



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ**

ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

**Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ p16 ΣΤΗΝ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΚΑΤΩΤΕΡΟΥ ΓΕΝΝΗΤΙΚΟΥ
ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ**

**ΙΩΑΝΝΑ ΤΣΟΥΜΠΟΥ
ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΟΣ-ΜΑΙΕΥΤΗΡΑΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2011



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ**

ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

**Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ p16 ΣΤΗΝ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΚΑΤΩΤΕΡΟΥ ΓΕΝΝΗΤΙΚΟΥ
ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ**

**ΙΩΑΝΝΑ ΤΣΟΥΜΠΟΥ
ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΟΣ-ΜΑΙΕΥΤΗΡΑΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2011

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

ΣΤΟΥΣ ΓΟΝΕΪΣ ΜΟΥ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η ιδέα της παρούσας διατριβής γεννήθηκε στις αρχές του 2006 και αποτελεί μία προσπάθεια μελέτης του ρόλου του δείκτη p16 στην αξιολόγηση των προκαρκινικών αλλοιώσεων από τον τραχήλο της μήτρας. Ο ρόλος των δεικτών χρόνιας λοίμωξης από τον ιό των ανθρωπίνων θηλωμάτων (HPV) στην αντιμετώπιση των προκαρκινικών αλλοιώσεων από τον τραχήλο της μήτρας, αποτελεί ένα από τα φλέγοντα θέματα της γυναικολογικής ογκολογίας. Η ανοσοχημική ανίχνευσή τους παρουσιάζεται από πολλούς μελετητές ως πανάκεια για την αντιμετώπιση αυτού του είδους των αλλοιώσεων. Το p16 παρουσιάζεται ως ένας από τους πιο πολλά υποσχόμενους δείκτες, αλλά ο ρόλος του δεν έχει μελετηθεί σε βάθος. Η διαπίστωση του εμπειρικού αυτού ελλείμματος μας οδήγησε στην πραγματοποίηση της έρευνας που περιγράφεται στην παρούσα μελέτη.

Η έρευνα βασίζεται στη συστηματική ανασκόπηση όλων των μελετών που παρατίθενται στη διεθνή βιβλιογραφία και αξιολογούν το ρολό του p16 στην αντιμετώπιση των προκαρκινικών αλλοιώσεων από τον τράχηλο της μήτρας και αποτελείται από δύο μέρη. Το πρώτο μέρος βασίζεται στη συστηματική ανασκόπηση της βιβλιογραφίας και στη μεθοδολογία της μετα-ανάλυσης. Επιλέξαμε τη μέθοδο αυτή, επειδή μας επέτρεπε να ενσωματώσουμε τα δεδομένα από τις διάφορες μελέτες και, συνεπώς, να διασφαλίσουμε την όσο το δυνατόν μεγαλύτερη εγκυρότητα των τελικών ευρημάτων και την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων.

Το δεύτερο μέρος της μελέτης λαμβάνει υπόψη τα συμπεράσματα από τη συστηματική ανασκόπηση και μετα-ανάλυση της βιβλιογραφίας, για την πραγματοποίηση μίας προοπτικής μελέτης. Η μελέτη αυτή αποσκοπεί στην αξιολόγηση του δείκτη p16 και της δοκιμασίας PCR για την ανίχνευση του HPV-DNA στην αντιμετώπιση της LSIL κυτταρολογίας.

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε με τη συνεργασία της Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής και του τμήματος Παθολογικής Ανατομίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Θεωρώ υποχρέωσή μου και αισθάνομαι βαθύτατη την επιθυμία να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες στους καθηγητές μου και μέλη της τριμελούς επιτροπής, οι οποίοι με βοήθησαν ποικιλοτρόπως στην ολοκλήρωση της διδακτορικής μου διατριβής και μου προσέφεραν το προνόμιο να μάθω πολλά από τη συνεργασία μαζί τους.

Θα ήθελα, κατ' αρχήν, να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα Καθηγητή Μαιευτικής και Γυναικολογίας στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κ. Ευάγγελο Παρασκευαΐδη, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και μου ανέθεσε την πραγματοποίηση της έρευνας αυτής, για τη συνεχή ενθάρρυνση, τις χρήσιμες συμβουλές και την ανεξάντλητη αισιοδοξία του. Με την πολύτιμη εμπειρία και καθοδήγησή του, καθώς και με την εξαιρετική υπομονή του, με στήριξε σε όλο το

χρονικό διάστημα που μεσολάβησε για την εκπόνηση της διδακτορικής μου διατριβής.

Θα ήθελα, ακόμη, να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου στην Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κ. Βασιλική Μαλάμου-Μήτση που, ως μέλος της τριμελούς επιτροπής, παρακολούθησε με υπομονή την πρόοδο της έρευνας και μου προσέφερε συνεχή υποστήριξη. Με βοήθησε, επίσης, με τα πολύτιμα σχόλια και τις χρήσιμες υποδείξεις της, στην κριτική ανάλυση των ευρημάτων και με ενθάρρυνε για την ολοκλήρωση της μελέτης στις γόνιμες συζητήσεις που είχα μαζί της.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Γεννητικής στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κ. Ιωάννη Γεωργίου που, ως μέλος της τριμελούς επιτροπής, με στήριξε κατά τη διάρκεια της διατριβής με τις πολύτιμες υποδείξεις του.

Θα ήθελα, επιπλέον, να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλα πρόσωπα, τα οποία με βοήθησαν, στα διάφορα στάδια της έρευνας και συνέβαλαν στην ολοκλήρωση αυτής της διατριβής:

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στον Marc Arbyn (Unit of Cancer Epidemiology, Scientific Institute of Public Health, Brussels, Belgium), για την πολύτιμη βοήθειά του

στην στατιστική ανάλυση των δεδομένων της έρευνας και τις επικοινωνιακές συζητήσεις.

Τον κ. Πέτρο Καρακίτσο, Αναπληρωτή Καθηγητή Παθολογικής Ανατομίας στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο «Αττικόν», για την πολύτιμη βοήθειά του στην ανοσοχημική χρώση των κυτταρολογικών δειγμάτων με το βιολογικό δείκτη p16 και στην κατανόηση των πρακτικών εφαρμογών του δείκτη.

Το κ. Γεώργιο Βαλασούλη, επιστημονικό συνεργάτη στη Μαιευτική και Γυναικολογία στο Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, για την ανεκτίμητη συνεισφορά του σε αυτή τη εργασία και για τη συνεχή υποστήριξή του.

Επιθυμώ επίσης να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της Επταμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: κ. Νικόλαο Δαλκαλίτση, Αναπληρωτή Καθηγητή Μαιευτικής και Γυναικολογίας, κ. Άννα Μπατιστάτου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας, κ. Δημήτριο Πέσχο, Επίκουρο Καθηγητή Φυσιολογίας και κ. Γεώργιο Κολιόπουλο, Λέκτορα Μαιευτικής και Γυναικολογίας, για τις επικοινωνιακές παρατηρήσεις τους.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην οικογένειά μου για τη βοήθεια και τη συμπαράσταση στην προσπάθειά μου να αντιπεξέλθω στις πολλές

και ταυτόχρονες υποχρεώσεις μου, κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διδακτορικής μου διατριβής.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Σελίδα

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΠΡΟΚΑΡΚΙΝΙΚΕΣ ΑΛΛΟΙΩΣΕΙΣ ΤΟΥ ΤΡΑΧΗΛΟΥ ΤΗΣ ΜΗΤΡΑΣ

1.1. Εισαγωγή.....	1
1.2. Αιτιολογία.....	2
1.2.1. Λοίμωξη με τον ιό των ανθρωπίνων θηλωμάτων (HPV).....	3
i. Ταξινόμηση των HPV υποτύπων.....	4
ii. HPV και προκαρκινικές αλλοιώσεις.....	5
1.2.2. Άλλες λοιμώξεις.....	7
i. Ερπηθς γεννητικών οργάνων (τύπου 2).....	7
ii. Χλαμύδια τραχώματος.....	7
iii. Ιός επίκτητης ανοσοανεπάρκειας (HIV).....	8
1.2.3. Κάπνισμα.....	9
1.2.4. Αντισυλληπτικά.....	10
1.2.5. Διατροφή.....	11
1.3. Συστήματα ταξινόμησης των προκαρκινικών αλλοιώσεων.....	12
1.4. Είδη προκαρκινικών αλλοιώσεων.....	15
1.4.1. ASCUS.....	16
1.4.2. LSIL.....	18
1.4.3. HSIL.....	20

2. ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΑΖΙΚΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΙΑΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ

2.1. Εισαγωγή.....	24
2.2. Τεστ Παπανικολάου.....	28
2.3. Κυτταρολογία υγρής φάσεως.....	30
2.4. Μέθοδοι ανίχνευσης του ιού HPV.....	32
2.4.1. Αρχές του τεστ για τον ιό HPV.....	33
2.4.2. Φυσική ιστορία των χαμηλής κακοήθειας τραχηλικών αλλοιώσεων από τον	

ιο HPV.....	34
2.4.3. Μέθοδοι ανίχνευσης του ιού HPV.....	36
i. Southern Blotting.....	36
ii. Dot Blot.....	39
iii. <i>In situ</i> Υβριδοποίηση.....	41
iv. Hybrid Capture.....	42
v. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	44
vi. Nucleic Acid Sequence-Based Amplification (NASBA).....	48
vii. Ανοσοχημεία.....	50
a. Ιικές πρωτεΐνες.....	51
b. Κυτταρικές πρωτεΐνες.....	52
2.5. Κολποσκόπηση.....	53
3. ΠΡΩΤΕΙΝΗ p16	
3.1. Εισαγωγή.....	55
3.2. p16 και κυτταρικός κύκλος.....	56
3.2.1. p16 και CDK.....	57
3.2.2. p16 και HPV.....	59
3.3. p16 και κυτταρικός γηρασμός.....	63
3.4. Άλλες πιθανές εφαρμογές του p16.....	64
3.5. Συμπεράσματα.....	66
4. ΣΚΟΧΟΙ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ.....	69

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Α. ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΕΠΙΣΚΟΠΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑ-ΑΝΑΛΥΣΗ

1. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

1.1. Στρατηγική αναζήτησης της βιβλιογραφίας.....	75
1.2. Κριτήρια επιλογής μελετών.....	76

1.3. Κριτήρια αποκλεισμού μελετών.....	77
1.4. Εξαγωγή δεδομένων.....	78
1.5. Στατιστική ανάλυση.....	80

2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

2.1. Αποτελέσματα αναζήτησης.....	82
2.1.1. Μη επιλεγμένες μελέτες.....	82
2.1.2. Επιλεγμένες μελέτες.....	83
2.2. Κυτταρολογία.....	87
2.3. Ιστολογία.....	92
2.4. Χρώση για το p16.....	92
2.5. Ερμηνεία της χρώσης για το p16.....	95
2.5.1. Κυτταρολογία.....	95
2.5.2. Ιστολογία.....	96

3. ΑΝΑΛΥΣΗ

3.1. Κυτταρολογία.....	98
3.2. Ιστολογία.....	100
3.3. Μετα-ανάλυση.....	103
3.4. Το p16 ως μέσο διαλογής των κυτταρολογικών δειγμάτων.....	107

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ..... 110

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗΣ ΕΠΙΣΚΟΠΗΣΗΣ ΤΗΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑ-ΑΝΑΛΥΣΗΣ..... 113

Β. ΠΡΟΟΠΤΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

p16 έναντι HPV DNA στην αξιολόγηση της LSIL κυτταρολογίας

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ..... 118

2. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	
2.1. Πληθυσμός και σχεδιασμός μελέτης.....	121
2.2. HPV DNA τεστ.....	123
2.3. Ανοσοκυτταρολογία για p16.....	122
2.4. Στατιστική ανάλυση.....	125
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	126
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	132
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΠΡΟΟΠΤΙΚΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	137
ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΗΝ ΕΛΛΗΝΙΚΗ.....	140
ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΗΝ ΑΓΓΛΙΚΗ.....	146
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	161
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	196
ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ.....	200

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 1

ΠΡΟ-ΚΑΡΚΙΝΙΚΕΣ ΑΛΛΟΙΩΣΕΙΣ ΤΟΥ ΤΡΑΧΗΛΟΥ ΤΗΣ ΜΗΤΡΑΣ

1.1. Εισαγωγή

Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας είναι ο πιο συχνός τύπος καρκίνου στις αναπτυσσόμενες χώρες και ο δεύτερος σε συχνότητα απαντώμενος καρκίνος στον κόσμο. Υπολογίζεται ότι το 75% των γυναικών που πάσχουν από αυτή την ασθένεια ζουν σε αναπτυσσόμενες χώρες, με έως και 450.000 νέα περιστατικά διηθητικού καρκίνου του τραχήλου ανά έτος. Συγκεκριμένα, στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής υπολογίζονται 16.000 νέα περιστατικά τον χρόνο ενώ στην Αγγλία και Ουαλία υπήρξαν 3.400 νέα περιστατικά για το 1999 (Statistics OfN 1999).

Ένα από τα χαρακτηριστικά της παθολογίας του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας είναι η δυνατότητα ανίχνευσης των προκαρκινικών αλλοιώσεων σε πρώιμο στάδιο. Η πρώιμη ανίχνευση και ο μαζικός πληθυσμιακός έλεγχος (ΜΠΕ) έχουν ελαττώσει τη θνησιμότητα από τη νόσο τόσο στις Σκανδιναβικές χώρες όσο και στο Ηνωμένο Βασίλειο της Μεγάλης Βρετανίας, όπου ο επιπολασμός του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας σημείωσε πτώση κατά 26% από το 1992 και η θνησιμότητα από 7.1 ανά 100.000 το 1988 σε 3.7 ανά 100.000 το 1997, μία μείωση σχεδόν 50% (Quinn *et al* 1999). Αυτή η ελάττωση οφείλεται σχεδόν αποκλειστικά στην διάδοση του μαζικού πληθυσμιακού κυτταρολογικού ελέγχου που αυξήθηκε από 35% το 1988 σε 85% το 1998.

1.2. Αιτιολογία

Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας αποτελεί μία σπάνια επιπλοκή μίας κοινής σεξουαλικά μεταδιδόμενης λοίμωξης. Η ασθένεια συσχετίζεται με λοίμωξη από συγκεκριμένους τύπους του ιού των ανθρωπίνων θηλωμάτων (HPV) και είναι χαρακτηριστικό ότι με κατάλληλες διαγνωστικές μελέτες το DNA του ιού μπορεί να ανιχνευθεί σε όλα τα δείγματα από διηθητικό καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Μία πληθώρα μελετών έχουν δείξει ότι τόσο ο καρκίνος εκ του πλακώδους επιθηλίου (SCC), όσο και τα αδενοκαρκινώματα, καθώς και η συντριπτική πλειοψηφία (>95%) των προκαρκινικών αλλοιώσεων, είναι θετικά για λοίμωξη από HPV. Άλλοι παράγοντες που αυξάνουν τον κίνδυνο ανάμεσα σε γυναίκες θετικές για HPV-DNA, είναι η χρήση αντισυλληπτικών χαπιών για πέντε ή περισσότερα χρόνια, το κάπνισμα, ο αυξημένος αριθμός τέκνων (πέντε ή περισσότερες τελειόμηνες κυήσεις) και το ιστορικό έκθεσης σε άλλα σεξουαλικά μεταδιδόμενα νοσήματα, όπως χλαμύδια και έρπης γεννητικών οργάνων τύπου 2. Επίσης, γυναίκες που έχουν εκτεθεί στον ιό της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV) εμφανίζουν αυξημένο κίνδυνο λοίμωξης από HPV που είναι δυνατό να εμμείνει και να οδηγήσει στην ανάπτυξη καρκίνου του τραχήλου (Πίνακας 1.1).

Πίνακας 1.1 Καρκίνος του τραχήλου της μήτρας και αιτιολογικοί παράγοντες

Λοίμωξη με τον ιό των ανθρωπίνων θηλωμάτων (HPV)

Άλλες λοιμώξεις

- Ερπηγ γεννητικών οργάνων (τύπου 2)
- Χλαμύδια
- HIV

Κάπνισμα

Αντισυλληπτικά

Διατροφικοί παράγοντες

1.2.1. Λοίμωξη με τον ιό των ανθρωπίνων θηλωμάτων (HPV)

Ο ιός των ανθρωπίνων θηλωμάτων (HPV) αποτελείται από μία κατηγορία ισοεδρικών σωματιδίων με διάμετρο 55 nm, χωρίς κάψα, που προσβάλλουν επιθηλιακούς ιστούς. Τα καψομερίδια αποτελούνται από δύο δομικές πρωτεΐνες:

- 57 kDa πρωτεΐνη L1, που αποτελεί το 80% των ιϊκών σωματιδίων και θεωρείται ότι είναι ειδική έναντι συγκεκριμένων αντιγόνων
- 43–53 kDa καψιδιακή πρωτεΐνη L2

Η απουσία κάψας δίνει στον ιό μια σχετική σταθερότητα και δυνατότητα να αντιστέκεται σε οργανικά διαλύματα. Λοίμωξη με τον ιό HPV είναι δυνατό να προκαλέσει τοπική υπερπλασία των κυττάρων που εμφανίζεται σαν κονδυλώματα ή τραχηλική ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία (CIN). Η πλειονότητα των καλοήθων νεοπλασιών υποστρέφουν αυτόματα σε ανοσολογικά ικανούς ασθενείς. Σε ασθενείς

με ανοσολογικές διαταραχές παρατηρείται μία τάση για εμφάνιση της λοίμωξης που στην περίπτωση των υψηλού κινδύνου υποτύπων (HR-HPV) είναι δυνατό να εξελιχθούν σε καρκίνο (Bosch *et al* 2002; zur Hausen 2002). Μελέτες έχουν δείξει ότι το HPV-DNA είναι δυνατό να ανευρεθεί στο 99.7% των καρκίνων του τραχήλου της μήτρας και οι υπότυποι 16, 18, 45 και 31 είναι οι πιο συχνά απαντώμενοι (Walboomers *et al* 1999; Bosch *et al* 2002; Muñoz *et al* 2003). Λοίμωξη με HR-HPV είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την ανάπτυξη του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας και ο παγκόσμιος οργανισμός υγείας (WHO) θεωρεί τους τύπους HPV16 και HPV18 ανθρώπινους καρκινογόνους παράγοντες.

i. Ταξινόμηση των HPV υποτύπων

Προγενέστερες προσπάθειες που αποσκοπούσαν στην ταξινόμηση των HPV υποτύπων βασίζονταν στην προτίμηση των διαφόρων τύπων του ιού είτε για το πλακώδες επιθήλιο της επιδερμίδος (π.χ. HPV 1, 4, 10), είτε για τους βλεννογόνους (π.χ. HPV 6, 16, 31). Ομως, αυτή η ταξινόμηση είναι υπεραπλουστευμένη και ανακριβής, καθώς υπάρχουν τύποι που εμφανίζονται τόσο στο πλακώδες επιθήλιο όσο και στους βλεννογόνους (π.χ. HPV 6). Η πιο πρόσφατη ταξινόμηση των διαφόρων τύπων του ιού βασίζεται στις διαφορές που παρατηρούνται στην αλληλουχία των DNA νουκλεοτιδίων στις περιοχές κωδικοποίησης των πρωτεϊνών E6, E7 και L1 (de Villiers *et al* 2004). Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί περισσότεροι από 130 διαφορετικοί HPV τύποι.

ii. HPV και προκαρκινικές αλλοιώσεις του τραχήλου της μήτρας

Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει πέρα από κάθε αμφιβολία την αιτιολογική σχέση μεταξύ λοίμωξης από τον ιό HPV και τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Η φυσική ιστορία της λοίμωξης από τον ιό, καθώς και προοπτικές μελέτες, έδειξαν ότι λοίμωξη από τον ιό HPV προηγείται της εμφάνισης του καρκίνου κατά μερικά χρόνια και ότι ο πιο κοινός τρόπος αναμετάδοσης του ιού είναι μέσω γενετήσιας επαφής. Τα αποτελέσματα αυτών των μελετών είναι συμβατά τόσο με επιδημιολογικές όσο και με κλινικές παρατηρήσεις που υποστήριζαν ότι ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας συμπεριφέρεται ως μία σεξουαλικά μεταδιδόμενη νόσος.

Ο ιός του HPV είναι δυνατό να ανιχνευθεί στο 95-100% των περιπτώσεων του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, έτσι ώστε η λοίμωξη από τον ιό να αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την ανάπτυξη του καρκίνου. Η συνειδητοποίηση ότι απουσία του ιϊκού DNA δεν είναι δυνατό να αναπτυχθεί καρκίνος του τραχήλου έχει εξαιρετική κλινική σημασία καθώς μπορεί να οδηγήσει σε ριζική αλλαγή στη διαδικασία πρόληψης και αντιμετώπισης των προκαρκινικών αλλοιώσεων. Στο παρελθόν θεωρούσαμε ως παράγοντες κινδύνου μία πληθώρα ασαφώς προσδιορισμένων παραγόντων (χαμηλό κοινωνικοοικονομικό επίπεδο, αυξημένος αριθμός σεξουαλικών συντρόφων, κάπνισμα, χρήση αντισυλληπτικών, ιστορικό σεξουαλικά μεταδιδόμενων νοσημάτων). Η διαπίστωση όμως ότι ο ιός του HPV είναι η μόνη απαραίτητη προϋπόθεση για την ανάπτυξη του καρκίνου του τραχήλου

της μήτρας, θέτει υπό αμφισβήτηση την υιοθέτηση προληπτικών μέτρων ενάντια σε μη-HPV σχετιζόμενους παράγοντες.

Λοίμωξη από τον ιό του HPV προσβάλλει το διαφοροποιημένο επιθήλιο και είναι συνήθως παροδική. Αφού ο ιός προσβάλει τα επιθηλιακά κύτταρα της βασικής στιβάδος το γονιδίωμά του αναπαράγεται αυτόματα. Με τη διαφοροποίηση των προσβεβλημένων κυττάρων προκαλείται αναπαραγωγή και έκφραση των γονιδίων του καψιδίου του ιού. Κάθε ερέθισμα που δρα ενάντια στη φυσιολογική διαφοροποίηση του επιθηλίου ή στην φυσιολογική αναπαραγωγή του ιού μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη χρόνιας λοίμωξης, η οποία με τη σειρά της είναι δυνατό να γίνει κλινικά εμφανής σε άτομα με κατεσταλμένο ανοσολογικό σύστημα. Η λοίμωξη από τον ιό οδηγεί στην παραγωγή μίας γενιάς ανοσοσφαιρινών G1 (IgG1) και IgA ενάντια σε ιϊκές πρωτεΐνες. Οι πρωτεΐνες αυτές δεν οδηγούν στην υποχώρηση των τραχηλικών αλλοιώσεων, που είναι δυνατή κυρίως μέσω της κυτταρικής ανοσίας. Η ανάπτυξη μακροχρόνιας λοίμωξης διαδραματίζει καίριο ρόλο στην εξέλιξη της ασθένειας. Επίσης, κάθε γεγονός που επιδρά στο ανοσολογικό σύστημα αυξάνει την συχνότητα κλινικών λοιμώξεων και τον κίνδυνο νεοπλασματικής εξαλλαγής.

1.2.2. Άλλες λοιμώξεις

Μία πληθώρα παραγόντων έχει συσχετισθεί κατά καιρούς με την ανάπτυξη του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Αυτοί οι παράγοντες έχουν επανεκτιμηθεί τα τελευταία χρόνια.

i. Ερπησ γεννητικών οργάνων (τύπου 2)

Η ανάλυση επτά μελετών που περιέλαβαν δείγματα από 1262 περιπτώσεις διηθητικού καρκίνου και 1117 φυσιολογικές βιοψίες (πληθυσμός ελέγχου) έδειξε ότι οροθετικότητα για έρπη γεννητικών οργάνων τύπου 2 ήταν υψηλότερη στον πληθυσμό μελέτης, σε σχέση με τον πληθυσμό ελέγχου. Ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου του τραχήλου της μήτρας ήταν σημαντικά υψηλότερος όταν η ανάλυση περιορίστηκε στον πληθυσμό με HPV-DNA θετικά δείγματα και όταν λάβαμε υπόψη μας άλλους παράγοντες (confounding factors), που είναι δυνατό να επηρεάσουν το αποτέλεσμα (OR 2.19; 95% CI 1.41–3.40). Η συσχέτιση παρατηρήθηκε τόσο σε καρκίνο εκ πλακωδών επιθηλίων όσο και εκ αδενικών κυττάρων (Smith *et al* 2002).

ii. Χλαμύδια τραχώματος

Η συχνότητα λοίμωξης από χλαμύδια του τραχώματος εμφανίζει σημαντικές διακυμάνσεις μεταξύ των διαφόρων χωρών. Η παρουσία αντισωμάτων έναντι

λοίμωξης από χλαμύδια σχετίζεται με 1.8 αύξηση του κινδύνου ανάπτυξης διηθητικού καρκίνου εκ των πλακωδών κυττάρων σε όλες τις χώρες εκτός της Ισπανίας. Ο κίνδυνος ήταν ακόμη μεγαλύτερος σε γυναίκες ηλικίας κάτω των 55 ετών (Smith *et al* 2004).

iii. Ιός επίκτητης ανοσοανεπάρκειας (HIV)

Η πρώτη ένδειξη ότι μπορεί να υπάρχει αιτιολογική σχέση μεταξύ HPV και HIV στην ανάπτυξη καρκίνου του τραχήλου της μήτρας επισημοποιήθηκε όταν ο καρκίνος του τραχήλου αναγνωρίστηκε ως ένα από τα κριτήρια του συνδρόμου της επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας (AIDS) ανάμεσα στις γυναίκες θετικές για HIV λοίμωξη.

Ο Massad και οι συνεργάτες του (Massad *et al* 1999) μελέτησε την τραχηλική κυτταρολογία από 1713 HIV θετικές γυναίκες και από 482 γυναίκες αρνητικές για τον ιό . Κυτταρολογικές αλλοιώσεις παρατηρήθηκαν στο 38.3% των γυναικών θετικών για HIV, σε σχέση με 16.2% του πληθυσμού ελέγχου που ήταν αρνητικός για HIV λοίμωξη. Ο σχετικός κίνδυνος (RR) για την ανάπτυξη κάθε είδους κυτταρολογικών αλλοιώσεων (ASCUS, LSIL, HSIL) παρουσίαζε αύξηση όταν ο πληθυσμός των CD4 ήταν μικρότερος από $200/\text{mm}^3$ (OR 2.13; 95% CI 1.45–3.13) και επί παρουσία HPV-DNA.

1.2.3. Κάπνισμα

Η επίδραση του καπνίσματος έχει μελετηθεί εκτενώς από ένα μεγάλο αριθμό μελετητών, που έδειξαν ότι υπάρχει μια στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, ακόμη και ανεξάρτητα από την επίδραση της λοίμωξης με τον ιό του HPV. Μελέτες που συμπεριέλαβαν γυναίκες θετικές για τον ιό HPV δείχνουν ότι το κάπνισμα αυξάνει τον κίνδυνο ανάπτυξης υψηλού βαθμού κυτταρικών αλλοιώσεων (HSIL) και καρκίνου του τραχήλου. Τα odds ratios (ORs) για γυναίκες που καπνίζουν, ανάμεσα στις γυναίκες με λοίμωξη από HPV, είναι της τάξης του 2–5. Επίσης, υπάρχουν μελέτες που αξιολόγησαν τον κίνδυνο ανάλογα με την ένταση και διάρκεια του καπνίσματος, οι οποίες έδειξαν αύξηση του κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου σε χρόνιες καπνίστριες (Castle *et al* 2002).

Οι πρώτη μελέτη, που υποστήριξε την ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ πίσσας και λοίμωξης από τον ιό HPV σε ποντίκια, δημοσιεύθηκε περίπου πριν από 100 χρόνια (Rous 1911). Πιο πρόσφατες μελέτες συνέδεσαν το κάπνισμα με τη νεοπλασματική εξαλλαγή ενδοτραχηλικών κυττάρων που είχαν προσβληθεί από HPV16 (Yang *et al* 1996). Το γεγονός ότι καρκινογόνα, άμεσα συσχετιζόμενα με νικοτίνη και καπνό, ανιχνεύθηκαν στην τραχηλική βλέννη καπνιστριών (Prokopczyk *et al* 1997), ενισχύει την υπόθεση της συνεργιστικής δράσης ανάμεσα στο κάπνισμα και στη λοίμωξη από HPV για την ανάπτυξη υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακών αλλοιώσεων /καρκίνου του τραχήλου. Τα χημικά καρκινογόνα συσχετιζόμενα με τον καπνό είναι πιθανό ότι

δρουν άμεσα στην κυτταρική μίτωση προκαλώντας βλάβη στο DNA. Είναι επίσης δυνατό η έκθεση στον καπνό να επηρεάζει την ικανότητα του ατόμου να αναπτύξει αποτελεσματική ανοσολογική απάντηση ενάντια στη λοίμωξη από τον ιό, ελαττώνοντας τον αριθμό των κυττάρων του Langerhans και άλλων δεικτών της ανοσολογικής αντίδρασης (Poppet *et al* 1995). Μία αναδρομική μελέτη (Guiliano *et al* 2002) έδειξε ότι λοίμωξη από HPV διαρκεί περισσότερο και είναι πιο δύσκολο να υποχωρήσει στις καπνίστριες, σε σχέση με γυναίκες που δεν έχουν καπνίσει ποτέ. Η μελέτη έδειξε επίσης ότι υπάρχει σημαντική συσχέτιση μεταξύ του βαθμού ελάττωσης του καπνίσματος και υποχώρησης της βλάβης σε γυναίκες με χαμηλού βαθμού αλλοιώσεις.

1.2.4. Αντισυλληπτικά

Η επίδραση των αντισυλληπτικών δισκίων στην παθογένεση του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας συνδέεται άμεσα με τη συχνότητα εμφάνισης της ασθένειας στον συγκεκριμένο πληθυσμό γυναικών και με την ύπαρξη μαζικού πληθυσμιακού ελέγχου (ΜΠΕ). Η επίδραση είναι πιο εμφανής σε χώρες με οργανωμένο πρόγραμμα ΜΠΕ, επιβεβαιώνοντας τη συσχέτιση μεταξύ τακτικού ΜΠΕ και αντισυλληπτικής χρήσης (δηλ. γυναίκες που χρησιμοποιούν αντισυλληπτικά έχουν κυτταρολογικό έλεγχο πιο συχνά). Μία μετα-ανάλυση που μελέτησε τη σχέση μεταξύ ορμονικής αντισύλληψης και καρκίνου του τραχήλου συμπέρανε ότι υπάρχει μια γραμμική δοσο-

εξαρτώμενη σχέση μεταξύ του διαστήματος χρήσης και του κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου του τραχήλου της μήτρας (Smith *et al* 2003).

Από την άλλη πλευρά, ο ρόλος του ιστορικού κυήσεων είναι εμφανής κυρίως σε χώρες όπου ένας σημαντικός αριθμός γυναικών έχουν πέντε ή περισσότερες εγκυμοσύνες. Η πλειονότητα των μελετών έχουν δείξει ότι υψηλός αριθμός κυήσεων συνδέεται με αύξηση του κινδύνου τόσο για το διηθητικό καρκίνο του τραχήλου όσο και για το καρκίνωμα *in situ*. Υπάρχουν στοιχεία που υποστηρίζουν ότι το odds ratio για καρκίνο του τραχήλου σε γυναίκες με επτά ή περισσότερες εγκυμοσύνες είναι τέσσερις φορές υψηλότερο, από ότι σε άτεκνες γυναίκες και ο κίνδυνος αυξάνει με τον αριθμό των τελειόμηνων κυήσεων (Munoz *et al* 2002).

1.2.5. Διατροφή

Μία πρόσφατη συστηματική ανασκόπηση της βιβλιογραφίας μελέτησε το ρόλο της διατροφής στην εξέλιξη της λοίμωξης από τον ιό του HPV και συμπεριέλαβε όλες τις σχετικές μελέτες που δημοσιεύθηκαν την χρονική περίοδο από τον Μάρτιο του 1995 έως το Νοέμβριο του 2003 (Garcia-Closas *et al* 2005). Η ανασκόπηση αξιολόγησε 29 μελέτες: έξι κλινικές δοκιμές, οκτώ προοπτικές και 15 case-control μελέτες. Παρόλο που υπάρχουν κάποια επιδημιολογικά στοιχεία που υποστηρίζουν ότι η διατροφή διαδραματίζει κάποιο ρόλο στην τραχηλική καρκινογένεση, οι υπάρχουσες μελέτες δείχνουν ότι δεν υπάρχουν αρκετά δεδομένα που να υποστηρίζουν τη σχέση μεταξύ

συγκεκριμένων διατροφικών συστατικών και καρκινογένεσης. Είναι γενικά αποδεκτό ότι τα φρούτα και λαχανικά έχουν προστατευτικό ρόλο έναντι σε χρόνια λοίμωξη από τον ιό του HPV (Sedjo *et al* 2002; Giuliano *et al* 2003). Επίσης, υπάρχουν στοιχεία που υποστηρίζουν τον προστατευτικό ρόλο της βιταμίνης E (Giuliano *et al* 1997; Ho *et al* 1998; Nagata *et al* 1999) και σε λιγότερο βαθμό της βιταμίνης B12 (Alberg *et al* 2000; Goodman *et al* 2000) και της βιταμίνης C (Ho *et al* 1998; Giuliano *et al* 2003). Αντίθετα, υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν ότι αυξημένα επίπεδα ομοκυστεΐνης στο αίμα συσχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο (Alberg *et al* 2000; Goodman *et al* 2000; Sedjo *et al* 2003). Ο προστατευτικός ρόλος συγκεκριμένων βιταμινών έναντι σε χρόνια λοίμωξη από τον ιό HPV είναι εξαιρετικά σημαντικό εύρημα και επισημαίνει το ρόλο της διατροφής, κυρίως στην πρόληψη και όχι τόσο στη θεραπεία των προ-καρκινικών τραχηλικών αλλοιώσεων.

1.3. Συστήματα ταξινόμησης των προκαρκινικών αλλοιώσεων

Μία πληθώρα συστημάτων έχουν χρησιμοποιηθεί κατά καιρούς για την ταξινόμηση των προκαρκινικών κυτταρικών αλλοιώσεων του τραχήλου της μήτρας. Ο δρ. Γεώργιος Παπανικολάου εισήγαγε τον όρο δυσκαρύωση και υιοθέτησε ένα σύστημα ταξινόμησης που αποτελείτο από πέντε βαθμίδες (Πίνακας 1.2). Ο δρ. Reagan εισήγαγε τον όρο «δυσπλασία» για να περιγράψει τις προ-καρκινικές αλλοιώσεις (Reagan 1953). Η έννοια της τραχηλικής ενδο-επιθηλιακής νεοπλασίας (CIN) εισήχθει για πρώτη φορά τη δεκαετία του '60 από τον Richart (Richart 1967). Οι όροι

“δυσπλασία” και “CIN” χρησιμοποιήθηκαν αρχικά για την περιγραφή των ιστολογικών αλλοιώσεων και στη συνέχεια των κυτταρολογικών δειγμάτων.

Η κυτταρολογική ταξινόμηση κατά Bethesda αντιπροσωπεύει μια προσπάθεια καθιέρωσης κυτταρολογικής ορολογίας κοινά αποδεκτής από τους ερευνητές ανά τον κόσμο. Η πρώτη Bethesda συνεδρία αποτελείτο από ειδικούς Κυτταρολόγους, Παθολογοανατόμους, Γυναικολόγους και άλλους ειδικούς, που συναντήθηκαν το 1988 υπό την αιγίδα του National Cancer Institute (National Cancer Institute Workshop 1989). Άλλες δύο συνεδρίες πραγματοποιήθηκαν το 1991 και το 2001 και ασχολήθηκαν με φλέγοντα θέματα, όπως αυτό του ρόλου των νέων τεχνολογιών (The Bethesda System 1991). Μια από τις σημαντικότερες καινοτομίες του συστήματος Bethesda είναι η αντικατάσταση της προϋπάρχουσας ορολογίας για τις προ-καρκινικές αλλοιώσεις με δυο βαθμίδες ενδοεπιθηλιακών αλλοιώσεων των πλακωδών ενδοεπιθηλιακών αλλοιώσεων (SIL): υψηλού και χαμηλού βαθμού (National Cancer Institute Workshop 1989) (Πίνακας 1.2). Μια άλλη πρωτοπορία του συστήματος Bethesda ήταν η ανάπτυξη κριτηρίων, ώστε ένα κυτταρικό δείγμα να θεωρείται επαρκές (Solomon *et al* 2002).

Το σύστημα ταξινόμησης των κυτταρολογικών δειγμάτων στη Μεγάλη Βρετανία υιοθετεί τον όρο δυσκαρύωση που αναπτύχθηκε στη δεκαετία του '60. Βάσει αυτής της ταξινόμησης, υψηλού βαθμού (severe) και μετρίου βαθμού (moderate) δυσκαρύωση αντιστοιχούν σε υψηλού βαθμού πλακώδεις ενδοεπιθηλιακές

αλλοιώσεις (HSIL) στο σύστημα Bethesda. Ελαφρά (mild) δυσκαρύωση αντιστοιχεί σε χαμηλού βαθμού πλακώδεις ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις (LSIL) και άτυπα πλακώδη κύτταρα σε ακαθόριστης σημαντικότητας (ASCUS) αλλοιώσεις (Πίνακας 1.2).

Πίνακας 1.2 Ταξινόμηση κυτταρολογικών δειγμάτων από τον τράχηλο της μήτρας

Παπανικολάου	Δυσκαρύωση	Bethesda 1991
Class I	Φυσιολογικό	Εντός φυσιολογικών ορίων
	Φλεγμονώδης ατυπία	Φλεγμονώδης αντίδραση
Class II	Πλακώδης ατυπία	Άτυπα πλακώδη κύτταρα απροσδιορίστου σημασίας (ASCUS)
	HPV ατυπία	Χαμηλού βαθμού πλακώδεις ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις (LSIL)
Class III	Ελαφρά δυσκαρύωση	Χαμηλού βαθμού πλακώδεις ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις (LSIL)
	Μετρίου βαθμού δυσκαρύωση	Υψηλού βαθμού πλακώδεις ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις (HSIL)
	Υψηλού βαθμού δυσκαρύωση	Υψηλού βαθμού πλακώδεις ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις (HSIL)
Class III	Καρκίνωμα in-situ	Υψηλού βαθμού πλακώδεις ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις (HSIL)
Class IV	Καρκίνος	Καρκίνος

Η ταξινόμηση κατά Bethesda αναθεωρήθηκε το 2001 (Wright *et al* 2002). Η κύρια διαφορά από την προηγούμενη ταξινόμηση είναι ότι διαιρεί περαιτέρω τα ASCUS δείγματα, σε ASC-US (άτυπα πλακώδη κύτταρα ακαθορίστου σημαντικότητας) και ASC-H (άτυπα πλακώδη κύτταρα που δεν μπορούν να αποκλείσουν υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία).

1.4. Είδη προκαρκινικών αλλοιώσεων

Οι πλειονότητα των συμβατικών τεστ Παπανικολάου (Παπ-τεστ) ή δειγμάτων κυτταρολογίας υγρής φάσεως (LBC) είναι αρνητικά για προκαρκινικές αλλοιώσεις. Στον πίνακα 1.3 παρουσιάζουμε συνοπτικά τη συχνότητα εμφάνισης των διαφόρων βαθμίδων κυτταρολογικών αλλοιώσεων τόσο σε συμβατικά Παπ-τεστ όσο και στην κυτταρολογία υγρής φάσεως, βάσει στοιχείων από κυτταρολογικά εργαστήρια των Ηνωμένων Πολιτειών για την περίοδο 2002 έως 2003 (Davey *et al* 2004).

Πίνακας 1.3. Συχνότητα εμφάνισης κυτταρολογικών αλλοιώσεων

	Παπ-τεστ	LBC
ASC-US	3.8%	4.76%
ASC-H	0.48%	0.55%
LSIL	2.1%	2.9%
HSIL+	0.7%	0.84%

1.4.1. ASCUS

Με το σύστημα Bethesda 1991 έγινε εμφανές ότι λόγω της υποκειμενικής φύσης της κυτταρολογίας, οι κυτταρολόγοι χρειάζονταν μια νέα ενδιάμεση κατηγορία. Η κατηγορία αυτή ονομάστηκε *atypical squamous cells of undetermined significance* (ASCUS). Η αναθεώρηση του συστήματος Bethesda το 2001 οδήγησε στη δημιουργία δύο υποκατηγοριών. Η πρώτη κατηγορία αναφέρεται σε δείγματα με χαμηλό κίνδυνο παρουσίας CIN2,3 και ονομάζεται ASC-US. Η δεύτερη κατηγορία είναι λιγότερο συχνή και συσχετίζεται με μεγαλύτερο κίνδυνο παρουσίας CIN2,3. Αυτή η κατηγορία ονομάζεται *atypical squamous cells; cannot exclude high-grade squamous intraepithelial lesion* (ASC-H). Η ορολογία ASC-H χρησιμοποιείται όταν υπάρχουν μερικά κυτταρολογικά κριτήρια που συνηγορούν για HSIL αλλά όχι όλα. Μια σημαντική παρατήρηση για τους κλινικούς ιατρούς είναι η παρατηρούμενη μικρή αναπαραγωγικότητα του ASCUS (Rob 1994; Stoler *et al* 2001). Αναφορικά, η *National Cancer Institute's ASC-US/LSIL Triage Study* (ATLS), έδειξε ότι μόνο 55% των κυτταρολογικών δειγμάτων αρχικά διεγνωσμένων ως ASC θεωρήθηκαν ASCUS από τους κυτταρολόγους που πραγματοποίησαν ποιοτικό έλεγχο, ενώ το 31% των περιπτώσεων υποβαθμίστηκαν σε φυσιολογικά δείγματα και το 14% αναβαθμίστηκαν σε SIL (Solomon *et al* 2001).

