



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Συγκριτική μελέτη τεχνικών μοριακών
μικροσυστοιχιών και invader signal
amplification στην ανίχνευση HPV
λοιμώξεων»**

Εκπόνηση: Γιαννόπουλος Κωνσταντίνος

**Τριμελής Επιτροπή: Καρακίτσος Πέτρος
Μαρκουλάτος Παναγιώτης
Μόσιαλος Δημήτρης**

Λάρισα, Ιούνιος 2012

Ευχαριστίες

Η παρούσα εργασία αποτελεί την Διπλωματική Εργασία στα πλαίσια των σπουδών μου στο Παναπιστήμιο Θεσσαλίας στο τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή καθηγητή της Ιατρικής Σχολής Αθηνών, Πέτρου Καρακίτσου, στον οποίο οφείλω ιδιαίτερες ευχαριστίες τόσο για την ανάθεση της μελέτης όσο και για την βοήθεια στην εκπόνησή της. Παράλληλα θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τις Βιολόγους-Επιστημονικές Συνεργάτιδες του εργαστηρίου Διαγνωστικής Κυτταρολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου «Αττικόν» Χρανιώτη Κατερίνα και Άγα Ευαγγελία για την βοήθεια, τις πολύτιμες συμβουλές και την καθοδήγηση στην εκπόνηση της συγκεκριμένης εργασίας.

Λάρισα, Ιούνιος 2012

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1	Γενικά περί του ιού HPV	6
1.2	Ταξινόμηση των ιών HPV	7
1.3	Μετάδοση και φυσική ιστορία των ιών HPV.....	9
1.4	Μοριακή Βιολογία του HPV	10
1.4.1	Βιολογία των ιών των θηλωμάτων.....	11
1.4.2	Λειτουργική διαίρεση του DNA των HPV.....	11
1.5	Πρώιμη περιοχή.....	13
1.5.1	Ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης E1.....	13
1.5.2	Ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης E2.....	14
1.5.3	Ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης E4.....	15
1.5.4	Ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης E5.....	15
1.5.5	Ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης E6.....	16
1.5.6	Ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης E7.....	17
1.6	Όψιμη περιοχή.....	18
1.6.1	Ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης L1.....	18
1.6.2	Ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης L2.....	19
1.6.3	Ρυθμιστική περιοχή.....	19

1.7	Τύποι καρκινικών αλλοιώσεων.....	20
-----	----------------------------------	----

2. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΤΟΥ ΙΟΥ HPV

2.1	Μέθοδοι ανίχνευσης του στόχου.....	22
2.1.1	PCR με χρήση εκκινητών συναίνεσης.....	23
2.1.2	Τυποειδική PCR.....	24
2.1.3	Ενίσχυση του ιικού mRNA.....	24
2.1.4	Ανάλυση της αλληλουχίας του HPV DNA....	25
2.1.5	Μικροσυστοιχίες.....	25

2.2	Μέθοδοι ενίσχυσης του σήματος.....	26
2.2.1	Υγρής φάσης.....	26
2.2.2	Μορφολογική.....	27
2.2.3	Κλινικό δείγμα για ανίχνευση HPV.....	27

3.1	Τεχνικές που μελετήθηκαν.....	27
3.1.1	Τεχνική μικροσυστοιχιών.....	27
3.1.2	Τεχνική invader signal amplification.....	29

4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....33

4.1	Υλικά και μέθοδοι.....	34
4.1.1	Βιολογικό υλικό.....	36
4.2	Πρωτόκολλο μικροσυστοιχιών.....	42
4.2.1	Εκχύλιση DNA.....	42
4.2.2	Οπτικοποίηση με μικροσυστοιχίες.....	43

4.3	Πρωτόκολλο invader signal amplification.....	45
	4.3.1 Ανάγνωση αποτελεσμάτων.....	48
5.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	49
6.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	51
7.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	54

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γενικά περί του ιού HPV

Οι ιοί των θηλωμάτων του ανθρώπου [Human papilloma virus (HPV)] είναι μία ομάδα DNA ιών με μικρό μέγεθος και με διπλή αλυσίδα DNA (1). Ανευρίσκονται σε διάφορα σημεία του σώματος, όπως στην πρωκτο- γεννητική περιοχή, την ουρήθρα, το δέρμα, το λάρυγγα, το βλεννογόνο της τραχείας και των βρόγχων, τη ρινική κοιλότητα, τους παραρρινικούς κόλπους, τον οισοφάγο, τον επιπεφυκότα και τη στοματική κοιλότητα.

Η διαπίστωση ότι η δημιουργία θηλωμάτων είναι ιολογικής προέλευσης, υπάρχει από το 1907, ενώ η επιβεβαίωση ήρθε αργότερα (1949), με τη βοήθεια του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου. Οι πρώτες πειραματικές απόπειρες σύνδεσης των θηλωμάτων με την ανάπτυξη του καρκίνου έγιναν από τον Rous και τους συνεργάτες του τη δεκαετία του 1930. Βασιζόμενος στις αρχικές παρατηρήσεις του Shope, απέδειξε την ογκογεννητικότητα του ιού του παπιλώματος των κουνελιών (Cotton Rabbit Papillomavirus: CRPV) σε κατοικίδια κουνέλια, καθώς επίσης και τη δράση της πίσσας και άλλων χημικών καρκινογόνων ως συγκαρκινογόνα μαζί με τον CRPV.

Η οικογένεια των ανθρώπινων ιών και των θηλωμάτων (Human Papilloma Viruses: HPVs) αντιπροσωπεύει μια αξιοσημείωτα ετερογενή ομάδα ιών. Το σχετικά μικρό μέγεθος του γονιδιώματος του ιού (7.000-8.000 ζεύγη βάσεων) διευκολύνει την ανάλυση των γονιδιακών λειτουργιών του και των αλληλεπιδράσεων των ιικών πρωτεϊνών με τα συστατικά του κυττάρου ξενιστή. Στο πολλαπλασιαζόμενο κύτταρο ξενιστή που περιέχει το γονίδωμα του ιού σε λανθάνουσα μορφή, η μόλυνση φαίνεται να ξεκινά στη βασική στιβάδα του επιθηλίου και να επεκτείνεται στα παραβασικά κύτταρα. Ο αναδιπλασιασμός του DNA, η λειτουργική ενεργότητα των ιικών πρωτεϊνών και ο σχηματισμός των ενεργών ιικών σωματιδίων φαίνεται να συμβαίνουν σε διαφοροποιημένα κύτταρα του στρώματος και της επιφάνειας του δέρματος και του βλεννογόνου. Στα κύτταρα αυτά ο ιός HPV απαντά είτε ως επισωματικό κυκλικό μόριο είτε ενσωματωμένος στο χρωμοσωμικό υλικό (DNA) σε θέσεις κλειδιά, όπως π.χ. κοντά σε πρωτοογκογονίδια (C-myc, N-myc, C-Ha-ras) και σε εύθραυστες θέσεις (fragile sites). Η ενοχοποίηση του ιού HPV για την

ανάπτυξη καρκινωμάτων στον άνθρωπο, αποτελεί ένα μεγάλο πεδίο ιατρικών, επιδημιολογικών ανοσολογικών και ιολογικών ερευνών και παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Ειδικοί τύποι του ιού, όπως ο HPV-16, HPV-18, HPV-33, έχουν ταυτοποιηθεί ως κύριοι καρκινογόνοι παράγοντες για το 90% των περιπτώσεων του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας και για το 50% τουλάχιστον των περιπτώσεων του καρκίνου στο υπόλοιπο γεννητικό σύστημα του ανθρώπου (2). Σήμερα το ενδιαφέρον της έρευνας έχει στραφεί προς τη μελέτη του μηχανισμού καρκινογένεσης από τον ιό, δηλαδή στον τρόπο με τον οποίο τα ιικά γονίδια επηρεάζουν την κυτταρική ανάπτυξη, στην αλληλεπίδραση των ιικών ογκοπρωτεϊνών με τα κυτταρικά συστατικά και στους παράγοντες που δρουν συνεργατικά ή ανταγωνιστικά στην ανάπτυξη της νόσου.

Η συσχέτιση των ερευνητικών δεδομένων τα οποία προκύπτουν από τη χρήση των μεθόδων της Μοριακής Βιολογίας με τα αποτελέσματα από παθολογοανατομικές, βιοχημικές, ανοσολογικές και κλινικές μελέτες, συνέβαλε στην ανάπτυξη τελειότερων προγνωστικών και θεραπευτικών μεθόδων για την καλύτερη αντιμετώπιση του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας που αποτελεί τη δεύτερη πιο συχνά απαντώμενη κακοήθεια στις γυναίκες παγκοσμίως, μετά τον καρκίνο του μαστού.

