



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

**ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ
ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΥΣΙΚΗΣ**

**Εφαρμογή μεθόδων αναγνώρισης προτύπων στην
ταξινόμηση αλλοιώσεων του τραχήλου της μήτρας με αξιοποίηση
πραγματικών δεδομένων με ελλιπή στοιχεία**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Καρακίτσου Ευφροσύνη

**Επιβλέπον Καθηγητής: Κουτσούρης Δημήτριος,
Καθηγητής ΕΜΠ**

Αθήνα 2013



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

**ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ
ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΥΣΙΚΗΣ**

**Εφαρμογή μεθόδων αναγνώρισης προτύπων στην
ταξινόμηση αλλοιώσεων του τραχήλου της μήτρας με αξιοποίηση
πραγματικών δεδομένων με ελλιπή στοιχεία**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Καρακίτσου Ευφροσύνη

**Επιβλέπον Καθηγητής: Κουτσούρης Δημήτριος,
Καθηγητής ΕΜΠ**

Αθήνα 2013

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. ΚΟΥΤΣΟΥΡΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ (επιβλέπον μέλος ΔΕΠ)
2. ΣΕΡΑΦΕΤΙΝΙΔΗΣ ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
3. ΜΑΤΣΟΠΟΥΛΟΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή, κύριο Δημήτριο Κουτσούρη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου αυτή τη διπλωματική εργασία, καθώς και τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής κύριο Αλέξανδρο Σεραφετινίδη και κύριο Γεώργιο Ματσόπουλο. Ακόμη, θα ήθελα να εκφράσω την ιδιαίτερη ευγνωμοσύνη μου στον κύριο Αβραάμ Πουλιάκη για την πολύτιμη βοήθεια, την καθοδήγηση και τον χρόνο που αφιέρωσε κατά την εκπόνηση της εργασίας. Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου και στα μέλη του εργαστηρίου Διαγνωστικής Κυτταρολογίας και του Β' Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής του Ιατρικού Τμήματος του ΕΚΠΑ για τα δεδομένα που μου παραχώρησαν και την αμέριστη συμπαράστασή τους. Ωστόσο, δε θα μπορούσα να παραλείψω να αναφερθώ και στην οικογένειά μου, η αγάπη και οι φροντίδες της οποίας με περιβάλλουν και με ενδυναμώνουν σε όλη μου την πορεία.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1	Περίληψη	16
2	Abstract	18
3	ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	20
3.1	ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑ	20
3.2	ΑΝΑΤΟΜΙΑ.....	21
3.2.1	Αγγεία και νεύρα	22
3.3	ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ.....	22
3.4	ΠΛΑΚΩΔΗΣ-ΚΥΛΙΝΔΡΙΚΗ ΣΥΜΒΟΛΗ ΚΑΙ ΖΩΝΗ ΜΕΤΑΠΤΩΣΗΣ	23
3.5	ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ	24
3.5.1	Πρωτεΐνη p53 [5]	25
3.5.2	Πρωτεΐνη Rb [5]	25
3.6	HPV.....	25
3.6.1	Δομή και γενωμική οργάνωση.....	26
3.6.2	Μολυσματικός κύκλος του HPV και ογκογένεση	28
3.6.3	Βιολογία της λοίμωξης από ιό HPV	31
3.6.4	Φυσική Ιστορία HPV λοίμωξης.....	32
3.6.5	Επιδημιολογία της HPV λοίμωξης.....	37
3.7	ΚΥΤΤΑΡΟΛΟΓΙΑ	42
3.7.1	Λήψη και προετοιμασία υλικού συμβατικού επιχρίσματος	43
3.7.2	Κυτταρολογία υγρής φάσης(Liquid Based Cytology, LBC).....	44
3.7.3	Σύστημα BETHESDA 2001 (TBS)[132, 134].....	46
3.7.3.1	A. επιχρίσματα «αρνητικά για ενδοεπιθηλιακή αλλοίωση ή κακοήθεια»	47
3.7.3.2	B. επιχρίσματα με παρουσία επιθηλιακών κυττάρων με αλλοιώσεις «ενδεικτικές ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης ή καρκινώματος» .	47
3.7.3.2.1	B1a. Άτυπα πλακώδη κύτταρα απροσδιόριστης σημασίας(ASCUS)	47
3.7.3.2.2	B1β. Άτυπα πλακώδη κύτταρα στα οποία δεν μπορεί να αποκλειστεί υψηλόβαθμη αλλοίωση(ASC-H)	47
3.7.3.2.3	B2. Χαμηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακή αλλοίωση του πλακώδους επιθηλίου (LSIL)	48
3.7.3.2.4	B3. Υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακή αλλοίωση του πλακώδους επιθηλίου (HSIL).....	48
3.7.3.2.5	B5. Άτυπα αδενικά κύτταρα (AGC)	48
3.7.3.2.6	B6. Άτυπα αδενικά κύτταρα η παρουσία των οποίων συνηγορεί υπέρ νεοπλασίας	48
3.7.3.2.7	B7. Αδενοκαρκίνωμα in situ(AIS)	49
3.7.3.2.8	B8. Αδενοκαρκίνωμα.....	49

3.7.4	Μοριακή κυτταρολογία	49
3.8	ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗ [3, 135].....	50
3.8.1	Οξυτενή κονδυλώματα	51
3.8.2	Χαμηλόβαθμη ενδοεπιθηλιακή αλλοίωση (low grade squamous intraepithelial lesion, LSIL).....	51
3.8.3	Υψηλόβαθμη ενδοεπιθηλιακή αλλοίωση (high grade squamous intraepithelial lesion, HSIL).....	52
3.8.4	Καρκίνωμα πλακώδους επιθηλίου (squamous cell carcinoma, SCC)	52
3.8.5	Αδενοκαρκίνωμα τραχήλου in situ.....	53
3.8.6	Αδενοκαρκίνωμα τραχήλου (ADENO-CA).....	53
3.9	ΚΟΛΠΟΣΚΟΠΗΣΗ	53
3.10	ΔΕΝΤΡΑ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗΣ (Classification And Regression Trees – CART)..	55
3.10.1	Εισαγωγή	55
3.10.2	Δέντρα ταξινόμησης	55
3.10.3	Ορισμοί	55
3.10.4	Διαδικά δένδρα	56
3.10.4.1	Συμβολισμοί	57
3.10.4.2	Αλγόριθμος κατασκευής του δέντρου	57
3.10.4.3	Μεγάλωμα (ανάπτυξη) του δέντρου	58
3.10.4.4	Κλάδεμα του δέντρου	60
3.11	ΚΑΜΠΥΛΕΣ ROC.....	61
3.11.1	Για ταξινομητές με δύο κατηγορίες	62
3.11.2	Για μη-διαδικούς ταξινομητές	63
4	ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	65
4.1	ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	65
4.1.1	Δείγμα πληθυσμού	65
4.1.2	Μέθοδοι.....	66
4.1.2.1	Κυτταρολογική εξέταση	66
4.1.2.2	Βιοδείκτες	66
4.1.2.3	Επιδημιολογικά δεδομένα	69
4.1.2.4	Ιστολογική εξέταση	69
4.1.2.5	Δέντρα ταξινόμησης	69
4.1.2.6	Μέθοδος αξιολόγησης	69
4.1.2.7	Συλλογή δεδομένων	70
4.1.3	Ελλειπή δεδομένα	70
4.1.4	Στόχος ταξινόμησης και στοιχεία που αξιοποιήθηκαν	71
5	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	73
5.1	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ	73
5.2	ΤΕΛΙΚΗ ΑΡΧΙΤΕΚΤΟΝΙΚΗ ΤΟΥ ΔΕΝΤΡΟΥ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗΣ.....	73

5.3	ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΧΡΗΣΗΣ ΚΑΙ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΔΕΝΤΡΟΥ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗΣ.....	76
5.4	ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΟΥ ΔΕΝΤΡΟΥ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗΣ.....	78
5.5	ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΕ ΤΙΣ ΚΑΜΠΥΛΕΣ ROC.....	80
5.5.1	Καμπύλη ROC για το δέντρο ταξινόμησης.....	80
5.5.2	Καμπύλη ROC για την κυτταρολογική εξέταση	82
5.5.3	Καμπύλες ROC για ARRAYS.....	84
5.5.3.1	Καμπύλες ROC για αποτέλεσμα ARRAYS ανεξαρτήτως υπότυπου	84
5.5.3.2	Καμπύλες ROC για αποτέλεσμα ARRAYS για υπότυπους υψηλού κινδύνου	86
5.5.3.3	Καμπύλες ROC για αποτέλεσμα ARRAYS για τους υπότυπους 16 και 18.....	88
5.5.4	Καμπύλη ROC για την εξέταση NASBA.....	90
5.5.5	Καμπύλη ROC για την κυτταρομετρία ροής	92
5.5.6	Καμπύλη ROC για την εξέταση p16	94
5.5.7	Συγκεντρωτική παρουσίαση των καμπυλών ROC	96
6	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	100
7	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	106
8	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	108
9	Παράρτημα Α: Ειδικότητα, Ευαισθησία και λοιπές μέθοδοι αξιολόγησης ταξινομητών	126

ΠΙΝΑΚΕΣ

Πίνακας 1: Λειτουργική δραστηριότητα των γονιδίων του HPV	28
Πίνακας 2: Σύγκριση συμβατικής κυτταρολογίας με κυτταρολογία υγρής φάσης	45
Πίνακας 3: Σύστημα ταξινόμησης κατά Γ. Παπανικολάου	46
Πίνακας 4: Οι μεταβλητές που χρησιμοποιήθηκαν στη κατασκευή του δέντρου ταξινόμησης	72
Πίνακας 5: Συσχέτιση της κυτταρολογικής με την ιστολογική απάντηση	73
Πίνακας 6: Αποτελέσματα του δέντρου ταξινόμησης σε συσχέτιση με την ιστολογική κατηγορία	78
Πίνακας 7: Συγκριτικά στατιστικά στοιχεία απόδοσης του δέντρου ταξινόμησης και μεμονωμένων εξετάσεων	79
Πίνακας 8: Συγκριτική παρουσίαση των χαρακτηριστικών των καμπυλών ROC για τις εναλλακτικές μεθόδους	97
Πίνακας 9: Αποτελέσματα του δέντρου ταξινόμησης σε σχέση με την κυτταρολογική και την ιστολογική απάντηση	99

ΣΧΗΜΑΤΑ

Σχήμα 1 (α) Δυαδικό δέντρο ταξινόμησης και (β) ο διαμερισμός του χώρου εισόδου	56
Σχήμα 2: (α) Ένα τυπικό δέντρο T με κόμβο-ρίζα t_1 και υποδένδρο Tt_3 (b) Το δέντρο t_1 μετά τον εκφυλισμό το υποδέντρου Tt_3 στον τερματικό κόμβο t_3	57
Σχήμα 3: Δομή του δέντρου ταξινόμησης	75

ΕΙΚΟΝΕΣ

Εικόνα 1: Ένα ενδεικτικό ROC γράφημα	62
Εικόνα 2: Ένα ενδεικτικό ROC γράφημα για μη-διαδικό ταξινομητή	64
Εικόνα 3: Η τεχνική CLART test	67
Εικόνα 4: Η τεχνική NASBA	67
Εικόνα 5: Η τεχνική κυτταρομέτρίας ροής	68
Εικόνα 6: Η τεχνική CINTek για την ανίχνευση της p16	68
Εικόνα 7: Εικόνες από της βάση δεδομένων που χρησιμοποιήθηκε για την καταγραφή των στοιχείων	70
Εικόνα 8: Καμπύλη ROC του δέντρου ταξινόμησης σε σχέση με την ιστολογική διάγνωση (στις δύο κατηγορίες)	80
Εικόνα 9: Καμπύλη ROC της κυτταρολογικής απάντησης σε σχέση με την ιστολογική διάγνωση (στις δύο κατηγορίες)	82
Εικόνα 10: Καμπύλη ROC των ARRAYS για οποιονδήποτε υπότυπο σε σχέση με την ιστολογική διάγνωση (στις δύο κατηγορίες)	84

Εικόνα 11: Καμπύλη ROC των ARRAYS για υπότυπους υψηλού κινδύνου σε σχέση με την ιστολογική διάγνωση (στις δύο κατηγορίες)	86
Εικόνα 12: Καμπύλη ROC των ARRAYS για τους υπότυπους 16 και 18 σε σχέση με την ιστολογική διάγνωση (στις δύο κατηγορίες)	88
Εικόνα 13: Καμπύλη ROC της εξέτασης NASBA σε σχέση με την ιστολογική διάγνωση (στις δύο κατηγορίες).....	90
Εικόνα 14: Καμπύλη ROC της εξέτασης με κυτταρομετρία ροής σε σχέση με την ιστολογική διάγνωση (στις δύο κατηγορίες)	92
Εικόνα 15: Καμπύλη ROC της εξέτασης p16 σε σχέση με την ιστολογική διάγνωση (στις δύο κατηγορίες)	94
Εικόνα 16: Συγκεντρωτική παρουσίαση των καμπυλών ROC για τις μεμονομένες εξετάσεις και του δέντρου ταξινόμησης σε σχέση με την ιστολογική διάγνωση (στις δύο κατηγορίες)	96
Εικόνα 17: Πίνακας ενδεχομένων και διάφορες μετρικές αναπαράστασης που μπορούν να υπολογιστούν από αυτόν	126

1 Περίληψη

Στόχος: Σήμερα πολλές τεχνικές βασισμένες στην ανίχνευση και τυποποίηση του HPV DNA και στο mRNA είναι επικουρικές και ανταγωνιστικές της κυτταρολογικής εξέτασης, όμως δεν υπάρχει μια τέλεια τεχνική, σε αυτή τη μελέτη στόχος είναι η αξιολόγηση των δέντρων ταξινόμησης (Classification and Regression Trees-CARTs) στην παραγωγή κανόνων ταξινόμησης των γυναικών και την εκτίμηση του κινδύνου για ύπαρξη νεοπλασιών του τραχήλου της μήτρας (Cervical Intraepithelial Neoplasia - CIN).

Σχεδιασμός: Η μελέτη βασίστηκε σε δεδομένα από 1625 περιπτώσεις. Σε αντίθεση με άλλες προσεγγίσεις χρησιμοποιήθηκαν ελλιπή δεδομένα προκειμένου να αξιοποιηθεί μεγαλύτερο τμήμα των διαθέσιμων δεδομένων, την εξαγωγή αποτελεσμάτων με μεγαλύτερη ακρίβεια και προκειμένου να προσεγγιστούν οι πραγματικές συνθήκες που παρατηρούνται στις γυναικολογικές κλινικές και στα κυτταρολογικά εργαστήρια. Το δέντρο ταξινόμησης εφαρμόστηκε και αξιολογήθηκε στα επόμενα δεδομένα: κυτταρολογική εξέταση, τυποποίηση HPV DNA, ανίχνευση HPV mRNA με τεχνική NASBA και κυτταρομετρία ροής, ανοσοκυταροχημική έκφραση της p16 και επιπλέον την ηλικία και το ιστορικό εγκυμοσύνης των γυναικών.

Αποτελέσματα: Παράχθηκαν αλγόριθμοι για τη διαχείριση των γυναικών, οι γυναικολόγοι μπορούν να χρησιμοποιούν αυτούς του κανόνες σε συνδυασμό με τα διαθέσιμα αποτελέσματα των εξετάσεων προκειμένου να έχουν μια εκτίμηση του κινδύνου των γυναικών να έχουν υψηλόβαθμες αλλοιώσεις στον τράχηλο της μήτρας.

Συμπεράσματα: Η πλέον σημαντική δοκιμασία είναι η κυτταρολογική εξέταση, όμως το δέντρο ταξινόμησης μπόρεσε να διαχειριστεί περιστατικά ακόμα και σε περιπτώσεις που η κυτταρολογική εξέταση δεν έδωσε αξιοποιήσιμη απάντηση. Η τεχνική έδωσε υψηλής ακρίβειας αποτελέσματα ακόμα και στις περιπτώσεις που δεν υπήρξαν αποτελέσματα από μερικές επικουρικές τεχνικές. Η επίδοση του δέντρου ταξινόμησης ήταν καλύτερη από κάθε μεμονωμένη τεχνική που εφαρμόστηκε σε αυτή τη μελέτη.

2 Abstract

Objective: Nowadays numerous ancillary techniques detecting HPV DNA and mRNA compete cytology, however no perfect test exists. In this study we evaluated Classification and Regression Trees (CARTs) for the production of triage rules and estimated the risk for Cervical Intraepithelial Neoplasia (CIN).

Study design: 1625 cases were used. In contrast to other approaches we used missing data to increase the data volume, obtain more accurate results and simulate real conditions in the everyday practice of gynecologic clinics and laboratories.

The proposed CART was based on: the cytological result, HPV DNA typing, HPV mRNA detection based on NASBA and flow cytometry, p16 immunocytochemical expression and finally age and parous status.

Results: Algorithms useful for the triage of women were produced; gynecologists could apply these in conjunction with available examination results and conclude to an estimation of the risk of a woman harboring CIN, expressed as a probability.

Conclusions: The most important test was the cytological examination. However the CART handled cases with inadequate cytological outcome and increased the diagnostic accuracy by exploiting the results of ancillary techniques even if there were inadequate missing data. The CART performance was better than any other single test involved in this study.

3 ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1 ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑ

Η φυλετική διαφοροποίηση των γεννητικών οδών και των εξωτερικών γεννητικών οργάνων ολοκληρώνεται σε 3 περιόδους: την εμβρυϊκή, την περιγεννητική και την ήβη.

Κατά την εμβρυϊκή περίοδο, στο πρώιμο και αδιαφοροποίητο ακόμα στάδιο, τα έμβρυα και των δύο φύλων έχουν πανομοιότυπες καταβολές. Οι γονάδες έχουν το δυναμικό να εξελιχθούν σε όρχεις ή ωθήκες. Στην περίπτωση κατά την οποία τα έμβρυα προορίζονται να γίνουν θήλεα, τα στοιχεία του άρρενος εξαφανίζονται.

Αρχικά σχηματίζεται η αμάρα, ένας διατεταγμένος θάλαμος, από το ουραίο άκρο του οπισθίου εντέρου. Το ενδόδερμά της βρίσκεται σε επαφή με το σωματικό εξώδερμα και μαζί σχηματίζουν τη μεμβράνη της αμάρας. Από την αμάρα εκτείνεται και η αλλαντοΐδα ως τον ομφάλιο λώρο. Η προβολή της διάμεσου μεσοδέρματος του γαστριδίου εντός του ενδοεμβρυϊκού κοιλώματος, από το ραχιαίο του τοίχωμα οδηγεί στο σχηματισμό της ουρογεννητικής ακρολοφίας. Αυτή στη συνέχεια εξελίσσεται σε δύο ακρολοφίες, την νεφρογόνο επί τα εκτός και τη γεννητική επί τα εντός. Προς τη γεννητική ακρολοφία και διαμέσου του ραχιαίου μεσεντερίου, ξεκινά η μετανάστευση των αρχέγονων γεννητικών κυττάρων από το ενδόδερμα του οπισθίου εντέρου. Εκεί, τα κύτταρα περιβάλλονται από επιθηλιακές χορδές. Παράλληλα στη νεφρογόνο ακρολοφία, σχηματίζονται ο μεσонеφρικός (πόρος του Wolff), ως συμπύκνωση του μεσοδέρματος, και ο παρανεφρικός πόρος (πόρος του Müller) ως εγκόλπωση του σπλαχνικού περιτοναίου.

Κατά την πέμπτη εβδομάδα διαιρείται η αμάρα. Σε στεφανιαίο επίπεδο το ούρο-ορθικό διάφραγμα, μεταξύ της αλλαντοΐδας και του οπισθίου εντέρου, τη διαχωρίζει οπίσθια σε ορθό και πρόσθια σε ουρογεννητικό κόλπο. Έτσι διαιρείται και η μεμβράνη της αμάρας σε ουρογεννητική και πρωκτική μεμβράνη. Από τη, μεν, ανώτερη μοίρα του ουρογεννητικού κόλπου σχηματίζεται η ατρακτοειδής ουροδόχος κύστη. Από τη, δε, κατώτερη πυελική/γεννητική μοίρα, η οποία αποτελεί και τον ιδίως ουρογεννητικό κόλπο, σχηματίζεται η ουρήθρα και οι συνοδοί αδένες και ιστοί. Στη σωματοπλευρά του γαστριδίου προβάλλει ως διόγκωση και το γεννητικό φύμα. Μεταξύ γεννητικού φύματος και γεννητικής μοίρας του ουρογεννητικού κόλπου παρατηρείται, στο στάδιο αυτό, στενή τοπογραφική συσχέτιση, με το γεννητικό φύμα να βρίσκεται υψηλότερα από το ουραίο άκρο του ουρογεννητικού κόλπου. Ενώ ο μετανεφρικός πόρος (ουρητήρας) εκβάλλει στην αναπτυσσόμενη ουροδόχο κύστη, ο παραμεσонеφρικός πόρος μετακινείται στον ουρογεννητικό κόλπο σε πιο ουραία θέση, συμπορευόμενοι όμως με τους μεσонеφρικούς. Οι παραμεσонеφρικοί πόροι συνενώνονται στο κατώτερο τμήμα τους κατά τη μέση γραμμή, καταλήγοντας στο κατώτερο τμήμα του ουρογεννητικού κόλπου. Από αυτούς θα αναπτυχθούν τα εσωτερικά γεννητικά όργανα στα θήλεα.

Κατά την όγδοη εβδομάδα, και το αδιαφοροποίητο ακόμα στάδιο, η ανάπτυξη του θήλεος είναι προκαθορισμένη. Λόγω της έλλειψης αντί-Μυλλέρειας ορμόνης και τεστοστερόνης (και οι δύο παρούσες στα αρρενα), οι μεσонеφρικοί πόροι του Wolff υποστρέφουν. Από τους παραμένοντες παραμεσонеφρικούς πόρους του Müller θα προκύψουν οι ωαγωγοί, η μήτρα και η ανώτερη μοίρα του κόλπου ενώ ο πρόδρομος και κατώτερη μοίρα του κόλπου προκύπτουν από τον ουρογεννητικό κόλπο.

Η εξωτερική γεννητική μοίρα του ουρογεννητικού κόλπου οριοθετείται από τα πλάγια από τις ουρογεννητικές πτυχές. Πλαγιότερα αυτών αναπτύσσονται οι χειλεοσχεϊκές πτυχές της σωματοπλευράς. Ενώ από το γεννητικό φύμα θα προκύψει η κλειτορίδα, από τις μεν ουρογεννητικές πτυχές προκύπτουν τα μικρά χείλη και από τις δε χειλεοσχεϊκές τα μεγάλα χείλη του αιδοίου[1].

3.2 ANATOMIA

Στον ανατομικό χώρο μεταξύ ουροδόχου κύστης και ορθού και εντός του πλατέως συνδέσμου, βρίσκεται η μήτρα. Πρόκειται για ένα μυώδες όργανο κοίλο, απιοειδούς σχήματος, με μήκος περί τα 6-8 cm και βάρος 50-60 gr. Η μήτρα αποτελείται από τον πυθμένας, το σώμα και τον τράχηλο. Μεταξύ σώματος και τραχήλου υπάρχει ο ισθμός. Στο κατώτερο μέρος του ο τράχηλος εισέρχεται εντός του κόλπου. Έτσι διακρίνεται ανατομικά στο υπερκολπικό και στο ενδοκολπικό τμήμα του τραχήλου. Το περιτόναιο, ενώ καλύπτει εξολοκλήρου τον πυθμένα και το σώμα της μήτρας, στην περιοχή του τραχήλου καλύπτει, οπίσθια μεν, μόνο το υπερκολπικό τμήμα του, πρόσθια, δε, ανακάμπτει πάνω από την ουροδόχο κύστη και έτσι η πρόσθια επιφάνεια του τραχήλου παραμένει ακάλυπτη. Έτσι σχηματίζεται η κυστεομητρική πτυχή και το κυστεομητρικό κόλπωμα. Πλαγίως του σώματος της μήτρας και με οριζόντια κατεύθυνση, το περιτόναιο σχηματίζει μια τετράπλευρη πτυχή, τον πλατύ σύνδεσμο. Από το οπίσθιο πέταλο του πλατέως συνδέσμου αναρτάται η ωοθήκη με μία πτυχή, το μεσοωοθήκιο. Ο πλατύς σύνδεσμος διαιρείται έτσι στο μεσοωοθήκιο άνωθεν και στο μεσοσαλπίγγιο κάτωθεν της πτυχής. Ανάμεσα στα δύο πέταλα του πλατέως συνδέσμου σχηματίζεται το παραμήτριο, ένας ανατομικός χώρος που πληρείται από συνδετικό ιστό.

Η κοιλότητα της μήτρας είναι σχισμοειδής με μήκος 5-7cm. Σε εγκάρσια διατομή έχει σχήμα τριγωνικό με τη βάση του τριγώνου προς τα επάνω. Από τον πυθμένα και προς τα κάτω διακρίνονται τα κέρατα της μήτρας, στα οποία καταλήγουν τα στόμια των ωαγωγών, το σώμα της μήτρας, ο ισθμός, το έσω τραχηλικό στόμιο, η ενδοτραχηλική κοιλότητα και το έξω τραχηλικό στόμιο.

Το τμήμα του τραχήλου το οποίο προβάλλει στον κόλπο λέγεται εξωτράχηλος. Η επιφάνειά του είναι κυρτή και αποστρογγυλωμένη. Το εξωτερικό στόμιο έχει σχήμα κυκλικό ή σχισμοειδές.

Η διατήρηση της θέσης της μήτρας γίνεται με το περιτόναιο και τους συνδέσμους της. Σε όρθια θέση της γυναίκας, όταν η κοιλότητα της μήτρας φέρεται

σχεδόν οριζόντια προς τα εμπρός και το σώμα σχηματίζει ως προς τον τράχηλο γωνία 80°-100°, τότε πρόκειται για πρόσθια κλίση και κάμψη της μήτρας. Όταν το σώμα κάμπτεται προς τα οπίσθια του τραχήλου, πρόκειται για οπίσθια κάμψη της μήτρας.

Οι στρογγύλοι σύνδεσμοι εκφύονται εκατέρωθεν του πυθμένα άμφω και μπροστά από τις σάλπιγγες. Ακολουθούν πορεία μέσω των πετάλων του πλατέως συνδέσμου, και δια του βουβωνικού πόρου καταφύονται στο δέρμα των μεγάλων χειλέων του αιδοίου. Οι ευθυμητρικοί ή ιερομητρικοί σύνδεσμοι εκφύονται μεταξύ 3^{ου} και 4^{ου} ιερού σπονδύλου εκατέρωθεν και ακολουθώντας λοξή πορεία, καταφύονται στην οπίσθια επιφάνεια της μήτρας, ισοϋψώς προς τον ισθμό, σχηματίζοντας το μητριάιο όγκωμα. Η ανέγερση του περιτοναίου την οποία προκαλούν δημιουργεί μία πτυχή, η οποία διαιρεί το ευθυμήτριο κόλπωμα σε δύο μοίρες: την άνω και την κάτω ή οπίσθιο χώρο του Douglas[2, 3].

3.2.1 Αγγεία και νεύρα

Η αγγείωση της μήτρας προέρχεται από τη μητριάια αρτηρία, η οποία είναι κλάδος της έσω λαγονίου. Μετά την είσοδό της εντός του πλατέως συνδέσμου από το κάτω χείλος του και παράλληλα προς τα πλάγια χείλη της μήτρας, διακλαδίζεται στο ύψος του ιδίου συνδέσμου της ωθήκης και δίνει κλάδους τελικούς αλλά και αναστομωτικούς με την ωθηκική και την κολπική αρτηρία.

Σχηματίζεται πυκνό φλεβικό δίκτυο το οποίο πορεύεται παράλληλα προς τους κλάδους της μητριάιας αρτηρίας, καταλήγοντας στην έσω λαγόνιο και κατά ένα μέρος και στην έσω σπερματική φλέβα.

Εντός του παραμητρίου πορεύονται τα λεμφαγγεία της μήτρας, τα οποία καταλήγουν στα αντίστοιχα λεμφογάγγλια παράλληλα προς το ηλιακό πλέγμα. Τα λεμφογάγγλια στα οποία παροχετεύονται τα λεμφαγγεία της μήτρας είναι αυτά του παραμητρίου, τα λαγόνια, τα υπογαστρικά, τα οσφυϊκά και τα παρά-αορτικά.

Η νεύρωση της μήτρας γίνεται από κλάδους του 4^{ου} ιερού νεύρου και του μητροκολεϊκού πλέγματος. Μεγαλύτερο από τα νευρικά γάγγλια είναι το γάγγλιο του Frankenhauser[2].

3.3 ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ

Ο πυθμένας και το σώμα και της μήτρας έχουν παχιά τοιχώματα αποτελούμενα από δέσμες λείου μυϊκού ιστού (μυομήτριο), οι οποίες διατάσσονται σε τρεις ασαφώς καθοριζόμενες στιβάδες. Το μυομήτριο επενδύεται εσωτερικά από το ενδομήτριο. Πρόκειται για χαμηλό κυβοειδές επιθήλιο, στηριζόμενο σε αραιό στρώμα ατρακτοειδών κυττάρων. Λίγοι υποτυπώδεις σωληνοειδείς αδένες σχηματίζονται από την κατάδυση του επιθηλίου στο εσωτερικό του στρώματος. Το

ενδομήτριο μεταβάλλεται στο ύψος του έσω τραχηλικού στομίου, το οποίο αποτελεί και το σημείο εσωτερικής συμβολής τραχήλου και σώματος της μήτρας.

Ο τράχηλος αποτελείται από επιθήλιο και στρώμα με λείες μυϊκές ίνες και κολλαγονώδη ιστό. Το επιθήλιο του ενδοτραχήλου είναι μονόστιβο κυλινδρικό, βλέννο-εκκριτικό. Το επιθήλιο αυτό παρουσιάζει βαθιές εγκολπώσεις, οι οποίες σχηματίζουν τυφλούς σωληνώδεις σχηματισμούς. Ανάμεσα στα βλέννο-εκκριτικά κυλινδρικά κύτταρα, υπάρχουν και λίγα κροσσωτά κυλινδρικά για τη μεταφορά της βλέννης.

Ο εξωτράχηλος καλύπτεται από πολύστιβο πλακώδες επιθήλιο μη κερατινοποιημένο. Σημαντικό χαρακτηριστικό, και για την κολποσκόπηση, είναι η παρουσία γλυκογόνου κατά την αναπαραγωγική ηλικία στο φυσιολογικό επιθήλιο.

Τα δύο διαφορετικά επιθήλια εξωτραχήλου και ενδοτραχήλου συναντώνται στην πλακώδη- κυλινδρική συμβολή[3].

3.4 ΠΛΑΚΩΔΗΣ-ΚΥΛΙΝΔΡΙΚΗ ΣΥΜΒΟΛΗ ΚΑΙ ΖΩΝΗ ΜΕΤΑΠΤΩΣΗΣ

Τόσο ο εντοπισμός, όσο και η μεταβολή της θέσης και των χαρακτηριστικών της συμβολής των δύο επιθηλίων και της ζώνης μετάπτωσης υπόκεινται σε ορμονικές επιδράσεις.

Κατά τη γέννηση, η πλακώδης- κυλινδρική συμβολή, λόγω επίδρασης των ορμονών της μητέρας στο έμβρυο, βρίσκεται στο έξω τραχηλικό στόμιο. Στην εφηβεία, το κυλινδρικό επιθήλιο επεκτείνεται στον εξωτράχηλο, σχηματίζοντας εκτρόπιο. Παράλληλα, το pH αρχίζει σταδιακά να μεταβάλλεται από αλκαλικό σε όξινο, λόγω διάσπασης του γλυκογόνου από τη φυσιολογική χλωρίδα του κόλπου. Η μεταβολή αυτή του pH δημιουργεί ένα «εχθρικό» περιβάλλον για το κυλινδρικό επιθήλιο. Έτσι προκαλείται κατά την αναπαραγωγική ηλικία μεταπλασία του κυλινδρικού επιθηλίου του εκτροπίου σε πλακώδες. Στη θέση της αρχικής συμβολής, αρχίζει έτσι η δημιουργία της ζώνης μετάπτωσης του ενός στο άλλο επιθήλιο. Η πλακώδης μεταπλασία μπορεί να οδηγήσει στην απόφραξη του αυλού των αδενίων του κυλινδρικού επιθηλίου, με αποτέλεσμα να συσσωρεύεται μικρή ποσότητα βλέννης, η οποία χωρίς δυνατότητα εξόδου, προκαλεί κυστικές διογκώσεις, τα θηλάκια Naboth. Κατά την εμμηνόπαυση η ζώνη μετάπτωσης μετατοπίζεται στον ενδοτράχηλο.

Η πλακώδης μεταπλασία είναι διαδικασία μη αναστρέψιμη. Η εξέλιξή της από άωρη σε ώριμη, και τα διαφορετικά χαρακτηριστικά τους, παίζουν σημαντικό ρόλο κατά την κολποσκόπηση.

Η σημασία της ζώνης μετάπτωσης είναι ότι αποτελεί το σημείο εμφάνισης και εξέλιξης των ενδοεπιθηλιακών αλλοιώσεων, οι οποίες αν δεν εντοπιστούν και αντιμετωπιστούν, ενδέχεται να εξελιχθούν σε διηθητικό καρκίνο[3].

3.5 ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ

Κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, το κύτταρο αναπαράγεται διεκπεραιώνοντας μία ιεραρχική ακολουθία γεγονότων, κατά την οποία διπλασιάζεται το περιεχόμενο του, και κατόπιν διαιρείται στα δύο. Πρόκειται για κύκλο διπλασιασμού και διαίρεσης. Ο κυτταρικός κύκλος αποτελείται από τις φάσεις: G₀ (κυτταρικής ανάπαυσης), G₁ (ανάπτυξη του κυττάρου σε μέγεθος), S (αναδιπλασιασμός του DNA), G₂ (αναδιπλασιασμός δομών και οργανιδίων, έκφραση πρωτεϊνών) και M (Μίτωση). Το στάδιο της Μίτωσης έχει επιμέρους στάδια την πρόφαση, τη μετάφαση, την ανάφαση και την τελόφαση. Εναλλακτικά το κύτταρο μπορεί να ακολουθήσει την οδό του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, που ονομάζεται απόπτωση.

Κατά τη διάρκεια των φάσεων του κυτταρικού κύκλου, μοναδικά και συγκεκριμένα γεγονότα λαμβάνουν χώρα με συγκεκριμένη αλληλουχία και χρονική διαδοχή. Το κύτταρο διαθέτει συστήματα ελέγχου (checkpoints), τα οποία ενεργοποιούν και απενεργοποιούν πρωτεΐνες που συμμετέχουν στον κυτταρικό κύκλο τον κατάλληλο χρόνο, συντονίζοντας διεργασίες που οδηγούν στην τελική διαίρεση των κυττάρων. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται :

- Ενεργοποίηση ενζύμων, που ελέγχουν τη διαδικασία της ακολουθίας των φάσεων
- Έλεγχος της ολοκλήρωσης της προηγούμενης φάσης πριν την έναρξη επόμενης
- Συνεκτίμηση συνθηκών περιβάλλοντος – μηνυμάτων
- Έλεγχος της επιλογής μεταξύ στατικότητας (G₀), επανενεργοποίησης, πολλαπλασιασμού ή απόπτωσης του κυττάρου
- Ανατροφοδότηση από μηνύματα του ίδιου του κυττάρου (π.χ. ολοκλήρωση προηγούμενης φάσης, κατάλληλο μέγεθος κ.τ.λ.)

Στα σημεία ελέγχου πυροδοτούνται μοριακά «φρένα», ούτως ώστε να μην ξεκινά το επόμενο στάδιο πριν την ολοκλήρωση του προηγούμενου, αποτελώντας, ουσιαστικά, σημαντικούς σταθμούς μοριακής ρύθμισης. Οι βασικοί ρυθμιστές των σημείων ελέγχου είναι μια ομάδα ετεροδιμερών πρωτεϊνικών κινασών (κυκλίνο-εξαρτώμενες κινάσες cdk), οι οποίες αποτελούνται από μία ρυθμιστική (κυκλίνη) και μία καταλυτική υπομονάδα (κινάση). Οι κινάσες αυτές ρυθμίζουν τη δράση αρκετών πρωτεϊνών, που επιδρούν στον αναδιπλασιασμό του DNA και στη μίτωση, φωσφορυλιώνοντάς τις σε συγκεκριμένες ρυθμιστικές τους περιοχές. Έτσι προκαλούν την ενεργοποίηση ή την αναστολή της δράσης τους, συντονίζοντας τη λειτουργία τους.

Η μετάβαση από τη μία φάση του κυτταρικού κύκλου στην άλλη, ελέγχεται από τα σύμπλοκα κυκλίνο-εξαρτώμενων κινασών G₁, S-phase και μίτωσης. Επιπλέον, μεγάλες, και με πολλές υπομονάδες, ουβικουϊτινικές λιγάσες (SCF και APC) επάγουν την πολύ-ουβικουϊτινοποίηση σημαντικών ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου, σηματοδοτώντας έτσι τον κατακερματισμό τους από το πρωτεάσωμα του κυττάρου. Στους ανώτερους οργανισμούς, ο έλεγχος του κυτταρικού κύκλου επιτυγχάνεται κυρίως μέσω της ρύθμισης της σύνθεσης και της

ενεργότητας των G1-κυκλίνη-CDK-συμπλόκων [4]. Αυτό επιτυγχάνεται με τη δράση ειδικών ανασταλτικών πρωτεϊνών των Cd κινασών (Cdk inhibitor proteins), οι οποίες αναστέλλουν τη συναρμολόγηση, και τελικά τη δράση, ενός ή περισσοτέρων συμπλόκων κυκλίνης- Cd κινάσης (π.χ. p21)[5].

3.5.1 Πρωτεΐνη p53 [5]

Το TP53 αποτελεί ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο, που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη 53 του όγκου, γνωστή ως p53. Η πρωτεΐνη αυτή βρίσκεται στον πυρήνα κάθε κυττάρου και μπορεί να συνδεθεί άμεσα με το DNA. Σε περίπτωση κατά την οποία προκληθεί βλάβη του DNA, διακόπτεται ο κυτταρικός κύκλος στη φάση G1. Αρχικά αυξάνεται η συγκέντρωση της ρυθμιστικής πρωτεΐνης p53, η οποία διεγείρει τη μεταγραφή του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη p21. Αυτή, με τη σειρά της, προσδένεται στα σύμπλοκα κυκλίνης-Cd κινάσης της φάσης S του κυτταρικού κύκλου, τα οποία προωθούν το κύτταρο στη φάση S και αναστέλλει τη δράση τους. Η διακοπή του κύκλου προσφέρει στο κύτταρο τη δυνατότητα να επιδιορθώσει τις βλάβες του DNA πριν το αντιγράψει.

Βλάβη ή απουσία της p53 οδηγεί σε απρόσκοπτη αντιγραφή του DNA, που, όταν συνοδεύεται από υψηλή συχνότητα μεταλλάξεων, έχει συνέπεια να παράγονται κύτταρα με προδιάθεση να γίνουν καρκινικά.

3.5.2 Πρωτεΐνη Rb [5]

Το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη του Ρετινοβλαστώματος (Rb) είναι ογκοκατασταλτικό. Η πρωτεΐνη Rb αφθονεί στον πυρήνα όλων των κυττάρων. Προσδένεται σε συγκεκριμένες πρωτεΐνες του κυττάρου, οι οποίες ρυθμίζουν τη μεταγραφή γονιδίων απαραίτητων για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (π.χ. E2F).

Η αδρανοποίηση της πρωτεΐνης Rb επιτυγχάνεται είτε με τη δημιουργία συμπλόκων, όπως με την πρωτεΐνη E7 του ιού HPV, είτε μέσω φωσφορυλίωσης από ενεργοποιημένα σύμπλοκα G1 κυκλινών- Cd κινασών, τροποποιώντας έτσι τη διαμόρφωσή της. Η απενεργοποιημένη Rb απελευθερώνει τις ρυθμιστικές πρωτεΐνες των γονιδίων, οι οποίες μπορούν, πλέον, να ενεργοποιήσουν τη μεταγραφή των γονιδίων- στόχων τους, επάγοντας έτσι τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

3.6 HPV

Οι πρώτες υποψίες περί της μολυσματικής φύσης των ανθρωπίνων θηλωμάτων είχαν τεθεί αιώνες πριν, συγχέονταν, όμως, με άλλες σεξουαλικά μεταδιδόμενες νόσους, όπως η σύφιλη και η γονόρροια. Το 1907, τα πειράματα επί της μετάδοσης των μυρμηγκιών από άτομο σε άτομο μετά από ενοφθαλμισμό με εκχύλισμα από ακυτταρικό ιστό πάσχοντος, οδήγησαν στην εδραίωση της θεωρίας περί ιογενούς αιτιολογίας της νόσου [6]. Το 1970 ο ιολόγος Harald zur Hausen (Νόμπελ Φυσιολογίας της Ιατρικής, 2008), χρησιμοποιώντας την τεχνική του

υβριδισμού, άρχισε τη μελέτη του ιού HPV και τη διερεύνηση της πιθανής συσχέτισής του με τα επιθηλιακά καρκινώματα. Το 1977 ανακοινώθηκε η ύπαρξη τεσσάρων διαφορετικών τύπων του ιού και εκφράστηκε η πεποίθηση ότι ο ιός παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη καρκίνου του τραχήλου της μήτρας [7-11].

Κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1980, η έρευνα για τον HPV εντατικοποιήθηκε. Το 1980, ο Shah χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της ανοσοϋπεροξυδάσης, απέδειξε παρουσία του ιού στο 50% των δυσπλασιών του τραχήλου της μήτρας [12]. Ακολούθησε η απομόνωση τεσσάρων νέων τύπων ιού, των 6 και 11, από θηλώματα του γεννητικού συστήματος και των 16 και 18 από βιοψίες καρκίνου του τραχήλου της μήτρας [13-16].

Η μελέτη επί του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας έδωσε στοιχεία για την ύπαρξη και άλλων παραγόντων, οι οποίοι ενέχονται στην καρκινογένεση, όπως η παρουσία και άλλων ιών [17], η ενεργοποίηση ογκογονιδίων (c-myc, c-Ha-ras) ή η απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων [18, 19]. Οι επιδημιολογικές μελέτες που ξεκίνησαν τη δεκαετία του 1980, ενοχοποίησαν τελικά τον ιό HPV ως την κυριότερη αιτία για τη δημιουργία προκαρκινικών και καρκινικών αλλοιώσεων στον τράχηλο της μήτρας [3, 20-22].

Ο ιός των ανθρωπίνων θηλωμάτων ανήκει στην οικογένεια Papovaviridae. Ανάμεσα στους τύπους του HPV παρατηρείται αξιοσημείωτη ετερογένεια. Μέχρι σήμερα, έχει αναλυθεί και προσδιοριστεί η αλληλουχία του DNA 85 διαφορετικών γονοτύπων του ιού, ενώ περισσότεροι από 120 νέοι υποψήφιοι έχουν μερικώς χαρακτηριστεί [23]. Οι περισσότεροι από του νέους τύπους HPV έχουν ταυτοποιηθεί με τη χρήση ευαίσθητων μοριακών τεχνικών, όπως η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).

Οι HPV γονότυποι διαφέρουν ως προς την ικανότητά τους να προκαλούν ογκογόνο μετασχηματισμό. Βάσει αυτού του κριτηρίου, διακρίνονται σε δύο κατηγορίες:

1. Τύποι «χαμηλού κινδύνου» (low risk): π.χ. 6, 11, 42, 43, 44, 54, 61, 62, 71, 72, 81, 83, 84, 89, οι οποίοι ανιχνεύονται σε εξωφυτικά οξυτενή κονδυλώματα, σε επίπεδα κονδυλώματα και σε χαμηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις του πλακώδους επιθηλίου του τραχήλου της μήτρας.
2. Τύποι «υψηλού κινδύνου» (high risk): π.χ. 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73, 82, 85, οι οποίοι ανιχνεύονται σε υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις του πλακώδους επιθηλίου του τραχήλου της μήτρας ή σε διηθητικούς καρκίνους[24].

3.6.1 Δομή και γενωμική οργάνωση

Ο HPV είναι ένας ιός, μικρός σε μέγεθος με διάμετρο 52-55 nm. Πρόκειται για DNA ιό με ομοιοπολικώς κλειστό, κυκλικό, δίκλωνο DNA το οποίο περιβάλλεται από κυβοειδές εικοσαεδρικό πρωτεϊνικό καψίδιο, που σχηματίζεται από 72 καψομερίδια. Τα καψομερίδια διατάσσονται ως 12 πενταμερή και 60 εξαμερή σύνολα διατεταγμένα σε μία T=7 συμμετρία. Ο ιός στερείται περιβλήματος και είναι ανθεκτικός τόσο σε υψηλές, όσο και σε

χαμηλές θερμοκρασίες, καθώς και σε λιποδιαλυτικές ουσίες (αιθέρας, χλωροφόρμιο) [25, 26]. Η επιφάνεια του ιικού σωματιδίου φέρει αντιγονικές ομάδες, χαρακτηριστικές του κάθε τύπου. Στο εσωτερικό του ιού υπάρχουν αντιγονικές ομάδες χαρακτηριστικές του γένους.

