

Κλινική μελέτη

Η μελέτη της βιολογικής συμπεριφοράς του ιού HPV στον τράχηλο της μήτρας με σύγχρονες διαγνωστικές και προγνωστικές μεθόδους

Α. Καμπάς¹
 Ρ.Μ. Βαλερή²
 Χ. Χαραλαμπίδης³
 Κ. Καπλάνης⁴
 Χ. Καρτσιούνης⁵
 Χ. Δεστούνη⁶

¹Άγος (ΥΙ) Κυτταρολόγος
 Κυτταρολογικού Τμήματος 424
 ΓΣΝΕ, επιστημονικός συνεργάτης
 Κυτταρολογικού Τμήματος Α.Ν.Θ.
 «Θεαγένειο»

²Επιμελήτρια Α΄ Κυτταρολογικού
 Τμήματος Α.Ν.Θ. «Θεαγένειο»

³Παθολογοανατόμος, Επιστημονικός
 συνεργάτης Α.Ν.Θ. «Θεαγένειο»

⁴Αναπληρωτής Διευθυντής
 Γυναικολογικής Ογκολογικής Κλινικής
 Α.Ν.Θ. «Θεαγένειο»

⁵Διευθυντής Γυναικολογικής
 Ογκολογικής Κλινικής Α.Ν.Θ.
 «Θεαγένειο»

⁶Διευθύντρια Κυτταρολογικού
 Τμήματος Α.Ν.Θ. «Θεαγένειο»

Αλληλογραφία:
 Λάμπρος Καμπάς
 Αλεξάνδρου Σβάλου 55
 54621 Θεσσαλονίκη
 Τηλ: 2310266799
 Fax: 2310266789
 E-mail: lambkamb@yahoo.com
 Κατατέθηκε: 16/04/10
 Εγκρίθηκε: 21/06/10

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός: Η διερεύνηση της αξίας σύγχρονων μεθόδων στην έγκαιρη ανίχνευση και πρόγνωση των προκαρκινικών αλλοιώσεων σε κολποτραχηλικά επιχρίσματα.

Υλικό και Μέθοδοι: Η μελέτη μας περιλαμβάνει 375 κολποτραχηλικά δείγματα από 75 γυναίκες, ηλικίας 21-52 ετών, με παθολογικό τεστ Παπ, στις οποίες διενεργήθηκε τακτικός επανέλεγχος (follow-up) ανά 3μήνο για διάστημα 12 μηνών. Η τεχνική επεξεργασία του υλικού έγινε με την Κυτταρολογία Ύγρης Φάσης (ThinPrep). Στο υπόλοιπο υλικό κάθε δείγματος εφαρμόστηκαν το HPV DNA test (hc2) για την ανίχνευση του ιικού φορτίου των low και high risk στελεχών, μία τεχνική PCR (Clinical Apgays) για την τυποποίηση του ιού, καθώς επίσης οι προγνωστικές ανοσοκυτταροχημικές μέθοδοι ανίχνευσης της L1 πρωτεΐνης και του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p16^{INK4a}. Ακολούθησε συγκριτική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων των τεχνικών και συσχετίσή τους με την κυτταρομορφολογική εικόνα.

Αποτελέσματα: Με βάση την κυτταρομορφολογία το 72% των περιστατικών παρουσίασε υποστρόφη, ενώ το 28% εμμένουσα λοίμωξη-εξέλιξη προς κακοήθεια. Το μοντέλο της υποστρόφης συνοδεύτηκε από μείωση και διαφοροποίηση του ιικού φορτίου από high σε low risk στελέχη, θετικοποίηση της L1 πρωτεΐνης και αρνητικοποίηση του p16^{INK4a}. Αντίθετα, αύξηση και διαφοροποίηση του ιικού φορτίου από low σε high risk στελέχη, υπερέκφραση του p16^{INK4a} και αρνητικοποίηση της L1 παρατηρήθηκαν στο μοντέλο της εξέλιξης.

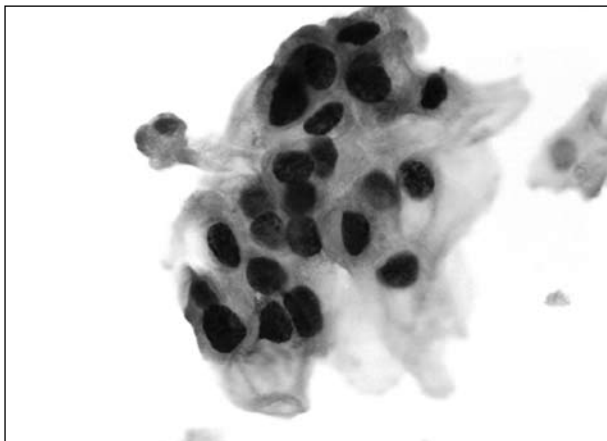
Τα αποτελέσματα της PCR έδειξαν την αναμενόμενη υπεροχή του τύπου 16 (29%) και ακολούθησαν με σειρά συχνότητας τα στελέχη 31, 53 και 66.