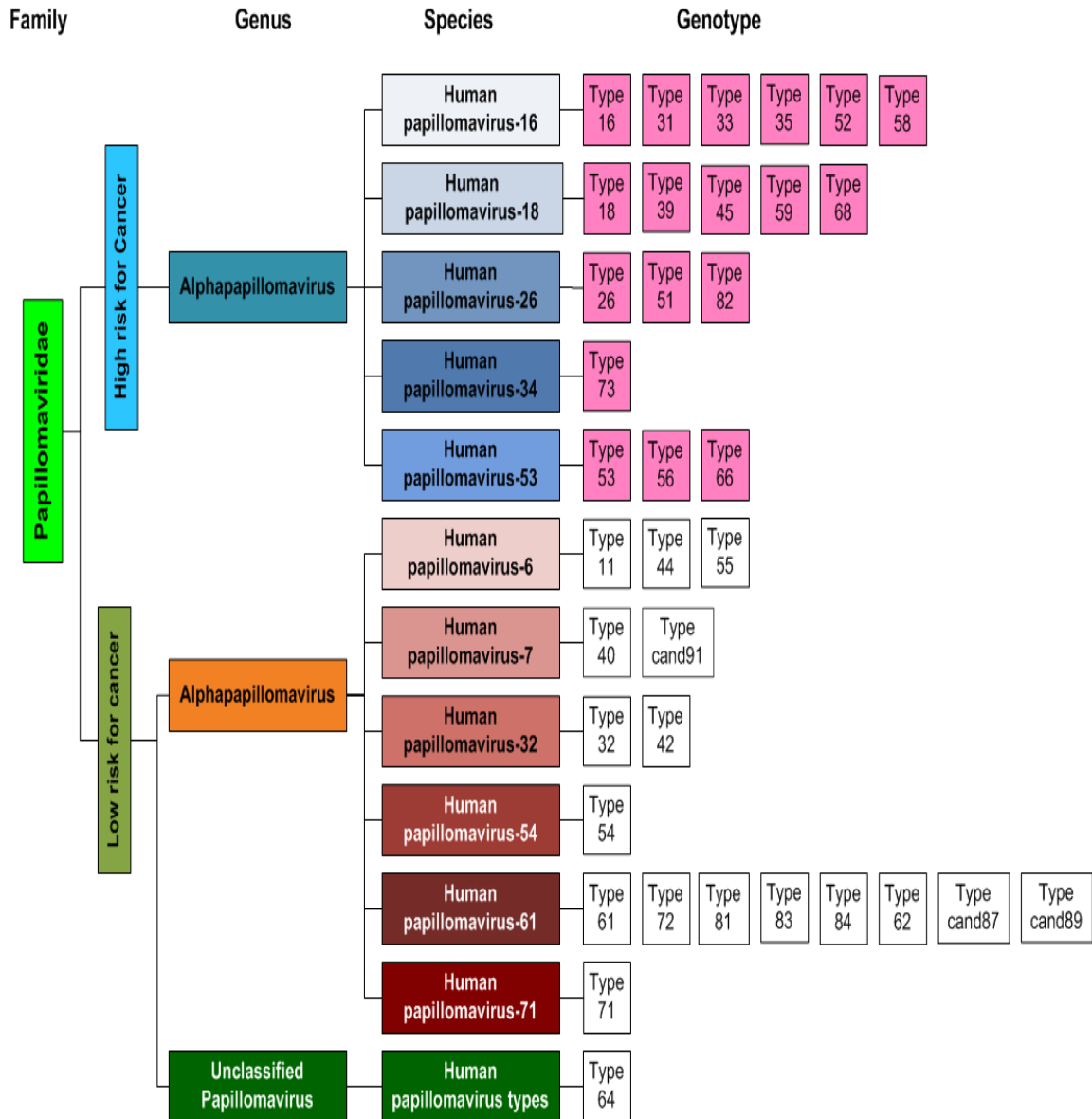
1.2 Ταξινόμηση των ιών HPV

Υπάρχουν διάφοροι τρόποι με τους οποίους είναι δυνατό να διακριθούν οι ιοί HPV. Με βάση την εξελικτική θεώρηση, αυτοί διακρίνονται σε δεκαέξι γένη, τα οποία ονομάζονται με βάση το ελληνικό αλφάβητο από α (Alpha) έως π (Pi), με κυριότερα τα Alpha, Beta, Gamma, Mu και Nu. Η ταξινόμηση των ιών των θηλωμάτων σε τύπους, υπότυπους και παραλλαγές (variants) βασίζεται στην αλληλουχία των L1 γονιδίων η οποία πρέπει να διαφέρει μεταξύ τους τουλάχιστον 10%, 2-10% και έως 2%, αντίστοιχα (3). Αν ληφθεί υπόψη ο τροπισμός τους, οι ιοί HPV μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε δερματικούς και βλεννογόνιους, ενώ με βάση το κακόηθες δυναμικό τους διακρίνονται σε χαμηλού και υψηλού κινδύνου.

Τα δύο κύρια γένη των ιών HPV είναι οι Alpha και οι Beta, στους οποίους ανήκουν περίπου το 90% των ιών θηλωμάτων που έχουν χαρακτηριστεί έως σήμερα (4). Οι περισσότεροι ιοί HPV ανήκουν

στο γένος Alpha, όπως για παράδειγμα οι τύποι που σχετίζονται με γεννητικές λοιμώξεις. Στο γένος Beta ανήκουν ιοί HPV που προκαλούν λοιμώξεις οι οποίες δεν είναι κλινικά εμφανείς. Δυστυχώς, όμως, σχετίζονται με την ανάπτυξη μη μελανωματικού καρκίνου δέρματος σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς, ενώ ενοχοποιούνται και για συμμετοχή στην παθογένεια μιας σπάνιας μορφής κληρονομούμενης θηλωμάτωσης, γνωστής ως ακροχορδονώδους επιδερμοδυσπλασίας (5,6). Οι υπόλοιποι τύποι HPV ανήκουν στα γένη Gamma, Mu και Nu προκαλώντας θηλώματα και ακροχορδώνες που δεν εξελίσσονται σε καρκίνο.

Όπως αναφέρθηκε, οι ιοί των θηλωμάτων ανάλογα με τον τροπισμό τους διακρίνονται στους δερματικούς και στους βλεννογόνιους. Σε καθεμιά από τις κατηγορίες αυτές περιλαμβάνονται ιοί χαμηλού και υψηλού κινδύνου, ανάλογα με το δυναμικό για κακοήγη εξαλλαγή των βλαβών που προκαλούν. Οι περισσότεροι ιοί HPV είναι χαμηλού κινδύνου και προκαλούν εντοπισμένα καλοήγη θηλώματα που δεν εξαλλάσσονται ακόμη και αν αφεθούν χωρίς θεραπεία. Από τους δερματικούς HPV, οι HPV5 και HPV8 μπορούν να θεωρηθούν υψηλού κινδύνου, καθώς σχετίζονται με ακροχορδονώδη επιδερμοδυσπλασία και μη μελανωτικό καρκίνο δέρματος. Από τους βλεννογόνιους HPV, οι HPV6 και HPV11 θεωρούνται χαμηλού κινδύνου καθώς προκαλούν μόνο γεννητικούς ακροχορδώνες. Μεταδίδονται με τη σεξουαλική επαφή και πιστεύεται ότι προσβάλλουν περίπου 1% του σεξουαλικά ενεργού πληθυσμού (7). Αντίθετα, οι ιοί υψηλού κινδύνου ευθύνονται για πλακώδεις ενδοεπιθηλιακές βλάβες που μπορεί να εξελιχθούν σε διηθητικά πλακώδη καρκινώματα (8,9). Η πλειονότητα των καρκινωμάτων τραχήλου μήτρας σχετίζονται με λοίμωξη από ιούς HPV υψηλού κινδύνου. Κύριος εκπρόσωπός τους είναι ο ιός HPV16, που ευθύνεται για το 50% περίπου των καρκίνων τραχήλου μήτρας, καθώς επίσης οι ιοί HPV18 και HPV31.



Εικόνα 1: Στην εικόνα φαίνεται η ταξινόμηση της Α-υπεροικογένειας του ιού HPV. Αυτοί διακρίνονται σε υψηλού κινδύνου (high risk) και χαμηλού κινδύνου (low risk) ανάλογα με το δυναμικό τους στη δημιουργία κακοήθειας. Επιπλέον οι διάφοροι τύποι του ιού ομαδοποιούνται σε species καθένα από τα οποία μπορεί να έχει από ένα έως οχτώ γονοτύπους του ιού. Ο γονότυπος HPV 64 δεν έχει προς το παρόν ταξινομηθεί σε κάποια από τις ομάδες όπως φαίνεται και στην παρούσα εικόνα. Ο γονότυποι 71 και 54 που ανήκουν στους χαμηλού κινδύνου τύπους, αποτελούν ο καθένας από αυτούς type-species χωρίς να συνοδεύονται από άλλους γονοτύπους.

1.3 Μετάδοση και φυσική ιστορία των ιών HPV

Η μετάδοση του ιού HPV γίνεται μέσω μικροσκοπικών βλαβών στο δέρμα ή στους βλεννογόνους, ενώ φαίνεται ότι διευκολύνεται από την παρουσία εκδορών ή υγρασίας στις επιθηλιακές επιφάνειες (10). Οι λοιμώξεις του γεννητικού συστήματος μεταδίδονται κυρίως με τη σεξουαλική επαφή, αν και σπάνια έχουν αναφερθεί και σε νέες γυναίκες χωρίς σεξουαλικούς συντρόφους (11).