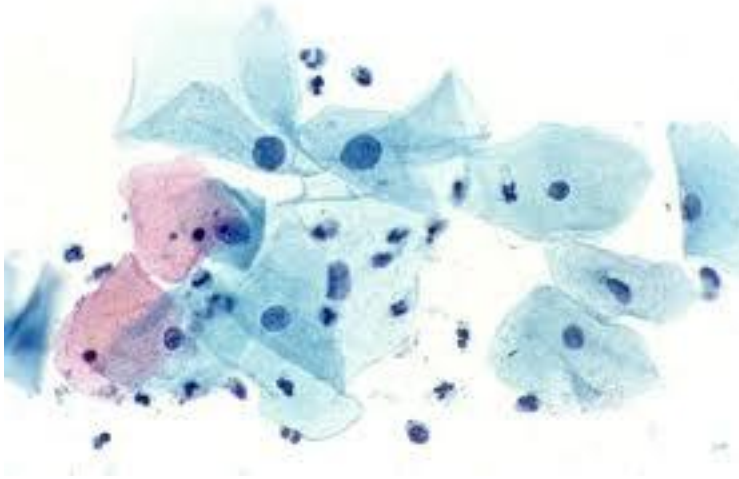
ASCUS κυτταρολογία

Η ASC-US κυτταρολογία αποτελεί >90% των ASC επιχρισμάτων και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά της είναι παρόμοια με αυτά που παρατηρούνται στα LSIL δείγματα, αλλά είναι είτε ποιοτικά είτε ποσοτικά ανεπαρκή ώστε να υποστηρίξουν τη διάγνωση LSIL. Οι κυτταρικές αλλαγές συνίσταται σε 1.5-2 φορές μεγέθυνση του πυρήνα, μικρή αύξηση της αναλογίας πυρήνα/κυτταροπλάσματος και μόνο ελαφρά πυρηνική υπερχρωμασία (Εικόνα 1.1).

Τα ASC-H δείγματα αποτελούν μόνο 5% των ASC επιχρισμάτων και εμφανίζουν στοιχεία που ομοιάζουν με HSIL, αλλά δεν είναι επαρκή για να θέσουν αυτή τη διάγνωση. Τα κύτταρα έχουν συνήθως το μέγεθος των μεταπλαστικών κυττάρων και μπορεί να εμφανισθούν μεμονωμένα ή σε ομάδες. Ο πυρήνας είναι 2.5-3 φορές διογκωμένος με υπερχρωμασία.

Κλινική σημασία της ASCUS κυτταρολογίας

Μια γυναίκα με κυτταρολογία ASCUS σε έλεγχο ρουτίνας έχει 5-16% πιθανότητα να έχει βιοψία που να αντιστοιχεί σε CIN2,3. Μια πρόσφατη μετα-ανάλυση, που συμπεριέλαβε 20 μελέτες, έδειξε ότι η συχνότητα εμφάνισης CIN2,3 σε πληθυσμό ASCUS ήταν 9.7% (Arbyn *et al* 2006). Στις περισσότερες μελέτες, περίπου 50% των γυναικών με ASC-H θα έχουν βιοψία που θα δείχνει CIN2,3.



Εικόνα 1.1 ASCUS κύτταρα

1.4.2. LSIL

Κυτταρολογικά επιχρίσματα με χαμηλού βαθμού πλακώδεις ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις (LSIL) αποτελούν μη νεοπλασματικές κυτταρικές αλλοιώσεις προκαλούμενες από λοίμωξη με HPV. LSIL δείγματα παρατηρούνται κυρίως σε γυναίκες νεαρής ηλικίας (16-26 ετών) ή στην αρχή της σεξουαλικής ζωής (Clifford *et al* 2003). Οι γυναίκες νεαρής ηλικίας προσβάλλονται με τον ιό HPV πολύ γρήγορα μετά την έναρξη της σεξουαλικής δραστηριότητας (Winer *et al* 2003). Μια πληθώρα μελετών έδειξε υψηλό επιπολασμό των HR-HPV υποτύπων σε γυναίκες νεαρότερες των 30 ετών, που όμως πέφτει σημαντικά με την ηλικία. Η συχνότητα αυτών των λοιμώξεων είναι 22-24% στην ηλικία των 20 ετών (Clavel *et al* 2001). Η «*Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance/Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesions Triage Study (ATLS)*» μελέτη έδειξε ότι 87% των γυναικών κάτω των 29

ετών με LSIL ήταν θετικές για HR-HPV, συγκριτικά με το 75% των μεγαλύτερης ηλικίας γυναικών (Sherman *et al* 2002). Σε αντίθεση με τα HSIL κυτταρολογικά επιχρίσματα, όπου η πλειονότητα των γυναικών έχουν επιμολυνθεί με έναν HPV τύπο, η ALTS μελέτη έδειξε ότι περισσότεροι του ενός HPV υπότυποι ανευρέθησαν στο 58.9% των γυναικών με LSIL (ALTS group 2000).

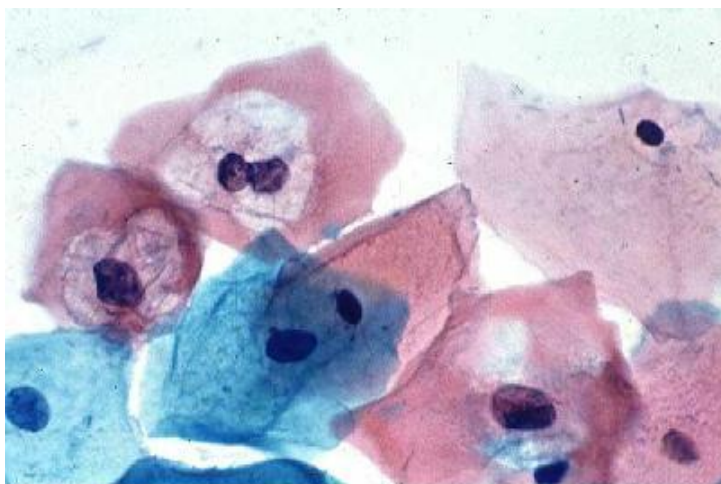
LSIL κυτταρολογία

Η κυτταρολογική διάγνωση του LSIL βασίζεται στην ανίχνευση ανώμαλων πλακωδών κυττάρων των οποίων το μέγεθος είναι ίδιο με αυτό των φυσιολογικών κυττάρων της επιφανειακής ή ενδιάμεσης στιβάδος (Εικόνα 1.2). Η διάγνωση βασίζεται στην παρουσία διογκωμένου πυρήνα, τουλάχιστον 3 φορές από τον φυσιολογικό πυρήνα των επιπολής και ενδιάμεσων κυττάρων, ανομοιογένεια της πυρηνικής μεμβράνης και της κατανομής της χρωματίνης. Επιπρόσθετα στοιχεία αποτελούν η παρουσία υπερχρωματικού πυρήνα και κοιλοκυττάρωσης (Εικόνα 1.2). Η διάγνωση του LSIL προαπαιτεί την παρουσία πυρηνικής διόγκωσης και ατυπίας.

Κλινική σημασία του LSIL

Το ποσοστό των γυναικών με LSIL που υποχωρούν ή υποτροπιάζουν δεν είναι πλήρως γνωστό. Περίπου 28% των γυναικών με κυτταρολογία LSIL θα έχουν CIN2,3 (Cox *et al* 2003). Υποχώρηση των αλλοιώσεων είναι συχνότερη σε νεαρότερες

γυναίκες, αλλά ένας μικρός πληθυσμός γυναικών θα αναπτύξει υψηλού βαθμού αλλοιώσεις. Ο Melnikow και οι συνεργάτες του πραγματοποίησαν μία μετα-ανάλυση των μελετών που παρακολούθησαν γυναίκες με LSIL χωρίς θεραπεία. Παρόλο που 47.4% των δειγμάτων έγιναν φυσιολογικά σε ένα διάστημα 2 ετών, 20.8% προχώρησαν σε CIN 2,3 και 0.15% σε διηθητικό καρκίνο (Melnikow *et al* 1998).



Εικόνα 1.2 LSIL με κοιλοκυττάρωση

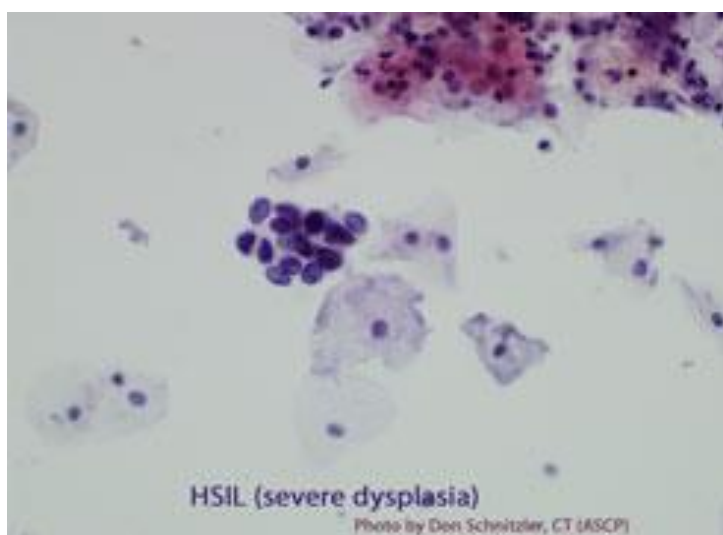
1.4.3. HSIL

Κυτταρολογία HSIL δεν είναι συχνό εύρημα και αποτελεί μόνο 0.5% των τεστ Παπανικολάου (Davey *et al* 2004). HSIL εμφανίζεται συχνότερα σε γυναίκες ηλικίας 25-29 ετών (Insinga *et al* 2004). Σε αυτές τις γυναίκες υπάρχει σημαντική κίνδυνος ύπαρξης CIN2,3 ή καρκίνου, αφού περίπου 70-75% των γυναικών με HSIL έχουν

CIN2,3 και 1-4% από αυτές έχουν διηθητικό καρκίνο (Jones *et al* 1996; Massad *et al* 2001).

HSIL κυτταρολογία

Τα κύτταρα χαρακτηρίζονται από απώλεια διαφοροποίησης, σημαντική πυρηνική ατυπία και ελάττωση της αναλογίας πυρήνα/κυτταροπλάσματος. Σε αντίθεση με τα LSIL, τα HSIL δείγματα χαρακτηρίζονται από απώλεια των κυτταροπλασματικών αλλαγών συσχετιζόμενων με παραγωγική λοίμωξη από τον ιό HPV, και άρα έλλειψη κοιλοκυττάρωσης. Οι πυρήνες των κυττάρων χαρακτηρίζονται από υπερχρωμασία και απουσία των πυρηνίων. Τα κύτταρα μπορεί να είναι μεμονωμένα ή να εμφανίζονται σε ομάδες. Σημαντική σύγχυση είναι δυνατό να προκληθεί σε εμμηνοπαυσιακές γυναίκες που λόγω κυτταρικής ατροφίας, τα πλακώδη κύτταρα εμφανίζουν αυξημένη πυρηνική προς κυτταροπλασματική αναλογία.



Εικόνα 1.3 HSIL κύτταρα

Στον πίνακα 1.4 φαίνεται η συσχέτιση μεταξύ της κυτταρολογικής και ιστολογικής διάγνωσης.

Πίνακας 1.4 Συσχέτιση μεταξύ της κυτταρολογικής και ιστολογικής διάγνωσης

Κυτταρολογία	Ιστολογία	
	CIN2,3	Καρκίνος
ASC-US	5-16%	0.1%
ASC-H	20-50%	3%
LSIL	21- 28%	0.15%
HSIL+	70-75%	1-4%

Κεφάλαιο 2

ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΑΖΙΚΟΥ ΠΡΟΛΗΠΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ

2.1. Εισαγωγή

Κάθε μέθοδος μαζικού προληπτικού ελέγχου (ΜΠΕ) αποτελεί μία προσπάθεια αναγνώρισης μίας ασθένειας μέσω εξετάσεων ή άλλων δοκιμασιών. Η επιτυχία της κάθε ΜΠΕ εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό, όχι μόνο από το πόσο αξιόπιστη είναι η μέθοδος αλλά και από την ύπαρξη κατάλληλου ανθρωπίνου δυναμικού, που μπορεί να πραγματοποιήσει τις απαιτούμενες εξετάσεις, καθώς και την ύπαρξη κατάλληλης υποδομής, ώστε πέρα από τη διάγνωση, να είναι δυνατή η θεραπεία και παρακολούθηση των ασθενών.

Μία πληθώρα παραμέτρων πρέπει να λαμβάνονται υπόψη πριν την υιοθέτηση κάθε μεθόδου για ΜΠΕ:

- **Ευαισθησία (Sensitivity)**

Η δυνατότητα της μεθόδου να ανιχνεύσει τον πληθυσμό που πάσχει από την ασθένεια

- **Ειδικότητα (Specificity)**

Η ικανότητα της μεθόδου να ανιχνεύσει τον πληθυσμό που δεν πάσχει από την ασθένεια

- **Θετική προγνωστική αξία (PPV)**

Ο βαθμός στον οποίο η μέθοδος είναι δυνατόν να ανιχνεύσει τον πληθυσμό που έχει την ασθένεια ανάμεσα στην ομάδα των θετικών αποτελεσμάτων

- **Αρνητική προγνωστική αξία (NPV)**

Ο βαθμός στον οποίο η μέθοδος είναι δυνατόν να ανίχνευσει τον πληθυσμό που δεν έχει την ασθένεια ανάμεσα στην ομάδα των αρνητικών αποτελεσμάτων

Κάθε δοκιμασία που είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί για πρόγραμμα ΜΠΕ αποσκοπεί στην ανίχνευση όσο το δυνατόν περισσότερων ασθενών (**υψηλή ευαισθησία**) και στην αποφυγή θετικού αποτελέσματος σε άτομα που δεν έχουν την ασθένεια (**υψηλή ειδικότητα**). Όταν η ευαισθησία και η ειδικότητα του τεστ είναι υψηλές, η πιθανότητα ένα θετικό αποτέλεσμα να αποτελεί το σωστό αποτέλεσμα (**υψηλή PPV**), εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον επιπολασμό της ασθένειας στον συγκεκριμένο πληθυσμό. Εάν ο επιπολασμός είναι πολύ χαμηλός, ακόμη και το καλύτερο τεστ θα έχει περιορισμένη αξία. Απαραίτητη προϋπόθεση για την επιτυχία κάθε προγράμματος ΜΠΕ, συμπεριλαμβανομένου αυτού για την ανίχνευση προ-καρκινικών αλλοιώσεων του τραχήλου της μήτρας, είναι η υιοθέτηση συγκεκριμένων κριτηρίων, όπως αυτά καθορίζονται από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO). Τα κριτήρια του WHO για τα προγράμματα ΜΠΕ παρουσιάζονται στον πίνακα 2.1. (Wilson *et al* 1968; Cochrane *et al* 1971; Gray *et al* 1996).

Πίνακας 2.1 Χαρακτηριστικά ιδανικού τεστ μαζικού προληπτικού ελέγχου κατά WHO

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

Πρόγραμμα ΜΠΕ

- Ύπαρξη κατάλληλου προσωπικού, υπηρεσιών και υποδομής
 - Όλες οι άλλες εναλλακτικές λύσεις για την αντιμετώπιση της ασθένειας πρέπει να έχουν ληφθεί υπόψη ώστε το πρόγραμμα ΜΠΕ να είναι αποτελεσματικό
 - Οι συμμετέχοντες στο πρόγραμμα ΜΠΕ πρέπει να έχουν πρόσβαση στις κατάλληλες πληροφορίες ώστε να αποφασίσουν αν επιθυμούν να συμμετάσχουν στο πρόγραμμα
-

Συνοπτικά, κάθε πρόγραμμα ΜΠΕ για τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας αποσκοπεί στην ανίχνευση προ-καρκινικών αλλοιώσεων μέσω τεχνικών που είναι εύκολες στην εφαρμογή τους, τόσο από το ιατρικό όσο και από το νοσηλευτικό προσωπικό, δεν έχουν υψηλό κόστος και είναι αποδεκτές και καλά ανεκτές από τον εξεταζόμενο πληθυσμό. Οι τεχνικές πρέπει επίσης να συνδυάζουν υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα στο να ανιχνεύουν τα άτομα με ασυμπτωματικές, προ-κλινικές μορφές της ασθένειας, και να τα διαφοροποιούν από αυτά που δεν έχουν την ασθένεια. Σε γενικές γραμμές, η αναλογία ασθένειας προς την απουσία της σε ένα συγκεκριμένο πληθυσμό πρέπει να κλίνει υπέρ της δεύτερης. Στις παθήσεις του τραχήλου, η επίπτωση του καρκίνου του τραχήλου είναι 0.2-0.5%, ενώ η επίπτωση των υψηλού και χαμηλού βαθμού κακοήθειας προ-καρκινικών αλλοιώσεων είναι 0.5-1.0% και 3-5% αντίστοιχα. Αρα, η επίπτωση του καρκινικών αλλοιώσεων είναι περίπου δέκα φορές μικρότερη σε σχέση με τις προκαρκινικές αλλοιώσεις (Boyes *et al* 1982; Miller *et al* 1992).

Οι εξής μέθοδοι έχουν μελετηθεί για ΜΠΕ για τις προκαρκινικές αλλοιώσεις από τον τράχηλο της μήτρας:

1. Συμβατική κυτταρολογία (τεστ Παπανικολάου)
2. Κυτταρολογία υγρής φάσεως (LBC)
3. Μέθοδοι ανίχνευσης του ιού HPV
 - Southern Blotting
 - Dot Blot
 - *In Situ* Hybridisation
 - Hybrid Capture
 - PCR
 - NASBA
 - Ανοσοχημικές χρώσεις
 - a) Ιϊκές πρωτεΐνες
 - b) Κυτταρικές πρωτεΐνες
4. Κολποσκόπηση

2.2. Τεστ Παπανικολάου

Το 1928 ο δρ. Γεώργιος Παπανικολάου, διδάκτωρ βιολογίας και ανατομίας στο εργαστήριο του δρ. Charles Stockard, παρατήρησε σε δείγματα από κολπικό επιθήλιο την ύπαρξη ανώμαλων, «δυσκαρυωτικών» κυττάρων από το τραχηλικό επιθήλιο σε γυναίκες με καρκίνο

του τραχήλου. Αυτή η παρατήρηση ήταν αποτέλεσμα της μακροχρόνιας μελέτης του ερευνητή στην ενδοκρινολογική λειτουργία των κυττάρων. Στη συνέχεια ο δρ. Παπανικολάου συνεργάστηκε με τον γυναικολόγο δρ. Herbert Traut και ανεκάλυψαν ότι ο καρκίνος του τραχήλου χαρακτηρίζεται από μια προ-καρκινική φάση, που προκαλεί συγκεκριμένες αλλοιώσεις στα κύτταρα, οι οποίες μπορούν να διαγνωσθούν σε πρώιμο, θεραπεύσιμο στάδιο (Papanicolaou *et al* 1941).

Ο έλεγχος για τις προκαρκινικές τραχηλικές αλλοιώσεις χρησιμοποιώντας το τεστ Παπανικολάου (Παπ-τεστ) άρχισε το 1940 (McSweeney *et al* 1948). Παρόλο που δεν έχει αξιολογηθεί σε προοπτική μελέτη, ελάχιστοι αμφισβητούν τον ρόλο του Παπ-τεστ ως μέσο μαζικού ελέγχου για τις προκαρκινικές αλλοιώσεις του τραχήλου της μήτρας. Μετά την εισαγωγή του μαζικού κυτταρολογικού ελέγχου στις ΗΠΑ, παρατηρήθηκε 50% ελάττωση στην συχνότητα εμφάνισης καρκίνου του τραχήλου και 70% ελάττωση στους θανάτους λόγω της ασθένειας. Η περίοδος από το 1970 έως τα μέσα της δεκαετίας του '90 μπορεί να θεωρηθεί η χρυσή εποχή του Παπ-τεστ. Κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου, το Παπ-τεστ ήταν η αναμφισβήτητη μέθοδος προληπτικού ελέγχου για το καρκίνο του τραχήλου. Ήταν όμως και κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου που άρχισαν να γίνονται εμφανείς οι ατέλειες του τεστ.

Η ευαισθησία του Παπ-τεστ για τη διάγνωση των προκαρκινικών αλλοιώσεων του τραχήλου θεωρείται αποδεκτή (30-80%, μέση τιμή: 47%). Το τεστ χαρακτηρίζεται από υψηλή

ειδικότητα (79-100%, μέση τιμή: 95%) (Nanda *et al* 2000). Παρόλο που η ευαισθησία του Παπ-τεστ μπορεί να θεωρηθεί αποδεκτή, δεν είναι η αναμενόμενη για μία δοκιμασία χρησιμοποιούμενη σε ένα πρόγραμμα ΜΠΕ. Το ποσοστό των ψευδώς-αρνητικών αποτελεσμάτων αποτελεί μία από τις σημαντικότερες αδυναμίες του τεστ-Παπ. Τα ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα οφείλονται κυρίως σε λάθη κατά τη συλλογή του δείγματος, είτε λόγω ανεπαρκούς δείγματος, είτε λόγω απουσίας διαγνωστικών κυττάρων από το δείγμα (McCoogan *et al* 1998).

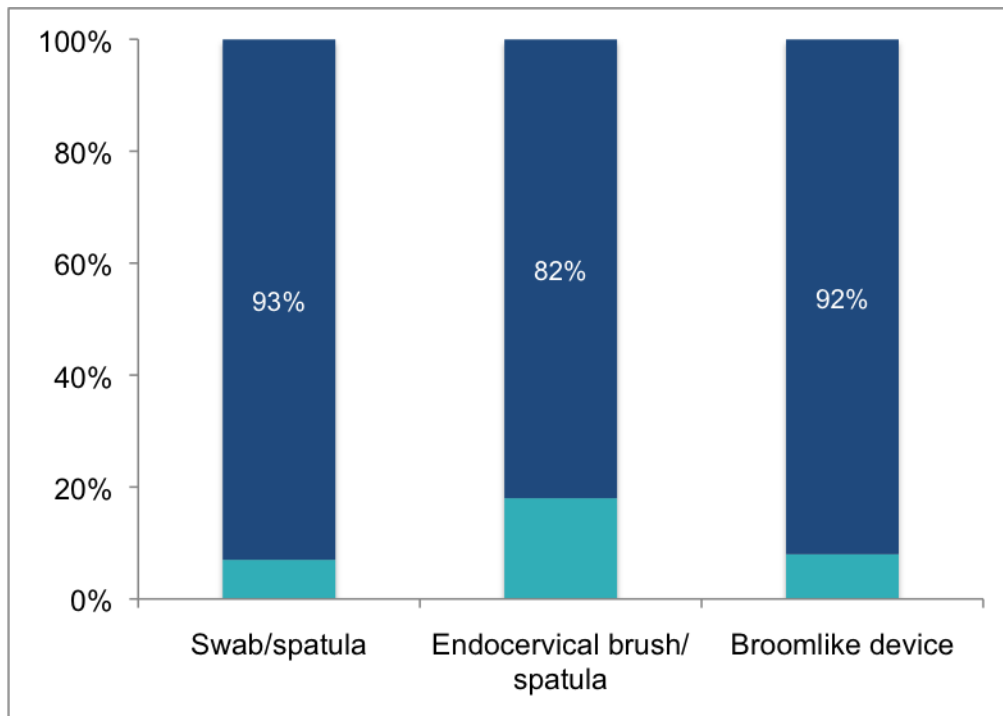
2.3. Κυτταρολογία υγρής φάσεως

Η κυτταρολογία υγρής φάσεως επιτρέπει τη συλλογή κυττάρων σε ειδικό υγρό και στη συνέχεια την αυτοματοποιημένη επεξεργασία του δείγματος. Το υπόλοιπο δείγμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να πραγματοποιηθούν άλλες συμπληρωματικές εξετάσεις, όπως για τον ιό HPV, ανοσοχημική χρώση για το βιοδείκτη p16 ή ακόμη και τεστ για σεξουαλικά μεταδιδόμενα νοσήματα, όπως χλαμύδια και γονόρροια.

Η αποτελεσματικότητα της κυτταρολογίας του τραχήλου βασίζεται στην υπόθεση ότι κάθε προ-νεοπλασματική ή νεοπλασματική αλλοίωση είναι δυνατόν να ανιχνευθεί με το Παπ-τεστ. Αυτό προϋποθέτει ότι ένας σημαντικός αριθμός κυττάρων μεταφέρονται στο πλακίδιο. Ο Hutchinson και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι με τη συμβατική κυτταρολογική μέθοδο συλλέγονται 600.000-1.200.000 τραχηλικά επιθηλιακά κύτταρα, αλλά λιγότερα από 20% των

κυττάρων θα μεταφερθούν στο πλακίδιο (Εικόνα 2.1) (Hutchinson *et al* 1999). Η αδυναμία μεταφοράς της πλειονότητας των επιθηλιακών κυττάρων στο πλακίδιο εξηγεί τον υψηλό αριθμό των ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων. Επιπλέον, η προετοιμασία του Παπ-τεστ και η μεταφορά του δείγματος στο πλακίδιο εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό από τον διενεργούντα τη λήψη του δείγματος, αλλά και από άλλες παραμέτρους, όπως επιμόλυνση του δείγματος από φλεγμονώδη κύτταρα και ερυθρά αιμοσφαίρια. Μελέτες έδειξαν ότι περισσότερα από 15% των Παπ-τεστ είναι περιορισμένης διαγνωστικής αξίας, λόγω της παρουσίας στοιχείων αίματος ή φλεγμονωδών κυττάρων που επικαλύπτουν τα επιθηλιακά κύτταρα (Bishop *et al* 1998; Hutchinson *et al* 1999).

Εικόνα 2.1 Λάθη συλλογής και παρασκευής



2.4. Μέθοδοι ανίχνευσης του ιού HPV

Είναι ευρέως αποδεκτό ότι λοίμωξη από τον ιό HPV είναι απαραίτητη, αλλά όχι και η μοναδική προϋπόθεση, για την ανάπτυξη τραχηλικών ενδοεπιθηλιακών αλλοιώσεων (CIN) και καρκίνου του τραχήλου της μήτρας (Munoz *et al* 1992; Schiffman *et al* 1993; Walboomers *et al* 1999). Παρόλο που τραχηλική λοίμωξη από HPV και πρώιμες κυτταρολογικές αλλαγές είναι πολύ συχνές, ειδικά σε σεξουαλικά δραστήριες γυναίκες νεαρής ηλικίας, υψηλού βαθμού προκαρκινικές αλλοιώσεις και καρκίνος του τραχήλου είναι σχετικά σπάνια και εμφανίζονται σε πιο προχωρημένες ηλικίες.

Υπάρχουν περισσότεροι από 70 HPV υπότυποι, από τους οποίους οι 20 προκαλούν λοίμωξη του τραχήλου της μήτρας. Οι υπότυποι που συνδέονται με την ανάπτυξη καρκίνου του τραχήλου ανήκουν στην κατηγορία υψηλού κινδύνου (HR-HPV) και είναι οι εξής: 16,18,31,33,35,39,45,51,52,56, και 58, ενώ οι υπότυποι 6,11,42,43, και 44, προκαλούν καρκίνο του τραχήλου πολύ σπάνια και ανήκουν στην κατηγορία χαμηλού κινδύνου (LR-HPV). Η πλειονότητα των λοιμώξεων από HPV μεταδίδεται μέσω σεξουαλικής επαφής. Ο εντοπισμός τους είναι δυνατός μόνο παροδικά, καθώς μέσω ανοσολογικών μηχανισμών γίνονται λανθάνουσες. Δεν είναι γνωστό αν η λοίμωξη από τον ιό προκαλεί ανοσία ενάντια σε επαναλοίμωξη με τον ίδιο ή άλλους HPV υποτύπους. Είναι όμως ξεκάθαρο ότι, ακόμη και για τους υποτύπους που ανήκουν στην ομάδα υψηλού κινδύνου, η λοίμωξη προκαλεί

ελαφρές αλλά παροδικές κυτταρολογικές αλλοιώσεις που σπανίως θα οδηγήσουν σε υψηλού βαθμού αλλοιώσεις ή διηθητικό καρκίνο.

2.4.1. Αρχές του τεστ για τον ιό HPV

Η ανίχνευση του HPV DNA σε δείγματα από τον τράχηλο της μήτρας αποτελεί τη βάση του προγράμματος ΜΠΕ για HPV λοίμωξη. Το HPV DNA απαντά συχνότερα στις ηλικίες από 15 έως 25 ετών, ταυτόχρονα με την έναρξη των σεξουαλικών επαφών. Ο επιπολασμός του ιού σε αυτή την ηλικία, σε σεξουαλικά δραστήριες νέες γυναίκες, είναι μεταξύ 30% έως 40% (Melkert *et al* 1993), αλλά ελαττώνεται δραματικά με την ηλικία, σε τέτοιο βαθμό που φαίνεται ότι η παρουσία του HPV DNA μπορεί να θεωρηθεί δείκτης της απαρχής της σεξουαλικής δραστηριότητας (Schiffman *et al* 1993). Η κυτταρολογική έκφραση αυτών των λοιμώξεων χαρακτηρίζεται από ευρήματα όπως κοιλοκυττάρωση ή οριακή (borderline) κυτταρολογική ατυπία. Μία χαμηλού βαθμού πλακώδης ενδοεπιθηλιακή αλλοίωση (LSIL) μπορεί επίσης να συσχετίζεται με παροδική λοίμωξη από τον ιό. Αυτοί οι τρεις τύποι αλλοιώσεων απαντούν στο 2-6% των γυναικών που λαμβάνουν μέρος στο πρόγραμμα ΜΠΕ. Η ανίχνευσή τους εμφανίζει έξαρση στην ίδια ηλικία με την έξαρση της λοίμωξης από τον ιό HPV και μπορεί να είναι παρούσα μήνες μετά λοίμωξη από τον ιό (Schiffman *et al* 1993).

2.4.2. Φυσική ιστορία των χαμηλής κακοήθειας τραχηλικών αλλοιώσεων από τον ιό HPV

Η φυσική ιστορία των χαμηλής κακοήθειας τραχηλικών αλλοιώσεων από τον ιό HPV δείχνει ότι πολλές από αυτές υποστρέφουν, και μόνο ένα μικρό ποσοστό (~11%) εξελίσσεται σε υψηλότερου βαθμού αλλοιώσεις (CIN2+) (Ostor 1993). Αλλοιώσεις συμβατές με CIN2+ εμφανίζονται συνήθως σε γυναίκες 5 έως 10 χρόνια μεγαλύτερης ηλικίας από ότι αυτές με χαμηλού βαθμού αλλοιώσεις. Αυτό δείχνει ότι **χρόνια λοίμωξη με HR-HPV** είναι απαραίτητη για την εμφάνιση CIN2+ και απαντά σε λιγότερο από 1% των κυτταρολογικών δειγμάτων. Η εμφάνιση διηθητικού καρκίνου συμβαίνει 5 έως 15 χρόνια αργότερα, από ότι οι υψηλού βαθμού προ-καρκινικές αλλοιώσεις, απόδειξη ότι απαιτείται ένα διάστημα αρκετών χρόνων για την εξέλιξη μίας υψηλού βαθμού αλλοίωσης σε καρκίνο. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι στο 80-90% των καρκίνων του τραχήλου είναι δυνατό να ανιχνεύσουμε HR-HPV DNA (Schiffman *et al* 1993). Ο Mansell και οι συνεργάτες του (Mansell *et al* 1994; Solomon *et al* 2001) επέδειξαν ότι 67% των CIN2+ που παρουσιάζονται σε γυναίκες που εμφανίζονται με μέτριες κυτταρολογικές αλλοιώσεις, μπορούν να ανιχνευθούν με εντοπισμό HPV DNA μόνο των τεσσάρων τύπων 16,18,31 και 33.

Ο Van den Brule συνοψισε τις εξής αρχές (Van den Brule *et al* 1991):

- 1) Όλα τα δείγματα από καρκίνο του τραχήλου είναι θετικά για HPV DNA. Οι πιο συχνά απαντώμενοι υπότυποι είναι οι 16 και 18
- 2) Παρατηρείται αυξημένη συχνότητα της εμφάνισης του HPV σε κυτταρικά δείγματα από ασθενείς με CIN, της τάξεως του 60 έως 80%.
- 3) Σε γυναίκες ηλικίας μεταξύ 35 και 55 ετών με αρνητική κυτταρολογία, ο επιπολασμός του HPV ήταν 4.5%

Σε γυναίκες ηλικίας 18-35 ετών με αρνητική κυτταρολογία, ο επιπολασμός του HPV εξαρτάται από την ηλικία και ελαττώνεται από 20% σε γυναίκες ηλικίας 20-25 σε 4.5% σε γυναίκες ηλικίας 30-35 ετών. Όσον αφορά στους HR-HPV υποτύπους 16,18,31 και 33, ο επιπολασμός ελαττώνεται από 7% σε 1.5% στις αντίστοιχες ηλικιακές ομάδες.
- 4) Πρώιμα ευρήματα από προοπτικές μελέτες γυναικών με παθολογική κυτταρολογία που παρακολούθηθηκαν για 36 μήνες με κολποσκόπηση και κυτταρολογία έδειξε ότι μόνο οι γυναίκες με HR-HPV ανέπτυξαν CIN3 (10% σε 24 μήνες).
- 5) Γυναίκες με παθολογική κυτταρολογία και λοίμωξη από LR-HPV ή αυτές που ήταν αρνητικές για HPV δεν εμφάνισαν υψηλότερου βαθμού αλλοιώσεις στους 24 μήνες παρακολούθησης.

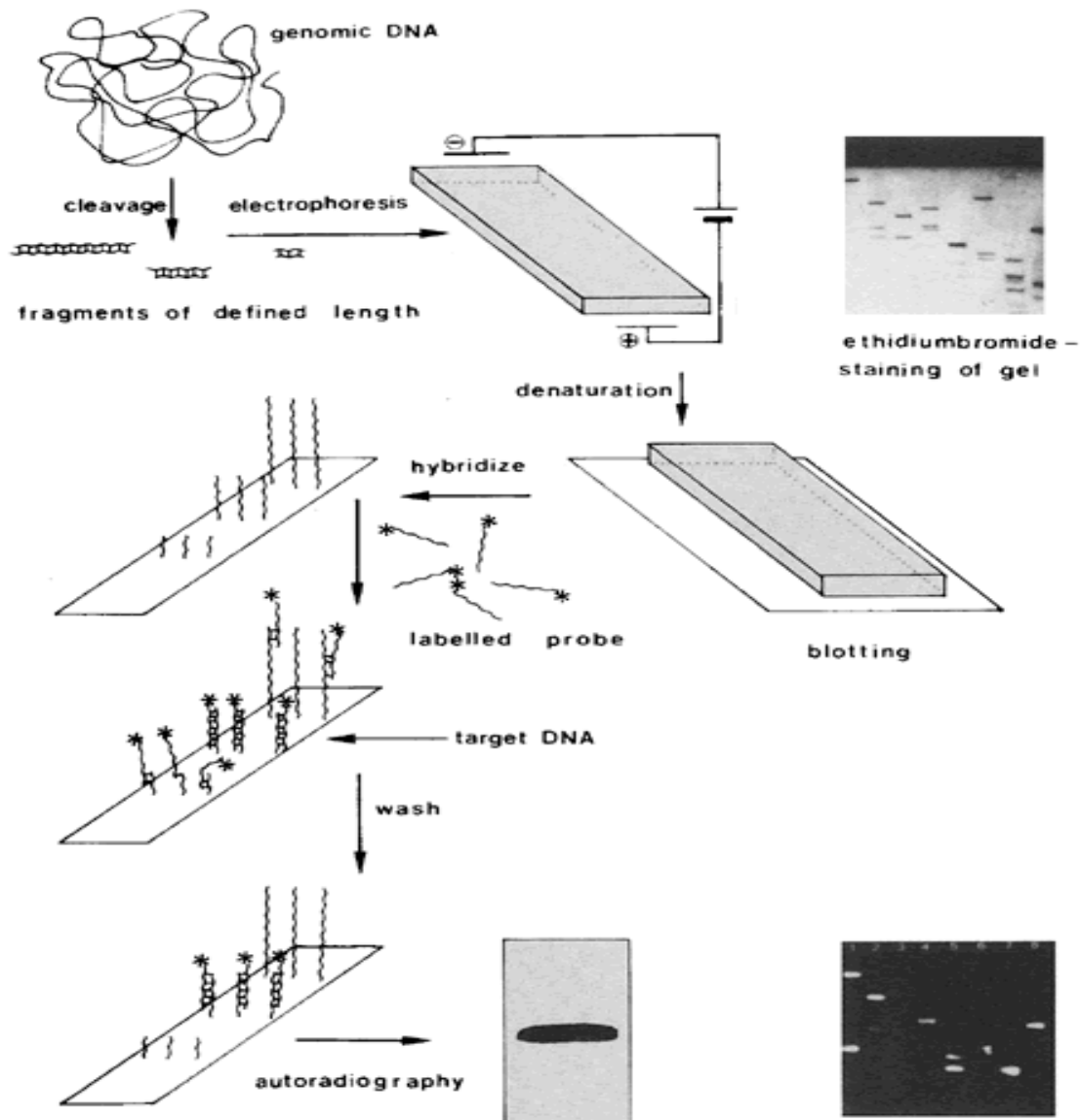
2.4.3. Μέθοδοι ανίχνευσης του ιού HPV

Οι μέθοδοι ανίχνευσης του ιού HPV έχουν εξελιγθεί τα τελευταία δέκα χρόνια. Οι πιο σημαντικές περιγράφονται στη συνέχεια.

i. Southern Blotting

Η τεχνική **Southern Blotting** οφείλει την ονομασία της στον επιστήμονα που την ανέπτυξε. Είναι μία μοριακή τεχνική που αποτελεί τη βάση για άλλες παρόμοιες τεχνικές. Συνίσταται στην εξαγωγή ικανής ποσότητας DNA από τα κύτταρα, ανάλυσή του και αντίδρασή του με ένζυμα που προκαλούν λύση του DNA σε τμήματα, ανάλογα με την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων. Στη συνέχεια το DNA καταμερίζεται με ηλεκτροφόρηση μέσω γέλης αγαρόζης, αποδιατάσσεται σε μονοκλωνικό DNA και μεταφέρεται σε ένα στερεό μέσο, συνήθως μέσω μίας νάιλον μεμβράνης. Η μεμβράνη εμπεριέχει ειδικές αλληλουχίες DNA με συμπληρωματικό μονοκλωνικό DNA ή RNA που είναι σεσημασμένα με ραδιενεργά μόρια. Κάτω από τις κατάλληλες συνθήκες κάθε αλληλουχία θα υποστεί υβριδισμό με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες DNA, έτσι ώστε όταν η μεμβράνη εκπλυθεί για την απομάκρυνση μη-υβριδοποιημένων μορίων, οι αλληλουχίες-στόχοι είναι δυνατό να ανιχνευθούν (Εικόνα 2.2). Αυτή η τεχνική έχει ευρέως χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση και τυποποίηση του HPV. Στα κατάλληλα χέρια έχει υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα αλλά απαιτεί μεγάλη ποσότητα DNA (5-10μg) που με τη σειρά του απαιτεί μεγάλο ιστικό δείγμα

εφάμιλλου μεγέθους με αυτό που αποκτάται από μία βιοψία. Επίσης, τα δείγματα που συλλέγονται στα πλαίσια του προγράμματος ΜΠΕ δεν περιέχουν ικανή ποσότητα DNA για την εφαρμογή αυτής της τεχνικής. Τέλος, η τεχνική Southern blotting είναι τεχνικά πολύπλοκη, απαιτεί χρόνο και δεν είναι δυνατό να αυτοματοποιηθεί. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να μη μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μέθοδος ΜΠΕ.



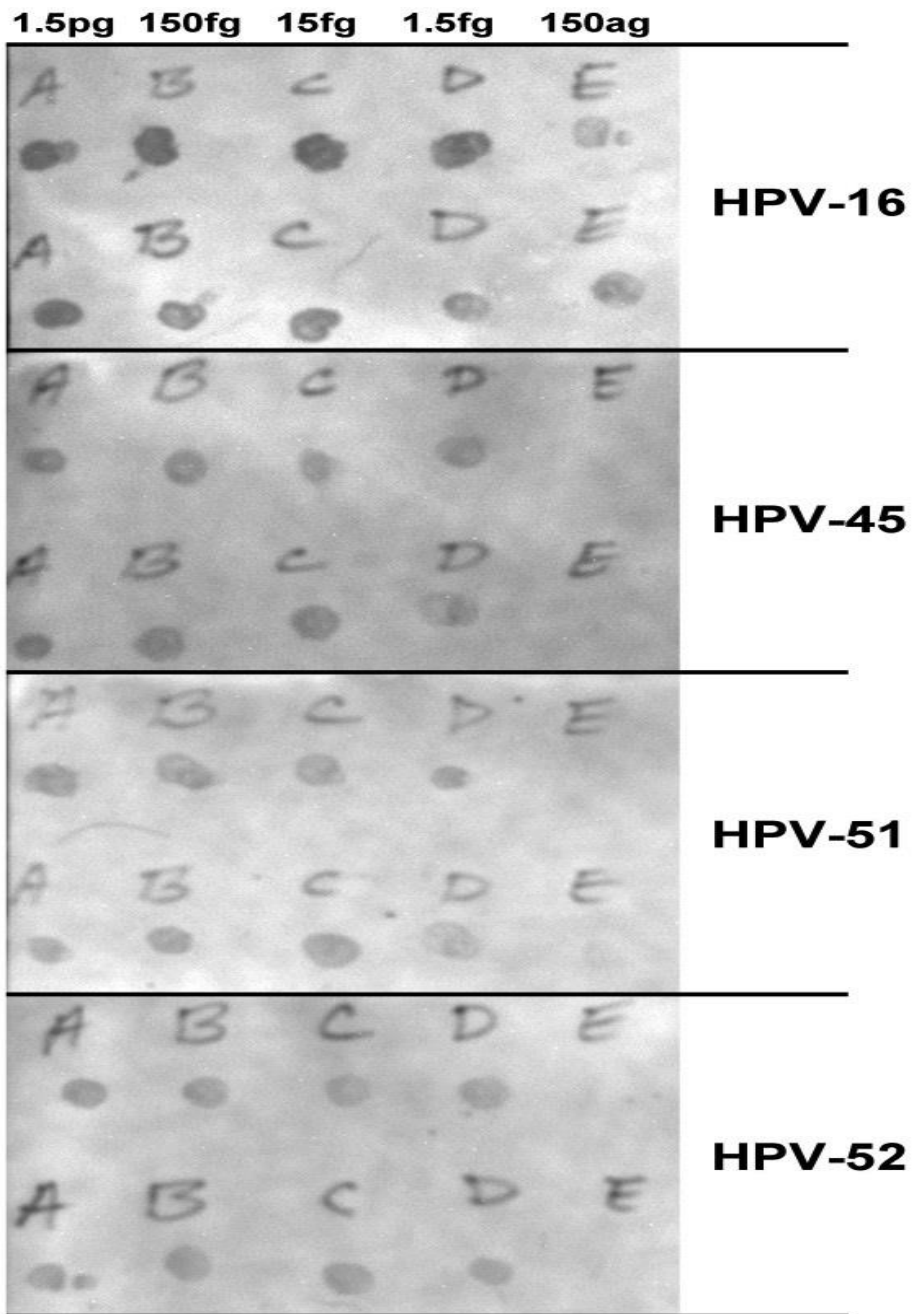
Εικόνα 2.2. Αρχές της τεχνικής Southern blot.