Το γονιδίωμα του ιού έχει μέγεθος 8.000 ζεύγη βάσεων (bp), μοριακό βάρος $5,2 \times 10^6$ Daltons και λόγο γουανίνης/κυτοσίνης (G/C) περίπου 42%. Το DNA είναι συνδεδεμένο με ιστόνες κυτταρικής προέλευσης, παίρνοντας τη μορφή μικρού χρωμοσώματος. Οι γονιδιακές περιοχές που κωδικοποιούν πρωτεΐνες (open reading frames) βρίσκονται στη μία μόνο αλυσίδα του ιικού DNA. Στη συμπληρωματική αλυσίδα περιλαμβάνονται περιοχές, οι οποίες είτε δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες, είτε κωδικοποιούν βραχεία τμήματα. Το γονιδίωμα του ιού διαιρείται λειτουργικά σε τρεις περιοχές:

1. Πρώιμη περιοχή (early-E), η οποία περιλαμβάνει 8 γονίδια, τα E1 έως E8. Οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα γονίδια αυτά εκφράζονται αμέσως μετά την είσοδο του ιού στο κύτταρο και είναι απαραίτητες για την αντιγραφή του DNA του ιού και την εξαλλαγή του κυττάρου.
2. Όψιμη περιοχή (late-L), η οποία περιλαμβάνει 2 γονίδια, τα L1 και L2. Οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα γονίδια αυτά εκφράζονται στα τελικά στάδια του κύκλου του ιού και είναι δομικές.
3. Μη κωδική ρυθμιστική περιοχή, η οποία ονομάζεται ανοδικός ρυθμιστής ανάγνωσης (upstream reading regulator) και ρυθμίζει τη μεταγραφή και την έναρξη αντιγραφής του DNA.

ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΟΥ HPV	
ΓΟΝΙΔΙΑ	ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ
E1	Αντιγραφή του DNA, διατήρηση επισώματος, μεταγραφική καταστολή
E2	Αντιγραφή του DNA (με το E1), έλεγχος μεταγραφής
E3	Άγνωστη (έχει βρεθεί μόνο στον ιό BPV 1)
E4	Καθορισμός τροπισμού των διαφόρων HPV τύπων ως προς κύτταρα/ιστούς, αλληλεπίδραση με κυτταροκερατίνες, ωρίμανση ιών
E5	Μετασχηματική ικανότητα (πρώιμα στάδια εξαλλαγής), αλληλεπίδραση με EGF και την 16K της ΑΤΡάσης
E6 και E7	Μετασχηματική ικανότητα (κύριες πρωτεΐνες), δημιουργία συμπλόκων με τις κυτταρικές πρωτεΐνες p53 και PRB αντίστοιχα, εξαλλαγή κυττάρων, διατήρηση κακοήθους φαινότυπου, έλεγχος μεταγραφής
E8	Άγνωστη
L1	Κύρια πρωτεΐνη του καψιδίου των ώριμων ιικών σωματιδίων
L2	Μικρή πρωτεΐνη του καψιδίου, σταθεροποίηση της δομής του καψιδίου [3]

Πίνακας 1: Λειτουργική δραστηριότητα των γονιδίων του HPV

3.6.2 Μολυσματικός κύκλος του HPV και ογκογένεση

Οι γονότυποι του HPV παρουσιάζουν εξειδικευμένο επιθηλιοτροπισμό.

Η διαδικασία της αντιγραφής του ιού εξαρτάται πλήρως από τους μηχανισμούς διαφοροποίησης του κυττάρου-ξενιστή. Η αντιγραφή και η μετάφραση του DNA του HPV επιτελείται σε κύτταρα υψηλού βαθμού διαφοροποίησης. Υπάρχουν βάσιμες ενδείξεις ότι και οι ίδιοι οι ιοί είναι σε θέση να τροποποιούν την ωρίμανση και την διαφοροποίηση των επιθηλιακών κυττάρων [27].

Αρχικά, προσβάλλεται το πλακώδες επιθήλιο του δέρματος και των βλεννογόνων. Συχνότερα προσβάλλεται ο οπίσθιος κολπικός θόλος και η ζώνη μετάλασης του τραχήλου. Η είσοδος και η εγκατάσταση του ιού γίνεται διαμέσου μικροταυματισμών του επιθηλίου. Οι παράγοντες του κυττάρου που διαμεσολαβούν για την είσοδο του ιού, δεν έχουν πλήρως καθοριστεί. Θεωρείται πιθανό ο HPV να προσκολλάται σε ειδικούς επιφανειακούς κυτταρικούς υποδοχείς, όπως η α6-ιντεγκρίνη, με την οποία συνδέεται ο HPV 6. Για τους γονότυπους 16 και 33 έχει αποδειχθεί πως προσκολλώνται στο κύτταρο μέσω της μίας κυτταρικής επιφανειακής πρωτεΐνης, της θειικής

ηπαράνης, η οποία αντιδρά με το καρβοξυτελικό άκρο της L1 πρωτεΐνης και μέσω ενός δεύτερου υποδοχέα η πρωτεογλυκανικού σταθεροποιητή [28-32].

Μετά τη διείσδυση του ιού στο κύτταρο, ακολουθεί απέκδυσή του με λύση του καψιδίου στο κυτταρόπλασμα. Το γονιδίωμα διεισδύει μέσω της πυρηνικής μεμβράνης και καταλήγει στον πυρήνα του κυττάρου. Στο επίπεδο της βασικής στιβάδας, η ιική αναπαραγωγή είναι μη παραγωγική και ο ιός εδραιώνεται ως επίσωμα, με τη μορφή πλασμιδίου. Χρησιμοποιώντας το μηχανισμό της αντιγραφής του DNA του κυττάρου-ξενιστή, ο ιός συνθέτει το δικό του DNA. Αυτό το επιτυγχάνει εκφράζοντας τα πρώιμα του γονίδια, τα οποία ρυθμίζουν τη σύνθεση του ιικού DNA.

Καθώς η βασική στιβάδα των επιθηλιακών κυττάρων διαφοροποιείται, μετακινείται ουσιαστικά και ο ιός προς τις επιφανειακές στιβάδες του επιθηλίου. Στα διαφοροποιημένα πλέον κερατινοκύτταρα, γίνεται ο πολλαπλασιασμός του γενετικού υλικού σε πολλά αντίγραφα, εκφράζονται τα όψιμα γονίδια του ιού που κωδικοποιούν τις δομικές πρωτεΐνες, συντίθενται τα καψομερίδια και τελικά συγκροτούνται τα ιικά σωματίδια.

Στα περισσότερα καρκινώματα του τραχήλου της μήτρας, το DNA του HPV ενσωματώνεται στο γένωμα του ξενιστή. Η ενσωμάτωση προκαλεί απώλεια της έκφρασης του E2 γονιδίου του ιού. Το γονίδιο αυτό λειτουργεί σαν καταστολέας της έκφρασης των E6 και E7 γονιδίων. Η απώλειά του οδηγεί σε υπερέκφραση των E6 και E7 ογκοπρωτεϊνών, οι οποίες έχουν ισχυρή ικανότητα μετασχηματισμού του κυττάρου. Προκαλούν αθανатоποίηση κυττάρων *in vitro* και επάγουν τη δημιουργία όγκων στο δέρμα διαγονιδιακών ζώων [33], και το αποτέλεσμα της δράσης τους είναι η απορρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και η αναστολή της απόπτωσης.

Η E6 ογκοπρωτεΐνη προσδένεται στην p53 και επάγει την ταχεία αποικοδόμησή της. Η πρωτεΐνη p53 λειτουργεί σαν μεταγραφικός ενεργοποιητής γονιδίων απαραίτητων για τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και την καταστολή ανάπτυξης όγκων. Η δέσμευσή της από την E6 πρωτεΐνη ιών χαμηλού κινδύνου έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία ασθενούς συμπλόκου, και η p53 δεν αποικοδομείται. Όταν, όμως, δεσμεύεται από την E6 ιών υψηλού κινδύνου, το ισχυρό σύμπλοκο που σχηματίζεται επάγει την αποικοδόμηση της p53 μέσω ενός πρωτεολυτικού συστήματος, που εξαρτάται από την ουβικουΐτίνη.

Η E7 ογκοπρωτεΐνη δημιουργεί σύμπλοκα με πρωτεΐνες της οικογένειας του ρετινοβλαστώματος. Η πρόσδεσή της στις πρωτεΐνες p107, p130 και Rb, οδηγεί στην απελευθέρωση των μεταγραφικών παραγόντων E2F, οι οποίοι ενεργοποιούν τα κυτταρικά γονίδια που σχετίζονται με την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Η E7, επιπλέον, σχηματίζει σύμπλοκα με την κυκλίνη A, η οποία ενεργοποιεί τις cdk2 και cdc2 κατά τις φάσεις S και G2/M, αντίστοιχα, και με την κυκλίνη E, η οποία ενεργοποιεί τη cdk2 κατά τη μετάβαση από τη φάση G1 στη φάση S του κυτταρικού κύκλου. Η δημιουργία αυτών των συμπλόκων μεταβάλλει τη λειτουργία των κυκλινοεξαρτώμενων

κινασών (cdks) ως προς τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, επάγοντας έτσι τον κυτταρικό υπερπολλαπλασιασμό.

Επομένως, η μη ελεγχόμενη έκφραση των E6 και E7 ιικών ογκογονιδίων προκαλεί χρωμοσωμική αστάθεια και αποτελεί ουσιαστικά τη σφραγίδα της καρκινογένεσης. Αν και η ενσωμάτωση του ιικού γενώματος στο γένωμα του ξενιστή έχει παρατηρηθεί σε μεγάλες σειρές καρκινικών κυττάρων και σε υψηλόβαθμες ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις, παρολαυτά αποτελεί σπανιότερο φαινόμενο σε πρώιμες βλάβες προκαλούμενες από HPV[34-40]. Με βάση αυτή την παρατήρηση, διατυπώθηκε η υπόθεση ότι η ενσωμάτωση του ιικού γενώματος αποτελεί το γεγονός-κλειδί στη διαδικασία της καρκινογένεσης και μπορεί να πυροδοτήσει την χρωμοσωμική αστάθεια. Στη βιβλιογραφία αναφέρονται, μεταξύ άλλων, τρεις σημαντικοί μηχανισμοί, οι οποίοι, ενδέχεται, τελικά, να εξηγούν αυτή τη θεωρία. Πρώτον, η διάρρηξη του ιικού E2 γονιδίου στα κύτταρα με ενσωματωμένο το γενωμικό υλικό του HPV, μπορεί να απελευθερώσει τον ιικό «προωθητή» (promoter) που ελέγχει την έκφραση των E6 και E7 ογκογονιδίων. Η υπόθεση αυτή υποστηρίζεται από πειράματα που κατέδειξαν ότι η εισαγωγή ανέπαφων E2 γονιδίων σε σειρές καρκινικών κυττάρων (HeLa) είχε σαν αποτέλεσμα την καταστολή της ανάπτυξης των όγκων λόγω καταστολής της έκφρασης των E6 και E7 γονιδίων. Δεύτερον οι *cis*- δρώσες κυτταρικές αλληλουχίες μπορεί να επηρεάσουν τη δράση του promoter ο οποίος ελέγχει - όπως αναφέρθηκε - τη μεταγραφή των ιικών E6/E7 γονιδίων. Εναλλακτικά, η επίδραση άλλων κυτταρικών ακολουθιών μπορεί να σταθεροποιήσει τα ιικά E6 και E7 αντίγραφα από τα ήδη ενσωματωμένα του ιικού γενώματος[41], ενισχύοντας, έτσι, τα επίπεδα έκφρασής τους και το ογκογόνο δυναμικό τους[42, 43]. Τρίτον, τα ενσωματωμένα ιικά γονίδια μπορούν, δυνητικά, να ενεργοποιήσουν κυτταρικά ογκογονίδια ή να απενεργοποιήσουν ογκοκατασταλτικά γονίδια του κυττάρου ως «ένθετη μεταλλαγή» (insertional mutagenesis)[38, 44, 45]. Ερευνητικά δεδομένα επί των γονιδιακών τόπων, όπου συνήθως επισυμβαίνει ενσωμάτωση (integration loci) σε περιπτώσεις προκαρκινικών αλλοιώσεων και σε καρκίνους, έχουν δείξει τη συσσώρευση τέτοιων σημείων ενσωμάτωσης σε εύθραυστες χρωμοσωμικές περιοχές με ενεργή αντιγραφική δραστηριότητα[38, 39]. Παρολαυτά η θεωρία της «ένθετης μεταλλαγής» ως απαραίτητος μηχανισμός της καρκινογένεσης δεν έχει ακόμα αποδειχθεί[35, 37, 46].

Αν και η ενσωμάτωση του ιικού γενώματος σε αυτό του ξενιστού συμβάλλει καθοριστικά στη διαδικασία της νεοπλασματικής εξαλλαγής, παρολαυτά η απουσία ενσωματωμένου ιικού υλικού σε ορισμένους καρκίνους, υποδηλώνει πως δεν είναι πάντα προαπαιτούμενο για την κακοήγη εξαλλαγή. Με βάση τη βιβλιογραφία, διατυπώνεται η θεωρία ότι η ενσωμάτωση του γενώματος των ιών HPV υψηλού κινδύνου (HR-HPV), ως επί το πλείστον αντικατοπτρίζει το επίπεδο της χρωμοσωμικής αστάθειας[47] και το ότι αν η ενσωμάτωση αποτελεί το βασικό καθοριστή που οδηγεί στην απρόσκοπτη έκφραση των ιικών γονιδίων και στη μετατροπή των λοιμώξεων

σε καρκινογένεση, ένα ποσοστό των όγκων πρέπει να φτάσει στο στάδιο αυτό μέσω διαφορετικών μονοπατιών (pathways). Εναλλακτικά, προτείνεται ότι η ενσωμάτωση είναι μάλλον, μία συνέπεια της χρωμοσωμικής αστάθειας, που προκαλείται από τη μη ελεγχόμενη έκφραση των E6/E7, και όχι η αιτία της[48]. Με βάση αυτό το σενάριο, η μη ελεγχόμενη έκφραση στα προσβεβλημένα κύτταρα από ιούς HPV υψηλού κινδύνου πρέπει προκαλείται με ανεξάρτητους μηχανισμούς. Επιπλέον, η συγκριτική μελέτη των χρονικών σημείων της ιικής ενσωμάτωσης και της εξάπλωσης των κυτταρικών κλώνων, έδειξε ότι η ανευπλοϊδία προηγείται της εξάπλωσης των κυτταρικών κλώνων που περιέχουν ενσωματωμένο ιικό γονιδίωμα[49].

Παρά τις θεωρίες αυτές, φαίνεται πως ο εντοπισμός της ύπαρξης αντιγράφων των E6/E7 αποτελεί πιο ακριβή μέθοδο ενδεικτική της εξέλιξης προς κακοήθεια, συγκριτικά με την ανίχνευση του HPV DNA. Αυτό αποδίδεται, πρώτον, στο ότι οι διαθέσιμες τεχνικές ανίχνευσης του HPV DNA έχουν επικεντρωθεί στην ανίχνευση της L1 δομικής περιοχής του ιού. Η πρωτεΐνη όμως αυτή εκφράζεται αργά στον κύκλο ζωής του ιού στα υψηλής διαφοροποίησης παραβασικά (suprabasal) κύτταρα, και δε σχετίζεται με το μηχανισμό ογκογένεσης. Έτσι, οι διαθέσιμες τεχνικές ανίχνευσης του HPV DNA δεν ανιχνεύουν τη δραστηριότητα των ογκοπρωτεϊνών του HPV, που επί της ουσίας, αποτελεί το μοναδικό μέτρο της εξέλιξης των νεοπλασματικών αλλαγών στο κύτταρο. Σε περίπτωση, δε, απώλειας της L1 περιοχής εξαιτίας της ενσωμάτωσης του ιικού γενώματος σε αυτό του ξενιστού, οι τεχνικές αυτές λανθασμένα θα καθορίσουν το δείγμα σαν αρνητικό, παρά το γεγονός ότι μπορεί να υπάρχει επιθετική δραστηριότητα, που μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρικές αλλαγές προκαλούμενες από τις ογκοπρωτεΐνες E6/E7.

Επιπλέον, η γονιδιακή έκφραση του HPV μεταβάλλεται στα διαφορετικά επίπεδα του επιθηλίου και διαφέρει ανάλογα με τη βαρύτητα της αλλοίωσης. Έτσι μελετώντας το μοντέλο της γονιδιακής έκφρασης, είναι πιθανό να εκτιμηθεί η βαρύτητα της υποκείμενης αλλοίωσης και το αποτέλεσμα της λοίμωξης. Τα δεδομένα αυτά οδήγησαν στην ανάπτυξη νέων, σύγχρονων μεθόδων μοριακής διερεύνησης για την τυποποίηση και την ανίχνευση του mRNA των E6/E7 ογκοπρωτεϊνών, όπως η τεχνική κυτταρομετρίας ροής και η τεχνική NASBA.

3.6.3 Βιολογία της λοίμωξης από ιό HPV

Η μόλυνση από HPV δεν συνεπάγεται απαραίτητα και εκδήλωση νόσου, καθώς, σε ορισμένες περιπτώσεις, μπορεί να παραμείνει σε λανθάνουσα μορφή. Η εξέλιξη ή όχι της λοίμωξης εξαρτάται από τη σχέση της ιογόνου δράσης και της ανοσολογικής απάντησης του ξενιστή στην προσβολή. Ο χρόνος επώασης του ιού κυμαίνεται από 6 εβδομάδες έως και 8 μήνες. Όταν ο ιός βρίσκεται σε επισωματική μορφή (λανθάνουσα φάση), το

χρονικό διάστημα ανάμεσα στη μόλυνση και στην πιθανή κλινική εκδήλωση της νόσου ανέρχεται μέχρι και στα 10 έτη.

Στην περίπτωση που η λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος εκπέσει τοπικά, αναπτύσσεται λοίμωξη παραγωγικού τύπου. Εάν το ιικό DNA δεν έχει ενσωματωθεί ακόμα στο γενετικό υλικό του ξενιστή, κατά τη διαδικασία της διαφοροποίησης των βασικών κυττάρων του επιθηλίου, τα αντίγραφα του επισωματικού ιού αυξάνονται, προκαλώντας την εμφάνιση κυρίως καλοήθων αλλοιώσεων [50]. Εάν έχει ενσωματωθεί όμως το γενετικό υλικό του ιού σε αυτό του ξενιστή, η εξέλιξη της βλάβης εξαρτάται από τον τύπο του ιού (υψηλού ή χαμηλού κινδύνου) και από τη συνέργεια, ενδεχομένως, και άλλων παραγόντων όπως το κάπνισμα, η εξωγενής χορήγηση ορμονών ή η χρήση ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων κ.ά [3, 51, 52].

3.6.4 Φυσική Ιστορία HPV λοίμωξης

Η ανάπτυξη καρκίνου του τραχήλου της μήτρας προκύπτει ως ακολουθία τεσσάρων βημάτων: προσβολή από τον ιό HPV, επιμονή της λοίμωξης, εξέλιξη ενός κλώνου κυττάρων- με εμμένουσα λοίμωξη από HPV - προς προκαρκινική αλλοίωση και, τελικά, διήθηση. Στο μοντέλο αυτό μπορεί να συμβούν και βήματα υποστροφής, με κάθαρση της λοίμωξης ή, σπανιότερα, με υποχώρηση των προκαρκινικών αλλοιώσεων.

Εξαιτίας της κοινής τους οδού μετάδοσης, μέσω επαφής, συχνά διαφορετικοί τύποι του HPV μεταδίδονται μαζί, με αποτέλεσμα να εμφανίζεται σε ποσοστό της τάξης του 20- 30% συλλοίμωξη από διαφορετικούς τύπους ιού στις προσβεβλημένες γυναίκες του γενικού πληθυσμού. Στις περισσότερες προοπτικές μελέτες γυναικών με αρνητική κυτταρολογική διάγνωση του επιχρίσματος του τεστ Παπανικολάου και θετικό HPV DNA test, κατά την εισαγωγή στον πληθυσμό της μελέτης, ο αθροιστικός κίνδυνος (cumulative risk) εμφάνισης χαμηλού βαθμού αλλοιώσεων στο τεστ Παπ φτάνει στο μέγιστο ποσοστό (25-50%) κατά τον πρώτο και δεύτερο χρόνο της μελέτης. Στη συνέχεια, ο κίνδυνος μειώνεται, καταλήγοντας σε ένα σταθερό βασικό επίπεδο (<5% των επιχρισμάτων) περίπου στα τέσσερα χρόνια της μελέτης[53, 54]. Ο ελάχιστος αυτός αθροιστικός κίνδυνος, όμως, συνεχίζει να υφίσταται και για μεγαλύτερο διάστημα παρατήρησης (≥ 15 χρόνια), υποδηλώνοντας ότι ορισμένες γυναίκες διατηρούν επίμονη μόλυνση[55, 56].

Οι περισσότερες λοιμώξεις από HPV είναι παροδικές και αντιμετωπίζονται από το ανοσιακό σύστημα (μέσω κυτταρικής ανοσίας) εντός διαστήματος 1-2 ετών από την πρώτο-μόλυνση[57]. Μεταξύ των διαφορετικών τύπων του ιού, αυτοί που προκαλούν τις πιο επίμονες μολύνσεις, φαίνεται ότι είναι και οι πιο συχνοί[58]. Ορίζοντας ένα χρονικό διάστημα μελέτης, παρατηρείται ότι όσο αυξάνεται η χρονική διάρκεια παραμονής της μόλυνσης από ένα, έστω, συγκεκριμένο τύπο HPV, τόσο μειώνεται η πιθανότητα κάθαρσής του και, αντίστροφα, αυξάνεται ο κίνδυνος εμφάνισης προκαρκινικών αλλοιώσεων[59]. Παρολαυτά, ο μέσος χρόνος παραμονής

και ορισμένων μη- καρκινογόνων τύπων (π.χ. HPV 61) μπορεί να είναι εξαιρετικά μεγάλος [58]. Οι παράγοντες που αυξάνουν τον κίνδυνο παραμονής μίας λοίμωξης ή πρόκλησης προκαρκινικών αλλοιώσεις, δεν έχουν αποσαφηνιστεί. Ως ισχυρότερος παράγοντας θεωρείται ο τύπος του ιού [55, 58]. Ο HPV 16 θεωρείται εξαιρετικά καρκινογόνος, με τον απόλυτο κίνδυνο ανάπτυξης προκαρκινικών αλλοιώσεων να προσεγγίζει το 40% μετά από 3- 5 χρόνια εμμένουσας μόλυνσης [56, 58, 60]. Ο συνολικός κίνδυνος ανάπτυξης προκαρκινικών αλλοιώσεων στην περίπτωση μόλυνσης από πολλαπλούς τύπους ιού είναι αυξημένος συγκριτικά με τον κίνδυνο από μονήρη μόλυνση με καθένα έναν τύπο ξεχωριστά. Δεν είναι όμως ξεκαθαρισμένο εάν ο συνολικός κίνδυνος αποτελεί άθροισμα των επιμέρους κινδύνων κάθε τύπου ξεχωριστά [61].

Οι επικρατούσες λοιμώξεις (prevalent infections) που ανιχνεύονται κατά τον πληθυσμιακό έλεγχο, τείνουν να επιμένουν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα στις γηραιότερες, έναντι των νεότερων γυναικών. Αυτό το φαινόμενο μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι ενδεχομένως πρόκειται για λοιμώξεις ήδη μακράς διάρκειας [62]. Από μελέτες πληθυσμιακού ελέγχου, φαίνεται ότι το μέσο χρονικό διάστημα στο οποίο αποκαθαίρεται η μόλυνση είναι 6- 18 μήνες [59]. Γενικά, δεν υφίσταται καθορισμός του χρονικού διαστήματος, μετά την παρέλευση του οποίου, η λοίμωξη να γίνεται κλινικά σημαντική. Σε μελέτες στις οποίες έχουν τεθεί τα χρονικά όρια για τον έλεγχο ανάπτυξης αλλοιώσεων στα δύο και πλέον χρόνια, υποδηλώνεται ότι οι εμμένουσες μολύνσεις θέτουν σε μεγαλύτερο κίνδυνο τις ασθενείς [63]. Ένα μικρό ποσοστό, της τάξης του 10%, λοιμώξεων με υψηλού κινδύνου ιούς, που επιμένουν για αρκετά χρόνια, αυξάνουν σημαντικά τον απόλυτο κίνδυνο εμφάνισης προκαρκινικών αλλοιώσεων [58].

Μελέτες κοορτής με στοιχεία μέχρι και 10 ετών παρακολούθησης, δείχνουν ότι μετά την κάθαρση, μπορεί να επανεμφανιστεί σποραδικά ο ίδιος τύπος ιού [64]. Δεν είναι ακόμα σαφές εάν οι λοιμώξεις δεν ανιχνεύονται επειδή όντως έχει επέλθει πλήρης κάθαρση του ιού, ή εάν παραμένει ο ιός σε λανθάνουσα φάση στα βασικά κύτταρα του επιθηλίου και πολλαπλασιάζεται μεν, αλλά σε πολύ χαμηλά επίπεδα, χωρίς πλήρη έκφραση των ιικών πρωτεϊνών και για το λόγο αυτό, πιθανών, δεν ανιχνεύεται από τις μοριακές τεχνικές που βασίζονται στο DNA. Η παρουσία αυξημένου αριθμού HPV λοιμώξεων σε οροθετικούς ασθενείς υποστηρίζει τη θεωρία της παραμονής του ιού σε λανθάνουσα φάση [65]. Σε ορισμένους πληθυσμούς, η παρουσία HPV εμφανίζει δικόρυφη κατανομή στις ηλικιακές ομάδες του πληθυσμού, με τη δεύτερη να αφορά σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να οφείλεται, είτε, σε επαν-ενεργοποίηση από τη λανθάνουσα φάση λόγω γήρανσης του συστήματος κυτταρικής ανοσίας που επιτηρεί τη λοίμωξη, είτε στην απόκτηση νέων ερωτικών συντρόφων των γυναικών ή των συντρόφων τους, είτε σε επίδραση του φαινομένου κοορτής (cohort effects). Στοιχεία εκ των ιδίων μελετών δείχνουν ότι παρά την πιθανή ενεργοποίηση από τη λανθάνουσα μορφή, οι γυναίκες μεγαλύτερης ηλικίας με μακρά περίοδο χωρίς στοιχεία κυτταρολογικής ατυπίας στο τεστ Παπ, έχουν πολύ μικρό κίνδυνο να αναπτύξουν καρκίνο του τραχήλου της μήτρας [66].

Στις περιπτώσεις γυναικών με ιστολογικά επιβεβαιωμένες CIN, ουσιαστικά ενέχεται μικρότερος κίνδυνος εξέλιξης σε καρκίνο του τραχήλου της μήτρας από αυτές μόνη ένδειξη την κυτταρολογική διάγνωση LSIL του τεστ Παπ[67]. Στην ιστολογική διάγνωση CIN 1 μπορούν να ενσωματωθούν και οι περιπτώσεις κακής ή ελλιπούς λήψης βιοψίας κολποσκοπικά κατευθυνόμενης. Θεωρείται ότι η συγκεκριμένη διάγνωση δεν μπορεί εύκολα να αναπαραχθεί, ακόμα και σε μεγάλα ιστοτεμάχια[68]. Σε περιπτώσεις λοίμωξης με οποιοδήποτε τύπο υψηλού κινδύνου HPV, στις περιπτώσεις CIN 1 δε φαίνεται να ελοχεύει μεγαλύτερος κίνδυνος εξέλιξης σε CIN 3 συγκριτικά με τις περιπτώσεις με αρνητική βιοψία[67]. Σε πρόσφατα δημοσιευμένη μελέτη ανασκόπησης της βιβλιογραφίας, αναφέρεται πως, σε μέσο χρονικό διάστημα παρακολούθησης του πληθυσμού 21,9 μηνών, ο αθροιστικός κίνδυνος ανάπτυξης CIN 1 αλλοίωσης ήταν 14,6%[69]. Ο ετήσιος κίνδυνος εξέλιξης προς CIN 1 υπολογίστηκε στο 8,3%, ενώ, ο αντίστοιχος ετήσιος κίνδυνος εξέλιξης μίας λοίμωξης ειδικά από τα στελέχη 16/18 προς CIN 1 εκτιμάται στο 9,4%[70].

Αρχής γενομένης χρονικά από την πρώτο-μόλυνση από τον HPV, και υπολογίζοντας τον ετήσιο κίνδυνο εξέλιξης σε CIN 2 και CIN3, αυτός εκτιμάται από 4,8% έως 6,7% και από 1,7% έως 5,3%, αντίστοιχα[69, 70]. Όταν η λοίμωξη προέρχεται από HPV 16/18, ο ετήσιος κίνδυνος εξέλιξης υπολογίζεται σε 5,8% για CIN 2 και 3,5% για CIN 3[70, 71].

Στοιχεία από δύο μελέτες ως προς την ετήσια εξέλιξη των CIN 1 προς CIN 2, ανεξαρτήτως HPV τύπου, αναφέρουν ότι ο μέσος κίνδυνος υπολογίζεται περίπου στο 7%[72, 73]. Στα πλαίσια ανασκόπησης της βιβλιογραφίας από τις Η.Π.Α. για τις περιπτώσεις CIN 2-3, έγινε εμφανές ότι στο 59% των δειγμάτων ελέγχου ανιχνεύθηκε HPV 16/18. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι οι περιπτώσεις CIN 1 στις οποίες ανιχνεύονται οι συγκεκριμένοι τύποι, είναι πιο πιθανό να εξελιχθούν σε CIN 2, από τις αντίστοιχες βλάβες με προσβολή από άλλους τύπους[74-78].

Δύο μελέτες, που δημοσιεύτηκαν στη διεθνή βιβλιογραφία, υπολόγισαν τον ετήσιο κίνδυνο εξέλιξης του CIN 2 σε CIN 3 σε ~ 8% και 20% αντίστοιχα. Η συναξιολόγηση των αποτελεσμάτων των συγκεκριμένων μελετών, καθόρισε τον ετήσιο κίνδυνο εξέλιξης στο τελικό 14%[69]. Ο μέσος χρόνος παρακολούθησης των γυναικών ήταν στη μία μελέτη 3,75 και στην άλλη 2,0 χρόνια. Το ποσοστό εξέλιξης σε CIN 3 κατά τη συνολική χρονική διάρκεια των μελετών ήταν ~ 23% και 33% αντίστοιχα[73, 79].

Οι μελέτες επί της εξέλιξης μίας υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης σε καρκίνο *in situ* ή μικροδιηθητικό καρκίνο, έχουν σοβαρούς περιορισμούς, λόγω των ηθικών θεμάτων, που εγείρονται ως προς την κλινική επιλογή παρακολούθησης ή αντιμετώπισης αυτών των περιστατικών. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται πως ο ετήσιος κίνδυνος υπολογίζεται από 47%[80], έως 38%[73]. Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων των δημοσιευμένων μελετών υπολογίζει το συνολικό κίνδυνο στο 43%[69]. Αξιοποιώντας τα στοιχεία του συνολικού διαστήματος παρακολούθησης, των 21 μηνών μίας μελέτης και των 45 μηνών άλλης, το ετήσιο ποσοστό εξέλιξης σε καρκίνο *in situ* σταθμίζεται στο 38% και 40%, αντίστοιχα.

Για τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας (Stage I κατά FIGO), τα στοιχεία είναι περιορισμένα. Χρησιμοποιώντας βαθμονόμηση (calibration) των

πληθυσμιακών δεδομένων, ορισμένοι ερευνητές έχουν υπολογίσει εξαιρετικά χαμηλά ποσοστά της ετήσιας εξέλιξης από το CIN 2/3 προς τον διηθητικό καρκίνο. Για παράδειγμα, οι Goldie και συν. αναφέρουν μεγάλο εύρος του εκτιμώμενου κινδύνου από το ελάχιστο 0,2% έως και το μέγιστο 4% σε γυναίκες 65 ετών και άνω[81]. Άλλοι συγγραφείς αναφέρουν τις πιθανότητες εξέλιξης σε ετήσιο επίπεδο μεταξύ 3% και 5%, χωρίς να κάνουν διάκριση ανάλογα με την ηλικία[82-84]. Τα χαμηλά ολικά ετήσια ποσοστά του κινδύνου εξέλιξης, αποδίδονται στην επίδραση της παρέλευσης του χρόνου. Το ηλικιακό φάσμα στο οποίο παρατηρείται η μέγιστη επίπτωση της μόλυνσης από HPV διαφέρει από αυτό της μέγιστης επίπτωσης του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας κατά δύο με τρεις δεκαετίες, κατά μέσο όρο[69].

Το χρονικό διάστημα μεταξύ πρώτο-λοίμωξης και εμφάνισης μικροσκοπικά ορατής προκαρκινικής αλλοίωσης, μπορεί να είναι μικρότερο του αναμενόμενου, ακόμα και εντός πενταετίας[85]. Σε ορισμένες περιπτώσεις, αναφέρεται ακόμα και δύο χρόνια μετά την έναρξη της σεξουαλικής ζωής[86-88]. Η κλινική σημασία (όπως ο κίνδυνος εμφάνισης διηθητικής νόσου) σε αυτές τις «πρώιμες» περιπτώσεις δεν έχει, ακόμα, καθοριστεί σαφώς. Η μέση ηλικία εμφάνισης προκαρκινικών αλλοιώσεων κυμαίνεται μεταξύ 25 και 35 ετών και εξαρτάται, αφενός, από τη μέση ηλικία έναρξης της σεξουαλικής ζωής και, αφετέρου, από τη συχνότητα εφαρμογής των διαγνωστικών μεθόδων του πληθυσμιακού ελέγχου. Όσον αφορά την ηλικία της πρώτης σεξουαλικής επαφής, γενικά θεωρείται ότι ταυτίζεται με την ηλικία έκθεσης στον HPV, εκτός των περιπτώσεων σεξουαλικής κακοποίησης σε νεαρή ηλικία.

Στους πληθυσμούς, που υποβάλλονται σε τυχαίο, μη οργανωμένο πρόγραμμα πληθυσμιακού ελέγχου, ο μεγαλύτερος κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου του τραχήλου της μήτρας παρουσιάζεται νωρίτερα σε σχέση με τους υπολοίπους καρκίνους των ενηλίκων, αγγίζοντας το υψηλότερο επίπεδο επίπτωσης, και διατηρώντας το, στην ηλικιακή ομάδα 35 έως 55 ετών[89]. Δεδομένου ότι σε απόλυτο αριθμό οι προκαρκινικές αλλοιώσεις είναι περισσότερες από τους καρκίνους, φαίνεται ότι τελικά μία μειοψηφία τελικά εξελίσσεται. Η αύξηση της πιθανότητας και ο ακριβής χρόνος κατά τον οποίο ο κίνδυνος διήθησης γίνεται μέγιστος, εάν οι προκαρκινικές αλλοιώσεις δεν αντιμετωπιστούν, δε δύναται να υπολογιστεί σε μελέτες κοορτής, λόγω των ηθικών θεμάτων που εγείρονται[90]. Από ορισμένες μελέτες προκύπτουν εκτιμήσεις του κινδύνου διήθησης από 20 έως 30% για χρονικά διαστήματα μελέτης 5 και 10 έτη αντίστοιχα [91, 92].

Ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου του τραχήλου της μήτρας οφείλεται αφενός στην επίδραση της λοίμωξης από HPV και αφετέρου στην έλλειψη αποτελεσματικού προγράμματος πληθυσμιακού ελέγχου. Άλλοι παράγοντες θεωρούνται ελάσσονος σημασίας συγκριτικά με την παρουσία ενός ή περισσότερων καρκινογόνων τύπων του ιού. Το κάπνισμα[93], η πολυτοκία[94] και η μακροχρόνια λήψη αντισυλληπτικών[95] διπλασιάζουν ή τριπλασιάζουν τον κίνδυνο εμφάνισης προκαρκινικών αλλοιώσεων και καρκίνου στις γυναίκες, που είναι ήδη προσβεβλημένες από τύπους HPV υψηλού κινδύνου. Ο ρόλος της επίδρασης χρόνιας φλεγμονής ιδιαίτερα από Χλαμύδια του Τραχώματος (Chlamydia Trachomatis), δεν έχει επιβεβαιωθεί[96]. Επιπλέον, δεν υπάρχουν επαρκή στοιχεία ως προς το ρόλο που πιθανών παίζουν τα μικροστοιχεία και οι παράγοντες

διατροφής, παρά μόνο ως προς την προστατευτική δράση που πιθανών ασκούν στην πρόληψη των προκαρκινικών αλλοιώσεων τα υψηλά επίπεδα φυλλικού οξέος[97]. Μεταξύ των ήδη προσβεβλημένων γυναικών από HPV, το χαμηλό κοινωνικό-οικονομικό επίπεδο θεωρείται παράγοντας κινδύνου, ακόμα και αν ληφθεί υπόψη η επαρκής παροχή υπηρεσιών υγείας[98]. Σε ορισμένες μελέτες, έχει γίνει εμφανής μία πρώιμη συσχέτιση μεταξύ της χρήσης προφυλακτικού και της μείωσης του χρονικού διαστήματος παραμονής της λοίμωξης ή ακόμα και της εξέλιξης προς προκαρκινικές αλλοιώσεις[99, 100].

Στις οροθετικές (HIV) ασθενείς η λοίμωξη με HPV παρουσιάζει μεγαλύτερη επίπτωση, επιμονή και μικρότερη πιθανότητα κάθαρσης. Παράλληλα, παρουσιάζουν συχνότερα πολλαπλές μολύνσεις. Παρολαυτά, πιθανότητα εμφάνισης διηθητικής νόσου δε φαίνεται να αυξάνεται για αυτές τις ασθενείς[101].

Όσον αφορά την εμφάνιση διηθητικής νόσου, πέραν της ηλικίας, δεν υπάρχουν γνωστοί παράγοντες κινδύνου. Ορισμένοι τύποι HPV όπως ο 16, 18 και 45 παρουσιάζονται ποσοστιαία συχνότερα σε διηθητικούς καρκίνους, έναντι των προκαρκινικών αλλοιώσεων από άλλους τύπους[102]. Θεωρείται πως η ενσωμάτωση του γενετικού υλικού του ιού σε αυτό του ξενιστή συνδέεται με την εμφάνιση διηθητικών μορφών της νόσου[103]. Η συνεχής μεταγραφή των ογκογονιδίων του HPV είναι απαραίτητη για να διατηρηθεί η ογκογένεση[37].

Η φυσική ιστορία της λοίμωξης από HPV δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί. Οι μελέτες που αφορούν το πεδίο αυτό, έχουν ορισμένους σοβαρούς περιορισμούς[104].

- Δεν υπάρχει αξιόπιστο ζωικό μοντέλο και in vitro πειραματικά συστήματα για τη μελέτη της φυσικής ιστορίας.
- Στις περισσότερες μελέτες, οι γυναίκες που συμμετέχουν έχουν ήδη εκτεθεί στον ιό πριν την είσοδο στη μελέτη, οι συμμετέχουσες, δε, παρακολουθούνται σε προκαθορισμένα χρονικά διαστήματα (από μήνες έως χρόνια).
- Τα, ενδεχομένως, μακρά αυτά χρονικά διαστήματα μεταξύ των ελέγχων, δεν επιτρέπουν το συνεχή έλεγχο της λοίμωξης και των μεταβολών που προκαλεί στον τράχηλο.
- Συνήθως, δεν διαχωρίζεται η έννοια της επίπτωσης και του επιπολασμού της λοίμωξης.
- Υπάρχουν περιορισμοί στη λήψη των επιχρισμάτων και στην τεχνολογία ανίχνευσης του ιού καθώς και ελλείψεις σε αναπαραγωγίμους βιοδείκτες, στοιχεία που καθιστούν δύσκολο τον προσδιορισμό πρώτο-μόλυνσης, επαναλοίμωξης ή αναζωπύρωσης προηγούμενης λοίμωξης.
- Συχνά είναι δύσκολο να καθοριστεί ο ακριβής τύπος HPV που προκαλεί αλλοίωση, όταν πρόκειται για περιπτώσεις πολλαπλών μολύνσεων. Η παρουσία πολλαπλών τύπων μπορεί να επηρεάσει την παραμονή της λοίμωξης και τη φυσική ιστορία της νόσου. Δεν είναι δυνατό να καθοριστεί ο ακριβής τύπος που ευθύνεται για την αρχική εμφάνιση της αλλοίωσης, καθώς και η απάντηση του ανοσοποιητικού απέναντι σε κάθε τύπο ξεχωριστά ή στο σύνολό τους, στοιχεία σημαντικά για την ανάπτυξη αποτελεσματικών εμβολίων.

- Οι μελέτες επί γυναικών που δεν έχουν έλθει σε επαφή με τον ιό, επικεντρώνονται σε νεαρές ηλικίες, και επομένως τα αποτελέσματα να μην μπορούν γενικευθούν με ασφάλεια και σε μεγαλύτερες ηλικίες.
- Στη λοίμωξη επιδρούν και ορισμένοι συμπαράγοντες. Κάποιοι από αυτούς, ίσως, σχετίζονται περισσότερο με την εξέλιξη της αλλοίωσης, έναντι της λοίμωξης από HPV, ενώ άλλοι μπορεί να σχετίζονται με τη δημιουργία ευνοϊκού για τον ιό μικροπεριβάλλοντος στα κύτταρα της βασικής στιβάδας.

3.6.5 Επιδημιολογία της HPV λοίμωξης

Οι περισσότερες γυναίκες παγκοσμίως θα μολυνθούν από τον HPV κάποια στιγμή στη ζωή τους[105]. Τα στοιχεία που αφορούν στην επιδημιολογία της λοίμωξης από τον ιό και η κατανομή των τύπων του, προέρχονται, κυρίως, από μετά-ανάλυση μελετών από την παγκόσμια βιβλιογραφία, που έγινε για λογαριασμό του Παγκοσμίου Οργανισμού Υγείας (Π.Ο.Υ.- W.H.O.) το 2010 και από μελέτες της IARC. Η μελέτη της IARC έχει δύο μεθοδολογικά πλεονεκτήματα:

1. χρησιμοποιήθηκε προτυπωμένο πρωτόκολλο για τη λήψη και τη συλλογή πληροφοριών ως προς τους παράγοντες κινδύνου
2. η ανίχνευση HPV DNA έγινε με μία μόνο τεχνική (GP5+/6+ PCR) από κεντρικά και μόνο εργαστήρια.

Η συνολική επίπτωση του HPV, προτυπωμένη ανάλογα με την ηλικία, υπολογίστηκε στο 10,5% (95% CI: 9,9%- 11%) από τη μελέτη της IARC[106].

Μεταξύ γυναικών με φυσιολογικό κυτταρολογικό επίχρισμα τραχήλου της μήτρας, από τα δεδομένα του Π.Ο.Υ. φαίνεται ότι σε παγκόσμιο επίπεδο η συνολική επίπτωση του HPV είναι 11,4% (95% CI: 11,3%- 11,5%). Ψηλότερα ποσοστά παρουσιάζονται μεταξύ των γυναικών από την Καραϊβική με 35,4% (95% CI: 29%- 42,2%) και ακολουθούν οι γυναίκες της Ανατολικής Αφρικής με 33,6% (95% CI: 30,2%- 37,1%). Χαμηλότερα ποσοστά έχει η Δυτική Ασία με 2,2% (95% CI: 1,5%- 3,1%) και η Δυτική Ευρώπη με 7,3% (95% CI: 7,1%- 7,5%). Στις γυναίκες αυτές ο πιο συχνός τύπος είναι ο 16 (2,7%), είτε πρόκειται για αναπτυγμένες, είτε για αναπτυσσόμενες περιοχές του πλανήτη. Η κατανομή μεταβάλλεται στη συνέχεια, αφού δεύτερος κατατάσσεται ο 31 σε παγκόσμιο επίπεδο (1,1%) και στις αναπτυγμένες χώρες (1,3%), ενώ στις αναπτυσσόμενες υπερέρχει ο 18 (1,4%). Σε φυσιολογικές γυναίκες ακολουθούν σε παγκοσμίως στην κατάταξη οι 18 (1,1%), 52 (1,0%), 51 (0,8%), 58 (0,7%), 56 (0,6%), 39 (0,6%), 45 (0,6%) και 33 (0,5%).

Οι διαφορές που παρατηρούνται ως προς τις σχετικές συχνότητες εμφάνισης των διαφορετικών τύπων του HPV, μπορεί να οφείλονται στην αλληλεπίδραση σύνθετων γεωγραφικών και βιολογικών παραγόντων, όπως η σχέση μεταξύ των τύπων του ιού και των ανοσιακών παραγόντων του ξενιστή (π.χ. πολυμορφισμοί HLA)[107]. Παρολαυτά, αν και η συχνότητα εμφάνισης του 16 σε σχέση με άλλους τύπους, παρουσιάζει μεγαλύτερη διαφοροποίηση ανάλογα με τη γεωγραφική περιοχή του πλανήτη (υψηλότερη στη Ευρώπη και χαμηλότερη στην Αφρική), ο

τύπος αυτός, ειδικά, φαίνεται να επηρεάζεται λιγότερο από την κατάσταση του ανοσιακού συστήματος[108].