Έχει τεκμηριωθεί σαφώς η συσχέτιση μεταξύ του αριθμού των σεξουαλικών συντρόφων και της επίπτωσης λοίμωξης με τον ιό HPV (12). Περιστασιακά, οι γεννητικές HPV λοιμώξεις μεταδίδονται με ενοφθαλμισμό μεταξύ των διαφόρων επιθηλίων (13), καθώς και ιατρογενώς μέσω ιατρικών οργάνων ή άλλων αντικειμένων. Επαφή του στόματος με τον γεννητικό βλεννογόνο μπορεί να οδηγήσει σε λοιμώξεις της στοματικής κοιλότητας από ιούς HPV (14). Ακολούθως, με τη βοήθεια του σιέλου, ο ιός είναι δυνατό να μεταφερθεί σε κατώτερες ανατομικές περιοχές (φάρυγγας, οισοφάγος) προκαλώντας λοίμωξη. Οι δερματικές λοιμώξεις προκαλούνται από στενή σωματική επαφή, τραυματισμό από μολυσματικά υλικά ή βάδισμα με γυμνά πέλματα πάνω σε τραχείες μολυσμένες επιφάνειες (15). Τέλος, σημαντική είναι η κάθετη μετάδοση από τη μητέρα στο νεογνό κατά τον φυσιολογικό τοκετό (16).

Ο κύκλος ζωής των ιών HPV συνδέεται στενά με το πρόγραμμα διαφοροποίησης των ανθρώπινων κερατινοκυττάρων. Η παραγωγή των ιικών σωματιδίων συμβαίνει αποκλειστικά στις διαφοροποιημένες στοιβάδες του επιθηλίου που βρίσκονται πάνω από τη βασική μεμβράνη. Παρόλα αυτά, σχετικά πρόσφατα, προτάθηκε μια θεωρία παραγωγής ιικών σωματιδίων ανεξάρτητη από το σύστημα πολλαπλασιασμού/διαφοροποίησης του επιθηλίου (17).

Η λοίμωξη με τον ιό HPV φαίνεται ότι απαιτεί τη διαθεσιμότητα ενός κυττάρου που βρίσκεται ακόμη σε φάση πολλαπλασιασμού (18). Αυτό συχνότερα φαίνεται να συμβαίνει σε μικροσκοπικές επιθηλιακές βλάβες, όπου τα κύτταρα της βασικής στοιβάδας εκτίθενται στην επιφάνεια του επιθηλίου. Οι περιοχές όπου συναντώνται διαφορετικά επιθήλια είναι, επίσης, ευάλωτες στη λοίμωξη με τον ιό HPV. Στον ενδοτράχηλο απαντάται η ζώνη μετάπτωσης του μονόστοιβου κυλινδρικού επιθηλίου του ενδομητρίου στο πολύστοιβο πλακώδες επιθήλιο του κόλπου. Στη ζώνη αυτή, ειδικά σε νεαρές γυναίκες, τα πολλαπλασιαζόμενα

κύτταρα αγγίζουν την επιθηλιακή επιφάνεια, καθιστώντας την περιοχή αυτή το συχνότερο σημείο προσβολής από τον ιό HPV.

1.4 Μοριακή βιολογία και οργάνωση του γονιδιώματος του ιού HPV

Οι ανθρώπινοι ιοί των θηλωμάτων (Human Papilloma Viruses, HPVs) είναι μικροί, κυκλικοί, DNA ιοί. Ανήκουν στην οικογένεια Papovaviridae και αποτελούν το γένος Papillomavirus. Στην ίδια οικογένεια απαντά το γένος Polyomavirus. Η διάκριση των παραπάνω γενών, γίνεται με βάση το μέγεθος του ιικού γενώματος και τη μορφολογία τους. Ιδιαίτερη σημασία έχει αποδοθεί στους ιούς των θηλωμάτων (HPV) του ανθρώπου, καθώς διαπιστώθηκε ότι ορισμένοι γονότυποι αυτών, σχετίζονται με τη δημιουργία καρκίνου και κυρίως καρκίνου του τραχήλου της μήτρας.

1.4.1 Βιολογία των ιών των θηλωμάτων

Πρόκειται για μικρούς, μη ελυτροφόρους ιούς. Είναι εικοσαεδρικοί, με διάμετρο 52-55nm. Η κάψα τους αποτελείται από 72 καψομερίδια, τα οποία είναι διαταγμένα σε 12 πενταμελή και σε 60 εξαμελή σύνολα σε μια $T=7$ συμμετρία. Το DNA των ιών αυτών είναι κυκλικό δίκλωνο, αποτελείται από 8×10^3 bp και έχει μοριακό βάρος 5.2×10^6 d. Οι ιοί του θηλώματος προσβάλλουν ειδικά τα επιθηλιακά κύτταρα του δέρματος ή των βλεννογόνων.

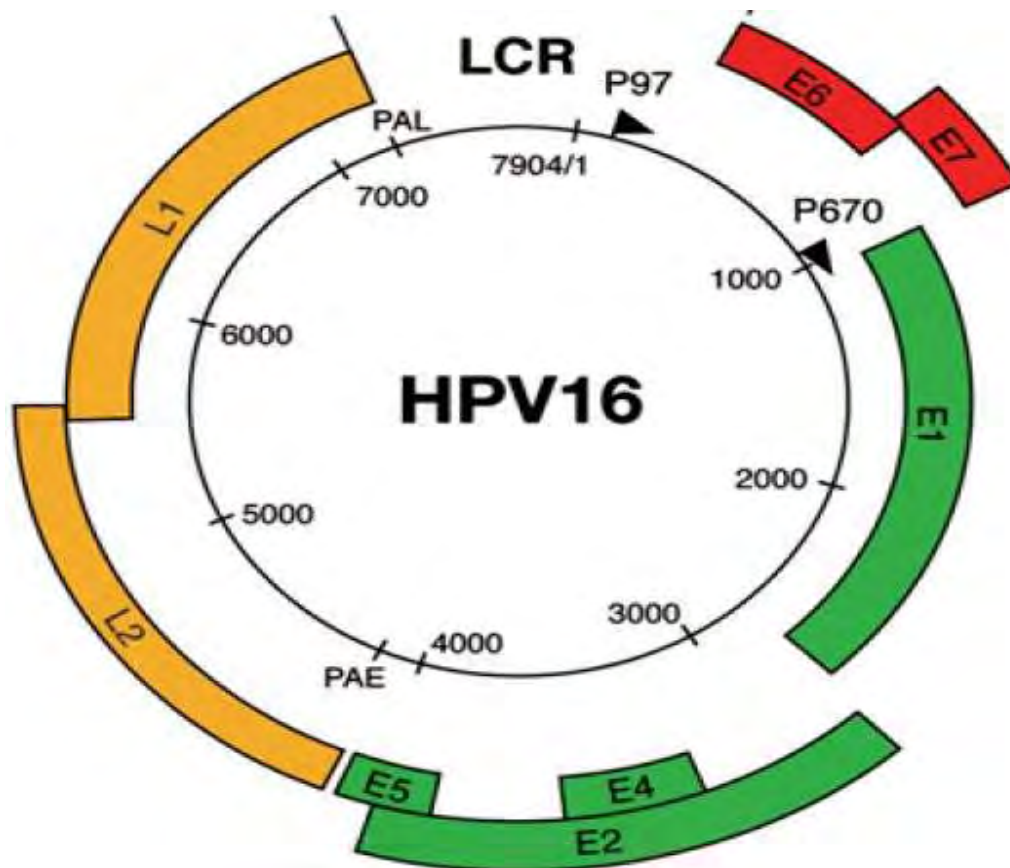
1.4.2 Λειτουργική διαίρεση του DNA των HPV.

Το ιικό γένωμα που μεταφράζεται αποτελείται από 10 «Ανοικτά Πλαίσια Ανάγνωσης» (Open Reading Frames, ORFs), τα οποία διακρίνονται σε αυτά της *πρώιμης* (Early, E) και της *όψιμης* (Late, L) περιοχής. Μεταξύ του 5' άκρου της E-περιοχής και του 3' άκρου της L- περιοχής υπάρχει μια τρίτη, μη κωδικοποιητική που ονομάζεται *ρυθμιστική* περιοχή (LCR), όπου χαρτογραφούνται cis-γενετικά στοιχεία (19). Χαρακτηριστικό είναι ότι η ύπαρξη κωδικών περιοχών εντοπίζεται μόνο στον ένα κλώνο του DNA. Στην εικόνα 1 απεικονίζεται η οργάνωση του γονιδιώματος του γονότυπου

HPV-16 σε ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης της E, της L και της ρυθμιστικής περιοχής. Στον πίνακα 2 παρουσιάζονται συνοπτικά οι λειτουργίες των δομικών γονιδίων της E και L περιοχής.

Λειτουργίες των HPV γονιδίων	
Γονίδιο	Λειτουργία
E1	Αντιγραφή του ιικού DNA, καταστολή της αντιγραφής
E2	Ρύθμιση της μεταγραφής, πρόσδεση στην LCR περιοχή
E3	Αγνώστου λειτουργίας
E4	Εκφράζεται ως όψιμο γονίδιο, ωρίμανση και απελευθέρωση των ιικών σωματιδίων
E5	Μετασχηματισμός (HPV-6)
E6 και E7	Στους υψηλού κινδύνου ιούς (HPV 16 και HPV 18), ενέχονται άμεσα στον κυτταρικό μετασχηματισμό. Μεταγράφονται από τον ίδιο υποκινητή (P97), αποτελώντας πολυκιστρονικό mRNA
E8	Αγνώστου λειτουργίας
L1	Μείζονα πρωτεΐνη της κάψας
L2	Ελάσσονα πρωτεΐνη της κάψας

Πίνακας 1: Στον πίνακα φαίνονται οι βασικές λειτουργίες τόσο των 7 γονιδίων της E περιοχής του HPV ιού όσο και αυτές των 2 γονιδίων της L περιοχής του HPV ιού.



