



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ

ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ –ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

**«ΚΥΤΤΑΡΟΛΟΓΙΚΟΙ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΩΣ ΚΡΙΤΗΡΙΑ
ΔΙΑΛΟΓΗΣ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΥΨΗΛΟΒΑΘΜΕΣ ΕΝΔΟΕΠΙΘΗΛΙΑΚΕΣ
ΑΛΛΟΙΩΣΕΙΣ ΤΡΑΧΗΛΟΥ»**

ΓΚΡΙΤΖΕΛΗ ΣΤΕΡΓΙΑΝΗ

ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΟΣ – ΜΑΙΕΥΤΗΡΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2015



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ –ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

**«ΚΥΤΤΑΡΟΛΟΓΙΚΟΙ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΩΣ ΚΡΙΤΗΡΙΑ
ΔΙΑΛΟΓΗΣ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΥΨΗΛΟΒΑΘΜΕΣ ΕΝΔΟΕΠΙΘΗΛΙΑΚΕΣ
ΑΛΛΟΙΩΣΕΙΣ ΤΡΑΧΗΛΟΥ»**

ΓΚΡΙΤΖΕΛΗ ΣΤΕΡΓΙΑΝΗ
ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΟΣ – ΜΑΙΕΥΤΗΡΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2015

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος).»

Ημερομηνία αίτησης της κ. Γκριζέλι Στεργιανής: 8-12-2008

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 653^α /3-2-2009

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Παρασκευαΐδης Ευάγγελος Καθηγητής Μαιευτικής – Γυναικολογίας του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Δαλκαλίτσης Νικόλαος Αναπληρωτής Καθηγητής Μαιευτικής – Γυναικολογίας του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Πασχόπουλος Μηνάς Επίκουρος Καθηγητής Μαιευτικής – Γυναικολογίας του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 17-6-2003

«Κυτταρολογικοί και μοριακοί δείκτες ως κριτήρια ασθενών με υψηλόβαθμες ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις τραχήλου της μήτρας»

ΛΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ 771^α/ 28-11-2014

Δαλκαλίτσης Νικόλαος	Καθηγητής Μαιευτικής–Γυναικολογίας με έμφαση στην Γυναικολογική Ενδοσκόπηση του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
Ζηκόπουλος Κωνσταντίνος	Καθηγητής Μαιευτικής–Γυναικολογίας με έμφαση στην Υποβοηθούμενη Αναπαραγωγή του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
Καρακίτσιος Πέτρος	Καθηγητής Κυτταρολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου ΕΚΠΑ
Λουφόπουλος Αριστοτέλης	Καθηγητής Μαιευτικής–Γυναικολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου ΑΠΘ
Παρασκευαΐδης Ευάγγελος	Καθηγητής Μαιευτικής–Γυναικολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
Πασχόπουλος Μηνάς	Καθηγητής Μαιευτικής–Γυναικολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
Ναυρόζογλου Ιορδάνης	Αναπληρωτής Καθηγητής Μαιευτικής–Γυναικολογίας με έμφαση στην Γυναικολογική Ογκολογία και Παθολογία του Μαστού του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό«ΑΡΙΣΤΑ» στις 13-3-2015

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ γραμματέας του Τμήματος

Μηνάς Πασχόπουλος

Καθηγητής Μαιευτικής–Γυναικολογίας

ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ

Στον πατέρα μου που έφυγε νωρίς....

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διατριβή διεξήχθη στο Ιατρείο Κολποσκόπησης της Μαιευτικής-Γυναικολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων υπό τη διεύθυνση του καθηγητή Ε. Παρασκευαΐδη σε συνεργασία με το Εργαστήριο Κυτταρολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου «Αττικόν» υπό τη διεύθυνση του καθηγητή Π. Καρακίτσου.

Το θέμα ήταν μια έμπνευση του καθηγητή μου και επιβλέποντα της διατριβής μου Ε. Παρασκευαΐδη του οποίου η ενασχόληση με την παθολογία του τραχήλου μετρά αρκετές δεκαετίες και η συμβολή του στην εξέλιξη του τομέα αυτού ήταν καθοριστική όπως αποδεικνύεται από πληθώρα επιστημονικών δημοσιεύσεων. Η αρχική σκέψη ξεκίνησε μετά τη διαπίστωση και επιστημονική τεκμηρίωση (Kyrgiou et al 2006; 2012) ότι η θεραπεία των προ-καρκινικών ενδοεπιθηλιακών αλλοιώσεων του τραχήλου της μήτρας μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρές επιπλοκές σε μελλοντικές κυήσεις που αφορούν κυρίως την προωρότητα και παρατηρούνται ακόμη και με τη συνήθη μέθοδο θεραπείας που είναι η Loop εκτομή (LLETZ).

Σε μια προσπάθεια λοιπόν ελάττωσης κατά το μέγιστο δυνατό των μη απαραίτητων επεμβάσεων στον τράχηλο, σκεφτήκαμε να αναζητήσουμε άλλους αξιόπιστους τρόπους παρακολούθησης των γυναικών με ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις, δείκτες δηλαδή κυτταρολογικούς και μοριακούς των οποίων η ευαισθησία και η ειδικότητα θα επιτρέπει μια ασφαλή παρακολούθηση. Η δική μου διδακτορική μελέτη επικεντρώθηκε στην ανίχνευση της αξιοπιστίας αυτών των δεικτών για τις υψηλόβαθμες ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις τραχήλου, μια ιδέα που αρχικά θεωρήθηκε ανατρεπτική ακόμα και από την ομάδα μας, στην πορεία όμως διαπιστώθηκε ότι ήταν εφικτή και υλοποιήσιμη.

Η διατριβή μου αποτελείται από δύο μέρη, το γενικό και το ειδικό. Το γενικό μέρος περιλαμβάνει μια ανασκόπηση της βιβλιογραφίας όσον αφορά την επίπτωση του καρκίνου του τραχήλου, την επιδημιολογία και φυσική ιστορία της HPV λοίμωξης και τις μεθόδους προληπτικού ελέγχου του καρκίνου και των προ-καρκινικών αλλοιώσεων. Τέλος γίνεται αναφορά στις στρατηγικές αντιμετώπισης των υψηλόβαθμων ενδοεπιθηλιακών αλλοιώσεων και τις μακροπρόθεσμες επιπλοκές της θεραπείας τους.

Στο ειδικό μέρος γίνεται λεπτομερής περιγραφή του σκοπού της διατριβής και της μεθοδολογίας διεξαγωγής της. Επίσης περιγράφονται αναλυτικά οι κυτταρολογικοί και μοριακοί δείκτες που ανιχνεύθηκαν και τα τεχνικά χαρακτηριστικά των μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν. Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα αποτελέσματα

της στατιστικής ανάλυσης όλων των παραμέτρων που μελετήθηκαν και η ερμηνεία τους και τέλος επιγραμματικά αναφέρονται τα συμπεράσματα που προκύπτουν από τη διατριβή αυτή.

Πριν προχωρήσω στην ανάπτυξη του κύριου μέρους της διατριβής μου αισθάνομαι βαθύτατα την ανάγκη να ευχαριστήσω θερμά και δημοσίως τον καθηγητή μου Ευάγγελο Παρασκευαΐδη, τον άνθρωπο που με το ανήσυχο και δημιουργικό πνεύμα του με ενέπνευσε, με παρότρυνε και με στήριξε στην εκπόνηση αυτής της διατριβής συμβάλλοντας καταλυτικά στην ολοκλήρωση της επιστημονικής μου κατάρτισης.

Επίσης ευχαριστώ ιδιαίτερος τους καθηγητές μου και μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής Νικόλαο Δαλκαλίτση και Μηνά Πασχόπουλο οι οποίοι ήταν πάντα στη διάθεση μου στηρίζοντάς με ποικιλοτρόπως και η συνεργασία μου μαζί τους ήταν άκρως εποικοδομητική. Θα ήθελα επιπλέον να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον καθηγητή και διευθυντή του Εργαστηρίου Κυτταρολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου «Αττικόν», Πέτρο Καρακίτσο και τους συνεργάτες του χωρίς την πολύτιμη βοήθεια των οποίων δεν θα ήταν εφικτή η ολοκλήρωση αυτής της διατριβής. Θεωρώ επίσης υποχρέωση μου να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής, Καθηγητές Μαιευτικής-Γυναικολογίας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Κων/νο Ζηκόπουλο και Ιορδάνη Ναυρόζογλου και τον Καθηγητή Μαιευτικής-Γυναικολογίας του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης Αριστοτέλη Λουφόπουλο για τη συμβολή τους στην ολοκλήρωση αυτού του πονήματος.

Οφείλω επίσης ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλα τα μέλη της ομάδας που δουλέψαμε μαζί στο Ιατρείο Κολποσκόπησης, πολύτιμους φίλους και συνεργάτες που συνέβαλλαν στα διάφορα στάδια της διεξαγωγής αυτής της έρευνας. Ιδιαίτερα ευχαριστώ τη συνάδελφο Γυναικολόγο/Μαιευτήρα Κύργιου Μάρα η βοήθεια της οποίας με την εμπειρία και τη γνώση της πάνω στο αντικείμενο της παθολογίας τραχήλου υπήρξε καταλυτική.

Τέλος θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην οικογένεια μου και ιδιαίτερα στον άντρα μου για την κατανόηση, την υπομονή και την στήριξη τους κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της διδακτορικής μου διατριβής.

Πίνακας περιεχομένων

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	6
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	7
ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΤΡΑΧΗΛΟΥ ΤΗΣ ΜΗΤΡΑΣ	7
1.1. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑΣ	7
1.2. ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ	7
1.2.1 ΛΟΙΜΩΞΗ ΜΕ ΤΟΝ ΙΟ ΤΩΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ ΘΗΛΩΜΑΤΩΝ (HPV).....	8
i) ΔΟΜΗ ΤΟΥ HPV – ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΥΠΟΤΥΠΩΝ	8
ii) ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΜΕΤΑΔΟΣΗ ΤΟΥ HPV.....	10
iii) ΦΥΣΙΚΗ ΙΣΤΟΡΙΑ ΤΗΣ HPV ΛΟΙΜΩΞΗΣ.....	11
1.2.2 HPV ΚΑΙ ΤΡΑΧΗΛΙΚΗ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ	12
i) Ο ρόλος των ογκοπρωτεϊνών	12
ii) Ο ρόλος της ενσωμάτωσης του ιού στο γονιδίωμα του κυττάρου-ξενιστή	12
1.2.3. ΑΛΛΟΙ ΠΡΟΔΙΑΘΕΣΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ	13
i) Κάπνισμα.....	13
ii) Αντισυλληπτικά.....	13
iv) Πολυτοκία.....	13
v) Κατάσταση του ανοσοποιητικού	14
1.2.4. ΑΛΛΕΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ.....	14
i) Έρπης γεννητικών οργάνων (τύπου II).....	14
ii) Χλαμύδια τραχώματος	14
iii) Ιός επίκτητης ανοσοανεπάρκειας (HIV)	14
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	15
ΠΡΟΛΗΠΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ (Screening).....	15
2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	15
2.2. ΣΥΜΒΑΤΙΚΗ ΚΥΤΤΑΡΟΛΟΓΙΑ (Τεστ Παπανικολάου)	18
2.2.1 Περιορισμοί της συμβατικής κυτταρολογίας.....	18

2.3.	ΚΥΤΤΑΡΟΛΟΓΙΑ ΥΓΡΗΣ ΦΑΣΗΣ (LBC)	19
2.4.	ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΟΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΑΛΛΟΙΩΣΕΩΝ.....	19
2.5.	ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΕΝΔΟΕΠΙΘΗΛΙΑΚΩΝ ΑΛΛΟΙΩΣΕΩΝ	22
2.5.1	ΑΤΥΠΑ ΠΛΑΚΩΔΗ ΚΥΤΤΑΡΑ (ASC-).....	22
2.5.2	ΧΑΜΗΛΟΒΑΘΜΕΣ ΕΝΔΟΕΠΙΘΗΛΙΑΚΕΣ ΑΛΛΟΙΩΣΕΙΣ (LSIL).....	23
2.5.3	ΥΨΗΛΟΒΑΘΜΕΣ ΕΝΔΟΕΠΙΘΗΛΙΑΚΕΣ ΑΛΛΟΙΩΣΕΙΣ (HSIL)	24
2.6.	ΑΛΛΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΔΙΑΛΟΓΗΣ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΤΡΑΧΗΛΟΥ ΤΗΣ ΜΗΤΡΑΣ.....	25
2.6.1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	25
2.6.2.	ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΤΟΥ HPV-DNA	26
i)	In situ υβριδοποίηση (ISH)	26
ii)	Hybrid Capture II	26
iii)	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	26
2.6.3.	ΚΛΙΝΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΟΥ HPV-DNA ΤΕΣΤ	27
2.6.4.	ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΤΟΥ m-RNA ΤΟΥ HPV	28
i)	Nucleic Acid Sequence-Based amplification (NASBA)	28
ii)	Κυτταρομετρία ροής.....	29
2.7.	ΚΟΛΠΟΣΚΟΠΗΣΗ	30
2.7.1.	Η κολποσκόπηση ως εργαλείο προληπτικού ελέγχου.....	30
2.7.2.	Διαγνωστική ακρίβεια της κολποσκόπησης.....	31
	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.....	33
	ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΤΩΝ ΥΨΗΛΟΒΑΘΜΩΝ ΕΝΔΟΕΠΙΘΗΛΙΑΚΩΝ ΑΛΛΟΙΩΣΕΩΝ ΤΟΥ ΤΡΑΧΗΛΟΥ	33
3.1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	33
3.2	ΔΙΑΓΝΩΣΗ.....	34
3.3	ΘΕΡΑΠΕΙΑ.....	36
3.4	ΜΑΚΡΟΠΡΟΘΕΣΜΕΣ ΕΠΙΠΛΟΚΕΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ.....	37
	ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	39
1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	40

2. ΣΚΟΠΟΣ	42
3. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ.....	44
3. 1 ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	44
3.2. ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ	46
3.2.1 Μορφολογική κυτταρολογία υγρής φάσης	46
3.2.2. HPV-DNAtest	47
3.2.3. Ανοσοκυτοχημική ανίχνευση του p16	47
3.2.4. Ανίχνευση του m-RNA (E6/E7) με κυτταρομετρία ροής	47
3.2.5. Ανίχνευση του m-RNA (E6/E7) με NASBA	48
3.2.6. Μίκρο-φασματοσκοπία (micro-spectroscopy).....	49
4.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	52
4.1. ΠΙΘΑΝΕΣ ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ	57
4.2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ	62
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	65
5.1 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ.....	69
6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	70
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	71
SUMMARY	74
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	79

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΤΡΑΧΗΛΟΥ ΤΗΣ ΜΗΤΡΑΣ

1.1. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑΣ

Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας είναι ο δεύτερος σε συχνότητα καρκίνος παγκοσμίως μεταξύ των γυναικών ηλικίας 15-44 ετών, με περισσότερες από 527000 νέες περιπτώσεις να έχουν διαγνωστεί μόνο το έτος 2012 (Ferlay *J et al* 2015).

Πάνω από 85% της παγκόσμιας επιβάρυνσης από τη νόσο παρατηρείται στις αναπτυσσόμενες χώρες όπου υπολογίζεται ότι αποτελεί το 13% του συνόλου των καρκίνων στις γυναίκες. Περιοχές «υψηλού» κινδύνου αποτελούν η Ανατολική και Δυτική Αφρική (> 30/100000 γυναίκες), η Νότια Αφρική(26,8/100000 γυναίκες) και η Νότια –Κεντρική Ασία (24,6/100000 γυναίκες) ενώ οι δείκτες είναι χαμηλότεροι στη Δυτική Ασία, Βόρεια Αμερική και Αυστραλία/Νέα Ζηλανδία (<6/100000 γυναίκες). Η επίπτωση του καρκίνου του τραχήλου στη θνησιμότητα είναι συνολικά περίπου 52% ενώ μόνο για το έτος 2008 καταγράφηκαν 275000 θάνατοι από τη νόσο το 88% των οποίων στις χώρες του αναπτυσσόμενου κόσμου.

Στην Ευρώπη ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας είναι ο 6^{ος} πιο συχνός καρκίνος στις γυναίκες με περίπου 58.400 νέα περιστατικά να έχουν διαγνωστεί το έτος 2012. Η μεγαλύτερη επίπτωση της νόσου για τη χρονιά αυτή παρατηρήθηκε στη Ρουμανία και η μικρότερη στην Ελβετία (Ferlay *J et al* 2015).

Στην Ελλάδα μέχρι σήμερα δεν υπάρχει οργανωμένο δίκτυο καταγραφής των επιδημιολογικών δεδομένων του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Παρόλα αυτά από δεδομένα εγγράφων από τη βάση δεδομένων Υγείας του Ο.Ο.ΣΑ (Οργανισμός Οικονομικής Συνεργασίας και Ανάπτυξης) προκύπτει ότι η επίπτωση της νόσου για τη χρονική περίοδο 2000-2005 ήταν 9,3/100000 γυναίκες και η θνησιμότητα 1,8/100000 γυναίκες.

1.2. ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Ο κυριότερος αιτιολογικός παράγοντας για την ανάπτυξη καρκίνου του τραχήλου της μήτρας θεωρείται σήμερα η λοίμωξη από συγκεκριμένους τύπους του ιού των ανθρωπίνων θηλωμάτων (HPV) το DNA του οποίου ανιχνεύεται με τις κατάλληλες διαγνωστικές τεχνικές σχεδόν σε όλα τα δείγματα από διηθητικό καρκίνο εκ πλακωδών κυττάρων, στο 95% των προκαρκινικών αλλοιώσεων αλλά και στα αδενοκαρκινώματα του τραχήλου της μήτρας. Άλλοι παράγοντες που προδιαθέτουν

ορισμένες γυναίκες στο να εμφανίσουν τραχηλικές δυσπλασίες ή/και διηθητικό καρκίνο είναι:

-το κάπνισμα

-η χρήση αντισυλληπτικών χαπιών

-η πολυτοκία

-η γενετική προδιάθεση και η κατάσταση του ανοσοποιητικού

-η συνυπάρχουσα μόλυνση του γενετικού σωλήνα από άλλους παθογόνους μικροοργανισμούς (χλαμύδια, έρπης γεννητικών οργάνων τύπου 2)

-η έκθεση στον ιό της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV).

1.2.1 ΛΟΙΜΩΞΗ ΜΕ ΤΟΝ ΙΟ ΤΩΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ ΘΗΛΩΜΑΤΩΝ (HPV)

Σύμφωνα με όσα γνωρίζουμε τις τελευταίες τρεις δεκαετίες η λοίμωξη από τον ιό HPV είναι « αναγκαία αλλά όχι ικανή» συνθήκη για την ανάπτυξη καρκίνου του τραχήλου της μήτρας (IARC 2007). Σύμφωνα με τα δεδομένα μιας μεγάλης έρευνας το ποσοστό επιπολασμού του HPV ιού στον καρκίνο του τραχήλου είναι πάνω από 99%, το μεγαλύτερο που έχει ποτέ αποδοθεί σε συγκεκριμένο αιτιολογικό παράγοντα για καρκίνο (Walboomers *et al* 1999) γι' αυτό και ο HPV έχει χαρακτηριστεί ως ογκογόνος ιός. Η αρχική απόδειξη ότι ο καρκίνος του τραχήλου θα μπορούσε να αποδοθεί σε λοίμωξη από τον HPV ιό προήλθε από τον zurHausen και τους συνεργάτες του το 1970 και οι πρώτες κυτταρολογικές και ιστολογικές συσχετίσεις του ιού με τον καρκίνο περιγράφηκαν ταυτόχρονα από τους zurHausen (zurHausen *et al* 1976) και Meisels (Meisels *et al* 1976; 1977). Εικοσιέξι χρόνια αργότερα νεότερα επιδημιολογικά και μοριακά δεδομένα οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι πρακτικά όλες οι περιπτώσεις καρκίνου του τραχήλου της μήτρας καθώς και οι προκαρκινικές αλλοιώσεις οφείλονται σε λοίμωξη από συγκεκριμένο τύπο του ιού (Bosch *et al* 2002; Munoz *et al* 2006).

i) ΔΟΜΗ ΤΟΥ HPV – ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΥΠΟΤΥΠΩΝ

Ο ιός HPV αποτελείται από ομοιοπολικό κλειστό κυκλικό δίκλωνο DNA με διάμετρο 52-55 nm. Το γονιδίωμα του έχει μέγεθος 8.000 ζεύγη βάσεων (8 kilobase-pair) και αποτελείται από:

-Μια πρώιμη περιοχή που περιλαμβάνει 6 πρωτεΐνες (E1,E2,E4,E5, E6 & E7) οι οποίες είναι αναγκαίες για την αντιγραφή του ιού. Ειδικά οι E6 και E7 είναι οι

κυριότερες όγκο-πρωτεΐνες και η παρουσία τους σε καλλιέργειες κερατινοκυττάρων προκαλεί κυτταρικό θάνατο. Οι δυο αυτές πρωτεΐνες είναι οι μοναδικές οι οποίες εκφράζονται σταθερά στον καρκίνο του τραχήλου.

-Μια όψιμη περιοχή που περιλαμβάνει 2 γονίδια (L1 & L2) που κωδικοποιούν δομικές πρωτεΐνες του καψιδίου. Η L1 είναι η πρωτεΐνη από την οποία κατασκευάζονται σωματίδια που προσομοιάζουν στον ιό (VLP) και χρησιμοποιούνται στην κατασκευή των εμβολίων.

-Μια ρυθμιστική περιοχή (long control region LCR) η οποία δεν περιέχει πρωτεΐνες αλλά ρυθμίζει τη μεταγραφή και την έναρξη αντιγραφής του DNA.

Αρχικά θεωρούνταν ότι υπήρχε ένας μόνο τύπος του ιού HPV, με την εξέλιξη όμως των τεχνικών της μοριακής βιολογίας έχουν αναγνωριστεί έως σήμερα πάνω από 100 διαφορετικοί τύποι και επιπλέον 50 έχουν μερικώς χαρακτηριστεί (zurHausen 2000). Η ταξινόμηση των διαφόρων τύπων γίνεται με νούμερα με βάση μικρές διαφορές (<90%) που αναγνωρίζονται στις πρωτεΐνες αυτών (deVilliers 1999). Όλοι οι τύποι του HPV είναι επιθηλιοτρόποι και η παρουσία πλήρως διαφοροποιημένου πλακώδους επιθηλίου είναι απαραίτητη για την ολοκλήρωση του κυτταρικού τους κύκλου. Μολύνονται κυρίως τα κύτταρα της βασικής στιβάδας του επιθηλίου ή τα αδιαφοροποίητα κερατινοκύτταρα και ο κύκλος αντιγραφής του ιού ολοκληρώνεται καθώς αυτά υφίστανται διαφοροποίηση. Έτσι ο ιός συγκεντρώνεται στον πυρήνα των διαφοροποιημένων κερατινοκυττάρων και ανιχνεύεται σ'αυτά κατά την απόπτωση τους από το επιθήλιο (Bryan et al 2001). Περίπου 40 διαφορετικοί τύποι του HPV μπορούν να μολύνουν το γεννητικό σωλήνα και η μόλυνση αυτή προκαλεί μια ποικιλία κλινικών καταστάσεων όπως: ασυμπτωματική λοίμωξη, γεννητικά κονδυλώματα, κυτταρολογικές ανωμαλίες του τραχηλικού επιθηλίου, προκαρκινικές αλλοιώσεις και διηθητικό καρκίνο του τραχήλου. Οι διάφοροι τύποι του ιού ταξινομούνται σε δύο κατηγορίες:

A) «Υψηλού κινδύνου» τύποι (HR-HPV)

B) «Χαμηλού κινδύνου» τύποι (LR-HPV)

ανάλογα με το αν κάποιος απ' αυτούς μπορεί να ανιχνευθεί σε δείγματα καρκίνου.

Οι «χαμηλού» κινδύνου τύποι (όπως HPV 6 & 11) σχετίζονται συνήθως με καλοήθεις αλλοιώσεις όπως τα γεννητικά κονδυλώματα (condylomata acuminata) και χαμηλού βαθμού τραχηλικές δυσπλασίες (Brown et al 1999). Οι «υψηλού» κινδύνου τύποι προκαλούν χαμηλού και υψηλού βαθμού δυσπλασίες στον τράχηλο αλλά και καρκίνο. Ιδιαίτερως οι τύποι 16 και 18 ενοχοποιούνται για την ανάπτυξη του 70% των καρκινωμάτων του τραχήλου της μήτρας γι'αυτό και έχουν χαρακτηριστεί από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO) ως ανθρώπινοι καρκινογόνοι παράγοντες

(Munoz *et al* 1999). Στον πίνακα 1.1 βλέπουμε τις δύο κατηγορίες των τύπων του HPV.

Πίνακας 1.1 Οι δύο κατηγορίες των τύπων του HPV.

Υψηλού κινδύνου (HR)	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58,59, 66, 68, 69, 73,82
Χαμηλού κινδύνου (LR)	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, 89

Από μια μέτα-ανάλυση (Clifford *et al* 2003) προκύπτει ότι πέντε από τους υψηλού κινδύνου τύπους (16,18,31,33,45) είναι οι συχνότεροι σε υψηλόβαθμες δυσπλασίες και αποτελούν το 97% των ογκογόνων τύπων που ανιχνεύονται σε διηθητικά καρκινώματα στην Ευρώπη και τη Βόρεια Αμερική.

ii) ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΜΕΤΑΔΟΣΗ ΤΟΥ HPV

Η μόλυνση από τον ιό HPV είναι αρκετά συχνή με αποτέλεσμα κάθε σεξουαλικά ενεργή γυναίκα να κινδυνεύει να προσβληθεί από HPV κάποια στιγμή στη ζωή της. Συγκεκριμένα το 60% των σεξουαλικά ενεργών νέων γυναικών θα έχει λοίμωξη από έναν ή περισσότερους τύπους HPV μέσα σε 5 έτη από την έναρξη της σεξουαλικής τους δραστηριότητας. Στις ΗΠΑ για παράδειγμα όπου ο μέσος όρος έναρξης της σεξουαλικής δραστηριότητας είναι τα 16 έτη, στην ηλικία των 21 ετών το 75% των γυναικών θα έχουν μολυνθεί από τον ιό. Η υψηλότερη συχνότητα διάδοσης της λοίμωξης παρατηρείται μεταξύ νέων γυναικών <25 ετών (Ho *et al* 1998; Sellors *et al* 2003). Εν τούτοις και μολονότι ο αριθμός των νέων λοιμώξεων μειώνεται με την ηλικία, ο κίνδυνος διατήρησής τους σε εμμένουσα λοίμωξη αυξάνεται (Castle *et al* 2005). Ο κίνδυνος λοίμωξης αυξάνεται επίσης με τον αριθμό των νέων σεξουαλικών συντρόφων καθώς και με το συνολικό αριθμό των σεξουαλικών συντρόφων. Η πλειοψηφία των λοιμώξεων σε άνδρες και γυναίκες είναι ασυμπτωματικές αλλά ακόμα και τα ασυμπτωματικά άτομα μεταδίδουν τη λοίμωξη τόσο αποτελεσματικά όσο και αυτά με τις ορατές αλλοιώσεις. Ο συνηθέστερος τρόπος μετάδοσης του ιού είναι μέσω γενετήσιας επαφής ή ακόμη και μέσω έμμεσης (δερματικής) επαφής όπως στην περίπτωση των ιών που προκαλούν τα δερματικά κονδυλώματα (Partridge *et al* 2006). Η χρήση του προφυλακτικού δεν προστατεύει πλήρως από τη μετάδοση του ιού, ωστόσο μειώνει τον κίνδυνο λοίμωξης (Winer *et al* 2006).

Τέλος η περιγεννητική μετάδοση από μητέρα που πάσχει στο νεογέννητο είναι μεν πιθανή αλλά θεωρείται εξαιρετικά σπάνια και παροδική.

iii) ΦΥΣΙΚΗ ΙΣΤΟΡΙΑ ΤΗΣ HPV ΛΟΙΜΩΞΗΣ

Σύμφωνα με επιδημιολογικά δεδομένα από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (W.H.O.) για κάθε 1.000.000 γυναίκες με HPV λοίμωξη 100.000 θα αναπτύξουν ενδοεπιθηλιακές νεοπλασίες τραχήλου βαθμού 1 και 2 (CINI&II), 8000 θα αναπτύξουν ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία βαθμού 3 (CINIII) και περίπου 1600 θα αναπτύξουν διηθητικό καρκίνο του τραχήλου αν δεν εντοπιστούν και θεραπευθούν εγκαίρως οι προκαρκινικές αλλοιώσεις. Επομένως ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας είναι το σπάνιο αποτέλεσμα μιας συνηθισμένης λοίμωξης με κάποιο ογκογόνο στέλεχος του ιού HPV (Bosch et al 2002). Οι περισσότερες από αυτές τις HPV λοιμώξεις είναι ασυμπτωματικές, υποκλινικές, έχουν ασαφή περίοδο επώασης (εβδομάδες έως μήνες για τα κονδυλώματα και αρκετοί μήνες έως χρόνια για τις τραχηλικές ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις) και συνήθως υποστρέφουν χωρίς θεραπεία. Απαραίτητη όμως προϋπόθεση για την ανάπτυξη καρκίνου είναι η παρουσία εμμένουσας (πάνω από 6-12 μήνες) λοίμωξης με υψηλού κινδύνου τύπους του ιού χωρίς ωστόσο αυτό να είναι αρκετό αφού η πλειοψηφία των γυναικών που φέρουν αυτούς τους τύπους δεν εμφανίζουν τη νόσο. Παράγοντες κινδύνου για εμμονή της λοίμωξης είναι:

- Βλάβες στους μηχανισμούς κυτταρικής ανοσίας
- Ανοσοκαταστολή
- Προχωρημένη ηλικία
- Παρουσία «υψηλού κινδύνου» τύπων του ιού.

Γενικότερα ο HPV χαρακτηρίζεται από την ικανότητα να «διαφεύγει» από τους μηχανισμούς κυτταρικής ανοσίας του οργανισμού (Munoz et al 2006; Stanley 2006). Αυτό οφείλεται στο ότι δεν προκαλεί ιαμμία, δεν καταστρέφει άμεσα τα κύτταρα του ξενιστή (ενσωματώνεται σ' αυτά), δεν ενεργοποιεί τα αντιγονοπαραγωγά κύτταρα του επιθηλίου (APCs) καθυστερώντας έτσι τη φλεγμονώδη απάντηση του οργανισμού και τέλος επηρεάζει τις οδούς της ειδικής τοπικής ανοσίας. Έτσι η φυσική λοίμωξη με τον ιό δεν οδηγεί πάντα σε επαρκή ανοσία για να προστατευθεί ο οργανισμός από μελλοντικές λοιμώξεις από τον ίδιο ή άλλους τύπους του ιού. Γι' αυτό και κατά τη διάρκεια της ενεργού σεξουαλικής ζωής τους οι γυναίκες κινδυνεύουν τόσο από νέες λοιμώξεις με ογκογόνους τύπους του ιού όσο και από επαναλοίμωξη (Mayrand et al 2000; Viscidi et al 2004).