Κοπή του DNA με ειδικά περιοριστικά ένζυμα παράγει διάφορα τμήματα DNA συγκεκριμένου μήκους. Αυτά τα τμήματα μπορούν να διαχωρισθούν με ηλεκτροφόρηση σε γέλη αгарόζης ανάλογα με το μήκος τους. Τα μεγαλύτερα δείγματα μετακινούνται πιο αργά από τα μικρότερα δείγματα και παραμένουν πιο κοντά στο αρνητικό ηλεκτρόδιο. Οι διάφορες αλυσίδες του DNA είναι δυνατό να γίνουν ορατές με ειδική χρώση. Αφού μεταφερθεί σε ειδική μεμβράνη, το DNA χρησιμοποιείται για υβριδοποίηση. Μονο-κλωνικά μόρια DNA συνδέονται με συμπληρωματικές αλληλουχίες του μονοκλωνικού DNA οδηγώντας στο σχηματισμό υβριδίων. Οι μη συνδεδεμένες αλληλουχίες αφαιρούνται με ειδική έκπλυση. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα, μόνο το DNA-στόχος να παραμένει σεσημασμένο και να είναι δυνατό να ανιχνευθεί. (Schneider *et al* 1989)

ii. Dot Blot

Η τεχνική **Dot Blot**, μία απλοποίηση της μεθόδου Southern blotting, είναι μία τεχνική στην οποία το εξαγώμενο DNA δεν καταμερίζεται με ηλεκτροφόρηση. Αντίθετα, το DNA τοποθετείται σε ένα στερεό υλικό, και τότε υβριδοποιείται ακριβώς με τον ίδιο τρόπο όπως το Southern blot. Η μέθοδος είναι απλούστερη και πιο γρήγορη, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μεγάλο αριθμό δειγμάτων και είναι δυνατό να αυτοματοποιηθεί ως ένα βαθμό. Όμως, κατά τη μεταφορά του υλικού υπάρχει κίνδυνος να μείνει όλο το κυτταρικό DNA συγκεντρωμένο σε μία τελεία (Εικόνα 2.3). Αυτό μπορεί να δυσκολεύσει την αναγνώριση των ισχνών θετικών σημάτων και αυξάνει την πιθανότητα λάθους αποτελέσματος.

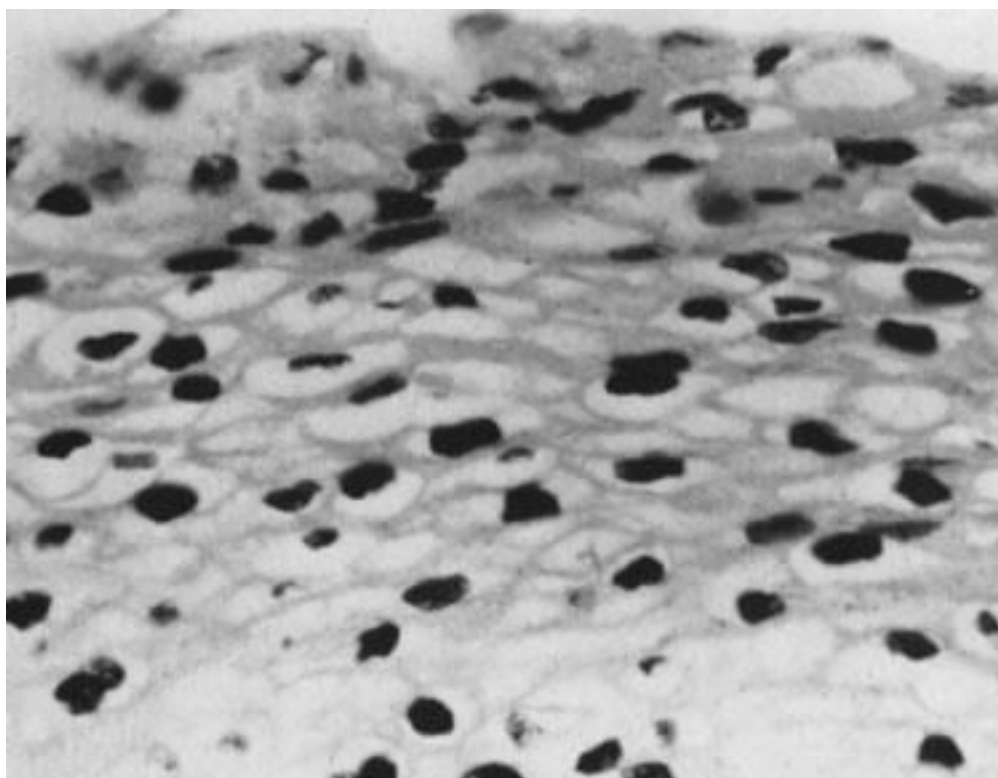
Δύο εμπορικά διαθέσιμα dot blot συστήματα που έχουν ευρέως μελετηθεί είναι το ViraPap και το ViraType (Life Technologies). Αυτή η τεχνική έχει χαμηλότερη ευαισθησία και ειδικότητα από ότι το Southern blotting, και επίσης απαιτεί μεγαλύτερη ποσότητα DNA, έτσι ώστε να μην είναι κατάλληλο για εφαρμογή σε πρόγραμμα ΜΠΕ.



Εικόνα 2.3 Dot blot ανίχνευση μίας πληθώρας HPV τύπων. (Evans *et al* 2005).

iii. *In situ* Υβριδοποίηση

Η τεχνική της *in situ* Υβριδοποίησης αποτελεί μία απλοποιημένη μορφή του Southern blotting. Τα κύτταρα τοποθετούνται απευθείας σε ένα στερεό υλικό το οποίο στη συνέχεια χρησιμοποιείται για καταμερισμό του DNA. Η τεχνική είναι απλή αλλά δίνει μόνο θετικό ή αρνητικό αποτέλεσμα και σαν αποτέλεσμα έχει περιορισμένες κλινικές εφαρμογές ως μέσο ΜΠΕ (Εικόνα 2.4).



Εικόνα 2.4 *In situ* υβριδοποίηση

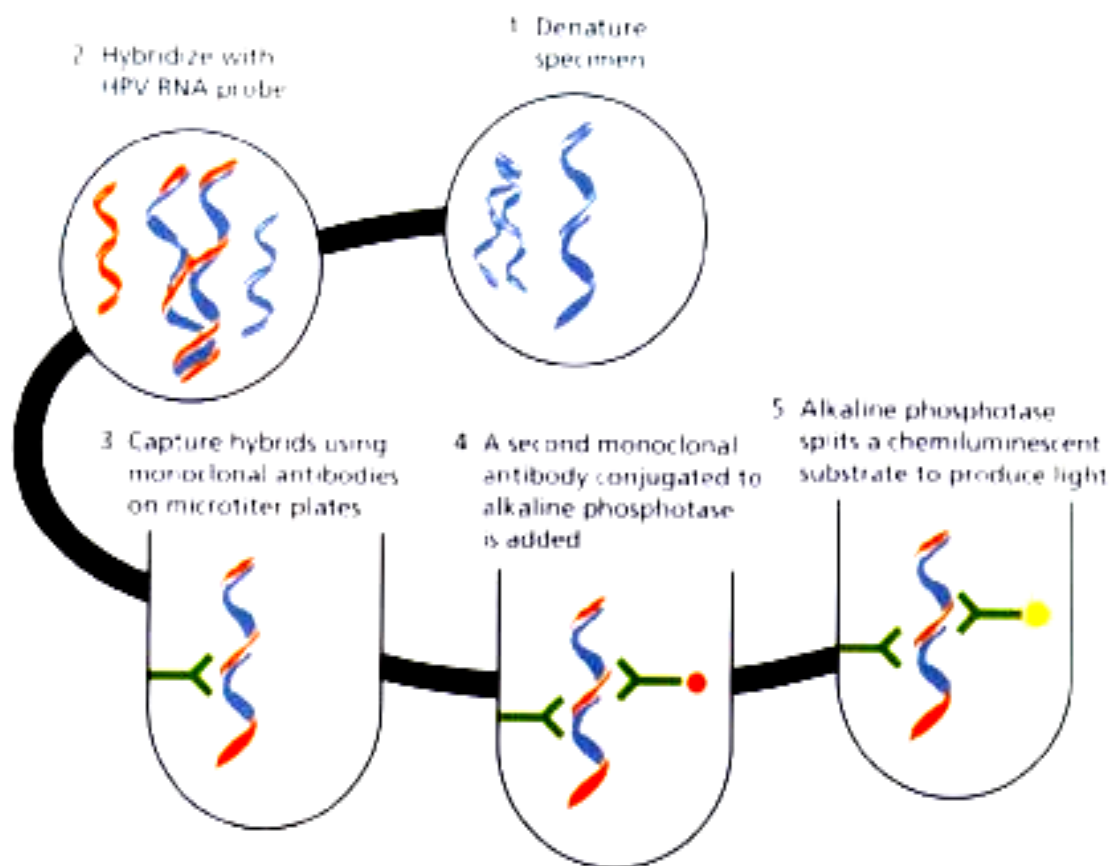
Τα επιφανειακά κυτταρικά στρώματα εμφανίζουν έντονη χρώση με ειδικά αντισώματα έναντι πρωτεϊνών των ιών HPV-16 και HPV-18.

iv. Hybrid Capture

Η τεχνική του Hybrid Capture χρησιμοποιεί ένα διάλυμα και όχι στερεό μέσο, παρόλο που οι βασικές αρχές χρησιμοποίησης συμπληρωματικών αλληλουχιών για την ανίχνευση της αλληλουχίας στόχου παραμένει η ίδια με τις προαναφερθείσες τεχνικές. Με αυτή την τεχνική, πραγματοποιείται εξαγωγή κυτταρικού DNA που επεξεργάζεται σε αλκαλικό διάλυμα και στη συνέχεια υβριδοποιείται με συμπληρωματικό RNA με στόχο την παραγωγή DNA-RNA υβριδικών μορίων. Όλη η διαδικασία λαμβάνει μέρος στην υγρή φάση και τα μόρια του υβριδοποιημένου DNA-RNA μεταφέρονται από το διάλυμα μέσω αντισωμάτων που επικαλύπτουν το τοίχωμα των δοχείων. Αυτά τα αντισώματα αναγνωρίζουν την τριδιάστατη δομή του υβριδικού DNA-RNA και δεν συνδέονται με διπλής έλικας DNA που αφαιρείται κατά την τελική έκπλυση. Η παρουσία των μορίων-στόχων ανιχνεύεται με την προσθήκη ειδικών αντισωμάτων, που στη συνέχεια αντιδρούν με ειδική ουσία για την παραγωγή φωτός που μετρείται με ειδικό όργανο (luminometer) (Εικόνα 2.5). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως «relative light units (RLUs)», που αποτελούν ένα μέτρο του φωτός που παράγεται από την αντίδραση (1.0 RLU αντιστοιχεί σε 1.0 pg/ml). Για την ανίχνευση του HPV, το πρώτης γενιάς Hybrid Capture (HC-I) μπορούσε να ανιχνεύσει ένα φάσμα χαμηλού και υψηλού κινδύνου HPV τύπους (χαμηλού κινδύνου τύποι 6,11,42,43,44: υψηλού κινδύνου τύποι 16,18,31,35,45,51,52, και 56), αλλά το τεστ είχε χαμηλή ευαισθησία και ειδικότητα.

Το HC-I έχει αντικατασταθεί από το τεστ δεύτερης γενιάς (HC-II), που επιτρέπει την ανίχνευση ενός ευρύτερου φάσματος HPV τύπων (χαμηλού κινδύνου

6,11,42,43,44 και 59; υψηλού κινδύνου 16,18,31,33,35,39,45,51,56,58,68), έχει δέκα φορές μεγαλύτερη ευαισθησία σε σχέση με τον προκατόχο του, και είναι εφάμιλλο της «Polymerase Chain Reaction (PCR)». Το τεστ μπορεί να ανιχνεύσει χαμηλού ή υψηλού κινδύνου υποτύπους και είναι δυνατή η αυτοματοποίησή του ώστε να εφαρμοσθεί σε προγράμματα ΜΠΕ.



Εικόνα 2.5 Αρχές του Hybrid Capture II (Digene Laboratories)

v. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR), βασίζεται στην *in vitro* αναπαραγωγή του DNA (Εικόνα 2.6). Ενας πλήρης κύκλος περιλαμβάνει επώαση των δειγμάτων σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες και γίνεται αυτόματα από ειδικά μηχανήματα, τους θερμοκυκλοποιητές (thermal cyclers). Σε μια τυπική αντίδραση, το δίκλωνο DNA αποδιατάσσεται με θέρμανση στους 95° C. Στη συνέχεια οι εκκινητές (primers) σε περίσσια προσδένονται με υβριδισμό στις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA εκμαγείου με ψύξη του δείγματος στους 50 – 60° C. Ακολουθεί επώαση στους 72° C για την επιμήκυνση των εκκινητών με τη βοήθεια θερμοάντοχης πολυμεράσης, παρουσία των τεσσάρων νουκλεοτιδίων.

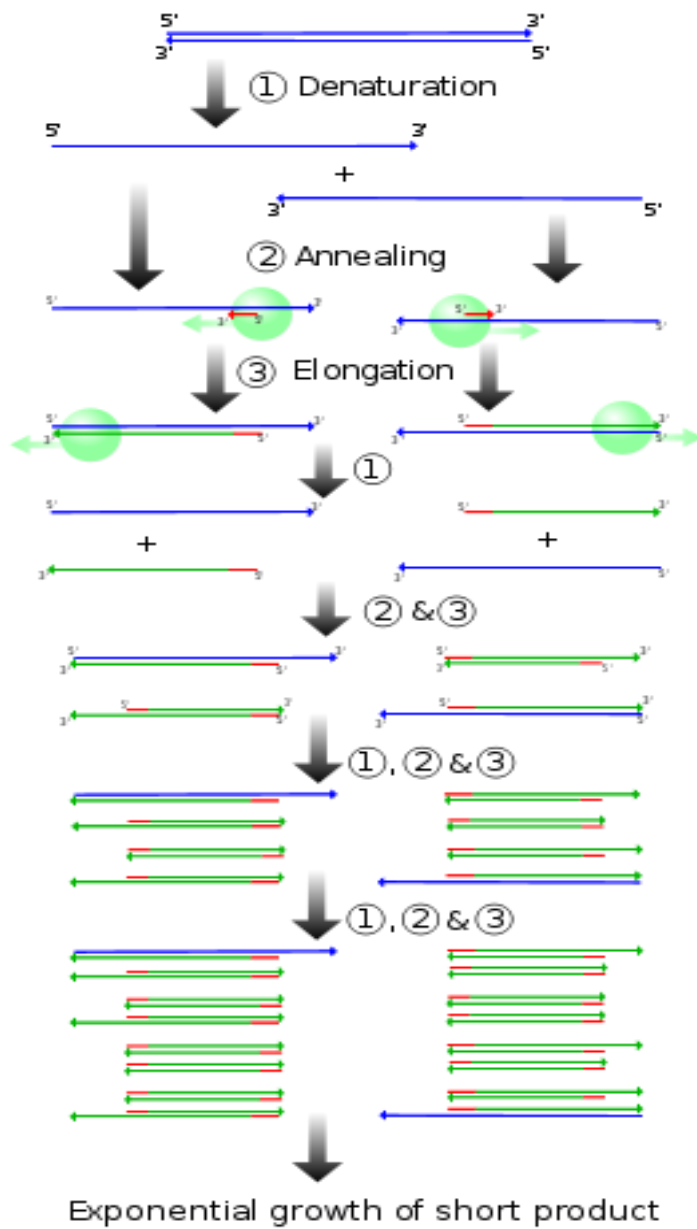
Καθώς η διαδικασία επαναλαμβάνεται, οι νεοσύστατοι κλώνοι με τη σειρά τους χρησιμοποιούνται ως εκμαγεία για την *in vitro* σύνθεση του DNA. Μετά από μερικούς κύκλους το προϊόν της αντίδρασης PCR είναι ένα τμήμα DNA το μέγεθος του οποίου αντιστοιχεί στην μεταξύ των δύο αρχικών εκκινητών απόσταση. Στη πράξη, 20 με 30 κύκλοι της αντίδρασης είναι αρκετοί για την αποτελεσματική ενίσχυση του DNA στόχου. Σε κάθε κύκλο, που διαρκεί περίπου πέντε λεπτά, η ποσότητα του DNA διπλασιάζεται. Η όλη διαδικασία κλωνοποίησης ενός DNA στόχου σε ένα *in vitro* σύστημα (χωρίς κύτταρα) διαρκεί μερικές ώρες, σε σχέση με τις μερικές μέρες που απαιτούνται για τις *in vivo* διαδικασίες κλωνοποίησης. Η ευαισθησία και ειδικότητα της τεχνικής PCR εξαρτάται κυρίως από το είδος των εκκινητών, το μέγεθος του προϊόντος της PCR, τις συνθήκες αντίδρασης και τη δράση της DNA πολυμεράσης, το φάσμα της αναπαραγωγής του HPV-DNA και την

ικανότητα της μεθόδου να ανιχνεύσει μία πληθώρα HPV τύπων. Λόγω της προσαρμοστικότητάς τους και της υψηλής ευαισθησίας τους, υπάρχουν πολλά συστήματα PCR. Τα συχνότερα χρησιμοποιούμενα συστήματα είναι αυτά ενάντια στο γονίδιο L1 και είναι δυνατό να ανιχνεύσουν όλους τους βλενογονιακούς τύπους του HPV (Bernard *et al* 1994). Ανάμεσά τους ξεχωρίζουν οι εκκινητές GP5/6 (de Roda *et al* 1995) και η μεταγενέστερη εκδοχή τους GP5+/6+ (Jacobs *et al* 1997), καθώς και οι MY09/11 (Manos *et al* 1989) και PGMY09/11 (Gravitt *et al* 1998). Μία άλλη ομάδα εκκινητών αναπαράγει μικρότερο μέγεθος (65 bp έναντι 150 bp για τους GP primers και 450 bp για το MY09/11) του L1 γονιδίου, αυξάνοντας την ευαισθησία της τεχνικής.

Μία άλλη τεχνική για το GP5+/6+ σύστημα, είναι ικανή να ανιχνεύσει 37 τύπους HPV επιτρέποντας τη χρήση της τόσο σε επιδημιολογικές μελέτες όσο και στην κλινική έρευνα (Jacobs *et al* 1997). Το τεστ αναπαράγει μικρότερο τμήμα και θεωρείται πιο ευαίσθητο από την PGMY09/11 PCR και έχει την ικανότητα ανίχνευσης περίπου 13% περισσότερου HPV σε τραχηλικά επιχρίσματα σε σχέση με τους PGMY primers (Iftner *et al* 2003). Επειδή αυτοί οι εκκινητές σχεδιάστηκαν για τους HR-HPV τύπους μόνο (HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 και 68), αυτά τα τεστ είναι παρόμοια του HC-II.

Παρόλο που η χρήση των μεθόδων PCR διακρίνεται από μέγιστη ευαισθησία ανίχνευσης HPV, δεν είναι ιδανική μέθοδος για ΜΠΕ. Η ιδανική μέθοδος ΜΠΕ είναι απαραίτητο να έχει ένα όριο, βασισμένο σε κλινικές μελέτες πέρα από το οποίο είναι δυνατό να ανιχνευθούν τα

κλινικά σημαντικά αποτελέσματα, πράγμα που δε χαρακτηρίζει τη μέθοδο PCR. Μέθοδοι με αυξημένη αναλυτική ευαισθησία είναι δύσκολο να συμβάλλουν σε βελτίωση του προγράμματος ΜΠΕ.



Εικόνα 2.6. Αρχές μεθόδου PCR

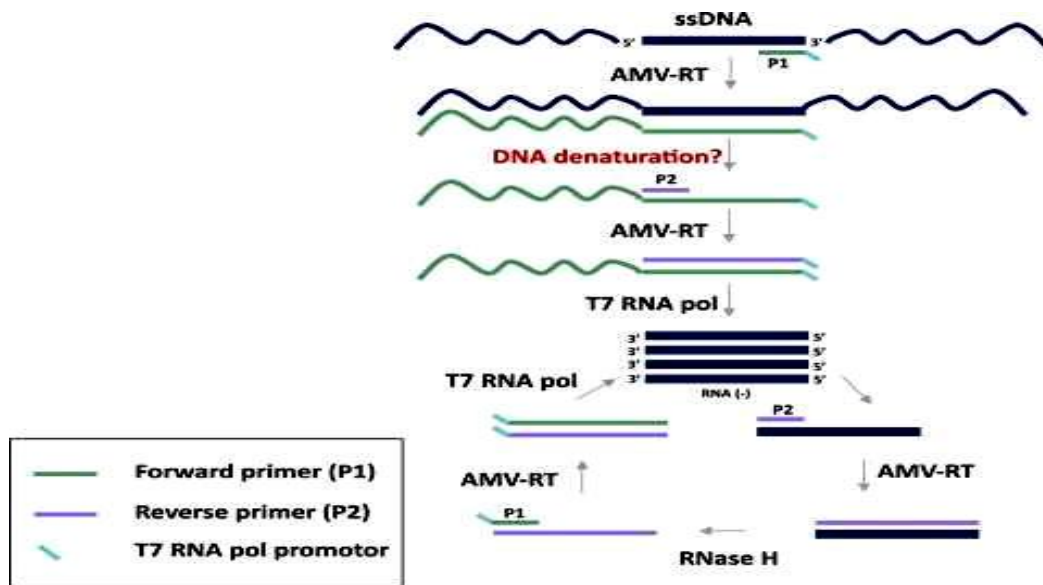
vi. Nucleic Acid Sequence-Based Amplification (NASBA)

Η χρήση των νέων βιολογικών δεικτών θεωρείται μία νέα μέθοδος ταξινόμησης του πληθυσμού θετικού για HPV σε υψηλού και χαμηλού κινδύνου για CIN2+. Μία προσπάθεια συνδυασμού του τεστ για HPV που μπορεί να ανιχνεύσει πέντε τύπους του ιού, με την ποσοτική αξιολόγηση των επιπέδων των ιϊκών E6/ E7 ογκογονιδίων, έχει προταθεί από τη Νορβηγική εταιρεία Norchip, χρησιμοποιώντας την τεχνολογία NASBA.

Το NASBA είναι ένα ευαίσθητο μεταγραφικό σύστημα για την αναπαραγωγή των νουκλεϊκών οξέων *in vitro*. Το κύριο προτέρημα αυτής της τεχνικής είναι το γεγονός ότι η αντίδραση πραγματοποιείται στους 41°C. Τα εξής ένζυμα παίρνουν μέρος σε αυτή την ομογενή ισόθερμη αντίδραση: avian myeloblastosis virus reverse transcriptase (RT), RNase H και T7 DNA εξαρτώμενη RNA polymerase (DdRp). Λόγω της ενσωμάτωσης της RT στη διαδικασία της αναπαραγωγής του DNA, η μέθοδος είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για ανάλυση mRNA. Το πρότυπο RNA επεξεργάζεται στους 65°C με ειδική αλληλουχία, που όχι μόνο είναι συμπληρωματική του, αλλά επίσης εμπεριέχει μία 5' αλληλουχία που αντιστοιχεί στον εκκινητή του T7 DdRp. Η RNA αλυσίδα του σχηματιζόμενου RNA-cDNA υβριδίου θα κατακερματισθεί στη συνέχεια από RNase ή μέσω της βοήθειας ενός αντίστροφου εκκινητήρα, συμπληρωματικού του cDNA. Διπλής έλικας DNA με μία T7 αλληλουχία, σχηματίζεται και μπορεί να χρησιμοποιηθεί από το T7 DdRp για τη σύνθεση νέων μορίων RNA που αντιστοιχούν στο πρότυπο RNA. Μετά αυτήν την αρχική αντίδραση, το NASBA

εισέρχεται στη διαδικασία αναπαραγωγής και το νέο RNA παράγεται μέσω της δράσης των RT και T7DdRp ενζύμων.

Η αντίδραση συνεχίζεται υπό ισόθερμες συνθήκες πετυχαίνοντας σημαντική αναπαραγωγή του στόχου (106 έως 109 φορές). Το παραγόμενο RNA ανιχνεύεται μέσω μοριακών σημάτων που είναι μονής αλυσίδας ολιγονουκλεοτίδια με δομή stem-loop. Ένα μέλος της αλυσίδας αποτελείται από μία φωσφορίζουσα χρωστική και το άλλο από μία μη-φωσφορίζουσα ουσία. Μετά την υβριδοποίηση του μοριακού τμήματος με τον ειδικό του στόχο, η μεταφορά ενέργειας διακόπτεται και πραγματοποιείται φωσφορισμός του οποίου η ένταση συσχετίζεται με τη συγκέντρωση του παραγόμενου μορίου. Δύο ολιγονουκλεοτιδικοί οδηγοί ειδικοί για το πρότυπο RNA καθορίζουν την ειδικότητα της αντίδρασης (Εικόνα 2.7). Αυτή η τεχνική χρησιμοποιείται από το τεστ Norchip PreTect HPV-Proof, που αποτελεί μέθοδο για την ανίχνευση του E6/E7 mRNA από τους HR-HPV τύπους 16, 18, 31, 33 και 45. Έχει προταθεί ότι βάσει των επιπέδων έκφρασης των ογκογονιδίων E6/E7, είναι δυνατό να πραγματοποιηθεί ταξινόμηση των γυναικών θετικών για HPV, παρόλο που δεν υπάρχει μεγάλος αριθμός σχετικών κλινικών μελετών (Sotlar *et al* 1998; Cuschieri *et al* 2004).



Εικόνα 2.7. Προτεινόμενος μηχανισμός της μεθόδου NASBA για amplification dsDNA. (Boulet *et al* 2010)

vii. Ανοσοχημεία

Η ύπαρξη ιϊκών πρωτεϊνών που επιτρέπουν την ταξινόμηση των γυναικών βάσει του κινδύνου ανάπτυξης υψηλού βαθμού προ-καρκινικών αλλοιώσεων, αποτελεί μία σημαντική εξέλιξη στην προσπάθεια έγκαιρης διάγνωσης και αντιμετώπισης του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Τεχνικές όπως η ανοσοχημεία παρέχουν σημαντικές πληροφορίες από κυτταρικά δείγματα. Τα κύτταρα χρωματίζονται με αντισώματα ενάντια σε ιϊκές ή κυτταρικές πρωτεΐνες που χρησιμεύουν ως δείκτες λοίμωξης από τον ιό HPV, ή ως ανεξάρτητοι παράγοντες εξέλιξης της νόσου. Μία πληθώρα παραμέτρων όπως η ειδικότητα

του κύριου και δευτερεύοντος αντισώματος, η εφαρμογή αντιστοίχων ανιχνευτικών συστημάτων, καθώς και η διαδικασία σταθεροποίησης του χρησιμοποιούμενου υλικού, επηρεάζουν την ειδικότητα και ευαισθησία της ανοσοχημείας. Είναι πολύ σημαντικό να διαπιστώσουμε αν υπάρχουν συγκεκριμένα ωφέλη ή και κίνδυνοι από την εφαρμογή των νέων βιοδεικτών, πριν χρησιμοποιηθούν ως μέσα ΜΠΕ. Προς το παρόν, λίγοι δείκτες φαίνεται να αξίζουν να μελετηθούν περαιτέρω.

a. Ιικές πρωτεΐνες

Η αναπαραγωγή του ιού του HPV και η ταυτόχρονη έκφραση της δομικής πρωτεΐνης L1 πραγματοποιείται μόνο στο χαμηλού βαθμού επιθηλιακές αλλοιώσεις. Σαν αποτέλεσμα, έχει προταθεί ότι η έλλειψη έκφρασης της L1 σε τραχηλικά δείγματα, μπορεί να αποτελεί δείκτη των αλλοιώσεων που αντιστοιχούν σε γυναίκες με CIN2+ ιστολογία (Melsheimer *et al* 2003). Επιπλέον, η διαπίστωση ότι οι δύο ιικές ογκοπρωτεΐνες E6 και E7 είναι απαραίτητες για τη νεοπλασματική μετατροπή των επιθηλιακών κυττάρων, καθώς και ότι οι πρωτεΐνες αυτές εκφράζονται σε HSIL και διηθητικές καρκινικές βλάβες, είναι πιθανό να αλλάξουν τον τρόπο που αξιολογούμε τη βαρύτητα των κυτταρικών αλλοιώσεων στο μέλλον.

b. Κυτταρικές πρωτεΐνες

Η λοίμωξη με HR-HPV υποτύπους υπερνικά τον κυτταρικό έλεγχο και προωθεί τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Ως αποτέλεσμα, έχει θεωρηθεί ότι η ανίχνευση δεικτών πολλαπλασιασμού σε κύτταρα από τραχηλικό επίχρισμα, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μία πρόσθετη μέθοδος για ΜΠΕ. Δείκτες όπως το Ki-67 και ειδικά πυρηνικά αντιγόνα δεν έχουν αποδειχθεί χρήσιμα ως ξεχωριστοί δείκτες (Keating *et al* 2001). Αντίστοιχα, πρωτεΐνες ρυθμιστικές της αναπαραγωγής του DNA, όπως οι πρωτεΐνες διατήρησης των μινοχρωμοσωμάτων και η CDC6, έχουν μόνο περιορισμένη κλινική χρησιμότητα γιατί δεν μπορούν να πραγματοποιήσουν διαχωρισμό μεταξύ δυσπλαστικών και φυσιολογικά πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων (Williams *et al* 1998; Freeman *et al* 1999). Ο βιολογικός δείκτης p16, η μελέτη του οποίου αποτελεί και το αντικείμενο αυτής της διατριβής, παρουσιάζεται ως ένας από τους πολλά υποσχόμενους δείκτες. Άλλα βιολογικά μόρια με πιθανές μελλοντικές εφαρμογές είναι το GATA-3 mRNA (ένας μεταφραστικός παράγοντας που ενεργοποιεί τον υποδοχέα των T κυττάρων) (Steenbergen *et al* 2002) και το TSLC1 (αναστολέας ογκογένεσης του καρκίνου του πνεύμονα; μέλος της IgG οικογένειας), που εμφανίζει μειωμένη έκφραση στα καρκινικά κύτταρα από τον τράχηλο της μήτρας. Σε αντίθεση, η έκφραση του C4.8, αυξάνεται στα νεοπλαστικά κύτταρα (Wollscheid *et al* 2002).

2.5. Κολποσκόπηση

Το 1958, ο Navratil έδειξε ότι η ταυτόχρονη χρήση της κυτταρολογίας και κολποσκόπησης έχει αυξημένη διαγνωστική αξία. Η χρήση οπτικών μέσων, ως συμπλήρωμα του Παπ-τεστ, έχει μελετηθεί ως μία προσπάθεια βελτίωσης της ευαισθησίας και ειδικότητας της μεθόδου. Η κολποσκόπηση δεν είναι μέθοδος ΜΠΕ, αλλά μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μέθοδος για την αξιολόγηση των μορφολογικών χαρακτηριστικών του τραχηλικού επιθηλίου σε γυναίκες με παθολογική κυτταρολογία.

Μία άλλη τεχνική είναι αυτή της χαρτογράφησης του τραχήλου και απαιτεί λήψη φωτογραφίας από τον τράχηλο μετά την τοποθέτηση 5% οξικού οξέος, αποφεύγοντας τη χρήση ακριβών κολποσκοπικών μηχανημάτων ή ειδικευμένων κολποσκόπων. Ένας ειδικός είναι δυνατό να αξιολογήσει 100-200 εικόνες σε 1 ώρα. Παρόλο που αυτή η τεχνική φαίνεται να είναι πιο ευαίσθητη από την κυτταρολογία, δεν είναι ιδανική για υιοθέτηση ως πρόγραμμα ΜΠΕ, λόγω του υψηλού βαθμού των ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων.

Κεφάλαιο 3

ΠΡΩΤΕΪΝΗ p16

3.1. Εισαγωγή

Οι πολυκυττάριοι οργανισμοί προστατεύονται από την καρκινογένεση μέσω της ικανότητας ανάπτυξης ομοιοστατικών μηχανισμών έναντι σε βλαβερά ερεθίσματα. Όταν μη αναστρέψιμοι νεοπλασματικοί παράγοντες είναι παρόντες, αυτοί οι μηχανισμοί άμυνας επιτρέπουν στο κύτταρο να ακολουθήσει δρόμους διαφορετικούς από αυτόν του ανεξέλεγκτου πολλαπλασιασμού, όπως η απόπτωση ή ο γηρασμός (senescence) (Leonart *et al* 2009).

Ο γηρασμός αναφέρεται στη διαδικασία εκείνη κατά την οποία, καθώς τα κύτταρα «ωριμάζουν», σταματούν να διαιρούνται λόγω σμίκρυνσης των τελομερών τους. Γηρασμός όμως μπορεί να επέλθει και πρόωρα από ορισμένα ογκογονίδια που εμπλέκονται στην καρκινογένεση ή ογκοκατασταλτικά γονίδια, όπως το p53 και η pRb (πρωτεΐνη ρετινοβλαστώματος) που ρυθμίζουν και την απόπτωση. Ο γηρασμός είναι μια εξελικτικά συντηρημένη διεργασία που διαφέρει από την απόπτωση ως προς το ότι δεν οδηγεί στην απαλοιφή δυσλειτουργικών ή επιβλαβών κυττάρων αλλά απλά σταματά τη διαίρεσή τους.

Ενώ η απόπτωση συμβάλει σε απώλεια ιστού και μπορεί να προκαλέσει νέο κύμα κυτταρικού πολλαπλασιασμού, ο κυτταρικός γηρασμός επιτρέπει στα κύτταρα να παραμείνουν ανέπαφα και μεταβολικά δρώντα, παρόλο που δεν είναι ικανά να διαιρεθούν

περαιτέρω. Η ογκογένεση ξεκινά όταν τα κύτταρα υπερνικούν τους προαναφερθέντες ενδογενείς μηχανισμούς άμυνας.

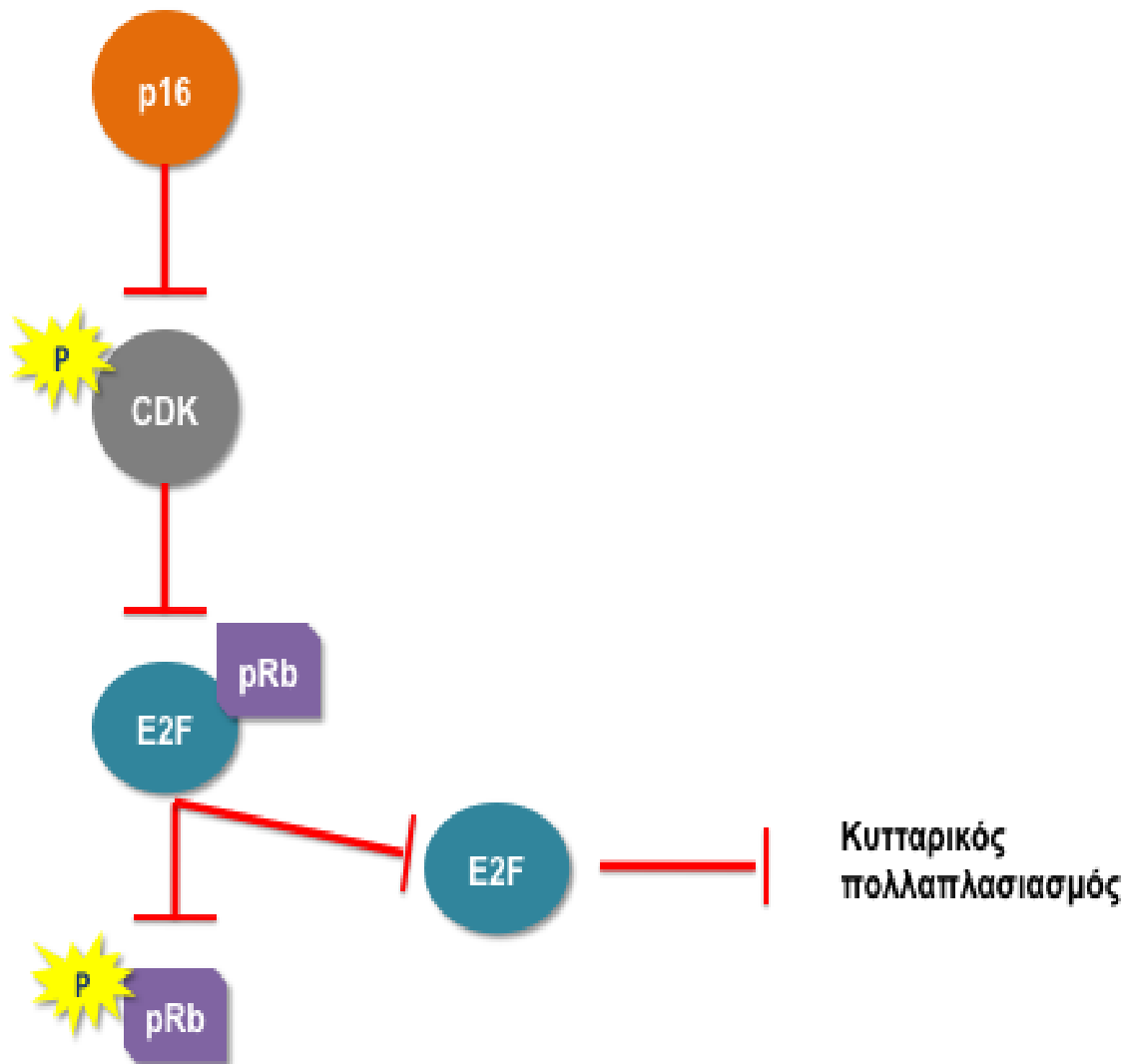
Αρκετά γονίδια που δρουν κατασταλτικά ενάντια στον καρκίνο συμμετέχουν στους μηχανισμούς που καθορίζουν την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου. Ένα από αυτά τα γονίδια είναι το p16 (Alcorta *et al* 1996). Η έκφραση του p16 έχει μελετηθεί σε μία πληθώρα καρκίνων με διαφορετικά κάθε φορά αποτελέσματα, από καταστολή (Brambilla *et al* 1999; Schneider-Stock *et al* 2005; Ayhan *et al* 2010), έως υπερέκφραση του βιοδείκτη (Milde-Langosch *et al* 2001; Armes *et al* 2005; Zhao *et al* 2006; Angiero *et al* 2008; Buajeeb *et al* 2009).

3.2. p16 και κυτταρικός κύκλος

Το p16 θεωρείται το πιο αντιπροσωπευτικό μέλος της INK4 οικογένειας των αναστολέων της Cyclin-Dependent-Kinase (CDK) και κωδικοποιείται από ένα γονίδιο που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 9p21 του INK4a/ARF επιτόπου. Η παραγόμενη πρωτεΐνη δρα ενάντια στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων συμμετέχοντας στον κύκλο της πρωτεΐνης pRb (Serrano *et al* 2007). Το p16 συμμετέχει στη ρύθμιση της κυτταρικής λειτουργίας, αναστέλοντας τη μετάβαση από τη G1 στην S φάση του κυτταρικού κύκλου.

3.2.1. p16 και CDK

Το p16 συνδέεται με την CDK4/6 αναστέλοντας τον σχηματισμό του συμπλέγματος της cyclin D–CDK4/6 και τη μέσω CDK4/6 προκαλούμενης φωσφορυλίωση των μελών της οικογένειας Rb. Φυσιολογικά, η ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα E2F προκαλείται μέσω φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης Rb. Η έκφραση του p16 διατηρεί τα μέλη της οικογένειας της Rb σε μία **υπο-φωσφορυλιωμένη (ενεργή)** κατάσταση η οποία προωθεί τη σύνδεση με τον E2F1 παράγοντα και σταματά τον κυτταρικό κύκλο στη G1 φάση (Serrano *et al* 1997). Αυτή η ερμηνεία της λειτουργία του δείκτη αποτελεί μια απλοποιημένη εκδοχή του ευρύτερου ρόλου του p16, καθώς πολλές πτυχές του τρόπου δράσης του είναι ακόμη άγνωστες (Εικόνα 3.1).



