηλόβαθμες τραχηλικές κυτταρολογικές αλλοιώσεις, ωστόσο με ένα περιστασιακό τρόπο. Τέλος συμπεριλήφθηκε και ένας μικρός αριθμός γυναικών με μη HPV σχετιζόμενη γυναικολογική παθολογία (ινομυώματα, καρκίνο ενδομητρίου, κύστεις ωοθήκης κτλ) ως μάρτυρες.

Κατόπιν προφορικής συγκατάθεσης των ασθενών λαμβάνονταν ένα τραχηλικό και ένα τραχηλικό κυτταρολογικό δείγμα που μεταφερόταν σε φιαλίδιο ThinPrep τα οποία εξετάζονταν για:

**A. HPV DNA testing** για την ανίχνευση και τυποποίηση 35 τύπων HPV με τη μέθοδο Clinical Arrays HPV (Genomica, Spain). Η μεθοδολογία του CLART Human Papillomavirus 2 kit βασίζεται ουσιαστικά στην ανίχνευση και τον υβριδισμό του HPV γονιδιώματος με την χρήση probes. Το κάθε probe είναι συγκεκριμένο για κάθε HPV τύπο για το λόγο αυτό είναι δυνατή η ανίχνευση λοιμώξεων και συνλοιμώξεων από 35 διαφορετικούς HPV τύπους

**Εικόνα 2. Η μέθοδος CLART**



### *Υλικά - Εξοπλισμός*

Το kit περιλαμβάνει μια σειρά ρυθμιστικών διαλυμάτων τα οποία προετοιμάζουν το προς εξέταση δείγμα για την ενίσχυση και τον υβριδισμό.

- Απεσταγμένο νερό
- Γάντια μιας χρήσεως
- Δοχείο με θρυματισμένο πάγο
- Eppendorf tubes (1.5 ml).
- Racks για την τοποθέτηση δοκιμαστικών σωλήνων 1.5 ml .
- Racks για την τοποθέτηση 0.5 ml/0.2 ml δοκιμαστικών σωλήνων.

- Μικροφυγόκεντρος
- Thermocycler.
- micropipettes (1-20  $\mu$ l, 20-200  $\mu$ l and 200-1000  $\mu$ l)
- Thermoblocks (at 37°C, 55°C and 100°C)
- Vortex
- Vacuum system
- Microarrays AT tubes or CS well strips (περιλαμβάνει τα probes). Είναι αποθηκευμένα σε ειδικό φάκελο. Μετά την πρώτη χρήση θα πρέπει να φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου προστατευμένο από το φως.
- RE (Developer). Αποθήκευση στους 4°C..
- SH (Hybridization solution). ). Αποθήκευση στους 4°C.
- DC (Conjugate solvent). ). Αποθήκευση στους 4°C.
- CJ (Conjugate). Store at 4°C. Φυγοκέντριση πριν τη χρήση
- TL (Washing buffer). ). Αποθήκευση στους 4°C.

Η τεχνική απαιτεί ένα σύστημα για να συλλαμβάνει και να επεξεργάζεται την εικόνα που λαμβάνει από το microarray. Το σύστημα αυτό λέγεται CAR (Clinical Reader Array) το οποίο επιτρέπει την ανάγνωση και ερμηνεία 96 δειγμάτων.

**Εικόνα 3. Car Reader Array**

Για το λόγο ότι η τεχνική στηρίζεται στην ενίσχυση γενετικού υλικού θα πρέπει να ακολουθηθεί αυστηρώς το πρωτόκολο με ιδιαίτερη προσοχή και η διαδικασία να εκτελείται με αυστηρή τεχνική ώστε να αποφευχθεί επιμόλυνση στα προς εξέταση δείγματα. Το συγκεκριμένο Kit περιλαμβάνει λεπτομερώς εσώκλειστες οδηγίες για οποιοδήποτε βήμα. Επιγραμματικά περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

1. HPV DNA EXTRACTION
2. Διαδικασία ενίσχυσης και υβριδισμού
3. Ανάγνωση αποτελεσμάτων (Car Reader Array)

**B. Κυτταρομετρία ροής** για την ανίχνευση E6&7 mRNA 14 υψηλού κινδύνου τύπων HPV types με τη μέθοδο HPV Onco Tect (IncellDx Inc, USA). Το kit στηρίζεται ουσιαστικά στις αρχές της κυτταρομετρίας η οποία περιλαμβάνει δυο βασικές κατηγορίες την κυτταρομετρία ροής και την κυτταρομετρία ανάλυσης

εικόνας. Κατά την κυτταρομετρία ροής τα προς ανάλυση κύτταρα ρέουν με τη μορφή εναιωρήματος μπροστά από μια φωτεινή ακτίνα Laser δια μέσου θαλάμου με ταχύτητα αρκετών χιλιάδων ανά δευτερόλεπτο. Η μέτρηση αναγνώριση και διαλογή γίνεται με βάση τον εκπεμπόμενο φωτισμό και τη σκέδαση του φωτός. Τα φωτεινά σήματα μετατρέπονται σε ηλεκτρικά σήματα και αυτά με τη σειρά τους ενισχύονται μετρούνται και διοχετεύονται υπό μορφή ψηφιακών ενδείξεων σε ηλεκτρονικό υπολογιστή συγκεκριμένου προγράμματος και λογισμικού, όπου παρουσιάζονται. Ουσιαστικά και το HPV ONCOTEST βασίζεται στις αρχές που αναφερθηκαν.

#### *Υλικά - Εξοπλισμός*

- Απιονιονισμένο νερό
- PBS pH 7,4
- 12X 75 Falcon tubes (polypropylene, polystyrene)
- Πιπέτες 20 μl 20-200 μl 200-1000μl
- Vortex mixer
- Centrifuge
- Υδατόλουτρο στους 43° C
- Flow cytometer system

Το Kit περιλαμβάνει λεπτομερώς εσωκλειστες οδηγίες για οποιοδήποτε βήμα.

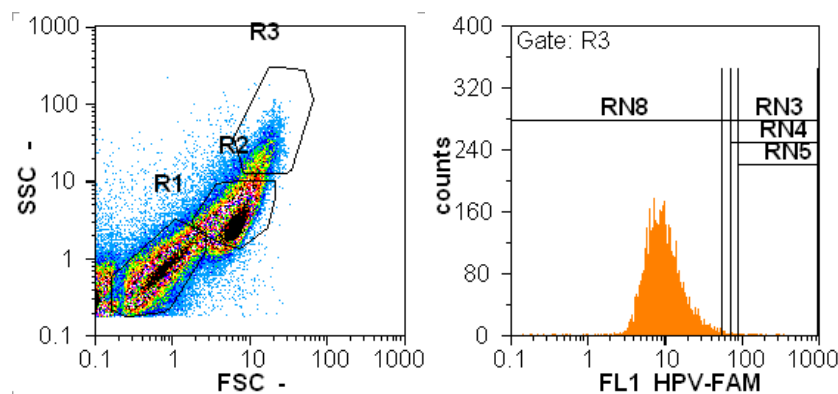
Επιγραμματικά περιλαμβάνει τα εξής στάδια:



1. Προετοιμασία του προς εξέταση υλικού Απομονωση κυττάρων
2. Υβριδισμός
3. Πλύσεις Κυττάρων
4. Κυτταρική Ανάλυση με Κυτταρομετρία Ροής

Ουσιαστικά τα κύτταρα κατά την προετοιμασία τους υβριδοποιούνται με «κοκτέιλ» ειδικών probes μέσω των πλύσεων απομακρύνονται τα probes που δεν έχουν δεσμευτεί και τα προς εξέταση κύτταρα αναλύονται μέσω της κυτταρομετρίας ροής.