Εικόνα 2: Οργάνωση των γονιδίων στον HPV 16 ιό. Παρατηρούμε τα 8 ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (γονίδια) καθώς και την ρυθμιστική περιοχή LCR.

1.5 Πρώιμη περιοχή

1.5.1 Ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης E1

Κωδικοποιεί την πρωτεΐνη E1, η οποία έχει λειτουργικές ιδιότητες παρόμοιες με εκείνες του μεγάλου αντιγόνου T του ιού SV40 (SV40 large T antigen) (20). Η πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη E1 δεσμεύει και υδρολύει ATP, έχει ATP-εξαρτώμενη δράση ελικάσης (21) και είναι απαραίτητη για την αντιγραφή του ιού(22). Επίσης αλληλεπιδρά με την κυτταρική πολυμεράση α (23).

1.5.2 Ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης E2

Η πρωτεΐνη E2 είναι απαραίτητη για την αντιγραφή του ιικού γενώματος, σχηματίζοντας ετερομερή σύμπλοκα με την πρωτεΐνη E1 (24). Εξετάζοντας την πρωτεϊνική δομή του γονιδιακού προϊόντος E2 μεταξύ των στελεχών HPV, διαπιστώνεται η ύπαρξη δύο καλά συντηρημένων περιοχών στα άκρα και μια ενδιάμεση που ποικίλει στη σύνθεση των αμινοξέων στα διάφορα στελέχη του ιού. Το αμινοτελικό άκρο των 220 αμινοξέων της πρωτεΐνης είναι ομόλογης σύνθεσης σε όλους σχεδόν τους γονότυπους, καθώς επίσης και το καρβοξυτελικό άκρο των 100 αμινοξέων. Το ενδιάμεσο τμήμα ποικίλει τόσο σε μέγεθος, όσο και σε σύνθεση αμινοξέων μεταξύ των στελεχών. Η πρωτεΐνη E2 αναγνωρίζει και προσδένεται στην αλληλουχία ACCN₆ GGT πάνω στο DNA η οποία είναι ιδιαίτερα συντηρημένη σε πολλούς τύπους HPV. Στους γεννητικούς τύπους HPV υπάρχουν τέσσερις θέσεις δέσμησης (Bs1 ως Bs4) της E2 στην LCR ρυθμιστική περιοχή, υψηλά συντηρημένες, απαραίτητες για τον παραγωγικό κύκλο ζωής του ιού (25). Η πρωτεΐνη E2 επάγει το προϊόν του γονιδίου p53 σε HeLa κύτταρα, καταστέλλοντας τη μεταγραφή των E6/E7 γονιδίων με την πρόσδεση της πρωτεΐνης στις θέσεις δέσμησης της στον υποκινητή P₁₀₅ (26,27). Μεταλλαγές στο A.Π.Α.-E2 στον γονότυπο HPV-16 καθώς και στη ρυθμιστική περιοχή αυτού, φαίνεται ότι καταλήγουν σε μετασχηματισμό του κυττάρου-ξενιστή (28)

1.5.3 Ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης E4

Το γονίδιο E4 αν και ανήκει στην πρώιμη περιοχή, εκφράζεται ως όψιμο γονίδιο, παίζοντας ρόλο στην παραγωγική μόλυνση (29). Η πρωτεΐνη E4 προέρχεται από τη μετάφραση mRNA που προκύπτει από splicing της αρχής του Α.Π.Α. E1 και όλου του E4. Το προϊόν αυτό είναι μια διπλή πρωτεΐνη Μ.Β. 16kd και 17kd, που με πρωτεολυτική διάσπαση χάνει τα 5 αμινοξέα του τμήματος E1 και τελικά ανιχνεύεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα του μολυσμένου κυττάρου.

Ο ρόλος της πρωτεΐνης E4 στον κύκλο ζωής του κυττάρου ξενιστή δεν είναι ακόμα αποσαφηνισμένος. Το mRNA του E4 γονιδίου είναι το πιο άφθονο μεταγράφημα στις αλλοιώσεις που επάγονται από τον ιό (30). Όμως δε φαίνεται απαραίτητο για το μετασχηματισμό των κυττάρων ή για τη διατήρηση της επισωματικής μορφής του ιικού DNA. Η πρωτεΐνη E4 εντοπίζεται σχεδόν αποκλειστικά στο διαφοροποιημένο στρώμα του επιθηλίου και ενοχοποιείται για τη διακοπή της ομαλής διαφοροποίησης του κυττάρου, δημιουργώντας έτσι συνθήκες ευνοϊκές για την ωρίμανση του ιού (31,32, 33)

Επίσης έχει διαπιστωθεί ότι, οι πρωτεΐνες E4 συνδέονται με τον κυτταρικό σκελετό κερατίνης στα μολυσμένα κύτταρα επιθηλίου (34). Η πρωτεΐνη E4 του γονότυπου HPV-1 έχει ταυτοποιηθεί ως πρωτεΐνη που σχηματίζει δάκτυλα ψευδαργύρου. Έχει παρατηρηθεί ότι οι αλληλουχίες DNA των διαφόρων γονοτύπων που κωδικοποιούν για την E4, δεν παρουσιάζουν μεγάλη ομολογία (35).

1.5.4 Ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης E5

Έχει μελετηθεί περισσότερο το Α.Π.Α.-E5 των ιών παπιλώματος βοοειδών (BPV) και έχει διαπιστωθεί ότι κωδικοποιεί για μια μικρού μεγέθους πρωτεΐνη (44 αμινοξέα), που έχει ιδιότητες

μετασχηματισμού σε καλλιεργούμενα κύτταρα. Πρόκειται για πολύ μικρή μεβρανο-δεσμευόμενη πρωτεΐνη που έχει λειτουργία σταθεροποίησης και ενεργοποίησης των κυττάρου επιφανειακών υποδοχέων (Dario Greco). Επίσης η πρωτεΐνη E5 του ιού BPV σχηματίζει σύμπλοκο με τη μεμβρανική υπομονάδα της ATPάσης 16kd καθώς και με άλλους υποδοχείς παραγόντων ανάπτυξης του κυττάρου όπως του επιθηλιακού αυξητικού παράγοντα (Epidermal Growth Factor: EGF) και του αποικιοδιεγερτικού παράγοντα 1 (Colony Stimulating Factor -1: CSF-1). Η πρωτεΐνη E5 του γονότυπου HPV-16 έχει χαμηλή ενεργότητα μετασχηματισμού (36). Σε χαμηλού βαθμού νεοπλασίες του γεννητικού συστήματος έχουν ανιχνευθεί μεγάλες ποσότητες mRNA E5 και πρωτεΐνης E5 (37). Είναι πιθανόν η πρωτεΐνη E5 να παίζει σημαντικό ρόλο στα πρώτα στάδια της μόλυνσης HPV, ενώ είναι λιγότερο απαραίτητη για τη διατήρηση του καρκινικού φαινοτύπου. Η πρωτεΐνη E5 σχηματίζει σύμπλοκα με τους υποδοχείς των παραγόντων EGFR προκαλώντας υπερέκφραση του μονοπατιού του που έχει σαν αποτέλεσμα την σύνθεση DNA (38,39). Έτσι, υπερέκφραση του μονοπατιού μεταγωγής σήματος του EGFR έχει συνδεθεί άμεσα με τη δημιουργία καρκίνου (40)

1.5.5 Ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης E6

Το γονίδιο E6 κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη 151 αμινοξέων, περιέχει τέσσερα μοτίβα αλληλουχιών Cys-X-X-Cys προς το καρβοξυτελικό άκρο που σχηματίζουν δύο δακτύλιους ψευδαργύρου και η ακεραιότητά της είναι πολύ σημαντική για τη λειτουργία του E6 γονιδίου. (41)

Η πρωτεΐνη E6 χαρακτηρίζεται από την υψηλή μετασχηματιστική της ενεργότητα. Μαζί με την πρωτεΐνη E7 είναι υπεύθυνη για την αθανатоποίηση ανθρωπίνων κερατινοκυττάρων(42). Αξιοσημείωτη είναι η παρατήρηση ότι η πρωτεΐνη E6 είναι ικανή να μετασχηματίσει, απουσία της E7, καλλιεργούμενα κύτταρα από ανθρώπινο μαστό (43).

Η E6 ογκοπρωτεΐνη παρουσιάζει ομοιότητα με την Ad5E1B55K πρωτεΐνη και το μεγάλο αντιγόνο του ιού SV40 (SV40 TAg) ως προς την ικανότητα δημιουργίας συμπλόκου με την πρωτεΐνη p53 (44). Η πρωτεΐνη αυτή είναι προϊόν του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53 λειτουργεί ως μεταγραφικός παράγοντας,

ρυθμίζοντας τον κυτταρικό κύκλο και καταστέλλοντας τη δημιουργία όγκων. Είναι υπεύθυνη για τη μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου p21, η έκφραση του οποίου έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της σύνθεσης των κυκλινο-εξαρτωμένων κινασών (cdKs) με επακόλουθο την παραμονή του κυττάρου στην G1 φάση. Ο ρόλος της E6 ογκοπρωτεΐνης εντοπίζεται σ' αυτό το σημείο, όπου η δημιουργία συμπλόκου με την πρωτεΐνη p53 οδηγεί στην αποικοδόμηση της τελευταίας μέσω πρωτεολυτικού συστήματος που εξαρτάται από την κυτταρική ουμπικιτίνη (45)

Σε E6-αθανατοποιημένα κύτταρα ή HPV- θετικά καρκινικά κύτταρα τραχήλου μήτρας παρατηρείται μείωση της έκφρασης p53 2 ως 3 φορές σε σχέση με τα πρωτογενή κύτταρα, καθώς επίσης ο ο χρόνος ημίσειας ζωής της p53 μειώνεται από 3h σε 20' στα ανθρώπινα κερατινοκύτταρα που εκφράζουν την πρωτεΐνη E6 (46).