Συμπεράσματα: Οι πληροφορίες που παρέχουν οι παραπάνω τεχνικές φαίνεται να είναι πολύ χρήσιμες για τη σωστή αξιολόγηση του βαθμού σοβαρότητας μιας προκαρκινικής ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης, συμβάλλοντας έτσι στην ορθή διαχείριση και στρατηγική αντιμετώπισης του γυναικείου πληθυσμού με HPV.

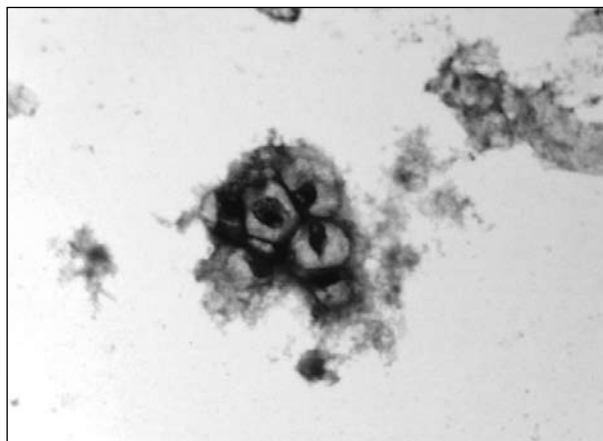
Όροι ευρητήριο: HPV, HPV DNA test, L1 πρωτεΐνη, γονίδιο p16^{INK4a}, υποστρόφη, εξέλιξη.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

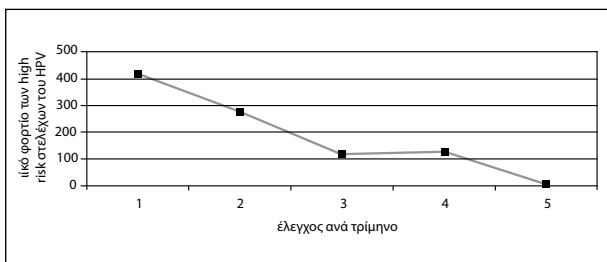
Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας αποτελεί σοβαρό κοινωνικό πρό-



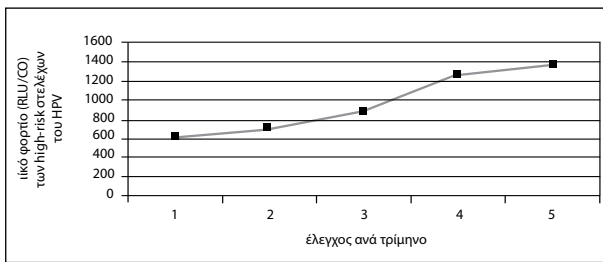
Εικόνα 1. Θετική έκφραση της L1 πρωτεΐνης σε LGSIL αλλοίωση (ThinPrep x 400).



Εικόνα 2. Θετική έκφραση του p16^{INK4a} πρωτεΐνης σε LGSIL αλλοίωση (ThinPrep x 400).



Διάγραμμα 1. Η μεταβολή του ιϊκού φορτίου (RLU/CO) των high-risk στελεχών του HPV σε διάστημα 12 μηνών στις περιπτώσεις που παρουσίασαν υποτροφή της λοίμωξης.



Διάγραμμα 2. Η μεταβολή του ιϊκού φορτίου των high-risk στελεχών του HPV σε διάστημα 12 μηνών στις περιπτώσεις που παρουσίασαν εμμένουσα λοίμωξη.

βλημα και παραμένει 2ος κατά σειρά συχνότητας στις γυναίκες παγκόσμια^{1,2}. Η Κυτταρολογική εξέταση (Παπ τεστ) με την εγκαίρη ανίχνευση των προκαρκινικών αλλοιώσεων έχει περιορίσει σημαντικά τα ποσοστά εμφάνισης καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, ειδικότερα σε χώρες που αναπτύχθηκαν προγράμματα συστηματικού πληθυσμιακού ελέγχου³. Παρά την εφαρμογή όμως των προγραμμάτων αυτών, ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας δεν έχει εξαλειφθεί, καθώς παρατηρούνται κάθε χρόνο 450.000 νέες περιπτώσεις και 250.000 θάνατοι παγκόσμια^{4,5}. Ο ιός των ανθρωπίνων θηλωμάτων (HPV) αποτελεί τον βασικό αιτιολογικό παράγοντα και φαίνεται να παίζει κυρίαρχο ρόλο στην τραχηλική καρκινογένεση. Σε μία πρόσφατη πολυκεντρική μελέτη διαπιστώθηκε η ύπαρξη ογκογόνων στελεχών του ιού HPV στο 99,7% των καρκίνων τραχήλου μήτρας^{2,6}. Η HPV λοίμωξη είναι μία συνεχώς μεταβαλλόμενη κατάσταση, εξαρτώμενη από πολλούς παράγοντες που αφορούν είτε τον ίδιο τον ιό είτε το κύτταρο ξενιστή. Μία πλακώδης ενδοεπιθηλιακή αλλοίωση, που οφείλεται στον ιό HPV,