Εικόνα 3.1 Φυσιολογικός κυτταρικός κύκλος

Το p16 είναι αναστολέας της CDK. Οδηγεί σε αναστολή της φωσφορυλίωσης της pRb και της απελευθέρωσης του E2F μεταγραφικού παράγοντα με αποτέλεσμα ο κυτταρικός κύκλος να σταματά στην G1 φάση.

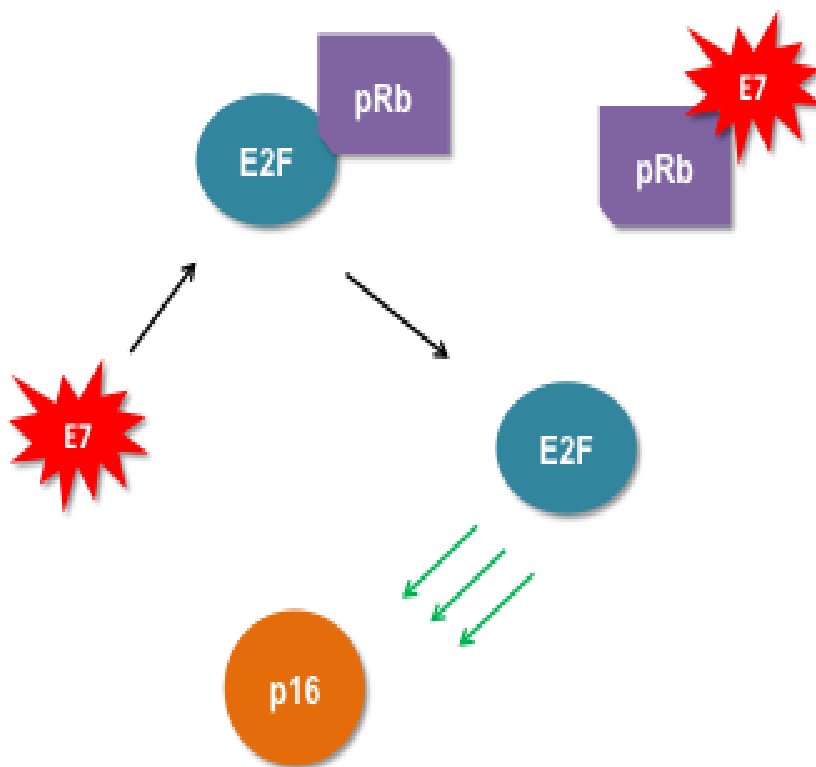
Ανασταλτική δράση 

3.2.2. p16 και HPV

Ο ρόλος του ιού των ανθρωπίνων θηλωμάτων (HPV) στη παθολογία του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας έχει μελετηθεί ευρέως στη βιβλιογραφία. Λοίμωξη από HPV έχει ανιχνευθεί στην πλειοψηφία των προκαρκινικών και καρκινικών αλλοιώσεων του τραχήλου της μήτρας. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι υπάρχουν περισσότεροι από 70 υπότυποι του ιού, από τους οποίους περίπου 20 είναι υπεύθυνοι για προσβολή του τραχηλικού επιθηλίου (Lorincz *et al* 1992; zur Hausen *et al* 1996). Επιπροσθέτως, κάθε HPV υπότυπος συσχετίζεται με διαφορετικού βαθμού κίνδυνο νεοπλασματικής εξαλλαγής των τραχηλικών επιθηλιακών κυττάρων με αποτέλεσμα οι HPV υπότυποι να έχουν ταξινομηθεί σε δύο κατηγορίες: υψηλού και χαμηλού κινδύνου (Matsukura *et al* 1995). Οι **υπότυποι 16 και 18** θεωρούνται υψηλού κινδύνου και έχουν τη μέγιστη κλινική σημασία. Αντιθέτως, οι **υπότυποι 6 και 11** θεωρούνται χαμηλού κινδύνου, αφού στην πλειονότητα των περιπτώσεων συσχετίζονται με καλοήθεις υπερπλαστικές αλλοιώσεις, όπως οξυτενή κονδυλώματα και χαμηλού βαθμού πλακώδεις ενδο-επιθηλιακές αλλοιώσεις (Lorincz *et al* 1992; Matsukura *et al* 1995; zur Hausen *et al* 1996).

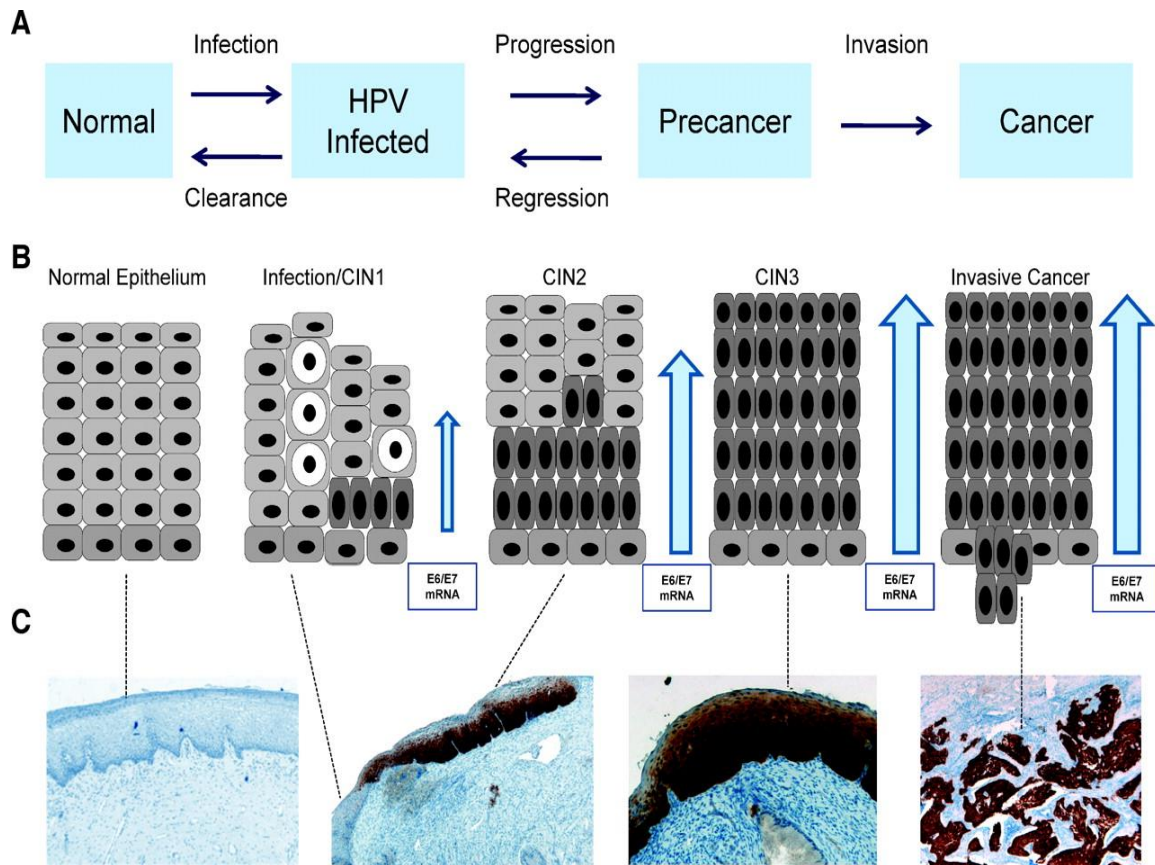
Κατά την προσβολή του κυττάρου από τον ιό του HPV, ο κύκλος του p16- pRb είναι συχνά ο στόχος των ιικών ογκοπρωτεϊνών, λόγω του καίριου ρόλου του ενάντια στον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Οι περισσότεροι ιοί που αλληλεπιδρούν με τον κύκλο p16–pRb, όπως ο HPV, προκαλούν υπερέκφραση του p16 λόγω άμεσης ή έμμεσης αδρανοποίησης

της pRb (Martin *et al* 2000). Η παρουσία των ογκοπρωτεϊνών E6 και E7 του HPV είναι ο μοριακός μηχανισμός που εξηγεί την υπερέκφραση του βιοδείκτη. Είναι ευρέως γνωστό ότι η καρκινογένεση από τον ιό του HPV προϋποθέτει χρόνια λοίμωξη και ένα κυτταρικό περιβάλλον που επιτρέπει την υπερέκφραση των ιικών ογκογονιδίων E6 and E7 (αρχικά στα κύτταρα της βασικής στιβάδος και στη συνέχεια σε όλο το τραχηλικό επιθήλιο). Οι πρωτεΐνες E6 και E7 είναι απαραίτητες για την αναπαραγωγή του ιού και εκφράζονται κατά τον παραγωγικό “φυσιολογικό” κυτταρικό κύκλο, όπου είναι κάτω από στενό έλεγχο. Η πρωτεΐνη Rb αδρανοποιείται μέσω της αλληλεπίδρασης με την high-risk HPV ογκοπρωτεΐνη E7 (Huang *et al* 1993), και η ογκοπρωτεΐνη E6 προκαλεί καταστροφή της ογκογένεσης p53. Η αδρανοποίηση της πρωτεΐνης Rb απελευθερώνει p16 μέσω αρνητικού ανατροφοδοτικού μηχανισμού (feedback), προκαλώντας μία παράδοξη αύξηση στα επίπεδα της πρωτεΐνης που προσπαθεί να αναστείλει την ανεξέλεγκτη κυτταρική αναπαραγωγή (Reuschenbach *et al* 2008) (Εικόνα 3.2). Σαν αποτέλεσμα, το p16 υπερεκφράζεται και συγκεντρώνεται στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα του κυττάρου. Υπερέκφραση του p16 εμφανίζεται σε έναν μεγάλο αριθμό τραχηλικών προ-καρκινικών και καρκινικών βλαβών ενώ σε φυσιολογικούς ιστούς είναι σπάνια. Ο δείκτης συγκεντρώνεται σε τέτοια επίπεδα που είναι δυνατό να ανιχνευθεί με ανοσοχημικές χρώσεις (Εικόνα 3.3).



Εικόνα 3.2 Λοίμωξη από HR-HPV

Σε παραγωγική λοίμωξη από τον ιό HPV, οι ιικές ογκοπρωτεΐνες E6 και E7 διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της απόπτωσης και ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου. Η E7 αναστέλει την σύνδεση της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος (pRb) με τον E2F μεταφραστικό παράγοντα. Τα κύτταρα υπερεκφράζουν p16 αλλά, αφού ο E2F δεν απελευθερώνεται μέσω CDK4/6 αλλά μέσω E7, η το p16 υπερεκφράζεται.



Εικόνα 3.3

Διάγραμμα των σταδίων που οδηγούν στον καρκίνο του τραχήλου μέσω λοίμωξης από HPV.

A. Λειτουργικό μοντέλο εξέλιξης της νόσου

B. Μορφολογική περιγραφή της εξέλιξης (τα βέλη αντιστοιχούν στην έκφραση των HPV ογκογονιδίων)

C. Χρώση p16 αντιπροσωπευτική των μορφολογικών και λειτουργικών σταδίων της ασθένειας

Cuschieri *et al* 2008

3.3. p16 και κυτταρικός γηρασμός

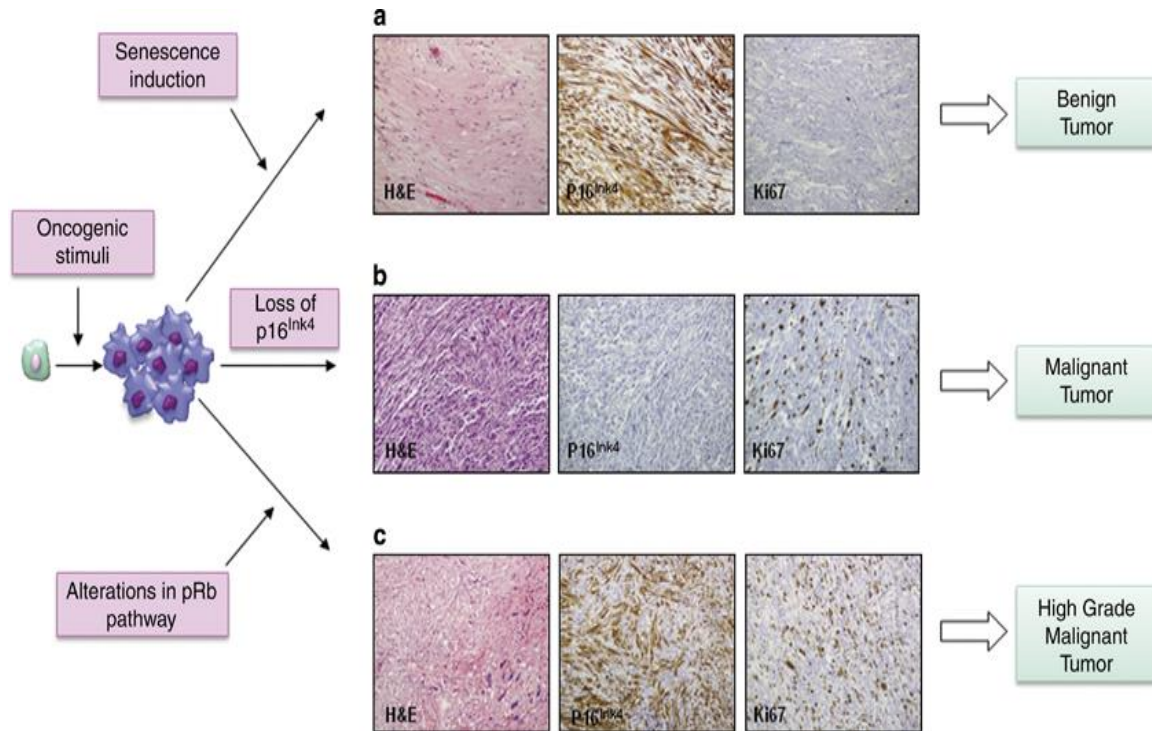
Ο κυτταρικός γηρασμός είναι ένας μηχανισμός καταστολής του κυτταρικού κύκλου που προστατεύει τα κύτταρα από τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό και από διάφορες μορφές στρες (Hayflick *et al* 1965; Bingham *et al* 2000). Η διαδικασία αυτή είναι δυνατό να ενεργοποιηθεί κατά τη γήρανση των κυττάρων (μεταγραφική senescence) ή σαν απάντηση σε διάφορα ερεθίσματα, όπως βλάβη του DNA, οξειδωτικό στρες ή έκθεση σε φάρμακα (πρώιμη senescence) (Passague *et al* 2000; Krishnamurthy *et al* 2004; Ruas *et al* 2007). Τα κύτταρα που είναι σε αυτή τη φάση επιδεικνύουν έναν αριθμό μεταβολών, όπως διογκωμένη εμφάνιση, έκφραση της δραστηριότητας της β-γαλακτοσιδάσης και άλλων ενζύμων (Gil *et al* 2006). Η διαδικασία του γηρασμού φαίνεται να διέπεται, τουλάχιστον μερικώς, από τους ίδιους μοριακούς μηχανισμούς, όπως ο κύκλος του p16/Rb και p14ARF/p53 (Schmitt *et al* 2002). Η έκφραση του p16 αυξάνεται με την ηλικία στο ανθρώπινο δέρμα και νεφρό (Zindy *et al* 1997; Ressler *et al* 2006), δείχνοντας το πόσο σημαντικός είναι ο ρόλος του ως αναστολέας ογκογένεσης στη διαδικασία γήρανσης (Hara *et al* 1996; Zhu *et al* 2002). Επιπροσθέτως, υπερέκφραση του p16 έχει αναφερθεί και σε ινοβλάστες σε φάση γηρασμού (Wu *et al* 2007), ως απάντηση στο οξειδωτικό στρες (Quevedo *et al* 2007), DNA βλάβη και αλλαγές στη δομή της χρωματίνης (Canepa *et al* 2007; Fordyce *et al* 2010). Η πλήρης όμως κατανόηση των σημάτων που προκαλούν κυτταρικό γηρασμό δεν έχει διερευνηθεί πλήρως. Το p16 φαίνεται να είναι ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες αυτής της διαδικασίας, αλλά χρειαζόμαστε περισσότερες πληροφορίες για να προσδιορίσουμε τον ακριβή ρόλο του.

3.4. Άλλες πιθανές εφαρμογές του p16

Πέρα από το ρόλο του p16 στη φυσιολογική διαδικασία του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και γηρασμού, η πρωτεΐνη έχει επίσης συνδεθεί με άλλες διεργασίες όπως αυτή της απόπτωσης και της αγγειογένεσης (Εικόνα 3.4). Το p16 μπορεί να οδηγήσει σε ελάττωση των επιπέδων του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF) σε διάφορες κυτταρικές σειρές και σε αναστολή της αγγειογένεσης σε κακοήγη γλοιώματα (Harada *et al* 1999). Αρκετές πειραματικές μελέτες υποστηρίζουν ότι η δράση του p16 συσχετίζεται με το ανβ3 στο μελάνωμα (Fahraeus *et al* 1999), στα γλοιώματα (Adachi *et al* 2001) και στον καρκίνο του παγκρέατος (Marchan *et al* 2010), συνδέοντας το p16 με αυτή την γνωστή πρωτεΐνη της αγγειογένεσης. *In vitro* μελέτες έχουν δείξει ότι το p16 παίζει ρόλο στη ρύθμιση της επέκτασης των γλοιωμάτων (Chintala *et al* 1997) και στην αναστολή της επέκτασης των κυτάρων από τον καρκίνο του μαστού (Li *et al* 2010). Υπερέκφραση του p16 έχει παρατηρηθεί σε διηθητικό καρκίνο του ενδομητρίου, του παχέος εντέρου και σε βασικοκυτταρικό καρκίνωμα (Jung *et al* 2001; Natarajan *et al* 2003; Horree *et al* 2007).

Επίσης, το p16 φαίνεται να συμβάλει σημαντικά στη διαδικασία αιματοποίησης, προωθώντας τη διαφοροποίηση και απόπτωση των ευθυροειδικών κυτάρων, επηρεάζοντας τη δράση του bcl-x και NF-kB (Minami *et al* 2003). Ο ρόλος του p16 ως αναστολέα της ογκογένεσης με πολλές προ-νεοπλασματικές κυτταρικές ιδιότητες (πολλαπλασιασμός, διήθηση και αγγειογένεση) είναι πιθανός. Το γονίδιο φαίνεται να

διαδραματίζει πολύ πιο σημαντικό και πολύπλοκο ρόλο από ότι είχε αρχικά θεωρηθεί.



Εικόνα 3.4 Σχηματική παρουσίαση της μοριακής βιολογίας της υπερέκφρασης του p16 στην ογκογένεση. Η υπερέκφραση του p16 σε καλοήγη νεοπλάσματα σχετίζεται με κυτταρικό γηρασμό.

- Σβάννωμα με υπερέκφραση του p16 και πολύ χαμηλή έκφραση του Ki67
- Κακοήθης όγκος των περιφερικών νεύρων με αρνητική χρώση για p16 και αυξημένη έκφραση του Ki67.
- Υπερέκφραση του p16 σε χαμηλής διαφοροποίησης νεοπλάσματα σχετίζεται με επίδραση στη δράση της Rb σε μία περίπτωση σαρκώματος

Romagosa *et al.* 2011

3.5. Συμπεράσματα

Κατά τη διάρκεια της 2006 συνεδρίας του Ευρωπαϊκού Ερευνητικού Οργανισμού ενάντια στις λοιμώξεις και νεοπλασματικές αλλοιώσεις του αναπαραγωγικού συστήματος, μία από τις ερευνητικές ομάδες ασχολήθηκε με τις κλινικές εφαρμογές των βιοδεικτών που συσχετίζονται με λοίμωξη από HPV. Οι ερευνητές πρότειναν τις εξής τέσσερις κατευθυντήριες γραμμές:

1. Ανίχνευση του mRNA των E6 και E7 HPV ογκοπρωτεϊνών
2. Ανίχνευση των αλλαγών στον τρόπο μεθυλίωσης των διαφόρων γονιδίων
3. Ανίχνευση των αλλαγών του γονιδίου του ιού (π.χ. κατά την ενσωμάτωση στο γονιδίωμα του κυττάρου)
4. Ανίχνευση κυτταρικών πρωτεϊνών που υπερεκφράζονται σε κύτταρα προσβεβλημένα από τον ιό HPV π.χ. πρωτεΐνη p16.

Ενώ οι μέθοδοι 2 και 3 είναι κυρίως πειραματικές, για το p16 υπάρχουν κλινικές μελέτες. Το p16 έχει μοναδικές ιδιότητες που το κάνουν έναν πολλά υποσχόμενο βιολογικό δείκτη για τις νεοπλασίες τις σχετιζόμενες με τον ιό HPV. Η έκφρασή του είναι άμεσα συνδεδεμένη με την δράση των HPV ογκογονιδίων. Η συνεχής έκφραση της E7 είναι απαραίτητη προϋπόθεση για τη διατήρηση του κακοήθου φαινοτύπου σε νεοπλασίες σχετιζόμενες με λοίμωξη από HPV (Romagosa *et al* 2011). Ένα από τα προτερήματα του p16 είναι ότι η έκφρασή του

φαίνεται να μην εξαρτάται από τον τύπο του ιού. Επίσης, σε αντίθεση με άλλους καρκινικούς δείκτες όπως το Ki67 ή MYC, το p16 συσχετίζεται κυρίως με τη διαδικασία γηρασμού του κυτταρικού κύκλου (Lam *et al* 2008) και δεν εκφράζεται σε φυσιολογικά κύτταρα της βασικής στιβάδος ή σε άλλα κύτταρα με φυσιολογική αναπαραγωγική ικανότητα.

Κεφάλαιο 4

ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Ο κατανόηση της παθογένεσης του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας και η εν τω βάθει μελέτη του κύκλου της λοίμωξης από τον ιό του HPV, οδήγησε στη μελέτη μίας πληθώρας βιολογικών δεικτών σχετιζόμενων με τα διάφορα στάδια της HPV λοιμώξεως και τραχηλικής καρκινογένεσης. Η πλειοψηφία αυτών των δεικτών προτείνονται από τις εκάστοτε εταιρείες ως πανάκεια για την επίλυση των προβλημάτων που σχετίζονται με την αντιμετώπιση των χαμηλού ή αμφιβόλου σημαντικότητας κυτταρικών δειγμάτων από τον τράχηλο της μήτρας. Επιπροσθέτως, κάποιοι από αυτούς τους δείκτες εμφανίζεται να έχουν και προγνωστική αξία μετά την θεραπεία υψηλού βαθμού κυτταρολογικών αλλοιώσεων, αφού μπορούν να αναδείξουν τις γυναίκες εκείνες που είναι δυνατό να υποτροπιάσουν.

Ο βιολογικός δείκτης p16 αποτελεί ένα σημαντικό ρυθμιστή του κυτταρικού κύκλου. Ο δείκτης εκφράζεται κατά τον φυσιολογικό κυτταρικό κύκλο, αλλά καθώς καταναλώνεται αμέσως ανιχνεύεται μονό σε μικρό ποσοστό. Αντιθέτως, μελέτες έχουν δείξει ότι η χρόνια λοίμωξη από HR-HPV μπορεί να οδηγήσει σε σημαντική υπερέκφραση του δείκτη p16, με αποτέλεσμα να είναι δυνατή η ανίχνευσή του με ανοσοχημική χρώση, τόσο σε κυτταρολογικά όσο και σε ιστολογικά δείγματα.

Ο στόχος αυτής της διατριβής είναι η κριτική και εν τω βάθει αξιολόγηση των μελετών που εξέτασαν τον ρόλο του p16 τόσο σε κυτταρολογικά όσο και σε ιστολογικά δείγματα από τον

τράχηλο της μήτρας. Συγκεκριμένα, θέλησαμε να εκτιμήσουμε τις πρακτικές παραμέτρους της χρήσης του δείκτη και την ύπαρξη πιθανών δυσκολιών στην ερμηνεία του αποτελέσματος της ανοσοχημικής χρώσης. Επίσης, θελήσαμε να διερευνήσουμε τις πιθανές κλινικές εφαρμογές του δείκτη, όπως τον ρόλο του ως μέσο μαζικού πληθυσμιακού ελέγχου, ως μέσο διαλογής των χαμηλού βαθμού πλακωδών ενδοεπιθηλιακών αλλοιώσεων, που αντιστοιχούν σε γυναίκες με CIN2+ ιστολογία, και ως μέσο παρακολούθησης των γυναικών μετά από θεραπεία. Τέλος, αφού λάβαμε υπόψη τα συμπεράσματα από τη συστηματική ανασκόπηση και μετα-ανάλυση της βιβλιογραφίας, πραγματοποιήσαμε μία προοπτική διαγνωστική μελέτη. Η μελέτη αυτή αποτέλεσε μία επιπλέον προσπάθεια αξιολόγησης του ρόλου του p16 από μόνου του, ή σε συνδυασμό με το HPV τεστ, στη διαδικασία διαλογής των χαμηλού βαθμού πλακωδών ενδοεπιθηλιακών αλλοιώσεων που αντιστοιχούν σε CIN2+ ιστολογία.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A. Συστηματική επισκόπηση
της βιβλιογραφίας και μετα-ανάλυση

Κεφάλαιο 1

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Η παρούσα εργασία είναι μια προσπάθεια συλλογής, συστηματικής παρουσίασης και ανάλυσης όλων των μελετών που αξιολόγησαν τις πιθανές κλινικές εφαρμογές του βιολογικού δείκτη p16 σε κυτταρολογικά και ιστολογικά δείγματα από τον τράχηλο της μήτρας.

1.1. Στρατηγική αναζήτησης της βιβλιογραφίας

Η ανασκόπηση της βιβλιογραφίας πραγματοποιήθηκε στις βιβλιογραφικές βάσεις δεδομένων MEDLINE and EMBASE, αναζητώντας μελέτες που δημοσιεύθηκαν την περίοδο από τον Ιανουάριο του 1998 έως τον Σεπτέμβριο του 2007.

Η στρατηγική αναζήτησης συμπεριέλαβε όρους, όπως: “cancer”, “dysplasia”, “SIL”, “CIN”, “cervix”, “p16”, “p16INK4a “ και “cyclin-dependent kinase”. Πιο αναλυτικά, η στρατηγική αναζήτησης είχε την ακόλουθη μορφή: (cancer OR carcinoma OR malignancy OR malign* OR neoplasia OR neoplas*) AND (cervix OR cervical OR cerv*) AND (p16INK4a OR p16) AND (CIN or SIL) AND (cyclin-dependent kinase).

Οι βιβλιογραφικές αναφορές των άρθρων που ανεκλήθησαν, καθώς και τα πρακτικά σχετικών ανακοινώσεων σε συνέδρια, εξετάσθησαν σχολαστικά για την ανεύρεση μελετών που πιθανώς να είχαν διαλάβει της αρχικής αναζήτησης. Επιπλέον, πραγματοποιήσαμε διασταυρούμενες ανασκοπήσεις και αναζητήσεις στη μηχανή αναζήτησης MEDLINE, με βάση τα ονόματα των ερευνητών που εμφανίζονταν ως κύριοι συγγραφείς σε τουλάχιστον μία από τις κατάλληλες υποψήφιες μελέτες. Τέλος, ανατρέξαμε, ξεφυλλίσαμε και μελετήσαμε τους τόμους όλων των τελευταίων δεκαετιών των περιοδικών εκείνων που δημοσίευσαν το μεγαλύτερο αριθμό ηλεκτρονικά αναγνωρίσιμων κλινικών δοκιμών.

1. 2. Κριτήρια επιλογής μελετών

Όλες οι προοπτικές ή αναδρομικές μελέτες που αξιολόγησαν το ρόλο της p16 ανοσοκυτταρολογίας σε κυτταρολογικά επιχρίσματα (Παπ-τεστ) ή σε δείγματα κυτταρολογίας υγρής φάσεως (LBC), καθώς και το ρόλο της ανοσοϊστοχημείας για το p16 σε ιστολογικά δείγματα από προκαρκινικές ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις του τραχήλου της μήτρας, συμπεριελήφθησαν σε αυτή την μελέτη. Συμπεριελάβαμε όλες τις μελέτες δημοσιευμένες στην Αγγλική, τη Γερμανική, τη Γαλλική ή την Ιταλική γλώσσα και μόνο μελέτες που ήταν δημοσιευμένες σε περιοδικά. Τέλος, οι μελέτες συμπεριελήφθησαν στην συστηματική επισκόπηση της βιβλιογραφίας ανεξάρτητα από το αντιδραστήριο που χρησιμοποιήθηκε για τη χρώση με το p16 και τον τρόπο ερμηνείας της χρώσης (Πίνακας 1).

Πίνακας 1 Κριτήρια Επιλογής Μελετών

- Προοπτικές ή αναδρομικές μελέτες
 - Προκαρκινικές αλλοιώσεις του τραχήλου της μήτρας
 - Ανοσοκυτταρολογία για p16
 - Ανοσοϊστοχημεία για p16
 - Παπ-τεστ ή LBC
 - Γλώσσα δημοσίευσης: Αγγλική, Γαλλική, Γερμανική ή Ιταλική
 - Μελέτες δημοσιευμένες σε περιοδικά
-

1.3. Κριτήρια αποκλεισμού μελετών

Αποκλείσαμε όλες τις μελέτες που αξιολόγησαν το ρόλο της p16 ανοσοκυτταρολογίας ή ανοσοϊστοχημείας σε κυτταρολογικά επιχρίσματα (τεστ-Παπ), σε δείγματα LBC ή σε δείγματα βιοψιών από αδενικές ή καρκινικές αλλοιώσεις των κυττάρων του τραχήλου της μήτρας. Οι μελέτες εξετάστηκαν εξονυχιστικά για να ανευρεθεί πιθανή πανομοιότυπη αναπαραγωγή και επικάλυψη. Σε περιπτώσεις αναφορών που αναπαράγονταν ή επικαλύπτονταν με καταχωρημένες μελέτες, διατηρήθηκε μόνο η κύρια αναφορά με τις περισσότερες πληροφορίες. Μελέτες δημοσιευμένες σε γλώσσες εκτός της Αγγλικής, της Γερμανικής, της Γαλλικής ή της Ιταλικής απεκλείστησαν. Επίσης, αποκλείσαμε τις περιλήψεις συνεδρίων (Πίνακας 2).

Πίνακας 2 Κριτήρια Αποκλεισμού Μελετών

- Αλλοιώσεις αδενικών κυττάρων από τον τράχηλο της μήτρας
 - Καρκινικές αλλοιώσεις των κυττάρων από τον τράχηλο της μήτρας
 - Γλώσσα δημοσίευσης εκτός Αγγλική, Γαλλική, Γερμανική, Ιταλική
 - Περιλήψεις συνεδρίων
-

1.4. Εξαγωγή δεδομένων

Οι πληροφορίες από κάθε μελέτη κατεγράφησαν σε περιγραφικούς πίνακες. Συγκεκριμένα, κατεγράψαμε τον πρώτο συγγραφέα, το έτος και το περιοδικό δημοσίευσης της κάθε μελέτης, τη χώρα προέλευσης των ερευνητών, το μέγεθος του δείγματος και το βαθμό κυτταρικής ή ιστολογικής αλλοίωσης που αξιολογήθηκε. Για τις μελέτες που αξιολόγησαν το ρόλο του p16 σε κυτταρολογικά δείγματα, κατεγράψαμε τη μέθοδο συλλογής του κυτταρολογικού δείγματος (Παπ-τεστ ή LBC), τον τύπο του αντιδραστηρίου που χρησιμοποιήθηκε για τον βιοδείκτη, καθώς και τον τρόπο ερμηνείας της χρώσης από τον κάθε ερευνητή. Αντίστοιχα, για τις μελέτες που αξιολόγησαν τον δείκτη σε ιστολογικά παρασκευάσματα, καταγράψαμε το βαθμό της ιστολογικής αλλοίωσης που αξιολογήθηκε, το αντιδραστήριο που χρησιμοποιήθηκε καθώς και το τρόπο ερμηνείας της χρώσης. Επίσης κατεγράψαμε τις κυτταρολογικές μελέτες που επαλήθευσαν τα αποτελέσματά τους με λήψη ιστολογικού υλικού από τις γυναίκες που εμφάνισαν συγκεκριμένα κυτταρολογικά ευρήματα.

Τέλος εξετάσαμε αν οι ερευνητές χρησιμοποίησαν και άλλους δείκτες έκφρασης της λοίμωξης από τον ιό του HPV, παράλληλα με το p16 (Πίνακας 3).

Για να εξασφαλίσουμε ομοιογένεια στην παρουσίαση των δεδομένων από τις κυτταρολογικές μελέτες, υιοθετήσαμε την προτεινόμενη από την 1991 Bethesda (TBS91) ταξινόμηση η οποία προτιμήθηκε και από την πλειοψηφία των μελετητών (18 έναντι 9).

Θεωρήσαμε τις εξής τρεις κυτταρολογικές ομάδες:

- Άτυπα επιθηλιακά κύτταρα απροσδιορίστου σημασίας (ASCUS)
- Χαμηλού βαθμού πλακώδεις ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις (LSIL)
- Υψηλού βαθμού πλακώδεις ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις (HSIL).

Οι κυτταρολογικές αλλοιώσεις που παρουσιάστηκαν σε διαφορετική από τις προαναφερθείσες μορφή, μετατράπηκαν σε TBS91 χρησιμοποιώντας κοινά αποδεκτούς μετατρεπτικούς πίνακες (Herbert *et al* 2007).

Για την περιγραφή των ιστολογικών δειγμάτων υιοθετήσαμε την CIN ορολογία (Richard 1973).

Πίνακας 3 Εξαγωγή δεδομένων

- Πρώτος συγγραφέας
 - Έτος δημοσίευσης
 - Περιοδικό δημοσίευσης
 - Χώρα προέλευσης των ερευνητών
 - Μέγεθος του δείγματος
 - Βαθμός κυτταρολογικής αλλοίωσης
 - Βαθμός ιστολογικής αλλοίωσης
 - Αντιδραστήριο για p16 χρώση
 - Ερμηνεία της χρώσης για p16
 - Ταυτόχρονη μελέτη άλλων δεικτών
 - Συσχέτιση κυτταρολογίας με ιστολογία
-

1.5. Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το στατιστικό σύστημα STATA (Stata Corp., College Station, Texas, US). Τυχαιοποιημένα μοντέλα (random effect models) υιοθετήθηκαν για να εξάγουν το συνολικό ποσοστό. Η ετερογένεια μεταξύ των μελετών αξιολογήθηκε με το Cochran's Q τεστ (Cochran 1954).

Συμπεριελάβαμε στη μετα-ανάλυση όλες τις μελέτες που αξιολόγησαν την χρήση της

ανοσοκυτταρολογίας για το p16, υιοθετώντας τα κριτήρια θετικής χρώσης για τον δείκτη τα προτεινόμενα από τον κάθε συγγραφέα. Όσον αφορά στις ιστολογικές μελέτες, συμπεριελάβαμε στη μετα-ανάλυση μόνο αυτές τις ερευνητικές προσπάθειες που υιοθέτησαν την ερμηνεία της χρώσης την προτεινόμενη από τον Klaes και τους συνεργάτες του (Klaes *et al* 2001) ή που ήταν δυνατόν να μετατραπούν στο προαναφερθέν σύστημα. Βάσει της ταξινόμησης κατά Klaes, η διάχυτη χρώση (>25% των κυττάρων χρωσμένων με p16) αποτέλεσε το κριτήριο θετικής χρώσης για τον δείκτη σε ιστολογικά δείγματα.

Κεφάλαιο 2

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

2.1. Αποτελέσματα αναζήτησης

Η ηλεκτρονική αναζήτηση της βιβλιογραφίας ανέδειξε 1254 περιλήψεις, οι οποίες μελετήθηκαν. Από αυτές, 584 θεωρήθηκαν σχετικές με την μελέτη και εξετάσθηκαν προσεκτικά. Ανακτήθηκαν 97 δυνητικά κατάλληλα άρθρα σε μορφή πλήρους κειμένου. Οι 61 αναφορές που θεωρήθηκαν κατάλληλες για περαιτέρω ανασκόπηση μελετήθηκαν αναλυτικά (Εικόνα 1).

2.1.1. Μη επιλεγμένες μελέτες

Αποκλείσαμε 36 μελέτες, οι οποίες δεν πληρούσαν τα κριτήρια επιλογής για ποικίλους λόγους. Υπήρξαν 6 μελέτες που αναπαράγονταν ή επικαλύπτονταν (Klaes *et al* 2002; Nieh *et al* 2003; Murphy *et al* 2005; Wang *et al* 2005; Bergeron *et al* 2006; Carozzi *et al* 2008), 9 που αναφέρονταν σε αδενικό ιστολογικό τύπο (Cameron *et al* 2002; Riethdorf *et al* 2002; Negri *et al* 2003; Murphy *et al* 2004; Nieh *et al* 2004; Tringler *et al* 2004; Chen *et al* 2005; Pavlakis *et al* 2006; Liang *et al* 2007) και σε 21

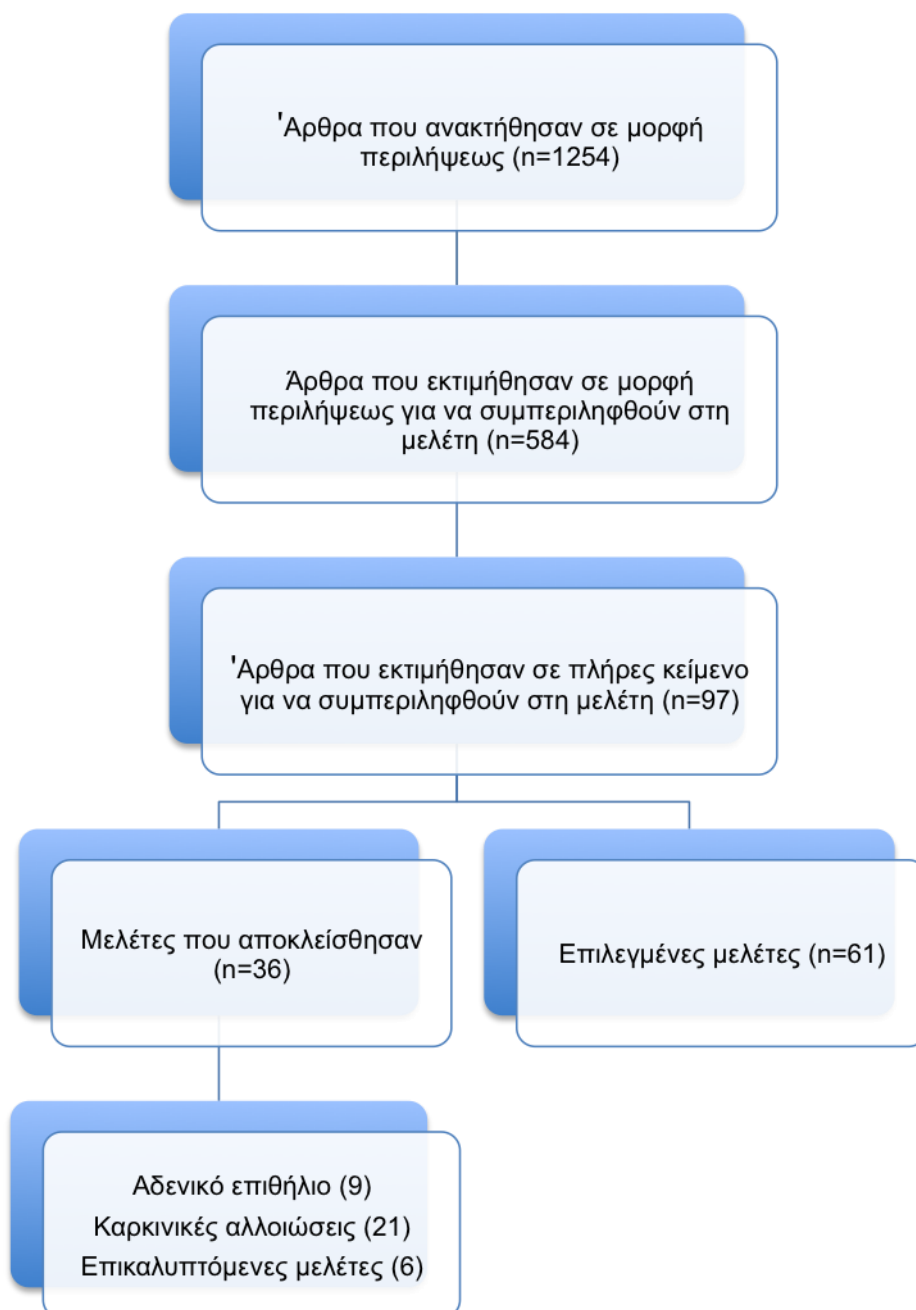
ο δείκτης p16INK4a μελετήθηκε σε δείγματα από διηθητικό καρκίνο του τραχήλου (Kim JR *et al* 1998; Kim JW *et al* 1998, Munirajan *et al* 1998; Wong *et al* 1999; Alfsen *et al* 2003; Ishikawa *et al* 2003; Masumoto *et al* 2003; McCluggage *et al* 2003; Negri *et al* 2003; Tripathi *et al* 2003; van de Putte *et al* 2003; Zielinski *et al* 2003; Ansari-Lari *et al* 2004; Kanao *et al* 2004; Li *et al* 2004; Schorge *et al* 2004; Parwani *et al* 2005; Horn *et al* 2006; Missaoui *et al* 2006; Ivanova *et al* 2007; Li *et al* 2007).