Η αποικοδόμηση της πρωτεΐνης p53 από την παρουσία της πρωτεΐνης E6, φαίνεται να είναι ο κύριος παράγοντας της χρωμοσωμικής αστάθειας και της εξέλιξης προκαρκινικών αλλοιώσεων σε κακοήθειες (47).

1.5.6 Ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης E7

Η πρωτεΐνη E7 είναι μια μικρή, πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη 98 αμινοξέων, πλούσια σε κυστεΐνη, που περιέχει δύο μοτίβα αλληλουχιών Cys-X-X-Cys στο καρβοξυτελικό άκρο τα οποία εμπλέκονται στο σχηματισμό δακτυλίου ψευδαργύρου (48). Το προϊόν του γονιδίου E7, έχει λειτουργικές ομοιότητες με το προϊόν 125E1A του αδενοϊού (Ad), αφού είναι δυνατό να ενεργοποιήσει τον E2 (Ad) υποκινητή και να επάγει σύνθεση του DNA σε κύτταρα που βρίσκονται σε ηρεμία. Επιπλέον η E7 μπορεί να δράσει συνεργιστικά με ενεργοποιημένο ras ογκογονίδιο και να μετασχηματίσει πρωτογενή νεφρικά κύτταρα αρουραίου (35). Επιπλέον η ογκοπρωτεΐνη E7 παρουσιάζει ομοιότητα αλληλουχίας με τμήματα των πρωτεϊνών E1A του αδενοϊού και του μεγάλου T αντιγόνου του ιού SV40. Οι συντηρημένες περιοχές των πρωτεϊνών αυτών συνδέονται με κυτταρικές πρωτεΐνες, μια εκ των οποίων είναι το προϊόν του ογκοκασταλτικού γονιδίου του ρετινοβλαστώματος Rb.

Η πρωτεΐνη E7 στους HPV γονότυπους «υψηλού κινδύνου» σχηματίζει ισχυρά σύμπλοκα με την πρωτεΐνη Rb, γεγονός που αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για τη μετασχηματιστική της ενεργότητα. Αντίθετα στους γονότυπους «χαμηλού κινδύνου» ο δεσμός αυτός είναι λιγότερο σταθερός (35).

Εκτός από την περιοχή δέσμευσης με την pRb, έχουν ταυτοποιηθεί και άλλα τμήματα του μορίου της E7 απαραίτητα για την αλληλεπίδραση με κυτταρικούς παράγοντες, όπως ο TBP (TATA-binding protein) (49). Το E7 μαζί με το E6 γονίδιο στους «υψηλού κινδύνου» HPV γονότυπους, μεταγράφονται από κοινό υποκινητή, P97 για τον HPV-16 και HPV-31 και p105 για τον HPV-18. Η ενεργότητα του υποκινητή ρυθμίζεται από μεταγραφικούς παράγοντες που δρουν στην LCR περιοχή. Ο παράγοντας AP1 φαίνεται να είναι ο πιο κοινός μεταξύ των HPV γονότυπων. Παράλληλα απαιτείται η συνεργασία, με ειδικούς για κάθε τύπο HPV κυτταρικούς παράγοντες, για την ενεργοποίηση των E6/E7 γονιδίων (50).

Η έκφραση της E7 ογκοπρωτεΐνης οδηγεί στην κατάργηση διαφόρων αρνητικών ρυθμιστικών σιγιάλων του κυτταρικού κύκλου, με αποτέλεσμα τελικώς διαφοροποιημένα κύτταρα, να συνεχίζουν να διαιρούνται. Έχει παρατηρηθεί ότι σε κερατινοκύτταρα που εκφράζουν την HPV-16 E7 ογκοπρωτεΐνη, ο cdK αναστολέας p21^{cip1} αλληλεπιδρά με την E7 και καταργείται η σύνδεσή του με τις κυκλίνες A και E, ώστε να μην αναστέλλεται η ενεργότητα των τελευταίων, γεγονός που επιτρέπει τη σύνθεση κυτταρικού DNA στα διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα (51). Επίσης η αλληλεπίδραση της E7 με τον p21, καταργεί την αναστολή της PCNA εξαρτωμένης αντιγραφής του κυτταρικού DNA (52).

1.6 Όψιμη περιοχή

1.6.1 Ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης L1

Κωδικοποιεί για την κυρία πρωτεΐνη (55kd) του ώριμου ιικού καψιδίου, που έχει εικοσαεδρική διάταξη. Η δομή αυτή είναι παρόμοια με εκείνη των ιών πολυώματος (Polyomaviruses) και σχηματίζεται από 72 πενταμερή κασομερίδια, που το καθένα αποτελείται από πέντε μόρια πρωτεΐνης L1 (53). Μελέτες σε συστήματα *in vitro* υποστηρίζουν ότι οι πρωτεΐνες L1

είναι ικανές να σχηματίσουν ιικά σωματίδια, χωρίς τη συμμετοχή της πρωτεΐνης L2 (35). Το πολυπεπτίδιο L1 του γονότυπου HPV-16 περιέχει 4 θέσεις γλυκοζυλίωσης.

1.6.2 Ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης L2

Κωδικοποιεί για τη δεύτερη πρωτεΐνη του ιικού καψιδίου, της οποίας η στερεοδιάταξη δεν είναι απόλυτα γνωστή. Ο ρόλος της πρωτεΐνης φαίνεται να είναι η διατήρηση της σταθερότητας της δομής του καψιδίου (54,55)

1.6.3 Ρυθμιστική περιοχή

Η ρυθμιστική περιοχή των περισσότερων γονοτύπων που μολύνουν το γεννητικό επιθήλιο έχει μέγεθος 800-900 ζεύγη βάσεων ενώ εκείνη των γονοτύπων που ανιχνεύεται σε δυσπλασίες της επιδερμίδας (αλλοιώσεις EV) είναι συχνά μικρότερη. Μέσα σε αυτή την περιοχή cis-ενεργά στοιχεία ρυθμίζουν τη μεταγραφή των γονιδίων E6 και E7, που ευθύνονται για το μετασχηματισμό των κυττάρων και τη διατήρηση του φαινοτύπου της κακοήθειας (56).

Ένας μεγάλος αριθμός κυτταρικών παραγόντων μεταγραφής έχει αποδειχθεί ότι προσδένεται στη ρυθμιστική περιοχή των γονιδίων των «υψηλής ογκογεννητικότητας» γονοτύπων, όπως οι NF-1, AP-1, KRF-1, Oct-1, SP-1, YY-1 και ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών (GR receptor). Η δυσλειτουργία των κυτταρικών αυτών παραγόντων μεταγραφής φαίνεται ότι παίζει καθοριστικό ρόλο στην έκφραση της ογκογεννητικότητας των τύπων HPV (76). Ένας άλλος κυτταρικός ρυθμιστικός παράγοντας, ο Eroc-1/Skn 1^α, προσδένεται στη ρυθμιστική περιοχή του ιού ελέγχοντας τη μεταγραφή του σε παραβατικά κύτταρα. Οι περισσότεροι από αυτούς τους κυτταρικούς παράγοντες μεταγραφής δεσμεύονται στο κεντρικό τμήμα της ρυθμιστικής περιοχής του ιού και επάγουν τη λειτουργία του υποκινητή των γονιδίων E6 και E7, ενώ μερικοί παράγοντες έχουν διπλή δράση, είτε διεγείροντας, είτε καταστέλλοντας τη λειτουργία του υποκινητή (YY-1).

Εκτός από τη ρύθμιση της ενεργότητας των γονιδίων E6 και E7 από κυτταρικούς παράγοντες, συμβαίνει και ενδογενωμική ρύθμιση της μεταγραφής από την πρωτεΐνη E2 του ιού. Η ρυθμιστική περιοχή του γονότυπου HPV-16 περιέχει τέσσερις θέσεις πρόσδεσης της πρωτεΐνης E2 στην αλληλουχία ACCN₆GGT: (57)

A) μια στο 5' άκρο, σχηματίζοντας το τελικό μέρος της ρυθμιστικής περιοχής και το κωδικόνιο λήξης της μεταγραφής του γονιδίου L1.

B) στο κεντρικό τμήμα της ρυθμιστικής περιοχής εντοπίζεται μια θέση πρόσδεσης της πρωτεΐνης E2 στο 3' άκρο που ρυθμίζει την έναρξη της αντιγραφής και επάγει την αντιγραφή των γονιδίων E6 και E7.

Γ) στο κεντρικό τμήμα της ρυθμιστικής περιοχής εντοπίζεται και μια θέση πρόσδεσης της πρωτεΐνης E2 στο 5' άκρο κοντά στο κωδικόνιο έναρξης της μεταγραφής του γονιδίου E6.