1.2.2 HPV ΚΑΙ ΤΡΑΧΗΛΙΚΗ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ

i) Ο ρόλος των ογκοπρωτεϊνών

Βασικό ρόλο στην ογκογόνο δράση του HPV ιού έχουν οι δύο σημαντικότερες ογκοπρωτεΐνες του E6 και E7. Από μελέτες της τραχηλικής καρκινογένεσης σε ζωικά μοντέλα, προκύπτει ότι ενώ η E7 ογκοπρωτεΐνη από μόνη της προκαλεί μικροδιηθητικό καρκίνο η E6 από μόνη της δεν προκαλεί ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία ή διηθητικό καρκίνο. Η συνδυασμένη όμως δράση των E6 και E7 προκαλεί μεγάλους εξαιρετικά διηθητικούς καρκίνους και είναι οι μοναδικές δύο ογκοπρωτεΐνες του ιού που ανιχνεύονται σταθερά στον καρκίνο του τραχήλου (Riley *et al* 2003). Η δράση τους αυτή επιτυγχάνεται κυρίως μέσω δύο οδών. Η πρώτη αφορά την αποδόμηση της p53 ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης μέσω της αλληλεπίδρασης της με την E6 ογκοπρωτεΐνη των στελεχών υψηλού κινδύνου, ενώ η δεύτερη την απενεργοποίηση ή και αποδόμηση της Rb πρωτεΐνης μέσω της δράσης της E7 ογκοπρωτεΐνης.

Η διαφορά στην ογκογονική δραστηριότητα μεταξύ υψηλού και χαμηλού κινδύνου τύπων του HPV οφείλεται σε ποσοτικές και ποιοτικές διαφορές των ογκοπρωτεϊνών τους. Για παράδειγμα οι E7 πρωτεΐνες των υψηλού κινδύνου τύπων συνδέονται με μεγαλύτερη συνάφεια με κάποια ογκογονίδια (pRb, p107, p130) απ' ότι οι E7 των χαμηλού κινδύνου τύπων (Demers *et al* 1996). Επίσης οι E6 των υψηλού κινδύνου τύπων στοχεύουν στην αποδόμηση του p53 ενώ των χαμηλού κινδύνου όχι. Τέλος οι E6 και E7 των χαμηλού κινδύνου τύπων δεν προκαλούν αστάθεια του γονιδιώματος του κυττάρου-ξενιστή σε αντίθεση με τις E6 και E7 των υψηλού κινδύνου τύπων που αυτή η ικανότητα τους προάγει την εξέλιξη της τραχηλικής καρκινογένεσης. Η κατανόηση αυτής της δυναμικής διαδικασίας θα προσφέρει μελλοντικά πολλά στην πρόληψη και θεραπεία των HPV σχετιζόμενων νεοπλασιών.

ii) Ο ρόλος της ενσωμάτωσης του ιού στο γονιδίωμα του κυττάρου-ξενιστή

Οι λοιμώξεις από HPV είναι πολύ συχνές, ωστόσο μόνο ένα μικρό ποσοστό αυτών εξελίσσεται σε καρκίνο ο οποίος συνήθως αναπτύσσεται πολλά χρόνια μετά τη λοίμωξη. Στην ανάπτυξη του καρκίνου συμβάλλουν εκτός από την ίδια τη λοίμωξη και γενετικές αλλαγές που συμβαίνουν στο γονιδίωμα του κυττάρου-ξενιστή όπως η διαδικασία της ενσωμάτωσης. Στην αρχή της λοίμωξης το γονιδίωμα του ιού βρίσκεται εκτός των χρωμοσωμάτων του κυττάρου-ξενιστή, μετά από μια περίοδο όμως της οποίας η διάρκεια δεν είναι καθορισμένη, εισέρχεται στο DNA αυτών και η όλη διαδικασία, που είναι και το τελευταίο στάδιο του κύκλου ζωής του ιού, ονομάζεται «ενσωμάτωση».

Η ενσωμάτωση σχετίζεται με τη μετάβαση από τις χαμηλόβαθμες στις υψηλόβαθμες αλλοιώσεις του τραχηλικού επιθηλίου (Horman *et al* 2004). Συγκεκριμένα από μια μελέτη (Tonon *et al* 2001) φάνηκε ότι υπήρχε ενσωματωμένο DNA του ιού στο 8% των χαμηλόβαθμων ενδοεπιθηλιακών αλλοιώσεων, στο 67% των υψηλόβαθμων και στο 83% των διηθητικών καρκίνων. Η ενσωμάτωση του HPV σχετίζεται επίσης με γονιδιακή αστάθεια, φτωχή πρόγνωση και αντίσταση στη θεραπεία (Lazo 1999).

1.2.3. ΑΛΛΟΙ ΠΡΟΔΙΑΘΕΣΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Η πλειοψηφία των γυναικών που θα μολυνθούν με τον HPV ιό δεν θα παρουσιάσει ποτέ σοβαρές επιπλοκές από τη λοίμωξη. Επομένως υπάρχουν κάποιοι επιπλέον παράγοντες που προδιαθέτουν ορισμένες γυναίκες στο να εμφανίζουν HPV-σχετιζόμενες τραχηλικές δυσπλασίες. Οι παράγοντες αυτοί είναι:

i) Κάπνισμα

Ενοχοποιείται από παλιά ως προδιαθεσικός παράγοντας για τραχηλική κακοήθεια και αυτό φαίνεται από πολλές μελέτες που έγιναν τις προηγούμενες δεκαετίες (Winkelstein 1977;1989;1990), αλλά και πρόσφατες (Haverkos 2005). Ο καπνός του τσιγάρου περιέχει και μεταφέρει διάφορα χημικά προϊόντα πολλά από τα οποία είναι γνωστά καρκινογόνα και κάποια από αυτά έχουν ανιχνευθεί στην τραχηλική βλέννα των καπνιστών μεταφερόμενα εκεί ίσως αιματογενώς.

Σε τυχαιοποιημένες μελέτες διακοπής του καπνίσματος μεταξύ γυναικών με χαμηλόβαθμες τραχηλικές αλλοιώσεις έχουν προκύψει θετικές επιδράσεις (Cuzick *et al* 1995).

ii) Αντισυλληπτικά

Μεγάλες σειρές μελετών επί πολλά έτη έχουν δείξει μια αντιφατική συσχέτιση μεταξύ των αντισυλληπτικών και του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Ωστόσο είναι δύσκολο να ξεχωρίσει κανείς την επίδραση που έχουν οι συνήθειες των γυναικών που χρησιμοποιούν τα χάπια αυτά σε σχέση με τα ίδια τα χάπια. Πρόσφατες ανασκοπήσεις στη βιβλιογραφία δείχνουν ότι η χρήση αντισυλληπτικών χαπιών για πάνω από πενταετία είναι ήπιος παράγοντας κινδύνου για καρκίνο του τραχήλου της μήτρας (Castle *et al* 2005; Franco *et al* 2003; Smith *et al* 2003).

iv) Πολυτοκία

Θεωρείται επίσης παράγοντας κινδύνου και οι πιθανοί μηχανισμοί που ενοχοποιούνται είναι η πρόκληση τραύματος στον τράχηλο και η διατήρηση ή όχι της ζώνης μετασχηματισμού.

ν) Κατάσταση του ανοσοποιητικού

Αποτελεί καθοριστικό παράγοντα των κλινικών εκδηλώσεων της HPV λοίμωξης. Έχει παρατηρηθεί για παράδειγμα ότι τα κονδυλώματα των γεννητικών οργάνων υποτροπιάζουν κυρίως σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα στα οποία παρατηρείται και αυξημένη επίπτωση καρκίνου του τραχήλου της μήτρας και καρκίνων του πρωκτού. Επίσης σε ασθενείς με μεταμόσχευση νεφρού παρατηρήθηκε υψηλότερη επίπτωση HPV-σχετιζόμενων καρκίνων.

1.2.4. ΑΛΛΕΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ

i) Έρπης γεννητικών οργάνων (τύπου II)

Από μια ανάλυση των δεδομένων επτά μελετών με συνολικά 1262 βιοψίες διηθητικού καρκίνου και 1117 βιοψίες φυσιολογικού επιθηλίου(πληθυσμός ελέγχου) προέκυψε ότι η οροθετικότητα για έρπη γεννητικών οργάνων (τύπου 2) στον πληθυσμό με διηθητικό καρκίνο ήταν υψηλότερη σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου του τραχήλου της μήτρας ήταν σημαντικά υψηλότερος όταν η ανάλυση περιορίστηκε μόνο στις γυναίκες με θετικά HPV-DNA δείγματα και όταν ελήφθησαν υπ' όψιν και άλλοι παράγοντες που είναι δυνατόν να επηρεάσουν το αποτέλεσμα. Η συσχέτιση αυτή του HPV με τον έρπητα των γεννητικών οργάνων παρατηρήθηκε τόσο σε καρκίνο εκ πλακωδών κυττάρων όσο και σε αδενοκαρκίνωμα του τραχήλου (Smith *et al* 2002).

ii) Χλαμύδια τραχώματος

Η λοίμωξη από χλαμύδια έχει επανειλημμένα συσχετιστεί από αρκετές μελέτες με την τραχηλική δυσπλασία και το διηθητικό καρκίνο. Συγκεκριμένα σε μία μεγάλη πληθυσμιακή μελέτη παρατήρησης των HPV – θετικών γυναικών το ιστορικό χλαμυδιακής λοίμωξης ήταν σημαντικός παράγοντας κινδύνου για εμμονή της HPVλοίμωξης (Dillner *et al* 2002).

iii) Ιός επίκτητης ανοσοανεπάρκειας (HIV)

Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας αναγνωρίστηκε ως ένα από τα κριτήρια του συνδρόμου της επίκτητης ανοσοανεπάρκειας (AIDS) για γυναίκες θετικές για HPV λοίμωξη. Αυτό το γεγονός δείχνει ότι πιθανόν να υπάρχει κάποια αιτιολογική συσχέτιση μεταξύ HPV και HIV στην ανάπτυξη καρκίνου του τραχήλου της μήτρας.

Σε μια μελέτη (Massad *et al* 1999) εξετάστηκε η κυτταρολογία του τραχήλου από 1713 HIV-θετικές γυναίκες και 482 HIV-αρνητικές. Κυτταρολογικές αλλοιώσεις στον τράχηλο παρατηρήθηκαν στο 38,3% των HIV-θετικών γυναικών ενώ το αντίστοιχο ποσοστό στις HIV-αρνητικές γυναίκες (ομάδα ελέγχου) ήταν 16.2%.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΠΡΟΛΗΠΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ (Screening).

2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η λογική της εφαρμογής προγραμμάτων πληθυσμιακού ελέγχου για τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας είναι η μείωση της επίπτωσης της νόσου μέσω της έγκαιρης ανίχνευσης και θεραπείας των προ-καρκινικών αλλοιώσεων. Ταυτόχρονα τα προγράμματα αυτά συνεισφέρουν στην βελτίωση της πρόγνωσης και στη μείωση της θνησιμότητας από καρκίνο του τραχήλου με την πρώιμη διάγνωση διηθητικής νόσου.

Για την εκτίμηση των ήδη εγκατεστημένων προγραμμάτων προληπτικού ελέγχου δεν είναι δυνατόν να σχεδιαστούν προοπτικές τυχαίοποιημένες μελέτες παρά μόνο μελέτες παρατήρησης. Μια τέτοια μελέτη διεξήχθη στη Σουηδία από διάφορα κέντρα (Andrae *et al* 2012) για να διερευνηθεί αν και σε ποιο βαθμό η συμμετοχή στα προγράμματα πληθυσμιακού ελέγχου και η ανίχνευση του καρκίνου μέσω αυτών έχει επιπτώσεις στη βελτίωση της πρόγνωσης της νόσου. Από τα αποτελέσματα της μελέτης προκύπτει ότι η πενταετής επιβίωση για τις γυναίκες στις οποίες ο καρκίνος ανιχνεύτηκε μέσω προληπτικού ελέγχου ήταν 95% ενώ σ' αυτές που διαγνώστηκε από τα συμπτώματα ήταν 69%. Αυτή η διαφορά στο ποσοστό επιβίωσης οφείλεται στο ότι ο καρκίνος που ανιχνεύτηκε μέσω προληπτικού ελέγχου ήταν σε πιο πρώιμο στάδιο από ότι αυτός που διαγνώστηκε από τα συμπτώματα. Αλλά ακόμα και στις περιπτώσεις που η διάγνωση τίθεται από τα συμπτώματα ο καρκίνος έχει καλύτερη πρόγνωση (74% πιθανότητες θεραπείας) όταν ανιχνεύεται μέσω προληπτικού ελέγχου παρά αν ανιχνευθεί σε γυναίκες που έχουν περάσει τα χρονικά όρια ελέγχου ή δεν έχουν ελεγχθεί ποτέ (60% πιθανότητες θεραπείας).

Το συμπέρασμα επομένως που προκύπτει από τη μελέτη αυτή είναι ότι όλες οι γυναίκες μπορούν να ωφεληθούν από τα προγράμματα πληθυσμιακού ελέγχου, ανεξάρτητα από προηγούμενη συμμετοχή τους σ' αυτά αυξάνοντας τις πιθανότητες θεραπείας ακόμα και στις περιπτώσεις διηθητικού καρκίνου.

Όσο αφορά τα χρονικά όρια του προληπτικού ελέγχου, τα διαστήματα επανάληψης (3 έτη για ηλικίες 23-50 ετών και 5 έτη για ηλικίες 51-60 ετών) είναι επαρκή για να έχουμε περαιτέρω μείωση της επίπτωσης και της θνησιμότητας από τη νόσο, καθώς πάνω από 3/4 των γυναικών που πέθαναν από καρκίνο του τραχήλου δεν είχαν κάνει τεστ μέσα στα διαστήματα αυτά.

Για την εφαρμογή της κατάλληλης μεθόδου προληπτικού ελέγχου λαμβάνονται υπ' όψιν παράμετροι όπως :

- Η ευαισθησία, δηλαδή η δυνατότητα ανίχνευσης από τον υπό έλεγχο πληθυσμό του ποσοστού των ατόμων που πράγματι έχουν τη νόσο.
- Η ειδικότητα, δηλαδή η δυνατότητα προσδιορισμού από το σύνολο του πληθυσμού που εξετάζεται του ποσοστού των ατόμων που είναι πράγματι υγιείς.
- Η θετική προγνωστική αξία (PPV), αναφέρεται στο ποσοστό του πληθυσμού με θετικά αποτελέσματα στο τεστ που πράγματι έχει τη νόσο.
- Η αρνητική προγνωστική αξία (NPV), αναφέρεται στο ποσοστό του πληθυσμού με αρνητικά αποτελέσματα στο τεστ που πράγματι είναι υγιείς.

Το ιδανικό τεστ προληπτικού ελέγχου είναι αυτό που έχει την υψηλότερη ευαισθησία αλλά και ειδικότητα. Η υψηλή ευαισθησία είναι εξαιρετικά σημαντική γιατί έτσι αναγνωρίζονται όλα τα άτομα που πράγματι νοσούν. Αλλά και η ειδικότητα είναι εξίσου σημαντικό να είναι υψηλή γιατί έτσι αποφεύγονται τα ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα, όταν δηλαδή ενώ το τεστ είναι αρνητικό το άτομο νοσεί. Όταν η ευαισθησία και η ειδικότητα ενός τεστ είναι υψηλές η υψηλή προγνωστική του αξία (η αποφυγή δηλαδή των ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων) εξαρτάται από τον επιπολασμό της νόσου στον πληθυσμό ελέγχου. Έτσι όταν ο επιπολασμός, δηλαδή ο συνολικός αριθμός περιπτώσεων μιας συγκεκριμένης νόσου σε δεδομένο πληθυσμό σε ορισμένο χρόνο, είναι χαμηλός τότε ακόμη και το καλύτερο τεστ έχει περιορισμένη αξία. Η συμβατική κυτταρολογία του τραχήλου (το γνωστό τεστ Παπανικολάου) είναι ένα παράδειγμα επιτυχημένου τεστ προληπτικού ελέγχου που μείωσε δραματικά την επίπτωση και τη θνησιμότητα από τον καρκίνο του τραχήλου όπου εφαρμόστηκε (Solomon 2003). Ο αριθμός των γυναικών με κυτταρολογικές ανωμαλίες που ανιχνεύονται με προληπτικό έλεγχο είναι 20 φορές υψηλότερος από τον αριθμό που αναμένεται να αναπτύξει καρκίνο του τραχήλου αν δεν υπάρξει προληπτικός έλεγχος και περίπου 60 φορές υψηλότερος από τον αριθμό των γυναικών που θα πεθάνουν από καρκίνο του τραχήλου (Raffle *et al* 2003).

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) έχει θεσπίσει ορισμένα κριτήρια για τα προγράμματα μαζικού προληπτικού ελέγχου. Αυτά παρουσιάζονται στον πίνακα 2.1.

Πίνακας 2.1 Χαρακτηριστικά ιδανικού τεστ μαζικού προληπτικού ελέγχου

Πάθηση	<ul style="list-style-type: none">▪ Σημαντικό πρόβλημα υγείας▪ Η επιδημιολογία και φυσική ιστορία της πάθησης πρέπει να είναι γνωστά▪ Ύπαρξη γνωστών παραγόντων κινδύνου, δεικτών της ασθένειας, λανθάνουσας περιόδου ή αρχικού σταδίου
Τεστ	<ul style="list-style-type: none">▪ Πρέπει να είναι απλό και ασφαλές▪ Η κατανομή των τιμών του τεστ στον εξεταζόμενο πληθυσμό πρέπει να είναι γνωστές και ένα αποδεκτό όριο (cut-off) πρέπει να έχει οριστεί▪ Το τεστ πρέπει να είναι αποδεκτό και καλά ανεκτό από το γενικό πληθυσμό▪ Πρέπει να υπάρχει ομοφωνία για τα απαιτούμενα διαγνωστικά τεστ και περαιτέρω αντιμετώπιση του πληθυσμού που έχει θετικό τεστ
Θεραπεία	<ul style="list-style-type: none">▪ Ύπαρξη αποτελεσματικής θεραπείας για τους ασθενείς αρχικού σταδίου▪ Απόδειξη ότι η θεραπεία σε αρχικό στάδιο οδηγεί σε καλύτερο αποτέλεσμα από θεραπεία σε προχωρημένο στάδιο της νόσου
Πρόγραμμα ΜΠΕ	<ul style="list-style-type: none">▪ Πρέπει να υπάρχει απόδειξη ότι το τεστ ΜΠΕ είναι αποτελεσματικό και ελαττώνει τη θνησιμότητα ή νοσηρότητα από την ασθένεια▪ Το τεστ και η σημασία του πρέπει να είναι κατανοητά από τον πληθυσμό▪ Το τεστ πρέπει να είναι κλινικά, κοινωνικά και ηθικά αποδεκτό από τους επαγγελματίες υγείας και τον πληθυσμό▪ Τα πλεονεκτήματα από το πρόγραμμα πρέπει να υπερβαίνουν το φυσιολογικό και ψυχολογικό κόστος▪ Το κόστος (συμπεριλαμβανομένων του τεστ, διάγνωσης και θεραπείας) πρέπει να είναι αποδεκτό▪ Ύπαρξη σχεδίου για έλεγχο της ποιότητας του προγράμματος

2.2. ΣΥΜΒΑΤΙΚΗ ΚΥΤΤΑΡΟΛΟΓΙΑ (Τεστ Παπανικολάου)

Ο πρώτος που μελέτησε τις αλλοιώσεις των καρκινικών κυττάρων σε δείγματα κολπικού επιχρίσματος ήταν ο Γεώργιος Παπανικολάου το 1928, ο οποίος χαρακτήρισε τα κύτταρα αυτά «δυσπλαστικά» εισάγοντας τον όρο αυτό στην κυτταρολογία. Αργότερα ο δρ. Παπανικολάου συνεργαζόμενος με ένα γυναικολόγο τον δρ. Herbert Traut αναγνώρισε κύτταρα διηθητικού καρκίνου αλλά και προκαρκινικών τραχηλικών αλλοιώσεων και αυτή του η ανακάλυψη οδήγησε στο συμπέρασμα ότι προηγείται του καρκίνου στον τράχηλο μια λανθάνουσα προδιηθητική αλλοίωση η οποία μπορεί να ανιχνευθεί με την κυτταρολογία και να αντιμετωπιστεί σε θεραπεύσιμο στάδιο. Έτσι τοποθετήθηκαν οι βάσεις για την εφαρμογή της κυτταρολογίας ως μεθόδου πληθυσμιακού ελέγχου για τον καρκίνο του τραχήλου (Papanicolaou *et al* 1941). Από την έναρξη της εφαρμογής προγραμμάτων μαζικού πληθυσμιακού ελέγχου με κυτταρολογία στην Αμερική το 1970 παρατηρήθηκε μείωση της επίπτωσης του καρκίνου του τραχήλου κατά 50% και των θανάτων που οφείλονται σ' αυτόν κατά 70% , έτσι ώστε σήμερα δεν περιλαμβάνεται ούτε μεταξύ των πρώτων 10 αιτιών θανάτου. Αυτό σημαίνει ότι το τεστ Παπανικολάου ήταν το πιο αποτελεσματικό, σε σχέση κόστους-αποτελέσματος, πρόγραμμα μείωσης του καρκίνου που έχει εφαρμοστεί ποτέ.

2.2.1 Περιορισμοί της συμβατικής κυτταρολογίας

Η ειδικότητα της συμβατικής κυτταρολογίας για την ανίχνευση του καρκίνου του τραχήλου και των προκαρκινικών αλλοιώσεων είναι υψηλή (79% -100%, μέση τιμή=95%) και η ευαισθησία της επίσης ικανοποιητική (30%-80% μέση τιμή 47%) όχι όμως η καλύτερη για μια μέθοδο μαζικού πληθυσμιακού ελέγχου (Nanda *et al* 2000). Μια από τις σημαντικότερες αδυναμίες της μεθόδου είναι το υψηλό ποσοστό ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων (5% έως 49% σε ορισμένες μελέτες). Αυτό οφείλεται στα 2/3 των περιπτώσεων σε ανεπαρκή δειγματοληψία από τη ζώνη μετασχηματισμού του τραχήλου όπου εντοπίζεται η πλειοψηφία των ενδοεπιθηλιακών αλλοιώσεων. Μερικές φορές επίσης η παρουσία φλεγμονωδών κυττάρων ή αίματος στο δείγμα μπορεί να καλύψει τα διαγνωστικά κύτταρα. Άλλη πιθανή αιτία των ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων μπορεί να είναι σε μικρότερο όμως ποσοστό η λάθος ερμηνεία τους, όταν δηλαδή ανιχνεύονται ανώμαλα κύτταρα στο πλακάκι αλλά δεν αναγνωρίζονται ως δυσπλαστικά ή κακοήγη (Demay *et al* 1996). Από μια μετα-ανάλυση των Koliopoulos *et al* που δημοσιεύτηκε στο *Gynecol.Oncol.* το 2007 προκύπτει ότι η συμβατική κυτταρολογία αποτυγχάνει να ανιχνεύσει το 20% περίπου των υψηλόβαθμων βλαβών CIN 3 (Koliopoulos *et al* 2007).

Η ακρίβεια του τεστ μπορεί να επηρεαστεί επίσης από θέματα που αφορούν τη συμμόρφωση των ασθενών. Βελτίωση επομένως της ευαισθησίας μπορεί να προκύψει με επανάληψη της εξέτασης σε τακτά χρονικά διαστήματα σύμφωνα με

τις κατευθυντήριες οδηγίες. Επιπλέον με κάθε επαναλαμβανόμενο αρνητικό αποτέλεσμα βελτιώνεται και η αρνητική προγνωστική αξία της μεθόδου. Έτσι ο κίνδυνος μια γυναίκα να αναπτύξει καρκίνο του τραχήλου μειώνεται με τον αριθμό των αρνητικών τεστ που είχε στο παρελθόν. Συγκεκριμένα από μια μελέτη από τη Δανία (Lynge *et al* 1986) προκύπτει ότι ένα και μόνο αρνητικό αποτέλεσμα στο τεστ Παπανικολάου μειώνει τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου κατά 48%, άρα μια γυναίκα με 5 ή περισσότερα αρνητικά τεστ έχει στην πραγματικότητα εκμηδενίσει τον κίνδυνο να αποκτήσει καρκίνο (αρνητική προγνωστική αξία περίπου 100%).

2.3. ΚΥΤΤΑΡΟΛΟΓΙΑ ΥΓΡΗΣ ΦΑΣΗΣ (LBC)

Η κυτταρολογία υγρής φάσης αναπτύχθηκε για να καλύψει τους περιορισμούς της συμβατικής κυτταρολογίας που αφορούν στην αποτυχία συλλογής όλων των επιθηλιακών κυττάρων που λαμβάνονται από την ασθενή και την ανεπαρκή σταθεροποίηση του δείγματος. Η συλλογή του δείγματος γίνεται μέσα σε υγρό διάλυμα και κατόπιν με φυγοκέντρηση ή με φιλτράρισμα υπό αρνητική πίεση παρασκευάζεται επίχρισμα τραχηλικών κυττάρων το οποίο μονιμοποιείται σε αντικειμενοφόρο πλάκα και μικροσκοπείται με ειδική χρώση. Τα αποτελέσματα προκύπτουν με συστηματική ανάλυση μέσω υπολογιστών. Το υπόλοιπο δείγμα που δεν χρησιμοποιήθηκε είναι διαθέσιμο για να γίνουν άλλα βοηθητικά μοριακά τεστ, καθώς και έλεγχος για σεξουαλικά μεταδιδόμενα νοσήματα όπως χλαμύδια, γονόρροια ή γενετικές καταστάσεις (π.χ. κυστική ίνωση). Με τη μέθοδο αυτή μειώνεται το ποσοστό των μη ικανοποιητικών δειγμάτων και ο χρόνος μικροσκόπησης ενώ αυξάνεται η επάρκεια της μεθόδου και βελτιώνεται η σχέση κόστους-αποτελεσματικότητας.

2.4. ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΟΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΑΛΛΟΙΩΣΕΩΝ

Τα πρώτα 40 χρόνια από την εισαγωγή της κυτταρολογίας ως μεθόδου πληθυσμιακού ελέγχου για τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας χρησιμοποιήθηκαν διάφορα συστήματα ορολογίας και ταξινόμησης των προκαρκινικών αλλοιώσεων.

Αρχικά ο Δρ Παπανικολάου εισήγαγε και χρησιμοποίησε τον όρο « **δυσκαρύωση** » σε ένα σύστημα αναφοράς που αποτελούνταν από πέντε βαθμίδες κάθε μία από τις οποίες ανταποκρινόταν σε ένα συγκεκριμένο επίπεδο της κατάστασης των καρκινικών κυττάρων. Έτσι δείγματα βαθμού 1 θεωρούνταν αρνητικά για καρκίνο ενώ δείγματα βαθμού 5 θετικά. Το σύστημα αυτό ήταν απλό στη σύλληψη αλλά είχε πολλές παραλλαγές που δεν ανταποκρίνονταν πλήρως στα επιστημονικά δεδομένα της γνώσης της τραχηλικής καρκινογένεσης.

Την επόμενη δεκαετία ο Δρ.Reagan εισήγαγε τον όρο « **δυσπλασία** » για να περιγράψει τις προκαρκινικές αλλοιώσεις και να τις διαχωρίσει ανάλογα με το

βαθμό της βλάβης και τον τύπο των κυττάρων που παρατηρούνται (Reagan *et al* 1953). Μετά από δέκα περίπου χρόνια ο Δρ. Richart χρησιμοποίησε τον όρο «**τραχηλική ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία**» (CIN) προωθώντας έτσι την ιδέα της εξέλιξης των προκαρκινικών αλλοιώσεων σε διηθητικό καρκίνο (Richart *et al* 1967). Αρχικά οι δύο αυτοί όροι (δυσπλασία και CIN) εφαρμόστηκαν στην ιστοπαθολογία του τραχήλου αλλά αργότερα χρησιμοποιήθηκαν για να περιγράψουν και τις κυτταρολογικές μεταβολές.

Σήμερα το πιο διαδεδομένο σύστημα αναφοράς στην κυτταρολογία του τραχήλου τόσο στις Ηνωμένες Πολιτείες (ΗΠΑ) όσο και σε πολλές άλλες χώρες είναι το Σύστημα Bethesda (TBS) το οποίο αναπτύχθηκε για να παρέχει μια ενιαία ορολογία έτσι ώστε να καθορίζονται κοινές κατευθυντήριες οδηγίες για τη διαχείριση και θεραπεία των ασθενών. Η πρώτη Σύνοδος Bethesda, αποτελούμενη από ειδικούς κυτταρολόγους, παθολογοανατόμους και γυναικολόγους, πραγματοποιήθηκε το 1988 από το Εθνικό Ινστιτούτο Καρκίνου (National Cancer Institute Workshop 1988). Από τότε έχουν γίνει άλλες δύο σύνοδοι το 1991 και το 2001, για να συζητηθούν κάποια αμφιλεγόμενα θέματα σχετικά με την ορολογία καθώς και ο ρόλος των νέων τεχνολογιών (Solomon *et al* 2002).

Μια από τις σημαντικότερες καινοτομίες του συστήματος Bethesda ήταν η αντικατάσταση του όρου προ-καρκινικές αλλοιώσεις με τον όρο πλακώδεις ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις (SIL) οι οποίες διαχωρίζονται σε δύο βαθμούς: χαμηλόβαθμες (LG-SIL) και υψηλόβαθμες (HG-SIL). Ο όρος αυτός χρησιμοποιήθηκε γιατί πολλές από τις αλλοιώσεις αυτές υποχωρούν, η εξέλιξη τους σε διηθητικό καρκίνο δεν μπορεί να προβλεφθεί και ο όρος μπορεί να περιγράψει πλακώδεις αλλοιώσεις οπουδήποτε στον κατώτερο γεννητικό σωλήνα. Άλλη μια καινοτομία του συστήματος Bethesda ήταν η ανάπτυξη κριτηρίων για την επάρκεια του κυτταρολογικού δείγματος. Επίσης μετά τη σύνοδο του 2001 συμφωνήθηκε ότι η κυτταρολογική έκθεση θα πρέπει να αναφέρεται πλέον ως «ερμηνεία» ή ως «συμπέρασμα» αντί για διάγνωση, να θεωρείται δηλαδή η κυτταρολογία ως μέθοδος η οποία σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να χρησιμεύσει συμβουλευτικά παρέχοντας μια εξήγηση των ευρημάτων στο δείγμα που θα συμβάλλει στη διάγνωση της νόσου (Solomon *et al* 2002). Τέλος άλλη μία σύσταση αφορά τη διευκρίνιση του τρόπου λήψης του κυτταρολογικού δείγματος, αν πρόκειται δηλαδή για συμβατική ή υγρής φάσης κυτταρολογία γιατί κάποιες κατευθυντήριες οδηγίες στην παρακολούθηση και διαχείριση των ασθενών μπορεί να διαφέρουν.