Με βάση τα στοιχεία των μελετών της IARC (2005), μεταξύ γυναικών με φυσιολογικό κυτταρολογικό επίχρισμα, οι θετικές περιπτώσεις στις δοκιμασίες ανίχνευσης του HPV DNA (10,5% προτυπωμένο με την ηλικία), είχαν σε ποσοστό 6,6% μονήρη λοίμωξη. Για λοιμώξεις από πολλαπλούς τύπους, 0,9% είχε προσβληθεί από τρεις και πλέον τύπους και το διπλάσιο, σχεδόν, ποσοστό από δύο (1,7%)[106].

Στην κυτταρολογική κατηγορία ASCUS, η διάγνωση, αφενός, δεν είναι τυποποιημένη και, αφετέρου, με δεδομένη την απόκλιση στη διάγνωση μεταξύ του ιδίου ή διαφορετικών κυτταρολόγων, η θετική εξέταση ανίχνευσης HPV παρουσιάζει μεγάλη διακύμανση, όπως φαίνεται στη βιβλιογραφία[109]. Επιπλέον, η παρουσία του ιού μεταβάλλεται ανάλογα με την ηλικία. Στη μελέτη ALTS, στην οποία ελέχθησαν 27 τύποι του ιού με PGMY09/11 ιχνηθέτες, 61% των εξετασθέντων δειγμάτων ήταν θετικά στον HPV, και ενώ ήταν 78% στις ηλικίες 18- 24, το ποσοστό έπεφτε στο 32% στις άνω των 35 ετών. Η συχνότητα εμφάνισης του HPV 16 ήταν, στην ίδια μελέτη, 24% και για τον HPV 18 8% στις ASCUS περιπτώσεις. Το ποσοστό της HPV 16/18 συλλοίμωξης παρουσιάζει, και αυτό, γραμμική μείωση με την πρόοδο της ηλικίας και κυμαίνεται στο 35% στις γυναίκες 18-24 ετών και 19% στις άνω των 35[60]. Άλλες μελέτες, χρησιμοποιώντας την ίδια τεχνική ανίχνευσης του ιού, παρουσιάζουν τα ποσοστά θετικότητας στο 42% και 59%, (5% και 15% με πολλαπλού τύπου λοιμώξεις) και τη συχνότητα των HPV 16 στο 22% και 15% , και HPV 18 στο 4% και 10%, στις αντίστοιχες ηλικιακές ομάδες [61, 110].

Στις περιπτώσεις με χαμηλού βαθμού επιθηλιακές αλλοιώσεις (LSIL), η παγκόσμια επίπτωση του HPV (οποιοδήποτε τύπου) είναι, 71,1% . Συνολικά, τα ποσοστά θετικότητας στις δοκιμασίες HPV DNA κυμαίνονται από 67,1% έως 68,3% για την Ευρώπη, την Κεντρική και Νότια Αμερική και την Ασία. Ιδιαίτερα αυξημένο ήταν στη Βόρεια Αμερική (80,2%) και χαμηλό στην Αφρική (59,1%)[111]. Τα στοιχεία του Π.Ο.Υ. για το 2010, διακρίνουν τις περιοχές σε αναπτυσσόμενες και αναπτυσσόμενες και υπολογίζουν την κατανομή των 10 συχνότερων τύπων του ιού μεταξύ των LSIL βλαβών.

Παγκοσμίως ο 16 είναι ο συχνότερος (18,5%) ακολουθούμενος από τον 51 (7,5% παγκόσμια και 9,1% στις αναπτυσσόμενες χώρες). Στις αναπτυσσόμενες χώρες δεύτερος συχνότερος είναι ο 58 (7,7%). Την τρίτη θέση καταλαμβάνει ο 31 (7,3% παγκόσμια και 7,9% στις αναπτυσσόμενες χώρες) και ο 18 (6,7%) στις αναπτυσσόμενες. Οι αναλογίες πιθανοτήτων (odds ratio, OR) των λοιμώξεων από HPV 16 και HPV 18 μεταξύ των θετικών LSIL περιστατικών, σε παλαιότερη μελέτη[111], συγκρίθηκαν κατά περιοχές χρησιμοποιώντας σαν αναφορά την Ευρώπη, λόγω του μεγέθους του δείγματος, που προερχόταν από αυτή την ήπειρο. Οι γυναίκες με HPV θετική LSIL αλλοίωση, στην Αφρική ήταν στατιστικώς σημαντικά λιγότερο πιθανό να έχουν προσβληθεί από HPV 16 (OR, 0,49, 95% FCI) σε σχέση με τις Ευρωπαίες (OR, 1,00, 95% FCI). Οι αντίστοιχες περιπτώσεις στη Βόρεια Αμερική και στην Κεντρική και Νότια Αμερική παρουσίασαν τιμές αναλόγων πιθανοτήτων μεταξύ αυτών Ευρώπης και Αφρικής. Όμως, οι βορειοαμερικανίδες

ήταν σημαντικά πιο πιθανό να έχουν προσβληθεί από HPV 18 (OR, 1,61, 95% FCI), σε σχέση με τις Ευρωπαίες (OR, 1,00, 95% FCI). ή τις κέντρο-νοτιοαμερικανίδες (OR, 0,69, 95% FCI). Από την ίδια μελέτη, φαίνεται ότι μετά από συγκεκριισμό των στοιχείων και αξιολόγηση πολλών παραμέτρων, οι αναλογίες πιθανοτήτων για τις HPV θετικές LSIL περιπτώσεις για τη λοίμωξη από HPV 16 και HPV 18 ήταν υψηλότερες για όσες επιβεβαιώθηκαν και ιστολογικά, έναντι αυτών στις οποίες υπήρχε μόνο κυτταρολογική διάγνωση.

Πολυκεντρικές μελέτες επί της φυσικής ιστορίας της λοίμωξης από HPV, καταδεικνύουν τη συμβολή της παρουσίας του ιού σε υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις, που ανέρχεται σε ποσοστό 85%[112]. Πρέπει να αναφερθεί ότι, συχνά, οι υπολογισμοί στις μελέτες της επίπτωσης των διαφόρων τύπων του ιού, δεν διαχωρίζουν τις μονήρεις από τις πολλαπλές λοιμώξεις. Αυτό σημαίνει, ότι στις πολλαπλών τύπων λοιμώξεις, μετράται ο κάθε τύπος, πιθανών, εις διπλούν, όταν αθροίζονται τα περιστατικά, και ότι μερικοί τύποι (π.χ. 6, 11) τείνουν να εμφανίζονται μόνο σε πολλαπλών τύπων λοιμώξεις[112]. Η εκτίμηση της ποσοστιαίας αναλογίας κάθε τύπου του ιού επί των θετικών δειγμάτων, επηρεάζεται, επιπλέον, σε μικρότερο βαθμό όμως, και από την ευαισθησία των τεχνικών ανάλυσης[105]. Αυτό οφείλει να λαμβάνεται υπόψη στη διαδικασία εκτίμησης των παραλλαγών ως προς τη γεωγραφική κατανομή και, τελικά, στον υπολογισμό των πραγματικών διαφορών σε παγκόσμιο επίπεδο.

Η οργάνωση πινάκων αξιολόγησης του Π.Ο.Υ. έδειξε πως δεν υπάρχουν ουσιαστικές διαφορές στην ανίχνευση του DNA του ιού για τους τύπους 16, 18, 33 και 45 μεταξύ των διαφορετικών τεχνικών και των διαφορετικών εργαστηρίων. Αντίθετα, για τους τύπους 31, 35, 52 και 6 υπάρχουν διαφορές ως προς την ευαισθησία και την ειδικότητα, οι οποίες πρέπει να λαμβάνονται υπόψη όταν αξιολογούνται τα στοιχεία διαφορετικών εργαστηρίων.

Ως προς την κατάταξη των διαφορετικών τύπων HPV σε HSIL αλλοιώσεις και στις πέντε ηπείρους, με βάση τα στοιχεία του Π.Ο.Υ. του 2010, ο 16 ανιχνεύεται σε ποσοστό 44,1% επί του συνόλου των δειγμάτων. Στη δεύτερη θέση βρίσκεται ο 31 (9,4% παγκόσμια και 10,2% στις αναπτυσσόμενες χώρες), αλλά στις αναπτυσσόμενες χώρες είναι ο 58 (13,5%). Μεγαλύτερες διακυμάνσεις ως προς την κατανομή παρατηρούνται από τις θέσεις αυτές και κάτω, αφού παγκοσμίως ακολουθούν οι 58, 33, 52 και 18, στις αναπτυσσόμενες χώρες οι 33, 52, 18 και 58 αντίστοιχα και στις αναπτυσσόμενες οι 33, 52, 18 και 58 αντίστοιχα.

Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας αποτελεί τον τρίτο σε συχνότητα καρκίνο μεταξύ των γυναικών παγκοσμίως και τον δεύτερο για τις ηλικίες από 15 έως 44 ετών. Το προτυπωμένο με βάση την ηλικία ποσοστό εμφάνισής του είναι 15,2 και ο σχετικός κίνδυνος 1,6. Η συνολική επίπτωση του ιού σε περιπτώσεις διηθητικού καρκίνου, οποιουδήποτε ιστολογικού τύπου, υπολογίζεται στο 87,2% (95% CI 86,7-87,8)[112, 113]. Θεωρητικά, θα έπρεπε, το 99,7% των καρκίνων του τραχήλου της μήτρας, να είναι θετικοί, όπως υπολογίζεται από τις πιο ευαίσθητες δοκιμασίες ανίχνευσης του HPV[114]. Οι αποκλίσεις από αυτές τις εκτιμήσεις εξηγούνται, γενικά, από τις διαφορές στην ποιότητα των υλικών που εξετάστηκαν, και από το είδος των δοκιμασιών, που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση της παρουσίας του ιού.

Τα παγκόσμια δεδομένα του Π.Ο.Υ. με την κατανομή των 10 συχνότερων τύπων του ιού επί των καρκίνων του τραχήλου της μήτρας, βασισμένα σε μετά-αναλύσεις, δείχνουν ότι ο 16 και ο 18 είναι οι συνηθέστεροι τύποι σε όλες τις ηπείρους (54,4% και 16,5% αντίστοιχα). Επιπροσθέτως, οι τύποι 33, 45 και 31 κατατάσσονται από την τέταρτη έως την έκτη θέση γενικά και από την τρίτη ως την πέμπτη θέση στις ανεπτυγμένες χώρες. Στις αναπτυσσόμενες χώρες, παρατηρείται αυξημένη συχνότητα των 58 και 52, οι οποίοι παρεμβάλλονται στην κατάταξη στην τρίτη και έκτη θέση αντίστοιχα. Μελέτη του 2007[102], αναφέρει πως συνολικά σε παγκόσμιο επίπεδο, 70% των περιπτώσεων διηθητικού καρκίνου σχετιζόταν με λοίμωξη, είτε από τον HPV 16 (55%), είτε από τον HPV 18 (15%). Οι 6 επόμενοι σε συχνότητα τύποι (31, 33, 35, 45, 52 και 58) ευθύνονταν για το επιπλέον 18% των περιπτώσεων.

Στην ανάλυση των τύπων του καρκίνου, φαίνεται ότι στον καρκίνο εκ πλακωδών κυττάρων συμπίπτει γενικά η συχνότητα εμφάνισης των τύπων του ιού με τη γενική κατάταξη, με την προσθήκη του 51 σε παγκόσμιο επίπεδο και των 56 και 68 επιπλέον στις ανεπτυγμένες χώρες. Στην περίπτωση, όμως των Αδενοκαρκινωμάτων, στην κατάταξη των 10 συχνότερων τύπων του HPV, παρατηρούνται ορισμένες διαφοροποιήσεις από το γενικό μοντέλο. Πρώτος είναι ο 18 (38,7%), ακολουθεί ο 16 (35,3%), ο 45 (5,2%) και στη συνέχεια, με φθίνουσα συχνότητα, οι 33, 31, 58, 52, 59, 51 και 35.

Από παλαιότερη μελέτη, που αναφέρει τη συνολική επίπτωση του ιού στο 92,5%, το 92,2% των θετικών δειγμάτων είχαν μονήρη και το 7,8% πολλαπλού τύπου λοίμωξη από δύο και πλέον τύπους του ιού[115].

Με βάση τα δεδομένα αυτά, και τα στοιχεία πολυκεντρικών ερευνών[102, 115-118], εάν αγνοηθεί προσωρινά η πιθανή επίδραση της διασταυρούμενης προστασίας από τα εμβόλια κατά του ιού που ήδη κυκλοφορούν, η επόμενη γενιά εμβολίων, που στοχεύουν στην κάλυψη περισσότερων από το 90% των ογκογόνων τύπων παγκοσμίως, θα πρέπει να περιλαμβάνουν στους τύπους 16, 18, 58, 33, 45, 31, 52, 35, 39 και επιπλέον τον 59 που ενδημεί στις αναπτυσσόμενες, και τον 73, με ποσοστό 0,8% στις ανεπτυγμένες χώρες[105, 115].

Γενικά, ο HPV 16 είναι ο συχνότερος τύπος ανεξαρτήτως διάγνωσης. Ο HPV 18 είναι ο δεύτερος συχνότερος τύπος σε όλο το φάσμα των αλλοιώσεων του τραχήλου και κυριαρχεί στο Αδενοκαρκίνωμα[119]. Ο HPV 45, μία σπάνια, σχετικά, λοίμωξη σε γυναίκες με φυσιολογικό κυτταρολογικό επίχρισμα, παρουσιάζει συχνότητα εμφάνισης 2,8% σε HSIL αλλοιώσεις και η συχνότητα του σχεδόν διπλασιάζεται (4,4%) στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Σε αντίθεση με παλαιότερα δεδομένα[105], που αναφέρουν τον HPV 58 σαν συχνό τύπο σε φυσιολογικές γυναίκες και σε HSIL, αλλά τον κατατάσσουν σε χαμηλή θέση στον καρκίνο, με τα νεότερα στοιχεία παρατηρείται, πλέον, σημαντική αύξηση της συχνότητας εμφάνισής του. Έτσι, για τους καρκίνους, γενικά, αποτελεί τον τρίτο σε συχνότητα τύπο παγκοσμίως, και διατηρεί για τα πλακώδη καρκινώματα την ίδια θέση, ενώ φαίνεται να είναι λιγότερο συχνός στα Αδενοκαρκινώματα. Αυτού του είδους οι καρκίνοι αποτελούν περίπου το 16% όλων των καρκίνων του τραχήλου, όπως υπολογίζεται από το φάσμα των συχνότητων που προέρχεται από τα αρχεία

καταγραφής καρκίνων. Παρολαυτά, στις αναπτυσσόμενες χώρες, με εφαρμοσμένα προγράμματα πληθυσμιακού ελέγχου, παρατηρούνται τάσεις αύξησης της επίπτωσης και της σχετικής συχνότητας εμφάνισης των Αδενοκαρκινωμάτων έως και το 20% των καταγεγραμμένων καρκίνων του τραχήλου. Οι αυξητικές τάσεις αυτές μπορεί να οφείλονται, αφενός στη χαμηλή αποδοτικότητα (efficacy) των προγραμμάτων πληθυσμιακού ελέγχου, που βασίζονται στην κυτταρολογία, να διαγνώσουν τις προκαρκινικές βλάβες, και αφετέρου στην πραγματική αύξηση του ποσοστού έκθεσης των νεώτερων γενεών, ως αποτέλεσμα των αλλαγών στη σεξουαλική συμπεριφορά[105].

Οι τύποι HPV16 και HPV18 υπο-αντιπροσωπεύονται στις φυσιολογικές γυναίκες (3,8%) συγκριτικά με τη συμβολή τους σε περιπτώσεις αλλοιώσεων του τραχήλου της μήτρας. Ο 16 ή/και ο 18 συμβάλλουν σε ποσοστό 24,3% στις LSIL αλλοιώσεις. Επιπλέον αφορούν σε περισσότερο από 50% των λοιμώξεων που ανιχνεύονται σε HSIL βλάβες, στο 70% των λοιμώξεων σε περιπτώσεις διηθητικών καρκινωμάτων και στο 81,5% των λοιμώξεων που ανιχνεύονται στα Αδενοκαρκινώματα[113, 119]. Οι παρατηρήσεις συμφωνούν με τα στοιχεία προοπτικών μελετών, που υποστηρίζουν πως οι συγκεκριμένοι τύποι έχουν πλεονέκτημα ως προς την επιμονή της λοίμωξης και την εξέλιξη προς αλλοιώσεις του τραχήλου, συγκριτικά με άλλους υψηλού κινδύνου τύπους του ιού[56]. Από στοιχεία μετά- αναλύσεων επί των κυτταρολογικών και ιστολογικών αλλοιώσεων σε Ευρωπαίες, φαίνεται ότι αυξάνεται η συχνότητα ανίχνευσης του HPV 16, όσο αυξάνεται και η βαρύτητα της βλάβης. Δεν ισχύει όμως το ίδιο και για τον HPV 18. Επί κυτταρολογικά διαγνωσμένων και ιστολογικά επιβεβαιωμένων αλλοιώσεων LSIL, CIN 1 και HSIL, CIN 2/3, και καρκίνο του πλακώδους επιθηλίου, ο μεν 16 ήταν παρών στο 18,8%, 23,7%, 45,7% , 55,4% και 64,5% αντίστοιχα, ενώ ο 18 στο 14,5%, 5,7%, 6% , 6% και 11% αντίστοιχα[120]. Αν και ανιχνεύεται σπανιότερα, ο HPV45 μπορεί και αυτός να έχει «βιολογικό πλεονέκτημα», δεδομένου ότι κατατάσσεται μόλις στην 9^η θέση μεταξύ HPV θετικών γυναικών με φυσιολογικό επίχρισμα (0,6%), αλλά αναγνωρίζεται μεταξύ των πέντε συχνότερων τύπων σε περιπτώσεις διηθητικών καρκίνων.

Η επίπτωση του HPV είναι αρκετά υψηλή (έως 30%) μεταξύ νεαρών γυναικών με εξαίρεση την Ασία[118]. Υπάρχουν στοιχεία που αποδίδουν το φαινόμενο στην αλλαγή της σεξουαλικής συμπεριφοράς, με πρωιμότερη έναρξη της σεξουαλικής ζωής στις ηλικιακές ομάδες κάτω των 25 ετών, έναντι αυτής των γυναικών από 45 και άνω[121-123]. Στις ενδιάμεσες ηλικιακές ομάδες παρατηρείται ύφεση και αυξάνεται ξανά στις κατηγορίες 35- 44 και 45- 54 ετών. Η δεύτερη αυτή αύξηση δεν παρατηρείται τόσο έντονα στους ασιατικούς πληθυσμούς. Δεν είναι ακόμα σαφώς καθορισμένο, κατά πόσο αυτή η αύξηση οφείλεται σε αντίστοιχη αύξηση της επίπτωσης τύπων χαμηλού κινδύνου, όπως προτείνουν ορισμένοι συγγραφείς[118, 123, 124]. Οι έρευνες επί αυτού του φαινομένου, υποστηρίζουν ότι 1) οι αλλαγές στη σεξουαλική συμπεριφορά των μεσηλικών γυναικών, ή των συντρόφων τους 2) η επανενεργοποίηση λανθανουσών λοιμώξεων λόγω γήρανσης του ανοσοποιητικού συστήματος και 3) αθροιστικά φαινόμενα, που μεταφράζονται ως συνεχιζόμενη έκθεση καθόλη τη διάρκεια της ζωής σε μεγαλύτερης ηλικίας γυναίκες, μπορεί να

ευθύνονται για τη δεύτερη αυξητική αιχμή της επίπτωσης[105, 125, 126]. Ορισμένοι συγγραφείς υποστηρίζουν πως ο ρόλος της παραμονής του ιού είναι ισχυρότερος από αυτών της απόκτησης νέων λοιμώξεων στις γυναίκες από 45 ετών και άνω[62]. Όμως, το γεγονός ότι η δεύτερη κορυφή της κατανομής παρατηρείται με διαφορά 10 ετών μεταξύ γυναικών των Η.Π.Α. (35- 44 ετών) και της Ευρώπης (45- 54 ετών), συνηγορεί υπέρ της επίδρασης συμπεριφορικών παραγόντων, παρά των βιολογικών φαινομένων, που σχετίζονται με την εμμηνόπαυση και την πρόοδο της ηλικίας[105].

Γενικά, ως προς τις διαφορές που παρατηρούνται στις συχνότητες εμφάνισης των τύπων του ιού ανά ηλικιακές ομάδες, πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι υπάρχει η τάση να χρησιμοποιούνται στο πλαίσιο των μελετών ομάδες ελέγχου με μεγαλύτερης ηλικίας γυναίκες προσπαθώντας, όσο το δυνατόν, να αντιστοιχηθούν οι ηλικίες με τις ομάδες του δείγματος. Επιπλέον, η ισχυρή επίδραση της ηλικίας επί της συχνότητας εμφάνισης του ιού, μπορεί να επηρεάσει ακόμα και τις εκτιμήσεις επί της επίπτωσης ανά γεωγραφική περιοχή. Παρά τις προσπάθειες να προτυπωθούν τα αποτελέσματα των μετά- αναλύσεων με βάση την ηλικία, αυτό δεν ήταν πάντα εφικτό [118].

Παρά τη δεδομένη ύπαρξη αιτιολογικής σχέσης μεταξύ της λοίμωξης από HPV και της εμφάνισης καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, η συσχέτιση της επίπτωσης με γεωγραφικά στοιχεία περιλαμβάνει ορισμένους ακόμα περιορισμούς. Πρώτον, προκύπτουν θέματα που αφορούν στην ποιότητα των στοιχείων που συλλέγονται. Υπάρχουν, γενικά, δυσκολίες ως προς τη διασφάλιση αντιπροσωπευτικού δείγματος, ειδικά σε χώρες με ελάχιστους οικονομικούς πόρους, προκειμένου να υπολογιστεί η επίπτωση του HPV. Επιπλέον, πιθανά λάθη μέτρησης οφείλονται και στη δυσκολία διάκρισης μεταξύ εμμένουσας ή παροδικής λοίμωξης[59]. Αν και η λοίμωξη αποτελεί τον πρωταρχικό παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση καρκίνου, έχουν ενοχοποιηθεί και αρκετοί άλλοι συμπαραγόντες, όπως η σεξουαλική συμπεριφορά, η χρήση αντισυλληπτικών και το κάπνισμα[93, 127, 128]. Οι συστηματικές διαφορές αυτών των συμπαραγόντων μεταξύ των πληθυσμών, αποτελούν συγχυτικούς παράγοντες στην αξιολόγηση των γεωγραφικών κατανομών. Σε πληθυσμιακό επίπεδο, ο σημαντικότερος συγχυτικός παράγοντας είναι ο τύπος του προγράμματος ελέγχου (screening). Θεωρητικά, ο αποτελεσματικός έλεγχος μειώνει την επίπτωση του καρκίνου, και ανιχνεύει περιστατικά με προκαρκινικές αλλοιώσεις, στις οποίες, αφού αντιμετωπιστούν αποτελεσματικά, εξαφανίζεται η λοίμωξη από τον HPV. Παρολαυτά, σε μελέτη που έγινε ανάλυση της ευαισθησίας, συγκρίνοντας και τις γυναίκες που δεν είχαν πρόσβαση στα συστήματα υγείας, δεν παρατηρήθηκαν τελικά διαφορές στη επίπτωση του ιού[123].

3.7 ΚΥΤΤΑΡΟΛΟΓΙΑ

Αντικείμενο της κυτταρολογίας αποτελεί η μελέτη των φυσιολογικών και των παθολογικών χαρακτήρων των ανθρωπίνων κυττάρων είτε ως προϊόντα αυτόματης αποφολίδωσης, είτε μετά από απόσπαση με τεχνητά μέσα από τους ιστούς (π.χ. ψήκτρα, παρακέντηση δια λεπτής βελόνης κ.ά.). Η κυτταρολογική διάγνωση της

κακοήθειας βασίζεται σε μορφολογικές αλλαγές που προκαλούνται κυρίως στον πυρήνα του κυττάρου, χρησιμοποιώντας συγκεκριμένα κριτήρια. Απαραίτητα στοιχεία για τη διάγνωση θεωρούνται, βέβαια τόσο η επάρκεια και η αντιπροσωπευτικότητα του δείγματος, όσο και η γνώση του ιστορικού του ασθενούς και η παράθεση των σχετικών κλινικών πληροφοριών. Βοηθητική, σε κάποιες περιπτώσεις θεωρείται και η χρήση νεώτερων διαγνωστικών τεχνικών όπως η ανοσοκυτταροχημεία, η κυτταρομετρία ροής και οι τεχνικές της μοριακής βιολογίας[3].

Σκοπός της κυτταρολογίας είναι η έγκαιρη και έγκυρη διάγνωση της πάθησης του ασθενούς, καλοήθους ή κακοήθους, από υλικό το οποίο έχει ληφθεί με μη παρεμβατικό τρόπο [129].

Η κυτταρολογική εξέταση του τραχήλου περιλαμβάνει τη συλλογή αποφολιδωμένων κυττάρων από τον τράχηλο της μήτρας και τη μικροσκοπική αξιολόγησή τους, μετά από κατάλληλη επεξεργασία. Οι πρωτοποριακές εργασίες των Παπανικολάου και Babes αποτέλεσαν τη βάση για την εφαρμογή τεχνικών αποφολιδωτικής κυτταρολογίας για την αναγνώριση γυναικών με καρκίνο της μήτρας, η συνεργασία, δε, του μεγάλου Έλληνα με τον Trot οδήγησε στην ανάπτυξη τεχνικής για τη λήψη κυττάρων από τον οπίσθιο κολπικό θόλο. Η ολοκληρωμένη μορφή λήψης του κολποτραχηλικού επιχρίσματος, διεθνώς γνωστού ως test Παπανικολάου, οφείλεται στους Παπανικολάου και Ayre [130-132].

3.7.1 Λήψη και προετοιμασία υλικού συμβατικού επιχρίσματος

Τις πλέον αποδεκτές τεχνικές λήψης δείγματος αποτελούν:

A. ο συνδυασμός εφαρμογής σπάτουλας του Ayre για τη λήψη δείγματος από τον εξωτράχηλο και ψήκτρας για τη λήψη δείγματος από τον ενδοτράχηλο

B. η εφαρμογή ψήκτρας τύπου Broom για ταυτόχρονη λήψη δείγματος από τον ενδοτράχηλο και τον εξωτράχηλο.

Η διαγνωστική ακρίβεια κατά τη διαδικασία της κυτταρολογικής εξέτασης επηρεάζεται σημαντικά από την τεχνική επεξεργασίας κάθε υλικού. Στην περίπτωση της επίστρωσης του ληφθέντος υλικού σε αντικειμενοφόρους πλάκες, είναι απαραίτητη η δημιουργία μονοεπίπεδης στρώσης κυττάρων, προκειμένου η μικροσκόπηση να είναι ευκρινής. Η επίστρωση του υλικού επιτυγχάνεται με τη χρήση δεύτερης αντικειμενοφόρου πλάκας η οποία σύρεται πάνω στην πρώτη που φέρει το υλικό. Το υλικό μονιμοποιείται με ισοπροπανόλη ή αιθανόλη πριν την εφαρμογή της χρώσης Παπανικολάου. Αυτή συνδυάζει τη χρώση του πυρήνα με αιματοξυλίνη και την αντίχρωση του κυτταροπλάσματος με Orange G και EA50. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται κατά τη μικροσκόπηση η ευκρινής απεικόνιση τόσο της κατανομής της χρωματίνης και του πυρηνίου, όσο και η διάκριση του κυτταροπλάσματος σε βασεόφιλο, ηωσινόφιλο ή κερατινοποιούμενο.

Ανεξαρτήτως μεθόδου λήψης συμβατικού επιχρίσματος, μόνο 20% των κυττάρων του δείγματος παραμένουν στην αντικειμενοφόρο πλάκα, ενώ το ποσοστό

ανεβαίνει στο 95% των κυττάρων που τελικά εναιωρούνται στο υλικό κυτταρολογίας υγρής φάσης.

3.7.2 Κυτταρολογία υγρής φάσης(Liquid Based Cytology, LBC)

Πρόκειται για σύγχρονη τεχνική συλλογής, μονιμοποίησης και αυτόματης επίστρωσης κυττάρων για την παρασκευή πλακιδίων προς μικροσκόπηση. Αναπτύχθηκε ως τεχνική προκειμένου να βελτιωθούν οι σημαντικότερες αιτίες που περιορίζουν τη διαγνωστική ακρίβεια του συμβατικού test Παπανικολάου. Δεδομένης της ολοένα αυξανόμενης χρήσης μηχανημάτων αυτοματοποιημένης σάρωσης, τα οποία απαιτούν επιχρίσματα με μικρού βαθμού κυτταρική αλληλοεπικάλυψη, η εφαρμογή της τεχνικής αυτής κερδίζει διαρκώς έδαφος. Η ThinPrep® είναι τεχνική αυτού του είδους αναγνωρισμένη από τον Οργανισμό Φαρμάκων και Τροφίμων των Η.Π.Α. (FDA).

Με την τεχνική αυτή επιτρέπεται η μεταφορά του συνόλου των κυττάρων σε ένα υγρό μέσο συντήρησης. Τα κύτταρα, εντός του υλικού αυτού μπορούν να διατηρηθούν για αρκετές εβδομάδες σε θερμοκρασία δωματίου. Τα επιχρίσματα τα οποία παρασκευάζονται, περιέχουν αντιπροσωπευτική αναλογία κυττάρων που ελήφθησαν από τον τράχηλο, με καθαρό υπόστρωμα. Σημαντικό στοιχείο αποτελεί η λεπτομερέστερη διάκριση του πυρήνα, με εμφανέστερη κατανομή της χρωματίνης, του πυρηνίου και της πυρηνικής μεμβράνης. Λόγω της μεγαλύτερης ευκρίνειας και της μείωσης του αριθμού των εξεταζομένων πλακιδίων που απαιτούνται ανά περιστατικό, ο συνολικός διαγνωστικός χρόνος του εργαστηρίου, τελικά μειώνεται κατά 40%.

Μετά την παρασκευή ενός αντιπροσωπευτικού επιχρίσματος για τη διάγνωση του τεστ, εάν απαιτείται, από το κυτταρικό δείγμα που παραμένει στο φιαλίδιο, υπάρχει η δυνατότητα να παρασκευαστούν επιπλέον επιχρίσματα (έως και 10 ανά φιαλίδιο), να εγκλειστούν τα κύτταρα σε κύβους παραφίνης, ή να εφαρμοστούν διαγνωστικές δοκιμασίες μοριακής κυτταρολογίας (HPV testing, ανίχνευση χλαμυδίων, γονόρροιας κ.ά.).

Τα γενικά κυτταρολογικά χαρακτηριστικά της κυτταρολογίας υγρής φάσης συγκριτικά με τη συμβατική, παρατίθενται στον πίνακα που ακολουθεί.

Χαρακτηριστικά	ThinPrep®	Συμβατικό επίχρισμα
Κυτταρική μονιμοποίηση	Άριστη	
Artifacts	Όχι	Συχνά
Κυτταρική κατανομή	Ομοιόμορφη σε μονοστιβάδα	Ανομοιόμορφη
Κυτταρικότητα	Επαρκής	Επαρκής
Κυτταρικό μέγεθος/σχήμα	Μικρότερο, αποστρογγυλεμένο	Μεγαλύτερο, με σχήμα ανάλογο της επίστρωσης
Αρχιτεκτονική	Διατηρείται	Διατηρείται
Κύτταρα του ενδοτραχήλου	Σε αθροίσεις	Σε αθροίσεις και μεμονωμένα
Υπόστρωμα καθαρό	Ναι	Όχι
Ερυθρά αιμοσφαίρια	Μειωμένα	Παρόντα σε αριθμό που συχνά δυσχεραίνουν τη διάγνωση
Λευκά αιμοσφαίρια	Μειωμένα	Παρόντα σε αριθμό που συχνά δυσχεραίνουν τη διάγνωση
Νέκρωση	Σε αθροίσεις	Διάχυτη
Βλέννη	Μειωμένη σε αθροίσεις	Άφθονη και διάχυτη
Αξιολόγηση επιχρίσματος	Εύκολο μετά από ειδική εκπαίδευση	Σχετικά δύσκολη
Συμπληρωματικές τεχνικές	Ναι	Συνήθως όχι

Πίνακας 2: Σύγκριση συμβατικής κυτταρολογίας με κυτταρολογία υγρής φάσης

Στην κυτταρολογική έκθεση γίνεται προσπάθεια αποτύπωσης της κατάστασης του τραχήλου της υπό διερεύνηση γυναίκας με τη χρήση συστημάτων ταξινόμησης. Η πρώτη προσπάθεια ταξινόμησης έγινε από τον ίδιο τον Παπανικολάου το 1940 και αναθεωρήθηκε από τον ίδιο το 1952-1958 [130]. Η ταξινόμηση του Μονάχου

αποτελεί εξελιγμένη μορφή της κυτταρολογικής απάντησης σε πέντε κατηγορίες [131].

ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗΣ ΚΑΤΑ Γ. ΠΑΠΑΝΙΚΟΛΑΟΥ

Κατηγορία I	Απουσία κυτταρικών στοιχείων ενδεικτικών φλεγμονής, προκαρκινωματώδους αλλοίωσης ή καρκινώματος
Κατηγορία II	Παρουσία κυττάρων με χαρακτήρες φλεγμονώδους αλλοίωσης
Κατηγορία III	Παρουσία κυττάρων που εγείρουν την υπόνοια κακοήθειας χωρίς να είναι δυνατή η διάγνωση υπέρ αυτής
Κατηγορία IV	Παρουσία κυττάρων που εγείρουν έντονα την υπόνοια κακοήθειας.
Κατηγορία V	Κυτταρολογική εικόνα συμβατή με κακοήθεια

Πίνακας 3: Σύστημα ταξινόμησης κατά Γ. Παπανικολάου

Το 1997, η Βρετανική Εταιρία Κλινικής Κυτταρολογίας πρότεινε ένα νέο σύστημα ταξινόμησης των κυτταρολογικών επιχρισμάτων που αντιστοιχούν σε προνεοπλασματικές και νεοπλασματικές αλλοιώσεις του τραχήλου της μήτρας πέντε κατηγοριών:

- Οριακές αλλοιώσεις
- Ελαφρά δυσκαρύωση
- Μέτρια δυσκαρύωση
- Σοβαρού βαθμού δυσκαρύωση
- Σοβαρού βαθμού δυσκαρύωση ενδεικτική διηθητικού καρκινώματος.

Η εισαγωγή από τον Richart του όρου «ενδοεπιθηλιακή αλλοίωση του τραχήλου» (CIN) [133], οδήγησε στην πιο πρόσφατη εξέλιξη του συστήματος απόδοσης της κυτταρολογικής διάγνωσης του CIN, δηλαδή στο σύστημα ονοματολογίας κατά Bethesda. Το αρχικό σύστημα του 1988 τροποποιήθηκε δύο φορές, το 1991 και το 2001.

3.7.3 Σύστημα BETHESDA 2001 (TBS)[132, 134]

Το σύστημα αυτό ταξινόμησης περιλαμβάνει τμήματα τα οποία αφορούν:

- στον τύπο του δείγματος: συμβατικό επίχρισμα ή κυτταρολογία υγρής φάσης.

- στην επάρκεια του δείγματος: ο καθορισμός της καταλληλότητας ενός δείγματος καθορίζεται από την κυτταρική σύνθεση του επιχρίσματος και την καταλληλότητα της παρασκευαστικής διαδικασίας. Εκτός της περίπτωσης του «ικανοποιητικού δείγματος», αιτιολογείται το «ανεπαρκές δείγμα» με στόχο τη συνεχόμενη βελτίωση της ποιότητας των επιχρισμάτων. Ακατάλληλο είναι το δείγμα όταν η αντικιμενοφόρος πλάκα είναι σπασμένη, όταν δεν ταυτοποιείται η ασθενής, όταν το 75% των επιθηλιακών κυττάρων καλύπτονται από πολυμορφοπύρρηνα, ερυθρά αιμοσφαίρια ή βλέννη και όταν το επίχρισμα είναι πτωχής κυτταρικότητας.
- στη γενική κατηγοριοποίηση: διακρίνοντας τα κυτταρολογικά επιχρίσματα σε «αρνητικά για ενδοεπιθηλιακή αλλοίωση ή κακοήθεια» και σε αυτά με παρουσία επιθηλιακών κυττάρων με αλλοιώσεις «ενδεικτικές ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης ή καρκινώματος», προσφέρεται μία ουσιαστική αποσαφήνιση του συμπεράσματος της κυτταρολογικής έκθεσης.
- στην αυτοματοποιημένη αναθεώρηση.
- στις βοηθητικές εξετάσεις: όπως η μοριακή διερεύνηση της HPV λοίμωξης και την αυτοματοποιημένη σάρωση του επιχρίσματος
- στην ερμηνεία, τα αποτελέσματα και τα σχόλια: ως προς το σχολιασμό, πρόκειται για προαιρετικά στοιχεία, υπό την προϋπόθεση της συναίνεσης των θεραπόντων ιατρών.

3.7.3.1 Α. επιχρίσματα «αρνητικά για ενδοεπιθηλιακή αλλοίωση ή κακοήθεια»

Στην κατηγορία αυτή ταξινομούνται τόσο τα επιχρίσματα χωρίς αλλοιώσεις ενδεικτικές ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης ή καρκίνου, καθώς και οι περιπτώσεις ατροφικού επιθηλίου, αλλοιώσεων οφειλόμενων σε φλεγμονώδη αντίδραση ανεξαρτήτως αιτιολογίας και οι αλλοιώσεις μετά από ακτινοβολία.

3.7.3.2 Β. επιχρίσματα με παρουσία επιθηλιακών κυττάρων με αλλοιώσεις «ενδεικτικές ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης ή καρκινώματος»

3.7.3.2.1 Β1α. Άτυπα πλακώδη κύτταρα απροσδιόριστης σημασίας(ASCUS)

Επιχειρείται η περιγραφή κυτταρολογικών χαρακτηριστικών που υποδηλώνουν, χωρίς να αποδεικνύουν, διάγνωση ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης του πλακώδους επιθηλίου. Στο επίχρισμα μπορεί να ανιχνεύονται κύτταρα του πλακώδους επιθηλίου με ευμεγέθεις μεν υπερχρωματικούς πυρήνες, αλλά ομοιογενή κατανομή της χρωματίνης και σχέση πυρήνα προς κυτταρόπλασμα $< \frac{1}{3}$.

3.7.3.2.2 Β1β. Άτυπα πλακώδη κύτταρα στα οποία δεν μπορεί να αποκλειστεί υψηλόβαθμη αλλοίωση(ASC-H)

Στην κατηγορία αυτή μπορεί να ενταχθούν επιχρίσματα με κύτταρα του πλακώδους επιθηλίου με ανισομεγέθεις βαθυχρωματικούς πυρήνες, αλλά ασάφεια κυτταροπλασματικών ορίων.

Πρέπει να τονιστεί πως μολονότι η κατηγορία ASC γενικά έχει πολύ χαμηλή διαγνωστική αναπαραγωγιμότητα τόσο μεταξύ διαφορετικών, όσο και από τον ίδιο κυτταρολόγο, εντούτοις εντάχθηκε στο σύστημα Bethesda προκειμένου να μειωθεί ο αριθμός των ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων της εξέτασης.

3.7.3.2.3 B2. Χαμηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακή αλλοίωση του πλακώδους επιθηλίου (LSIL)

Τα κλασσικά κυτταρολογικά κριτήρια αφορούν την παρουσία κυττάρων με ευρεία ανώμαλη περιπυρηνική άλω (κοιλοκύτταρα), την παρουσία υπερκεράτωσης, παρακεράτωσης, δυσκεράτωσης και την παρουσία κυττάρων της επιπολής και της διάμεσης στιβάδας με δυσκαρυωτικούς πυρήνες. Η σχέση πυρήνα με κυτταρόπλασμα είναι τουλάχιστον $\frac{1}{3}$. Τα κύτταρα διατάσσονται μεμονωμένα ή σε αθροίσεις διατηρώντας όμως τα κυτταροπλασματικά τους όρια.

3.7.3.2.4 B3. Υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακή αλλοίωση του πλακώδους επιθηλίου (HSIL)

Τα κυτταρολογικά κριτήρια για την κατηγορία αυτή περιλαμβάνουν την παρουσία μικρών κυττάρων της διάμεσης στιβάδας με χαρακτήρες πλακώδους μετάπλασης και έντονη δυσκαρύωση. Ανάλογα με τη βαρύτητα της αλλοίωσης, η σχέση πυρήνα προς κυτταρόπλασμα κυμαίνεται από $\frac{2}{3}$ έως $\frac{3}{4}$. Τα κύτταρα διατάσσονται είτε μεμονωμένα, είτε σε σφιχτούς συγκυτιακούς σωρούς.

3.7.3.2.5 B5. Άτυπα αδενικά κύτταρα (AGC)

Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει τα επιχρίσματα με κύτταρα που διατάσσονται σε συμπαγείς αθροίσεις με μικρού βαθμού πυρηνική αλληλοεπικάλυψη. Οι πυρήνες συνήθως παρουσιάζουν σχετικά ομοιόμορφη κοκκιώδη κατανομή χρωματίνης και σπάνια ξεφεύγουν από τα όρια των κυτταρικών αθροίσεων.

3.7.3.2.6 B6. Άτυπα αδενικά κύτταρα η παρουσία των οποίων συνηγορεί υπέρ νεοπλασίας

Στην κατηγορία αυτή περιγράφονται κύτταρα του αδενικού επιθηλίου που διατάσσονται σε συμπαγείς τρισδιάστατους σωρούς. Οι πυρήνες παρουσιάζουν σχετικά ανώμαλα κατανεμημένη αδροκοκκώδη χρωματίνη, ευδιάκριτα χρωμόκεντρα ή και υποσημαινόμενα πυρήνια. Στην περιφέρεια αυτών των ομάδων οι πυρήνες, συνήθως, δίνουν την εντύπωση φτερού.

3.7.3.2.7 B7. Αδενοκαρκίνωμα *in situ*(AIS)

Στα επιχρίσματα αυτά αναγνωρίζονται άφθονα άτυπα αδενικά κύτταρα. Διατάσσονται σε πυκνούς τρισδιάστατους σωρούς αυξημένης κυτταρικότητας και στην περιφέρεια αναγνωρίζονται πυρήνες με σαφή σχηματισμό «φτερού». Επίσης αναγνωρίζονται άτυπα κύτταρα σε ροζετοειδείς σχηματισμούς και σε πασσαλοειδή διάταξη, δίνοντας την εικόνα ψευδοπολύστιβου επιθηλίου. Οι πυρήνες, με ποικιλία μεγέθους και σχήματος, παρουσιάζουν αδροκοκκώδη κατανομή της χρωματίνης, χρωμόκεντρα και ευδιάκριτα πυρήνια.

3.7.3.2.8 B8. Αδενοκαρκίνωμα

Τα κύτταρα στα επιχρίσματα αυτής της κατηγορίας διατάσσονται μεμονωμένα ή σε τρισδιάστατες αθροίσεις. Τα κύτταρα είναι αδενικού τύπου με έντονη διαταραχή της σχέσης πυρήνα προς κυτταρόπλασμα. Στον πυρήνα παρατηρείται αδροκοκκώδης ανώμαλη κατανομή της χρωματίνης και ευδιάκριτα πυρήνια. Σπάνια, αναγνωρίζονται στο υπόστρωμα και θέσεις νεκροβίωσης.

3.7.4 Μοριακή κυτταρολογία

Στην τελευταία δεκαετία του 20^{ου} αιώνα η τεχνολογία επέτρεψε την ανάπτυξη νέων «απλοποιημένων» εργαστηριακών δοκιμασιών προκειμένου η διερεύνηση των νουκλεϊκών οξέων και των προϊόντων έκφρασής τους να είναι πιο απλουστευμένη. Έτσι, κερδίζει όλο και περισσότερο έδαφος η μοριακή διερεύνηση της αιτιοπαθογένειας των νόσων. Παράλληλα, με την ανάπτυξη της τεχνολογίας κυτταρολογίας υγρής φάσης ThinPrep[®], κατέστη δυνατή η χρήση ιχνηθετών νουκλεϊκών οξέων για άμεση μελέτη πληροφοριών που κωδικοποιούνται σε βιολογικά δείγματα, τα οποία έχουν ληφθεί με τεχνικές αποφολιδωτικής κυτταρολογίας ή παρακέντησης με λεπτή βελόνη. Η τεχνική αυτή αποτελεί επανάσταση στο χώρο της προεγχειρητικής διάγνωσης, επειδή παρέχει την δυνατότητα για εφαρμογή μεθοδολογιών διερεύνησης της έκφρασης πρωτεϊνών, DNA και mRNA σε μονιμοποιημένο υλικό, αντιπροσωπευτικό μέρος του οποίου έχει χρησιμοποιηθεί για διαγνωστικούς σκοπούς.

