

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ: ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ – ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ**

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Ν. Κ. ΒΑΜΒΑΚΟΠΟΥΛΟΣ

**ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ HeLa ΣΕ ΜΟΛΥΝΣΗ ΜΕ
ΙΟΥΣ ΓΡΙΠΗΣ ΤΥΠΟΥ Β & Α: ΠΙΘΑΝΕΣ
ΠΡΟΕΚΤΑΣΕΙΣ ΣΤΗΝ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ
ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΗΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΑΣΘΕΝΕΙΑΣ**

**ΔΕΣΠΟΙΝΑΣ Ο. ΣΙΟΥΤΟΠΟΥΛΟΥ
ΙΑΤΡΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΛΟΓΟΥ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΥΠΟΒΛΗΘΗΚΕ ΣΤΟ ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

ΛΑΡΙΣΑ, ΠΑΝΕΠ. ΕΤΟΣ 2006-07

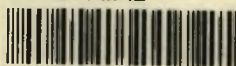
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 7787/1
Ημερ. Εισ.: 25-11-2009
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: Δ
572.8
ΣΙΟ

✓

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000083807

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ HeLa ΣΕ ΜΟΛΥΝΣΗ ΜΕ ΙΟΥΣ
ΓΡΙΠΗΣ ΤΥΠΟΥ Β & Α: ΠΙΘΑΝΕΣ ΠΡΟΕΚΤΑΣΕΙΣ ΣΤΗΝ
ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΗΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΑΣΘΕΝΕΙΑΣ**

**ΔΕΣΠΟΙΝΑΣ Ο. ΣΙΟΥΤΟΠΟΥΛΟΥ
ΙΑΤΡΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΛΟΓΟΥ**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
Ν.Κ. ΒΑΜΒΑΚΟΠΟΥΛΟΣ**

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

ΛΑΡΙΣΑ 2007

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ABSTRACT

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Αρχές Κυτταρικής Βιολογίας Ανθρώπου

-Γενικές αρχές κυτταρικής οργάνωσης βιολογικών συστημάτων

-Οργάνωση διαφοροποιημένων ανθρώπινων κυττάρων σε ιστούς, όργανα και συστήματα

-Μορφολειτουργικές ιδιότητες επιθηλιακού ιστού

2. Αρχές Βιολογίας Ιϊκών Συστημάτων

-Εισαγωγικά

-Γενική Βιολογία ιών γρίπης

-Επιδημιολογία ιών γρίπης

-Γενικές ιδιότητες ογκογόνων ιών HPV

3. Αρχές Κυτταρολογίας

-HPV και δυσπλασία του τραχήλου της μήτρας

4. Κυτταρικές σειρές

5. Καρκίνος

6. Σκοπός της μελέτης

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

- Πρωτόκολλο καλλιέργειας κυττάρων HeLa
- Απομόνωση ιών γρίπης σε κυτταροκαλλιέργεια
- Ιϊκή μόλυνση κυττάρων και τιτλοποίηση ιών γρίπης
- Μέθοδος αιμοσυγκόλλησης
- Μέθοδος τιτλοποίησης του αντιγόνου της αιμοσυγκολλητίνης (HA)
- Επεξεργασία υλικού
- Χρώση Παπανικολάου –Τεχνική
- Χρώσεις ανοσοκυτταροχημείας με μονοκλωνικά αντισώματα
- Μέθοδος απομόνωσης ολικού RNA
- Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA)
- Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Μελέτη της απόκρισης τριών γονιδιακών συστημάτων του κυττάρου σε μόλυνση με ιό γρίπης Β: μη απαραίτητων (HPV & RARα) και απαραίτητων (GAPDH) για τη κυτταρική επιβίωση

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

- Ιολογικά δεδομένα του υπό μελέτη συστήματος μοντέλου ιού-κυττάρου
- Μορφολογικές μεταβολές κυττάρων HeLa πριν και μετά τη μόλυνση με ιό γρίπης: σύγκριση με φυσιολογικά κύτταρα ενδοτραχήλου
- Ανοσοκυτταροχημική έκφραση κυτταρικών συστημάτων: κασπάσης 3
κασπάσης 8
- Ογκογονιδίου p53
- Αντιγόνου πολλαπλασιασμού Ki-67
- Κυκλίνης E
- Ανοσοφθορισμός

-Αποτελέσματα PCR

-Αποτελέσματα μόλυνσης με ιό γρίπης τύπου Α

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο επίκτητος γενετικός επαναπρογραμματισμός των φυσιολογικών κυτταρικών λειτουργιών έχει αναγνωρισθεί ως μια συνήθη αιτία των ανθρώπινων ασθενειών, ιδιαίτερα του καρκίνου που αποτελεί απειλητική κατάσταση για τη ζωή.

Προσπάθειες να αναστραφεί ή και να επιδιορθωθεί το παθολογικό γενετικό πρόγραμμα των καρκινικών κυττάρων με βιοφυσικές και βιοχημικές μεθόδους δεν απέδωσαν μέχρι στιγμής τα αναμενόμενα αποτελέσματα, πιθανώς λόγω της σύνθετης πολυπαραγοντικής και πολυσταδιακής φύσης του καρκίνου.

Σύμφωνα με το βασικό βιολογικό αξίωμα που υποστηρίζει ότι «όλα τα βιολογικά προβλήματα πρέπει να έχουν και τις βιολογικές λύσεις» επιχειρήθηκε μια εξ' ολοκλήρου βιολογική διορθωτική προσέγγιση του καρκίνου, μέσω της επίδρασης μη ογκογόνων ιών σε δεκτικά καρκινικά κύτταρα.

Για το σκοπό αυτό ανθρώπινα αδενοκαρκινικά κύτταρα τραχήλου μήτρας (HeLa), που έφεραν 20 αντίγραφα του στελέχους υψηλού κινδύνου HPV-18 σταθερά ενσωματωμένο στο γενετικό τους υλικό και εξέφραζαν κατάλληλους ιϊκούς υποδοχείς, μολύνθηκαν ανεξάρτητα με στελέχη ιού γρίπης Β και Α. Συγκρίθηκαν τα μορφολογικά χαρακτηριστικά, οι δείκτες αντιγονικής έκφρασης και οι δυνατότητες διαίρεσης των κυττάρων ξενιστών που επιβίωσαν της μόλυνσης, με αυτές των φυσιολογικών πρωτογενών κυττάρων του ενδοτραχήλου της μήτρας και των μη μολυσμένων HeLa μαρτύρων με χρώση Παπανικολάου και ανοσοκυτταροχημεία.

Αυτή η σύγκριση αποκάλυψε ότι τα φυσιολογικά πρωτογενή ενδοτραχηλικά και τα μολυσμένα κύτταρα HeLa που επιβίωσαν της μόλυνσης, μοιράζονται παρόμοια μορφολογικά, φαινοτυπικά χαρακτηριστικά και διαδικασίες

διαίρεσης, ενώ διαφέρουν δραστικά από αυτές των μη μολυσμένων κυττάρων HeLa.

Ο αριθμός των κυττάρων ξενιστών που επιβίωσαν 7 ημέρες μετά τη μόλυνση, δεν άλλαξε κατά τη διάρκεια μιας περιόδου παρακολούθησης 3 εβδομάδων ενώ τα επίπεδα της κυκλίνης έδειξαν ότι τα κύτταρα σταμάτησαν στη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου λόγω του ιϊκού στρες.

Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι επιπροσθέτως της απόπτωσης το μη ογκογόνο ιϊκό στρες επέφερε αλλαγές στα κύτταρα HeLa που επέζησαν της ιϊκής λοίμωξης διαφοροποιώντας τα δραστικά από τα μη μολυσμένα HeLa και εμφάνισαν έντονες φαινοτυπικές ομοιότητες με τα πρωτογενή και μεταπλαστικά αδενικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας.

Ένας μηχανισμός προσαρμοστικής αντικατάστασης της γονιδιακής έκφρασης των μη απολύτως απαραίτητων για την κυτταρική επιβίωση γονιδιακών συστημάτων προτάθηκε για να εξηγήσει συνολικά αυτές τις παρατηρήσεις. Για να εξετάσουμε άμεσα την υπόθεση εργασίας κύτταρα HeLa μολύνθηκαν με χαμηλό(10^{-9} μονάδες), μέσο(10^{-6}) και υψηλό τίτλο(10^{-2}) ιού γρίπης τύπου B και τα περιεχόμενα mRNA του HPV της υπομονάδας α του υποδοχέα του ρετινοϊκού οξέος (RARα) και του γλυκολυτικού ενζύμου glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH), των κυττάρων ξενιστών που επιβίωσαν της μόλυνσης 10 ημέρες μετά, συγκρίθηκαν με αυτά των μη μολυσμένων πρωτογενών κυττάρων με ημιποσοτική RT/PCR (αντίστροφη τρανσκριπτάση). Αυτή η σύγκριση αποκάλυψε μέτρια και δραστική εξάρτηση του περιεχομένου mRNA του HPV και RARα αντίστοιχα, ενώ απεκάλυψε πλήρη ανεξαρτησία της έκφρασης του mRNA του GAPDH αντίστοιχα ως προς τον ιϊκό τίτλο.

Καταστολή της υπάρχουσας γονιδιακής έκφρασης των μη απαραίτητων γονιδίων για την επιβίωση όπως του HPV και RARα στα κύτταρα που επιβίωσαν από το στρες με μη ογκογόνο ιό, προφανώς διέσωσε αυτά από απόπτωση, επιτρέποντάς τα να υποστηρίξουν την έκφραση ιϊκών αντιγόνων. Αυτές οι παρατηρήσεις παρείχαν άμεση υποστήριξη του προτεινόμενου μηχανισμού της προσαρμοστικής αντικατάστασης της γονιδιακής έκφρασης με την έκφραση ιϊκών γονιδίων ως τη βάση για την παρατηρούμενη διαφορετική ευαισθησία των φυσιολογικών και καρκινικών κυττάρων σε ιϊκούς υποδοχείς για τους μη ογκογόνους ιούς.

Συμπερασματικά, αυτή η μελέτη περιέγραψε ένα μηχανισμό εξάλειψης/επιδιόρθωσης των δεκτικών καρκινικών κυττάρων από κατάλληλο μη ογκογόνο ιϊκό στρες εξηγώντας τα ευρήματά μας από το απλό μοντέλο: «μεταλλαγμένα καρκινικά κύτταρα (HeLa) - μη ογκογόνοι ιοί (γρίπης τύπου B & A)», που πιθανώς υπόσχεται κλινικές εφαρμογές για καλύτερη αντιμετώπιση των ανθρώπινων ασθενειών περιλαμβανομένων και των δεκτικών καρκίνων με καθαρά βιολογικά μέσα

ABSTRACT

Acquired genetic reprogramming of normal cellular activities is rapidly recognized as a common cause of human disease with cancer, a life threatening condition, being the most representative member of this disease group. Attempts to reverse or correct the altered genetic program of transformed cells by biophysical or biochemical methods have been inconclusive, most likely because of the complex multistage and multifactorial nature of the cancer state. In line to basic biological guidelines suggesting that all biological problems must have biological solution(s), an entirely biological corrective approach to cancer and this disease group accordingly was exploited, by assessing the effect of non-oncogenic viruses on receptive cancer cells. For this purpose, human adenocarcinoma cells (HeLa) carrying 20 copies of the high risk human papiloma virus-18 strain (HPV-18) stably integrated in their genome and expressing appropriate viral receptors, were infected independently with influenza B (IBV) & A (IAV) viral strains and compared the morphologic, marker antigen expression and divisional properties of surviving hosts to those of normal primary endocervical adenoepithelial cells and uninfected HeLa cell controls by Papanikolaou-staining and immunocytochemistry. This comparison revealed that normal primary endocervical and infected HeLa cells surviving infection shared similar morphologic, phenotypic and divisional patterns, which

differed drastically from those of uninfected HeLa cells. The number of viable infected hosts at seven days post infection did not change during a three week follow-up period and their cyclin E levels suggested that they had been arrested to the G1 phase of the cell cycle by viral stress. These findings suggested that in addition to apoptosis, non-oncogenic viral stress activated expression of endocervical metaplastic-like motifs to surviving hosts. A mechanism of adoptive replacement of conditional cellular with viral gene expression was proposed to collectively account for these observations.

To test directly this working hypothesis, HeLa cells were infected with low (10^{-9} units), medium (10^{-6} units) and high (10^{-2} units) IBV titers and the resulting HPV, retinoic acid receptor α subunit (RAR α) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA content of surviving infected hosts 10 days post-infection was compared to that of their uninfected precursors by semi-quantitative reverse transcriptase/polymerase chain reaction amplification (RT/PCR). This comparison revealed moderate and drastic dependence of HPV and RAR α mRNA content respectively, while complete independence of GAPDH mRNA expression, on viral titer. Suppression of conditional gene expression of dispensable products like HPV and RAR α , in cell remnants surviving non-oncogenic viral stress, apparently rescued the cells from apoptosis by allowing them to support viral antigen expression. These observations provided direct support to the proposed mechanism of adaptive replacement of conditional cellular with viral gene expression as the basis for the observed differential susceptibility of viral receptor-expressing normal and cancer cells to non-oncogenic viruses.

In conclusion this study described a mechanism of elimination / correction of receptive cancer cells by appropriate non-oncogenic viral stress, that bears promise for a broad range of biomedical applications on the improved management of human disease including directly responsive types of cancer, by entirely biological means.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Ο καρκίνος είναι επιγενετική νόσος, που οφείλεται στην απορρύθμιση του κυτταρικού ελέγχου σε γενετικό επίπεδο. Δεδομένου ότι οι διάφοροι τύποι καρκίνου προέρχονται από λάθος γενετική εγγραφή, ο ιδανικός τρόπος αντιμετώπισής τους θα ήταν η επιδιόρθωση του σφάλματος που τους προκάλεσε σε επίπεδο γενετικού υλικού. Προφανώς μια τέτοια δυνατότητα προϋποθέτει ενδελεχή και σε βάθος γνώση της βιολογίας του κυττάρου. Στη πράξη οι προσπάθειες αντιμετώπισης του προβλήματος αξιοποιούν παράγοντες με διαφορεική δράση σε υγιή και καρκινικά κύτταρα. Εκτιμώντας ότι ο καρκίνος σαν βιολογική οντότητα θα πρέπει να είναι αντιμετωπίσιμος με αμιγώς βιολογικά μέσα, αναζητήσαμε βιολογικές δυνατότητες θεραπευτικής προσέγγισης του προβλήματος. Για το σκοπό αυτό μελετήσαμε τη βιολογία απλού συστήματος μοντέλου «καρκινικό κύτταρο - μη-ογκογόνοι ιοί» σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο.

Ειδικότερα διερευνήθηκε η δυνατότητα βιολογικής επιδιόρθωσης αθανатоποιημένων καρκινικών κυττάρων (αδενοεπιθηλιακών κυττάρων καρκίνου τραχήλου μήτρας HeLa μολυσμένων με HPV-18) με ιούς γρίπης τύπου B & A. Παρατηρήθηκε ότι σε αντίθεση με τη χαρακτηριστική ανοχή των φυσιολογικών κυττάρων στόχων σε μη-ογκογόνο ιϊκή μόλυνση, τα καρκινικά κύτταρα εμφάνισαν εκτενή θραυστότητα στον ιό. Το αποτέλεσμα της ιϊκής μόλυνσης στα επιζώντα κύτταρα εκτιμήθηκε με βάση τα μορφομετρικά τους χαρακτηριστικά και την έκφραση των ακόλουθων κυτταρικών αντιγόνων: κασπάση 3, κασπάση 8 (δείκτες απόπτωσης), Ki-67 (δείκτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού), του ογκογονιδίου p53 και κυκλίνης E (δείκτης μετάπτωσης από τη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου). Διαπιστώθηκε ότι ο ιός γρίπης B επέφερε φαινοτυπική μετατροπή των αδenoκαρκινικών κυττάρων σε τύπο παρόμοιο με αυτό των πρωτογενών φυσιολογικών. Περαιτέρω πειραματική επαλήθευση έγινε με τη χρήση έμμεσου ανοσοφθορισμού

(ανίχνευση ιϊκών αντιγόνων γρίπης) και PCR (ενδοκυττάρια παρουσία HPV, α υπομονάδας υποδοχέων ρετινοϊκού οξέος και ενζύμου της γλυκόλυσης πριν και μετά τη μόλυνση). Συμπεραίνεται ότι με την ιϊκή μόλυνση με μη ογκογόνο ιό επιτυγχάνεται η ειδική στόχευση και καταστροφή ή επιδιόρθωση, μέσω επαναπρογραμματισμού γενετικά ή επιγενετικά αποπρογραμματισμένων καρκινικών κυττάρων. Ο προτεινόμενος μηχανισμός της εξάλειψης ή της διόρθωσης των δεκτικών καρκινικών κυττάρων από κατάλληλη μη ογκογόνο ιϊκή λοίμωξη, μέσω προσαρμοστικής αντικατάστασης της γονιδιακής έκφρασης πιθανώς υπόσχεται κλινικές εφαρμογές για καλύτερη αντιμετώπιση δεκτικών καρκίνων από καθαρά βιολογικούς παράγοντες.

Με την ευκαιρία της παρουσίασης της μελέτης αυτής θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλους όσους βοήθησαν στη διεξαγωγή και ολοκλήρωσή της και ιδιαίτερα:

Τον καθηγητή Ν. Βαμβακόπουλο για την ανάθεση του θέματος, το αμέριστο ενδιαφέρον και τις πολύτιμες υποδείξεις του για την ολοκλήρωση αυτής της μελέτης, καθώς και την δρ. Α.Τσέζου και δρ. Π. Κόλλια που συμμετείχαν στην τριμελή επιτροπή.

Θεωρώ υποχρέωσή μου να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον δρ. Η. Πλακοκέφαλο για την πολύτιμη συνεργασία του σε θέματα Ιολογίας και στην όλη διαμόρφωση αυτής της μελέτης.

Ευχαριστώ θερμά την δρ. Χ. Δεστούνη, διευθύντρια του Κυτταρολογικού τμήματος του Αντικαρκινικού Νοσοκομείου «Θεαγένειο» για το έντονο ενδιαφέρον, τη συμπαράσταση και τις πολύτιμες υποδείξεις της .

Επιθυμώ να ευχαριστήσω επίσης το υπόλοιπο προσωπικό του εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας – Κυτταρογενετικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας και του Κυτταρολογικού τμήματος του Νοσοκομείου «Θεαγένειο», ιδιαίτερα τον τεχνολόγο κ. Κ. Νεστορίδη για την ουσιαστική του βοήθεια.

ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ

Ο καρκίνος αποτελεί τη σημαντικότερη μάστιγα της σύγχρονης κοινωνίας. Αν και η βιογένεσή του οφείλεται σε συσσώρευση σφαλμάτων με πιθανούς στόχους τα περισσότερα από τα γνωστά βιομόρια, κυτταρικά οργανίδια και λειτουργίες, η εκδήλωσή του προϋποθέτει απώλεια ελέγχου του κυτταρικού κύκλου. Το γεγονός ότι ο καρκίνος είναι αποτέλεσμα λανθασμένου κυτταρικού προγραμματισμού μας οδηγεί στο αβίαστο συμπέρασμα ότι η αντιμετώπισή του θα προέλθει τελικά από τη δυνατότητα επιδιορθωτικών επεμβάσεων σε επίπεδο κυτταρικού προγράμματος. Προς την κατεύθυνση αυτή θα απαιτηθεί ολοκληρωμένη και σε βάθος γνώση της βιολογίας του κυττάρου. Οι σημαντικότερες μέχρι σήμερα προσπάθειες αντιμετώπισης του προβλήματος εστιάζουν σε σταδιοποίηση και σχεδιασμό εξατομικευμένων θεραπευτικών επεμβάσεων για την διακοπή ή καθυστέρηση της πορείας του, με συνδυασμό χειρουργικών και χημειο-ακτινοθεραπευτικών σχημάτων διαφορικής επίδρασης σε καρκινικά και φυσιολογικά κύτταρα.

Οι δυνατότητες των βιολογικών συστημάτων στην αντιμετώπιση του καρκίνου χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης. Από τα σημαντικότερα μοριακά εργαλεία βιολογικής προέλευσης για την επιγενετική αντιμετώπιση των προσαρμοστικών αναγκών των οργανισμών είναι οι ιοί, που μολύνουν επιλεκτικά και προκαλούν γενετικές ανακατανομές στον ξενιστή. Βιολογικής συνεπώς προέλευσης ιϊκή μόλυνση προκαλεί στρες σε κύτταρα στόχους οδηγώντας τα είτε σε απόπτωση και κυτταρικό θάνατο είτε σε προσαρμοστικό προγραμματισμό για τον πολλαπλασιασμό του ιού. Κοινό εύρημα των περισσότερων τύπων καρκίνου είναι και η γονιδιακή υπερέκφραση των απορυθμισμένων καρκινικών κυττάρων που μπορεί να οδηγήσει σε έκτοπη έκφραση ποικίλων ιϊκών υποδοχέων στην επιφάνειά τους διαφοροποιώντας επιλεκτικά τα καρκινικά κύτταρα ως προς τα πρωτογενή τους ομόλογα και

μετατρέποντάς τα σε πρωτεύοντες στόχους και ξενιστές των περισσότερων ιών.

