

NOVE TRIAŽNE METODE PRI HPV POZITIVNIH ŽENSKAH

Ana Pogačnik¹, Nataša Nolde¹,
Uršula Prosenc Zmrzljak², Marina Grgič²,
Veronika Kloboves Prevodnik¹, Srdjan Novaković²,
Urška Ivanuš³, Maja Primic Žakelj³



¹Oddelek za citopatologijo,

²Oddelek za molekularno diagnostiko,

³Program Zora,
Onkološki inštitut Ljubljana



HPV test

Prednosti:

- zelo občutljiv
- visoka negativna napovedna vrednost

Pomanjkljivosti:

- premajhna klinična specifičnost
- ne loči med prehodnimi in transformirajočimi okužbami

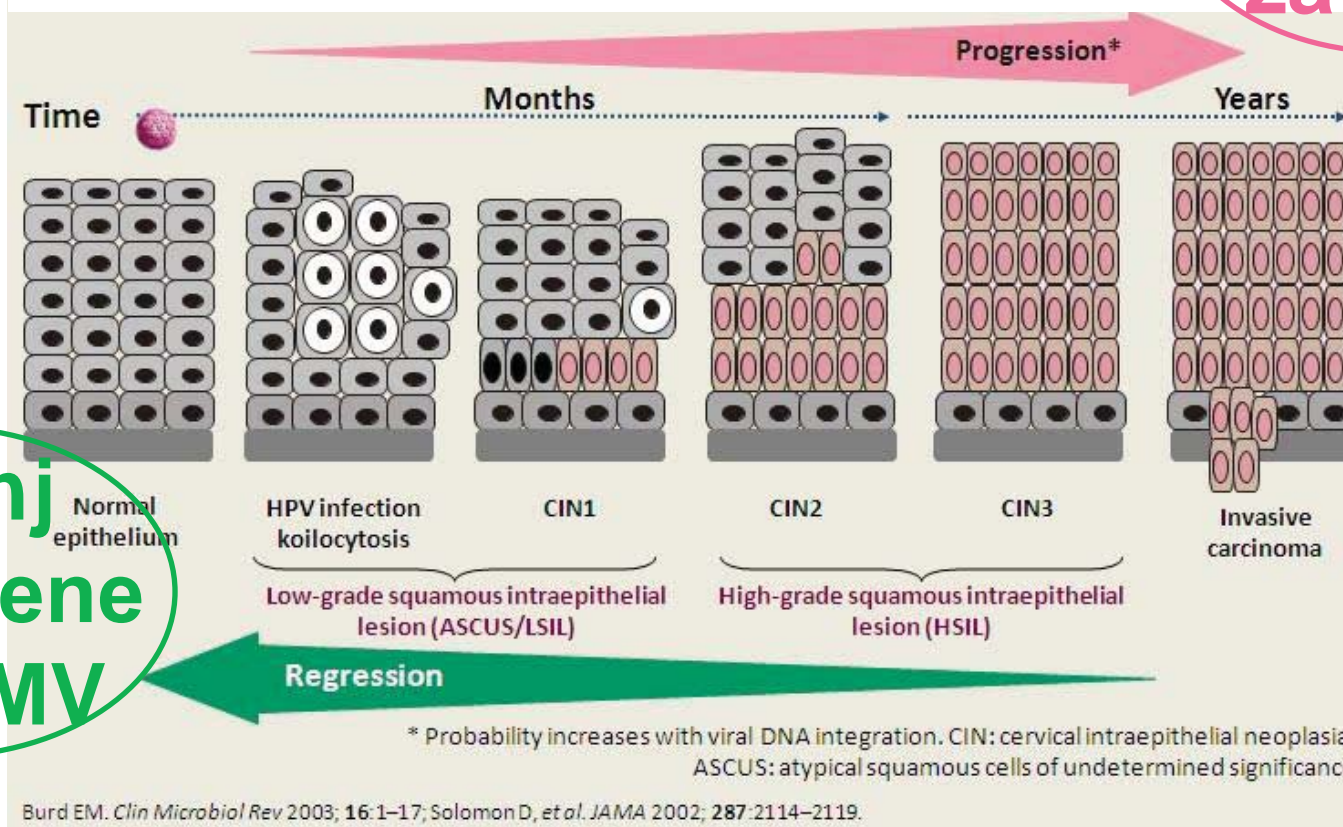
Kako obravnavati HPV pozitivne ženske z normalnim citološkim brisom?