Δ) μια ακόμα κοντά σε αλληλουχία TATA

1.7 Τύποι κυτταρικών αλλοιώσεων

Κυτταρικές αλλοιώσεις ASCUS (Atypical squamous cells of underestimat significance)

Όπως αναφέρεται και στο όνομα των συγκεκριμένων αλλοιώσεων ο όρος αναφέρεται σε άτυπα κύτταρα απροσδιορίστου σημασίας. Συνήθως είναι χαμηλού βαθμού επικινδυνότητας και αποτελούν μη φυσιολογικά κύτταρα που μπορεί να καλύπτουν το μεγαλύτερο μέρος του εξωτραχήλου της μήτρας (πλακώδη κύτταρα- ASCUS) είτε να καλύπτουν το εξωτραχηλικό στόμιο και τον αυλό του ενδοτράχηλου της μήτρας (αδενικά κύτταρα- ASCUS). Η αιτία εμφάνισης των συγκεκριμένων αλλοιώσεων είναι συχνά απροσδιόριστη. Μπορεί να οφείλονται σε μικροβιακές, ορμονικές, τυχαίες ή και ιογενής αιτίες. Ωστόσο, χρήζουν περαιτέρω έρευνας και επανάληψη του test Παπανικολάου ύστερα από μερικούς μήνες.

Κυτταρικές αλλοιώσεις LSIL (Low-Grade squamous intraepithelial lesion)

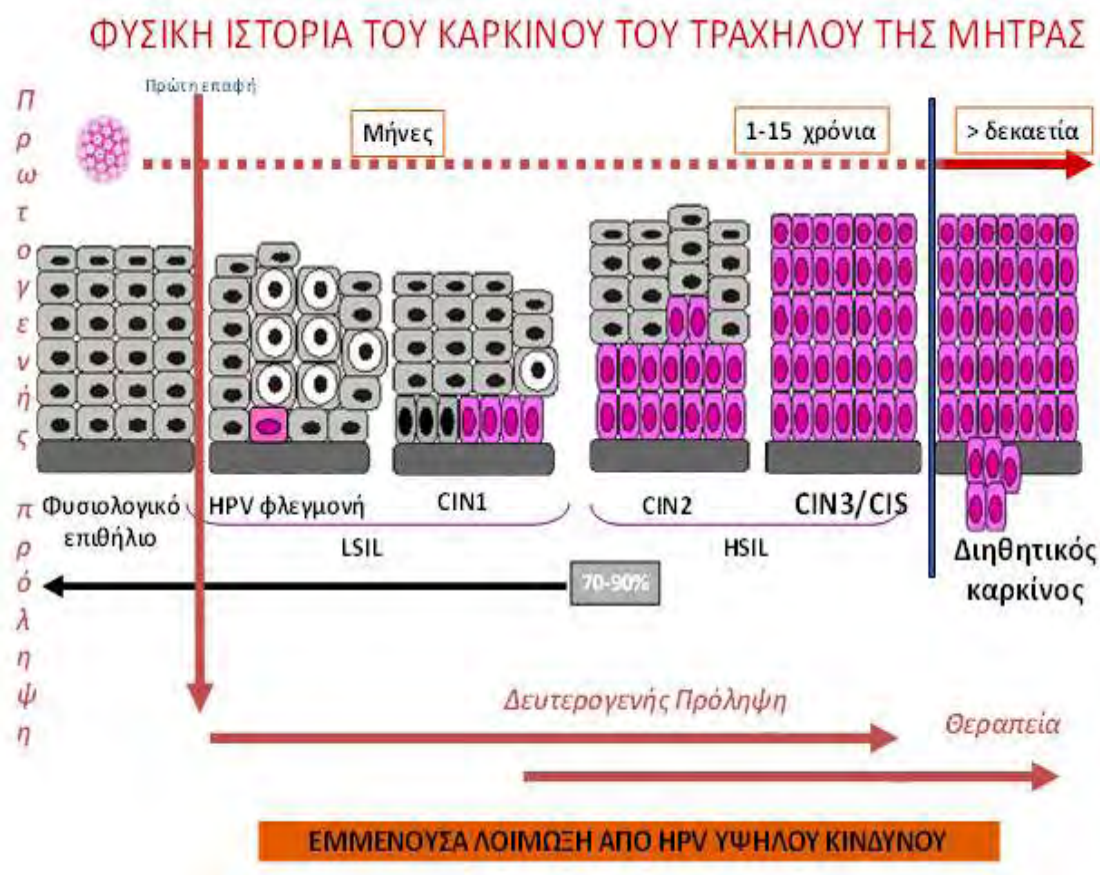
Ο όρος LSIL αναφέρεται σε κυτταρολογικές αλλοιώσεις που είναι συμβατές με HPV λοίμωξη και ενδοεπιθηλιακή αλλοίωση πρώτου βαθμού (CIN 1). Οι περισσότερες από αυτές τις χαμηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακών αλλοιώσεων οφείλονται στον ιό HPV και χρήζουν λεπτομερέστερης ανάλυσης του δείγματος.

Κυτταρικές αλλοιώσεις ASCH

Αποτελούν κυτταρικές αλλοιώσεις που συνήθως αναφέρονται σε προκαρκινική βλάβη, χωρίς όμως να μπορεί να προσδιοριστεί ο βαθμός της.

Κυτταρικές αλλοιώσεις HSIL: (High-Grade squamous intraepithelial lesion)

Ο όρος HSIL αναφέρεται σε κυτταρικές αλλοιώσεις συμβατές με υψηλού βαθμού τραχηλική ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία. (CIN 2,3).



Εικόνα 3: Στην εικόνα παρατηρούμε τα στάδια της καρκινικής αλλοίωσης στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Πως δηλαδή το φυσιολογικό επιθήλιο

μετατρέπεται σε διηθητικό καρκίνο ύστερα από χρόνια λοίμωξη από HPV ιό υψηλού κινδύνου.

2.0 Μέθοδοι ανίχνευσης του ιού HPV

Ο ιός HPV δεν μπορεί να καλλιεργηθεί σε συμβατικές κυτταροκαλλιέργειες και οι ορολογικές δοκιμασίες έχουν περιορισμένη ακρίβεια. Η λοίμωξη από τον ιό HPV ακολουθείται από χυμική ανοσιακή απάντηση του ξενιστή έναντι στην μείζονα πρωτεΐνη του καψιδίου L1 και τα αντισώματα παραμένουν ανιχνεύσιμα για πολλά έτη (58). Έτσι, δεν είναι δυνατό να διακριθεί η παρούσα από μια παρελθούσα HPV λοίμωξη. Επομένως, η ακριβής διάγνωση της HPV λοίμωξης βασίζεται στην ανίχνευση του ιικού νουκλεϊκού οξέος. Οι μέθοδοι ανίχνευσης του ιού HPV διακρίνονται στις μεθόδους ανίχνευσης του στόχου και στις μεθόδους ανίχνευσης του σήματος (59).

2.1 Μέθοδοι ενίσχυσης του στόχου

Σε αυτή την κατηγορία υπάρχουν διαφορετικές μέθοδοι με κοινό στοιχείο την ενίσχυση διαφορετικών περιοχών του ιικού γονιδιώματος μέσω της PCR.

2.1.1 PCR με χρήση εκκινητών συναίνεσης (consensus primers)

Στις περισσότερες μεθόδους ανίχνευσης του ιού HPV, ένα ευρύ φάσμα των τύπων του ιού ενισχύεται με χρήση εκκινητών συναίνεσης, η οποία ακολουθείται από ανίχνευση με τυπο-ειδικούς ανιχνευτές. Οι εκκινητές συναίνεσης στοχεύουν σε μια περιοχή του γονιδιώματος που είναι διατηρημένη μεταξύ των διαφόρων τύπων των ιών HPV. Καθώς η περιοχή L1 είναι το περισσότερο διατηρημένο τμήμα του γονιδιώματος, συνήθως τα ζεύγη των εκκινητών συναίνεσης στοχεύουν σε αυτή την περιοχή. Οι εκκινητές συναίνεσης μπορεί να είναι εκφυλισμένοι, όπως στα

συστήματα MY09/11 και CPI/II (60) Εναλλακτικά, οι εκκινητές μπορεί να περιέχουν μη ομόλογες περιοχές, αποδεκτές όμως κάτω από συνθήκες PCR χαμηλής αυστηρότητας (σύστημα GP5+/6+). Επίσης, μπορεί να περιέχουν βάσεις ινοσίνης σε διφορούμενες (ambiguous) θέσεις βάσεων (συστήματα IU/IWDO (61) και SPF (62) ή ζεύγη αλληλοεπικαλυπτόμενων εκκινητών (συστήματα PGMV (63) και AmpliCor (64).

2.1.2 Τυπο-ειδική PCR

Για την ανίχνευση κάποιου συγκεκριμένου τύπου ιού HPV μπορεί να χρησιμοποιηθεί η τυπο-ειδική PCR. Ιδιαίτερη φροντίδα θα πρέπει να ληφθεί ώστε να επιλεγούν οι πλέον μεταβλητές περιοχές της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του συγκεκριμένου τύπου, ώστε να αποκλειστούν οι πιθανότητες υβριδισμού σε ομόλογες περιοχές άλλου τύπου.