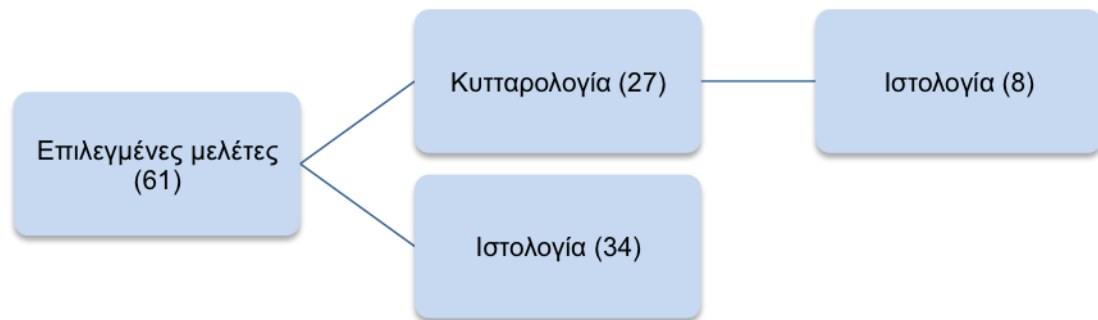
2.1.2. Επιλεγμένες μελέτες

Αφού αποκλείσαμε τις προαναφερθείσες μελέτες, επιλέξαμε 61 μελέτες για ενδελεχή περαιτέρω ανάλυση. Από αυτές, 27 μελέτες αξιολόγησαν το ρόλο της ανοσοκυτταρολογίας για το p16 σε κυτταρολογικά δείγματα (Bibbo *et al* 2002; Saqi *et al* 2002; Bibbo *et al* 2003; Murphy *et al* 2003; Pientong *et al* 2003; Akpolat *et al* 2004; Guo *et al* 2004; Pientong *et al* 2004; Sahebali *et al* 2004; Trunk *et al* 2004; Yoshida *et al* 2004; Bose *et al* 2005; Filho *et al* 2005; Moore *et al* 2005; Nieh *et al* 2005; Wentzensen *et al* 2005; Ekalksananan *et al* 2006; Holladya *et al* 2006; Negri *et al* 2006; Sahebali *et al* 2006; Wentzensen *et al* 2006; Bolanca *et al* 2007; Carozzi *et al* 2007; Carydis *et al* 2007; Liu *et al* 2007; Meyer *et al* 2007; Monsonogo *et al* 2007) και σε έξι από αυτές (Bibbo *et al* 2002; Bibbo *et al* 2003; Murphy *et al* 2003; Yoshida *et al* 2004; Nieh *et al* 2005; Ekalaksananan *et al* 2006), ενώ 34 μελέτες αξιολόγησαν την χρώση για τον δείκτη μόνο σε ιστολογικά δείγματα (Sano *et al* 1998; Klaes *et al* 2001; Keating *et al* 2001; Agoff *et al* 2003; Branca *et al* 2004; Negri *et al* 2004;

Volgareva *et al* 2004; Wang JL *et al* 2004; Wang SS *et al* 2004; Aoyama *et al* 2005; Day *et al* 2005; Guimaraes *et al* 2005; Hu *et al* 2005; Kalof *et al* 2005; Kim *et al* 2005; Lin *et al* 2005; Lorenzato *et al* 2005; Qiao *et al* 2005; Andersson *et al* 2006; Benevolo *et al* 2006; Bulten *et al* 2006; Ishikawa *et al* 2006; Lambert *et al* 2006; Queiroz *et al* 2006; Zhang *et al* 2006; Bahnassy *et al* 2007; Eleuterio *et al* 2007; Focchi *et al* 2007; Hariri *et al* 2007; Iaconis *et al* 2007; Kong *et al* 2007; Nam *et al* 2007; Omori *et al* 2007; Yildiz *et al* 2007) (Εικόνα 2).

Εικόνα 1 Διάγραμμα ροής (flow chart) για τις μελέτες που συμπεριελήφθησαν ή αποκλείστηκαν από την ανάλυση



Εικόνα 2 Επιλεγμένες μελέτες

2.2. Κυτταρολογία

Ανοσοχημική χρώση για το p16 πραγματοποιήθηκε σε επιλεγμένα κυτταρολογικά δείγματα, αντιπροσωπευτικά των διαφόρων βαθμίδων κυτταρολογικών αλλοιώσεων. Τα χαρακτηριστικά των μελετών που εξέτασαν το ρόλο της ανοσοκυτταρολογικής χρώσης για τον βιοδείκτη παρουσιάζονται στον πίνακα 4. Τυχαιοποιημένη συλλογή κυτταρολογικών δειγμάτων από πληθυσμό μαζικού κυτταρικού ελέγχου πραγματοποιήθηκε μόνο σε μία μελέτη (Sahebali *et al* 2004). Ομως, ακόμη και σε αυτή την μελέτη από την Sahebali και τους συναδέλφους της, μόνο οι γυναίκες που ήταν θετικές για τον ιό του HPV σε κυτταρικά δείγματα από τον τράχηλο της μήτρας συμπεριελήφθησαν.

Ανοσοκυτταρολογία για το p16 πραγματοποιήθηκε τόσο σε συμβατική κυτταρολογία (Παπ-τεστ) όσο και σε LBC. Η LBC μέθοδος χρησιμοποιήθηκε σε 19 μελέτες (Bibbo *et al* 2002; Saqi *et al* 2002; Bibbo *et al* 2003; Murphy *et al* 2003; Akpolat *et al* 2004; Guo *et al* 2004; Sahebali *et al* 2004; Trunk *et al* 2004; Yoshida *et al* 2004; Moore *et al* 2005; Wentzensen *et al* 2005; Holladay *et al* 2006; Sahebali *et al* 2006; Wentzensen *et al* 2006; Carozzi *et al* 2007; Carydis *et al* 2007; Liu *et al* 2007; Meyer *et al* 2007; Monsonogo *et al* 2007) και το Παπ-τεστ σε οκτώ (Pientong *et al* 2003; Pientong *et al* 2004; Bose *et al* 2005; Filho *et al* 2005; Nieh *et al* 2005; Ekalaksananan *et al* 2006; Negri *et al* 2006; Bolanca *et al* 2007). Τα συστήματα

LBC που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον πίνακα 4. Χρώση για το p16 πραγματοποιήθηκε σε όλα τα ευρέως διαδεδομένα συστήματα (ThinPrep, SurePath, TriPath, Seroa), αλλά τα δεδομένα είναι περιορισμένα και δε μας επιτρέπουν να πραγματοποιήσουμε σύγκριση της απόδοσης του δείκτη μεταξύ των διαφόρων συστημάτων. Η συσχέτιση μεταξύ κυτταρολογικής διάγνωσης, ανοσοκυτταρολογικής χρώσης για το p16 και ιστολογίας, αποτέλεσε το αντικείμενο μελέτης 8 εργασιών (Guo *et al* 2004; Trunk *et al* 2004; Nieh *et al* 2005; Negri *et al* 2006; Wentzensen *et al* 2006; Carozzi *et al* 2007; Meyer *et al* 2007; Monsonogo *et al* 2007) (Εικόνα 2).

Πίνακας 4 Χαρακτηριστικά των κυτταρολογικών μελετών

Μελέτη	Χώρα	Πληθυσμός	Μέγεθος	Κ/Β συσχέτιση	Μέσο	p16 αντίσωμα
Bibbo 2002	ΗΠΑ	ΔΑ	47	Όχι	LBC	E6H4
Saqi 2002	ΗΠΑ	ΔΑ	40	Όχι	LBC	Neomarkers
Bibbo 2003	ΗΠΑ	ΔΑ	30	Όχι	LBC	E6H4
Murphy 2003	Ιρλανδία	ΔΑ	27	Όχι	LBC	PharMingin
Pientong 2003	Ταϊλάνδη	Μαζικός έλεγχος	150	Όχι	Παπ-τεστ	Biosource
Akpolat 2004	ΗΠΑ	ΔΑ	77	Όχι	LBC	Neomarkers
Guo 2004	ΗΠΑ	Μαζικός έλεγχος	210	Ναι	LBC	Novocastra 6H12
Pientong 2004	Ταϊλάνδη	Μαζικός έλεγχος	165	Όχι	Παπ-τεστ	Biosource
Sahebalı 2004	Βέλγιο	Μαζικός έλεγχος	291	Όχι	LBC	E6H4
Trunk 2004	Γερμανία	ΔΑ	90	Ναι	LBC	E6H4
Yoshida 2004	Ιαπωνία	Κυτταρολογικές αλλοιώσεις	98	Όχι	LBC	Neomarkers
Bose 2005	ΗΠΑ	ΔΑ	107	Όχι	Παπ-τεστ	E6H4
Filho 2005	Βραζιλία	Μαζικός έλεγχος	199	Όχι	Παπ-τεστ	E6H4
Moore 2005	ΗΠΑ	ΔΑ	34	Όχι	LBC	Biosciences
Nieh 2005	Κίνα	ΔΑ	66	Ναι	Παπ-τεστ	E6H4
Wentzensen 2005	Γερμανία	ΔΑ	210	Όχι	LBC	E6H4
Ekalaksananan 2006	Ταϊλάνδη	Κυτταρολογικές αλλοιώσεις	186	Όχι	Παπ-τεστ	ND
Holladay 2006	ΗΠΑ	ΔΑ	400	Όχι	LBC	E6H4
Negri 2006	Ιταλία	ΔΑ	81	Ναι	Παπ-τεστ	E6H4
Sahebalı 2006	Βέλγιο	Μαζικός έλεγχος	200	Όχι	LBC	E6H4
Bollanca 2007	Κροατία	Μαζικός έλεγχος	137	Όχι	Παπ-τεστ	E6H4
Carozzi 2007	Ιταλία	Κυτταρολογικές αλλοιώσεις	283	Ναι	LBC	E6H4
Carydis 2007	Καναδάς	Κυτταρολογικές αλλοιώσεις	46	Όχι	LBC	E6H4
Liu 2007	ΗΠΑ	ΔΑ	75	Όχι	LBC	16P04
Meyer 2007	ΗΠΑ	ΔΑ	394	Ναι	LBC	E6H4
Monsonogo 2007	Γαλλία	Κυτταρολογικές αλλοιώσεις	248	Ναι	LBC	E6H4
Wentzensen 2007	Γερμανία	ΔΑ	225	Ναι	LBC	E6H4

ΔΑ: δεν αναφέρεται, **Κ/Β:** κυτταρολογία/ βιοψία, **LBC:** κυτταρολογία υγρής φάσεως

Πίνακας 5. Χαρακτηριστικά των ιστολογικών μελετών

Μελέτη	Χώρα	Πληθυσμός	Υλικό	Μέγεθος	FU	p16 αντίσωμα
Keating 2001	ΗΠΑ	ΔΑ	Punch/κωνοειδείς βιοψίες	85	Οχι	G175-405 PharMingin
Klaes 2001	Γερμανία	ΔΑ	ΔΑ	310	Οχι	E6H4
Bibbo 2002	ΗΠΑ	ΔΑ	ΔΑ	47	Οχι	E6H4
Sano 2002	Ιαπωνία	ΔΑ	ΔΑ	64	Οχι	JC8
Agoff 2003	ΗΠΑ	ΜΠΕ	Punch / LLETZ βιοψίες	569	Οχι	E6H4
Bibbo 2003	ΗΠΑ	ΔΑ	ΔΑ	30	Οχι	E6H4
Murphy 2003	Ιρλανδία	ΔΑ	ΔΑ	153	Οχι	PharMingin
Branca 2004	Ιταλία	ΔΑ	Punch/κωνοειδείς βιοψίες	292	Οχι	polyclonal Ab #7962
Negri 2004	Ιταλία	ΔΑ	ΔΑ	96	Ναι	E6H4
Volgareva 2004	Ρωσία	ΔΑ	ΔΑ	197	Οχι	E6H4
Wang JL 2004	Σουηδία	ΔΑ	ΔΑ	40	Οχι	MonoclonalF-12
Wang S 2004	Γερμανία	ΔΑ	Punch/κωνοειδείς βιοψίες	171	Ναι	E6H4
Yoshida 2004	Ιαπωνία	ΔΑ	ΔΑ	98	Οχι	Neomarkers
Aoyama 2005	ΗΠΑ	ΔΑ	ΔΑ	37	Οχι	PharMingin
Dray 2005	Αυστραλία	ΔΑ	Punch βιοψίες	189	Οχι	JC8
Guimaraes 2005	Βραζιλία	ΔΑ	Punch/κωνοειδείς βιοψίες	28	Οχι	Freemont
Hu 2005	ΗΠΑ	Εφηβοι	Punch βιοψίες	142	Οχι	Novocastra
Kalof 2005	ΗΠΑ	ΔΑ	Punch/κωνοειδείς βιοψίες	39	Οχι	E6H4
Kim 2005	Κορέα	ΔΑ	ΔΑ	82	Οχι	SC 468
Lin 2005	Κορέα	ΔΑ	ΔΑ	117	Οχι	E6H4
Lorenzato 2005	Γαλλία	hrHPV (+)	Punch βιοψίες	99	Οχι	E6H4
Nieh 2005	Κίνα	ASCUS	Punch βιοψίες	66	Οχι	E6H4
Qiao 2005	ΗΠΑ	>50 ετών	Punch/κωνοειδείς βιοψίες	31	Οχι	PharMingin
Andersson 2006	Σουηδία	ΔΑ	ΔΑ	80	Οχι	E6H4
Benevolo 2006	Ιταλία	ΔΑ	ΔΑ	86	Οχι	E6H4
Bulten 2006	Ολλανδία	ΔΑ	ΔΑ	39	Οχι	Neomarkers
Ekalaksananan 2006	Ταϊλάνδη	ΔΑ	Punch βιοψίες	39	Οχι	ND
Ishikawa 2006	Ιαπωνία	ΔΑ	ΔΑ	164	Οχι	E6H4
Lambert 2006	Βραζιλία	ΔΑ	Punch/κωνοειδείς βιοψίες	54	Οχι	Novocastra
Queiroz 2006	Βραζιλία	ΔΑ	Punch/κωνοειδείς βιοψίες	60	Οχι	E6H4

Μελέτη	Χώρα	Πληθυσμός	Υλικό	Μέγεθος	FU	p16 αντίσωμα
Zhang 2006	ΗΠΑ	ΜΠΕ	Punch / LLETZ βιοψίες	329	Οχι	Novocastra
Bahnassy 2007	Αίγυπτος	ΔΑ	Punch / LLETZ βιοψίες	130	Οχι	ND
Eleuterio 2007	Βραζιλία	ΔΑ	ΔΑ	96	Οχι	E6H4
Focchi 2007	Βραζιλία	ΔΑ	Punch/κωνοειδείς βιοψίες	314	Οχι	Neomarkers
Hariri 2007	Δανία	ΔΑ	Punch / LLETZ βιοψίες	200	Ναι	K5336 Dako
Iaconis 2007	ΗΠΑ	ΔΑ	ΔΑ	96	Οχι	E6H4
Kong 2007	ΗΠΑ	ΔΑ	Punch / LLETZ βιοψίες	28	Οχι	E6H4
Nam 2007	Κορέα	ΔΑ	Punch / κωνοειδείς βιοψίες	256	Οχι	E6H4
Otori 2007	Ιαπωνία	ΔΑ	Punch/κωνοειδείς βιοψίες	107	Ναι	E6H4
Yildiz 2007	Τουρκία	ΔΑ	LLETZ βιοψίες	35	Οχι	E6H4

ΔΑ: δεν αναφέρεται, **ΜΠΕ:** μαζικός πληθυσμιακός έλεγχος, **FU:** follow-up (παρακολούθηση)

2.3. Ιστολογία

Τα χαρακτηριστικά των μελετών που εξέτασαν το ρόλο της ανοσοχημικής χρώσης για το βιοδείκτη p16 σε ιστολογικά παρασκευάσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 5.

Τα ιστολογικά δείγματα περιελάμβαναν punch, LLETZ ή κωνοειδείς εκτομές. Σε τέσσερις μελέτες (Wang JL *et al* 2004; Wang SS *et al* 2004; Hariri *et al* 2007; Omori *et al* 2007) οι γυναίκες ήταν υπό παρακολούθηση, με αποτέλεσμα να είναι δυνατή η αξιολόγηση της προγνωστικής αξίας του δείκτη (Πίνακας 5).

2.4 Χρώση για p16

Μία πληθώρα αντισωμάτων χρησιμοποιήθηκε για ανοσολογική αναγνώριση του p16.

Οι συγγραφείς πραγματοποίησαν την ανοσοχημική χρώση ακολουθώντας συγκεκριμένες οδηγίες από τους κατασκευαστές, ανάλογα με το αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε. Τα διάφορα αντισώματα παρουσιάζονται στον πίνακα 6.

Πίνακας 6 Αντισώματα για ανοσολογική ανίχνευση του p16

Αντίσωμα	Τύπος	Εταιρεία	Χώρα προέλευσης
E6H4	Μονοκλωνικό	Dako Cytomation	Γερμανία
clone G175-405	Μονοκλωνικό	PharMingin,	ΗΠΑ
clone 16P07	Μονοκλωνικό	Neomarkers	ΗΠΑ
clone JC8	Μονοκλωνικό	Biocare	ΗΠΑ
clone 6H12	Μονοκλωνικό	Novocastra,	Αγγλία
clone F-12	Μονοκλωνικό	Santa Cruz	ΗΠΑ
clone #7962	Πολυκλωνικό	Abcam	Αγγλία
clone SC468	Πολυκλωνικό	Santa Cruz	ΗΠΑ

Η μέθοδος χρώσης ήταν πανομοιότυπη τόσο στα κυτταρολογικά (Παπ-τεστ ή LBC), όσο και στα ιστολογικά δείγματα, με μικρές διαφοροποιήσεις ανάλογα με την εταιρία. Η πλειοψηφία των μελετών χρησιμοποίησε το αντίσωμα E6H4 της Dako Cytomation.

Η διαδικασία της ανοσοκυτταρολογίας ήταν σε γενικές γραμμές η ακόλουθη. Το CINtec® Cytology Kit περιέχει μία ομάδα αντιδραστηρίων για την ανοσοκυτταρολογική και ανοσοϊστοχημική ανίχνευση του p16 αντιγόνου, που πραγματοποιείται μέσω του μονοκλωνικού αντισώματος E6H4 ενάντια στην πρωτεΐνη-παράγωγο του p16. Ένα αντιδραστήριο άμεσης χρήσης, που περιέχει ένα πολυμερές αντιδραστήριο συνδεδεμένο με περοξιδάση και Fab' αντίσωμα, χρησιμοποιείται. Το αντιδραστήριο έχει υποβληθεί σε απορρόφηση στερεής φάσης για να ελαχιστοποιήσει τη διασταυρούμενη αντίδραση με ανθρώπινες

ανοσοσφαιρίνες. Η χρωματογενής αντίδραση βασίζεται στην μέσω περοξιδάσης προκαλούμενης μετατροπής μίας διαμινο-βενζιδίνης (DAB) χρωμογενούς ουσίας σε μία εμφανή αντίδραση στη θέση του αντιγόνου. Μετά τη χρώση με DAB, το δείγμα μπορεί να αξιολογηθεί με οπτικό μικροσκόπιο. Κάθε συσκευασία περιέχει τα εξής υλικά:

1. Αντιδραστήριο ενάντια στην περοξιδάση
2. p16 μονοκλωνικό αντίσωμα
3. Ουσία για απεικόνιση της αντίδρασης
4. DAB χρωμογενής ουσία

Ενα τυπικό πρωτόκολλο περιλαμβάνει την επώαση των cytosprins με το πρωτογενές αντίσωμα για την p16 πρωτεΐνη, ακολουθούμενη από επώαση με το δευτερεύον goat-anti-mouse αντίσωμα και με DAB. Στη συνέχεια χρησιμοποιείται αιματοξυλίνη που επιτρέπει την αξιολόγηση του πυρήνα. Μικρές διαφοροποιήσεις στην προαναφερθείσα τακτική παρατηρήθηκαν ανάλογα με τον τύπο του αντισώματος που χρησιμοποιήθηκε.

2.5. Ερμηνεία της χρώσης για το p16

2.5.1. Κυτταρολογία

Μία από τις σημαντικότερες παρατηρήσεις αυτής της συστηματικής μελέτης της βιβλιογραφίας ήταν ότι δεν υπήρξε ομοφωνία μεταξύ των ερευνητών σχετικά με το τι καθιστά θετικό αποτέλεσμα της χρώσης για το p16. Η θετικότητα ενός αποτελέσματος καθορίσθηκε ανάλογα με τις οδηγίες του εκάστοτε παρασκευαστή, αλλά δεν έλλειψαν οι περιπτώσεις που ήταν αυθαίρετη.

Ποσοτικά κριτήρια μόνο (αριθμός χρωσμένων κυττάρων) υιοθετήθηκαν από 12 μελέτες (Saqi *et al* 2002; Pientong *et al* 2003; Akpolat *et al* 2004; Pientong *et al* 2004; Bose *et al* 2005; Filho *et al* 2005; Nieh *et al* 2005; Ekalaksananan *et al* 2006; Sahebali *et al* 2006; Carydis *et al* 2007; Liu *et al* 2007; Monsonogo *et al* 2007), ενώ τόσο ποσοτικά όσο και ποιοτικά κριτήρια (μορφολογικά κυτταρικά χαρακτηριστικά) υιοθετήθηκαν από εννέα μελέτες (Bibbo *et al* 2002; Bibbo *et al* 2003; Guo *et al* 2004; Yoshida *et al* 2004; Moore *et al* 2005; Wentzensen *et al* 2005; Holladay *et al* 2006; Wentzensen *et al* 2006; Meyer *et al* 2007) (Πίνακας 7). Οι τελευταίες μελέτες θεώρησαν θετικό αποτέλεσμα για το p16 αυτά τα κύτταρα που όχι μόνο ήταν χρωσμένα με τον δείκτη αλλά επίσης εμφάνιζαν μορφολογικές αλλοιώσεις συμβατές με προκαρκινικό στάδιο. Η ένταση της χρώσης δε θεωρήθηκε αξιόπιστη παράμετρος επειδή η εκτίμησή της δεν είναι αντικειμενική. Οι παράμετροι που αξιολογήθηκαν για

την εκτίμηση της χρώσης για το δείκτη σε κυτταρολογικά δείγματα παρουσιάζονται στον πίνακα 7.

Πίνακας 7 Κυτταρολογική χρώση

Ποσοτική παράμετρος

- Αριθμός ή ποσοστό των κυττάρων (ανεξαρτήτου μορφολογίας και ενδοκυτταρικής κατανομής χρώσεως) που επιδुकνεύουν χρώση για το p16

Ποιοτικοί παράμετροι

- Ενδοκυτταρική κατανομή χρώσης (κυτταροπλασματική ή/και πυρηνική
 - Κυτταρική μορφολογία
 - Ένταση χρώσης
-

2.5.2. Ιστολογία

Η πλειοψηφία των ιστολογικών μελετών υιοθέτησε την ταξινόμηση την προτεινόμενη από τον Klaes και τους συνεργάτες του (Klaes *et al* 2001) ο οποίος θεωρείται ως ένας από τους πρωτοπόρους στην εισαγωγή των βιοδεικτών στην αξιολόγηση των προκαρκινικών αλλοιώσεων του τραχήλου της μήτρας. Ο Klaes χρησιμοποίησε μία ημιποσοτική κλίμακα αξιολόγησης της χρώσης για τον δείκτη ως εξής: αρνητική χρώση (<1% των κυττάρων θετικά), σποραδική (μεμονωμένα κύτταρα θετικά αλλά

<5%), τοπική (<25% των κυττάρων θετικά), διάχυτη ($\geq 25\%$ των κυττάρων θετικά)

(Πίνακας 8).

Πίνακας 8 Ταξινόμηση κατά Klaes

Αρνητική χρώση	<1% του δείγματος θετικά χρωσμένο
Σποραδική χρώση	1-5% του δείγματος θετικά χρωσμένο
Τοπική χρώση	5-25% του δείγματος θετικά χρωσμένο
Διάχυτη χρώση	$\geq 25\%$ του δείγματος θετικά χρωσμένο

ΑΝΑΛΥΣΗ

3.1. Κυτταρολογία

Οι 27 μελέτες που εξέτασαν το ρόλο της ανοσοκυτταρολογίας για το p16 παρουσιάζονται στον πίνακα 9. Κάθε μελέτη υιοθέτησε τα κριτήρια αξιολόγησης της χρώσης για τον δείκτη τα προτεινόμενα από τον εκάστοτε παρασκευαστή. Τα κριτήρια για την θεώρηση θετικής χρώσης για το p16, καθώς και το ποσοστό των θετικών Παπ-τεστ επιχρισμάτων ή LBC δειγμάτων, ανά βαθμίδα κυτταρικής αλλοίωσης, παρουσιάζονται στον πίνακα 9.

Πίνακας 9 Κριτήρια θετικής χρώσης για p16 και ποσοστό κυτταρολογικών δειγμάτων θετικών για το δείκτη ανά κατηγορία

Μελέτη	Θετικό p16		% δειγμάτων θετικών για p16			
	Π ή Κ / κύτταρα		Αρνητικό	ASCUS	LSIL	HSIL
Bibbo 2002	Π+Κ	>10 ΑΚ	0%	-	74%	96%
Saqi 2002	Π±Κ	>10 κύτταρα	21%	50%	74%	90%
Bibbo 2003	Π+Κ	>10 ΑΚ	-	-	-	63%
Murphy 2003	ΔΑ	ΔΑ	0%	100%	86%	100%
Pientong 2003	Π+Κ	≥3 κύτταρα	0%	57%	33%	93%
Akpolat 2004	Π±Κ	≥10% κυττάρων	0%	10%	-	42%
Guo 2004	Π±Κ	≥5 ΑΚ	-	-	58%	97%
Pientong 2004	Π+Κ	≥10 κύτταρα	0%	53%	54%	100%
Saheballi 2004	Π+Κ	ΔΑ	-	-	-	-
Trunk 2004	ΔΑ	ΔΑ	11%	67%	79%	100%
Yoshida 2004	Π+Κ	≥1 ΑΚ	--	13%	58%	100%
Bose 2005	Π+Κ	>10 κύτταρα	13%	29%	21%	81%
Filho 2005	ΔΑ	Κάθε χρώση	49%	56%	-	-
Moore 2005	ΔΑ	>30% ΑΚ	0%	14%	44%	100%
Nieh 2005	ΔΑ	Κάθε χρώση	-	61%	-	-
Wentzensen 2005	Π±Κ	ΠΣ>2	1%		10%	98%
Ekalaksananan 2006	ΔΑ	≥10 κύτταρα	7%	63%	60%	100%
Holladay 2006	Π ή Κ	≥1 ΑΚ	0%	35%	42%	80%
Negri 2006	Π ή Κ	ΔΑ	13%	56%	67%	100%
Saheballi 2006	Π+Κ	ΔΑ	-	-	-	-
Bollanca 2007	Π±Κ	>1% κύτταρα	2%	-	35%	96%
Carozzi 2007	ΔΑ	ΔΑ	35%	50%	40%	80%
Carydis 2007	ΔΑ	>10 κύτταρα	10%	-	-	-
Liu 2007	Π±Κ	>10 κύτταρα	20%	-	50%	82%
Meyer 2007	Π±Κ	≥1 ΑΚ	9%	18%	42%	81%
Monsonogo 2007	Π ή Κ	Κάθε χρώση	36%	55%	28%	88%
Wentzensen 2007	Π	ΠΣ>2	-	27%	24%	-
Pooled value (random effect model)			12%	45%	45%	89%
(95 % CI)			(7-17%)	(35- 54%)	(37-57%)	(84-95%)

ΑΚ: άτυπα κύτταρα, **ΔΑ:** δεν αναφέρεται, **Κ:** κυτταροπλασματική χρώση, **Π:** πυρηνική χρώση, **ΠΣ:** πυρηνικό σκορ, **ASCUS:** άτυπα επιθηλιακά κύτταρα μη προσδιορισμένης σημαντικότητας, **HSIL:** υψηλού βαθμού πλακώδεις ενδο-επιθηλιακές αλλοιώσεις, **LSIL:** χαμηλού βαθμού πλακώδεις ενδο-επιθηλιακές αλλοιώσεις

3.2. Ιστολογία

Για να ελαττώσουμε την ετερογένεια στην παρουσίαση των αποτελεσμάτων μεταξύ των διαφόρων μελετών, μετατρέψαμε τις διάφορες ταξινομήσεις της χρώσης για το p16 στην ταξινόμηση την προτεινόμενη από τον Klaes (Πίνακας 10). Αυτή η μετατροπή δεν ήταν δυνατή για τέσσερις μελέτες (Kim *et al* 2005; Ekalaksanan *et al* 2006; Iakonis *et al* 2007; Nam *et al* 2007).

Θεωρήσαμε σα θετικό αποτέλεσμα για p16 ανοσοχημική χρώση την εμφάνιση διάχυτης χρώσης, που συμπεριελάμβανε τόσο τη βασική όσο και την παραβασική στιβάδα, και αποτελεί ένδειξη χρόνιας λοίμωξης και μετατροπής των κυττάρων από τον υψηλού κινδύνου ιό των ανθρωπίνων κονδυλωμάτων (Wentzensen *et al* 2007).

Το ποσοστό των βιοψιών που εμφάνισαν θετική χρώση για το p16 ανά βαθμίδα αλλοίωσης παρουσιάζεται στον Πίνακα 10.

Πίνακας 10 Κριτήρια θετικής χρώσης για p16 και ποσοστό βιοψιών θετικών για το δείκτη ανά κατηγορία

Μελέτη	Κατανομή	Π/Κ	Χρώση	% βιοψιών θετικών για p16			
				Αρνητικό	CIN1	CIN2	CIN3
Keating 2001	Klaes*	Κ±Π	Διάχυτη+	0%	38%	-	-
Klaes 2001	Klaes	Π+Κ	Διάχυτη+	1%	62%	100%	100%
Bibbo 2002	Klaes	Π+Κ	Διάχυτη+	0%	58%	91%	100%
Sano 2002	Klaes*	Π+Κ	Διάχυτη+	0%	100%	88%	100%
Agoff 2003	Klaes	Π+Κ	Διάχυτη+	8%	38%	64%	86%
Bibbo 2003	Klaes	Π+Κ	Τοπική+	0%	40%	100%	100%
Murphy 2003	Klaes*	ΔΑ	Τοπική+	0%	93%	73%	91%
Branca 2004	Klaes*	ΔΑ	Διάχυτη+	0%	10%	24%	54%
Tringler 2004	Klaes*	Π+Κ	Τοπική+	6%	72%	-	-
Volgareva 2004	Klaes	Κ+Π	Διάχυτη+	0%	2%	3%	17%
Wang JL 2004	Klaes	Π±Κ	Διάχυτη+	13%	50%	83%	75%
Wang S 2004	Klaes	ΔΑ	Διάχυτη+	5%	36%	63%	100%
Yoshida 2004	Klaes	Π+Κ	Διάχυτη+	3%	0%	88%	86%
Aoyama 2005	Klaes*	ΔΑ	Διάχυτη+	-	17%	-	-
Dray 2005	Klaes*	Π±Κ	Διάχυτη+	-	45%	-	-
Guimaraes 2005	Klaes	Π+Κ	Διάχυτη+	-	0%	-	-
Hu 2005	Klaes	Π±Κ	Διάχυτη+	-	9%	63%	84%
Kalof 2005	Klaes	ΔΑ	Διάχυτη+	-	50%	-	-
Kim 2005	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	0%	36%	-	-
Lin 2005	Klaes	ΔΑ	Τοπική+	0%	90%	-	-
Lorenzato 2005	Klaes	ΔΑ	Διάχυτη+	0%	52%	-	-
Nieh 2005	Klaes*	ΔΑ	Τοπική+	5%	-	79%	95%
Qiao 2005	Klaes	Κ±Π	Διάχυτη+	0%	-	-	-
Andersson 2006	Klaes	Π±Κ	Διάχυτη+	-	47%	65%	77%
Benevolo 2006	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	0%	31%	90%	100%
Bulten 2006	Klaes*	Π+Κ	Τοπική+	NA	67%	100%	100%
Ekalaksanana n 2006	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	37%	13%	-	-
Ishikawa 2006	Klaes*	ΔΑ	Διάχυτη+	14%	25%	80%	94%
Lambert 2006	Klaes	Π+Κ	Τοπική+	-	50%	-	-
Queiroz 2006	Klaes*	Π+Κ	Διάχυτη+	9%	53%	70%	93%
Zhang 2006	Klaes*	ΔΑ	Τοπική+	33%	52%	70%	80%
Bahnassy 2007	Klaes*	Π±Κ	Τοπική+	0%	0%	36%	63%

Πίνακας 10 Κριτήρια θετικής χρώσης για p16 και ποσοστό βιοψιών θετικών για το δείκτη ανά κατηγορία

Μελέτη	Κατανομή	Π/Κ	Χρώση	% βιοψιών θετικών για p16			
				Αρνητικό	CIN1	CIN2	CIN3
Eleuterio 200	Klaes	Π+Κ	Διάχυτη+	0%	15%	-	-
Focchi 2007	Klaes	Π+Κ	Διάχυτη+	0%	91%	-	-
Hariri 2007	Klaes*	ΔΑ	Διάχυτη+	6%	71%	-	-
Iaconis 2007	ΔΑ	Π±Κ	ΔΑ	27%	-	-	-
Kong 2007	Klaes*	Π±Κ	Τοπική+	-	-	91%	100%
Nam 2007	ΔΑ	Π±Κ	ΔΑ	-	27%	37%	62%
Omorì 2007	Klaes	ΔΑ	Διάχυτη+	-	36%	73%	100%
Yildiz 2007	Kales*	Π±Κ	Τοπική+	-	80%	-	-
Pooled value (random effect model)				2%	38%	68%	82%
(95% CI)				(0.4- 30%)	(23-53%)	(44-92%)	(72- 92%)

ΔΑ: δεν αναφέρεται, **Κ:** κυτταροπλασματική χρώση, **Π:** πυρηνική χρώση,

CIN: τραχηλική επιθηλιακή νεοπλασία, **Klaes*:** μετατροπή στην ταξινόμηση κατά Klaes, **SCC:** καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων,

3.3. Μετα-ανάλυση

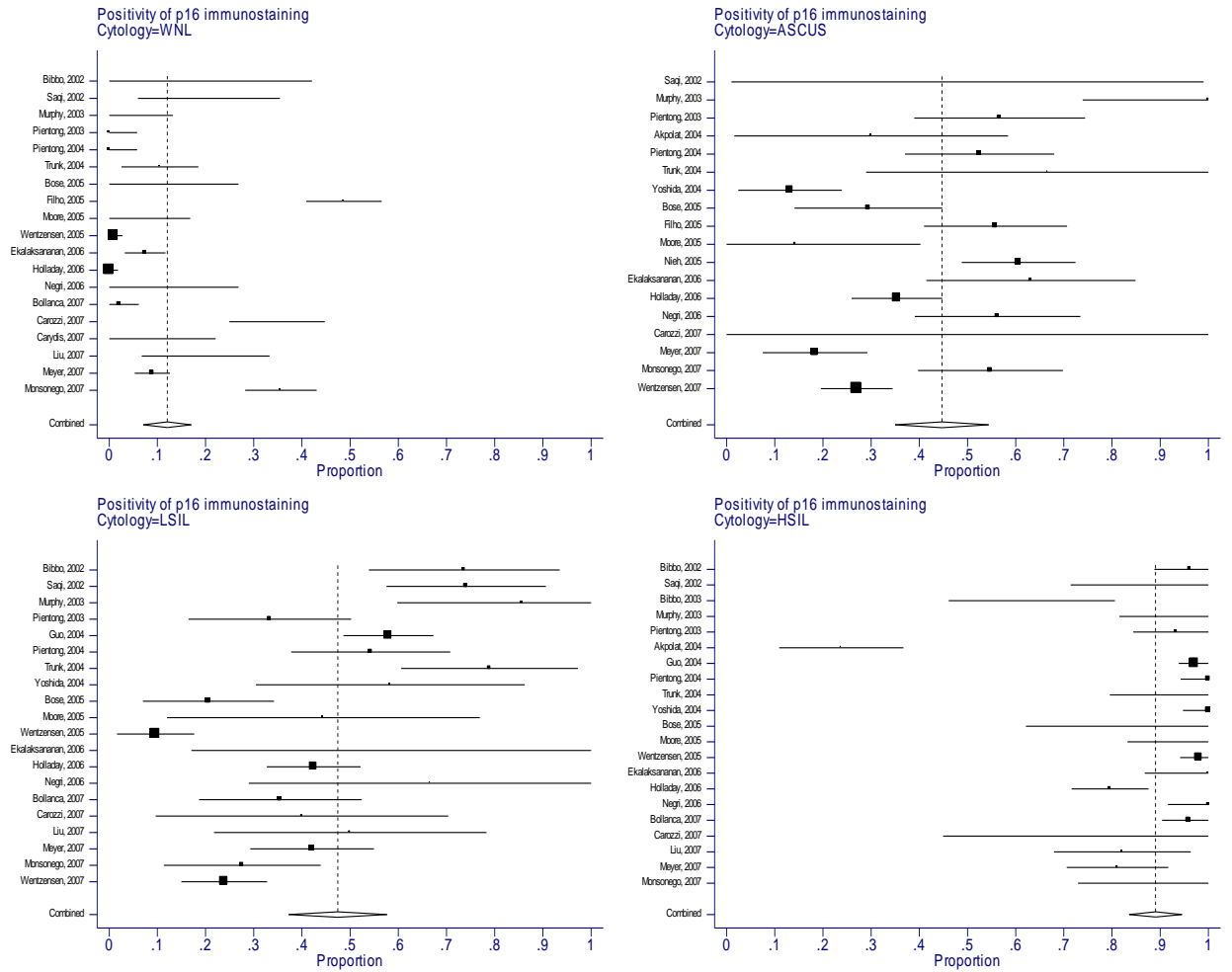
Αφού λάβαμε υπόψη τις προαναφερθείσες ασυμφωνίες σχετικά με την ερμηνεία της χρώσης για το δείκτη p16, υπολογίσαμε, και στη συνέχεια απεικονίσαμε τη μέση τιμή του ποσοστού των δειγμάτων που επέδειξαν θετική χρώση για το δείκτη, τόσο σε κυτταρολογικά δείγματα όσο και σε βιοψίες από τον τράχηλο της μήτρας, ανάλογα με το βαθμό αλλοίωσης (Εικόνες 3 και 4).

Το ποσοστό των κυτταρολογικών δειγμάτων θετικών για το p16 αυξάνει με το βαθμό της κυτταρολογικής αλλοίωσης (Εικόνα 3). Ανάμεσα στα φυσιολογικά κυτταρικά επιχρίσματα, μόνο 12% (95% CI: 7–17%) εμφάνισαν θετική χρώση για το δείκτη σε σχέση με 45% των ASCUS (95% CI: 35–54%), 45% των LSIL (95% CI: 37–57%) και 89% των HSIL (95% CI: 84–95%) επιχρισμάτων (Εικόνα 3). Αντίστοιχα, μόνο 2% των φυσιολογικών βιοψιών (95% CI: 0.4–30%) και 38% των CIN1 αλλοιώσεων (95% CI: 23–53%) επέδειξαν διάχυτη χρώση για το p16 (Klaes ταξινόμηση) σε σχέση με 68% των CIN2 (95% CI: 44–92%) και 82% των CIN3 (95% CI: 72–92%) (Εικόνα 4).