Ένα άλλο σύστημα ταξινόμησης είναι αυτό που προτείνεται από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO) και χρησιμοποιείται στη Μεγάλη Βρετανία. Αυτό χρησιμοποιεί τον όρο «δυσπλασία» για να χαρακτηρίσει τις κυτταρολογικές αλλοιώσεις. Ο χαρακτηρισμός «ελαφρά» δυσπλασία αντιστοιχεί σε χαμηλού

βαθμού πλακώδεις ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις στο σύστημα Bethesda ενώ «μέτρια» και «σοβαρή» δυσπλασία αντιστοιχούν σε υψηλού βαθμού πλακώδεις ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις.

Οι διαφορές στην ορολογία μεταξύ των διαφόρων συστημάτων ταξινόμησης φαίνονται στον Πίνακα 2.3.

Πίνακας 2.3. Συστήματα ταξινόμησης κυτταρολογικών ευρημάτων

Conversion table for different cytological classification systems										
Papanicolaou	I	II			III			IV		V
WHO	Normal	Atypical	Atypical glandular cells		Mild dysplasia	Moderate dysplasia	Severe dysplasia	CIS	AIS	Invasive carcinoma
CIN					Condyloma	CIN I	CIN II	CIN III	CGIN	
TBS 1991	Infection, reactive repair	ASCUS	AGUS		LSIL	HSIL		AGUS		
TBS 2001		Negative for epithelial abnormality	ASC-US	ASC-H	Atypical glandular cells	LSIL	HSIL		AIS	

2.5. ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΕΝΔΟΕΠΙΘΗΛΙΑΚΩΝ ΑΛΛΟΙΩΣΕΩΝ

Η πλειοψηφία (περίπου 90%) των κυτταρολογικών απαντήσεων στο γενικό πληθυσμό που υποβάλλεται σε προληπτικό έλεγχο είναι φυσιολογικές και μόνο ένα 10% περίπου αυτών θα έχουν ανώμαλα κυτταρολογικά ευρήματα. Από αυτό το 10% των μη φυσιολογικών τεστ Παπανικολάου το 7% αντιστοιχεί σε χαμηλόβαθμες αλλοιώσεις και το 3% σε υψηλόβαθμες. Η συχνότητα εμφάνισης των διαφόρων κατηγοριών ενδοεπιθηλιακών αλλοιώσεων στη συμβατική κυτταρολογία και την κυτταρολογία υγρής φάσης με βάση δεδομένα από τα κυτταρολογικά εργαστήρια των Ηνωμένων Πολιτειών για την περίοδο 2002-2003 φαίνεται στον παρακάτω πίνακα: (Davey *et al* 2004).

Πίνακας 2.4. Συχνότητα εμφάνισης των διαφόρων κατηγοριών ενδοεπιθηλιακών αλλοιώσεων στη συμβατική κυτταρολογία και την κυτταρολογία υγρής φάσης

Κατηγορίες αλλοιώσεων	Τεστ Παπανικολάου	Κυτ/γία υγρής φάσης
ASC-US	3,8%	4,76%
ASC-H	0,48%	0,55%
LSIL	2,1%	2,9%
HSIL	0,7%	0,84%

2.5.1 ΑΤΥΠΑ ΠΛΑΚΩΔΗ ΚΥΤΤΑΡΑ (ASC-)

Η κατηγορία αυτή υπήρξε εξ'αρχής αντιφατική γιατί αντιπροσωπεύει το μεγαλύτερο ποσοστό ενδοεπιθηλιακών αλλοιώσεων στα περισσότερα κυτταρολογικά εργαστήρια και η ερμηνεία τους είναι αρκετά υποκειμενική (Davey *et al* 2005).

Παρόλο που ο σχετικός κίνδυνος μια μεμονωμένη περίπτωση δείγματος ASC να υποκρύπτει καρκίνο είναι μικρός (0,1% και 5-20% για υψηλόβαθμη αλλοίωση) η ύπαρξη μεγάλου αριθμού ASC αλλοιώσεων στα επιχρίσματα σημαίνει ότι ένα σημαντικό ποσοστό υψηλόβαθμων ενδοεπιθηλιακών αλλοιώσεων μπορεί να ξεκινά με μια τέτοια κυτταρολογία (Wright *et al* 2002).

Η σύνοδος Bethesda 2001 όρισε 2 υποκατηγορίες των ASC αλλοιώσεων:

- ASC-US (άτυπα πλακώδη κύτταρα ακαθόριστης σημαντικότητας) με συχνότητα εμφάνισης 3,9%

- ASC-H (άτυπα πλακώδη κύτταρα από τα οποία δεν μπορεί να αποκλειστεί υψηλόβαθμη αλλοίωση) με συχνότητα εμφάνισης 0,2%.

Η ASC-US κυτταρολογία αντιπροσωπεύει ποσοστό > 90% των ASC επιχρισμάτων και τα κυτταρολογικά χαρακτηριστικά της υποδηλώνουν μεν χαμηλόβαθμη αλλοίωση αλλά είναι ποιοτικά ή ποσοτικά ανεπαρκή ώστε να υποστηρίξουν τη διάγνωση αυτή. Το ποσοστό των γυναικών με κυτταρολογία ASCUS που τελικά έχουν ιστολογική διάγνωση (βιοψία) CIN2,3 είναι γενικώς αποδεκτό γύρω στο 20% (Cramer 1974; Vassilakos *et al* 1996). Από άλλες μελέτες προκύπτει ότι ο απόλυτος αριθμός των υψηλόβαθμων ιστολογικά αλλοιώσεων που αναγνωρίζονται σε γυναίκες με ASCUS κυτταρολογία είναι μεγαλύτερος απ' αυτόν που αναγνωρίζεται σε γυναίκες με HSIL κυτταρολογία (Benedet *et al* 1981; Aronte-Cipriani *et al* 1995). Οι κυτταρολογικές αλλαγές στα επιχρίσματα ASCUS περιλαμβάνουν μεγέθυνση του πυρήνα 2,5 έως 3 φορές σε σχέση με το φυσιολογικό, μικρή αύξηση της αναλογίας πυρήνα/κυτταροπλάσματος και ήπια πυρηνική υπερχρωμία.

Οι στρατηγικές διαχείρισης των γυναικών με ASCUS περιλαμβάνουν διενέργεια HPV-DNA τεστ (ιδίως όταν πρόκειται για δείγματα κυτταρολογίας υγρής φάσης), δύο επαναλαμβανόμενους κυτταρολογικούς ελέγχους ή κολποσκόπηση (αναλόγως της ηλικίας των ασθενών) (Wright *et al* 2002).

Η ASC-H κυτταρολογία αντιπροσωπεύει μόνο το 5% των ASC επιχρισμάτων και σ' αυτά παρατηρούνται κυτταρολογικά χαρακτηριστικά παρόμοια με αυτά των υψηλόβαθμων αλλοιώσεων όχι όμως καθοριστικά. Τα κύτταρα έχουν συνήθως το μέγεθος των μεταπλαστικών κυττάρων και εμφανίζονται μεμονωμένα ή σε ομάδες. Υπάρχει επίσης μεγέθυνση του πυρήνα 1,5 έως 2,5 φορές σε σχέση με το φυσιολογικό και υπερχρωμία αυτού. Η παρακολούθηση των γυναικών με ASC-H κυτταρολογία περιλαμβάνει κολποσκόπηση γιατί τουλάχιστον το 35% αυτών στην πορεία θα εμφανίσει υψηλόβαθμες αλλοιώσεις (Alli *et al* 2003; Louro *et al* 2003). Η διαλογή με HPV-DNA τεστ δεν ενδείκνυται σ' αυτές τις γυναίκες γιατί το ποσοστό των θετικών τεστ είναι πολύ μεγαλύτερο από ότι στην ASCUS κυτταρολογία (Srodon *et al* 2006).

2.5.2 ΧΑΜΗΛΟΒΑΘΜΕΣ ΕΝΔΟΕΠΙΘΗΛΙΑΚΕΣ ΑΛΛΟΙΩΣΕΙΣ (LSIL)

Κυτταρολογικά δείγματα LSIL παρατηρούνται πιο συχνά σε γυναίκες στην αρχή της αναπαραγωγικής τους ηλικίας (μεταξύ 16 και 26 ετών) ή κατά την έναρξη της σεξουαλικής τους δραστηριότητας (Carson *et al* 1993). Η κυτταρολογική διάγνωση τίθεται με την αναγνώριση ανώμαλων πλακωδών κυττάρων με μέγεθος παρόμοιο με αυτό των φυσιολογικών επιφανειακών ή διάμεσων κυττάρων, αύξηση του μεγέθους του πυρήνα έως και 3 φορές πάνω από το φυσιολογικό, υπερχρωμάτωση και κοιλοκυττάρωση ενώ μόνο η παρουσία της κοιλοκυττάρωσης χωρίς τις μεταβολές του πυρήνα δεν στοιχειοθετεί τη διάγνωση. Σύμφωνα με την

ASCUS/LSILstudy (Stoler *et al* 2001) η αναπαραγωγικότητα των LSIL είναι υψηλότερη από αυτή των ASC, συγκεκριμένα το 68% των LSIL δειγμάτων επιβεβαιώθηκαν στη διάγνωση από την ομάδα που διενέργησε τον ποιοτικό έλεγχο σε σύγκριση με το 43% των ASCUS.

2.5.3 ΥΨΗΛΟΒΑΘΜΕΣ ΕΝΔΟΕΠΙΘΗΛΙΑΚΕΣ ΑΛΛΟΙΩΣΕΙΣ (HSIL)

Κυτταρολογία HSIL παρατηρείται σπάνια (περίπου 0,5% των τεστ Παπανικολάου) και είναι συχνότερη σε γυναίκες στο μέσον περίπου της αναπαραγωγικής τους ηλικίας (μεταξύ 26 - 48 έτη) παρόλο που μπορεί να βρεθεί και αμέσως μετά την έναρξη της σεξουαλικής δραστηριότητας (Carson *et al* 1993). Η κυτταρολογική διάγνωση βασίζεται στην παρουσία ανώμαλων πλακωδών κυττάρων μικρότερου μεγέθους σε σχέση με τις χαμηλόβαθμες αλλοιώσεις (περίπου όμοια με τα φυσιολογικά κύτταρα της παραβασικής στιβάδας) που μπορεί να εμφανίζονται μεμονωμένα ή σε συναθροίσεις. Συγκεκριμένα παρατηρούνται ευμεγέθεις πυρήνες, αύξηση του λόγου πυρήνα/κυτταροπλάσματος, υπερχρωμάτωση του πυρήνα και απουσία πυρηνίων. Χαρακτηριστική είναι η έλλειψη κοιλοκυττάρων και κυτταροπλασματικών μεταβολών που σχετίζονται με παραγωγική λοίμωξη από τον ιό HPV. Δυσκολίες στη διάγνωση μπορεί να παρουσιαστούν στις εμμηνοπαυσιακές γυναίκες όπου λόγω ατροφίας του επιθηλίου τα πλακώδη κύτταρα εμφανίζουν αυξημένη σχέση πυρήνα/κυτταροπλάσματος. Επίσης δύσκολος μπορεί να είναι μερικές φορές ο διαχωρισμός των υψηλόβαθμων αλλοιώσεων από τον καρκίνο. Χαρακτηριστικά που συνηγορούν υπέρ του καρκίνου είναι: πλειομορφισμοί των κυττάρων, ανώμαλα μοτίβα χρωματίνης και προεξέχοντα πυρήνια.

Τέλος υπάρχει μια μειοψηφία περιπτώσεων που είναι δύσκολο να ταξινομηθούν σαν χαμηλόβαθμες ή υψηλόβαθμες και αναφέρονται ως SIL μη καθορισμένου βαθμού (Solomon *et al* 2004). Συνήθως πρόκειται για δείγματα που περιέχουν μερικά κύτταρα με μη καθορισμένα χαρακτηριστικά ή με χαρακτηριστικά που συνηγορούν υπέρ χαμηλόβαθμης αλλοίωσης και σε ορισμένες θέσεις λίγα στοιχεία υψηλόβαθμης βλάβης. Πολλές από αυτές τις περιπτώσεις θα έχουν ιστολογία CIN 2 ή δυσκολία και στην ιστολογική διάγνωση (Adams *et al* 2003). Σύμφωνα με ένα πρόγραμμα σύγκρισης των Αμερικανικών κυτταρολογικών εργαστηρίων τέτοιες διφορούμενες απαντήσεις μεταξύ LSIL και HSIL αποτελούν το 10 – 15% των συνολικών κυτταρολογικών απαντήσεων.

2.6. ΑΛΛΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΔΙΑΛΟΓΗΣ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΤΡΑΧΗΛΟΥ ΤΗΣ ΜΗΤΡΑΣ

2.6.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το κλασικό μοντέλο για την πρόληψη του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας – πληθυσμιακός έλεγχος με κυτταρολογία που ακολουθείται από κολποσκοπικά κατευθυνόμενες διαγνωστικές βιοψίες και θεραπεία των προκαρκινικών αλλοιώσεων – υφίσταται δυναμική μεταβολή με την είσοδο του HPV-DNA τεστ και άλλων νέων τεχνικών διερεύνησης της νόσου. Τα τρία βασικά στάδια για την αντιμετώπιση του καρκίνου του τραχήλου είναι:

1° Προληπτικός έλεγχος ασυμπτωματικών ατόμων για την αναγνώριση αυτών που είναι σε κίνδυνο για τη νόσο.

2° Διάγνωση της νόσου.

3° Θεραπεία του καρκίνου ή των προκαρκινικών αλλοιώσεων.

Μεταξύ του προληπτικού ελέγχου και της διάγνωσης τοποθετείται ένα επιπλέον βήμα, η **διαλογή**, για την αναγνώριση του υποπληθυσμού που είναι σε αυξημένο κίνδυνο για τη νόσο και τη βελτίωση των διαδικασιών διαχείρισης των ασθενών.

Ως «διαλογή» ορίζεται μια οργανωμένη, ελεγχόμενη συστηματική παρέμβαση δημόσιας υγείας που περιλαμβάνει την εφαρμογή μιας απλής, ασφαλούς, επαναλαμβανόμενης και σχετικά οικονομικής μεθόδου σε σαφώς καθορισμένο πληθυσμό υγιών ατόμων, προκειμένου να γίνει έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου σε προ-συμπτωματικό στάδιο με τελικό στόχο τη μείωση της επίπτωσης της νόσου με την κατάλληλη θεραπεία. Η χρησιμότητα ενός τεστ διαλογής στα πλαίσια ενός προγράμματος προληπτικού ελέγχου εξαρτάται από τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του ίδιου του τεστ αλλά και από:

- Τον πληθυσμό που ελέγχεται
- Τη συχνότητα της νόσου
- Τη μέθοδο πληθυσμιακού ελέγχου που χρησιμοποιείται
- Το κόστος παρακολούθησης
- Τη συμμόρφωση των ασθενών

Η διαλογή έχει μεγαλύτερη αξία όταν το τεστ προληπτικού ελέγχου έχει χαμηλή ειδικότητα ή/και όταν οι διαγνωστικές διαδικασίες είναι ακριβές ή περιορισμένες. Ένα ικανοποιητικό τεστ διαλογής θα πρέπει να μειώνει την υπερθεραπεία και το συνολικό κόστος διαχείρισης μειώνοντας τον αριθμό διαγνωστικών επεμβάσεων, χωρίς ταυτόχρονα να θυσιάζεται η ευαισθησία του στην ανίχνευση της νόσου.

2.6.2. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΤΟΥ HPV-DNA

Η λοίμωξη από τον ιό HPV είναι αναγκαία αλλά όχι ικανή συνθήκη για την ανάπτυξη καρκίνου του τραχήλου της μήτρας (Munoz *et al* 1992; Walboomers *et al* 1999). Η ανίχνευση επομένως του DNA του ιού σε δείγματα από τον τράχηλο της μήτρας είναι εξαιρετικά σημαντική ως μέθοδος πληθυσμιακού ελέγχου και διαλογής για την εκτίμηση του κινδύνου εμφάνισης της νόσου. Οι τεχνικές ανίχνευσης του HPV-DNA έχουν εξελιχθεί αρκετά τα τελευταία χρόνια. Οι κυριότερες απ'αυτές είναι:

i) In situ υβριδοποίηση (ISH)

Είναι μια εξαιρετικά απλή τεχνική που εφαρμόζεται σε τμήματα ιστού ή δείγματα κυττάρων τα οποία τοποθετούνται απευθείας σε ένα στερεό υλικό το οποίο στη συνέχεια χρησιμοποιείται για καταμερισμό του DNA. Δεν αναγνωρίζει συγκεκριμένους τύπους του ιού αλλά δίνει μόνο θετικό ή αρνητικό αποτέλεσμα γι' αυτό και έχει περιορισμένες κλινικές εφαρμογές.

ii) Hybrid Capture II

Με την τεχνική αυτή πραγματοποιείται εξαγωγή κυτταρικού DNA που επεξεργάζεται σε αλκοολικό διάλυμα και υβριδοποιείται με συμπληρωματικό RNA με αποτέλεσμα τη δημιουργία DNA-RNA υβριδικών μορίων τα οποία μεταφέρονται από το διάλυμα μέσω αντισωμάτων που βρίσκονται στο τοίχωμα των δοχείων. Η παρουσία των μορίων αυτών ανιχνεύεται με την προσθήκη ειδικών αντισωμάτων που αντιδρούν κατόπιν με μια ειδική ουσία για την παραγωγή φωτός που μετράται με ειδικό όργανο (luminometer) και τα αποτελέσματα εκφράζονται ως «relative light units» (RLUs).

iii) Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Πρόκειται για μια μοριακή τεχνική η οποία εξετάζει τις διπλές έλικες DNA των κυττάρων-στόχων με φυσικά μέσα (θέρμανση). Πραγματοποιούνται 30-40 κύκλοι μεταβολής της θερμοκρασίας με 3 βήματα σε κάθε κύκλο:

1ο βήμα: Διαχωρισμός της διπλής έλικας DNA σε δύο μονές.

2^ο βήμα : Προσθήκη σε διάλυμα που περιέχει μικρά σεσημασμένα τμήματα DNA (primers) συμπληρωματικά του γονιδιώματος του HPV, νουκλεοτίδια και DNA πολυμεράση.

3^ο βήμα: Δημιουργία συμπληρωματικών αλυσίδων από το πολυμερές DNA έτσι ώστε να δημιουργηθούν μεγάλες ποσότητες αντιγράφων της αναζητούμενης αλληλουχίας DNA. Στη συνέχεια γίνεται τυποποίηση του ακριβούς τύπου HPV μέσω ανίχνευσης της αλληλουχίας DNA με τη χρήση μεθόδων όπως ηλεκτροφόριση και ανοσοφθορισμός.

2.6.3. ΚΛΙΝΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΟΥ HPV-DNA ΤΕΣΤ

Μια σημαντική εφαρμογή του HPV-DNA τεστ ως εργαλείου διαλογής, όπως προκύπτει από τα δεδομένα της ALTS μελέτη (ASCUS/LSIL Triage Study Group 2000), είναι η κυτταρολογία ASCUS αφού το 40%-50% των γυναικών με ASCUS κυτταρολογία είναι HPV θετικές. Επίσης όλες οι CIN 2 και 3 αλλοιώσεις που σχετίζονται με ASCUS κυτταρολογία ανιχνεύθηκαν στην ομάδα των γυναικών που ήταν HPV θετικές. Άρα στην περίπτωση της ASCUS κυτταρολογίας η διαλογή με HPV-DNA τεστ γλιτώνει περίπου το 50% των γυναικών από μια άσκοπη κολποσκόπηση. Η ευαισθησία της διαλογής των ASCUS με HPV τεστ ήταν 90%-96% σε σύγκριση με την επαναλαμβανόμενη κυτταρολογία όπου ήταν 75%-85% (ASCUS/LSIL Triage Study Group 2003). Όσον αφορά τις LSIL κυτταρολογικές αλλοιώσεις το HPV τεστ δεν χρησιμεύει ως μέθοδος διαλογής λόγω της υψηλής συχνότητας του ιού HPV που παρατηρείται σ' αυτές.

Σημαντικά συμπεράσματα για τον πιθανό ρόλο του HPV τεστ στον πρωτογενή προληπτικό έλεγχο (screening) προκύπτουν από την ARTISTIC trial (Kitchener et al 2006) που συσχέτισε την ηλικία, την ανίχνευση του HPV και το βαθμό της κυτταρολογικής αλλοίωσης. Η συχνότητα ήπιας δυσκαρύωσης ανάλογα με την ηλικία στις HPV- θετικές γυναίκες ήταν:

-87% σε ηλικίες <30 ετών

-58% σε ηλικίες 30-49 ετών

-28% σε ηλικίες 50-64 ετών.

Η συχνότητα σοβαρής δυσκαρύωσης στις HPV θετικές γυναίκες ήταν 100 φορές υψηλότερη σε σχέση με τις HPV- αρνητικές και αυτό παρατηρήθηκε τόσο στις ηλικίες <30 ετών όσο και στις ηλικίες μεταξύ 30-49 ετών. Αυτά τα στοιχεία υποδηλώνουν ότι ο ρόλος του HPV τεστ ως μέθοδος πληθυσμιακού ελέγχου δεν θα πρέπει να περιορίζεται μόνο στις ηλικίες < 30 όπως είχε διαπιστωθεί από άλλες μελέτες στο παρελθόν (Sasieni et al 2002; Cuzick et al 2003).

Άλλες εφαρμογές του HPV-DNA ΤΕΣΤ είναι:

- Παρακολούθηση μετά από θεραπεία (Alonso et al 2006).

-Αποσαφήνιση των διαφορούμενων ευρημάτων σε κυτταρολογία, ιστολογία κολποσκόπηση (Fait et al 1998).

-Ως εργαλείο επιβεβαίωσης σε συνδυασμό με την κολποσκόπηση για αποκλεισμό της πιθανότητας χαμένης διάγνωσης (Guido et al 2003).

Από αρκετές μελέτες προκύπτει ότι η ευαισθησία του HPV- τεστ στην ανίχνευση υψηλόβαθμων αλλοιώσεων και διηθητικού καρκίνου είναι 100% περίπου (76% έως 100%) σε σύγκριση με 68% (38% έως 94%) της επαναλαμβανόμενης κυτταρολογίας. Ιδιαίτερα σημαντική είναι μια μελέτη από την Ιταλία (Ronco *et al* 2006), η οποία ήταν η πρώτη τυχαιοποιημένη μελέτη και περιέλαβε 16.706 γυναίκες που έκαναν HPV-τεστ και 16.658 που έκαναν κυτταρολογία υγρής φάσης (control group). Όταν η ηλικία των γυναικών ήταν < 30 ετών το HPV-τεστ ανίχνευε 97% των HG-CIN σε αντίθεση με το 74% της κυτταρολογίας υγρής φάσης. Η ειδικότητα του HPV τεστ όμως ήταν παρόμοια με αυτή της κυτταρολογίας (93% και 95% αντίστοιχα).

Η χρήση του HPV – DNA τεστ μαζί με την κυτταρολογία ως μέθοδος πληθυσμιακού ελέγχου έχει εγκριθεί από τον FDA στην Αμερική από το Μάρτιο του 2003 για γυναίκες ηλικίας > 30 ετών και περιλαμβάνεται στις κατευθυντήριες οδηγίες της Αμερικανικής Εταιρίας Καρκίνου (American Cancer Society). Σύμφωνα με τις οδηγίες αυτές γυναίκες που έχουν αρνητική κυτταρολογία και HPV-DNA τεστ είναι σε πολύ χαμηλό κίνδυνο για ανάπτυξη CIN 3 ή καρκίνου και μπορούν να ελέγχονται ανά 3 έτη. Επομένως ο συνδυασμός HPV-DNA τεστ και κυτταρολογίας μπορεί να είναι μια ενδιάμεση στρατηγική ελέγχου που θα οδηγήσει ίσως μελλοντικά στη χρήση του HPV-DNA τεστ μεθόδου προληπτικού ελέγχου και της κυτταρολογίας ως μεθόδου διαλογής.

2.6.4. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΤΟΥ m-RNA ΤΟΥ HPV.

i) Nucleic Acid Sequence-Based amplification (NASBA)

Η τεχνική αυτή αποτελεί μια από τις πλέον σύγχρονες μεθόδους μοριακής διερεύνησης του HPV που μπορεί να ανιχνεύσει πέντε τύπους του ιού με την ποσοτική αξιολόγηση των επιπέδων των E6/E7 ογκοπρωτεϊνών.

Με αυτή την τεχνική μειώνεται η πιθανότητα αστοχίας της ανίχνευσης HPV γονιδιώματος ιδίως για τις περιπτώσεις εκείνες που βιολογικά είναι και οι πλέον επικίνδυνες, όταν δηλαδή έχουμε πλήρη ενσωμάτωση του γονιδιώματος των ιών υψηλού κινδύνου στο γονιδίωμα των κυττάρων του τραχήλου όπως συμβαίνει στις υψηλόβαθμες αλλοιώσεις.

Λειτουργεί με παρόμοιο τρόπο με την PCR με δυο σημαντικές διαφορές:

-Αντί για DNA χρησιμοποιεί RNA(m-RNA) ως αρχική μήτρα για την επιλεκτική ενίσχυση κάποιου τμήματος.

-Η αντίδραση ενίσχυσης πραγματοποιείται σε μια σταθερή θερμοκρασία χωρίς εναλλαγές.

Ανιχνεύεται έτσι το m-RNA των E6 κ E7 πρωτεϊνών 5 υψηλού κίνδυνου τύπων HPV(16,18,31,33 και 45)οι οποίοι σχετίζονται με το 95% των HPV εξαρτώμενων καρκίνων του τραχήλου της μήτρας στην Ευρώπη (Kraus *et al* 2006). Τα βασικά πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι ότι αφενός ανιχνεύονται τα επίπεδα έκφρασης των ογκογόνων πρωτεϊνών και αφετέρου ότι μπορεί να εκτιμηθεί η φάση της μόλυνσης, αν δηλαδή είναι επισωματική ή ενσωματωμένη, καθώς έχει αποδειχθεί ότι σε ενσωματωμένες μορφές μόλυνσης η έκφραση των E6 και E7 αυξάνεται ενώ το ιϊκό φορτίο (υπολογισμένο σε αντίγραφα DNA του ιού) μειώνεται σημαντικά (Kraus *et al* 2004). Από διαφορές μελέτες προκύπτει ότι η τεχνική αυτή παρουσιάζει υψηλότερη ειδικότητα και θετική προγνωστική αξία για την ανίχνευση ιστολογικά επιβεβαιωμένων CIN 2 αλλοιώσεων σε σχέση με τεχνικές βασισμένες στην τυποποίηση HPV-DNA (Schiftman *et al* 2005; Molden *et al* 2005; 2006). Συγκεκριμένα μια μελέτη από την Νορβηγία (Lie *et al* 2005) σύγκρινε τις DNA και m-RNA μεθόδους ανίχνευσης του HPV στις υψηλόβαθμες ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις και κατέληξε στα εξής αποτελέσματα.

-Στο 99.7% των ιστολογικά επιβεβαιωμένων υψηλόβαθμων αλλοιώσεων (CIN 2) ανιχνεύτηκαν υψηλού κινδύνου τύποι HPV.

-Το DNA τεστ ήταν θετικό στο 95% των ιστολογικά υψηλόβαθμων αλλοιώσεων ενώ το m-RNA ήταν θετικό στο 77% αυτών και στο σύνολο των διηθητικών καρκίνων

-Υψηλόβαθμη ιστολογικά αλλοίωση ανιχνεύτηκε σε 83% των γυναικών με φυσιολογική κυτταρολογία και θετικό m-RNA και σε 62% των γυναικών με φυσιολογική κυτταρολογία και θετικό DNA τεστ.

-Μόνο το 2,4% των γυναικών με υψηλόβαθμη ιστολογία ήταν αρνητικές και στα δυο τεστ.

Από τα αποτελέσματα της μελέτης προκύπτει ότι και τα δυο τεστ έχουν την δυνατότητα να βελτιώσουν το ρυθμό ανίχνευσης υψηλόβαθμων ενδοεπιθηλιακών αλλοιώσεων, ωστόσο το m-RNA τεστ φαίνεται να είναι πιο κατάλληλο για την εκτίμηση του κινδύνου ιδίως αν βελτιωθεί η ευαισθησία του με την εισαγωγή της δυνατότητας ανίχνευσης περισσότερων υψηλού κινδύνου τύπων HPV.

ii) Κυτταρομετρία ροής.

Αποτελεί μια σχετικά γρήγορη τεχνική ανίχνευσης της έκφρασης του m-RNA των E6/E7 περιοχών των υψηλού κινδύνου τύπων HPV. Έχει πλεονεκτήματα όπως, ποσοτικοποιημένη ανάλυση σε μεγάλο αριθμό κυττάρων, σύντομο χρονικό διάστημα ανάλυσης, χαμηλό κόστος και υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα. Το κύριο μειονέκτημα της είναι η αδυναμία προσδιορισμού καθενός από τους τύπους του HPV που ενοχοποιούνται στην πιθανότητα κακοήθους εξαλλαγής.

2.7. ΚΟΛΠΟΣΚΟΠΗΣΗ

Ως τεχνική η κολποσκόπηση χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά στις αρχές του προηγούμενου αιώνα (1925) από τον Hinselman. Συνίσταται στην οπτική επισκόπηση του τραχήλου και του κόλπου πριν και μετά τη χρήση οξικού οξέως με τη βοήθεια μιας πηγής φωτός. Η διάδοση και η ευρεία εφαρμογή της στην παθολογία του τραχήλου οφείλεται στα πλεονεκτήματα της που είναι το χαμηλό κόστος, η ασφάλεια, η μικρή χρονική διάρκεια της εξέτασης, η ευκολία στην εκμάθηση και η δυνατότητα συνδυασμού διάγνωσης και θεραπείας σε μια επίσκεψη.

2.7.1. Η κολποσκόπηση ως εργαλείο προληπτικού ελέγχου.

Μέχρι πρόσφατα οι κολποσκοπικά κατευθυνόμενες βιοψίες θεωρούνταν ο « χρυσός κανόνας» για τη διάγνωση του καρκίνου του τραχήλου. Ωστόσο από στοιχεία που προκύπτουν από την ALTS μελέτη (ASCUS-LSIL Triage Study Group 2003) φαίνεται ότι με την κολποσκόπηση με λήψη βιοψιών χάνεται περίπου το 1/4 των CIN2&3 αλλοιώσεων. Η ευαισθησία της μεθόδου για την ανίχνευση CIN3 αλλοιώσεων κατά τη διάρκεια των 2 ετών παρατήρησης ήταν μόλις 54%. Επομένως θα υπάρχει μια ομάδα γυναικών που παρά τα αρνητικά ευρήματα της κολποσκόπησης θα είναι σε αυξημένο κίνδυνο για CIN3 σε σχέση με το γενικό πληθυσμό. Η ευαισθησία της κολποσκόπησης στη διάκριση του φυσιολογικού τραχηλικού επιθηλίου απ' όλες τις άλλες κυτταρολογικές διαγνώσεις κυμαίνεται μεταξύ 87%-99% ενώ η ειδικότητα της είναι μεταξύ 23%-87% (Folen *et al* 1998). Λόγω του ικανοποιητικού βαθμού ευαισθησίας της έχει προταθεί από πολλούς ερευνητές η χρήση της σε συνδυασμό με την κυτταρολογία ως μεθόδου πληθυσμιακού ελέγχου σε μια προσπάθεια μείωσης των ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων της κυτταρολογίας (Pete *et al* 1998). Τα αναφερόμενα από τη βιβλιογραφία ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα της κυτταρολογίας κυμαίνονται από 10% έως 80% με κοινώς αποδεκτές τιμές από όλα τα εργαστήρια μεταξύ 20% - 25% (Johnson *et al* 2000). Ο συνδυασμός της κυτταρολογίας με την κολποσκόπηση θα μείωνε αυτά τα ποσοστά ανιχνεύοντας τις περιπτώσεις εκείνες που ξεφεύγουν από την κυτταρολογία.