Επιβεβαίωση της ειδικότητας της τυπο-ειδικής PCR μπορεί να γίνει είτε με υβριδισμό φίλτρου (κανονικό ή αντίστροφο) είτε με EIA, καθώς και με PCR πραγματικού χρόνου (real-time PCR, Q-PCR) (65,66,67). Ένα μεγάλο πλεονέκτημα της real-time PCR είναι η δυνατότητα ποσοτικοποίησης του ιού HPV στο δείγμα. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η ποσότητα του ιού HPV υψηλού κινδύνου που είναι παρούσα σε ένα τραχηλικό επίχρισμα (ιικό φορτίο), όπως μπορεί να μετρηθεί με PCR πραγματικού χρόνου, είναι ενδεικτική για την παρουσία ή την ανάπτυξη τραχηλικής κακοήθειας (68,69,70,71,72). Εντούτοις, για την επίτευξη αξιόπιστων δεδομένων ποσοτικοποίησης απαιτείται απομόνωση του DNA, γεγονός που αυξάνει τον φόρτο εργασίας.

2.1.3 Ενίσχυση του ιικού mRNA

Πολλές πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η ανάλυση των ιών HPV υψηλού κινδύνου μπορεί να γίνει μέσω της ανίχνευσης του ιικού mRNA και ιδιαίτερα των περιοχών εκείνων που κωδικοποιούν για τις ογκοπρωτεΐνες E6 και E7. Πιστεύεται ότι η παρουσία του ιικού E6 και E7 mRNA στα τραχηλικά επιχρίσματα έχει καλύτερη θετική προγνωστική αξία για τις υψηλού βαθμού κακοήθειες συγκριτικά με την ανίχνευση της παρουσίας του ιικού DNA, καθώς

η παρουσία του συγκεκριμένου mRNA υποδηλώνει ενεργό μόλυνση με κυτταρο-μετασχηματιστικό δυναμικό, ενώ το ιικό DNA μπορεί να είναι παρόν κάτω από συνθήκες που δεν παρουσιάζουν κλινικό ενδιαφέρον.

Η ανίχνευση του ιικού mRNA σε τραχηλικά επιχρίσματα μπορεί να γίνει με RT-PCR (73) ή με ενίσχυση του νουκλεϊκού οξέος βασισμένη στην αλληλουχία (nucleic acid sequence-based amplification, NASBA). Εναλλακτικά, μπορεί να γίνει ανίχνευση των μεταγράφων που προκύπτουν από τη σύντηξη του ιικού γονιδιώματος με αυτό του ξενιστή, μετά την ενσωμάτωση του ιού στο ανθρώπινο γενετικό υλικό (amplification of papillomavirus oncogene transcripts, μέθοδος APOT) (74). Παρότι η μέθοδος αυτή απαιτεί μεγαλύτερο φόρτο εργασίας και κόστος, εντούτοις προσφέρει πληροφορίες που δεν παρέχονται με τις άλλες τεχνικές. Συγκεκριμένα, αφενός αποκαλύπτει την ιική ενσωμάτωση στο DNA του ξενιστή και αφετέρου επιτρέπει την ταυτοποίηση συγκεκριμένων μεταγράφων που προκύπτουν από τη σύντηξη αυτή, βοηθώντας στην παρακολούθηση των τραχηλικών αλλοιώσεων και τη διαφοροδιάγνωση μεταξύ υποτροπής ή επαναλοίμωξης από άλλο ιικό στέλεχος.

2.1.4 Ανάλυση της αλληλουχίας του HPV DNA

Η μέθοδος αυτή είναι ιδιαίτερα αξιόπιστη όταν μόνον ένας ή δύο τύποι του ιού είναι παρόντες στο υλικό. Στην περίπτωση ταυτόχρονης παρουσίας πολλών γονοτύπων στο κλινικό δείγμα η ταυτοποίηση είναι πολύ δύσκολη.

2.1.5 Μικροσυστοιχίες DNA

Η μέθοδος αυτή έχει αναπτυχθεί πολύ πρόσφατα και χάρη στη μεγάλη ακρίβεια και αξιοπιστία της είναι πιθανό να υποκαταστήσει στο άμεσο μέλλον ένα μεγάλο μέρος των υπαρχουσών μεθόδων. Σήμερα, μπορεί να ανιχνεύσει ταυτόχρονα 35 διαφορετικούς τύπους του ιού, ενώ στο άμεσο μέλλον πιστεύεται ότι θα μπορεί να ανιχνεύσει το σύνολο των γνωστών τύπων του ιού, ενώ

ταυτόχρονα θα μπορεί να υπολογίζει και το ιικό φορτίο. Η τεχνική αυτή βασίζεται στην PCR μετά από ενίσχυση του γονιδιώματος του ιού και υβριδισμό με τυπο-ειδικά νουκλεοτίδια, τα οποία έχουν ακινητοποιηθεί σε στερεά φάση.

2.2 Μέθοδοι ενίσχυσης του σήματος

2.2.1 Υγρής φάσης

Η πλέον γνωστή τεχνική σε αυτή την κατηγορία είναι η εμπορικά διαθέσιμη,εγκεκριμένη από τον FDA, μέθοδος του Hybrid Capture 2 (HC2) (75). Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιεί ένα μείγμα από ανιχνευτές RNA που αντιστοιχούν στους τύπους ιών HPV υψηλού κινδύνου 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 και 68. Πριν από την ανάλυση, τα κλινικά δείγματα μετουσιώνονται. Η ανίχνευση του υβριδισμού του ανιχνευτή με το DNA του ιού HPV που βρίσκεται στα δείγματα γίνεται με αντισώματα σημασμένα με υπεροξειδάση, τα οποία αναγνωρίζουν το υβρίδιο RNA/DNA και εντοπίζονται με χημειοφωταύγεια. Η αναλυτική ευαισθησία της μεθόδου σύμφωνα με τις πληροφορίες που δίνονται στον ηλεκτρονικό ιστότοπο της κατασκευάστριας εταιρείας, αντιστοιχεί σε περίπου 5000 αντίγραφα του γονιδιώματος του ιού HPV. Έχουν αναφερθεί ψευδώς θετικά αποτελέσματα λόγω διασταυρούμενης αντίδρασης των ανιχνευτών HC2 με στελέχη ιών HPV τα οποία δεν αντιπροσωπεύονται στο μείγμα των ανιχνευτών, συμπεριλαμβανομένων και ιών HPV χαμηλού κινδύνου (76).

2.2.2 Μορφολογική

Η τεχνική αυτή βασίζεται στον υβριδισμό in situ σε κυτταρολογικά (77,78) ή ιστολογικά παρασκευάσματα (79). Η μέθοδος εμφανίζει μεγάλη ευαισθησία, αλλά είναι αρκετά επίπονη ώστε να χρησιμοποιηθεί σε δοκιμές μεγάλης κλίμακας για τον ιό HPV.

2.2.3 Κλινικό δείγμα για την ανίχνευση του ιού HPV

Το είδος του διαθέσιμου κλινικού παρασκευάματος καθορίζει και την επιλογή της μεθόδου ανίχνευσης του ιού. Οι περισσότερες μέθοδοι που αναφέρθηκαν μπορούν να πραγματοποιηθούν με

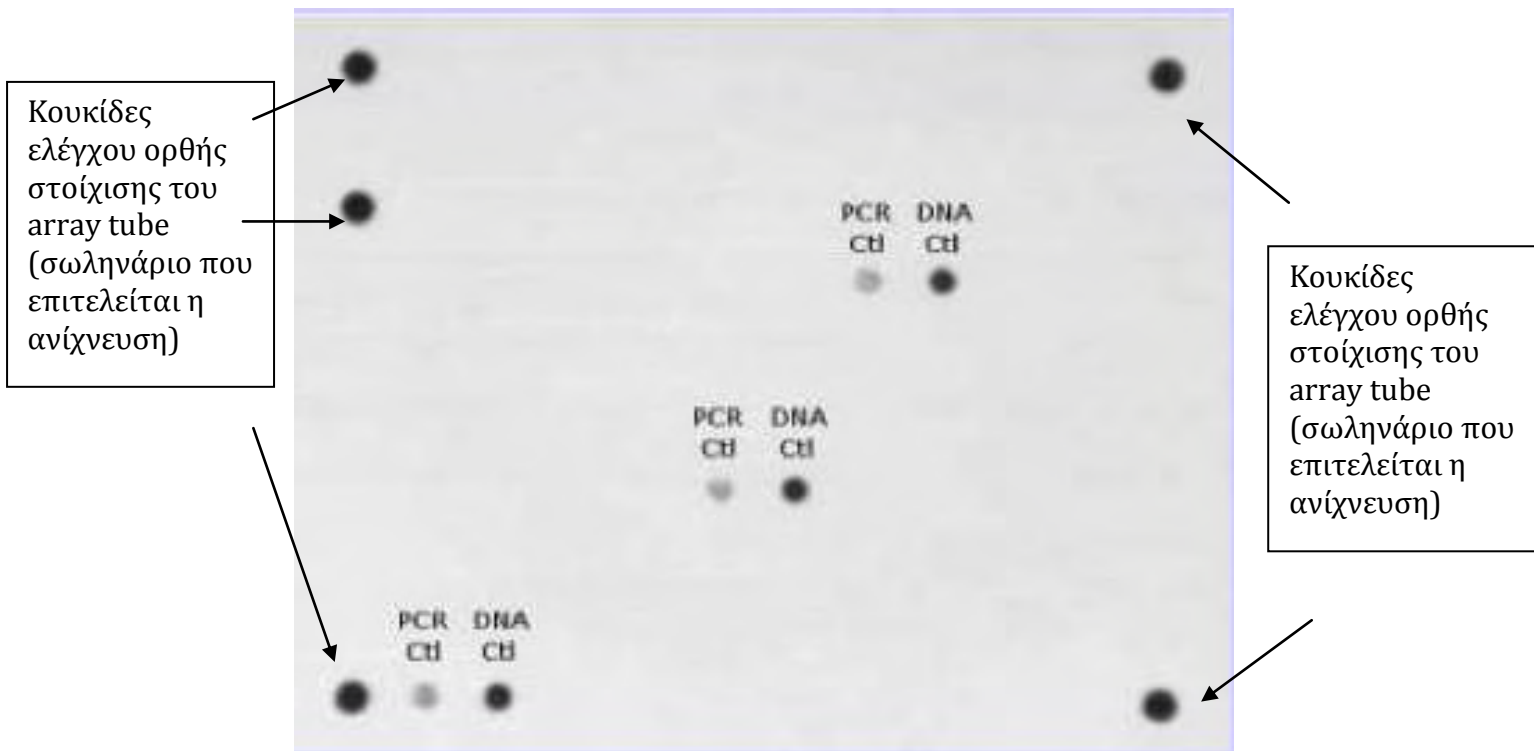
κάθε τύπου κλινικό υλικό, όπως τομές παραφίνης και τραχηλικά επιχρίσματα από test-Pap.