Κυρίαρχη θέση στην ογκογένεση του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας φαίνεται ότι παίζουν ορισμένοι τύποι του ιού των ανθρωπίνων θηλωμάτων και κατά

συνέπεια τα «βιολογικά μονοπάτια» που διαταράσσονται κατά την ενσωμάτωση του HPV στο γονιδίωμα του ξενιστή.

Από τα μέσα της δεκαετίας του 70 ξεκίνησε η εφαρμογή μοριακής διερεύνησης του HPV, χωρίς όμως μέχρι σήμερα η επιστημονική κοινότητα να έχει καταλήξει ποια από τις τεχνικές διερεύνησης γονιδιώματος HPV είναι η πλέον αξιόπιστη και ποια είναι η σημασία της μοριακής διερεύνησης της HPV λοίμωξης στην παθολογία του τραχήλου της μήτρας. Οι μόνες χώρες, οι οποίες έχουν σαφείς οδηγίες για την διαδικασία πληθυσμιακού ελέγχου και την θεραπευτική αντιμετώπιση των ενδοεπιθηλιακών αλλοιώσεων του τραχήλου της μήτρας είναι οι Η.Π.Α., το Ηνωμένο Βασίλειο, η Νορβηγία και η Δανία. Σύμφωνα λοιπόν με τις υποδείξεις της Επιτροπής Φαρμάκων και Τροφίμων των Η.Π.Α. (Food and Drug Administration, FDA) η μοριακή διερεύνηση του γονιδιώματος του HPV, με τεχνικές Hybrid Capture 2, Combas, Cervista (HR 16/18) και Aptima, προτείνεται στη διαχείριση γυναικών με κυτταρολογική διάγνωση ASC-US, στην παρακολούθηση γυναικών που έχουν υποβληθεί σε κολποσκόπηση, στην παρακολούθηση γυναικών που έχουν υποβληθεί σε χειρουργική θεραπεία HGSIL και ως συμπληρωματική εξέταση του ThinPrep PapTest στο πληθυσμιακό έλεγχο γυναικών ηλικίας μεγαλύτερης των τριάντα ετών. Στο Ηνωμένο Βασίλειο οι οδηγίες είναι αντίστοιχες με εκείνες των Η.Π.Α. με τη διαφορά ότι τα τεστ Combas, Cervista (HR 16/18) και Aptima ευρίσκονται ακόμα υπό διερεύνηση. Οι οδηγίες για την παρακολούθηση γυναικών στην Δανία προτείνουν την εφαρμογή DNA δοκιμασίας (Hybrid Capture 2), σε γυναίκες άνω των 30 ετών με κυτταρολογική διάγνωση ASCUS και mRNA δοκιμασίας (NucliSens EasyQ HPV) σε γυναίκες με κυτταρολογική ASCUS ή LgSIL ανεξαρτήτως ηλικίας. Τέλος στη Νορβηγία ακολουθείται συγκεκριμένος αλγόριθμος βασισμένος μόνο στα αποτελέσματα της mRNA δοκιμασίας (NucliSens EasyQ HPV) σε γυναίκες με κυτταρολογική ASCUS ή LgSIL ανεξαρτήτως ηλικίας. Επειδή όμως η απλή αναγνώριση ακόμα και ενός ογκογόνου τύπου του ιού παρέχει ενδείξεις και όχι αποδείξεις της βιολογικής συμπεριφοράς της ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης που συνδέεται με αυτόν, αρκετοί ερευνητές προτείνουν την μελέτη και άλλων παραμέτρων που σχετίζονται με την καρκινογένεση του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας.

3.8 ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗ [3, 135]

Οι αλλοιώσεις που οφείλονται στην HPV λοίμωξη και αφορούν στο πολύστιβο πλακώδες επιθήλιο του τραχήλου της μήτρας εντοπίζονται συνηθέστερα στη ζώνη

μετάπτωσης του κυλινδρικού επιθηλίου του ενδοτραχήλου σε πολύστιβο πλακώδες επιθήλιο.

Ιστολογικά ο ιός προκαλεί:

- **Οξυτενή κονδυλώματα** (condyloma acuminatum)
- **Χαμηλόβαθμη ενδοεπιθηλιακή αλλοίωση** (low grade squamous intraepithelial lesion, LSIL),
- **Υψηλόβαθμη ενδοεπιθηλιακή αλλοίωση** (high grade squamous intraepithelial lesion, HSIL),
- **Καρκίνωμα πλακώδους επιθηλίου** (squamous cell carcinoma, SCC).
- Αδενοκαρκίνωμα In situ
- Αδενοκαρκίνωμα

3.8.1 Οξυτενή κονδυλώματα

Κατά το παρελθόν, τα οξυτενή κονδυλώματα του τραχήλου θεωρούνταν σπάνια. Εντούτοις, τις τελευταίες δεκαετίες, λόγω συχνότερης διενεργείας κολποσκόπησης, διαπιστώνονται συχνότερα. Αυτό αποδίδεται στο γεγονός ότι τα κονδυλώματα σχετίζονται με λοίμωξη από τους τύπους 6 και 11 του ιού HPV (που ευθύνονται για το 95% των κονδυλωμάτων του γεννητικού σωλήνα της γυναίκας), καθώς και με άλλους, σπανιότερους ΙrHPVs, που απαντώνται στο 10-15% των λοιμώξεων του τραχήλου.

Τα μεγαλύτερα κονδυλώματα φαίνονται με γυμνό μάτι και ενδέχεται να θεωρηθούν εσφαλμένα ως καρκίνωμα. Η κολποσκόπηση και η βιοψία θέτουν την ορθή διάγνωση. Μακροσκοπικά, τα κονδυλώματα ποικίλλουν, από εξωφυτικά, ελαφρώς άμισχες υπεργέρσεις, έως μικρές θηλώδεις προσεκβολές. Μικροσκοπικά, το πολύστιβο πλακώδες επιθήλιο σε κονδυλώματα παρουσιάζει θηλωμάτωση, ακάνθωση, παρακεράτωση και υπερκεράτωση. Σε μεγάλη μεγέθυνση, κάθε θηλώδης προσεκβολή περιέχει ένα μικρό αγγείο. Η κοιλοκυτταρική ατυπία αποτελεί προέχον χαρακτηριστικό, ενώ ταυτόχρονα παρατηρείται δυσκεράτωση και παρουσία περισσοτέρων του ενός (συνήθως δύο) πυρήνων ανά κύτταρο. Στο υποκείμενο στρώμα παρατηρούνται συχνά κύτταρα χρόνιας φλεγμονής (λεμφοκύτταρα, πλασματοκύτταρα, ιστιοκύτταρα).

3.8.2 Χαμηλόβαθμη ενδοεπιθηλιακή αλλοίωση (low grade squamous intraepithelial lesion, LSIL)

Οι αλλοιώσεις αυτές αναφέρονται επίσης και ως επίπεδα κονδυλώματα. Μικροσκοπικά χαρακτηρίζονται από ωρίμαση στα ανώτερα 2/3 του πάχους του επιθηλίου, και τα επιφανειακά κύτταρα παρουσιάζουν ποικίλη, αλλά συνήθως ήπια

ατυπία, ή κοιλοκυττάρωση. Παρατηρούνται ήπιες ατυπίες του πυρήνα και μικρή μιτωτική δραστηριότητα στο κατώτερο επίπεδο του επιθηλίου. Σπάνια παρατηρούνται ανώμαλες μορφές κυττάρων (CERVICAL INTRAEPITHELIAL NEOPLASIA 1-CIN-1).

3.8.3 Υψηλόβαθμη ενδοεπιθηλιακή αλλοίωση (high grade squamous intraepithelial lesion, HSIL)

Οι αλλοιώσεις αυτές εγκυμονούν και το μεγαλύτερο κίνδυνο για ανάπτυξη καρκινώματος του τραχήλου της μήτρας. Κατά τη μικροσκοπική εξέταση ωρίμαση παρατηρείται στο άνω μισό του πάχους του επιθηλίου με καταφανή πυρηνική ατυπία τόσο στις ανώτερες, όσο και στις κατώτερες στιβάδες. Η μιτωτική δραστηριότητα περιορίζεται στα κατώτερα 2/3 του επιθηλίου. Μπορεί να παρατηρηθούν ορισμένες ανώμαλες μορφές κυττάρων (CERVICAL INTRAEPITHELIAL NEOPLASIA 2-CIN-2).

Σε βαρύτερες περιπτώσεις η ωρίμαση (συμπεριλαμβανομένης της κερατινοποίησης της επιπολής στιβάδας) μπορεί είτε να εκλείπει τελείως, είτε να περιορίζεται στο επιπολής 1/3 του επιθηλίου. Πυρηνική ατυπία παρατηρείται στο μεγαλύτερο μέρος ή σε όλο το πάχος του επιθηλίου. Υπάρχουν πολυάριθμες μιτώσεις σε όλα τα επίπεδα του επιθηλίου, αρκετές από τις οποίες είναι ανώμαλες (CERVICAL INTRAEPITHELIAL NEOPLASIA 3-CIN-3).

3.8.4 Καρκίνωμα πλακώδους επιθηλίου (squamous cell carcinoma, SCC)

Ένα μέρος των υψηλόβαθμων ενδοεπιθηλιακών αλλοιώσεων θα εξελιχθούν σε διηθητικό καρκίνωμα εάν δεν ανιχνευθούν έγκαιρα και δεν αντιμετωπιστούν επαρκώς χειρουργικά.

Μικροσκοπικά, τα συχνότερα μορφολογικά κριτήρια διήθησης περιλαμβάνουν τη δεσμοπλαστική αντίδραση του παρακείμενου στρώματος, την εστιακή εμφανή ωρίμαση του νεοπλασματικού επιθηλίου και την απώλεια προσανατολισμού των πυρήνων στο όριο επιθηλίου-στρώματος, με απουσία πασσαλοειδούς διάταξης των κυττάρων της βασικής στιβάδας (που παραμένει στην τραχηλική ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία). Επίσης, παρατηρείται ανωμαλία στο όριο επιθηλίου – στρώματος, προβολή ψευδοκρυπτών και «πτύχωση ή διπλασιασμός» του νεοπλασματικού επιθηλίου. Η προβολή ψευδοκρυπτών ορίζεται ως η παρουσία διακριτών φωλεών διηθητικού καρκινώματος συνήθως με κεντρική νέκρωση. Ο διπλασιασμός του επιθηλίου αναφέρεται στην παρουσία αγγείων εντός μίας ομάδας νεοπλασματικών επιθηλιακών κυττάρων δίνοντας την εντύπωση ατελώς σχηματισμένης θηλής.

3.8.5 Αδενοκαρκίνωμα τραχήλου in situ

Πρόκειται για βλάβη στην οποία τα αδένια βρίσκονται, μεν, στη φυσιολογική τους θέση, έχει όμως αντικατασταθεί το επιθήλιο τους, μερικώς ή πλήρως, από κύτταρα με κακοήθεις χαρακτήρες. Το όριο της βλάβης διατηρείται, χαρακτηριστικά, αδρό. Τα κύτταρα είναι συνήθως ομαλά διατεταγμένα με τον μακρύ άξονα τους κάθετο στη βασική μεμβράνη. Οι επιμηκυσμένοι, πλειομορφικοί και υπερχρωματικοί πυρήνες διατάσσονται κοντά στη βάση. Το νεοπλαστικό επιθήλιο συνήθως βρίσκεται εντός των κρυπτών. Αν και υπάρχει έντονος ερεθισμός του στρώματος, δεν παρατηρείται δεσμοπλαστική αντίδραση.

3.8.6 Αδενοκαρκίνωμα τραχήλου (ADENO-CA)

Πρόκειται για καρκινώματα με αδενική διαφοροποίηση. Περίπου οι μισοί όγκοι αυτού του τύπου παρουσιάζονται ως εξωφυτικές, πολυποειδείς ή θηλώδεις μάζες. Οι υπόλοιποι είναι οζώδεις με διάχυτη διόγκωση ή εξέλκωση του τραχήλου

3.9 ΚΟΛΠΟΣΚΟΠΗΣΗ

Η κολποσκόπηση είναι μία διαγνωστική τεχνική που επιτρέπει την εξέταση, υπό φωτισμό και μεγέθυνση, του τραχήλου της μήτρας, του κόλπου και του αιδοίου. Γίνεται με τη χρήση κολποσκοπίου, το οποίο μεγεθύνοντας την εικόνα 6x έως 40x, επιτρέπει στον κολποσκόπο να διακρίνει οπτικά τις φυσιολογικές από τις παθολογικές περιοχές και να πάρει κατευθυνόμενες βιοψίες για περαιτέρω ιστολογική εξέταση. Η εξέταση εφαρμόστηκε αρχικά το 1925 από τον Γερμανό Hans Hinselmann.

Η κολποσκόπηση χρησιμοποιείται για τρεις σκοπούς:

1. Εκτίμηση γυναικών με παθολογικό τεστ Παπανικολάου.
2. Εκτίμηση γυναικών με κλινικά ύποπτο τράχηλο.
3. Ως βασικό εργαλείο πληθυσμιακού ελέγχου στα πλαίσια της γυναικολογικής εξέτασης. Αυτό αφορά αρκετές χώρες της Ευρώπης και της Λατινικής Αμερικής, με χαμηλή όμως ειδικότητα της εξέτασης, αν και υψηλή ευαισθησία για τον εντοπισμό προκαρκινικών αλλοιώσεων.

Στην περίπτωση γυναικών με παθολογικό επίχρισμα τραχήλου της μήτρας, σκοποί της κολποσκόπησης είναι:

1. Ο καθορισμός της ακριβούς γεωγραφικής/ανατομικής εντόπισης της ζώνης μετάπτωσης.
2. Η επιβεβαίωση ή αναίρεση της κυτταρολογικής υποψίας ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης.
3. Η αναγνώριση ή ο αποκλεισμός διηθητικού καρκίνου.

4. Η αναγνώριση ή ο αποκλεισμός αδενικής βλάβης.
5. Η διευκόλυνση της θεραπείας και η παρακολούθηση της εξέλιξης ή της οπισθοχώρησης της ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης.

3.10 ΔΕΝΤΡΑ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗΣ (Classification And Regression Trees – CART)

3.10.1 Εισαγωγή

Ο αλγόριθμος CART είναι μια γρήγορη και ισχυρή μέθοδος για την επίλυση προβλημάτων ταξινόμησης. Δίνει τη δυνατότητα για τα ακόλουθα:

- Επιλογή μόνο των μεταβλητών εισόδου που είναι σημαντικές για την επίλυση του προβλήματος ταξινόμησης.
- Κατασκευή μιας αρχικής αρχιτεκτονικής που διαχωρίζει τον χώρο εισόδου.
- Την παραγωγή κατανοητών κανόνων, ώστε να είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν με ευκολία στην πράξη.
- Την εξόρυξη γνώσης από τα διαθέσιμα δεδομένα.

Ένα δέντρο ταξινόμησης, κατασκευάζει έναν δενδροειδή διαμερισμό του χώρου εισόδου που απαλείφει το πρόβλημα της «κατάρας των διαστάσεων», ότι δηλαδή ο αριθμός των κανόνων αυξάνει εκθετικά με τον αριθμό των εισόδων.

3.10.2 Δέντρα ταξινόμησης

Ένα δέντρο ταξινόμησης επιμερίζει τον χώρο εισόδου (επίσης γνωστό και ως χώρο των χαρακτηριστικών – feature space) ενός συνόλου δεδομένων (dataset) σε αμοιβαία αποκλειόμενες περιοχές, σε κάθε μια από τις οποίες αντιστοιχίζει μια ετικέτα ή μια τιμή. Ο μηχανισμός είναι ευδιάκριτος, διότι μπορούμε να ακολουθήσουμε μια δενδρική δομή εύκολα και να εξηγήσουμε πώς λαμβάνεται κάποια απόφαση. Γι' αυτό και η μέθοδος δέντρων απόφασης έχει χρησιμοποιηθεί κατά κόρον στα πεδία της μηχανικής μάθησης, των έμπειρων συστημάτων και της πολυμεταβλητής ανάλυσης. Ίσως μάλιστα να είναι και η πιο καλά ανεπτυγμένη τεχνική για τη δημιουργία κανόνων από ένα σύνολο δειγμάτων.

3.10.3 Ορισμοί

- Ένα **δέντρο απόφασης** είναι μια δενδροειδής μορφή αποτελούμενη από εσωτερικούς και εξωτερικούς κόμβους συνδεδεμένους με κλαδιά.
- Ένας **εσωτερικός κόμβος** είναι μια μονάδα λήψης αποφάσεων που υπολογίζει μια συνάρτηση απόφασης για να αποφασίσει ποιον θυγατρικό κόμβο να επισκεφτεί μετά.
- Αντιθέτως, ένας **εξωτερικός κόμβος** –γνωστός και ως τερματικός κόμβος ή φύλλο- δεν έχει θυγατρικούς κόμβους και χαρακτηρίζεται με μια ετικέτα ή τιμή που περιγράφει τα δεδομένα που οδήγησαν σε αυτόν.

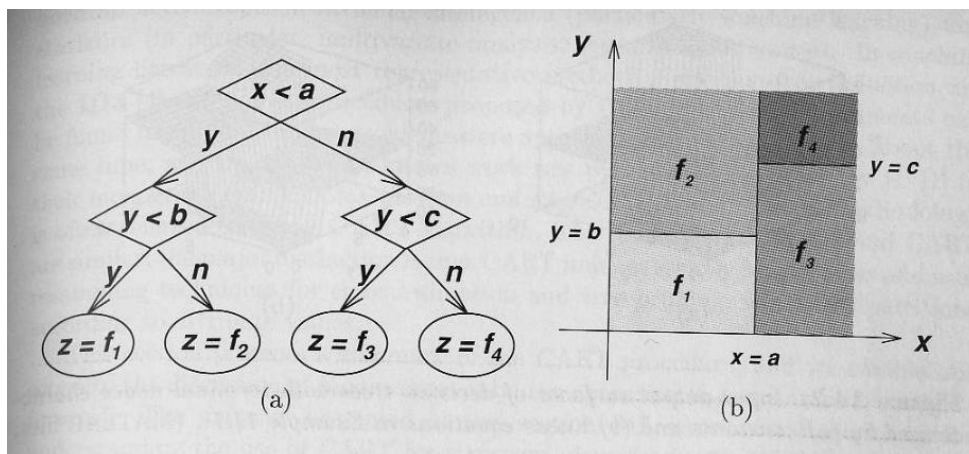
Γενικά, ένα δέντρο απόφασης το χρησιμοποιούμε ως εξής: Πρωτίστως, του παρουσιάζουμε ένα διάνυσμα εισόδων στον αρχικό κόμβο ή κόμβο-ρίζα. Ανάλογα με το αποτέλεσμα μιας συνάρτησης απόφασης που χρησιμοποιεί ένας εσωτερικός κόμβος, θα μας οδηγήσει σε έναν από τους θυγατρικούς κόμβους του έως ότου φθάσουμε σε ένα τερματικό κόμβο. Τότε μια τιμή ή μια ετικέτα αποδίδεται στο συγκεκριμένο διάνυσμα εισόδου.

3.10.4 Δυαδικά δένδρα

Στην περίπτωση ενός δυαδικού δέντρου ταξινόμησης, κάθε εσωτερικός κόμβος έχει ακριβώς δύο θυγατρικούς και έτσι η συνάρτηση απόφασης μπορεί πάντα να ερμηνευθεί ως Σωστό/Λάθος.

Τα δυαδικά δένδρα για προβλήματα ταξινόμησης καλούνται συχνά απλώς **δέντρα ταξινόμησης** και κάθε τερματικός κόμβος περιέχει μια ετικέτα που υποδηλώνει την εκτιμώμενη κατηγορία ενός διανύσματος εισόδου. Με την ίδια συλλογιστική, τα δέντρα απόφασης που χρησιμοποιούνται σε προβλήματα εκτίμησης συνάρτησης ονομάζονται **δέντρα παλινδρόμησης** και οι ετικέτες των τερματικών τους κόμβων μπορεί να είναι σταθερές ή εξισώσεις που δηλώνουν την εκτιμώμενη τιμή εξόδου ενός δοσμένου διανύσματος εισόδου. Στο Σχήμα 1(α) απεικονίζεται ένα τυπικό δυαδικό δέντρο ταξινόμησης με δύο αριθμητικές εισόδους x και y και μια λεκτική έξοδο z . Το άξιο προσοχής είναι ότι το δέντρο χωρίζει τον χώρο εισόδου σε τέσσερις μη επικαλυπτόμενες ορθογώνιες περιοχές, κάθε μια εκ των οποίων αντιστοιχεί σε μια ετικέτα f_i που αναπαριστά την εκτιμώμενη έξοδο, όπως φαίνεται και στην Σχήμα 1(β).

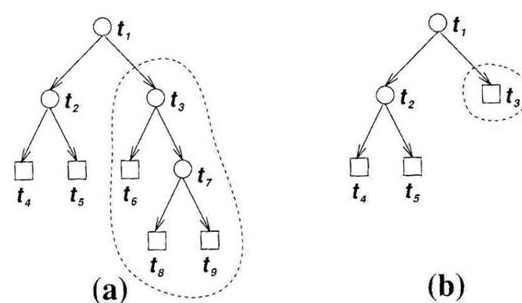
Παρατηρείστε ότι κάθε τερματικός κόμβος έχει ένα μοναδικό μονοπάτι που αρχίζει με τον κόμβο ρίζα και τελειώνει στον τερματικό κόμβο. Το μονοπάτι αντιστοιχεί σε έναν κανόνα απόφασης που είναι ουσιαστικά η τομή πολλών συνθηκών ελέγχου. Είναι σημαντικό να παρατηρήσουμε ότι για κάθε ένα δεδομένο διάνυσμα εισόδου, ένα και μόνο ένα μονοπάτι θα ακολουθηθεί.



Σχήμα 1 (α) Δυαδικό δέντρο ταξινόμησης και (β) ο διαμερισμός του χώρου εισόδου

3.10.4.1 Συμβολισμοί

Πριν από την περιγραφή του δέντρου ταξινόμησης είναι σημαντικό να καθορίσουμε χρήσιμους συμβολισμούς. Ένα τυπικό δυαδικό δέντρο, σαν κι αυτό στο Σχήμα 2(α), συχνά συμβολίζεται με T . Ένας εσωτερικός κόμβος του T συμβολίζεται με t και το υποδένδρο με ρίζα τον t -συμβολίζεται με T_t , όπως φαίνεται και στο Σχήμα 2(α), όπου $t=t_3$. Χρησιμοποιούμε το T για να δηλώσουμε το σύνολο των τερματικών κόμβων σε ένα δέντρο T . Ο αριθμός των τερματικών κόμβων είναι $|\bar{T}|$ (και ίσος με πέντε στην περίπτωση που απεικονίζεται στο Σχήμα 2. Προκύπτει εύκολα ότι σε ένα πλήρες δυαδικό δέντρο, όπου δηλαδή κάθε κόμβος έχει μηδέν ή δύο θυγατρικούς, ο αριθμός των τερματικών κόμβων είναι πάντα ένας παραπάνω από τον αριθμό των εσωτερικών.



Σχήμα 2: (α) Ένα τυπικό δέντρο T με κόμβο-ρίζα t_1 και υποδένδρο T_{t_3} (β) Το δέντρο t_1 μετά τον εκφυλισμό το υποδέντρου T_{t_3} στον τερματικό κόμβο t_3

Ένα παράδειγμα ψαλιδισμού είναι να εκφυλιστεί το υποδένδρο T της εικόνας σε έναν τερματικό κόμβο. Το δέντρο που προκύπτει συμβολίζεται με T -υποσύνολο του αρχικού.

3.10.4.2 Αλγόριθμος κατασκευής του δέντρου

Η χρήση δέντρων ταξινόμησης ξεκινά από το AID (*Automatic Interaction Detection*). Μέθοδοι για δημιουργία δένδρων απόφασης από δεδομένα –γνωστές και ως «αναδρομικός μερισμός του χώρου» - έχουν από τότε γίνει ένα σημαντικό πεδίο έρευνας στην τεχνητή νοημοσύνη, ιδιαίτερα στη μηχανική μάθηση και στη στατιστική, κυρίως στον τομέα της ανάλυσης πολλών μεταβλητών. Παρόμοια προβλήματα αντιμετωπίστηκαν από τους στατιστικούς περίπου την ίδια εποχή και η πιο γνωστή εργασία δημοσιεύτηκε από τους Breiman et al [136] τη μονογραφία τους με τίτλο «Classification And Regression Trees». Γι' αυτό και η μεθοδολογία τους αναφέρεται ως ο αλγόριθμος CART, που εντάσσεται στο επιστημονικό πεδίο

της στατιστικής. Ακολουθεί μια συνοπτική παρουσίαση του αλγορίθμου που επικεντρώνεται σε δυαδικά μόνο δέντρα.

Για να κατασκευάσει ένα κατάλληλο δένδρο απόφασης, ο CART πρώτα αναπτύσσει το δέντρο διεξοδικά βασιζόμενος σε ένα σύνολο δειγμάτων (ή δεδομένων εκπαίδευσης) και μετά «κλαδεύει» (pruning) το δέντρο προς τα πίσω με βάση μια αρχή ελαχιστοποίησης της πολυπλοκότητάς του. Το αποτέλεσμα είναι μια σειρά από δέντρα με ποικίλα μεγέθη. Το τελικό δέντρο που θα επιλεγεί είναι αυτό που επιτυγχάνει καλύτερη επίδοση στην εξέταση ενός ανεξάρτητου συνόλου δεδομένων ελέγχου. Συνοπτικά λοιπόν, η μεθοδολογία περιλαμβάνει δύο στάδια:

- 1) Μεγάλωμα του δένδρου και
- 2) Κλάδεμα.

3.10.4.3 **Μεγάλωμα (ανάπτυξη) του δέντρου**

Ο CART αναπτύσσει ένα δέντρο απόφασης δημιουργώντας μια διαδοχή από διαχωριστικά (ή όρια εναλλαγής) που χωρίζουν τα δεδομένα εκπαίδευσης σε υποσύνολα. Αρχίζοντας από τον κόμβο-ρίζα που περιέχει όλα τα δεδομένα εκπαίδευσης, διεξάγεται μια εξονυχιστική έρευνα για να βρεθεί εκείνη η τιμή διαχωρισμού που ελαχιστοποιεί ένα μέτρο του λάθους (ή συνάρτηση κόστους). Όταν βρεθεί το διαχωριστικό, το σύνολο των δεδομένων διαμοιράζεται σε δύο ξεχωριστά υποσύνολα, σύμφωνα με την τιμή διαχωρισμού. Τα υποσύνολα παριστάνονται με δύο θυγατρικούς κόμβους που ξεκινούν από τη ρίζα, και η αυτή μέθοδος εφαρμόζεται και σε αυτούς. Η αναδρομική διαδικασία τερματίζεται είτε όταν το μέτρο του λάθους σε έναν κόμβο πέσει κάτω από ένα όριο ανοχής, είτε όταν η μείωση του λάθους που προκύπτει από επιπλέον διαχωρισμό του κόμβου δεν υπερβαίνει ένα κατώφλι.

Τα δέντρα ταξινόμησης χρησιμοποιούνται για την επίλυση αντιστοιχών προβλημάτων, όπου τα χαρακτηριστικά ενός αντικειμένου χρησιμοποιούνται για να καθορίσουν την κλάση όπου ανήκει. Για το μεγάλωμα του δέντρου χρειαζόμαστε ένα μέτρο του λάθους $E(t)$ που ποσοτικοποιεί την επίδοση ενός κόμβου t ως προς την ικανότητά του να διαχωρίζει δεδομένα διαφορετικών κλάσεων. Το μέτρο του λάθους για δέντρα ταξινόμησης αναφέρεται συχνά ως «συνάρτηση ανομοιογένειας» (*impurity function*). Για έναν δεδομένο κόμβο (ή ισοδύναμα για συγκεκριμένο σύνολο δεδομένων) πρέπει να ισούται με μηδέν όταν όλα τα δεδομένα ανήκουν στην ίδια κλάση και να μεγιστοποιείται όταν τα δεδομένα κατανέμονται ομοιόμορφα σε όλες τις πιθανές κλάσεις.

Ένας αυστηρός ορισμός της συνάρτησης ανομοιογένειας για ένα πρόβλημα J κατηγοριών είναι ο εξής:

Ορισμός 1. Συνάρτηση ανομοιογένειας για προβλήματα J κλάσεων:

Η συνάρτηση ανομοιογένειας ϕ είναι μια συνάρτηση J μεταβλητών που αντιστοιχίζει τα ορίσματα εισόδου της $p_1, p_2, \dots, p_J$, με $\sum_{j=1}^J p_j = 1$, σε έναν μη αρνητικό πραγματικό αριθμό ούτως ώστε

$$\varphi(\frac{1}{J}, \frac{1}{J}, \dots, \frac{1}{J}) = \text{maximum} \quad \text{και} \quad \varphi(1, 0, 0, \dots, 0) = \varphi(0, 1, 0, \dots, 0) = \varphi(0, 0, 0, \dots, 1) = 0$$

Τα ορίσματα εισόδου p_j , $j=1:J$, είναι η πιθανότητα ένα δεδομένο στον κόμβο να ανήκει στην κλάση j . Συνεπώς, η συνάρτηση ανομοιογένειας για δεδομένο κόμβο μεγιστοποιείται όταν όλες οι κλάσεις είναι ισόποσα αναμεμιγμένες στον κόμβο, και ελαχιστοποιείται όταν ο κόμβος περιέχει δεδομένα μιας μόνο κλάσης. Χρησιμοποιώντας λοιπόν τη συνάρτηση ανομοιογένειας φ , το μέτρο της «καθαρότητας» ενός κόμβου t είναι $E(t) = \varphi(p_1, p_2, \dots, p_J)$, όπου p_j είναι τα ποσοστά των περιπτώσεων στον κόμβο που ανήκουν στην κλάση j .

Όμοια, το μέτρο καθαρότητας ολοκλήρου του δέντρου είναι

$E(T) = \sum_{t \in \tilde{T}} E(t)$, όπου T είναι το σύνολο των τερματικών κόμβων του δέντρου T . Τρεις είναι οι πιο γνωστές συναρτήσεις ανομοιογένειας:

1. Συνάρτηση εντροπίας:

$$\phi_e(p_1, \dots, p_J) = - \sum_{j=1}^J p_j \cdot \ln p_j$$

2. Gini index:

$$\phi_g(p_1, \dots, p_J) = \sum_{i \neq j} p_i p_j = 1 - \sum_{j=1}^J p_j^2$$

3. Twoing rule:

$$\frac{p_l p_r}{4} \left[\sum_j p_j(t_l) p_j(t_r) \right]^2$$

Όσον αφορά τον Twoing rule, τα $p_j(t_l)$ και $p_j(t_r)$ είναι οι πιθανότητες ένα δείγμα να ανήκει στην κλάση j , δοθέντος ότι τα δεδομένα προέρχονται από τον αριστερό και τον δεξιό θυγατρικό κόμβο, αντίστοιχα, και p_l και p_r είναι τα ποσοστά των δειγμάτων που διακλαδίζονται αριστερά και δεξιά αντίστοιχα.

Επίσης, καθώς $\sum p_j = 1$, ισχύει $0 \leq p_j \leq 1 \quad \forall j$, οι συναρτήσεις είναι πάντοτε θετικές εκτός αν μία από τις πιθανότητες p_j είναι μονάδα και όλες οι άλλες μηδέν.

Επιπλέον, και οι τρεις εμφανίζουν μέγιστο όταν:

$$p_j = \frac{1}{J} \quad \forall j.$$

Δοθείσης μιας συνάρτησης ανομοιογένειας για τον υπολογισμό του κόστους ενός κόμβου, η ρουτίνα ανάπτυξης του δέντρου προσπαθεί να βρει έναν βέλτιστο τρόπο να χωρίσει τα δείγματα στον κόμβο ούτως ώστε η μείωση του κόστους να είναι μέγιστη. Για δυαδικό δέντρο, η αλλαγή στην ομοιογένεια λόγω της διάσπασης είναι

$$\Delta E(s, t) = E(t) - p_l E(t_l) - p_r E(t_r),$$

όπου t είναι ο κόμβος που διασπάται, $E(t)$ είναι η ομοιογένειά του, $E(t_l)$ και $E(t_r)$ είναι οι συναρτήσεις ανομοιογένειας του αριστερού και δεξιού θυγατρικού κόμβου και τέλος p_l και p_r τα ποσοστά των δειγμάτων που διακλαδίζονται αριστερά και δεξιά αντίστοιχα. Χρησιμοποιώντας συμβολική αναπαράσταση, θα μπορούσαμε να πούμε ότι η ρουτίνα ανάπτυξης του δέντρου προσπαθεί να βρει ένα σημείο διάσπασης για τον κόμβο t τέτοιο που η διάσπαση να επιφέρει τη μέγιστη μείωση στη συνάρτηση ανομοιογένειας.

3.10.4.4 *Κλάδεμα του δέντρου*

Το δέντρο που παράγει η προηγούμενη διαδικασία είναι συχνά πολύ μεγάλο και «προκατειλημένο» στα δεδομένα εκπαίδευσης. Έτσι, εμφανίζει έναν απαράδεκτα υψηλό βαθμό ακρίβειας στο να δίνει τις αναμενόμενες εξόδους από τα δεδομένα εκπαίδευσης. Με άλλα λόγια, ίσως αντιμετωπίσουμε το γνωστό πρόβλημα της υπερεκπαίδευσης και της υπερεξειδίκευσης στα δεδομένα εκπαίδευσης και το δέντρο δεν θα γενικεύει καλά σε νέα, άγνωστα δεδομένα. Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι για την εύρεση του μεγέθους του δέντρου που δίνει την καλύτερη εκτίμηση του πραγματικού μέτρου του λάθους. Μία από τις πιο αποτελεσματικές βασίζεται στην αρχή της ελαχιστοποίησης του συνδυασμού **κόστους-πολυπλοκότητας (minimum cost-complexity)** ή αλλιώς αφαίρεση του πιο αδύναμου υποδέντρου. Το πρώτο βήμα είναι να μεγαλώσουμε ένα πλήρως ανεπτυγμένο δέντρο $T_{\max}$ που έχει ένα αρκετά χαμηλό μέτρο λάθους όσον αφορά τα δεδομένα εκπαίδευσης. Όμως, ένα τέτοιο δέντρο είναι πολύ μεγάλο και θέλουμε να το κλαδέψουμε προς τα πίσω με κάποιο συνεπή τρόπο, βρίσκοντας το πιο αδύναμο υποδέντρο του. Αυτό μπορεί να βρεθεί αν πάρουμε τόσο την τιμή του σφάλματος εκπαίδευσης όσο και τον αριθμό των τερματικών κόμβων, που θεωρούνται ένα μέτρο της πολυπλοκότητας του δέντρου.

3.11 ΚΑΜΠΥΛΕΣ ROC

Η σύλληψη των καμπύλων ROC (Receiver Operating Characteristic: Λειτουργικό Χαρακτηριστικό Δέκτη) έχει τις ρίζες τις στις αρχές της δεκαετίας του 1950 όταν προτάθηκαν από τους μεταπτυχιακούς φοιτητές WW Peterson και TG Birdsall του Τμήματος Ηλεκτρολόγων Μηχανικών του Πανεπιστημίου του Michigan, οι οποίοι εφάρμοσαν τη στατιστική θεωρία αποφάσεων σε προβλήματα της θεωρίας λήψης σημάτων (signal detection theory). Οι καμπύλες ROC προτάθηκαν αρχικά ως γραφική μέθοδος μέτρησης της ποιότητας λήψης σήματος από ένα δέκτη σε ατελή διαγνωστικά συστήματα. Συγκεκριμένα, όταν για ένα δέκτη οι κατανομές του εξωτερικού θορύβου και του σήματος (στόχου της λήψης) συμπίπτουν σε κάποιο διάστημα (και έστω ότι χωρίς βλάβη της γενικότητας οι μετρήσεις σήματος έχουν υψηλότερες μετρήσεις γενικά από αυτές του θορύβου), η καμπύλη ROC που αντιστοιχεί δείχνει τη συμμεταβολή των ποσοστών 'ορθής λήψης σήματος' από τις πραγματικές μετρήσεις σήματος και 'εσφαλμένου συναγερμού' από τις πραγματικές μετρήσεις θορύβου, συναρτήσει του σημείου απόφασης – δηλαδή της μέτρησης με βάση την οποία ο δέκτης θεωρεί ότι κάθε άλλη μέτρηση μεγαλύτερη αυτής αποτελεί σήμα.

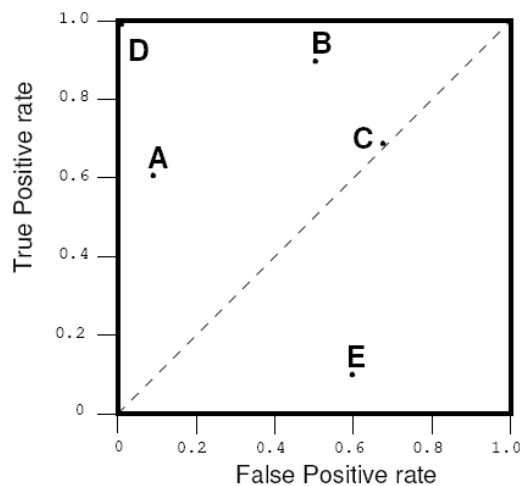
Ένα ROC γράφημα αποτελεί χρήσιμη τεχνική για την οργάνωση, επιλογή και απεικόνιση ταξινομητών με βάση τη γραφική τους παράσταση. Η ROC ανάλυση έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στην απεικόνιση και ανάλυση της συμπεριφοράς διαγνωστικών συστημάτων. Η ιατρική κοινότητα λήψης αποφάσεων έχει ένα μακρύ ιστορικό πάνω στη χρήση των ROC γραφημάτων στους διαγνωστικούς της ελέγχους. Οι Swets, Dawes και Monahan πρόσφατα έφεραν τις ROC καμπύλες στην προσοχή του κοινού με το άρθρο τους *Scientific American*.

Ένας από τους πρώτους που υιοθέτησαν τα ROC γραφήματα στην μηχανική μάθηση ήταν ο Spackman (1989), ο οποίος ανέδειξε την αξία των ROC καμπυλών στην αξιολόγηση και σύγκριση αλγορίθμων. Τα τελευταία χρόνια έχει παρατηρηθεί μία άνοδος στη χρήση των ROC γραφημάτων στην κοινότητα μηχανικής εκμάθησης. Δεν αποτελούν όμως μόνο μία χρήσιμη μέθοδο αναπαράστασης γραφημάτων, αλλά έχουν και ιδιότητες που τις καθιστούν ιδιαίτερα χρήσιμες σε τομείς με ασύμμετρες κατανομές και άνισα ταξινομημένα σφάλματα.

Τα περισσότερα βιβλία εξόρυξης δεδομένων και μηχανικής εκμάθησης αν δεν αναφέρουν καθόλου τις ROC καμπύλες, θα έχουν μόνο μία σύντομη περιγραφή της τεχνικής. Οι ROC καμπύλες είναι εννοιολογικά απλές αλλά υπάρχουν κάποιες, όχι και τόσο εμφανείς περιπλοκές που εμφανίζονται όταν αυτές οι καμπύλες χρησιμοποιούνται στην έρευνα. Υπάρχουν επίσης συχνές παρανοήσεις και παγίδες όταν αυτές χρησιμοποιούνται στην πράξη.

3.11.1 Για ταξινομητές με δύο κατηγορίες

Τα ROC γραφήματα είναι γραφήματα δύο διαστάσεων στα οποία το TPR σχεδιάζεται στον Υ-άξονα και το FPR στον Χ-άξονα (ή με διαφορετικά λόγια Sensitivity με 1-Specificity). Επιπλέον η ROC καμπύλη απεικονίζει τη συμμεταβολή του οφέλους (από το ποσοστό των αληθώς θετικών μετρήσεων) και του κόστους (από το ποσοστό των ψευδώς θετικών μετρήσεων). Η Εικόνα 1 δείχνει ένα ενδεικτικό ROC γράφημα.



Εικόνα 1: Ένα ενδεικτικό ROC γράφημα

Κάποια σημεία πάνω στον ROC χώρο παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Αρχικά το χαμηλότερο σημείο από τα αριστερά, το (0,0) αντιπροσωπεύει την στρατηγική του να μην εκδίδεται ποτέ μία θετική ταξινόμηση. Αυτό σημαίνει ότι στην περίπτωση αυτή ένας ταξινομητής δεν παράγει ούτε ψευδώς θετικά αποτελέσματα, αλλά ούτε και αληθώς θετικά. Η αντίθετη περίπτωση, κατά την οποία, ανεξαρτήτως συνθηκών παράγονται μόνο θετικές ταξινομήσεις, αντιπροσωπεύεται από το ανώτερο από τα δεξιά σημείο, (1,1).

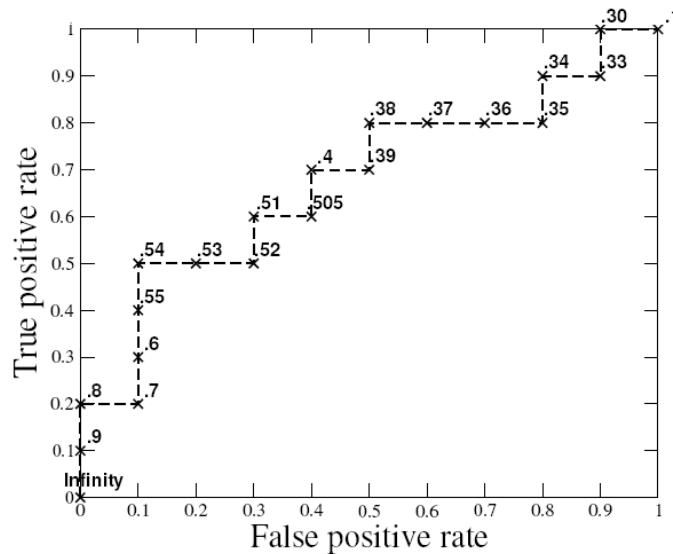
Το σημείο D(0,1) αντιπροσωπεύει την τέλεια ταξινόμηση. Ανεπίσημα, ένα σημείο στον ROC χώρο είναι καλύτερο από ένα άλλο, εφόσον βρίσκεται περισσότερο βορειοδυτικά από εκείνο, πράγμα που σημαίνει ότι :PR χαμηλότερο, TPR υψηλότερο ή και τα δύο. Οι ταξινομητές που εμφανίζονται στην αριστερή πλευρά του ROC γραφήματος, κοντά στον άξονα των Χ, μπορούν να θεωρηθούν πιο συντηρητικοί, καθώς αυτοί πραγματοποιούν θετικές ταξινομήσεις μόνο όταν διαθέτουν ισχυρές ενδείξεις. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να δίνουν λίγα ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Παράλληλα, η τακτική αυτή έχει ως συνέπεια ένα χαμηλό TPR, δηλαδή περιορισμένο αριθμό αληθώς θετικών αποτελεσμάτων. Από την άλλη πλευρά, οι ταξινομητές που βρίσκονται στην άνω δεξιά πλευρά του ROC γραφήματος μπορούν να θεωρηθούν πιο φιλελεύθεροι. Αυτοί πραγματοποιούν θετικές ταξινομήσεις με ασθενέστερα στοιχεία με αποτέλεσμα να ταξινομούν σχεδόν όλα τα θετικά περιστατικά σωστά, αλλά συγχρόνως έχουν και υψηλό ποσοστό ψευδώς θετικών ταξινομήσεων. Στην Εικόνα 1, το σημείο Α είναι περισσότερο συντηρητικό από το Β. Επειδή σε πολλούς τομείς στον πραγματικό κόσμο

επικρατούν μεγάλοι αριθμοί αρνητικών περιστατικών, η περιοχή της αριστερής πλευράς του ROC γραφήματος παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον.

3.11.2 Για μη-διαδικούς ταξινομητές

Πολλοί ταξινομητές, όπως δέντρα απόφασης ή σύνολα κανόνων, είναι σχεδιασμένοι έτσι ώστε να παράγουν μία μόνο απόφαση κλάσης, για παράδειγμα ένα Υ(Yes) ή Ν(No) για την κάθε περίπτωση. Όταν ένας τέτοιος διακριτός ταξινομητής εφαρμόζεται σε ένα σύνολο δεδομένων ενός test, δίνει ένα πίνακα ενδεχομένων ο οποίος με τη σειρά του αντιστοιχεί σε ένα μόνο ROC σημείο. Έτσι, ένας διακριτός ταξινομητής παράγει ένα μόνο σημείο στον ROC χώρο. Κάποιοι ταξινομητές, όπως ο ταξινομητής Bayes ή ένα νευρωνικό δίκτυο, δίνουν ένα περιστατικό πιθανότητας ή ένα σκορ ή μία αριθμητική τιμή που αντιπροσωπεύει το βαθμό κατά τον οποίο ένα περιστατικό αποτελεί μέλος μιας κλάσης. Τέτοιες τιμές μπορεί να είναι αυστηρές πιθανότητες, κατά την οποία περίπτωση αυτές προσκολλώνται σε σταθερά θεωρήματα πιθανότητας. Επίσης οι τιμές αυτές θα μπορούσαν να είναι γενικά, μη βαθμονομημένα σκορ, κατά την οποία περίπτωση η μόνη ιδιότητα που διατηρούν είναι ότι ένα υψηλότερο σκορ υποδηλώνει μία μεγαλύτερη πιθανότητα. Εμείς θα επικαλεστούμε έναν πιθανολογικό ταξινομητή παρά το γεγονός ότι το αποτέλεσμα πιθανόν να μην είναι μία κατάλληλη πιθανότητα.