μπορεί να υποστραφεί πλήρως ή μερικώς, να παραμείνει ως έχει ή να εξελιχθεί σε σοβαρότερο βαθμού αλλοίωση^{7,8}. Είναι πολύ σημαντικό να γνωρίζει ο κλινικός ιατρός την πρόγνωση των αλλοιώσεων αυτών, έτσι ώστε να επιλέξει την ομάδα γυναικών υψηλού κινδύνου που χρήζει τακτικότερου ελέγχου και ενδεχομένως ειδικών θεραπευτικών χειρισμών.

Έτσι λοιπόν, η δεδομένη άμεση συσχέτιση του HPV με την τραχηλική καρκινογένεση επιβάλλει σήμερα την ακριβέστερη ανίχνευσή του, καθώς επίσης και την στενή παρακολούθηση της βιολογικής συμπεριφοράς της HPV λοίμωξης. Στο πεδίο αυτό, το επιστημονικό ενδιαφέρον εστιάζεται τα τελευταία χρόνια στη μοριακή προσέγγιση του προβλήματος, κυρίως με την ανάπτυξη μεθόδων ανίχνευσης τόσο του ιϊκού γονιδιώματος όσο και πρωτεϊνών του ιού ή του κυτταρικού κύκλου, παρέχοντας πληροφορίες για την υποτροφή ή εξέλιξη μιας προκαρκινικής αλλοίωσης.

Ο σκοπός της μελέτης μας ήταν η διερεύνηση της αξίας σύγχρονων τεχνικών ανίχνευσης του HPV που

Πίνακας 1. Η έκφραση της L1 πρωτεΐνης κατά το follow-up

N=75	1ος έλεγχος		2ος έλεγχος		3ος έλεγχος		4ος έλεγχος		5ος έλεγχος		Πορεία της HPV λοίμωξης
	L1(+)	L1(-)	L1(+)	L1(-)	L1(+)	L1(-)	L1(+)	L1 (-)	L1(+)	L1 (-)	
54	38	16	44	10	50	4	36	18	15	39	Υποστροφή
21	7	14	5	16	4	17	1	20	-	21	Εμμένουσα-Εξέλιξη

Πίνακας 2. Η έκφραση του γονιδίου P16^{INK4a} κατά το follow-up

N=75	1ος έλεγχος		2ος έλεγχος		3ος έλεγχος		4ος έλεγχος		5ος έλεγχος		Πορεία της HPV λοίμωξης
	P16(+)	P16(-)	P16(+)	P16(-)	P16(+)	P16(-)	P16(+)	P16(-)	P16(+)	P16(-)	
54	16	38	12	42	5	49	-	54	-	54	Υποστροφή
21	14	7	16	5	17	4	18	3	19	2	Εμμένουσα-Εξέλιξη

συμβάλουν στη διάγνωση και κυρίως στην πρόγνωση των προκαρκινικών αλλοιώσεων σε κολποτραχηλικά δείγματα.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Στη μελέτη μας συμπεριλάβαμε 75 γυναίκες ηλικίας 21-52 ετών, που εξετάστηκαν στο Κέντρο Προληπτικού Ελέγχου του Α.Ν.Θ. «Θεαγένειο» και των οποίων το τεστ Παπ είχε παθολογικά ευρήματα που αφορούσαν αλλοιώσεις HPV λοίμωξης, χαμηλού βαθμού δυσπλασία (LGSIL κατά Bethesda) ή ASCUS (Atypical squamous cells of undetermined significance). Στις συγκεκριμένες ασθενείς διενεργήθηκε τακτικός επανέλεγχος (follow-up) ανά τρίμηνο για διάστημα ενός έτους. Έτσι, το συνολικό υλικό που διερευνήθηκε στη μελέτη μας αφορούσε 375 κολποτραχηλικά δείγματα (Τεστ Παπ).

