

**Μη Επεμβατική Ανίχνευση
Ανθρώπινου Ιού των Θηλωμάτων σε
Ιστούς Οφθαλμικού Πτερυγίου:
Κλινικο-Επιδημιολογικές Συσχετίσεις**



Χαλκιά Αικατερίνη

Τμήμα Ιατρικής

Πανεπιστήμιο Κρήτης

Διδακτορική Διατριβή

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. ΔΕΤΟΡΑΚΗΣ ΕΥΣΤΑΘΙΟΣ, αναπληρωτής καθηγητής οφθαλμολογίας, τμήμα ιατρικής, πανεπιστήμιο Κρήτης
2. ΣΟΥΡΒΙΝΟΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ, καθηγητής κλινικής ιολογίας, τμήμα ιατρικής, πανεπιστήμιο Κρήτης
3. ΖΑΦΕΙΡΟΠΟΥΛΟΣ ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ, επίκουρος καθηγητής κλινικής ιολογίας-βιολογίας εξωκυττάριου χώρου, τμήμα ιατρικής, πανεπιστήμιο Κρήτης

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. ΔΕΤΟΡΑΚΗΣ ΕΥΣΤΑΘΙΟΣ, αναπληρωτής καθηγητής οφθαλμολογίας, τμήμα ιατρικής, πανεπιστήμιο Κρήτης
2. ΣΟΥΡΒΙΝΟΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ, καθηγητής κλινικής ιολογίας, τμήμα ιατρικής, πανεπιστήμιο Κρήτης
3. ΖΑΦΕΙΡΟΠΟΥΛΟΣ ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ, επίκουρος καθηγητής κλινικής ιολογίας-βιολογίας εξωκυττάριου χώρου, τμήμα ιατρικής, πανεπιστήμιο Κρήτης
4. ΤΣΙΛΙΜΠΑΡΗΣ ΜΙΛΤΙΑΔΗΣ, καθηγητής οφθαλμολογίας, τμήμα ιατρικής, πανεπιστήμιο Κρήτης
5. ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΣ ΣΙΓΑΝΟΣ, αναπληρωτής καθηγητής οφθαλμολογίας, τμήμα ιατρικής, πανεπιστήμιο Κρήτης
6. ΧΑΜΗΛΟΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ, καθηγητής κλινικής μικροβιολογίας-μικροβιακής παθογένεσης, τμήμα ιατρικής, πανεπιστήμιο Κρήτης
7. ΧΛΟΥΒΕΡΑΚΗΣ ΓΡΗΓΟΡΗΣ, αναπληρωτής καθηγητής βιοστατιστικής, τμήμα ιατρικής, πανεπιστήμιο Κρήτης

Στον άνδρα μου και στα παιδιά μου, για τη στήριξη και την έμπνευση.

Δήλωση

Δηλώνω ότι, εκτός εάν γίνεται ειδική αναφορά στο έργο άλλων, το περιεχόμενο αυτής της διατριβής είναι πρωτότυπο και δεν έχει υποβληθεί εξ ολοκλήρου ή εν μέρει για εξέταση για οποιοδήποτε άλλο πτυχίο ή προσόντα σε αυτό ή οποιοδήποτε άλλο Πανεπιστήμιο. Αυτή η διατριβή είναι το αποτέλεσμα της δικής μου δουλειάς και δεν περιλαμβάνει τίποτα που είναι το αποτέλεσμα της εργασίας που έγινε σε συνεργασία, εκτός αν αναφέρεται συγκεκριμένα στο κείμενο.

Χαλκιά Αικατερίνη

Ιούνιος 2021

Ευχαριστίες

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Κρήτης και στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Ηρακλείου από τον Ιούλιο 2014 έως τον Απρίλιο 2021 και τιμήθηκε με την υποτροφία υποψήφιου διδάκτορα ΕΛΚΕ το 2015. Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν στην ολοκλήρωση της διατριβής.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον αναπληρωτή καθηγητή οφθαλμολογίας και επιβλέποντά μου κ. Ευστάθιο Δετοράκη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, προσφέροντάς μου τη δυνατότητα να πραγματοποιήσω το ερευνητικό αυτό έργο. Τον ευχαριστώ θερμά για τη συνεχή επιστημονική και ηθική υποστήριξη που μου προσέφερε, την καθοδήγηση σε κάθε στάδιο της διατριβής, αλλά και για την υπομονή και την κατανόηση που έδειξε σε κάθε μου δυσκολία.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον καθηγητή κλινικής ιολογίας κ. Σουρβίνο για την προθυμία, την αμέριστη και απλόχερη βοήθειά του και κυρίως για την καθοδήγηση που μου προσέφερε και το χρόνο που αφιέρωσε στη μελέτη κατά τη διάρκεια των αναλύσεων στο εργαστήριο ιολογίας. Οι υποδείξεις του παρείχαν ουσιαστική βοήθεια στη διαμόρφωση του ερευνητικού πρωτοκόλλου.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επίκουρο καθηγητή κλινικής ιολογίας-βιολογίας εξωκυττάρου χώρου, κ. Αλέξανδρο Ζαφειρόπουλο για την ευκαιρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω τη διδακτορική αυτή διατριβή.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στον καθηγητή και διευθυντή της οφθαλμολογικής κλινικής του ΠαΓΝΗ κ. Μιλτιάδη Τσιλιμπάρη, μέλος της επταμελούς επιτροπής, για τη διακριτική επίβλεψη και το ενδιαφέρον που έδειξε, κάνοντας χρήσιμες υποδείξεις και προσφέροντάς μου καίριους προβληματισμούς πάνω σε επιμέρους θέματα της διατριβής.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον αναπληρωτή καθηγητή οφθαλμολογίας κ. Σιγανό, τον καθηγητή κλινική μικροβιολογίας-μικροβιακής παθογένεσης, κ. Χαμηλό και τον αναπληρωτή καθηγητή βιοστατιστικής κ. Χλουβεράκη, μέλη της επταμελούς επιτροπής που με τίμησαν με τη συμμετοχή τους στην εξεταστική επιτροπή.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στη Μελίνα Τσέλιου και το Σταύρο Δέρδα, χωρίς την πολύτιμη βοήθεια και την καθοδήγηση των οποίων, η διαδικασία της εργαστηριακής ανάλυσης των δειγμάτων δεν θα ήταν εφικτή.

Δεν θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω το συνάδελφο και φίλο Γιώργο Μπόντζο για το ενδιαφέρον, την προθυμία του και την ανεκτίμητη βοήθεια που μου προσέφερε στη ανάλυση των αποτελεσμάτων της μελέτης. Τον ευχαριστώ θερμά για το χρόνο που αφιέρωσε και την άψογη συνεργασία.

Ευχαριστώ τους συναδέλφους Νίκο Τσακαλή, Στελλα Μπλαζάκη και Δημήτρη Λιακόπουλο για τη βοήθεια που μου προσέφεραν στη λήψη των δειγμάτων.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και κυρίως τον άνδρα μου γιατί είναι πάντα δίπλα μου με υπομονή και επιμονή, στηρίζοντας με κάθε δυνατό τρόπο τις επιλογές μου.

Περίληψη

Το οφθαλμικό περύγιο αποτελεί χρόνια, τριγωνικού σχήματος ινοαγγειακή βλάβη, η οποία εκτείνεται από τα βλαστικά κύτταρα του σκληροκερατειακού ορίου προς τον επιπεφυκότα και τον κερατοειδή. Η προοδευτική αύξηση του μεγέθους του μπορεί να απειλήσει την όραση. Η εμφάνισή του έχει συνδεθεί κυρίως με τη χρόνια έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία, όμως αν και έχει εκτενώς μελετηθεί, η παθογένειά του δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί. Στο παρελθόν είχε θεωρηθεί εκφυλιστική βλάβη, αλλά πρόσφατες μελέτες, οι οποίες ανίχνευσαν μοριακές γενετικές αλλοιώσεις, αλλοιώσεις στην έκφραση ογκοκατασταλτικών γονιδίων και παρουσία δυνητικά ογκογόνων ιών, όπως τον ιό των θηλωμάτων (HPV), σε περύγια, υπέδειξαν μια πιθανώς νεοπλασματική φύση των περρυγίων.

Ο ιός των ανθρώπινων θηλωμάτων έχει συνδεθεί με την εμφάνιση θηλωμάτων ή και ακανθοκυτταρικού καρκινώματος στον επιπεφυκότα. Ο ρόλος του στη δημιουργία του περρυγίου παραμένει αμφιλεγόμενος. Αρκετές μελέτες ανίχνευσαν τον HPV σε ιστοικά τεμάχια περρυγίων. Παρόλα αυτά, έχει διαπιστωθεί η ύπαρξη σημαντικών διαφορών στη συχνότητα εμφάνισης του ιού στις διάφορες μελέτες, γεγονός που μπορεί να οφείλεται σε γεωγραφικούς παράγοντες και χρήση διαφορετικών τεχνικών ανίχνευσης του ιού.

Στην παρούσα διατριβή διερευνήθηκε η δυνατότητα χρήσης επιχρίσματος, μιας ελάχιστα επεμβατικής μεθόδου ανίχνευσης του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων, σε 40 ασθενείς με περύγιο και σύγκριση των αποτελεσμάτων με αντίστοιχα ιστοτεμάχια των περρυγίων. Για την ανίχνευση και τη γονοτύπηση 14 HPV τύπων, υψηλού και

ενδιάμεσου κινδύνου (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 και 68) πραγματοποιήθηκε πραγματικού χρόνου PCR ανάλυση. Επιπλέον, 40 ασθενείς με φυσιολογική οφθαλμική επιφάνεια, συμπεριελήφθησαν στη μελέτη ως ομάδα ελέγχου. Ο συνολικός χρόνος παρακολούθησης για τους ασθενείς χωρίς υποτροπή είχε διάρκεια ενός έτους από την ημερομηνία χειρουργικής αφαίρεσης του περρυγίου.

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων ανέδειξε την παρουσία του ιού σε 11 ιστικά τεμάχια και σε 9 επιχρίσματα. Οι τύποι που ανιχνεύτηκαν ήταν οι 33, 39, 45, 56, 59, 66, 68. Για το διαγνωστικό τεστ με χρήση επιχρίσματος διαπιστώθηκε ευαισθησία 81.82% και ειδικότητα 100%. Από τους 40 ασθενείς, 35 ολοκλήρωσαν ένα έτος μετεγχειρητικής παρακολούθησης. Σε 15 (43%) ασθενείς πραγματοποιήθηκε αφαίρεση περρυγίου με την τεχνική του γυμνού σκληρού και σε 20 ασθενείς αφαίρεση περρυγίου και χρήση αυτομοσχεύματος. Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων, διαπιστώθηκε συσχέτιση του μεγέθους του περρυγίου και του είδους του χειρουργείου με την πιθανότητα υποτροπής. Τέλος, οι ασθενείς με υποτροπιάζουσα νόσο είχαν αυξημένες πιθανότητες να είναι θετικοί στον HPV, ενώ στους ασθενείς με HPV + περύγιο και χωρίς υποτροπή 1 έτος μετά την αφαίρεση του περρυγίου, ο ιός δεν ανιχνεύτηκε. Όσον αφορά τους ασθενείς με φυσιολογική οφθαλμική επιφάνεια, σε 37 από αυτούς ο ιός δεν ανιχνεύτηκε, ενώ σε 3 από αυτούς η ποσότητα του δείγματος δεν ήταν αρκετή για ανάλυση.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματά μας υποδεικνύουν ότι η χρήση επιχρίσματος σε συνδυασμό με PCR πραγματικού χρόνου αποτελεί ένα πολύτιμο εργαλείο για την ανίχνευση του HPV στο οφθαλμικό περύγιο και μπορεί να οδηγήσει στην καλύτερη κατανόηση της παθογένειας και της μετεγχειρητικής υποτροπής του.

Abstract

Ophthalmic pterygium represents a chronic, triangle-shaped, fibrovascular lesion, that expands from the limbal stem cells towards the bulbar conjunctiva and the cornea. Its gradual expansion may be sight-threatening. Pterygium development has been correlated to chronic UV exposure, however, although pterygium has been extensively studied, its pathogenesis remains unclear. In the past, it has been considered a degenerative disease, but recent studies, that identified molecular genetic alterations, alterations in tumor suppression genes and presence of oncogenic viruses, such as Human papillomavirus (HPV), in pterygia, indicated a possible neoplastic nature of the disease.

HPV has been correlated with conjunctival papillomas and ocular surface squamous neoplasia of the conjunctiva. Many studies have identified HPV in ophthalmic pterygia. However, there is discordance regarding the prevalence of the virus in the different studies, that may be due to geographical differences and variability in the virus identification methods.

In the present thesis, the evaluation of the use of swab samples, a minimally invasive diagnostic technique for the identification of HPV, in 40 patients with ophthalmic pterygium, compared with respective tissue specimens was studied. For the identification and genotyping of 14 high and intermediate risk HPV types (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 and 68) real time PCR analysis was conducted. Moreover, 40 patients with normal conjunctiva were

included in our study as control group. Patients with no recurrence had an 1-year post-surgical follow up.

The analysis of our results revealed the presence of HPV in 11 tissue specimens and in 9 swab samples. The HPV subtypes detected were 33, 39, 45, 56, 59, 66, 68. The swab test had 81.82% sensitivity and 100% specificity. Thirty-five patients with pterygium completed the 12-months follow up. In 15 (43%) of them, pterygium removal was performed with bare sclera excision and twenty patients underwent surgical excision with use of autologous conjunctival graft. The analysis of the results revealed a correlation of the size of pterygium and the type of surgery with disease relapse. Lastly, patients with disease recurrence had more probabilities to be HPV+, whereas in HPV+ pterygium patients with no recurrence, the virus was not detected one year after surgery. As for the patients with normal conjunctiva, the virus was not detected in 37 of them, whereas in 3 patients the quantity of the sample was not adequate for analysis.

Our findings indicate that the use of swab samples and real time PCR analysis may be a valuable tool for HPV detection in ophthalmic pterygium and may offer a better understanding of its pathogenetic mechanism and recurrence.

Περιεχόμενα

Περιεχόμενα	xv
Λίστα Εικόνων.....	xix
Λίστα Πινάκων	xxi
Γενικό Μέρος	1
Κεφάλαιο 1 Ανατομικά και Ιστολογικά Χαρακτηριστικά της Οφθαλμικής Επιφάνειας 3	
1.1 Δακρυϊκή Στιβάδα.....	3
1.2 Κερατοειδής.....	4
1.3 Επιπεφυκότας.....	7
1.4 Σκληρο-Κερατοειδικό Όριο (ΣΚΟ).....	9
Κεφάλαιο 2 Το Οφθαλμικό Πτερύγιο.....	11
2.1 Γενικά χαρακτηριστικά του πτερυγίου	11
2.2 Διαφορική διάγνωση	13
2.3 Επιδημιολογία	14
2.4 Ιστοπαθολογία	15
2.5 Παθογένεια.....	17
2.5.1 Γενετική προδιάθεση	17
2.5.2 Η υπεριώδης ακτινοβολία	18
2.5.3 Ιοί.....	22
2.5.4 Επιθηλιακή-Μεσεγχυματική Μετατροπή (EMT) και μηχανισμοί ανάπτυξης του πτερυγίου.....	23
2.5.5 Αυξητικοί παράγοντες (GF).....	24
2.5.6 Μεταλλοπρωτεϊνάσες της εξωκυττάριας ουσίας (MMPs).....	25
2.5.7 Παράγοντες φλεγμονής	26

2.6	Θεραπεία του πτερυγίου	27
Κεφάλαιο 3	Οι Ιοί των Ανθρώπινων Θηλωμάτων (HPV)	31
3.1	Γενικά Χαρακτηριστικά των Ιών HPV	31
3.2	Ο κύκλος ζωής του HPV	35
3.3	Μέθοδοι ανίχνευσης του HPV	36
Κεφάλαιο 4	Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης PCR.....	39
4.1	Βασική τεχνική της PCR.....	39
4.2	Real-Time PCR	41
4.2.1	Καμπύλη ενίσχυσης φθορισμού (Amplification plot)	42
4.2.2	Συστήματα ανίχνευσης.....	43
4.2.3	Ποσοτικοποίηση	48
Κεφάλαιο 5	HPV και Οφθαλμός.....	51
5.1	HPV και Θηλώματα του Επιπεφυκότα	51
5.2	HPV και Νεοπλασία των Πλακωδών Κυττάρων της Οφθαλμικής Επιφάνειας 52	
5.3	Ο ρόλος του HPV στο πτερύγιο	55
Ειδικό Μέρος	59
Κεφάλαιο 6	Περιγραφή Ερευνητικού Έργου.....	61
6.1	Σκοπός και Αναγκαιότητα της Μελέτης	61
6.2	Αναμενόμενα Αποτελέσματα	61
6.3	Σημασία της Μελέτης.....	62
Κεφάλαιο 7	Μεθοδολογία	63
7.1	Στρατολόγηση Ασθενών	63
7.2	Χειρουργική Αφαίρεση Πτερυγίου	64
7.3	Τρόπος Συλλογής και Αποθήκευσης Δειγμάτων	66
7.4	Απομόνωση Γενετικού Υλικού από τα Επιχρίσματα.....	68
7.5	Απομόνωση Γενετικού Υλικού από Ιστούς	70
7.6	Real-time PCR	72
7.7	Μετεγχειρητική Παρακολούθηση.....	76
Κεφάλαιο 8	Στατιστική Ανάλυση.....	79

Κεφάλαιο 9	Αποτελέσματα	81
9.1	Δημογραφικά	81
9.2	Έλεγχος αξιοπιστίας της μεθόδου.....	84
9.3	Ανάλυση των αποτελεσμάτων	86
9.4	Διερεύνηση του ρόλου του ιού στην υποτροπή του περυγίου.....	88
Κεφάλαιο 10	Συζήτηση.....	95
Κεφάλαιο 11	Προσφορά στη Γνώση	101
Βιβλιογραφία		103

Λίστα Εικόνων

- Εικόνα 1:** Ανατομικά στοιχεία του περυγίου. Βέλος: Διακρίνονται τα ανώμαλα όρια της κάψας και η διήθηση του περυγίου στον κερατοειδή. Κουκίδα: Κεφαλή, σταθερά προσκολλημένη στον κερατοειδή. Αστερίσκος: Αυχένος, άνωθεν του ΣΚΟ. Αστέρι: Σώμα, το κινητό τμήμα του περυγίου που καλύπτει τον επιπεφυκότα.12
- Εικόνα 2:** Παθογενετικός μηχανισμός ανάπτυξης του περυγίου20
- Εικόνα 3:** Τα γένη των Papillomavirus α, β, γ, μ, και ν περιλαμβάνουν στελέχη που έχουν ανευρεθεί στον άνθρωπο. Στο γένος α, τα είδη 9, 7, 5, 6, 11 (**αστέρι**) σχετίζονται με υψηλού κινδύνου βλάβες των βλεννογόνων, τα είδη 1, 8, 10, 13 (**βέλος**) σχετίζονται συχνότερα με χαμηλού κινδύνου βλάβες των βλεννογόνων, τα είδη 3, 14, 2, 4 (**αστερίσκος**) σχετίζονται με χαμηλού κινδύνου βλάβες των βλεννογόνων ή του δέρματος.34
- Εικόνα 4:** Καμπύλη ενίσχυσης φθορισμού (Amplification plot): Threshold: κατώφλι ανίχνευσης, Ct: ο κύκλος κατά τον οποίο ο φθορισμός ξεπερνά το κατώφλι ανίχνευσης, Baseline: το επίπεδο του θορύβου, ΔR_n = ένταση φθορισμού χρωστικής – ένταση σήματος κάτω από το κατώφλι ανίχνευσης.....43
- Εικόνα 5:** Dual Hybridisation probes45
- Εικόνα 6:** Taqman probes.....46
- Εικόνα 7:** Molecular beacons47
- Εικόνα 8:** Scorpions48
- Εικόνα 9:** Α. Οφθαλμικό περύγιο, Β. Αφαίρεση με την τεχνική του γυμνού σκληρού65
- Εικόνα 10:** Α. Οφθαλμικό περύγιο Β. Αφαίρεση και συρραφή μοσχεύματος επιπεφυκότα για κάλυψη του σκληρού στην περιοχή της βλάβης.....66
- Εικόνα 11:** Λήψη κυτταρικού επιχρίσματος από την επιφάνεια του περυγίου με βαμβάκοφόρο στυλεό.....67
- Εικόνα 12:** Eppendorf με απομονωμένο γενετικό υλικό ιστικών δειγμάτων. Χρησιμοποιήθηκαν 4 Eppendorf για την ανάλυση κάθε δείγματος, 4 Eppendorf για τη standard K2 και 4 Eppendorf για τον αρνητικό μάρτυρα.74

Εικόνα 13: Συσκευή Mx3000P real-time PCR thermal cycler με χρήση software version 4.1 (Stratagene, La Jolla, CA) του εργαστηρίου Ιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης και τοποθέτηση των δειγμάτων.....	76
Εικόνα 14: Ηλικία-Φύλο (Box plot 1)	82
Εικόνα 15: Μέγεθος περυγίου-Φύλο (Box plot 2)	83
Εικόνα 16: Καμπύλη ενίσχυσης φθορισμού: Επίχρισμα περυγίου θετικό στον HPV 56 [61].....	90
Εικόνα 17: Καμπύλη ενίσχυσης φθορισμού. Ιστός περυγίου του ίδιου ασθενή θετικός στον HPV56 [61].....	91
Εικόνα 18: Καμπύλη ενίσχυσης φθορισμού: Αρνητικοποίηση της ανίχνευσης του ιού στο επίχρισμα, 1 χρόνο μετά την αφαίρεση του περυγίου [61]	92

Λίστα Πινάκων

Πίνακας 1: Ποσοστό υποτροπής ανά χειρουργική τεχνική αφαίρεσης περυσίου	29
Πίνακας 2: Η δράση των πρωτεϊνών των HPV	32
Πίνακας 3: HPV & θηλώματα του επιπεφυκότα [52].....	52
Πίνακας 4: HPV & νεοπλασία πλακωδών κυττάρων του επιθηλίου οφθαλμικής επιφάνειας [52].....	54
Πίνακας 5: HPV & οφθαλμικό περύγιο [52]	56
Πίνακας 6: Έλεγχος ομοιογένειας για τη μεταβλητή «μέγεθος του περυσίου».....	83
Πίνακας 7: Αποτελέσματα HPV τύπων που ανιχνεύτηκαν σε επιχρίσματα και ιστούς	84
Πίνακας 8: Πίνακας 2x2 για έλεγχο ευαισθησίας και ειδικότητας του τεστ	85
Πίνακας 9: Έλεγχος ύπαρξης σημαντικής διαφοράς ανάμεσα στα 2 φύλα στην ανίχνευση του ιού	86
Πίνακας 10: Έλεγχος ύπαρξης σημαντικής διαφοράς ανάμεσα σε ασθενείς με θετικό και αρνητικό οικογενειακό ιστορικό στην ανίχνευση του ιού	87
Πίνακας 11: Binary logistic regression για τους παράγοντες που σχετίζονταν με την παρουσία του HPV στα ιστικά τεμάχια.....	89
Πίνακας 12: Δημογραφικά και σύνοψη στατιστικής ανάλυσης ασθενών που ολοκλήρωσαν το πρωτόκολλο παρακολούθησης [61].....	93

Γενικό Μέρος

Κεφάλαιο 1

Ανατομικά και Ιστολογικά Χαρακτηριστικά της Οφθαλμικής Επιφάνειας

Η οφθαλμική επιφάνεια βρίσκεται σε επαφή με το εξωτερικό περιβάλλον και ανατομικά περιλαμβάνει τη δακρυϊκή στιβάδα / φιλμ, το επιθήλιο του κερατοειδή, το επιθήλιο του βλεφαρικού και του βολβικού επιπεφυκότα και το σκληροκερατοειδικό όριο (ΣΚΟ). Βασική λειτουργία της οφθαλμικής επιφάνειας αποτελεί η προστασία του οφθαλμού από μικροβιακές, χημικές, τοξικές και μηχανικές βλάβες, η ρύθμιση της ενυδάτωσης του κερατοειδούς, συμβάλλοντας έτσι στη διατήρηση της διαύγειάς του, καθώς και η ενυδάτωση του επιπεφυκότα. Για την άριστη λειτουργία και ακεραιότητα της οφθαλμικής επιφάνειας, παρακείμενες δομές του οφθαλμού, όπως τα βλέφαρα και οι βλεφαρίδες, οι ταρσαίοι αδένες και το δακρυϊκό σύστημα, είναι απαραίτητες [1].

1.1 Δακρυϊκή Στιβάδα

Η δακρυϊκή στιβάδα αποτελείται από 3 επιμέρους στιβάδες, οι οποίες ξεκινώντας από την πιο επιφανειακή είναι:

- 1) Η λιπιδική στιβάδα: Παράγεται κυρίως από τους ταρσαίους αδένες. Συμβάλλει στη λίπανση του οφθαλμού, διευκολύνοντας το βλεφαρισμό, και αποτρέπει την εξάτμιση της υδάτινης στιβάδας.
- 2) Η υδάτινη στιβάδα: Παράγεται από τους δακρυϊκούς αδένες. Συμβάλλει στην άμυνα ενάντια στους μικροοργανισμούς, καθώς και στην ενυδάτωση και την ωσμωτική ισορροπία, τη θρέψη και την παροχή οξυγόνου στον κερατοειδή.
- 3) Η βλενώδης στιβάδα: Παράγεται από τα καλυκοειδή κύτταρα του επιπεφυκότα. Διαβρέχει τις μικρολάχνες του επιθηλίου του κερατοειδή, συμβάλλει στη σταθεροποίηση της δακρυϊκής στιβάδας και στην ομοιόμορφη κατανομή της στον κερατοειδή [2].

1.2 Κερατοειδής

Ο κερατοειδής αποτελεί διαφανή, ανάγγειο ιστό και μια από τις κυριότερες διαθλαστικές δομές του οφθαλμού, με δείκτη διάθλασης 1.38. Επιπλέον, λόγω της σύστασής του, αποτελεί ανθεκτικό φραγμό σε μηχανικές, χημικές και μικροβιακές προσβολές προερχόμενες από το εξωτερικό περιβάλλον. Καλύπτει το 1/6 της οφθαλμικής επιφάνειας και είναι κυρτός με μεγαλύτερη καμπυλότητα από αυτή του υπόλοιπου βολβού (ακτίνα καμπυλότητας 7.7 mm εξωτερικά και 6.9 mm εσωτερικά). Το πάχος του κυμαίνεται από 540 μm κεντρικά έως 700 μm στην περιφέρεια. Ως ανάγγειος ιστός καλύπτει τις ανάγκες του σε οξυγόνο μέσω της άμεσης επαφής του με τον ατμοσφαιρικό αέρα και τις θρεπτικές του απαιτήσεις από το υδατοειδές υγρό και

το αγγειακό δίκτυο του σκληροκερατοειδικού ορίου (ΣΚΟ). Ιστολογικά αποτελείται από 5 στιβάδες: το επιθήλιο, τη μεμβράνη του Bowman (πρόσθιο αφοριστικό πέταλο), το στρώμα, τη μεμβράνη του Descemet (οπίσθιο αφοριστικό πέταλο) και το ενδοθήλιο [2][3].