Ένας τέτοιος βαθμιδωτός ταξινομητής μπορεί να χρησιμοποιηθεί με ένα όριο, γνωστό και ως σημείο απόφασης, ώστε να παράγει ένα διακριτό (δυαδικό) ταξινομητή. Αν το αποτέλεσμα του ταξινομητή είναι πάνω από το όριο αυτό, ο ταξινομητής δίνει σαν αποτέλεσμα ένα Υ, διαφορετικά δίνει ένα Ν. Κάθε τιμή ορίου δίνει και ένα διαφορετικό σημείο πάνω στον ROC χώρο. Επομένως, εμείς μπορούμε να φανταστούμε ένα τέτοιο όριο-σημείο απόφασης να κυμαίνεται από το $-\infty$ έως το $+\infty$ και να σχηματίζει έτσι μία καμπύλη στον ROC χώρο. Υπολογιστικά αυτός είναι ένας φτηνός τρόπος παραγωγής μιας ROC καμπύλης και παρακάτω θα περιγραφεί μία πιο αποτελεσματική και προσεκτική μέθοδος. Η Εικόνα 2 δείχνει ένα παράδειγμα μιας ROC καμπύλης από ένα σύνολο είκοσι περιστατικών ενός test.



Εικόνα 2: Ένα ενδεικτικό ROC γράφημα για μη-διαδικό ταξινομητή

Κάθε ROC καμπύλη η οποία προέρχεται από ένα πεπερασμένο σύνολο περιστατικών είναι στην πραγματικότητα μία συνάρτηση βήματος, η οποία προσεγγίζει μία πραγματική καμπύλη καθώς ο αριθμός των περιστατικών πλησιάζει το άπειρο. Η συνάρτηση βήματος στην Εικόνα 2 έχει προκύψει από ένα πολύ μικρό σύνολο περιστατικών και έτσι η προέλευση του κάθε σημείου μπορεί να γίνει εύκολα αντιληπτή. Στον πίνακα της Εικόνας 2 τα περιστατικά ταξινομούνται με βάση το σκορ τους και κάθε σημείο στο ROC γράφημα φέρει την τιμή του ορίου-σημείου απόφασης από το οποίο προέκυψε το σημείο αυτό. Το όριο $+\infty$ παράγει το σημείο (0,0). Καθώς εμείς κατεβάζουμε το όριο στο 0.9 το πρώτο θετικό περιστατικό ταξινομείται ως θετικό δίνοντας το σημείο (0,0.1). Καθώς το όριο περιορίζεται ακόμα, η καμπύλη σκαρφαλώνει προς τα πάνω και δεξιά καταλήγοντας στο σημείο (1,1) με μία τιμή ορίου 0.1. Αξίζει να σημειωθεί εδώ ότι, καθώς ρίχνουμε την τιμή του ορίου πιο χαμηλά αυτό αντιστοιχεί με μετακίνηση από τις πιο συντηρητικές περιοχές του γραφήματος στις περισσότερες φιλελεύθερες.

Αν και το σύνολο δεδομένων του τεστ είναι πολύ μικρό, είναι δυνατόν να γίνουν κάποιες δοκιμαστικές παρατηρήσεις για τον ταξινομητή. Αυτός εμφανίζεται να συμπεριφέρεται καλύτερα στην πιο συντηρητική περιοχή του γραφήματος. Το ROCσημείο (0.1,0.5) δίνει την μεγαλύτερη ακρίβεια (70%). Αυτό σημαίνει ότι ο ταξινομητής είναι καλύτερος στο να αναγνωρίζει πιθανά θετικά περιστατικά από ότι πιθανά αρνητικά περιστατικά. Αξίζει να σημειωθεί επίσης ότι η καλύτερη ακρίβεια του ταξινομητή επιτυγχάνεται στο σημείο απόφασης 0.54, αντί του 0.5 που ίσως να αναμέναμε (το οποίο αποδίδει 60%). Παρακάτω αναλύεται το φαινόμενο αυτό.

Σε περίπτωση σύγκρισης δύο ταξινομητών μας ενδιαφέρει συνήθως αυτός που έχει το μεγαλύτερο εμβαδόν κάτω από την καμπύλη.

4 ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4.1 ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1.1 Δείγμα πληθυσμού

Στην παρούσα μελέτη εντάχθηκαν 1625 περιπτώσεις γυναικών με μέση ηλικία τα $(34,3 \pm 11,9)$ έτη, στο ηλικιακό φάσμα μεταξύ 18 και 65 ετών. Το δείγμα αφορούσε γυναίκες, οι οποίες προσήλθαν στα ιατρεία κολποσκοπήσης της Γ΄ Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Αθηνών και της Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Η μελέτη εγκρίθηκε από τις επιτροπές ηθικής και δεοντολογίας των νοσοκομείων που συμμετείχαν και οι γυναίκες υπέγραψαν φόρμες συγκατάθεσης μετά από ενημέρωση (Informed Consent Form ICON) για τη συμμετοχή τους στο ερευνητικό πρωτόκολλο καθώς επίσης και για να επιτραπεί η χρήση των επιδημιολογικών και ιατρικών δεδομένων.

Βάσει του πρωτοκόλλου, οι συμμετέχουσες αρχικά υποβλήθηκαν σε κυτταρολογική εξέταση με τεστ Παπανικολάου. Ακουλούθησε η άμεση επισκόπηση του τραχήλου με τη χρήση κολποσκοπίου σε κάθε περίπτωση και σημειωνόταν η παρουσία ορατής παθολογίας στον τράχηλο της συμμετέχουσας ως κλινική πληροφορία.

Στην κολποσκοπική εξέταση ελήφθησαν κολποσκοπικά κατευθυνόμενες βιοψίες εάν:

1. Υπήρχε ορατή αλλοίωση.
2. Τυχαίες βιοψίες επί διάγνωσης ASCUS+ ακόμα και χωρίς ορατή αλλοίωση.
3. Επί θετικού αποτελέσματος οποιασδήποτε από τις μοριακές τεχνικές.

Η επεξεργασία του επιχρίσματος του τραχήλου της μήτρας, που ελήφθη από τις γυναίκες του πληθυσμού έρευνας, η προετοιμασία του πλακιδίου και η διάγνωσή του, καθώς και η εφαρμογή και ανάλυση των μοριακών τεχνικών έγινε στο Εργαστήριο Διαγνωστικής Κυτταρολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών στο Π.Γ.Ν. «ΑΤΤΙΚΟΝ».

Η επεξεργασία και διάγνωση των πλακιδίων από τα βιοπτικά υλικά που ελήφθησαν από τον τράχηλο των γυναικών με τη μέθοδο της κολποσκοπικά κατευθυνόμενης βιοψίας, έγινε στο Β΄ Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής του Πανεπιστημίου Αθηνών στο Π.Γ.Ν. «ΑΤΤΙΚΟΝ».

Η λήψη του επιχρίσματος από τον τράχηλο της μήτρας, η κολποσκοπήση των γυναικών και η λήψη βιοψιών που συμμετείχαν στον πληθυσμό της έρευνας πραγματοποιήθηκαν στα ιατρεία κολποσκοπήσης της Γ΄ Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Αθηνών στο «ΑΤΤΙΚΟΝ» Νοσοκομείο και της Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων.

Η κολποσκόπηση εφαρμόστηκε για τον ανατομικό καθορισμό της επιθηλιακής βλάβης, και την αρχική εκτίμηση της σοβαρότητας αυτής και τη λήψη βιοψιών [3].

Σε καμία περίπτωση δεν ακολουθήθηκε η άμεση θεραπευτική προσέγγιση, χωρίς να προηγηθεί η ιστολογική επιβεβαίωση της παρουσίας αλλοίωσης από το βιοπτικό υλικό.

4.1.2 Μέθοδοι

Για τις ανάγκες της μελέτης αξιοποιήθηκαν πέντε συνιστώσες:

- Αποτέλεσμα Κυτταρολογικής εξέτασης.
- Αποτελέσματα επικουρικών τεχνικών (βιοδείκτες).
- Βασικά επιδημιολογικά στοιχεία των γυναικών.
- Αποτέλεσμα της ιστολογικής εξέτασης ως εξέταση αναφοράς.
- Δέντρα ταξινόμησης.
- Στατιστικές τεχνικές ανάλυσης των αποτελεσμάτων και καμπύλες ROC.

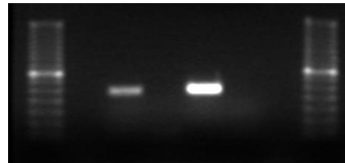
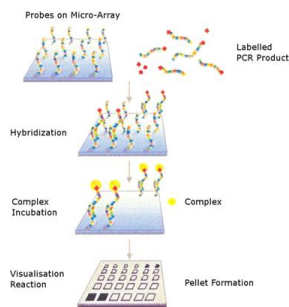
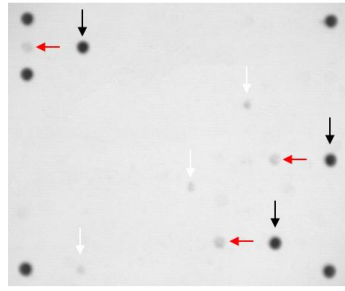
4.1.2.1 Κυτταρολογική εξέταση

Η κυτταρολογική εξέταση καθώς και οι επικουρικές τεχνικές που εφαρμόστηκαν βασίστηκαν σε υλικό κυτταρολογίας υγρής φάσης (ThinPrep Liquid Based Cytology (LBC)) και το υλικό λαμβάνονταν πριν από την κολποσκοπική εξέταση. Σε πρώτη φάση παρασκευάστηκαν τα πλακίδια για τον έλεγχο κατά Παπανικολάου σύμφωνα με τις τυποποιημένες διαδικασίες του εργαστηρίου και το εναπομείναν υλικό στο μπουκαλάκι του ThinPrep χρησιμοποιήθηκε για την εξαγωγή βιοδεικτών που σχετίζονται με τον κύκλο ζωής του HPV. Το αποτέλεσμα της κυτταρολογικής εξέτασης εκφράστηκε σύμφωνα με το σύστημα ταξινόμησης Bethesda (TBS2001 system) [155, 156].

4.1.2.2 Βιοδείκτες

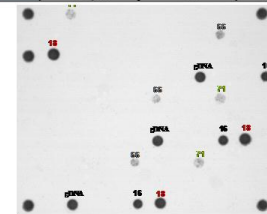
Όσον αφορά στους βιοδείκτες που σχετίζονται με τον κύκλο ζωής του HPV μετρήθηκαν τα ακόλουθα: **α)** HPV DNA με το kit CLART® HUMAN PAPILLOMAVIRUS 2 (GENOMICA) που επιτρέπει την ταυτόχρονη ανίχνευση 35 υποτύπων με τεχνική PCR θραυσμάτων την περιοχής L1 του ιού [157] **β)** NASBA assays [158] (NucliSENS EasyQ® HPV v1.0) για την ανίχνευση του E6/E7 mRNA του HPV για τους υπότυπους: 16, 18, 31, 33 και 45 **γ)** το kit PermiFlow® (Invirion Diagnostics, LLC, Oak Brook, IL) για την ανίχνευση της έκφρασης E6/E7 mRNA των υποτύπων υψηλού κινδύνου του HPV με τεχνική κυτταρομετρίας ροής [159] και **δ)** η ανοσοκυταροχημική έκφραση της πρωτεΐνης p16 με το κυτταρολογικό kit CINtec® [160].

HPV Clinical Arrays

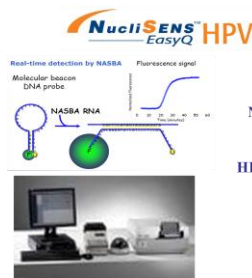


Genomic DNA control (white arrows),
HPV type 51 (red arrows)
HPV type 53 (black arrows).

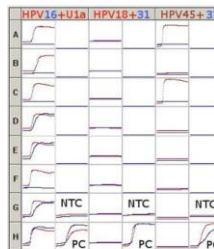
HPV GENOTYPE	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity	PPV	NPV
6	93.75	100	100	99.54
11	100.00	100	100	100.00
16	100.00	100	100	100.00
18	100.00	100	100	100.00
26	100.00	100	100	100.00
31	100.00	100	100	100.00
33	100.00	100	100	100.00
35	100.00	100	100	100.00
39	100.00	100	100	100.00
40	100.00	100	100	100.00
42	100.00	100	100	100.00
43	100.00	100	100	100.00
44	100.00	100	100	100.00
45	100.00	100	100	100.00
51	100.00	100	100	100.00
52	100.00	100	100	100.00
53	96.67	100	100	99.50
54	100.00	100	100	100.00
56	100.00	100	100	100.00
58	95.00	100	100	99.53
59	100.00	100	100	100.00
61	100.00	100	100	100.00
62	91.67	100	100	99.55
66	100.00	100	100	100.00
68	100.00	100	100	100.00
70	100.00	100	100	100.00
71	100.00	100	100	100.00
72	100.00	100	100	100.00
73	100.00	100	100	100.00
81	100.00	100	100	100.00
82	100.00	100	100	100.00
83	100.00	100	100	100.00
84	92.31	100	100	99.54
85	—	100	—	100.00
89	100.00	100	100	100.00



Εικόνα 3: Η τεχνική CLART test

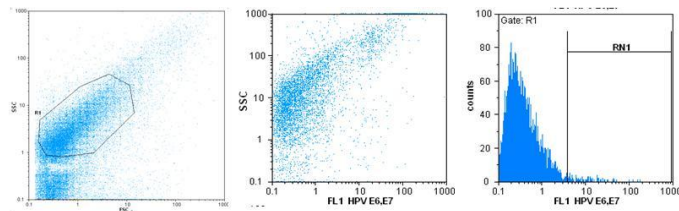


10ml initial ThinPrep
Nucleic acid extraction (DNA+RNA)
Amplification of E6/E7 mRNA of
HPV 16, 18, 31, 33 and 45 with NASBA
Fluorescence detection
(Nuclisens EasyQ)

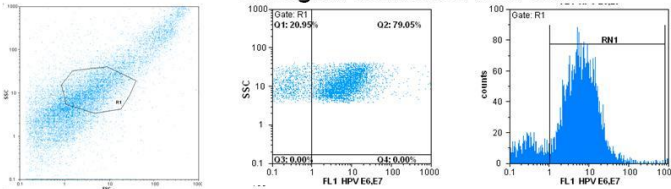


HPV16/18/31/45									
Results									
Ref	Sample	Validity	Result	Intensity	Ref	Sample	Validity	Result	Intensity
A1	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A2	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A3	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A4	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A5	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A6	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A7	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A8	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A9	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A10	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A11	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A12	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A13	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A14	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A15	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A16	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A17	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A18	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A19	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A20	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A21	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A22	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A23	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A24	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A25	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A26	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A27	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A28	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A29	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A30	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A31	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A32	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A33	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A34	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A35	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A36	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A37	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A38	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A39	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A40	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A41	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A42	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A43	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A44	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A45	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A46	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A47	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A48	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A49	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A50	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A51	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A52	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A53	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A54	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A55	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A56	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A57	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A58	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A59	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A60	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A61	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A62	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A63	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A64	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A65	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A66	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A67	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A68	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A69	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A70	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A71	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A72	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A73	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A74	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A75	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A76	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A77	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A78	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A79	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A80	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A81	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A82	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A83	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A84	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A85	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A86	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A87	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A88	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A89	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A90	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A91	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A92	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A93	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A94	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A95	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A96	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A97	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A98	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A99	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000
A100	100	Valid	100	10000	100	100	Valid	100	10000

Εικόνα 4: Η τεχνική NASBA

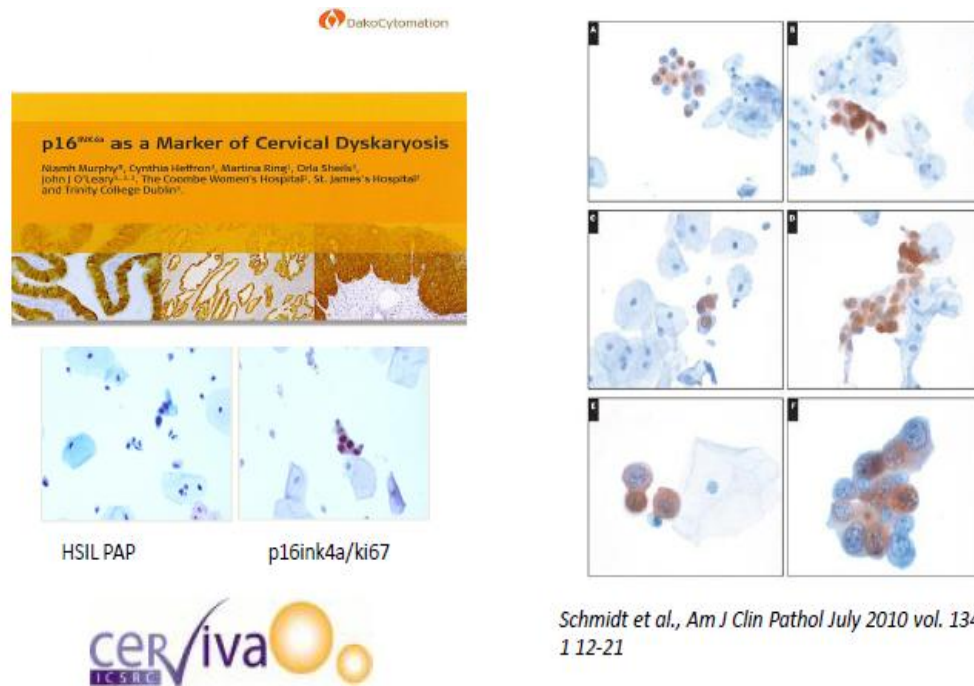


WNL sample displaying under 2% positive cells (cut-off set at 5%).
R1 region defines cervical cells.



HgSIL sample displaying over 74% positive cells (cut-off set at 5%).
R1 region defines cervical cells.

Εικόνα 5: Η τεχνική κυτταρομέτρίας ροής



Εικόνα 6: Η τεχνική CINTek για την ανίχνευση της p16

4.1.2.3 **Επιδημιολογικά δεδομένα**

Εκτός από τα ιατρικά δεδομένα χρησιμοποιήθηκαν και επιδημιολογικά χαρακτηριστικά και πιο συγκεκριμένα η ηλικία της γυναίκας και αν έχει γεννήσει.

4.1.2.4 **Ιστολογική εξέταση**

Το ιστολογικό υλικό (σε όσα περιστατικά ήταν διαθέσιμο) ελήφθη κατά τη διάρκεια της κολποσκόπησης ή κατά τη θεραπεία με κωνοειδή εκτομή. Τα υλικά αυτά προετοιμάστηκαν σύμφωνα με τις τυποποιημένες ιστολογικές διαδικασίες και πρωτόκολλα.

Ως αποτέλεσμα αναφοράς (golden standard) χρησιμοποιήθηκε η ιστολογική απάντηση και ήταν και ο στόχος που προσπαθήσαμε να κατατάξουμε κάθε ένα περιστατικό. Οι βιοψίες punch ελήφθησαν από έμπειρους κολποσκόπους (με εμπειρία άνω των 10 ετών). Η ιστολογική απάντηση τυποποιήθηκε κατά το κλιμακωτό σύστημα Cervical Intraepithelial Neoplasia (CIN). Επιπλέον στη μελέτη συμπεριλάβαμε κλινικώς αρνητικά περιστατικά (Clinically negative - CN). Ως τέτοια ορίστηκαν περιστατικά που είχαν αρνητικά κυτταρολογικά αποτελέσματα, αρνητική κολποσκόπηση και αρνητικό HPV τεστ (για όλους τους υπότυπους του HPV). Παρότι δεν υπήρχε για αυτά τα περιστατικά η ιστολογική απάντηση για προφανείς ηθικούς λόγους, τα στοιχεία αυτών των γυναικών συμπεριελήφθησαν στη μελέτη αυτή με κατηγορία στόχο μικρότερη του CIN2.

4.1.2.5 **Δέντρα ταξινόμησης**

Για την εκπαίδευση του δέντρου ταξινόμησης χρησιμοποιήθηκε η πλατφόρμα IBM SPSS Statistics 19 for Windows (SPSS Inc., Chicago, USA).

4.1.2.6 **Μέθοδος αξιολόγησης**

Προκειμένου να αξιολογηθεί η απόδοση της τεχνικής χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές τεχνικές:

1. Εξήχθησαν διάφορες στατιστικές ποσότητες όπως: ειδικότητα (specificity), ευαισθησία (sensitivity), προγνωστική αξία θετικού και αρνητικού αποτελέσματος (positive and negative predictive value (PPV and NPV)), λόγος ψευδώς θετικών και αρνητικών αποτελεσμάτων (false positive and false negative rates (FPR and NPR)), καθώς και η συνολική ακρίβεια (overall accuracy - OA). Οι στατιστικές αυτές ποσότητες υπολογίστηκαν με συναρτήσεις που υλοποιήθηκαν στο περιβάλλον του Microsoft Excel 2007®. Οι ποσότητες συγκρίθηκαν με τεχνική χ^2 , ώστε να βρεθεί και να αιτιολογηθεί ποια είναι η βέλτιστη.

2. Παρήχθησαν οι καμπύλες ROC για διαφορετικές εναλλακτικές μεθόδους.

4.1.2.7 Συλλογή δεδομένων

Η συλλογή και η αποθήκευση των αποτελεσμάτων έγινε στο Εργαστήριο Διαγνωστικής Κυτταρολογίας σε βάση δεδομένων Microsoft Access 2007®, (Microsoft, Η.Π.Α.). Τα δεδομένα εξάχθηκαν σε αρχείο Microsoft Excel 2007®, το οποίο είναι εύκολο να εισαχθεί στο SPSS για τη στατιστική επεξεργασία.

Εικόνα 7: Εικόνες από της βάση δεδομένων που χρησιμοποιήθηκε για την καταγραφή των στοιχείων

4.1.3 Ελλιπή δεδομένα

Σε ένα κυτταρολογικό εργαστήριο είναι σύνηθες μια επικουρική τεχνική, αλλά ακόμα και η εξέταση κατά Παπανικολάου να δώσουν αποτελέσματα τα οποία δεν είναι χρήσιμα ή ακόμα και το εναπομείναν βιολογικό υλικό στο φιαλίδιο να μην είναι επαρκές για την ολοκλήρωση επιπλέον εξετάσεων. Συνεπώς, δεν είναι εγγυημένο πως θα υπάρχουν δεδομένα για όλες τις γυναίκες που συμμετέχουν στη μελέτη. Επιπλέον, λεπτομέρειες σχετικά με προηγούμενες εγκυμοσύνες δεν θεωρούνται σημαντικές και συχνά δεν απαντώνται στα παραπεμπτικά.

4.1.4 Στόχος ταξινόμησης και στοιχεία που αξιοποιήθηκαν

Ο στόχος μας ήταν να ταξινομήσουμε τις γυναίκες σε μία από τις ακόλουθες κατηγορίες: α) $< \text{CIN}2$, περιλαμβάνει τα ιστολογικά αρνητικά, τα ιστολογικά CIN-1 περιστατικά καθώς και τα κλινικώς αρνητικά (CN) και β) $\geq \text{CIN}2$, σε αυτή την κατηγορία συμπεριλαμβάνονται οι ιστολογικές κατηγορίες: CIN-2, CIN-3, SCC και ADENO-CA.

Για κάθε γυναίκα δημιουργήθηκε ένα διάνυσμα με 50 συνιστώσες (Πίνακας 4), το οποίο συμπεριελάμβανε το αποτέλεσμα της κυτταρολογικής εξέτασης, σύμφωνα με την τυποποίηση κατά Bethesda, αποτελέσματα του HPV DNA test για κάθε έναν από τους 35 διαφορετικούς υπότυπους (είτε ως θετικό είτε ως αρνητικό); ως μία ξεχωριστή συνιστώσα για κάθε HPV DNA γενότυπο. Επιπλέον, κατασκευάστηκαν 5 ακόμα μεταβλητές: ύπαρξη υπότυπου υψηλού κινδύνου, ύπαρξη υπότυπου χαμηλού κινδύνου, ύπαρξη οποιουδήποτε υπότυπου και το πλήθος των υποτύπων χαμηλού ή υψηλού κινδύνου. Για την εξέταση NASBA HPV mRNA typing χρησιμοποιήθηκε το αποτέλεσμα για κάθε έναν ξεχωριστά υπότυπο (16, 18, 31, 33 και 45). Το αποτέλεσμα της κυτταρομετρίας ροής αξιοποιήθηκε με δύο μεταβλητές, σαν ποσοστό και σαν θετικό ή αρνητικό αποτέλεσμα (το κατώφλι που χρησιμοποιήθηκε ήταν το ποσοστό 1.5%). Επιπλέον χρησιμοποιήθηκε το αποτέλεσμα της ανοσοκυτταροχημικής εξέτασης για p16, το οποίο εκφράστηκε ως θετικό ή αρνητικό. Τέλος, χρησιμοποιήθηκαν δύο ακόμα μεταβλητές: ηλικία της γυναίκας κατά τη διάρκεια της εξέτασης και πληροφορίες για κύσεις (θετικό αν υπήρξε έστω και μία κύηση, αλλιώς αρνητικό). Για όσες μεταβλητές δεν υπήρξαν στοιχεία το αποτέλεσμα ήταν κενό ή δηλώθηκε ακατάλληλο, κάτι που είναι ενδεικτικό αποτυχίας της εξέτασης ή έλλειψης βιολογικού υλικού.

Όνομα μεταβλητής	Περιγραφή	Τιμές
Αποτέλεσμα κυτταρολογικής απάντησης (CYTOLOGY)	Το αποτέλεσμα της κυτταρολογικής εξέτασης εκφρασμένο κατά Bethesda 2009	WNL, ASC-US, LGSIL, ASC-H, HGSIL, SCC, ADENO CA, <κενό> αν δεν υπάρχει αποτέλεσμα
Αποτέλεσμα HPV DNA Arrays: A6, A11, A16, A18, A26, A31, A33, A35, A39, A40, A42, A43, A44, A45, A51, A52, A53, A54, A56, A58, A59, A61, A62, A66, A68, A70, A71, A72, A73, A81, A82, A83, A84, A85, A89	Για κάθε υπότυπο που ελέγχθηκε η ύπαρξη DNA σύμφωνα με την εξέταση μικροσυστοιχιών	0 αν δεν υπάρχει ο συγκεκριμένος υπότυπος 1 αν εντοπίστηκε <κενό> αν δεν υπάρχει αποτέλεσμα
Ύπαρξη υποτύπων υψηλού κινδύνου (Has HR)	Θετικό αν βρέθηκε έστω και ένας υπότυπος υψηλού κινδύνου	POSITIVE, NEGATIVE ή MISSING
Ύπαρξη υποτύπων χαμηλού κινδύνου (Has LR)	Θετικό αν βρέθηκε έστω και ένας υπότυπος χαμηλού κινδύνου	POSITIVE, NEGATIVE ή MISSING
Ύπαρξη οιονδήποτε υποτύπων (Has AnyType)	Θετικό αν βρέθηκε έστω και ένας υπότυπος ανεξαρτήτως τύπου	POSITIVE, NEGATIVE ή MISSING
Πλήθος υποτύπων υψηλού κινδύνου που ανιχνεύθηκαν (No HR)	Το πλήθος των υποτύπων υψηλού κινδύνου που ανιχνεύθηκαν	Ως ακέραιος ή MISSING
Πλήθος υποτύπων χαμηλού κινδύνου που ανιχνεύθηκαν (No LR)	Το πλήθος των υποτύπων χαμηλού κινδύνου που ανιχνεύθηκαν	Ως ακέραιος ή MISSING
Αποτέλεσμα εξέτασης NASBA για τους πέντε υπότυπους (N16, N18, N31, N33, N45)	Το αποτέλεσμα της ανίχνευσης E6/E7 mRNA για συγκεκριμένου υπότυπους του HPV	0 για αρνητικό αποτέλεσμα, 1 για θετικό, <κενό> αν δεν υπάρχει αποτέλεσμα
Αποτέλεσμα κυτταρομετρίας ροής (Flow)	Το αποτέλεσμα της ανίχνευσης E6/E7 mRNA για υπότυπους υψηλού κινδύνου με τεχνική κυτταρομετρίας ροής	0 για αρνητικό (<1.5%) 1 για θετικό (>1.5%) <κενό> αν δεν υπάρχει αποτέλεσμα
Ποσοστό κυτταρομετρίας ροής (Flow %)	Το αποτέλεσμα της ανίχνευσης E6/E7 mRNA για υπότυπους υψηλού κινδύνου με τεχνική κυτταρομετρίας ροής εκφρασμένο σαν ποσοστό	Ένας αριθμός με δεκαδικά ψηφία ή <κενό> αν δεν υπάρχει αποτέλεσμα
Αποτέλεσμα ανοσοκυταροχημικής έκφρασης (p16)	Ανίχνευση της πρωτεΐνης p16	0 για αρνητικό αποτέλεσμα, 1 για θετικό, <κενό> αν δεν υπάρχει αποτέλεσμα
Ηλικία (Age)	Η ηλικία της γυναίκας τη στιγμή της λήψης του δείγματος	Θετικός ακέραιος
Κατάσταση εγκυμοσύνης (Parous)	Πληροφορίες για εγκυμοσύνες στο παρελθόν	1 αν έχει κυήσεις 0 αν όχι

Πίνακας 4: Οι μεταβλητές που χρησιμοποιήθηκαν στη κατασκευή του δέντρου ταξινόμησης

5 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.1 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Τα αποτελέσματα βασίστηκαν στη μελέτη 1006 ιστολογικά επιβεβαιωμένων περιπτώσεων (161 αρνητικές, 510 CIN-1, 159 CIN-2, 129 CIN-3 και 47 περιστατικά με καρκίνο του τραχήλου της μήτρας (29 καρκινώματα του πλακώδους επιθηλίου (squamous cell carcinomas - SCC) και 18 αδenoκαρκινώματα (ADENO-CA)). Συμπεριελήφθησαν και 619 κλινικώς αρνητικές περιπτώσεις (CN).

Η συσχέτιση της κυτταρολογικής με την ιστολογική απάντηση και η κατανομή των περιστατικών παρουσιάζεται στον σχετικό πίνακα (Πίνακας 5). Στο υλικό που μελετήθηκε το ποσοστό των κατάλληλων αποτελεσμάτων (δηλαδή μετά από αφαίρεση των ακατάλληλων ή ανεπαρκών αποτελεσμάτων) ήταν: για την κυτταρολογική απάντηση 96.25%, για την εξέταση μικροσυστοιχιών (ARRAYS) 91.94%, για την εξέταση NASBA 67.75%, για την κυτταρομετρία ροής: 81.54% και για το p16 68.68%.

ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΟ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ

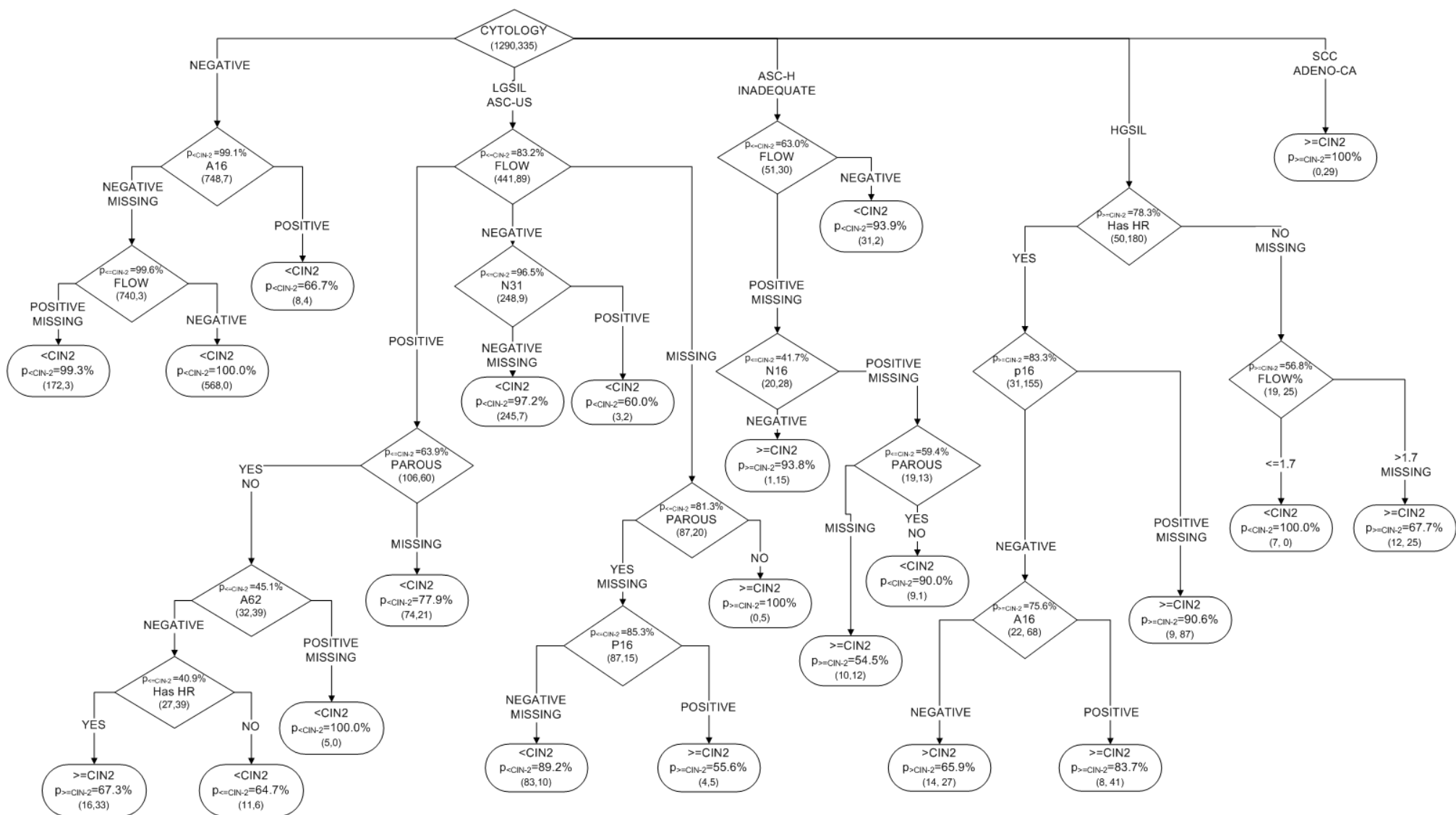
ΚΥΤΤΑΡΟΛΟΓΙΑ		N	C NEGATIVE	CIN 1	CIN 2	CIN 3	SCC	ADENO-CA	Μερικό σύνολο
	INADEQUATE	-	10	29	9	9	2	2	61
	NEGATIVE	619	62	67	5	2	-	-	755
	ASC-US	-	37	109	18	5	-	-	169
	LGSIL	-	36	259	50	15	-	1	361
	ASC-H	-	6	6	2	3	2	1	20
	HGSIL	-	10	40	75	94	9	2	230
	SCC	-	-	-	-	1	15	2	18
	ADENO-CA	-	-	-	-	-	1	10	11
	Σύνολο	619	161	510	159	129	29	18	1625

Πίνακας 5: Συσχέτιση της κυτταρολογικής με την ιστολογική απάντηση

5.2 ΤΕΛΙΚΗ ΑΡΧΙΤΕΚΤΟΝΙΚΗ ΤΟΥ ΔΕΝΤΡΟΥ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗΣ

Για τη δημιουργία του δέντρου ταξινόμησης χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος CHAID, Η αρχιτεκτονική του ήταν 20-5-10, δηλαδή κάθε κόμβος είχε πάνω από 20 διανύσματα, κάθε τερματικός κόμβος έπρεπε να έχει παραπάνω από 5 διανύσματα και το βάθος του δέντρου αφέθηκε να μεγαλώσει 10 επίπεδα. Μετά την εκπαίδευση το δέντρο απλοποιήθηκε (pruning) προκειμένου να έχει μια ευκολότερα κατανοητή μορφή (χρησιμοποιήθηκε επίπεδο σημαντικότητας 0.05), χρησιμοποιήθηκε η στατιστική χ^2 με λόγο πιθανότητας και οι τιμές των επιπέδων σημαντικότητας καθορίστηκαν με τη μέθοδο Bonferroni. Επιτράπηκε κόμβοι που συγχωνεύθηκαν να χωριστούν εκ νέου στους επόμενους κύκλους της εκπαίδευσης. Για τις μεταβλητές που έχουν συνεχόμενες τιμές (ηλικία και ποσοστό κυτταρομετρίας ροής) καθορίστηκαν αυτόματα 10 στάθμες και τέλος επιτράπηκε να γίνουν μέχρι 500 επαναλήψεις κατά τη διαδικασία εκπαίδευσης.

Η τελική μορφή/αρχιτεκτονική του δέντρου ταξινόμησης παρουσιάζεται στο Σχήμα 3. Είναι σημαντικό ότι η κυτταρολογική απάντηση είναι το κυρίαρχο χαρακτηριστικό που λαμβάνεται υπόψη, αφού είναι και το πρώτο χαρακτηριστικό που εξετάζεται. Επιπλέον στοιχεία, όπως η ηλικία και η πλειοψηφία των HPV υποτύπων, δεν βρέθηκαν σημαντικοί και για αυτό δεν συμπεριελήφθησαν στη δομή του δέντρου



Σχήμα 3: Δομή του δέντρου ταξινόμησης

5.3 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΧΡΗΣΗΣ ΚΑΙ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΔΕΝΤΡΟΥ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗΣ

Ένα παράδειγμα χρήσης του δέντρου ταξινόμησης:

- Ο χρήστης ξεκινά από τον πρώτο κόμβο και εξετάζει την τιμή ενός συγκεκριμένου χαρακτηριστικού, στην περίπτωση μας το αποτέλεσμα της κυτταρολογικής απάντησης.
- Σύμφωνα με την τιμή ο χρήστης επιλέγει τον επόμενο κατάλληλο κόμβο, στην περίπτωση μας αν έχουμε ένα ακατάλληλο αποτέλεσμα στην κυτταρολογική απάντηση, πρέπει να εξετάσουμε στη συνέχεια το αποτέλεσμα της κυτταρομετρίας ροής. Ένα αρνητικό αποτέλεσμα υποδηλώνει για το περιστατικό να είναι ιστολογικά αρνητικό με πιθανότητα ίση με 93.9%, ενώ αν δεν υπάρχει κατάλληλο αποτέλεσμα είτε υπάρχει θετική απάντηση στην κυτταρομετρία ροής τότε πρέπει να εξεταστεί η ύπαρξη του υπότυπου 16 στο mRNA test με NASBA. Σε αυτή την περίπτωση ένα αρνητικό αποτέλεσμα συνδέεται με πιθανότητα για CIN2+ ίση με 93.8% αφού οι 15 από τις 16 περιπτώσεις με αυτό το προφίλ είχαν CIN2+ ιστολογικώς.
- Κατά τη διάρκεια της κατάβασης σε χαμηλότερους κόμβους του δέντρου, ο χρήστης μπορεί να επιλέξει να μένει σε όποιον κόμβο επιθυμεί αν είναι ικανοποιημένος από το ποσοστό κινδύνου που υπάρχει, σε διαφορετική περίπτωση και προκειμένου να αυξηθεί το ποσοστό, είτε όσον αφορά στην πιθανότητα για καλοήθεια είτε για κακοήθεια θα πρέπει ο χρήστης να κατεβεί σε χαμηλότερους κόμβους και να αξιοποιήσει το αποτέλεσμα της εξέτασης που προτείνεται, προφανώς και με κάποιο ενδεχόμενο κόστος.
- Αν ο χρήστης δεν είναι ικανοποιημένος από τα ποσοστά που προτείνονται θα πρέπει να εξαντλήσει ολόκληρη τη δομή του δέντρου μέχρι να καταλήξει σε έναν τερματικό κόμβο.

Σε ένα δεύτερο παράδειγμα:

Αν υπάρχει αρνητική κυτταρολογική απάντηση, σύμφωνα με τις επιδόσεις του εργαστηρίου η πιθανότητα αυτό το περιστατικό να είναι ιστολογικά CIN2+ είναι πολύ χαμηλή (0.9%) αν όμως απαιτούνται περισσότερες εγγυήσεις, τότε μπορεί να ζητηθεί μια εξέταση HPV DNA test, ένα θετικό αποτέλεσμα για τον υπότυπο 16 μειώνει την πιθανότητα αυτή από 99.1% σε 66.7% (4 από τις 12 περιπτώσεις με αρνητική κυτταρολογία και θετικό HPV DNA στον υπότυπο 16 βρέθηκαν να είναι ιστολογικά CIN2+), ενώ ένα αρνητικό ή έστω ακατάλληλο αποτέλεσμα στο HPV 16 και σε συνδυασμό με μια αρνητική κυτταρομετρία ροής πρακτικά μας διασφαλίζει ότι η γυναίκα δεν διατρέχει κανένα κίνδυνο, αφού 568 περιπτώσεις με αυτό το προφίλ στο υλικό μας είχαν αλλοιώσεις χαμηλότερες από CIN-2, ενώ δεν βρέθηκε ούτε μία περίπτωση CIN2+.

Σε ένα τρίτο παράδειγμα:

Εξετάζουμε περιστατικά που κυτταρολογικά έχουν δοθεί σαν ASCUS ή LGSIL, αν η περεταίρω διαχείριση της γυναίκας βασιστεί μόνο στην κυτταρολογική διάγνωση, όλες αυτές οι γυναίκες θα πρέπει να παραπεμφθούν για κολποσκόπηση (συνολικά 530 γυναίκες στο υλικό μας), όμως από το πλήθος αυτών των γυναικών 441 ήταν <CIN-2 και μόνο 89 ήταν CIN2+, συνεπώς η πιθανότητα για μια γυναίκα να έχει <CIN-2 είναι 83.2%, αν υπάρχει διαθέσιμο

επιπλέον βιολογικό υλικό στο φιαλίδιο τότε σύμφωνα με το δέντρο ταξινόμησης μια εξέταση κυτταρομετρίας ροής μπορεί να βοηθήσει, συγκεκριμένα ένα αρνητικό αποτέλεσμα στο flow αυξάνει την πιθανότητα για <CIN-2 σε ποσοστό 96.5%, ενώ ένα θετικό αποτέλεσμα είναι ενδεικτικό ότι η συγκεκριμένη γυναίκα έχει περισσότερες πιθανότητες να έχει CIN-2+ (46.1% Σχήμα 3), σε αυτή την περίπτωση οι γυναίκες μπορούν να παραπεμφθούν σε κολποσκόπηση. Με αυτή την προσέγγιση θα υπάρξει μια μείωση το παραπομπών σε κολποσκόπηση κατά 257, και πιο συγκεκριμένα από 530 σε 273, συνεπώς θα υπάρχει μια μείωση του φόρτου των κολποσκοπικών ιατρείων περίπου στο ήμισυ (51.51%).

5.4 ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΟΥ ΔΕΝΤΡΟΥ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗΣ

Ο πίνακας συσχέτισης (Πίνακας 6) με τα αποτελέσματα του δέντρου ταξινόμησης δείχνει ότι το προτεινόμενο σύστημα ταξινόμησε ορθά 1216 από τις 1290 <CIN2 περιπτώσεις και 279 από τις 335 ≥CIN2 περιπτώσεις. Τα στατιστικά στοιχεία της μεθόδου είναι ευαισθησία: 83.28%, ειδικότητα: 94.26%, PPV: 79.04%, NPV: 95.60%, FPR: 5.74%, FNR: 16.72% και OA: 92.00%.

Πραγματική κατηγορία	Κατηγορία σύμφωνα με το δέντρο ταξινόμησης		Μερικό σύνολο
	< CIN 2	≥ CIN 2	
< CIN 2	1216	74	1290
≥ CIN 2	56	279	335
Σύνολο	1272	353	1625

Πίνακας 6: Αποτελέσματα του δέντρου ταξινόμησης σε συσχέτιση με την ιστολογική κατηγορία

Προκειμένου να αξιολογήσουμε την απόδοση του δέντρου ταξινόμησης σε σχέση με άλλες μεμονωμένες τεχνικές που εφαρμόστηκαν κάναμε εξαγωγή των στατιστικών απόδοσης για κάθε μία εξέταση ξεχωριστά (Πίνακας 7). Συγκεκριμένα παρουσιάζονται τα στοιχεία για το δέντρο ταξινόμησης, για την κυτταρολογική εξέταση με κατώφλι το ASCUS (δηλαδή όλες οι περιπτώσεις που ήταν ASCUS και χειρότερο, θεωρούνται υψηλού κινδύνου και παραπέμπονται για κολποσκόπηση). Παρόμοια με κατώφλι το ASC-H +. Για την εξέταση μικροσυστοιχιών για υπότυπους HPV DNA χρησιμοποιήθηκαν τρεις εναλλακτικές προσεγγίσεις: η γυναίκα θεωρείται πως έχει υψηλό κίνδυνο και πρέπει να παραπεμφθεί για κολποσκόπηση αν 1) βρέθηκε ένας οποιοσδήποτε HPV υπότυπος, 2) αν βρέθηκε έστω και ένας υπότυπος υψηλού κινδύνου και 3) αν βρέθηκε ο υπότυπος 16 ή 18. Τέλος, συγκρίνεται η απόδοση για το mRNA test με την τεχνική NASBA ή με την κυτταρομετρία ροής καθώς και η ανοσοκυτταροχημική έκφραση της p16, δηλαδή ένα περιστατικό θεωρείται υψηλού κινδύνου και πρέπει να παραπεμφθεί για κολποσκόπηση αν βρεθεί έστω και ένας υπότυπος με την εξέταση NASBA ή βρέθηκε θετικό στην κυτταρομετρία ροής ή θετικό στην p16.