Η επεξεργασία αυτών έγινε με την Κυτταρολογία Υγρής Φάσης (τεχνική ThinPrep) που αποτελεί μία αυτοματοποιημένη μέθοδο επεξεργασίας και επίστρωσης κυτταρολογικού υλικού σε μονοεπίπεδη στοιβάδα και παρουσιάζει σαφή πλεονεκτήματα έναντι της συμβατικής μεθόδου⁹.

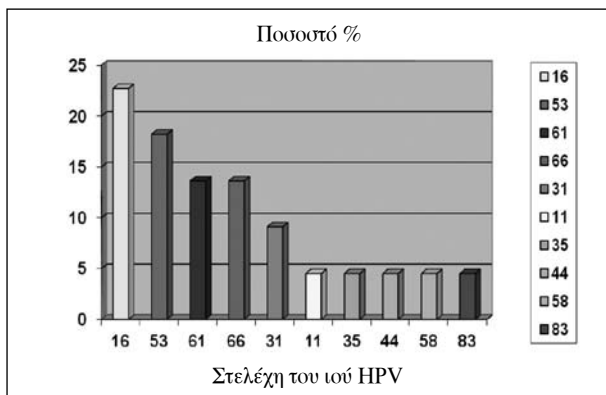
Στο υπόλοιπο υλικό κάθε δείγματος εφαρμόστηκαν 2 μοριακές τεχνικές ανίχνευσης του ιϊκού γονιδιώματος, το HPV DNA test (Hybrid Capture 2, Digene) και μία τεχνική PCR (Clinical Arrays, Genomica). Η πρώτη μέθοδος στηρίζεται στην τεχνολογία ανάλυσης προσδιορισμένου υβριδίου με ενίσχυση σήματος σε πλακίδιο μικροτιτλοδότησης χρησιμοποιώντας χημειοφωταύγεια, και παρέχει τη δυνατότητα ανίχνευσης του DNA 2 ομάδων στελεχών του HPV (low και high-risk), καθώς και

μέτρησης του ιϊκού φορτίου σε μονάδες RLU (Relative Light Units). Η δεύτερη μέθοδος βασίζεται στον πολλαπλασιασμό του DNA με τη γνωστή αλυσιδωτή αντίδραση με πολυμεράση, χρησιμοποιώντας και τη μεθοδολογία των μικροσυστοιχιών. Η τεχνική αυτή είναι ικανή να προσδιορίσει ακριβώς τον τύπο στελεχούς του ιού (τυποποίηση).

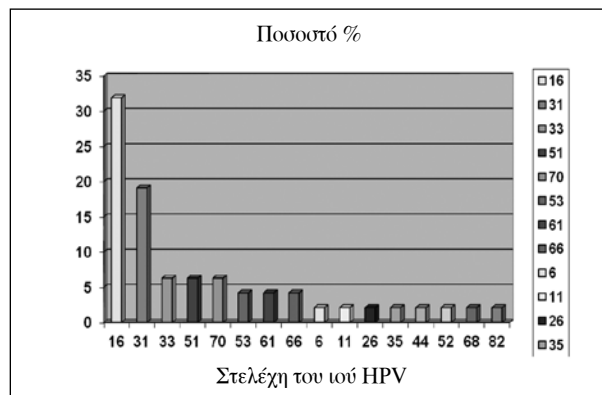
Εκτός από τις μοριακές μεθόδους ανίχνευσης του ιϊκού DNA, εφαρμόστηκαν σε επιπλέον πλακίδια από το ίδιο δείγμα 2 απλές ανοσοκυτταροχημικές τεχνικές, οι οποίες παρέχουν πληροφορίες για την πρόγνωση της εξέλιξης των προκαρκινικών αλλοιώσεων του τραχήλου της μήτρας. Πρόκειται για την ανίχνευση της L1 καψιδικής πρωτεΐνης του HPV και της p16^{INK4a} πρωτεΐνης του κυτταρικού κύκλου που κωδικοποιείται από το ομώνυμο ογκοκατασταλτικό γονίδιο.

Η L1 καψιδική πρωτεΐνη του ιού HPV αποτελεί τον κύριο στόχο της κυτταρικής ανοσοαπάντησης⁵. Η ανίχνευσή της σημαίνει ενεργοποίηση του οργανισμού και θεωρείται θετικό προγνωστικό στοιχείο για την υποστροφή των αλλοιώσεων. Για την L1 χρησιμοποιήθηκε το Viroactiv HPV screening kit (Virofem Diagnostica, Wiesbaden, Germany) και αξιολογήθηκε η πυρηνική έκφραση των προσβληθέντων κυττάρων από τον ιό.