Αναφορικά με το καρκίνο οι ιοί κατατάσσονται σε δύο κατηγορίες: τους ογκογόνους και τους μη ογκογόνους. Οι συχνότεροι μη ογκογόνοι ιοί του ανθρώπου είναι οι ιοί που προκαλούν τις κοινές γρίπες. Μόλυνση επιθηλιακών κυττάρων του αναπνευστικού συστήματος με μη-ογκογόνους ιούς γρίπης δεν προκαλεί απόπτωση παρά μόνο ελεγχόμενη κυτταρική απόκριση. Δεδομένου του ότι η μόλυνση καρκινικών κυττάρων στόχων με μη ογκογόνους ιούς δεν έχει επαρκώς διερευνηθεί μελετήσαμε τη δράση των μη ογκογόνων ιών σε καρκινικά κύτταρα στόχους. Η παρούσα συνεπώς μελέτη επικεντρώθηκε στην διερεύνηση των φαινοτυπικών μεταβολών που επιφέρει η μόλυνση αθανатоποιημένων αδενοκαρκινικών κυττάρων τραχήλου μήτρας ανθρώπου με μη ογκογόνους ιούς γρίπης καθώς και των εμπλεκόμενων μηχανισμών πρόκλησής τους.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Αρχές Κυτταρικής Βιολογίας Ανθρώπου

Γενικές αρχές κυτταρικής οργάνωσης βιολογικών συστημάτων: Το κύτταρο αποτελεί το μικρότερο βιολογικό σύστημα που μπορεί να υποστηρίξει το φαινόμενο της ζωής. Σαν αποτέλεσμα της κυτταρικής τους διαφοροποίησης οι πολυκύτταροι οργανισμοί εμφανίζουν κυτταρική εξειδίκευση και πλήθος προερχόμενων ιδιοτήτων, η μελέτη και κατανόηση των οποίων προϋποθέτουν λεπτομερή γνώση της κυτταρικής δομής και λειτουργίας και της γενικότερης βιολογίας του κυττάρου και των κυτταρικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ τους και με άλλους κυτταρικούς τύπους. Η μορφολογία ή φαινότυπος αποτελεί συνεπώς πρωτεύουσα προτεραιότητα της κυτταρικής βιολογίας και της διαγνωστικής Κυτταρολογίας.

Οργάνωση διαφοροποιημένων ανθρώπινων κυττάρων σε ιστούς, όργανα και οργανικά συστήματα: Έχουν αναγνωριστεί με μορφολειτουργικά κριτήρια 4 κύριοι τύποι ιστών κοινής εμβρυϊκής προέλευσης στον άνθρωπο: ο νευρικός, ο μυϊκός, ο ερειστικός και ο επιθηλιακός, που συμμετέχουν στο σχηματισμό των ποικίλων οργανικών υπερδομών (1). Ο επικρατέστερος ιστός έχει άμεση σχέση με την λειτουργική αποστολή των οργάνων στα οποία συμμετέχει και ονομάζεται κύριος ιστός, οι δε υπόλοιποι συμμετέχοντες ιστοί ονομάζονται δευτερεύοντες και συμβάλλουν στη συμπλήρωση της λειτουργικής αποστολής του οργάνου. Κάθε όργανο αποτελείται από ερειστικό υπόστρωμα συνδετικού κυρίως ιστού, άλλα πρωτεύοντα κυτταρικά στοιχεία του οργάνου, αγγεία και νεύρα. Όργανα που επιτελούν κοινές λειτουργίες, συμμετέχουν στη στελέχωση των διαφόρων οργανικών συστημάτων. Η διαφοροποίηση των ιστών, οργάνων και οργανικών συστημάτων του ανθρώπου έχει τη βάση της στην έντονη διαφοροποίηση που παρατηρείται σε κυτταρικό επίπεδο.

Μορφολειτουργικές ιδιότητες επιθηλιακού ιστού: είναι ο αρχαιότερος όλων και προέρχεται και από τα τρία βλαστικά δέρματα του εμβρύου. Αποτελείται κυρίως από κύτταρα και χαρακτηρίζεται από την έλλειψη άφθονης μεσοκυττάριας ουσίας μεταξύ τους. Στον άνθρωπο ανάλογα με τη θέση και τη λειτουργική αποστολή του βρίσκεται είτε με τη μορφή καλυπτήριου επιθηλίου είτε με τη μορφή του αδενικού επιθηλίου. Το καλυπτήριο επιθήλιο επενδύει την εξωτερική επιφάνεια του σώματος, την εσωτερική επιφάνεια των κοιλοτήτων, την εξωτερική επιφάνεια διαφόρων οργάνων, τις κοιλότητες και τους αυλούς των κοίλων οργάνων και τέλος τους αυλούς των εκφορητικών πόρων των αδένων (1). Λόγω του ότι τα επιθήλια του σώματος προέρχονται και από τα τρία βλαστικά στρώματα έχουμε γένεση μεγάλου αριθμού καρκινωμάτων (επιθήλιο) και σαρκωμάτων (μεσέγχυμα).

2. Αρχές Βιολογίας Ιϊκών Συστημάτων

Εισαγωγικά

Οι ιοί προκαλώντας προσαρμοστικές και εξελικτικές γενετικές ανακατανομές στο ξενιστή τους συμβάλλουν αποφασιστικά στη μελέτη σύνθετων βιολογικών φαινομένων

Αναφορικά με τον καρκίνο υπάρχουν 2 ομάδες ιών:

- Οι ογκογόνοι ιοί, όπως HPV (Human papilloma virus), HBV (Hepatitis B virus), HCV (Hepatitis C virus), EBV (Ebstein-Barr), HHV-8 (Human herpesvirus-8) και άλλοι, που αν και είναι επιβαρυντικοί παράγοντες καρκινογένεσης, αφού η μόλυνσή τους αυξάνει ως και 1000 φορές την πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου, το ποσοστό των μολυσμένων ατόμων που αναπτύσσουν εν ζωή καρκίνο είναι μικρότερο από 1% περίπου.
- Οι μη ογκογόνοι ιοί, όπως οι κοινές γρίπες, η ομάδα των εντεροϊών και άλλοι, οι οποίοι δεν προκαλούν καρκίνο, φαίνεται να αναγνωρίζουν και να επιμολύνουν επιλεκτικά τα καρκινικά κύτταρα που λόγω της φύσεώς τους υπερεκφράζουν τους αντίστοιχους υποδοχείς.

Γενική Βιολογία ιών γρίπης

Οι ιοί γρίπης ανήκουν στην οικογένεια των ορθομυξοϊών και διακρίνονται σε τρεις αντιγονικούς τύπους Α, Β και C (2-4). Το γενετικό τους υλικό είναι μονόκλωνο RNA αρνητικής πολικότητας και είναι τεμαχισμένο σε οκτώ τμήματα, γεγονός που δικαιολογεί τον μεγάλο βαθμό ανασυνδυασμών που εμφανίζουν.

Από τους τρεις αντιγονικούς τύπους, ο τύπος Α θεωρείται ως ο πλέον μολυσματικός και ενοχοποιείται για όλες τις μέχρι σήμερα πανδημίες γρίπης. Ο τύπος Α προσβάλλει τον άνθρωπο, υδρόβια πτηνά, άλογα και άλλα θηλαστικά.

Ο τύπος Β μολύνει μόνο τον άνθρωπο, ενώ ο τύπος C διαφέρει γενετικά από τους άλλους τύπους γρίπης στο ότι μπορεί να περιέχει λιγότερα από 8 τμήματα RNA. Επιπλέον διαφέρει των τύπων Α και Β επειδή στερείται νευραμινιδάσης. Από ιατρικής πλευράς παρουσιάζει ελάχιστο σημασία και εμφανίζει υποκλινικά μόνο συμπτώματα κυρίως σε άτομα κάτω των 30 ετών(2-4).

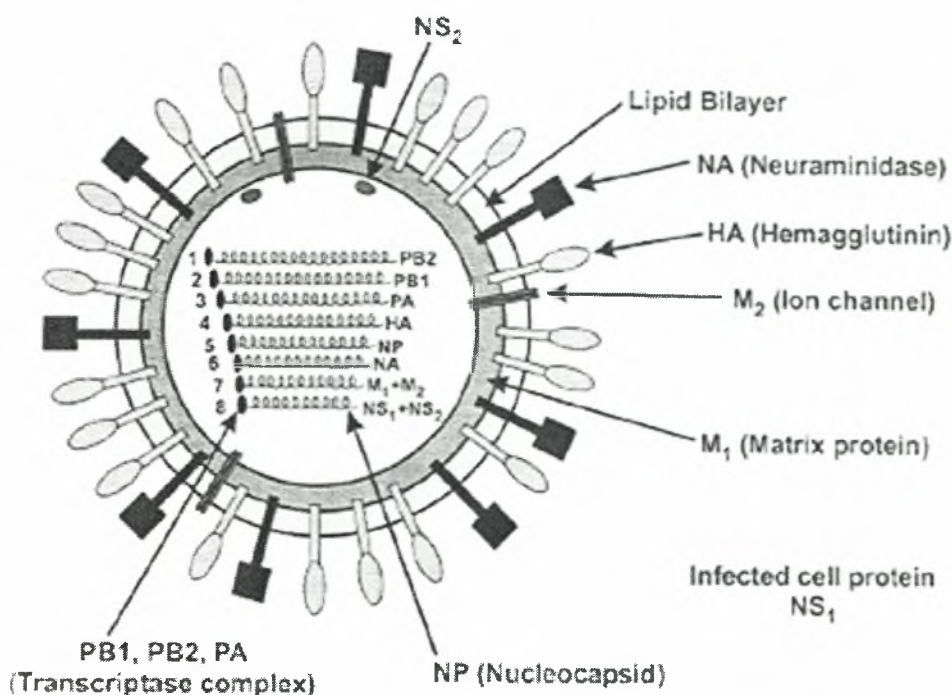
Επιδημιολογία γρίπης

Οι ιοί γρίπης εμφανίζουν χαρακτηριστικά εξελικτικά φαινόμενα μείζονος και ελάσσονος αντιγονικής μεταβολής. Η γρίπη Α διακρίνεται σε υπότυπους βάση αλλαγών στα επιφανειακά αντιγόνα αιμοσυγκολλητίνης (16 υπότυποι) και νευραμινιδάσης (9 υπότυποι). Από τους 16 συνολικά υποτύπους αιμοσυγκολλητίνης τον άνθρωπο μολύνουν ο H1N1, ο H3N2 και στο παρελθόν (μέχρι το 1968) ο H2N2 (εικόνα 1).

Η γρίπη Β παρουσιάζει μόνο έλασσον αντιγονική μεταβολή αιμοσυγκολλητίνης νευραμινιδάσης αλλά δεν παρουσιάζει υπότυπους. Σημειακές μεταλλαγές που συσσωρεύονται στα γονίδια της αιμοσυγκολλητίνης και της νευραμινιδάσης προκαλούν ετήσιες επιδημίες της νόσου (2-4).

Οι ιοί γρίπης του ανθρώπου μολύνουν κυρίως επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού συστήματος. Εκτός από τα πρωτογενή κύτταρα, τα

εμβρυοφόρα αυγά όρνιθας και τα πειραματόζωα, οι ιοί της γρίπης μολύνουν διάφορες κυτταρικές σειρές όπως από νεφρικά κύτταρα σκύλου (MDCK, Madin Darby Canine Kidney) και ανθρώπου ποικίλης ιστολογικής προέλευσης (HeLa, HepG2, MRC-5 και Vero). Οι ιοί γρίπης αναγνωρίζουν ειδικούς υποδοχείς στην επιφάνεια των κυττάρων ξενιστών in vivo και in vitro που περιέχουν σιαλικά οξέα (5). Ιική μόλυνση επιτυγχάνεται μέσω των αντιγόνων επιφανείας του ιού, την αιμοσυγκολλητίνη και την νευραμινιδάση. Από τους τρεις αντιγονικούς τύπους του ιού, ο B παρουσιάζει υψηλότερα ποσοστά μόλυνσης απ' ότι οι δύο άλλοι τύποι. Ο ιός δεν παρουσιάζει συνήθως έντονη κυτταροπαθογόνο δράση (CPE) in vitro και δεν λύει τα κύτταρα που μολύνει in vivo αλλά εξέρχεται από αυτά με εκβλάστηση (budding process)(5). Ανιχνεύεται με διάφορες εργαστηριακές μεθόδους όπως αιμοσυγκόλληση και ανοσοενζυμικό προσδιορισμό (ELISA).

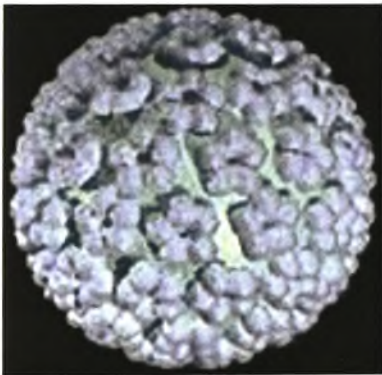


Εικόνα 1. Ιός γρίπης με εσωτερικό νουκλεοκαψίδιο ελικοειδούς συμμετρίας, καλυπτόμενο από έλυτρο που φέρει δύο τύπους προσεκβολών : τις αιμοσυγκολλητίνες και τις νευραμινιδάσες.

Γενικές ιδιότητες ογκογόνων ιών HPV (human papillomaviruses, ιοί θηλωμάτων του ανθρώπου)

Οι ογκογόνοι ιοί HPV ανήκουν στην οικογένεια Papovaviridae (Papovav) φέρουν δίκλωνο κυκλικό DNA 8000 ζευγών βάσεων και έχουν μέχρι σήμερα απομονωθεί περί τα 150 διαφορετικά στελέχη. Το γένωμά τους φέρει την περιοχή L (Late) που είναι υπεύθυνη για τις πρωτεΐνες της κάψας και την περιοχή E (early) που περιέχει τις πρωτεΐνες για τον πολλαπλασιασμό του ιού(6).

Η ενσωμάτωση του ιϊκού DNA στο DNA του κυττάρου ξενιστή γίνεται μέσω των γονιδιακών περιοχών E1 και E2. Το δυναμικό ογκογένεσης του ιού HPV εξαρτάται από τα προϊόντα των πρώιμων γονιδίων E6 και E7. Η πρωτεΐνη του E6 συνδέεται με το προϊόν του ογκοκατασταλτικού κυτταρικού γονιδίου p53 και το εξουδετερώνει ενώ η E7 συνδέεται με την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος (Rb) του κυττάρου και απελευθερώνει τους παράγοντες μεταγραφής, που φυσιολογικά ελέγχει το Rb (εικόνα 2) (6).



Εικόνα 2. Ιός HPV

Γενικά οι ιοί HPV προσβάλλουν τα επιθηλιακά κύτταρα του δέρματος και των βλεννογόνων προκαλώντας δερματικές μυρμηγκίες, γεννητικά θηλώματα, θηλώματα της αναπνευστικής οδού, δυσπλασίες και καρκίνο του τραχήλου της μήτρας.

3. Αρχές Κυτταρολογίας

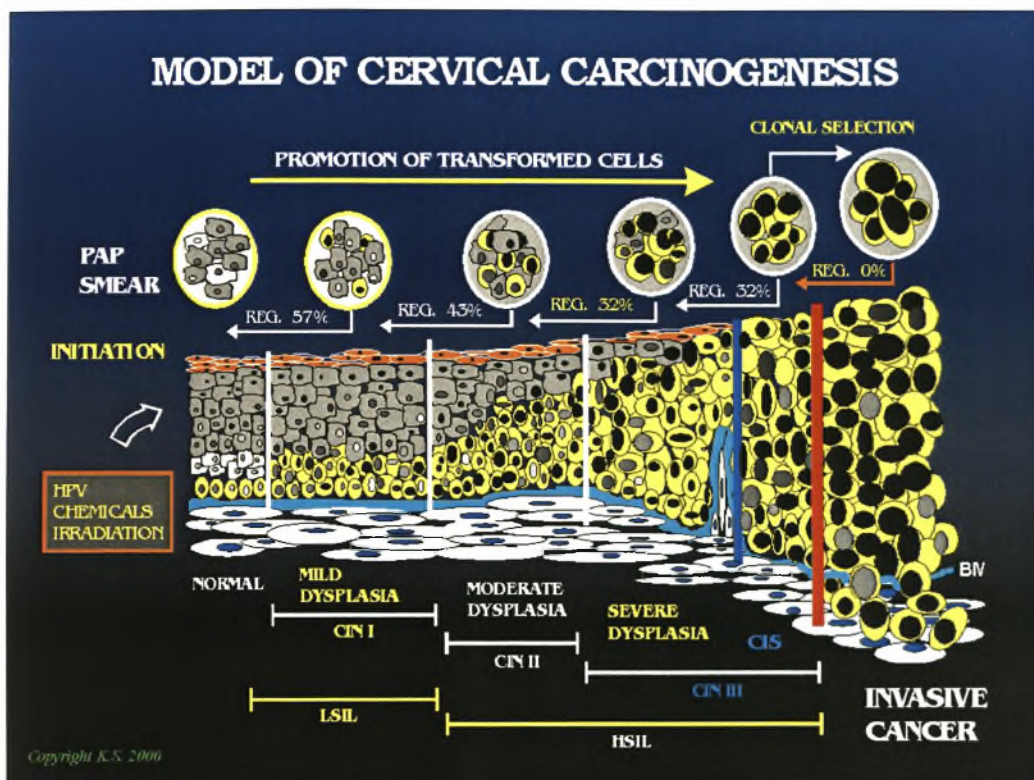
HPV και δυσπλασία του τραχήλου της μήτρας (τραχηλική ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία)

Οι δυσπλασίες αποτελούν ένα φάσμα ανωμαλιών του τραχηλικού επιθηλίου με προοδευτική εξέλιξη, που συχνά προηγούνται της ανάπτυξης καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Ο τράχηλος της μήτρας αποτελεί τη συχνότερη εντόπιση λοίμωξης από τους ιούς HPV. Ειδικότερα οι ιοί HPV προσβάλλουν τα κύτταρα της βασικής στιβάδας του πλακώδους επιθηλίου. Τα μεταπλαστικά κύτταρα φαίνεται να είναι ο κύριος στόχος της λοίμωξης, γιατί τα κύτταρα αυτά βρίσκονται σε κατάσταση ενεργού πολλαπλασιασμού και είναι σχετικά πιο επιδεκτικά στην επίδραση του εισερχόμενου ιού. Ακόμη ο ιός είναι δυνατόν να απομονωθεί σε κύτταρα του αδενοκαρκινώματος του τραχήλου.

Οι 60 περίπου τύποι HPV που προσβάλλουν το γενετικό σύστημα του ανθρώπου, κατατάσσονται σε υψηλού κινδύνου για την πρόοδο της ενδοεπιθηλιακής βλάβης σε διηθητικό καρκίνο όπως οι τύποι 16, 18, 31, 33, 35 και άλλοι, σε χαμηλού κινδύνου 6, 11, 42, 43 και άλλοι, που απομονώνονται συνήθως από οξυτενή κονδυλώματα και σε απροσδιόριστης επικινδυνότητας στελέχη. Οι γονότυποι HPV 16 και 18 ανιχνεύονται στην πλειονότητα των περιπτώσεων καρκίνου του τραχήλου, γεγονός που καταδεικνύει το ογκογόνο τους δυναμικό(7,8).

Οι δυσπλασίες όπως αναφέρθηκε, είναι αλλοιώσεις του επιθηλίου που προηγούνται του καρκίνου. Όταν εντοπίζονται στο πλακώδες επιθήλιο ονομάζονται χαμηλού βαθμού (Low Grade Squamous Intraepithelial Lesion LGSIL) και περιλαμβάνουν τις αλλοιώσεις από τον HPV και την χαμηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία (CIN1) και υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακή αλλοίωση (High Grade Squamous Intraepithelial Lesion, HGSIL), που περιλαμβάνει μέτριου και έντονου βαθμού ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία ή καρκίνωμα in situ (CIN2 και CIN3). Εικόνα 3. Ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία του αδενικού επιθηλίου του τραχήλου της μήτρας εκδηλώνεται στο καλυπτικό επιθήλιο και τα αδένια (Cervical Intraepithelial Glandular Neoplasia, CIGN) με ανάλογο βαθμό δυσπλασίας με αυτόν του πλακώδους επιθηλίου.

Το στέλεχος του ιού του ανθρώπινου θηλώματος που ενοχοποιείται για τη νεοπλασία αυτή είναι το HPV-18 (9-11).