Namen novih triažnih metod pri HPV poz ženskah

Nadaljnja diagnostika, zdravljenje ← 5-10%

**Bolj
ogrožene
za RMV**



**Manj
ogrožene
za RMV**

90-95%

Normalno presejanje



Možnosti triaže HPV poz žensk

- **citologija** (*nizek % APC-N, 5 letni presejalni interval*)
- **citologija + genotipizacija invazivnejših genotipov** HPV16/18/31/33/45 (*visok % APC-N, 3 letni presejalni interval*)
- **ponovni HPV test po 1 letu**
- **genotipizacija HPV16/18** (*neg test ne zagotavlja varne vrnitve v presejanje*)
- **proteinski označevalci**
- **molekularne triažne metode**

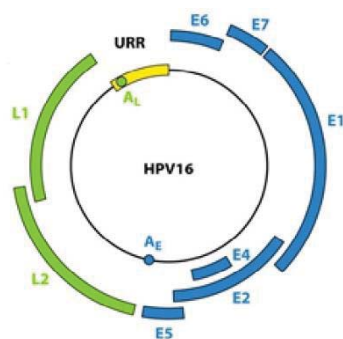


Nivoji merjenja sprememb HPV okužbe

<http://cmr.asm.org/content/25/2/215/F2.expansion.html>

<http://www.buzzle.com/articles>

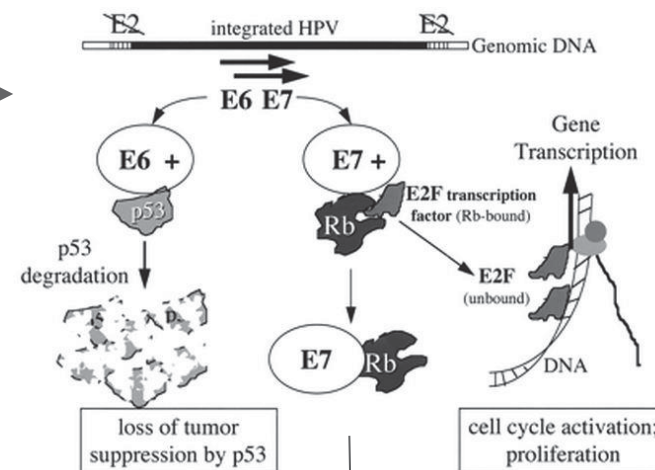
<http://www.intechopen.com/books>



DNA