Όσον αφορά στο επιθήλιο του κερατοειδή, πρόκειται για μη κερατοποιημένο, πολύστιβο, πλακώδες επιθήλιο, αποτελούμενο από 5-7 στρώματα κυττάρων πάχους 50-60 μm , οι οποίοι στο ΣΚΟ αυξάνονται σε ≥ 10 στρώματα. Τα πιο επιφανειακά επιθηλιακά κύτταρα είναι πεπλατυσμένα και φέρουν μικρολάχνες και μικροπτυχώσεις που συμβάλλουν στη συγκράτηση της δακρυϊκής στιβάδας. Προχωρώντας προς την εσωτερική επιφάνεια του επιθηλίου τα κύτταρα μετατρέπονται σε περυγοειδή, με πολλαπλές πλάγιες προσεκβολές, και στη συνέχεια σε εν τω βάθει κυλινδρικά βασικά κύτταρα, τα οποία επικάθονται στη βασική μεμβράνη, η οποία είναι ισχυρά προσκολλημένη στη μεμβράνη του Bowman. Η βασική στιβάδα παρουσιάζει έντονη μιτωτική δραστηριότητα και μαζί με τα βλαστικά κύτταρα του σκληροκερατοειδικού ορίου συμβάλλουν στην παραγωγή νέων επιθηλιακών κυττάρων [2][3].

Η μεμβράνη του Bowman (πρόσθιο αφοριστικό πέταλο) βρίσκεται ανάμεσα στο επιθήλιο και το στρώμα και αποτελεί ακυτταρική, σκληρή μεμβράνη, πάχους 8-10 μm , η οποία συμβάλλει στη διατήρηση της ακεραιότητας και του σχήματος του κερατοειδή. Αποτελείται από άτακτα διατεταγμένες ίνες κολλαγόνου (κυρίως I, III, V) εντός μεσοκυττάριας ουσίας [2][3].

Το στρώμα συνιστά το 90% του κερατοειδή και συμβάλλει στη μηχανική στήριξη του, καθώς και στη διατήρηση της διαφάνειάς του. Αποτελείται από πολλαπλά πέταλα ινών κολλαγόνου (κυρίως τύπου I), παράλληλα προσανατολισμένων μεταξύ τους και ως προς την επιφάνεια του κερατοειδή και κάθετα προσανατολισμένων ως προς τις ίνες των γειτονικών πετάλων, καθώς και από θεμέλιο ουσία. Μεταξύ των πετάλων απαντώνται πεπλατυσμένα κερατοκύτταρα (ινοβλάστες), των οποίων η κύρια λειτουργία είναι η παραγωγή κολλαγόνου και βλεννοπερωτεϊνών. Η θεμέλιος ουσία είναι πλούσια σε γλυκοζαμινογλυκάνες και νερό [2][3].

Η μεμβράνη του Descemet (οπίσθιο αφοριστικό πέταλο) αποτελεί τη βασική μεμβράνη του ενδοθηλίου του κερατοειδούς. Πρόκειται για ομοιογενή, ανθεκτική δομή λεπτών ινιδίων κολλαγόνου τύπου I, εμβυθισμένων σε μητρική ουσία, πάχους 10 μm [2][3].

Το ενδοθήλιο του κερατοειδούς αποτελείται από μια στιβάδα πεπλατυσμένων, εξαγωνικών κυττάρων, στενά συνδεδεμένων μεταξύ τους μέσω αποφρακτικών ζωνών. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι υπεύθυνα για τη φυσιολογική ενυδάτωση και το μεταβολισμό του κερατοειδή, δρώντας ως φραγμός στην υπερβολική διέλευση υδατοειδούς υγρού, καθώς και ως αντλία ύδατος από τον κερατοειδή προς τον πρόσθιο θάλαμο. Τα κύτταρα του ενδοθηλίου δεν ανανεώνονται. Η κυτταρική πυκνότητα είναι συνήθως 3000 έως 4000 κύτταρα/ mm^2 στα παιδιά και 1000 έως 2000 κύτταρα/ mm^2 στην ηλικία των 80 [2][3].

Ο κερατοειδής στερείται αγγείων και λεμφικού συστήματος, παρουσιάζει όμως πλούσια νεύρωση μέσω των μακρών ακτινοειδών νευρών του οφθαλμικού κλάδου του τριδύμου [2][3].

1.3 Επιπεφυκότας

Ο επιπεφυκότας ανήκει στα επικουρικά εξαρτήματα του οφθαλμού. Πρόκειται για λεπτό και ημιδιαφανή ιστό που διακρίνεται σε τρεις μοίρες: 1) τη βλεφαρική, η οποία καλύπτει και είναι πολύ στενά συνδεδεμένη με την έσω επιφάνεια των βλεφάρων, 2) τα κολπώματα που αντιπροσωπεύουν το τμήμα μετάβασης από τη βλεφαρική στη βολβική μοίρα και 3) τη βολβική μοίρα, η οποία αποτελεί το πιο λεπτό και χαλαρό τμήμα του επιπεφυκότα, το οποίο συνδέεται με το σκληρό και την περιοφθάλμια περιτονία και καλύπτει τους τένοντες των ορθών μύων [3].

Ο επιπεφυκότας προσφέρει τη δυνατότητα ανεξάρτητης κίνησης των βλεφάρων και του βολβού και μέσω της έκκρισης βλεννίνης, αντιβακτηριδιακών πρωτεϊνών, ηλεκτρολυτών και ύδατος συμβάλλει στην προστασία της οφθαλμικής επιφάνειας [2][3].

Ιστολογικά, αποτελείται από εξωτερικό μη κερατοποιημένο, πολύστιβο, κυλινδρικό επιθήλιο, το οποίο έρχεται σε συνέχεια με το μη κερατοποιημένο, πολύστιβο πλακώδες επιθήλιο του κερατοειδούς και με το κερατοποιημένο, πολύστιβο πλακώδες επιθήλιο της επιδερμίδας των βλεφάρων, καθώς και από το στρώμα (substantia propria), μια

στιβάδα χαλαρού συνδετικού ιστού. Το επιθήλιο διαχωρίζεται από το στρώμα με τη βασική μεμβράνη, η οποία αποτελείται κυρίως από κολλαγόνο τύπου IV. Στην περιοχή του ΣΚΟ και στα βλεφαρικά χείλη η βασική μεμβράνη σχηματίζει θηλές. Όπως και στον κερατοειδή, τα πιο επιφανειακά επιθηλιακά κύτταρα παρουσιάζουν μικρολάχνες και μικροπυλώσεις [2][3].

Διάσπαρτα ανάμεσα στα επιθηλιακά κύτταρα του επιπεφυκότα απαντώνται καλυκοειδή κύτταρα, υπεύθυνα για την έκκριση της έσω βλεννώδους στιβάδας των δακρύων, καθώς και κυστίδια βλεννίνης. Τα καλυκοειδή κύτταρα του βολβικού επιπεφυκότα απαντώνται κυρίως στο κατώτερο ρινικό τμήμα του. Επίσης, στο επιθήλιο του επιπεφυκότα ανευρίσκονται λεμφοκύτταρα, κύτταρα του Langerhans και μελανοκύτταρα [4].

Σε αντίθεση με τον κερατοειδή το επιθήλιο του επιπεφυκότα αποτελεί διαπερατή μεμβράνη, τα κύτταρα της οποίας συνδέονται μεταξύ τους με δεσμοσώματα και στενούς συνδέσμους και παρουσιάζουν μεγάλα διακυτταρικά διαστήματα. Η ύπαρξη των μεγάλων αυτών διακυτταρικών διαστημάτων καθιστά δυνατή τη γρήγορη πρόσβαση στην οφθαλμική επιφάνεια κυττάρων φλεγμονής από τα υποκείμενα αγγεία. Επιπλέον, τα διαστήματα αυτά, διευκολύνουν τη διέλευση στην κυκλοφορία του αίματος τοπικών φαρμάκων, αλλά και μικροβίων [3].

Όσον αφορά στο στρώμα, πρόκειται για ινοαγγειακό ιστό, πλούσιο σε επικουρικούς δακρυϊκούς αδένες, ιστιοκύτταρα, λεμφοκύτταρα, πλασματοκύτταρα, ουδετερόφιλα, αιμοφόρα αγγεία, λεμφαγγεία και νεύρα [2][3].

1.4 Σκληρο-Κερατοειδικό Όριο (ΣΚΟ)

Το όριο σύνδεσης του κερατοειδή με το σκληρό ονομάζεται σκληρο-κερατοειδικό όριο (ΣΚΟ). Λόγω του ότι ο κερατοειδής παρουσιάζει μεγαλύτερη καμπυλότητα από αυτή του υπόλοιπου βολβού μια μικρή αύλακα, η επιπολής σκληραία αύλακα σχηματίζεται στο ΣΚΟ [3].

Στο ΣΚΟ, το πολύστιβο πλακώδες μη κερατινοποιημένο κερατοειδικό επιθήλιο μετατρέπεται σε επιθήλιο του επιπεφυκότα, εκτός του ενδοθηλίου που αντικαθίσταται από τα κανάλια αποχέτευσης του ηθμοειδούς δικτυωτού (trabecular meshwork) και το στρώμα συνεχίζει με το σκληρό. Επιπλέον, κυρίως στην ανώτερη και κατώτερη περιοχή του ΣΚΟ η πλούσια αγγείωση του επιπεφυκότα καταλήγει σε ένα αγγειακό σκληροκερατοειδικό πλέγμα [2][3].

Η ύπαρξη ακτινοειδώς διατεταγμένων επαρμάτων συνδετικού ιστού (palisades of Vogt), κυρίως στο ανώτερο και στο κατώτερο τεταρτημόριο του σκληροκερατοειδικού ορίου, φαίνεται από μελέτες να συνδέεται με την ύπαρξη πληθυσμού βλαστικών κυττάρων, υπεύθυνων για τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των κερατοειδικών επιθηλιακών κυττάρων. Τα κύτταρα αυτά, κατά τη διάρκεια της

φυσιολογικής ομοιόστασης του επιθηλίου αλλά και κατά τη διάρκεια της επούλωσης εκτεταμένων κερατοειδικών ελλειμμάτων, μεταναστεύουν από το ΣΚΟ με κεντρομόλο αμοιβαδοειδή κίνηση προς τη βασική στιβάδα του επιθηλίου του κερατοειδή, όπου μετατρέπονται σε μεταβατικά ενισχυτικά κύτταρα (transient amplifying cells – TAC). Τα κύτταρα αυτά, στη συνέχεια, διαιρούνται και διαφοροποιούνται μεταβαίνοντας άνωθεν της βασικής στιβάδας, σε μετα-μιτωτικά κύτταρα (postmitotic cells – PMC) και σταδιακά σε περυγοειδή κύτταρα και στη συνέχεια σε τελικώς διαφοροποιημένα κύτταρα στις εξωτερικές στιβάδες του κερατοειδικού επιθηλίου. Επιπλέον, εκτός από την κεντρομόλο κατεύθυνση προς τον κερατοειδή, κάποια βλαστικά κύτταρα κινούνται, διαιρούνται και διαφοροποιούνται κάθετα στο ΣΚΟ [2][3][5][6].

Κεφάλαιο 2

Το Οφθαλμικό Πτερύγιο

2.1 Γενικά χαρακτηριστικά του πτερυγίου

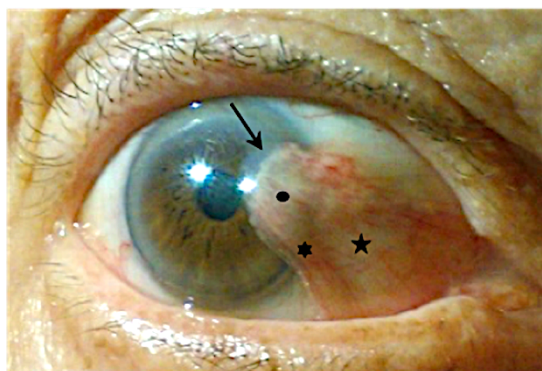
Τα οφθαλμικά πτερύγια αποτελούν τριγωνικές ινοαγγειακές βλάβες του βολβικού επιπεφυκότα και χαρακτηρίζονται από υπερπλασία βλαστικών κυττάρων του σκληροκερατοειδικού (ΣΚΟ) ορίου προς το κέντρο του κερατοειδή στο επίπεδο της μεσοβλεφάριας σχισμής. Σε προχωρημένα στάδια, υπό την επίδραση κυτοκινών, αυξητικών παραγόντων και μεταλλοπρωτεϊνών του συνδετικού ιστού, προκαλούν καταστροφή της στιβάδας του Bowman του κερατοειδούς, φλεγμονή του στρώματος, αγγειογένεση και αναδιαμόρφωση του συνδετικού ιστού [7].

Το πτερύγιο συνήθως αναπτύσσεται στο ρινικό ΣΚΟ, ενίοτε στο κροταφικό και σπανίως μπορεί να είναι αμφοτερόπλευρο. Ανατομικά, αποτελείται από 4 βασικά τμήματα (**Εικόνα 1**):

- 1) ένα πρόσθιο άκρο, την κάψα (cap), η οποία παρουσιάζει ανώμαλα όρια γνωστά ως «Fuchs islets» και εισβάλλει στον κερατοειδή
- 2) την κεφαλή του πτερυγίου (head), οπισθίως της κάψας, μια ανάγγειο περιοχή σταθερά προσκολλημένη στον κερατοειδή

- 3) τον αυχένα (neck), ο οποίος συνδέει την κεφαλή με το σώμα άνωθεν του ΣΚΟ
- 4) το σώμα (body), το οποίο καλύπτει τον επιπεφυκότα και αποτελεί το μεγαλύτερο κομμάτι του πτερυγίου

Το σώμα είναι κινητό και εύκολα χειρουργικά αποσπώμενο από τους υποκείμενους ιστούς. Η εναπόθεση σιδήρου στη βασική στιβάδα του κερατοειδή, προσθίως της κάψας, ονομάζεται γραμμή του Stocker και υποδεικνύει χρονιότητα της βλάβης.



Εικόνα 1: Ανατομικά στοιχεία του πτερυγίου. Βέλος: Διακρίνονται τα ανώμαλα όρια της κάψας και η διήθηση του πτερυγίου στον κερατοειδή. Κουκίδα: Κεφαλή, σταθερά προσκολλημένη στον κερατοειδή. Αστερίσκος: Αυχένος, άνωθεν του ΣΚΟ. Αστέρι: Σώμα, το κινητό τμήμα του πτερυγίου που καλύπτει τον επιπεφυκότα.

Εκτός από την αλλοίωση της αισθητικής εικόνας, το πτερύγιο μπορεί να επηρεάσει την όραση είτε λόγω αποκλεισμού του οπτικού άξονα, είτε λόγω μεταβολής της καμπυλότητας του κερατοειδούς και δημιουργίας αστιγματισμού, καθώς και να προκαλέσει χρόνια φλεγμονή στην οφθαλμική επιφάνεια, συμβλέφαρο και περιορισμό της κινητικότητας του οφθαλμού. Για το λόγο αυτό, στην κλινική αξιολόγηση του

περυγίου, η έκτασή του στον κερατοειδή, εκφραζόμενη ως την απόσταση ανάμεσα στην κάψα και το ΣΚΟ ή την κόρη, αποτελεί τον πιο σημαντικό δείκτη βαρύτητας της νόσου. Άλλοι παράγοντες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παρακολούθηση της νόσου είναι η οπτική οξύτητα, η κινητικότητα του οφθαλμού καθώς και ο ρυθμός ανάπτυξης του περυγίου [2].

2.2 Διαφορική διάγνωση

Η διαφορική διάγνωση του περυγίου περιλαμβάνει [8][9]:

- 1) Το ψευδοπερύγιο: πρόκειται για σύμφυση του επιπεφυκότα στον κερατοειδή στα πλαίσια φλεγμονής ή τραύματος. Καθώς το ψευδοπερύγιο προσφύεται σταθερά μόνο στο άκρο που έρχεται σε επαφή με τον κερατοειδή, η διαφορική διάγνωση από το περύγιο βασίζεται στο «Bowman's probe» τεστ, κατά το οποίο μια μήλη χρησιμοποιείται για να ελέγξει τη βατότητα εκατέρωθεν της βλάβης και την απουσία πρόσφυσης στον υποκείμενο ιστό.
- 2) Το στεάτιο: λευκο-κίτρινη, επίπεδη ή ελαφρώς υπεγερμένη βλάβη του επιπεφυκότα στο επίπεδο της μεσοβλεφάριας σχιχμής και δίπλα στο ΣΚΟ. Δεν εκτείνεται στον κερατοειδή.
- 3) Πάννος: χαρακτηρίζεται από την ανάπτυξη αγγείων συνήθως στο επίπεδο της μεμβράνης του Bowman. Δεν παρουσιάζει υπέγερση και η εμφάνισή του συνδέεται με τη χρήση φακών επαφής, καθώς και με παθήσεις όπως η

βλεφαρίτιδα, το τράχωμα, η ροδόχρους ακμή, η ερπητική κερατίτιδα, η ατοπία και το τραύμα.

- 4) Οξώδης σκληρίτιδα: βαριά και επώδυνη φλεγμονή του σκληρού, ο οποίος παρουσιάζεται διογκωμένος και υπεραίμικός στην περιοχή της φλεγμονής.
- 5) Ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία του επιπεφυκότα (CIN): ετερόπλευρη, θηλώδης και ζελατινώδης αλλοίωση, που μπορεί να συνοδεύεται από λευκοπλακία. Συχνά είναι υπεργερμένη και παρουσιάζει αγγείωση. Η θέση δεν είναι η τυπική ρινική ή κροταφική του πτερυγίου και δεν έχει το χαρακτηριστικό τριγωνικό σχήμα του πτερυγίου.
- 6) Δερμοειδής κύστη του ΣΚΟ: συγγενής, στρογγυλή, λευκωπή βλάβη, συνηθέστερα εντοπισμένη στο κάτω-κροταφικό τεταρτημόριο του ΣΚΟ.

2.3 Επιδημιολογία

Μέχρι σήμερα, δεν υπάρχουν δεδομένα για τον παγκόσμιο επιπολασμό του πτερυγίου. Από μελέτες, φαίνεται ότι η συχνότητα του πτερυγίου παρουσιάζει σημαντικές γεωγραφικές διακυμάνσεις από 0.07% έως 53%, με το συνολικό επιπολασμό να κυμαίνεται από 10.2% έως 12% [10][11]. Επιπλέον, το πτερύγιο παρουσιάζεται ελαφρώς συχνότερα στους άνδρες και εντοπίζεται συνήθως ρινικά και ετερόπλευρα. Εμφανίζεται με μεγαλύτερη συχνότητα σε ηλικιωμένους, σε αγροτικούς πληθυσμούς και σε άτομα με υπαίθριες δραστηριότητες. Η εμφάνισή του παρουσιάζει σημαντική θετική συσχέτιση με την έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία και έχει παρατηρηθεί

υψηλότερος επιπολασμός σε περιοχές χαμηλού γεωγραφικού πλάτους $< 40^\circ$, ενώ φαίνεται η χρήση προστατευτικών για την ηλιακή ακτινοβολία γυαλιών να μειώνει την πιθανότητα εμφάνισής του [10][11][12].

2.4 Ιστοπαθολογία

Η κάψα του περυγίου καλύπτεται από διαφοροποιημένο κερατοειδικό επιθήλιο, ενώ η υπόλοιπη επιφάνεια του περυγίου καλύπτεται με επιθήλιο όπως αυτό του επιπεφυκότα, το οποίο όμως παρουσιάζει πλακώδη μετάπλαση, καθώς και υπερπλασία των καλυκοειδών κυττάρων (goblet cells). Η κύρια μάζα του περυγίου αποτελείται από συνδετικό ιστό, πλούσιο σε αγγεία και συχνά οιδηματώδη, ο οποίος παρουσιάζει μεταβολές ως προς τη σύσταση της εξωκυττάριας ουσίας, με συσσώρευση ανώμαλων μορφών ελαστίνης, γλυκοζαμινογλυκανών, ινοβλαστών και ινών κολλαγόνου [1].

Αναλυτικότερα, η ανάπτυξη του περυγίου ξεκινά από τροποποιημένα βλαστικά κύτταρα του ΣΚΟ, τα οποία μεταναστεύουν προς τη βασική στιβάδα του κερατοειδή και διαφοροποιούνται σε μη φυσιολογικά κερατοειδικά κύτταρα, τα οποία παρουσιάζουν υπερπλασία και προκαλούν διάλυση της μεμβράνης του Bowman, που οπτικά αναγνωρίζεται ως θόλωση γύρω από την κάψα.

Στο σημείο καταστροφής της μεμβράνης του Bowman πραγματοποιείται επιθηλιακή-μεσεγγυματική μετάβαση, καθώς η κάψα του περυγίου φαίνεται να εμπεριέχει τροποποιημένους ινοβλάστες με επιμηκυμένους και ανώμαλους πυρήνες, οι οποίοι

αναπτύσσονται από το ΣΚΟ προς το κέντρο του κερατοειδούς, καταστρέφοντας την μεμβράνη του Bowman και μέρος του στρώματος, με δημιουργία ινοαγγειακού ιστού, του οποίου οι ίνες κολλαγόνου (κυρίως τύπου I και III) παρουσιάζουν εκφύλιση. Επιπλέον, διαταραχές στη σύνθεση του ελαστικού ιστού (ελάστωση), με συναθροίσεις ηωσινοφυλικού, κοκκιωματώδους υλικού, αποτελούμενο από άτακτα διατεταγμένες ανώμαλες πρόδρομες μορφές ελαστικών ινών (ελαστοδυσπλασία), οι οποίες σταδιακά οδηγούνται σε εκφύλιση και πλήρη αποδιοργάνωση με δημιουργία άμορφων συσσωματωμάτων ελαστικού ιστού (ελαστοδυστροφία), έχουν διαπιστωθεί κατά την ανάπτυξη του πτερυγίου. Οι ελαστικές αυτές ίνες φαίνεται ότι παράγονται από τους κατεστραμμένους από την ηλιακή ακτινοβολία ινοβλάστες της θεμέλιου ουσίας. Χαρακτηριστική είναι επίσης η φλεγμονώδης διήθηση με παρουσία κυρίως ουδετερόφιλων, T-λεμφοκυττάρων, μακροφάγων, μαστοκυττάρων, καθώς και η νεοαγγείωση [7][13].

Από μελέτη των ινοβλαστών της κάψας του πτερυγίου, προκύπτει ότι πρόκειται για διαφοροποιημένους και πιθανόν προ-νεοπλασματικούς ινοβλάστες, αφού εξαρτώνται λιγότερο από το πλάσμα και τους εξωγενείς παράγοντες ανάπτυξης, φτάνουν σε κορεσμό πυκνότητας πληθυσμού 3 φορές μεγαλύτερο από τους φυσιολογικούς ινοβλάστες του επιπεφυκότα και μπορούν να δημιουργήσουν αποικίες σε ημιστερεό άγαρ, ενώ σε ίδιες συνθήκες, οι ινοβλάστες του επιπεφυκότα δεν μπορούν να αναπτυχθούν [14].

Τέλος, η παρουσία δυσπλασίας και μελανοκυτταρικών βλαβών, καθώς και η ανάπτυξη καρκινώματος *in situ* και ακανθοκυτταρικού καρκινώματος, που έχουν παρατηρηθεί σε περύγια, υπογραμμίζουν τη δυνητικά νεοπλασματική συμπεριφορά των βλαβών αυτών. Επιπλέον, σε αυτό συνηγορούν, η απώλεια ετεροζυγωτίας (LOH) και η υπερέκφραση του p53 που έχουν παρατηρηθεί σε κάποιες μελέτες [15][16].

2.5 Παθογένεια

Αν και η παθογένεια του περυγίου δεν είναι σαφής, επιστημονικά ευρήματα συνηγορούν ότι πρόκειται για πολυπαραγοντική πάθηση, καθώς η έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία, η γενετική προδιάθεση, ιοί και άλλοι περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως η σκόνη και ο αέρας φαίνεται να συμβάλουν στη δημιουργία του περυγίου (**Εικόνα 2**).

2.5.1 Γενετική προδιάθεση

Ο ρόλος της γενετικής προδιάθεσης στην ανάπτυξη του περυγίου φαίνεται να αφορά είτε στην ίδια τη νόσο, είτε στην αυξημένη ευαισθησία των ασθενών στην ηλιακή ακτινοβολία.

Πράγματι, σε έναν υποπληθυσμό των ασθενών με περύγιο διαφαίνεται ότι η πάθηση παρουσιάζει κληρονομικό χαρακτήρα. Ο υποπληθυσμός αυτός περιλαμβάνει ασθενείς νεότερους σε ηλικία και ο συνηθέστερος τρόπο μετάδοσης, βάσει του γενεαλογικού

ιστορικού των ασθενών, φαίνεται να είναι αυτοσωμικός επικρατής ή αυτοσωμικός επικρατής με ατελή κυριαρχία. Στους ασθενείς αυτούς έχει διαπιστωθεί ότι η έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία παίζει λιγότερο σημαντικό ρόλο, αφού σε μελέτες το ποσοστό έκθεσης δεν παρουσιάζει σημαντικές διαφορές μεταξύ των ασθενών και του δείγματος ελέγχου [17][18].

Επιπλέον, γενετικό υπόβαθρο, που αφορά σε συγγενείς ανωμαλίες της επιδιόρθωση βλαβών του DNA, οι οποίες οδηγούν σε αυξημένη ευαισθησία στην ηλιακή ακτινοβολία, φαίνεται να σχετίζεται με την ιδιαίτερα συχνή εμφάνιση αμφοτερόπλευρου πτερυγίου σε ασθενείς με μελαγχρωστικό ξηροδερμα [19].

Τέλος, διάφοροι πολυμορφισμοί όπως της ανθρώπινης γλυκοσιδάσης 1 της 8-υδροξυγουανίνης (HOGG1) Ser326Cys, του μηδενικού (null) αλληλόμορφου του γονιδίου GSTM1 της S-τρανσφεράσης της γλουταθειόνης και του εκκινητή του Ku70, T-991C, έχουν συσχετιστεί σε μελέτες με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης πτερυγίου σε κάποιους ασθενείς [7].