Εικόνα 3. Στάδια τραχηλικής καρκινογένεσης, κυτταρολογικό-ιστολογικό επίπεδο

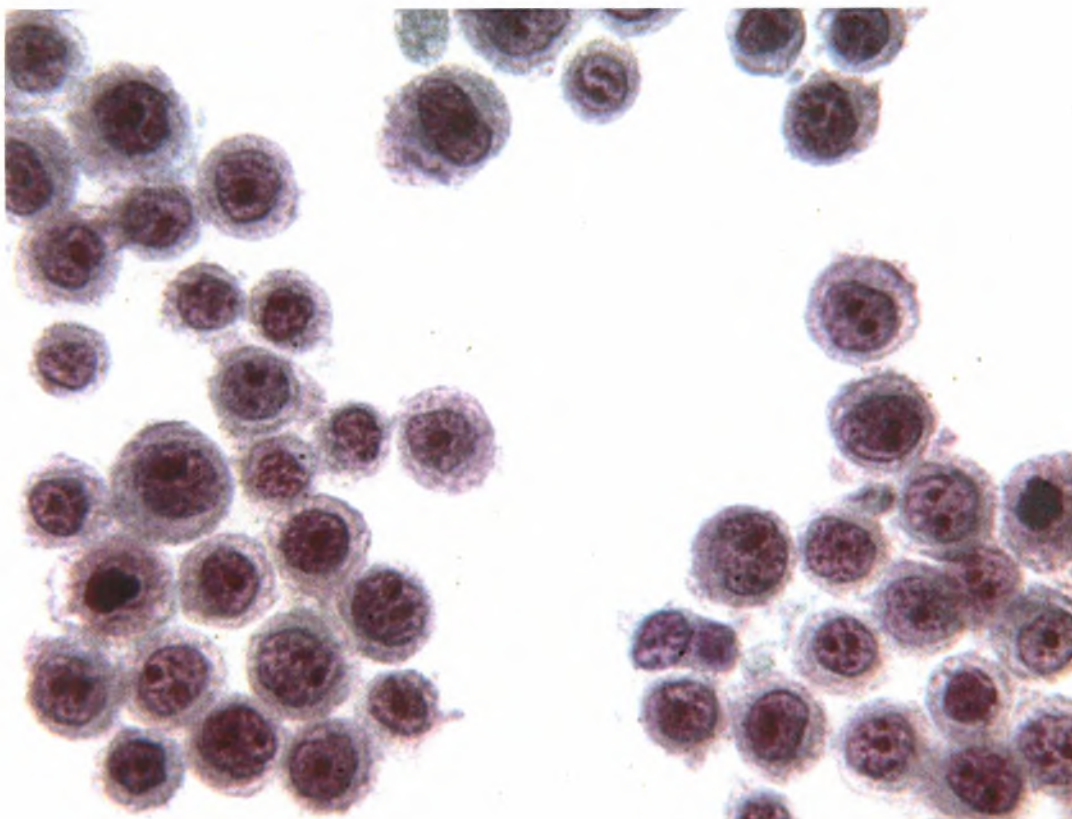
4. Κυτταρικές σειρές

Οι κυτταρικές σειρές χρησιμοποιούνται ευρέως στην βιοϊατρική έρευνα για τη μελέτη της απόκρισης του κυττάρου σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα και σαν ξενιστές ιικών συστημάτων.

Η κυτταρική σειρά HeLa είναι από τις πρώτες που αναπτύχθηκαν το 1951 και ονομάστηκαν από τα αρχικά της Henrietta Lacks από τη Βαλτιμόρη των ΗΠΑ, που πέθανε σε ηλικία 31 ετών από καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Όπως διαπιστώθηκε, η σειρά προήλθε από κύτταρα τραχήλου μήτρας μολυσμένα με το στέλεχος HPV-18, που υπέστησαν καρκινική μετατροπή και αθανатоποιήθηκαν και φέρουν σταθερά ενσωματωμένα στο

γενετικό τους υλικό 20 αντίγραφα του ιού. Έρευνες κυττάρων HeLa συνέβαλαν στην κατανόηση βασικών κυτταρικών μηχανισμών(12).

Τα κύτταρα HeLa εμφανίζουν όλα τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των κακοήθων κυττάρων. Οι πυρήνες τους είναι εξαιρετικά υπερχρωματικοί και μεγάλοι. Ο λόγος πυρήνα προς κυτταρόπλασμα μπορεί να προσεγγίζει το 1/1 αντί του φυσιολογικού 1/4 έως 1/6. Η χρωματίνη είναι αδρή και σχηματίζει σβώλους και τα πυρήνια μπορεί να φθάνουν σε εκπληκτικό μέγεθος (εικόνα 4). Η άτυπη μορφολογία των κυττάρων HeLa συνδέεται στενά με την έκτοπη υπερέκφραση ποικίλων αντιγονικών συστημάτων και ιικών υποδοχέων, όπως έναντι των ιών γρίπης, στην επιφάνειά τους. Συνεπώς τα κύτταρα HeLa, όπως άλλωστε και τα περισσότερα καρκινικά κύτταρα, αποτελούν πρωτεύοντες στόχους και ξενιστές των περισσότερων τύπων ιών γεγονός που τα διαφοροποιεί από τα πρωτογενή τους ομόλογα.



Εικόνα 4. Κύτταρα HeLa, χρώση pap x 600

5. Καρκίνος

Ο καρκίνος αποτελεί τη δεύτερη κύρια αιτία θανάτου μετά τις καρδιαγγειακές παθήσεις. Εκδηλώνεται σε προχωρημένες κυρίως ηλικιακές ομάδες, σαν το τελικό αποτέλεσμα της κλωνικής ανάπτυξης ενός πληθυσμού κυττάρων, τα οποία έχουν υποστεί έναν αριθμό μη θανάσιμων γενετικών μεταβολών, οι οποίες προάγουν τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό ή την αναστολή του κυτταρικού θανάτου(13). Οι γενετικές μεταβολές που επηρεάζουν τα ογκογονίδια και τα ογκοκατασταλτικά γονίδια, τις δύο κατηγορίες γονιδίων κλειδιών για το σχηματισμό του καρκίνου, αφορούν τις παρακάτω τέσσερις βασικές κατηγορίες: 1) αλλαγές στην αλληλουχία, 2) αλλαγές στον αριθμό χρωμοσωμάτων, 3) χρωμοσωμική αντιμετάθεση και 4) γονιδιακή επαγωγή. Οι διάφορες μορφές του καρκίνου είναι προϊόντα μεταλλάξεων που αποδεσμεύουν το κύτταρο από τους συνήθεις μηχανισμούς ελέγχου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της κυτταρικής επιβίωσης (14). Ένα κύτταρο του σώματος μεταλλάσσεται με μια σειρά τυχαίων συμβάντων και αποκτά την ικανότητα να πολλαπλασιάζεται χωρίς τους φυσιολογικούς περιορισμούς, ενεργοποιώντας γονίδια πολλαπλασιασμού (πρωτο-ογκογονίδια) ενώ παράλληλα αδρανοποιεί γονίδια αντιπολλαπλασιασμού (ογκοκατασταλτικά γονίδια). Οι απόγονοί του κληρονομούν τις μεταλλάξεις αυτές και αναπτύσσουν έναν όγκο που μπορεί να αυξάνει απεριόριστα.

Ακόμα και σ' ένα περιβάλλον απαλλαγμένο από βλαπτικούς μεταλλαξογόνους παράγοντες (καπνό, ραδιενέργεια κλπ), μεταλλάξεις συμβαίνουν αυθόρμητα με συχνότητα περίπου 10^{-6} μεταλλάξεις ανά γονίδιο ανά κυτταρική διαίρεση, μια τιμή που καθορίζεται από τους βασικούς εγγενείς περιορισμούς της ακρίβειας της αντιγραφής και της επιδιόρθωσης του DNA. Για να μετατραπεί ένα φυσιολογικό κύτταρο σε καρκινικό και να αποκτήσει όλες τις απαιτούμενες ιδιότητες πρέπει να υποστεί τουλάχιστον πέντε ή έξι ανεξάρτητες μεταλλάξεις, οι οποίες συμβαίνουν διαδοχικά και όχι ταυτόχρονα, συνήθως μέσα σε μια χρονική περίοδο πολλών ετών. Τυπικά ο καρκίνος είναι νόσημα των ηλικιωμένων, επειδή απαιτείται χρόνος για τη συσσώρευση ικανού αριθμού αλλαγών. Σποραδικά βέβαια συναντά κανείς ανθρώπους οι οποίοι έχουν κληρονομήσει μια μετάλλαξη της γαμετικής σειράς σ' ένα

ογκοκατασταλτικό γονίδιο ή ένα ογκογονίδιο. Στους ανθρώπους αυτούς, ο αριθμός των επιπρόσθετων μεταλλάξεων που απαιτούνται για την ανάπτυξη όγκου είναι μικρότερος και το νόσημα εμφανίζεται με μεγαλύτερη συχνότητα (13-16). Μέχρι σήμερα παρά τις σύγχρονες συνδυασμένες θεραπείες που εφαρμόζονται (χειρουργικές, ακτινο-χημειοθεραπευτικές) η θνησιμότητα είναι υψηλή και ο καρκίνος παραμένει ανίατο νόσημα.

Δεδομένου ότι οι διάφοροι τύποι καρκίνου οφείλονται σε λάθος γενετική εγγραφή, ο ιδανικός τρόπος αντιμετώπισής τους θα ήταν η επιδιόρθωση του σφάλματος που τους προκάλεσε σε επίπεδο γενετικού υλικού. Στην προσπάθεια θεμελίωσης βάσιμων προσδοκιών ριζικής αντιμετώπισης του καρκίνου απαραίτητη προϋπόθεση είναι η κατανόηση σε βάθος των μηχανισμών ρύθμισης της έκφρασης του γενετικού υλικού, και των προγραμμάτων κυτταρικής διαφοροποίησης και αποκωδικοποίησης του γενικότερου προγράμματος της ζωής.

Οι ιοί προκαλούν προσαρμοστικές εξελικτικές μεταβολές στο γενετικό υλικό των ξενιστών τους. Ενώ η διαδοχή των γεγονότων που οδηγούν κάποια κύτταρα μετά από μόλυνση με ογκογόνο ιό σε κακοήθεια έχουν μελετηθεί ιδιαίτερα, πολύ λίγα είναι γνωστά για την επίδραση των μη ογκογόνων ιών στα ήδη καρκινικά κύτταρα.

6. Σκοπός της παρούσας μελέτης

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε το αποτέλεσμα της μόλυνσης αδενοεπιθηλιακών κυττάρων καρκίνου τραχήλου μήτρας HeLa με μη ογκογόνους ιούς γρίπης τύπου B & A, στα πλαίσια μίας νέας προσέγγισης για την αποτελεσματικότερη αντιμετώπιση του καρκίνου με βιολογικά μέσα. Προτάθηκε μηχανισμός προσαρμοστικής αντικατάστασης μη απαραίτητης γονιδιακής έκφρασης για την ερμηνεία των ευρημάτων εξάλειψης ή διόρθωσης δεκτικών καρκινικών κυττάρων από κατάλληλη μη-ογκογόνο ιϊκή λοίμωξη στο απλό σύστημα μοντέλο κυττάρου – ιού που μελετήθηκε.

Ειδικότεροι στόχοι της μελέτης:

1. Περιγραφή του συστήματος μοντέλου ιού-κυττάρου
2. Απάντηση καρκινικών κυττάρων στην ιϊκή μόλυνση:
απόπτωση, κυτταρικός θάνατος
επιβίωση – προσαρμογή
3. Μορφολογική ανάλυση κυτταροφαινότυπου
3. Ανοσοκυτταροχημική ανάλυση της έκφρασης επιλεγμένων αντιγόνων κυτταρικού κύκλου και απόπτωσης
4. Μοριακή ανάλυση επιλεγμένων γονιδιακών συστημάτων απαραίτητων και μη για την κυτταρική επιβίωση
5. Προτεινόμενοι μηχανισμοί ερμηνείας των ευρημάτων
6. Συμπεράσματα που απορρέουν από τους προτεινόμενους μηχανισμούς. Πιθανές κλινικές εφαρμογές

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Οι ιοί γρίπης εμφανίζουν τροπισμό στην κυτταρική σειρά HeLa, την οποία και επιμολύνουν μέσω πρόσδεσης σε συγκεκριμένους υποδοχείς της επιφάνειας του κυττάρου που περιέχουν σιαλικό οξύ(17,18). Κύτταρα HeLa μολύνθηκαν με ιό γρίπης τύπου Β και μελετήθηκαν οι φαινοτυπικές αλλαγές των κυττάρων που επέζησαν από την ιϊκή μόλυνση.

Πρωτόκολλο καλλιέργειας των κυττάρων HeLa

Η καλλιέργεια κυττάρων HeLa περιλαμβάνει έλεγχο του μεγέθους της κυτταρικής μονοστοιβάδας (cellular monolayer) και ανανέωση των υλικών καλλιέργειας κάθε 2 με 3 ημέρες. Το υλικό καλλιέργειας περιέχει διάφορα θρεπτικά υλικά για το κύτταρο όπως αμινοξέα, γλυκόζη, βιταμίνες και άλλα ανόργανα συστατικά για τη ρύθμιση του ΡΗ καθώς και αυξητικούς παράγοντες ορού εμβρύου μόσχου για την ενίσχυση των μηχανισμών κυτταρικής διαίρεσης. Τα κύτταρα προσαρτώνται σε στερεό υπόστρωμα και αναπτύσσονται σε κατάλληλα δοχεία κυτταροκαλλιέργειας που τοποθετούνται σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C σε 5% CO₂. Η μέτρηση των κυττάρων γίνεται με τη πλάκα Neubauer και η βιωσιμότητά τους ελέγχεται με απόρριψη της χρωστικής trypan blue.

Απομόνωση ιών γρίπης σε κυτταροκαλλιέργεια

Υλικά: κύτταρα HeLa σε φλάσκες, θρεπτικό υλικό MEM, ορός (10%), διάλυμα Hanks.

Πρωτόκολλο

1. Αφαιρούμε προσεκτικά το υλικό από τις φλάσκες και ξεπλένουμε δύο φορές τα κύτταρα με 2ml διάλυμα Hanks τη φορά και αφαιρούμε το υπερκείμενο διάλυμα.
2. Εμβολιάζουμε 75 µl υπερκείμενο που περιέχει ιό γνωστού τίτλου.

3. Επωάζουμε τα κύτταρα σε θερμοκρασία εργαστηρίου μακριά από φώς για 30 – 45 λεπτά. Προσθέτουμε 2 ml MEM-D (Seromed) με tricine (37°C)
4. Επωάζουμε τα κύτταρα στους 35°C.
5. Κατόπιν 48hr επώασης, στο υλικό καλλιέργειας γίνεται δοκιμασία αιμοσυγκόλλησης με 0,5% ερυθρά για την τιτλοποίηση της αιμοσυγκολλητίνης του ιού.

Ιϊκή μόλυνση κυττάρων και τιτλοποίηση ιού

Τα κύτταρα διαμοιράστηκαν σε ίσα μέρη περίπου 50×10^6 και ενοφθαλμίστηκαν με 75ml πρωτογενούς ιϊκού υλικού (πέρασμα 1), 75ml ιϊκού υπερκείμενου από το πέρασμα 1 (πέρασμα 2), 75ml ιϊκού υπερκείμενου από το πέρασμα 2 (πέρασμα 3), 75 ml ιϊκού υπερκείμενου από το πέρασμα 3 (πέρασμα 4) και 75 ml ιϊκού υπερκείμενου από το πέρασμα 4 (πέρασμα 5). Μη μολυσμένα κύτταρα HeLa χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες σε κάθε πέρασμα. Όλες οι ενοφθαλμήσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν. Ο ιϊκός τίτλος αυξάνει σταδιακά από το πέρασμα 1 στο πέρασμα 5. Το ιϊκό στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε ήταν αντιγονικά όμοιο με το πρότυπο στέλεχος B/Panama/45/90.

Η μόλυνση των κυττάρων γίνεται σε μονάδες αιμοσυγκολλητίνης (HA units) με την μέθοδο της αιμοσυγκόλλησης. Χαμηλός, μεσαίος και υψηλός τίτλος HA θεωρείται ο < 32, ο 128-256 και ο >1280, αντίστοιχα. Η τιτλοποίηση του ιού γίνεται πριν και μετά την μόλυνση του κυττάρου για να διαπιστωθεί η μολυσματική ικανότητα του ιού. Επίσης, ο τίτλος του ιού μπορεί να εκφραστεί σε μονάδες TCID (tissue culture infectious dose) και με τη μέθοδο πλακών λύσης σε κύτταρα (plaque assay).

Μέθοδος αιμοσυγκόλλησης - Τίτλοποίηση του αντιγόνου HA ιών γρίπης.

Πρωτόκολλο

1. Τα ερυθρά πλένονται 3 φορές σε 1X PBS κατόπιν γίνεται η αραίωση 0,5% σε 1 X PBS.
2. Οι αραιώσεις γίνονται σε πλάκες U (100μl υπερκείμενο καλλιέργειας και 50 μl PBS)
3. Προσθήκη 50 μl ερυθρών, επώαση 30 min σε θερμοκρασία εργαστηρίου.
4. Εξακρίβωση του τίτλου της HA.

Επεξεργασία υλικού

Τα κύτταρα HeLa που επιβίωσαν 7 μέρες μετά τα μόλυνση μεταφέρθηκαν σε 20 ml ειδικού μονιμοποιητικού υλικού. Η επεξεργασία του υλικού έγινε με την αυτοματοποιημένη μέθοδο Κυτταρολογίας υγρής φάσης (Thin-Prep). Η μέθοδος αποδίδει κυτταρολογικό δείγμα υψηλής ποιότητας κατάλληλο για ανοσοκυτταροχημικές εφαρμογές. Ποσότητα 1 ml από το κάθε δείγμα τοποθετήθηκε στο φιαλίδιο του Thin-Prep το οποίο περιέχει 20 ml μονιμοποιητικού υγρού που έχει σαν βάση την αλκοόλη.

Το εναιώρημα των κυττάρων διαχωρίζεται βαθμιαία και δημιουργείται ένας ομοιογενής πληθυσμός. Στη συνέχεια το φιαλίδιο τοποθετείται σε ειδικό μηχανήμα επεξεργασίας το οποίο επιλέγει ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα κυττάρων ,το συλλέγει με ένα φίλτρο μιας χρήσεως και το επιστρώνει σε ένα αντικειμενοφόρο πλακίδιο για να χρωσθεί στη συνέχεια. Τα κύτταρα με την τεχνική αυτή επιστρώνονται σε μια μονοεπίπεδη στοιβάδα, σε σαφώς αφοριζόμενη κυκλική περιοχή του πλακιδίου , ενώ συγχρόνως το υπόστρωμα απαλλάσσεται από την περίσσεια βλέννης κ.λ.π έτσι ώστε το τελικό επίχρισμα να είναι καθαρό. Ακολούθησε χρώση Παπανικολάου.

Χρώση Παπανικολάου -Τεχνική.

Τα αντιδραστήρια και οι χρωστικές Παπανικολάου φέρονται έτοιμα στο εμπόριο. Τα επιχρίσματα μονιμοποιούνται σε αιθυλική αλκοόλη 96%

1. Νερό βρύσης καλή έκπλυση 50 δευτερόλεπτα.
2. Αιματοξυλίνη ίδιος χρόνος.
3. Νερό βρύσης καλή έκπλυση (2 φορές)
4. Απόλυτη αλκοόλη 100% εμβαπτήσεις
5. Orange 50 δευτερόλεπτα
6. Αλκοόλη 96% (2 φορές)
7. Eosin (ΕΑ) 50 δευτερόλεπτα
8. Αλκοόλη 96%
9. Αλκοόλη 100%
10. Ξυλόλη
11. Κάλυψη (βάλσαμο και καλυπτρίδα)
12. Στέγνωμα

Χρώσεις ανοσοκυτταροχημείας με μονοκλωνικά αντισώματα

Η τεχνική της χρώσης που ακολουθήθηκε με τη μέθοδο της αβιδίνης-βιοτίνης-υπεροξειδάσης περιλάμβανε τα εξής στάδια για τα μονοκλωνικά αντισώματα κασπάση 8 και 3, κυκλίνη Ε, Ki-67 και p53:

Προετοιμασία δείγματος

Το δείγμα μετά την επίστρωση και τη μονιμοποίηση, τοποθετείται σε προθερμασμένο κιτρικό διάλυμα ΡΗ 7,3 και θερμαίνεται για 20 min στα 350 W. Ψύχεται επί 5-20 min σε θερμοκρασία δωματίου, ξεπλένεται επί 5 min σε τρεχούμενο νερό βρύσης και τοποθετείται σε απεσταγμένο νερό για 5 min. Κατόπιν ξεκινά η διαδικασία χρώσης, στο αυτόματο μηχάνημα ανοσοχρώσης της Ventana ακολουθώντας τα εξής στάδια:

1. Έκπλυση με ρυθμιστικό διάλυμα ΑΡΚ (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφόρου -PBS + άλλες ουσίες).