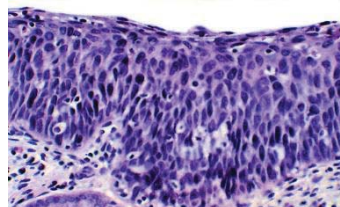


RNA

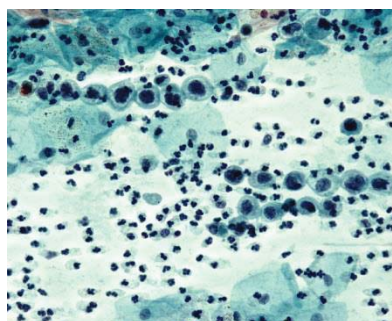


PROTEINI

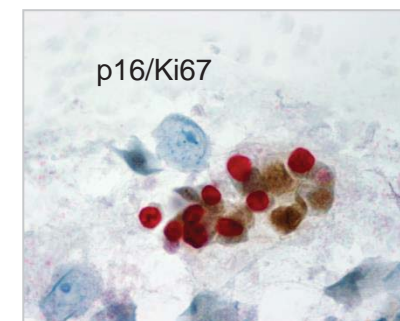
RAK MATERNIČNEGA VRATU



SPREMEMBE NA
HISTOLOŠKEM NIVOJU



SPREMEMBE NA
CELIČNEM NIVOJU



SPREMENJENO IZRAŽANJE
CELIČNIH PROTEINOV

http://www.uaz.edu.mx/histo/pathology/ed/ch_18

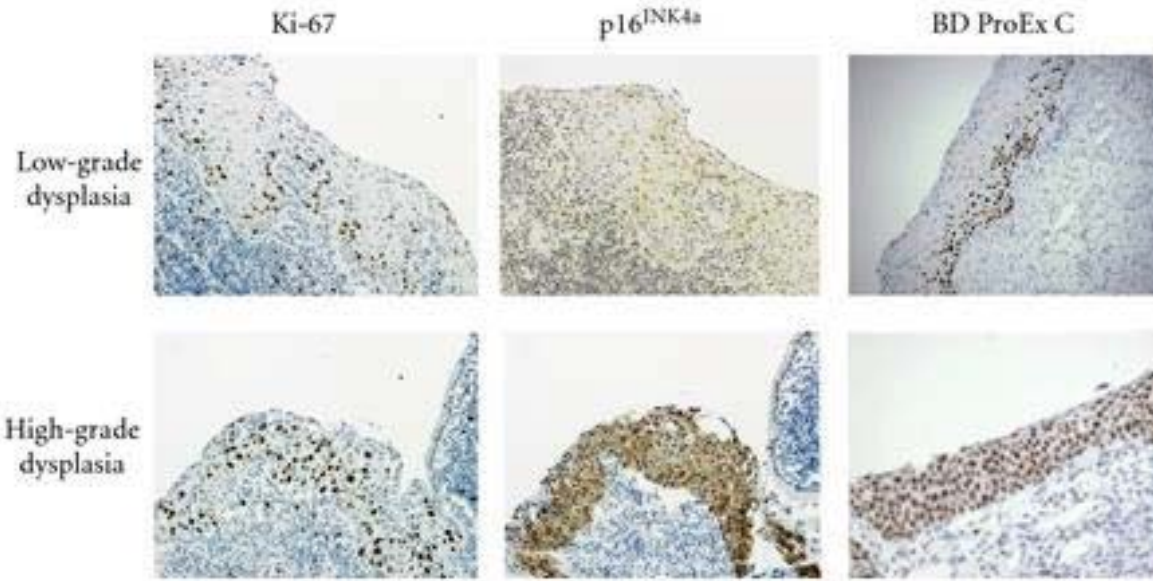
Arhiv fotografij OIL, Odd za citopatologijo

Arhiv fotografij OIL, Odd za citopatologijo

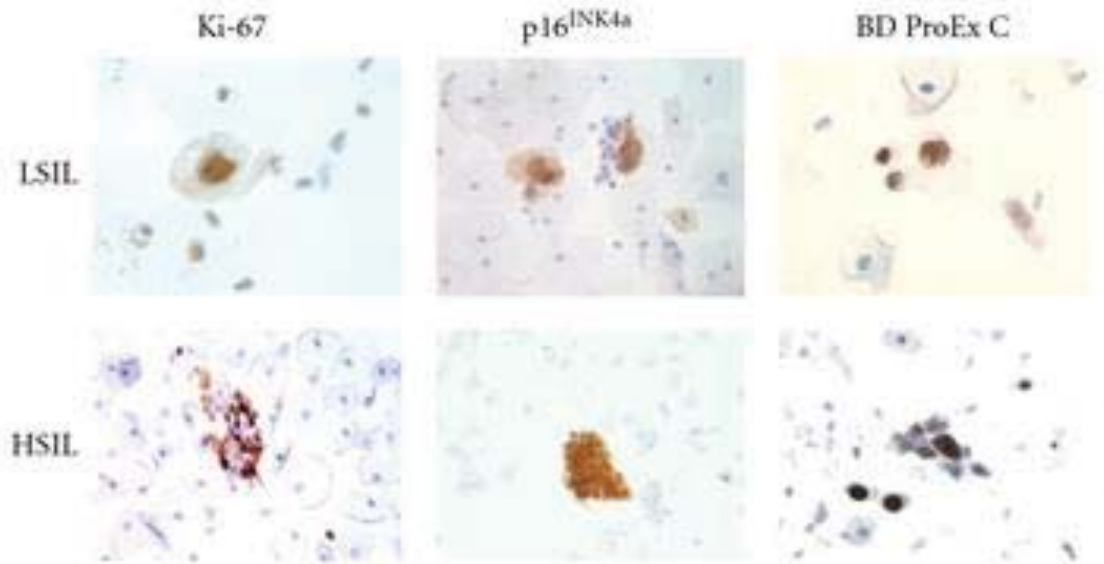


Proteinski označevalci

- Določanje z imunohisto/citokemičnimi metodami:
 - MCM2 proteini
 - Topo2A
 - Ki67
 - p16^{INK4a}
 - p16^{INK4a}/Ki67
- } BD ProExC (TriPath Imaging)
- CINtecPLUS (Roche)
- Najbolj preiskovani, zanesljivi pokazatelji predrakavih in rakavih sprememb
 - Razlikovanje med CIN in morfološko podobnimi spremembami