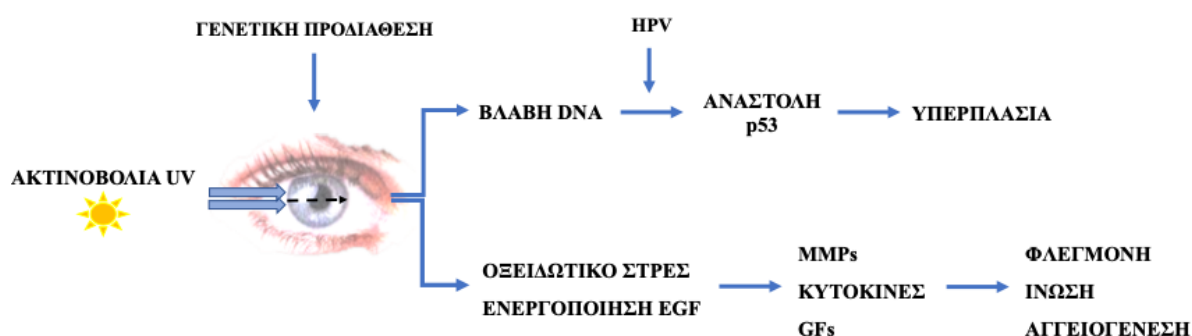
2.5.2 Η υπεριώδης ακτινοβολία

Επιδημιολογικές μελέτες υποδεικνύουν την υπεριώδη ακτινοβολία UVA και UVB με μήκος κύματος από 290 έως 400 nm, ως το σημαντικότερο παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη του πτερυγίου και καθιστούν το πτερύγιο μια από τις σημαντικότερες «οφθαλμοηλιώσεις». Την άποψη αυτή επιβεβαιώνουν το γεγονός ότι το πτερύγιο

παρατηρείται συχνότερα σε πληθυσμούς που εκτίθενται σε υψηλές δόσεις υπεριώδους ακτινοβολίας, είτε λόγω επαγγέλματος, είτε λόγω υπαίθριων δραστηριοτήτων. Χαρακτηριστικός είναι ο υψηλός επιπολασμός του πτερυγίου σε περιοχές με γεωγραφικά πλάτη 40° βορείως και νοτίως του ισημερινού, την ονομαζόμενη « ζώνη του πτερυγίου». Ο επιπολασμός του πτερυγίου στη ζώνη αυτή ανέρχεται στο 22%, ενώ μειώνεται σε λιγότερο από 2% έξω από αυτή. Επιπλέον, το πτερύγιο είναι ιδιαίτερα συχνό σε εδάφη με υψηλή λευκαύγεια (albedo). Μελέτη στον πληθυσμό της Αυστραλίας υποδεικνύει ότι αύξηση 1% της υπεριώδους ακτινοβολίας μπορεί να προκαλέσει αύξηση της επίπτωσης του πτερυγίου 2.5-14%. Άμεση συσχέτιση με την έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία φαίνεται να έχει η πτερυγοειδής εμφάνιση του πτερυγίου και η ρινική συνήθως θέση του, καθώς το ηλιακό φως προσπίπτει στο κροταφικό ΣΚΟ, διαπερνά τον πρόσθιο θάλαμο και συγκεντρώνεται στο ρινικό ΣΚΟ. Η ποσότητα του φωτός που συγκεντρώνεται στο ΣΚΟ είναι ανάλογη της καμπυλότητάς του κερατοειδή. Τέλος, η συσχέτιση του πτερυγίου με «δερματοηλιώσεις», όπως το δερματικό βασικοκυτταρικό καρκίνωμα, η δερματική πορφύρα, το πολύμορφο ακτινικό ερύθημα και το μελαγχρωστικό ξηρόδερμα, συνηγορούν στην άμεση συσχέτιση του πτερυγίου με την έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία [20][21].

Η υπεριώδης ακτινοβολία φαίνεται να προκαλεί αλλοίωση και ενεργοποίηση των βλαστικών κυττάρων του ΣΚΟ, δρώντας με τον τρόπο αυτό ως εναρκτήριο παράγοντας (trigger factor) στην ανάπτυξη του πτερυγίου. Ο μηχανισμός δράσης, όπως

και κατά τη φωτογήρανση, μπορεί να περιλαμβάνει είτε την απευθείας πρόκληση βλαβών στο DNA των κυττάρων, είτε την παραγωγή ελευθέρων ριζών και την πρόκληση οξειδωτικού στρες. Οι μηχανισμοί αυτοί προκαλούν την ενεργοποίηση μονοπατιών επιθηλιακής-μεσεγχυματικής μετατροπής με παραγωγή αυξητικών παραγόντων, κυτοκινών και μεταλλοπρωτεϊνών της θεμέλιας ουσίας, οδηγώντας σε φλεγμονή, αγγειογένεση, πολλαπλασιασμό, ίνωση και αναδιαμορφωση του συνδετικού ιστού (**Εικόνα 2**). Οι πιθανοί μηχανισμοί που σχετίζονται με τη δράση της ηλιακής ακτινοβολίας στην ανάπτυξη του πτερυγίου αναλύονται παρακάτω [7][21].



Εικόνα 2: Παθογενετικός μηχανισμός ανάπτυξης του πτερυγίου

2.5.2.1 Οξειδωτικό στρες

Το οξειδωτικό στρες προκαλείται από την διαταραχή της ισορροπίας ανάμεσα σε αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς και παραγωγή δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS) και αζώτου (RNS) κατά τον κυτταρικό μεταβολισμό, με βλαπτικές συνέπειες σε επίπεδο

πρωτεϊνών, λιπιδίων και DNA του κυττάρου. Το οξειδωτικό στρες εμπλέκεται στην παθοφυσιολογία πολλών νοσημάτων όπως η χρόνια φλεγμονή, οι καρδιαγγειακές παθήσεις, ο καρκίνος, καθώς και στη διεργασία της γήρανσης. Σε επίπεδο οφθαλμού, εμπλέκεται σε παθήσεις όπως η ξηροφθαλμία, ο κερατόκωνος, η φυσαλιδώδης κερατοπάθεια, η ενδοθηλιακή δυστροφία Fuchs, ο καταρράκτης, η ραγοειδίτιδα, το γλαύκωμα, η αμφιβληστροειδοπάθεια της προωρότητας και η ηλικιακή εκφύλιση της ωχράς [22].

Μελέτες υποδεικνύουν την παρουσία οξειδωτικού στρες στο πτερύγιο, καθώς έχουν ανιχνευτεί αυξημένα επίπεδα του δείκτη οξειδωτικής καταστροφής του DNA, 8-υδροξυ-2-δεοξυγουανοσίνη (8-OhdG) και του δείκτη οξειδωτικής καταστροφής των λιπιδίων μαλονδυαλδεύδη (MDA) σε ιστούς πτερυγίου. Επιπλέον, αυξημένα επίπεδα μονοξειδίου του αζώτου (NO) και της συνθάσης του (iNOS) έχουν επίσης ανιχνευτεί στο επιθήλιο του πτερυγίου [23][7] [24].

2.5.2.2 Ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53

Η πρωτεΐνη p53 κωδικοποιείται από το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 και εκφράζεται στον πυρήνα των φυσιολογικών κυττάρων. Λειτουργεί ως ρυθμιστικός παράγοντας στον πολλαπλασιασμό του κυττάρου, αφού συμμετέχει ενεργά τόσο στη διαδικασία επιδιόρθωσης του DNA, όσο και στην απόπτωση των κυττάρων με αλλοιωμένο DNA. Σε φυσιολογικές συνθήκες η πρωτεΐνη δεν είναι ανιχνεύσιμη λόγω της μικρής ημίσειας ζωής της. Η ενεργοποίηση του γονιδίου p53, η οποία πραγματοποιείται σε συνθήκες

οξειδωτικού στρες, κατά την έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία και σε περιπτώσεις βλάβης του DNA, καθώς και η μετάλλαξή του, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της σταθερότητάς της, επιτρέπουν την ανίχνευση της πρωτεΐνης p53 με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους [21].

Η πρωτεΐνη p53 φαίνεται να καταστέλλει την επιθηλιακή-μεσεγχυματική μετατροπή (EMT), επάγοντας την έκφραση μικρο-RNA (mi-RNA), καθώς και αναστέλλοντας το σηματοδοτικό μονοπάτι του TGF- β (τροποποιητικός αυξητικός παράγοντας β). Στο οφθαλμικό πτερύγιο, διάφορες μελέτες υποστηρίζουν ότι η πρόκληση μεταλλάξεων του p53 στα βλαστοκύτταρα του ΣΚΟ, εξαιτίας της χρόνιας έκθεσης στην υπεριώδη ακτινοβολία ή η απενεργοποίησή του μέσω των ογκοπρωτεϊνών E6 και E7 του ιού HPV, μπορεί να σχετίζονται με την ανάπτυξή του. Επιπλέον, έχει διαπιστωθεί ότι η απενεργοποίηση του p53 καταστέλλει το μονοπάτι miR-200a με αποτέλεσμα την υπερέκφραση της μεταγραφικής πρωτεΐνης ZEB, η οποία συμβάλλει στην εξέλιξη της επιθηλιακής μεσεγχυματικής μετατροπής στο πτερύγιο. Παρόλα αυτά, ο ρόλος του p53 στην ανάπτυξη του πτερυγίου παραμένει αμφιλεγόμενος [25][26].

2.5.3 Ιοί

Η συμμετοχή διαφόρων ογκογόνων ιών στην παθογένεια του πτερυγίου, όπως ο απλός έρπητας (HSV), ο κυτταρομεγαλοϊός (CMV), ο ιός Epstein-Barr (EBV) και ο ανθρώπινος ιός των θηλωμάτων (HPV), έχει εκτενώς μελετηθεί. Από τους ιούς αυτούς, ο HPV έχει

περισσότερο συσχετιστεί με την παρουσία του πτερυγίου και αποτελεί σημαντικό σημείο έρευνας όσον αφορά στην παθογένεια του οφθαλμικού πτερυγίου [27].

2.5.4 Επιθηλιακή-Μεσεγχυματική Μετατροπή (EMT) και μηχανισμοί ανάπτυξης του πτερυγίου

Ο μηχανισμός της επιθηλιακής-μεσεγχυματικής μετατροπής βασίζεται στην ιδιότητα της επιθηλιακής πλαστικότητας και περιλαμβάνει την ικανότητα διαφοροποίησης επιθηλιακών κυττάρων σε κύτταρα μεσεγχυματικού τύπου. Παίζει σημαντικό ρόλο, στην ανάπτυξη κατά τη διάρκεια της εμβρυικής ζωής, στη διαδικασία της φλεγμονής και της επούλωσης, καθώς και στη μετάσταση επιθηλιακών καρκίνων. Κατά τη διαδικασία αυτή, παρατηρείται απώλεια της συνοχής των επιθηλιακών κυττάρων, τροποποίηση του κυτταροσκελετού και δυνατότητα μετακίνησης των κυττάρων. Επιπλέον, κατά την EMT παρατηρείται υπερέκφραση μεταλλοπρωτεϊνών, που οδηγούν στην αποδόμηση της βασικής μεμβράνης και της θεμέλιας ουσίας, στη διείσδυση των κυττάρων, στην παραγωγή αυξητικών παραγόντων και στην αγγειογένεση. Διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια (NOTCH, p53, Wnt/ β -catenin, β -catenin/ TCF, ZEB1, ZEB2, TWIST), τα οποία καταλήγουν στον πυρήνα των κυττάρων επιδρώντας με μεταγραφικούς παράγοντες, φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην EMT κατά τη δημιουργία του πτερυγίου. Επιπλέον μελέτες υποδεικνύουν το σημαντικό ρόλο της EMT όχι μόνο στην ανάπτυξη, αλλά και την υποτροπή μετά από χειρουργική επέμβαση του πτερυγίου [25][28].

2.5.5 Αυξητικοί παράγοντες (GF)

Οι αυξητικοί παράγοντες (GF) προάγουν την μίτωση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Υψηλά επίπεδα αυξητικών παραγόντων έχουν ανιχνευτεί στο οφθαλμικό περύγιο και φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξή του. Επιπλέον, η συσχέτιση της έκθεσης στην ηλιακή ακτινοβολία με την αύξηση ορισμένων αυξητικών παραγόντων στους ιστούς, συμβάλλει στη θεώρηση της ηλιακής ακτινοβολίας ως «trigger factor» στη δημιουργία του περυγίου. Αυξητικοί παράγοντες που έχουν ανιχνευτεί στο περύγιο είναι [21][29]:

- 1) HB-EGF (επιδερμικός αυξητικός παράγοντας που συνδέεται με την ηπαρίνη): ανήκει στην οικογένεια των EGF, παρουσιάζει ισχυρή μιτογόνο δράση και εμπλέκεται στον πολλαπλασιασμό, τη φλεγμονή, την αγγειογένεση και την επούλωση. Συνδέεται με τον υποδοχέα EGFR ενεργοποιώντας τη δραστηριότητα της τυροσινικής κινάσης. Αύξηση των EGFR έχει διαπιστωθεί στα περύγια.
- 2) VEGFs (ενδοθηλιακοί αυξητικοί παράγοντες): Η οικογένεια των VEGF περιλαμβάνει τους VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, και τον αυξητικό παράγοντα του πλακούντα PLGF. Οι VEGFs προάγουν την αγγειογένεση και τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και αναστέλλουν την απόπτωση. Αυξημένα επίπεδα mRNA του VEGF-A, σε σύγκριση με το φυσιολογικό επιπεφυκότα, έχουν ανιχνευτεί σε περύγια. Επιπλέον, υψηλά επίπεδα mRNA του VEGF-C έχουν συσχετιστεί με τη

διαδικασία της λεμφαγγειογένεσης στο πτερύγιο. Παρά το γεγονός ότι οι VEGFs φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του πτερυγίου, η αποτελεσματικότητα της χρήσης αντι-αγγειογενετικών παραγόντων (anti-VEGFs) στην θεραπεία του πτερυγίου, αν και έχει προταθεί από διάφορες μελέτες, παραμένει αμφιλεγόμενη.

- 3) PDGF (αυξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων): Ο παράγοντας αυτός είναι χημειοτακτικός για τα κύτταρα που μεταναστεύουν στους ιστούς, όπως είναι τα ουδετερόφιλα, τα μονοκύτταρα και οι ινοβλάστες. Επιπλέον, ενισχύει τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών και την παραγωγή εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας.
- 4) b-FGF (αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών): Παρουσιάζει μιτογόνο δράση, ρυθμίζει τη μετανάστευση και τη διαφοροποίηση των κυττάρων και συμμετέχει στους μηχανισμούς επούλωσης.
- 5) TGF-β (τροποποιητικός αυξητικός παράγοντας β): Η οικογένεια του TGF-β περιλαμβάνει μία μεγάλη οικογένεια πρωτεϊνών που παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη, την ομοίωση, την επούλωση και την ίωση, συμμετέχοντας έτσι στη δημιουργία του ινοαγγειακού ιστού του πτερυγίου.

2.5.6 Μεταλλοπρωτεϊνάσες της εξωκυττάριας ουσίας (MMPs)

Πρόκειται για πρωτεϊνάσες που περιέχουν ένα ιόν ψευδαργύρου (Zn^{2+}). Εμπλέκονται στον καταβολισμό των συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας, ο οποίος απαιτεί

υποχρεωτικά την παρουσία ιόντων Ca^{2+} . Διακρίνονται σε κατηγορίες: 1) Κολλαγενάσες (MMP-1, -8, -13), 2) Ζελατινάσες (MMP-2, -9), 3) Στρωμολυσίνες (MMP-3, -10, -11), 4) Ματριλυσίνες (MMP-7), 4) Μεταλλοπρωτεϊνάσες των μεμβρανών (MT-MMPs) 5) άλλες. Η καταλυτική δραστηριότητα των MMPs ρυθμίζεται από τρεις αναστολείς (TIMPs, Tissue Inhibitors of Metalloproteinases).

Αυξημένη σύνθεση των MMPs ενζύμων ανιχνεύεται σε σοβαρές ασθένειες όπως η φλεγμονώδης αρθρίτιδα, οι καρδιαγγειακές και οι νευροεκφυλιστικές παθήσεις, οι αλλεργίες και οι νεοπλασίες. Όσον αφορά στον οφθαλμό, εμπλέκονται στη διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια, το γλαύκωμα, την ξηροφθαλμία, τη χοριοειδική νέο-αγγείωση (CNV) και την ηλικιακή εκφύλιση της ωχράς (AMD). Υπερέκφραση των MMPs ενζύμων, πιθανόν οφειλόμενης σε αυξημένη έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία, έχει συσχετιστεί με την καταστροφή της μεμβράνης του Bowman και την αναδιαμόρφωση της θεμέλιου ουσίας στο οφθαλμικό περύγιο [21][29].

2.5.7 Παράγοντες φλεγμονής

Η παρουσία χρόνιας φλεγμονής είναι απαραίτητη για τη δημιουργία του περυγίου. Πολλαπλοί παράγοντες φλεγμονής και κυρίως οι ιντερλευκίνες (IL)-1, -6 και -8 έχουν ανιχνευτεί στο περύγιο. Η υπερέκφραση των παραγόντων αυτών είναι πιθανό να οφείλεται σε αυξημένη έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία [21][29].

2.6 Θεραπεία του πτερυγίου

Η θεραπεία του πτερυγίου βασίζεται στη χειρουργική αφαίρεσή του και πλήθος τεχνικών έχουν προταθεί προκειμένου να εξασφαλιστεί το καλύτερο λειτουργικό και αισθητικό αποτέλεσμα και η αποφυγή επιπλοκών και υποτροπών. Οι χειρουργικές αυτές τεχνικές περιλαμβάνουν [30][31]:

1. **Την εκτομή του πτερυγίου και τη συρραφή με πρωτογενή σύγκλειση του επιπεφυκότα:** περιλαμβάνει τη χειρουργική αφαίρεση του πτερυγίου με τη μικρότερη δυνατή εκτομή επιπεφυκότα και συρραφή του τραύματος, με σκοπό την κάλυψη του σκληρού κάτω από το πτερύγιο.
2. **Τη σύγκλειση με την τεχνική του γυμνού σκληρού:** περιλαμβάνει τη χειρουργική αφαίρεση του πτερυγίου και τη συρραφή του επιπεφυκότα με τρόπο ώστε ο σκληρός κάτω από το πτερύγιο να παραμένει για 2-3 mm ακάλυπτος.
3. **Την εκτομή του πτερυγίου και τη συρραφή με κρημνό επιπεφυκότα:** περιλαμβάνει τη χειρουργική αφαίρεση του πτερυγίου, την παρασκευή κρημνού από γειτονικό υγιή επιπεφυκότα, την αλλαγή του προσανατολισμού του κρημνού και τη συρραφή αυτού προκειμένου να καλύψει πλήρως τον υποκείμενο του πτερυγίου σκληρό.

4. **Την εκτομή και τη συρραφή με χρήση αυτομοσχευμάτων επιπεφυκότα:** περιλαμβάνει τη χειρουργική αφαίρεση του πτερυγίου, τη λήψη μοσχεύματος υγιούς επιπεφυκότα από τον ίδιο οφθαλμό και είτε τη συρραφή αυτού με τον επιπεφυκότα, είτε την καθήλωσή του με χρήση ιστικής κόλλας στην περιοχή αφαίρεσης του πτερυγίου, προκειμένου να καλυφτεί πλήρως ο σκληρός.
5. **Την εκτομή και τη συρραφή με χρήση αμνιακών μεμβρανών:** περιλαμβάνει τη χειρουργική αφαίρεση του πτερυγίου και είτε τη συρραφή αμνιακής μεμβράνης με τον επιπεφυκότα, είτε την καθήλωσή της με χρήση ιστικής κόλλας, στην περιοχή αφαίρεσης του πτερυγίου, προκειμένου να καλυφτεί πλήρως ο σκληρός.

Παρά την πληθώρα όμως των χειρουργικών τεχνικών, το πτερύγιο παρουσιάζει υψηλά ποσοστά υποτροπής, κυρίως μέσα στον πρώτο χρόνο από την αφαίρεσή του. Επιπλέον, η ανάπτυξη των υποτροπιαζόντων πτερυγίων φαίνεται να είναι πιο γρήγορη και επιθετική και η θεραπεία τους δυσκολότερη. Παράγοντες που έχουν συνδεθεί με την πιθανότητα υποτροπής είναι η φυλή, η εμφάνιση του πτερυγίου σε νεότερη ηλικία, το μέγεθος και η έκτασή του στον κερατοειδή, καθώς και η παρουσία αυξημένης αγγείωσης στην περιοχή της βλάβης και η αυξημένη μετεγχειρητική φλεγμονή [32][33][34].

Μία κλίμακα έχει προταθεί για την αξιολόγηση της πιθανότητας υποτροπής του χειρουργικά αφαιρεθέντος πτερυγίου, η οποία βασίζεται στην εκτίμηση της βαρύτητας

της πάθησης ανάλογα με την ορατότητα των επισκληρίδιων αγγείων κάτω από το σώμα. Η κλίμακα περιλαμβάνει τις εξής διαβαθμίσεις [2]:

- 1) Βαθμός T1 (ατροφικό), όταν είναι δυνατή η επισκόπηση των επισκληρικών αγγείων κάτω από το σώμα.
- 2) Βαθμός T2 (ενδιάμεσο), όταν τα επισκληρικά αγγεία διαφαίνονται ελαφρώς.
- 3) Βαθμός T3 (σαρκώδες), όταν τα επισκληρικά αγγεία δεν διαφαίνονται λόγω επικάλυψής τους από ινοαγγειακό ιστό.

Πίνακας 1: Ποσοστό υποτροπής ανά χειρουργική τεχνική αφαίρεσης πτερυγίου

Χειρουργική Τεχνική	Ποσοστό Υποτροπής (%)
Γυμνού σκληρού (Bare sclera)	38-88
Πρωτογενής σύγκλειση (Primary closure)	45-70
Αυτομόσχευμα επιπεφυκότα με χρήση ραμμάτων	5-30
Αυτομόσχευμα επιπεφυκότα με χρήση ιστικής κόλλας	5.3-11.9
Σκληροκερατοειδικό Αυτομόσχευμα επιπεφυκότα	0-15
Κρημνός (flap) επιπεφυκότα	13-33.3
Μόσχευμα αμνιακής μεμβράνης με χρήση ραμμάτων	6-40
Μόσχευμα αμνιακής μεμβράνης με χρήση ιστικής κόλλας	10-10.5

Εξαιτίας των αυξημένων πιθανών υποτροπών, διάφορες συνδυαστικές με τη χειρουργική αφαίρεση θεραπείες έχουν προταθεί, όπως η β-ακτινοβολία, η τοπική εφαρμογή μιτομυκίνης C (MTC), 5-φλουοροουρακίλης (5-FU), ιντερφερόνης άλφα-2b (IFN alpha-2b), κυκλοσπορίνης A (CsA), καθώς και η χρήση ανταγωνιστών των VEGFs (anti-VEGF). Παρόλα αυτά, η επιτυχία της χειρουργικής αφαίρεσης του πτερυγίου

παραμένει αμφίβολη και ο κίνδυνος σοβαρών επιπλοκών όπως η σκληροκερατοειδική τήξη, η ανεπάρκεια βλαστικών κυττάρων του ΣΚΟ, ο καταρράκτης και το γλαύκωμα, υψηλός (**Πίνακας 1**) [35].

Κεφάλαιο 3

Οι Ιοί των Ανθρώπινων Θηλωμάτων (HPV)

3.1 Γενικά Χαρακτηριστικά των Ιών HPV

Οι HPV ανήκουν στην οικογένεια Papovaviridae και στο γένος των ιών των θηλωμάτων PV (papillomavirus). Οι PV είναι ευρέως διαδεδομένοι στη φύση, αλλά ειδικοί ως προς τον ξενιστή. Έχουν ανευρεθεί περίπου 200 τύποι του ιού, από τους οποίους περίπου οι 150 προσβάλλουν αποκλειστικά τον άνθρωπο και προκαλούν υπερπλαστικές, προκαρκινικές και καρκινικές βλάβες στο δέρμα και στους βλεννογόνους του γεννητικού συστήματος, του πρωκτού, του ανώτερου αναπνευστικού και του στοματοφάρυγγα.

Πρόκειται για μικρούς ιούς με διπλή, κυκλική έλικα DNA και χαρακτηριστική εικοσαεδρική συμμετρία. Το DNA του ιού περιβάλλεται από καψίδιο χωρίς έλυτρο, το οποίο δομούν δύο καψιδικές πρωτεΐνες, η μείζονα L1 και η ελάσσονα L2. Το γονιδίωμα του ιού διακρίνεται σε 3 περιοχές: την πρόιμη περιοχή E (Early region), την όψιμη περιοχή L (Late region) και μια τρίτη, τη μακρά LCR (Long Control Region) περιοχή. Η E περιοχή περιλαμβάνει 6 ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια ORFs (Open Reading Frames) E1, E2, E4, E5, E6, E7, τα οποία είναι υπεύθυνα για τον

πολλαπλασιασμό του ιού, τη μεταγραφή του DNA, την απελευθέρωση των ιικών σωματιδίων και τον κυτταρικό μετασχηματισμό. Η περιοχή L κωδικοποιεί τις δομικές πρωτεΐνες L1 και L2 του καψιδίου. Η LCR αποτελεί μη κωδικοποιούσα περιοχή (Non Coding Region), η οποία ελέγχει την έκφραση γονιδίων και την αντιγραφή του ιού [36][37][38].