Η πρωτεΐνη p16^{INK4a} είναι προϊόν ογκοκατασταλτικού γονιδίου και αποτελεί μέρος του μονοπατιού του pRb, ενώ ο ρόλος της είναι η διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1-S^{10,11}. Σε περίπτωση HPV λοίμωξης η πρωτεΐνη αυτή εμπλέκεται και διαταράσσει τον κυτταρικό κύκλο, μέσω της ογκοπρωτεΐνης E7 του ιού, με αποτέλεσμα την υπερέκφρασή της. Έτσι ενισχύε-



Διάγραμμα 3. Αποτελέσματα της τυποποίησης του HPV με την τεχνική PCR στις περιπτώσεις που παρουσίασαν υποστρωφή της λοίμωξης.



Διάγραμμα 4. Αποτελέσματα της τυποποίησης του HPV με την τεχνική PCR στις περιπτώσεις που παρουσίασαν εμμένουσα λοίμωξη.

ται η άποψη ότι το p16^{INK4a} αποτελεί δυναμικό μοριακό δείκτη κακής πρόγνωσης. Για την ανίχνευσή του χρησιμοποιήθηκε το CINtecTM p16^{INK4a} Cytology Kit (K5340, DakoCytomation, Denmark), και αξιολογήθηκε τόσο η πυρηνική όσο και η κυτταροπλασματική έκφρασή του στα δυσπλαστικά πλακώδη επιθηλιακά κύτταρα.

Μετά την ολοκλήρωση των τεχνικών αυτών, ακολούθησε η συγκριτική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων τους, η συσχέτισή τους με τα κυτταρομορφολογικά ευρήματα, καθώς επίσης η μεταβολή τους στο χρονικό διάστημα του τακτικού επανελέγχου για την κάθε γυναίκα χωριστά.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η κυτταρομορφολογική εικόνα των δειγμάτων από το follow-up 54 γυναικών (72% επί του συνόλου) ήταν συμβατή με υποστρωφή των αλλοιώσεων. Αντίθετα, στις υπόλοιπες 21 (28%) παρατηρήθηκαν εμμένουσες βλάβες και μία τάση εξέλιξης σε σοβαρότερου βαθμού αλλοίωση.

Τα αποτελέσματα του HPV DNA test έδειξαν για την ομάδα της υποστρωφής σχετικά μέτριες τιμές ιϊκού φορτίου (414 RLU/CO κατά μέσο όρο) στον πρώτο έλεγχο, που στη συνέχεια μειώθηκαν πολύ, φθάνοντας έτσι στον έλεγχο μετά από 12 μήνες την κατά μέσο όρο τιμή 3,5 RLU/CO (Διάγραμμα 1). Από την άλλη πλευρά, η ομάδα της εμμένουσας λοίμωξης παρουσίασε μία συνεχώς αυξητική τάση σε ιϊκό φορτίο, ξεκινώντας από τον πρώτο έλεγχο με τιμή κατά μέσο όρο 620 RLU/CO και καταλήγοντας στην τιμή 1389 RLU/CO ένα χρόνο μετά (Διάγραμμα 2).

Στις γυναίκες με υποστρωφή η τυποποίηση που διενεργήθηκε με την PCR έδειξε τα κυριότερα κατά σειρά συχνότητας στελέχη: 16 (22,7%), 53 (18,2%), 61 (13,6%),

66 (13,6%) και 31 (9,1%) (βλ. Διάγραμμα 3). Στην ομάδα της εμμένουσας λοίμωξης τα κυριότερα στελέχη του ιού ήταν τα 16 (31,9%), 31 (19,1%), 33(6,3%), 51(6,3%), 70 (6,3%), και 53 (4,2%) (βλ. Διάγραμμα 4).

Στα περισσότερα περιστατικά παρατηρήθηκε μεταβολή της έκφρασης των ανοσοκυτταροχημικών δεικτών ανάλογα με την κυτταρομορφολογική εικόνα. Όπως φαίνεται στους πίνακες 1 και 2, η έκφραση της L1 πρωτεΐνης παρατηρήθηκε στα περιστατικά που παρουσίασαν τάση υποστρωφής, ενώ το p16^{INK4a} υπερεκφράστηκε στις περιπτώσεις με εξέλιξη προς υψηλότερου βαθμού αλλοιώσεις.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Είναι δεδομένο σήμερα ότι ο ιός των ανθρωπίνων θηλωμάτων HPV παίζει πρωταρχικό ρόλο στην τραχηλική καρκινογένεση και την ανάπτυξη της διθητικής νόσου. Μόλυνση όμως μιας γυναίκας από τον ιό HPV δεν σημαίνει υποχρεωτικά και εμφάνιση καρκίνου τραχήλου μήτρας. Μία αλλοίωση LGSIL που προκαλείται από HPV λοίμωξη είτε θα υποστραφεί πλήρως ή μερικώς, είτε θα παραμείνει ως έχει, είτε θα εξελιχθεί^{7,8}. Υπολογίζεται ότι σε υψηλό ποσοστό που αγγίζει το 90% των ατόμων με HPV λοίμωξη, οι αλλοιώσεις υποστρέφουν σε χρονικό διάστημα ενός χρόνου περίπου⁵. Το είδος και ο βαθμός σοβαρότητας της αλλοίωσης που θα προκληθεί εξαρτάται άμεσα από τον ογκογόνο τύπο του ιού, από τη θέση της μόλυνσης και κυρίως από την κατάσταση του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή και των μηχανισμών ογκοκαταστολής που θα επιτρέψουν την ανάπτυξη ή μη μιας παθολογικής κατάστασης¹². Η παροχή πληροφοριών για την πορεία μιας προκαρκινικής αλλοίωσης είναι πρωταρχικής σημασίας για την επιλογή των γυναικών υψηλού κινδύνου που