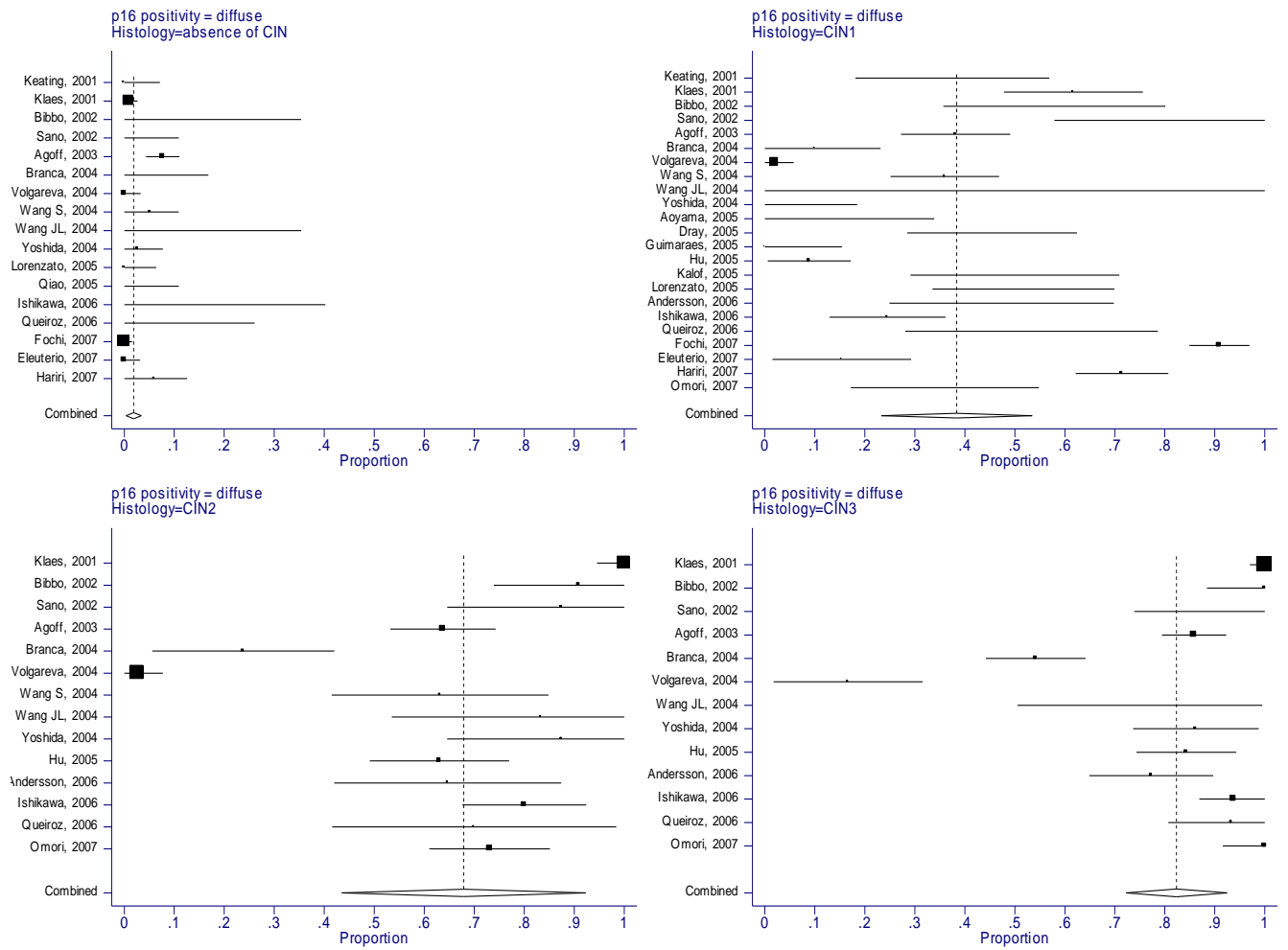
Τα αποτελέσματα ήταν πολύ ετερογενή για όλους τους τύπους αλλοιώσεων (p για το Q test <0.001). Ειδικά στις ενδιάμεσες κατηγορίες, η ετερογένεια μεταξύ των μελετών ήταν ιδιαίτερα σημαντική. Το ποσοστό των επιχρισμάτων θετικών για το p16 κυμάνθηκε μεταξύ 10% (Akrolat *et al* 2004) έως 100% (Murphy *et al* 2003) για τα ASCUS και από 10% (Wentzensen *et al* 2005) σε 86% (Murphy *et al* 2003) για τα

LSIL (Εικόνα 3). Αντίστοιχα, στην ιστολογία η αναλογία των CIN1 βιοψιών που επέδειξαν διάχυτη χρώση για το p16 κυμάνθηκε από 0% (Yoshida *et al* 2004) έως 100% (Sano *et al* 2002) (Εικόνα 4). Μόνο στα δύο άκρα του φάσματος των αλλοιώσεων (φυσιολογικά ή HSIL/CIN3 δείγματα) υπήρξε μία σχετική ομοιογένεια μεταξύ των μελετών και των αντιστοίχων αποτελεσμάτων. Η μετα-ανάλυση περιορίστηκε μόνο στη συσχέτισης του p16 και του βαθμού της εκάστοτε αλλοίωσης σε κυτταρολογικά ή ιστολογικά δείγματα, λόγω έλλειψης ικανού αριθμού μελετών που ασχολήθηκαν με άλλες κλινικές παραμέτρους του δείκτη p16

Εικόνα 3: Μετα-ανάλυση της αναλογίας των κυτταρολογικών δειγμάτων θετικών για p16 ανά κυτταρολογική βαθμίδα



Εικόνα 4: Μετα-ανάλυση της αναλογίας των βιοψιών θετικών για p16 ανά βαθμό ιστολογικής αλλοίωσης



3.4. Το p16 ως μέσο διαλογής των κυτταρολογικών δειγμάτων

Ο ρόλος του δείκτη ως μέσο διαλογής των γυναικών με άτυπα επιθηλιακά κύτταρα μη προσδιορισμένης σημαντικότητας (ASCUS) ή χαμηλού βαθμού πλακώδεις ενδο-επιθηλιακές αλλοιώσεις (LSIL) που έχουν υψηλού βαθμού ιστολογική αλλοίωση (CIN2+), μελετήθηκε σε μικρότερο βαθμό. Μόνο τέσσερις μελέτες (Guo *et al* 2004; Nieh *et al* 2005; Meyer *et al* 2007; Monsonogo *et al* 2007) αξιολόγησαν την ικανότητα του p16, έναντι του Hybrid Capture II (HCII) για τον ιό HPV (assay Qiagen, city, state, USA) στην προσπάθεια ανίχνευσης του ASCUS (Nieh *et al* 2005; Meyer *et al* 2007) ή LSIL πληθυσμού (Guo *et al* 2004; Meyer *et al* 2007) με CIN2+ ιστολογία (Πίνακας 11). Το p16 επέδειξε χαμηλότερη ή παρόμοια ευαισθησία, αλλά υψηλότερη ειδικότητα σε σχέση με το HCII για την ανίχνευση υψηλόβαθμων αλλοιώσεων.

Η ανοσοϊστοχημική έκφραση του p16, ως δείκτη κινδύνου εξέλιξης των χαμηλού βαθμού αλλοιώσεων, αξιολογήθηκε σε τέσσερις μελέτες (Negri *et al* 2004; Wang SS *et al* 2004; Hariri *et al* 2007; Omori *et al* 2007). Ο Negri και οι συνεργάτες του (Negri *et al* 2004) μελέτησαν το ρόλο του p16 στη διαλογή CIN1 δειγμάτων που είναι δυνατόν να εξελιχθούν σε CIN3 σε διάστημα τεσσάρων ετών. Οι συγγραφείς διαπίστωσαν ότι το p16 μπορεί να εκφρασθεί σε χαμηλού βαθμού βλάβες (CIN1) που υποτροπιάζουν χωρίς θεραπεία, αλλά η παρουσία διάχυτης χρώσης (>25% δείγματος θετικό για το δείκτη) αποτελεί σημαντικό δείκτη κινδύνου για ανάπτυξη υψηλότερου βαθμού ιστολογικών αλλοιώσεων. Συνολικά, 71.4% και 37.8% από τα

p16 αρνητικά και διάχυτα κεχρωσμένα CIN1 δείγματα υποτροπίασαν αντίστοιχα.

Στη μελέτη από τη Wang και τους συνεργάτες της (Wang SS *et al* 2004) οι CIN1 βλάβες παρακολούθηθηκαν για ένα διάστημα πέντε έως επτά ετών. Η θετική προοπτική αξία (PPV) της διάχυτης χρώσης για p16 για CIN2+ ήταν 39% και η αρνητική προγνωστική αξία (NPV) ήταν 85%.

Μια άλλη μελέτη (Hariri *et al* 2007) έδειξε 96% ευαισθησία και 39% PPV της διάχυτης χρώσης για το p16 στη διάγνωση αυτών των CIN1 βιοψιών που θα μπορούσαν να εξελιχθούν σε CIN2 σε μία πενταετία, για μία σημαντικά υψηλότερη NPV (96%).

Μεγαλύτερη πιθανότητα εξέλιξης σε CIN3 παρατηρήθηκε σε CIN2 δείγματα με διάχυτη χρώση για p16 μετά από δύο χρόνια παρακολούθησης, σε μία μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τον Omori και τους συνεργάτες του (Omori *et al* 2007).

Πίνακας 11 p16 έναντι HCII

Μελέτη	Κυτταρολογία	Ιστολογία	Τεστ	Ευαισθησία	Ειδικότητα	PPV	NPV
Guo 2004	LSIL	CIN2	P16	92%	49%	33%	96%
			HCII	100%	7%	21%	100%
Nieh 2005	ASCUS	CIN2	P16	95%	56%	50%	96%
			HCII	86%	31%	37%	82%
Meyer 2007	ASCUS	CIN2	P16	0%	93%	0%	93%
			HCII	100%	21%	8%	100%
Meyer 2007	LSIL	CIN2	P16	80%	52%	27%	92%
			HCII	100%	17%	21%	100%

Κεφάλαιο 4

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η σημαντική πρόοδος που έχει σημειωθεί στον τομέα πρόληψης ενάντια στην καρκινογένεση του τραχήλου της μήτρας, οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στην κατανόηση της συσχέτισής του με λοίμωξη από τον ιό των ανθρωπίνων θηλωμάτων. Η κλινική σημασία του τεστ ανίχνευσης του DNA του ιού έχει μελετηθεί εκτενώς στη βιβλιογραφία. Οι ερευνητές έχουν δείξει ότι HPV DNA τεστ παίζει σημαντικό ρόλο στην διαλογή ASCUS κυτταρολογικών δειγμάτων που αντιστοιχούν σε γυναίκες με αυξημένο κίνδυνο CIN2+ (Arbyn *et al* 2008a). Παράλληλα, υπάρχουν σημαντικές μελέτες που στηρίζουν το ρόλο του HPV DNA τεστ ως μέσο μαζικού πληθυσμιακού ελέγχου που θα μπορούσε ενδεχομένως να αντικαταστήσει την κυτταρολογία (Naucler *et al* 2007; Ronco *et al* 2006), ή ως μέσο παρακολούθησης των γυναικών μετά από θεραπεία (Paraskevaïdis *et al* 2004; Arbyn *et al* 2005). Οι εφαρμογές όμως του HPV DNA τεστ περιορίζονται από το γεγονός ότι δεν μπορεί να αξιολογήσει εάν η προσβολή από τον ιό είναι οξεία ή χρόνια. Μια τέτοια πληροφορία θα ήταν πολύ χρήσιμη, καθώς όπως έχει αποδειχθεί η καρκινογένεση από τον ιό HPV σχετίζεται με χρόνια και όχι οξεία λοίμωξη.

Το p16 είναι αναστολέας της CDK και ένας από τους πολλά υποσχόμενους βιολογικού δείκτες. Η χρόνια προσβολή των κυττάρων από τον ιό HPV προκαλεί

υπερ-έκφραση του δείκτη, έτσι ώστε να είναι δυνατή η ανίχνευσή του με ανοσοχημικές μεθόδους, τόσο στην κυτταρολογία (συμβατική ή υγρής φάσεως), όσο και σε ιστολογικά παρασκευάσματα. Όμως, όπως προκύπτει από τη συστηματική επισκόπηση και μετα-ανάλυση της βιβλιογραφίας, η έλειψη ομοφωνίας ανάμεσα στην επιστημονική κοινότητα σχετικά με το τι θεωρούμε θετικό αποτέλεσμα για τη p16 χρώση, ιδιαίτερα σε κυτταρολογικά δείγματα, είναι ίσως το σημαντικότερο εμπόδιο στην αξιολόγηση των πιθανών κλινικών εφαρμογών του δείκτη. Οι μελέτες που αξιολόγησαν το ρόλο της ανοσοχημικής χρώσης για p16 σε δείγματα από επιθηλιακά κύτταρα από τον τράχηλο της μήτρας, εξέτασαν διάφορες παραμέτρους της χρώσης, όπως πυρηνική έναντι σε κυτταροπλασματική χρώση, αριθμό κεχρωσμένων κυττάρων ή ένταση της χρώσης. Οι πιο πρόσφατες μελέτες όμως δεν δίνουν μεγάλη βαρύτητα στις προ-αναφερθείσες παραμέτρους. Αντιθέτως, λαμβάνουν υπόψη τη μορφολογία και όχι μόνο τον αριθμό των κυττάρων που εμφανίζουν υπερέκφραση του δείκτη.

Σε μία πρόσφατη μελέτη, οι ερευνητές προσπάθησαν να ανταποκριθούν στην πρόκληση της ερμηνείας της χρώσης για το σε κυτταρολογικά δείγματα προτάσσοντας ένα νέο σύστημα. Το νέο αυτό σύστημα βασίζεται στην αξιολόγηση του πυρηνικού σκορ (nuclear scoring: NS) σε LBC δείγματα (Wentzensen *et al* 2005). Αξιολογώντας το μέγεθος του πυρήνα και την αναλογία πυρήνα/κυτταροπλάσματος, καθώς και άλλα στοιχεία μορφολογίας του πυρήνα, οι συγγραφείς πρότειναν μία νέα ταξινόμηση για να περιγράψουν τα πλακώδη κύτταρα που επέδειξαν θετική χρώση για τον

δείκτη. Αφού πραγματοποιήσαν μια ενδελεχή εκτίμηση (Receiver Operator Curve analysis) των διαφόρων βαθμών θετικότητας για το p16, συμπέραναν ότι NS >2 παρουσιάζει την καλύτερη ευαισθησία και ειδικότητα από όλα τα άλλα συστήματα για την ανίχνευση CIN2+ (Wentzensen *et al* 2006). Το σημαντικότερο μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι προϋποθέτει αξιολόγηση των μορφολογικών κυτταρολογικών χαρακτηριστικών, η αναγνώριση των οποίων απαιτεί κατάλληλη εκπαίδευση και εμπειρία από την πλευρά των παθολογο-ανατόμων (Meyer *et al* 2007).

Ένας ιδανικός βιοδείκτης πρέπει να στηρίζεται σε υποκειμενικά κριτήρια όσο το δυνατό λιγότερο. Λαμβάνοντας υπόψη τις προαναφερθείσες επιφυλάξεις σχετικά με τη χρώση για το p16, προσπαθήσαμε να πραγματοποιήσουμε μία μετα-ανάλυση για να αξιολογήσουμε το ρόλο του δείκτη στην αντιμετώπιση των διαφόρων κυτταρολογικών και ιστολογικών αλλοιώσεων των πλακωδών κυττάρων του τραχήλου της μήτρας. Χρώση με p16 συσχετίζεται με το βαθμό της κυτταρολογικής ή ιστολογικής αλλοίωσης, αλλά κυρίως όσον αφορά στις υψηλού βαθμού αλλοιώσεις. Όσον αφορά στα ASCUS ή LSIL, η έκφραση του δείκτη δεν είναι ομοιόμορφη (Εικόνες 3 και 4).

Δεν υπήρξαν μελέτες που να εξετάσουν το δείκτη σε προγράμματα ΜΠΕ για τον καρκίνο του τραχήλου. Στη μελέτη από την Sahebalι και τους συνεργάτες της (Sahebalι *et al* 2004) τα κυτταρολογικά επιχρίσματα προέρχονταν από τυχαία επιλεγμένες γυναίκες που πήραν μέρος σε ΜΠΕ, αλλά μόνο αυτά που προέρχονταν

από γυναίκες που ήσαν θετικές για HPV είχαν χρώση για p16. Επιπροσθέτως, μόνο ένας μικρός αριθμός μελετών αξιολόγησαν το ρόλο του δείκτη στη διαλογή των LSIL και ASCUS επιχρισμάτων, έναντι στο τεστ HCII (Guo *et al* 2004; Nieh *et al* 2005; Meyer *et al* 2007; Monsonogo *et al* 2007). Υπάρχουν επίσης ενδείξεις ότι διάχυτη χρώση με p16 σε ιστολογικά δείγματα μπορεί να αποτελεί δείκτη κινδύνου εξέλιξης (Negri *et al* 2004; Wang SS *et al* 2004; Hariri *et al* 2007; Omori *et al* 2007), αλλά ο αριθμός των μελετών είναι επίσης πολύ μικρός για να επιτρέψει την ευρεία εφαρμογή του δείκτη στην κλινικές πράξη.

Κεφάλαιο 5

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗΣ

ΕΠΙΣΚΟΠΗΣΗΣ ΤΗΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑ-ΑΝΑΛΥΣΗΣ

- Η πλειονότητα των συγγραφέων που μελέτησαν το ρόλο της ανοσοχημικής χρώσης για το p16 εστίασαν το ενδιαφέρον τους στη σχέση μεταξύ του δείκτη και της βαθμίδος της κυτταρολογικής ή ιστολογικής αλλοίωσης
- Ο ρόλος του δείκτη ως μέσο μαζικού πληθυσμιακού ελέγχου, ή ως μέσο διαλογής της ASCUS ή LSIL κυτταρολογίας, έναντι του HPV-DNA, αποτέλεσε το αντικείμενο μελέτης μόνο ενός περιορισμένου αριθμού μελετών
- Οι ασυμφωνίες στην ερμηνεία της χρώσης με το δείκτη, τόσο στις κυτταρολογικές όσο και στις ιστολογικές μελέτες, ελάττωσε σε μεγάλο βαθμό τη δυνατότητα αναπαραγωγής των αποτελεσμάτων
- Τα αποτελέσματα των υπάρχουσων μελετών δε μας επιτρέπουν να καταλήξουμε σε απόλυτες συστάσεις σχετικά με τη χρησιμότητα του δείκτη στην κλινική πράξη
- Η ομοφωνία στην παρασκευή αλλά κυρίως στην ερμηνεία των δειγμάτων έχει

εξαιρετική σημασία και αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την αξιολόγηση των κλινικών εφαρμογών του δείκτη

- Μέθοδοι που χρησιμοποιούν μορφολογικές παραμέτρους (π.χ. το πυρηνικό σύστημα) για την αξιολόγηση του αποτελέσματος της ανοσοχημικής χρώσης χαρακτηρίζονται από υψηλή ειδικότητα
- Είναι απαραίτητο να εκτιμήσουμε το ρόλο του δείκτη σε συγκεκριμένα κλινικά σενάρια με σκοπό να απαντήσουμε κλινικά ερωτήματα
- Η ιδανική μελέτη προαπαιτεί συσχέτιση της χρώσης για το p16 με ιστολογικό υλικό, και τουλάχιστον διετή παρακολούθηση του εξεταζόμενου πληθυσμού, ώστε να είναι εφικτή η μελέτη της προγνωστικής αξίας του δείκτη

B. Προοπτική διαγνωστική μελέτη

p16 έναντι HPV DNA

στην αξιολόγηση της LSIL κυτταρολογίας

Κεφάλαιο 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το πρόγραμμα μαζικού κυτταρολογικού ελέγχου αποσκοπεί στην έγκαιρη διάγνωση και θεραπεία των προ-καρκινικών αλλοιώσεων από τον τράχηλο της μήτρας, και σαν αποτέλεσμα στην ελάττωση τόσο της συχνότητας όσο και της θνησιμότητας από την ασθένεια. Ενώ είναι κοινά αποδεκτό ότι οι γυναίκες με σοβαρές κυτταρολογικές αλλοιώσεις πρέπει να παραπεμφθούν άμεσα για κολποσκοπική εξέταση, ή ακόμη και θεραπεία, υπάρχει ασυμφωνία μεταξύ των κλινικών σχετικά με την αντιμετώπιση αυτών των γυναικών με χαμηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακές κυτταρολογικές αλλοιώσεις (LSIL). Οι LSIL αποτελούν περίπου το 4-7% όλων των κυτταρολογικών επιχρισμάτων που πραγματοποιούνται στην Αγγλία σε διάστημα ενός έτους (Cervical Screening England 2009). Η αντιμετώπισή τους αποτελεί πρόκληση γιατί, ενώ απασχολούν ένα μεγάλο μέρος του προσωπικού υγείας, η κλινική τους σημασία δεν είναι πλήρως εξακριβωμένη. Η πλειονότητα των LSIL αντιπροσωπεύουν κυτταρολογικές αλλοιώσεις περιορισμένης κλινικής σημαντικότητας, που είναι δυνατό να υποχωρήσουν χωρίς ανάγκη θεραπευτικής παρέμβασης. Υπάρχει όμως και ένας αριθμός LSIL δειγμάτων που εμφανίζονται σε γυναίκες με υψηλού βαθμού ιστολογική αλλοίωση (Walker *et al* 1986).

Οι υπάρχουσες μέθοδοι αντιμετώπισης της LSIL κυτταρολογίας είναι κυτταρολογική

παρακολούθηση ή απευθείας παραπομπή για κολποσκόπηση ή προσπάθεια διαλογής των υψηλόβαθμων αλλοιώσεων μέσω ανίχνευσης του DNA του ιού HPV. Κάθε μία από αυτές τις μεθόδους έχει σημαντικά μειονεκτήματα. Όπως είναι αναμενόμενο, ένας αριθμός γυναικών που ακολουθούν την οδό της κυτταρολογικής παρακολούθησης μόνο, δε θα επιστρέψουν για παρακολούθηση (Kyrgiou *et al* 2007). Αν λάβουμε υπόψην ότι έως και το 28% των γυναικών με LSIL κυτταρολογία έχουν τραχηλική ενδοεπιθηλιακή αλλοίωση (CIN) βαθμίδας 2 ή και 3 (Cox *et al* 2003), οι γυναίκες που δε θα είναι συνεπείς με την κυτταρολογική παρακολούθηση κινδυνεύουν να αναπτύξουν υψηλού βαθμού αλλοιώσεις. Όσον αφορά στις γυναίκες που παραπέμπονται για κολποσκοπική εξέταση, διατρέχουν τον κίνδυνο να υπερθεραπευτούν με δυσμενείς επιπτώσεις, ιδιαίτερα για τις γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας στις οποίες αφαιρετικές θεραπείες του τραχήλου της μήτρας αυξάνουν τον κίνδυνο πρόωρου τοκετού (Kyrgiou *et al* 2006; Arbyn *et al* 2008). Η πολυκεντρική τυχαίοποιημένη κλινική δοκιμή TOMBOLA έδειξε ότι, ενώ η συχνότητα ανίχνευσης CIN βαθμίδος 2 ή υψηλότερης (CIN2+) είναι αρχικά μεγαλύτερη στις γυναίκες που παραπέμπονται απευθείας για κολποσκόπηση, υπάρχει μόνο μικρή διαφορά στην αθροιστική συχνότητα εμφάνισής τους σε διάστημα τριών ετών, συγκριτικά με την κυτταρολογική παρακολούθηση (TOMBOLA 2009).

Ενας σημαντικός αριθμός μελετών και μοριακών δοκιμών έδειξαν ότι προσβολή από τον υψηλής επικινδυνότητας ιό του HPV (HR-HPV) είναι απαραίτητη, αλλά όχι και μοναδική προϋπόθεση για την ανάπτυξη της σημαντικής πλειονότητας των διηθητικών καρκίνων του

τραχήλου της μήτρας εκ του πλακώδους επιθηλίου (Walboomers *et al* 1999; Munoz *et al* 2000). Το τεστ για την ανίχνευση του HR-HPV DNA διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διαλογή των ASCUS κυτταρολογικών επιχρισμάτων που αντιστοιχούν σε υψηλού βαθμού αλλοιώσεις (Arbyn *et al* 2004), αλλά η αξία του στη διαλογή των LSIL δειγμάτων είναι υπό αμφισβήτηση, ειδικά για γυναίκες της αναπαραγωγικής ηλικίας (Arbyn *et al* 2005).

Πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν ότι βιολογικοί δείκτες που συσχετίζονται με λοίμωξη από HR-HPV μπορούν να χρησιμοποιηθούν σα μέσα διαλογής των LSIL επιχρισμάτων που αντιστοιχούν σε γυναίκες με CIN2+ ιστολογία, έτσι ώστε να αντισταθμίσουν για την έλλειψη ειδικότητας του HR-HPV DNA τεστ. Το p16 είναι ένας από τους βιολογικούς δείκτες που υπερεκφράζονται κατά τη διάρκεια μετατρεπτικής HPV λοίμωξης και συναθροίζεται στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα των προσβεβλημένων κυττάρων, καθιστώντας δυνατή την ανίχνευσή του με ανοσοχημικές μεθόδους (Wentzensen *et al* 2007; Tsoumprou *et al* 2009).

Αυτή η μελέτη αποσκοπεί στην αξιολόγηση του ρόλου του HR-HPV τεστ και της ανοσοχημικής χρώσης για το p16, καθώς επίσης και του ρόλου της ανίχνευσης των υποτύπων 16 ή 18 του ιού στην διαλογή γυναικών με LSIL κυτταρολογία που υποκρύπτουν CIN2+ ιστολογία. Επιπλέον, πραγματοποιήσαμε μία δευτερεύουσα ανάλυση με σκοπό να αξιολογήσουμε το ρόλο του p16 ως συμπληρωματικό τεστ στην αξιολόγηση HR-HPV θετικής LSIL κυτταρολογίας.

Κεφάλαιο 2

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

2.1. Πληθυσμός και σχεδιασμός μελέτης

Πραγματοποιήσαμε μία προοπτική διαγνωστική μελέτη που συμπεριέλαβε γυναίκες που προσήλθαν στο Τμήμα Κολποσκοπήσεως του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων με LSIL κυτταρολογία σε Παπ-τεστ ή LBC. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε το χρονικό διάστημα μεταξύ Οκτώβριο του 2008 έως Φεβρουάριο του 2010.

Εγκυμονούσες γυναίκες και αυτές που είχαν υποβληθεί σε εξαχνωτική ή καταστρεπτική θεραπεία του τραχήλου στο παρελθόν, απεκλείσθησαν από τη μελέτη. Για την πρωτογενή ανάλυση συμπεριελάβαμε μόνο γυναίκες από τις οποίες πήραμε βιοψίες κατά τη διάρκεια της κολποσκοπικής εξέτασης. Σε μία προσπάθεια αξιολόγησης του αντίκτυπου που είχε στα αποτελέσματα ο αποκλεισμός των γυναικών που δεν είχαν βιοψίες, επειδή η κολποσκόπηση ήταν φυσιολογική, πραγματοποιήσαμε μία δευτερεύουσα ανάλυση στην οποία συμπεριελάβαμε όλες τις γυναίκες που προσήλθαν για κολποσκοπική εξέταση για LSIL κυτταρολογία, και υποθέσαμε ότι αυτές που δεν είχαν βιοψίες δεν είχαν ιστολογική αλλοίωση.

Κυτταρολογία υγρής φάσεως (LBC) απεκτήθη από όλες τις γυναίκες που πήραν μέρος στη μελέτη με Rovers™ Cervex-brush και τοποθετήθηκε σε διάλυμα PreservCyt πριν από την κολποσκοπική εξέταση. Το δείγμα χρησιμοποιήθηκε για ανοσοχημική χρώση με p16 και για HPV DNA τεστ. Δύο έμπειροι ιατροί πραγματοποίησαν όλες τις κολποσκοπήσεις αγνοώντας τα αποτελέσματα του κάθε τεστ.

Οι γυναίκες με φυσιολογική κολποσκόπηση δεν είχαν βιοψίες και παραπέμφθηκαν για επαναληπτική κυτταρολογική και κολποσκοπική εξέταση σε έξι μήνες. Ο πληθυσμός των γυναικών με χαμηλού βαθμού (low-grade) κολποσκόπηση είχαν, κολποσκοπικά καθοδηγούμενες μία ή πολλαπλές βιοψίες, ή LLETZ βιοψία. Η LLETZ θεωρείται ως το απόλυτο κριτήριο για αξιόπιστη ιστολογική διάγνωση, καθώς περιλαμβάνει τη ζώνη μετατροπής του τραχήλου και γι' αυτό το λόγο είναι προτιμότερη από πολλαπλές βιοψίες, σε γυναίκες που έχουν ολοκληρώσει την οικογένειά τους. Όλες οι γυναίκες με υψηλού βαθμού (high-grade) κολποσκόπηση είχαν βιοψίες. Η υποκατηγορία των γυναικών με low-grade κολποσκόπηση που δεν είχαν βιοψίες, παραπέμφθηκε για παρακολούθηση στην κολποσκοπική κλινική σε έξι μήνες με επαναληπτική κυτταρολογία. Εμπειροί παθολογοανατόμοι που αγνοούσαν τα αποτελέσματα του HPV και p16 τεστ, αξιολόγησαν τις βιοψίες.

Το αντικείμενο της μελέτης ήταν η ευαισθησία και ειδικότητα του τεστ για HR-HPV στο να

ανιχνεύει τον πληθυσμό των LSIL επιχρισμάτων που έχουν βιοψία CIN2+. Επίσης αξιολογήσαμε το ρόλο της ανίχνευσης των υποτύπων 16 και 18 του HPV και της ανοσολογικής χρώσης για το p16 στη διαλογή του LSIL. Τέλος, αξιολογήσαμε το p16 σα μέσο διαλογής των HR-HPV (+) LSIL δειγμάτων για CIN2+ ιστολογία.

2.2. HPV DNA τεστ

Το DNA απεκτίθει από τραχηλικά κυτταρικά επιχρίσματα χρησιμοποιώντας το σκεύασμα Purelink, Invitrogen. Η ανίχνευση των διαφόρων τύπων του HPV ιού πραγματοποιήθηκε με PCR με την τεχνολογία CLART® (Clinical Array Technology) Human Papillomavirus 2 Kit. Η τεχνική που βασίζεται στην αναπαραγωγή ειδικών τμημάτων του ιϊκού γονιδιώματος και υβριδοποίησή τους με ειδικές αλληλουχίες για κάθε τύπο του HPV, χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση λοιμώξεων και συλλοιμώξεων με έως και 35 HPV γενότυπους. Η μέθοδος αξιολόγησε τους ακόλουθους υψηλής επικινδυνότητας τύπους του ιού: 16,18,26,31,33,35,39,43,45,51,52,53,56,58,59,66,68,70,73,82, και 85, και της χαμηλής επικινδυνότητας HPV τύπους 6,11,40,42,44,54,61,62,71,72,81,83,84 και 89, στον ίδιο δοκιμαστικό σωλήνα (Dunne *et al*/2007).

2.3. Ανοσοκυτταρολογία για p16

Τα δείγματα LBC απεκτήθησαν πριν από την κολποσκοπική εξέταση και τοποθετήθηκαν σε PreservCyt φιαλίδιο. Τα φιαλίδια εστάλησαν στο εργαστήριο και από αυτά προήλθαν τα ThinPrep δείγματα χρησιμοποιώντας τον ThinPrep αυτόματο παρασκευαστή 2000 (Cytoc Corporation, Marlborough, MA, US). Στα πρώτο δείγμα χρησιμοποιήσαμε χρώση Παπανικολάου και στο δεύτερο ανοσοχημική χρώση για το p16, η οποία πραγματοποιήθηκε με CINtec αντιδραστήριο χρησιμοποιώντας τον αυτοματοποιημένο “Dako Autostainer Universal Slide Stainer”. Όλα τα δείγματα είχαν επίσης χρωσθεί με αιματοξυλίνη για να είναι δυνατή η αξιολόγηση του πυρήνα. Η μέθοδος CINtec προκαλεί μία 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. Όλα τα δείγματα αξιολογήθηκαν από ειδικούς κυτταρολόγους με εμπειρία στις ανοσοχημικές τεχνικές, ακολουθώντας συγκεκριμένες οδηγίες από τον κατασκευαστή. Βάσει αυτών των οδηγιών, η ένταση της χρώσης δε θεωρείται κριτήριο θετικότητας, ενώ η παρουσία χρώσης σε δυσκαρυωτικά (και όχι δυσπλαστικά) κύτταρα αποτελεί θετικό αποτέλεσμα. Δείγματα που δεν εμφάνισαν καφέ χρώση των τραχηλικών κυττάρων, θεωρήθηκαν αρνητικά. Αντιθέτως, η ύπαρξη καφέ χρώσης των τραχηλικών κυττάρων και η ύπαρξη μορφολογικών πυρηνικών αλλοιώσεων, απετέλεσαν τα κριτήρια για να θεωρηθεί ένα δείγμα θετικό, ακόμη και όταν οι προαναφερθείσες προϋποθέσεις αφορούσαν σε ένα μόνο δυσκαρυωτικό κύτταρο. Από την άλλη πλευρά, καφέ χρώση των μεταπλαστικών ή φυσιολογικών ενδοτραχηλικών κυττάρων, δε θεωρήθηκε θετικό αποτέλεσμα.

Χρησιμοποιήσαμε σα θετικό έλεγχο ThinPrep δείγματα από HSIL πληθυσμό που είχαν βιοψία CIN2+ και είχαν χρωσθεί θετικά για το p16.

2.4. Στατιστική ανάλυση

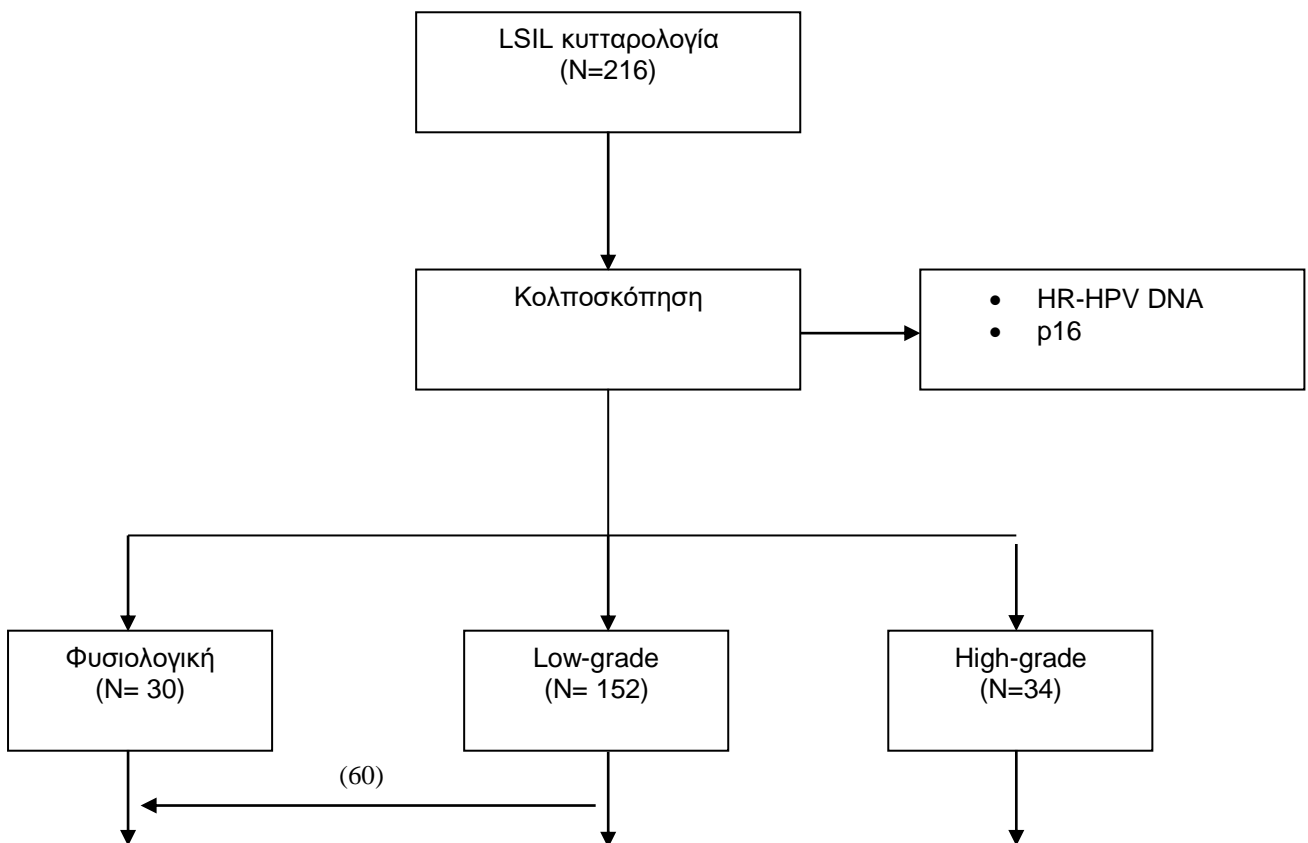
Αξιολογήσαμε τις στατιστικές παραμέτρους π.χ. ευαισθησία (S), ειδικότητα (Sp), θετική προγνωστική αξία (PPV) και αρνητική προγνωστική αξία (NPV) του HR-HPV, HPV16 ή HPV18 και του p16, βάσει της δυνατότητας του κάθε τεστ να ανιχνεύσει τα LSIL κυτταρολογικά δείγματα που αντιστοιχούν σε πληθυσμό με CIN2+ βιοψία. Επίσης, αξιολογήσαμε το ρόλο της ανοσοχημικής χρώσης για το p16 σαν ένα τεστ συμπληρωματικό του HR-HPV για τα LSIL δείγματα. Η στατιστική σημαντικότητα υπολογίσθηκε με το McNemar exact τεστ ή το Chi-square τεστ με διόρθωση κατά Yates. Θεωρήσαμε στατιστικά σημαντικά τα αποτελέσματα με p-value <0.05.

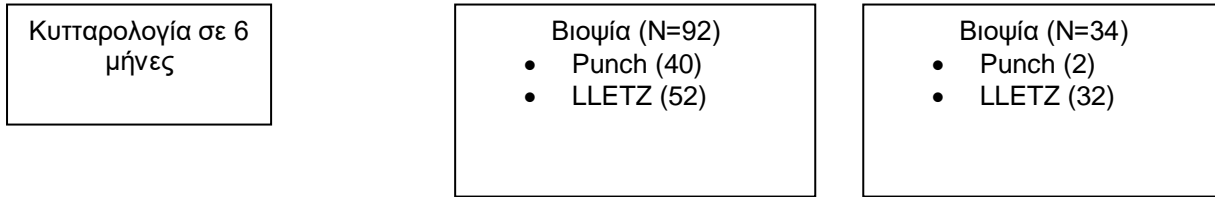
Κεφάλαιο 3

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Ενας πληθυσμός 216 γυναικών παραπέμφθησαν για κολποσκοπική εξέταση με LSIL κυτταρολογίας. Ανάμεσά τους υπήρξαν 30 γυναίκες με φυσιολογική κολποσκόπηση που αποκλείσθησαν από τη μελέτη, καθώς δεν υπήρξε ένδειξη για λήψη ιστολογικού υλικού. Επίσης, αποκλείσαμε 60 γυναίκες με low-grade κολποσκόπηση από τις οποίες δεν ελήφθη ιστολογικό υλικό. Συμπεριελάβαμε μόνο τις 126 γυναίκες που είχαν τραχηλική βιοψία υπό κολποσκοπική παρακολούθηση. Τα χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης, καθώς και του τύπου των βιοψιών παρουσιάζονται αναλυτικά στο εικόνα 1. Η πλειοψηφία (94%) των γυναικών με high-grade κολποσκόπηση είχαν LLETZ βιοψίες, ενώ το 43% των γυναικών με low-grade κολποσκόπηση είχαν πολλαπλές punch βιοψίες και οι υπόλοιπες 57% είχαν LLETZ βιοψίες.

Εικόνα 1 Πληθυσμός μελέτης





Τα δημογραφικά χαρακτηριστικά των 126 γυναικών της μελέτης παρουσιάζονται στον Πίνακα 1. Η πλειονότητα των γυναικών (90%) ήταν άνω των 25 ετών και είχαν ήδη τεκνοποιήσει (64%).

Στον πίνακα 2 παρουσιάζουμε τη σχέση μεταξύ LSIL κυτταρολογίας και ιστολογικής διάγνωσης σε 126 ασθενείς από τις οποίες ελήφθη βιοπτικό υλικό. Η πλειοψηφία των δειγμάτων (61.5%) αντιστοιχούν σε χαμηλού βαθμού ιστολογικές αλλοιώσεις (CIN1 ή λιγότερο).

Όλα τα LSIL δείγματα συσχετίστηκαν με το αποτέλεσμα του βιοπτικού υλικού που απεκτήθη

στην κλινική κολποσκοπήσεως. Η συσχέτιση μεταξύ ιστολογικής διάγνωσης, HR-HPV και p16 παρουσιάζεται στον πίνακα 3. Στη συνέχεια αξιολογήσαμε τις στατιστικές παραμέτρους κάθε τεστ χωριστά, καθώς και τις στατιστικές παραμέτρους των HPV16 ή HPV18 υποτύπων στο να ανιχνεύουν τα LSIL δείγματα που αντιστοιχούν σε CIN2+ ιστολογία (Πίνακας 4). Το HR-HPV τεστ επέδειξε στατιστικά σημαντικότερη υψηλότερη ευαισθησία σε σχέση με την ανοσολογική χρώση για το p16 ($p=0.0037$). Από την άλλη πλευρά, το p16 επέδειξε στατιστικά σημαντικά υψηλότερη ειδικότητα σε σχέση με το τεστ για HR-HPV ($p=0.0000$).

Στη συνέχεια αξιολογήσαμε το ρόλο της ανοσολογικής χρώσης για το p16 στην αξιολόγηση 64 LSIL δειγμάτων θετικών για HR-HPV. Η προσθήκη p16 ανοσολογικής χρώσης σε HR-HPV θετική LSIL κυτταρολογία οδήγησε σε βελτίωση της ειδικότητας του HR-HPV τεστ (73% έναντι 64%), η διαφορά όμως δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($p=0.61$). Παρατηρήσαμε όμως μία σημαντική απώλεια στην ευαισθησία του τεστ (39% έναντι 75%) ($p=0.0019$).

Τέλος, προκειμένου να αξιολογήσουμε της επίδραση του αποκλεισμού των γυναικών που δεν είχαν βιοψία στο τελικό αποτέλεσμα, πραγματοποιήσαμε μία επιπλέον ανάλυση στην οποία συμπεριλάβαμε όλες τις 216 γυναίκες που παραπέμφθησαν για κολποσκόπηση λόγω LSIL κυτταρολογίας (Table 5). Αν υποθέσουμε ότι οι 90 γυναίκες που δεν είχαν βιοψία από τον τράχηλο της μήτρας κατά την κολποσκοπική εξέταση, δεν είχαν σημαντικές ιστολογικές αλλοιώσεις (π.χ. είχαν ιστολογία \leq CIN1), οι στατιστικές παράμετροι για κάθε τεστ παρουσιάζονται στον πίνακα 5. Συμπερασματικά, παρόλο που δεν παρατηρείται αλλαγή

στην ευαισθησία του τεστ, η ειδικότητα αυξάνεται; 75% έναντι 64% για το HR-HPV και 92% έναντι 90% για την ανοσοκυτταρολογική χρώση για το p16.