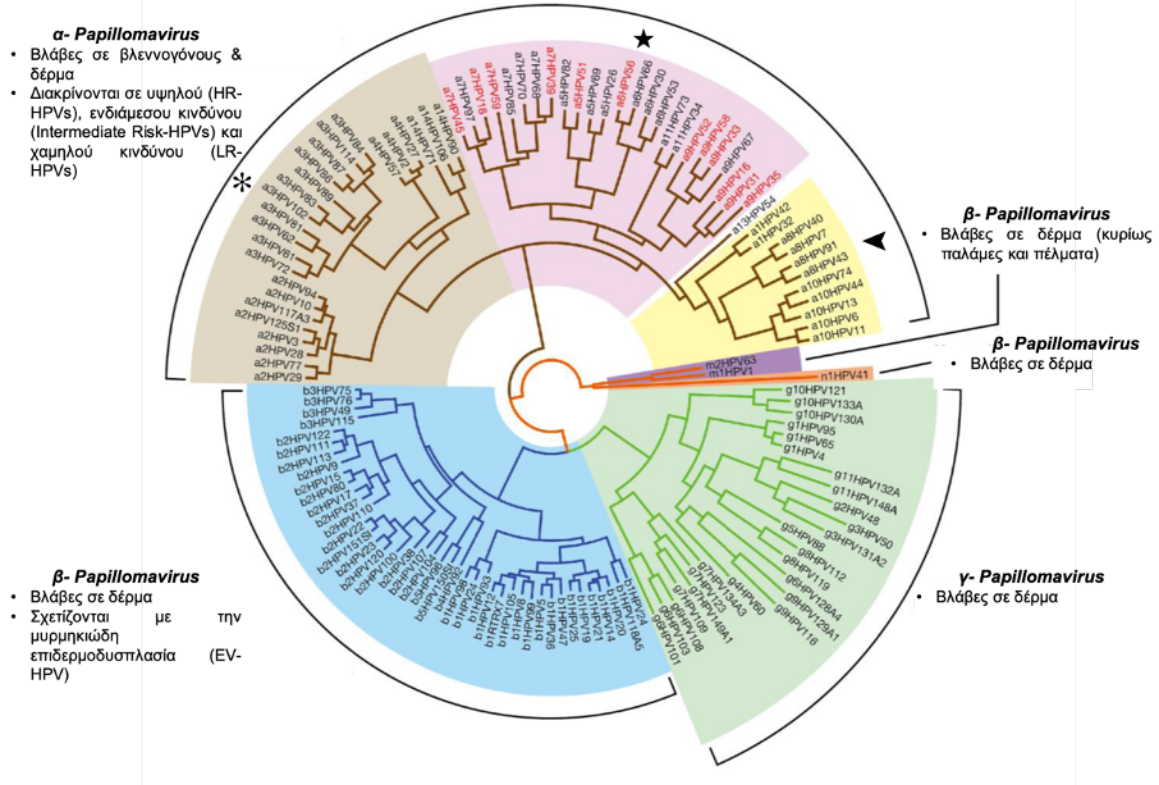
Πίνακας 2: Η δράση των πρωτεϊνών των HPV

HPV πρωτεΐνες	ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ
E1	Ελέγχει την αντιγραφή του ιικού γονιδιώματος
E2	Ελέγχει την αντιγραφή και τη μεταγραφή του ιικού γονιδιώματος
E4	Δρα στο δίκτυο ινιδίων κερατίνης επάγοντας την απελευθέρωση των νεοσχηματιζόμενων ιικών σωματιδίων
E5	Ενεργοποιεί αυξητικούς παράγοντες
E6	Μείζων ογκοπρωτεΐνη. Στους υψηλού κινδύνου α-PV γονότυπους προκαλεί απορρύθμιση του κυτταρικού κύκλου αναστέλλοντας τη δράση της πρωτεΐνης p53. Δρώντας με την E7 προκαλεί κακοήθη εξαλλαγή
E7	Μείζων ογκοπρωτεΐνη. Στους υψηλού κινδύνου α-PV γονότυπους αλληλεπιδρά με την οικογένεια των πρωτεϊνών του ρετινοβλαστώματος (Rb) απορρυθμίζοντας τον κυτταρικό κύκλο και οδηγώντας σε ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Έχει ογκογόνο δράση μόνη ή σε συνδυασμό με την E6
L1	Μείζονα καψιδική πρωτεΐνη
L2	Ελάσσονα καψιδική πρωτεΐνη

Υπάρχουν διάφοροι τρόποι ταξινόμησης των PV. Βάσει της εξελικτικής τους θεώρησης και της ομολογίας του ιικού γονιδιώματος διακρίνονται σε γένη (genera), των οποίων η ονομασία καθορίζεται από ένα γράμμα του ελληνικού αλφάβητου. Τα

γέννη με τη σειρά τους χωρίζονται σε είδη (species), τα οποία περιέχουν ένα ή περισσότερους γονότυπους (types). Τα γένη μεταξύ τους παρουσιάζουν λιγότερο από 60% ομολογία του γονιδίου L1, τα διαφορετικά είδη στο ίδιο γένος 60-70% ομολογία και ομολογία των γονιδίων L1 71-89% παρουσιάζουν οι διαφορετικοί τύποι, ενώ διαφορές στην ομολογία της τάξης του 2-10% διαχωρίζει μεταξύ τους τους διαφορετικούς υπότυπους (subtypes) και μικρότερη του 2% τις διαφορετικές παραλλαγές (variants) [36][37][38].

Επιπλέον, οι HPVs, βάσει του τροπισμού τους, μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε αυτούς που προσβάλλουν το επιθήλιο του δέρματος, αυτούς που προσβάλλουν τους βλεννογόνους και αυτούς που σχετίζονται με την μυρμηκιδώδη επιδερμοδυσπλασία (EV), ενώ με βάση την πιθανότητα κακοήθους εξαλλαγής τους διακρίνονται σε χαμηλού (Low-Risk HPVs ή LR-HPVs) ενδιάμεσου (Intermediate-Risk HPVs) και υψηλού κινδύνου (High-Risk HPVs ή HR-HPVs) (**Εικόνα 3**). Σε αντίθεση με τους LR-HPVs, τα γονίδια E6 και E7 των HR-HPVs παίζουν καθοριστικό ρόλο στην ικανότητά τους για νεοπλασματική εξαλλαγή. Οι LR-HPVs περιλαμβάνουν τους τύπους 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81. Οι HR-HPVs περιλαμβάνουν τους τύπους 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82 και τους πιθανώς ογκογόνους 26, 53 και 66. Οι τύποι 16, 18 είναι υπεύθυνοι για το 80% των περιπτώσεων του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, ενώ οι τύποι 6 και 11 είναι οι πιο κοινοί σε κονδυλώματα βλεννογόνου [36][37][38].



Εικόνα 3: Τα γένη των Papillomavirus α, β, γ, μ, και ν περιλαμβάνουν στελέχη που έχουν ανευρεθεί στον άνθρωπο. Στο γένος α, τα είδη 9, 7, 5, 6, 11 (**αστέρι**) σχετίζονται με υψηλού κινδύνου βλάβες των βλεννογόνων, τα είδη 1, 8, 10, 13 (**βέλος**) σχετίζονται συχνότερα με χαμηλού κινδύνου βλάβες των βλεννογόνων, τα είδη 3, 14, 2, 4 (**αστερίσκος**) σχετίζονται με χαμηλού κινδύνου βλάβες των βλεννογόνων ή του δέρματος.

3.2 Ο κύκλος ζωής του HPV

Τρόποι μετάδοσης του ιού αποτελούν κυρίως η δερματική και η σεξουαλική επαφή καθώς και ο αυτοενοφθαλμισμός μέσω της επαφής των χεριών ή μολυσμένων αντικειμένων με τους βλεννογόνους. Μικροτραυματισμοί και οι μηχανισμοί επούλωσής τους, κατά τους οποίους ενεργοποιείται ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, φαίνεται να διευκολύνουν την πρόσβαση των LR-HPVs στο επιθήλιο του δέρματος και των βλεννογόνων, ενώ οι HR-HPVs έχουν την ικανότητα να προάγουν οι ίδιοι τον πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων. Αρχικά, ο ιός μολύνει τα αρχέγονα κερατινοκύτταρα της βασικής στιβάδας του επιθηλίου, ενισχύοντας το γονιδίωμα του και παραμένοντας εντός του πυρήνα των κυττάρων ως επίσωμα. Ο κύκλος ζωής του ιού είναι στενά συνδεδεμένος με τον κύκλο ζωής και διαφοροποίησης των κυττάρων. Σε κάθε στάδιο διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων, εκφράζονται διαφορετικές ιικές πρωτεΐνες. Η ολοκλήρωση της αναπαραγωγής και η απελευθέρωση του ιού πραγματοποιείται στις ανώτερες στιβάδες του επιθηλίου [36][37].

Η διαδικασία μετάπτωσης σε υψηλού βαθμού δυσπλασίες και τελικά σε καρκίνο απαιτεί την ενσωμάτωση του ιικού γενετικού υλικού στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή, την έκφραση κυτταροκερατινών, ογκοπρωτεϊνών και την παρουσία γενετικών μεταλλάξεων και εξαρτάται από τα ανοσολογικά στοιχεία του ξενιστή. Όσον αφορά στους HR-HPVs, ο κίνδυνος νεοπλασματικής εξαλλαγής βασίζεται στην ικανότητα της πρωτεΐνης τους E6, αναστέλλοντας τη λειτουργία του p53 και της

πρωτεΐνης τους E7, αλληλεπιδρώντας με τις πρωτεΐνες της οικογένειας του ρετινοβλαστώματος (pRb), να συμβάλλουν στην αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και την αναστολή της απόπτωσης, οδηγώντας τα κύτταρα στην «αθανатоποίηση» μέσω της ενεργοποίησης της τελομεράσης [36][37].

Η λοίμωξη από τους HPV δεν προκαλεί απαραίτητα και την εκδήλωση της νόσου. Η μόλυνση του επιθηλίου από τον ιό μπορεί να παραμείνει σε λανθάνουσα φάση (επισωμική) ή να εξελιχθεί σε λοίμωξη με υποκλινικές ή και κλινικές εκδηλώσεις. Η εκδήλωση ή μη της νόσου εξαρτάται από τη σχέση μεταξύ της ιογόνου δράσης του HPV και της ανοσολογική απάντησης του ξενιστή. Γενικά, όσον αφορά την πλειοψηφία των λοιμώξεων του γεννητικού συστήματος, το 80-90% έχουν καλή πρόγνωση. Αποτυχία στην ανάπτυξη κυτταρικής ανοσίας για τον έλεγχο της λοίμωξης έχει ως αποτέλεσμα εμμένουσα λοίμωξη και στην περίπτωση των HR-HPVs αυξημένη πιθανότητα κακοήθους εξαλλαγής [36][37][38].

3.3 Μέθοδοι ανίχνευσης του HPV

Για την ανίχνευση του ιού, ο τρόπος συλλογής του δείγματος, η ποσότητα του ιικού DNA στο δείγμα και οι διάφορες τεχνικές ανίχνευσης του ιού μπορεί να επηρεάσουν σημαντικά την διάγνωση των HPV λοιμώξεων. Δεδομένου ότι ο ιός δεν μπορεί να καλλιεργηθεί *in vitro* και οι ορολογικές τεχνικές δεν είναι ακριβείς, η έγκυρη ανίχνευση

και τυποποίηση του ιού βασίζονται σε τεχνικές μοριακής βιολογίας που επιτρέπουν την ανίχνευση του DNA του ιού.

Το HPV-DNA μπορεί να απομονωθεί από ιστοτεμάχιο με *in situ* υβριδοποίηση (ISH), Southern blotting και dot blot υβριδισμό. Όμως οι τεχνικές αυτές, είτε είναι εργώδεις και χρειάζονται μεγάλες ποσότητες DNA, είτε έχουν χαμηλή ευαισθησία [39].

Σε περιπτώσεις που το δείγμα είναι μικρό με περιορισμένη ποσότητα DNA, μπορούν να χρησιμοποιηθούν τεχνικές πολλαπλασιασμού συγκεκριμένων περιοχών του γονιδιώματος, οι οποίες αυξάνουν την ευαισθησία και την ειδικότητα του τεστ. Η Hybrid Capture II (HC-II) αποτελεί μια δοκιμασία υβριδισμού νουκλεϊκού οξέος με ενίσχυση σήματος, χρησιμοποιώντας πλακίδιο χημειοφωταύγειας για την ποιοτική ανίχνευση 13 τύπων HR-HPV και 5 LR-HPV HPV DNA με υψηλή ευαισθησία, αλλά δεν επιτρέπει τη γονοτύπηση του ιού. Αντίθετα, η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) αποτελεί μια μέθοδο που προσφέρει μεγάλη ευαισθησία και εξειδίκευση, καθώς και δυνατότητα τυποποίησης του ιού [39].

Κεφάλαιο 4

Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης PCR

4.1 Βασική τεχνική της PCR

Η ανάπτυξη της τεχνική της PCR βασίστηκε στα στάδια της *in vivo* αντιγραφής του γενετικού υλικού και παρουσιάστηκε το 1983 από τον Dr K. Mullis, ο οποίος το 1993 τιμήθηκε με βραβείο Νόμπελ Χημείας. Πρόκειται για *in vitro*, ενζυματική μέθοδο ενίσχυσης γενετικού υλικού μέσω επαναλαμβανόμενων κύκλων αντιγραφής και σύνθεσης επιλεγμένων αλληλουχιών νουκλεϊκών οξέων. Η αλληλουχία στόχος μπορεί να αφορά DNA ή και RNA, αφού μεταγραφεί σε συμπληρωματικό DNA (cDNA). Κάθε κύκλος PCR περιλαμβάνει 3 στάδια και οδηγεί στη δημιουργία εκατομμυρίων αντιγράφων [40]:

- 1) Αποδιάταξη (Denaturation) του DNA. Η διπλή έλικα του DNA διαχωρίζεται σε 2 μονές έλικες κατά την έκθεση σε υψηλές θερμοκρασίες. Κάθε μια από τις 2 μονές έλικες θα χρησιμοποιηθεί ως μήτρα για τη δημιουργία συμπληρωματικού κλώνου.
- 2) Υβριδισμός (Annealing) των εκκινητών (primers). Το σημείο έναρξης της αντιγραφής ορίζεται από ολιγονουκλεοτιδικό εκκινητή, ο οποίος

υβριδοποιείται με τις αντίστοιχες συμπληρωματικές αλληλουχίες της μήτρας. Κατά τον υβριδισμό απαιτούνται χαμηλότερες θερμοκρασίες.

- 3) Επιμήκυνση (Elongation), κατά την οποία η θερμοκρασία αυξάνεται ξανά και μια θερμοσταθερή DNA πολυμεράση ξεκινά τη σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας, επιμηκύνοντας της αλληλουχίες μεταξύ των εκκινητών με πρόσθεση τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) στη μήτρα του DNA στόχου.

Η διαδικασία πραγματοποιείται σε συσκευή θερμοκικού κυκλοποιητή (Thermal Cycler). Οι κύκλοι επαναλαμβάνονται 30-40 φορές, γεγονός που θεωρητικά οδηγεί στην εκθετική αύξηση της ποσότητας της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας-στόχου. Στην πράξη όμως, η απόδοση της αντίδρασης δεν μπορεί να είναι 100%, καθώς η διαδικασία της PCR διακρίνεται σε 3 φάσεις που αποδίδονται διαγραμματικά με καμπύλη ενίσχυσης (amplification plot): την εκθετική φάση κατά την οποία υπάρχει επάρκεια αντιδραστηρίων και η αλληλουχία στόχος διπλασιάζεται σε κάθε κύκλο, τη γραμμική φάση αύξησης, καθώς μειώνονται τα αντιδραστήρια και ο ρυθμός σύνθεσης επιβραδύνεται και τέλος τη φάση κορεσμού (πλατώ), λόγω εξάντλησης των αντιδραστηρίων [40].

Η PCR οδηγεί στη δημιουργία εκατομμυρίων αντιγράφων σε σύντομο χρονικό διάστημα και χαρακτηρίζεται από μεγάλη εξειδίκευση και ευαισθησία, γεγονός που την καθιστά ιδιαίτερα χρήσιμη στη μοριακή βιολογία. Παράγοντες που μπορεί να

επηρεάσουν την ευαισθησία της είναι η καταλληλότητα των δειγμάτων, των εκκινητών, της DNA πολυμεράσης και του γενετικού υλικού στόχου [40].

Όσον αφορά στον HPV, η χρήση γενικών εκκινητών του L1 ORF, όπως οι MY09/MY11 και οι GP5/GP6, επιτρέπει την ανίχνευση του ιού. Στη συνέχεια, για την τυποποίηση του ιού, μπορεί να γίνει χρήση είτε ειδικών εκκινητών για τα E6, E7, είτε να χρησιμοποιηθούν άλλες μέθοδοι όπως η Southern blot υβριδοποίηση, η dot-blot υβριδοποίηση, η ELISA, η reverse line blot υβριδοποίηση (LiPA) και η αλληλούχηση DNA (Sequencing) [39][41][42].

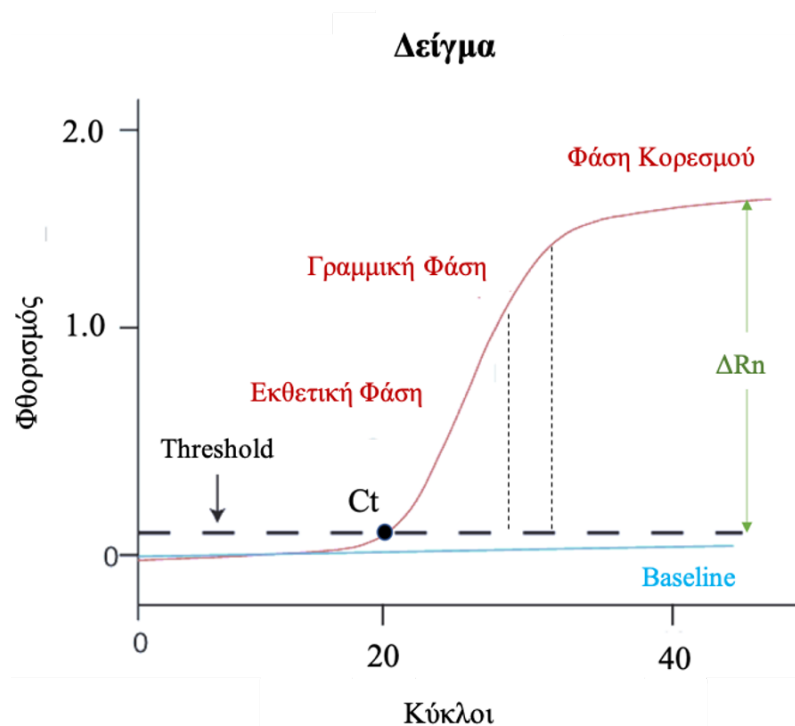
4.2 Real-Time PCR

Η real-time PCR επιτρέπει τη μεγέθυνση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας-στόχου, την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση του συντιθέμενου προϊόντος (amplicon), σε κάθε κύκλο της αντίδρασης, με χρήση φθορίζουσας χρωστικής. Θερμικοί κυκλοποιητές με εξειδικευμένο οπτικό εξοπλισμό χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση του φθορισμού που εκπέμπεται και οι μετρήσεις αποτυπώνονται σε καμπύλη ενίσχυσης του φθορισμού (amplification plot) σε συνάρτηση με τον αριθμό των κύκλων. Η ένταση του σήματος φθορισμού είναι ανάλογη του συντιθέμενου προϊόντος [43].

4.2.1 Καμπύλη ενίσχυσης φθορισμού (Amplification plot)

Σε αντίθεση με τη βασική PCR, η Real-Time PCR επιτρέπει τη συλλογή των δεδομένων σε πραγματικό χρόνο, στην εκθετική φάση της αντίδρασης, όπου η αποδοτικότητα είναι 100%, καθώς τα αντιδραστήρια (εκκινητές, πολυμεράση και dNTPs) είναι σε περίσσεια, και όχι στη φάση κορεσμού (πλατώ).

Βασική παράμετρος για τη διεξαγωγή της ποσοτικοποίησης αποτελεί ο προσδιορισμός του cycle threshold (Ct), του κλασματικού αριθμού των κύκλων που χρειάζονται έτσι ώστε ο φθορισμός των προϊόντων της αντίδρασης να φτάσει το κατώφλι ανίχνευσης (threshold). Το κατώφλι ανίχνευσης ορίζεται πάνω από το όριο του θορύβου (baseline) στην αρχή της εκθετικής φάσης και καθορίζει το σημείο της αντίδρασης όπου όλα τα δείγματα μπορούν να συγκριθούν. Η Ct είναι αντιστρόφως ανάλογη της αρχικής ποσότητας του υποστρώματος, επομένως, όσο μεγαλύτερη είναι η ποσότητα DNA ή cDNA στο αρχικό δείγμα, τόσο λιγότεροι κύκλοι χρειάζονται για να παραχθεί ανιχνεύσιμος φθορισμός (**Εικόνα 4**) [43][44].



Εικόνα 4: Καμπύλη ενίσχυσης φθορισμού (Amplification plot): Threshold: κατώφλι ανίχνευσης, Ct: ο κύκλος κατά τον οποίο ο φθορισμός ξεπερνά το κατώφλι ανίχνευσης, Baseline: το επίπεδο του θορύβου, ΔR_n = ένταση φθορισμού χρωστικής – ένταση σήματος κάτω από το κατώφλι ανίχνευσης.

4.2.2 Συστήματα ανίχνευσης

Η αξιολόγηση της προόδου της αντίδρασης, πραγματοποιείται με τη βοήθεια δύο τύπων χημικών αντιδράσεων:

1. Μη ειδικές χημικές αντιδράσεις

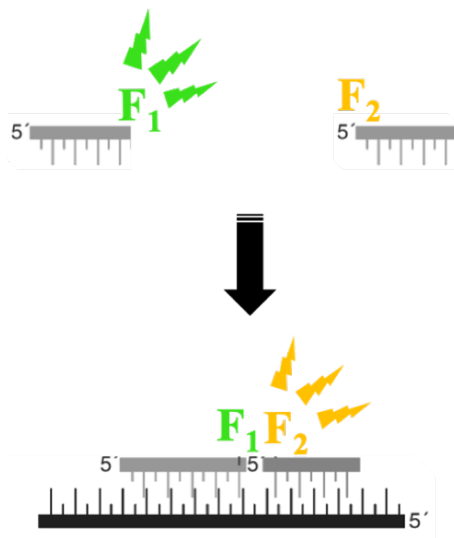
Ευρέως χρησιμοποιούμενη μη ειδική φθορίζουσα χρωστική αποτελεί η SYBR green I, η οποία φθορίζει όταν συνδέεται στα παραγόμενα δίκλιωνα μόρια DNA, ενώ δεν παράγει φθορισμό όταν είναι ελεύθερη. Ο φθορισμός είναι ανάλογος της ποσότητας του παραγόμενου προϊόντος. Πλεονεκτήματα της χρήσης της μεθόδου είναι η υψηλή ευαισθησία της, το χαμηλό κόστος και το γεγονός ότι η SYBR green I είναι κοινή για οποιοδήποτε ζεύγος εκκινητών. Κύριο μειονέκτημα αποτελεί η δυνατότητα σύνδεσής της σε παραπροϊόντα και διμερή εκκινητών, που μπορεί να οδηγήσουν σε λανθασμένη ποσοτικοποίηση του παραγόμενου προϊόντος. Παρόλα αυτά, η μελέτη των καμπυλών τήξης / αποδιάταξης (melting curve analysis), μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, επιτρέπει το διαχωρισμό τους. Με τον όρο θερμοκρασία τήξης / αποδιάταξης (T_m) ορίζεται η θερμοκρασία στην οποία το 50% των μορίων DNA βρίσκεται σε μονόκλινη μορφή. Η T_m είναι χαρακτηριστική κάθε αλληλουχίας και εξαρτάται από το μήκος και τη σύνθεση των βάσεων του προϊόντος [45][46].

2. Ειδικές χημικές αντιδράσεις

Για μεγαλύτερη ειδικότητα, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ειδικοί ολιγονουκλεοτιδικοί ιχνηθέτες. Στην περίπτωση αυτή, οι φθορίζουσες χρωστικές προσδένονται πάνω σε ολιγονουκλεοτιδικά μόρια DNA, τα οποία υβριδίζονται στην αλληλουχία στόχο. Ιχνηθέτες αυτού του τύπου αποτελούν οι Taqman probes, οι Molecular beacons και οι Scorpion primers. Σημαντικό πλεονέκτημα των μεθόδων αυτών αποτελεί το γεγονός ότι οι ιχνηθέτες υβριδίζονται αποκλειστικά στη συγκεκριμένη έλικα στόχο. Αποτελούν

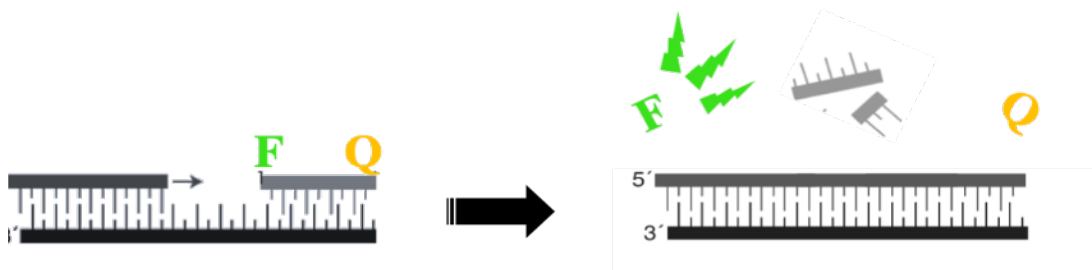
όμως τεχνικές υψηλού κόστους και επιβάλλουν το σχεδιασμό ειδικού ιχνηθέτη. Σε αυτούς περιλαμβάνονται:

- Οι Dual Hybridisation probes, οι οποίοι αποτελούνται από δύο ιχνηθέτες που δεσμεύονται στο προϊόν της αντίδρασης σε παρακείμενες θέσεις. Ο πρώτος ιχνηθέτης φέρει στο άκρο 3' φθοροφόρο μόριο (fluorophore) που δρα ως δότης ενέργειας και ο δεύτερος φέρει στο άκρο 5' φθοροφόρο μόριο που δρα ως δέκτης ενέργειας. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, οι Dual Hybridisation probes υβριδοποιούνται στην αλληλουχία στόχο, γεγονός που οδηγεί στη γειννίαση των δυο φθοροφόρων μορίων, την αλληλεπίδραση μεταξύ τους και τη μεταφορά ενέργειας συντονισμού φθορισμού από το δότη στο δέκτη κατά το φαινόμενο FRET (fluorescence resonance transfer) με διέγερση του δότη, αλλά ανίχνευση εκπομπής μόνο του δέκτη (**Εικόνα 5**) [45][46].



Εικόνα 5: Dual Hybridisation probes

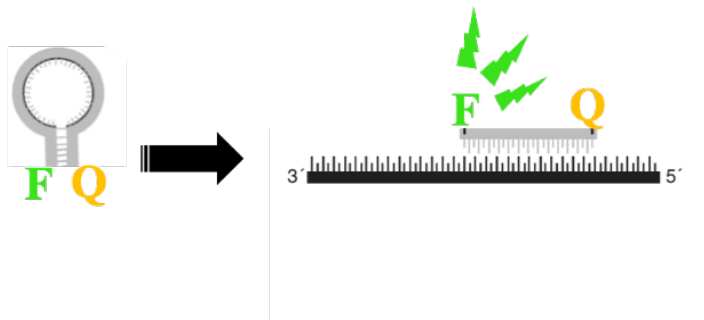
- Οι Taqman probes, οι οποίοι φέρουν στο άκρο 5' ένα φθοροφόρο μόριο (fluorophore) και στο άκρο 3' έναν καταστολέα του φθορισμού (quencher). Όταν οι ιχνηθέτες είναι ελεύθεροι, τα δύο μόρια βρίσκονται πολύ κοντά και δεν εκπέμπεται φθορισμός, λόγω του φαινομένου FRET. Κατά τη διάρκεια της επιμήκυνσης, η Taq πολυμεράση υδρολύει τον ιχνηθέτη διαχωρίζοντας το φθοροφόρο μόριο από τον καταστολέα, γεγονός που οδηγεί στην εκπομπή φθορισμού (**Εικόνα 6**) [45][46].