**Εικόνα 4. Απάντηση κυτταρομετρίας ροής σε ασθενή της μελέτης μας**



**Γ. Μορφολογική κυτταρολογία** υγρής φάσης με απαντήσεις βάσει του συστήματος Bethesda.

Μετά από πολλά χρόνια πειραματισμών, ο Δρ Παπανικολάου ανέπτυξε την τρίχρωμη χρώση η οποία επέζησε, με μικρή μόνο τροποποίηση, ως τις μέρες μας, και είναι η χρώση επιλογής για κυτταρολογικό υλικό. Η χρώση Παπανικολάου είναι μία πολύχρωμη χρωστική μέθοδος η οποία αποτελείται από μία πυρηνική χρώση (αιματοξυλίνη) και δύο εξουδετερωτικές χρώσεις (Orange G και EA). Απαιτείται

ενυδάτωση των μονιμοποιημένων επιχρισμάτων, ώστε τα κύτταρα να απορροφήσουν την αιματοξυλίνη, ενώ η αφυδάτωση προετοιμάζει τα κύτταρα για να δεχθούν τις εξουδετερωτικές χρώσεις. Orange G είναι μία όξινη χρώση η οποία βάφει ροζ χρώμα τις βασικές πρωτεΐνες όπως είναι η προκερατίνη. Η Orange G επίσης έχει ισχυρή συγγένεια με την κερατίνη την οποία χρωματίζει έντονο πορτοκαλί.

EA είναι μία πολυχρωματική χρώση η οποία είναι συνδυασμός ανοιχτού πράσινου, SF κίτρινου και εωσίνης Y. Χρωματίζει το κυτταρόπλασμα των μεταβολικά δραστήριων κυττάρων (όπως τα παραβασικά κύτταρα, τα διάμεσα κύτταρα, τα λευκοκύτταρα και τα ιστιοκύτταρα, όπως επίσης και τα καρκινικά κύτταρα) με ένα ελαφρύ πράσινο χρώμα.

Τα προς εξέταση πρωκτικά επιχρίσματα τα οποία είχαν εμβαπτιστεί σε μονοποιητικό υλικό Thin Prep βάφτηκαν με την χρώση Παπανικολάου όπως περιγράφηκε παραπάνω. Το τελικό αποτέλεσμα της χρώσης δεν διέφερε ιδιαίτερα από αυτό των αντίστοιχων τραχηλικών και ήταν το εξής:

Πυρήνας- μπλε μαύρο

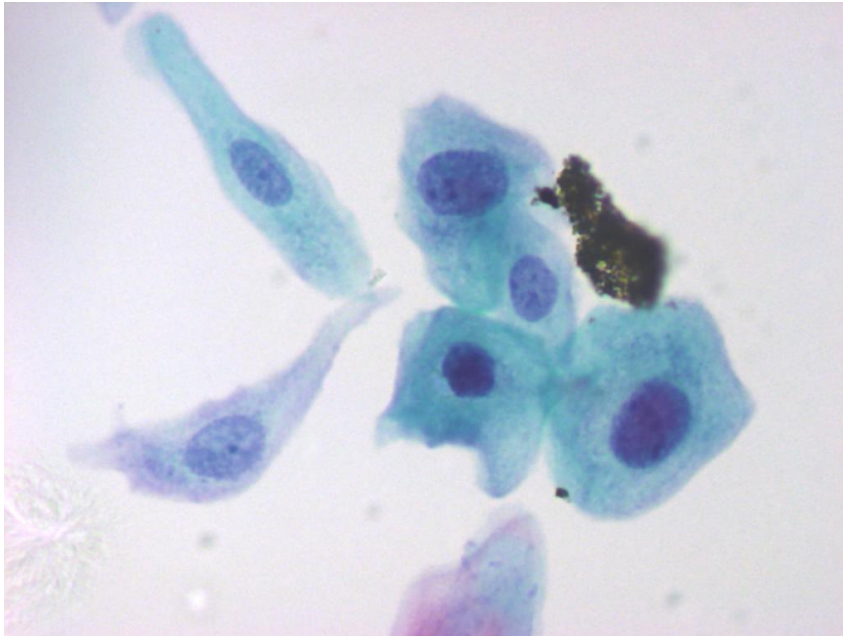
Κυτταρόπλασμα (μη κερατινοποιούμενο)- μπλέ και εξασθηνημένο κόκκινο

Κύτταρα του αίματος- πράσινο

Κυτταρόπλασμα (κερατινοποιούμενο)- ροζ

Ερυθρά αιμοσφαίρια-πορτοκαλί

*Εικόνα 5. Πρωκτικό κυτταρολογικό επίχρισμα της κατηγορίας LSIL από ασθενή της μελέτης μας*



Από όλες τις γυναίκες θα γινόταν λήψη ενός λεπτομερούς ιατρικού και γυναικολογικού ιστορικού με εστίαση σε στοιχεία της σεξουαλικής τους δραστηριότητας.

Οι γυναίκες στις οποίες διεγνώσθη CIN2/3 γινόταν λήψη και δεύτερου πρωκτικού δείγματος 6-12 μήνες μετά την κωνοειδή εκτομή. Γυναίκες οι οποίες στα πρωκτικά δείγματα βρέθηκαν θετικές είτε στο HPV DNA για οποιονδήποτε τύπο, είτε το mRNA, είτε την κυτταρολογία (ASCUS+) παραπέμφθηκαν για πρωκτοσκόπηση υψηλής ευκρίνειας (high resolution anoscopy - HRA).

Τα αποτελέσματα των βιοδεικτών και από τις δύο ανατομικές περιοχές, τα ευρήματα από την κολποσκόπηση (παρουσία ή απουσία CIN, καρκίνου ή κονδυλωμάτων) και παράγοντες από το ιστορικό (ηλικία, τοκετοί, ηλικία έναρξης επαφών, αριθμός

συντρόφων, πρωκτικές επαφές) χρησιμοποιήθηκαν σαν ανεξάρτητες μεταβλητές σε μια multiple logistic regression ανάλυση με την παρουσία ή απουσία HPV DNA ή RNA στον πρωκτό να αποτελούν την εξαρτημένη μεταβλητή. Το Fisher's exact test χρησιμοποιήθηκε για univariate συγκρίσεις ποιοτικών χαρακτηριστικών.

## Αποτελέσματα

Συνολικά 235 γυναίκες συμμετείχαν στη μελέτη με μέση ηλικία 34.3 έτη. Τα δημογραφικά χαρακτηριστικά παραθέτονται στον πίνακα 2.