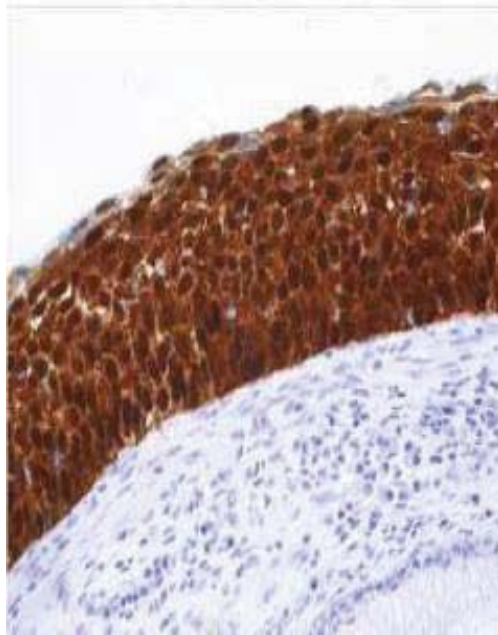
H
I
S
T
O



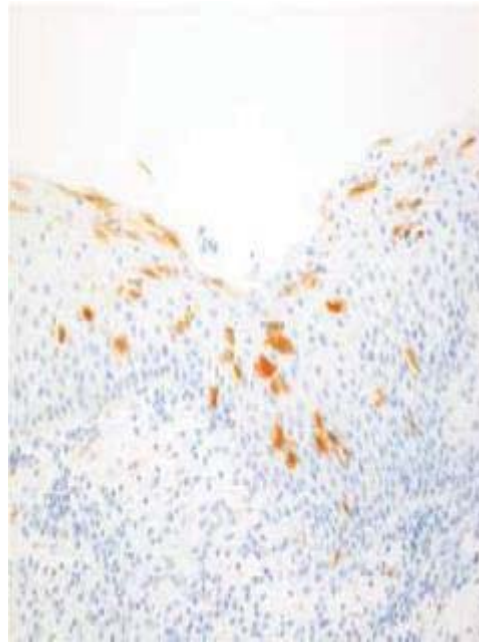
C
I
T
O



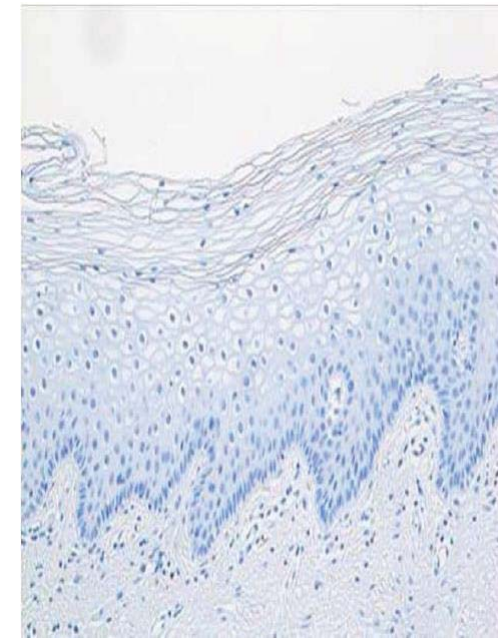
p16^{INK4a} v histologiji



poz



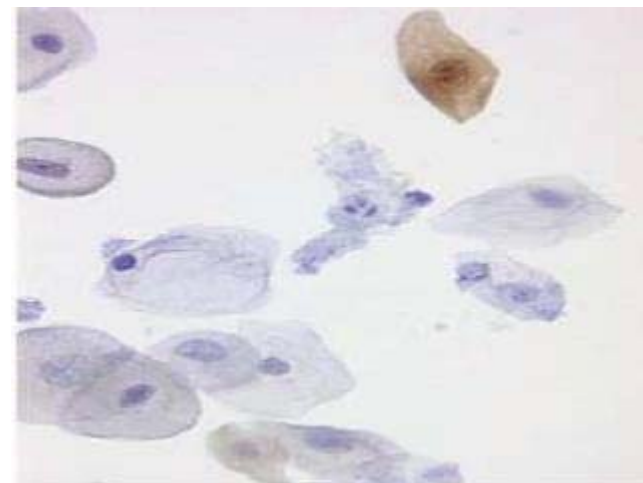
neg



neg

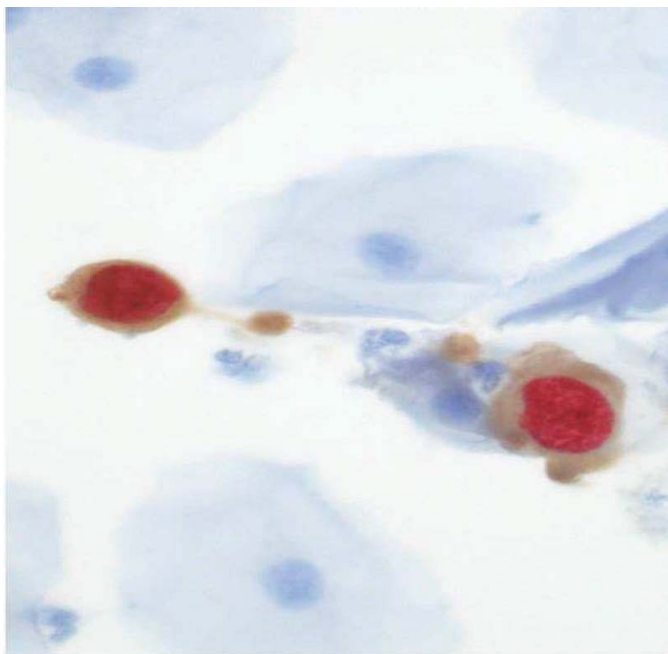
p 16^{INK4a} v citologiji

poz/neg???!?





Citologija p16^{INK4a}/Ki67



- p16^{INK4a} anti-proliferativni marker
- Ki-67 proliferativni marker



Povečevanje specifičnosti p16^{INK4a}
Od morfolologije neodvisen biomarker!



HPV vs p16^{INK4a}/Ki67 (CIN2+)

	N	HPV		p16 ^{INK4a} /Ki67	
		Obč (%)	Spec (%)	Obč (%)	Spec (%)
APC-N ⁽¹⁾	361	91	36	92	81
PIL-NS ⁽¹⁾	415	96	19	94	68