Εικόνα 6: Taqman probes

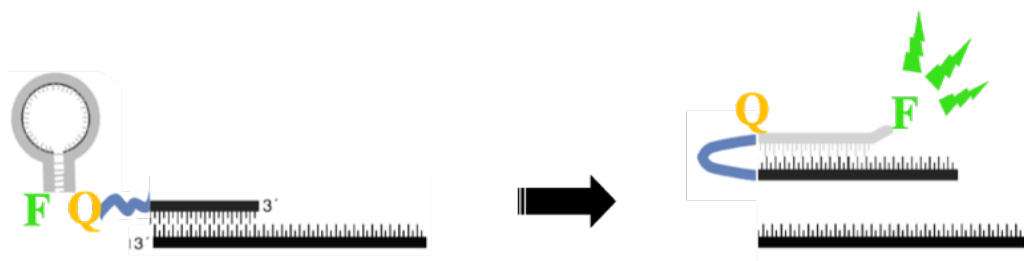
- Οι molecular beacons, οι οποίοι είναι ολιγονουκλεοτίδια, τα οποία σε ελεύθερη μορφή αποτελούνται από μια μονόκλωνη θηλιά, συμπληρωματική μιας εσωτερικής περιοχής της αλληλουχίας στόχου και ένα δίκλωνο μίσχο, στις άκρες 5' και 3' του οποίου, προσδένονται αντίστοιχα το φθοροφόρο μόριο (fluorophore) και ο καταστολέας του φθορισμού (quencher). Στη μορφή αυτή, ισχύει το φαινόμενο FRET. Η ένωση του ιχνηθέτη με το προϊόν της αντίδρασης

οδηγεί στην απομάκρυνση των δύο άκρων και στην εκπομπή φθορισμού (Εικόνα 7) [45][46].



Εικόνα 7: Molecular beacons

- ο Οι Scorpions αποτελούνται από ολιγονουκλεοτιδική αλληλουχία που δρα ως εκκινητής, στην οποία έχει προσδεθεί δομή θηλιάς-μίσχου, στις άκρες 5' και 3' της οποίας, προσδένονται αντίστοιχα το fluorophore και το quencher. Ο μηχανισμός φθορισμού είναι παρόμοιος με τους molecular beacons. Για την παρεμπόδιση της αντιγραφής της δομής θηλιάς μίσχου από την πολυμεράση, ειδικά διαμορφωμένη αλληλουχία, παρεμβάλλεται ανάμεσα στον εκκινητή και τη δομή (Εικόνα 8) [45][46].



Εικόνα 8: Scorpions

Επιπλέον η real-time PCR προσφέρει τη δυνατότητα χρήσης πολλαπλών ειδικών ιχνηθετών με διαφορετικά φθοροφόρα μόρια (multiplex real-time PCR) και επιτρέπει την ανίχνευση πολλαπλών προϊόντων σε μια αντίδραση. Πλεονεκτήματα της μεθόδου αυτής είναι η δυνατότητα χρήσης εσωτερικού μάρτυρα (internal control), το χαμηλότερο κόστος αντιδραστηρίων και η οικονομία στην ποσότητα του δείγματος. Για την αποφυγή αλληλοεπικάλυψης του φάσματος εκπομπής από τις φθορίζουσες χρωστικές, δεν είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν περισσότερες από 4 χρωστικές σε μία αντίδραση [45][46].

4.2.3 Ποσοτικοποίηση

Για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων της αντίδρασης, δύο μέθοδοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν:

1. Η απόλυτη ποσοτικοποίηση (absolute quantitation) με πρότυπη καμπύλη (standard curve).

Η απόλυτη ποσοτικοποίηση αποτελεί τη μέθοδο με την μεγαλύτερη ακρίβεια. Χρησιμοποιεί ένα πρότυπο δείγμα μάρτυρα της αλληλουχίας στόχου, γνωστής συγκέντρωσης, το οποίο υποβάλλεται σε διαδοχικές αραιώσεις. Με τον τρόπο αυτό, δημιουργούνται δείγματα αναφοράς, τα οποία συνήθως έχουν 1 log διαφορά στη συγκέντρωση της αλληλουχίας στόχου. Απαιτούνται τουλάχιστον 4 αραιώσεις για την ακρίβεια της μεθόδου. Στη συνέχεια τα δείγματα αναφοράς υποβάλλονται σε real time PCR μαζί με το υπό διερεύνηση δείγμα. Το γράφημα της πρότυπης καμπύλης (Standard curve plot) που προκύπτει, είναι συνάρτηση του C_t των δειγμάτων αναφοράς με τη λογαριθμική τιμή των συγκεντρώσεων και εμφανίζεται ως ευθεία γραμμή. Το εύρος των συγκεντρώσεων στην πρότυπη καμπύλη πρέπει να καλύπτει όλο το εύρος των συγκεντρώσεων που θα μετρηθούν στη μελέτη. Η ποσοτικοποίηση επιτυγχάνεται μέσω της σύγκρισης των τιμών C_t των υπό μελέτη δειγμάτων με αυτές της πρότυπης καμπύλης. Η τεχνική αυτή είναι εξαιρετικά ακριβής και βρίσκει εφαρμογή στον προσδιορισμό μικού ή μικροβιακού φορτίου [47].

2. Η σχετική ποσοτικοποίηση (relative quantitation)

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στον υπολογισμό της συγκέντρωσης της αλληλουχίας στόχου σε σχέση με εκείνη ενός γονιδίου ελέγχου (calibrator ή control sample). Η ένταση φθορισμού του υπό μελέτη δείγματος συγκρίνεται με εκείνη ενός γονιδίου αναφοράς (reference ή normalizer gene) στην ίδια αντίδραση ενίσχυσης. Όσον αφορά το γονίδιο αναφοράς, συνήθως πρόκειται για ενδογενές (housekeeping) γονίδιο, το οποίο είναι

υπεύθυνο για ζωτικές λειτουργίες του κυττάρου και είναι κοινό σε όλους τους οργανισμούς, όπως αυτό της β-ακτίνης, της β-2 μικροσφαιρίνης και το GAPDH. Τόσο οι τιμές Ct των δειγμάτων υπό μελέτη και όσο και του γονιδίου ελέγχου κανονικοποιούνται ως προς τις τιμές Ct του γονιδίου αναφοράς. Η σχετική ποσοτικοποίηση βασίζεται στην παρακάτω μαθηματική εξίσωση:

$$\text{Σχετική ποσότητα} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \cdot \text{δείγματος} - \Delta Ct \cdot \text{control sample}$$

$$\Delta Ct = Ct \text{ γονίδιο στόχος} - Ct \text{ normalizer}$$

Συνοψίζοντας, η χρήση της Real-Time PCR προσφέρει τη δυνατότητα ελαχιστοποίησης πιθανών επιμολύνσεων, δεδομένου ότι η εκτέλεση και η ανάλυση της αντίδρασης πραγματοποιείται σε αυτοματοποιημένο κλειστό σύστημα. Επιπλέον χαρακτηρίζεται από υψηλή ευαισθησία και παρέχει τη δυνατότητα ποσοτικοποίησης [47].

Κεφάλαιο 5

HPV και Οφθαλμός

Η παρουσία των HPV στην οφθαλμική επιφάνεια έχει συσχετιστεί με παθήσεις όπως τα θηλώματα του επιπεφυκότα, την ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία του επιπεφυκότα (CIN) και το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα του επιπεφυκότα.

5.1 HPV και Θηλώματα του Επιπεφυκότα

Τα θηλώματα του επιπεφυκότα αποτελούν ιδιαίτερα συχνούς καλοήθεις όγκους του πλακώδους επιθηλίου του επιπεφυκότα. Συνήθως πρόκειται για εξωφυτικά, επάρματα με μίσχο ή χωρίς, λεία ή μυρμηκιώδη επιφάνεια και αυξημένη εσωτερική αγγείωση. Σπανιότερα μπορεί να είναι ανεστραμμένα ή μικτά. Η εμφάνιση θηλωμάτων του επιπεφυκότα αφορά συχνότερα άνδρες 20-39 ετών, ηλικίες που συμπίπτουν με τις ηλικίες όπου η HPV λοίμωξη των γεννητικών οργάνων παρουσιάζει κορύφωση. Οι βλάβες αυτές μπορεί να παρουσιάσουν αυτόματη υποστροφή, αλλά τείνουν να υποτροπιάζουν μετά από χειρουργική αφαίρεση. Μπορεί να εμφανίζουν περιοχές δυσπλασίας αλλά η κακοήθης εξαλλαγή τους είναι σπάνια. Η παρουσία του HPV έχει συσχετιστεί με την εμφάνιση των θηλωμάτων του επιπεφυκότα και συγκεκριμένα με την παρουσία των LR-HPV τύπων 6, και 11, οι οποίοι σχετίζονται με τα οξυτενή

κονδυλώματα των γεννητικών οργάνων (**Πίνακας 3**). Το γεγονός αυτό και η πιθανή κάθετη μετάδοση του ιού από μητέρα σε βρέφος, θα μπορούσε να εξηγήσει και την ανάπτυξη θηλωμάτων σε βρέφη και παιδιά [48][49][50][51][52].

Πίνακας 3: HPV & θηλώματα του επιπεφυκότα [52]

Μελέτες	Επιπολασμός HPV	Τύποι HPV	Μέθοδος ανίχνευσης	Μέγεθος δείγματος
Lass et al	50%	11	SB	2
Naghashfar et al	0%	-	SB/ISH	1
Mc Donnell et al	65%	6, 11	ISH	23
Mantjarvi et al	0%	-	ISH	1
Fierlbeck et al	0%	-	ISH	1
Mincione et al	50%	6, 11	ISH	4
Saegusa et al	100%	16	PCR	5
Michel et al	0%	-	ISH	1
Nakamura et al	50%	6	PCR	8
Assadoullina et al	0%	-	PCR	1
Sjo et al	92%	6, 11, 16	PCR	52
Minchiotti et al	100%	11	PCR	4
Sjo et al	81%	6, 11, 45	PCR	106
Takamura et al	100%	-	PCR/HC-II	8
Annadanam et al	100%	6, 11	ISH	1

5.2 HPV και Νεοπλασία των Πλακωδών Κυττάρων της Οφθαλμικής Επιφάνειας

Ο όρος νεοπλασία των πλακωδών κυττάρων του επιθηλίου της οφθαλμικής επιφάνειας (OSSN) αναφέρεται σε ένα ευρύ φάσμα βλαβών του επιπεφυκότα, το οποίο

περιλαμβάνει τις ενδοεπιθηλιακές νεοπλασίες του επιπεφυκότα (CIN), οι οποίες διαχωρίζονται σε ήπιες δυσπλασίες CIN I: εντοπίζονται στο έσω 1/3 του επιθηλίου, μέτριες CIN II: εντοπίζονται στα έσω 2/3 του επιθηλίου, σοβαρές CIN III ή Carcinoma in situ (CIS): εντοπίζονται σε όλο επιθήλιο, καθώς και το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα του επιπεφυκότα (SCCC), το οποίο εκτείνεται και στο στρώμα [53].

Το OSSN, στους υπερήλικες, αποτελεί τον τρίτο πιο συχνό τύπο οφθαλμικού όγκου μετά το μελάνωμα και το λέμφωμα. Η εμφάνισή του αφορά κυρίως την καυκάσια φυλή και η επίπτωσή του κυμαίνεται από 0.03-1.9/100,000/έτος έως και 3-3.4/100,000/έτος στους αφρικανικούς πληθυσμούς. Πρόκειται για ελαφρώς υπεγεργμένες γκριζωπές βλάβες με πλούσια αγγείωση στο ΣΚΟ, οι οποίες μπορεί να εκτείνονται και στον κερατοειδή. Μπορεί να παρουσιάζουν λευκοπλακία, να πρόκειται για ζελατινώδεις, θηλώδεις ή οζώδεις βλάβες ή να παρουσιάζονται διάχυτες στον επιπεφυκότα. Βασικό παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξή τους φαίνεται να αποτελεί η έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία. Επιπλέον, ασθενείς με μελαγχρωστικό ξηροδερμα, αλλά και με HIV λοίμωξη φαίνεται να είναι πιο επιρρεπείς στην εμφάνιση επιθετικού OSSN. Τέλος, τα τελευταία χρόνια, αν και δεν έχει πλήρως διελευκανθεί, έχει διαπιστωθεί πιθανή συσχέτιση της παρουσίας HPV λοίμωξης και κυρίως των τύπων 16, 18 και ανάπτυξης OSSN (**Πίνακας 4**) [52] [53][54][55].

Πίνακας 4: HPV & νεοπλασία πλακωδών κυττάρων του επιθηλίου οφθαλμικής επιφάνειας [52]

Μελέτες	Επιπολασμός HPV	Τύποι HPV	Μέθοδος ανίχνευσης	Μέγεθος δείγματος	% HIV +
Lauer et al	80%	16, 18	PCR	5	-
Tuppurainen et al	0%	-	PCR/ISH	4	-
Mc Donnell et al	88%	16	PCR	42	-
Tabrizi et al	39%	6, 11, 16, 18	PCR	88	-
Karcioglu et al	55.60%	16, 18	Nested PCR, SB	45	-
Dushku et al	0	-	Nested PCR	8	-
Toth et al	22%	16, 18	PCR/IHC	23	-
Scott et al	100%	16, 18	PCR/ISH	10	-
Eng et al	0%	-	Nested PCR	20	-
Tulvatana et al	0%	-	PCR/Dot Hybridisation	30	-
Ateenyi-Agaba et al	86%	EV-HPVs	PCR	21	-
Moubayed et al	93%	6, 11, 18	ISH Immunomax	14	64.20% 65.1%
Tornesello et al	19.80%	6, 18, EV-HPVs, CJ198-	PCR	86	(25% HPV+)
Kuo et al	100%	6, 11, 16, 18, 33, 37, 58, 72	Nested PCR	9	-
Sen et al	0%	-	IHC	30	-
De Koning et al	-	38% τύποι βλεννογόνων (HR & LR-HPVs) 22% δερματικοί τύποι	PCR	81	(48% HPV+)
Manderwad et al	0%	-	PCR/ISH-CARD	57	-
Guthoff et al	0%	-	PCR/IHC	31	Χωρίς HIV
Ateenyi-Agaba et al	-	Τύποι βλεννογόνων: 6.4% SCC, 7.7% Δυσπλασία Δερματικοί τύποι: 44.7% SCC, 41% Δυσπλασία	PCR	94 SCC 39 Δυσπλασία του HIV	Αβέβαιος ο ρόλος του HIV
Asadi-Amoli et al	88%	Δεν ανιχνεύτηκε ο ιός	Nested PCR	50	-
Chauhan et al	11%	16	PCR	64	-
Woods et al	6.50%	16	Nested PCR	50	-
Afrogheh et al	30%	16	IHC, ISH, PCR	43	-

5.3 Ο ρόλος του HPV στο περύγιο

Παρά το γεγονός ότι η παρουσία του HPV στο οφθαλμικό περύγιο έχει εκτενώς μελετηθεί, δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί ο ρόλος του στην παθογένεια της βλάβης. Από τις διάφορες μελέτες διαπιστώνεται η ύπαρξη HPV λοίμωξης περρυγίων σε έναν υποπληθυσμό ασθενών, υπογραμμίζοντας έτσι τη σύνθετη παθογένεια της πάθησης.

Το 1993, ο Coroneo υπέδειξε ότι μια χρόνια λοίμωξη της οφθαλμικής επιφάνειας θα μπορούσε να συμμετέχει στο μηχανισμό δημιουργίας του περρυγίου [20]. Αργότερα, Detorakis et al, βάσει της διαπίστωσης απώλειας ετεροζυγωτίας (LOH) στο περύγιο, πρότειναν ένα μηχανισμό 2 σταδίων ανάπτυξης της βλάβης, όπου αρχικά κληρονομούμενες γενετικές μεταλλάξεις ή η έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία προκαλούν προδιάθεση για τη δημιουργία του περρυγίου (“first hit”), ενώ στη συνέχεια η χρόνια έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία ή η λοίμωξη από ογκογόνους ιούς, οδηγούν σε βλάβες του γενετικού υλικού και στην ανάπτυξη ή και την υποτροπή του περρυγίου (“second hit”) [16][56].

Πολυάριθμες μελέτες προσπάθησαν να διερευνήσουν την παρουσία HPV λοίμωξης στο περύγιο. Σε κάποιες από αυτές, δεν ανιχνεύτηκε λοίμωξη από τον ιό, ενώ σε αρκετές μελέτες διαπιστώθηκε η παρουσία στελεχών του ιού με σημαντικές όμως διαφορές τόσο στους τύπους του ιού που ανιχνεύτηκαν, όσο και στην επίπτωση του ιού στο οφθαλμικό περύγιο, με διακύμανση αυτής από 3-100% [52]. Οι διαφορές αυτές φαίνεται να οφείλονται στις διαφορετικές τεχνικές δειγματοληψίας και

ανίχνευσης του ιού που χρησιμοποιήθηκαν. Επιπλέον φυλετικές, αλλά και γεωγραφικές διαφορές στην επίπτωση του HPV στο γενικό πληθυσμό φαίνεται να συμβάλουν στην ασυμφωνία μεταξύ των διαφόρων μελετών [57].

Πίνακας 5: HPV & οφθαλμικό περύγιο [52]

Μελέτες	Επιπολασμός HPV	Τύπος HPV	Χώρα μελέτης	Μέθοδος ανίχνευσης	Μέγεθος δείγματος
McDonell et al	0%	-	ΗΠΑ	PCR	6
Varinli et al	64%	-	Τουρκία	IHC	25
Dushku et al	0%	-	ΗΠΑ	PCR	13
Detorakis et al	24%	18	Ελλάδα	PCR	50
Gallagher et al	50%	6, 11, 16	Ηνωμένο Βασίλειο	PCR	10
Piras et al	100% 21%	52, 54, <i>cand</i> HPV90	Ιταλία/ Εκουαδόρ	PCR- sequencing	41
Chen et al	0%	-	Ταϊβάν	PCR	65
Ateenyi-Agaba et al	50%	11, 37	Ουγκάντα	PCR- Southern	10
Schellini et al	0%	-	Βραζιλία	PCR	36
Kuo et al	0%	-	Ταϊβάν	PCR	4
Sjö et al	4.4%	6	Δανία	PCR-ISH	90
Takamura et al	4.8%	-	Ιαπωνία	PCR-HC II	42
Rodrigues et al	58.3%	1, 2, 16	Βραζιλία	PCR	36
Otlu et al	0%	-	Τουρκία	real-time PCR	40
Tsai et al	24%	16, 18	Ταϊβάν	nested-PCR	129
Guthoff et al	0%	-	Γερμανία	PCR-IHC	
Pieczk-Sidor et al	27.6%	5, 6, 11, 16, 18, 31, 52, 59	Πολωνία	PCR	58
Hsiao et al	3%	18	Ταϊβάν	PCR-ISH	65
Chong et al	64.4%	16, 18, 58, 59	Μαλαισία	Nested PCR	45
Hamed-Azzam et al	0%	-	Ισραήλ	IHC	100

Συμπερασματικά, φαίνεται ότι ο HPV συμμετέχει στην ανάπτυξη του περρυγίου σε έναν υποπληθυσμό των ασθενών και η δημιουργία κατάλληλων πρωτοκόλλων ανίχνευσης του ιού θα συμβάλει στην αποσαφήνιση του ρόλου του ιού στην παθογένεια αλλά και τη μετεγχειρητική υποτροπή του περρυγίου.

Ειδικό Μέρος

Κεφάλαιο 6

Περιγραφή Ερευνητικού Έργου

6.1 Σκοπός και Αναγκαιότητα της Μελέτης

Στην παρούσα διατριβή διερευνήθηκε η δυνατότητα χρήσης μιας απλά εφαρμοζόμενης, μη επεμβατικής μεθόδου για τη διάγνωση του ιού των θηλωμάτων σε ασθενείς με οφθαλμικό περύγιο, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει στην καλύτερη κατανόηση της παθογένειας του περυγίου, στην καλύτερη αντιμετώπιση των ασθενών αυτών και ενδεχομένως στη δυνατότητα αναστολής της ανάπτυξης και της υποτροπής του περυγίου με χρήση τοπικής θεραπείας κατά του ιού.

6.2 Αναμενόμενα Αποτελέσματα

Πολλές μελέτες διαπίστωσαν την παρουσία του HPV σε οφθαλμικά περύγια. Παρόλα αυτά, η ανίχνευση του ιού στις μελέτες αυτές βασίζεται σε χειρουργική εξαίρεση ιστοτεμαχίων, μια ακριβή και χρονοβόρα διαδικασία με πολλές πιθανές σοβαρές επιπλοκές. Είναι προφανής η ανάγκη ανάπτυξης αξιόπιστων, ελάχιστα επεμβατικών, χαμηλού κόστους, απλά εφαρμοζόμενων διαγνωστικών μεθόδων που θα παρέχουν ικανοποιητική ποσότητα κυττάρων και θα επιτρέπουν την ανίχνευση του ιού στα περύγια.

Η μελέτη μας στοχεύει να αποδείξει τη διαγνωστική ικανότητα της λήψης επιχρίσματος από την επιφάνεια του περυγίου στην ανίχνευση του HPV, σε σχέση με τη χειρουργική εξαίρεση ιστοτεμαχίων, σε περύγια, προσφέροντας τη δυνατότητα χρήσης μιας τεχνική λήψης υλικού που θα προσφέρει ικανή ποσότητα και ποιότητα κυττάρων χωρίς δειγματοληπτικά σφάλματα. Σημαντικά πλεονεκτήματα της τεχνικής αυτής αποτελούν η ευκολία και η ταχύτητα συλλογής του δείγματος, καθώς η λήψη αποφολιδωτικού επιχρίσματος μπορεί να εφαρμοστεί στο ιατρείο, με χρήση τοπικής αναισθησίας ακόμη και σε παιδιά.

6.3 Σημασία της Μελέτης

Η μέθοδος αυτή θα μπορέσει να προσφέρει

- Την καλύτερη αξιολόγηση της συχνότητας εμφάνισης του ιού στο περύγιο.
- Την καλύτερη αξιολόγηση της συχνότητας εμφάνισης του ιού σε φαινομενικά υγιή επιπεφυκότα.
- Την καλύτερη κατανόηση του ρόλου του ιού στην παθογένεια του περυγίου.
- Τη διερεύνηση του ρόλου του ιού στη μετεγχειρητική υποτροπή του περυγίου.
- Τη δυνατότητα εφαρμογής στοχευμένης αντι-ιικής θεραπείας σε επιλεγμένα HPV-μολυσμένα περύγια.
- Τη δυνατότητα εξατομικευμένης χειρουργικής θεραπείας
- Την αποφυγή μετεγχειρητικών υποτροπών.

Κεφάλαιο 7

Μεθοδολογία

7.1 Στρατολόγηση Ασθενών

Στη μελέτη μας, η οποία έλαβε έγκριση από την επιτροπή βιοηθικής και δεοντολογίας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου (αρ. πρωτοκόλλου 16440/21-11-2014), συμπεριελήφθησαν ασθενείς, οι οποίοι παρακολουθούνταν, στην Οφθαλμολογική Κλινική του νοσοκομείου. Η στρατολόγηση αφορούσε σε ασθενείς άνω των 18 ετών, με οφθαλμικό περύγιο, πρωτοπαθές ή υποτροπιάζον, εκτεινόμενο στον κερατοειδή. Οι ασθενείς δεν παρουσίαζαν άλλες οφθαλμικές ή συστηματικές παθήσεις που θα μπορούσαν να επηρεάσουν το αποτέλεσμα της μελέτης ή να απειλήσουν την ασφάλεια τους και επρόκειτο να υποβληθούν σε χειρουργική αφαίρεση οφθαλμικού περυγίου. Επιπλέον, ασθενείς με φυσιολογική οφθαλμική επιφάνεια, ηλικίας άνω των 18 ετών, οι οποίοι δεν παρουσίαζαν άλλες οφθαλμικές ή συστηματικές παθήσεις που θα μπορούσαν να επηρεάσουν το αποτέλεσμα της μελέτης ή να απειλήσουν την ασφάλειά τους, συμπεριελήφθησαν στη μελέτη ως ομάδα ελέγχου (control group). Όλοι ασθενείς έλαβαν λεπτομερή ενημέρωση (προφορική και γραπτή) για το ερευνητικό πρωτόκολλο και υπέγραψαν έντυπη συγκατάθεση.