Αν υιοθετούσαμε ένα απλό θεωρητικό μοντέλο με δεδομένη τη γνωστή επίπτωση του CIN στο γενικό πληθυσμό (περίπου 1 -2%) και το γενικώς αποδεκτό ψευδώς αρνητικό ποσοστό της κυτταρολογίας (περίπου 20%),σε έναν πληθυσμό 10.000 γυναικών που θα ελέγχονταν περίπου 100 θα είχαν προκαρκινικές αλλοιώσεις. Από αυτές οι 80 θα ανιχνεύονταν με την κυτταρολογία και οι 20 θα χάνονταν. Για να εντοπιστούν αυτές οι 20 γυναίκες δηλαδή θα χρειαζόταν να υποβληθούν σε κολποσκόπηση 9920 γυναίκες, υποθέτοντας βέβαια ότι η μέθοδος είναι 100% ευαίσθητη κάτι που δεν συμβαίνει στην πραγματικότητα (ανώτερη ευαισθησία 99%). Επιπλέον στα πλαίσια της επαναλαμβανόμενης κυτταρολογίας, σε ένα καλά

οργανωμένο πρόγραμμα πληθυσμιακού ελέγχου, η πλειοψηφία των ψευδώς αρνητικών γυναικών θα ανιχνεύονταν με δεδομένη και τη μακρά φυσική ιστορία (περίπου 10 έτη) της τραχηλικής καρκινογένεσης (Ponten *et al* 1995; Ostör *et al* 1993; Holowaty *et al* 1999). Δηλαδή ακόμα και σε έναν ανά τριετία ή πενταετία επαναλαμβανόμενο έλεγχο θα υπήρχαν τουλάχιστον δυο κυτταρολογικές εκθέσεις για κάθε γυναίκα, πόσο μάλλον όταν (όπως στην Ελλάδα) η κυτταρολογία επαναλαμβάνεται κάθε έτος. Άρα η χρήση της κολποσκόπησης ως συμπληρωματικής της κυτταρολογίας μεθόδου πληθυσμιακού ελέγχου θα ήταν άσκοπη. Επιπλέον αυτό θα είχε και άλλα μειονεκτήματα όπως το κόστος, ο χρόνος εκτέλεσης και η αύξηση του άγχους της ασθενούς. Τέλος στις περιπτώσεις που θα εφαρμοζόταν κάποια θεραπεία θα έπρεπε να ληφθεί σοβαρά υπ' όψιν ότι ιδιαίτερα οι αφαιρετικές μέθοδοι θεραπείας αυξάνουν την πιθανότητα για πρόωρο τοκετό και άλλες μαιευτικές επιπλοκές (Kyrgiou *et al* 2006).

2.7.2. Διαγνωστική ακρίβεια της κολποσκόπησης

Η κολποσκόπηση δεν είναι το απόλυτο διαγνωστικό τεστ γιατί η οπτική εκτίμηση του κολποσκόπου για το βαθμό της αλλοίωσης έχει φτωχή αναπαραγωγιμότητα. (Jeronimo *et al* 2007; Massad *et al* 2008). Επιπλέον σε περιπτώσεις μη ικανοποιητικής κολποσκόπησης (μη ορατό άνω όριο της ζώνης μετασχηματισμού) και φυσιολογικών κολποσκοπικών ευρημάτων ή απλά στοιχείων λοίμωξης μπορεί να χρειαστεί ιστολογική διάγνωση με βιοψίες ή αφαίρεση της ζώνης μετασχηματισμού. Οι διαγνωστικές ελλείψεις της κολποσκόπησης αναφέρονται σε αρκετές μελέτες όπου συγκρίνεται η κολποσκοπική εντύπωση με την ιστολογική διάγνωση η οποία θεωρείται ο «χρυσός κανόνας». Συγκεκριμένα σε μια μελέτη που συμπεριέλαβε 2.100 γυναίκες κολποσκοπική και ιστολογική ταύτιση στη διάγνωση παρατηρήθηκε στο 37% των περιπτώσεων και συμφωνία σε ένα συγκεκριμένο βαθμό αλλοίωσης στο 75% (Massad *et al* 2003).

Η διαγνωστική ακρίβεια της κολποσκόπησης στην αναγνώριση υψηλόβαθμων αλλοιώσεων είναι μεγαλύτερη απ' ότι στην αναγνώριση χαμηλόβαθμης νόσου (Horman *et al* 1998). Σε μια μεγάλη αναδρομική μελέτη που συμπεριλήφθησαν 84.244 γυναίκες και συσχετίστηκαν η κυτταρολογία, η κολποσκοπική εντύπωση και οι κατευθυνόμενες βιοψίες διαπιστώθηκε ότι στο 90% των περιπτώσεων η κολποσκοπική εντύπωση συσχετιζόταν με την κυτταρολογία σε ένα βαθμό. Η προγνωστική ακρίβεια της κολποσκόπησης βελτιώνονταν καθώς αυξάνονταν ο βαθμός της αλλοίωσης (Benedet *et al* 2004). Έτσι στις περιπτώσεις που η κολποσκοπική εντύπωση ήταν υψηλόβαθμης αλλοίωσης ή καρκίνου η ιστολογία επιβεβαίωσε τα κολποσκοπικά ευρήματα στο 85% αυτών των περιπτώσεων ενώ στο υπόλοιπο 15% η ιστολογία έδειξε καλοήθεια ή χαμηλόβαθμη αλλοίωση.

Εν κατακλείδι η κολποσκόπηση είναι μια πολύ καλή μέθοδος διαλογής για τον καρκίνο του τραχήλου σε γυναίκες με ανώμαλη κυτταρολογία αλλά δεν έχει χρησιμότητα ως εργαλείο πρωτογενούς προληπτικού ελέγχου. Έχει καθορισμένο ρόλο στην αναγνώριση ύποπτων περιοχών του τραχήλου απ' όπου θα παρθούν βιοψίες βελτιώνοντας έτσι τη διαγνωστική της ακρίβεια με την ιστολογία και συμβάλλοντας στο σχεδιασμό αποτελεσματικής θεραπείας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΤΩΝ ΥΨΗΛΟΒΑΘΜΩΝ ΕΝΔΟΕΠΙΘΗΛΙΑΚΩΝ ΑΛΛΟΙΩΣΕΩΝ ΤΟΥ ΤΡΑΧΗΛΟΥ

3.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ανίχνευση υψηλόβαθμης ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης στον τράχηλο δεν είναι συχνή, αντιστοιχώντας περίπου στο 0,5% όλων των τέστ Παπανικολάου (Davey *et al* 2004). Η ουσία όμως της πρόληψης του καρκίνου του τραχήλου είναι η ανίχνευση και αντιμετώπιση των πρόδρομων αλλοιώσεων που έχουν πραγματικά κακόηθες δυναμικό, αυτών δηλαδή που αν αφεθούν χωρίς θεραπεία έχουν το μεγαλύτερο κίνδυνο εξέλιξης σε διηθητικό καρκίνο. Σύμφωνα με τη μελέτη του Ostör (Ostör 1993) οι πιθανότητες εξέλιξης των διαφόρων βαθμών ενδοεπιθηλιακών αλλοιώσεων φαίνονται στον πίνακα 3.1.

Πίνακας 3.1 Εξέλιξη των ενδοεπιθηλιακών αλλοιώσεων (Ostör 1993)

ΒΑΘΜΟΣ ΑΛΛΟΙΩΣΗΣ	ΥΠΟΣΤΡΟΦΗ	ΕΜΜΟΝΗ	ΕΞΕΛΙΞΗ ΣΕ CIN 3	ΕΞΕΛΙΞΗ ΣΕ ΔΙΗΘΗΤΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ
CIN 1	60%	30%	10%	1%
CIN 2	40%	40%	20%	5%
CIN 3	33%	< 55%	-	> 12%

Σύμφωνα με τη μελέτη αυτή ακόμα και οι προδιηθητικές βλάβες (CIN 3) έχουν πιθανότητες να υποστρέψουν ενώ περίπου οι μισές από αυτές θα παραμείνουν χωρίς εξέλιξη για μεγάλο χρονικό διάστημα. Ο συνολικός κίνδυνος εξέλιξης σε καρκίνο των υψηλόβαθμων αλλοιώσεων είναι > 15%.

Υπάρχουν ωστόσο πιο πρόσφατες μελέτες που δείχνουν μεγαλύτερα ποσοστά υποστρόφης, για παράδειγμα για τις CIN2 αλλοιώσεις έως και 74% σε 12 μήνες (Discacciati *et al* 2011). Παρόλα αυτά επειδή οι στρατηγικές πρόληψης και ανίχνευσης των ενδοεπιθηλιακών αλλοιώσεων δεν έχουν απόλυτη ευαισθησία και ειδικότητα το κατώτερο όριο στην αντιμετώπιση αυτών έχει τεθεί χαμηλά (στις ΗΠΑ με τα σημερινά δεδομένα απαιτείται θεραπεία των ιστολογικά επιβεβαιωμένων CIN2 & CIN3). Αυτό όμως αυξάνει το κόστος της περαιτέρω παρακολούθησης και οδηγεί σε υπερθεραπεία με τις επιπλοκές που αυτή συνεπάγεται (μιαευτικές και

άλλες). Η εφαρμογή πιο ευαίσθητων μεθόδων πληθυσμιακού ελέγχου και διαλογής θα οδηγούσε σε πιο πρώιμη ανίχνευση και θεραπεία πολύ μικρών αλλοιώσεων χωρίς τελικά καμία ουσιαστική επίδραση στην επίπτωση του καρκίνου γιατί αυτές οι μικρές αλλοιώσεις ακόμα και αν ανιχνεύονταν αργότερα ενώ ήταν ακόμα ενδοεπιθηλιακές θα είχαν και πάλι μικρή πιθανότητα εξέλιξης σε καρκίνο (Sherman *et al* 2003). Άρα ακόμη και οι πιο ευαίσθητες μέθοδοι διαλογής και ελέγχου έχουν περιορισμένη προγνωστική αξία. Η κυτταρολογία για παράδειγμα, στην ανίχνευση υψηλόβαθμων ενδοεπιθηλιακών αλλοιώσεων έχει μικρή προγνωστική αξία. Σε μια μελέτη της αναπαραγωγιμότητας της μεθόδου 27% των γυναικών με υψηλόβαθμη κυτταρολογία βρέθηκαν να έχουν χαμηλόβαθμη αλλοίωση μετά την επανεξέταση του δείγματος, 23% είχαν ASCUS και 3% είχαν αρνητική κυτταρολογία. (Stoler *et al* 2001). Επιπλέον η διαλογή των υψηλόβαθμων αλλοιώσεων με HPV-DNA τεστ δεν έχει εφαρμογή λόγω της αυξημένης επίπτωσης των υψηλού κινδύνου τύπων του HPV σε αυτές.

Η εισαγωγή νέων μοριακών βιοδεικτών στην παθολογία του τραχήλου μπορεί μελλοντικά να έχει κάποια χρήση στη διαλογή και εκτίμηση του κινδύνου ανάπτυξης διηθητικού καρκίνου. Ένας τέτοιος δείκτης είναι το p16 το οποίο είναι ένας ενεργοποιητής μιας κυκλικής κινάσης και εκφράζεται σε μεγάλη συγκέντρωση σε ιστούς με CIN2&CIN3 αλλά και σε CIN1 αλλοιώσεις που σχετίζονται με υψηλού κινδύνου τύπους HPV, αλλά δεν εκφράζεται σε φυσιολογικούς ιστούς. Η ανίχνευση του p16 με τη χρήση ανοσοϊστοχημείας με μονοκλωνικό αντίσωμα βελτίωσε την αναπαραγωγιμότητα στη διάγνωση των ενδοεπιθηλιακών αλλοιώσεων διακρίνοντας ακόμα και μικρές αλλοιώσεις οι οποίες μπορεί να οδηγούσαν σε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα (Klaes *et al* 2002).

3.2 ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Η ετήσια επίπτωση των υψηλόβαθμων αλλοιώσεων με βάση την ηλικία, σύμφωνα με μια μελέτη (Insinga *et al* 2004) είναι 1,5/1000 γυναίκες και είναι συχνότερες σε ηλικίες 25-29 ετών (8,1/1000 γυναίκες). Όλες αυτές οι νέες γυναίκες που είναι στην αναπαραγωγική ηλικία έχουν αυξημένο κίνδυνο για καρκίνο του τραχήλου, αλλά οπωσδήποτε δεν έχουν όλες πραγματικά κακόηθες δυναμικό. Το σημαντικό λοιπόν είναι να διακρίνει κανείς ποιες απ' αυτές έχουν πράγματι αλλοιώσεις με δυναμική εξέλιξης σε κακοήθεια και πρέπει να οδηγηθούν σε θεραπεία, έτσι ώστε να αποφευχθούν άσκοπες επεμβάσεις στον τράχηλο οι οποίες, με δεδομένη την ηλικία των γυναικών αυτών, θα έχουν μακροπρόθεσμες επιπτώσεις σε μελλοντικές κυήσεις. Από την άλλη βέβαια τυχόν αποτυχία στη διάγνωση και θεραπεία των αλλοιώσεων με πραγματικά κακόηθες δυναμικό διηθητικής νόσου, μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη καρκίνου με πραγματικά καταστροφικές συνέπειες.

Ο «χρυσός κανόνας» για τη διάγνωση των υψηλόβαθμων ενδοεπιθηλιακών αλλοιώσεων του τραχήλου είναι η ιστολογία, η οποία θα θέσει τις βάσεις για τον καθορισμό της περαιτέρω διαχείρισης και θεραπείας των ασθενών. Η ιστολογική επιβεβαίωση υψηλόβαθμης κυτταρολογικά αλλοίωσης είναι σχετικά συχνή, περίπου 70%-75% των γυναικών με υψηλόβαθμη κυτταρολογία θα έχουν CIN2 ή CIN3 στην ιστολογία και περίπου 1%-4% θα έχουν διηθητικό καρκίνο (Massad *et al* 2001).

Από μια πρόσφατη μελέτη στην οποία συμπεριλήφθησαν 2.681 γυναίκες από 16 διαφορετικά κέντρα στο Ισραήλ και η διάρκεια παρακολούθησης ήταν 6 έτη (2001-2007), προέκυψε ότι από τις 1.683 γυναίκες που υποβλήθηκαν σε θεραπεία για CIN2&3 το 80% αυτών είχε ιστολογική επιβεβαίωση CIN2 & 3. Εξίσου σημαντικά όμως ήταν τα ευρήματα όσον αφορά το επίπεδο υπο-διάγνωσης. Συγκεκριμένα από το σύνολο των γυναικών που υποβλήθηκαν σε θεραπεία για CIN2 & 3 ένα ποσοστό 2,3% είχαν τελικά καρκίνο, ενώ από τις γυναίκες που υποβλήθηκαν σε θεραπεία για CIN 1 το ποσοστό που είχε τελικά καρκίνο ήταν 0,4% (μόνο 2 γυναίκες). Το συνολικό ποσοστό συμφωνίας στη διάγνωση μεταξύ βιοψιών (runch biopsy) και ιστολογίας μετά από αφαίρεση της ζώνης μετασχηματισμού (LLETZ) ήταν 83,3% με το υψηλότερο επίπεδο συμφωνίας να παρατηρείται για τις διαγνώσεις CIN2 & CIN3. Στον πίνακα 3.2 φαίνονται οι ενδείξεις για θεραπεία (κυτταρολογικές και άλλες) και οι τελικές ιστολογικές διαγνώσεις (Siegler *et al* 2011).

Όσον αφορά τις κολποσκοπικά κατευθυνόμενες βιοψίες του τραχήλου η ακρίβεια τους στη διάγνωση των ενδοεπιθηλιακών αλλοιώσεων μελετήθηκε από μια μετα-ανάλυση των Underwood *et al* από τα αποτελέσματα της οποίας προκύπτει ότι η ευαισθησία των βιοψιών στη διάγνωση CIN2+ (με κατώτερο όριο το CIN1+) ήταν 91,3% και η ειδικότητα τους 24,6%. Σε μελέτες όπου αμέσως μετά τις βιοψίες έγινε αφαίρεση τμήματος τραχήλου (LOOP excision) και ο αριθμός των θετικών βιοψιών ήταν μικρός η ευαισθησία τους ήταν 81,4% και η ειδικότητα 63,3%. Επομένως για να αυξηθεί η διαγνωστική ακρίβεια των βιοψιών θα πρέπει να αυξηθεί ο αριθμός τους (Underwood *et al* 2012).

Πίνακας 3.2 Ενδείξεις για LEEPZ και ιστολογικές διαγνώσεις (Siegler *et al* 2011).

Indications for LEEP	LEEP final histology 2001–07				
	Total (%)	Cervical carcinoma (%)	CIN 2–3 (%)	CIN 1 (%)	Normal (%)
1. Pap, Papanicolau; PCB, postcoital bleeding.					
Carcinoma	51 (1.9)	31 (60.7)	13 (25.5)	1 (1.9)	4 (7.8)
CIN 2–3	1683 (63.2)	40 (2.3)	1349 (80)	156 (9.3)	138 (8.2)
CIN 1	545 (20.5)	2 (0.4)	111 (20.3)	238 (43.7)	194 (35.6)
Abnormal Pap smear	281 (10.5)	8 (2.8)	121 (43.1)	46 (16.4)	106 (37.7)
PCB/others	121 (4.5)	3 (2.5)	21 (17.3)	32 (26.5)	65 (53.7)
Total	2681 (100)	85 (3.2)	1615 (60.2)	474 (17.6)	507 (18.9)

3.3 ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Η πλειοψηφία των γυναικών με υψηλόβαθμες ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις είναι μεταξύ 25-29 ετών (Insinga *et al* 2004). Είναι επομένως σαφές ότι σ' αυτές τις γυναίκες που πιθανόν να μην έχουν ακόμα τεκνοποιήσει υπάρχει ανάγκη για συντηρητική θεραπεία που θα διατηρεί την ανατομία του τραχήλου και τη μελλοντική του λειτουργικότητα, χωρίς ωστόσο να διακυβεύεται η αποτελεσματικότητα της.

Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες της Συνόδου που πραγματοποιήθηκε από την Αμερικανική Εταιρία Κολποσκόπησης και Παθολογίας τραχήλου το 2006 (ASCCP) για τη διαχείριση των υψηλόβαθμων κυτταρολογικά αλλοιώσεων του τραχήλου υπάρχουν δύο επιλογές:

- 1) Άμεση αφαίρεση της ζώνης μετασχηματισμού
- 2) Κολποσκόπηση με κατευθυνόμενες βιοψίες (Wright *et al* 2006).

Η άμεση αφαίρεση της ζώνης μετασχηματισμού είναι η καταλληλότερη επιλογή για μεγαλύτερης ηλικίας γυναίκες στις οποίες οι υψηλόβαθμες αλλοιώσεις είναι λιγότερο πιθανό να υποστρέψουν, γυναίκες που δεν ακολουθούν τα προγράμματα

μαζικού προληπτικού ελέγχου και δεν έχουν τακτική παρακολούθηση και γι' αυτές που έχουν ολοκληρώσει την οικογένεια τους. Αντιθέτως οι γυναίκες που είναι μικρότερης ηλικίας και σχεδιάζουν μελλοντική εγκυμοσύνη καθώς και αυτές που εφαρμόζουν τακτικό προληπτικό έλεγχο μπορούν να υποβληθούν σε κολποσκόπηση με κατευθυνόμενες βιοψίες και αναλόγως των αποτελεσμάτων να υποβληθούν ή όχι σε οριστική θεραπεία. Σε περιπτώσεις μεγάλης κολποσκοπικά αλλοίωσης με έντονα κακοήθη χαρακτηριστικά απαιτείται άμεση αφαίρεση ("see and treat" policy) ενώ οι μικρές αλλοιώσεις με πιο ήπια κολποσκοπικά χαρακτηριστικά, που έχουν μεγαλύτερη λανθάνουσα περίοδο εξέλιξης σε διηθητικό καρκίνο και μεγάλη πιθανότητα να υποστραφούν μπορούν να αντιμετωπιστούν με κολποσκοπικά κατευθυνόμενες βιοψίες και περαιτέρω διαχείριση αναλόγως της ιστολογικής διάγνωσης. Όταν υπάρχει ασυμφωνία στη διάγνωση μεταξύ κυτταρολογίας και ιστολογίας (μετά από βιοψίες) οι κατευθυντήριες οδηγίες της ASCCP συνιστούν:

- Άμεση θεραπευτική αντιμετώπιση
- Παρακολούθηση μέχρις ότου η βλάβη είτε να υποστρέψει, είτε να επιμείνει ή να εμφανιστούν νέες αλλοιώσεις οπότε επιβάλλεται θεραπεία.

3.4 ΜΑΚΡΟΠΡΟΘΕΣΜΕΣ ΕΠΙΠΛΟΚΕΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ

Μέχρι πρόσφατα υπήρχε η άποψη ότι οι συντηρητικές μέθοδοι θεραπείας των υψηλόβαθμων ενδοεπιθηλιακών αλλοιώσεων δεν είχαν επιπτώσεις στη γονιμότητα των γυναικών. Αυτή η άποψη και το γεγονός ότι αυτές οι μέθοδοι θεραπείας πραγματοποιούνταν σχετικά εύκολα και ήταν καλά ανεκτές από τις ασθενείς οδήγησε σε υπερθεραπεία αλλοιώσεων που πιθανόν να είχαν υποστρέψει αυτόματα.

Μια πρόσφατη μετα-ανάλυση όμως από τους Kyrgiou et al που δημοσιεύθηκε στο Lancet το 2006 έφερε την ανατροπή σε όλα τα μέχρι τότε γνωστά δεδομένα σχετικά με τη θεραπευτική προσέγγιση των ενδοεπιθηλιακών αλλοιώσεων. Συγκεκριμένα αναλύθηκαν 27 μελέτες και εκτιμήθηκαν τα αποτελέσματα των διαφόρων μεθόδων θεραπείας της τραχηλικής ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας όσον αφορά τη γονιμότητα και μελλοντικές κυήσεις. Από τα δεδομένα αυτής της μετα-ανάλυσης προκύπτει ότι η κωνοειδής εκτομή του τραχήλου με νυστέρι (cold-knife conization) σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο για πρόωρο τοκετό <37 εβδ. (σχετικός κίνδυνος=2.59), χαμηλό βάρος γέννησης <2.500γρ.(σχετικός κίνδυνος=2.53) και καισαρική τομή (σχετικός κίνδυνος=3.17). Το πιο σημαντικό σημείο της μελέτης όμως είναι ότι και η αφαίρεση της ζώνης μετασχηματισμού με Loop (LLETZ) σχετίζεται με παρόμοιες επιπλοκές, δηλαδή με αυξημένο κίνδυνο πρόωρου τοκετού (σχετικός κίνδυνος=1.70), χαμηλό βάρος γέννησης (σχετικός κίνδυνος = 1.82) και πρόωρη ρήξη υμένων (σχετικός

κίνδυνος=2.69). Παρόμοιες επιπτώσεις αλλά όχι σε τόσο μεγάλο βαθμό φαίνεται να έχει και η κωνοειδής εκτομή με Laser (σχετικός κίνδυνος πρόωρου τοκετού = 1.71) ενώ δεν παρατηρήθηκε αυξημένος κίνδυνος μαιευτικών επιπλοκών μετά από καυτηριασμό με Laser (Laser ablation). Δυστυχώς όλες οι μελέτες που συμπεριλήφθηκαν σ' αυτή τη μετα-ανάλυση ήταν αναδρομικές με όλους τους περιορισμούς που αυτό συνεπάγεται. Για παράδειγμα στην εκτίμηση του κινδύνου για πρόωρο τοκετό μπορεί να εμπλέκονται στα αποτελέσματα και άλλοι παράγοντες ανεξάρτητοι του είδους θεραπείας. Τα συμπεράσματα που προκύπτουν από τη μελέτη αυτή έχουν κάποιο νόημα σε σχέση με τη βιολογική συμπεριφορά του τραχήλου αν σκεφτεί κανείς πως οι θεραπείες αυτές καταστρέφουν το τραχηλικό στρώμα με αποτέλεσμα να χάνεται το όριο ασφαλείας που θα επέτρεπε σε μία εγκυμοσύνη να συνεχίσει κανονικά. Μερικές από τις μελέτες έδειξαν ότι στις αφαιρετικές θεραπείες το βάθος αφαίρεσης του ενδοτραχηλικού καναλιού σχετίζεται με τον κίνδυνο για πρόωρο τοκετό , επομένως θα πρέπει να γίνονται προσπάθειες για όσο το δυνατόν μείωση του βάθους εκτομής χωρίς παράλληλα να ρισκάρει η αποτελεσματικότητα της θεραπείας. Ίσως στο μέλλον ο σχεδιασμός προοπτικών μελετών να μας δώσει περισσότερες πληροφορίες σχετικά με πιθανά διαφορετικά μοτίβα συμπεριφοράς του τραχήλου κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, συμπεριφορά η οποία μπορεί να σχετίζεται με το ποσοστό του όγκου του τραχήλου και/ή το βάθος του ενδοτραχηλικού καναλιού που αφαιρείται.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας αποτελεί μια από τις συχνότερες γυναικολογικές κακοήθειες και ευθύνεται για περίπου 250.000 θανάτους παγκοσμίως κάθε χρόνο. Η επίπτωση όμως της νόσου δεν είναι η ίδια σε όλες τις χώρες και για το γεγονός αυτό καταλυτικό ρόλο φαίνεται ότι παίζει η εφαρμογή οργανωμένων προγραμμάτων πληθυσμιακού ελέγχου στις αναπτυγμένες χώρες (Parkin *et al* 2006).

Από αρκετές επιστημονικές μελέτες αποδεικνύεται ότι η περιοδική γυναικολογική εξέταση σε συνδυασμό με τη διενέργεια κυτταρολογικού ελέγχου (τεστ Παπανικολάου) οδηγεί σε μείωση έως και 70% της θνησιμότητας από καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Η επιτυχία του τεστ Παπανικολάου ως διαδικασία δευτερογενούς πρόληψης οφείλεται στο γεγονός ότι με βάση τη φυσική ιστορία της HPV λοίμωξης, το χρονικό διάστημα από την εμφάνιση προ-καρκινικής αλλοίωσης στον τράχηλο έως την ανάπτυξη διηθητικού καρκίνου μπορεί να κυμαίνεται από 10 ως 20 χρόνια (Baseman *et al* 2005). Από το συνολικό πληθυσμό που εξετάζεται με τεστ Παπανικολάου μόνο το 10% περίπου θα έχει ανώμαλα κυτταρολογικά ευρήματα ενώ η ανίχνευση υψηλόβαθμων αλλοιώσεων είναι ασυνήθης και αντιπροσωπεύει το 0,5% όλων των επιχρισμάτων (Davey *et al* 2004). Περίπου το 70% - 75% των γυναικών με υψηλόβαθμη κυτταρολογία θα έχουν ενδο-επιθηλιακή αλλοίωση βαθμού 2 ή 3 (CIN2 , 3), ενώ το 1-4% αυτών θα έχουν διηθητικό καρκίνο. Από μία πιο πρόσφατη μελέτη προκύπτει ότι στο 12% των ασθενών με υψηλόβαθμη κυτταρολογία δεν αναγνωρίστηκε καμία αλλοίωση κατά την κολποσκόπηση και το 7% αυτών εξακολουθούσε να μην έχει αλλοιώσεις μετά από παρακολούθηση μηνών. Αλλοιώσεις βαθμού 2 & 3 (CIN2/3) αναγνωρίστηκαν στο 71% των ασθενών και καρκίνος στο 4% (Massad *et al* 2001). Ιστολογική τεκμηρίωση σοβαρής δυσκαρύωσης (CIN2+ & CIN 3) διαπιστώνεται περίπου στα 2/3 των ασθενών με κυτταρολογικά και κολποσκοπικά ευρήματα υψηλόβαθμης αλλοίωσης ενώ το υπόλοιπο 1/3 αυτών θα έχει ιστολογικά χαμηλόβαθμη νόσο.

Η ανεύρεση υψηλόβαθμης αλλοίωσης στον κυτταρολογικό έλεγχο αποτελεί πρόδρομη κατάσταση του διηθητικού καρκίνου, ωστόσο από τη φυσική ιστορία της HPV λοίμωξης γνωρίζουμε ότι ακόμα και οι υψηλόβαθμες βλάβες παρουσιάζουν ένα βαθμό υποστροφής που φτάνει το 33%-40% σύμφωνα με τη μελέτη του Ostör (Ostör 1993) και το ποσοστό αυτό είναι μεγαλύτερο σε ηλικίες κάτω των 30 χρόνων όπου παρατηρείται και η μεγαλύτερη συχνότητα υψηλόβαθμης κυτταρολογίας (Insinga *et al* 2004). Σύμφωνα με τη Σύνοδο που πραγματοποιήθηκε το 2006 από την Αμερικανική Εταιρία Κολποσκόπησης και Παθολογίας τραχήλου (ASCCP), η

διαχείριση των γυναικών με υψηλόβαθμη κυτταρολογία περιλαμβάνει δύο εναλλακτικές:

-άμεση αφαίρεση της ζώνης μετασχηματισμού (LLETZ), ή

-κολποσκόπηση με κατευθυνόμενες βιοψίες,

με κάποιες διαφοροποιήσεις βεβαίως όσον αφορά την ηλικία των γυναικών ή την κατάσταση εγκυμοσύνης (Wright *et al* 2007). Από μελέτες στις οποίες εφαρμόστηκε άμεση αφαίρεση της ζώνης μετασχηματισμού σε γυναίκες με υψηλόβαθμη κυτταρολογία, ιστολογική επιβεβαίωση CIN3 αλλοίωσης διαπιστώθηκε στο 45% αυτών και CIN2 στο 35% ενώ στο 15-25% η ιστολογία έδειξε CIN1 ή καθόλου αλλοίωση (Numnum *et al* 2005). Αυτή η διαπίστωση σε συνδυασμό με το γεγονός ότι τα τελευταία χρόνια από αρκετές μελέτες έχει τεκμηριωθεί ότι η θεραπεία για τραχηλικές ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση του κινδύνου για πρόωρο τοκετό και άλλες σχετικές με την κύηση επιπλοκές, με διαφορετικά είδη θεραπείας να ενοχοποιούνται γι' αυτές μεταξύ των οποίων και η LLETZ, έχει κάνει τους ασχολούμενους με την παθολογία του τραχήλου πιο συντηρητικούς όσον αφορά την επιλογή του κατάλληλου τρόπου και χρόνου εφαρμογής της όποιας θεραπείας, ιδιαίτερα όταν πρόκειται για νέες γυναίκες που δεν έχουν ολοκληρώσει ακόμα την οικογένεια τους (Kyrgiou *et al* 2006; 2012). Έχοντας λοιπόν υπόψη μας αυτά τα δεδομένα γίνεται αντιληπτό το πόσο σημαντικό είναι να καθοριστεί μια συγκεκριμένη διαγνωστική μεθοδολογία με βάση την οποία θα επιλέγονται οι γυναίκες με υψηλόβαθμη κυτταρολογία που έχουν πράγματι κακήθες δυναμικό και επομένως αυξημένο κίνδυνο να αναπτύξουν διηθητικό καρκίνο ώστε να υποβάλλονται άμεσα σε θεραπεία, ενώ αντίθετα για αυτές που ο κίνδυνος είναι μικρότερος να ακολουθείται μια πιο συντηρητική αντιμετώπιση.