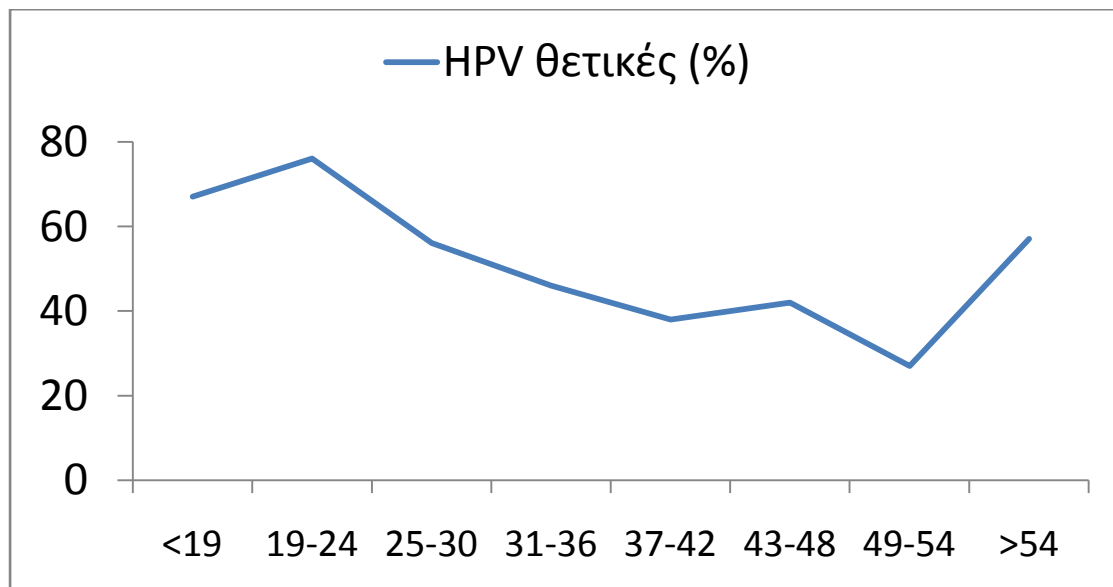
Πίνακας 2. Δημογραφικά και στοιχεία από το ιστορικό

<b>Μέση Ηλικία</b>	34,3 έτη	
<b>Μέσος αριθμός ερωτικών συντρόφων</b>	4	
<b>&gt; 3 ερωτικοί σύντροφοι</b>	130/235	55,3%
<b>Μέση ηλικία έναρξης σεξουαλικής δραστηριότητας</b>	17,4 έτη	
<b>Γυναίκες με έναρξη σεξουαλικών επαφών πριν τα 18 έτη</b>	70/235	29,8%
<b>Αναφερόμενη συστηματική χρήση προφυλακτικού</b>	140/235	59,6%
<b>Αναφερόμενες πρωκτικές επαφές</b>	126/235	53,6%
<b>Ιστορικό διακοπής κύησης</b>	85/235	36,2%
<b>Ιστορικό τελειομήνων κυήσεων</b>	92/235	39,1%
<b>Καπνίστριες</b>	104/235	44,3%

Εικοσιμία γυναίκες έπασχαν από καρκίνο τραχήλου, 76 είχαν CIN 2/3, 65 είχαν οξυτενή κονδυλώματα, , 59 ήπιες κυτταρολογικές αλλοιώσεις στο τεστ Παπανικολάου, τέσσερις VIN, μία καρκίνο αιδοίου και εννέα ήταν μάρτυρες (δηλ. γυναίκες που παραπέμφθηκαν στη Γυναικολογική κλινική για ενδείξεις άσχετες από τον HPV).

Στο πρωκτικό επίχρισμα ανιχνεύθηκαν HPV DNA, high-risk HPV DNA, high-risk mRNA σε 109 (46.4%), 72 (30.6%) και 19 (8.1%) γυναίκες αντιστοίχως. Λοίμωξη από πολλαπλούς τύπους βρέθηκε σε 40/235 (17%) γυναίκες. Στην κυτταρολογική εξέταση του πρωκτικού επιχρίσματος τα 30/202 επιχρίσματα ταξινομήθηκαν ως ASCUS/LSIL, χωρίς να υπάρξουν καθόλου υψηλόβαθμες κυτταρολογικές αλλοιώσεις.

**Εικόνα 6. Θετικότητα στον πρωκτό ανά ηλικία**



Έγινε μελέτη της συσχέτισης του αποτελέσματος της πρωκτικής κυτταρολογίας με τα πρωκτικά αποτελέσματα HPV DNA, high-risk HPV DNA and high-risk mRNA με τη χρήση του συντελεστή phi. Ο συντελεστής ήταν 0,353 για κυτταρολογία/HPV DNA και 0,336 για κυτταρολογία/ high-risk mRNA.

Στο τραχηλικό επίχρισμα ανιχνεύθηκαν HPV DNA, high-risk HPV DNA and high-risk mRNA σε 131 (55.7%), 91 (38.7%), 60 (25.5%) γυναίκες αντιστοίχως. Το υλικό ήταν ανεπαρκές για DNA & mRNA εξέταση σε 15/235 (6.4%) πρωκτικά επιχρίσματα και 4/235 (1.7%) τραχηλικά επιχρίσματα. Η στατιστική ανάλυση με το Fisher's exact test αποκάλυψε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ πρωκτικών και τραχηλικών επιχρισμάτων μόνο ως προς την θετικότητα για mRNA και τον αριθμό των ανεπαρκών δειγμάτων και όχι ως προς τη θετικότητα για HPV DNA και high-risk HPV DNA (Πίνακας 3).

Πίνακας 3. Θετικότητα βιοδεικτών στο τραχηλικό και το πρωκτικό επίχρισμα

Βιοδείκτης	Θετικό στον τράχηλο	Θετικό στον Πρωκτό	P (Fisher exact)
HPV DNA	131/235 (55.7%)	109/235 (46.4%)	0.053
HPV hr DNA	91/235 (38.7%)	72/235 (30.6%)	0.081
HPV mRNA (flow)	60/235 (25.5%)	19/235 (8.1%)	<.001
Λοίμωξη από πολλαπλούς τύπους	52/235 (22.1%)	40/235 (17%)	0.2
Μη ικανοποιητικό δείγμα	4/235 (1.7%)	15/235 (6.4%)	0.017

Η ταυτόχρονη λήψη τραχηλικού και κολπικού επιχρίσματος από κάθε γυναίκα επέτρεψε τη μελέτη της συνάφειας των τύπων HPV που μολύνουν τις δύο ανατομικές περιοχές. Απόλυτη συνάφεια (ακριβώς οι ίδιοι τύποι στις δύο περιοχές) παρατηρήθηκε σε 24.6%, μερική συνάφεια (μερικοί αλλά όχι όλοι οι τύποι ίδιοι) σε 49% και καμία συνάφεια (εντελώς διαφορετικοί τύποι) σε 26.4%. Οι πιο συχνοί τύποι ήταν οι 6 και 18 για τον πρωκτό και ο 16 για τον τράχηλο.