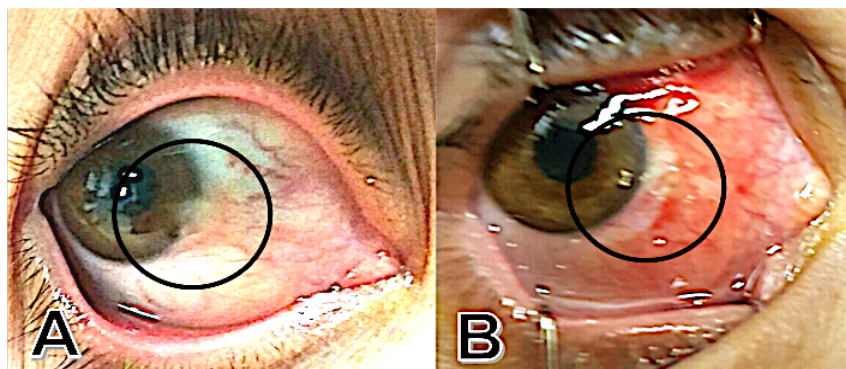
Η προεγχειρητική εξέταση περιλάμβανε:

- καταγραφή δημογραφικών στοιχείων του ασθενούς (ημερομηνία γέννησης, επάγγελμα, τόπο διαβίωσης τα τελευταία 20 έτη, στοιχεία επικοινωνίας)
- καταγραφή ιατρικού ιστορικού και τοπικής/συστηματικής αγωγής
- καταγραφή του χρονικού διαστήματος από την εμφάνιση του περρυγίου, τυχών υποτροπών ή άλλων μετεγχειρητικών επιπλοκών μετά από προηγηθείσα χειρουργική εξαίρεση, καθώς και άλλων οφθαλμολογικών παθήσεων
- καταγραφή οικογενειακού οφθαλμολογικού ιστορικού
- κλινική οφθαλμολογική εξέταση με μέτρηση της καλύτερης διορθωμένης οπτικής οξύτητας (BCVA) σε οπτότυπο «Snellen», εξέταση σε σχισμοειδή λυχνία, μέτρηση της έκτασης του περρυγίου στον κερατοειδή σε mm, μέτρηση της ενδοφθάλμιας πίεσης και βυθοσκόπηση
- φωτογράφιση του περρυγίου

7.2 Χειρουργική Αφαίρεση Πτερυγίου

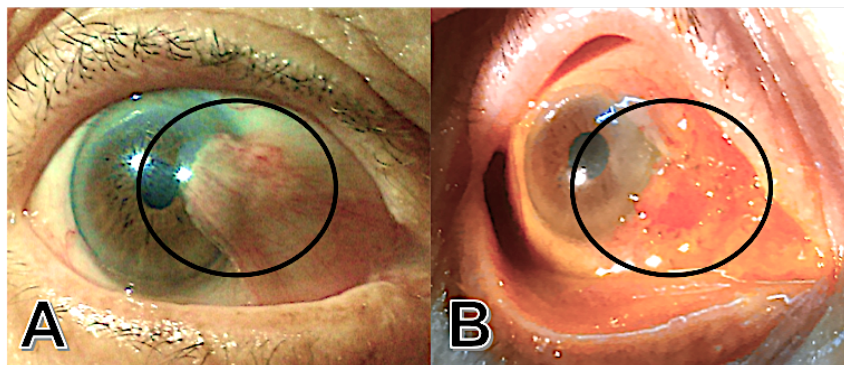
Για τη χειρουργική αφαίρεση του περρυγίου χρησιμοποιήθηκαν 2 τεχνικές. Η αφαίρεση του περρυγίου και η συρραφή με την τεχνική του γυμνού σκληρού, καθώς και η αφαίρεση του περρυγίου και η συρραφή του επιπεφυκότα με τη χρήση αυτομοσχεύματος επιπεφυκότα.

Κατά την αφαίρεση του περυγίου με την τεχνική του γυμνού σκληρού πραγματοποιήθηκε εκτομή του περυγίου και η απογυμνωμένη περιοχή του σκληρού παρέμεινε ακάλυπτη για 3-4mm (**Εικόνα 9**).



Εικόνα 9: Α. Οφθαλμικό περύγιο, Β. Αφαίρεση με την τεχνική του γυμνού σκληρού

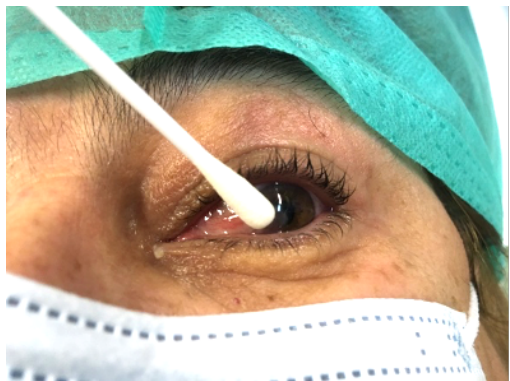
Κατά την αφαίρεση του περυγίου και τη συρραφή με χρήση αυτομοσχεύματος επιπεφυκότα, πραγματοποιήθηκε αφαίρεση του περυγίου και της περιβάλλουσας κάψα του Tenon και πλαστική αποκατάσταση του γυμνού σκληρού με λήψη αυτομοσχεύματος από τον ανώτερου επιβολβικό επιπεφυκότα του ίδιου οφθαλμού και συρραφή αυτού στην περιοχή του γυμνού σκληρού (**Εικόνα 10**).



Εικόνα 10: Α. Οφθαλμικό περύγιο Β. Αφαίρεση και συρραφή μοσχεύματος επιπεφυκότα για κάλυψη του σκληρού στην περιοχή της βλάβης.

7.3 Τρόπος Συλλογής και Αποθήκευσης Δειγμάτων

Η λήψη του επιχρίσματος λάμβανε χώρα, μετά από ενστάλαξη τοπικού αναισθητικού (col υδροχλωρικής προξυμετακαΐνης 0,5%), με ελαφριά τριβή βαμβακοφόρου στυλεού στην περιοχή της βλάβης ή στο φυσιολογικό βολβικό επιπεφυκότα (**Εικόνα 11**). Στη συνέχεια, οι στυλεοί τοποθετούνταν σε σωληνάκια Stuart (Meus s.r.l., Piove di Sacco, Italy) και αποθηκεύονταν σε θερμοκρασία -80°C .



Εικόνα 11: Λήψη κυτταρικού επιχρίσματος από την επιφάνεια του περυγίου με βαμβακοφόρο στυλεό.

Κατόπιν, λάμβανε χώρα η προγραμματισμένη χειρουργική αφαίρεση του περυγίου και λήψη 2 ιστικών τεμαχίων, εκ των οποίων το ένα αποθηκευόταν σε αποστειρωμένο δοχείο (F.L. Medical s.r.l., Torreglia, Italy) σε θερμοκρασία -80°C , προκειμένου να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη και το άλλο αποθηκευόταν σε αποστειρωμένο δοχείο (F.L. Medical s.r.l., Torreglia, Italy) με φορμόλη, με σκοπό την ιστοπαθολογική εξέτασή του για την επιβεβαίωση της διάγνωσης και τον αποκλεισμό άλλης παθολογίας.

Στη συνέχεια, πραγματοποιούνταν απομόνωση του γενετικού υλικού των 2 αποθηκευμένων στους -80°C δειγμάτων (επίχρισμα και ιστοτεμάχιο) και η μοριακή ανάλυσή τους με PCR πραγματικού χρόνου για την ανίχνευση του ιού HPV. Η διερεύνηση των επιχρισμάτων λάμβανε χώρα σε διαφορετικό από τη διερεύνηση των ιστών χρόνο, ώστε να ελαχιστοποιηθεί η πιθανότητα σφάλματος.

7.4 Απομόνωση Γενετικού Υλικού από τα Επιχρίσματα

Για την απομόνωση γενετικού υλικού χρησιμοποιήθηκαν ειδικά πακέτα «κιτ» έτοιμων αντιδραστηρίων, τα οποία προσφέρουν δυνατότητα χειρισμού πολλών δειγμάτων, καθώς και απομόνωση υψηλής ποιότητας γενετικού υλικού.

Με τα παραπάνω «κιτ» επιτυγχάνεται η πρόσδεση του γενετικού υλικού σε μεμβράνη πυριτίου, εντός ειδικά διαμορφωμένου σωληνάριου. Αρχικά, πραγματοποιείται λύση των κυττάρων με χρήση διαλύματος υψηλής αλατότητας και πρωτεΐνης K, και στη συνέχεια προστίθεται αιθανόλη. Ακολουθεί τοποθέτηση του διαλύματος στο ειδικό σωληνάριο και φυγοκέντρωση, η οποία οδηγεί στην πρόσδεση του γενετικού υλικού στη μεμβράνη πυριτίου, ενώ τα υπόλοιπα κυτταρικά συστατικά και οι ρίποι διαχωρίζονται, συλλέγονται στο σωληνάριο και στη συνέχεια απορρίπτονται. Ακολουθούν διαδοχικές πλύσεις με ειδικά διαλύματα που εμπεριέχουν αιθανόλη για την περαιτέρω απομάκρυνση κυτταρικών συστατικών και ρίπων και τέλος, το γενετικό υλικό, μετά από έκλουση με αλκαλικό διάλυμα χαμηλής αλατότητας, απελευθερώνεται από τη μεμβράνη και συλλέγεται σε κατάλληλο σωληνάριο.

Για την απομόνωση του DNA των επιχρισμάτων χρησιμοποιήθηκε το «κιτ» Thermo Scientific Gene JET Viral DNA and RNA purification kit της Thermo Fisher Scientific Inc. , USA (LOT: 00345526, 00213426) και το ακόλουθο πρωτόκολλο:

- Τοποθέτηση σε Eppendorf 200μl δείγματος, 200μl ρυθμιστικού διαλύματος λύσης (εμπεριέχει υψηλής συγκέντρωσης υδροχλωρικής γουανιδίνης και είναι εμπλουτισμένο με carrier RNA) και 50μl πρωτεΐνάσης K
- Ανάμειξη με μηχανικό αναδευτήρα
- Επώαση για 15min στους 56°C
- Προσθήκη 300μl αιθανόλης 96-100% και ανάμειξη με μηχανικό αναδευτήρα
- Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 3min
- Φυγοκέντρωση για 3-5sec
- Τοποθέτηση του διαλύματος σε σωληνάριο πλύσης με στήλη που εμπεριέχει το φίλτρο πυριτίου και φυγοκέντρωση για 1min στις 6000 x g
- Απόρριψη του σωληναρίου πλύσης με τα συγκεντρωμένα κυτταρικά συστατικά και τοποθέτηση της στήλης σε νέο σωληνάριο πλύσης
- Προσθήκη 700μl διαλύματος πλύσης «Wash Buffer 1» (εμπλουτισμένο με αιθανόλη) και φυγοκέντρωση για 1min 6000 x g
- Απόρριψη του σωληναρίου πλύσης και τοποθέτηση της μεμβράνης σε νέο σωληνάριο πλύσης
- Προσθήκη 500μl διαλύματος πλύσης «Wash Buffer 2» (εμπλουτισμένο με αιθανόλη) και φυγοκέντρωση για 1min 6000 x g
- Απόρριψη του σωληναρίου πλύσης και τοποθέτηση της μεμβράνης σε νέο σωληνάριο πλύσης

- Προσθήκη 500μl διαλύματος πλύσης «Wash Buffer 2» (εμπλουτισμένο με αιθανόλη) και φυγοκέντρωση για 1min 6000 x g
- Απόρριψη του σωληναρίου πλύσης και τοποθέτηση της μεμβράνης σε σωληνάριο έκλουσης
- Φυγοκέντρωση για 3 min στις 16000 x g
- Προσθήκη 50μl διαλύματος έκλουσης «Eluent», προθερμασμένου στους 56°C, και επώαση για 2 min σε θερμοκρασία δωματίου
- Φυγοκέντρωση για 1 min στις 13000 x g
- Απόρριψη της στήλης και διατήρηση του σωληναρίου έκλουσης το οποίο εμπεριέχει το καθαρό γενετικό υλικό

7.5 Απομόνωση Γενετικού Υλικού από Ιστούς

Για την απομόνωση του γενετικού υλικού από τους ιστούς χρησιμοποιήθηκε το «κιτ» NucleoSpin[®] Tissue της Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (LOT 1909/001) και το ακόλουθο πρωτόκολλο:

- Τοποθέτηση του δείγματος σε Eppendorf, προσθήκη 180μl διαλύματος Buffer T1 και 25 μl πρωτεϊνάσης K
- Ανάμειξη με μηχανικό αναδευτήρα
- Επώαση στους 56°C για 1 βράδυ
- Ανάμειξη με μηχανικό αναδευτήρα

- Προσθήκη 200μl διαλύματος «Buffer B3» (εμπεριέχει υψηλής συγκέντρωσης υδροχλωρικής γουανιδίνης), ανάμειξη και επώαση στους 70°C για 10min
- Προσθήκη 210 μl αιθανόλης (96-100%) και ανάμειξη
- Τοποθέτηση του διαλύματος σε σωληνάριο πλύσης με στήλη που εμπεριέχει το φίλτρο πυριτίου και φυγοκέντρωση για 1min στις 11000 x g
- Απόρριψη των ρίπων από το σωληνάριο και τοποθέτηση της μεμβράνης ξανά στο σωληνάριο πλύσης
- Προσθήκη 500 μl διαλύματος πλύσης «Buffer BW» (εμπεριέχει υψηλής συγκέντρωσης υδροχλωρικής γουανιδίνης και ισοπροπανόλης) και φυγοκέντρωση για 1min 11000 x g
- Απόρριψη των ρίπων από το σωληνάριο και τοποθέτηση της μεμβράνης ξανά στο σωληνάριο πλύσης
- Προσθήκη 600 μl διαλύματος πλύσης «Buffer B5» (εμπλουτισμένο με αιθανόλη) και φυγοκέντρωση για 1min 11000 x g
- Απόρριψη των ρίπων από το σωληνάριο και τοποθέτηση της μεμβράνης ξανά στο σωληνάριο πλύσης
- Φυγοκέντρωση για 1min 11000 x g
- Τοποθέτηση της στήλης σε σωληνάριο έκλουσης 1.5ml και προσθήκη 100μl διαλύματος έκλουσης Buffer BE, προθερμασμένου στους 70°C, και επώαση για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου
- φυγοκέντρωση για 1min 11000 x g

- Απόρριψη της στήλης και διατήρηση του σωληναρίου έκλουσης το οποίο εμπεριέχει το καθαρό γενετικό υλικό

7.6 Real-time PCR

Για την ανίχνευση και τη γονοτύπηση HR- και intermediate risk- HPV's πραγματοποιήθηκε multiplex real time PCR με χρήση ειδικού κιτ (ποσότητα: 3, LOT 24L15M760, 18I19K579, 22A190301) «HPV Genotypes 14 Real-TM Quant, (Sacace Biotechnologies, Como, Italy, cat. no V67- 100FRT)», το οποίο επιτρέπει την ανίχνευση των 14 HPV τύπων, υψηλού και ενδιάμεσου κινδύνου: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 και 68.

Για τον ποιοτικό έλεγχο των δειγμάτων DNA, το παραπάνω κιτ εμπεριέχει εσωτερικό μάρτυρα (ανθρώπινο γονίδιο β-σφαιρίνης), η ανίχνευση του οποίου επιτρέπει τη διαπίστωση της καταλληλότητας του δείγματος. Επιπλέον, αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε για επιβεβαίωση της αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων μας.

Υλικά που εμπεριέχει το κιτ «HPV Genotypes 14 Real-TM Quant»:

- PCR-mix-1 «16-18-31-IC», 4 x 0.3 ml
- PCR-mix-1 «39-45-59-IC», 4 x 0.3 ml
- PCR-mix-1 «33-35-56-68», 4 x 0.3 ml
- PCR-mix-1 «51-52-58-66», 4 x 0.3 ml
- PCR- buffer-FRT, 4 x 0.6 ml

- Hot Start DNA Polymerase, 4 x 0.06 ml
- Αρνητικός μάρτυρας (NC), 1.2 ml

Standards:

- K1 “16-18-31-IC”, 0.2 ml (mix HPV DNA C+ 16, 18, 31 και ανθρώπινο DNA) – 1000000 GE/ml
- K2 “16-18-31-IC”, 0.2 ml (mix HPV DNA C+ 16, 18, 31 και ανθρώπινο DNA) – 1000 GE/ml
- K1 “39-45-59-IC”, 0.2 ml (mix HPV DNA C+ 39, 45, 59 και ανθρώπινο DNA) – 1000000 GE/ml
- K2 “39-45-59-IC”, 0.2 ml (mix HPV DNA C+ 39, 45, 59 και ανθρώπινο DNA) – 1000 GE/ml
- K1 “33-35-56-68”, 0.2 ml (mix HPV DNA C+ 33, 35, 56, 68) – 1000000 GE/ml
- K2 “33-35-56-68”, 0.2 ml (mix HPV DNA C+ 33, 35, 56, 68) - 1000 GE/ml
- K1 “51-52-58-66”, 0.2 ml (mix HPV DNA C+ 51, 52, 58, 66) – 1000000 GE/ml
- K2 “51-52-58-66”, 0.2 ml (mix HPV DNA C+ 51, 52, 58, 66) – 1000 GE/ml

Ποιοτικός έλεγχος:

Χρησιμοποιήθηκαν 4 Eppendorf για την ανάλυση κάθε δείγματος, 4 Eppendorf για τη standard K2 και 4 Eppendorf για τον αρνητικό μάρτυρα (**Εικόνα 12**).

- Προστέθηκε σε Eppendorf, το οποίο εμπεριείχε το PCR-buffer-FRT, 60 μl Hot Start DNA Polymerase και πραγματοποιήθηκε ελαφριά ανάμειξη.



Εικόνα 12: Eppendorf με απομονωμένο γενετικό υλικό ιστικών δειγμάτων. Χρησιμοποιήθηκαν 4 Eppendorf για την ανάλυση κάθε δείγματος, 4 Eppendorf για τη standard K2 και 4 Eppendorf για τον αρνητικό μάρτυρα.

- Για κάθε PCR-mix-1 προετοιμάστηκε ένα νέο Eppendorf, στο οποίο προστέθηκαν $10 \cdot N + 3$ (+2 για την ποιοτική ανάλυση) μl του PCR-mix-1 and $5 \cdot N + 3$ (+2 για την ποιοτική ανάλυση) του Mix (PCR-buffer-FRT με Hot Start DNA Polymerase).
- Προστέθηκαν 15 μl από το παραπάνω μείγμα σε κάθε Eppendorf: Αναλυτικότερα, στο πρώτο από τα 4 Eppendorf για κάθε δείγμα, προστέθηκαν 15 μl του μείγματος «16, 18, 31, IC», στο δεύτερο Eppendorf για κάθε δείγμα, 15 μl του μείγματος «39, 45, 59, IC», στο τρίτο Eppendorf για κάθε δείγμα, 15 μl του

μείγματος «33, 35, 56, 68» και στο τέταρτο Eppendorf για κάθε δείγμα, 15 μl του μείγματος «51, 52, 58, 66».

- Προστέθηκαν 10 μl απομονωμένου DNA του δείγματος στα αντίστοιχα Eppendorf.
- Για την πραγματοποίηση της real-time PCR χρησιμοποιήθηκε ειδικός θερμικός κυκλοποιητής «Mx3000P real-time PCR thermal cycler» με χρήση software version 4.1 (Stratagene, La Jolla, CA) του εργαστηρίου Ιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης (**Εικόνα 13**)
- Η διαδικασία περιλάμβανε: 1 κύκλο στους 95 °C για 15 min; 5 κύκλους στους 95°C για 5s, στους 60°C για 20s, στους 72°C για 15s και 40 κύκλους στους 95°C για 5s, στους 60°C για 30s και στους 72°C για 15s.
- Τα αποτελέσματα ερμηνεύτηκαν με το λογισμικό του οργάνου Real Time PCR μέσω της παρουσίας της καμπύλης φθορισμού και της γραμμής ορίου:
 - Στο FAM/Green κανάλι ανιχνεύονται οι HPV τύποι 16, 39, 33, 58
 - Στο JOE/Yellow/HEX ανιχνεύονται οι HPV τύποι 31, 45, 35, 52
 - Στο ROX/Orange κανάλι ανιχνεύονται οι HPV τύποι 18, 59, 68, 66
 - Στο Cy5/Red κανάλι ανιχνεύονται οι HPV τύποι 56 και 51



Εικόνα 13: Συσκευή Mx3000P real-time PCR thermal cycler με χρήση software version 4.1 (Stratagene, La Jolla, CA) του εργαστηρίου Ιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης και τοποθέτηση των δειγμάτων.

7.7 Μετεγχειρητική Παρακολούθηση

Όλοι οι ασθενείς εκλήθησαν για μετεγχειρητικό έλεγχο και τακτική παρακολούθηση, η οποία περιλάμβανε μέτρηση της καλύτερης διορθωμένης οπτικής οξύτητας (BCVA) σε οπτότυπο Snellen, εξέταση της οφθαλμικής επιφάνειας σε σχισμοειδή λυχνία, και μέτρηση της ενδοφθάλμιας πίεσης. Το διάστημα ανάμεσα στους προγραμματισμένους ελέγχους καθορίστηκε ανάλογα με την πορείας επούλωσης και του ενδεχόμενου υποτροπής του περυγίου εξατομικευμένα για κάθε ασθενή. Ο συνολικός χρόνος παρακολούθησης για τους ασθενείς χωρίς υποτροπή είχε διάρκεια ενός έτους από την ημερομηνία χειρουργικής αφαίρεσης του περυγίου. Σε όλους τους ασθενείς με HPV +

περυγία και χωρίς υποτροπή 1 έτος μετά την αφαίρεση του περυγίου, πραγματοποιήθηκε λήψη επιχρίσματος από το σημείο αφαίρεσης του περυγίου και multiplex real time PCR ανάλυση με χρήση κιτ «HPV Genotypes 14 Real-TM Quant, (Sacace Biotechnologies, Como, Italy, cat. no V67- 100FRT)» για την ανίχνευση και την τυποποίηση του ιού.

Κεφάλαιο 8

Στατιστική Ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το λογισμικό SPSS (IBM SPSS Statistics, Version 21.0; Armonk, NY, USA). Η κατανομή των μεταβλητών εξετάστηκε με το Shapiro-Wilk test, εφόσον το δείγμα ασθενών ήταν <100. Οι ποσοτικές μεταβλητές περιγράφονται σαν μέση τιμή ± τυπική απόκλιση (SD). Οι συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων έγιναν χρησιμοποιώντας t-test για ανεξάρτητα δείγματα για τις ποσοτικές μεταβλητές και το chi-square χ^2 test για τις κατηγορικές μεταβλητές. Σε περίπτωση που δεν πληρούνταν οι προϋποθέσεις για την πραγματοποίηση χ^2 test χρησιμοποιήθηκε το Fischer's exact test. Το Levene's test χρησιμοποιήθηκε για να εκτιμήσει την συσχέτιση μεταξύ των διακυμάνσεων. Όλες οι τιμές p-value σχετίζονται με test δύο δρόμων (two-sided) με επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0.05$.

Για να υπολογίσουμε το 95% διάστημα εμπιστοσύνης για τους μετρούμενους δείκτες (ευαισθησία, ειδικότητα, θετική και αρνητική προβλεπτική αξία) χρησιμοποιήσαμε την μέθοδο score-test [58]. Για τον υπολογισμό του 95% διαστήματος εμπιστοσύνης της πιθανότητας αναλογίας (likelihood ratios) χρησιμοποιήθηκε η προτεινόμενη μέθοδος από τους Deeks et al, ενώ οι μηδενικές τιμές αντικαταστάθηκαν με την τιμή 0.5 για την αποφυγή λογιστικών προβλημάτων όπως προτείνουν οι συγγραφείς στα [59][60].

Για τον σχεδιασμό της μελέτης μας υπολογίσαμε ότι για διαγνωστικό τεστ με ευαισθησία 90%, για confidence interval 95%, με βάση τον γνωστό επιπολασμό του HPV στο πληθυσμό μας των πτερυγίων που ήταν 40%, 40 άτομα είναι απαραίτητα για να έχουμε 10% margin for error. Η power analysis του δείγματος πραγματοποιήθηκε με βάση την παρακάτω σχέση:

$$TP + FN = z^2 \times \frac{(SN (1 - SN))}{W^2}$$

$$N(sN) = \frac{TP + FN}{P}$$

Όπου:

TP = true positive

FP = false negative

SN = sensitivity

z = confidence interval (for 95% CI ---> z=1.96)

W = accuracy

N (sN) = sample size

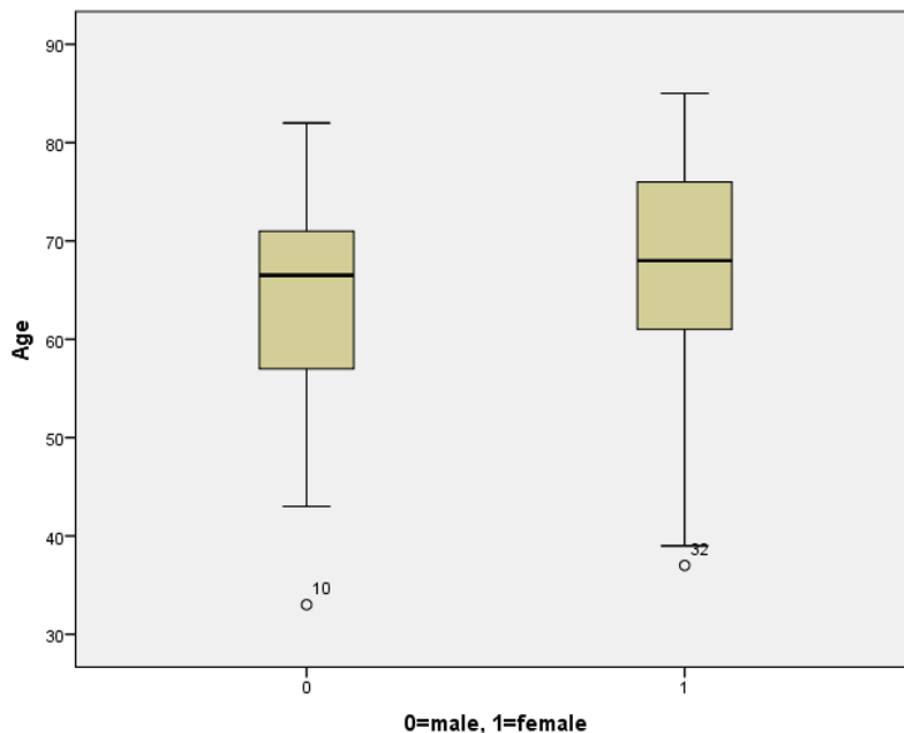
P = prevalence of disease

Κεφάλαιο 9

Αποτελέσματα

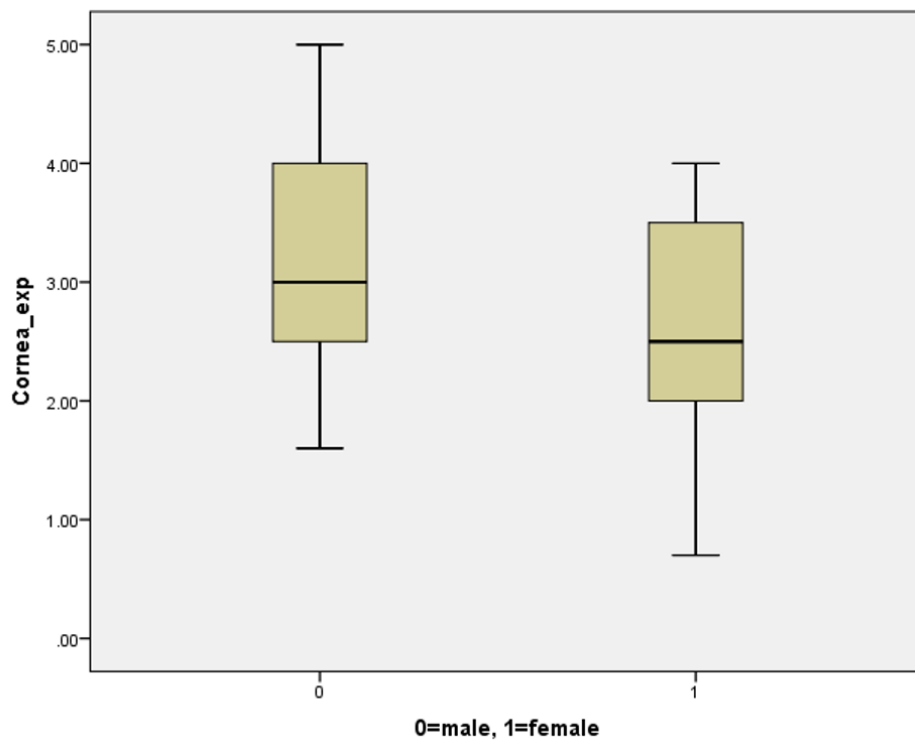
9.1 Δημογραφικά

Συνολικά συμπεριλήφθηκαν 40 οφθαλμοί από 40 ασθενείς με οφθαλμικό περύγιο και 40 οφθαλμοί από 40 ασθενείς με φυσιολογική οφθαλμική επιφάνεια στην παρούσα ανάλυση. Όλοι οι ασθενείς ήταν Καυκάσιας φυλής (75 από Ελλάδα, 2 από Βουλγαρία, 3 από Αλβανία). Σε όλες τις περιπτώσεις οφθαλμικού περυγίου, η ιστοπαθολογική εξέταση επιβεβαίωσε την διάγνωση και αποκλείστηκε άλλη συνυπάρχουσα παθολογία. Από τους ασθενείς με περύγιο, δέκα (25%) είχαν θετικό οικογενειακό ιστορικό και 36 ασθενείς (90%) ανέφεραν εκτεταμένη έκθεση στον ήλιο. Οκτώ από τους 40 ασθενείς (20%) είχαν υποτροπιάζουσα νόσο. Η μέση ηλικία των ασθενών ήταν 64.23 ± 12.65 έτη (εύρος 33-85), ενώ οι 30 από αυτούς ήταν άνδρες (75%) (**Εικόνα 14**).