2. Επώαση με αναστολέα (3% H₂O₂) για 4 min. Δέσμευση της ενδογενούς υπεροξειδάσης και δέσμευση μη ειδικών αντιγονικών θέσεων με μη ευαισθητοποιημένο ορό (normal serum)
3. Έκπλυση με APK ρυθμιστικό διάλυμα.
4. Επώαση με το μονοκλωνικό αντίσωμα (κασπάση 3 και 8, κυκλίνη E, Ki-67, p53) σε αραιώση 1:25 για 32 min.
5. Έκπλυση με APK ρυθμιστικό διάλυμα.
6. Επώαση με μονιμοποιητικό διάλυμα γλουταραλδεύδης 0,2%
7. Έκπλυση με APK ρυθμιστικό διάλυμα.
8. Επώαση με βιοτινυλιωμένο δεύτερο αντίσωμα έναντι Ig ανοσοσφαιρινών ποντικού και κουνελιού (ready to use) για 8 min.
9. Έκπλυση με APK ρυθμιστικό διάλυμα.
10. Επώαση με σύμπλεγμα αβιδίνης – βιοτίνης –υπεροξειδάσης για 8 min.
11. Έκπλυση με APK ρυθμιστικό διάλυμα.
12. Επώαση με διάλυμα διαμινοβενζιδίνης και υπεροξειδίου της διαμινοβενζιδίνης για 8 min.
13. Έκπλυση με APK ρυθμιστικό διάλυμα.
14. Επώαση με άλατα χαλκού για 4min (αύξηση της χρωστικής αντίδρασης).
15. Έκπλυση με APK ρυθμιστικό διάλυμα.
16. Επώαση με αιματοξυλίνη για 4 min
17. Έκπλυση με APK ρυθμιστικό διάλυμα.
18. Επώαση με αντιδραστήριο που διαφοροποιεί την αιματοξυλίνη (Bluing Reagent) για 4 min.
19. Έκπλυση με APK ρυθμιστικό διάλυμα
20. Τα πλακίδια μεταφέρονται από το μηχάνημα σε διάλυμα νερού βρύσης και υγρού σαπουνιού για min. Ακολουθεί έκπλυση σε τρεχούμενο νερό βρύσης για 5min και σε διαδοχικά διαλύματα αλκοόλης 70%, 96%, 100% για 5min σε κάθε διάλυμα. Ακολουθεί διαύγαση με ξυλόλη και κάλυψη του δείγματος με καλυπτρίδα.

Σε κάθε στάδιο επώασης εκτός από το κατά σειρά αντιδραστήριο τοποθετείται στο πλακίδιο ειδικό λάδι, που δεν επιτρέπει την εξάτμιση του

εκάστοτε αντιδραστήριου (liquid coverslip), γι' αυτό και το πλύσιμο με σαπούνι. Η όλη διαδικασία της χρώσης στο μηχάνημα διαρκεί περίπου 1hr και 30min σε θερμοκρασία 41°C και θερμοκρασία πλακιδίου 37°C.

Τα δείγματα είναι έτοιμα για αξιολόγηση στο οπτικό μικροσκόπιο. Να σημειωθεί ότι για τη διεκπεραίωση της ανωτέρω διαδικασίας της ανοσοκυτταροχημικής χρώσης για τους υποδοχείς των αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν απαιτήθηκε ακριβής τήρηση των χρόνων και των αραιώσεων των διαλυμάτων για αξιόπιστα αποτελέσματα.

Μέθοδος απομόνωσης ολικού RNA από κύτταρα – Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA)

Χρησιμοποιήθηκαν ίσες ποσότητες ολικού RNA για την παρασκευή συμπληρωματικού DNA (cDNA) με το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση του ιού της μυελοβλάστωσης των πτηνών (AMVRT) (19-21). Οι αντιδράσεις cDNA που έγιναν απουσία AMVRT χρησιμοποιήθηκαν σαν αρνητικοί μάρτυρες της παρουσίας προσμίξεων γενωμικού DNA στα παρασκευάσματα RNA που μελετήθηκαν. Αξιολογήθηκαν τα επίπεδα cDNA του HPV και της α υπομονάδας του υποδοχέα του ρετινοϊκού οξέος (RARα) σαν δείκτες μη απαραίτητης γονιδιακής έκφρασης για την κυτταρική επιβίωση και τα επίπεδα cDNA του γλυκολυτικού ενζύμου glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) σαν απαραίτητος δείκτης κυτταρικής επιβίωσης(22,23).

Μελέτη της απόκρισης τριών γονιδιακών συστημάτων του κυττάρου σε μη ογκογόνο ιϊκό στρες με τη τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR)

Οι εκκινητές ανίχνευσης του HPV αναφέρονται βιβλιογραφικά ως συστήματα MY09/11 και PGMV και παρουσιάζονται στους Πίνακες 1 & 2. Στον Πίνακα 3 έχουν καταχωρηθεί τα εκκινητικά ζεύγη ανίχνευσης του υποδοχέα της α υπομονάδας του ρετινοϊκού οξέος (RARα) και του ενζύμου της γλυκόλυσης (GAPDH).

Οι αντιδράσεις έγιναν σε τελικό όγκο 20μλ (15λ H₂O, 1λ από κάθε εκκινητικό μίγμα και 2λ cDNA). Τα αντιδραστήρια της PCR ήταν προϊόντα της εταιρίας Amersham Biosciences.

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για HPV, RARα και GAPDH διενεργήθηκε με τα εκκινητικά συστήματα που αναγράφονται στους Πίνακες 1, 2 & 3 σύμφωνα με τις ακόλουθες συνθήκες:

- HPV:
- αρχική αποδιάταξη: 95⁰C 1min
 - κυρίως αντίδραση: διεξάγεται σε 35 κύκλους.
 - Κάθε κύκλος περιλαμβάνει:
 - φάση αποδιάταξης: 94⁰C 1min
 - φάση σύνδεσης εκκινητών: 55⁰C 1min
 - φάση επέκτασης μορίων DNA 72⁰C 1min
 - τελική επέκταση συντεθειμένων μορίων DNA: 72⁰C 10min

- RARα: - αρχική αποδιάταξη: 94⁰C 5min
- κυρίως αντίδραση: διεξάγεται σε 40 κύκλους.
 - Κάθε κύκλος περιλαμβάνει:
 - φάση αποδιάταξης: 94⁰C 1min
 - φάση σύνδεσης εκκινητών: 53⁰C 1min
 - φάση επέκτασης μορίων DNA 72⁰C 1min
 - τελική επέκταση συντεθειμένων μορίων DNA: 72⁰C 10min

- και GAPDH: - αρχική αποδιάταξη: 95⁰C, 5min
- κυρίως αντίδραση: διεξάγεται σε 30 κύκλους.
 - Κάθε κύκλος περιλαμβάνει:
 - φάση αποδιάταξης: 95⁰C, 30"
 - φάση σύνδεσης εκκινητών: 55⁰C, 30"
 - φάση επέκτασης μορίων DNA: 72⁰C, 30"
 - τελική επέκταση συντεθειμένων μορίων DNA: 72⁰C, 10min

ΠΙΝΑΚΑΣ 1. MY09/11 sequence alignments^a

Sequence name and HPV type	Sequence (5'-3')							
MY09	CGT	CCM	ARR	GGA	WAC	TGA	TC	
HPV-6	...	...	...	...	...	...	..	
HPV-11	...	...	...	...	...	...	..	
HPV-16	...	..T	...	...	...	...	..	
HPV-18	...	...	...	...	..T	...	..	
HPV-26	..C	..T	..T	...	..T	...	..	
HPV-31	..A	...	..T	...	...	...	..	
HPV-33	...	...	...	...	...	...	..	
HPV-35	..G	...	..C	...	...	...	..	
HPV-39	...	...	...	..G	..T	...	..	
HPV-40	...	..T	..T	...	..T	...	..	
HPV-42	..TA	..T	...	...	..T	...	..	
HPV-45	..A	...	...	...	..T	...	..	
HPV-52	..TA	..T	...	...	...	...	..	
HPV-53	..TG	...	...	...	...	...	..	
HPV-55	..TA	...	...	...	..T	...	..	
HPV-56	..TA	...	..T	...	..T	...	..	
HPV-58	...	...	...	...	...	...	..	
HPV-59	...	...	...	...	...	...	..	
MY11	GCM	CAG	GGW	CAT	AAY	AAT	GG	
HPV-6	...	...	...	...	...	...	..	
HPV-11	..T	...	...	...	...	...	..	
HPV-16	...	...	..C	..C	...	...	..	
HPV-18	...	...	...	...	...	...	..	
HPV-26	...	...	...	...	...	...	..	
HPV-31	..T	...	...	..C	...	...	..	
HPV-33	...	..A	...	...	...	...	..	
HPV-35	...	..S	..C	...	...	...	..	
HPV-39	...	...	..C	..C	...	...	..	
HPV-40	...	...	..C	...	...	...	..	
HPV-42	...	..A	...	..C	...	...	..	
HPV-45	...	...	..C	...	...	...	..	
HPV-52	..G	...	..C	..C	...	...	..	
HPV-53	...	...	...	...	...	...	..	
HPV-55	..G	...	..C	..C	...	...	..	
HPV-56	...	..A	..C	...	...	...	..	
HPV-58	...	..A	...	...	...	...	..	
HPV-59	..T	...	...	TTA	...	...	..	

^a The primer sequences are in boldface type with the corresponding HPV sequence alignments underneath. Nucleotide homology is indicated with a period, and mismatches are indicated with the nucleotide change in the corresponding sequence. The degenerate base code is as follows: M = A or C, W = A or T, Y = C or T, and R = A or G.

Πίνακας 2. PGMY primer sequences

Primer designation	Primer sequence (5'-3')
PGMY11-A	GCA CAG GGA CAT AAC AAT GG
PGMY11-B	GCG CAG GGC CAC AAT AAT GG
PGMY11-C	GCA CAG GGA CAT AAT AAT GG
PGMY11-D	GCC CAG GGC CAC AAC AAT GG
PGMY11-E	GCT CAG GGT TTA AAC AAT GG
PGMY09-F	CGT CCC AAA GGA AAC TGA TC
PGMY09-G	CGA CCT AAA GGA AAC TGA TC
PGMY09-H	CGT CCA AAA GGA AAC TGA TC
PGMY09-I ^a	G CCA AGG GGA AAC TGA TC
PGMY09-J	CGT CCC AAA GGA TAC TGA TC
PGMY09-K	CGT CCA AGG GGA TAC TGA TC
PGMY09-L	CGA CCT AAA GGG AAT TGA TC
PGMY09-M	CGA CCT AGT GGA AAT TGA TC
PGMY09-N	CGA CCA AGG GGA TAT TGA TC
PGMY09-P ^a	G CCC AAC GGA AAC TGA TC
PGMY09-Q	CGA CCC AAG GGA AAC TGG TC
PGMY09-R	CGT CCT AAA GGA AAC TGG TC
HMB01 ^b	GCG ACC CAA TGC AAA TTG GT

^a PGMY09-I and PGMY09-P are 18 bp in length. The first two 5' bases were deleted to reduce the significant internal secondary structure of the oligonucleotide.

^b HMB01 is shifted 3' from the downstream primer region of the other HPV genotypes to avoid secondary structure formation and internal priming.

Πίνακας 3. Άλλα εκκινητικά ζεύγη

RARα, forward: 5'-GGTGCCTCCCTACGCCTTCT-3'
RARα, Reverse: 5'-GGCGCTGACCCCATAGTGGT-3'

GAPDH, forward: 5'-TGGTATCGTGGAAGGACTCATGAC-3'

GAPDH, reverse: 5'-ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAGC-3'

Τα προϊόντα PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης με χρώση βρωμιούχου αιθιδίου και εκτιμήθηκαν με τη βοήθεια πηγής UV.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στην προσπάθεια της διερεύνησης της δυνατότητας βιολογικής επιδιόρθωσης καρκινικών κυττάρων με τη χρήση μη ογκογόνων ιών, χρησιμοποιήσαμε αθανатоποιημένα καρκινικά κύτταρα HeLa που προήλθαν από αδενοεπιθηλιακά κύτταρα τραχήλου μήτρας μολυσμένα με ογκογόνο ιό HPV-18. Τα κύτταρα αυτά μολύνθηκαν με συνεχώς αυξανόμενο τίτλο ιού γρίπης τύπου Β. Έγινε συσχέτιση μεταξύ ιϊκού φορτίου, απόδοσης ιϊκού τίτλου και ποσοστού κυτταρικής επιβίωσης.(πίνακας 4)

Τα κύτταρα που επέζησαν από την ιϊκή μόλυνση συγκρίθηκαν με πρωτογενή φυσιολογικά κύτταρα τραχήλου της μήτρας που προέρχονταν από γυναίκες 35 έως 40 ετών χωρίς ιστορικό δυσπλασίας(εικόνα 5a,b). Μελετήθηκαν οι μορφολογικές αλλαγές, η αντιγονική έκφραση των ενεργών μορφών των κυτταρικών αντιγόνων (κασπάσης 3 και 8, κυκλίνης E, Ki-67, p53) και η ανίχνευση ιϊκών αντιγόνων με έμμεσο ανοσοφθορισμό, πριν και μετά την ιϊκή μόλυνση σε συνδυασμό με την αύξηση του ιϊκού τίτλου.

Πίνακας 4. Συσχέτιση μεταξύ απόδοσης ιϊκού τίτλου, ποσοστού κυτταρικής επιβίωσης μετά από μόλυνση με ιό γρίπης τύπου Β και ιϊκού φορτίου.

Τίτλος ιού Μονάδες	Απόδοση ιϊκού τίτλου ¹	Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης. ²
---	---	100
L (10 ⁻⁹)	10	80
M (10 ⁻⁶)	4	50
H (10 ⁻²)	1.5	8

¹ Απόδοση ιϊκού τίτλου ορίστηκε ο λόγος του ιϊκού τίτλου εξόδου προς τον ιϊκό τίτλο εισόδου στα διαδοχικά περάσματα

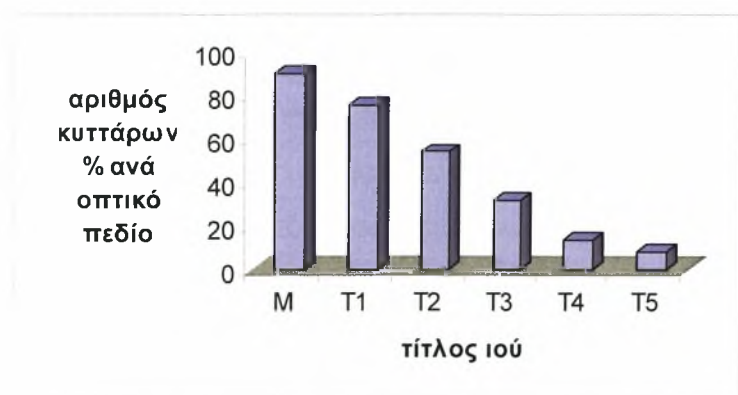
² Ποσοστό κυττάρων που επιβίωσαν ορίζεται ο αριθμός των μολυσθέντων προσκολλημένων κυττάρων που ανοσοφθορίζουν (μετά την πρόσληψη της χρωστικής tryphan blue) 6-7 μέρες μετά τη μόλυνση , προς τον αριθμό των μη μολυσμένων κυττάρων που λαμβάνονται ως μάρτυρες.

Μορφολογικές μεταβολές

Τα κύτταρα HeLa βρίσκονται σε κατάσταση γονιδιακής εκφραστικής υπερδιέγερσης. Το σχήμα τους είναι στρογγυλό και το μέγεθος μεγαλύτερο του φυσιολογικού. Οι πυρήνες είναι υπερχρωματικοί μεγάλοι σε μέγεθος και ο λόγος πυρήνα/κυτταρόπλασμα προσεγγίζει το 1/1 αντί του φυσιολογικού 1/4 ή 1/6. Παρουσιάζουν αιματοξυλινοφιλική υπερχρωμία, αντανάκλαση του αυξημένου DNA και των συνδεδεμένων με αυτό πρωτεϊνών. Η χρωματίνη είναι συμπυκνωμένη και αθροίζεται σε ανώμαλους σχηματισμούς, ενώ τα πυρήνια ένα ή περισσότερα μπορεί να φθάσουν σε μεγάλο μέγεθος. (εικόνα 1 και 5c)

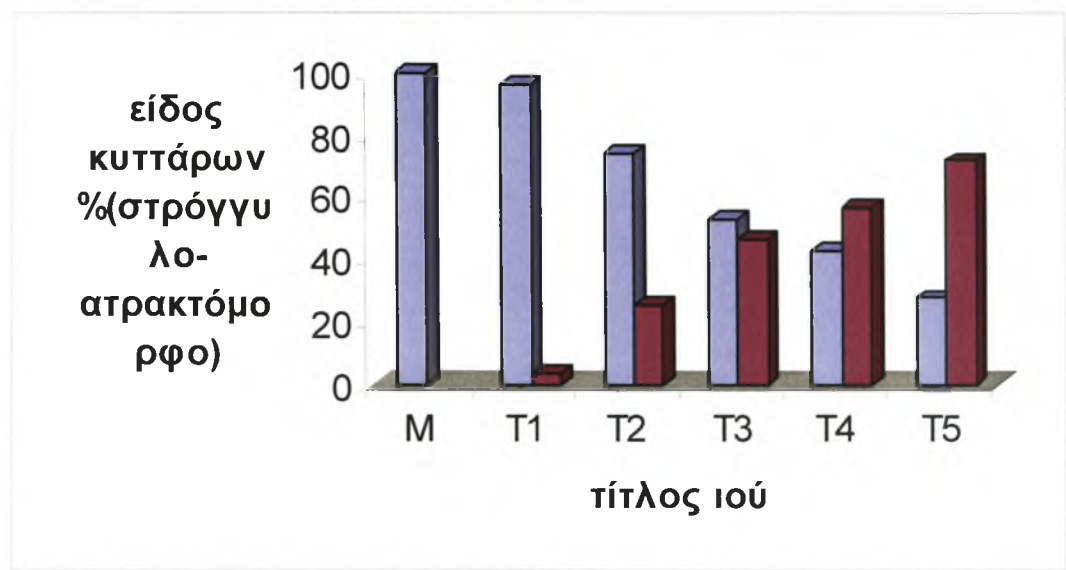
Μετά την μόλυνση με ιό γρίπης τύπου B, στα δύο πρώτα περάσματα (εικόνα 5d) που αντιστοιχούν σε μόλυνση με χαμηλό τίτλο ιού (10^{-9} μονάδες) , στο τρίτο και τέταρτο πέρασμα (εικόνα 5e) που αντιστοιχούν σε μόλυνση με τίτλο ιού (10^{-6} μονάδες) και στο πέμπτο (εικόνα 5f) που αντιστοιχεί σε μόλυνση με υψηλό τίτλο (10^{-2} μονάδες) παρατηρήθηκαν οι ακόλουθες αλλαγές:

α) Μείωση του αριθμού των κυττάρων ανά οπτικό πεδίο από 90 που ήταν στο control (HeLa μη μολυσμένα) σε 75 και 54 στο πρώτο και δεύτερο πέρασμα, 32 και 14 για το τρίτο και τέταρτο αντίστοιχα και 8 κύτταρα ανά οπτικό πεδίο για το πέμπτο πέρασμα (σχήμα 1).



Σχήμα 1. Αριθμός κυττάρων % ανά οπτικό πεδίο σε σχέση με τον αυξανόμενο τίτλο ιού. T1 –T2:χαμηλός τίτλος, T3-T4:μέσος τίτλος, T5:υψηλός τίτλος ιού.

β) Αναφορικά με το σχήμα προέκυψαν δύο πληθυσμοί κυττάρων στρογγυλά και ατρακτόμορφα, με υπερίσχυση του δεύτερου πληθυσμού στα τελευταία περάσματα(σχήμα 2).



Σχήμα 2. Διαφορετικές μορφές κυττάρων που προέκυψαν μετά από μόλυνση με διαδοχικά αυξανόμενο ιϊκό τίτλο. Στρογγυλά (μπλέ), ατρακτόμορφα (κόκκινα).