	Δέντρο ταξινόμη σης	Κυτταρολ ογία με κατώφλι ASCUS+	Κυτταρο λογία με κατώφλι ASC-H+	Arrays (Θετικό αποτέλεσ μα αν υπάρχει έστω και ένας υπότυπ ος)	Arrays (Θετικό αποτέλε σμα αν υπάρχει έστω και ένας υπότυπ ος υψηλού κινδύνου)	Arrays (Θετικό αποτέλε σμα αν υπάρχει υπότυπ ος 16 ή 18)	NASBA (Θετικό αποτέλε σμα αν υπάρχει έστω και ένας υπότυπο ς)	Κυτταρ ομετρία Ροής (θετικό αν >1.5%)	p16
Ευαισθη σία	83.28%	97.76%	69.33%	87.71%	84.72%	52.82%	69.65%	88.19%	57.21%
Ειδικότητα	94.26%	59.79%	95.04%	70.49%	75.02%	90.28%	87.09%	79.60%	93.57%
PPV	79.04%	37.82%	77.78%	42.86%	46.11%	57.82%	62.15%	48.49%	69.68%
NPV	95.60%	99.07%	92.53%	95.79%	95.11%	88.35%	90.41%	96.87%	89.44%
FPR	5.74%	40.21%	4.96%	29.51%	24.98%	9.72%	12.91%	20.40%	6.43%
FNR	16.72%	2.24%	30.67%	12.29%	15.28%	47.18%	30.35%	11.81%	42.79%
OA	92.00%	67.39%	89.90%	73.96%	76.97%	82.73%	83.02%	81.13%	86.11%
Πλήθος κατάλληλων αποτελεσμά των	1625	1564	1564	1494	1494	1494	1101	1325	1116
% κατάλληλων αποτελεσμά των	100.00 %	96.25%	96.25%	91.94%	91.94%	91.94%	67.75%	81.54%	68.68%

Πίνακας 7: Συγκριτικά στατιστικά στοιχεία απόδοσης του δέντρου ταξινόμησης και μεμονωμένων εξετάσεων

5.5 ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΕ ΤΙΣ ΚΑΜΠΥΛΕΣ ROC

Σε αυτό το κεφάλαιο γίνεται η εξαγωγή των καμπυλών ROC για την κάθε μία προτεινόμενη εξέταση συμπεριλαμβανομένου και του δέντρου ταξινόμησης.

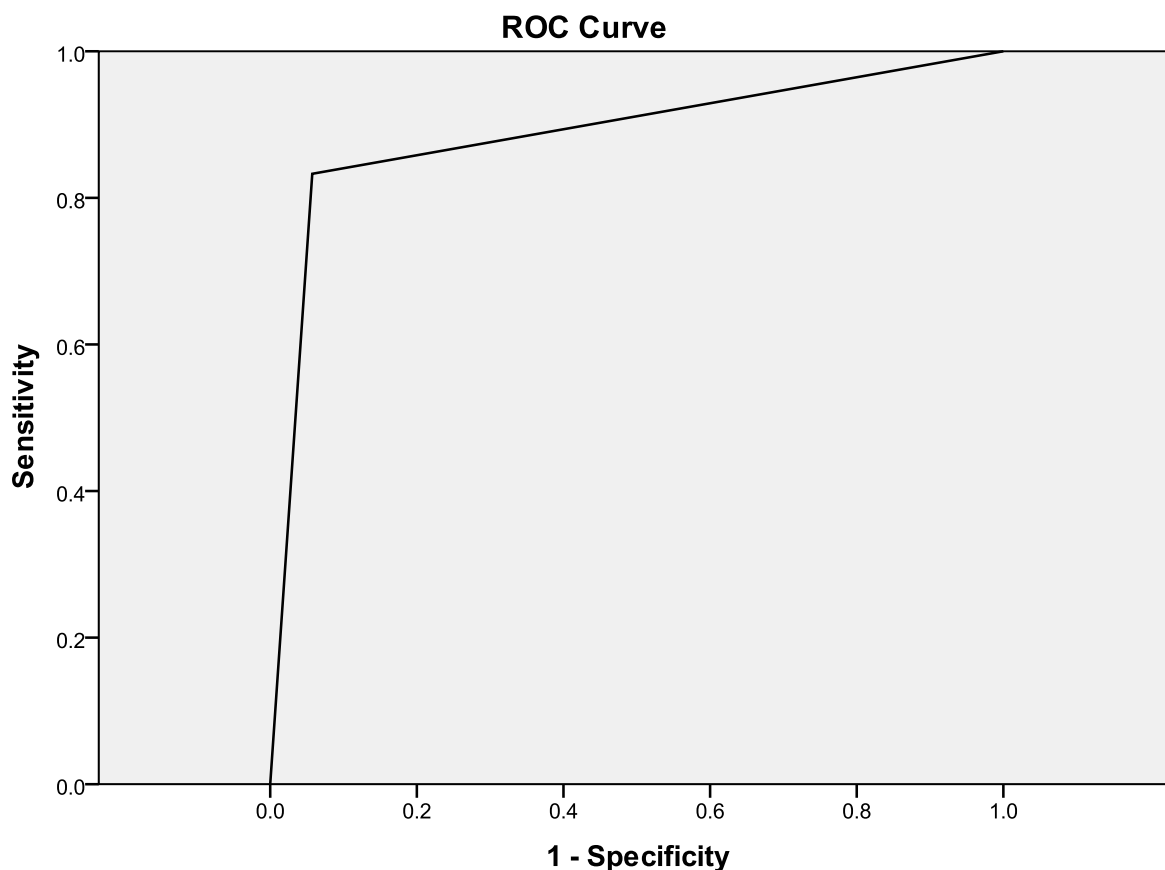
5.5.1 Καμπύλη ROC για το δέντρο ταξινόμησης

Για την παραγωγή αυτής της καμπύλης προηγήθηκε αριθμητική κωδικοποίηση της απόκρισης του δέντρου ταξινόμησης σε κλίμακα όπου όσο αυξάνεται το νούμερο αυξάνει και ο βαθμός επικινδυνότητας.

Η κωδικοποίηση που χρησιμοποιήθηκε ήταν:

- ('< CIN 2' = 0)
- ('>= CIN 2' = 1).

Η καμπύλη ROC παρουσιάζεται στο επόμενο σχήμα.



Diagonal segments are produced by ties.

Εικόνα 8: Καμπύλη ROC του δέντρου ταξινόμησης σε σχέση με την ιστολογική διάγνωση (στις δύο κατηγορίες)

Τα στατιστικά χαρακτηριστικά της καμπύλης συνοψίζονται στον ακόλουθο πίνακα:

Area	Std. Error ^a	Asymptotic Sig. ^b	Asymptotic 95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
.888	.013	.000	.863	.912

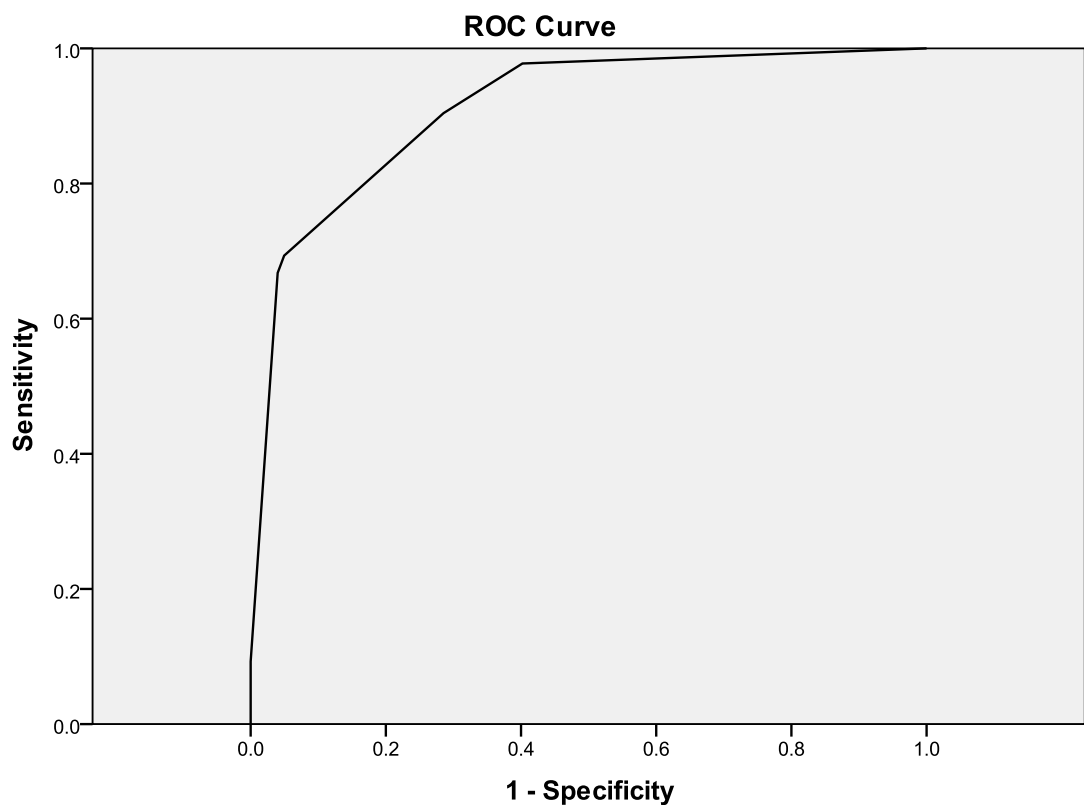
5.5.2 Καμπύλη ROC για την κυτταρολογική εξέταση

Για την παραγωγή αυτής της καμπύλης είναι απαραίτητο να γίνει αριθμητική κωδικοποίηση των κυτταρολογικών απαντήσεων σε κλίμακα όπου όσο αυξάνεται το νούμερο αυξάνει και ο βαθμός επικινδυνότητας.

Η κωδικοποίηση που χρησιμοποιήθηκε ήταν:

- ('NEGATIVE' = 0)
- ('ASC-US' = 1)
- ('LGSIL' = 2)
- ('ASC-H' = 3)
- ('HGSIL' = 4)
- ('SCC' = 5)
- ('ADENO-CA' = 5)
- Όσα αποτελέσματα ήταν ακατάλληλα δεν χρησιμοποιήθηκαν.

Η καμπύλη ROC παρουσιάζεται στο επόμενο σχήμα.



Diagonal segments are produced by ties.

Εικόνα 9: Καμπύλη ROC της κυτταρολογικής απάντησης σε σχέση με την ιστολογική διάγνωση (στις δύο κατηγορίες)

Τα στατιστικά χαρακτηριστικά της καμπύλης συνοψίζονται στον ακόλουθο πίνακα:

Area	Std. Error	Asymptotic Sig.	Asymptotic 95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
.911	.009	.000	.894	.929

5.5.3 Καμπύλες ROC για ARRAYS

Έγινε παραγωγή τριών καμπυλών ROC, συγκεκριμένα:

- Αν βρέθηκε έστω και ένας υπότυπος ανεξαρτήτως βαθμού επικινδυνότητας το περιστατικό θεωρείται θετικό.
- Αν βρέθηκε έστω και ένας υπότυπος υψηλού κινδύνου το περιστατικό θεωρείται θετικό.
- Αν βρέθηκε ο υπότυπος 16 ή 18 το περιστατικό θεωρείται θετικό.

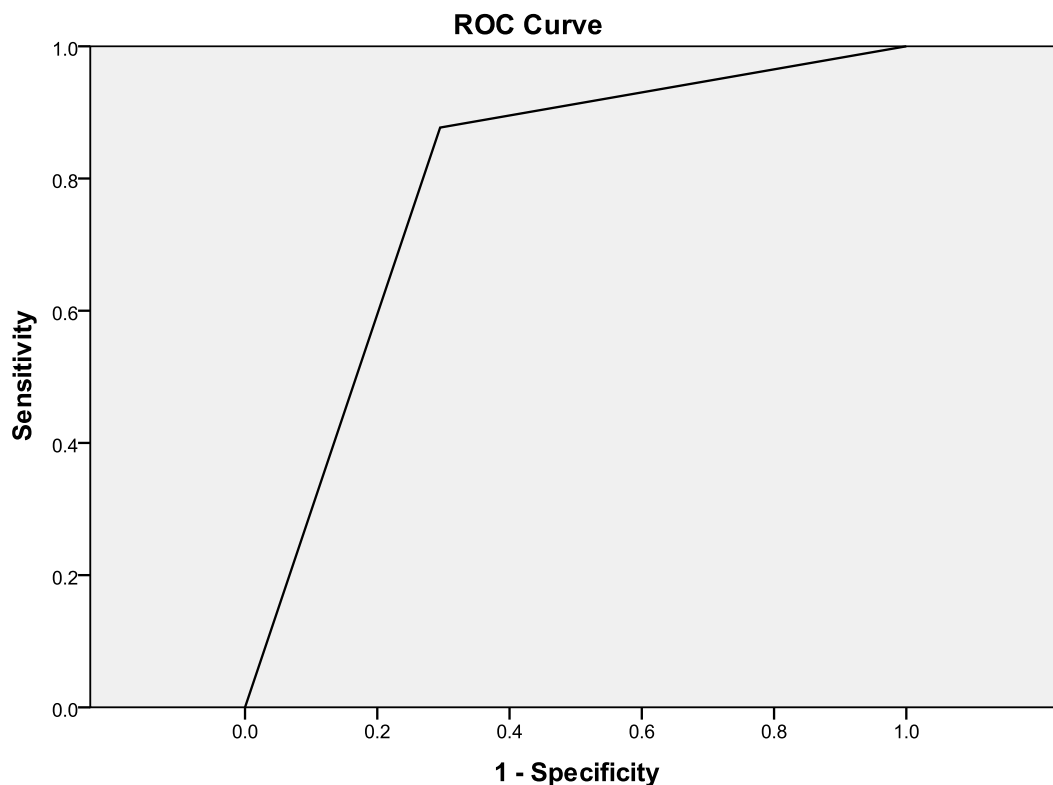
5.5.3.1 Καμπύλες ROC για αποτέλεσμα ARRAYS ανεξαρτήτως υπότυπου

Για την παραγωγή αυτής της καμπύλης προηγήθηκε αριθμητική κωδικοποίηση της απάντησης των ARRAYS σε κλίμακα όπου όσο αυξάνεται το νούμερο αυξάνει και ο βαθμός επικινδυνότητας.

Η κωδικοποίηση που χρησιμοποιήθηκε ήταν:

- Δεν βρέθηκε κανένας υπότυπος = 0
- Βρέθηκε έστω και ένας υπότυπος ανεξαρτήτως βαθμού επικινδυνότητας = 1

Η καμπύλη ROC παρουσιάζεται στο επόμενο σχήμα.



Diagonal segments are produced by ties.

Εικόνα 10: Καμπύλη ROC των ARRAYS για οποιονδήποτε υπότυπο σε σχέση με την ιστολογική διάγνωση (στις δύο κατηγορίες)

Τα στατιστικά χαρακτηριστικά της καμπύλης συνοψίζονται στον ακόλουθο πίνακα:

Area	Std. Error ^a	Asymptotic Sig. ^b	Asymptotic 95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
.791	.014	.000	.764	.818

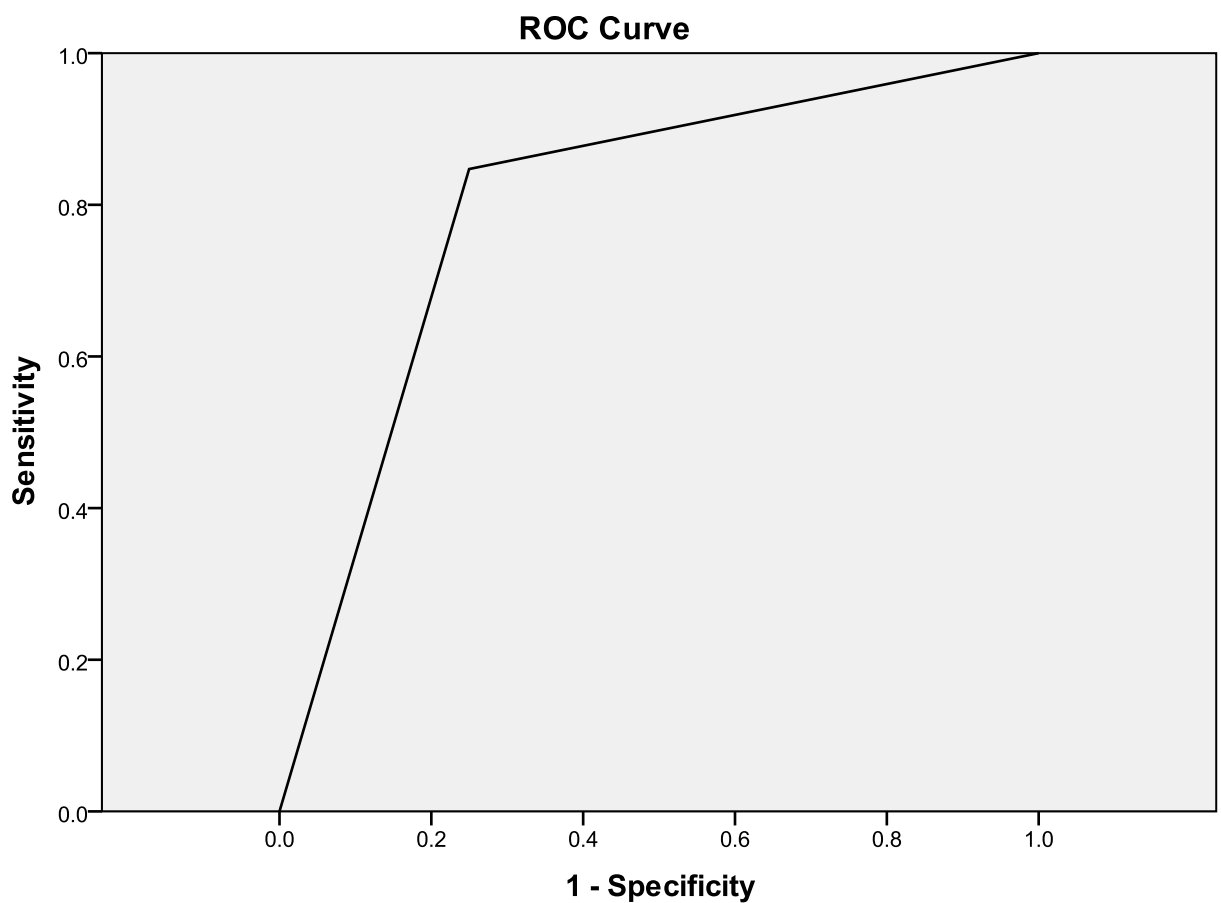
5.5.3.2 Καμπύλες ROC για αποτέλεσμα ARRAYS για υπότυπους υψηλού κινδύνου

Για την παραγωγή αυτής της καμπύλης προηγήθηκε αριθμητική κωδικοποίηση της απάντησης των ARRAYS σε κλίμακα όπου όσο αυξάνεται το νούμερο αυξάνει και ο βαθμός επικινδυνότητας.

Η κωδικοποίηση που χρησιμοποιήθηκε ήταν:

- Δεν βρέθηκε υπότυπος υψηλού κινδύνου = 0
- Βρέθηκε έστω και ένας υπότυπος υψηλού κινδύνου = 1

Η καμπύλη ROC παρουσιάζεται στο επόμενο σχήμα.



Diagonal segments are produced by ties.

Εικόνα 11: Καμπύλη ROC των ARRAYS για υπότυπους υψηλού κινδύνου σε σχέση με την ιστολογική διάγνωση (στις δύο κατηγορίες)

Τα στατιστικά χαρακτηριστικά της καμπύλης συνοψίζονται στον ακόλουθο πίνακα:

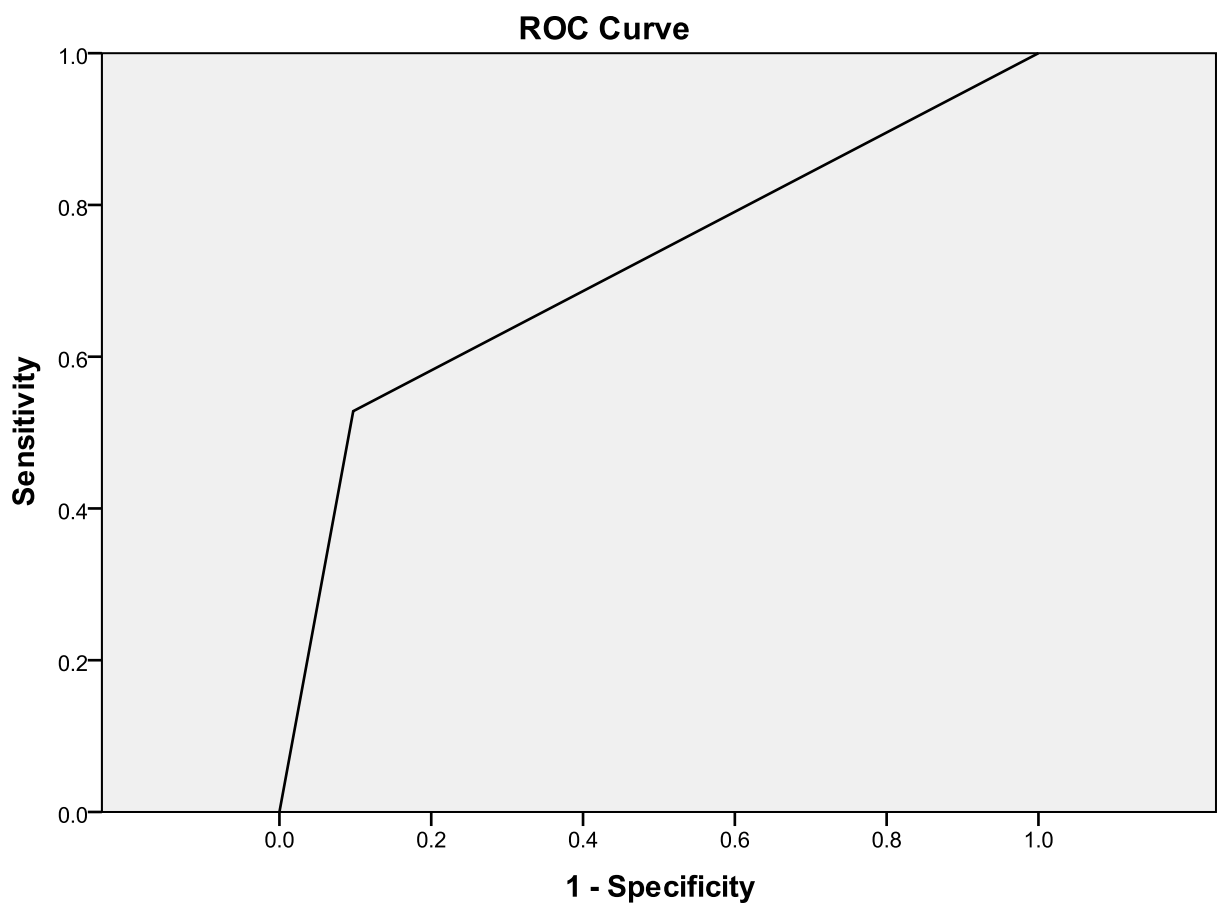
Area	Std. Error ^a	Asymptotic Sig. ^b	Asymptotic 95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
.799	.014	.000	.771	.826

5.5.3.3 Καμπύλες ROC για αποτέλεσμα ARRAYS για τους υπότυπους 16 και 18

Για την παραγωγή αυτής της καμπύλης προηγήθηκε αριθμητική κωδικοποίηση της απάντησης των ARRAYS σε κλίμακα όπου όσο αυξάνεται το νούμερο αυξάνει και ο βαθμός επικινδυνότητας.

- Η κωδικοποίηση που χρησιμοποιήθηκε ήταν:
- Δεν βρέθηκε ο υπότυπος 16 ή 18 = 0
- Βρέθηκε ο υπότυπος 16 ή 18 = 1

Η καμπύλη ROC παρουσιάζεται στο επόμενο σχήμα.



Εικόνα 12: Καμπύλη ROC των ARRAYS για τους υπότυπους 16 και 18 σε σχέση με την ιστολογική διάγνωση (στις δύο κατηγορίες)

Τα στατιστικά χαρακτηριστικά της καμπύλης συνοψίζονται στον ακόλουθο πίνακα:

Area	Std. Error ^a	Asymptotic Sig. ^b	Asymptotic 95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
.716	.019	.000	.679	.752

5.5.4 Καμπύλη ROC για την εξέταση NASBA

Για την παραγωγή αυτής της καμπύλης είναι απαραίτητο να γίνει αριθμητική κωδικοποίηση των απαντήσεων της εξέτασης NASBA σε κλίμακα όπου όσο αυξάνεται το νούμερο αυξάνει και ο βαθμός επικινδυνότητας.

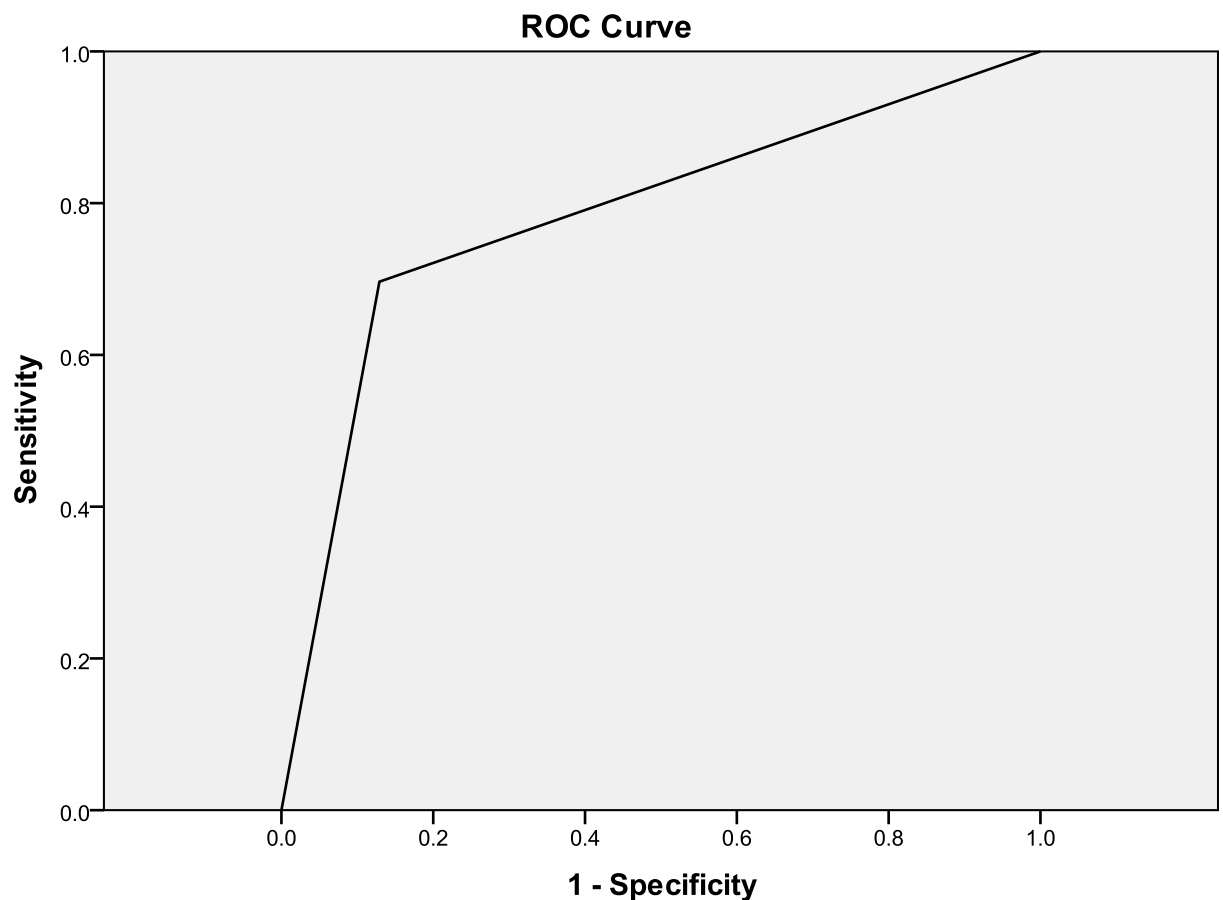
Η κωδικοποίηση που χρησιμοποιήθηκε ήταν:

Αν δεν βρέθηκε κανένας υπότυπος = 0

Αν βρέθηκε έστω και ένας υπότυπος = 1

επιπλέον όσων αποτελέσματα ήταν ακατάλληλα δεν χρησιμοποιήθηκαν.

Η καμπύλη ROC παρουσιάζεται στο επόμενο σχήμα.



Diagonal segments are produced by ties.

Εικόνα 13: Καμπύλη ROC της εξέτασης NASBA σε σχέση με την ιστολογική διάγνωση (στις δύο κατηγορίες)

Τα στατιστικά χαρακτηριστικά της καμπύλης συνοψίζονται στον ακόλουθο πίνακα:

Area	Std. Error ^a	Asymptotic Sig. ^b	Asymptotic 95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
.784	.018	.000	.748	.819

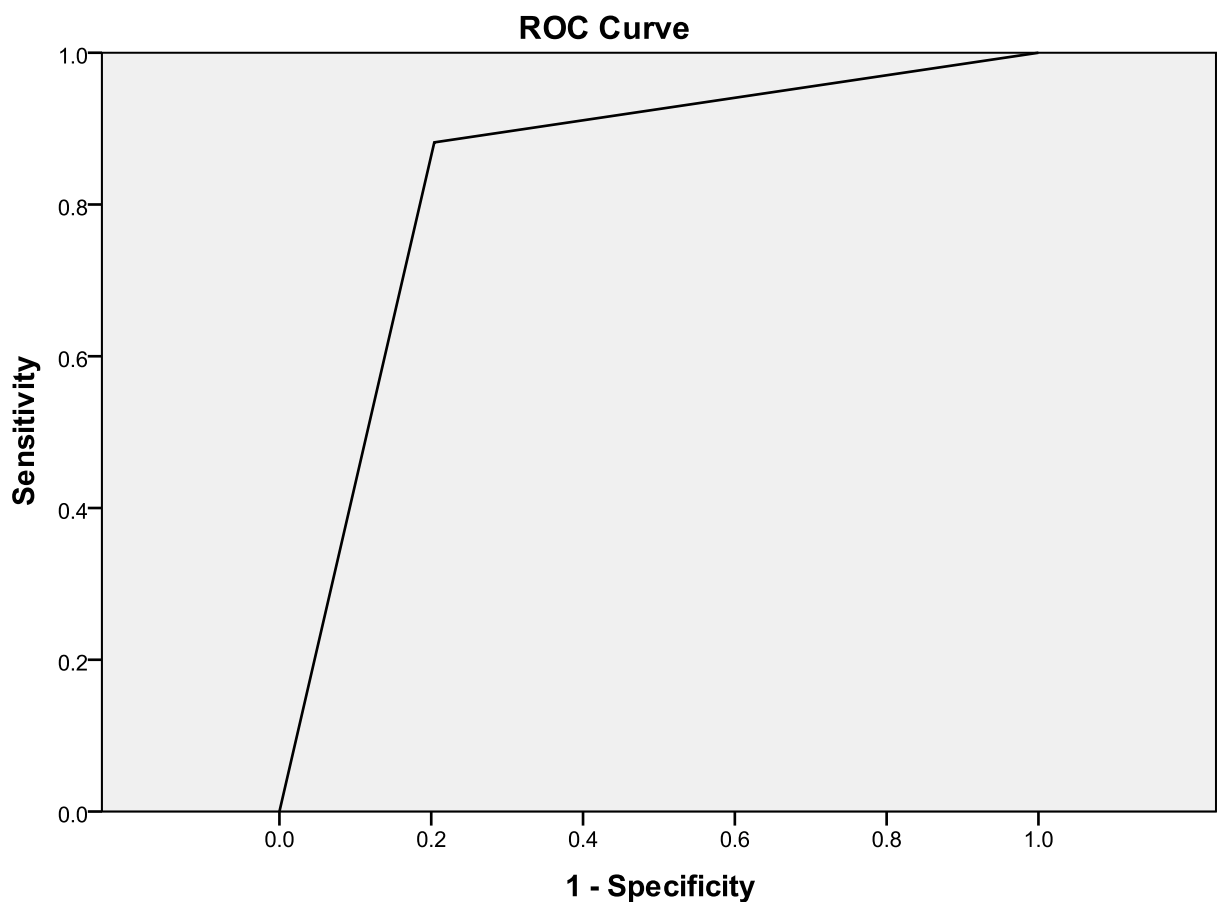
5.5.5 Καμπύλη ROC για την κυτταρομετρία ροής

Αντίστοιχα με τις άλλες περιπτώσεις έγινε αριθμητική κωδικοποίηση των απαντήσεων της εξέτασης με κυτταρομετρία ροής σε κλίμακα όπου όσο αυξάνεται το νούμερο αυξάνει και ο βαθμός επικινδυνότητας.

Η κωδικοποίηση που χρησιμοποιήθηκε ήταν:

- Αν υπήρξε αρνητική απάντηση = 0
- Αν υπήρξε θετική απάντηση = 1
- Επιπλέον όσα αποτελέσματα ήταν ακατάλληλα δεν χρησιμοποιήθηκαν.

Η καμπύλη ROC παρουσιάζεται στο επόμενο σχήμα.



Diagonal segments are produced by ties.

Εικόνα 14: Καμπύλη ROC της εξέτασης με κυτταρομετρία ροής σε σχέση με την ιστολογική διάγνωση (στις δύο κατηγορίες)

Τα στατιστικά χαρακτηριστικά της καμπύλης συνοψίζονται στον ακόλουθο πίνακα:

Area	Std. Error ^a	Asymptotic Sig. ^b	Asymptotic 95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
.839	.014	.000	.811	.867

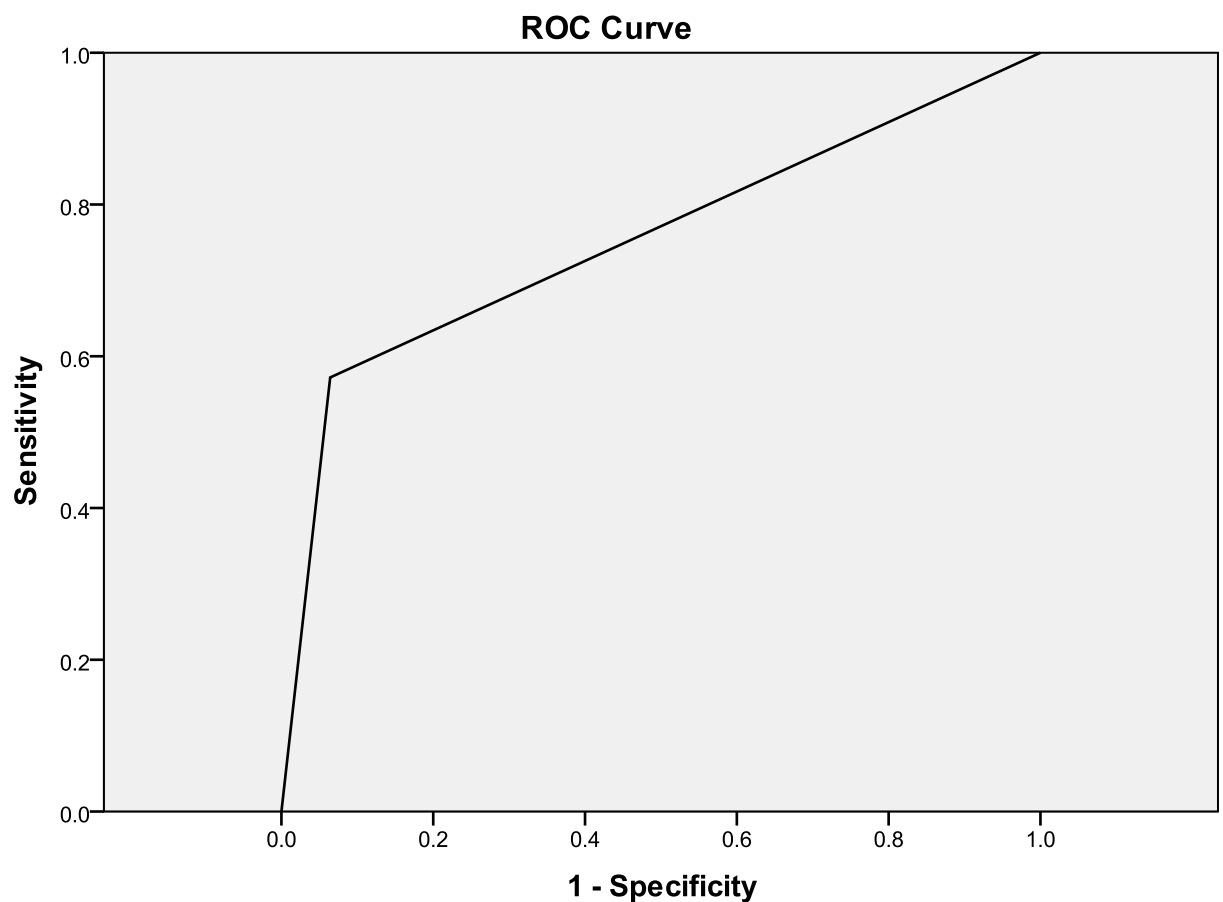
5.5.6 Καμπύλη ROC για την εξέταση p16

Αντίστοιχα με τις άλλες περιπτώσεις έγινε αριθμητική κωδικοποίηση των απαντήσεων της εξέτασης p16 σε κλίμακα όπου όσο αυξάνεται το νούμερο αυξάνει και ο βαθμός επικινδυνότητας.

Η κωδικοποίηση που χρησιμοποιήθηκε ήταν:

- Αν υπήρξε αρνητική απάντηση = 0
- Αν υπήρξε θετική απάντηση = 1
- Επιπλέον όσα αποτελέσματα ήταν ακατάλληλα δεν χρησιμοποιήθηκαν.

Η καμπύλη ROC παρουσιάζεται στο επόμενο σχήμα.



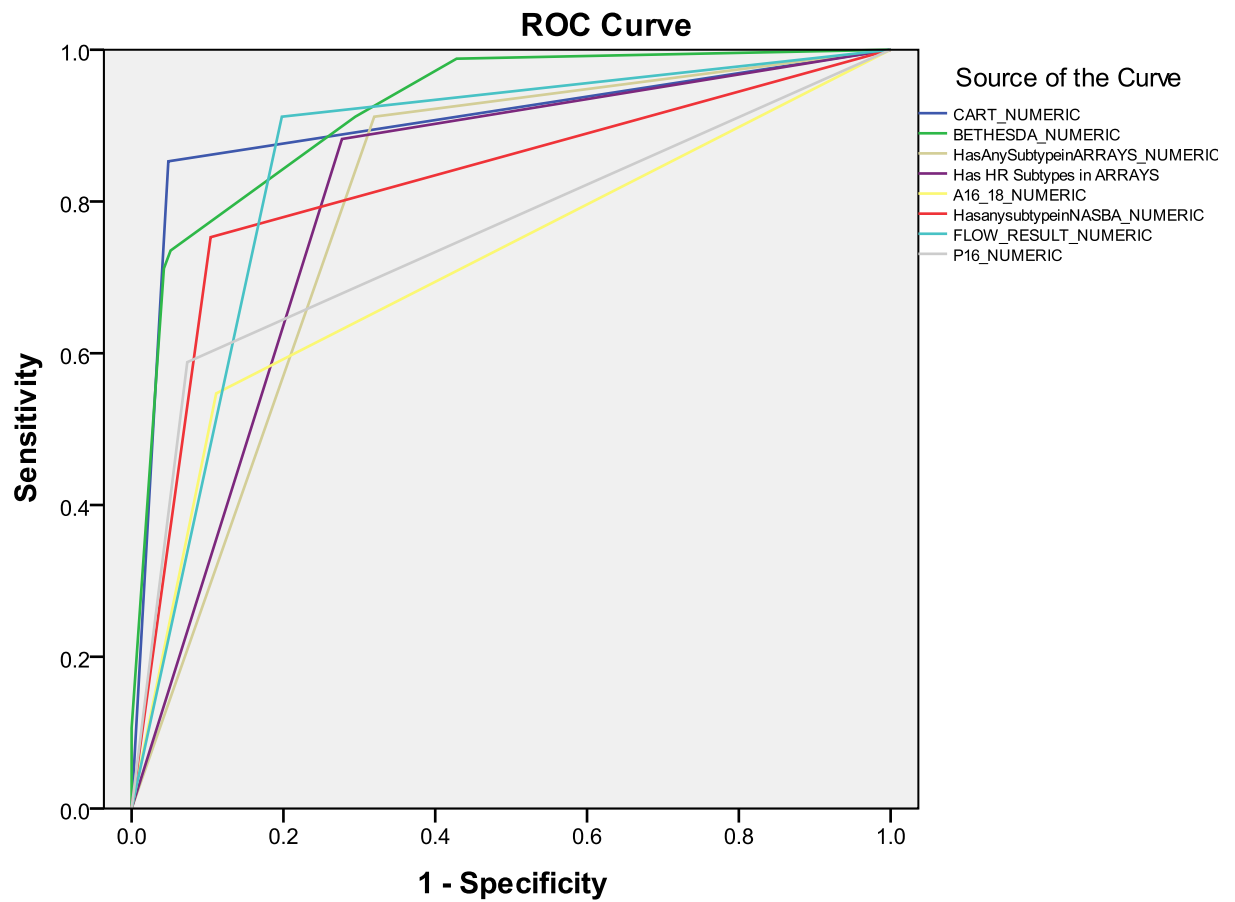
Diagonal segments are produced by ties.

Εικόνα 15: Καμπύλη ROC της εξέτασης p16 σε σχέση με την ιστολογική διάγνωση (στις δύο κατηγορίες)

Τα στατιστικά χαρακτηριστικά της καμπύλης συνοψίζονται στον ακόλουθο πίνακα:

Area	Std. Error ^a	Asymptotic Sig. ^b	Asymptotic 95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
.754	.021	.000	.713	.795

5.5.7 Συγκεντρωτική παρουσίαση των καμπυλών ROC



Diagonal segments are produced by ties.

Εικόνα 16: Συγκεντρωτική παρουσίαση των καμπυλών ROC για τις μεμονομένες εξετάσεις και του δέντρου ταξινόμησης σε σχέση με την ιστολογική διάγνωση (στις δύο κατηγορίες)

Τα στατιστικά χαρακτηριστικά της καμπύλης συνοψίζονται στον ακόλουθο πίνακα:

Area Under the Curve

Test Result Variable(s)	Area	Std. Error ^a	Asymptotic Sig. ^b	Asymptotic 95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
CART_NUMERIC	.902	.017	.000	.870	.935
BETHESDA_NUMERIC	.919	.011	.000	.898	.941
HasAnySubtypeinARRAYS_NUMERIC	.796	.017	.000	.762	.830
Has HR Subtypes in ARRAYS	.803	.018	.000	.768	.838
A16_18_NUMERIC	.718	.025	.000	.670	.766
HasanysubtypeinNASBA_NUMERIC	.824	.021	.000	.784	.865
FLOW_RESULT_NUMERIC	.857	.016	.000	.826	.887
P16_NUMERIC	.757	.024	.000	.710	.805

Πίνακας 8: Συγκριτική παρουσίαση των χαρακτηριστικών των καμπυλών ROC για τις εναλλακτικές μεθόδους

Τέλος προκειμένου να αξιολογηθούν πιο λεπτομερώς τα αποτελέσματα και η μεθοδολογία, παρουσιάζεται σε μορφή πίνακα (Πίνακας 9) η σύγκριση της κυτταρολογικής, της ιστολογικής (ομάδες γραμμών) στην οποία φαίνεται η ιστολογική απάντηση και η κυτταρολογική διάγνωση που δόθηκε, καθώς και τα αποτελέσματα του δέντρου ταξινόμησης.

Λεπτομέρειες από αυτόν τον πίνακα αναλύονται στη συζήτηση.