Από την ανασκόπηση της βιβλιογραφίας προκύπτει ότι από τις έως σήμερα χρησιμοποιούμενες μεθόδους η άμεση παραπομπή σε κολποσκόπηση έχει μικρή ευαισθησία (54%) στην αναγνώριση CIN3 αλλοιώσεων (ASCUS/LSIL Triage Study Group 2003). Το HPV-DNA τεστ, ενώ έχει σημαντικό ρόλο στη διαλογή των ASCUS κυτταρολογικών επιχρισμάτων που αντιστοιχούν ιστολογικά σε υψηλού βαθμού αλλοιώσεις (Arbyn *et al* 2004) και είναι καλύτερο από την επαναλαμβανόμενη κυτταρολογία στην παρακολούθηση των γυναικών μετά από θεραπεία για υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία (Arbyn *et al* 2005), δεν έχει μελετηθεί ο ρόλος του ως μεθόδου διαλογής των κυτταρολογικά HSIL αλλοιώσεων. Τέλος η χρησιμότητα των βιολογικών δεικτών δραστηριότητας του HPV όπως το p16 ενώ έχει αποδειχθεί για τη διαλογή των χαμηλόβαθμων επιχρισμάτων που αντιστοιχούν σε CIN2+ ιστολογία (Tsoumprou *et al* 2009), δεν έχει μελετηθεί για τα HSIL επιχρίσματα.

2. ΣΚΟΠΟΣ

Η κατανόηση της παθογένειας του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας και η διερεύνηση του κύκλου της λοίμωξης από τον HPV ιό οδήγησε στη μελέτη βιολογικών δεικτών που σχετίζονται με τα διάφορα στάδια της λοίμωξης και της τραχηλικής καρκινογένεσης. Η πλειοψηφία αυτών των δεικτών όπως αποδεικνύεται από αρκετές μελέτες συμβάλλουν στην επίλυση των προβλημάτων που σχετίζονται με την αντιμετώπιση των χαμηλού βαθμού (LSIL) αλλά και των αδιευκρίνιστης σημαντικότητας (ASCUS) κυτταρολογικών επιχρισμάτων, ενώ κάποιοι από αυτούς φαίνεται να έχουν προγνωστική αξία στην παρακολούθηση μετά από θεραπεία των υψηλού βαθμού τραχηλικών αλλοιώσεων αναδεικνύοντας τις περιπτώσεις εκείνες που πιθανόν να υποτροπιάσουν.

Από την ανασκόπηση της βιβλιογραφίας δεν υπάρχουν δεδομένα για τη διερεύνηση της χρησιμότητας αυτών των δεικτών στη διαγνωστική μεθοδολογία των υψηλού βαθμού κυτταρολογικών επιχρισμάτων, η διαλογή των οποίων δεν είναι αποδεκτή ως μέθοδος διαχείρισης σύμφωνα με τις ισχύουσες κατευθυντήριες οδηγίες. Ο σκοπός λοιπόν της παρούσας διατριβής είναι η διερεύνηση της πιθανής εφαρμογής κάποιων από αυτούς τους μοριακούς και βιολογικούς δείκτες δραστηριότητας του HPV, σε συνδυασμό με την κυτταρολογία και την κολποσκόπηση, ως κριτηρίων διαλογής των υψηλόβαθμων αλλοιώσεων του τραχήλου.

Έτσι πραγματοποιήσαμε μια προοπτική διαγνωστική μελέτη παρατήρησης σε μια προσπάθεια να εκτιμηθεί η θέση και η σημαντικότητα πολλαπλών παραμέτρων σχετιζόμενων με την παθολογία τραχήλου σε ένα σύστημα αξιολόγησης του πληθυσμού με υψηλόβαθμη κυτταρολογία. Οι παράμετροι αυτοί αφορούν μοριακούς και βιολογικούς δείκτες δραστηριότητας του HPV αλλά και δημογραφικά δεδομένα (ηλικία, συνήθειες, αριθμός τοκετών) τα οποία σε συνδυασμό με την κυτταρολογία και την κολποσκόπηση θα χρησιμοποιηθούν για τη δημιουργία ενός συστήματος αξιολόγησης του αθροιστικού κινδύνου για ανάπτυξη διηθητικού καρκίνου σε γυναίκες με τεστ Παπανικολάου ενδεικτικό υψηλόβαθμης βλάβης. Η πιθανή χρήση ενός τέτοιου συστήματος βαθμολόγησης θα αποτελέσει καινοτομία σε σχέση με την έως σήμερα χρησιμοποιούμενη διαγνωστική μεθοδολογία των προγραμμάτων πληθυσμιακού ελέγχου του καρκίνου του τραχήλου. Η απόφαση για θεραπεία των υψηλόβαθμων φαινοτυπικά ενδοεπιθηλιακών αλλοιώσεων θα μπορεί να εξατομικευθεί με βάση την κατάταξη της κάθε γυναίκας σ' αυτό το σύστημα βαθμολόγησης. Αν δηλαδή οι τιμές των διαφόρων δεικτών είναι τέτοιες που να κατατάσσουν τη γυναίκα στη ζώνη υψηλού κινδύνου τότε θα πρέπει να υποβληθεί άμεσα σε θεραπεία, ενώ αν με βάση τις τιμές των δεικτών κατατάσσεται στη ζώνη μεσαίου ή χαμηλού κινδύνου θα μπορεί ακολουθήσει μια πιο συντηρητική αντιμετώπιση με στενή παρακολούθηση των δεικτών, της κυτταρολογίας και της κολποσκοπικής της εικόνας. Βασικός μας σκοπός μέσω αυτού του συστήματος

βαθμολόγησης είναι η αναγνώριση ενός συνδυασμού παραμέτρων που θα αναδεικνύουν τον πληθυσμό των γυναικών που παρά τον αρχικά υψηλόβαθμο φαινότυπο θα έχει ηπιότερες αλλοιώσεις και επομένως μικρότερο κίνδυνο ανάπτυξης διηθητικού καρκίνου, γεγονός που τελικά θα επιτρέψει τη μείωση των θεραπευτικών παρεμβάσεων στον τράχηλο, του κόστους και του άγχους που αυτές συνεπάγονται για τη γυναίκα και την αποφυγή των επιπλοκών από αυτές (μειευτικές και άλλες).

3. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

3. 1 ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Στην προοπτική μελέτη παρατήρησης που πραγματοποιήσαμε έλαβαν μέρος γυναίκες που προσήλθαν στο Τμήμα Κολποσκόπησης του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων με κυτταρολογία (συμβατική ή υγρής φάσης) ενδεικτική υψηλόβαθμης αλλοίωσης στον τράχηλο (HSIL), η οποία και θεωρήθηκε ως κριτήριο για να συμπεριληφθούν στη μελέτη, κατά το χρονικό διάστημα από τον Οκτώβριο του 2009 έως τον Οκτώβριο του 2013, συνεπώς όλες τους έχουν συμπληρώσει από ένα έως και πέντε έτη παρακολούθησης. Από τη μελέτη αποκλείστηκαν οι έγκυες γυναίκες ,και αυτές που είχαν υποβληθεί στο παρελθόν σε κάποιας μορφής θεραπεία στον τράχηλο (εξαχνωτική ή αφαιρετική) για οποιαδήποτε αιτία.

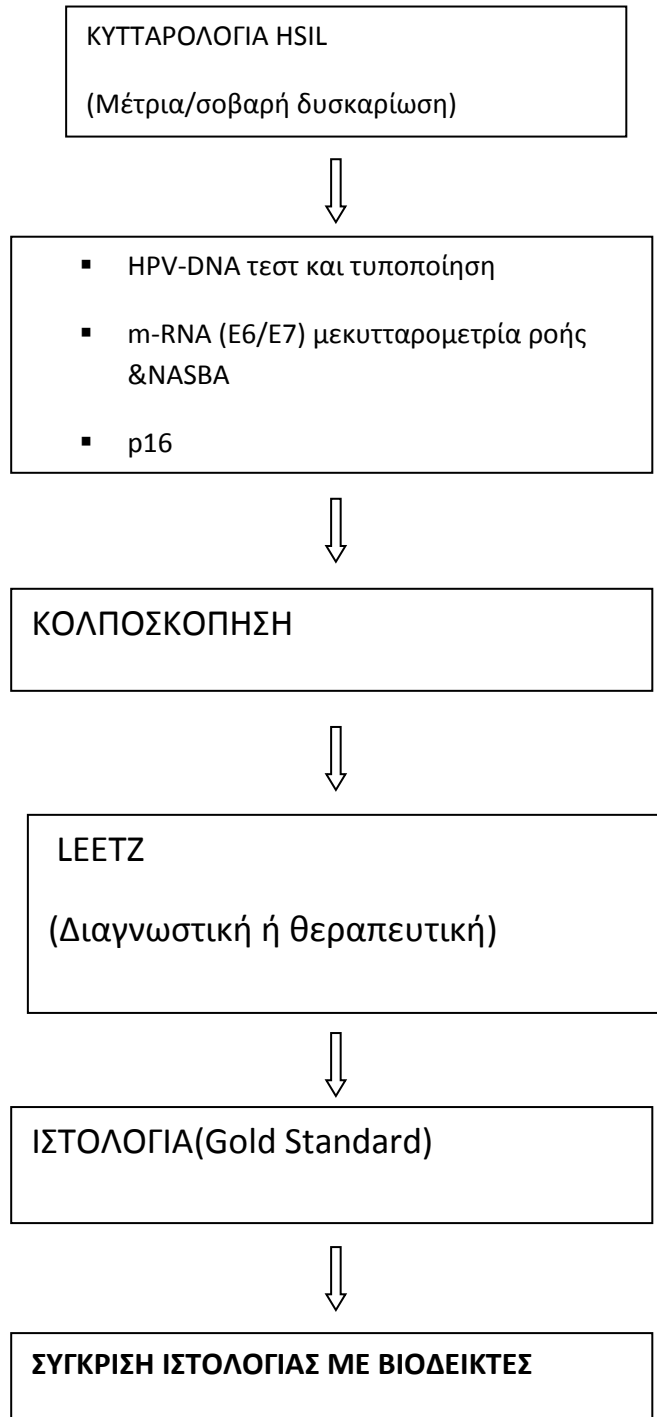
Οι ασθενείς που συμμετείχαν στην έρευνα είχαν ενημερωθεί για το σκοπό και τον τρόπο διεξαγωγής της και έδωσαν προφορική συγκατάθεση πριν από αυτή. Επίσης τους ζητήθηκαν ορισμένες πληροφορίες που αφορούσαν δημογραφικά και άλλα στοιχεία από το ατομικό και οικογενειακό τους ιστορικό. Η μελέτη διεξήχθη σύμφωνα με το πρωτόκολλο, τις αρχές της Ορθής Κλινικής Πράξης (GCP) , τη Διακήρυξη του Ελσίνκι (EUDIRECTIVE) και κατόπιν εγκρίσεως από το Επιστημονικό Συμβούλιο του Νοσοκομείου.

Από όλες τις γυναίκες που πήραν μέρος στη μελέτη ελήφθη πριν από την κολποσκόπηση τραχηλικό δείγμα με Rovers™ Cervex-brush και τοποθετήθηκε σε διάλυμα PreservCyt . Αυτό το δείγμα θεωρήθηκε ως κυτταρολογία «αναφοράς» για τη διεξαγωγή των στατιστικών αναλύσεων της μελέτης και όχι το αρχικό τεστ Pap με το οποίο προσέρχονταν οι γυναίκες στο Ιατρείο Κολποσκόπησης που μπορεί να είχε πραγματοποιηθεί σε διαφορετικά κυτταρολογικά εργαστήρια. Από το ίδιο αυτό δείγμα προσδιορίστηκαν οι εξής παράμετροι:

- Κυτταρολογία υγρής φάσης.
- HPV-DNAtest για ανίχνευση και τυποποίηση του HPV ιού.
- Ανοσοκυτοχημική ανίχνευση του p16.
- Ανίχνευση του m-RNA (E6/E7) με κυτταρομετρία ροής.
- Ανίχνευση του m-RNA (E6/E7) με τη μέθοδο NASBA.
- Μίκρο-φασματοσκοπία (micro-spectroscopy), η οποία πραγματοποιήθηκε για ένα μικρό δείγμα του συνολικού πληθυσμού (50 γυναίκες).

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε παρουσιάζεται επιγραμματικά στο σχεδιάγραμμα που ακολουθεί:

3.1. Σχεδιάγραμμα πρωτοκόλλου (flowchart)



Μετά τη λήψη του τραχηλικού δείγματος, όλες οι γυναίκες της μελέτης υποβάλλονταν σε κολποσκόπηση με χρήση οξικού οξέως 5% που πραγματοποιήθηκε από έναν έμπειρο κολποσκόπο χωρίς να γνωρίζει τα αποτελέσματα του κάθε τεστ. Οι γυναίκες που συμπεριλήφθησαν στη μελέτη υποβλήθηκαν όλες σε LLETZ βιοψία (διαγνωστική ή θεραπευτική) είτε ταυτόχρονα με την κολποσκόπηση (“see and treat” policy) είτε σε προγραμματισμένο επόμενο ραντεβού και το παρασκεύασμα στάλθηκε για ιστολογική εξέταση. Έτσι αποκτήθηκε ιστολογική διάγνωση για το σύνολο του υπό μελέτη πληθυσμού, η οποία αποτέλεσε και την παράμετρο σύγκρισης με τους υπόλοιπους βιοδείκτες κατά τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων. Η LLETZ (Large Loop Excision of Transformation Zone) θεωρείται ως το απόλυτο κριτήριο (GOLD STANDARD) για αξιόπιστη ιστολογική διάγνωση γιατί περιλαμβάνει όλη τη ζώνη μετασχηματισμού του τραχήλου γι’ αυτό και προτιμήθηκε από τις κατευθυνόμενες βιοψίες.

Η αναδρομική ανάλυση που έγινε επικεντρώθηκε στη σύγκριση των ευρημάτων από την ιστολογία με τα αποτελέσματα της ανίχνευσης των μοριακών και βιολογικών δεικτών, σε μια προσπάθεια αναζήτησης του συνδυασμού των παραμέτρων που θα μπορούσε εκ των προτέρων να αναδείξει τις γυναίκες εκείνες που στην πραγματικότητα έχουν ηπιότερες αλλοιώσεις από τις περιγραφόμενες στην κυτταρολογία, και συνεπώς θα μπορούσαν να παρακολουθηθούν στενότερα με τη χρήση των βιοδεικτών αποφεύγοντας την άμεση θεραπευτική παρέμβαση.

3.2. ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ

3.2.1 Μορφολογική κυτταρολογία υγρής φάσης

Τα τραχηλικά δείγματα που ελήφθησαν τοποθετήθηκαν σε PreservCyt φιαλίδια και στάλθηκαν στο εργαστήριο. Από αυτά προήλθαν τα Thin-Prep δείγματα χρησιμοποιώντας τον Thin-Prep αυτόματο παρασκευαστή 2000 (Cytoc Corporation Malborough, MA, US). Τα δείγματα αυτά βάφτηκαν με χρώση Παπανικολάου που είναι έως σήμερα χρώση επιλογής για κυτταρολογικό υλικό. Πρόκειται για μια πολύχρωμη χρωστική μέθοδο που αποτελείται από μια χρώση αιματοξυλίνης (ειδική για την αξιολόγηση του πυρήνα) και δύο εξουδετερωτικές χρώσεις (OrangeG και EA). Η OrangeG είναι μια χρώση που έχει ισχυρή συγγένεια με την κερατίνη την οποία χρωματίζει έντονο πορτοκαλί ενώ η EA χρωματίζει το κυτταρόπλασμα των μεταβολικά δραστήριων κυττάρων (παραβασικά, διάμεσα, λευκοκύτταρα, ιστιοκύτταρα και τα καρκινικά κύτταρα) με ελαφρό πράσινο χρώμα. Αρχικά γίνεται ενυδάτωση των μονιμοποιημένων επιχρισμάτων ώστε τα κύτταρα να απορροφήσουν την αιματοξυλίνη και κατόπιν αφυδάτωση η οποία τα προετοιμάζει να δεχθούν τις εξουδετερωτικές χρώσεις. Τα δείγματα αξιολογήθηκαν από δύο ανεξάρτητους ειδικούς κυτταρολόγους και οι απαντήσεις δόθηκαν με βάση το σύστημα Bethesda.

3.2.2. HPV-DNAtest

Από το ίδιο τραχηλικό επίχρισμα απεκτήθη το DNA του HPV ιού χρησιμοποιώντας το σκεύασμα Purelink Invitrogen. Η ανίχνευση των διαφόρων τύπων του ιού πραγματοποιήθηκε με PCR με την τεχνολογία CLART[®] (Clinical Array Technology) Humanpapillomavirus 2 kit η οποία βασίζεται ουσιαστικά στην ανίχνευση και τον υβριδισμό του HPV γονιδιώματος με τη χρήση probes. Η μέθοδος αυτή έχει τη δυνατότητα να ανιχνεύει λοιμώξεις και συλλοιμώξεις με έως και 35 HPV γονότυπους. Η διαδικασία περιλαμβάνει επιγραμματικά τα εξής στάδια:

- HPV-DNA extraction
- Διαδικασία ενίσχυσης και υβριδισμού
- Ανάγνωση των αποτελεσμάτων με το σύστημα CAR (Clinical Reader Array).

Έτσι αξιολογήθηκαν 21 τύποι HPV υψηλής επικινδυνότητας (16,18,26,31,33,35,39,43,45,51,52,53,56,58,59,66,68,70,73,82 και 85) και 14 τύποι χαμηλής επικινδυνότητας (6,11,40,42,44,54,61,62,71,72,81,83,84 και 89).

3.2.3. Ανοσοκυτοχημική ανίχνευση του p16

Η ανίχνευση του p16 έγινε με ανοσοχημική χρώση που πραγματοποιήθηκε με CINtec αντιδραστήριο χρησιμοποιώντας τον αυτοματοποιημένο “DakoAutostainerUniversalSlideStainer”. Η μέθοδος αυτή προκαλεί μια χρωματική αντίδραση ανάλογα με την έκφραση του δείκτη στον πυρήνα ή το κυτταρόπλασμα του κυττάρου. Καφέ χρώση των κυττάρων (πυρηνική ή/και κυτταροπλασματική) είναι δείγμα υπερέκφρασης του δείκτη. Τα δείγματα αξιολογήθηκαν από κυτταρολόγους με εμπειρία στις ανοσοχημικές τεχνικές και με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή, σύμφωνα με τις οποίες η ένταση της χρώσης δεν θεωρείται κριτήριο θετικότητας αλλά και μόνο η παρουσία χρώσης σε έστω και ένα δυσκαρυωτικό κύτταρο αποτελεί θετικό αποτέλεσμα. Επομένως δείγματα που δεν εμφάνισαν καφέ χρώση των κυττάρων θεωρήθηκαν αρνητικά. Επίσης παρουσία καφέ χρώσης σε μεταπλαστικά ή φυσιολογικά ενδοτραχηλικά κύτταρα θεωρήθηκε ως αρνητικό αποτέλεσμα.

3.2.4. Ανίχνευση του m-RNA (E6/E7) με κυτταρομετρία ροής

Η μέθοδος αυτή ανιχνεύει την έκφραση m-RNA των E6/E7 περιοχών του γονιδιώματος υψηλού κινδύνου τύπων του HPV ιού με χρήση της τεχνολογίας Permiflow (INVIRION DIAGNOSTICS, LLC, OacBrook, IL).

Η τεχνική αυτή βασίζεται στις αρχές της κυτταρομετρίας ροής σύμφωνα με τις οποίες τα προς ανάλυση κύτταρα ρέουν με τη μορφή εναιωρήματος μπροστά από μια φωτεινή ακτίνα Laser με πολύ υψηλές ταχύτητες και η αναγνώριση, η διαλογή

και η καταμέτρηση τους γίνεται με βάση τον εκπεμπόμενο φωτισμό και τη σκέδαση του φωτός. Τα φωτεινά αυτά σήματα μετατρέπονται σε ηλεκτρικά σήματα και αυτά ενισχύονται και διοχετεύονται με τη μορφή ψηφιακών ενδείξεων σε ηλεκτρονικό υπολογιστή όπου αναλύονται και παρουσιάζονται ως θετικά ή αρνητικά ποσοστά (κατώτερο όριο θετικότητας ορίζεται από τον κατασκευαστή το 1,5%).

Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι ότι πραγματοποιεί ποσοτικοποιημένη ανάλυση σε μεγάλο αριθμό κυττάρων και σε σύντομο χρονικό διάστημα και είναι μια μέθοδος σχετικά χαμηλού κόστους με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα. Το κύριο μειονέκτημα της είναι η αδυναμία προσδιορισμού των συγκεκριμένων τύπων του ιού που ενοχοποιούνται για τη λοίμωξη.

3.2.5. Ανίχνευση του m-RNA (E6/E7) με NASBA

Η χρήση της τεχνολογίας NASBA (NUCLEIC ACID AMPLIFICATION BY TRANSCRIPTIONAL BONDING) επιτρέπει την ανίχνευση του m-RNA των E6/E7 πρωτεϊνών από 5 υψηλού κινδύνου τύπους του ιού HPV (16, 18, 31, 33 και 45) οι οποίοι σχετίζονται με το 95% των HPV-εξαρτώμενων καρκίνων του τραχήλου μήτρας στην Ευρώπη (Kraus *et al* 2006).

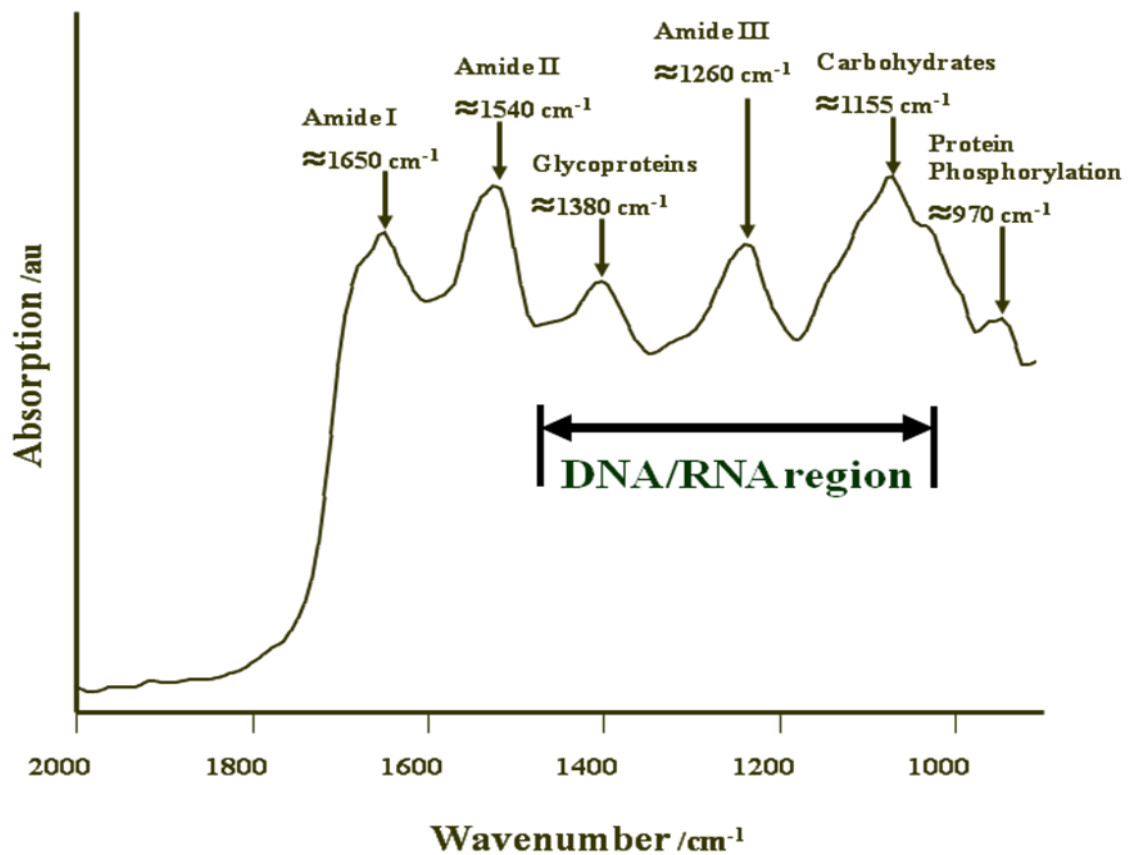
Η μέθοδος χρησιμοποιεί ως αρχική μήτρα για την επιλεκτική ενίσχυση ενός τμήματος το RNA του ιού (και όχι DNA ή c-DNA όπως άλλες μέθοδοι) και η αντίδραση ανίχνευσης πραγματοποιείται σε σταθερή θερμοκρασία 41°C. Η διαδικασία ξεκινά με τον υβριδισμό του στόχου με κατάλληλο εκκινητή (P1) ο οποίος διαθέτει αλληλουχία πρόσδεσης της T7 RNA-πολυμεράσης. Ακολουθεί η αντίστροφη μεταγραφή του τμήματος με χρήση της AMV-RT. Το RNA στο υβρίδιο RNA-DNA που έχει προκύψει υδρολύεται από την R-Nase. Το γεγονός αυτό επιτρέπει στο δεύτερο εκκινητή (P2) ο οποίος είναι συμπληρωματικός του ενός τμήματος του RNA στόχου να προσδεθεί στην c-DNA αλυσίδα. Η δραστηριότητα της DNA-πολυμεράσης της AMV-RT αντιγράφει το τμήμα δημιουργώντας μια διπλή c-DNA αλυσίδα, η οποία είναι αντίγραφο της αρχικής RNA αλληλουχίας, με έναν πλήρως λειτουργικό υποκινητή της T7 RNA πολυμεράσης. Ο υποκινητής αναγνωρίζεται από την T7 RNA πολυμεράση η οποία παράγει 10-10.000 αντίστροφα (anti-sense) μονόκλινα RNA μετάγραφα του αρχικού στόχου. Αυτά χρησιμοποιούνται ως μήτρα για την επανεκκίνηση του κύκλου της διαδικασίας με τη μόνη διαφορά ότι τώρα οι εκκινητές προσδένονται με αντίθετη σειρά. Η τυπική τάξη ενίσχυσης που πραγματοποιείται μ' αυτή τη διαδικασία κυμαίνεται στα 10⁹ αντίγραφα.

Τα βασικά πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι ότι αφενός ανιχνεύονται τα επίπεδα έκφρασης των ογκογόνων πρωτεϊνών (E6/E7) και αφετέρου ότι μπορεί να εκτιμηθεί η φάση της μόλυνσης, αν δηλαδή είναι επισωματική ή ενσωματωμένη, καθώς έχει δειχθεί ότι σε ενσωματωμένες μορφές μόλυνσης η έκφραση των E6 και E7 αυξάνεται ενώ το ιϊκό φορτίο, υπολογισμένο σε αντίγραφα DNA του ιού, μειώνεται

σημαντικά. Η τεχνική αυτή παρουσιάζει υψηλότερη ειδικότητα και θετική προγνωστική αξία για την ανίχνευση ιστολογικά επιβεβαιωμένων CIN2+ αλλοιώσεων σε σχέση με τεχνικές βασισμένες στην HPV-DNA τυποποίηση (Molden *et al* 2004; 2005). Ένα επίσης ενδιαφέρον εύρημα της βιβλιογραφίας (Lie *et al* 2005) είναι η ανίχνευση με τη μέθοδο αυτή ενεργού HPV λοίμωξης στο 5% περίπου των σεξουαλικά ενεργών γυναικών με αρνητική κυτταρολογία και κολποσκόπηση.

3.2.6. Μίκρο-φασματοσκοπία (micro-spectroscopy)

Η μέθοδος φασματοσκοπίας που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη αυτή είναι η Attenuated Total Reflection-Fourier Transform IR (ATR-FTIR) φασματοσκοπία η οποία ερευνά την ικανότητα κυτταρικών βιομορίων να απορροφούν σε συγκεκριμένα μήκη κύματος ($\lambda = 2.5 - 25\mu\text{m}$) την υπέρυθρη ακτινοβολία μέσω δονήσεων των χημικών τους δεσμών. Έτσι ανιχνεύονται και μετρούνται κυτταρικοί βιοδείκτες όπως DNA, RNA, λιπίδια, πρωτεΐνες και υδατάνθρακες (Martin *et al* 2010). Με τη μέθοδο αυτή μπορούν να καταγραφούν 10 φάσματα από ένα κυτταρολογικό δείγμα μέσα σε 15 λεπτά. Στην εικόνα 3.2.1. βλέπουμε το αρχικό φάσμα όπου συγκεκριμένα χημικά μόρια απορροφούν την ακτινοβολία σε ένα ορισμένο μήκος κύματος και παρουσιάζουν καθορισμένες αιχμές απορρόφησης.



Biophysical Journal (2005) 88: 3699-3706

Εικόνα 3.2.1. Καταγραφή του φάσματος απορρόφησης της υπέρυθρης ακτινοβολίας συγκεκριμένων κυτταρικών βιομορίων.

Η προετοιμασία του τραχηλικού δείγματος υπό τη μορφή κυτταρολογίας υγρής φάσης (LBC) πριν τη φασματοσκοπία διαρκεί περίπου 30 λεπτά και περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

1ο Στάδιο Καθαρισμός του δείγματος με φυγοκέντρίσή του στους 1500 κύκλους/λεπτό για 5 λεπτά και αναρρόφηση του ελαιώρηματος. Το ίζημα των κυττάρων που προκύπτει ξεπλένεται με 3 ml αποσταγμένου νερού, φυγοκεντρείται για άλλα 5 λεπτά στους 1500 κύκλους/λεπτό και αφαιρείται το σχηματιζόμενο ελαιώρημα. Αυτό το βήμα επαναλαμβάνεται 3 φορές.

2ο Στάδιο Τοποθέτηση του ιζήματος των κυττάρων μετά τον καθαρισμό πάνω σε ειδικό γυάλινο πλακίδιο (low-E glass microscope slide, Kevley Technologies, Chesterland, OH, USA.)

3ο Στάδιο Αφυδάτωση. Τα πλακίδια αφήνονται να στεγνώσουν στον αέρα και κατόπιν αποθηκεύονται σε ειδικό αφυγραντήρα μέχρι την ανάλυσή τους,

εξουδετερώνοντας έτσι κάθε πιθανότητα παρεμβολής από τυχόν παρουσία νερού στο λαμβανόμενο φάσμα.