χρηζουν συστηματικής παρακολούθησης και ειδικής θεραπευτικής αντιμετώπισης.

Η εφαρμογή σύγχρονων μεθόδων βασιζόμενες στη μοριακή βιολογία και την ανοσοκυτταροχημεία, πέραν της κλασικής Κυτταρολογίας, φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο τα τελευταία χρόνια στην πρόληψη του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Οι μέθοδοι ανίχνευσης του ιϊκού γονιδιώματος (hc2 και PCR) επιτρέπουν μία ακριβέστερη διάγνωση της HPV λοίμωξης, καθώς και την πρόγνωσή της με την ανεύρεση των ογκογόνων στελεχών του ιού. Παράλληλα, ο ποσοτικός προσδιορισμός του ιϊκού φορτίου παρέχει επιπλέον πληροφορίες για το δυναμικό της HPV λοίμωξης.

Στις εμμένουσες για HPV λοίμωξη περιπτώσεις της μελέτης μας η τυποποίηση που διενεργήθηκε με την PCR μέθοδο έδειξε την αναμενόμενη υπεροχή του στελέχους 16, που είναι και ο συχνότερος τύπος του ιού στα πλακώδη καρκινώματα τραχήλου της μήτρας¹³⁻¹⁴. Ακολούθησαν οι τύποι 31, 33 και 51, οι οποίοι θεωρούνται υψηλού κινδύνου (high-risk) και βρίσκονται μέσα στα 10 πιο συχνά στελέχη του ιού¹³. Από την άλλη πλευρά, στην ομάδα των γυναικών με υποτροπή ανιχνεύθηκαν, εκτός από το 16 που ήταν και εδώ το συχνότερο, στελέχη high-risk άλλα λιγότερο δημοφιλή, όπως το 53, 66 και 61¹³. Τα ευρήματα αυτά αποδεικνύουν ότι η ανεύρεση high-risk ογκογόνων τύπων, ακόμη και του στελέχους 16 δεν προδικάζει την κακοήγη εξέλιξη μιας HPV λοίμωξης.

Παρατηρήσαμε επίσης, ότι η μεταβολή του ιϊκού φορτίου και των 2 ομάδων γυναικών στο διάστημα των 12 μηνών ήταν ανάλογη της βιολογικής συμπεριφοράς του ιού (Διάγραμμα 1, 2). Στις εμμένουσες περιπτώσεις ο μέσος όρος ιϊκού φορτίου παρουσίασε ανοδική τάση πλησιάζοντας την τιμή 1400 RLU/CO στον τελευταίο έλεγχο. Αντίθετα στις υποστραφείσες περιπτώσεις ο μέσος όρος του ιϊκού φορτίου παρουσίασε πτωτική τάση, που στην πλειονότητά τους στον τελευταίο έλεγχο δεν ανιχνεύθηκε καθόλου το DNA του ιού. Οι πληροφορίες που παρέχει η μέτρηση του ιϊκού φορτίου με το hc2 φαίνεται ότι είναι ενδεικτικές του δυναμικού της HPV λοίμωξης.