		Αποτέλεσμα δέντρου ταξινόμηση			Μερικό σύνολο
Ιστολογικό αποτέλεσμα	Κυτταρολογία	ΣΩΣΤΟ	ΨΕΥΔΩΣ ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΨΕΥΔΩΣ ΘΕΤΙΚΟ	
CN	NEGATIVE	619			619
(CN) Σύνολο		619			619
NEGATIVE	INADEQUATE	10			10
	NEGATIVE	62			62
	ASC-US	36		1	37
	LGSIL	36			36
	ASC-H	3		3	6
	HGSIL	2		8	10
NEGATIVE Σύνολο		149		12	161
CIN 1	INADEQUATE	25		4	29
	NEGATIVE	67			67
	ASC-US	107		2	109
	LGSIL	242		17	259
	ASC-H	2		4	6
	HGSIL	5		35	40
CIN 1 Σύνολο		448		62	510
CIN 2	INADEQUATE	8	1		9
	NEGATIVE		5		5
	ASC-US	7	11		18
	LGSIL	26	24		50
	ASC-H	2			2
	HGSIL	75			75
CIN 2 Σύνολο		118	41		159

CIN 3	INADEQUATE	8	1		9
	NEGATIVE		2		2
	ASC-US	2	3		5
	LGSIL	8	7		15
	-H	3			3
	HGSIL	94			94
	SCC	1			1
CIN 3 Σύνολο		116	13		129
SCC	INADEQUATE	2			2
	ASC-H	2			2
	HGSIL	9			9
	SCC	15			15
	ADENO-CA	1			1
SCC Σύνολο		29			29
ADENO-CA	INADEQUATE	2			2
	LGSIL		1		1
	ASC-H		1		1
	HGSIL	2			2
	SCC	2			2
	ADENO-CA	10			10
ADENO-CA Σύνολο		16	2		18
Σύνολο		1495	56	74	1625

Πίνακας 9: Αποτελέσματα του δέντρου ταξινόμηση σε σχέση με την κυτταρολογική και την ιστολογική απάντηση

6 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας (Cervical cancer) είναι ο τρίτος πλέον συχνός καρκίνος παγκοσμίως στις γυναίκες και το τέταρτο αίτιο θνησιμότητας των γυναικών [161]. Περισσότερα από 85% αυτών των περιστατικών και θανάτων παρατηρούνται σε αναπτυσσόμενες ή υπανάπτυκτες χώρες. Κύριο αίτιο είναι η έλλειψη συστηματικών ελέγχων που επιτρέπουν τον εντοπισμό προκαρκινικών αλλοιώσεων σε πρώιμο στάδιο και πριν την ανάπτυξη καρκινωμάτων.

Το τεστ Παπανικολάου θεωρείται ως το πλέον επιτυχημένο τεστ για έλεγχο για καρκίνο τραχήλου μήτρας [131] υπό την προϋπόθεση ότι εφαρμόζεται με επαναληπτικό τρόπο σε οργανωμένα προγράμματα πληθυσμικού ελέγχου. Όμως ο καρκίνος τραχήλου μήτρας δεν έχει εξαλειφθεί ακόμα και σε χώρες που τα εφαρμόζουν. Βασικοί λόγοι είναι η μη συμμόρφωση των γυναικών λόγω αδυναμίας ακριβούς καθορισμού του κινδύνου που διατρέχουν για ανάπτυξη καρκίνου τραχήλου μήτρας (25% των περιπτώσεων τελικής διάγνωσης καρκίνου) και ο αποκλεισμός γυναικών από το σύστημα υγείας (λόγω του κοινοοικονομικού περιβάλλοντος) και κατ' επέκταση από τα οργανωμένα προγράμματα πληθυσμικού ελέγχου (75% των περιπτώσεων με τελική διάγνωση καρκίνου).

Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας είναι γνωστό ότι προκαλείται με προσβολή από τον ιό των ανθρωπίνων κονδυλωμάτων (human papillomavirus - HPV), που αποτελεί την πλέον συχνά σεξουαλικά μεταδιδόμενη λοίμωξη παγκοσμίως. Σήμερα έχουν ανιχνευθεί περίπου 100 διαφορετικοί υπότυποι του HPV που μπορούν να προσβάλουν τον άνθρωπο. Μεταξύ αυτών, 15 είναι ογκογόνοι και ικανοί να προκαλέσουν καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Οι σύγχρονες επιστημονικές έρευνες σχετικά με την κατανόηση της λοίμωξης από τον HPV και της φυσικής ιστορίας των νεοπλασμάτων του τραχήλου της μήτρας έχουν συμβάλει στην προώθηση επικουρικών τεχνικών όπως HPV DNA test είτε ως επικουρική στην παραδοσιακή εξέταση με τεστ Παπανικολάου αλλά και ως ανταγωνιστική τεχνική.

Σήμερα υπάρχει μια πληθώρα από επικουρικές τεχνικές. Συμπεριλαμβάνονται τυποποίηση του DNA του HPV (HPV DNA typing) και ανίχνευση του mRNA των ογκογονιδίων E6/E7 τα οποία είναι συνδεδεμένα με την ογκογένεση. Ανάμεσα σε αυτές ανίχνευση του mRNA με ενίσχυση νουκλεϊκών οξέων (nucleic acid based amplification - NASBA) [162] και τεχνικές κυτταρομετρίας ροής με φθορισμό (mRNA-Flow-FISH). Αυτές οι τεχνικές έχουν αυξημένη προγνωστική αξία θετικού αποτελέσματος (positive predictive value – PPV) και μπορούν να βοηθήσουν στη μείωση των παραπομπών για κολποσκόπηση [159, 163-166]. Παράλληλα έχει αναφερθεί πως η ανοσοκυτταροχημική ανίχνευση της πρωτεΐνης p16 είναι δυνατόν να αυξήσει τη διαγνωστική ακρίβεια του τεστ Παπανικολάου [167, 168].

Μέχρι σήμερα έχουν ολοκληρωθεί πολλές επιστημονικές μελέτες που αξιολογούν κάθε μία τεχνική χωριστά σαν μια μοναδική δοκιμασία είτε ως

επικουρική είτε για την αντικατάσταση του τεστ Παπανικολάου [144, 159, 162-175]. Από τη λεπτομερή ανάλυση αυτών των μελετών συμπεραίνεται ότι ο τρόπος μέτρησης της απόδοσης αλλά και η απόδοση αυτών των μεθόδων διαφέρει σημαντικά στην κάθε μελέτη, επιπλέον η απόδοση επηρεάζεται από τον επιπολασμό και την επίπτωση του HPV στον υπό μελέτη πληθυσμό. Συνεπώς η εφαρμογή μια και μοναδικής μεθόδου, παρότι προσφέρει κάποια επίπεδα προστασίας δεν καθορίζει με ακρίβεια τον κίνδυνο να υποθάλπεται κάποια νεοπλασία του τραχήλου της μήτρας (cervical intraepithelial neoplasia - CIN). Πάραυτα από μετα-αναλύσεις μελετών [144, 169-171, 176, 177] είναι προφανές πως ο συνδυασμός του τεστ Παπανικολάου με ένα HPV DNA test έχει μεγαλύτερη ευαισθησία από κάθε μία τεχνική ξεχωριστά. Παρόλα αυτά στις Η.Π.Α., επειδή καταγράφεται το ιατρικό σφάλμα με πολύ μεγαλύτερη ακρίβεια από οποιαδήποτε άλλη χώρα του κόσμου, έχειδειχτεί ότι η πολιτική αυτή οδηγεί σε αυξημένο αριθμό άσκοπων κολποσκοπήσεων και κωνοειδών εκτομών.

Η νέες εξελίξεις στην πληροφορική και στις εφαρμογές τεχνητής νοημοσύνης, σήμερα έχουν επιτρέψει την ανάπτυξη συστημάτων υποβοήθησης λήψης απόφασης για την υποστήριξη διαγνωστικών ή θεραπευτικών αποφάσεων. Τεχνικές ταξινόμησης όπως τα τεχνητά νευρωνικά δίκτυα (artificial neural networks - ANNs) [178-184], στατιστικές μέθοδοι όπως η διαχωριστική ανάλυση [183, 185, 186], τα δέντρα ταξινόμησης (classification and regression trees - CARTs) [177, 187-189] ή γενετικοί αλγόριθμοι [190] έχουν ήδη χρησιμοποιηθεί σε πολλές εφαρμογές στην ιατρική. Οι νέες μοριακές τεχνικές είναι μια ακόμα τεχνολογική εξέλιξη που σήμερα είναι στην καθημερινή πράξη και ρουτίνα μεγάλου αριθμού κυτταρολογικών εργαστηρίων [191] και βελτιώνουν τη διαγνωστική ακρίβεια σε σύγκριση με τη χρήση της κυτταρολογικής εξέτασης μόνο.

Μεταξύ των διαφόρων τεχνικών υποστήριξης λήψης απόφασης τα δέντρα ταξινόμησης είναι μια ελκυστική στατιστική προσέγγιση για την εξόρυξη γνώσης από τα δεδομένα και επιπλέον είναι σχετικά εύκολο να δομηθούν και εύκολα κατανοητά όσον αφορά τον τρόπο χρήσης τους από τους ιατρούς. Αυτές οι τεχνικές παράγουν κανόνες/αλγορίθμους που είναι ιδιαίτερα εύκολο να χρησιμοποιηθούν και παράλληλα έχουν τη δυνατότητα να συνδυάζουν πιθανότητες (π.χ. πιθανότητα κινδύνου για νόσο) που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην παραγωγή κανόνων διαχείρισης των ασθενών και ενδεχομένως στην καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών σε νόσους.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η διερεύνηση των δυνατοτήτων που έχουν τα δέντρα ταξινόμησης όταν εφαρμόζονται σε μια πληθώρα διαγνωστικών στοιχείων που μετρούνται στο μοντέρνο κυτταρολογικό εργαστήριο, και στην κατασκευή αλγορίθμων για την αξιολόγηση και διαχείριση των γυναικών σε εξατομικευμένο επίπεδο. Η μελέτη έχει σχεδιαστεί να είναι όσο το δυνατόν πιο κοντά στην πραγματική κατάσταση που υπάρχει σε ένα κυτταρολογικό εργαστήριο και για αυτό το λόγο: 1) έχουν χρησιμοποιηθεί δεδομένα από γυναίκες από διαφορετικά σημεία της χώρας 2) ένα μέρος των περιστατικών θεωρήθηκαν ως αρνητικά παρότι δεν υπήρχε ιστολογική απάντηση για λόγους

ηθικής και δεοντολογίας και 3) συμπεριελήφθησαν ελλιπή δεδομένα από εξετάσεις, αφού είναι μια πραγματικότητα που υπάρχει στα κυτταρολογικά εργαστήρια.

Σήμερα υπάρχουν κατευθυντήριες οδηγίες για την εφαρμογή των διαθέσιμων βιοδείκτων στη διαχείριση των μη φυσιολογικών τεστ Παπανικολάου [152, 163, 167, 192-198]. Όμως επειδή όλοι έχουν είτε υψηλή ευαισθησία είτε ειδικότητα, όχι όμως ταυτόχρονα και τα δύο, δεν υπάρχει συμφωνία στην επιστημονική κοινότητα για τη βέλτιστη διαχείριση γυναικών με μη φυσιολογικό τεστ Παπανικολάου. Οι αλγόριθμοι που έχουν ενσωματωθεί στις κατευθυντήριες οδηγίες διαφέρουν από χώρα σε χώρα, συχνά μάλιστα γυναίκες με προηγούμενα παθολογικά αποτελέσματα τα οποία δεν επαναλαμβάνονται στις επόμενες επισκέψεις οδηγούν συχνά σε σύγχυση με αποτέλεσμα ενώ υποκρύπτεται υψηλόβαθμη ιστολογικά αλλοίωση (CIN2+), οι γυναίκες να αντιμετωπίζονται όπως οι φυσιολογικές. Στις γυναίκες με κυτταρολογική διάγνωση ASCUS υπάρχουν πιο σύνθετα προβλήματα στη διαχείρισή τους. Η ευρέως διαδεδομένη επιλογές για τη διαχείριση αυτών των περιπτώσεων είναι είτε άμεση παραπομπή σε κολποσκόπηση είτε παρακολούθηση με επαναλαμβανόμενα τεστ Παπανικολάου. Η πρώτη επιλογή έχει ως συνέπεια την υπερφόρτωση των κολποσκοπικών κλινικών και επιπλέον άνευ λόγου θεραπεία λόγω κάποιων ευρημάτων. Τέτοιου είδους θεραπεία έχει αρνητικές ψυχολογικές επιπτώσεις στις γυναίκες με πρόκληση αυξημένου άγχους και επιπλέον είναι δυνατόν να αυξήσει την προγεννητική θνησιμότητα σε μελλοντικές εγκυμοσύνες [199]. Αντίθετα η επαναλαμβανόμενες κυτταρολογικές εξετάσεις εμπεριέχουν υψηλό κίνδυνο για άυξημένο ποσοστό ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων και μη εντοπισμό υψηλόβαθμων αλλοιώσεων (HGSILs), πάντα σε συσχέτιση με τις επιδόσεις του εργαστηρίου, επιπλέον εμπεριέχει τον κίνδυνο μη συμμόρφωσης των γυναικών και αυξάνει τις ψυχολογικές πιέσεις στις γυναίκες με κυτταρολογικές αλλοιώσεις που δεν αξιολογούνται άμεσα. Προφανώς απαιτείται να αυξηθεί η ακρίβεια της διαγνωστικής διαδικασίας προκειμένου να μειωθούν οι παραπομπές για κολποσκοπήσεις χωρίς όμως συμβιβασμούς στην ανίχνευση των υψηλόβαθμων αλλοιώσεων.

Στο υλικό μας (Πίνακας 5, Πίνακας 9) το ποσοστό των CIN 2+ περιπτώσεων που δόθηκαν ως ASCUS κυτταρολογικά ήταν $23/169=13.61\%$. Επιπλέον το ποσοστό των CIN 2+ περιπτώσεων στις περιπτώσεις που ήταν ιστολογικά LgSIL ήταν $66/361=18.28\%$. Και τα δύο ποσοστά είναι συμβατά με αυτά που δίνονται βιβλιογραφικά [200], και βρίσκονται στα όρια 5-17% και 9-16%, αντίστοιχα. Αντίστοιχα, το ποσοστό το περιπτώσεων που δόθηκαν κυτταρολογικά ως HGSIL και βρέθηκαν στην ιστολογική εξέταση να είναι χαμηλότερα από CIN 2 ήταν $50/230=21.74\%$, ποσοστό επίσης συμβατό με τη διεθνή βιβλιογραφία [201, 202], εύρημα που καταδικνύει αφενός μεν την εγκυρότητα των δεδομένων της μελέτης καθώς και ότι το πρόβλημα είναι το ίδιο ανεξάρτητα της χώρας. Επομένως η μελέτη μας συμβάλει με τα αποτελέσματά της στη λύση ενός παγκόσμιου προβλήματος.

Η αξιοποίηση των αποτελεσμάτων επικουρικών εξετάσεων για τη βελτίωση της ανίχνευσης των αλλοιώσεων του τραχήλου της μήτρας είναι σήμερα ένα ερευνητικό πεδίο που παρατηρείται έντονη δραστηριότητα. Από το 2010 η Ελληνική Ακαδημαϊκή Ομάδα Παθολογίας Τραχήλου Μήτρας (the Hellenic Cervical Pathology (HeCPA) study group), δραστηριοποιείται στην έρευνα μοντέρνων τεχνικών που χρησιμοποιούν προηγμένα μαθηματικά μοντέλα και τεχνολογίες πληροφορικής και τεχνητής νοημοσύνης για την αξιοποίηση των νέων βιοδεικτών που είναι διαθέσιμοι στις μέρες μας. Μέχρι σήμερα τα πρώτα αποτελέσματα έχουν ήδη παρουσιαστεί στον επιστημονικό τύπο [177, 184]. Σε προηγούμενη δημοσιευμένη μελέτη [177] εφαρμόσαμε δέντρα ταξινόμησης βασιζόμενοι σε ένα μικρότερο σύνολο δεδομένων, και χρησιμοποιώντας περιστατικά για τα οποία υπήρχαν έγκυρα δεδομένα για όλες τις επικουρικές εξετάσεις. Αυτή η προσέγγιση έχει το μειονέκτημα ότι δεν μπορεί να αξιοποιηθεί ένα μεγάλος μέρος από διαθέσιμα δεδομένα και επιπλέον δεν είναι συμβατή με την πραγματική κατάσταση που παρατηρείται στα κυτταρολογικά εργαστήρια, δηλαδή την διεξαγωγή εξετάσεων που να μην δίνουν ένα αξιοποιήσιμο αποτέλεσμα ή την έλλειψη βιολογικού υλικού. Επιπλέον δεν αξιοποιήθηκαν δημογραφικά δεδομένα των γυναικών. Σε μια δεύτερη δημοσιευμένη εργασία [184] από την ίδια ομάδα, εφαρμόστηκαν τεχνητά νευρωνικά δίκτυα για την επίλυση του ίδιου προβλήματος; το μειονέκτημα αυτής της τεχνικής ήταν η απαίτηση και πάλι να υπάρχει έγκυρα δεδομένα για όλους τους βιοδείκτες και επιπλέον δεν υπήρξε υπολογισμός του ποσοστού κινδύνου. Σε αυτή τη μελέτη αξιοποιούμε τη δυνατότητα των δέντρων ταξινόμησης να μπορούν να διαχειριστούν δεδομένα με ελλείψεις και συνεπώς ήταν δυνατόν να αυξηθεί η ισχύς της μελέτης. Επίσης εξάγονται οι πιθανότητες σε κάθε κόμβο του δέντρου ταξινόμησης και ακόμα χρησιμοποιήσαμε και δημογραφικά στοιχεία και συμπεραίνουμε που οι κυήσεις είναι ενδεχομένως ένας σημαντικός παράγοντας. Τέλος πραγματοποιήθηκε εξόρυξη γνώσης από τα δεδομένα με τη μορφή αλγορίθμων για τη βέλτιστη διαχείριση των γυναικών, γνώση που ενδεχομένως είναι χρήσιμη στους διαμορφωτές γνώμης και αποφάσεων αλλά και στους ιατρούς προκειμένου τα χρησιμοποιούν για την επιλογή των πλέον κατάλληλων επικουρικών εξετάσεων αλλά και την προαγωγή ενός συστήματος βαθμολόγησης (scoring system) που ταξινομεί τις γυναίκες ως χαμηλού, μέσου ή υψηλού κινδύνου.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, παρότι μια πληθώρα από στοιχεία (Πίνακας 4) χρησιμοποιήθηκαν κατά την δόμηση του δέντρου ταξινόμησης, ο αλγόριθμος εκπαίδευσης κατάληξε να συμπεριλάβει στην τελική του δομή (Σχήμα 3) μόνο ένα μικρό μέρος από αυτά, τα οποία θεωρούνται και ως τα σημαντικά χαρακτηριστικά για την διαχείριση των γυναικών. Το χαρακτηριστικό με την μεγαλύτερη ικανότητα διαχωρισμού ήταν η κυτταρολογική διάγνωση, όσον αφορά στην τυποποίηση των υποτύπων του HPV χρησιμοποιήθηκε μόνο η ανίχνευση για υπότυπους υψηλού κινδύνου καθώς και για τους υπότυπους 16 και 62, ειδικότερα ο υπότυπος 62 είναι χαρακτηριστικό που χρησιμοποιήθηκε για το διαχωρισμό μόνο ενός μικρού πλήθους περιστατικών. Αναφορικά με την έκφραση

της E6 και E7 βρέθηκε πως η ανίχνευση με κυτταρομετρία ροής εκφρασμένη τόσο ως δύο στάθμες (θετικό / αρνητικό) όσο και ως ποσοστό καθώς και ο υπότυπος 31 με την εξέταση NASBA ήταν σημαντικά. Τέλος στους κόμβους του δέντρου υπάρχει και η ανοσοκυταροχημική έκφραση της p16 καθώς και στοιχεία των κυήσεων της γυναίκας. Δεδομένου ότι η επιδημιολογία της HPV λοίμωξης είναι περίπου η ίδια δεν θα πρέπει να παρασυρθούμε και να προτείνουμε τη μηχανιστική εφαρμογή της μεθοδολογίας μας παγκοσμίως, αλλά την αξιοποίησή της ως εργαλείου εξατομικευμένης ιατρικής με βάση τις επιδημιολογικές ιδιαιτερότητες της χώρας και ενδεχομένως της κάθε γεωγραφικής περιοχής της.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα (Πίνακας 7) η προτεινόμενη μεθοδολογία έχει καλύτερη απόδοση από οποιαδήποτε μεμονωμένη τεχνική, αναλυτικά η συνολική ακρίβεια (92.00%) ήταν καλύτερη από την ακρίβεια κάθε εναλλακτικής μεθόδου, υπήρχε μόνο οριακά στατιστικά σημαντική διαφορά ($\chi^2=4.027$, $p=0.0448$) μεταξύ της συνολικής ακρίβειας του δέντρου ταξινόμησης και της κυτταρολογικής απάντησης με κατώφλι ASC-H+, και ειδικότερα υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά υπέρ του δέντρου ταξινόμησης μεταξύ δέντρου και κυτταρολογίας με κατώφλι ASCUS+ ($p<0.0001$), Arrays για κάθε υπότυπο ($p<0.0001$), Arrays για του υπότυπους υψηλού κινδύνου ($p<0.0001$), Arrays για τους υπότυπους 16 or 18 ($p<0.0001$), NASBA για οποιονδήποτε υπότυπο ($p<0.0001$) και τέλος και για την ανοσοκυταροχημικής έκφραση της p16 ($p<0.0001$). Αναφορικά με τη σύγκριση του δέντρου ταξινόμησης και της κυτταρολογίας με κατώφλι ASC-H+, η ευαισθησία του δέντρου ταξινόμησης (83.28%) ήταν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερη ($p<0.0001$) από αυτή της κυτταρολογικής απάντησης (69.33%), συνεπώς αποδεικνύεται πως η προτεινόμενη μέθοδος είναι καλύτερη από όλες τις εναλλακτικές.

Η ανάλυση των ψευδώς θετικών περιπτώσεων δείχνει ότι το δέντρο ταξινόμησης λανθασμένα κατέταξε 74 περιπτώσεις ως θετικές ($\geq$ CIN2), από αυτές 12 ήταν ιστολογικά αρνητικές και 62 CIN1, 50 από αυτές τις περιπτώσεις είχαν δοθεί κυτταρολογικά σαν ASC-H ή HGSIL (Πίνακας 9), 17 ως LGSIL, 3 ως ASCUS και οι υπόλοιπες 4 περιπτώσεις δεν είχαν έγκυρο αποτέλεσμα στην κυτταρολογική εξέταση. Κυτταρολογικά δεν είχα δοθεί ούτε μία περίπτωση ως αρνητική. Δοθέντως ότι η κυτταρολογική εξέταση είναι το πλέον σημαντικό χαρακτηριστικό που καθορίστηκε από το δέντρο ταξινόμησης, αυτά τα αποτελέσματα ήταν αναμενόμενα. Το FPR of του δέντρου ταξινόμησης ήταν 5.74%, και η μόνη εξέταση που είχε καλύτερη απόδοση όσον αφορά σε αυτό το χαρακτηριστική ήταν η κυτταρολογική απάντηση με κατώφλι ASCUS+ (2.24%) πλην όμως με το κόστος της κατά πολύ μειωμένης ειδικότητας (94.26 vs. 59.79% Πίνακας 7).

Η ανάλυση των ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων είναι πιο σημαντική αφού εμπεριέχουν τον κίνδυνο να μην εντοπιστούν έγκαιρα περιπτώσεις που υποθάλλουν αλλοιώσεις. Το δέντρο ταξινόμησης κατέταξε λανθασμένα 56 περιπτώσεις ως αρνητικές (κυτταρολογικά ήταν 14 ASCUS, 32 LGSIL, 2 ακατάλληλες, 7 αρνητικές και 1 ASC-H, Πίνακας 9). Καμία από αυτές τις περιπτώσεις δεν είχε δοθεί κυτταρολογικά ως HGSIL ή χειρότερα ως καρκίνωμα.

Τα ιστολογικά αποτελέσματα για αυτές τις 56 περιπτώσεις ήταν: 41 CIN2, 13 CIN3 και 2 αδενοκαρκινώματα. Η κυτταρολογική απάντηση για τις δύο τελευταίες περιπτώσεις ήταν ASC-H και LGSIL και υπήρχε αντίστοιχη κολποσκοπική συμφωνία της κολποσκόπησης με την κυτταρολογικής εξέταση.

Το υλικό περιελάμβανε 61 περιπτώσεις με μη αξιοποιήσιμη κυτταρολογική απάντηση (ακατάλληλο, Πίνακας 9), 22 περιπτώσεις ήταν ιστολογικά CIN2+, ανάμεσα σε αυτές 4 καρκινώματα (2 αδεν9καρκινώματα και 2 καρκινώματα του πλακώδους επιθηλίου-SCC), 9 CIN2, 9 CIN3 και οι υπόλοιπες 39 περιπτώσεις ήταν <CIN2. Το δέντρο ταξινόμησης κατέταξε ορθά τις 54 από τις 61 αυτές περιπτώσεις (35 <CIN2, 8 CIN2, 8 CIN3, και τα 4 καρκινώματα) κατέταξε λανθασμένα 6 περιπτώσεις (4 CIN1, 1 CIN2 and 1 CIN3). Είναι ιδιαίτερα σημαντικό ότι η κατάταξη αυτών των περιπτώσεων βασίστηκε μόνο στους βιοδείκτες και το παρελθόν των γυναικών αναφορικά με τις εγκυμοσύνες τους. Με βάση αυτά τα αποτελέσματα το πλήθος των γυναικών που θα προσέρχονταν για επαναληπτική κυτταρολογική εξέταση επειδή το αποτέλεσμα της πρώτης ήταν ακατάλληλο μπορεί να μειωθεί δραματικά.

7 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συμπερασματικά, η προτεινόμενη τεχνική έδωσε ενθαρρυντικά αποτελέσματα που μπορεί να είναι χρήσιμα όχι μόνο για την καλύτερη διαχείριση των γυναικών ανάλογα με τα κυτταρολογικά ευρήματα, αλλά επιπλέον είναι μια εύκολη στη χρήση τεχνική για την εκτίμηση του κινδύνου μια γυναίκα να έχει αλλοιώσεις CIN2+. Η προτεινόμενη μέθοδος είναι ένας οδηγός προς την εξατομικευμένη ιατρική (personalized medicine) και εξατομικευμένες θεραπευτικές αποφάσεις. Τέλος είναι δυνατόν, η εφαρμογή της να μειώσει τον φόρτο των κολποσκοπικών κλινικών, τις άσκοπες θεραπείες και να ανιχνεύσει ένα μεγαλύτερο ποσοστό γυναικών που κινδυνεύουν από καρκίνο τραχήλου μήτρας ή έχουν προκαρκινικές αλλοιώσεις.

Πηγή χρηματοδότησης

Τα δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την εργασία έχουν προέλθει από μερικώς χρηματοδοτούμενα προγράμματα από της Γενική Γραμματεία Έρευνα και Τεχνολογίας και την Ευρωπαϊκή Ένωση, Έργο: HPV-Guard (Συνεργασίες 2011-2013, 11ΣΥΝ_10_250) , επιπλέον μέρος των δεδομένων έχει προέλθει από δύο άλλα ερευνητικά έργα “ΑΚΑΚΟΣ” (ΑΤΤ 95) χρηματοδοτούμενο προγράμματα από της Γενική Γραμματεία Έρευνα και Τεχνολογίας και την Ευρωπαϊκή Ένωση και από το έργο: “ Μελέτη και αξιολόγηση μεθοδολογιών που ενέχονται στην πρόγνωση της επιτυχίας υποχρεωτικού εμβολιασμού για την HPV λοίμωξη – Υγεία Πρόνοια 2000-2006” χρηματοδοτούμενο προγράμματα από το Υπουργείο Υγείας Πρόνοιας και Κοινωνικών Ασφαλίσεων.

8 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] L. R. Cochard and F. H. Netter, *Netter's atlas of human embryology*, 1st ed. Teterboro, N.J.: Icon Learning Systems, 2002.
- [2] E. Novak and J. S. Berek, *Novak's gynecology*, 13th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002.
- [3] Ε. Διακομανώλης, ΚΟΛΠΟΣΚΟΠΗΣΗ & Παθολογία του Κατώτερου Γεννητικού Συστήματος της Γυναίκας. Αθήνα: Π.Χ. Πασχαλίδης ΕΠΕ, 2010.
- [4] H. F. Lodish, *Molecular cell biology*, 6th ed. New York: W.H. Freeman, 2008.
- [5] B. Alberts, *Essential cell biology*, 2nd ed. New York, NY: Garland Science Pub., 2004.
- [6] Ciuffo, "Imnfesto positivo con filtrato di verruca volgare.," *Giorn Ital Mal Venereol*, vol. 48, pp. 12-17, 1907.
- [7] L. Gissmann and H. zur Hausen, "Human papilloma virus DNA: physical mapping and genetic heterogeneity," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 73, pp. 1310-3, Apr 1976.
- [8] G. Orth, M. Favre, and O. Croissant, "Characterization of a new type of human papillomavirus that causes skin warts," *J Virol*, vol. 24, pp. 108-20, Oct 1977.
- [9] H. zur Hausen, H. Schulte-Holthausen, H. Wolf, K. Dorries, and H. Egger, "Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors. II. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human herpes group viruses," *Int J Cancer*, vol. 13, pp. 657-64, May 15 1974.
- [10] H. zur Hausen, "Condylomata acuminata and human genital cancer," *Cancer Res*, vol. 36, p. 794, Feb 1976.
- [11] H. zur Hausen, "Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas," *Curr Top Microbiol Immunol*, vol. 78, pp. 1-30, 1977.
- [12] K. H. Shah, M. G. Lewis, A. B. Jenson, R. J. Kurman, and W. D. Lancaster, "Papillomavirus and cervical dysplasia," *Lancet*, vol. 2, p. 1190, Nov 29 1980.
- [13] M. Boshart, L. Gissmann, H. Ikenberg, A. Kleinheinze, W. Scheurlen, and H. zur Hausen, "A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer," *EMBO J*, vol. 3, pp. 1151-7, May 1984.
- [14] M. Durst, L. Gissmann, H. Ikenberg, and H. zur Hausen, "A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 80, pp. 3812-5, Jun 1983.
- [15] L. Gissmann and H. zur Hausen, "Partial characterization of viral DNA from human genital warts (Condylomata acuminata)," *Int J Cancer*, vol. 25, pp. 605-9, May 15 1980.

[16] L. Gissmann, V. Diehl, H. J. Schultz-Coulon, and H. zur Hausen, "Molecular cloning and characterization of human papilloma virus DNA derived from a laryngeal papilloma," *J Virol*, vol. 44, pp. 393-400, Oct 1982.

[17] H. zur Hausen, "Human genital cancer: synergism between two virus infections or synergism between a virus infection and initiating events?," *Lancet*, vol. 2, pp. 1370-2, Dec 18 1982.

[18] G. Riou, M. Barrois, I. Tordjman, V. Dutronquay, and G. Orth, "[Presence of papillomavirus genomes and amplification of the c-myc and C-Ha-ras oncogenes in invasive cancers of the uterine cervix]," *C R Acad Sci III*, vol. 299, pp. 575-80, 1984.

[19] H. Shirasawa, Y. Tomita, S. Sekiya, H. Takamizawa, and B. Simizu, "Integration and transcription of human papillomavirus type 16 and 18 sequences in cell lines derived from cervical carcinomas," *J Gen Virol*, vol. 68 (Pt 2), pp. 583-91, Feb 1987.

[20] F. X. Bosch, M. M. Manos, N. Munoz, M. Sherman, A. M. Jansen, J. Peto, M. H. Schiffman, V. Moreno, R. Kurman, and K. V. Shah, "Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group," *J Natl Cancer Inst*, vol. 87, pp. 796-802, Jun 7 1995.

[21] T. Matsukura and M. Sugase, "Identification of genital human papillomaviruses in cervical biopsy specimens: segregation of specific virus types in specific clinicopathologic lesions," *Int J Cancer*, vol. 61, pp. 13-22, Mar 29 1995.

[22] N. Munoz, F. X. Bosch, S. de Sanjose, L. Tafur, I. Izarzugaza, M. Gili, P. Viladiu, C. Navarro, C. Martos, N. Ascunce, and 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*, vol. 52, pp. 743-9, Nov 11 1992.

[23] H. zur Hausen, "Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis," *J Natl Cancer Inst*, vol. 92, pp. 690-8, May 3 2000.

[24] E. F. Dunne, E. R. Unger, M. Sternberg, G. McQuillan, D. C. Swan, S. S. Patel, and L. E. Markowitz, "Prevalence of HPV infection among females in the United States," *JAMA*, vol. 297, pp. 813-9, Feb 28 2007.

[25] W. Bonnez, R. K. Elswick, Jr., A. Bailey-Farchione, D. Hallahan, R. Bell, R. Isenberg, M. H. Stoler, and R. C. Reichman, "Efficacy and safety of 0.5% podofilox solution in the treatment and suppression of anogenital warts," *Am J Med*, vol. 96, pp. 420-5, May 1994.

[26] M. B. Quan and R. L. Moy, "The role of human papillomavirus in carcinoma," *J Am Acad Dermatol*, vol. 25, pp. 698-705, Oct 1991.

[27] C. M. Proby, L. Churchill, P. E. Purkis, M. T. Glover, C. J. Sexton, and I. M. Leigh, "Keratin 17 expression as a marker for epithelial transformation in viral warts," *Am J Pathol*, vol. 143, pp. 1667-78, Dec 1993.

- [28] G. Andrei, R. Snoeck, J. Piette, P. Delvenne, and E. De Clercq, "Antiproliferative effects of acyclic nucleoside phosphonates on human papillomavirus (HPV)-harboring cell lines compared with HPV-negative cell lines," *Oncol Res*, vol. 10, pp. 523-31, 1998.
- [29] A. L. Combita, A. Touze, L. Bousarghin, P. Y. Sizaret, N. Munoz, and P. Coursaget, "Gene transfer using human papillomavirus pseudovirions varies according to virus genotype and requires cell surface heparan sulfate," *FEMS Microbiol Lett*, vol. 204, pp. 183-8, Oct 16 2001.
- [30] D. M. Gilbert and S. N. Cohen, "Bovine papilloma virus plasmids replicate randomly in mouse fibroblasts throughout S phase of the cell cycle," *Cell*, vol. 50, pp. 59-68, Jul 3 1987.
- [31] T. Giroglou, L. Florin, F. Schafer, R. E. Streeck, and M. Sapp, "Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate," *J Virol*, vol. 75, pp. 1565-70, Feb 2001.
- [32] J. G. Joyce, J. S. Tung, C. T. Przysiecki, J. C. Cook, E. D. Lehman, J. A. Sands, K. U. Jansen, and P. M. Keller, "The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes," *J Biol Chem*, vol. 274, pp. 5810-22, Feb 26 1999.
- [33] M. S. Campo, "Animal models of papillomavirus pathogenesis," *Virus Res*, vol. 89, pp. 249-61, Nov 2002.
- [34] R. Klaes, S. M. Woerner, R. Ridder, N. Wentzensen, M. Duerst, A. Schneider, B. Lotz, P. Melsheimer, and M. von Knebel Doeberitz, "Detection of high-risk cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer by amplification of transcripts derived from integrated papillomavirus oncogenes," *Cancer Res*, vol. 59, pp. 6132-6, Dec 15 1999.
- [35] A. H. Hopman, F. Smedts, W. Dignef, M. Ummelen, G. Sonke, M. Mravunac, G. P. Vooijs, E. J. Speel, and F. C. Ramaekers, "Transition of high-grade cervical intraepithelial neoplasia to micro-invasive carcinoma is characterized by integration of HPV 16/18 and numerical chromosome abnormalities," *J Pathol*, vol. 202, pp. 23-33, Jan 2004.
- [36] M. R. Pett, W. O. Alazawi, I. Roberts, S. Downen, D. I. Smith, M. A. Stanley, and N. Coleman, "Acquisition of high-level chromosomal instability is associated with integration of human papillomavirus type 16 in cervical keratinocytes," *Cancer Res*, vol. 64, pp. 1359-68, Feb 15 2004.
- [37] N. Wentzensen, S. Vinokurova, and M. von Knebel Doeberitz, "Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract," *Cancer Res*, vol. 64, pp. 3878-84, Jun 1 2004.
- [38] M. J. Ferber, E. C. Thorland, A. A. Brink, A. K. Rapp, L. A. Phillips, R. McGovern, B. S. Gostout, T. H. Cheung, T. K. Chung, W. Y. Fu, and D. I. Smith, "Preferential integration of human papillomavirus type 18 near the c-myc locus in cervical carcinoma," *Oncogene*, vol. 22, pp. 7233-42, Oct 16 2003.

- [39] M. Kalantari, E. Blennow, B. Hagmar, and B. Johansson, "Physical state of HPV16 and chromosomal mapping of the integrated form in cervical carcinomas," *Diagn Mol Pathol*, vol. 10, pp. 46-54, Mar 2001.
- [40] A. P. Cullen, R. Reid, M. Campion, and A. T. Lorincz, "Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm," *J Virol*, vol. 65, pp. 606-12, Feb 1991.
- [41] M. von Knebel Doeberitz, T. Bauknecht, D. Bartsch, and H. zur Hausen, "Influence of chromosomal integration on glucocorticoid-regulated transcription of growth-stimulating papillomavirus genes E6 and E7 in cervical carcinoma cells," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 88, pp. 1411-5, Feb 15 1991.
- [42] S. Jeon and P. F. Lambert, "Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 92, pp. 1654-8, Feb 28 1995.
- [43] S. Jeon, B. L. Allen-Hoffmann, and P. F. Lambert, "Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells," *J Virol*, vol. 69, pp. 2989-97, May 1995.
- [44] M. Peter, C. Rosty, J. Couturier, F. Radvanyi, H. Teshima, and X. Sastre-Garau, "MYC activation associated with the integration of HPV DNA at the MYC locus in genital tumors," *Oncogene*, vol. 25, pp. 5985-93, Sep 28 2006.
- [45] S. Reuter, M. Bartelmann, M. Vogt, C. Geisen, I. Napierski, T. Kahn, H. Delius, P. Lichter, S. Weitz, B. Korn, and E. Schwarz, "APM-1, a novel human gene, identified by aberrant co-transcription with papillomavirus oncogenes in a cervical carcinoma cell line, encodes a BTB/POZ-zinc finger protein with growth inhibitory activity," *EMBO J*, vol. 17, pp. 215-22, Jan 2 1998.
- [46] C. Ziegert, N. Wentzensen, S. Vinokurova, F. Kisseljov, J. Einenkel, M. Hoeckel, and M. von Knebel Doeberitz, "A comprehensive analysis of HPV integration loci in anogenital lesions combining transcript and genome-based amplification techniques," *Oncogene*, vol. 22, pp. 3977-84, Jun 19 2003.
- [47] S. Vinokurova, N. Wentzensen, I. Kraus, R. Klaes, C. Driesch, P. Melsheimer, F. Kisseljov, M. Durst, A. Schneider, and M. von Knebel Doeberitz, "Type-dependent integration frequency of human papillomavirus genomes in cervical lesions," *Cancer Res*, vol. 68, pp. 307-13, Jan 1 2008.
- [48] T. D. Kesis, D. C. Connolly, L. Hedrick, and K. R. Cho, "Expression of HPV16 E6 or E7 increases integration of foreign DNA," *Oncogene*, vol. 13, pp. 427-31, Jul 18 1996.
- [49] P. Melsheimer, S. Vinokurova, N. Wentzensen, G. Bastert, and M. von Knebel Doeberitz, "DNA aneuploidy and integration of human papillomavirus type 16 e6/e7 oncogenes in intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma of the cervix uteri," *Clin Cancer Res*, vol. 10, pp. 3059-63, May 1 2004.
- [50] M. Durst, A. Kleinheinz, M. Hotz, and L. Gissmann, "The physical state of human papillomavirus type 16 DNA in benign and malignant genital tumours," *J Gen Virol*, vol. 66 (Pt 7), pp. 1515-22, Jul 1985.

[51] S. C. Cotton, L. Sharp, R. Seth, L. F. Masson, J. Little, M. E. Cruickshank, K. Neal, and N. Waugh, "Lifestyle and socio-demographic factors associated with high-risk HPV infection in UK women," *Br J Cancer*, vol. 97, pp. 133-9, Jul 2 2007.

[52] S. Vaccarella, R. Herrero, M. Dai, P. J. Snijders, C. J. Meijer, J. O. Thomas, P. T. Hoang Anh, C. Ferreccio, E. Matos, H. Posso, S. de Sanjose, H. R. Shin, S. Sukvirach, E. Lazcano-Ponce, G. Ronco, R. Rajkumar, Y. L. Qiao, N. Munoz, and S. Franceschi, "Reproductive factors, oral contraceptive use, and human papillomavirus infection: pooled analysis of the IARC HPV prevalence surveys," *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, vol. 15, pp. 2148-53, Nov 2006.

[53] A. B. Moscicki, N. Hills, S. Shiboski, K. Powell, N. Jay, E. Hanson, S. Miller, L. Clayton, S. Farhat, J. Broering, T. Darragh, and J. Palefsky, "Risks for incident human papillomavirus infection and low-grade squamous intraepithelial lesion development in young females," *JAMA*, vol. 285, pp. 2995-3002, Jun 20 2001.

[54] P. E. Castle, S. Wacholder, M. E. Sherman, A. T. Lorincz, A. G. Glass, D. R. Scott, B. B. Rush, F. Demuth, and M. Schiffman, "Absolute risk of a subsequent abnormal pap among oncogenic human papillomavirus DNA-positive, cytologically negative women," *Cancer*, vol. 95, pp. 2145-51, Nov 15 2002.

[55] S. Kjaer, E. Hogdall, K. Frederiksen, C. Munk, A. van den Brule, E. Svare, C. Meijer, A. Lorincz, and T. Iftner, "The absolute risk of cervical abnormalities in high-risk human papillomavirus-positive, cytologically normal women over a 10-year period," *Cancer Res*, vol. 66, pp. 10630-6, Nov 1 2006.

[56] M. J. Khan, P. E. Castle, A. T. Lorincz, S. Wacholder, M. Sherman, D. R. Scott, B. B. Rush, A. G. Glass, and M. Schiffman, "The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice," *J Natl Cancer Inst*, vol. 97, pp. 1072-9, Jul 20 2005.

[57] M. Stanley, "Immune responses to human papillomavirus," *Vaccine*, vol. 24 Suppl 1, pp. S16-22, Mar 30 2006.

[58] M. Schiffman, R. Herrero, R. Desalle, A. Hildesheim, S. Wacholder, A. C. Rodriguez, M. C. Bratti, M. E. Sherman, J. Morales, D. Guillen, M. Alfaro, M. Hutchinson, T. C. Wright, D. Solomon, Z. Chen, J. Schussler, P. E. Castle, and R. D. Burk, "The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution," *Virology*, vol. 337, pp. 76-84, Jun 20 2005.

[59] M. Plummer, M. Schiffman, P. E. Castle, D. Maucort-Boulch, and C. M. Wheeler, "A 2-year prospective study of human papillomavirus persistence among women with a cytological diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance or low-grade squamous intraepithelial lesion," *J Infect Dis*, vol. 195, pp. 1582-9, Jun 1 2007.

[60] P. E. Castle, D. Solomon, M. Schiffman, and C. M. Wheeler, "Human papillomavirus type 16 infections and 2-year absolute risk of cervical precancer in women with equivocal or mild cytologic abnormalities," *J Natl Cancer Inst*, vol. 97, pp. 1066-71, Jul 20 2005.

[61] R. Herrero, P. E. Castle, M. Schiffman, M. C. Bratti, A. Hildesheim, J. Morales, M. Alfaro, M. E. Sherman, S. Wacholder, S. Chen, A. C. Rodriguez, and R. D. Burk, "Epidemiologic profile of type-specific human papillomavirus infection and cervical neoplasia in Guanacaste, Costa Rica," *J Infect Dis*, vol. 191, pp. 1796-807, Jun 1 2005.

[62] P. E. Castle, M. Schiffman, R. Herrero, A. Hildesheim, A. C. Rodriguez, M. C. Bratti, M. E. Sherman, S. Wacholder, R. Tarone, and R. D. Burk, "A prospective study of age trends in cervical human papillomavirus acquisition and persistence in Guanacaste, Costa Rica," *J Infect Dis*, vol. 191, pp. 1808-16, Jun 1 2005.

[63] N. W. Bulkman, J. Berkhof, S. Bulk, M. C. Bleeker, F. J. van Kemenade, L. Rozendaal, P. J. Snijders, and C. J. Meijer, "High-risk HPV type-specific clearance rates in cervical screening," *Br J Cancer*, vol. 96, pp. 1419-24, May 7 2007.

[64] M. Schiffman and S. K. Kjaer, "Chapter 2: Natural history of anogenital human papillomavirus infection and neoplasia," *J Natl Cancer Inst Monogr*, pp. 14-9, 2003.

[65] H. D. Strickler, R. D. Burk, M. Fazzari, K. Anastos, H. Minkoff, L. S. Massad, C. Hall, M. Bacon, A. M. Levine, D. H. Watts, M. J. Silverberg, X. Xue, N. F. Schlecht, S. Melnick, and J. M. Palefsky, "Natural history and possible reactivation of human papillomavirus in human immunodeficiency virus-positive women," *J Natl Cancer Inst*, vol. 97, pp. 577-86, Apr 20 2005.