HPV+, cito- (2)	425	-	-	92	82

(1) Schmidt D et al, Cancer Pathology, 2011

(2) Petry KU et al, Gynecol Oncol, 2011



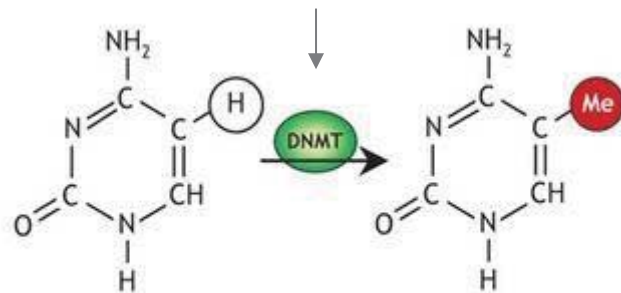
Kandidati za molekularno triažno metodo

- Merjenje virusne RNA (detekcija E6 in E7 prepisa),
Pomemben je način odvzema vzorca, da se RNA ohrani.
- Ali se je HPV genom vgradil v človeški genom,
Ni enostavne metode, virus se ne vgradi vedno na isto mesto.
- Določanje števila HPV kopij (ang.: *viral load*).
Za vsak genotip je potrebna „umeritvena krivulja“, pri nizkih
CIN-ih je pogosta okužba z več genotipi hkrati.
- **Meritev ravni metilacije DNA humanih in virusnih genov.**