Ιδιαίτερη προσοχή απαιτείται κατά την τοποθέτηση του δείγματος στο πλακίδιο ώστε να εξασφαλίζεται ένα ομοιόμορφο πάχος του υλικού (περίπου 3-5μm) για να το διαπερνά η προσπίπτουσα υπέρυθρη ακτινοβολία.

Η φασματοσκοπική ανάλυση των δειγμάτων διενεργήθηκε με ATR-FTIR φασματοσκοπία στο Κέντρο Βιοφωτονικών (Centre for Biophotonics) στο Πανεπιστήμιο του Lancaster στην Αγγλία. Οι ειδικοί που πραγματοποίησαν τη φασματοσκοπία δεν γνώριζαν τις κυτταρολογικές και ιστολογικές διαγνώσεις των δειγμάτων. Το φασματοσκόπιο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το BrukerTENSOR 27 FTIR. με ένα επιπλέον εξάρτημα, το HeliosATR που περιείχε έναν κρύσταλλο από διαμάντι (Bruker Optics Ltd, Coventry, UK). Με τη χρήση κάμερας (CCTV) αποκτήθηκε το φάσμα από 10 διαφορετικές περιοχές του δείγματος. Το λαμβανόμενο φάσμα μετατράπηκε σε απορροφώμενη ενέργεια με τη χρήση του BrukerOPUS 6.5 λογισμικού και κατόπιν έγινε επεξεργασία των δεδομένων χρησιμοποιώντας πολύπλοκα μαθηματικά λογισμικά (MAT LAB R2010a software).

Η επεξεργασία του φάσματος περιλαμβάνει τρία βήματα:

α) Κόψιμο. Το φάσμα κόβεται μεταξύ των περιοχών ενδιαφέροντος, δηλαδή των περιοχών που περιλαμβάνουν το βιοχημικό αποτύπωμα των κυττάρων.

β) Βασική διόρθωση. Δηλαδή διόρθωση λαθών που προκύπτουν ως αποτέλεσμα φυσικών φαινομένων όπως η διασπορά υπέρυθρης ακτινοβολίας από σκέδασή της.

γ) Κανονικοποίηση. Γίνεται για να διορθώσει διαφορές στις εντάσεις απορρόφησης που προκύπτουν από παράγοντες όπως το πάχος του δείγματος ή η συγκέντρωσή του.

Ακολουθεί η επεξεργασία των δεδομένων προς την οπτικοποίησή τους με γραφήματα με χρήση γραμμικών μεθόδων όπως PCA (Principal Component Analysis), LDA (Linear Discriminant Analysis) ή PCA-LDA. Οι μέθοδοι αυτοί συμβάλλουν στην κατανόηση των υποκείμενων βιοχημικών μεταβολών που είναι υπεύθυνες για το διαχωρισμό των κυτταρολογικών κατηγοριών στο λαμβανόμενο φάσμα.

Το πλεονέκτημα της φασματοσκοπίας είναι ότι επιτρέπει έναν αρκετά ικανοποιητικό διαχωρισμό των φυσιολογικών από τα ανώμαλα κύτταρα ξεπερνώντας τους περιορισμούς της συμβατικής κυτταρολογίας ή της κυτταρολογίας υγρής φάσης όπως το ποσοστό των ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων (El-Tawil *et al* 2008). Ουσιαστικά η μέθοδος αυτή ανιχνεύει τις

αλλαγές σε μοριακό επίπεδο μέσω δομικών αλλαγών συγκεκριμένων ομάδων κυττάρων και όχι τις μορφολογικές αλλοιώσεις τους όπως η συμβατική κυτταρολογία.

4.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Κατά το χρονικό διάστημα εκπόνησης της διατριβής μου ένας πληθυσμός 177 γυναικών προσήλθαν στο Ιατρείο Κολποσκόπησης με κυτταρολογία αναφοράς ενδεικτική υψηλόβαθμης αλλοίωσης στον τράχηλο (HSIL). Τα δημογραφικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού που έλαβε μέρος στη μελέτη παρατίθενται στον πίνακα 4.1

Ηλικία (εύρος τιμών)	21-42 έτη	
Ηλικία (μέση τιμή)	29,5 έτη	
Τεκνοποίηση	51/177	29%
Κάπνισμα	140/177	79%
Μέση ηλικία έναρξης σεξουαλικής δραστηριότητας	18,9 έτη	
>3 σεξουαλικοί σύντροφοι	113/177	64%

Πίνακας 4.1 Δημογραφικά στοιχεία πληθυσμού

Όπως προκύπτει από αυτά τα δημογραφικά δεδομένα η εμφάνιση υψηλόβαθμων ενδοεπιθηλιακών αλλοιώσεων του τραχήλου παρατηρείται συνήθως κατά τη μέση αναπαραγωγική ηλικία, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από τη βιβλιογραφία όπου αναφέρεται συγκεκριμένα υψηλότερος κίνδυνος στις ηλικίες μεταξύ 25-29 ετών (Insinga *et al* 2004). Επίσης οι περισσότερες από τις γυναίκες αυτές (περίπου το 70%) είναι άτοκες επομένως η διαχείριση τους θα πρέπει να γίνει με επιφύλαξη και ιδιαίτερη προσοχή σε σχέση με την πιθανότητα επιπλοκών από τη θεραπεία σε μελλοντική κύηση(π.χ. κίνδυνος προωρότητας).

Είναι γνωστό πως η λοίμωξη με τον ιό HPV είναι αναγκαία συνθήκη για την εμφάνιση καρκίνου του τραχήλου της μήτρας και αποτελεί μια από τις πλέον συχνές σεξουαλικά μεταδιδόμενες νόσους. Επομένως είναι εξαιρετικά σημαντικές πληροφορίες που αφορούν τις σεξουαλικές συνήθειες του υπό εξέταση πληθυσμού όπως η ηλικία έναρξης της σεξουαλικής δραστηριότητας και ο αριθμός των σεξουαλικών συντρόφων ο οποίος επηρεάζει τον κίνδυνο μετάδοσης της λοίμωξης σύμφωνα με πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα (Herrero *et al* 2005). Η υπολογιζόμενη μέση ηλικία έναρξης της σεξουαλικής δραστηριότητας των συμμετεχόντων στην παρούσα μελέτη ήταν τα 18,9 έτη, ηλικία σημαντικά μεγαλύτερη από το 16^ο έτος που εκτιμάται ότι είναι η ηλικία έναρξης της σεξουαλικής ζωής στο γενικό πληθυσμό στην Ελλάδα. Όμως παρόλη την προχωρημένη ηλικία έναρξης της σεξουαλικής ζωής οι περισσότερες από τις μισές γυναίκες (ποσοστό 64%) είχαν έως τη συγκεκριμένη χρονική στιγμή πάνω από τρεις σεξουαλικούς συντρόφους, γεγονός που, όπως αναφέρθηκε, αυξάνει τον κίνδυνο μετάδοσης του HPV. Διαπιστώνεται επίσης ότι ένα μεγάλο ποσοστό (79%), περίπου οι οκτώ στις δέκα γυναίκες της μελέτης, ανέφεραν ότι καπνίζουν προσθέτοντας έτσι στο ιστορικό τους έναν ακόμα προδιαθεσικό παράγοντα για την εμφάνιση καρκίνου του τραχήλου.

Κατά την κολποσκοπική εξέταση μόνο οι 18 από το σύνολο των 177 γυναικών με υψηλόβαθμη κυτταρολογία αναφοράς είχαν κολποσκοπική εικόνα ενδεικτική χαμηλόβαθμης αλλοίωσης ενώ οι υπόλοιπες 156 είχαν υψηλόβαθμες βλάβες. Επίσης παρατηρήσαμε ότι από το συνολικό πληθυσμό με υψηλόβαθμη κυτταρολογία ένα ποσοστό περίπου 20% είχε ιστολογική διάγνωση ενδεικτική χαμηλόβαθμης αλλοίωσης (<CIN2) ενώ ιστολογική επιβεβαίωση βλάβης με πραγματικό κακόηθες δυναμικό (CIN3 ή χειρότερη) είχε μόνο το 58% .

Από τη σύγκριση της κολποσκόπησης με την ιστολογική διάγνωση, όταν χρησιμοποιήθηκε ως κατώτερο όριο (cut-off) το CIN2+, μόνο το 12% των γυναικών με κολποσκόπηση ενδεικτική υψηλόβαθμης αλλοίωσης είχαν τελικά στην ιστολογία ηπιότερες βλάβες από CIN2 ενώ η πλειοψηφία αυτών (88%) είχε ιστολογική αλλοίωση βαθμού CIN2+ ή χειρότερου. Ενώ όταν ως κατώτερο όριο (cut-off) ιστολογικής διάγνωσης χρησιμοποιήθηκε το CIN3+ το ποσοστό των γυναικών με ιστολογική αλλοίωση CIN3+ ή χειρότερη ήταν 62%. Όσον αφορά την υποομάδα των γυναικών με χαμηλόβαθμη κολποσκοπικά εικόνα το μεγαλύτερο ποσοστό τους (70%) είχαν βλάβες ηπιότερες από CIN2 όταν ως κατώτερο όριο στην ιστολογία ετέθη το CIN2+. Το ίδιο ποσοστό γυναικών (70%), δηλαδή οι 12 στις 18 είχαν βλάβες ηπιότερες από CIN3 όταν κατώτερο ιστολογικά όριο ήταν το CIN3+.

Στον πίνακα 4.2. παρουσιάζεται ένας διαχωρισμός του πληθυσμού με βάση την κολποσκόπηση και την ιστολογία.

Πίνακας 4.2. Σύγκριση κολποσκοπησης – ιστολογικής διάγνωσης

ΚΟΛΠΟΣΚΟΠΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ	ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ			
	<CIN2	≥CIN2+	<CIN3+	≥CIN3+
Υψηλόβαθμη βλάβη (n=156)	18/156 (12%)	138/156(88%)	60/156 (38%)	96/156(62%)
Χαμηλόβαθμη βλάβη (n=18)	12/18 (70%)	6/18 (30%)	12/18 (70%)	6/18 (30%)
Συνολικόςπληθυσμός (n=177)	30/177 (17%)	144/177 (83%)	75/177 (42%)	102/177(58%)

Με βάση τα αποτελέσματα της μελέτης μας προκύπτει ότι η κολποσκοπική εκτίμηση παρουσιάζει υψηλή διαγνωστική ακρίβεια σε σύγκριση με την ιστολογία ιδίως όσον αφορά τη διάγνωση υψηλόβαθμων αλλοιώσεων (CIN2+/CIN3+) με ποσοστό συμφωνίας περίπου 95%, γεγονός που οφείλεται στο ότι όλες οι κολποσκοπήσεις έγιναν από έναν ειδικευμένο και έμπειρο κολποσκόπο.

Επίσης αξιολογήθηκαν οι στατιστικές παράμετροι της ευαισθησίας, της ειδικότητας, της θετικής και αρνητικής προγνωστικής αξίας του κάθε τεστ ξεχωριστά καθώς και δέκα διαφορετικών συνδυασμών τους. Τα αποτελέσματα αυτής της στατιστικής ανάλυσης φαίνονται στους πίνακες 4.3 και 4.4.

Πίνακας 4.3 Ευαισθησία και ειδικότητα του κάθε τεστ ξεχωριστά

ΤΕΣΤ	ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ	ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ	PPV	NPV
LBC	77% (95%CI:64-89)	50% (95%CI:19-81)	88% (95%CI:78-98)	31% (95%CI:9-54)
ΚΟΛΠΟΣΚΟΠΗΣΗ	96% (95%CI:90-100)	40% (95%CI:10-70)	88% (95%CI:80-97)	67% (95%CI:29-100)
HPV(+ve for any HR-type)	90% (95%CI:81-98)	50% (95%CI:19-81)	90% (95%CI:81-98)	50% (95%CI:19-81)
HPV(+ve for at least one of 16,18,31,33,45)	63% (95%CI:50-77)	60% (95%CI:30-90)	89% (95%CI:78-99)	25% (95%CI:8-42)
NASBA	72% (95%CI:59-85)	78% (95%CI:51-100)	94% (95%CI:87-100)	35% (95%CI:14-56)
Flow cytometry	55% (95%CI:41-69)	30% (95%CI:2-58)	79% (95%CI:66-93)	12% (95%CI:1-25)
P16	53% (95%CI:39-67)	70% (95%CI:42-98)	89% (95%CI:78-100)	24% (95%CI:9-40)

Το τεστ με την υψηλότερη ευαισθησία φαίνεται να είναι η κολποσκόπηση η οποία όπως αναφέρεται και στη βιβλιογραφία είναι πιο ακριβής ως μέθοδος στην αναγνώριση υψηλόβαθμης νόσου (Horman *et al* 1998)

Πίνακας 4.4 Ευαισθησία, ειδικότητα, PPV και NPV δέκα διαφορετικών συνδυασμών των βιοδεικτών.

ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΙ	ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ	ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ	PPV	NPV
Κολποσκοπήση& HPV(+ve if any HR-type)	100% (95%CI:100-100)	43% (95%CI:6-80)	91% (95%CI:83-99)	100% (95%CI:100-100)
Κολποσκοπήση&HPV(+ve if at least one of 5 HR-types)	100% (95%CI:100-100)	50% (95%CI:10-90)	92% (95%CI:84-100)	100% (95%CI:100-100)
Κολποσκοπήση&HPV(+ve if any HR-types) & p16	100% (95%CI:100-100)	75% (95%CI:33-100)	95% (95%CI:87-100)	100% (95%CI:100-100)
Κολποσκοπήση&HPV(+ve if at least one of 5 HR-types) & p16	100% (95%CI:100-100)	100% (95%CI:100-100)	100% (95%CI:100-100)	100% (95%CI:100-100)
Κολποσκοπήση& HPV(+ve if any HR-types) & NASBA	100% (95%CI:100-100)	60% (95%CI:17-100)	94% (95%CI:85-100)	100% (95%CI:100-100)
Κολποσκοπήση&HPV(+ve if at least one of 5 HR-types) & NASBA	100% (95%CI:100-100)	60% (95%CI:17-100)	93% (95%CI:83-100)	100% (95%CI:100-100)
Κολποσκοπήση& HPV(+ve if any HR-types) & NASBA & p16	100% (95%CI:100-100)	100% (95%CI:100-100)	100% (95%CI:100-100)	100% (95%CI:100-100)
HPV(+ve if any HR-types) & NASBA	91% (95%CI:82-100)	71% (95%CI:38-100)	94% (95%CI:86-100)	63% (95%CI:29-96)
HPV(+ve if at least one of 5 HR-types) & NASBA	69% (95%CI:55-84)	71% (95%CI:38-100)	93% (95%CI:84-100)	29% (95%CI:8-51)

Από την αρχική αυτή ανάλυση βλέπουμε ότι προκύπτουν αρκετοί συνδυασμοί παραμέτρων που παρουσιάζουν υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα στην ανίχνευση υψηλόβαθμων αλλοιώσεων και συγκεκριμένα ο απόλυτα ιδανικός συνδυασμός φαίνεται να είναι αυτός της κολποσκοπήσης με τις μεθόδους ανίχνευσης του DNA και m-RNA του HPV και τη συμμετοχή του p16.

4.1. ΠΙΘΑΝΕΣ ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ

Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης, κάτι που είναι γνωστό ευρέως και από τη βιβλιογραφία, δεν έχουν όλες οι γυναίκες με υψηλόβαθμη κυτταρολογία ιστολογικά επιβεβαιωμένη υψηλόβαθμη αλλοίωση. Ένα σημαντικό ποσοστό αυτών (περίπου 20% στη μελέτη μας) είχε χαμηλόβαθμη ιστολογία παρά τον αρχικά υψηλόβαθμο φαινότυπο και το ποσοστό αυτό ήταν μεγαλύτερο (έως και 70%) στις περιπτώσεις που υπήρχε ασυμφωνία μεταξύ κυτταρολογίας και κολποσκοπικής εικόνας. Με βάση αυτό το δεδομένο, προσπαθήσαμε να διερευνήσουμε τη δυνατότητα χρήσης των μοριακών δεικτών που ανιχνεύθηκαν για τη διαλογή των γυναικών με υψηλόβαθμη κυτταρολογία πριν να υποβληθούν σε κολποσκόπηση, έτσι ώστε να αναγνωριστούν αυτές με χαμηλό κακόηθες δυναμικό που δεν θα χρειαζόταν άμεση παραπομπή σε κολποσκόπηση. Ως κατώτερο όριο ιστολογικής διάγνωσης (cut-off) ορίστηκε το CIN3+ και υπολογίστηκε η ευαισθησία και η ειδικότητα κάθε τεστ ξεχωριστά αλλά και συνδυασμών τους στην αναγνώριση των γυναικών με CIN3+ αλλοιώσεις πριν από την κολποσκοπική εκτίμηση. Τα αποτελέσματα αυτής της ανάλυσης φαίνονται στον πίνακα 4.1.1

Πίνακας 4.1.1 Διαλογή γυναικών πριν από την κολποσκόπηση.

Τεστ και συνδυασμοί	Ευαισθησία (%)	Ειδικότητα (%)
HPV-DNA(anytype)	91	29
HPV-DNA(5 HRtypes)	63	49
P16	60	63
m-RNA (NASBA)	79	62
m-RNA (Flow)	59	42
HPV-DNA(any type)+p16	53	72
HPV-DNA(any type)+m-RNA(NASBA)	74	62
HPV-DNA(any type)+m-RNA(Flow)	57	60
HPV-DNA(any type)+p16 OR m-RNA(NASBA)	79	51
HPV-DNA(any type)+p16 OR m-RNA(Flow)	78	49
HPV-DNA(any type) +m-RNA(NASBA) OR Flow	81	49

Από την ανάλυση αυτή προκύπτει ότι το τεστ με την υψηλότερη ευαισθησία (91%) είναι το HPV-DNA τεστ για την ανίχνευση οποιουδήποτε από τους 35 τύπους του ιού, ενώ την υψηλότερη ειδικότητα (72%) φαίνεται να έχει ο συνδυασμός του HPV-DNA τεστ με την ανίχνευση του p16. Το τεστ με τον ιδανικότερο συνδυασμό ευαισθησίας-ειδικότητας ($S=79\%$ & $Sp=62\%$) είναι η ανίχνευση του m-RNA του HPV με τη μέθοδο NASBA, γεγονός που συνάδει και με τα δεδομένα από τη βιβλιογραφία (Molden *et al* 2004).

Μια δεύτερη πιθανή κλινική εφαρμογή των μοριακών δεικτών που εξετάστηκε ήταν η δυνατότητα επιλογής των γυναικών οι οποίες μετά την κολποσκοπική εκτίμηση θα πρέπει να παραπεμφθούν για θεραπεία. Η αναγνώριση δηλαδή αυτού του πληθυσμού που με βάση τον υψηλόβαθμο φαινότυπο αλλά και τις τιμές των δεικτών θα έχει αυξημένο κίνδυνο εξέλιξης της νόσου και επομένως ανάγκη άμεσης θεραπευτικής αντιμετώπισης. Η στατιστική ανάλυση των βιοδεικτών και της κολποσκόπησης, σε σύγκριση πάντα με την ιστολογία (cut-off=CIN3+), προς αυτή την κατεύθυνση έδωσε τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον πίνακα 4.1.2.

Πίνακας 4.1.2 Διαλογή γυναικών μετά την κολποσκόπηση.

Τεστ και συνδυασμοί	Ευαισθησία (%)	Ειδικότητα (%)
Κολποσκόπηση	94	18
Κολποσκόπηση +HPV-DNA(any type)	88	31
Κολποσκόπηση+ P16	53	62
Κολποσκόπηση+ m-RNA (NASBA)	74	64
Κολποσκόπηση m-RNA (Flow)	52	60
Κολποσκόπηση+ HPV-DNA(any type)+p16	44	72
Κολποσκόπηση+ HPV-DNA(any type)+m-RNA(NASBA)	68	68
Κολποσκόπηση+ HPV-DNA(any type)+m-RNA(Flow)	50	62
Κολποσκόπηση+ HPV-DNA(any type)+p16 OR m-RNA(NASBA)	73	51
Κολποσκόπηση+ HPV-DNA(any type)+p16 OR m-RNA(Flow)	71	51
Κολποσκόπηση+ HPV-DNA(any type) +m-RNA(NASBA) OR Flow	78	51

Βλέπουμε ότι το τεστ με την υψηλότερη ευαισθησία (94%) ήταν η κολποσκόπηση ενώ ο συνδυασμός της με το HPV-DNA τεστ και την ανίχνευση του p16 παρουσιάζει την υψηλότερη ειδικότητα (72%). Όταν η κολποσκόπηση συνδυάζεται με την ανίχνευση του m-RNA του ιού με τη μέθοδο NASBA επιτυγχάνεται καλύτερη σχέση μεταξύ ευαισθησίας-ειδικότητας, ενώ με την προσθήκη του HPV-DNA τεστ έχουμε την απόλυτη ισορροπία (S=68%, Sp=68%).

Ωστόσο και για τις δυο αυτές πιθανές κλινικές εφαρμογές η ανάλυση των αποτελεσμάτων δεν ανέδειξε κάποιο συνδυασμό δεικτών με υψηλές τιμές ευαισθησίας και ειδικότητας τέτοιες ώστε να θεωρηθεί ως ιδανικό τεστ διαλογής.

Εξετάσαμε επίσης μία ακόμη πιθανότητα χρήσης των βιοδεικτών, για τη διαλογή των γυναικών που παρουσίασαν ασυμφωνία στη διάγνωση μεταξύ κυτταρολογίας/κολποσκόπησης, αυτές δηλαδή στις οποίες παρά τον υψηλόβαθμο κυτταρολογικά φαινότυπο τα ευρήματα της κολποσκόπησης ήταν ενδεικτικά χαμηλόβαθμης αλλοίωσης ή είχαν φυσιολογική κολποσκοπική εικόνα.

Το διαγνωστικό αυτό δίλλημα, περιπτώσεις δηλαδή που παρά την υψηλόβαθμη κυτταρολογία στην κολποσκόπηση αναδεικνύονται ηπιότερες βλάβες ή ακόμα και αλλοιώσεις ενδεικτικές απλής HPV λοίμωξης (acetowhite επιθήλιο), παρουσιάζεται συχνά στην κλινική πράξη και θα μπορούσαν ίσως οι γυναίκες αυτές να ωφεληθούν από μια πιο στενή συντηρητική παρακολούθηση. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης προς αυτή την κατεύθυνση ήταν πιο ενθαρρυντικά γιατί ανέδειξαν υψηλή ευαισθησία αλλά και ειδικότητα για όλες σχεδόν τις παραμέτρους που εξετάστηκαν. Το κατώτερο όριο ιστολογικής διάγνωσης που χρησιμοποιήθηκε για σύγκριση σ'αυτή την ανάλυση ήταν CIN3+/CIN2+ και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται αναλυτικά στον πίνακα 4.1.3.

Πίνακας 4.1.3 Διαλογή γυναικών με χαμηλόβαθμη ή/και φυσιολογική κολποσκόπηση.

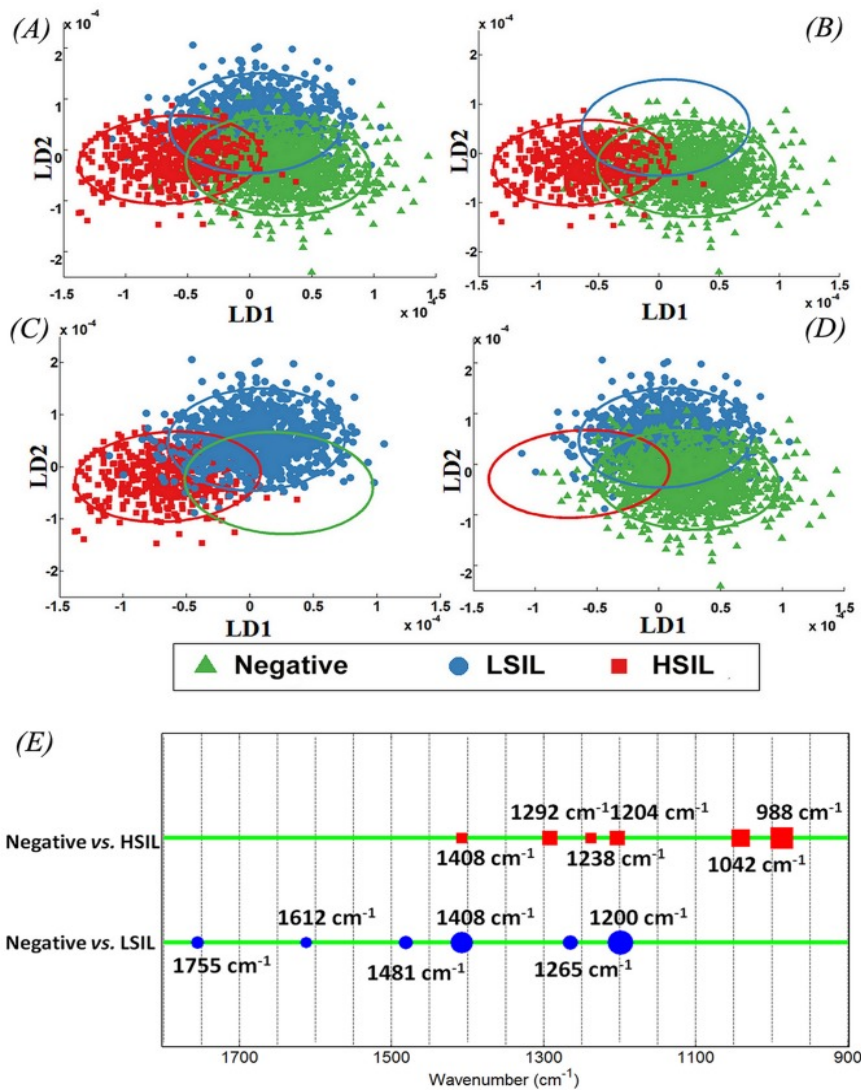
Τεστ και συνδυασμοί	Ευαισθησία (%)	Ειδικότητα (%)
HPV-DNA(anytype)	91	72
HPV-DNA(5 HRtypes)	91	72
P16	91	94
m-RNA (NASBA)	91	94
m-RNA (Flow)	91	5
HPV-DNA(any type)+p16	91	94
HPV-DNA(any type)+m-RNA(NASBA)	91	72
HPV-DNA(any type)+m-RNA(Flow)	91	94
HPV-DNA(any type)+p16 OR m-RNA(NASBA)	91	94
HPV-DNA(any type)+p16 OR m-RNA(Flow)	91	71
HPV-DNA(any type) +m-RNA(NASBA) OR Flow	91	72
HPV-DNA(any type)+p16 + m-RNA(NASBA)	91	94

Όπως παρατηρούμε η ανάλυση των δεδομένων γι'αυτή την τελευταία πιθανή εφαρμογή των βιοδεικτών δείχνει ότι σχεδόν όλοι μόνοι τους ή σε συνδυασμούς παρουσιάζουν αρκετά υψηλή ευαισθησία (πάνω από 90%). Όσον αφορά την ειδικότητα οι περισσότερες από τις παραμέτρους που αναλύθηκαν έδειξαν επίσης υψηλές τιμές (έως 94%).

4.2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ

Τα τραχηλικά δείγματα από μια ομάδα γυναικών της μελέτης (50 γυναίκες) αναλύθηκαν μαζί με άλλα 208 δείγματα, από τα οποία 120 αντιστοιχούσαν σε αρνητική και 88 σε χαμηλόβαθμη κυτταρολογία, με τη μέθοδο της φασματοσκοπίας με σκοπό να τεκμηριωθεί η διαγνωστική ακρίβεια της μεθόδου σε σχέση με την κυτταρολογία αλλά και την ιστολογία (Gajjar *et al* 2014). Για όλες σχεδόν τις γυναίκες με υψηλόβαθμη κυτταρολογία (48 από τις 50) υπήρχε δείγμα τραχηλικού ιστού για ιστολογική διάγνωση. Υψηλόβαθμη ιστολογία (CIN2+) είχαν οι 31 από τις 48 γυναίκες (65%) ενώ χαμηλόβαθμη οι 5 (10%). Μόνο 3 γυναίκες (6%) είχαν αρνητική ιστολογία ενώ οι 9 από τις 48 είχαν ιστολογικά επιβεβαιωμένη διηθητική νόσο (19%).

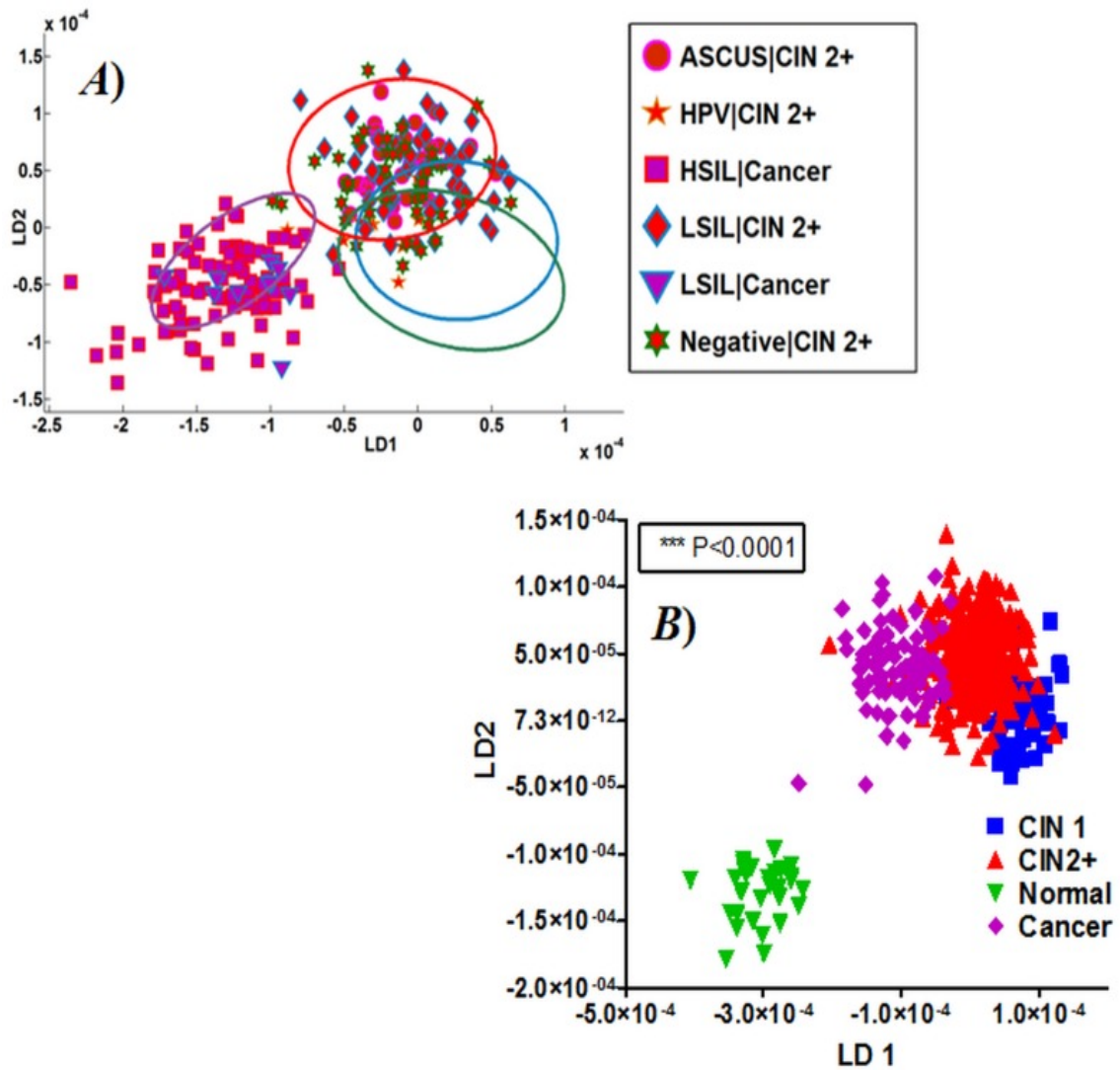
Στην εικόνα 4.2.1. φαίνεται η LD ανάλυση του φάσματος υπέρυθρης ακτινοβολίας με βάση την κυτταρολογία. Παρατηρείται σημαντικού βαθμού αλληλοεπικάλυψη και για τους τρεις βαθμούς κυτταρολογίας (A). Ωστόσο ο διαχωρισμός των φασμάτων φαίνεται να είναι καλύτερος με μικρότερη αλληλοεπικάλυψη μεταξύ αρνητικής και υψηλόβαθμης κυτταρολογίας (B) και μεταξύ χαμηλόβαθμης και υψηλόβαθμης (C). Οι ελλειπτικοί κύκλοι γύρω από τα φάσματα αντιπροσωπεύουν το 90% διάστημα εμπιστοσύνης για τις παρατηρούμενες τιμές. Στο σχήμα E φαίνονται οι έξι κορυφαίες αιχμές απορρόφησης που είναι υπεύθυνες για το διαχωρισμό των φασμάτων της αρνητικής κυτταρολογίας από τη χαμηλόβαθμη και την υψηλόβαθμη.