[66] G. F. Sawaya, K. J. McConnell, S. L. Kulasingam, H. W. Lawson, K. Kerlikowske, J. Melnikow, N. C. Lee, G. Gildengorin, E. R. Myers, and A. E. Washington, "Risk of cervical cancer associated with extending the interval between cervical-cancer screenings," *N Engl J Med*, vol. 349, pp. 1501-9, Oct 16 2003.

[67] J. T. Cox, M. Schiffman, and D. Solomon, "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*, vol. 188, pp. 1406-12, Jun 2003.

[68] M. H. Stoler and M. Schiffman, "Interobserver reproducibility of cervical cytologic and histologic interpretations: realistic estimates from the ASCUS-LSIL Triage Study," *JAMA*, vol. 285, pp. 1500-5, Mar 21 2001.

[69] R. P. Insinga, E. J. Dasbach, and E. H. Elbasha, "Epidemiologic natural history and clinical management of Human Papillomavirus (HPV) Disease: a critical and systematic review of the literature in the development of an HPV dynamic transmission model," *BMC Infect Dis*, vol. 9, p. 119, 2009.

[70] R. P. Insinga, E. J. Dasbach, E. H. Elbasha, K. L. Liaw, and E. Barr, "Progression and regression of incident cervical HPV 6, 11, 16 and 18 infections in young women," *Infect Agent Cancer*, vol. 2, p. 15, 2007.

[71] R. L. Winer, N. B. Kiviat, J. P. Hughes, D. E. Adam, S. K. Lee, J. M. Kuypers, and L. A. Koutsky, "Development and duration of human papillomavirus lesions, after initial infection," *J Infect Dis*, vol. 191, pp. 731-8, Mar 1 2005.

[72] M. S. Mikhail, I. R. Merkatz, and S. L. Romney, "Clinical usefulness of computerized colposcopy: image analysis and conservative management of mild dysplasia," *Obstet Gynecol*, vol. 80, pp. 5-8, Jul 1992.

[73] V. Kataja, K. Syrjanen, R. Mantyjarvi, M. Vayrynen, S. Syrjanen, S. Saarikoski, S. Parkkinen, M. Yliskoski, J. T. Salonen, and O. Castren, "Prospective follow-up of cervical HPV infections: life table analysis of histopathological, cytological and colposcopic data," *Eur J Epidemiol*, vol. 5, pp. 1-7, Mar 1989.

[74] C. Aoyama, J. Peters, S. Senadheera, P. Liu, and H. Shimada, "Uterine cervical dysplasia and cancer: identification of c-myc status by quantitative polymerase chain reaction," *Diagn Mol Pathol*, vol. 7, pp. 324-30, Dec 1998.

[75] M. F. Evans, S. L. Mount, B. G. Beatty, and K. Cooper, "Biotinyl-tyramide-based in situ hybridization signal patterns distinguish human papillomavirus type and grade of cervical intraepithelial neoplasia," *Mod Pathol*, vol. 15, pp. 1339-47, Dec 2002.

[76] C. Isacson, T. D. Kessis, L. Hedrick, and K. R. Cho, "Both cell proliferation and apoptosis increase with lesion grade in cervical neoplasia but do not correlate with human papillomavirus type," *Cancer Res*, vol. 56, pp. 669-74, Feb 15 1996.

[77] B. J. Quade, J. J. Park, C. P. Crum, D. Sun, and A. Dutta, "In vivo cyclin E expression as a marker for early cervical neoplasia," *Mod Pathol*, vol. 11, pp. 1238-46, Dec 1998.

[78] K. R. Shroyer, G. S. Lovelace, M. L. Abarca, R. H. Fennell, M. E. Corkill, W. D. Woodard, and G. H. Davilla, "Detection of human papillomavirus DNA by in situ hybridization and polymerase chain reaction in human papillomavirus equivocal and dysplastic cervical biopsies," *Hum Pathol*, vol. 24, pp. 1012-6, Sep 1993.

[79] D. De Aloysio, L. Miliffi, T. Iannicelli, P. Penacchioni, and F. Bottiglioni, "Intramuscular interferon-beta treatment of cervical intraepithelial neoplasia II associated with human papillomavirus infection," *Acta Obstet Gynecol Scand*, vol. 73, pp. 420-4, May 1994.

[80] L. Westergaard and M. Norgaard, "Severe cervical dysplasia. Control by biopsies or primary conization? A comparative study," *Acta Obstet Gynecol Scand*, vol. 60, pp. 549-54, 1981.

[81] S. J. Goldie, M. Kohli, D. Grima, M. C. Weinstein, T. C. Wright, F. X. Bosch, and E. Franco, "Projected clinical benefits and cost-effectiveness of a human papillomavirus 16/18 vaccine," *J Natl Cancer Inst*, vol. 96, pp. 604-15, Apr 21 2004.

[82] G. D. Sanders and A. V. Taira, "Cost-effectiveness of a potential vaccine for human papillomavirus," *Emerg Infect Dis*, vol. 9, pp. 37-48, Jan 2003.

[83] S. L. Kulasingam, J. P. Hughes, N. B. Kiviat, C. Mao, N. S. Weiss, J. M. Kuypers, and L. A. Koutsky, "Evaluation of human papillomavirus testing in primary screening for cervical abnormalities: comparison of sensitivity, specificity, and frequency of referral," *JAMA*, vol. 288, pp. 1749-57, Oct 9 2002.

[84] S. L. Kulasingam and E. R. Myers, "Potential health and economic impact of adding a human papillomavirus vaccine to screening programs," *JAMA*, vol. 290, pp. 781-9, Aug 13 2003.

[85] C. B. Woodman, S. Collins, H. Winter, A. Bailey, J. Ellis, P. Prior, M. Yates, T. P. Rollason, and L. S. Young, "Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: a longitudinal cohort study," *Lancet*, vol. 357, pp. 1831-6, Jun 9 2001.

[86] R. L. Winer, S. K. Lee, J. P. Hughes, D. E. Adam, N. B. Kiviat, and L. A. Koutsky, "Genital human papillomavirus infection: incidence and risk factors in a cohort of female university students," *Am J Epidemiol*, vol. 157, pp. 218-26, Feb 1 2003.

[87] H. Richardson, G. Kelsall, P. Tellier, H. Voyer, M. Abrahamowicz, A. Ferenczy, F. Coutlee, and E. L. Franco, "The natural history of type-specific human papillomavirus infections in female university students," *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, vol. 12, pp. 485-90, Jun 2003.

[88] A. C. Rodriguez, R. Burk, R. Herrero, A. Hildesheim, C. Bratti, M. E. Sherman, D. Solomon, D. Guillen, M. Alfaro, R. Viscidi, J. Morales, M. Hutchinson, S. Wacholder, and M. Schiffman, "The natural history of human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia among young women in the Guanacaste cohort shortly after initiation of sexual life," *Sex Transm Dis*, vol. 34, pp. 494-502, Jul 2007.

[89] L. Gustafsson, J. Ponten, M. Zack, and H. O. Adami, "International incidence rates of invasive cervical cancer after introduction of cytological screening," *Cancer Causes Control*, vol. 8, pp. 755-63, Sep 1997.

[90] J. Peto, C. Gilham, O. Fletcher, and F. E. Matthews, "The cervical cancer epidemic that screening has prevented in the UK," *Lancet*, vol. 364, pp. 249-56, Jul 17-23 2004.

[91] A. R. Chang, "Carcinoma in situ of the cervix and its malignant potential. A lesson from New Zealand," *Cytopathology*, vol. 1, pp. 321-8, 1990.

[92] L. J. Kinlen and A. I. Spriggs, "Women with positive cervical smears but without surgical intervention. A follow-up study," *Lancet*, vol. 2, pp. 463-5, Aug 26 1978.

[93] P. Appleby, V. Beral, A. Berrington de Gonzalez, D. Colin, S. Franceschi, A. Goodill, J. Green, J. Peto, M. Plummer, and S. Sweetland, "Carcinoma of the cervix and tobacco smoking: collaborative reanalysis of individual data on 13,541 women with carcinoma of the cervix and 23,017 women without carcinoma of the cervix from 23 epidemiological studies," *Int J Cancer*, vol. 118, pp. 1481-95, Mar 15 2006.

[94] I. Frosio, M. Spadea, E. De Momi, M. Riboldi, G. Baroni, G. Ferrigno, R. Orecchia, and A. Pedotti, "A neural network based method for optical

patient set-up registration in breast radiotherapy," *Ann Biomed Eng*, vol. 34, pp. 677-86, Apr 2006.

[95] J. S. Smith, J. Green, A. Berrington de Gonzalez, P. Appleby, J. Peto, M. Plummer, S. Franceschi, and V. Beral, "Cervical cancer and use of hormonal contraceptives: a systematic review," *Lancet*, vol. 361, pp. 1159-67, Apr 5 2003.

[96] J. S. Smith, C. Bosetti, N. Munoz, R. Herrero, F. X. Bosch, J. Eluf-Neto, C. J. Meijer, A. J. Van Den Brule, S. Franceschi, and R. W. Peeling, "Chlamydia trachomatis and invasive cervical cancer: a pooled analysis of the IARC multicentric case-control study," *Int J Cancer*, vol. 111, pp. 431-9, Sep 1 2004.

[97] R. Garcia-Closas, X. Castellsague, X. Bosch, and C. A. Gonzalez, "The role of diet and nutrition in cervical carcinogenesis: a review of recent evidence," *Int J Cancer*, vol. 117, pp. 629-37, Nov 20 2005.

[98] M. J. Khan, E. E. Partridge, S. S. Wang, and M. Schiffman, "Socioeconomic status and the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 among oncogenic human papillomavirus DNA-positive women with equivocal or mildly abnormal cytology," *Cancer*, vol. 104, pp. 61-70, Jul 1 2005.

[99] C. J. Hogewoning, M. C. Bleeker, A. J. van den Brule, F. J. Voorhorst, P. J. Snijders, J. Berkhof, P. J. Westenberg, and C. J. Meijer, "Condom use promotes regression of cervical intraepithelial neoplasia and clearance of human papillomavirus: a randomized clinical trial," *Int J Cancer*, vol. 107, pp. 811-6, Dec 10 2003.

[100] H. Richardson, M. Abrahamowicz, P. P. Tellier, G. Kelsall, R. du Berger, A. Ferenczy, F. Coutlee, and E. L. Franco, "Modifiable risk factors associated with clearance of type-specific cervical human papillomavirus infections in a cohort of university students," *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, vol. 14, pp. 1149-56, May 2005.

[101] J. M. Palefsky, M. L. Gillison, and H. D. Strickler, "Chapter 16: HPV vaccines in immunocompromised women and men," *Vaccine*, vol. 24 Suppl 3, pp. S3/140-6, Aug 31 2006.

[102] J. S. Smith, L. Lindsay, B. Hoots, J. Keys, S. Franceschi, R. Winer, and G. M. Clifford, "Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update," *Int J Cancer*, vol. 121, pp. 621-32, Aug 1 2007.

[103] P. Peitsaro, B. Johansson, and S. Syrjanen, "Integrated human papillomavirus type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative real-time PCR technique," *J Clin Microbiol*, vol. 40, pp. 886-91, Mar 2002.

[104] W. K. Huh, "Human papillomavirus infection: a concise review of natural history," *Obstet Gynecol*, vol. 114, pp. 139-43, Jul 2009.

[105] F. X. Bosch, A. N. Burchell, M. Schiffman, A. R. Giuliano, S. de Sanjose, L. Bruni, G. Tortolero-Luna, S. K. Kjaer, and N. Munoz, "Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific

implications in cervical neoplasia," *Vaccine*, vol. 26 Suppl 10, pp. K1-16, Aug 19 2008.

[106] G. M. Clifford, S. Gallus, R. Herrero, N. Munoz, P. J. Snijders, S. Vaccarella, P. T. Anh, C. Ferreccio, N. T. Hieu, E. Matos, M. Molano, R. Rajkumar, G. Ronco, S. de Sanjose, H. R. Shin, S. Sukvirach, J. O. Thomas, S. Tunsakul, C. J. Meijer, and S. Franceschi, "Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis," *Lancet*, vol. 366, pp. 991-8, Sep 17-23 2005.

[107] A. Hildesheim and S. S. Wang, "Host and viral genetics and risk of cervical cancer: a review," *Virus Res*, vol. 89, pp. 229-40, Nov 2002.

[108] H. D. Strickler, J. M. Palefsky, K. V. Shah, K. Anastos, R. S. Klein, H. Minkoff, A. Duerr, L. S. Massad, D. D. Celentano, C. Hall, M. Fazzari, S. Cu-Uvin, M. Bacon, P. Schuman, A. M. Levine, A. J. Durante, S. Gange, S. Melnick, and R. D. Burk, "Human papillomavirus type 16 and immune status in human immunodeficiency virus-seropositive women," *J Natl Cancer Inst*, vol. 95, pp. 1062-71, Jul 16 2003.

[109] G. Clifford, S. Franceschi, M. Diaz, N. Munoz, and L. L. Villa, "Chapter 3: HPV type-distribution in women with and without cervical neoplastic diseases," *Vaccine*, vol. 24 Suppl 3, pp. S3/26-34, Aug 31 2006.

[110] C. E. Depuydt, A. J. Vereecken, G. M. Salembier, A. S. Vanbrabant, L. A. Boels, E. van Herck, M. Arbyn, K. Segers, and J. J. Bogers, "Thin-layer liquid-based cervical cytology and PCR for detecting and typing human papillomavirus DNA in Flemish women," *Br J Cancer*, vol. 88, pp. 560-6, Feb 24 2003.

[111] G. M. Clifford, R. K. Rana, S. Franceschi, J. S. Smith, G. Gough, and J. M. Pimenta, "Human papillomavirus genotype distribution in low-grade cervical lesions: comparison by geographic region and with cervical cancer," *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, vol. 14, pp. 1157-64, May 2005.

[112] E. M. Smith, J. M. Ritchie, M. Pawlita, L. M. Rubenstein, T. H. Haugen, L. P. Turek, and E. Hamsikova, "Human papillomavirus seropositivity and risks of head and neck cancer," *Int J Cancer*, vol. 120, pp. 825-32, Feb 15 2007.

[113] G. M. Clifford, J. S. Smith, T. Aguado, and S. Franceschi, "Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: a meta-analysis," *Br J Cancer*, vol. 89, pp. 101-5, Jul 7 2003.

[114] J. M. Walboomers, M. V. Jacobs, M. M. Manos, F. X. Bosch, J. A. Kummer, K. V. Shah, P. J. Snijders, J. Peto, C. J. Meijer, and N. Munoz, "Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide," *J Pathol*, vol. 189, pp. 12-9, Sep 1999.

[115] N. Munoz, F. X. Bosch, X. Castellsague, M. Diaz, S. de Sanjose, D. Hammouda, K. V. Shah, and C. J. Meijer, "Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective," *Int J Cancer*, vol. 111, pp. 278-85, Aug 20 2004.

[116] "HPV and cervical cancer in the 2007 report," *Vaccine*, vol. 25 Suppl 3, pp. C1-230, Nov 1 2007.

[117] G. M. Clifford, J. S. Smith, M. Plummer, N. Munoz, and S. Franceschi, "Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis," *Br J Cancer*, vol. 88, pp. 63-73, Jan 13 2003.

[118] S. de Sanjose, M. Diaz, X. Castellsague, G. Clifford, L. Bruni, N. Munoz, and F. X. Bosch, "Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis," *Lancet Infect Dis*, vol. 7, pp. 453-9, Jul 2007.

[119] X. Castellsague, M. Diaz, S. de Sanjose, N. Munoz, R. Herrero, S. Franceschi, R. W. Peeling, R. Ashley, J. S. Smith, P. J. Snijders, C. J. Meijer, and F. X. Bosch, "Worldwide human papillomavirus etiology of cervical adenocarcinoma and its cofactors: implications for screening and prevention," *J Natl Cancer Inst*, vol. 98, pp. 303-15, Mar 1 2006.

[120] H. De Vuyst, G. Clifford, N. Li, and S. Franceschi, "HPV infection in Europe," *Eur J Cancer*, vol. 45, pp. 2632-9, Oct 2009.

[121] P. Laukkanen, P. Koskela, E. Pukkala, J. Dillner, E. Laara, P. Knekt, and M. Lehtinen, "Time trends in incidence and prevalence of human papillomavirus type 6, 11 and 16 infections in Finland," *J Gen Virol*, vol. 84, pp. 2105-9, Aug 2003.

[122] J. Peto, C. Gilham, J. Deacon, C. Taylor, C. Evans, W. Binns, M. Haywood, N. Elanko, D. Coleman, R. Yule, and M. Desai, "Cervical HPV infection and neoplasia in a large population-based prospective study: the Manchester cohort," *Br J Cancer*, vol. 91, pp. 942-53, Aug 31 2004.

[123] S. Franceschi, R. Herrero, G. M. Clifford, P. J. Snijders, A. Arslan, P. T. Anh, F. X. Bosch, C. Ferreccio, N. T. Hieu, E. Lazcano-Ponce, E. Matos, M. Molano, Y. L. Qiao, R. Rajkumar, G. Ronco, S. de Sanjose, H. R. Shin, S. Sukvirach, J. O. Thomas, C. J. Meijer, and N. Munoz, "Variations in the age-specific curves of human papillomavirus prevalence in women worldwide," *Int J Cancer*, vol. 119, pp. 2677-84, Dec 1 2006.

[124] P. E. Castle, J. Jeronimo, M. Schiffman, R. Herrero, A. C. Rodriguez, M. C. Bratti, A. Hildesheim, S. Wacholder, L. R. Long, L. Neve, R. Pfeiffer, and R. D. Burk, "Age-related changes of the cervix influence human papillomavirus type distribution," *Cancer Res*, vol. 66, pp. 1218-24, Jan 15 2006.

[125] N. Munoz, F. Mendez, H. Posso, M. Molano, A. J. van den Brule, M. Ronderos, C. Meijer, and A. Munoz, "Incidence, duration, and determinants of cervical human papillomavirus infection in a cohort of Colombian women with normal cytological results," *J Infect Dis*, vol. 190, pp. 2077-87, Dec 15 2004.

[126] K. Wellings, M. Collumbien, E. Slaymaker, S. Singh, Z. Hodges, D. Patel, and N. Bajos, "Sexual behaviour in context: a global perspective," *Lancet*, vol. 368, pp. 1706-28, Nov 11 2006.

[127] P. Konofaos, P. Tomos, K. Malagari, A. Karakatsani, D. Pavlopoulos, E. Lachanas, M. Flessas, A. Kostakis, and P. Karakitsos, "The role

of ThinPrep cytology in the investigation of lung tumors," *Surg Oncol*, vol. 15, pp. 173-8, Nov 2006.

[128] P. Appleby, V. Beral, A. Berrington de Gonzalez, D. Colin, S. Franceschi, A. Goodhill, J. Green, J. Peto, M. Plummer, and S. Sweetland, "Cervical cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data for 16,573 women with cervical cancer and 35,509 women without cervical cancer from 24 epidemiological studies," *Lancet*, vol. 370, pp. 1609-21, Nov 10 2007.

[129] K. R. Geisinger, *Modern cytopathology*. Philadelphia, Pa.: Churchill Livingstone, 2004.

[130] A. Meisels and C. Morin, *Cytopathology of the uterine cervix*. Chicago: ASCP Press, 1991.

[131] H. F. Nauth, *Gynecological cytology*. Stuttgart ; New York: Thieme, 2007.

[132] D. Solomon and R. Nayar, *The Bethesda system for reporting cervical cytology : definitions, criteria, and explanatory notes*, 2nd ed. New York: Springer, 2004.

[133] R. M. Richart, "Cervical intraepithelial neoplasia," *Pathol Annu*, vol. 8, pp. 301-28, 1973.

[134] D. Solomon, D. Davey, R. Kurman, A. Moriarty, D. O'Connor, M. Prey, S. Raab, M. Sherman, D. Wilbur, T. Wright, Jr., and N. Young, "The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology," *JAMA*, vol. 287, pp. 2114-9, Apr 24 2002.

[135] World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumors of the Breast and Female Genital Organs. Lyon: IARC Press, 2003.

[136] L. Breiman, *Classification and regression trees*. Belmont, Calif.: Wadsworth International Group, 1984.

[137] M. Arbyn, A. Antilla, and J. A. Jordan, Eds., *European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening*. Luxembourg: European Commission, 2008, p.^pp. Pages.

[138] A. Anttila, L. von Karsa, A. Aasmaa, M. Fender, J. Patnick, M. Rebolj, F. Nicula, L. Vass, Z. Valerianova, L. Voti, C. Sauvaget, and G. Ronco, "Cervical cancer screening policies and coverage in Europe," *Eur J Cancer*, vol. 45, pp. 2649-58, Oct 2009.

[139] International Agency for Research on Cancer. IARC monograph on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2007.

[140] M. Arbyn, C. Bergeron, P. Klinkhamer, P. Martin-Hirsch, A. G. Siebers, and J. Bulten, "Liquid compared with conventional cervical cytology: a systematic review and meta-analysis," *Obstet Gynecol*, vol. 111, pp. 167-77, Jan 2008.

[141] G. Ronco, P. Giorgi-Rossi, F. Carozzi, P. Dalla Palma, A. Del Mistro, L. De Marco, M. De Lillo, C. Naldoni, P. Pierotti, R. Rizzolo, N. Segnan, P.

Schincaglia, M. Zorzi, M. Confortini, and J. Cuzick, "Human papillomavirus testing and liquid-based cytology in primary screening of women younger than 35 years: results at recruitment for a randomised controlled trial," *Lancet Oncol*, vol. 7, pp. 547-55, Jul 2006.

[142] G. Ronco, N. Segnan, P. Giorgi-Rossi, M. Zappa, G. P. Casadei, F. Carozzi, P. Dalla Palma, A. Del Mistro, S. Folicaldi, A. Gillio-Tos, G. Nardo, C. Naldoni, P. Schincaglia, M. Zorzi, M. Confortini, and J. Cuzick, "Human papillomavirus testing and liquid-based cytology: results at recruitment from the new technologies for cervical cancer randomized controlled trial," *J Natl Cancer Inst*, vol. 98, pp. 765-74, Jun 7 2006.

[143] E. Davey, J. d'Assuncao, L. Irwig, P. Macaskill, S. F. Chan, A. Richards, and A. Farnsworth, "Accuracy of reading liquid based cytology slides using the ThinPrep Imager compared with conventional cytology: prospective study," *BMJ*, vol. 335, p. 31, Jul 7 2007.

[144] J. Cuzick, M. Arbyn, R. Sankaranarayanan, V. Tsu, G. Ronco, M. H. Mayrand, J. Dillner, and C. J. Meijer, "Overview of human papillomavirus-based and other novel options for cervical cancer screening in developed and developing countries," *Vaccine*, vol. 26 Suppl 10, pp. K29-41, Aug 19 2008.

[145] J. Paavonen, D. Jenkins, F. X. Bosch, P. Naud, J. Salmeron, C. M. Wheeler, S. N. Chow, D. L. Apter, H. C. Kitchener, X. Castellsague, N. S. de Carvalho, S. R. Skinner, D. M. Harper, J. A. Hedrick, U. Jaisamrarn, G. A. Limson, M. Dionne, W. Quint, B. Spiessens, P. Peeters, F. Struyf, S. L. Wieting, M. O. Lehtinen, and G. Dubin, "Efficacy of a prophylactic adjuvanted bivalent L1 virus-like-particle vaccine against infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: an interim analysis of a phase III double-blind, randomised controlled trial," *Lancet*, vol. 369, pp. 2161-70, Jun 30 2007.

[146] D. Levy-Bruhl, V. Bousquet, L. A. King, D. O'Flanagan, S. Bacci, P. L. Lopalco, and S. Salmaso, "The current state of introduction of HPV vaccination into national immunisation schedules in Europe: results of the VENICE 2008 survey," *Eur J Cancer*, vol. 45, pp. 2709-13, Oct 2009.

[147] E. Lund and T. Bjerkedal, "[Cancer in situ of the uterine cervix. Increased perinatal death and prematurity after conization]," *Tidsskr Nor Laegeforen*, vol. 106, pp. 543-6, Mar 10 1986.

[148] J. Kristensen, J. Langhoff-Roos, and F. B. Kristensen, "Increased risk of preterm birth in women with cervical conization," *Obstet Gynecol*, vol. 81, pp. 1005-8, Jun 1993.

[149] M. Kyrgiou, G. Koliopoulos, P. Martin-Hirsch, M. Arbyn, W. Prendiville, and E. Paraskevaides, "Obstetric outcomes after conservative treatment for intraepithelial or early invasive cervical lesions: systematic review and meta-analysis," *Lancet*, vol. 367, pp. 489-98, Feb 11 2006.

[150] P. Naucler, W. Ryd, S. Tornberg, A. Strand, G. Wadell, K. Elfgrén, T. Radberg, B. Strander, B. Johansson, O. Forslund, B. G. Hansson, E. Rylander, and J. Dillner, "Human papillomavirus and Papanicolaou tests to screen for cervical cancer," *N Engl J Med*, vol. 357, pp. 1589-97, Oct 18 2007.

[151] N. W. Bulkmands, J. Berkhof, L. Rozendaal, F. J. van Kemenade, A. J. Boeke, S. Bulk, F. J. Voorhorst, R. H. Verheijen, K. van Groningen, M. E. Boon, W. Ruitinga, M. van Ballegooijen, P. J. Snijders, and C. J. Meijer, "Human papillomavirus DNA testing for the detection of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 and cancer: 5-year follow-up of a randomised controlled implementation trial," *Lancet*, vol. 370, pp. 1764-72, Nov 24 2007.

[152] M. Arbyn, F. Buntinx, M. Van Ranst, E. Paraskevaidis, P. Martin-Hirsch, and J. Dillner, "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*, vol. 96, pp. 280-93, Feb 18 2004.

[153] E. A. Burger, H. Kornor, M. Klemp, V. Lauvrak, and I. S. Kristiansen, "HPV mRNA tests for the detection of cervical intraepithelial neoplasia: a systematic review," *Gynecol Oncol*, vol. 120, pp. 430-8, Mar 2011.

[154] K. Syrjanen, L. Di Bonito, L. Goncalves, L. Murjal, M. Santamaria, V. Mahovlic, P. Karakitsos, B. Onal, and F. C. Schmitt, "Cervical cancer screening in Mediterranean countries: implications for the future," *Cytopathology*, vol. 21, pp. 359-67, Dec 2010.

[155] M. R. Henry, "The Bethesda System 2001: an update of new terminology for gynecologic cytology," *Clin Lab Med*, vol. 23, pp. 585-603, Sep 2003.

[156] J. H. Smith, "Bethesda 2001," *Cytopathology*, vol. 13, pp. 4-10, Feb 2002.

[157] J. J. Gomez-Roman, C. Echevarria, S. Salas, M. A. Gonzalez-Moran, B. Perez-Mies, I. Garcia-Higuera, M. Nicolas Martinez, and J. F. Val-Bernal, "A type-specific study of human papillomavirus prevalence in cervicovaginal samples in three different Spanish regions," *APMIS*, vol. 117, pp. 22-7, Jan 2009.

[158] S. Tyagi, D. P. Bratu, and F. R. Kramer, "Multicolor molecular beacons for allele discrimination," *Nat Biotechnol*, vol. 16, pp. 49-53, Jan 1998.

[159] R. Narimatsu and B. K. Patterson, "High-throughput cervical cancer screening using intracellular human papillomavirus E6 and E7 mRNA quantification by flow cytometry," *Am J Clin Pathol*, vol. 123, pp. 716-23, May 2005.

[160] R. Klaes, A. Benner, T. Friedrich, R. Ridder, S. Herrington, D. Jenkins, R. J. Kurman, D. Schmidt, M. Stoler, and M. von Knebel Doeberitz, "p16INK4a immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia," *Am J Surg Pathol*, vol. 26, pp. 1389-99, Nov 2002.

[161] A. Jemal, F. Bray, M. M. Center, J. Ferlay, E. Ward, and D. Forman, "Global cancer statistics," *CA Cancer J Clin*, vol. 61, pp. 69-90, Mar-Apr 2011.

[162] H. L. Smits, B. van Gemen, R. Schukkink, J. van der Velden, A. H. S. P. Tjong, M. F. Jebbink, and J. ter Schegget, "Application of the NASBA nucleic acid amplification method for the detection of human papillomavirus type 16 E6-E7 transcripts," *J Virol Methods*, vol. 54, pp. 75-81, Jul 1995.

[163] C. Kottaridi, S. Tsiodras, A. Spathis, A. Chranioti, A. Pappas, D. Kassanos, I. Panayiotides, and P. Karakitsos, "Clinical performance of human papillomavirus E6, E7 mRNA flow cytometric assay compared to human papillomavirus DNA typing," *Anal Quant Cytol Histol*, vol. 33, pp. 305-10, Dec 2011.

[164] A. Trope, K. Sjoborg, A. Eskild, K. Cuschieri, T. Eriksen, S. Thoresen, M. Steinbakk, V. Laurak, C. M. Jonassen, U. Westerhagen, M. B. Jacobsen, and A. K. Lie, "Performance of human papillomavirus DNA and mRNA testing strategies for women with and without cervical neoplasia," *J Clin Microbiol*, vol. 47, pp. 2458-64, Aug 2009.

[165] S. W. Sorbye, S. Fismen, T. Gutteberg, and E. S. Mortensen, "Triage of women with minor cervical lesions: data suggesting a "test and treat" approach for HPV E6/E7 mRNA testing," *PLoS One*, vol. 5, p. e12724, 2010.

[166] G. Coquillard, B. Palao, and B. K. Patterson, "Quantification of intracellular HPV E6/E7 mRNA expression increases the specificity and positive predictive value of cervical cancer screening compared to HPV DNA," *Gynecol Oncol*, vol. 120, pp. 89-93, Jan 2011.

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

[168] I. Tsoumpou, M. Arbyn, M. Kyrgiou, N. Wentzensen, G. Koliopoulos, P. Martin-Hirsch, V. Malamou-Mitsi, and E. Paraskevidis, "p16(INK4a) immunostaining in cytological and histological specimens from the uterine cervix: a systematic review and meta-analysis," *Cancer Treat Rev*, vol. 35, pp. 210-20, May 2009.

[169] M. H. Mayrand, E. Duarte-Franco, I. Rodrigues, S. D. Walter, J. Hanley, A. Ferenczy, S. Ratnam, F. Coutlee, and E. L. Franco, "Human papillomavirus DNA versus Papanicolaou screening tests for cervical cancer," *N Engl J Med*, vol. 357, pp. 1579-88, Oct 18 2007.

[170] A. Mathew and P. S. George, "Trends in incidence and mortality rates of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of cervix--worldwide," *Asian Pac J Cancer Prev*, vol. 10, pp. 645-50, Oct-Dec 2009.

[171] P. Naucler, W. Ryd, S. Tornberg, A. Strand, G. Wadell, K. Elfgrén, T. Radberg, B. Strander, O. Forslund, B. G. Hansson, B. Hagmar, B. Johansson, E. Rylander, and J. Dillner, "Efficacy of HPV DNA testing with cytology triage and/or repeat HPV DNA testing in primary cervical cancer screening," *J Natl Cancer Inst*, vol. 101, pp. 88-99, Jan 21 2009.

[172] M. Benevolo, A. Vocaturo, D. Caraceni, D. French, S. Rosini, R. Zappacosta, I. Terrenato, L. Ciccocioppo, A. Frega, and P. Giorgi Rossi, "Sensitivity, specificity, and clinical value of human papillomavirus (HPV) E6/E7 mRNA assay as a triage test for cervical cytology and HPV DNA test," *J Clin Microbiol*, vol. 49, pp. 2643-50, Jul 2011.

[173] K. Cuschieri and N. Wentzensen, "Human papillomavirus mRNA and p16 detection as biomarkers for the improved diagnosis of cervical neoplasia," *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, vol. 17, pp. 2536-45, Oct 2008.

[174] F. M. Carozzi, "Combined analysis of HPV DNA and p16INK4a expression to predict prognosis in ASCUS and LSIL pap smears," *Coll Antropol*, vol. 31 Suppl 2, pp. 103-6, Apr 2007.

[175] K. J. Denton, C. Bergeron, P. Klement, M. J. Trunk, T. Keller, and R. Ridder, "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*, vol. 134, pp. 12-21, Jul 2010.

[176] A. Spathis, C. Kottaridi, A. Chranioti, C. Meristoudis, C. Chrelias, I. G. Panayiotides, E. Paraskevaides, and P. Karakitsos, "mRNA and DNA detection of human papillomaviruses in women of all ages attending two colposcopy clinics," *PLoS One*, vol. 7, p. e49205, 2012.

[177] P. Karakitsos, A. Pouliakis, C. Meristoudis, N. Margari, D. Kassanos, M. Kyrgiou, J. G. Panayiotides, and E. Paraskevaides, "A preliminary study of the potential of tree classifiers in triage of high-grade squamous intraepithelial lesions," *Anal Quant Cytol Histol*, vol. 33, pp. 132-40, Jun 2011.

[178] B. Cochand-Priollet, K. Koutroumbas, T. M. Megalopoulou, A. Pouliakis, G. Sivolapenko, and P. Karakitsos, "Discriminating benign from malignant thyroid lesions using artificial intelligence and statistical selection of morphometric features," *Oncol Rep*, vol. 15 Spec no., pp. 1023-6, 2006.

[179] P. Karakitsos, B. Cochand-Priollet, P. J. Guillausseau, and A. Pouliakis, "Potential of the back propagation neural network in the morphologic examination of thyroid lesions," *Anal Quant Cytol Histol*, vol. 18, pp. 494-500, Dec 1996.

[180] P. Karakitsos, E. B. Stergiou, A. Pouliakis, M. Tzivras, A. Archimandritis, A. I. Liossi, and K. Kyrkou, "Potential of the back propagation neural network in the discrimination of benign from malignant gastric cells," *Anal Quant Cytol Histol*, vol. 18, pp. 245-50, Jun 1996.

[181] C. Markopoulos, P. Karakitsos, E. Botsoli-Stergiou, A. Pouliakis, A. Ioakim-Liossi, K. Kyrkou, and J. Gogas, "Application of the learning vector quantizer to the classification of breast lesions," *Anal Quant Cytol Histol*, vol. 19, pp. 453-60, Oct 1997.

[182] D. Pantazopoulos, P. Karakitsos, A. Ioakim-Liossi, A. Pouliakis, E. Botsoli-Stergiou, and C. Dimopoulos, "Back propagation neural network in the discrimination of benign from malignant lower urinary tract lesions," *J Urol*, vol. 159, pp. 1619-23, May 1998.

[183] A. M. Marchevsky, J. A. Tsou, and I. A. Laird-Offringa, "Classification of individual lung cancer cell lines based on DNA methylation markers: use of linear discriminant analysis and artificial neural networks," *J Mol Diagn*, vol. 6, pp. 28-36, Feb 2004.

[184] P. Karakitsos, C. Chrelias, A. Pouliakis, G. Koliopoulos, A. Spathis, M. Kyrgiou, C. Meristoudis, A. Chranioti, C. Kottaridi, G. Valasoulis, I.

Panayiotides, and E. Paraskevaïdis, "Identification of women for referral to colposcopy by neural networks: a preliminary study based on LBC and molecular biomarkers," *J Biomed Biotechnol*, vol. 2012, p. 303192, 2012.

[185] P. Karakitsos, T. M. Megalopoulou, A. Pouliakis, M. Tzivras, A. Archimandritis, and A. Kyroudes, "Application of discriminant analysis and quantitative cytologic examination to gastric lesions," *Anal Quant Cytol Histol*, vol. 26, pp. 314-22, Dec 2004.

[186] E. S. McHugh, A. P. Shinn, and J. W. Kay, "Discrimination of the notifiable pathogen *Gyrodactylus salaris* from *G. thymalli* (Monogenea) using statistical classifiers applied to morphometric data," *Parasitology*, vol. 121 (Pt 3), pp. 315-23, Sep 2000.

[187] J. P. M. d. Sá, *Applied statistics : using SPSS, Statistica, MATLAB, and R*, 2nd ed. Berlin ; New York: Springer, 2007.

[188] L. Breiman, J. Friedman, C. J. Stone, and R. A. Olshen, *Classification and regression trees*. Belmont, Calif.: Wadsworth International Group, 1984.

[189] M. Tzivras, T. M. Megalopoulou, A. Pouliakis, A. E. Giahnaki, I. G. Karaitianos, S. Archondakis, J. Georgoulakis, and P. Karakitsos, "The potential of tree classifiers on the cytological examination of gastric lesions," *Archives of the Balkan Medical Union*, vol. 43, pp. 239-244, 2008.

[190] F. Saiti, A. A. Naini, M. A. Shoorehdeli, and M. Teshnehlab, "Thyroid Disease Diagnosis Based on Genetic Algorithms Using PNN and SVM," in *Bioinformatics and Biomedical Engineering , 2009. ICBBE 2009. 3rd International Conference on*, 2009, pp. 1-4.

[191] F. C. Schmitt, A. Longatto-Filho, A. Valent, and P. Vielh, "Molecular techniques in cytopathology practice," *J Clin Pathol*, vol. 61, pp. 258-67, Mar 2008.

[192] G. Koliopoulos, C. Chrelias, A. Pappas, S. Makridima, E. Kountouris, M. Alepaki, A. Spathis, V. Stathopoulou, I. Panayiotides, P. Panagopoulos, P. Karakitsos, and D. Kassanos, "The diagnostic accuracy of two methods for E6&7 mRNA detection in women with minor cytological abnormalities," *Acta Obstet Gynecol Scand*, vol. 91, pp. 794-801, Jul 2012.

[193] T. Kelesidis, L. Aish, M. A. Steller, I. S. Aish, J. Shen, P. Foukas, J. Panayiotides, G. Petrikkos, P. Karakitsos, and S. Tsiodras, "Human papillomavirus (HPV) detection using in situ hybridization in histologic samples: correlations with cytologic changes and polymerase chain reaction HPV detection," *Am J Clin Pathol*, vol. 136, pp. 119-27, Jul 2011.

[194] M. Nasioutziki, A. Daniilidis, K. Dinas, M. Kyrgiou, G. Valasoulis, P. D. Loufopoulos, E. Paraskevaïdis, A. Loufopoulos, and P. Karakitsos, "The evaluation of p16INK4a immunoexpression/immunostaining and human papillomavirus DNA test in cervical liquid-based cytological samples," *Int J Gynecol Cancer*, vol. 21, pp. 79-85, Jan 2011.

[195] I. Tsoumpou, G. Valasoulis, C. Founta, M. Kyrgiou, M. Nasioutziki, A. Daponte, G. Koliopoulos, V. Malamou-Mitsi, P. Karakitsos, and E.

Paraskevaïdis, "High-risk human papillomavirus DNA test and p16(INK4a) in the triage of LSIL: a prospective diagnostic study," *Gynecol Oncol*, vol. 121, pp. 49-53, Apr 2011.

[196] A. Spathis, E. Aga, M. Alepaki, A. Chranioti, C. Meristoudis, I. Panayiotides, D. Kassanos, and P. Karakitsos, "Promoter methylation of p16(INK4A), hMLH1, and MGMT in liquid-based cervical cytology samples compared with clinicopathological findings and HPV presence," *Infect Dis Obstet Gynecol*, vol. 2011, p. 927861, 2011.

[197] M. Arbyn, P. Martin-Hirsch, F. Buntinx, M. Van Ranst, E. Paraskevaïdis, and J. Dillner, "Triage of women with equivocal or low-grade cervical cytology results: a meta-analysis of the HPV test positivity rate," *J Cell Mol Med*, vol. 13, pp. 648-59, Apr 2009.

[198] J. Roelens, M. Reuschenbach, M. von Knebel Doeberitz, N. Wentzensen, C. Bergeron, and M. Arbyn, "p16INK4a immunocytochemistry versus human papillomavirus testing for triage of women with minor cytologic abnormalities: a systematic review and meta-analysis," *Cancer Cytopathol*, vol. 120, pp. 294-307, Oct 25 2012.

[199] M. Arbyn, M. Kyrgiou, C. Simoens, A. O. Raifu, G. Koliopoulos, P. Martin-Hirsch, W. Prendiville, and E. Paraskevaïdis, "Perinatal mortality and other severe adverse pregnancy outcomes associated with treatment of cervical intraepithelial neoplasia: meta-analysis," *BMJ*, vol. 337, p. a1284, 2008.

[200] R. S. Hoda and S. A. Hoda, *Fundamentals of PAP test cytology*. Totowa, N.J.: Humana Press, 2007.

[201] London Quality Assurance Reference Centre. (2006). *KC61 Report London Annual Report 2005-2006*. Available: http://www.londongarc.nhs.uk/downloads.php?filename=112_KC61_April_2005_-_March_2006_Annual_Report.pdf

[202] B. A. Jones and D. A. Novis, "Cervical biopsy-cytology correlation. A College of American Pathologists Q-Probes study of 22 439 correlations in 348 laboratories," *Arch Pathol Lab Med*, vol. 120, pp. 523-31, Jun 1996.

9 Παράρτημα Α: Ειδικότητα, Ευαισθησία και λοιπές μέθοδοι αξιολόγησης ταξινομητών

Σε μια πρώτη προσέγγιση μας ενδιαφέρουν μοντέλα παράγουν διακριτές τιμές κλάσεων υποδηλώνοντας μόνο την προβλεπόμενη κλάση του περιστατικού. Για να διακρίνουμε την πραγματική κλάση από την προβλεπόμενη χρησιμοποιούμε τις ενδείξεις {Y,N}για τις προβλέψεις κλάσης που παράγονται από ένα μοντέλο. Δοσμένου ενός ταξινομητή και ενός περιστατικού, υπάρχουν τέσσερα δυνατά αποτελέσματα.

1. Αν το περιστατικό είναι θετικό και ταξινομείται ως θετικό, μετριέται ως αληθώς θετικό,
2. Αν αυτό ταξινομείται ως αρνητικό τότε θεωρείται ψευδώς αρνητικό. Αντίστοιχα
3. Αν το περιστατικό είναι αρνητικό και ταξινομείται ως αρνητικό τότε λογίζεται ως αληθώς αρνητικό, ενώ
4. Αν αυτό ταξινομείται ως θετικό τότε θεωρείται ψευδώς θετικό.

Δοσμένων ένα ταξινομητή και ένα σύνολο από περιστατικά(το σύνολο των περιστατικών του τεστ) ένας, δύο επί δύο πίνακας ενδεχομένων μπορεί να κατασκευαστεί αντιπροσωπεύοντας όλες τις δυνατές περιπτώσεις.

Αυτός ο πίνακας αποτελεί τη βάση για πολλές συνήθεις μετρικές. Η Εικόνα 17 δείχνει έναν πίνακα ενδεχομένων και εξισώσεις διάφορων συνήθων μετρικών που μπορούν να υπολογιστούν από αυτό. Οι τιμές κατά μήκος της κυρίας διαγωνίου αντιπροσωπεύουν τις σωστές αποφάσεις ως προς τον χαρακτηρισμό του περιστατικού ως θετικό ή αρνητικό. Αντίθετα οι τιμές εκτός αυτής της διαγωνίου αντιπροσωπεύουν τις λανθασμένες αποφάσεις(ή διαφορετικά την σύγχυση ανάμεσα στις διάφορες κλάσεις).

		<u>True class</u>	
		p	n
<u>Hypothesized class</u>	Y	True Positives	False Positives
	N	False Negatives	True Negatives

Εικόνα 17: πίνακας ενδεχομένων και διάφορες μετρικές αναπαράστασης που μπορούν να υπολογιστούν από αυτόν

Το ποσοστό των αληθώς θετικών αποτελεσμάτων,TPR(True Positive Rate) ενός ταξινομητή εκτιμάται ως εξής:

$$TPR = \frac{TP}{P} = \frac{\text{Θετικά Σωστά ταξινομημένα}}{\text{Σύνολο Θετικών}}$$

Το ποσοστό των ψευδών θετικών αποτελεσμάτων,FPR(False Positive Rate)ενός ταξινομητή εκτιμάται ως εξής:

$$FPR = \frac{FP}{N} = \frac{\text{Αρνητικά Λανθασμένα ταξινομημένα}}{\text{Σύνολο Αρνητικών}}$$

Επιπρόσθετοι όροι συνδεδεμένοι με τις ROC καμπύλες είναι η ευαισθησία (sensitivity) και η ειδικότητα (specificity) και ορίζονται ως εξής:

$$\text{Sensitivity} = SE = TPR \quad \text{Specificity} = \frac{TN}{FP + TN}$$

Ορίζονται εδώ και κάποιες άλλες πολύ χρήσιμες έννοιες που αφορούν τους διαγνωστικούς ελέγχους. Η θετική προβλεπόμενη τιμή (PPV) είναι μια από αυτές και ερμηνεύεται ως η πιθανότητα εμφάνισης θετικού περιστατικού μεταξύ όλων των θετικών προβλέψεων. Παρόμοια ορίζεται και η αρνητική προβλεπόμενη τιμή (NPV) ως η πιθανότητα εμφάνισης αρνητικού περιστατικού μεταξύ όλων των αρνητικών προβλέψεων. Οι παραπάνω υπολογίζονται ως εξής:

$$PPV = \frac{TP}{TP + FP} \quad \text{και} \quad NPV = \frac{TN}{TN + FN}$$