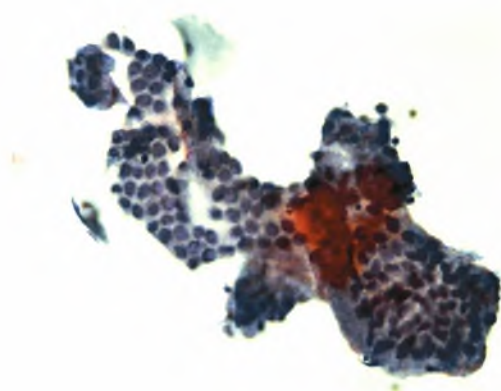
- γ) Μείωση του μεγέθους των κυττάρων.
- δ) Μείωση του μεγέθους του πυρήνα σε σχέση με το συνολικό μέγεθος του κυττάρου. Έτσι η ποσοστιαία αναλογία του πυρήνα είναι 80% και 72% για το πρώτο και δεύτερο πέρασμα (μόλυνση με χαμηλό τίτλο ιού), 63% και 52% για το τρίτο και τέταρτο πέρασμα (μόλυνση με μέσο τίτλο ιού) και 40% για το πέμπτο πέρασμα (μόλυνση με υψηλό τίτλο ιού).
- ε) Η υφή της χρωματίνης από συμπυκνωμένη που ήταν γίνεται αραιοχρωματική. Τα πυρήνια με την αύξηση του τίτλου του ιού εκεί που υπάρχουν είναι μικρότερα και δεν προέχουν.

Πίνακας 5. Φαινοτυπικές ομοιότητες και διαφορές των διαφόρων κυτταρικών τύπων πριν και μετά τη μόλυνση με ιό γρίπης τύπου Β.

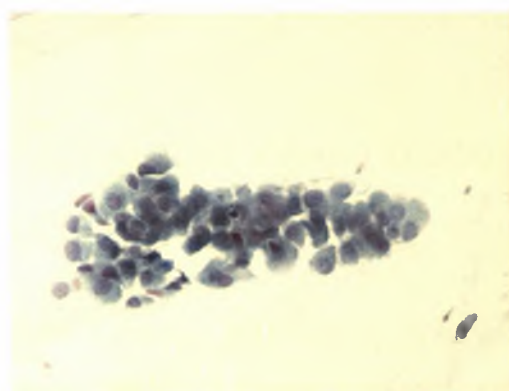
		HeLa κύτταρα			
		Πρωτογενή αδενοεπιθηλιακά & μεταπλαστικά κύτταρα	Control Μη μολυσμένα	Μολυσμένα με IBV τίτλο	
			χαμηλό	μέσο	υψηλό
Μέγεθος πυρήνα ¹	+	+++	++	+	+
Πυκνότητα χρωματίνης ²	-	+++	++	+	-
Πυρήνιο ³	-	+++	++	+	+
Κασπάση 8 ⁴	+/-	-	+	++	++
Κασπάση 3 ⁴	+/-	-	-	+	++
Ki-67 ⁴	+/-	+++	++	+/-	-
Κυκλίνη E ⁴	+/-	++	+	-	-

Αριθμός κυττάρων.που επιβίωσαν 80/80/80 50/50/50 8/8/8
1/2/3 εβδομάδες μετά τη μόλυνση (%)

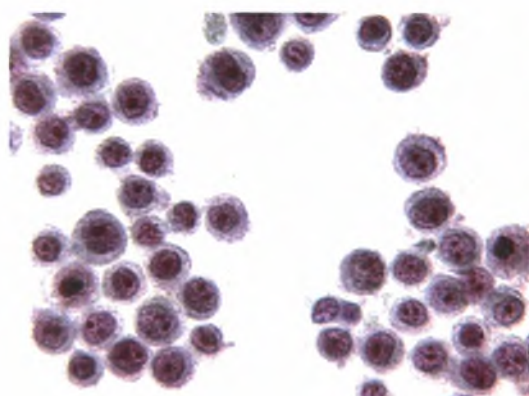
- 1: +, ++, +++ δείχνει το ποσοστό του μεγέθους του πυρήνα: μικρότερος από το 1/3 του μεγέθους του κυττάρου, 1/2 του κυτταρικού μεγέθους και μεγαλύτερος από τα 2/3 του κυτταρικού μεγέθους, αντίστοιχα.
- 2: -, +, ++, +++ δείχνει την πυκνότητα του πυρήνα και την κατανομή της χρωματίνης: ομοιόμορφη κατανομή, ενδιάμεσες μορφές ,αδρή κατανομή αντίστοιχα.
- 3: -, +, ++, +++ δείχνει την απουσία ή την παρουσία: μικρού, φυσιολογικού, ανωμάλου και μεγάλου σε μέγεθος πυρηνίου, αντίστοιχα.
- 4: -, +/-, +, ++, +++ δείχνει την ανοσοκυτταροχημική έκφραση των αντιγόνων, αρνητική, ασθενή, ενδιάμεση και έντονη έκφραση, αντίστοιχα στους διαφορετικούς τύπους κυττάρων.



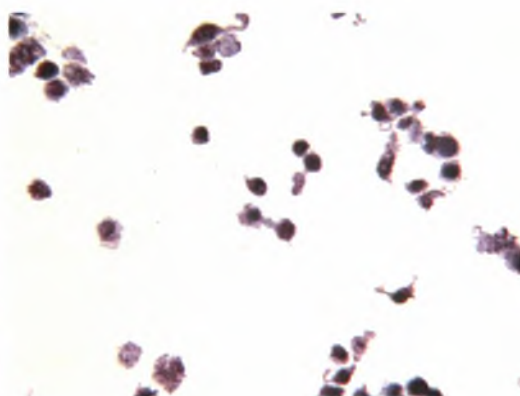
Εικόνα 5a.Κύτταρα ενδοτραχήλου φυσιολογικά. Χρώση pap x 400.



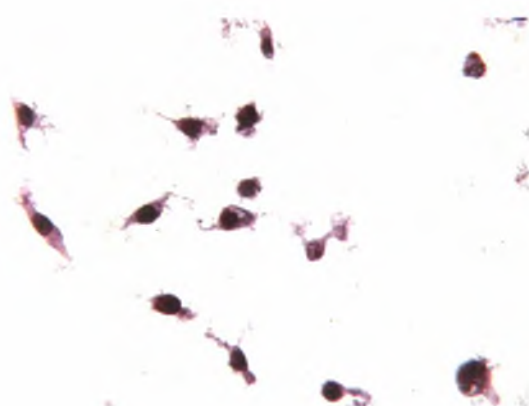
Εικόνα 5b.Μεταπλαστικά κύτταρα τραχήλου μήτρας. Χρώση papx400



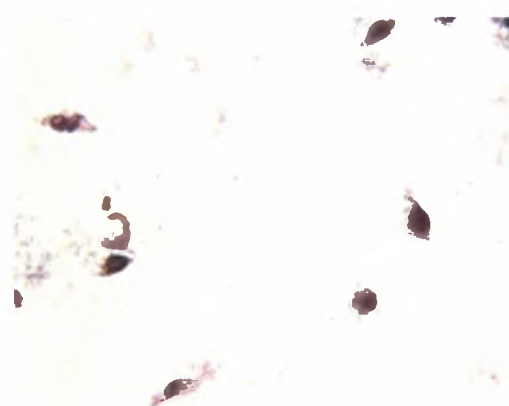
Εικόνα 5c. Κύτταρα HeLa. Χρώση pap x 400.



Εικόνα 5d. Κύτταρα HeLa μετά από μόλυνση με χαμηλό τίτλο ιού. Χρώση pap x 400.



Εικόνα 5e. Κύτταρα HeLa μετά από μόλυνση με μέσο τίτλο ιού. Χρώση pap x 400.



Εικόνα 5f.Κύτταρα HeLa μετά από μόλυνση με χαμηλό τίτλο ιού. Χρώση pap x 400.

Ανοσοκυτταροχημική έκφραση

Κασπάση 3 – Κασπάση 8 (δείκτες αρχικού και τελικού σταδίου απόπτωσης)

Η ανοσοκυτταροχημική χρώση για τις εν λόγω πρωτεάσες έγινε με μονοκλωνικά αντισώματα κασπάση-3 (κλώνος JHM62, Novocastra Labs) και κασπάση-8 (κλώνος 11B6, Novocastra Labs) .

Η ένταση της χρώσης εκτιμήθηκε με βαθμολογία από 0 έως 3, σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία. Όπου η εκτίμηση για την ένταση της χρώσης περιλάμβανε τους βαθμούς (0) θεωρήθηκε αρνητική,(απουσία θετικών κυττάρων στη χρώση), (1+) ελαφρώς θετική η έκφραση του αντισώματος (<15% κύτταρα θετικά στη χρώση), ο βαθμός (2+) μετρίως θετική (15%-50% κύτταρα θετικά στη χρώση) και ο βαθμός (3+) εντόνως θετική (>50% κύτταρα θετικά στη χρώση). Όριο αριθμού κυττάρων για την εκτίμηση της χρώσης ήταν το ποσοστό 10%

Η χρώση βαθμολογήθηκε βάση της μεμβρανικής εντόπισης.

Στα HeLa κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν για control (μη μολυσμένα με ιό γρίπης) η έκφραση της κασπάσης 3 ήταν αρνητική όπως και στη μόλυνση με χαμηλό τίτλο ιού (εικόνα 6a), ήταν ελαφρώς θετική (1+) στη μόλυνση με μέσο τίτλο και μετρίως θετική (2+) με υψηλό τίτλο. (εικόνα 6b) (24-27)



Εικόνα 6a. Κύτταρα HeLa αρνητική έκφραση της κασπάσης 3. (Thin Prep x 200)

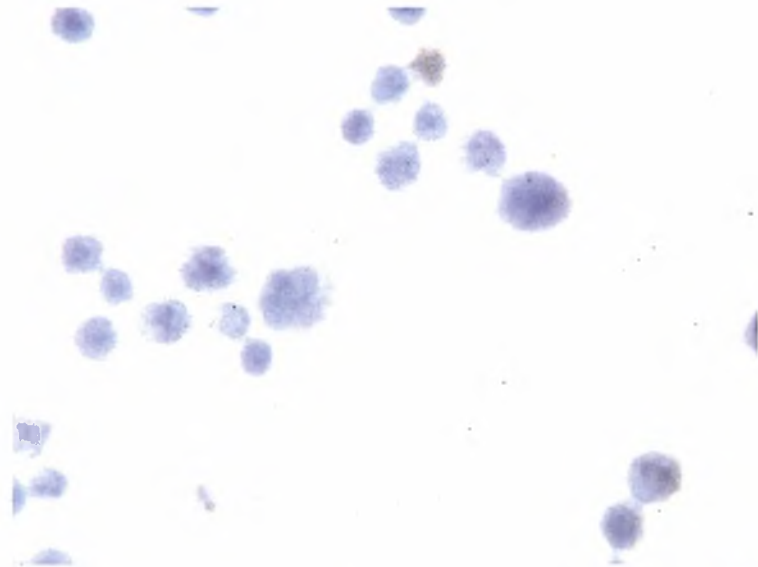


Εικόνα 6b. Μόλυνση με υψηλό τίτλο ιού, έκφραση της κασπάσης 3, μετρίως θετική. (Thin Prep x 200)

Η έκφραση της Κασπάσης 8 ήταν αρνητική στα HeLa (εικόνα 7a), ασθενώς θετική στη μόλυνση με χαμηλό τίτλο ιού (1+) και μετρίως θετική με μέσο (εικόνα 7b) και υψηλό τίτλο (2+). (εικόνα 7c)

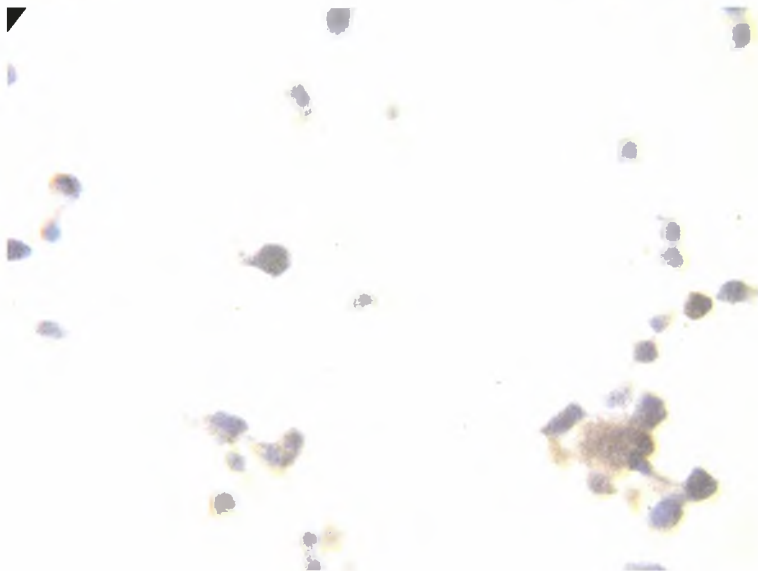
Εικόνα 7a.

Κύτταρα HeLa,
έκφραση
κασπάσης 8
αρνητική. (Thin
Prep x 400)



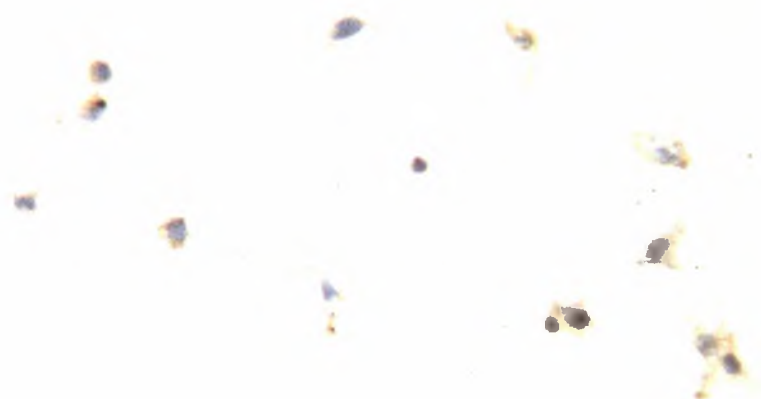
Εικόνα 7b.

Μόλυνση με μέσο
τίτλο ιού, έκφραση
κασπάσης
8, μετρίως θετική.
(Thin prep x 400)



Εικόνα 7c.

Μόλυνση με
υψηλό τίτλο
ιού, έκφραση
κασπάσης 8
μετρίως θετική
(Thin Prep x 400)

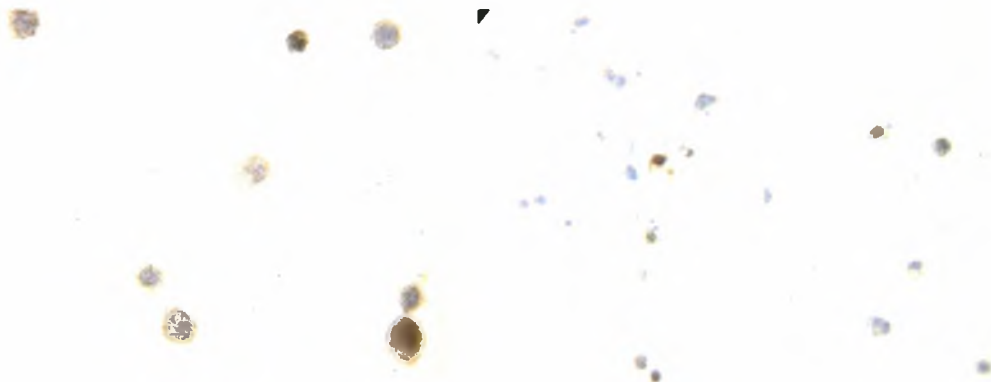


Ογκογονίδιο p53

Χρησιμοποιήθηκε πρωτογενές μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι υποδοχέων της ογκοπρωτεΐνης p53 (κλώνος DO-7 της Novocastra)

Με την ανοσοκυτταροχημική χρώση ανιχνεύουμε τον μεταλλαγμένο τύπο του ογκογονιδίου λόγω του μικρού χρόνου ημίσειας ζωής του φυσικού στελέχους (20 min). Η ανίχνευση του μεταλλαγμένου τύπου σχετίζεται με επιθετική βιολογική συμπεριφορά. Η χρώση είναι πυρηνική.

Στα HeLa (εικόνα 8a) η έκφραση είναι μετρίως θετική (2+), όσο αυξάνει ο τίτλος του ιού η έκφραση μειώνεται σταδιακά (εικόνα 8b)



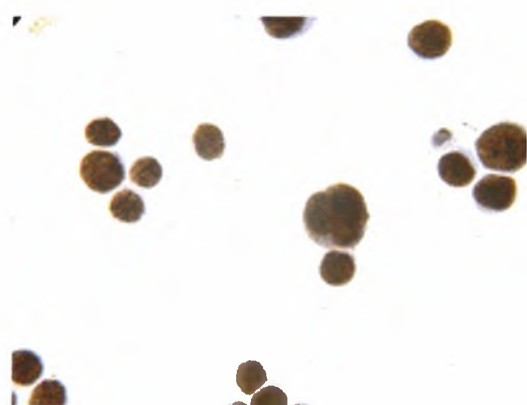
Εικόνα 8a. Κύτταρα HeLa, έκφραση του p53 μετρίως θετική. (Thin Prep x 400)

Εικόνα 8b. Μόλυνση με μέσο τίτλο ιού, ασθενή έκφραση του p53. (Thin Prep x 400)

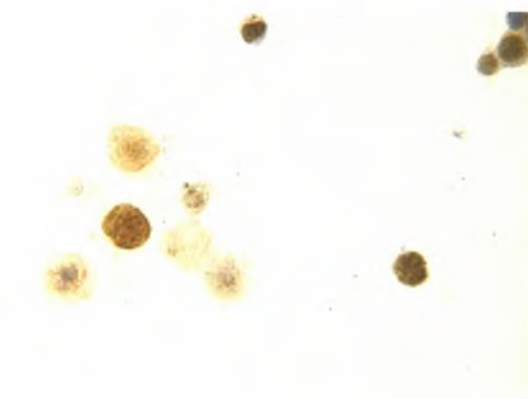
Αντιγόνο πολλαπλασιασμού Ki-67

Χρησιμοποιήθηκε το μονοκλωνικό αντίσωμα για υποδοχείς του πυρηνικού αντιγόνου Ki-67 (κλώνος Ki-88 Bio Genex)

Η χρώση είναι πυρηνική. Παρατηρήθηκε έντονη θετικότητα (3+) στα κύτταρα HeLa (εικόνα 9a) και σταδιακή μείωση της έκφρασης με την αύξηση του ιικού φορτίου. (εικόνα 9b και 9c) (28,29).



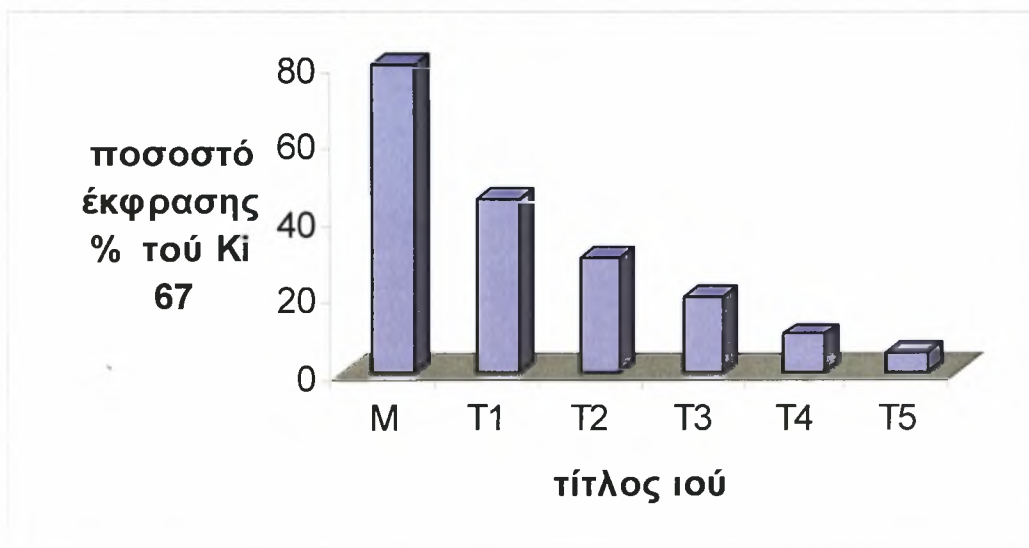
Εικόνα 9a. Κύτταρα HeLa, έκφραση εντόνως θετική του Ki-67. (Thin Prep x400)



Εικόνα 9b. Μόλυνση με χαμηλό τίτλο ιού, μέτρια έκφραση του Ki-67. (Thin Prep x400)



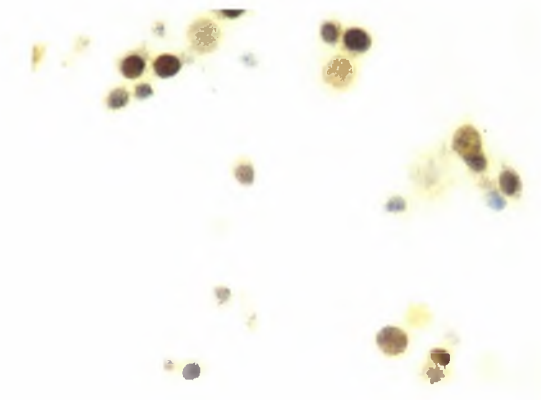
Εικόνα 9c. Μόλυνση με υψηλό τίτλο ιού, αρνητική έκφραση του Ki-67. (Thin Prep x 400)



Σχήμα 3. Σταδιακή μείωση της έκφρασης του αντιγόνου πολλαπλασιασμού Ki-67 στη μόλυνση με διαδοχικά αυξανόμενο ιικό τίτλο.