Εικόνα 4.2.1. IR φάσματα κυτταρολογίας με LD ανάλυση.

Στην εικόνα 4.2.2. παρουσιάζεται η ανάλυση του IR φάσματος των τραχηλικών δειγμάτων με υψηλόβαθμη ιστολογία (CIN2+) και καρκίνο σε σχέση με την αρχική κυτταρολογική διάγνωση. Παρατηρούμε ότι στον ελλειπτικό κύκλο που αντιστοιχεί στην κατηγορία των υψηλόβαθμων αλλοιώσεων (κόκκινος κύκλος) περιλαμβάνονται όλα τα σημεία του φάσματος που αντιστοιχούν σε αρνητική κυτταρολογία με υψηλόβαθμη όμως ιστολογία με αποτέλεσμα να μειώνονται τα ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα της κυτταρολογίας. Γίνεται επομένως αντιληπτό ότι υπάρχει σημαντικού βαθμού συμφωνία των σημάτων του φάσματος για τις υψηλόβαθμες ιστολογικά βλάβες παρά την ασυμφωνία που παρατηρείται στην κυτταρολογία αναφοράς. Όταν τα φάσματα της υψηλόβαθμης κυτταρολογίας αναλύθηκαν σε σχέση με την ιστολογία, όπως φαίνεται στο σχήμα Β. παρατηρήθηκε

εξαιρετικός διαχωρισμός των φυσιολογικών από όλους τους άλλους ιστολογικούς βαθμούς αλλά και των υψηλόβαθμων (CIN2+) από τον καρκίνο.



Εικόνα 4.2.2. IR φάσμα κυτταρολογίας σε σχέση με υψηλόβαθμη ιστολογία.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι υψηλόβαθμες αλλοιώσεις του τραχήλου της μήτρας παρόλο που δεν είναι συχνό εύρημα στην κυτταρολογία, αντιπροσωπεύουν το 0,5% όλων των τεστ Παπ, (Davey *et al* 2004) ανευρίσκονται συχνότερα μεταξύ των γυναικών ηλικίας 25-29 ετών (Insinga *et al* 2004) γεγονός που επιβεβαιώθηκε και στη μελέτη αυτή (μέση ηλικία=29,5 έτη). Επιπλέον όπως είναι γνωστό από τη φυσική ιστορία της HPV λοίμωξης ένα σημαντικό ποσοστό (έως 33%) των υψηλόβαθμων αλλοιώσεων παρουσιάζουν δυνατότητα υποστροφής (Östor 1993) και αυτό το ποσοστό φαίνεται να είναι μεγαλύτερο σε ηλικίες κάτω των 30 ετών (Insinga *et al* 2004), ενώ η εξέλιξη τους σε διηθητικό καρκίνο συμβαίνει συνήθως μετά από μια πορεία 5-10 ετών. Είναι επίσης σημαντικό το γεγονός ότι ένα ποσοστό περίπου 20% των γυναικών της μελέτης όπως αποδείχτηκε από την ιστολογία είχαν ηπιότερες αλλοιώσεις, εύρημα που συμβαδίζει με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας (Massad *et al* 2001).

Η διαχείριση των ασθενών με υψηλόβαθμη κυτταρολογία σύμφωνα με τις ισχύουσες κατευθυντήριες οδηγίες (ASCCP 2006) συνίσταται σε άμεση παραπομπή για κολποσκόπηση ή/και θεραπεία (LEETZ) εκτός από συγκεκριμένες ομάδες πληθυσμού (έγκυες, έφηβες < 21 ετών). Αυτή η πρακτική αντιμετώπισης όμως έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση περιστατικών στα ιατρεία κολποσκόπησης αυξάνοντας έτσι το κόστος των προγραμμάτων υγείας, αλλά και την υπερθεραπεία γυναικών που πιθανόν να έχουν ηπιότερες βλάβες από αυτές που περιγράφονται με την κυτταρολογία. Η πραγματοποίηση μη απαραίτητων θεραπειών ειδικά σε νέες άτοκες γυναίκες έχει σοβαρές, κυρίως μακροπρόθεσμες επιπτώσεις σχετιζόμενες με αυξημένο κίνδυνο περιγεννητικής θνησιμότητας σε μελλοντικές κυήσεις (Kyrgiou *et al* 2006; 2012). Επομένως είναι εξαιρετικής σημασίας η προσπάθεια για μείωση του αριθμού των θεραπειών με τον καθορισμό εκ των προτέρων, αν είναι δυνατόν και πριν την κολποσκόπηση, συγκεκριμένων ενδείξεων για τη διενέργειά τους. Η ιδέα αυτή της αναζήτησης μιας τέτοιας μεθοδολογίας για τη διαλογή των υψηλόβαθμων αλλοιώσεων είναι αρκετά ανατρεπτική και καινοτόμα καθώς δεν υπάρχουν αντίστοιχες αναφορές στη βιβλιογραφία ενώ παράλληλα ελλοχεύει πάντα ο κίνδυνος να μας ξεφύγουν οι πραγματικά πρόδρομες του καρκίνου αλλοιώσεις. Η συνεχώς εξελισσόμενη έρευνα σε σχέση με τον καρκίνο του τραχήλου έχει αναδείξει αρκετούς μοριακούς δείκτες που συμβάλλουν στην ανίχνευσή του ωστόσο κανένας απ' αυτούς δεν φαίνεται να έχει ευαισθησία και ειδικότητα τέτοιες ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μέθοδος διαλογής ειδικά για τις υψηλόβαθμες αλλοιώσεις.

Στα πλαίσια της εκπόνησης αυτής της διατριβής επιχειρήσαμε μια διαφορετική προσέγγιση του ρόλου αυτών των δεικτών στην εκτίμηση του κινδύνου των γυναικών με υψηλόβαθμη κυτταρολογία. Διερευνήσαμε την ευαισθησία και την ειδικότητά τους σε σύγκριση με την ιστολογική διάγνωση (gold standard) για τρεις πιθανές κλινικές εφαρμογές. Ως κατώτερο όριο ιστολογικής διάγνωσης (cut-off) σε όλες τις αναλύσεις τέθηκε ο βαθμός CIN3+ γιατί θεωρείται ότι είναι ο βαθμός που αντιπροσωπεύει τις πραγματικά προ-καρκινικές αλλοιώσεις.

Το σκεπτικό όσον αφορά την πρώτη πιθανή κλινική εφαρμογή ήταν να αναζητηθεί αν υπάρχει κατάλληλος συνδυασμός βιοδεικτών ώστε να αναγνωρίζει πριν την κολποσκόπηση τις γυναίκες που είναι σε χαμηλό κίνδυνο να έχουν υψηλόβαθμη νόσο παρά τα ευρήματα της κυτταρολογίας έτσι ώστε να μην είναι απαραίτητη η άμεση παραπομπή τους για κολποσκόπηση. Από την ανάλυση των δεδομένων προκύπτει ότι δεν υπάρχει μεμονωμένο τεστ ή συνδυασμός τους που να έχει την ιδανική ισορροπία ευαισθησίας-ειδικότητας ώστε να χρησιμεύσει για τη διαλογή των γυναικών πριν την κολποσκόπηση. Η ανίχνευση του m-RNA με τη μέθοδο NASBA παρουσιάζει ικανοποιητικές τιμές ευαισθησίας (79%) γεγονός που είναι αναμενόμενο αν σκεφτεί κανείς ότι σε ενσωματωμένες μορφές μόλυνσης, όπως συμβαίνει στις υψηλόβαθμες αλλοιώσεις, η έκφραση των ογκοπρωτεϊνών E6/E7 αυξάνεται. Η ειδικότητα όμως της μεθόδου (62%) δεν είναι αρκετά υψηλή ώστε να θεωρηθεί αξιόπιστο τεστ διαλογής. Επομένως όλες οι γυναίκες με υψηλόβαθμη κυτταρολογία θα πρέπει να παραπέμπονται σε κολποσκόπηση η οποία σε συνδυασμό με την κυτταρολογία μειώνει τα ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα αυτής. Στη δική μας μελέτη η διαγνωστική ακρίβεια της κολποσκόπησης σε σχέση με την ιστολογία βελτιώνεται καθώς αυξάνει ο βαθμός της αλλοίωσης γεγονός που ταυτίζεται με τα ευρήματα της βιβλιογραφίας (Benedet *et al* 2004). Η ευαισθησία όμως της μεθόδου στην αναγνώριση υψηλόβαθμων αλλοιώσεων (CIN3+) είναι εξαιρετικά υψηλή (94%) στη μελέτη μας και αυτό έρχεται σε αντίθεση με άλλες μελέτες όπως η ALTS study όπου η ευαισθησία έφτανε μόλις το 54% στα δύο χρόνια παρατήρησης. Αυτή η μεγάλη απόκλιση οφείλεται στο γεγονός ότι στη δική μας μελέτη το σύνολο των κολποσκοπήσεων έγιναν από έναν και μόνο κολποσκόπο με εξαιρετική εμπειρία και ικανότητα στο αντικείμενο αυτό.

Διερευνήσαμε επίσης την πιθανότητα οι μοριακοί δείκτες σε συνδυασμό με την κολποσκοπική εκτίμηση να χρησιμεύσουν μετά από αυτή ως μέθοδος διαλογής των γυναικών που θα πρέπει να οδηγηθούν άμεσα σε θεραπεία επειδή έχουν πράγματι υψηλό κακόηθες δυναμικό ενώ αυτές που έχουν ηπιότερη κολποσκοπικά εικόνα θα μπορούσαν ίσως να ωφεληθούν από μια πιο συντηρητική αντιμετώπιση. Από τα αποτελέσματα της ανάλυσης αυτής προκύπτει ότι η ευαισθησία της κολποσκόπησης μειώνεται όταν συνδυαστεί με τους μοριακούς δείκτες ενώ αντίθετα η ειδικότητά της αυξάνει. Ωστόσο δεν προκύπτει συνδυασμός με ιδανική

ισορροπία τιμών ώστε να εφαρμοστεί για την επιλογή των γυναικών που θα υποβληθούν ή όχι σε θεραπεία.

Η ασυμφωνία μεταξύ κυτταρολογίας/κολποσκόπησης έχει επανειλημμένα αναφερθεί ως εύρημα σε αρκετές μελέτες και οφείλεται στο γεγονός ότι και οι δυο μέθοδοι είναι υποκειμενικές και εξαρτώνται από τις ικανότητες του εξεταστή. Πολλές φορές στην κλινική πράξη έχουμε έρθει αντιμέτωποι με το δίλλημα ενώ η κυτταρολογία αναφοράς είναι ενδεικτική υψηλόβαθμης αλλοίωσης η κολποσκόπηση να αναδεικνύει βλάβες που δεν έχουν τα χαρακτηριστικά υψηλόβαθμης νόσου, είναι δηλαδή ηπιότερες ή ενδεικτικές απλής HPV λοίμωξης (acetowhite επιθήλιο) ή ακόμα μπορεί να έχουμε υποκλινική HPV λοίμωξη χωρίς ορατές κολποσκοπικά αλλοιώσεις. Προσπαθήσαμε λοιπόν να διερευνήσουμε τη χρησιμότητα των βιοδεικτών σ' αυτή την υποομάδα γυναικών της μελέτης μας με κολποσκοπική εικόνα ενδεικτική χαμηλόβαθμης αλλοίωσης παρά την υψηλόβαθμη κυτταρολογία. Βέβαια ο αριθμός τους ήταν πολύ περιορισμένος, ίσως λόγω της υψηλής ευαισθησίας της κολποσκοπικής εκτίμησης από το συγκεκριμένο κολποσκόπο, ωστόσο είχαμε τη δυνατότητα πραγματοποίησης της ανάλυσης.

Από τα αποτελέσματα αυτής της ανάλυσης προκύπτουν αρκετά υψηλές τιμές ευαισθησίας (>90%) για όλα τα τεστ που μελετήθηκαν. Αυτό σημαίνει πως μπορούν με μεγάλη ακρίβεια να ανιχνεύσουν από τον πληθυσμό με χαμηλόβαθμο κολποσκοπικά φαινότυπο αυτές τις γυναίκες που έχουν στην πραγματικότητα υψηλό κακόηθες δυναμικό και θα χρειαστούν άμεσα θεραπευτική αντιμετώπιση. Όσον αφορά την ειδικότητα οι περισσότερες από τις παραμέτρους που αναλύθηκαν έδειξαν επίσης υψηλές τιμές (έως 94%). Η χρήση επομένως αυτών των τεστ με υψηλή ειδικότητα μπορεί να προβλέψει τον πληθυσμό των γυναικών που έχουν χαμηλό κίνδυνο προόδου της νόσου και θα μπορούσαν να αντιμετωπιστούν πιο συντηρητικά με στενή παρακολούθηση. Τα εξαιρετικά ειδικά αυτά τεστ μπορούν στη διάρκεια της παρακολούθησης να επιβεβαιώνουν τα αποτελέσματα των τεστ με την υψηλή ευαισθησία μειώνοντας το ποσοστό των ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων. Φυσικά οι γυναίκες αυτές παρά το χαμηλόβαθμο κολποσκοπικά φαινότυπο παραμένουν σε υψηλό κίνδυνο για τραχηλική ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία. Ωστόσο ο άμεσος κίνδυνός τους για ανάπτυξη διηθητικού καρκίνου φαίνεται να είναι σχετικά χαμηλός και θα μπορούσαν ίσως με τη χρήση ενός τέτοιου ιδανικού τεστ για την πρόβλεψη αυτού του κινδύνου να αντιμετωπιστούν πιο συντηρητικά.

Συμπερασματικά λοιπόν μπορούμε να πούμε πως παρά τον περιορισμένο αριθμό γυναικών για τις οποίες εξετάστηκε, αυτή η εφαρμογή των βιοδεικτών φαίνεται να είναι εφικτή στην κλινική πράξη. Θα μπορούσαν δηλαδή κάποιοι συνδυασμοί τους να έχουν έναν πιθανό ρόλο στη διαλογή των γυναικών με υψηλόβαθμη

κυτταρολογία που παρουσιάζουν ασυμφωνία στη διάγνωση μεταξύ κυτταρολογίας/κολποσκόπησης ώστε να μειωθεί ο αριθμός των μη απαραίτητων θεραπειών. Χρειάζεται όμως ιδιαίτερη προσοχή στη διαχείριση αυτών των γυναικών γιατί υπάρχει ο κίνδυνος να διαφύγουν αλλοιώσεις που είναι πράγματι προ-διηθητικές. Ένας ακόμη περιορισμός της μελέτης αυτής είναι η απουσία ανάλυσης της αξιοπιστίας των δεικτών σε συγκεκριμένες ηλικιακές ομάδες όπου με δεδομένη τη διαφορετική συμπεριφορά των προκαρκινικών αλλοιώσεων (υψηλότερα ποσοστά υποστροφής σε μικρότερες ηλικίες) θα μπορούσαν να έχουν περισσότερες κλινικές εφαρμογές.

Η πρόοδος της έρευνας στον τομέα των βιολογικών δεικτών ανίχνευσης του καρκίνου του τραχήλου στράφηκε τελευταία στην αναζήτηση της πιθανής εφαρμογής τους στη δημιουργία ενός μοντέλου εκτίμησης του αθροιστικού κινδύνου (scoring system) που θα επιτρέπει την ορθολογιστική επιλογή των γυναικών με προ-καρκινικές αλλοιώσεις που χρήζουν συστηματικής παρακολούθησης ή/ και επεμβατικής αντιμετώπισης. Έτσι, στα πλαίσια της διερεύνησης προς αυτή την κατεύθυνση, κατά τη διάρκεια των πέντε ετών παρακολούθησης των γυναικών της μελέτης αυτής λαμβάνονταν σε κάθε επίσκεψη ένα δείγμα LBC από το οποίο αναλύονταν όλοι οι μοριακοί δείκτες. Οι δείκτες αυτοί σε συνδυασμό με άλλους γνωστούς παράγοντες κινδύνου από το ιστορικό των γυναικών θα συμμετέχουν στη δημιουργία ενός εξατομικευμένου συστήματος εκτίμησης του κινδύνου εμφάνισης της νόσου κατά την παρακολούθηση μετά από θεραπεία (follow-up scoring system), το οποίο θα προκύψει με τη χρήση πολύπλοκης στατιστικής μεθοδολογίας. Ένα τέτοιο σύστημα θα βελτιώσει την ακρίβεια της παρακολούθησης αναγνωρίζοντας εγκαίρως τις γυναίκες που έχουν αυξημένο κίνδυνο υποτροπής της νόσου καθώς είναι γνωστό ότι η συμμόρφωση στην παρακολούθηση μειώνεται με το χρόνο.

Παρόμοια συστήματα εκτίμησης του κινδύνου βασισμένα σε πολύπλοκα μαθηματικά μοντέλα μπορούν συνδυάζοντας επιδημιολογικά δεδομένα, αποτελέσματα των εξετάσεων (κυτταρολογία, κολποσκόπηση) και τις τιμές διαφόρων μοριακών δεικτών να υπολογίζουν ένα συγκεκριμένο βαθμό για κάθε γυναίκα (score) με βάση τον οποίο θα λαμβάνονται αποφάσεις για την περαιτέρω διαχείρισή της. Γυναίκες που θα έχουν υψηλό score σ' ένα τέτοιο σύστημα σημαίνει ότι είναι σε αυξημένο κίνδυνο για διηθητικό καρκίνο και επομένως χρήζουν άμεσης θεραπευτικής αντιμετώπισης, ενώ αντίθετα γυναίκες με χαμηλό score μπορούν να ωφεληθούν από μια πιο συντηρητική διαχείριση. Η εφαρμογή τέτοιων συστημάτων (Clinical Decision Support Systems) έχει δώσει ικανοποιητικά αποτελέσματα όσον αφορά την ανίχνευση υψηλόβαθμων τραχηλικών ενδοεπιθηλιακών νεοπλασιών CIN2+ (s=89,4% & sp=97,1%), υποδηλώνοντας ότι μια τέτοια προσέγγιση μπορεί να

επιτρέψει μια εξατομικευμένη διαχείριση των ασθενών μειώνοντας τον αριθμό των κολποσκοπήσεων και των επεμβάσεων στον τράχηλο (Bountris *et al* 2014).

5.1 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ

Στα πλαίσια της αναζήτησης νέων χαμηλού κόστους τεχνολογιών για τον πληθυσμιακό έλεγχο του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας διερευνήσαμε για μια ομάδα γυναικών της μελέτης μας (50 γυναίκες) τη μέθοδο της φασματοσκοπίας. Οι γυναίκες αυτές συμπεριλήφθησαν στην ανάλυση ενός συνόλου 322 γυναικών με κυτταρολογία διαφόρων βαθμών. Για την ανάλυση του υπέρυθρου φάσματος (IR) των τραχηλικών (LBC) δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν ως μέτρο σύγκρισης τόσο η κυτταρολογική όσο και η ιστολογική διάγνωση από την αφαίρεση της ζώνης μετασχηματισμού (gold standard) ώστε να καθοριστεί η ακρίβεια της μεθόδου. Η αρχική ανάλυση του IR φάσματος σε σύγκριση με τους διαφόρους κυτταρολογικούς βαθμούς (imperfect gold standard) έδειξε μη ικανοποιητικό διαχωρισμό με σημαντική αλληλοεπικάλυψη μεταξύ των διαφόρων κατηγοριών κυτταρολογίας (εικ.4.1). Ωστόσο όταν το IR φάσμα αναλύθηκε σε σύγκριση με την ιστολογία με κατώτερο όριο ιστολογικής διάγνωσης το CIN2+ παρατηρήθηκε διάκριση των κυτταρολογικών βαθμών σύμφωνα με το μοτίβο της υποκείμενης νόσου (εικ.4.2.A). Επομένως η χρήση της φασματοσκοπίας μπορεί να μειώσει τα ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα της κυτταρολογίας.

Η αναγνώριση των αλλοιώσεων με χαμηλό κακόηθες δυναμικό (\leq CIN1) σε υψηλόβαθμη κυτταρολογία είναι εξαιρετικά σημαντική γιατί συμβάλλει στην αποφυγή μη απαραίτητων θεραπειών. Από τις 48 ασθενείς με υψηλόβαθμη κυτταρολογία ένα ποσοστό 16% είχαν ιστολογική διάγνωση CIN 1 ή και αρνητική ιστολογία. Το IR φάσμα των τραχηλικών δειγμάτων με αρνητική ιστολογία διαχωρίστηκε εξαιρετικά από τις χαμηλόβαθμες και υψηλόβαθμες αλλοιώσεις (εικ.4.2.B) αλλά και ο διαχωρισμός των υψηλόβαθμων αλλοιώσεων από τον καρκίνο ήταν ικανοποιητικός. Ο βασικός περιορισμός της ανάλυσης αυτής ήταν ο μικρός αριθμός ασθενών με HSIL που συμμετείχε, ωστόσο η φασματοσκοπία φαίνεται να αναγνωρίζει με μεγάλη ακρίβεια την υποκείμενη προκαρκινική νόσο ιδίως όταν χρησιμοποιείται η ιστολογική, και όχι η κυτταρολογική, διάγνωση για σύγκριση. Η φασματοσκοπία είναι μια φθηνή, αυτοματοποιημένη μέθοδος που βασίζεται σε αντικειμενικά κριτήρια και δεν απαιτεί εξειδικευμένο προσωπικό. Μπορεί επομένως να έχει μελλοντική εφαρμογή είτε σαν μέθοδος διαλογής της κυτταρολογίας του τραχήλου ή σαν συμπληρωματικό τεστ για την αναγνώριση αλλοιώσεων χαμηλού κινδύνου όταν υπάρχει ασυμφωνία στη διάγνωση μεταξύ κυτταρολογίας/ιστολογίας, περιορίζοντας έτσι τις μη απαραίτητες επεμβάσεις στον τράχηλο και μειώνοντας το άγχος των γυναικών και τις μακροπρόθεσμες, κυρίως μαιευτικές, επιπλοκές μετά από θεραπεία (Kyrgiou *et al* 2012).

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η χρήση των βιολογικών και μοριακών δεικτών ανίχνευσης του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας φαίνεται να έχει κάποια περιορισμένη εφαρμογή στη διαλογή της HSIL κυτταρολογίας.

Σε περιπτώσεις ασυμφωνίας μεταξύ κυτταρολογίας/κολποσκόπησης, όταν δηλαδή η υψηλόβαθμη κυτταρολογία ακολουθείται από χαμηλόβαθμη ή φυσιολογική κολποσκόπηση, η εφαρμογή των βιοδεικτών μπορεί με ικανοποιητική ακρίβεια να καθορίσει ποιές γυναίκες έχουν πράγματι υψηλό κακόηθες δυναμικό και ποιές όχι μειώνοντας έτσι τις μη απαραίτητες επεμβάσεις στον τράχηλο.

Ωστόσο μια ανάλυση που θα ξεχωρίζει τις γυναίκες με υψηλόβαθμη κυτταρολογία και ήπιες αλλοιώσεις στην κολποσκόπηση από αυτές με φυσιολογική κολποσκόπηση και ένας διαχωρισμός των διαφόρων ηλικιακών ομάδων θα μπορούσε ίσως να δώσει εξαιρετικά ενδιαφέροντα αποτελέσματα.

Επίσης ιδιαίτερα σημαντικό είναι να διατηρηθεί μια ισορροπία μεταξύ της προσπάθειας αποφυγής των επιπτώσεων από την υπέρ-θεραπεία και του κινδύνου ανάπτυξης διηθητικού καρκίνου σε αλλοιώσεις που ξέφυγαν της διάγνωσης.

Για την ευρεία κλινική εφαρμογή τέτοιων μεθόδων διαλογής χρειάζονται οπωσδήποτε μεγαλύτεροι αριθμοί περιστατικών ώστε να εκτιμηθεί το κόστος σε σχέση με την αποτελεσματικότητά τους και να εξαχθούν πιο ισχυρά και αναπαραγώγιμα συμπεράσματα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας αποτελεί μια από τις συχνότερες γυναικολογικές κακοήθειες με διαφορετική επίπτωση στις διάφορες χώρες εξαιτίας της εφαρμογής οργανωμένων προγραμμάτων πληθυσμιακού ελέγχου στις πιο αναπτυγμένες από αυτές.

Οι υψηλόβαθμες ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις του τραχήλου είναι σπάνιες, αντιπροσωπεύουν μόνο το 0,5% όλων των τεστ Παπανικολάου. Οι κατευθυντήριες οδηγίες για την αντιμετώπιση των γυναικών με υψηλόβαθμη κυτταρολογία περιλαμβάνουν κολποσκόπηση και ιστολογική επιβεβαίωση της αλλοίωσης και ακολούθως θεραπεία αυτής. Στις περισσότερες περιπτώσεις η υψηλόβαθμη κυτταρολογία ακολουθείται από υψηλόβαθμη ιστολογία, ωστόσο υπάρχει ένα ποσοστό γυναικών (έως 30- 40%) που παρά τον υψηλόβαθμο φαινότυπο δεν έχουν ιστολογικά επιβεβαιωμένη υψηλόβαθμη αλλοίωση. Η δυνατότητα ανεύρεσης βιολογικών και μοριακών δεικτών οι οποίοι συνδυαζόμενοι αθροιστικά μεταξύ τους θα μπορούσαν να ξεχωρίζουν τις γυναίκες που έχουν πράγματι κακόηθες δυναμικό από τις υπόλοιπες με μηδενικό ή αμελητέο κίνδυνο θα είχε τεράστια οφέλη τόσο οικονομικά, εξαιτίας της μείωσης του πραγματικού κόστους του συστήματος προληπτικού ελέγχου, όσο και ψυχοκοινωνικά λόγω της μείωσης των μη απαραίτητων θεραπειών.

Από την ανασκόπηση της βιβλιογραφίας δεν υπάρχουν δεδομένα για τη χρήση μοριακών και κυτταρολογικών δεικτών ως κριτηρίων διαλογής των γυναικών με υψηλόβαθμες ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις τραχήλου με σκοπό την πρόβλεψη του κινδύνου για ανάπτυξη διηθητικού καρκίνου. Η επαναλαμβανόμενη κυτταρολογία από μόνη της ή το HPV-DNA test δεν είναι αποδεκτά ως κριτήρια διαλογής. Επίσης οι μοριακοί δείκτες δραστηριότητας του ιού HPV όπως το m-RNAE6&E7 και το p16 δεν έχουν μελετηθεί σε σχέση με τις υψηλόβαθμες αλλοιώσεις του τραχήλου.

ΣΚΟΠΟΣ

Ο σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η διερεύνηση μέσω μιας προοπτικής διαγνωστικής μελέτης παρατήρησης της πιθανής εφαρμογής κυτταρολογικών και μοριακών δεικτών δραστηριότητας του HPV ιού ως κριτηρίων διαλογής των υψηλόβαθμων ενδοεπιθηλιακών αλλοιώσεων του τραχήλου.

Οι δείκτες αυτοί σε συνδυασμό με άλλες παραμέτρους σχετιζόμενες με την παθολογία τραχήλου καθώς και δημογραφικά δεδομένα θα χρησιμοποιηθούν για τη δημιουργία ενός συστήματος εξατομικευμένης αξιολόγησης του αθροιστικού κινδύνου για την ανάπτυξη διηθητικού καρκίνου σε γυναίκες με υψηλόβαθμη κυτταρολογία.

Στόχος της εφαρμογής ενός τέτοιου συστήματος αξιολόγησης είναι η αναγνώριση του πληθυσμού που παρά τον αρχικά υψηλόβαθμο φαινότυπο έχει τελικά ηπιότερες αλλοιώσεις στον τράχηλο γεγονός που θα επιτρέψει μια πιο συντηρητική αντιμετώπιση μειώνοντας έτσι τις μη απαραίτητες θεραπείες ιδίως σε νέες άτοκες γυναίκες.

ΥΛΙΚΟ – ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Πραγματοποιήθηκε μια προοπτική διαγνωστική μελέτη παρατήρησης που συμπεριέλαβε γυναίκες που προσήλθαν στο Ιατρείο Κολποσκόπησης του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων με HSIL κυτταρολογία. Από τις γυναίκες αυτές ελήφθη τραχηλικό δείγμα (LBC) και κατόπιν υπεβλήθησαν σε κολποσκόπηση και LLETZ βιοψία.

Το αντικείμενο της μελέτης μας ήταν η εκτίμηση της ευαισθησίας και της ειδικότητας μοριακών δεικτών που σχετίζονται με την παθολογία τραχήλου όπως:

-HPV-DNA test & typing

-m-RNA (NASBA & Flow cytometry)

- p 16

σε σύγκριση με την ιστολογία (gold standard) και η αναζήτηση πιθανών κλινικών εφαρμογών των δεικτών αυτών σε σχέση με τη διαλογή των γυναικών με υψηλόβαθμη κυτταρολογία.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στη μελέτη συμπεριλήφθησαν 177 γυναίκες με υψηλόβαθμη (HSIL) κυτταρολογία και για όλες υπήρξε ιστολογική επιβεβαίωση της αλλοίωσης μετά από αφαίρεση της ζώνης μετασχηματισμού (LLETZ). Από την εκτίμηση της ευαισθησίας και της ειδικότητας διαφόρων συνδυασμών των βιοδεικτών σε σύγκριση πάντα με την ιστολογία προκύπτει ότι τόσο το HPV-DNA test όσο και η ανίχνευση του m-RNA με τη μέθοδο NASBA αλλά και το p16 όταν συνδυαστούν με την κολποσκόπηση αυξάνουν τη διαγνωστική ακρίβεια της μεθόδου για τις υψηλόβαθμες αλλοιώσεις (> 90%).