Πίνακας 1 Χαρακτηριστικά των 126 γυναικών από τις οποίες απεκτήθησαν βιοψίες

Παράμετροι	Αριθμός γυναικών (%)
Ηλικία	
18-24	12(10%)
25-35	67 (53%)
≥ 36	47 (37%)
Αριθμός σεξουαλικών συντρόφων	
0-5	101 (80%)
≥6	25 (20%)
Κάπνισμα	
Ναι	44 (35%)
Όχι	82 (65%)
Αριθμός τέκνων	
0	45 (36%)
≥1	81 (64%)

Πίνακας 2 Συσχέτιση μεταξύ κυτταρολογίας και ιστολογίας

Κυτταρολογία	Σύνολο	Ιστολογία			
		Φυσιολογική	CIN1, HPV	CIN2	CIN3
LSIL	126	12 (9.5%)	66 (52%)	36 (29%)	12 (9.5%)

Table 3 Συσχέτιση μεταξύ HR-HPV και p16 με ιστολογική διάγνωση σε 126 LSIL δείγματα

Ιστολογία	Αποτέλεσμα	Τεστ	
		HR-HPV	p16
≤CIN1 (n=78)	(+)	28	8
	(-)	50	70
≥CIN2 (n=48)	(+)	36	20
	(-)	12	28

Table 4 Στατιστικές παράμετροι για HR-HPV και p16 σε 126 LSIL δείγματα για ιστολογία CIN2+

	HR-HPV	p16	HPV16/18	p-value (HR-HPV / p16)
Ευαισθησία	75%	44%	42%	0.0037*
Ειδικότητα	64%	89%	90%	0.0000*
PPV	56%	73%	71%	0.62**
NPV	81%	71%	71%	0.71**

*McNemar paired test, ** Chi-square test

Table 5 Στατιστικές παράμετροι για HR-HPV έναντι συνδυασμού HR-HPV και p16 για CIN2+ ιστολογία

	HR-HPV	HR-HPV and p16	p-value*
Ευαισθησία	75%	39%	0.0019
Ειδικότητα	64%	73%	0.61
PPV	56%	70%	0.4
NPV	81%	42%	0.0002

*Chi-square test,

Κεφάλαιο 4

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Αυτή η εργασία αποτελεί μια προσπάθεια αξιολόγησης του ρόλου της ανίχνευσης του HR-HPV μέσω της δοκιμασίας PCR, της ανοσολογικής χρώσης για το p16, καθώς και των συνδυασμών τους, στην αντιμετώπιση της LSIL κυτταρολογίας. Η δοκιμασία PCR είναι μία δοκιμασία ανίχνευσης του HPV εναλλακτική του συστήματος Hybrid Capture II (HC-II; Digene Corp., Gaithersburg, MD). Το Hybrid capture II (HC-II) είναι μία τεχνική που σχεδιάστηκε με σκοπό την ανίχνευση χαμηλού και υψηλού κινδύνου HPV υποτύπων αλλά σε αντίθεση με τη δοκιμασία PCR δεν διακρίνει τον τύπο του ιού. Παρόλο που το HC-II είναι ένα τεστ που εφαρμόζεται παγκοσμίως, δεν αξιολογεί εάν η λοίμωξη από τον ιό HPV είναι η

δεύτερη, τρίτη ή μία μεταγενέστερη λοίμωξη με τον ίδιο τύπο HPV που έδωσε θετικό αποτέλεσμα στην πρώτη εξέταση. Επίσης, το τεστ HC-II απαιτεί έναν σχετικά αυξημένο όγκο του PreserveCyt για να αυξήσει την αξιοπιστία της μεθόδου κάνοντας αδύνατη την πραγματοποίηση συμπληρωματικών τεστ στο ίδιο δείγμα. Η μέθοδος CLART® Human Papillomavirus 2 Kit που χρησιμοποιήθηκε για αυτή την μελέτη απαιτεί λιγότερη από τη μισή ποσότητα του δείγματος σε σχέση με τη μέθοδο HC-II.

Οι ερευνητές αποσκοπούν όχι μόνο στην ανίχνευση του ιού του HPV και των υποτύπων του, αλλά επίσης και στην ανάπτυξη τεχνολογιών που θα ανιχνεύσουν βιολογικούς δείκτες που σχετίζονται με τα διάφορα στάδια της λοίμωξης από τον ιό HPV έτσι ώστε να βελτιώσουν το αποτέλεσμα των συμβατικών διαγνωστικών τεχνικών. Η ανοσολογική χρώση για το p16 έχει προταθεί σαν αντιστάθμισμα για την έλλειψη ειδικότητας του HPV DNA τεστ και θα μπορούσε να αποτελεί ένα συμπληρωματικό τεστ ρουτίνας (Klaes *et al* 2001). Υπό φυσιολογικές συνθήκες το p16 αδρανοποιεί τις cyclin-dependent kinases CDK4/6. Κατά μία μετατρεπτική λοίμωξη από λοίμωξη με HR-HPV, τα ιοικά ογκογονίδια E6 και E7 διαδραματίζουν πρωταρχικό ρόλο στη διαδικασία της αποπτώσεως και της ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου. Σημαντικός είναι ο ρόλος της πρωτεΐνης E7 που αναστέλει την σύνδεση της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος (pRb) με το μετατραπτικό παράγοντα E2F με αποτέλεσμα την προώθηση του κυτταρικού κύκλου, μία μοριακή διαδικασία που συνήθως ενεργοποιείται από την CDK4/6. Τα προσβαλλόμενα κύτταρα εκφράζουν τον δείκτη p16 σαν αντιστάθμιση για την διαταραγμένη κυτταρική λειτουργία; όμως, καθώς ο παράγοντας E2F

δεν απελευθερώνεται μέσω της ενεργοποίησης της δράσης της CDK4/6, αλλά μέσω της E7, η έκφραση του p16 δεν διαδραματίζει κάποιο ρόλο στη διαδικασία της κυτταρικής ενεργοποίησης. Με το χρόνο το p16 συγκεντρώνεται στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα των προσβεβλημένων κυττάρων και μπορεί να ανιχνευθεί με ανοσολογική χρώση (Wentzensen *et al* 2007).

Η έλλειψη κοινά αποδεκτού τρόπου αντιμετώπισης των LSIL επιχρισμάτων αποτελεί πηγή ανησυχίας τόσο για την ιατρική κοινότητα, όσο και για τις γυναίκες. Προσπαθώντας να βελτιώσουμε την αξιοπιστία της μελέτης, τα αποτελέσματα του τεστ HR-HPV, καθώς και της ανοσολογικής χρώσης για το p16, συσχετίστηκαν με το gold standard της μελέτης, δηλαδή το βιοπτικό υλικό από τον τράχηλο της μήτρας που ελήφθει υπό κολποσκοπική καθοδήγηση. Είναι κατανοητό ότι η αναπαραγωγισιμότητα της LSIL κυτταρολογίας δεν είναι 100% και είναι πιθανό τα δείγματα που εξετάστηκαν να ανταποκρίνονταν σε υψηλότερου βαθμού βλάβες. Αυτό θα μπορούσε να εξηγήσει γιατί η συχνότητα εμφάνισης CIN2+ στον πληθυσμό υπό μελέτη ήταν υψηλότερη από τη συνήθως αναφερόμενη. Η υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης του CIN2+ μπορεί επίσης να οφείλεται στο γεγονός ότι στην πρωταρχική ανάλυση συμπεριελάβαμε μόνο γυναίκες που είχαν βιοψίες υπό κολποσκοπική παρακολούθηση, βασιζόμενοι στα κολποσκοπικά ευρήματα. Επιπροσθέτως, μία σημαντική ομάδα συμμετεχόντων είχαν LLETZ βιοψία, με αποτέλεσμα να αυξάνεται σε μεγαλύτερο βαθμό η πιθανότητα ανίχνευσης CIN2+.

Η μελέτη έδειξε ότι το τεστ HR-HPV έχει χαμηλή ευαισθησία (75%) και ειδικότητα 64% στο να ανιχνεύει αυτά τα LSIL δείγματα που αντιστοιχούν σε CIN2+ ιστολογία. Συμπεριλαμβάνοντας γυναίκες που δεν είχαν βιοψία, η ειδικότητα του τεστ αυξάνει στο 74% και η NPV στο 91%. Ο ρόλος του HR-HPV στη διαλογή της LSIL κυτταρολογίας αποτέλεσε το αντικείμενο της μελέτης TOMBOLA που έδειξε ότι η ευαισθησία του HR-HPV στην ανίχνευση των LSIL δειγμάτων που αντιστοιχούν σε CIN2+ ιστολογία, ήταν 75.2% και η ειδικότητα 46.9% (TOMBOLA *et al* 2009). Επίσης, το τεστ για τους HPV16/18 υποτύπους δεν είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί σα μοναδικό τεστ γιατί έχει πολύ χαμηλή ευαισθησία (44%).

Η ανοσολογική χρώση για το p16 έδειξε χαμηλή ευαισθησία στη διαλογή της LSIL κυτταρολογίας που αντιστοιχεί σε γυναίκες με υψηλού βαθμού αλλοιώσεις (42%), αλλά η ειδικότητά της ήταν εφάμιλλη του τεστ για HPV16/18 (90%). Η χρήση του p16 ως μεθόδου διαλογής της HR-HPV θετικής LSIL κυτταρολογίας, επέδειξε την αναμενόμενη απώλεια στην ευαισθησία, σε σχέση με το τεστ για HR-HPV, όμως το κέρδος στην ειδικότητα δεν ήταν σημαντικό. Τα ευρήματα για το ρόλο του p16 στην αξιολόγηση της LSIL κυτταρολογίας είναι αντικρουόμενα. Η ευαισθησία του δείκτη κυμαίνεται μεταξύ 28% (Monsonogo *et al* 2007) έως 92.2% (Denton *et al* 2010) και η ειδικότητα από 37.3% (Denton *et al* 2010) έως 86% (Valasoulis *et al* 2011). Οι ασυμφωνίες που παρατηρούνται στις στατιστικές παραμέτρους του p16 ανάμεσα στις διάφορες μελέτες οφείλονται σε μεγάλο βαθμό στους διάφορους τρόπους ερμηνείας της ανοσολογικής χρώσης ανάμεσα στους διάφορους μελετητές. Οι κλινική χρησιμότητα του δείκτη επηρεάζεται από την έλλειψη κοινά αποδεκτής μεθοδολογίας.

Στη μελέτη μας θεωρήσαμε σα θετικό αποτέλεσμα την παρουσία θετικής χρώσης για το p16 σε δυσκαρυωτικά κύτταρα με χρωσμένο τον πυρήνα ή/και το κυτταρόπλασμα. Αναγνωρίζουμε όμως ότι η μορφολογική αξιολόγηση των p16-χρωσμένων κυττάρων μπορεί να είναι δύσκολη και όχι πάντα αντικειμενική. Η μελέτη από το Denton και τους συνεργάτες του (Denton *et al* 2010) έδειξε τις σημαντικές διαφορές στην ερμηνεία της ανοσολογικής χρώσης για το p16 μεταξύ των παρασκευαστών και των κυτταρολόγων. Η ευαισθησία του p16 στη LSIL κυτταρολογία για CIN2+ ήταν 92.2% για τους παρασκευαστές και 80.1% για τους κυτταρολόγους. Η μελέτη έδειξε πολύ χαμηλότερη ειδικότητα σε σχέση με τα δικά μας αποτελέσματα για το p16 στην LSIL κυτταρολογία (37.3% για τους παρασκευαστές και 53.3% για τους κυτταρολόγους).

Κεφάλαιο 5

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΠΡΟΟΠΤΙΚΗΣ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

- Η ιδανική μέθοδος διαλογής της LSIL κυτταρολογίας που αντιστοιχεί σε CIN2+ ιστολογία θα πρέπει να στηρίζεται όσο το δυνατόν λιγότερο σε υποκειμενικά κριτήρια
- Τα αποτελέσματα της προοπτικής μελέτης που παρουσιάσαμε υποστηρίζουν την υπεροχή του p16, ως προς την ειδικότητα του δείκτη, σε σχέση με το HR-HPV, για την αξιολόγηση της LSIL κυτταρολογίας

- Η χαμηλή ευαισθησία του p16, και η έλλειψη κοινά αποδεκτού τρόπου ερμηνείας της ανοσοχημικής χρώσης, αποτελούν σημαντικά εμπόδια στην υιοθέτησή του ως ανεξάρτητης μεθόδου αξιολόγησης της LSIL κυτταρολογίας
- Νέοι βιολογικοί δείκτες που θα εξετασθούν παράλληλα ή ανεξάρτητα από το p16 και το HR-HPV τεστ, είναι δυνατό να συμβάλλουν περαιτέρω στην αντιμετώπιση των γυναικών με LSIL κυτταρολογία

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΗΝ ΕΛΛΗΝΙΚΗ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η σημαντική πρόοδος που έχει σημειωθεί στον τομέα πρόληψης ενάντια στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στην κατανόηση της συσχέτισής του με χρόνια λοίμωξη από τον ιό των ανθρωπίνων κονδυλωμάτων (HPV) . Βιολογικοί δείκτες, που σχετίζονται με τη λοίμωξη από τον ιό HPV, είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν για την

αξιολόγηση των τραχηλικών κυτταρολογικών δειγμάτων. Η πρωτεΐνη p16 αποτελεί έναν από τους πολλά υποσχόμενους δείκτες.

ΣΤΟΧΟΣ

Ο στόχος αυτής της διατριβής ήταν η κριτική και εν τω βάθει αξιολόγηση των μελετών που εξέτασαν το ρόλο του p16, τόσο σε κυτταρολογικά όσο και σε ιστολογικά δείγματα από τον τράχηλο της μήτρας. Συγκεκριμένα, θέλησαμε να εκτιμήσουμε τις πρακτικές παραμέτρους της χρήσης του δείκτη και να διερευνήσουμε τις πιθανές κλινικές εφαρμογές του, όπως τον ρόλο του ως μέσο μαζικού πληθυσμιακού ελέγχου και ως μέσο διαλογής των χαμηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακών κυτταρολογικών αλλοιώσεων (LSIL). Τέλος, αφού λάβαμε υπόψη τα συμπεράσματα από τη συστηματική ανασκόπηση και μετα-ανάλυση της βιβλιογραφίας, πραγματοποιήσαμε μία προοπτική διαγνωστική μελέτη. Η μελέτη αυτή αποτέλεσε μία επιπλέον προσπάθεια αξιολόγησης του ρόλου του p16 από μόνου του ή σε συνδυασμό με το HPV τεστ στη διαλογής της LSIL κυτταρολογίας που αντιστοιχεί σε CIN2+ ιστολογία.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Πραγματοποιήσαμε μία συστηματική ανασκόπηση και μετα-ανάλυση της βιβλιογραφίας που μελέτησε το ρόλο της ανοσοχημείας για το p16 σε πλακώδη κυτταρολογικά ή ιστολογικά δείγματα από τον τράχηλο της μήτρας. Για τη περαιτέρω αξιολόγηση του δείκτη

πραγματοποιήσαμε μία προοπτική διαγνωστική μελέτη που συμπεριέλαβε γυναίκες που προσήλθαν στο Τμήμα Κολποσκοπήσεως του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων με LSIL κυτταρολογία σε Παπ-τεστ ή LBC. Το αντικείμενο της μελέτης ήταν η ευαισθησία και ειδικότητα του p16 και του HR-HPV στην ανίχνευση των LSIL δειγμάτων που έχουν βιοψία CIN2+. Τέλος, αξιολογήσαμε το p16 ως μέσο διαλογής των HR-HPV(+) LSIL δειγμάτων που έχουν CIN2+ ιστολογία. Προσπαθώντας να βελτιώσουμε την αξιοπιστία της μελέτης, τα αποτελέσματα τόσο του τεστ HR-HPV, καθώς και της ανοχημικής χρώσης για το p16, συσχετίστηκαν με βιοπτικό υλικό από τον τράχηλο της μήτρας που ελήφθει υπό κολποσκοπική καθοδήγηση και αποτέλεσε το gold standard της μελέτης.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η ηλεκτρονική αναζήτηση της βιβλιογραφίας ανέδειξε 61 μελέτες οι οποίες θεωρήθηκαν κατάλληλες για περαιτέρω ανασκόπηση. Μία από τις σημαντικότερες παρατηρήσεις ήταν ότι δεν υπήρξε ομοφωνία μεταξύ των ερευνητών σχετικά με το τι καθιστά θετικό αποτέλεσμα της ανοσοχημικής χρώσης για το p16. Οι μελέτες που αξιολόγησαν το ρόλο της χρώσης για το δείκτη σε δείγματα από επιθηλιακά κύτταρα από τον τράχηλο της μήτρας εξέτασαν διάφορες παραμέτρους της χρώσης, όπως πυρηνική έναντι κυτταροπλασματική χρώση, αριθμό κεχρωσμένων κυττάρων ή ένταση της χρώσης. Οι πιο πρόσφατες μελέτες όμως δεν δίνουν μεγάλη βαρύτητα στις προ-αναφερθείσες παραμέτρους, αλλά λαμβάνουν υπόψη κυρίως τη μορφολογία των κυττάρων που εμφανίζουν υπερέκφραση του δείκτη. Η πλειοψηφία των

ιστολογικών μελετών υιοθέτησε την ταξινόμηση την προτεινόμενη από τον Klaes και τους συνεργάτες του (Klaes *et al* 2001).

Αφού λάβαμε υπόψην τις προαναφερθείσες ασυμφωνίες σχετικά με την ερμηνεία της χρώσης για το δείκτη p16, υπολογίσαμε, και στη συνέχεια απεικονίσαμε τη μέση τιμή του ποσοστού των κυτταρολογικών και ιστολογικών δειγμάτων που ήταν θετικά για το δείκτη, ανάλογα με τη βαθμίδα αλλοίωσης. Η ανάλυσή μας έδειξε ότι το ποσοστό, τόσο των κυτταρολογικών, όσο και των ιστολογικών δειγμάτων θετικών για το p16, αυξάνει με τη βαθμίδα αλλοίωσης. Ο ρόλος του δείκτη στη διαλογή των LSIL και ASCUS επιχρισμάτων έναντι στο τεστ HCII, αξιολογήθηκε από μόνο ένα μικρό αριθμός μελετών (Guo *et al* 2004; Nieh *et al* 2005; Meyer *et al* 2007; Monsonego *et al* 2007), ενώ δεν υπήρξαν μελέτες που να εξετάσουν το δείκτη σε προγράμματα μαζικού πληθυσμιακού ελέγχου για τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας.

Όσον αφορά στη προοπτική διαγνωστική μελέτη, συμπεριελάβαμε 126 γυναίκες που είχαν τραχηλική βιοψία υπό κολποσκοπική παρακολούθηση. Θεωρήσαμε σα θετικό αποτέλεσμα την παρουσία θετικής χρώσης για το p16 σε δυσκαρυωτικά κύτταρα με χρωσμένο τον πυρήνα ή/και το κυτταρόπλασμα. Η μελέτη έδειξε ότι το τεστ HR-HPV έχει χαμηλή ευαισθησία (75%) και ειδικότητα (64%) να ανιχνεύει LSIL δείγματα που αντιστοιχούν σε CIN2+ ιστολογία. Η ανοσοχημική χρώση για p16 έδειξε χαμηλή ευαισθησία στη διαλογή της LSIL κυτταρολογίας που αντιστοιχεί σε γυναίκες με υψηλού βαθμού αλλοιώσεις (42%), αλλά η ειδικότητά της ήταν εφάμιλλη του τεστ για HPV16/18 (90%). Η χρήση του p16 ως μέθοδος

διαλογής της HR-HPV θετικής LSIL κυτταρολογίας, επέδειξε την αναμενόμενη απώλεια στην ευαισθησία σε σχέση με το τεστ για HR-HPV, όμως το κέρδος στην ειδικότητα δεν ήταν σημαντικό.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η έκφραση του δείκτη p16 σχετίζεται με τη βαθμίδα κυτταρολογικής ή ιστολογικής αλλοίωσης αλλά μόνο ένας περιορισμένος αριθμός μελετών αξιολόγησαν τις κλινικές εφαρμογές του δείκτη. Το σημαντικότερο εμπόδιο στην ευρύτερη εφαρμογή του p16 είναι η ασυμφωνία μεταξύ των μελετητών σχετικά με το τι καθιστά θετικό αποτέλεσμα.

Η προοπτική μελέτη που δειξάγαμε, υποστηρίζει την υπεροχή του p16 ως προς την ειδικότητά του, σε σχέση με το HR-HPV για την αξιολόγηση της LSIL κυτταρολογίας. Όμως, η χαμηλή ευαισθησία του δείκτη και η έλλειψη κοινά αποδεκτού τρόπου ερμηνείας της ανοσοχημικής χρώσης, αποτελούν σημαντικά εμπόδια στην υιοθέτησή του ως ανεξάρτητης μεθόδου αξιολόγησης της LSIL κυτταρολογίας. Νέοι βιολογικοί δείκτες που θα εξετασθούν παράλληλα ή ανεξάρτητα από την ανοσοχημική χρώση για το p16 ή το τεστ για HR-HPV, είναι δυνατό να συμβάλλουν στην βελτίωση της αντιμετώπισης των γυναικών με LSIL κυτταρολογία.

SUMMARY

The role of p16 in the pathology of the lower genital tract

Medical Thesis

Ioanna Tsoumpou, M.D.

INTRODUCTION

The introduction of human papillomavirus (HPV) DNA testing in clinical practice raised hopes for further improvements in the efficacy of the primary screening, triage and post-treatment surveillance. Randomized clinical trials have demonstrated that HPV testing can be efficiently integrated into primary screening, either as an adjunct to cytology or as a sole primary test (Naucler *et al* 2007; Ronco *et al* 2006). It has also been shown that HPV DNA testing can be used to triage women with equivocal cytological abnormalities (Arbyn *et al*

2004) and that it has a potential role in identifying women at risk of residual or recurrent disease after treatment for CIN (Paraskevaidis *et al* 2004; Arbyn *et al* 2005). However, it fails in the triage of low-grade lesions (Arbyn *et al* 2005) and even if implemented as a primary screening test, it would be necessary to have a more disease specific triage marker to identify women that would need to undergo colposcopy. Furthermore, a single HPV DNA test although it could confirm infection by the virus, present in 99% of all cervical cancers (Walboomers *et al* 1999), it does not discriminate between transient and chronic infection. The discrimination between the two types of infection is crucial as it is the persistent infection that predisposes to progression to cervical neoplasia and not the transient one (Ho *et al* 1998).

Research nowadays is focused on the development of objective biomarkers that can distinguish transforming from productive HPV infections and predict disease severity. The cellular tumor suppressor protein p16^{INK4a} (p16) has been identified as a biomarker for transforming HPV infections. Physiologically, p16 blocks the activity of cyclin-dependent kinases CDK4/6. In a transforming HPV infection the viral oncogenes E6 and E7 interfere substantially with apoptosis and cell cycle regulation. Most importantly, E7 disrupts the protein of retinoblastoma (pRb) from its binding to E2F transcription factor and thereby promotes cell cycle progression, a molecular switch that is usually activated by CDK4/6. Affected cells strongly express p16 to counteract the irregular cell cycle activation; however, since E2F is not released through CDK4/6 action, but by E7, p16 expression has no effect

on cell cycle activation. Over time, p16 accumulates in the nucleus and cytoplasm of affected cells and can be detected by immunostaining (Wentzensen *et al* 2007).

We conducted a systematic review and meta-analysis of the literature in an attempt to collect, systematically present and analyse the existing evidence on possible clinical applications of p16 in cytological and histological samples from the uterine cervix. Furthermore, we conducted a study aiming to evaluate the role of p16 immunostaining and HR-HPV test, in detecting these women with LSIL cytology who have CIN2+ histology. We also assessed the role of p16 as an adjunct test in the triage of a population of HR-HPV positive LSIL smears.

MATERIAL AND METHODS

I. Systematic review and meta-analysis

Search Strategy

We searched two electronic databases - MEDLINE and EMBASE - targeting reports published between January 1998 and September 2007. The search strategy used terms such as "cancer", "dysplasia", "SIL", "CIN", "cervix", "p16" and "cyclin-dependent kinase".

Type of Studies, Inclusion and Exclusion Criteria

All retrospective or prospective studies that assessed p16 immunostaining in cervical cytological samples, in conventional cytology or in LBC, as well as in histological specimens from the uterine cervix were included in this review. We excluded studies that assessed the expression of the biomarker in glandular or invasive cervical lesions. In cases of overlap or duplicate studies, we retained only the most comprehensive one.

Types of Outcome Measures

All outcomes were defined prior to the literature search. The primary outcome was the correlation between cytological or histological degree of cervical abnormality and overexpression of p16 identified by immunochemistry. Other parameters assessed were the role of the biomarker in the cervical cancer screening, its role in the triage of equivocal or low-grade cytological abnormalities compared to HPV testing and its efficacy as a marker of progression risk in low grade cervical lesions.

Data Extraction Statistical Analyses

For all included studies we generated descriptive tables for population and study characteristics. Furthermore, we described the method of p16 immunostaining, the type of

antibody and medium used and the various interpretations of p16 immunoreactivity as adopted by each author.

Three cytological groups were considered, i.e. atypical squamous cells of undetermined significance (ASCUS), low-grade (LSIL) and high-grade squamous intra-epithelial lesions (HSIL). The CIN nomenclature was applied in order to describe histological outcomes (Richard 1973).

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using STATA (Stata Corp., College Station, Texas, US). Random effects models were used to pool proportions for pooling (Dersimonian *et al* 1986) and analysis and interstudy heterogeneity was assessed with the Cochran's Q test (Cochran 1954).

In the meta-analysis of cytological studies we adopted the cut-off of p16 positivity proposed by each author, whilst for the analysis of histological studies we included in the meta-analytic pool only those that either adopted the distribution of staining proposed by Klaes and colleagues (Klaes *et al* 2001) or could be converted to the above classification system. According to the Klaes classification the diffuse staining (>25% of cells stained for p16) was considered as the cut-off of positivity.

II. Prospective diagnostic study

Study population and design

We conducted a prospective diagnostic study assessing women reviewed at the Colposcopy Department of the University Hospital of Ioannina, Greece. The study population included women who attended the colposcopy clinic with a Papanicolaou test (Pap test) or Liquid Based Cytology (LBC) smear showing LSIL, in the context of screening for cervical cancer, from October 2008 to February 2010. We excluded pregnant women, those who had ablative or destructive treatment of cervical lesions in the past and women who were previously reviewed in colposcopy for abnormal smears. We also excluded women who had no biopsies taken during the colposcopic assessment.

Types of Outcome Measures

The primary outcome was the sensitivity and specificity of p16 immunostaining and HR-HPV test to detect histologically confirmed CIN2+ on a population of LSIL samples. We also evaluated the use of p16 on the triage of HR-HPV positive LSIL smears for an endpoint of CIN2+ histology.

Statistical analysis

We assessed the sensitivity (S), specificity (Sp), positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) of p16 and HR-HPV on the basis of detecting LSIL smears harboring CIN2+. We further evaluated the role of p16 immunostaining as an adjunct test to HR-HPV positive LSIL smears. Statistical significance was determined on the basis of the McNemar exact test or the two-tailed Chi-square test with Yates correction. A p-value of <0.05 was considered as statistical significant.

RESULTS**I. Systematic review and meta-analysis**

The electronic search yielded 584 studies that were assessed for inclusion in the review. Of those, 97 were potentially eligible and subsequently scrutinized in full text.

Included Studies

Sixty-one studies qualified for the overview. Liquid based cytology was the preparation method adopted in the majority of studies whereas the correlation between cytology, histology and p16 immunoreactivity was assessed only in eight studies.

A variety of antibodies were used for immunodetection of p16. The method of staining was similar amongst cytological (conventional or LBC) and histological specimens, with small alterations indicated by each manufacturer.

P16 positivity in cytological specimens was determined according to the distribution of staining into the cell compartments (cytoplasm or nucleus) and the number of cells overexpressing the biomarker. The cut-offs of positivity varied substantially across the studies. Quantitative criteria (i.e. the number of stained cells) were evaluated or both quantitative and qualitative parameters (i.e. morphological cytological features).

The majority of histological studies adopted the classification proposed by Klaes and colleagues (Klaes *et al* 2001). We considered as positive cut-off for p16 immunoreactivity the diffuse stain that includes both basal and parabasal cell layers and indicates hrHPV-induced transformation

Meta-analysis

Taking into consideration the aforementioned discrepancies in the interpretation of staining, we estimated and also presented graphically the mean proportion of samples that were positive for p16 in cytology and histology, stratified by the grade of the lesion.

The pooled average proportion of p16-positive smears increased with the severity of cytological abnormality. Among normal smears, only 12% (95% CI: 7- 17%) were positive for the biomarker compared to 45% of ASCUS (95% CI: 35- 54%), 45% of LSIL (95% CI: 37 - 57%) and 89% of HSIL (95% CI: 84- 95%) smears.

Similarly, in histology, on average only 2% of normal biopsies (95% CI: 0.4-30%) and 38% of CIN1 (95% CI: 23-53%) showed diffuse staining for p16 (Klaes classification) compared to 68% of CIN2 (95% CI: 44- 92%) and 82% of CIN3 (95% CI: 72 - 92%).

Results were very heterogeneous in all types of specimen and categories of epithelial neoplasia (p for Q test always <0 .001). In particular in the intermediate categories, inter-study variation was extreme. The percentage of smears positive for p16 ranged from 10% to 100% (Murphy *et al* 2003) for ASCUS and from 10% (Wentzensen *et al* 2005) to 86% (Murphy *et al* 2003) for LSIL. Similarly, in histology the proportion of CIN1 biopsies exhibiting diffuse staining for p16 varied from 0% (66, 93) to 100% (Sano *et al* 1998). Only at both ends of the spectrum of lesions (normal specimen or HSIL/CIN3 lesions) the percentages

tended to scatter, after exclusion of one or two outlying studies, within a more narrow range near the left and right border of the forest plots.

II. Prospective diagnostic study

A series of 216 women with LSIL cytology were referred to colposcopy. Finally, we only included in the study the 126 women who had colposcopically directed biopsies undertaken. All women with high-grade colposcopy had LLETZ biopsies undertaken, whereas 43% of those with low-grade colposcopy had multiple punch biopsies and the remaining 57% had LLETZ cervical biopsies. The vast majority (90%) was above 25 years of age and parous (64%). Only 20% of women had more than 5 lifetime sex partners.

The correlation between LSIL cytology and the relevant histologic diagnosis in 126 patients who had biopsies undertaken showed that the majority of smears (61.5%) corresponded to low-grade histology (CIN1 or less). We subsequently assessed the accuracy parameters of each test separately, as well as the accuracy of HPV16 or HPV18 subtypes only in detecting those LSIL smears that harbor CIN2+ histology. HR-HPV test showed the highest sensitivity (75%) and HPV16/18 detection the highest specificity (90%). HR-HPV test had statistically significant higher sensitivity compared to p16 immunostaining ($p=0.0037$). On the other hand, p16 had statistically significant higher specificity compared to HR-HPV test ($p=0.0000$).

Finally, the role of p16 immunostaining in the triage of LSIL smears positive for HR-HPV was evaluated. Adding p16 immunostaining in HR-HPV positive LSIL smears improved the specificity of the HR-HPV test (73% versus 64%) but the effect was not significant ($p=0.61$). There was however a significant loss in sensitivity and negative predictive value.

DISCUSSION

The progress in the understanding of HPV- related cervical carcinogenesis promoted the evaluation of various biomarkers that could potentially improve the current methods of cervical cancer screening. The cyclin-dependent kinase inhibitor protein p16 is one of the most promising and most studied of these biomarkers.

Immunostaining for p16 can be easily applied in both cytology and histology specimens. However, assessment of its clinical applications is seriously hampered by lack of standardized methodology. Until now, despite several proposed evaluation strategies of p16 in both cytology and histology, there is no general consensus for establishing threshold values above which a sample becomes "p16-positive". This is especially a problem in p16 cytology, since the histological criteria of p16 positivity (negative, focal, diffuse) are now widely accepted.

As some non-dysplastic cells may also display p16 immunoreactivity additional criteria that discriminate p16 staining in abnormal cells from atrophic or metaplastic cells may increase

specificity. In a recent study (Wentzensen *et al* 2005) a nuclear scoring (NS) system was introduced for p16 in LBC samples. By applying the NS on p16 positive cells the authors noticed a significant increase in specificity for the detection of CIN2+ as compared to calling every slide with any p16 positive cells positive (from 50% to 80%) (Wentzensen *et al* 2006). However, the morphological assessment of p16-stained cells may be difficult in some cases, thus training and experience are necessary (80). An ideal biomarker should avoid relying on subjective criteria as much as possible.

Taking into consideration the above described limitations in the interpretation of p16 staining, we attempted a meta-analysis of the available data in order to evaluate the correlation of the p16 immunostaining to the degree of cytological or histological abnormality. P16 is related to the severity of cervical neoplasia in both cytology and histology however, there is lack of reproducibility in the equivocal and low grade squamous cervical abnormalities.

The prospective study attempted to assess whether p16 immunostaining and HR-HPV detection, are useful tools in the risk assessment of LSIL cytology. In order to increase the study validity, the outcomes of HR-HPV, as well as of p16 immunostaining test, were correlated with the study gold standard i.e. colposcopically directed punch or LLETZ biopsies. Our results showed that HR-HPV test had acceptable sensitivity (75%) but poor specificity (64%) in identifying those LSIL smears harboring CIN2+. Furthermore, testing for

the HPV16/18 genotypes although it exhibited optimum specificity (90%) could not be used as a single test because of its very low sensitivity (42%).

p16 immunostaining showed suboptimal sensitivity to detect LSIL smears harboring high-grade lesions (44%) but specificity equivalent to the HPV16/18 detection (89%). The use of p16 as a triage method for HR-HPV positive LSIL smears demonstrated an expected loss in sensitivity, compared to HR-HPV test alone, however the gain in specificity was not significant.

The evidence on the role of p16 in the risk assessment of LSIL smears is conflicting. An ideal biomarker should avoid relying on subjective criteria as much as possible. Our findings support that p16 is superior in terms of specificity compared to HR-HPV for the triage of LSIL smears. However, because of the low sensitivity and the discrepancies in its interpretation we cannot support its use as an independent test. New biomarkers need to be assessed separately or in conjunction with p16 in order to replenish any obstacles in the reproducibility of the test.

CONCLUSIONS

The very large majority of studies on p16 immunostaining focus on the correlation between the biomarker and the degree of cytological or histological abnormality. Only a few address specific clinical questions such as the role of p16 in primary cervical cancer screening, in the triage of equivocal or low-grade smears versus the HPV-DNA test and its role as a marker of progression risk in low-grade dysplastic lesions of the cervix uteri. Furthermore, the discrepancies in the interpretation of p16 immunostaining in both cytology and histology reduce its reproducibility and hamper the interpretation of the data across different studies.

The available evidence does not allow us to formulate any definite recommendations regarding the applications of p16 in clinical practice. The standardization of sample preparation and evaluation is of paramount importance. After a consensus is reached regarding the interpretation of staining, the biomarker needs to be evaluated in various clinical settings addressing specific clinical questions. A good and meaningful study would require a rigorous colposcopy-biopsy workup (with multiple biopsies taken) and at least a two year follow up to detect disease missed in initial colposcopy/biopsy.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Adachi Y, Lakka SS, Chandrasekar N, et al. Down-regulation of integrin alpha(v) beta(3) expression and integrin-mediated signaling in glioma cells by adenovirus-mediated transfer of antisense urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) and sense p16 genes. *J Biol Chem* 2001; **276**: 47171–7.

Agoff SN, Lin P, Morihara J, et al. P16INK4a expression correlates with degree of cervical neoplasia: a comparison with Ki-67 expression and detection of high-risk HPV types. *Mod Pathol* 2003; **16**: 665–73.

Akpolat I, Smith DA, Ramzy I, et al. The utility of p16INK4a and Ki-67 staining on cell blocks prepared from residual thin-layer cervicovaginal material. *Cancer* 2004; **102**: 142–9.

Alberg AJ, Selhub J, Shah KV et al. The risk of cervical cancer in relation to serum concentrations of folate, vitamin B12, and homocysteine. *Cancer Epidem Biomark Prev*, 2000; **9**: 761–4.

Alcorta DA, Xiong Y, Phelps D, et al. Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci* 1996; **93**: 13742-7.

Alfsen GC, Reed W, Sandstad B, et al. The prognostic impact of cyclin dependent kinase inhibitors p21WAF1, p27Kip1, and p16INK4/MTS1 in adenocarcinomas of the uterine cervix: an immunohistochemical evaluation of expression patterns in population-based material from 142 patients with international federation of gynecology and obstetrics stage I and II adenocarcinoma. *Cancer* 2003; **98**:1880–9.

Al-Nafussi AI, Colquhoun MK, Williams AR. Accuracy of cervical smears in predicting the grades of cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Gynecol Cancer* 1993; **3**: 89-93.

Andersson S, Wangsa D, Flores-Staino C, et al. Expression of p16INK4a in relation to histopathology and viral load of "high-risk" HPV types in cervical neoplastic lesions. *Eur J Cancer* 2006; **42**: 2815–20.

Angiero F, Berenzi A, Benetti A, et al. Expression of p16, p53 and Ki-67 proteins in the progression of epithelial dysplasia of the oral cavity. *Anticancer Res* 2008; **28**: 2535–9.

Ansari-Lari MA, Staebler A, Zaino RJ, et al. Distinction of endocervical and endometrial adenocarcinomas: immunohistochemical p16 expression correlated with human papillomavirus (HPV) DNA detection. *Am J Surg Pathol* 2004; **28**: 160–7.

Aoyama C, Liu P, Ostrzega N, et al. Histologic and immunohistochemical characteristics of neoplastic and non-neoplastic subgroups of atypical squamous lesions of the uterine cervix. *Am J Clin Pathol* 2005; **123**: 699–706.

Arbyn M, Buntinx F, Van Ranst M, et al. Virologic versus cytologic triage of women with equivocal Pap smears: a meta-analysis of the accuracy to detect high-grade intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 2004; **96**: 280-93.

Arbyn M, Paraskeva E, Martin-Hirsch P, et al. Clinical utility of HPV- DNA detection: triage of minor cervical lesions, follow-up of women treated for high-grade CIN: an update of pooled evidence. *Gynecol Oncol* 2005; **99 (3 Suppl 1)**: S7-S11

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

Arbyn M (a), Bergeron C, Klinkhamer P, et al. Liquid compared with conventional cervical cytology. A systematic review and meta-analysis. *Obstet Gynecol* 2008; **111**: 167–77.

Armes JE, Lourie R, de Silva M, et al. Abnormalities of the RB1 pathway in ovarian serous papillary carcinoma as determined by overexpression of the p16 (INK4A) protein. *Int J Gynecol Pathol* 2005; **24**: 363–8.

Ayhan S, Isisag A, Saruc M, et al. The role of pRB, p16 and cyclin D1 in colonic carcinogenesis. *Hepatogastroenterology* 2010; **57**: 251–6.

Bahnassy AA, Zekri AR, Saleh M, et al. The possible role of cell cycle regulators in multistep process of HPV-associated cervical carcinoma. *BMC Clin Pathol* 2007; **7**:4.

Benevolo M, Mottolese M, Marandino F, et al. Immunohistochemical expression of p16INK4a is predictive of HR-HPV infection in cervical low-grade lesions. *Mod Pathol* 2006; **19**:384–91.

Bergeron C, Wentzensen N, Cas F, et al. La protéine p16INK4a: un marqueur cytologique pour détecter les néoplasies intraépithéliales de haut grade du col utérin. *Ann Pathol* 2006; **26**: 397–402.

Bernard HU, Chan SY, Manos MM et al. Identification and assessment of known and novel

human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. *J Infect Diseases*, 1994, **170**: 1077–85.

Bibbo M, Klump WJ, DeCecco J, et al. Procedure for immunocytochemical detection of p16INK4a antigen in thin-layer, liquid-based specimens. *Acta Cytol* 2002; **46**:25–9.

Bibbo M, DeCecco J, Kovatich A. P16INK4a as an adjunct test in Liquid-Based cytology. *Anal Quant Cytol Histol* 2003; **25**:8–11.

Bishop JW, Bigner SH, Colgan TJ et al. Multicenter masked evaluation of AutoCyte PREP in thin layers with matched conventional smears. Including initial biopsy results. *Act Cytol* 1998; **42**: 209-13.

Bolanca I, Ciglar S. Evaluation of p16INK4a in cervical lesion of premenopausal and postmenopausal women. *Coll Antropol* 2007; **31(Suppl. 2)**: 107–11.

Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N et al. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol*, 2002, **55**:244–65.

Bose S, Evans H, Lantzy L, et al. P16INK4a is a surrogate biomarker for a subset of human papilloma virus-associated dysplasias of the uterine cervix as determined on the pap smear. *Diagn Cytopathol* 2005; **32**:21–4.

Boulet GA, Micalessi IM, Horvath CA, et al. Nucleic acid sequence-based amplification assay for human papillomavirus mRNA detection and typing: evidence for DNA

amplification. *J Clin Microbiol.* 2010; **48**: 2524-9.

Boyes DA, Morrison B, Knox EG, et al. A cohort study of cervical cancer screening in British Columbia. *Clin Invest Med* 1982; **5**:1-29.

Brambilla E, Gazzeri S, Moro D, et al. Alterations of Rb pathway (Rb-p16INK4-cyclin D1) in preinvasive bronchial lesions. *Clin Cancer Res* 1999; **5**: 243–50.

Branca M, Ciotti M, Santini D, et al. P16INK4a expression is related to grade of CIN and high-risk human papillomavirus but does not predict virus clearance after conization or disease outcome. *Int J Gynecol Pathol* 2004; **23**:354–65.

Bringold F, Serrano M. Tumor suppressors and oncogenes in cellular senescence. *Exp Gerontol* 2000; **35**: 317–29.

Buajeeb W, Poomsawat S, Punyasingh J, et al. Expression of p16 in oral cancer and premalignant lesions. *J Oral Pathol Med* 2009; **38**: 104–8.

Bulten J, van der Avoort I, Melchers W, et al. P14ARF and p16INK4a, two products of the same gene, are differently expressed in cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol* 2006; **101**: 487–94.

Cameron RI, Maxwell P, Jenkins D, et al. Immunohistochemical staining with MIB1, bcl2 and p16 assists in the distinction of cervical glandular intraepithelial neoplasia from tubo-endometrial metaplasia, endometriosis and microglandular hyperplasia. *Histopathology* 2002; **41**:313–21.

Canepa ET, Scassa ME, Ceruti JM, et al. INK4 proteins, a family of mammalian CDK inhibitors with novel biological functions. *IUBMB Life* 2007; **59**: 419–26.