Cyclin E

Χρησιμοποιήθηκε το μονοκλωνικό αντίσωμα για υποδοχείς του πυρηνικού αντιγόνου cyclin E (κλώνος 13A3, IgG2α, YLEM, Italy). Η χρώση είναι πυρηνική. Παρατηρήθηκε μέτρια θετικότητα στα κύτταρα HeLa (εικόνα 10a) και σταδιακή μείωση της έκφρασης με την αύξηση του ιικού φορτίου. (εικόνα 10 b).



Εικόνα 10a. Κύτταρα HeLa ,έκφραση
μετρίως θετική της κυκλίνης E (Thin-Prep
x 400)

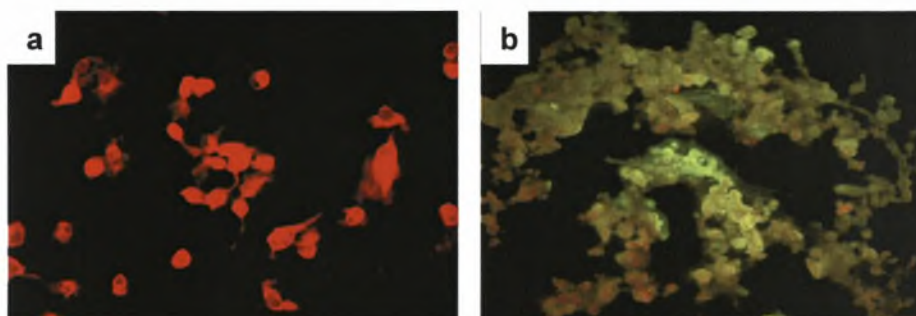


Εικόνα 10b. Μόλυνση με υψηλό τίτλο ιού
,αρνητική έκφραση της κυκλίνης E.(Thin
Prep x 400)

Ανοσοφθορισμός

Χρησιμοποιήθηκε πρωτογενές μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της νουκλεοπρωτεΐνης του ιού B (CDC, USA) και FITC-σημασμένο δευτερογενές αντίσωμα (Argene, Biosoft), που χρησίμευσαν σαν μέθοδος αξιολόγησης της λοιμογόνου δράσης του ιού και της βιωσιμότητας των κυττάρων. Σε κάθε περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες για να αξιολογηθεί η ειδικότητα των πρωτογενών και δευτερογενών αντισωμάτων.

Παρατηρήθηκε στα HeLa κύτταρα (πριν τη μόλυνση με ιό) απουσία έκφρασης ιϊκών αντιγόνων (εικόνα 11a) ενώ μετά τη μόλυνση παρουσία έκφρασης ιϊκών αντιγόνων. (εικόνα 11b) (35).

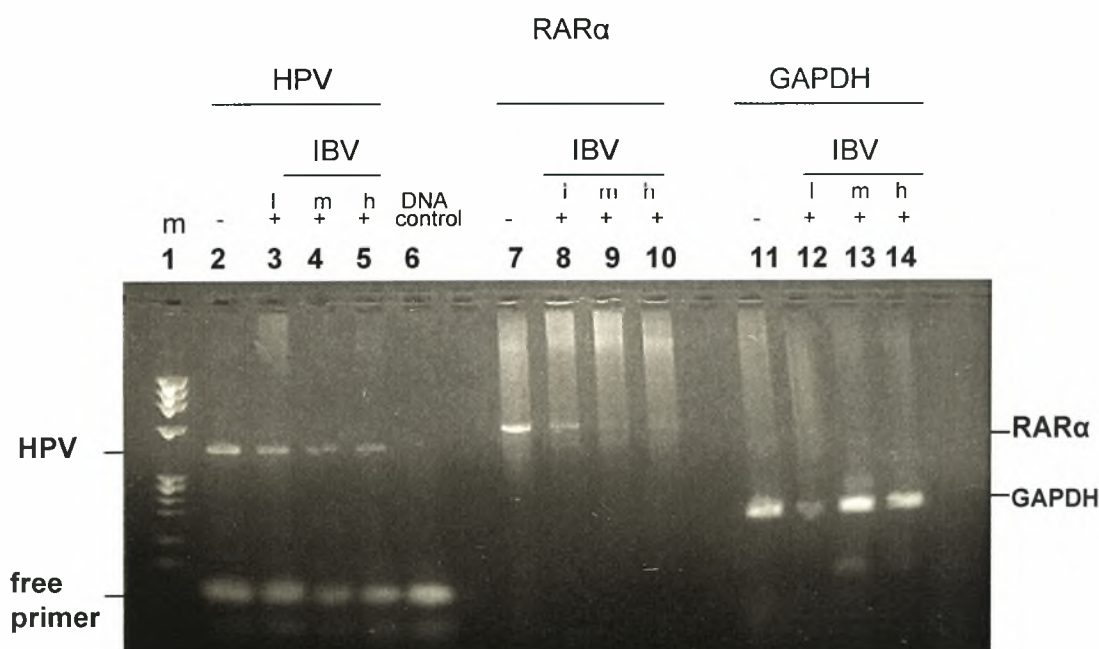


Εικόνα 11: Ανίχνευση των αντιγόνων του ιού γρίπης τύπου B με έμμεσο ανοσοφθορισμό. Απουσία αντίδρασης , control, μη μολυσμένα κύτταρα HeLa (εικόνα a) και αντίδραση στα μολυσμένα κύτταρα HeLa που επέζησαν 10 ημέρες μετά τη μόλυνση με υψηλό ιϊκό τίτλο. (εικόνα b). Χωρίς φθορισμό (κόκκινο), με φθορισμό (πράσινο) αντίστοιχα.

Αποτελέσματα PCR

Περαιτέρω πληροφορίες σχετικά με το μηχανισμό κυτταρικών αλληλομετατροπών μετά από μη ογκογόνο ιϊκό στρες μας έδωσε η ανάλυση του κυτταρικού περιεχομένου σε μηνύματα HPV, α υπομονάδων υποδοχέων ρετινοϊκού οξέος και του απαραίτητου για την κυτταρική επιβίωση καταλυτικού ενζύμου της γλυκόλυσης glyceraldehyde - 3 - phosphate dehydrogenase (GAPDH) πριν και μετά τη μόλυνση.

Διαπιστώθηκε ότι τα επιζώντα από ιϊκή μόλυνση κύτταρα εμφανίζουν επιλεκτική καταστολή της έκφρασης μη απαραίτητων για την κυτταρική επιβίωση γονιδίων όπως του ογκογόνου ιού HPV καθώς του γονιδίου του υποδοχέα του ρετινοϊκού οξέος (RARα) χωρίς να παρατηρείται αντίστοιχη επίδραση της μόλυνσης σε απαραίτητα για την κυτταρική επιβίωση γονίδια όπως αυτό του γλυκολυτικού ενζύμου GAPDH. (εικόνα 12)



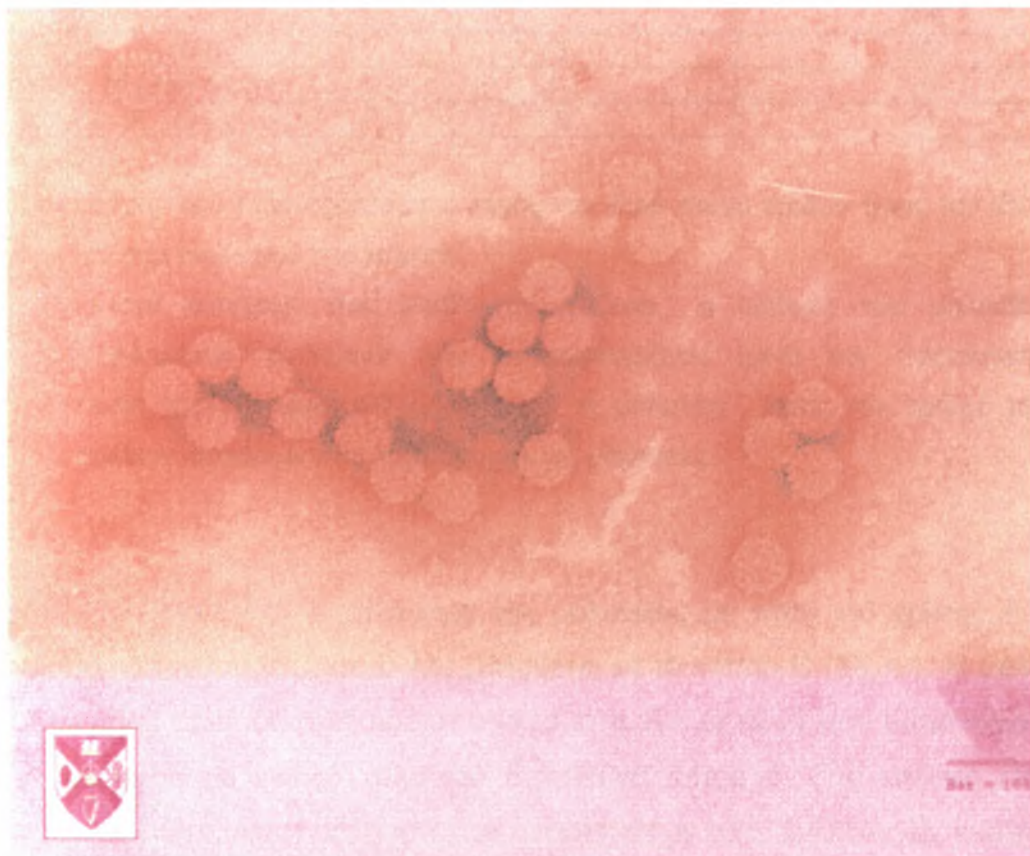
Εικόνα 12. Επίδραση του προφίλ έκφρασης επιλεγμένων μηνυμάτων κυττάρων HeLa πριν τη μόλυνση από ιϊκό φορτίο και 10 ημέρες μετά.

Αποτέλεσμα της μόλυνσης από IBV(+) με χαμηλό μέσο και υψηλό τίτλο στα μη απαραίτητα για την κυτταρική επιβίωση γονίδια HPV (αύλακες 2-5), RARa (αύλακες 6-10) και στα απαραίτητα για την κυτταρική επιβίωση GAPDH (αύλακες 11-14), σε σχέση με τα μη μολυσμένα κύτταρα HeLa μάρτυρες (-) που φαίνονται στις αύλακες 2, 7 και 11. Η αύλακα 6 δείχνει ότι τα RNA παρασκευάσματα που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις σύνθεσης cDNA ήταν ελεύθερες από DNA επιμολύνσεις. Στην αύλακα 1 φαίνεται η διάσπαση του DNA του βακτηριοφάγου Φx174 με το περιοριστικό ένζυμο HaeIII που έχει χρησιμοποιηθεί σαν δείκτης μοριακού βάρους της PCR.

Αποτελέσματα μόλυνσης με ιό γρίπης τύπου Α

Φαίνεται ότι η μόλυνση καρκινικών κυττάρων με μη ογκογόνο ιό δημιουργεί καταστροφή ή επιδιόρθωση αυτών μέσω επαναπρογραμματισμού, τα οποία υπερπαράγουν κατάλληλους υποδοχείς και αυτό θα μπορούσε να αποτελέσει ένα βήμα στη βιολογική αντιμετώπιση του καρκίνου, ως συμπλήρωμα των σύγχρονων μεθόδων αντιμετώπισής του (χειρουργικών, ακτινοθεραπευτικών και χημικών σχημάτων)

Με βάση αυτόν το μηχανισμό μελετήσαμε άλλο έναν μη ογκογόνο ιό, γρίπης τύπου Α για τη μόλυνση κυττάρων HeLa (εικόνα 13)



Εικόνα 13. Ιός γρίπης τύπου Α σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

Γρίπη Α παρατηρείται στη φύση, όχι μόνο στον άνθρωπο, αλλά και σε διάφορα είδη πτηνών και θηλαστικών. Διάφοροι υπότυποι της γρίπης είναι δυνατό να κυκλοφορούν ταυτόχρονα σε αγέλες ζώων, ιδιαίτερα υδρόβιων πτηνών και χοίρων. Επίσης στο νερό των δεξαμενών και λιμνών μπορεί να

συνυπάρχουν διάφοροι υπότυποι. Για αυτό το λόγο παρουσιάζονται ευκαιρίες για **ΓΕΝΕΤΙΚΗ** αναδιάταξη στη φύση και εμφάνιση νέων στελεχών που προκαλούν επιδημίες στον άνθρωπο. Ο ιός τύπου A παρουσιάζει τη μεγαλύτερη αντιγονική ποικιλομορφία έναντι των B και C, μείζονες αντιγονικές μεταβολές και μπορεί να προκαλέσει πανδημίες (36,37). Το **στέλεχος** του ιού που χρησιμοποιήσαμε ήταν A/Sydney/5/97 (H3N2). Το **πρωτόκολλο** που ακολουθήσαμε ήταν το ίδιο με εκείνο της γρίπης B.

Πίνακας 6. Συσχέτιση μεταξύ απόδοσης ιϊκού τίτλου, ποσοστού κυτταρικής επιβίωσης μετά από μόλυνση με ιό γρίπης τύπου A και ιϊκού φορτίου.

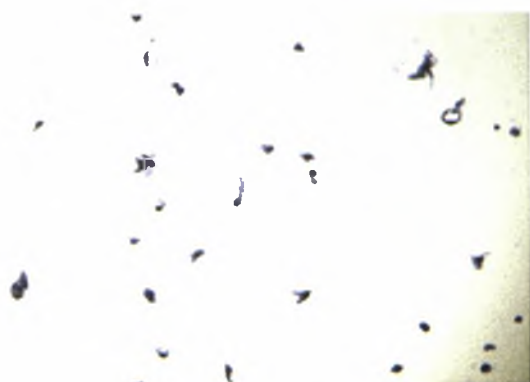
Τίτλος ιού Μονάδες	Απόδοση ιϊκού τίτλου ¹	Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης. ²
---	---	100
L (64)	10	35
M (256-512)	4	10
H (2048)	1.5	<1

¹ Απόδοση ιϊκού τίτλου ορίστηκε ο λόγος του ιϊκού τίτλου εξόδου προς τον ιϊκό τίτλο εισόδου στα διαδοχικά περάσματα

² Ποσοστό κυττάρων που επιβίωσαν ορίζεται ο αριθμός των μολυσθέντων προσκολλημένων κυττάρων που ανοσοφθορίζουν (μετά την πρόσληψη της χρωστικής tryphan blue) 6-7 μέρες μετά τη μόλυνση , προς τον αριθμό των μη μολυσμένων κυττάρων που λαμβάνονται ως μάρτυρες.

Το βιολογικό αποτέλεσμα της μόλυνσης με τύπο ιού γρίπης A ήταν πολύ πιο ισχυρό από αυτό της μόλυνσης με ιό τύπου B (38,39). Η μόλυνση με χαμηλό τίτλο ιού A έδωσε αποτελέσματα ίδια με αυτά που αντιστοιχούσαν σε μόλυνση με υψηλό τίτλο ιού B. (εικόνα 14a,b,c). Στις εικόνες (15-19) φαίνεται ενδεικτικά η έκφραση των αντισωμάτων p53, κυκλίνης E, κασπάσης 3 και 8 και του Ki-67. Η έκφραση στη μόλυνση με χαμηλό τίτλο ιού γρίπης τύπου A, είναι παρόμοια με την έκφραση που αντιστοιχεί σε μόλυνση με υψηλό τίτλο ιού γρίπης τύπου B. (πίνακες 5-7).

Στον πίνακα 6 γίνεται συσχέτιση μεταξύ απόδοσης ιϊκού τίτλου και ποσοστού κυττάρων που επιβίωσαν της μόλυνσης με ιό τύπου A και ιϊκού φορτίου.



Εικόνα 14a. Μόλυνση με χαμηλό τίτλο ιού γρίπης Α. Χρώση pap x 400



Εικόνα 14b. Μόλυνση με μέσο τίτλο ιού. Χρώση pap x 400



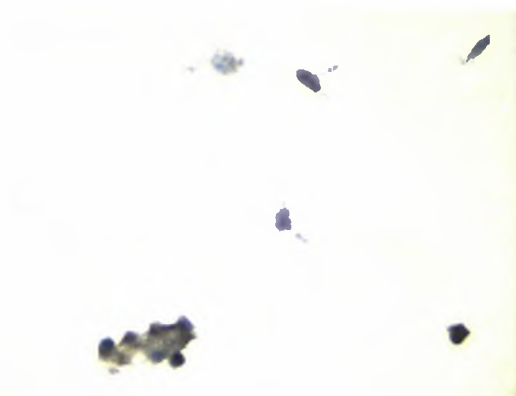
Εικόνα 14c. Μόλυνση με υψηλό τίτλο ιού. Χρώση pap x 400



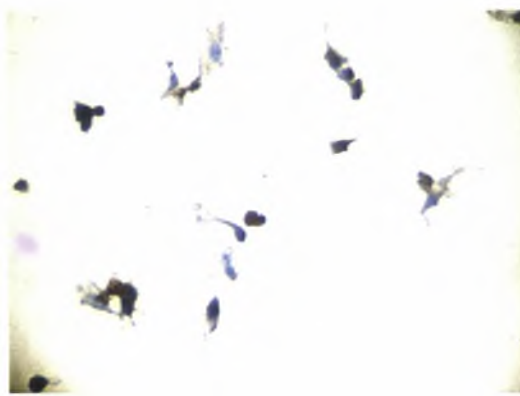
Εικόνα 15. Μόλυνση με χαμηλό τίτλο ιού Α, ασθενή έκφραση του p53. (Thin Prep x400)



Εικόνα 16. Μόλυνση με χαμηλό τίτλο ιού Α, ασθενή έκφραση κυκλίνης Ε (Thin Prep x 400)



Εικόνα 17. Μόλυνση με χαμηλό τίτλο ιού A, μέτρια έκφραση κασπάσης 3. (Thin Prep x 400)



Εικόνα 18. Μόλυνση με χαμηλό τίτλο ιού A, μέτρια έκφραση κασπάσης 8. (Thin Prep x 400)



Εικόνα 19. Μόλυνση με χαμηλό τίτλο ιού A, μέτρια έκφραση του Ki-67. (Thin Prep x 400)

Στον πίνακα 7 διακρίνονται οι φαινοτυπικές ομοιότητες και διαφορές των διαφόρων τύπων κυττάρων πριν και μετά από μόλυνση με ιό γρίπης τύπου A.

Πίνακας 7: Φαινοτυπικές ομοιότητες και διαφορές μεταξύ των φυσιολογικών αδενοεπιθηλιακών κυττάρων του ενδοτραχήλου της μήτρας, των μη μολυσμένων HeLa και των μολυσμένων HeLa με ιό γρίπης τύπου Α.

	HeLa κύτταρα				
	Πρωτογενή αδενοεπιθηλιακά & μεταπλαστικά κύτταρα	Control	Μολυσμένα με IAV τίτλο		
		Μη μολυσμένα	χαμηλό	μέσο	υψηλό
Μέγεθος πυρήνα ¹	+	+++	+	+	
Πυκνότητα χρωματίνης ²	-	+++	+	-	
Πυρήνιο ³	-	+++	+	+/-	
Κασπάση 8 ⁴	+/-	-	++	++	
Κασπάση 3 ⁴	+/-	-	+	++	
Ki-67 ⁴	+/-	+++	+/-	-	
Κυκλίνη E ⁴	+/-	++	+/-	-	

1: +, ++, +++ δείχνει το ποσοστό του μεγέθους του πυρήνα: μικρότερος από το 1/3 του μεγέθους του κυττάρου, 1/2 του κυτταρικού μεγέθους και μεγαλύτερος από τα 2/3 του κυτταρικού μεγέθους , αντίστοιχα.

2: -, +, ++, +++ δείχνει την πυκνότητα του πυρήνα και την κατανομή της χρωματίνης: ομοιόμορφη κατανομή, ενδιάμεσες μορφές ,αδρή κατανομή αντίστοιχα.

3: -, +, ++, +++ δείχνει την απουσία ή την παρουσία: μικρού, φυσιολογικού, ανωμάλου και μεγάλου σε μέγεθος πυρηνίου, αντίστοιχα.

4: -, +/-, +, ++, +++ δείχνει την ανοσοκυταροχημική έκφραση των αντιγόνων:αρνητική, ασθενή, ενδιάμεση και έντονη έκφραση, αντίστοιχα στους διαφορετικούς τύπους κυττάρων.

* Απουσία μολυσθέντων κυττάρων στο υλικό του thin prep .