Από τη διερεύνηση πιθανών κλινικών εφαρμογών των βιοδεικτών για τη διαλογή των υψηλόβαθμων αλλοιώσεων προκύπτει ότι στις περιπτώσεις που η κολποσκοπική εικόνα δεν συμβαδίζει με τον αρχικά υψηλόβαθμο φαινότυπο η χρήση των βιοδεικτών θα μπορούσε να διαχωρίσει τις γυναίκες με πράγματι υψηλό κακόηθες δυναμικό αφού σχεδόν όλοι τους παρουσίασαν εξαιρετική ευαισθησία (90%) αλλά και ειδικότητα (94%) σε σύγκριση με την ιστολογία (cut-off CIN2+/CIN3+).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από τη μελέτη που διεξήγαμε προκύπτει ότι η χρήση μοριακών βιολογικών δεικτών οι οποίοι αντανakλούν το κακόηθες δυναμικό της αλλοίωσης σε εξατομικευμένο επίπεδο μπορεί να έχει κάποια περιορισμένη εφαρμογή στη διαλογή της HSIL κυτταρολογίας στις περιπτώσεις όπου υπάρχει ασυμφωνία στη διάγνωση μεταξύ κυτταρολογίας/κολποσκόπησης.

Η αναγνώριση των γυναικών με πράγματι υψηλό κακόηθες δυναμικό με τη βοήθεια ενός συστήματος εξατομικευμένης εκτίμησης του κινδύνου θα έχει σημαντικές επιπτώσεις στα προγράμματα πληθυσμιακού ελέγχου (μείωση των παραπομπών σε Ιατρεία κολποσκόπησης, αποφυγή υπερθεραπείας) χρειάζεται όμως μεγαλύτερο δείγμα πληθυσμού ώστε να εξαχθούν πιο ισχυρά και αναπαραγώγιμα συμπεράσματα.

SUMMARY

“CYTOLOGICAL AND MOLECULAR BIOMARKERS AS TRIAGE CRITERIA OF PATIENTS WITH HIGH GRADE CERVICAL INTRAEPITHELIAL LESIONS “

GKRITZELI STERGIANI M.D.P.H.D.

INTRODUCTION

Cervical cancer is one of the most common cancer diagnoses in women, although after the widespread acceptance of Pap-test as screening method to identify patients with treatable pre-invasive disease a significant reduction of its incidence has been observed especially in nations with well-organized screening programs.

High-grade squamous intra-epithelial lesions in cytology are rare, accounting for only about 0,5% of all Pap-tests (Davey *et al* 2004) with the highest incidence among women between 25-29 years of age (Insinga *et al* 2004). Women with cytological findings of HSIL are at substantial risk for cervical cancer but not all of them have true pre-invasive disease. According to the ASCCP management guidelines of 2006 the second step after a cytological finding of HSIL is colposcopic evaluation (Wright *et al* 2007). The critical skill for the colposcopist managing these patients is to distinguish those with pre-invasive lesions who require treatment from those who do not. Failure to treat lesions with true premalignant potential can result in

progression to cancer, with devastating consequences. On the other hand treating women with self-limited HPV infections wastes limited resources, creates anxiety and increases the risk for prematurity and other pregnancy-related complications in future pregnancies (Kyrgiou et al 2006).

Histological confirmation of high-grade CIN and cancer are quite common among women with HSIL in cytology. Approximately 70%-75% of them will have underlying CIN 2 or 3 in histology and about 1% to 4% will have invasive cancer (Massad et al 2001). Conclusively there will be a 25% to 30% of women in which histology will not confirm the HSIL described by cytology. These women with milder lesions (<CIN2 or lower) are at a quite low immediate risk for developing invasive cancer, thus some of these lesions may regress spontaneously especially in younger ages. There for distinguishing the group of population with true premalignant potential who are at high risk for invasive cancer from those who are at lower immediate risk might be of great importance because it would reduce the number of unnecessary treatments and the post treatment complications (pregnancy-related and other).

PURPOSE

The aim of this thesis is to investigate through a prospective diagnostic clinical trial of observation the possibility of using various cytological and molecular markers of viral activity of HPV as triage criteria for high-grade intra-epithelial lesions of cervix. These biomarkers in combination with other parameters related to cervical pathology will be used to create a model of scoring system which could estimate for each woman separately a cumulative risk of developing cervical cancer. Using such a scoring system it will be possible to distinguish among women with HSIL the group of population with true premalignant lesions who are at high risk for invasive cancer and there for require immediate treatment, from those with milder lesions who are consequently at low risk and could be followed-up more systematically.

From the review of the literature, such an effort of triaging HSIL using a combination of molecular and cytological biomarkers has not been referred. Repeated cytology alone or HPV-DNA test are not acceptable as triage methods for HSIL. Molecular markers of viral activity of HPV such as m-RNA (E6/E7) and p16 have not been studied in relation with triage of HSIL. Therefore the possibility of clinical application of these biomarkers in triaging high-grade intraepithelial lesions and creating a scoring system for estimation of cumulative risk will bring innovations in the diagnostic methodology which is, so far, used in the screening programs for cervical cancer.

MATERIAL-METHODS

We conducted a prospective diagnostic clinical trial of observation in which participated, after consent opinion, all women referred at the Colposcopy Department of the University Hospital of Ioannina with HSIL cytology, from October 2009 until October 2013, therefore they all have completed from one to five years of observation. Women who were currently pregnant or had previously been treated for any lesion in the cervix have been excluded from the study.

Before the colposcopic evaluation a smear was taken from the woman's cervix in the form of liquid-based cytology (LBC) which was considered as "referral cytology". From this one and only sample we assessed several parameters beside cytology such as:

- Detection and typing of HPV virus.
- Detection of m-RNA (E6/E7) with two different methodologies (NASBA and flow cytometry).
- Immunocytochemical detection of p16.
- Micro-spectroscopy (in a small sample of population).

All women included in the study underwent LLETZ biopsy (diagnostic or therapeutic) therefore we obtained histological diagnosis from the transformation zone which is considered as the "gold standard".

The objective of this study was the evaluation of the sensitivity and specificity of the parameters mentioned above in comparison with the histology (gold standard) and the investigation of possible clinical applications of several combinations of these parameters in triaging women with HSIL cytology.

RESULTS

The total number of women with HSIL cytology included in this study was 177 and all of them had LLETZ biopsies for histological confirmation of the lesion. The medium range of age was 29 years of old and the vast majority was nuliparus women. More than 50% of them had more than 3 sexual partners from the beginning of their sexual life and almost 80% of them were casual smokers.

The colposcopic evaluation revealed that only a small number of these women (12%) had milder lesions than those described by cytology. Histological confirmation of

high-grade lesion (\geq CIN3+) was observed in 58% of the population while a 20% of them had histological diagnosis of low-grade lesion ($<$ CIN2+).

When we compared the colposcopic impression with histology we observed that in the vast majority of women with colposcopic impression of high-grade lesion histology showed CIN2+ or worse (cut-off = CIN2+) however there was a 12% of them in which the histological diagnosis showed milder lesion than the one described at colposcopy. The evaluation of sensitivity and specificity of all the parameters analyzed, showed that colposcopy was the test with the highest sensitivity and when combined with detection of m-RNA and p16 its specificity was also increased. From the results of our study it turns out that there is a significant amount of women (20%) who despite the high-grade phenotype had low-grade lesions in histology and this proportion was even higher in cases of discordance between colposcopy and histology. Based on this evidence we tried to investigate the possibility of using the biomarkers mentioned above in order to identify these women with low malignant potential.

Three possible clinical scenarios of triaging high-grade cytology were investigated:

-Triage before colposcopy

-Triage after colposcopy

-Triage in cases of colposcopic/histological discordance.

From the evaluation of the sensitivity and specificity of the biomarkers and their combinations there was no evidence for clinical application of them for triage before or after colposcopy. However in cases of disagreement in diagnosis between colposcopy and histology the results of our study were encouraging because they showed high sensitivity and specificity for almost all the parameters and their combinations that were studied.

DISCUSSION

High-grade intraepithelial cervical lesions are not a very common finding in cytology but it is of great importance because it suggests a high malignant potential. However the development of these lesions into cervical cancer usually occurs after a long course of 5 – 10 years, thus a significant proportion of them (33% according to Ostor's paper) might regress, with even higher proportions among younger women $<$ 30 years. Another important fact is that almost 20% of the women in our study had, as it was proven by histology, milder lesions than those described by cytology. Therefore not all women with high-grade cytology require immediate ablative treatment. Distinguishing those with low malignant potential who could be

benefited by a more conservative follow-up might lead to reduction of unnecessary treatment and subsequent complications (pregnancy related and other) especially in younger women.

In the context of this study we investigated the possibility of using molecular biomarkers related to cervical pathology for triaging high-grade intraepithelial lesions. We estimated the sensitivity and specificity from various combinations of these biomarkers in comparison with histology for three different clinical applications. From the analysis of the results it appears that the use of these biomarkers might have clinical application in cases where there is discordance between cytological findings and colposcopic impression. Despite the small number of women in this subgroup the results showed that almost all the biomarkers that have been studied had extremely high sensitivity and specificity. As a consequence, they can quite accurately detect from all the women with high-grade cytology and low-grade colposcopy those who indeed have malignant potential and need immediate treatment, while those with lower risk can be conservatively managed with close follow-up.

We must undoubtedly be very careful in managing women with high-grade cytology because there is always the risk of skipping lesions which are indeed pre-malignant. Therefore we must try to keep a balance between avoiding overtreatment and risk of skipping lesions which might progress to invasive cancer.

CONCLUSIONS

The use of molecular biomarkers related to cervical pathology appears to have limited application in triage of high-grade cytology.

Specifically in cases of discordance between cytology and colposcopy, when despite the high-grade phenotype the colposcopic evaluation reveals milder lesions the application of biomarkers can quite accurately determine the population with high malignant potential, thereby reducing the unnecessary interventions in the cervix.

However it is of great importance to keep a balance between an effort to avoid overtreatment with its complications (pregnancy related and others) and the risk of developing invasive cancer.

Of course the wide application of such triage methods requires larger cohorts in order to estimate the cost versus effectiveness for the extraction of more robust and reproducible conclusions regarding their impact in general population screening programs.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Adams KC, Absher KJ, Brill YM, et al. Reproducibility of subclassification of squamous intraepithelial lesions: Conventional versus ThinPrep Paps. *J Low Genit Tract Dis* 2003;**7**:203-8.

Alli PM, Ali SZ. Atypical squamous cells of undetermined significance—rule out high-grade squamous intraepithelial lesion: Cytopathology characteristics and clinical correlates. *Diagn Cytopathol* 2003; **28**:308-12.

Alonso I, Torne A, Puig-Tintore LM, et al. Pre- and post-conization high-risk HPV testing predicts residual/recurrent disease in patients treated for CIN2-3. *Gynecol Oncol* 2006; **103**: 631-6.

Andrae B, Andersson T, Lambert P, et al. Screening and cervical cancer cure: population based cohort study. *BMJ* 2012; **344**: e900.

Aponte-Cipriani SL, Teplitz C, Rorat E, et al. Cervical smears prepared by an automated device versus the conventional method. A comparative analysis. *Acta Cytol* 1995; **39**:623-30.

Arbyn M, Kyrgiou M, Simoens C, et al. Perinatal mortality and other severe adverse pregnancy outcomes associated with treatment of cervical intraepithelial neoplasia: meta-analysis. *BMJ* 2008; **337**:a1284.

Baseman JG, Koutsky LA. The epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virol*2005; **32**:16-24.

Benedet JL, Anderson GH. Cervical intraepithelial neoplasia in British Columbia: A comprehensive program for detection, diagnosis, and treatment. *Gynecol Oncol* 1981;**12**:280-91.

Benedet JL, Matisic JP, Bertrand MA. An analysis of 84244 patients from the British Columbia cytology-colposcopy program. *Gynecol Oncol* 2004; **92**:127-34.

Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, et al. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2002; **55**:244-

Bountris P, Haritou M, Pouliakis A, et al. An Intelligent Clinical Decision Support System for patient-specific predictions to improve cervical intraepithelial neoplasia detection. *Biomed Res Int.* 2014; **2014**:341483.

Brown DR, Schroeder JM, Bryan JT, et al. Detection of multiple human papillomavirus types in *Condylomata acuminata* lesions from otherwise healthy and immunosuppressed patients. *J Clin Microbiol* 1999;**37**:3316-22.

Bryan JT, Brown DR. Transmission of human papillomavirus type 11 infection by desquamated cornified cells. *Virology* 2001;**281**:35-42.

Carson HJ, DeMay RM. The mode ages of women with cervical dysplasia. *Obstet Gynecol* 1993;**82**:430-34.

Castle PE. Beyond human papillomavirus: the cervix, exogenous secondary factors, and the development of cervical precancer and cancer. *J Low Genit Tract Dis* 2004; **8**:224-30.

Castle PE, Schiffman M, Herrero R, et al. A prospective study of age trends in cervical human papillomavirus acquisition and persistence in Guanacaste, Costa Rica. *J Infect Dis* 2005; **191**:1808-16.

Clifford GM, Smith JS, Aguado T, et al. Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer* 2003; **89**:101-5.

Cramer DW. The role of cervical cytology in the decline morbidity and mortality of cervical cancer. *Cancer* 1974; **34**:2018-27.

Cuzick J, Szarewski A, Cubie H, et al. Management of women who test positive for high-risk types of human papillomavirus: the HART study. *Lancet* 2003; **362**:1871-76.

Cuzick J, Szarewski A, Terry G, et al. Human papillomavirus testing in primary cervical screening. *Lancet* 1995; **345**:1533-36.

Davey DD. Cytopathology update on atypical squamous cells. *J Low Genit Tract Dis* 2005; **9**:124-9.

Davey DD, Neal MH, Wilbur DC, et al. Bethesda 2001 implementation and reporting rates: 2003 practices of participants in the College of American Pathologists Interlaboratory Comparison Program in Cervicovaginal Cytology. *Arch Pathol Lab Med* 2004; **128**:1224-9.

DeMay RM. Cytopathology of false negatives preceding cervical carcinoma. *Am J Obstet Gynecol* 1996; **175**:1110-3.

Demers GW, Espling E, Harry JB, et al. Abrogation of growth arrest signals by human papillomavirus type 16 E7 is mediated by sequences required for transformation. *J Virol* 1996; **70**:6862-69.

DeVilliers EM. Human papillomaviruses-introduction. *Semin Cancer Biol* 1999; **9**:377.

Dillner J, Silins I, Ryd W, et al. History of Chlamydia trachomatis infection is a determinant of HPV DNA persistence. A population-based cohort study. Abstract for HPV conference, 2002.

Discacciati MG, de Souza CA, d'Otavianno MG, et al. Outcome of expectant management of cervical intra-epithelial neoplasia grade 2 in women followed for 12 months. *Eur J Obstet Gynecol* 2011; **155**: 204-8.

El-Tawil SG, Adnan R, Muhamed ZN, et al. Comparative study between Pap smear cytology and FTIR spectroscopy: a new tool for screening for cervical cancer. *Pathology* 2008; **40**:600-3.

Fait G, Daniel Y, Kupferminc MJ, et al. Does typing of human papillomavirus assist in the triage of women with repeated low-grade, cervical cytologic abnormalities? *Gynecol Oncol* 1998; **70**:319-22.

Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in CLOBOCAN 2012. *Int.J Cancer* 2015; **136**:E359-86.

Folen MF, Schottenfeld D, Tortolero-Lone G, et al. Colposcopy for the diagnosis of squamous intraepithelial lesions: a meta-analysis. *Obstet Gynecol* 1998; **91**: 626-31.

Franco EL, Schlecht NE, Saslow D. The epidemiology of cervical cancer. *Cancer J* 2003; **9**:348-59.

Gajjar K, Ahmadzai AA, Valasoulis G, et al. Histology verification demonstrates that biospectroscopy analysis of cervical cytology identifies underlying disease more accurately than conventional screening: Removing the confounder of discordance. *PLoS One* 2014; **9**:e82416.

Guido R, Schiffman M, Solomon D, et al. For the ASCUS-LSIL Triage Study (ALTS) Group. Postcolposcopy management strategies for women referred with low-grade squamous intraepithelial lesions or human papillomavirus DNA-positive atypical squamous cells of undetermined significance: A two-year prospective study. *Am J Obstet Gynecol* 2003; **188**:1401-5.

Haverkos HW. Multifactorial ethiology of cervical cancer: a hypothesis. *Med Gen Med* 2005; **7**:57.

Herrero R, Castle PE, Schiffman M, et al. Epidemiologic profile of type-specific human papillomavirus infection and cervical neoplasia in Guanacaste Costa Rica. *J Infect Dis* 2005; **19**:1796-807.

Herrero R, Munoz N. Human papillomavirus and cancer. *Cancer Surv* 1999; **33**:75-98.

Ho GY, Bierman R, Beardsley L, et al. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* 1998; **338**:423-8.

Holowaty P, Miller AB, Rohan T, et al. Natural history of dysplasia of the uterine cervix. *J Natl Cancer Inst* 1999; **91**:252-8.

Hopman AH, Smedts F, Dignef W, et al. Transition of high-grade cervical intraepithelial neoplasia to micro-invasive carcinoma is characterized by integration of HPV 16/18 and numerical chromosome abnormalities. *J Pathol* 2004; **202**:23-33.

Hopman EH, Kenemans P, Helmerhorst TJ. Positive predictive rate of colposcopic examination of the cervix uteri: an overview of the literature. *Obstet Gynecol Surv* 1998; **53**: 97-106.

IARC 2007. (International Agency for Research on Cancer)

Insigna RP, Glass AG, Rush BB. Diagnoses and outcomes in cervical cancer screening: a population-based study. *Am J Obstet Gynecol* 2004; **191**:105-13.

Jeronimo J, Massad LS, Castle PE, et al. National Institutes of Health (NIH)-American Society for Colposcopy and Cervical Pathology (ASCCP) Research Group. Interobserver agreement in the evaluation of digitized cervical images. *Obstet Gynecol* 2007; **110**:833-40.

Johnson J, Patnick J. Achievable standards, benchmarks for reporting, and criteria for evaluating cervical cytopathology including revised performance indicators (2nd edition). NHSCSP publication 1. Sheffield, NHS Cancer Screening Programmes. NHSCSP Publications 2000, 1-36.

Kitchener HC, Almonte M, Wheeler P, et al, on behalf of the ARTISTIC Trial Study Group. HPV testing in routine cervical screening: cross-sectional data from the ARTISTIC trial. *British Journal of Cancer* 2006; **95**:56-61.

Klaes R, Benner A, Friedrich T, et al. P16 immunohistochemistry improves inter-observer agreement in the diagnosis of cervical intra-epithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2002; **26**:1389-99.

Koliopoulos G, Arbyn M, Martin-Hirsch P, et al. 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.

Kraus I, Molden T, Holm R, et al. Presence of E6 and E7 m-RNA from human papillomavirus Types 16, 18, 31, 33, and 45 in the majority of cervical carcinomas. *Journal of Clin Microbiol* 2006; **44**:1310-17.

Kraus I, Molden T, Erno LE, et al. Human papillomavirus oncogenic expression in the dysplastic portio: an investigation of biopsies from 190 cervical cones. *British Journal of Cancer* 2004 ; **90**: 1407-13.

Kyrgiou M, Arbyn M, Martin-Hirsch P, et al. Increased risk of preterm birth after treatment for CIN. *BMJ* 2012; **345**:e5847.

Kyrgiou M, Koliopoulos G, Martin-Hirsch P, et al. Obstetrical and fertility outcomes after conservative treatment for intra-epithelial or early invasive cervical lesions: a systematic review and meta-analysis of the literature. *Lancet* 2006; **367**:489-98.

Kyrgiou M, Tsoumbou I, Vrekousis T, et al. The up-to-date evidence on colposcopy practice and treatment of cervical intra-epithelial neoplasia: The Cochrane Colposcopy and Cervical Cytopathology Collaborative Group (C5 group) approach. *Cancer Treat Rev* 2006; **32**:516-23.

Lazo PA. The molecular genetics of cervical carcinoma. *Br J Cancer* 1999; **80**:2008-18.

Lie AK, Risberg B, Borge B, et al. DNA-versus RNA-based methods for human papillomavirus detection in cervical neoplasia. *Gynecol Oncol* 2005; **97**: 908-15.

Louro AP, Roberson J, Eltoum I, et al. Atypical squamous cells, cannot exclude high-grade squamous intraepithelial lesion: A follow up study of conventional and liquid-based preparations in a high risk population. *Am J Clin Pathol* 2003; **120**:392-7.

Lynge E, Poll P. Incidence of cervical cancer following negative smear: A cohort study of Maribo County, Denmark. *Am J Epidemiol* 1986; **124**:345-52.

Martin FL, Kelly JG, Llabjani V, et al. Distinguishing cell types or populations based on the computational analysis of their infrared spectra. *Nat Protoc* 2010; **5**:1748-60.

Massad LS, Collins YC, Meyer PM. Biopsy correlates of abnormal cervical cytology classified using the Bethesda System. *Gynecol Oncol* 2001; **82**:516-22.

Massad LS, Collins YC. Strength of correlations between colposcopic impression and biopsy histology. *Gynecol Oncol* 2003; **89**:424-8.

Massad LS, Riester KA, Anastos KM, et al. Prevalence and predictors of squamous cell abnormalities in Papanicolaou smears from women

infected with HIV-1. Women's Interagency HIV Study Group. *J AIDS* 1999; **21**:33-41.

Massad LS, Stewart L, Jeronimo J, et al. For the National Institutes of Health/American Society for Colposcopy and Cervical Pathology (NIH/ASCCP) Research Group. Interobserver agreement in the assessment of components of colposcopic grading. *Obstet & Gynecol* 2008; **111**:1279-84.

Mayrand MH, Coutlee F, Hankins C, et al. Detection of human papillomavirus type 16 DNA in consecutive genital samples does not always represent persistent infection as determined by molecular variant analysis. *J Clin Microbiol* 2000; **38**:3388-93.

Meisels A, Fortin R. Condylomatous lesions of the cervix and vagina I Cytologic patterns. *Acta Cytol* 1976; **20**:505-9.

Meisels A, Fortin R, Roy M. Condylomatous lesions of the cervix II Cytologic, colposcopic and histopathologic study. *Acta Cytol* 1977; **21**:379-90.

Molden T, Kraus I, Karlsen F, et al. Human papillomavirus E6/E7 mRNA expression in women younger than 30 years of age. *Gynecol Oncol* 2006; **100**:95-100.

Molden T, Nygard JF, Kraus I, et al. Predicting CIN2 when detecting HPV m-RNA and DNA by PreTect HPV-proofer and consensus PCR: A 2-year follow-up of women with ASCUS or LSIL Pap smear. *Int J Cancer* 2005; **114**:973-76.

Molden T, Kraus I, Karlsen F, et al. Comparison of human papillomavirus messenger RNA and DNA detection: a cross-sectional study of 4136 women >30 years of age with a 2-year follow-up of high-grade squamous intraepithelial lesion. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2005; **14**:367-72.

Munoz N, Bosch FX, De Sanjose S, et al. The causal link between human papillomavirus and invasive cervical cancer: A population based case-control study in Colombia and Spain. *Int J Cancer* 1992; **52**:743-9.

Munoz N, Castellsague X, de Gonzalez AB, et al. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine* 2006; **24S3**:S1-S10.

Nanda K, McCrory DC, Myers ER, et al. Accuracy of the Papanicolaou test in screening for and follow-up of cervical cytologic abnormalities: A systemic review. *Ann Intern Med* 2000; **132**: 810-9.

National Cancer Institute Workshop. The 1988 Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses. *JAMA* 1989; **262**:931-4.

Numnum TM, Kirby TO, Leath CA, et al. A prospective evaluation of “ see and treat” in women with HSIL Pap smear results: is this an appropriate strategy? *J Low. Genit Tract Dis* 2005; **9**:2-6.

Ostör AG. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *Int J Gynecol Pathol* 1993; **12**:186-92.

Papanicolaou GN, Traut HF. The diagnostic value of vaginal smears in carcinoma of the uterus. *Am J Obstet Gynecol* 1941; **42**: 193-206.

Parkin DM, Bray F. The burden of HPV-related cancers. *Vaccine* 2006; **2**:11-25.

Partridge JM, Koutsky LA. Genital human papillomavirus infection in men. *Lancet Infect Dis* 2006; **6**:21-31.

Pete I, Toth V, Bosze P. The value of colposcopy in screening cervical carcinoma. *Eur J Gynecol Oncol* 1998; **19**:120-2.

Ponten J, Adami HO, Bergstrom R, et al. Strategies for global control of cervical cancer. *Int J Cancer* 1995; **60**:1-26.

Raffle AE, Alden B, Quinn M, et al. Outcomes of screening to prevent cancer: analysis of cumulative incidence of cervical abnormality and modeling of cases and deaths prevented. *BMJ* 2003; **326**: 901-5.

Reagan JW, Seidemann IL, Saracusa Y. The cellular morphology of carcinoma in situ and dysplasia or atypical hyperplasia of the uterine cervix. *Cancer* 1953; **6**:224-34.

Richart RM. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia. *Clin Obstet Gynecol* 1967; **10**:748-84.

Riley RR, Duensing S, Brake T, et al. Dissection of human papillomavirus E6 and E7 function in transgenic mouse models of cervical carcinogenesis. *Cancer Res* 2003; **63**:4862-71.

Ronco G, Segnan N, Giorgi-Rossi P, et al. Human papillomavirus testing and liquid-based cytology: Results at recruitment from the new technologies for cervical cancer randomized controlled trial. *J Natl Cancer Inst* 2006; **98**:765-74.

Sasieni P, Cuzick J. Could HPV testing become the sole primary cervical screening test? *J Med Screen* 2002; **9**:49-51.

Schiffman M, Khan MJ, Solomon D, et al. A Study of the impact of adding HPV types to cervical cancer screening and triage tests. *J of the National Cancer Institute* 2005; **97**:147-50.

Sellers JW, Karwalajtys TL, Kaczorowski J, et al. Incidence, clearance and predictors of human papillomavirus infection in women. *CMAJ* 2003; **168**:421-5.

Sherman ME, Wang SS, Tarone R, et al. Histopathologic extent of CIN3 lesions in the ASCUS/LSIL Triage Study (ALTS): implications for subject safety and lead-time bias. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003; **12**:372-9.

Siegler E, Bornstein J. Loop electrosurgical excision procedures in Israel. *Gynecol Oncol Invest* 2011; **72**:85-9.

Smith J, Green J, Berrington de Gonzalez A, et al. Cervical cancer and use of hormonal contraceptives: a systematic review. *Lancet* 2003; **361**:1159-67.

Smith JS, Herrero R, Bosetti C, et al. Herpes simplex virus-2 as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* 2002; **94**:1604-13.

Solomon D, Davey DD, Kurman R, et al. The 2001 Bethesda System: Terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA* 2002; **287**: 2114-9.

Solomon D, Nayar R. The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology, ed 2. New York: Springer Verlag, 2004; P1-156.

Solomon D. Role of triage testing in Cervical Cancer Screening. *JNCI Monographs* 2003; **31**:97-101.

Srodon M, Parry Dilworth H, Ronnet BM. Atypical squamous cells, cannot exclude high-grade squamous intraepithelial lesion: Diagnostic performance, human papilloma virus testing, and follow – up results. *Cancer (Cancer Cytopathol)* 2006; **108**:32-8.

Stanley M. Immune responses to human papillomavirus. *Vaccine* 2006; **24**:S16-22.

Stoler MH, Schiffman M. For the Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance-Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion Triage Study (ALTS) group. Interobserver reproducibility of cervical cytologic and histologic interpretations: Realistic estimates from the ASCUS-LSIL triage study. *JAMA* 2001; **285**:1500-5.

Stoler MH, Schiffman M. For the ALTS Group. Inter-observer reproducibility of cervical cytologic and histologic interpretations: realistic estimates from the ASCUS/LSIL Triage Study. *J Am Med Assoc* 2001; **285**:1500-5.

The ASCUS-LSIL Triage Study (ALTS) Group. A randomized trial on the management of low-grade squamous intraepithelial lesion cytology interpretations. *Am J Obstet Gynecol* 2003; **188**:1393-400.

The ASCUS-LSIL Triage Study (ALTS) Group. Results of a randomized trial on the management of cytology interpretations of atypical squamous cells of undetermined significance. *Am J Obstet Gynecol* 2003; **188**:1383-92.

The Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance/Low – Grade Squamous Intraepithelial Lesions Triage Study (ALTS) Group. Human papillomavirus testing for triage of women with cytologic

evidence of low-grade squamous intraepithelial lesions: baseline data from a randomized trial. *J Natl Cancer Inst* 2000; **92**:397-402.

The Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses. Report of the 1991, Bethesda Workshop. *JAMA* 1992; **267**:1892.

Tonon SA, Picconi MA, Bos PD, et al. Physical status of the E2 human papilloma virus 16 viral gene in cervical preneoplastic and neoplastic lesions. *J Clin Virol* 2001; **21**:129-134.

Tsoumpou I, Arbyn M, Kyrgiou M, et al. P16 (INK4a) immunostaining in cytological and histological specimens from the uterine cervix : a systematic review and meta-analysis. *Cancer Treat Rev* 2009; **35**:210-20.

Underwood M, Arbyn M, Parry-Smith W, et al. Accuracy of colposcopy-directed punch biopsies: a systematic review and meta-analysis. *BJOG* 2012; **119**:1293-1301.

Vassilakos P, Cossali D, Albe X, et al., Efficacy of monolayer preparations for cervical cytology: Emphasis on suboptimal specimens. *Acta Cytol* 1996; **40**:496-500.

Viscidi RP, Schiffman M, Hildesheim A, et al. Seroreactivity to human papillomavirus (HPV) types 16, 18, or 31 and risk of subsequent HPV infection: results from a population-based study in Costa Rica. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;**13**:324-7.

Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999; **189**:12-9.

Winer RL, Hughes JP, Feng Q, et al. Condom use and the risk of genital human papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* 2006; **354**:2645-54.

Winkelstein W. Smoking and cancer of the uterine cervix: hypothesis. *Am J Epidemiol* 1977; **106**:257-9.

Winkelstein W Jr. Smoking and cervical cancer-current status: a review. *Am J Epidemiol* 1990; **131**:945-57.

Winkelstein W Jr. Smoking and cervical cancer: cause or coincidence. *J Am Med Assoc* 1989; **262**:1631-32.

Wright TC, Cox JT, Massad LS, et al. 2001 Consensus guidelines for the management of women with cervical cytological abnormalities. *JAMA* 2002; **287**:2120-9.

Wright TC, Massad LS, Dunton CJ, et al. For the 2006 ASCCP-Sponsored Consensus Conference. 2006 consensus guidelines for the management of women with abnormal cervical screening tests. *J Low Genit Tract Dis* 2007; **11**:201-22.

Zur Hausen H. Condylomata acuminata and human genital cancer. *Cancer Res* 1976;**36**:794.