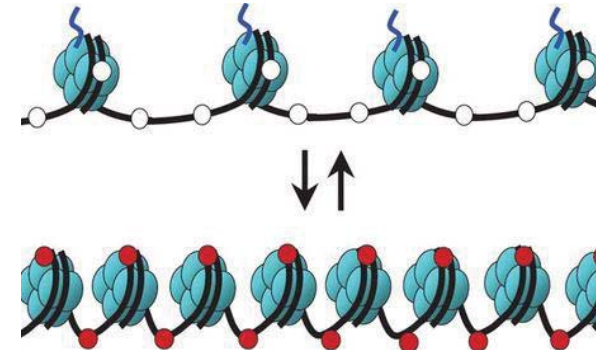
DNA metilacija – kaj je to?

encim DNA-metil-transferaza



citozin

5-metil-citozin

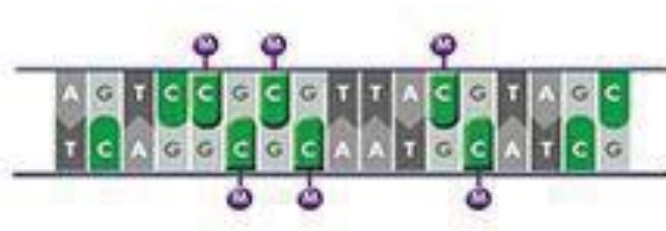


Metilirana DNA, kromatin bolj kompakten in neaktiven.

Na tem delu DNA se geni **ne prepisujejo.**

Utišanje genov.

Težave, če so metilirani tumor-supresorski geni.



metilirana DNA – merimo % metilacije

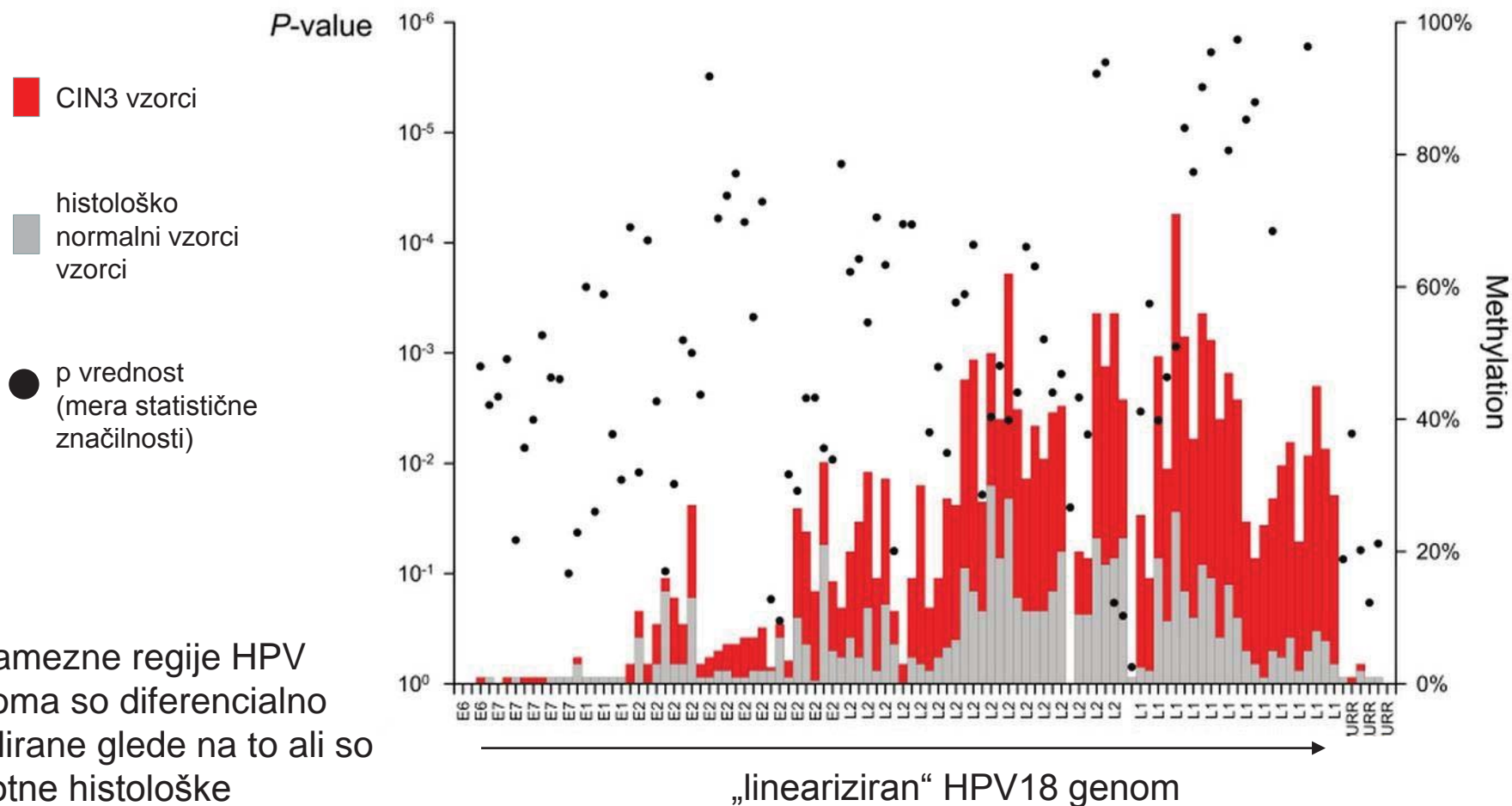
Vir shem:

- <http://pubs.niaaa.nih.gov/publications/arcr351/6-16.htm>
- <http://cnx.org/contents/cbba1ce8-b158-45af-a907-b99e32dff7be@1.1:2/Genetics>



Metilacija virusnih genov

HPV18

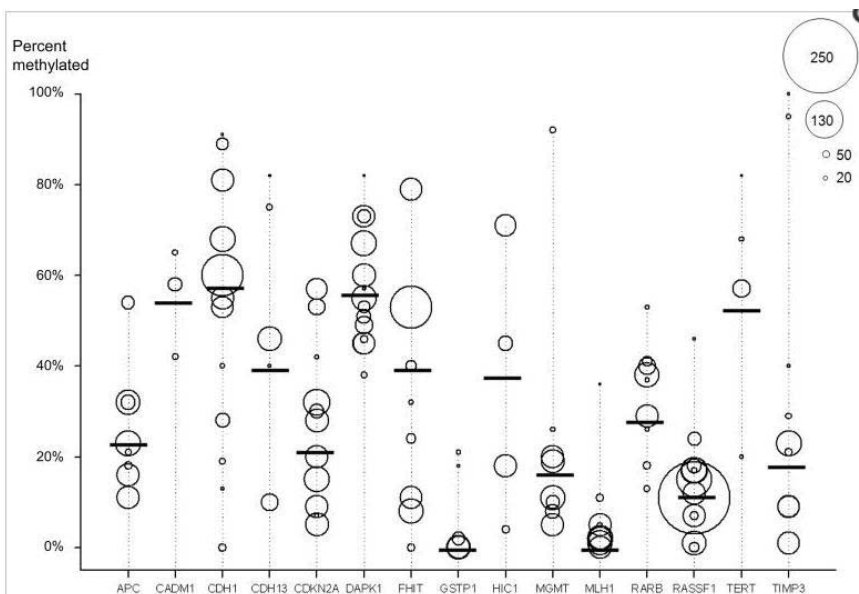


Posamezne regije HPV genoma so diferencialno metilirane glede na to ali so prisotne histološke spremembe ali ne – možnost razvoja metode za triažo HPV+ žensk.