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Όπως αναφέρθηκε ο καρκίνος είναι μια κατάσταση επίκτητου γενετικού επαναπρογραμματισμού των φυσιολογικών κυτταρικών λειτουργιών και βασική αιτία θνητότητας και νοσηρότητας παγκοσμίως. Προσπάθειες να αναστραφεί ή και να επιδιορθωθεί το παθολογικό γενετικό πρόγραμμα των καρκινικών κυττάρων με βιοφυσικές και βιοχημικές μεθόδους δεν απέδωσαν μέχρι στιγμής τα αναμενόμενα αποτελέσματα, πιθανώς λόγω της σύνθετης πολυπαραγοντικής και πολυσταδιακής φύσης του καρκίνου.

Εκτιμώντας ότι κάθε βιολογικό πρόβλημα πρέπει να έχει βιολογική λύση, διερευνήθηκε βιολογική προσέγγιση αντιμετώπισης του καρκίνου σε επίπεδο καρκινικού κυττάρου. Εξετάστηκε το αποτέλεσμα της μόλυνσης καρκινικών κυττάρων HeLa, που φέρουν ως γνωστό 20 αντίγραφα του ογκογόνου ιϊκού στελέχους HPV-18 σταθερά ενσωματωμένο στο γενετικό τους υλικό και εκφράζουν υποδοχείς ιών γρίπης, με μη-ογκογόνους ιούς και συγκρίθηκε η μορφολογία και τα επίπεδα επιλεγμένων δεικτών αντιγονικής έκφρασης και κυτταρικού κύκλου μεταξύ επιζώντων ξενιστών, μη μολυσμένων με ιό κυττάρων HeLa και φυσιολογικών αδενικών κυττάρων του τραχήλου της μήτρας που ως γνωστό είναι τελικά διαφοροποιημένα επιθηλιακά κύτταρα, με διάρκεια ζωής 3-5 εβδομάδων. Επιθετικά ερεθίσματα όπως μόλυνση με ογκογόνο ιό HPV σε πρόδρομα επιθηλιακά κύτταρα, μπορεί δυνητικά να προκαλέσουν αθανатоποίηση και φαινοτυπική μετατροπή τους σε καρκινικά, ανάλογα και με τη βιογένεση των κυττάρων HeLa. Όμοια η εφαρμογή ενός μη ογκογόνου ιού σε αθανатоποιημένα HeLa κύτταρα φαίνεται ότι τα μετατρέπει φαινοτυπικά σε κύτταρα που μοιάζουν με τα φυσιολογικά. Η ανίχνευση παρόμοιων επιπέδων των μιτωτικών δεικτών του πυρηνικού αντιγόνου Ki-67, του ειδικού μεταπτωτικού δείκτη της φάσης G1/S του κυτταρικού κύκλου κυκλίνη E, του αντιογκογονιδίου p53 και των αποπτωτικών δεικτών κασπάσης 3 και 8 σε φυσιολογικά αδενικά και σε κύτταρα που επέζησαν της μόλυνσης, συμφωνούν με αυτή την υπόθεση (40,41). (πίνακες 5-7). Για να επιβεβαιωθεί μακροσκοπικά το αποτέλεσμα του οξέος μη ογκογόνου ιϊκού στρές στις αθανатоποιημένες κυτταρικές λειτουργίες διατηρήσαμε κύτταρα HeLa μολυσμένα με χαμηλό μέσο και

υψηλό ιικό φορτίο σε καλλιέργειες έως 3 εβδομάδες μετά τη μόλυνση και καταγράψαμε περιοδικά τον αριθμό των επιζώντων κυττάρων. Σε αντίθεση με τους ταχέως διαιρούμενους μη μολυσμένους μάρτυρες HeLa δεν παρατηρήσαμε καμία αλλαγή στον αριθμό των κυττάρων κατά τη διάρκεια της παρατήρησης των 3 εβδομάδων. Η μόλυνση με ιό γρίπης τύπου Β άλλαξε το δυναμικό αθανатоποίησης των κυττάρων HeLa μπλοκάροντας την κυτταρική διαίρεση των επιζώντων μολυσμένων κυττάρων προφανώς στη φάση G1 όπως αποδεικνύεται από τα συγκρίσιμα επίπεδα των κασπασών 3 και 8 του Ki-67, p53 και κυκλίνης E σε φυσιολογικά και μολυσμένα κύτταρα.(πίνακες 5-7). Το ίδιο υποστηρίζεται μακροσκοπικά από την έλλειψη κυτταρικής διαίρεσης των επιζώντων μολυσμένων ξενιστών κατά τη διάρκεια των 3 πρώτων εβδομάδων μετά τη μόλυνση, όπως φαίνεται από τον αριθμό των κυττάρων.

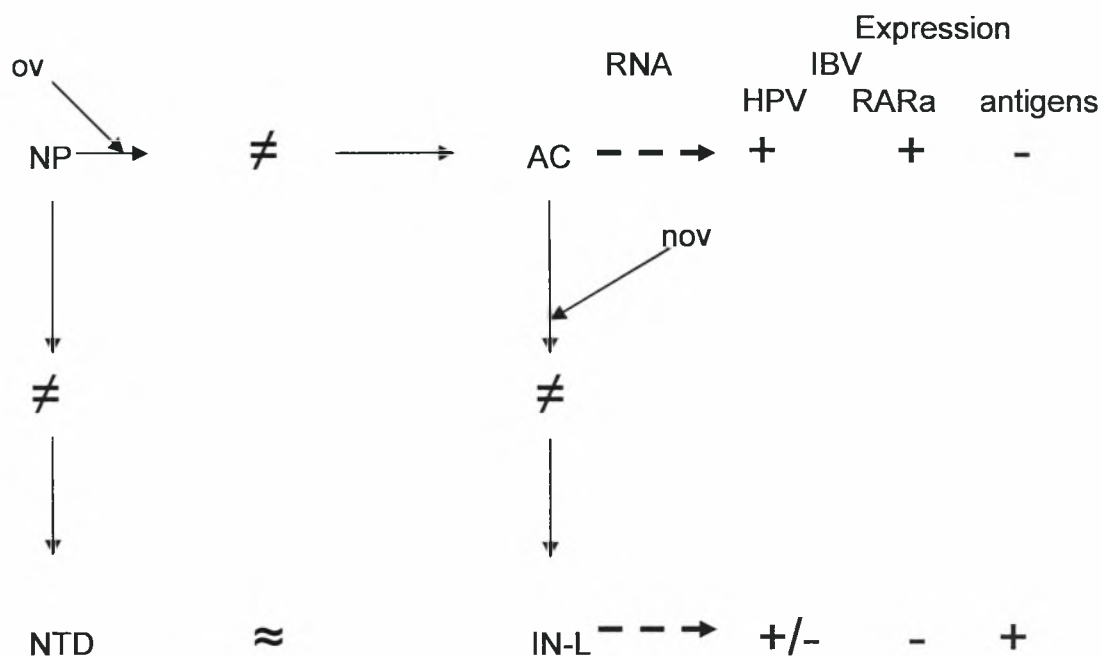
Από τη μελέτη μας αυτή διαπιστώθηκε ότι: **α)** Σε αντίθεση με την υψηλή ανοχή των φυσιολογικών αδενικών κυττάρων στόχων σε μόλυνση με μη ογκογόνο ιό γρίπης, τα κύτταρα HeLa εμφάνισαν σημαντική θραυστότητα που τα οδήγησε σε εκτεταμένη απόπτωση και κυτταρικό θάνατο. Η διαφορετική συνεπώς τοξικότητα του μη ογκογόνου ιού σε υγιή και καρκινικά κύτταρα θα υποστήριζε θεραπευτικές εφαρμογές με βάση το βιολογικό αυτό παράγοντα. και **β)** τα κύτταρα HeLa που επέζησαν της ιϊκής λοίμωξης διαφοροποιήθηκαν δραστικά από τα μη μολυσμένα HeLa και εμφάνισαν έντονες φαινοτυπικές ομοιότητες με τα πρωτογενή και μεταπλαστικά αδενικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας. Προτάθηκε ότι η έντονη απόπτωση που προκάλεσε η λοίμωξη με μη ογκογόνο ιό σε καρκινικά κύτταρα στόχους, που ήδη βρίσκονται σε γονιδιακή υπερέκφραση και βρίσκεται σε ευθεία αντίθεση με την ανάλογη αντίδραση φυσιολογικών κυττάρων στόχων, πιθανώς να οφείλεται σε αδυναμία των καρκινικών κυττάρων να υποστηρίξουν νέα, πρόσθετη γονιδιακή έκφραση. Οι παρατηρούμενες συνεπώς φαινοτυπικές μεταβολές των κυττάρων που επιβίωσαν της ιϊκής λοίμωξης αφορούν προσαρμοστική αντικατάσταση της γονιδιακής έκφρασης μη απολύτως απαραίτητων για τη κυτταρική επιβίωση γονιδιακών συστημάτων.

Σύμφωνα με την παραπάνω υπόθεση εργασίας, για να είναι συμβατή η νέα γονιδιακή έκφραση που επιβάλλεται στο καρκινικό κύτταρο ξενιστή από τον ιό για το πολλαπλασιασμό του με τη κυτταρική επιβίωση θα πρέπει να

συνοδεύεται από προσαρμοστική απενεργοποίηση ή καταστολή μη απαραίτητων για τη κυτταρική επιβίωση γονιδιακών συστημάτων.

Για την επιβεβαίωση του προτεινόμενου μηχανισμού σε μοριακό επίπεδο μελετήθηκε η επίδραση μη-ογκογόνων ιών στα επίπεδα αντιπροσωπευτικών γονιδιακών συστημάτων του κυττάρου όπως ογκοκαταστολής, διαφοροποίησης και γλυκόλυσης. Ειδικότερα μελετήθηκε η εξάρτηση των επιπέδων του μηνύματος του ενζύμου GAPDH, που συμμετέχει στη γλυκόλυση, διαδικασία ζωτικής σημασίας για το κύτταρο και έχει χρησιμοποιηθεί σε διαγνωστικές απεικονιστικές εφαρμογές όπως το PET, καθώς και των μηνυμάτων HPV και RARα. (42-44). Πειραματικά διενεργήθηκε ημιοσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων των ως άνω μηνυμάτων με τη συζευγμένη μέθοδο παρασκευής συμπληρωματικού DNA με το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (RT/PCR) σε κυτταρικό RNA μη μολυσμένων και επιζώντων της μόλυνσης με χαμηλό, μέσο και υψηλό ιικό φορτίο κυττάρων HeLa.(εικόνα 12) Παρατηρήθηκε ότι η αύξηση του ιικού φορτίου οδήγησε: α. σε σταδιακή τιτλοεξαρτώμενη μείωση της έκφρασης του HPV. β. σε δραστική εξάλειψη του RARα mRNA, αποτελέσματα συμβατά με την εμφανή υποχώρηση κακοήθων και εμφάνιση τελικά διαφοροποιημένων φαινοτυπικών χαρακτηριστικών στα επιζώντα από ιική μόλυνση κύτταρα και γ. σε μη επηρεασμό των επιπέδων GAPDH mRNA (εικόνα 12). (45,46).

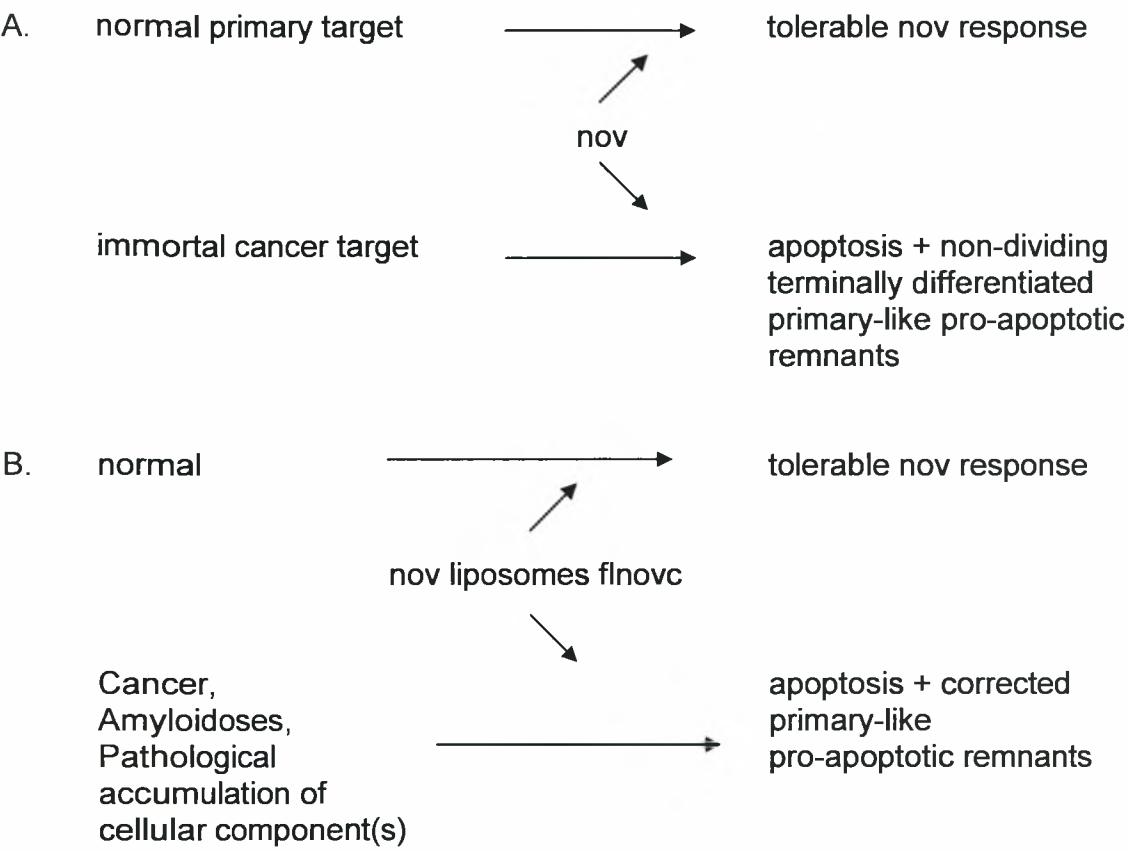
Με βάση κριτήρια μορφολογικά, αντιγονικής έκφρασης, κυτταρικής διαίρεσης και μοριακής έκφρασης δεικτών επιλεγμένων γονιδιακών συστημάτων φαίνεται ότι η γρίπη Β προκάλεσε εκτεταμένη απόπτωση και φαινοτυπική μεταβολή των επιζώντων προ-αποπτωτικών κυτταρικών υπολειμάτων ταυτοποιώντας τα με τα φυσιολογικά και διαφοροποιώντας τα δραστικά από τα πρόδρομά τους HeLa. Το σχήμα 4, συμπυκνώνει το συνολικό φάσμα της κυτταρικής μετατροπής από πρόδρομα φυσιολογικά (NP) σε καρκινικά (AC) κατόπιν μόλυνσης με ογκογόνο ιό (ον) και από καρκινικά (AC) σε κύτταρα (IN-L) που φαινοτυπικά μοιάζουν με τελικά διαφοροποιημένα φυσιολογικά (NTD) μετά από επίδραση μη ογκογόνου ιικού στρες (non).



Σχήμα 4 :Κυτταρικές αλληλομετατροπές που επάγονται από μη ογκογόνο ιϊκό στρες. **ovs** (oncogenic viral stress):ογκογόνο ιϊκό στρες. **NP**(normal primary endocervical adenoepithelial and metaplastic cells) :φυσιολογικά πρωτογενή αδενικά και μεταπλαστικά κύτταρα ενδοτραχήλου **AC**:(adenocarcinoma) κύτταρα αδενοκαρκινώματος. **n-ovs**(non-oncogenic viral stress):μη ογκογόνο ιϊκό στρες. **IN-L**(infected normal like): μολυσμένα κύτταρα που φαινοτυπικά μοιάζουν με τα πρωτογενή αδενικά επιθηλιακά.

Το ενδεικτικό προφίλ επηρεαζόμενης από ιϊκό φορτίο έκφρασης των μηνυμάτων HPV & RARa ως προς το αντίστοιχο μη επηρεαζόμενο του μηνύματος GAPDH όπως απεικονίζει η εικόνα 12, υποστηρίζει ευθέως την υπόθεση εργασίας μας αναφορικά με το προτεινόμενο μηχανισμό προσαρμοστικής αντικατάστασης μη απολύτως απαραίτητης για κυτταρική επιβίωση γονιδιακής έκφρασης από επιβαλλόμενη παραγωγή ιϊκών αντιγόνων. Η παραπάνω επιβεβαίωση του προτεινόμενου μηχανισμού διαφορικής δράσης των μη ογκογόνων ιών προς υγιή και καρκινικά κύτταρα ανοίγει νέους ορίζοντες για την κατανόηση βιολογικών διαδικασιών κεντρικής σημασίας για τη ζωή και οδηγεί σε πιθανές βιοϊατρικές εφαρμογές όπως εν συντομία αναφέρεται ακολούθως.

Στο σχήμα 5Α συνοψίζονται τα βασικά στοιχεία του διαφορικού αποτελέσματος των μη ογκογόνων ιών σε φυσιολογικά και καρκινικά κύτταρα στόχους σαν βάση βιολογικής επιδιόρθωσης του καρκίνου.



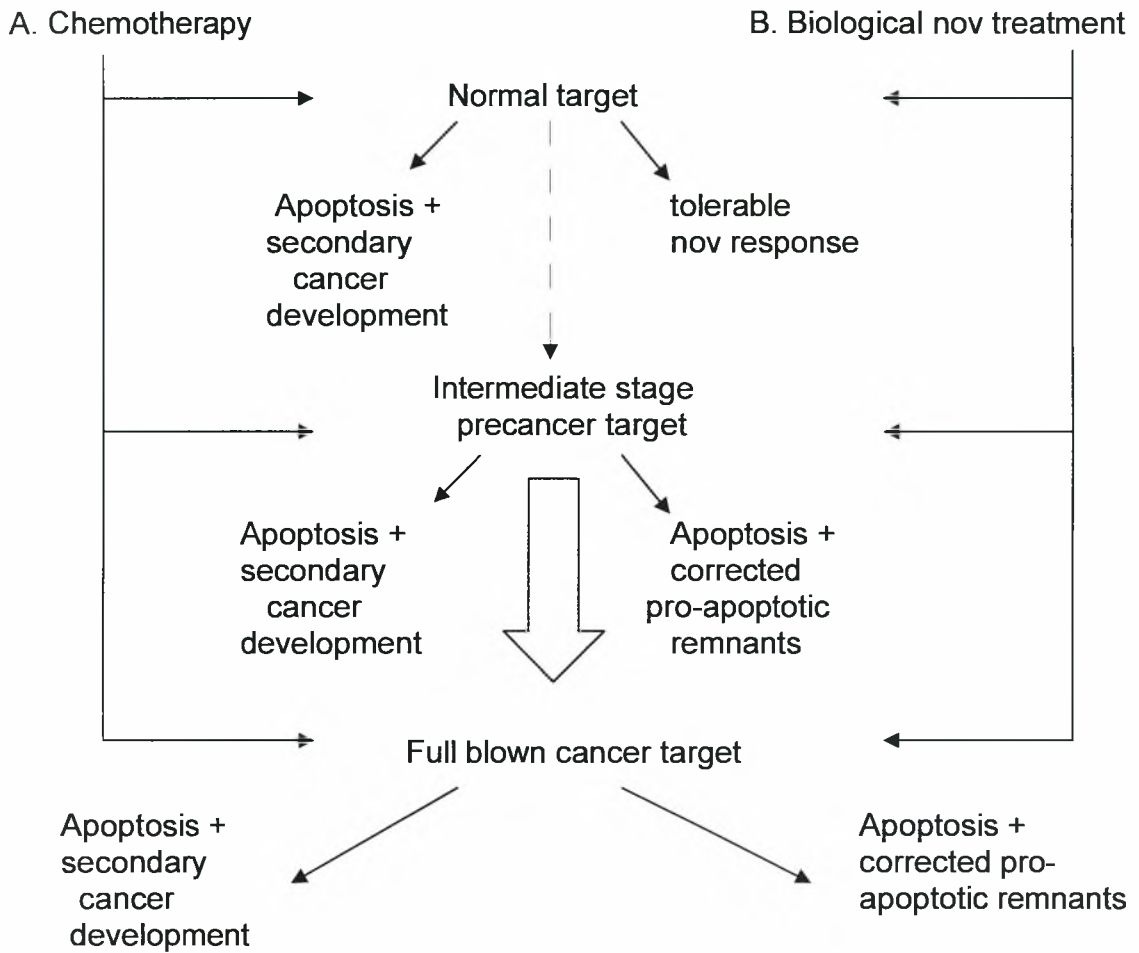
Σχήμα 5. Υποθετικό μοντέλο βιολογικής επιδιόρθωσης του καρκίνου, που εκμεταλλεύεται τη διαφορετική δράση Α. μη ογκογόνων ιών (nov) σε φυσιολογικούς και καρκινικούς στόχους και Β. το υπολογιζόμενο όφελος από τη δημιουργία λειτουργικών λιπόφιλων μη ογκογόνων ιικών κατασκευών(flnovc:functional lipophilic nov-construct), έναντι φυσιολογικών, καρκινικών ή άλλων νοσηρών καταστάσεων, που αφορούν ιστούς που δεν εκφράζουν κατάλληλους υποδοχείς για μη ογκογόνους ιούς (nov).