Carozzi FM, Cecchini S, Confortini M, et al. Role of p16INK4a expression in identifying CIN2 or more severe lesions among HPV-positive patients referred for colposcopy after abnormal cytology. *Cancer* 2006; **108**:119–23.

Carozzi FM. Combined analysis of HPV DNA and p16INK4a expression to predict prognosis in ASCUS and LSIL Pap smears. *Coll Antropol* 2007; **31(Suppl. 685)**:103–6.

Carydis VB, Walker T, Wing A, et al. Utility of p16 (ink4a) immunocytochemistry in liquid-based cytology specimens from women treated for high-grade squamous intraepithelial lesions. *Acta Cytol* 2007; **51**:517–22.

Castle PE, Wacholder S, Lorincz AT et al. A prospective study of high-grade cervical neoplasia risk among human papillomavirus-infected women. *J Nat Cancer Institute* 2002, **94**: 1406–14.

Cervical Screening Programme, England: 2008-9. The health and social information centre 2009.

Chen SF, Yang SF, Chu TY, et al. Which test is a better strategy to determine the outcome of atypical glandular cell-categorized Pap smears? Immunocytochemical p16INK4a expression or human papillomavirus test—a retrospective cohort study. *Gynecol Oncol* 2005; **99**:578–84.

Chintala SK, Fueyo J, Gomez-Manzano C, et al. Adenovirus-mediated p16/CDKN2 gene transfer suppresses glioma invasion in vitro. *Oncogene* 1997;**15**:2049–57.

Clavel C, Massure M, Bory JP et al. Human papillomavirus testing in primary screening for the detection of high-grade cervical lesions: a study of 7932 women. *Br J Cancer* 2001; **84**: 1616-23.

Clifford GM, Franceschi S, Diaz M et al. Chapter 3: HPV type-distribution in women with and without cervical neoplastic diseases. *Vaccine* 2006; **24s3**: S3/26-S3/34

Cochran WG. The combination of estimates from different experiments. *Biometrics* 1954; **10**:101–29.

Cochrane AL, Holland WW. Validation of screening procedures. *Br Med Bull.* 1971; **27**: 3.

Contreras-Melendez L, Herbert A, Millward-Sadler GH, et al. Assessment of the accuracy of cytology in women referred for colposcopy and biopsy: the results of a 1-year audit. *Cytopathology* 1992; **3**: 267-74.

Cox JT, Schiffman M, Solomon D. Prospective follow-up suggests similar risk of subsequent cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 among women with cervical intraepithelial neoplasia grade 1 or negative colposcopy and directed biopsy. *Am J Obstet Gynecol* 2003; **188**: 1406-12.

Cuschieri KS, Whitley MJ, Cubie HA. Human papillomavirus type specific DNA and RNA

persistence: implications for cervical disease progression and monitoring. *J Med Virol*, 2004; **73**: 65–70.

Cuschieri K, Wentzensen N. Human papillomavirus mRNA and p16 detection as biomarker for the improved diagnosis of cervical neoplasia. *Cancer Epid Blom Prev* 2008; **17**: 2536-45.

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.

Denton KJ, Bergeron C, Klement P, et al; European CINtec Cytology Study Group. The sensitivity and specificity of p16 (INK4a) cytology vs. HPV testing for detecting high-grade cervical disease in the triage of ASC-US and LSIL pap cytology results. *Am J Clin Pathol* 2010; **134**: 12-21.

Dray M, Russell P, Dalrymple C, et al. P16INK4a as a complementary marker of high-grade intraepithelial lesions of the uterine cervix. I: Experience with squamous lesions in 189 consecutive cervical biopsies. *Pathology* 2005; **37**:112–24.

Dunne EF, Unger ER, Sternberg M, et al. Prevalence of HPV infection among females in the United States. *JAMA* 2007; **297**: 813-9.

Ekalaksananan T, Pientong C, Sriamporn S, et al. Usefulness of combining testing for p16 protein and human papillomavirus (HPV) in cervical carcinoma screening. *Gynecol Oncol* 2006; **103**:62–6.

Eleuterio J, Giraldo P, Goncalves A, et al. Prognostic markers of high-grade squamous intraepithelial lesions: the role of p16INK4a and high-risk human papillomavirus. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2007; **86**:94–8.

Evans MF, Adamson C, Simmons-Arnold L, et al. *BMC Clinic Pathol* 2005, 5:10doi: 10.1186/1472-6890-5-10

Fahraeus R, Lane DP. The p16 (INK4a) tumour suppressor protein inhibits alphavbeta3 integrin-mediated cell spreading on vitronectin by blocking PKC-dependent localization of alphavbeta3 to focal contacts. *EMBO J* 1999; **18**: 2106–18.

Filho AL, Utagawa ML, Shirata NK, et al. Immunocytochemical expression of p16INK45a and Ki-67 in cytologically negative and equivocal Pap smears positive for oncogenic human papillomavirus. *Int J Gynecol Pathol* 2005; **24**:118–24.

Flannelly G. Immediate colposcopy or cytological surveillance for women with mild dyskaryosis: a cost effectiveness analysis. *J Public Health Med* 1997; **19**: 419-23.

Focchi G, Silva I, Nogueira-de-Souza N, et al. Immunohistochemical expression of p16 (INK4A) in normal uterine cervix, nonneoplastic epithelial lesions, and low-grade squamous intraepithelial lesions. *J Low Genit Tract Dis* 2007; **11**:98–104.

Fordyce C, Fessenden T, Pickering C, et al. DNA damage drives an activin a-dependent induction of cyclooxygenase-2 in premalignant cells and lesions. *Cancer Prev Res (Phila)* 2010; **3**:190–201.

Freeman A, Morris LS, Mills AD et al. Minichromosome maintenance proteins as biological markers of dysplasia and malignancy. *Clin Cancer Res* 1999, **5**: 2121–32.

García-Closas R, Castellsagué X, Bosch X, et al. The role of diet and nutrition in cervical carcinogenesis: a review of recent evidence. *Int J Cancer* 2005. **117**:629-37.

Gil J, Peters G. Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006: **7**: 667–77.

Giuliano AR, Papenfuss M, Nour M et al. Antioxidant nutrients: associations with persistent human papillomavirus infection. *Cancer Epidemiology Biomark Preview* 1997, **6**: 917–23.

Gray JAM. Dimensions and definitions of screening. Milton Keynes: NHS Executive Anglia and Oxford, Research and Development Directorate, 1996.

Guiliano AR, Sedjo RL, Roe DJ et al. Clearance of oncogenic human papillomavirus (HPV) infection: effect of smoking (United States). *Cancer Causes Control* 2002, **13**: 839–46.

Giuliano AR, Siegel EM, Roe DJ et al. Dietary intake and risk of persistent human papillomavirus (HPV) infection: the Ludwig–McGill HPV natural history study. *Infect Dis* 2003, **188**: 1508–16.

Guimaraes M, Goncalves M, Soares C, et al. Immunohistochemical expression of p16INK4a and bcl-2 according to HPV type and to the progression of cervical squamous intraepithelial lesions. *J Histochem Cytochem* 2005; **53**:509–16.

Goodman MT, McDuffie K, Hernandez B et al. Case-control study of plasma folate, homocysteine, vitamin B(12), and cysteine as markers of cervical dysplasia. *Cancer* 2000, **89**: 376–82.

Gravitt PE, Peyton CL, Apple RJ, et al. Genotyping of 27 human papillomavirus types by using L1 consensus PCR products by a single hybridization, reverseline blot detection method. *J Clin Microbiology* 1998, **36**: 3020–7.

Guo M, Hu L, Baliga M, et al. The predictive value of p16INK4a and hybrid capture 2 human papillomavirus testing for high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Clin Pathol* 2004; **122**:894–901.

Hara E, Smith R, Parry D, et al. Regulation of p16CDKN2 expression and its implications for cell immortalization and senescence. *Mol Cell Biol* 1996;**16**: 859–67.

Harada H, Nakagawa K, Iwata S, et al. Restoration of wild-type p16 down-regulates vascular endothelial growth factor expression and inhibits angiogenesis in human gliomas. *Cancer Res* 1999; **59**: 3783–9.

Hariri J, Oster A. The negative predictive value of p16INK4a to assess the outcome of cervical intraepithelial neoplasia 1 in the uterine cervix. *Int J Gynecol Pathol* 2007; **26**:223–8.

Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1965; **37**: 614–36.

Herbert A, Bergeron C, Wiener H, et al. European guidelines for quality assurance in

cervical cancer screening: recommendations for cervical cytology terminology. *Cytopathology* 2007; **18**: 213–9.

Ho GY, Palan PR, Basu J et al. Viral characteristics of human papillomavirus infection and antioxidant levels as risk factors for cervical dysplasia. *Inter J Cancer* 1998, **78**: 594–9.

Holladay EB, Logan S, Arnold J, et al. A comparison of the clinical utility of p16INK4a immunolocalization with the presence of human papillomavirus by hybrid capture 2 for the detection of cervical dysplasia/neoplasia. *Cancer* 2006; **108**:451–61.

Horn LC, Lindner K, Szepankiewicz G, et al. P16, p14, p53, and cyclin D1 expression and HPV analysis in small cell carcinomas of the uterine cervix. *Int J Gynecol Pathol* 2006; **25**:182–6.

Horree N, van Diest PJ, Sie-Go DM, et al. The invasive front in endometrial carcinoma: higher proliferation and associated derailment of cell cycle regulators. *Hum Pathol* 2007; **38**: 1232–8.

Hu L, Guo M, He Z, et al. Human papillomavirus genotyping and p16INK4a expression in cervical intraepithelial neoplasia of adolescents. *Mod Pathol* 2005; **18**:267–73.

Huang PS, Patrick DR, Edwards G, et al. Protein domains governing interactions between E2F, the retinoblastoma gene product, and human papillomavirus type 16 E7 protein. *Mol Cell Biol* 1993; **13**: 953–60.

Hutchinson ML, Zahniser DJ, Sherman ME et al. Utility of liquid-based cytology for cervical carcinoma screening: Results of a population-based study conducted in a region of Costa Rica with a high incidence of cervical carcinoma. *Cancer* 1999; **87**: 48-55.

Iaconis L, Hyjek E, Ellenson LH, et al. P16 and Ki-67 immunostaining in atypical immature squamous metaplasia of the uterine cervix. Correlation with human papillomavirus detection. *Arch Pathol Lab Med* 2007; **131**:1343–9.

Iftner T, Villa LL. Human papillomavirus technologies. *J Natl Cancer Inst Monographs* 2003, **31**: 80–8.

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

Ishikawa M, Fujii T, Masumoto N, et al. Correlation of p16INK4A overexpression with human papillomavirus infection in cervical adenocarcinomas. *Int J Gynecol Pathol* 2003; **22**:378–85.

Ishikawa M, Fujii T, Saito M, et al. Overexpression of p16INK4a as an indicator for human papillomavirus oncogenic activity in cervical squamous neoplasia. *Int J Gynecol Cancer* 2006; **16**:347–53.

Ivanova TA, Golovina DA, Zavalishina LE, et al. Up-regulation of expression and lack of 50 CpG island hypermethylation of p16 INK4a in HPV-positive cervical carcinomas. *BMC Cancer* 2007; **7**:47.

Jacobs MV, Snijders PJF, Van den Brule AJC et al. A general primer GP5+/ GP6+-mediated

PCR-enzyme immunoassay method for rapid detection of 14 high-risk and 6 low-risk human papillomavirus genotypes in cervical scrapings. *J Clin Microbiology* 1997; **35**: 791–5.

Jones BA, Novis DA. Cervical biopsy-cytology correlation. A College of American Pathologists Q-Probes study of 22 439 correlations in 348 laboratories. *Arch Pathol Lab Med* 1996; **120**:523-31.

Jung A, Schrauder M, Oswald U, et al. The invasion front of human colorectal adenocarcinomas shows co-localization of nuclear beta-catenin, cyclin D1, and p16INK4A and is a region of low proliferation. *Am J Pathol* 2001; **159**: 1613-7.

Kalof AN, Evans MF, Simons-Arnold L, et al. P16INK4a immunoexpression and HPV in situ hybridization signal patterns. *Am J Surg Pathol* 2005; **29**:674–9.

Kanao H, Enomoto T, Ueda Y, et al. Correlation between p14(ARF)/p16(INK4A) expression and HPV infection in uterine cervical cancer. *Cancer Lett* 2004; **213**:31–7.

Keating JT, Cviko A, Riethdorf S et al. Ki-67, cyclin E, and p16INK4 are complimentary surrogate biomarkers for human papilloma virus-related cervical neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2001; **25**: 884–91.

Kim JR, Kim SY, Kim MJ, et al. Alterations of CDKN2 (MTS1/p16INK4A) gene in paraffin-embedded tumor tissues of human stomach, lung, cervix and liver cancers. *Exp Mol Med* 1998; **30**:109–14.

Kim JW, Namkoong SE, Ryu SW, et al. Absence of p15INK4B and p16INK4A gene

alterations in primary cervical carcinoma tissues and cell lines with human papillomavirus infection. *Gynecol Oncol* 1998; **70**: 75–9.

Kim NR, Lin Z, Kim KR, et al. Epstein-Barr virus and p16INK4A methylation in squamous cell carcinoma and precancerous lesions of the cervix uteri. *J Korean Med Sci* 2005; **20**:636–42.

Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, et al. Overexpression of p16INK4a as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer* 2001; **92**:276–84.

Klaes R, Benner A, Friedrich T, et al. P16INK4a immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2002; **26**: 1389–99.

Kong CS, Balzer BL, Troxell ML, et al. P16INK4a immunohistochemistry is superior to HPV in situ hybridization for the detection of high-risk HPV in atypical squamous metaplasia. *Am J Surg Pathol* 2007; **31**: 33–43.

Krishnamurthy J, Torrice C, Ramsey MR, et al. Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J Clin Invest* 2004; **114**: 1299–307.

Kyrgiou M, Koliopoulos G, Martin-Hirsch P, et al. Obstetric outcomes after conservative treatment for intraepithelial or early invasive cervical lesions: systematic review and meta-analysis. *Lancet* 2006; **367**: 489-98.

Kyrgiou M, Koliopoulos G, Martin-Hirsch P, et al. Management of minor cervical cytological abnormalities: A systematic review of the literature. *Cancer Treat Rev* 2007; **33**: 514-20.

Lam AK, Ong K, Giv MJ, et al. p16 expression in colorectal adenocarcinoma: marker of aggressiveness and morphological types. *Pathology* 2008; **40**: 580-5.

Li L, Lu Y. Inhibition of hypoxia-induced cell motility by p16 in MDA-MB-231 breast cancer cells. *J Cancer* 2010; **1**: 126-35.

Lambert AP, Anschau F, Schmitt V. P16INK4a expression in cervical premalignant and malignant lesions. *Exp Mol Pathol* 2006; **80**:192-6.

Li C, Rock KL, Woda BA, et al, Dresser K. IMP3 is a novel biomarker for adenocarcinoma in situ of the uterine cervix: an immunohistochemical study in comparison with p16INK4a expression. *Mod Pathol* 2007; **20**:242-7.

Li W, Thompson CH, Cossart YE, et al. The site of infection and ethnicity of the patient influence the biological pathways to HPV-induced mucosal cancer. *Mod Pathol* 2004; **17**:1031-7.

Liang J, Mittal KR, Wei JJ, et al. Utility of p16INK4a, CEA, Ki67, P53 and ER/PR in the differential diagnosis of benign, premalignant, and malignant glandular lesions of the uterine cervix and their relationship with Silverberg scoring system for endocervical glandular lesions. *Int J Gynecol Pathol* 2007; **26**:71-5.

Lin Z, Gao M, Zhang X, et al. The hypermethylation and protein expression of p16INK4a and DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase in various uterine cervical

lesions. *J Cancer Res Clin Oncol* 2005; **151**:364–70.

Liu H, Shi J, Wilkerson M, et al. Immunohistochemical detection of p16INK4a in liquid-based cytology specimens on cell block sections. *Cancer* 2007; **111**:74–82.

Lleonart ME, Artero-Castro A, Kondoh H. Senescence induction; a possible cancer therapy. *Mol Cancer* 2009; **8**: 3.

Lorenzato M, Caudroy S, Bronner C, et al. Cell cycle and/or proliferation markers: what is the best method to discriminate cervical high-grade lesions? *Hum Pathol* 2005; **36**:1101–7.

Lorincz AT, Reid R, Bennett Jenson A, et al. Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. *Obstet Gynecol* 1992; **79**: 328–37.

Manos MM, Ting Y, Wright DK et al. Use of polymerase chain reaction amplification for detection of genital papillomavirus. *Cancer Cells* 1989, **29**: 20–7.

Mansell ME, Ho L, Terry G, et al. Semi-quantitative human papillomavirus DNA detection in the management of women with minor cytological abnormality. *Br J Obstet Gynaecol* 1994; **101**: 807-9.

Marchan S, Perez-Torras S, Vidal A, et al. Dual effects of beta3 integrin subunit expression on human pancreatic cancer models. *Anal Cell Pathol (Amst)* 2010; **33**:191–205.

Martin A, Baran-Marzak F, El Mansouri S, et al. Expression of p16/INK4a in posttransplantation lymphoproliferative disorders. *Am J Pathol* 2000; **156**: 1573–9.

Masumoto N, Fujii T, Ishikawa M, et al. P16 overexpression and human papillomavirus infection in small cell carcinoma of the uterine cervix. *Hum Pathol* 2003; **34**:778–83.

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

Matsukura T, Sugase M: Identification of genital human papillomaviruses in cervical biopsy specimens: segregation of specific virus types in specific clinicopathologic lesions. *Int J Cancer* 1995; **61**:13-22.

McCluggage WG, Jenkins D. P16 immunoreactivity may assist in the distinction between endometrial and endocervical adenocarcinoma. *Int J Gynecol Pathol* 2003; **22**:231–5.

McGoogan E, Colgan TJ, Ramzy et al. Cell preparation methods and criteria for sample adequacy. IAC Task Force summary. *Acta Cytologica* 1998; **42**: 25-32.

McSweeney DJ, McKay DG. Uterine cancer: Its early detection by simple screening methods. *N Engl J Med* 1948; **238**: 867-70.

Melinikow J, Nuovo J, Willan AR et al. Natural history of cervical squamous intraepithelial lesions: a meta-analysis. *Obstet Gynecol* 1998; **92**: 727-35.

Melkert PW, Hopman E, van den Brule AJ, et al. Prevalence of HPV in cytomorphologically normal cervical smears, as determined by the polymerase chain reaction, is age-dependent. *Int J Cancer* 1993; **53**: 919-23.

Melsheimer P, Kaul S, Dobeck S, et al. Immunocytochemical detection of HPV high-risk type L1 capsid proteins in LSIL and HSIL as compared with detection of HPV L1 DNA. *Acta Cytol* 2003, **47**: 124–8.

Meyer JL, Hanlon DW, Andersen BT, et al. Evaluation of p16INK4a expression in ThinPrep cervical specimens with the CINtec p16INK4a assay. *Cancer* 2007; **111**:83–92.

Milde-Langosch K, Bamberger AM, Rieck G, et al. Overexpression of the p16 cell cycle inhibitor in breast cancer is associated with a more malignant phenotype. *Breast Cancer Res Treat* 2001; **67**: 61–70.

Miller AB. The cost effectiveness of cervical cancer screening. *Ann Intern Med* 1992; **117**: 529-30.

Minami R, Muta K, Umemura T, et al. p16 (INK4a) induces differentiation and apoptosis in erythroid lineage cells. *Exp Hematol* 2003; **31**: 355–62.

Missaoui N, Hmissa S, Frappart L, et al. P16INK4A overexpression and HPV infection in uterine cervix adenocarcinoma. *Virchows Arch* 2006; **448**:597–603.

Monsonego J, Pollini G, Evrard MJ, et al. P16INK4a immunocytochemistry in liquid-based cytology samples in equivocal Pap smears. *Acta Cytol* 2007; **51**:755–66.

Moore GD, Lear SC, Wills-Frank LA, et al. Differential expression of cdk inhibitors p16, p21cip1, p27kip1, and Cyclin E in cervical cytological smears prepared by the ThinPrep method. *Diagn Cytopathol* 2005; **32**:82–7.

Munirajan AK, Kannan K, Bhuvaramurthy V, et al. The status of human papillomavirus and tumor suppressor genes p53 and p16 in carcinomas of uterine cervix from India. *Gynecol Oncol* 1998; **69**:205–9.

Muñoz 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.

Muñoz N. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *J Clin Virol*. 2000; **19**: 1-5.

Muñoz N, Franceschi S, Bosetti C et al. Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case–control study. *Lancet* 2002; **359**: 1093–101.

Muñoz N, Bosch FX, de Sanjose S et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *NEJM* 2003; **348**: 518–27.

Murphy N, Ring M, Killalea AG, et al. P16INK4a as a marker for cervical dyskaryosis: CIN and cGIN in cervical biopsies and ThinPrep™ smears. *J Clin Pathol* 2003; **56**:56–63.

Murphy N, Heffron CCBB, King B, et al. P16INK4a positivity in benign, premalignant and malignant cervical glandular lesions: a potential diagnostic problem. *Virchows Archive* 2004;

445:610–5.

Murphy N, Ring M, Heffron CCBB, et al. P16INK4a, CDC6, and MCM5: predictive biomarkers in cervical preinvasive neoplasia and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2005; **58**:525–34.

Nagata C, Shimizu H, Yoshikawa H et al. Serum carotenoids and vitamins and risk of cervical dysplasia from a case–control study in Japan. *British Journal of Cancer* 1999, **81**: 1234–7.

Nam EJ, Kim JW, Sang WK, et al. The expression of the pRb pathway in cervical intraepithelial neoplasia; predictive and prognostic significance. *Gynecol Oncol* 2007; **104**:207–11.

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

Natarajan E, Saeb M, Crum CP, et al. Co-expression of p16(INK4A) and laminin 5 gamma2 by microinvasive and superficial squamous cell carcinomas in vivo and by migrating wound and senescent keratinocytes in culture. *Am J Pathol* 2003; **163**: 477–91.

National Cancer Institute Workshop. The 1998 Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses. *JAMA* 1989; **262**: 931-4.

Naucler P, Ryd W, Törnberg S, et al. Human papillomavirus and Papanicolaou tests to screen for cervical cancer. *NEJM* 2007; **357**:1589–97.

Negri G, Egarter-Vigl E, Kasal A, et al. P16INK4a is a useful marker for the diagnosis of adenocarcinoma of the cervix uteri and its precursors. *Am J Surg Pathol* 2003; **27**:187–93.

Negri G, Vittadello F, Romano F, et al. P16INK4a expression and progression risk of low-grade intraepithelial neoplasia of the cervix uteri. *Virchows Arch* 2004; **445**: 616–20.

Negri G, Moretto G, Menia E, et al. Immunocytochemistry of p16INK4a in liquid-based cervicovaginal specimens with modified Papanicolaou counterstaining. *J Clin Pathol* 2006; **59**:827–30.

Nieh S, Chen SF, Chu TY, et al. Expression of p16INK4a in Papanicolaou smears containing atypical squamous cells of undetermined significance from the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 2003; **91**:201–8.

Nieh S, Chen SF, Chu TY, et al. Expression of p16INK4a in Pap Smears containing atypical glandular cells from the uterine cervix. *Acta Cytol* 2004; **48**:173–80.

Nieh S, Chen SF, Chu TY, et al. Is p16INK4a expression more useful than human papillomavirus test to determine the outcome of atypical squamous cells of undetermined significance-categorized Pap smears? A comparative analysis using abnormal cervical smears with follow-up biopsies. *Gynecol Oncol* 2005; **97**:35–40.

Omori M, Hashi A, Nakazawa K, et al. Estimation of prognoses for Cervical Intraepithelial Neoplasia 2 by p16INK4a immunoexpression and high-risk HPV in situ hybridization signal types. *Am J Clin Pathol* 2007; **128**: 208–17.

Ostor 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.

Paraskevaidis E, Arbyn M, Sotiriadis A, et al. The role of HPV DNA testing in the follow-up period after treatment for CIN: a systematic review of the literature. *Cancer Treat Rev* 2004; **30**:205–11.

Parham DM, Wiredu EK, Hussein KA. The cytological prediction of cervical intra-epithelial neoplasia in colposcopically directed biopsies. *Cytopathology* 1991; **2**: 285-90.

Parwani AV, Smith Sehdev AE, Kurman RJ, et al. Cervical adenoid basal tumors comprised of adenoid basal epithelioma associated with various types of invasive carcinoma: clinicopathologic features, human papillomavirus DNA detection, and P16 expression. *Hum Pathol* 2005; **36**:82–90.

Passegue E, Wagner EF. JunB suppresses cell proliferation by transcriptional activation of p16 (INK4a) expression. *EMBO J* 2000; **19**: 2969–79.

Pavlakakis K, Messini I, Athanasiadou S, et al. Endocervical glandular lesions: a diagnostic approach combining a semi-quantitative scoring method to the expression of CEA MIB-1 and p16. *Gynecol Oncol* 2006; **103**:971–6.

Pientong C, Ekalaksananan T, Swadpanich U, et al. Immunocytochemical detection of p16INK4a protein in scraped cervical cells. *Acta Cytol* 2003; **47**:616–23.

Pientong C, Ekalaksananan T, Kongyingyoes B, et al. Immunocytochemical staining of p16INK4a protein from conventional Pap test and its association with human papillomavirus infection. *Diagn Cytopathol* 2004; **31**:235–42.

Poppe WA, Ide PS, Drijkoningen MP et al. Tobacco smoking impairs the local immunosurveillance in the uterine cervix. An immunohistochemical study. *Gynec Obstet Investigations* 1995; **39**:34–8.

Prokopczyk B, Cox JE, Hoffmann D, et al. Identification of tobaccospecific carcinogen in the cervical mucus of smokers and nonsmokers. *J Nat Cancer Institute* 1997; **89**: 868–73.

van de Putte G, Holm R, Lie AK, et al. Expression of p27, p21, and p16 protein in early squamous cervical cancer and its relation to prognosis. *Gynecol Oncol* 2003; **89**:140–7.

Qiao X, Bhuiya TA, Spitzer M. Differentiating high-grade cervical intraepithelial lesion from atrophy in postmenopausal women using Ki-67, cyclin E, and p16 immunohistochemical analysis. *J Low Genit Tract Dis* 2005; **9**:100–7.

Queiroz C, Silva TC, Alves VA, et al. P16INK4a expression as a potential prognostic marker in cervical pre-neoplastic and neoplastic lesions. *Pathol Res Pract* 2006; **202**:77–83.

Quereda V, Martinalbo J, Dubus P, et al. Genetic cooperation between p21Cip1 and INK4 inhibitors in cellular senescence and tumor suppression. *Oncogene* 2007; **26**: 7665–74.

Quinn M, Babb P, Jones J, et al. Effect of screening on incidence of and mortality from cancer of cervix in England: evaluation based on routinely collected statistics. *BMJ* 1999; **318**: 904-8.

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.

Ressler S, Bartkova J, Niederegger H, et al. p16INK4A is a robust in vivo biomarker of cellular aging in human skin. *Aging Cell* 2006; **5**: 379–89.

Reuschenbach M, Waterboer T, Wallin KL, et al. Characterization of humoral immune responses against p16, p53, HPV16 E6 and HPV16 E7 in patients with HPV-associated cancers. *Int J Cancer* 2008; **123**: 2626–31.

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

Richard RM. Cervical intraepithelial neoplasia. *Pathol Annu* 1973; **8**:301–28.

Riethdorf L, Riethdorf S, Lee KR, et al. Human papillomaviruses, expression of p16INK4a, and early endocervical glandular neoplasia. *Hum Pathol* 2002; **3**:899–904.

Robb JA. The “ASCUS” swamp. *Diag Cytopathol* 1994; **11**: 319-20.

de Roda Husman AM, Walboomers JMM, Van den Brule AJC et al. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences

improves human papillomavirus detection by polymerase chain reaction. *J General Virology*, 1995; **76**: 1057–62.

Romagosa C, Simonetti S, Lopez-Vincente L, et al. p16INK4a overexpression in cancer: a tumor suppressor gene associated with senescence and high-grade tumors. *Oncogene* 2011; 1-11.

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.

Rous P. Transmission of a malignant new growth by mean of a cell-free filtrate. *J Am Med Association* 1911; **56**: 198.

Ruas M, Gregory F, Jones R, et al. CDK4 and CDK6 delay senescence by kinasedependent and p16INK4a-independent mechanisms. *Mol Cell Biol* 2007; **27**: 4273–82.

Sahebali S, Depuydt C, Segers K, et al. P16INK4a as an adjunct marker in liquid-based cervical cytology. *Int J Cancer* 2004; **108**:871–6.

Sahebali S, Depuydt C, Boulet G, et al. Immunocytochemistry in liquid-based cervical cytology: analysis of clinical use following a cross-sectional study. *Int. J Cancer* 2006; **118**:1254–60.

Sano T, Oyama T, Kashiwabara K, et al. Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. *Am J Path* 1998;

153:1741–8.

Saqi A, Pasha TL, McGrath CM, et al. Overexpression of p16INK4a in liquid-based specimens (SUREPATH TM) as marker of cervical dysplasia and neoplasia. *Diagn Cytopathol* 2002; **27**:365–70.

Schiffman MH, Bauer HM, Hoover RN, et al. Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1993; **85**: 958-64.

Schmitt CA, Fridman JS, Yang M, et al. A senescence program controlled by p53 and p16INK4a contributes to the outcome of cancer therapy. *Cell* 2002; **109**: 335-46.

Schneider A, Grubert T: Recombinant DNA technology. *Clin Obstet Gynecol* 1989; **32**: 127

Schneider-Stock R, Boltze C, Lasota J, et al. Loss of p16 protein defines high-risk patients with gastrointestinal stromal tumors: a tissue microarray study. *Clin Cancer Res* 2005; **11**: 638–45.

Schorge JO, Lea JS, Elias KJ, et al. P16 as a molecular biomarker of cervical adenocarcinoma. *Am J Obstet Gynecol* 2004; **190**:668–73.

Sedjo RL, Roe DJ, Abrahamsen M et al. Vitamin A, carotenoids, and risk of persistent oncogenic human papillomavirus infection. *Cancer Epidem Biomark Prev* 2002; **11**: 876–84.

Sedjo RL, Fowler BM, Schneider A et al. Folate, vitamin B12, and homocysteine status. findings of no relation between human papillomavirus persistence and cervical dysplasia. *Nutrition* 2003; **19**: 497–502.

Serrano M. The tumor suppressor protein p16INK4a. *Exp Cell Res* 1997; **237**: 7–13.

Serrano M. Cancer regression by senescence. *N Engl J Med* 2007; **356**: 1996–7.

Sherman ME, Schiffman M, Cox JT; Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance/ Low Grade Squamous Intraepithelial Lesions Triage Study Group. Effects of age and human papilloma viral load on colposcopy triage: data from the randomized Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance/ Low Grade Squamous Intraepithelial Lesion Triage Study (ATLS). *J Natl Cancer Inst* 2002; **94**: 102-7.

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.

Smith JS, Green J, Berrington DG et al. Cervical cancer and use of hormonal contraceptives: a systematic review. *Lancet* 2003; **361**: 1159–67.

Smith JS, Bosetti C, Munoz N et al. *Chlamydia trachomatis* and invasive cervical cancer: a pooled analysis of the IARC multicentric case–control study. *Int J Cancer* 2004; **111**: 431–9.

Solomon D, Schiffman M, Tarone R. Comparison of three management strategies for patients with atypical squamous cells of undetermined significance: baseline results from a randomized trial. *J Natl Cancer Instit* 2001; **93**: 293-9.

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

Sotlar K, Selinka HC, Menton M et al. Detection of human papillomavirus type16 E6/E7 oncogene transcripts in dysplastic and nondysplastic cervical scrapes by nested RT-PCR. *Gynecol Oncol* 1998; **69**: 114–21.

Statistics OfN. Data from Improving Outcomes in Gynaecological Cancers 1999.

Steenbergen RD, OudeEngberink VE, Kramer D et al. Down-regulation of GATA-3 expression during human papillomavirus-mediated immortalization and cervical carcinogenesis. *Am J Pathol* 2002; **160**: 1945–51.

Stewart CJ, Livingstone D, Mutch AF. Borderline nuclear abnormality in cervical smears: a cytological review of 200 cases with histological correlation. *Cytopathology* 1993; **4**:339-45.

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

The Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance/Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesions Triage Study (ATLS) 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

TOMBOLA Group. Cytological surveillance compared with immediate referral for colposcopy in management of women with low-grade cervical abnormalities multicentre randomized controlled trial. *BMJ* 2009; **339**: b2546

Tringler B, Gup C, Singh M, et al. Evaluation of p16INK4a and pRb expression in cervical squamous and glandular neoplasia. *Hum Pathol* 2004; **35**:659–95.

Tripathi A, Banerjee S, Roy A, et al. Alterations of the P16 gene in uterine cervical carcinoma from Indian patients. *Int J Gynecol Cancer* 2003; **13**:472–9.

Trunk M, Dallenbach-Hellweg G, Ridder R, et al. Morphologic characteristics of p16INK4a-positive cells in cervical cytology samples. *Acta Cytol* 2004; **48**:771–82.

Tsoumpou I, Arbyn M, Kyrgiou M, et al. p16INK4a immunostaining in cytological and histological specimens from the uterine cervix: A systematic review and meta-analysis. *Cancer Treatm Rev* 2009; **35**: 210-20.

Usman F, Hammond R. Cervical screening: management of patients referred for colposcopy with smear abnormalities less severe than dyskaryosis. *Cytopathology* 1998; **9**:100-6.

Valasoulis G, Tsoumpou I, Founta C, et al. The role of p16 (INK4a) immunostaining in the risk assessment of women with LSIL cytology: a prospective pragmatic study. *Eur J Gynaecol Oncol* 2011; **32**: 150-2.

Van Den Brule AJ, Walboomers JM, Du Maine M, et al. Difference in prevalence of human papillomavirus genotypes in cytomorphologically normal cervical smears is associated with a history of cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer* 1991; **48**:404-8.

Volgareva G, Zavalishina L, Andreeva Y, et al. Protein p16 as a marker of dysplastic and neoplastic alterations in cervical epithelial cells. *BMC Cancer* 2004; **4**:58.

de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR et al. Classification of papillomaviruses. *Virology*, 2004; **324**: 17–27.

Yang X, Jin G, Nakao Y et al. Malignant transformation of HPV 16- immortalized human endocervical cells by cigarette smoke condensate and characterization of multistage carcinogenesis. *Inter J Cancer* 1996; **65**: 338–44.

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

Walker EM, Dodgson J, Duncan ID. Does mild atypia on a cervical smear warrant further investigation? *Lancet* 1986; ii: 772–3.

Wang JL, Zheng BY, Li XD, et al. Predictive significance of the alterations of p16INK4a, p14ARF, p53, and proliferating cell nuclear expression in the progression of cervical cancer. *Clin Cancer Res* 2004; **10**:2407–14.

Wang JL, Zheng BY, Li XD, et al. P16INK4a and p14ARF expression pattern by

immunohistochemistry in human papillomavirus-related cervical neoplasia. *Mod Pathol* 2005; **18**: 629–37.

Wang SS, Trunk M, Schiffman M, et al. Validation of p16INK4a as a marker of oncogenic human papillomavirus infection in cervical biopsies from a population-based cohort in Costa Rica. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; **23**:1355–60.

Wentzensen N, Bergeron C, Cas F, et al. Evaluation of a nuclear score for p16INK4a–stained cervical squamous cells in liquid-based cytology samples. *Cancer* 2005; **105**: 461–7.

Wentzensen N, Bergeron C, Cas F, et al. Triage of women with ASCUS and LSIL cytology. *Cancer* 2006; **111**: 58–66.

Wentzensen N, von Knebel Doeberitz M. Biomarkers in cervical cancer screening. *Dis Markers* 2007; **23**: 315–30.

Williams GH, Romanowski P, Morris L et al. Improved cervical smear assessment using antibodies against proteins that regulate DNA replication. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 1998, **95**: 14932–7.

Wilson JMG, Jungner G. Principles and practice of screening for disease. *Public Health Paper Number 34*. Geneva: WHO, 1968.

Winer RL, Lee S, Hughes JP et al. Genital human papillomavirus infection: incidence and risk factors in a cohort of female university students. *AM J Epidemiol* 2003; **157**: 218-26.

Wollscheid V, Kuhne-Heid R, Stein I et al. Identification of a new proliferation associated protein NET-1/C4.8 characteristic for a subset of high-grade cervical intraepithelial neoplasia and cervical carcinomas. *Int J Cancer* 2002; **99**: 771–5.

Wong YF, Chung TK, Cheung TH, et al. Methylation of p16INK4A in primary gynecologic malignancy. *Cancer Lett* 1999;**136**: 231–5.

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

Wu J, Xue L, Weng M, et al. Sp1 is essential for p16 expression in human diploid fibroblasts during senescence. *PLoS One* 2007; **2**: e164.

Yildiz I, Usubutun A, Firat P, et al. Efficiency of immunohistochemical p16 expression and HPV typing in cervical squamous intraepithelial lesion grading and review of the p16 literature. *Pathol Res Pract* 2007; **203**:445–9.

Yoshida T, Fukuda T, Sano T, et al. Usefulness of liquid-based cytology specimens for the immunocytochemical study of p16 expression and human papillomavirus testing. *Cancer* 2004; **102**:100–8.

Zhang Q, Kuhn L, Denny L, et al. Impact of utilizing p16INK4a immunohistochemistry on estimated performance of three cervical cancer screening test. *Int. J. Cancer* 2006; **120**:351–6.

Zhao P, Mao X, Talbot IC. Aberrant cytological localization of p16 and CDK4 in colorectal

epithelia in the normal adenoma carcinoma sequence. *World J Gastroenterol* 2006; **12**: 6391-6.

Zhu D, Xu G, Ghandhi S, et al. Modulation of the expression of p16INK4a and p14ARF by hnRNP A1 and A2 RNA binding proteins: implications for cellular senescence. *J Cell Physiol* 2002; **193**: 19–25.

Zielinski GD, Snijders PJ, Rozendaal L, et al. The presence of high-risk HPV combined with specific p53 and p16INK4a 557expression patterns points to high-risk HPV as the main causative agent for adenocarcinoma in situ and adenocarcinoma of the cervix. *J Pathol* 2003; **201**:535–43.

Zindy F, Quelle DE, Roussel MF, et al. Expression of the p16INK4a tumor suppressor versus other INK4 family members during mouse development and aging. *Oncogene* 1997; **15**: 203–11.

zur Hausen H: Papillomavirus infections: a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta* 1996; **1288**:55–78.

zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature Review of Cancer* 2002, 342–50.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΕΝΤΥΠΟ ΓΙΑ ΤΗ ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Στοιχεία ασθενούς

Επώνυμο

Όνομα

Ημερ. Γεννήσεως

Τηλέφωνο

Ιστορικό

Ηλικία ενάρξεως

Αριθμός συντρόφων

σεξουαλικών επαφών

Κυήσεις

Αποβολές

Κάπνισμα

Αντισύλληψη

Ιστορικό τραχηλικής επεμβάσεως

Ναι

Όχι

Είδος επέμβασης

Ενδειξη

Ετος επέμβασης

Αιτία παραπομπής για κολποσκόπηση

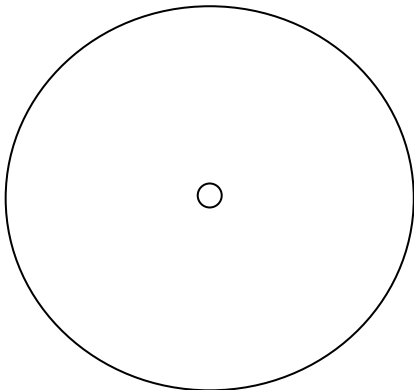
Προληπτικός έλεγχος

Αιμορραγία μετά από
σεξουαλική επαφήΜετα-εμμηνοπαυσιακή
αιμορραγία**Παραπεμπτική κυτταρολογική εξέταση**

Pap Test

LBC

Αποτέλεσμα

Κολποσκόπηση

Ημερομηνία:

HPV αλλοιώσεις: Ναι

Όχι

High-grade: Ναι

Όχι

ΣΥΣΤΑΣΗ

Επανάληψη κυτταρολογίας σε 6 μήνες 12 μήνες

Επανάληψη κολποσκοπησης σε 6 μήνες 12 μήνες

HPV-DNA test Ναι Όχι

ΘΕΡΑΠΕΙΑ Ναι Όχι

LLETZ Κωνοειδής εκτομή Άλλο -----

ΚΥΤΤΑΡΟΛΟΓΙΑ (1^η επίσκεψη)

Αποτέλεσμα:

ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ (1^η επίσκεψη)

Όχι Ναι LLETZ Κωνοειδής εκτομή Άλλο

Διάγνωση:

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Tsoumpou I, Arbyn M, Kyrgiou M, Wentzensen N, Koliopoulos G, Martin Hirsch P, Malamou- Mitsi V, Paraskevaïdis E. 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.

Tsoumpou I, Valasoulis G, Founta C, Kyrgiou M, Nasioutziki M, Daponte A, Koliopoulos G, Malamou-Mitsi V, Karakitsos P, Paraskevaïdis E. High-risk human papillomavirus DNA test and p16 (INK4a) in the triage of LSIL: A prospective diagnostic study. *Gynecol Oncol* 2011; **121**: 49-53.

Valasoulis G, Tsoumpou I, Founta C, Kyrgiou M, Dalkalitsis N, Nasioutziki M, Kassanos D, Paraskevaïdis E, Karakitsos P. The role of p16 (INK4a) immunostaining in the risk assessment of women with LSIL cytology: a prospective pragmatic study. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2011; **32**: 150-2.

Valasoulis G, Koliopoulos G, Founta C, Kyrgiou M, Tsoumpou I, Valari O, Martin-Hirsch P, Daponte A, Karakitsos P, Paraskevaïdis E. Alterations in human papillomavirus-related biomarkers after treatment of cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol*. 2011; **121**: 43-8.