Το ποσοστό προσέλευσης για μικροπρωκτοσκόπηση (HRA) ήταν χαμηλό (19,8%) πιθανώς λόγω φόβου για τη διαδικασία. Τα αποτελέσματα της HRA μαζί με της βιοψίας, όπου αυτή ήταν απαραίτητη, στις 25 γυναίκες που προσήλθαν (συμπεριλαμβανομένων και 4 από τις 19 mRNA θετικές) ήταν τα ακόλουθα: φυσιολογικά ευρήματα σε 17, ενδοπρωκτικά κονδυλώματα σε 7 (δύο από τις οποίες ήταν mRNA θετικές) και AIN I σε μία.



**Εικόνα 7. HRA με ενδοπρωκτικά οξυτενή κονδυλώματα σε ασθενή της μελέτης μας**



Τα αποτελέσματα της logistic regression ανάλυσης για την αναγνώριση προβλεπτικών παραγόντων για πρωκτική HPV θετικότητα αναγράφονται στον πίνακα 4. Επιγραμματικά οι κύριοι προβλεπτικοί παράγοντες για πρωκτική HPV DNA θετικότητα ήταν το ιστορικό περισσότερων από τριών σεξουαλικών συντρόφων και η θετικότητα για HPV DNA στον τράχηλο. Για την high-risk HPV DNA θετικότητα ο μόνος προβλεπτικός παράγοντας με στατιστική σημαντικότητα ήταν η θετικότητα για high-risk HPV DNA στον τράχηλο. Τέλος για την πρωκτική high-risk mRNA θετικότητα ο μόνος προβλεπτικός παράγοντας ήταν η high-risk mRNA θετικότητα στον πρωκτό.

Πίνακας 4. Αποτελέσματα Logistic regression: odds ratios με 95% διαστήματα αξιοπιστίας για θετικό βιοδείκτη

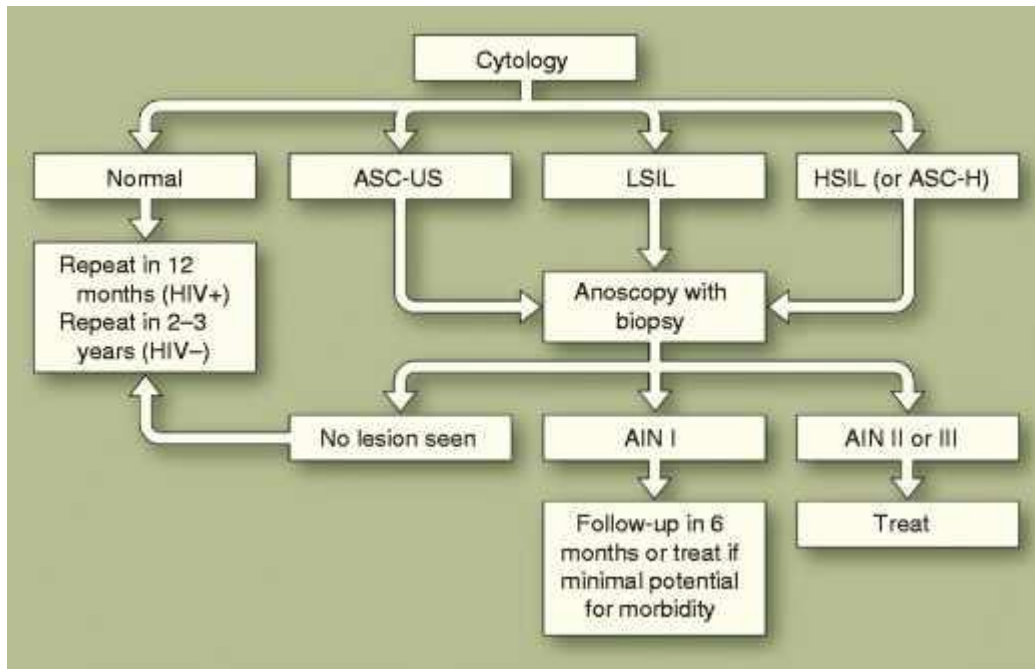
<b>Independent variables</b>	<b>+HPV DNA</b>	<b>+hr HPV DNA</b>	<b>+HPV mRNA</b>	<b>+ Κυτταρολογία</b>
Ηλικία >35	NS	NS	NS	NS
Έναρξη σεξουαλικής δραστηριότητας <18	NS	NS	NS	NS
>3 ερωτικοί σύντροφοι	2.27 (1.13–4.6)	NS	NS	NS
Πρωκτικές επαφές	NS	NS	NS	NS
Χρήση προφυλακτικού	NS	NS	NS	NS
Ατοκία	NS	NS	NS	NS
Κάπνισμα	NS	NS	NS	NS
Εκτρώσεις	NS	NS	NS	NS
Αντίστοιχο τεστ θετικό στον τράχηλο	2.44 (1.23–4.84)	3.25 (1.67–6.33)	5.22 (1.84–14.76)	NS

Από τις 76 γυναίκες που έκαναν Loop εκτομή ως θεραπεία για CIN2/3, 30 υπεβλήθησαν και σε δεύτερο πρωκτικό επίχρισμα 6–12 μήνες μετά τη θεραπεία. Από αυτές 4 ήταν HPV αρνητικές στον τράχηλο αλλά HPV θετικές στον πρωκτό, 12 ήταν διπλά αρνητικές, 8 ήταν HPV θετικές στον τράχηλο και αρνητικές στον πρωκτό και 6 ήταν διπλά θετικές 6–12 μήνες μετά τη θεραπεία. Αυτό σημαίνει ότι 6–12 μήνες μετά από Loop εκτομή 53% των γυναικών ήταν HPV αρνητικές στον τράχηλο, αλλά το 25% αυτών παρέμεναν HPV θετικές στον πρωκτό..

## Συζήτηση

Η HPV λοίμωξη στον πρωκτό μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρές επιπτώσεις όπως η πρωκτική ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία (AIN) και ο καρκίνος του πρωκτού. Ο καρκίνος του πρωκτού είναι σπάνιος αλλά η επίπτωσή του είναι ιδιαίτερα υψηλή σε επιλεγμένες υποομάδες του πληθυσμού που συγκεντρώνουν κάποιους παράγοντες κινδύνου όπως το κάπνισμα, η ηλικία >50, το ιστορικό παθητικών πρωκτικών επαφών, η ανοσοκαταστολή, η χρόνια φλεγμονή και η ακτινοθεραπεία [17]. Μια τέτοια υποομάδα είναι οι HIV ομοφυλόφιλοι άνδρες (men who have sex with men - MSM). Η επίπτωση του AIN και του καρκίνου σε αυτόν τον πληθυσμό είναι 40 φορές μεγαλύτερη αυτής του γενικού πληθυσμού. Ακόμα και HIV αρνητικοί MSM έχουν μεγαλύτερη επίπτωση πρωκτικών βλαβών [18,19]. Αυτός ο κίνδυνος οδήγησε στη δημιουργία κατευθυντήριων οδηγιών μαζικού ελέγχου για την πρόληψη του καρκίνου του πρωκτού στους MSM. HIV θετικοί MSM υποβάλλονται σε πρωκτικό κυτταρολογικό επίχρισμα και δακτυλική εξέταση του πρωκτού ετησίως, ενώ HIV αρνητικοί MSM κάθε 2–3 έτη [20,21]. Άνδρες με θετικά ευρήματα θα πρέπει να παραπέμπονται για HRA.