Απαραίτητη προϋπόθεση της πιθανής αυτής εφαρμογής είναι η υπερέκφραση μη ογκογόνων ιικών υποδοχέων σε ανεπιθύμητα κύτταρα μαζί με το υπόλοιπο φάσμα των παθολογικών προϊόντων. Η καταγραφή της σχετικής κατανομής και περιεκτικότητας σιαλικού οξέος προσαρτημένου σε μόρια γαλακτόζης με δεσμούς α-2,3 & α-2,6 σε καρκινικό υλικό, θα αναγνωρίσει δεκτικούς τύπους καρκίνου και θα φωτίσει το βασικό αυτό προαπαιτούμενο της υπόθεσης εργασίας. Επιπροσθέτως με τα HeLa αυτή η

προσδοκία συναντάται και στην κυτταρική σειρά ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων του ήπατος HepG2, υποδηλώνοντας ότι οι περισσότεροι καρκίνοι του τραχήλου και του ήπατος που οφείλονται σε ογκογονίδια υπερεκφράζουν στην επιφάνειά τους μη ογκογόνους ιϊκούς υποδοχείς.(52,53). Νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις υπόσχεται η χρήση λιποσωμάτων για την ανάπτυξη λιπόφιλων μη ογκογόνων ιϊκών κατασκευών, προσφέροντας δυνατότητες παράκαμψης της απαραίτητης αυτής προϋπόθεσης σύμφωνα με το σχήμα 5B και διεύρυνσης των εφαρμογών της βιολογικής αυτής θεραπείας σε ασθένειες πρωτεϊνικής δρομολόγησης συμπεριλαμβανομένων νευροεκφυλιστικών παθήσεων, αμυλοειδώσεων και άλλων rgion παθήσεων επιπλέον του καρκίνου (47-49).

Η ασθενής συγγένεια χημειοθεραπευτικών παραγόντων έναντι πρόδρομων μορφών του προς θεραπεία νοσούντος ιστού μπορεί να οδηγήσει σταδιακά σε παρενέργειες που να εξουδετερώνουν τα αναμενόμενα οφέλη από την αρχικά σχεδιαζόμενη διορθωτική παρέμβαση (6A).

Προς αυτή τη κατεύθυνση θα αναμέναμε ότι η βιολογική διόρθωση με μη ογκογόνο ιϊκή θεραπεία θα προσέφερε ευεργετικά πλεονεκτήματα όχι μόνο λόγω εξειδίκευσης, ενισχυμένη διαφοροποίηση προ-καρκινικών και καρκινικών κυττάρων, αλλά κυρίως λόγω της ιϊκής φύσης που θα εγγυάται ελαχιστοποίηση αντίστοιχων παρενεργειών με διορθωτική εκρίζωση ανεπιθύμητων κυττάρων που προκύπτουν από τη θεραπεία (σχήμα 6B). Έτσι επιπλέον με τη πιθανή χρήση τους στη διορθωτική θεραπεία του καρκίνου, οι μη ογκογόνοι ιοί θα πλεονεκτούν των συμβατικών μεθόδων στη προληπτική αντιμετώπισή του καταστρέφοντας κατάλληλα σημασμένα ανεπιθύμητα κύτταρα στόχους μέσω επίμονης θεραπευτικής επιμόλυνσης. Το γονιδιακό προφίλ έκφρασης του συστήματος κυττάρου-ιού που μελετήθηκε μπορεί να τύχει πρακτικής εφαρμογής στη προγνωστική αξιολόγηση των επιπέδων ιϊκού HPV RNA σε κλινικά δείγματα σαν άμεσος δείκτης σταδιοποίησης του καρκίνου με πιθανές δυνατότητες λειτουργικής του σταδιοποίησης (49) καθώς και στην αξιολόγηση του σχετικού βαθμού συμμετοχής κάθε ανιχνεύσιμου με RT/PCR γονιδιακού προϊόντος σε πρωτεύουσες για τη κυτταρική βιωσιμότητα διεργασίες .



Σχήμα 6. Προσδοκόμενο πλεονέκτημα της βιολογικής θεραπείας έναντι της χημειοθεραπείας σε δεκτικά καρκινικά κύτταρα στόχους. Και οι δύο μορφές θεραπείας δρουν στα φυσιολογικά κύτταρα στόχους που αποτελούν την πηγή προέλευσης του μεταλλαγμένου κλώνου από τον οποίο προέρχονται και οι ενδιάμεσες προκαρκινικές μορφές κυττάρων (διακεκομένο βέλος) και τα πλήρη καρκινικά κύτταρα (μη διακεκομένο βέλος).

Συμπερασματικά, ο μηχανισμός προσαρμοστικής αντικατάστασης κυτταρικής με μη ογκογόνο ιϊκή γονιδιακή έκφραση σαν προϋπόθεση κυτταρικής επιβίωσης, υπόσχεται ευρύ φάσμα βιοϊατρικών εφαρμογών για τη καλλίτερη αντιμετώπιση της ανθρώπινης ασθένειας με αμιγώς βιολογικά μέσα.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

A. Ειδικά

1. Μόλυνση με ιό γρίπης B αθανатоποιημένων καρκινικών κυττάρων HeLa, που ήδη βρίσκονται σε κατάσταση έντονης γονιδιακής έκφρασης, προκαλεί περαιτέρω γονιδιακή διέγερση στο ξενιστή για την αντιμετώπιση του ιού, η οποία δεν είναι ανεκτή με ακόλουθη συνέπεια μεγάλος αριθμός κυττάρων να εισέρχεται σε μονοπάτια απόπτωσης και κυτταρικού θανάτου.
2. Ένας μικρός αριθμός κυττάρων που επιβιώνει από ιϊκή μόλυνση εμφανίζει ακινητοποίηση στη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου, μη περαιτέρω κυτταρική διαίρεση, πλήρη διαφοροποίηση από τα πρόδρομα καρκινικά κύτταρα προέλευσης HeLa και φαινοτυπική ομοιότητα με τα φυσιολογικά αδενικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας. (πίνακες 5,7)
3. Διαπιστώθηκε ότι τα κύτταρα που επιβιώνουν από ιϊκή μόλυνση εμφανίζουν επιλεκτική καταστολή της έκφρασης μη απαραίτητων για την επιβίωσή τους γονιδίων όπως του ιού HPV και της α υπομονάδας του υποδοχέα του ρετινοϊκού οξέος (RARα), το προϊόν του οποίου απαιτείται στα αρχικά στάδια ανάπτυξης του οργανισμού, χωρίς να επηρεάζεται η έκφραση απαραίτητων για τη κυτταρική επιβίωση γονιδίων όπως του γλυκολυτικού ενζύμου (GAPDH) (εικόνα 12).
4. Ανάλογα με τον ιό γρίπης B μελετήθηκε ιός γρίπης A στο σύστημα μοντέλο ιού – κυττάρου, σαν εναλλακτικός μη ογκογόνος ιός για εφαρμογές βιολογικής αντιμετώπισης κατάλληλα αποκρινόμενων καρκίνων. Ο τύπος γρίπης A αποδείχθηκε πολύ ισχυρότερος του τύπου B, προκαλώντας σε χαμηλό τίτλο τα ίδια βιολογικά αποτελέσματα με αυτά που προκαλούσε υψηλός τίτλος ιού γρίπης B (πίνακας 7).
5. Φαίνεται ότι μετά από μόλυνση με μη ογκογόνο ιό επιτυγχάνεται η ειδική στόχευση και καταστροφή ή επιδιόρθωση μέσω επαναπρογραμματισμού γενετικά ή επιγενετικά αποπρογραμματισμένων καρκινικών κυττάρων που εκφράζουν κατάλληλους υποδοχείς.

B. Γενικά

1. Ο καρκίνος είναι σύνθετη πολυπαραγοντική και πολυσταδιακή νόσος (50,51).
2. Τα πρωτόκολλα θεραπευτικής αντιμετώπισης του καρκίνου αξιοποιούν χημικές κυρίως ουσίες με διαφορεική δράση σε καρκινικά από φυσιολογικά κύτταρα.
3. Πιθανή εκδήλωση τοξικότητας μη-ογκογόνων ιών προς καρκινικά κύτταρα στόχους, θα τους αναδείκνυε σε πολύτιμους βιολογικούς παράγοντες αντιμετώπισης του προβλήματος, δεδομένης της ανθεκτικότητας των φυσιολογικών κυττάρων στόχων σε μόλυνση με τους ιούς αυτούς.
4. Τα ευρήματα της παρούσας διατριβής στο απλό σύστημα μοντέλο «κύτταρο – ιός» που μελετήθηκε, συνηγορούν υπέρ της παραπάνω δυνητικής προϋπόθεσης, όπως συνοψίζεται και στο σχήμα 5.
5. Για τη συλλογική ερμηνεία των ευρημάτων προτάθηκε μηχανισμός προσαρμοστικής αντικατάστασης μη απολύτως απαραίτητης για τη κυτταρική επιβίωση γονιδιακής έκφρασης.
6. Πιθανή έκφραση υποδοχέων μη ογκογόνων ιών στους περισσότερους τύπους καρκινικών κυττάρων θα ενίσχυε σημαντικά τη δυνητική θεραπευτική τους χρήση τους (52).
7. Βιολογική θεραπεία μη ογκογόνων ιών θα πλεονεκτούσε της χημειοθεραπείας στην ελαχιστοποίηση των ανεπιθύμητων παρενεργειών της αγωγής, όπως σχηματικά απεικονίζεται στο σχήμα (σχήμα 6).
8. Τα παραπάνω ευρήματα στο σχετικά απλό μοντέλο «κύτταρο–ιός» ανοίγουν νέους ορίζοντες θεραπευτικής αντιμετώπισης σύνθετων βιοϊατρικών προβλημάτων και κατανόησης βασικών βιολογικών μηχανισμών ελέγχου της κυτταρικής μετάβασης από την υγιή στην καρκινική και πίσω στην υγιή κατάσταση.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Junqueira C Luis, Cameiro Jose, Long A. John. Επιθηλιακός ιστός . Βασική Ιστολογία 5^η έκδοση , τόμος Α, σελ.77-107.
2. Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. Microbiol. Rev. 1992; 56:152-79.
3. Cox NJ and Subbarao K. Influenza. Lancet 1999; 354: 1277-82.
4. Nicolson KG, Wood JM, Zambon M. Influenza. The Lancet 2003; 362:1733-45.
5. Yamanaka T, Shirasawa H, Yoshizawa S. Isolation of influenza A and B viruses in HeLa cells. Microbiol.Immunol.1995; 39:361-63.
6. Gissman L.(1989) Linking HPV to cancer. Clin.Obst.Gyn.32:1,141-147.
7. Gloor E, Hurlimann J.(1986) Cervical Intraepithelial glandular neoplasia(adenocarcinoma in situ and glandular dysplasia). Cancer,58:1272-1280.
8. Griffin NR, Beran IS, Lewis FA, Wells M, Young LS.(1990). Demonstration of multiple HPV types in cervix and in cervical squamous cell carcinoma using the polymerase chain reaction on paraffin wax embedded material. Journal of Clinical Pathology,43:52-56.
9. Frable J.(1991). Glandular Lesions in cervical, vaginal cytology. Foundation for Advanced Education in Science Inc. National Institutes of Health. New Solutions to old problems in Diagnostic Pathology. Bethesda, Maryland.
10. Gray W, McKee GT. Glandular neoplasms of the uterine cervix. In:Diagnostic Cytopathology, 2003;2nd edition, Elsevier:p769-85.
11. De May, RM.In: The art and science of cytopathology,2000; Am Soc Clin Pathol edition: p 121-130
12. Cell Biology, Washington University Medical School, 1997:<http://www.madsci.org/posts/archives/m/>.
13. Cancer epidemiology: www.cancerindex.org
14. National Cancer Institute: www3.cancer.gov.

15. Alberts, Bray, Raff, Roberts, Walter. Έλεγχος του κυτταρικού κύκλου – κυτταρικός θάνατος. Βασικές Αρχές Κυτταρικής Βιολογίας.σελ.679-695.
16. Kumar V, Cotran R, Robbins S, Νεοπλασία, Βασική Παθολογοανατομία, 6^η έκδοση, σελ 145-174
17. Matrosovich NM, Matrosovich TY, Gray T, Roberts NA, Klenk HD. Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101:4620-4.
18. Matrosovich NM, Matrosovich TY, Gray T, Roberts NA, Klenk HD. Avian - virus - like reseptor specificity of the hemagglutinin impedes influenza virus replication in cultures of human airway epithelium. *Virology*.2007 Jan 4; [Epub ahead of print].
19. Plakokefalos E., Markoulatos, P., Ktenas, E., Spirou, N., Vamvakopoulos, NC. A comparative study of immunocapture ELIZA and RT-PCR for screening clinical samples from Southern Greece for human influenza virus types A & B. *Journal of Medical Microbiology*. 2000; 49:1037-1041.
20. Plakokefalos, E., Markoulatos, P., Spirou, N., Bei, T. A., Vamvakopoulos, NC. Molecular and phylogenetic analysis of haemagglutinin and neuraminidase sequences from recent human influenza type A (H3N2) viral isolates in Sauthern Greece. *Archives of Virology*. 2001; 146:1899-1918.
21. Vamvakopoylos NC, Kourides IA. Identification of separate mRNAs coding for the alpha and beta subunits of thyrotropin. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*.1979; 76:3809-3813.
22. Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, Wheeler CM, Coutlee F, Hildesheim A, Schiffman MH, Scott DR, Apple RJ. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol*. 2000; 38:357-61.
23. Kollia P., Samara M., Stamatopoulos K., Belessi C., Stavroyianni N., Tsompanakou A., Athanasiadou A., Vamvakopoulos NC., Laoutaris N., Anagnostopoulos A., Fassas A. Molecular evidence for transferrin receptor 2 expression in all FAB subtypes of acute myeloid leukemia *Res*. 2003; 27:1101-1103.
24. Schultz-Cherry S, Koci M, Thompson E, Tumpey TM, Tumpey TM. Examining the cellular pathways involved in influenza virus induced apoptosis. *Avian Dis*. 2003; 47:968-71.

25. Takizawa T, Matsukawa S, Higuchi Y et al. Induction of programmed cell death (apoptosis) by influenza virus infection in tissue culture cells. *J.Gen. Virol.* 1993; 74: 2347-55.
26. Hinsaw VS, Olsen CW, Dybdahl-Sissoko N, Evans D. Apoptosis: a mechanism of cell killing by influenza A and B viruses. *J Virol* 1994;68:3667-73
27. Liu X, Zou H, Slaughter C, Wang X, DEF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 1997;89:175-84.
28. Schluter C, Duchrow M, Wohlenberg C et al. The cell proliferation – associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated element, representing a new kind of cell cycle – maintaining proteins. *J. Cell Biol.* 1993;123:513-22.
29. Cambruzzi E, Zettler CG, Alexandre COP. Expression of Ki-67 and squamous intraepithelial lesions are related with HPV in endocervical adenocarcinoma. *Pathology Oncology Research* 2005;11:114-20.
30. Takizawa T, Tatematsu C, Ohashi K, Nakanishi Y. Recruitment of apoptotic cysteine proteases (caspases) in influenza virus-induced cell death. *Microbiol. Immunol.* 1999;43:245-52.
31. El-Ghobasha AA, Shaaban AM, Herod J, Prime W, Herrington CS. Overexpression of cyclins A and B as markers of neoplastic glandular lesions of the cervix. *Gynecol Oncol* 2004;92:628-34.
32. Cho NH, Kim YT, Kim JW. Correlation between G & cyclins and HPV in the uterine cervix. *Int J Gynecol Pathol* 1997; 16:339-47.
33. Hayase Y, Tobita K. Characterization of HeLa cells persistently infected with influenza virus B/Lee/40 with respect to telomerase activity and apoptosis. *Intervirology* 2003; 46:319-22.
34. Guo JM, Xiao BX, Kang GZ, Liu DH, Chens H, Zhang XN. Suppression of telomerase activity and arrest at G1 phase in human cervical cancer HeLa cells by all-trans retinoic acid. *Int J Gynecol Cancer* 2006;16:341-346.
35. Hermann B, Larsson C, Zweyberg BW. Simultaneous detection and typing of influenza viruses A and B by a nested reverse transcription-PCR:

- comparison to virus isolation and antigen detection by immunofluorescence and optical immunoassay (FLU OIA). *J Clin Microbiol* 2001;39:134-8.
36. Wurzer WJ, Planz O, Ehrhardt C, Giner M, Silberzahn T, Pleschka S, Ludwig S. Caspase 3 activation is essential for efficient influenza virus propagation. *EMBO J* . 2003; 22:2717-28.
 37. Morris SJ, Nightingale k, Smith H, Sweet C. Influenza A virus-induced apoptosis is a multifactorial process: Exploiting reverse genetics to elucidate the role of influenza A proteins in virus –induced apoptosis. *Virology* 2005; 335:198-211.
 38. Schultz-Cherry S, Dybdahl – Sissoko N, Neumann G, Kawaoka Y, Hinshaw VS. Influenza virus ns1 protein induces apoptosis in cultured cells. *J Virol* 2001;75:7875-81.
 39. Takizawa T, Matsukawa S, Higuchi Y, Nakamura S, Nakanishi Y, Fukuda R. Induction of programmed cell death (apoptosis) by influenza virus infection in tissue culture cells. *J Gen Virol* 1993; 74:2347-55.
 40. Session DR, Lee GS, Choi J, Wolgermouth DJ. Expression of cyclin E in gynecologic malignancies. *Gynecol Oncol* 1999; 72:32-7
 41. Vamvakopoulos NC. Sexual dimorphism of stress response and immune/inflammatory reaction: The corticotropin releasing hormone perspective. *Medial inflammat* 1995;4:163-74.
 42. Patronas NJ, Brooks RA, DeLaPaz RL, Smith BH, Kornblith PL, Di Chiro G. Glycolytic rate (PET) and contrast enhancement (CT) in human cerebral gliomas. *AJNR Am J Neuroradiol*. 1983; 4:533-5.
 43. Francavilla TL, Miletich RS, Di Chiro G, Patronas NJ, Rizzoli HV, Wright DC. Positron emission tomography in detection of malignant degeneration of low-grade gliomas. *Neurosurgery*. 1989; 24:1-5.
 44. Francavilla TL, Miletich RS, DeMichele D, Patronas NJ, Oldfield EH, Weintraub BD, Di Chiro G. Positron emission tomography of pituitary macroadenomas: hormone production and effects of therapies. *Neurosurgery*. 1991; 28:826-33.
 45. Jacobs S, Lie DC, DeCicco KL, Shi Y, DeLuca LM, Gage FH, Evans RM. Retinoic acid is required early during adult neurogenesis in the dentate gyrus. *Proc Nati Acad Sci USA*.2006; 103:3902-7.

46. Chiang MY, Misner D, Kempermann G, Schikorski T, Giguere V, Sucov HM, Gage FH, Stevens CF, Evans RM. An essential role for retinoid receptors RARbeta and RXRgamma in long -term potentiation and depression. *Neuron*. 1998; 21:1353-61.
47. Cohen FE, Kelly JW. Therapeutic approaches to protein-misfolding diseases. *Nature* 2003; 426:905-909.
48. Castro-Fernandes C, Maya-Nunez G, Conn MP. Beyond the signal sequence: Protein routing in health and disease. *Endocrine Reviews* 2005; 26:479-503.
49. Nomikos IN, Vambakopoulos NC. Correlating functional staging to effective treatment of acute surgical illness. *The American Journal of Surgery*. 2001; 182:278-286.
50. Sidhu S, Gicquel C, Bambach CP, Campbell P, Magarey C, Robinson BG, Delbridge LW. Clinical and molecular aspects of adrenocortical tumourigenesis. *ANZ J Surg*. 2003; 73:727-38
51. El-Ghobasha AA, Shaaban AM, Herod J. The pathology and management of endocervical glandular neoplasia. *Int J Gynecol Cancer* 2005; 15:583-92.
52. Ollier L., Caramella A., Giordanengo V., Lefebvre JC. Related Articles. High permissivity of Human HepG2 hepatoma cells for influenza viruses. *J Clin Microbiol*. 2004; 42:5861-5.
53. Roscic – Mrkic B, Schwendener RA, Odermatt B, Zuniga A, Pavlovic J, Billeter MA, Cattaneo R. The role of macrophages in measles virus infection of genetically modified mice. *J Virol*. 2001; 75; 3343-3351.