Εικόνα 14: Ηλικία-Φύλο (Box plot 1)

Το μέσο μέγεθος των περυγίων ήταν 3.05 ± 1.01 mm. Τόσο η ηλικία όσο και το μέγεθος των περυγίων είχαν κανονική κατανομή (Shapiro-Wilk test: $p=0.08$ για την ηλικία και $p=0.4$ για το μέγεθος του περυγίου). Το μέγεθος του περυγίου στους άνδρες ήταν 3.20 ± 0.97 mm και στις γυναίκες 2.58 ± 0.98 mm, ενώ δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων ($p=0.089$) (**Εικόνα 14** και **Πίνακας 6**).



Εικόνα 15: Μέγεθος περυγίου-Φύλο (Box plot 2)

Πίνακας 6: Έλεγχος ομοιογένειας για τη μεταβλητή «μέγεθος του περυγίου»

	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference Lower Upper	
Cornea_exp									
Equal variances assumed	.162	.690	1.748	38	.089	.62333	.35662	-.09861	1.34527
Equal variances not assumed			1.744	15.414	.101	.62333	.35734	-.13654	1.38320

9.2 Έλεγχος αξιοπιστίας της μεθόδου

Ο ιός HPV ανιχνεύτηκε σε 11 από τους 40 ασθενείς (27.5%) στα χειρουργικά εξαιρεμένα δείγματα μέσω PCR και σε 9 από τους 40 ασθενείς (22.5%) χρησιμοποιώντας επίχρισμα από την περιοχή της βλάβης. Σημειώνεται ότι δεν παρατηρήθηκαν ψευδώς θετικά αποτελέσματα στα επιχρίσματα. Οι γονότυποι του ιού που ανιχνεύτηκαν είναι οι 33, 39, 45, 56, 59, 66, 68 (Πίνακας 7).

Πίνακας 7: Αποτελέσματα HPV τύπων που ανιχνεύτηκαν σε επιχρίσματα και ιστούς

Tissue sample	HPV-DNA Swab	HPV-DNA Tissue	HPV-type detected	Tissue sample	HPV-DNA Swab	HPV-DNA Tissue	HPV-type detected
P01	-	-	-	P21	-	-	-
P02	+	+	HPV39; HPV45; HPV59	P22	-	-	-
P03	+	+	HPV39	P23	-	-	-
P04	-	-	-	P24	-	-	-
P05	-	-	-	P25	-	-	-
P06	+	+	HPV39	P26	-	-	-
P07	-	-	-	P27	-	-	-
P08	-	-	-	P28	-	-	-
P09	-	-	-	P29	-	-	-
P10	+	+	HPV39	P30	-	-	-
P11	-	-	-	P31	-	-	-
P12	+	+	HPV39; HPV56	P32	-	-	-
P13	-	-	-	P33	-	-	-
P14	-	-	-	P34	+	+	HPV56
P15	-	+	HPV66	P35	-	-	-
P16	+	+	HPV33	P36	-	-	-
P17	+	+	HPV59	P37	-	-	-
P18	+	+	HPV56	P38	-	-	-
P19	-	-	-	P39	-	-	-
P20	-	-	-	P40	-	+	HPV68

Για την αξιολόγηση της μεθόδου με επίχρισμα κατασκευάστηκε ο πίνακας στατιστικής ανάλυσης 2:

Πίνακας 8: Πίνακας 2x2 για έλεγχο ευαισθησίας και ειδικότητας του τεστ

Results of Swab-based testing	Positive HPV-DNA by reference test	Negative HPV-DNA reference test
Swab- specimen testing		
Positive	9	0
Negative	2	29

Με βάση τα παραπάνω, χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω τύποι ώστε να βρούμε την ευαισθησία της μεθόδου για την οποία θα δούμε κατά πόσο το τεστ είναι κατάλληλο για την ανίχνευση ιού σε μολυσμένα δείγματα:

- Sensitivity: $A/(A+C) \times 100$

Από όπου προκύπτει ότι η ευαισθησία είναι 81.82% με εύρος τιμών 48.22- 97.72

Και η ειδικότητα

- Specificity: $D/(D+B) \times 100$

Είναι 100% με εύρος τιμών 88.06-100

Στη συνέχεια για την απάντηση του ερωτήματος: «Ποια είναι η πιθανότητα ένα θετικό test με την μέθοδο των επιχρισμάτων να αντιστοιχεί σε ένα πράγματι θετικό test στα εξαιρεμένα δείγματα;» χρησιμοποιήθηκαν η θετική και η αρνητική προβλεπτική αξία σύμφωνα με τους παρακάτω τύπους:

- Positive Predictive Value: $A/(A+B) \times 100$

η οποία ανευρίσκεται 100% με εύρος τιμών 86-100

- Negative Predictive Value: $D/(D+C) \times 100$

η οποία ανευρίσκεται 93.55% με εύρος τιμών 80.54-98.07

9.3 Ανάλυση των αποτελεσμάτων

Στην συνέχεια της ανάλυσης έγιναν χ^2 test ανάμεσα στις κατηγορικές μεταβλητές από όπου προκύπτει ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά για την ανίχνευση ιού στα εξαιρεμένα περύγια ανάμεσα στα δύο φύλα ($p=0.890$) ή σε ασθενείς με θετικό ή αρνητικό οικογενειακό ιστορικό ($p=0.656$).

Πίνακας 9: Έλεγχος ύπαρξης σημαντικής διαφοράς ανάμεσα στα 2 φύλα στην ανίχνευση του ιού

	HPV tissue
Mann-Whitney U	145.000
Wilcoxon W	200.000
Z	-.216
Asymp. Sig. (2-tailed)	.829
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.890 ^b
a. Grouping Variable: 0=male, 1=female	
b. Not corrected for ties.	

Πίνακας 10: Έλεγχος ύπαρξης σημαντικής διαφοράς ανάμεσα σε ασθενείς με θετικό και αρνητικό οικογενειακό ιστορικό στην ανίχνευση του ιού

	HPV tissue
Mann-Whitney U	135.000
Wilcoxon W	600.000
Z	-.648
Asymp. Sig. (2-tailed)	.517
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.656 ^b
a. Grouping Variable: Family_history	
b. Not corrected for ties.	

Επιπλέον, οι διαφορές στην ηλικία και το μέγεθος περυγίων των ασθενών ανάμεσα στους HPV-θετικούς (64.61 ± 13.4 έτη και 3.01 ± 1.01 mm, αντιστοιχα) και HPV-αρνητικούς (62.89 ± 11.1 έτη και 3.16 ± 1.13 mm, αντίστοιχα) δεν ήταν στατιστικά σημαντικές, τόσο μετά από έλεγχο με t test ($t = 0.351$, $P = 0.727$; και $t = 0.401$, $P = 0.691$) για ανεξάρτητα δείγματα, καθώς και από την πραγματοποίηση odds ratio μετά από binary logistic regression analysis (odds ratio = 0.99; $P = 0.956$ και odds ratio = 0.882; $P = 0.818$, αντίστοιχα).

Στατιστικά σημαντική συσχέτιση διαπιστώθηκε από τη μελέτη μεταξύ μεγέθους του περυγίου και ύπαρξης υποτροπιάζουσας νόσου (Exp [B]: 2.632, $P = 0.045$), ενώ δεν υπήρχε συσχέτιση μεταξύ μεγέθους του περυγίου και φύλου ($p=0.089$), ηλικίας ($p=0.451$), οικογενειακού ιστορικού ($p=0.573$) και έκθεσης στον ήλιο ($p=0.498$).

Επιπλέον, από τη στατιστική ανάλυση προέκυψε ότι ο τύπος της χειρουργικής επέμβασης ήταν σημαντικός προγνωστικός παράγοντας για την ύπαρξη υποτροπιάζουσας νόσου (Exp [B]: 0.245, P = 0.05).

9.4 Διερεύνηση του ρόλου του ιού στην υποτροπή του περρυγίου

Από τους 40 ασθενείς με περρυγίο, 35 (87.5%) ολοκλήρωσαν ένα χρόνο μετεγχειρητικής παρακολούθησης. Δεκαπέντε από αυτούς (43%) υποβλήθηκαν σε αφαίρεση του περρυγίου και συρραφή με την τεχνική του ακάλυπτου σκληρού και 11 από αυτούς (73.3%) υποτροπίασαν (4/11 ήταν HPV+). Είκοσι ασθενείς (57%) υποβλήθηκαν σε χειρουργική αφαίρεση και συρραφή με χρήση αυτομοσχεύματος και 5 από αυτούς (25%) παρουσίασαν υποτροπή (2/5 ήταν HPV+). Δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική απόκλιση του μεγέθους του περρυγίου ανάμεσα στα 2 γκρουπ χειρουργικής επέμβασης (P=0.54, independent samples t-test).

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων ανέδειξε υψηλή συσχέτιση μεταξύ υποτροπιάζουσας νόσου και HPV λοίμωξης του περρυγίου (Exp [B]: 12.41; P = 0.031). Τα αποτελέσματα του μοντέλου των παραγόντων που πιθανώς σχετίζονται με HPV λοίμωξη του ιστού του περρυγίου φαίνονται στο παρακάτω πίνακα:

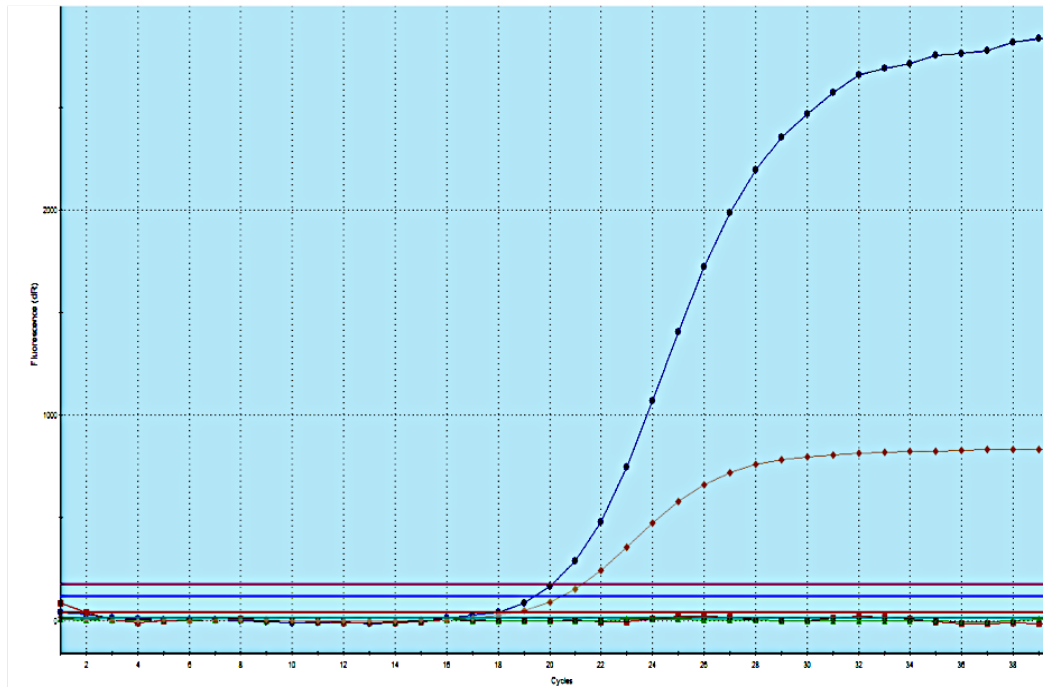
Πίνακας 11: Binary logistic regression για τους παράγοντες που σχετίζονταν με την παρουσία του HPV στα ιστικά τεμάχια

Variables in the Equation

	B	S.E	Wald	df	Sig.	Exp(B)
Step 1 ^a Gender	-.970	1.240	.612	1	.434	.379
Age	-.002	.037	.003	1	.956	.998
Family_history	1.540	1.145	1.809	1	.179	4.664
Sun_exposure	21.926	18112.695	.000	1	.999	3328048258
Cornea_exp	-.125	.545	.053	1	.818	.882
Recurrent	2.518	1.171	4.627	1	.031	12.409
Constant	-23.251	18112.696	.000	1	.999	.000
Variable(s) entered on step 1: Gender, Age, Family_history, Sun_exposure, Cornea_exp, Recurrent						

Επιπλέον, σε 5 HPV+ ασθενείς που δεν παρουσίασαν υποτροπή, πραγματοποιήθηκε λήψη επιχρίσματος, κατά τη συμπλήρωση 1 έτους μετεγχειρητικής παρακολούθησης, από το σημείο αφαίρεσης του περρυγίου και η ανάλυση με real time PCR ήταν αρνητική για HPV λοίμωξη.

HPV56 POSITIVE SAMPLE (SWAB)



Blue: Internal control

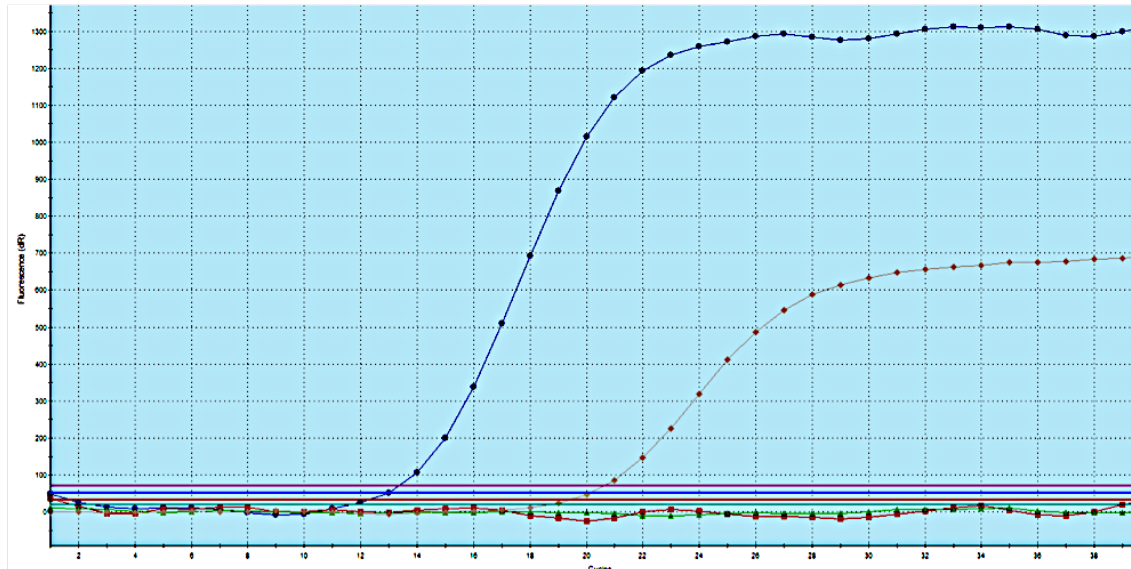
Pink: HPV56

Green: HPV35

Red: HPV68

Εικόνα 16: Καμπύλη ενίσχυσης φθορισμού: Επίχρυσμα περυγίου θετικό στον HPV 56 [61]

HPV56 POSITIVE SAMPLE (TISSUE)



Blue: Internal control

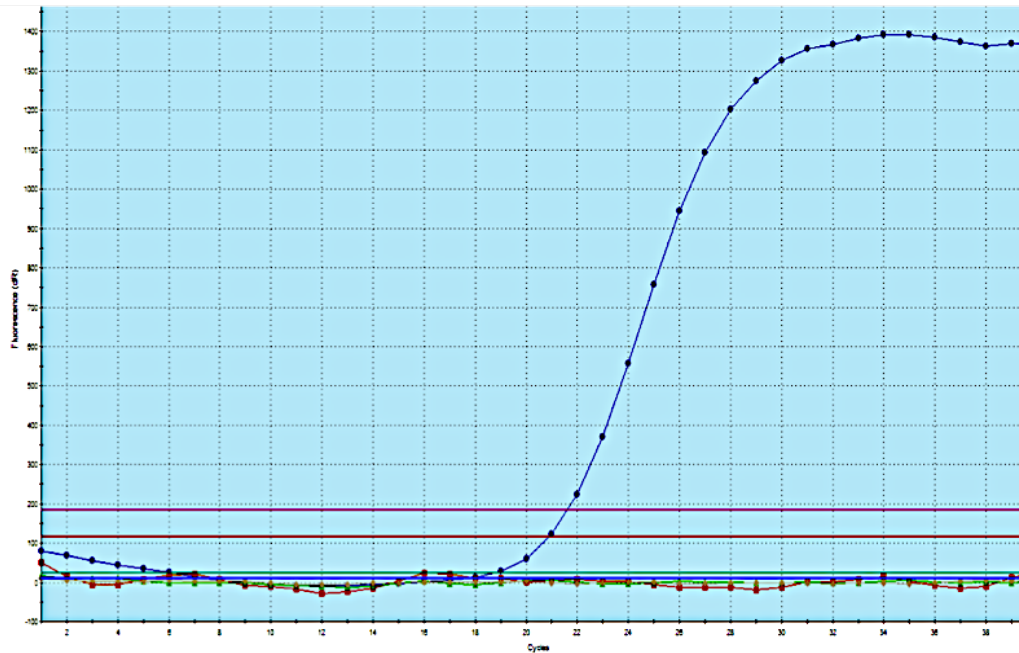
Pink: HPV56

Green: HPV35

Red: HPV68

Εικόνα 17: Καμπύλη ενίσχυσης φθορισμού. Ιστός περυγίου του ίδιου ασθενή θετικός στον HPV56 [61]

NEGATIVE SAMPLE



Blue: Internal control

Pink: HPV56

Green: HPV35

Red: HPV68

Εικόνα 18: Καμπύλη ενίσχυσης φθορισμού: Αρνητικοποίηση της ανίχνευσης του ιού στο επίχρισμα, 1 χρόνο μετά την αφαίρεση του περυγίου [61]

Οι δημογραφικές πληροφορίες των ασθενών που ολοκλήρωσαν το πρωτόκολλο μετεγχειρητικής παρακολούθησης, συγκεντρώνονται και στον ακόλουθο πίνακα:

Πίνακας 12: Δημογραφικά και σύνοψη στατιστικής ανάλυσης ασθενών που ολοκλήρωσαν το πρωτόκολλο παρακολούθησης [61]

Variable	No HPV-DNA detection (n=24)	DNA Tissue (n=11)	P Value
Patient Characteristics, No. (%)			
Sex: Male	19 (79.2)	7 (63.6)	0.086 [†]
Female	5 (20.8)	4 (36.4)	
Sunlight exposure	20 (83.3)	11 (100)	n.s. *
Family History	5 (20.8)	4 (36.4)	n.s. *
Duration >10y	7 (24.13)	3 (27.3)	n.s. *
Recurrent disease	10 (41.6.)	6 (54.5)	n.s. *
Population Characteristics, mean (SD)			
Age (years)	65.5 (13.4)	64.4 (11.4)	n.s. §
Pterygium Size, mean (SD)	3.03 (0.93)	3.01 (0.89)	n.s. §
*Fischer's exact test			
†Chi-square test			
§Independent samples t-test			
n.s.= non-significant result			

Τέλος, η μέση ηλικία του δείγματος ελέγχου (control group) ήταν 64.78 ± 15 (εύρος 25-84). Σε 37 ασθενείς δεν ανιχνεύτηκε HPV λοίμωξη, ενώ σε 3 ασθενείς η ποσότητα του DNA που είχε ληφθεί δεν ήταν αρκετή για ανάλυση.

Κεφάλαιο 10

Συζήτηση

Η αποφολιδωτική κυτταρολογία (exfoliative cytology) βασίζεται στη λήψη αποφολιδωτικού υλικού (επιχρίσματος) από το επιθήλιο και κυρίως τους βλεννογόνους. Η λήψη του επιχρίσματος πραγματοποιείται με τη χρήση διαφόρων τεχνικών όπως η χρήση στυλεού, σπάτουλας, βούρτσας, έκπλυσης ή αναρρόφησης [62]. Η τεχνική αυτή έχει εκτενώς χρησιμοποιηθεί στη διάγνωση του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας (τεστ ΠΑΠ), αλλά και στη διάγνωση λοιμώξεων και καρκίνων του αναπνευστικού, του ουροποιητικού και του γαστρεντερικού. Πλεονεκτήματα της λήψης επιχρίσματος αποτελούν η ασφάλεια, καθώς πρόκειται για ελάχιστα επεμβατική μέθοδο, η εύκολη και γρήγορη εφαρμογή της, αλλά και το χαμηλό κόστος [63].

Όσον αφορά τον οφθαλμό, η αποφολιδωτική κυτταρολογία επιτρέπει τη λήψη και τη μελέτη των πλέον διαφοροποιημένων κυττάρων της ανώτερης στιβάδας του επιθηλίου του επιπεφυκότα και των καλυκοειδών κυττάρων και τη διερεύνηση ύπαρξης ατυπίας ή φλεγμονής [64][65]. Έχει χρησιμοποιηθεί στη διάγνωση παθήσεων της οφθαλμικής επιφάνειας όπως η ξηροφθαλμία, η χρόνια επιπεφυκίτιδα, η έλλειψη βιταμίνης Α, η έλλειψη βλαστικών κυττάρων στο ΣΚΟ και η νεοπλασία των πλακωδών κυττάρων του επιθηλίου της οφθαλμικής επιφάνειας [66][67][68][69][70].

Επιπλέον, καθώς η ύπαρξη λοίμωξης διαταράσσει τη συνοχή των επιθηλιακών κυττάρων, η αποφολιδωτική κυτταρολογία αποτελεί κατάλληλη τεχνική για τη διερεύνηση της παρουσίας λοιμογόνων παραγόντων, καθώς προσφέρει τη δυνατότητα λήψης μικρού αλλά ικανοποιητικού αριθμού κυττάρων και γενετικού υλικού, που σε συνδυασμό με την εφαρμογή μοριακών τεχνικών ανάλυσης, μπορεί να οδηγήσει σε γρήγορη και αξιόπιστη διάγνωση. Τέτοιες μέθοδοι έχουν εφαρμοστεί για τη διάγνωση λοιμώξεων της οφθαλμικής επιφάνειας όπως αυτή από αδενοϊό, απλό έρπητα και πρόσφατα από SARS-CoV-2 [71].

Η HPV λοίμωξη έχει συσχετιστεί με την παρουσία καλοηθών νεοπλασμάτων, όπως τα οξυτενή κονδυλώματα των γεννητικών οργάνων και τα θηλώματα του λάρυγγα, αλλά και με την ανάπτυξη πλήθους κακοηθών νεοπλασιών των πλακωδών κυττάρων του επιθηλίου του γεννητικού, γαστρεντερικού, ουροποιητικού και αναπνευστικού συστήματος [72]. Επιπλέον, σε αρκετές παθήσεις σχετιζόμενες με HPV λοίμωξη, όπως τα θηλώματα της ρινός και των παραρρίνιων κόλπων, τα αδενοκαρκινώματα της κεφαλής και του τραχήλου και οι ενδοεπιθηλιακές νεοπλασίες του τραχήλου της μήτρας και του κόλπου, η εμμένουσα ανίχνευση του ιού μετά από θεραπεία έχει συνδεθεί με αυξημένο κίνδυνο υποτροπής της πάθησης [73][74][75][76][77].

Σε όλες τις περιπτώσεις, οι σχετιζόμενοι με HPV λοίμωξη όγκοι, φαίνεται να προέρχονται από τη ζώνη μετάπλασης (transition zone), όπου το επιθήλιο μεταπίπτει από κυλινδρικό σε πλακώδες, ζώνη που ανατομικά αντιστοιχεί στο ΣΚΟ της

οφθαλμικής επιφάνειας [37][78]. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με τον πιθανό παθογενετικό μηχανισμό δημιουργίας του περρυγίου από τα βλαστικά κυττάρων του ΣΚΟ, συμβάλλουν στη θεώρηση του HPV ως πιθανό παράγοντα στην ανάπτυξη του περρυγίου.

Μοριακές τεχνικές ανίχνευσης των HR-HPV DNA θεωρούνται σήμερα το «gold standard» για την ανίχνευση του ιού σε βλάβες του τραχήλου της μήτρας. Αυτές περιλαμβάνουν τον υβριδισμό και την ενίσχυση των νουκλεϊκών οξέων. Η μοριακή ανάλυση με χρήση της real time-PCR αποτελεί μια αξιόπιστη μέθοδο με καλή ευαισθησία και ειδικότητα για την ανίχνευση των HPV γονότυπων. Χρησιμοποιείται ευρέως τα τελευταία χρόνια στο «screening» του τραχήλου της μήτρας, καθώς επιτρέπει την ανίχνευση ακόμα και πολύ μικρής ποσότητας γενετικού υλικού, μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ιστοτεμάχια αλλά και σε επιχρίσματα, είναι γρήγορη και αξιόπιστη [79][80].

Η λήψη επιχρίσματος με στυλεό, σε συνδυασμό με real time-PCR έχει χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της περιγεννητικής μετάδοσης του ιού HPV, κατά την οποία διαπιστώθηκε η παρουσία DNA του ιού στον επιπεφυκότα, σε 3 παιδιά με μητέρες θετικές σε HPV λοίμωξη [81]. Επιπλέον, παρόμοιες τεχνικές έχουν χρησιμοποιηθεί για τη διερεύνηση λοίμωξης από HPV της φυσιολογικής οφθαλμικής επιφάνειας [82].