**Εικόνα 8. Οδηγίες προληπτικού ελέγχου MSM στις ΗΠΑ**



Ωστόσο ο καρκίνος του πρωκτού δεν είναι αποκλειστικότητα των ομοφυλοφίλων ανδρών. Το 2010 στις ΗΠΑ εμφανίστηκαν περίπου 5000 νέα περιστατικά καρκίνου του πρωκτού και οι περισσότερες εξ αυτών (3000) αφορούσαν γυναίκες [22].

Προκύπτει λοιπόν ότι ο καρκίνος του πρωκτού είναι συνηθέστερος στις γυναίκες από ότι στους άνδρες και συνεπώς δεν μπορεί να θεωρηθεί νόσος των ομοφυλοφίλων.

Από μελέτες έχει φανεί ότι ο κίνδυνος καρκίνου πρωκτού σε HIV θετικές γυναίκες είναι επταπλάσιος του γενικού πληθυσμού [20,21]. Μία άλλη ομάδα υψηλού κινδύνου με ιδιαίτερη σημασία για αυτή τη μελέτη είναι οι γυναίκες που έχουν υποβληθεί σε θεραπεία για CIN3. Ο σχετικός κίνδυνος για καρκίνο του πρωκτού σε αυτές τις γυναίκες είναι 5 [23]. Αυτό μπορεί να αποτελέσει ένα ισχυρό επιχείρημα για τη δημιουργία ενός προγράμματος προληπτικού ελέγχου του πρωκτού σε γυναίκες με ιστορικό HPV σχετιζομένων νεοπλαστικών αλλοιώσεων οπουδήποτε στο κατώτερο γεννητικό σύστημα. Προς περαιτέρω στήριξη αυτής της άποψης μία άλλη μελέτη 205 γυναικών με CIN, VIN ή VAIN βρήκε 12% επιπολασμό AIN [38]. Το θέμα του

πρωκτικού screening σε γυναίκες υψηλού κινδύνου δεν έχει ευρέως μελετηθεί. Η πλειονότητα των σχετικών μελετών αφορά άνδρες [39,40]. Σε μία από τις ελάχιστες δημοσιεύσεις σε γυναίκες μελετήθηκαν 104 HIV θετικές γυναίκες με πρωκτική κυτταρολογία και βρέθηκε 6% επίπτωση high grade AIN [41]. Ωστόσο δεν υπάρχουν δημοσιευμένα στοιχεία για τη χρήση των βιοδεικτών της HPV λοίμωξης (HPV DNA testing και E6&7 mRNA testing) ως μέσα πρωκτικού screening. Με δεδομένο ότι το HPV DNA έχει ανώτερη ευαισθησία από την κυτταρολογία για την ανίχνευση CIN2-3 [42], θα ήταν λογικό να διερευνηθεί η πιθανή χρήση του στη ανίχνευση AIN. Στη μελέτη μας συμπεριλάβαμε και την εξέταση για E6&7 mRNA καθώς πρόσφατα δεδομένα για το τεστ αυτό υποδηλώνουν ότι αυξάνει την ειδικότητα του HPV DNA test [43].

Τα υψηλά ποσοστά θετικότητας HPV DNA στον πρωκτό (46% οποιουδήποτε τύπος, 30% high risk τύποι) που παρατηρήθηκαν στη μελέτη μας υποδηλώνουν ότι το HPV DNA testing είναι ακατάλληλη μέθοδος διαλογής για τον συγκεκριμένο υψηλό κινδύνου πληθυσμό γυναικών. Σε αντίθεση το ποσοστό θετικότητας mRNA στον πρωκτό ήταν αρκετά χαμηλότερα από αυτό του HPV DNA, (8% προς 46%) κάτι που κάνει αυτό το τεστ μια καλύτερη επιλογή διαλογής. Η εξέταση για την έκφραση E6&7 mRNA στο πρωκτικό επιθήλιο θα μπορούσε να βοηθήσει στη διάκριση ανάμεσα στις πρωκτικές HPV λοιμώξεις που θα υποστρέψουν και σε αυτές που θα εξελιχθούν σε προκαρκινικές αλλοιώσεις.

Το χαμηλότερο ποσοστό έκφρασης E6&7 στον πρωκτό σε σχέση με τον τράχηλο όπως αυτό ανιχνεύεται από την κυτταρομετρία (8% προς 25%) μπορεί να εγείρει την υπόθεση ότι η πρωκτική ζώνη μετάπλασης μπορεί να μην είναι τόσο ευάλωτη στην καρκινογένεση όσο η αντίστοιχη τραχηλική. Αυτό αντικατοπτρίζεται και στον χαμηλό επιπολασμό υψηλόβαθμων πρωκτικών αλλοιώσεων σε αυτή τη μελέτη, αν

και αυτό το εύρημα θα πρέπει να εξετάζεται υπό το πρίσμα του υψηλού ποσοστού μη προσέλευσης για HRA. Για τον ίδιο λόγο επιλέξαμε να μην υπολογίσουμε δείκτες διαγνωστικής ακρίβειας των βιοδεικτών για την ανίχνευση AIN. Ωστόσο, καθώς το εύρημα των ενδοπρωκτικών κονδυλωμάτων ήταν συχνό στις γυναίκες με γεννητικά κονδυλώματα, καλό θα ήταν η HRA να αποτελεί μέρος της εξέτασης όλων των γυναικών με γεννητικά κονδυλώματα και ιστορικό πρόσφατης πρωκτικής επαφής. Δεν είμαστε όμως σε θέση βάσει των δεδομένων μας να υποστηρίξουμε την εξέταση του πρωκτικού σωλήνα σε όλες τις γυναίκες που προσέρχονται στο ιατρείο κολποσκόπησης.

Ένα άλλο εύρημα ήταν ότι τα μη ικανοποιητικά πρωκτικά δείγματα ήταν πιο συχνά από ότι τα τραχηλικά (6.4% vs 1.7%). Αυτό σημαίνει ότι η αποφολίδωση των κυττάρων από το πρωκτικό επιθήλιο είναι πιο περιορισμένη κάτι που θα πρέπει να γνωρίζουν οι ιατροί και το παραϊατρικό προσωπικό που λαμβάνουν πρωκτικά επιχρίσματα.