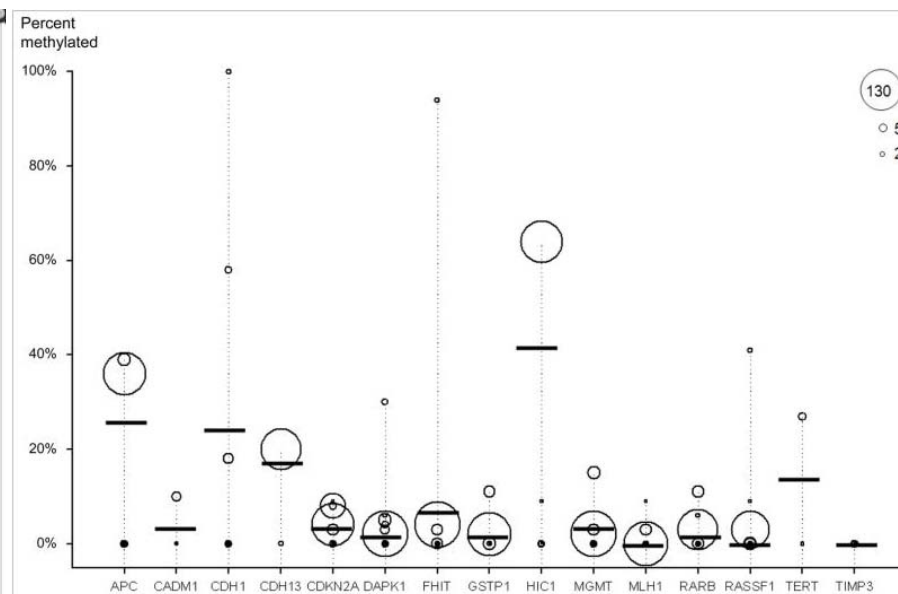
Metilacija humanih genov

Tumorsko cervikalno tkivo



↑ CADM1
↑ DAPK1
↑ RASSF1 ↑ TERT

Zdravo cervikalno tkivo



↑ CADM1
↑ DAPK1
↑ RASSF1 ↑ TERT

Nekateri humani geni so diferencialno metilirani v tumorskem tkivu glede na normalno cervikalno tkivo. Razlika v % metilacije mora biti dovolj velika, da omogoča zanesljivo ločevanje med vzorci bolj in manj ogroženih žensk.

Triaža HPV+ žensk z merjenjem ravni metilacije humanih genov

CIN 2/3	občutljivost	specifičnost
EPB41L3	85%	31%
DYS	82%	31%
MAL1	94%	6%

Vasiljević et. al., Gynecologic oncology 132 (2014) 709-714

Triaža HPV+ žensk z merjenjem ravni metilacije v humanih genih (EPB41L3 in DPYS) in virusnih genih (HPV16 L1 in L2 regijah, HPV18 6 mest v L2 regiji, HPV31 2 mesti v L1 regiji)

CIN 2/3 - 90% občutljivost	specifičnost
HPV16 + vzorci	38%
HPV18 + vzorci	53%
HPV31 + vzorci	39%
HVP16 + 18 + 31 + vzorci	44%
Razen HPV16 +	17%

Brentnall et.al., Int.J.Cancer 135 (2014) 1425-1432

Primerjava triaže HPV+ žensk s citologijo in merjenjem ravni metilacije humanih genov MAL1 in miR124-2

CIN 2+	% (95% CI)
Triaža s citologijo	70,8% (66,1 – 75,4)
Triaža z metilacijo	70,5% (66,1 – 75,0)
CIN3+	
Triaža s citologijo	74% (70,3 – 79,2)
Triaža z metilacijo	67% (62,9 – 72,0)

Verhoef et.al., Lancet oncology, vol 15 (2014) 315 - 322

* Citologija: specifičnost 95,4%, občutljivost 68,5%

*PALMS študija, Ikenberg et. al., JNCI, vol 105 (2013) 1550 - 1557

** HPV+, metilacija MAL1 in miR124-2 pri specifičnosti 50%,
CIN2+ občutljivost 71,3%, CIN3+ občutljivost 77,0%

**Verhoef et.al., Lancet oncology, vol 15 (2014) 315 - 322



Zaključki

HPV testiranje je zaradi **visoke občutljivosti** zelo obetavna metoda, ki bi jo bilo v prihodnosti smiselno uporabiti tudi kot metodo **primarnega presejanja**, ampak ker je **specifičnost prenizka**, je potrebna ustrezna **metoda triaže**, ki bi ohranila presejalni program funkcionalen, hkrati pa bi omogočala varno vrnitev manj ogroženih HPV+ žensk v presejanje.

Triaža s proteinskimi markerji je ovrednotena metoda v različnih študijah in zagotavlja ustrezno specifičnost. Uporabna pa je le na **vzorcih**, ki imajo **ohranjeno morfološko strukturo celic**. Pri **vzorcih s porušeno morfologijo celic**, pa je še vedno mogoče meriti **raven metilacije**. Pri tej metodi je potrebno povečati specifičnost in jo validirati na večjem številu vzorcev iz primarnega presejanja.