Οι ανοσοκυτταροχημικές μέθοδοι ανίχνευσης των πρωτεϊνών L1 και P16^{INK4a} φαίνεται ότι αποτελούν αξιόπιστους προγνωστικούς δείκτες για την εξέλιξη των αλλοιώσεων από HPV λοίμωξη σε συνεργασία με την κλινική και κυτταρολογική εξέταση. Η θετική έκφραση της L1 πρωτεΐνης σημαίνει ενεργό λοίμωξη, δηλαδή ανοσοαντίδραση του οργανισμού στον ιό HPV, γεγονός που θεωρείται θετικό προγνωστικό στοιχείο για την υποτροπή των αλλοιώσεων¹⁵. Το p16^{INK4a} είναι ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο, το οποίο σε πολλούς όγκους έχει διαπιστωθεί ότι είναι

λειτουργικά απενεργοποιημένο, είτε λόγω κάποιας γονιδιακής μετάλλαξης είτε λόγω υπερμεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου. Σε περίπτωση HPV λοίμωξης και ειδικότερα από ογκογόνα στελέχη του ιού παρατηρείται, μέσω της E7 ογκοπρωτεΐνης, άρση της αναστολής μετάβασης από τη G1 στην S φάση του κυτταρικού κύκλου, γεγονός που οδηγεί σε υπερέκφραση του p16^{INK4a}^{10,16-18}.

Τα δεδομένα της μελέτης μας έδειξαν ότι η L1 εκφράστηκε κυρίως στις χαμηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις (LGSIL) καθώς και στα περιστατικά με τάση υποτροφής στο follow-up, γεγονός που ερμηνεύει την ευνοϊκή προγνωστική της αξία. Από την άλλη πλευρά, η αρνητική έκφραση της L1 πρωτεΐνης σε αλλοιώσεις HGSIL συνδυάζεται με εξέλιξη προς κακοήθεια, ενώ δεν έχει την ίδια σημασία σε ηπιότερου βαθμού αλλοιώσεις, όπου μπορεί να δηλώνει και την απουσία του ιού.

Σχετικά με το p16^{INK4a}, παρατηρήθηκε υπερέκφραση του σε όλα τα περιστατικά με υψηλού βαθμού αλλοιώσεις, καθώς και στις LGSIL περιπτώσεις που κατά το follow-up παρουσίασαν τάση εξέλιξης της νόσου.

Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί ότι η επίτευξη τόσο των μοριακών όσο και των ανοσοκυτταροχημικών τεχνικών προϋποθέτει την εφαρμογή της Κυτταρολογία Υγρής Φάσης (τεχνική ThinPrep). Η τεχνολογία της υγρής φάσης με το φίλτράρισμα, την απομάκρυνση της βλέννης και των ερυθρών και την μονοεπίπεδη επίστρωση του υλικού, επιτρέπει το καθαρότερο υπόστρωμα και την υψηλής ευκρίνειας κυτταρομορφολογία. Το γεγονός ότι αντιπροσωπευτικό δείγμα του υλικού επιστρώνεται στο πλακίδιο, δίνει τη δυνατότητα δημιουργίας αρχειακού υλικού στο οποίο μπορούν να εφαρμοσθούν επιπλέον τεχνικές.

Από τη μελέτη αυτή φαίνεται ότι η HPV λοίμωξη δεν είναι μια σταθερή αλλά μία συνεχώς μεταβαλλόμενη κατάσταση, η έκβαση της οποίας ενδεχομένως εξαρτάται και από διάφορους συνεργούς παράγοντες. Η εκτίμηση μιας προκαρκινικής αλλοίωσης θα πρέπει να γίνεται πρωταρχικά από την αξιολόγηση των κυτταρομορφολογικών ευρημάτων. Οι πληροφορίες που αντλούνται από τις μοριακές και ανοσοκυτταροχημικές μεθόδους θα πρέπει να εκτιμώνται πάντα σε σχέση με την κυτταρομορφολογική εικόνα. Όπως φάνηκε στη μελέτη μας, η απλή αναγνώριση ογκογόνων τύπων HPV παρείχε απλά ενδείξεις και όχι αποδείξεις της βιολογικής συμπεριφοράς μιας λοίμωξης. Επίσης η ερμηνεία του ανοσοκυτταροχημικού δείκτη L1 διαφοροποιούταν ανάλογα με το είδος της αλλοίωσης.

Η μείωση του ιϊκού φορτίου, η θετικοποίηση της L1 και η αρνητικοποίηση του p16^{INK4a} συσχετίστηκαν με βάση κυρίως την κυτταρομορφολογική εικόνα με τάση υποτροφής της αλλοίωσης. Αντίθετα, η εξέλιξη

της κυτταρομορφολογίας σε συνδυασμό με την αύξηση του ιϊκού φορτίου, την υπερέκφραση του p16^{INK4a} και την αρνητικοποίηση της L1 εξέφρασαν την εμμένουσα λοίμωξη και την τάση εξέλιξης της αλλοίωσης προς κακοήθεια.