Στην μελέτη μας ο κίνδυνος πρωκτικής HPV λοίμωξης δεν σχετιζόταν με το κάπνισμα ή τις σεξουαλικές συνήθειες. Αυτό είναι σε συμφωνία με μία προηγούμενη μελέτη σε παρόμοιο αλλά μικρότερο πληθυσμό [24]. Ένα από τα κύρια ευρήματα της μελέτης ήταν ότι η πρωκτογεννητική περιοχή αποτελεί ένα ενιαίο πεδίο για τη μολυσματική και καρκινογόνο δράση του HPV. Αυτό απορρέει από το υψηλό ποσοστό HPV DNA θετικότητας στο πρωκτικό δείγμα, παρόμοιο με του τραχηλικού (46% vs 55%), το υψηλό ποσοστό απόλυτης ή μερικής ταύτισης τύπων (75%) ανάμεσα στο πρωκτικό και το τραχηλικό επίχρισμα και από τα ευρήματα της logistic regression ανάλυσης. Η logistic regression ανάλυση απέδειξε ότι ο πιο σημαντικός προβλεπτικός παράγοντας για την πρωκτική HPV λοίμωξη σε αυτόν τον πληθυσμό είναι η τραχηλική HPV λοίμωξη. Επομένως θα ήταν λογικό να υποθέσουμε ότι η

κάθαρση του ιού από το ανοσοποιητικό σύστημα θα επηρέαζε παράλληλα και τις δύο περιοχές. Αν ο ιός καταστραφεί από το ανοσοποιητικό σύστημα στην περιοχή του τραχήλου, τότε θα περιμέναμε ταυτόχρονη κάθαρση του και από την περιοχή του πρωκτού. Αυτή η υπόθεση μπορεί να έχει κλινική σημασία στην περίπτωση παρακολούθησης γυναικών μετά από θεραπεία (LEEP, LASER κτλ.) για CIN2-3. Τα δεδομένα μέχρι τώρα προτείνουν τη χρήση ενός HPV test 6–12 μήνες μετά από θεραπεία για την ταξινόμηση των γυναικών ως χαμηλού ή υψηλού κινδύνου για υποτροπή κάτι το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε ανάλογη τροποποίηση του τρόπου παρακολούθησης [44]. Όμως η μελέτη μας έδειξε ότι γυναίκες με αρνητικό HPV test στον τράχηλο μετά από θεραπεία μπορεί να εξακολουθούν να έχουν θετικό τεστ στον πρωκτό και επομένως να μην είναι πραγματικά αρνητικές για τον ιό. Επομένως προτείνουμε μια πιο προσεκτική προσέγγιση του θέματος της αρνητικοποίησης μετά από θεραπεία. Ακόμα και αν ο τράχηλος γίνει πραγματικά αρνητικός στον HPV, ο πρωκτός θα μπορούσε να αποτελέσει ρεζερβουάρ για την τραχηλική επαναμόλυνση. Η πιθανότητα HPV θετικότητας μετά από θεραπεία για CIN (47%) σε αυτή τη μελέτη είναι υψηλότερη από μελέτες όπου χρησιμοποιήθηκε το the hybrid capture 2 test (29%) [28]. Αυτό οφείλεται πιθανώς στη μεγαλύτερη αναλυτική ευαισθησία της PCR που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη μας και στο γεγονός ότι για τον ορισμό της θετικότητας δεν συμπεριλάβαμε μόνο την παρουσία υψηλού κινδύνου τύπων. Άλλωστε μια άλλη μελέτη στην οποία χρησιμοποιήθηκε PCR βρέθηκαν παρόμοια ποσοστά (43%) HPV θετικότητας μετά από θεραπεία [45].

Στη μελέτη μας αποδείξαμε ότι η χρήση βιοδεικτών σε πρωκτικά επιχρίσματα είναι εφικτή. Αν και δεν προτείνεται η χρήση τους στο γενικό πληθυσμό, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στον ειδικό πληθυσμό των γυναικών που προσέρχονται στο ιατρείο κολποσκόπησης για την ανίχνευση πρωκτικών αλλοιώσεων. Κατευθύνσεις



μελλοντικής έρευνας στο αντικείμενο θα μπορούσαν να αποτελέσουν ο υπολογισμός του κινδύνου AIN στο συγκεκριμένο ειδικό πληθυσμό εφαρμόζοντας HRA σε όσο γίνεται περισσότερες γυναίκες, όπως και η σύγκριση της διαγνωστικής ακρίβειας της πρωκτικής κυτταρολογίας με τους βιοδείκτες ως μεθόδους screening tools, θέματα τα οποία θεωρούνται ακόμα αναπάντητα από την υπάρχουσα ιατρική βιβλιογραφία [46].

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Η χρήση βιοδεικτών σε πρωκτικά επιχρίσματα είναι εφικτή.
- Η αποβολή των κυττάρων από το πρωκτικό επιθήλιο είναι πιο περιορισμένη
- Ο κίνδυνος πρωκτικής HPV λοίμωξης δεν σχετίζεται με το κάπνισμα ή με τις σεξουαλικές συνήθειες
- Ο βασικός παράγοντας κινδύνου για πρωκτική HPV λοίμωξη σε αυτόν τον πληθυσμό είναι η τραχηλική λοίμωξη
- Η πρωκτογεννητική περιοχή αποτελεί ένα ενιαίο πεδίο για τη μολυσματική και καρκινογόνο δράση του HPV
- Η πρωκτική ζώνη μετάπλασης μπορεί να μην είναι τόσο ευάλωτη στην καρκινογένεση όσο η αντίστοιχη τραχηλική.
- Η HRA να αποτελεί μέρος της εξέτασης όλων των γυναικών με γεννητικά κονδυλώματα και ιστορικό πρόσφατης πρωκτικής επαφής.
- Γυναίκες με αρνητικό HPV test στον τράχηλο μετά από θεραπεία μπορεί να εξακολουθούν να έχουν θετικό τεστ στον πρωκτό και επομένως να μην είναι πραγματικά αρνητικές για τον ιό

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

### Εισαγωγή

Γυναίκες με διαπιστωμένη προκαρκινική βλάβη από τον HPV στον τράχηλο της μήτρας ή το αιδοίο έχουν υψηλότερο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου πρωκτού. Ωστόσο τα διαθέσιμα στοιχεία δεν είναι αρκετά για να υποστηρίξουν την εφαρμογή ενός προγράμματος screening για πρωκτικές προκαρκινικές βλάβες ή καρκίνο σε αυτές τις γυναίκες. Σκοπός της μελέτης είναι να αποδείξει κατά πόσο είναι εφικτή η χρήση των HPV biomarkers στην εξέταση των πρωκτικών επιχρισμάτων, να υπολογίσει την επίπτωση της HPV λοίμωξης στην πρωκτική περιοχή στον συγκεκριμένο πληθυσμό γυναικών και να παρουσιάσει τους πιθανούς παράγοντες κινδύνου για τη λοίμωξη.

### Μέθοδοι

Στην μελέτη μας συμπεριλαμβάνονται οι γυναίκες που παραπέμπονται για κολποσκόπηση λόγω κλινικής HPV λοίμωξης του κατώτερου γεννητικού (CIN, VIN, κονδυλώματα, καρκίνος τραχήλου).

Πρωκτικό επίχρισμα συλλέγεται με ειδικό βουρτσάκι και μεταφέρεται στο Thin Prep μονιμοποιητικό υγρό. Παράλληλα λαμβάνεται τραχηλικό επίχρισμα. Αυτά εξετάζονται με κυτταρομετρία ροής για ανίχνευση E6&7 mRNA, με PCR για DNA ανίχνευση και τυποποίηση και με μορφολογική κυτταρολογία.

Γυναίκες με θετικό αποτέλεσμα πρωκτικών εξετάσεων παραπέμπονται για μικροπρωκτοσκόπηση (High resolution anoscopy). Κάθε γυναίκα δίνει ένα λεπτομερές ιστορικό σεξουαλικής δραστηριότητας.