Αρκετές μελέτες έχουν διαπιστώσει την παρουσία HPV λοίμωξης σε οφθαλμικά περρύγια. Διαφορές στον επιπολασμό του ιού και των γονότυπών του, φαίνεται να

σχετίζονται με γεωγραφικές και φυλετικές διαφορές , καθώς και με τη χρήση μεθόδων ανίχνευσης του ιού με διαφορετική ευαισθησία και ειδικότητα [27]. Η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη κατά την οποία λήψη επιχρίσματος από τον επιπεφυκότα με στυλεό και real time-PCR ανάλυση, χρησιμοποιήθηκαν για τη διερεύνηση της παρουσίας HPV DNA στο οφθαλμικό περύγιο, με ταυτόχρονη σύγκριση των αποτελεσμάτων με αυτά από αντίστοιχα ιστοτεμάχια των περρυγίων.

Τα αποτελέσματα της μελέτης μας ανέδειξαν εξαιρετική ειδικότητα και υψηλή αξιοπιστία των επιχρισμάτων στη διάγνωση των μολυσμένων με HPV περρυγίων, καθιστώντας την τεχνική αυτή πολύτιμο εργαλείο στην κατανόηση του ρόλου του ιού στο περύγιο, αλλά και στην αντιμετώπισή του.

Οι γονότυποι του ιού που ανιχνεύτηκαν ήταν οι 33, 39, 45, 56, 59, 66, 68. Όπως και στο 45.5% των μελετών του επιπολασμού του ιού στο οφθαλμικό περύγιο, δεν διαπιστώθηκε παρουσία των HR-HPV τύπων 16 και 18, οι οποίοι κυρίως σχετίζονται με τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με τη διαπίστωση της παρουσίας νεοπλασίας των πλακωδών κυττάρων του επιθηλίου της οφθαλμικής επιφάνειας (OSSN) σε κάποια περρύγια [83], ενδεχομένως να υποδεικνύουν έναν διαφορετικό τροπισμό του ιού στο οφθαλμικό περύγιο.

Όσον αφορά στη θεραπεία του περρυγίου, διάφοροι παράγοντες έχουν συνδεθεί με την πιθανότητα μετεγχειρητικής υποτροπής. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων μας ανέδειξε ότι το μέγεθος του περρυγίου και το είδος του χειρουργείου σχετίζονται με

την πιθανότητα υποτροπής. Επιπλέον, η παρουσία του HPV παρουσίασε υψηλή συσχέτιση με την πιθανότητα μετεγχειρητικής υποτροπής του περυσίου σε διάστημα ενός έτους από την αφαίρεσή του. Από την άλλη πλευρά, στα HPV μολυσμένα περυσία με επιτυχή χειρουργική αφαίρεση χωρίς υποτροπή μετά από ένα έτος μετεγχειρητικής παρακολούθησης, ο ιός δεν ανιχνεύτηκε. Αυτή είναι η πρώτη μελέτη όπου διαπιστώνεται η συσχέτιση του ιού με την πιθανότητα υποτροπής του περυσίου με χρήση μιας ελάχιστα επεμβατικής μεθόδου.

Τα παραπάνω ευρήματα υποδεικνύουν ότι η ελάχιστα επεμβατική χρήση επιχρίσματος που εφαρμόστηκε για την ανίχνευση του HPV στο οφθαλμικό περυσίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί όχι μόνο στη μελέτη της παθογένειας του ιού, αλλά και για τη μελέτη της πιθανότητας μετεγχειρητικής υποτροπής. Με τον τρόπο αυτό, η παραπάνω τεχνική μπορεί να προσφέρει νέα δεδομένα στην κατανόηση του μηχανισμού υποτροπής του περυσίου, καθώς και τη δυνατότητα χρήσης ενδεχομένως πιο επιθετικών τεχνικών σε περιπτώσεις παρουσίας HR-HPV, όπως ευρύτερες εκτομές, εντατική χρήση αντι-μεταβολιτών, τοπική θεραπεία ή μετεγχειρητική αγωγή με αντι-ικά φάρμακα όπως η ιντερφερόνη άλφα-2b (IFN alpha-2b) και το imiquimod.

Στις μέρες μας 3 διαθέσιμα εμβόλια έχουν αναπτυχθεί για την πρόληψη της HPV λοίμωξης και των σχετιζόμενων με αυτή νοσημάτων. Συγκεκριμένα τα εμβόλια είναι:

- 1) Το 4-δύναμο εμβόλιο Gardasil, το οποίο στοχεύει τους HPV τύπους 6, 11, 16, 18, 2)
- Το 9-δύναμο εμβόλιο Gardasil 9, το οποίο στοχεύει τους HPV τύπους 6, 11, 16, 18, 31,

33, 45, 52, 58 και 3) Το 2-δύναμο Cervarix, το οποίο στοχεύει τους HPV τύπους 16, 18. Στις ΗΠΑ το 9-δύναμο εμβόλιο Gardasil 9 έχει λάβει έγκριση για την πρόληψη των γεννητικών κονδυλωμάτων, προκαρκινικών τραχηλικών βλαβών και του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας και άλλων νοσημάτων που εμφανίζονται σε άλλα όργανα του γεννητικού συστήματος, του πρωκτού και για ορισμένες μορφές καρκίνου του στοματοφάρυγγα, της στοματικής κοιλότητας και του λάρυγγα [84]. Επιπλέον, γίνονται προσπάθειες ανάπτυξης θεραπευτικών εμβολίων κατά του ιού με σκοπό την ύφεση νοσημάτων σχετιζόμενων με HPV-λοίμωξη [85][86][87]. Δεδομένου των παραπάνω, η μελέτη του ρόλου του ιού στο οφθαλμικό περύγιο και στην μετεγχειρητική υποτροπή του, με χρήση επιχρίσματος και real time PCR ανάλυση, μπορεί να προσφέρει τη δυνατότητα αξιολόγησης της επίπτωσης του εμβολιασμού στον επιπολασμό του περυγίου, αλλά και στην ανάπτυξη εξατομικευμένων εμβολιαστικών πρωτοκόλλων για την πρόληψη και τη θεραπεία του περυγίου.

Τέλος, καθώς και άλλοι ιοί, όπως όπως ο απλός έρπητας (HSV), ο κυτταρομεγαλοϊός (CMV) και ο ιός Epstein-Barr (EBV) έχουν συσχετιστεί σε κάποιες μελέτες με την ανάπτυξη αλλά και τη μετεγχειρητική υποτροπή του περυγίου [88], η χρήση επιχρίσματος σε συνδυασμό με real time PCR ανάλυση μπορεί να προσφέρει νέα δεδομένα στην κατανόηση του παθογενετικού μηχανισμού ανάπτυξης του περυγίου και του ρόλου των ιών σε αυτή.

Κεφάλαιο 11

Προσφορά στη Γνώση

Από την παρούσα μελέτη προκύπτει ότι η προτεινόμενη χρήση επιχρίσματος σε συνδυασμό με real time PCR ανάλυση για την ανίχνευση και τη γονοτύπηση του HPV στο οφθαλμικό περύγιο παρουσιάζει υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα, προσφέροντας έτσι δυνατότητα για:

- 1) Εκτίμηση του επιπολασμού του HPV στο οφθαλμικό περύγιο.
- 2) Νέα δεδομένα στην κατανόηση του μηχανισμού ανάπτυξης και μετεγχειρητικής υποτροπής του περυγίου.
- 3) Ανάπτυξη στοχευμένης αντιϊκής θεραπείας και χειρουργικών τεχνικών σε HPV μολυσμένα περύγια.
- 4) Μελέτη της επίπτωσης του εμβολιασμού κατά του HPV στην ανάπτυξη του περυγίου.
- 5) Ανάπτυξη εμβολιαστικών πρωτοκόλλων για την πρόληψη, την υποτροπή και τη θεραπεία του οφθαλμικού περυγίου.
- 6) Μελέτη του επιπολασμού του HPV στην οφθαλμική επιφάνεια.

Πλεονεκτήματα της μεθόδου αποτελούν η υψηλή ειδικότητα και ευαισθησία, η εύκολη και γρήγορη εφαρμογή της ακόμη και σε παιδιά, η δυνατότητα εφαρμογής της σε ιατρείο και η υψηλή αξιοπιστία.

Μελλοντικό πεδίο έρευνας, όσον αφορά την παραπάνω μέθοδο αφορά την εφαρμογή της σε μεγαλύτερο πληθυσμό, τη βελτιστοποίηση του τρόπου λήψης του επιχρίσματος ώστε να προσφέρει ικανοποιητικό αριθμό κυττάρων και υψηλής ποιότητας γενετικό υλικό, καθώς και τη χρήση της για τη μελέτη της παρουσίας άλλων ιών στο οφθαλμικό πτερύγιο.

Βιβλιογραφία

- [1] Holland EJ, Mannis MJ, Lee WB. Ocular surface disease: cornea, conjunctiva and tear film: expert consult-online and print. Elsevier Health Sciences; 2013 May 17.
- [2] Holland EJ, Mannis MJ, editors. Ocular surface disease: medical and surgical management. Springer Science & Business Media; 2002.
- [3] Σκανδαλάκης Π, Βέργαδος Ι. Κλινική Ανατομία του οφθαλμού. Αθήνα: Ιατρικές εκδόσεις ΠΧ Πασχαλίδης. 2006.
- [4] Gipson IK. Goblet cells of the conjunctiva: A review of recent findings. Progress in retinal and eye research. 2016 Sep 1;54:49-63.
- [5] Townsend WM. The limbal palisades of Vogt. Transactions of the American Ophthalmological Society. 1991;89:721.
- [6] West JD, Dorà NJ, Collinson JM. Evaluating alternative stem cell hypotheses for adult corneal epithelial maintenance. World journal of stem cells. 2015 Mar 26;7(2):281.
- [7] Chui J, Di Girolamo N, Wakefield D, Coroneo MT. The pathogenesis of pterygium: current concepts and their therapeutic implications. The ocular surface. 2008 Jan 1;6(1):24-43.

- [8] Jaros PA, DeLuise VP. Pingueculae and pterygia. *Survey of ophthalmology*. 1988 Jul 1;33(1):41-9.
- [9] Gerstenblith AT, Rabinowitz MP. *The willis eye manual: office and emergency room diagnosis and treatment of eye disease*. Lippincott Williams & Wilkins; 2012 May 11.
- [10] Rezvan F, Khabazkhoob M, Hooshmand E, Yekta A, Saatchi M, Hashemi H. Prevalence and risk factors of pterygium: a systematic review and meta-analysis. *Survey of ophthalmology*. 2018 Sep 1;63(5):719-35.
- [11] Liu L, Wu J, Geng J, Yuan Z, Huang D. Geographical prevalence and risk factors for pterygium: a systematic review and meta-analysis. *BMJ open*. 2013 Nov 1;3(11).
- [12] Peng LÜ, Xiao-ming C. Prevalence and risk factors of pterygium. *International Eye Science*. 2008 Jan 1;8(5):871-4.
- [13] Reid TW, Dushku N. Pterygia and limbal epithelial cells: relationship and molecular mechanisms. *Progress in Retinal and Eye Research*. 1996 Jan 1;15(2):297-329.
- [14] Chen JK, Tsai RJ, Lin SS. Fibroblasts isolated from human pterygia exhibit transformed cell characteristics. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*. 1994 Apr 1;30(4):243-8.
- [15] Chui J, Coroneo MT, Tat LT, Crouch R, Wakefield D, Di Girolamo N. Ophthalmic pterygium: a stem cell disorder with premalignant features. *The American journal of pathology*. 2011 Feb 1;178(2):817-27.

- [16] Detorakis ET, Sourvinos G, Tsampralakis J, Spandidos DA. Evaluation of loss of heterozygosity and microsatellite instability in human pterygium: clinical correlations. *British Journal of Ophthalmology*. 1998 Nov 1;82(11):1324-8.
- [17] Hecht F, Shoptaugh MG. Winglets of the eye: dominant transmission of early adult pterygium of the conjunctiva. *Journal of medical genetics*. 1990 Jun 1;27(6):392-4.
- [18] Zhang JD. An investigation of aetiology and heredity of pterygium: report of 11 cases in a family. *Acta Ophthalmologica*. 1987 Aug;65(4):413-6.
- [19] Goyal JL, Rao VA, Srinivasan R, Agrawal K. Oculocutaneous manifestations in xeroderma pigmentosa. *British Journal of Ophthalmology*. 1994 Apr 1;78(4):295-7.
- [20] Coroneo MT. Pterygium as an early indicator of ultraviolet insolation: a hypothesis. *The British journal of ophthalmology*. 1993 Nov;77(11):734.
- [21] Zhou WP, Zhu YF, Zhang B, Qiu WY, Yao YF. The role of ultraviolet radiation in the pathogenesis of pterygia. *Molecular medicine reports*. 2016 Jul 1;14(1):3-15.
- [22] Cejka C, Cejkova J. Oxidative stress to the cornea, changes in corneal optical properties, and advances in treatment of corneal oxidative injuries. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2015 Jan 1;2015.
- [23] Tsai YY, Cheng YW, Lee H, Tsai FJ, Tseng SH, Lin CL, Chang KC. Oxidative DNA damage in pterygium. *Mol Vis*. 2005 Jan 25;11(1):71-5.

- [24] Balci M, Şahin Ş, Mutlu FM, Yağci R, Karanci P, Yildiz M. Investigation of oxidative stress in pterygium tissue. *Molecular Vision*. 2011;17:443.
- [25] Meshkani SE, Kooshan N, Moghadam AB, Falanji F, Adli A, Baghbani-Arani F, Arian AG, Rad A. Signaling roadmap to epithelial–mesenchymal transition in pterygium, TWIST1 centralized. *Journal of cellular physiology*. 2019 Oct;234(10):18146-55.
- [26] Liu T, Liu Y, Xie L, He X, Bai J. Progress in the pathogenesis of pterygium. *Current Eye Research*. 2013 Dec 1;38(12):1191-7.
- [27] Chalkia AK, Spandidos DA, Detorakis ET. Viral involvement in the pathogenesis and clinical features of ophthalmic pterygium. *International journal of molecular medicine*. 2013 Sep 1;32(3):539-43.
- [28] Hodoroagea A, Calinescu A, Antohe M, Balaban M, Nedelcu RI, Turcu G, Ion DA, Badarau IA, Popescu CM, Popescu R, Popp C. Epithelial-mesenchymal transition in skin cancers: a review. *Analytical Cellular Pathology*. 2019 Dec 16;2019.
- [29] Feng QY, Hu ZX, Song XL, Pan HW. Aberrant expression of genes and proteins in pterygium and their implications in the pathogenesis. *International journal of ophthalmology*. 2017;10(6):973.
- [30] Hacıoğlu D, Erdöl H. Developments and current approaches in the treatment of pterygium. *International ophthalmology*. 2017 Aug;37(4):1073-81.

- [31] Janson BJ, Sikder S. Surgical management of pterygium. *The ocular surface*. 2014 Apr 1;12(2):112-9.
- [32] Hirst LW, Sebban A, Chant D. Pterygium recurrence time. *Ophthalmology*. 1994 Apr 1;101(4):755-8.
- [33] Mahar PS, Manzar N. Pterygium recurrence related to its size and corneal involvement. *Journal of the College of Physicians and Surgeons Pakistan*. 2013;23(2):120.
- [34] Han SB, Jeon HS, Kim M, Lee SJ, Yang HK, Hwang JM, Kim KG, Hyon JY, Wee WR. Risk factors for recurrence after pterygium surgery: an image analysis study. *Cornea*. 2016 Aug 1;35(8):1097-103.
- [35] Fonseca EC, Rocha EM, Arruda GV. Comparison among adjuvant treatments for primary pterygium: a network meta-analysis. *British journal of ophthalmology*. 2018 Jun 1;102(6):748-56.
- [36] Egawa N, Egawa K, Griffin H, Doorbar J. Human papillomaviruses; epithelial tropisms, and the development of neoplasia. *Viruses*. 2015 Jul;7(7):3863-90.
- [37] Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, Stanley MA. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*. 2012 Nov 20;30:F55-70.
- [38] Grm HS, Bergant M, Banks L. Human papillomavirus infection, cancer & therapy. *Indian Journal of Medical Research*. 2009 Sep 1;130(3):277.

- [39] Molijn A, Kleter B, Quint W, van Doorn LJ. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *Journal of clinical virology*. 2005 Mar 1;32:43-51.
- [40] Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, editors. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic press; 2012 Dec 2.
- [41] Qu W, Jiang G, Cruz Y, Chang CJ, Ho GY, Klein RS, Burk RD. PCR detection of human papillomavirus: comparison between MY09/MY11 and GP5+/GP6+ primer systems. *Journal of clinical microbiology*. 1997 Jun;35(6):1304.
- [42] Villa LL, Denny L. CHAPTER 7 Methods for detection of HPV infection and its clinical utility. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*. 2006 Nov;94:S71-80.
- [43] Fraga D, Meulia T, Fenster S. Real-time PCR. *Current protocols essential laboratory techniques*. 2014 Feb;8(1):10-3.
- [44] Dorak MT, editor. *Real-time PCR*. Taylor & Francis; 2007 Jan 24.
- [45] Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-time PCR in virology. *Nucleic acids research*. 2002 Mar 15;30(6):1292-305.
- [46] Watzinger F, Ebner K, Lion T. Detection and monitoring of virus infections by real-time PCR. *Molecular aspects of medicine*. 2006 Apr 1;27(2-3):254-98.

- [47] Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C T method. *Nature protocols*. 2008 Jun;3(6):1101.
- [48] Sjö N, Heegaard S, Prause JU. Conjunctival papilloma: a histopathologically based retrospective study. *Acta Ophthalmologica Scandinavica*. 2000 Dec;78(6):663-6.
- [49] Egbert JE, Kersten RC. Female genital tract papillomavirus in conjunctival papillomas of infancy. *American journal of ophthalmology*. 1997 Apr 1;123(4):551-2.
- [50] Verma V, Shen D, Sieving PC, Chan CC. The role of infectious agents in the etiology of ocular adnexal neoplasia. *Survey of ophthalmology*. 2008 Jul 1;53(4):312-31.
- [51] Sjö NC, von Buchwald C, Cassonnet P, Norrild B, Prause JU, Vinding T, Heegaard S. Human papillomavirus in normal conjunctival tissue and in conjunctival papilloma: types and frequencies in a large series. *British journal of ophthalmology*. 2007 Aug 1;91(8):1014-5.
- [52] Chalkia AK, Bontzos G, Spandidos DA, Detorakis ET. Human papillomavirus infection and ocular surface disease. *International journal of oncology*. 2019 May 1;54(5):1503-10.
- [53] Chauhan S, Sen S, Sharma A, Dar L, Kashyap S, Kumar P, Bajaj MS, Tandon R. Human papillomavirus: a predictor of better survival in ocular surface squamous neoplasia patients. *British journal of ophthalmology*. 2012 Dec 1;96(12):1517-21.

- [54] Gichuhi S, Ohnuma SI, Sagoo MS, Burton MJ. Pathophysiology of ocular surface squamous neoplasia. *Experimental eye research*. 2014 Dec 1;129:172-82.
- [55] Mittal R, Rath S, Vemuganti GK. Ocular surface squamous neoplasia—Review of etiopathogenesis and an update on clinico-pathological diagnosis. *Saudi Journal of Ophthalmology*. 2013 Jul 1;27(3):177-86.
- [56] Detorakis ET, Drakonaki EE, Spandidos DA. Molecular genetic alterations and viral presence in ophthalmic pterygium. *International journal of molecular medicine*. 2000 Jul 1;6(1):35-76.
- [57] Di Girolamo N. Association of human papilloma virus with pterygia and ocular-surface squamous neoplasia. *Eye*. 2012 Feb;26(2):202-11.
- [58] Agresti A, Coull BA. Approximate is better than “exact” for interval estimation of binomial proportions. *The American Statistician*. 1998 May 1;52(2):119-26.
- [59] Deeks JJ, Altman DG. Diagnostic tests 4: likelihood ratios. *Bmj*. 2004 Jul 15;329(7458):168-9.
- [60] Deeks JJ, Higgins JP. Statistical algorithms in review manager 5. *Statistical Methods Group of The Cochrane Collaboration*. 2010 Aug;1(11).
- [61] Chalkia AK, Tseliou M, Bontzos G, Tsakalis NG, Liakopoulos DA, Blazaki S, Sourvinos G, Detorakis ET. Association between HPV detection in swab samples and

- tissue specimens and ophthalmic pterygium recurrence. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*. 2021 Jun 22;1-6.
- [62] McGrew EA. The role of exfoliative cytology in the diagnosis and treatment of malignant disease. *Postgraduate medical journal*. 1961 Aug;37(430):456.
- [63] Al-Abbadi MA. Basics of cytology. *Avicenna journal of medicine*. 2011 Jul;1(1):18.
- [64] Brignole-Baudouin F, Ott AC, Warnet JM, Baudouin C. Flow cytometry in conjunctival impression cytology: a new tool for exploring ocular surface pathologies. *Experimental eye research*. 2004 Mar 1;78(3):473-81.
- [65] Nolan GR, Hirst LW, Wright RG, Bancroft BJ. Application of impression cytology to the diagnosis of conjunctival neoplasms. *Diagnostic cytopathology*. 1994 Oct;11(3):246-9.
- [66] Rivas L, Oroza MA, Perez-Esteban A, Murube-del-Castillo J. Morphological changes in ocular surface in dry eyes and other disorders by impression cytology. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology*. 1992 Jul;230(4):329-34.
- [67] Calonge M, Diebold Y, Sáez V, de Salamanca AE, García-Vázquez C, Corrales RM, Herreras JM. Impression cytology of the ocular surface: a review. *Experimental eye research*. 2004 Mar 1;78(3):457-72.
- [68] Lopin E, Deveney T, Asbell PA. Impression cytology: recent advances and applications in dry eye disease. *The ocular surface*. 2009 Apr 1;7(2):93-110.

- [69] McKelvie P. Ocular surface impression cytology. *Advances in anatomic pathology*. 2003 Nov 1;10(6):328-37.
- [70] Donisi PM, Rama P, Fasolo A, Ponzin D. Analysis of limbal stem cell deficiency by corneal impression cytology. *Cornea*. 2003 Aug 1;22(6):533-8.
- [71] Sabage LE, Mazzo A, Sabage J, Olivo TE, Lourençone LF. Schirmer strip and conjunctival swab for viral detection on the ocular surface of adults: a scoping review.
- [72] Ljubojevic S, Skerlev M. HPV-associated diseases. *Clinics in dermatology*. 2014 Mar 1;32(2):227-34.
- [73] von der Holte AP, Fangk I, Glombitza S, Wilkens L, Welkoborsky HJ. Prognostic factors and risk factors for development and recurrence of sinonasal papillomas: potential role of different HPV subtypes. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*. 2020 Mar;277(3):767-75.
- [74] Fakhry C, Blackford AL, Neuner G, Xiao W, Jiang B, Agrawal A, Gillison ML. Association of oral human papillomavirus DNA persistence with cancer progression after primary treatment for oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *JAMA oncology*. 2019 Jul 1;5(7):985-92.
- [75] So KA, Lee IH, Kim TJ, Lee KH. Risk factors of persistent HPV infection after treatment for high-grade squamous intraepithelial lesion. *Archives of gynecology and obstetrics*. 2019 Jan 14;299(1):223-7.

- [76] Nagai Y, Maehama T, Asato T, Kanazawa K. Persistence of human papillomavirus infection after therapeutic conization for CIN 3: is it an alarm for disease recurrence?. *Gynecologic oncology*. 2000 Nov 1;79(2):294-9.
- [77] Bogani G, Martinelli F, Ditto A, Taverna F, Lombardo C, Signorelli M, Chiappa V, Maggiore UL, Fontanella C, Sabatucci I, Borghi C. Human papillomavirus (HPV) persistence and HPV 31 predict the risk of recurrence in high-grade vaginal intraepithelial neoplasia. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2017 Mar 1;210:157-65.
- [78] Herfs M, Hubert P, Moutschen M, Delvenne P. Mucosal junctions: open doors to HPV and HIV infections?. *Trends in microbiology*. 2011 Mar 1;19(3):114-20.
- [79] Hubbard RA. Human papillomavirus testing methods. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2003 Aug;127(8):940-5.
- [80] Abreu AL, Souza RP, Gimenes F, Consolaro ME. A review of methods for detect human Papillomavirus infection. *Virology journal*. 2012 Dec;9(1):1-9.
- [81] Trottier H, Mayrand MH, Coutlée F, Monnier P, Laporte L, Niyibizi J, Carceller AM, Fraser WD, Brassard P, Lacroix J, Francoeur D. Human papillomavirus (HPV) perinatal transmission and risk of HPV persistence among children: design, methods and preliminary results of the HERITAGE study. *Papillomavirus Research*. 2016 Dec 1;2:145-52.

- [82] Chong PP, Tung CH, Rahman NA, Yajima M, Chin FW, Yeng CL, Go ES, Chan CM, Yawata N, Yamamoto N. Prevalence and viral load of oncogenic human papillomavirus (HPV) in pterygia in multi-ethnic patients in the Malay Peninsula. *Acta ophthalmologica*. 2014 Nov;92(7):e569-79.
- [83] Hirst LW, Axelsen RA, Schwab I. Pterygium and associated ocular surface squamous neoplasia. *Archives of Ophthalmology*. 2009 Jan 12;127(1):31-2.
- [84] Laurent JS, Luckett R, Feldman S. HPV vaccination and the effects on rates of HPV-related cancers. *Current problems in cancer*. 2018 Sep 1;42(5):493-506.
- [85] Chabeda A, Yanez RJ, Lamprecht R, Meyers AE, Rybicki EP, Hitzeroth II. Therapeutic vaccines for high-risk HPV-associated diseases. *Papillomavirus Research*. 2018 Jun 1;5:46-58.
- [86] Vonsky MS, Runov AL, Gordeychuk IV, Isagulians MG. Therapeutic vaccines against human papilloma viruses: achievements and prospects. *Biochemistry (Moscow)*. 2019 Jul;84(7):800-16.
- [87] Garbuglia AR, Lapa D, Sias C, Capobianchi MR, Del Porto P. The use of both therapeutic and prophylactic vaccines in the therapy of papillomavirus disease. *Frontiers in immunology*. 2020 Feb 18;11:188.

- [88] Rykov SO, Usenko KO, Mogilevskyy SI, Ziablitsev SV, Denisiuk LI. Relationship of the recurrence after pterygium surgery with the presence of HSV, EBV, CMV, HPV, and BRAFV600E mutation. *Journal of Ophthalmology (Ukraine)*. 2019(1):486.