Συμπερασματικά, η Κυτταρομορφολογία στο τεστ Παπ σε συνδυασμό με τις τεχνικές αυτές φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο για τη σωστή αξιολόγηση του βαθμού σοβαρότητας μιας προκαρκινικής ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης, γεγονός που συμβάλλει στην ορθή διαχείριση και στρατηγική αντιμετώπισης του γυναικείου πληθυσμού με HPV λοίμωξη. Η νέα εποχή της πρωτογενούς πρόληψης με τα εμβόλια για τον ιό HPV σε συνδυασμό με τη δευτερογενή πρόληψη (Παπ τεστ, μοριακές και ανοσοκυτταροχημικές τεχνικές), φαίνεται ότι θα ικανοποιήσουν τις προσδοκίες για την εξάλειψη του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, που αποτελεί τον κύριο στόχο όλων μας.

Summary

Kampas K, Valeri RM, Xaralambidis X, Kaplanis K, Kartsionis D, Destouni X

The combination of ancillary techniques in the prognosis and management of cervical intraepithelial lesions
Hellen Obstet Gynecol 22(4):183-189, 2010

Objective: The aim of this report is to estimate the value of the combination of ancillary techniques in the prognosis and management of cervical intraepithelial lesions.

Methods: In 75 women with abnormal Pap test 5 serial follow-up specimens were collected during a period of 12 months, processed by ThinPrep method. Four ancillary techniques were performed, including HPV DNA test (hc2), PCR (clinical arrays) and the immunocytochemical tests for detection of host p16^{INK4a} and HPV L1. The results of each case were evaluated in correlation with cytomorphology.

Results: In most cases, the results of these tests were equal to cytomorphology. Fifty four of the 75 studied cases (72%) regressed while 21 (28%) persisted or progressed within a period of 12 months. Regression of lesions was marked by diversion from dysplasia to normal epithelial cells, host p16^{INK4a} negativity, HPV L1 positivity and elimination of HPV DNA during follow up. Accordingly, persistence or progression of intraepithelial lesions was associated with host p16^{INK4a} positivity, HPV L1 negativity and presence of high-risk HPV DNA.

The most frequent genotypes were HPV 16 (20%), 31, 53 and 66.

Conclusions: All these methods seem to be valuable in prognosis of a changing dynamic

condition with an unpredictable biological behaviour. Cytomorphology in combination with these ancillary techniques contribute to the management of HPV affected women.

Key words: HPV, L1, p16^{INK4a}, HPV DNA test, regression, progression.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Bosch FX, Manos MM, Munoz N et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *J Natl cancer Inst* 1995; 87:796-802.
2. Walboomers JMM, Jacobs MV, Manos MM et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999; 189:12-19.
3. Cantor SB, Atkinson EN, Cardenas-Turan MC et al. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a meta-analysis. *Acta Cytol* 2005; 49:405-415.
4. Munoz N. *J Clin Virol* 2000; 19:1-5.
5. White WI, Wilson SD, Bonnez W et al. In vitro infection and typed-restricted antibody-mediated neutralization of authentic human papillomavirus type 16. *J Virol* 1998; 72:959-649.
6. Hagensee ME, Koutsky LA, Lee SK et al. Detection of cervical antibodies to HPV-16 capsid antigens in relation to detection of HPV-16 DNA and cervical lesions. *J Infect Dis* 2000; 181:1234-1239.
7. Pagliusi SR, Aguado MT. Efficacy and other milestones for human papillomavirus vaccine introduction. *Vaccine* 2004; 23:569-578.
8. Insinga RP, Glass AG and Rush BB. Diagnoses and outcomes in cervical cancer screening: A population-based study. *Am J Obstet Gynecol*. 2004; 191:105-113.
9. Linder J, Zahniser D. ThinPrep Papanicolaou testing to reduce false-negative cervical cytology. *Arch Pathol Lab Med* 1998; 122:139-144.
10. Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D et al. Overexpression of p16 as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer* 2001; 92:276-284.
11. Durst m, Glitz D, Schneider a, zur Hausen H. HPV 16 gene expression and DNA replication in cervical neoplasia: analysis by in situ hybridization. *Virology* 1992; 189:132-140.
12. Koutsky L. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am J Med* 1997; 102:3-8.
13. Munoz N, Bosch X, de Sanjose S et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types

- associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003; 348:518-27.
14. Beutner K, Tying S. Human papillomavirus and human disease. *Am J Med* 1997; 102:9-15.
 15. Griesser H, Sander H, Hilfrich R, Moser B, Schenk U. Correlation of immunochemical detection of HPV L1 capsid protein in Pap smears with regression of high-risk HPV positive mild/moderate dysplasia. *Analyt Quant Cytol Histol* 2004; 26:241-245.
 16. Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin C/CDK4. *Nature* 1993; 366:704-707.
 17. Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J et al. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 1994; 264:436-440.
 18. Nobori T, Miura K, Wu DJ et al. Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* 1994; 368:753-6.