### Αποτελέσματα

Συνολικά 235 γυναίκες έχουν συμπεριληφθεί στη μελέτη (μέση ηλικία 34,2 έτη). Θετικό HPV DNA, high-risk HPV DNA, high-risk mRNA στον πρωκτό είχαν οι 109 (46.4%), 72 (30.6%) και 19 (8.1%) γυναίκες αντίστοιχα. Τα αντίστοιχα ποσοστά στα τραχηλικά επιχρίσματα των γυναικών αυτών ήταν 55.7%, 35.7% και 25.5%. Το  $X^2$  έδειξε ότι υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά στην πιθανότητα θετικότητας mRNA μεταξύ τραχήλου και πρωκτού, όχι όμως για τη θετικότητα σε DNA και high risk DNA. Πολλαπλούς τύπους στο πρωκτικό επίχρισμα είχαν 40/235 (17%).

Παρατηρήθηκε απόλυτη ή μερική ταύτιση των τύπων τραχήλου και πρωκτού στο 73,5%.

Από τις 63 γυναίκες που είχαν υποβληθεί σε LLETZ, 24 επανήλθαν για δεύτερο πρωκτικό επίχρισμα 6-12 μήνες μετά τη θεραπεία. Από αυτές πέντε (21%) ήταν HPV αρνητικές στον τράχηλο αλλά παρέμεναν θετικές στον πρωκτό.

Η logistic regression analysis έδειξε ότι ο βασικός παράγοντας κινδύνου για θετικό αποτέλεσμα DNA και mRNA στον πρωκτό είναι η παρουσία DNA και mRNA στον τράχηλο αντίστοιχα.

### **Συμπέρασμα**

Η χρήση μοριακών δεικτών για την ανάλυση του πρωκτικού επιχρίσματος είναι εφικτή. Οι γυναίκες που προσέρχονται στο ιατρείο κολποσκόπησης έχουν υψηλό κίνδυνο πρωκτικής HPV λοίμωξης (άρα και αλλοιώσεων AIN) μια και η τραχηλική και η πρωκτική HPV λοίμωξη φαίνεται ότι είναι αλληλένδετες. Η έκφραση mRNA στον πρωκτό είναι πιο ασύνηθης. Ο πρωκτός μπορεί να αποτελέσει εστία επαναλοίμωξης του τραχήλου μετά από θεραπεία για CIN, επομένως ο χαρακτηρισμός μιας γυναίκας ως HPV αρνητικής βάσει μόνο του τραχηλικού επιχρίσματος είναι παρακινδυνευμένος

## **A study of anal smears using HPV related molecular markers in women with cervical HPV infection**

Olga Valari, BSc Biochemist MSc in Applied Microbiology

### **Summary**

**Objective.** Women with HPV related pathology of the lower genital tract are at higher risk for AIN and anal cancer than the general population. A strategy to identify anal disease in these women has not been formulated. The aim of this study is to examine the feasibility of HPV related biomarker testing on anal smears, to identify the risk factors for anal HPV positivity and to provide information of the clinical implications of anal HPV infection in this population.

**Methods.** In women referred for colposcopy because of HPV related pathology of the lower genital tract (cervical cancer, CIN, VIN, warts) a detailed questionnaire, an anal smear and a cervical smear were taken. On each sample morphological cytology, flow cytometric evaluation of E6&7 mRNA, and HPV DNA detection and typing were performed. Women with a positive anal result were referred for high resolution anoscopy.

**Results.** So far 235 women have been included (mean age 34.3). HPV DNA, high-risk HPV DNA, high-risk mRNA was detected in 45%, 31% and 8% of the anal smears and in 56%, 39% and 25% of the cervical smears respectively. Absolute or partial concordance of the types between the cervix and the anus was seen in 74%. Positivity for mRNA was significantly lower in the anus than the cervix (8% vs 25%). Logistic regression analysis revealed risk factors for the presence of anal HPV DNA (N3 lifetime sexual partners and presence of cervical HPV DNA), hr HPV DNA (presence of cervical hr HPV DNA), and hr mRNA (presence of cervical hr mRNA). Twelve

months after LLETZ 53% of women were cervical HPV negative, but 25% of those were still HPV positive in the anus.

Conclusions. HPV infection of the anus is common in this group and is interlinked with the cervical infection. Anal HPV E6&7mRNA expression is less common than in the cervix. Possible clinical implications of anal infection could be the development of AIN and recurrence of CIN after treatment due to cervical reinfection from the anal reservoir. The use of HPV biomarkers is feasible in anal smears, although especially DNA testing as triage method for referral to anoscopy is probably inappropriate due to high positivity rate.

**Βιβλιογραφικές παραπομπές**

1. Agur AMR, Lee MJ, Grant JCB. *Grant's Atlas of Anatomy*. 10th Ed. London, UK: Lippincott Williams and Wilkins; 1999.
2. Gray H, Lewis WH. *Gray's Anatomy of the Human Body*. 20<sup>th</sup> ed. New York, NY: Bartleby; 2000:
3. zur Hausen H, Gissmann L, Steiner W, Dippold W, Dreger I. Human papilloma viruses and cancer. *Bibl Haematol*. 1975 Oct;(43):569-71.
4. Bosch FX, Muñoz N. The viral etiology of cervical cancer. *Virus Res*. 2002 Nov;89(2):183-90.
5. Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)*. 2006 May;110(5):525-41.
6. Chow LT, Broker TR, Steinberg BM. The natural history of human papillomavirus infections of the mucosal epithelia. *APMIS*. 2010 Jun;118(6-7):422-49.
7. Tjalma WA, Van Waes TR, Van den Eeden LE, Bogers JJ. Role of human papillomavirus in the carcinogenesis of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the cervix. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2005 Aug;19(4):469-83
8. Abreu AL, Souza RP, Gimenes F, Consolaro ME. A review of methods for detect human Papillomavirus infection. *Virol J*. 2012 Nov 6;9:262.
9. Poljak M, Kocjan BJ. Commercially available assays for multiplex detection of alpha human papillomaviruses. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2010 Oct;8(10):1139-62.

10. (Barbara S Apgar , Gregory L Brotzman, Mark Spitzer, Colposcopy principles and practice second edition, Saunders Elsevier Philadelphia 2008)
11. Ostör AG. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *Int J Gynecol Pathol.* 1993;12:186-92
12. McIndoe WA, McLean MR, Jones RW, Mullins PR. The invasive potential of carcinoma in situ of the cervix. *Obstet Gynecol.* 1984 Oct;64(4):451-8.
13. Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, Raab S, Sherman M, Wilbur D, Wright T Jr, Young N; Forum Group Members; Bethesda 2001 Workshop. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA.* 2002;287:2114-9
14. Luesley D, Leeson S. Colposcopy and Programme Management. Guidelines for the NHS Cervical Screening Programme. NHSCSP Publication No. 20. Sheffield: NHS Cancer Screening Programmes; 2004.
15. Parkin DM, Bray F. Chapter 2: the burden of HPV-related cancers. *Vaccine* 2006;24 (Suppl 3):S3/11–25.
16. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010; 127(12): 2893-917.
17. Tseng HF, Morgenstern H, Mack TM, Peters RK. Risk factors for anal cancer: results of a population-based case–control study. *Cancer Causes Control* 2003;14:837–46.
18. Frisch M, Biggar RJ, Goedert JJ. Human papillomavirus-associated cancers in



patients with human immunodeficiency virus infection and acquired immunodeficiency syndrome. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:1500–10.

19. Melbye M, Coté TR, Kessler L, Gail M, Biggar RJ. High incidence of anal cancer among AIDS patients. The AIDS/Cancer Working Group. *Lancet* 1994;343:636–9.

20. Goldie SJ, Kuntz KM, Weinstein MC, Freedberg KA, Palefsky JM. Cost effectiveness of screening for anal squamous intraepithelial lesions and anal cancer in human immunodeficiency virus-negative homosexual and bisexual men. *Am J Med* 2000;108:634–41.

21. Goldie SJ, Kuntz KM, Weinstein MC, Freedberg KA, Welton ML, Palefsky JM. The clinical effectiveness and cost-effectiveness of screening for anal squamous intraepithelial lesions in homosexual and bisexual HIV-positive men. *JAMA* 1999;281:1822–9.

22. Cancer Statistics. Surveillance Epidemiology and End Results, National Cancer Institute. [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2007/results\\_single/sect\\_01\\_table.01.pdf](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2007/results_single/sect_01_table.01.pdf).

23. Edgren G, Sparén P. Risk of anogenital cancer after diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia: a prospective population-based study. *Lancet Oncol* 2007;8:311–6.

24. Park IU, Ogilvie Jr JW, Anderson KE, Li ZZ, Darrah L, Madoff R, et al. Anal human papillomavirus infection and abnormal anal cytology in women with genital neoplasia. *Gynecol Oncol* 2009;114:399–403.

25. Valari O, Koliopoulos G, Karakitsos P, *et al.* Human papillomavirus DNA and mRNA positivity of the anal canal in women with lower genital tract HPV lesions: Predictors and clinical implications. *Gynecol Oncol* 2011; 122(3): 505-8.
26. Valasoulis G, Koliopoulos G, Founta C, *et al.* Alterations in human papillomavirus-related biomarkers after treatment of cervical intraepithelialneoplasia. *Gynecol Oncol* 2011; 121(1): 43-8.
27. Paraskevoidis E, Koliopoulos G, Alamanos Y, Malamou-Mitsi V, Lolis ED, Kitchener HC. Human papillomavirus testing and the outcome of treatment for cervical intraepithelial neoplasia. *Obstetrics and Gynecology* 2001; 98: 833-8
28. Verguts J, Bronselaer B, Donders G, Arbyn M, Van Eldere J, Drijkoningen M, *et al.* Prediction of recurrence after treatment for high-grade cervical intraepithelial neoplasia: the role of human papillomavirus testing and age at conisation. *BJOG* 2006;113:1303–7.
29. Kyrgiou M, Koliopoulos G, Martin-Hirsch P, Arbyn M, Prendiville W, Paraskevoidis E. Obstetric outcomes after conservative treatment for intraepithelial or early invasive cervical lesions: systematic review and meta-analysis. *Lancet* 2006; 367: 489-97
30. Arbyn M, Kyrgiou M, Simoens C, *et al.* Peri-natal mortality and other severe adverse pregnancy outcomes associated with treatment of cervical intraepithelial neoplasia: a metaanalysis. *Br Med J* 2008; 337: 1284-96
31. Burchell AN, Richardson H, Mahmud SM, *et al.* Modeling the sexual transmissibility of human papillomavirus infection using stochastic computer simulation and empirical data from a cohort study of young women in Montreal, Canada. *Am J Epidemiol* 2006; 163: 534-43.

32. Trottier H, Ferreira S, Thomann P, *et al.* Human papillomavirus infection and reinfection in adult women: the role of sexual activity and natural immunity. *Cancer Res* 2010; 70(21): 8569-77.
33. Goodman MT, Shvetsov YB, McDuffie K, *et al.* Sequential acquisition of human papillomavirus (HPV) infection of the anus and cervix: the Hawaii HPV Cohort Study. *J Infect Dis* 2010; 201(9):1331-9.
34. Hernandez BY, McDuffie K, Zhu X, *et al.* Anal human papillomavirus infection in women and its relationship with cervical infection. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14(11 Pt 1): 2550- 6.
35. Chandra A, Mosher WD, Copen C. Sexual Behavior, Sexual Attraction, and Sexual Identity in the United States: Data From the 2006-2008 National Survey of Family Growth. *National Health Statistics Reports* 2011; 36
36. Calore EE, Giaccio CM, Nadal SR. Prevalence of anal cytological abnormalities in women with positive cervical cytology. *Diagn Cytopathol* 2011 May; 39(5): 323-7.
37. Crawford R, Grignon AL, Kitson S, *et al.* High prevalence of HPV in non-cervical sites of women with abnormal cervical cytology. *BMC Cancer* 2011; 11: 473.
38. Santoso JT, Long M, Crigger M, Wan JY, Haefner HK. Anal intraepithelial neoplasia in women with genital intraepithelial neoplasia. *Obstet Gynecol* 2010;116: 578–82.
39. Mathews WC, Sitapati A, Caperna JC, Barber RE, Tugend A, Go U. Measurement characteristics of anal cytology, histopathology, and high-resolution anoscopic visual impression in an anal dysplasia screening program. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2004;37:1610–5.

40. Palefsky JM, Holly EA, Hogeboom CJ, Berry JM, Jay N, Darragh TM. Anal cytology as a screening tool for anal squamous intraepithelial lesions. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1997;14:415–22.
41. Gingelmaier A, Weissenbacher T, Kost B, Kaestner R, Sovric M, Mylonas I, et al. Anal cytology as a screening tool for early detection of anal dysplasia in HIV infected women. *Anticancer Res* 2010;30:1719–23.
42. Koliopoulos G, Arbyn M, Martin-Hirsch P, Kyrgiou M, Prendiville W, Paraskeva E. Diagnostic accuracy of human papillomavirus testing in primary cervical screening: a systematic review and meta-analysis of non-randomized studies. *Gynecol Oncol* 2007;104:232–46.
43. Coquillard G, Palao B, Patterson BK. Quantification of intracellular HPV E6/E7mRNA expression increases the specificity and positive predictive value of cervical cancer screening compared to HPV DNA. *Gynecol Oncol* 2011;120:89–93.
44. Arbyn M, Sasieni P, Meijer CJ, Clavel C, Koliopoulos G, Dillner J. Chapter 9: clinical applications of HPV testing: a summary of meta-analyses. *Vaccine* 2006;24(Suppl 3): S3/78–89.
45. Aerssens A, Claeys P, Beerens E, Garcia A, Weyers S, Van Renterghem L, et al. Prediction of recurrent disease by cytology and HPV testing after treatment of cervical intraepithelial neoplasia. *Cytopathology* 2009;20:27–35.
46. Eckert L. Screening for anal dysplasia in women with cervical, vaginal, or vulvar dysplasia: yes, no, maybe? *Obstet Gynecol* 2010;116:566–7.