3.1 Τεχνικές που μελετήθηκαν

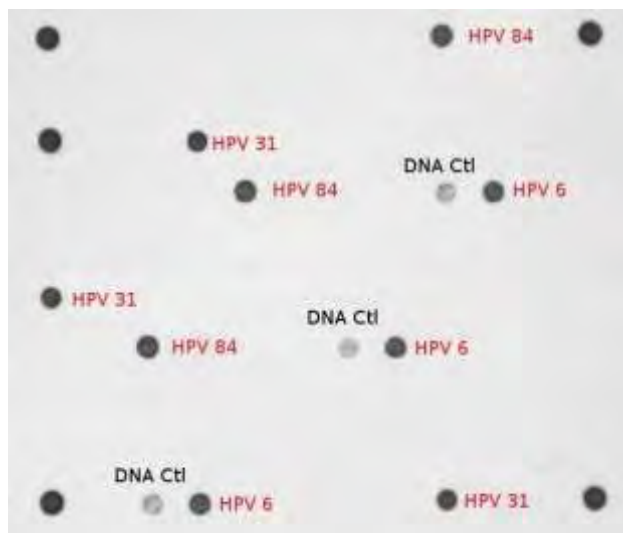
3.1.1 Τεχνική μικροσυστοιχιών

Η πρώτη μέθοδος που εφαρμόστηκε ήταν αυτή της ανίχνευσης των διαφόρων τύπων του ιού HPV μέσω μεθόδου γραμμικών μικροσυστοιχιών. Η μέθοδος αυτή έχει αναπτυχθεί πολύ πρόσφατα και χάρη στη μεγάλη ακρίβεια και αξιοπιστία της είναι πιθανό να υποκαταστήσει στο άμεσο μέλλον ένα μεγάλο μέρος των υπάρχουσων μεθόδων. Σήμερα, μπορεί να ανιχνεύσει ταυτόχρονα 35 διαφορετικούς τύπους του ιού, ενώ στο άμεσο μέλλον πιστεύεται ότι θα μπορεί να ανιχνεύσει το σύνολο των γνωστών τύπων του ιού. Η τεχνική αυτή βασίζεται στην PCR μετά από ενίσχυση του γονιδιώματος του ιού και υβριδισμό με τυποειδικά νουκλεοτίδια, τα οποία έχουν ακινητοποιηθεί σε στερεά φάση. Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκε το kit Clart Human Papillomavirus 2 της εταιρείας Genomica. Η τεχνική βασίζεται:

- Σε μια αντίδραση PCR υψηλής ευαισθησίας και ειδικότητας σε μία πολύ συντηρημένη περιοχή 450bp της L1 περιοχής του ιού. Οι θέσεις πρόσδεσης των εκκινητών δεν αναφέρονται στο συνοδευτικό έντυπο της κατασκευάστριας εταιρείας.
- Στην υβριδοποίηση PCR προϊόντων με τη χρήση της τεχνολογίας των μικροσυστοιχιών μικρής πυκνότητας



Εικόνα 4: Τυπική εικόνα μικροσυστοιχιών αρνητικού δείγματος για την ύπαρξη γενώματος των τύπων 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 61, 62, 66, 68, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84, 85 και 89 του HPV. Οι έντονες κουκίδες αποτελούν την επιβεβαίωση της ύπαρξης γενωμικού DNA στο υπό εξέταση δείγμα η οποία προκύπτει από την ενίσχυση τμήματος του ανθρώπινου γονιδίου CFTR. Οι ασθενέστερες κουκίδες αποτελούν την επιβεβαίωση της ορθής λειτουργίας του PCR και επομένως τον αποκλεισμό της ύπαρξης αναστολέων κατά την αντίδραση.



Εικόνα 5: Τυπική εικόνα μικροσυστοιχιών για θετικό σε πολλαπλή λοίμωξη από HPV δείγμα στα στελέχη HPV 6, HPV 31, HPV 84. Όταν υπάρχει ιικό DNA στο δείγμα δίδεται πλεονέκτημα στην ενίσχυση αυτού σε σχέση με το

γενωμικό DNA και για το λόγο αυτό παρατηρούνται ασθενέστερες οι κουκίδες του DNA CtI σε σχέση με την εικόνα 4. Παράλληλα στην παρούσα εικόνα φαίνονται οι κουκίδες που σχετίζονται με τη στοίχιση του array tube όπως περιγράφεται στην εικόνα 4.

3.1.2 Τεχνική invader signal amplification

Η δεύτερη μέθοδος που μελετήθηκε ήταν αυτή του invader signal amplification χρησιμοποιώντας το kit της εταιρείας Cervista. Το συγκεκριμένο τεστ χρησιμοποιεί τη χημεία Invader®, μια μέθοδο ενίσχυσης σήματος για την ανίχνευση συγκεκριμένων αλληλουχιών νουκλεϊνικών οξέων που βασίζεται στην ενζυματική δράση της νουκλεάσης Cleavase® (Hologic™, Inc). Η μέθοδος χρησιμοποιεί δύο τύπους ισοθερμικών αντιδράσεων: την πρώτη, που λαμβάνει χώρα επί της αλληλουχίας-στόχο και τη δεύτερη η οποία παράγει φθορισμό.

Κατά την πρώτη αντίδραση συμμετέχουν δύο ολιγονουκλεοτίδια. Ο ανιχνευτής της αλληλουχίας στόχου και ένα ειδικό Invader ολιγονουκλεοτίδιο. Ο ανιχνευτής εντοπίζει την αλληλουχία στόχο και προσδένεται σε αυτήν. Το Invader ολιγονουκλεοτίδιο προσδένεται και αυτό στην αλληλουχία στόχο. Όταν τα δύο αυτά ολιγονουκλεοτίδια αλληλοεπικαλύπτονται σε τουλάχιστον μία νουκλεοτιδική θέση στην αλληλουχία-στόχο, τότε δημιουργείται μια «δομή εισβολής» (invasive structure) την οποία αναγνωρίζει και χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα η νουκλεάση Cleavase η οποία το αποκόπτει δημιουργώντας τμήματα λίγων βάσεων. Έτσι σε πολλούς κύκλους της αντίδρασης δημιουργούνται αρκετά θραύσματα (Εικόνα 6). Στη δεύτερη αντίδραση αυτά τα ολιγονουκλεοτίδια που προκύπτουν προσδένονται σε ένα ειδικό σημασμένο ανιχνευτή. Ακολούθως το σύμπλοκο αναγνωρίζεται και πάλι από την cleavase η οποία τα αποκόπτει. Κατά την αντίδραση αυτή παράγεται φθορισμός τον οποίο εμείς ανιχνεύουμε (Εικόνα 7). Ο εσωτερικός μάρτυρας του Cervista HR test δημιουργεί κόκκινο φθορισμό όταν υπάρχει αρκετή ποσότητα DNA στο δείγμα και πράσινο φθορισμό όταν ανιχνευθεί η παρουσία ενός ή περισσότερων HR HPV γονότυπων στο δείγμα.

Το υπό διερεύνηση δείγμα ελέγχεται χρησιμοποιώντας τρία μίγματα ολιγονουκλεοτιδίων που ανιχνεύουν τους προαναφερθέντες 14 HR HPV τύπους και είναι ομαδοποιημένα ανάλογα με τη φυλογενετική τους συσχέτιση. Σε κάθε ένα από τα χρησιμοποιούμενα μίγματα, περιέχεται και ιχνηθέτης που προσδένεται στο γονίδιο της ανθρώπινης ιστόνης 2 και αποτελεί τον εσωτερικό μάρτυρα της αντίδρασης για την παρουσία γενωμικού DNA στο υπό εξέταση δείγμα. Θετικό αποτέλεσμα υποδηλώνει την ύπαρξη τουλάχιστον ενός από τους 14 HR HPV και δίνεται ως σήμα φθορισμού που υπερβαίνει μια κατώφλια τιμή.

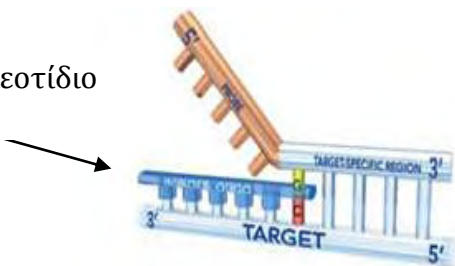
Μίγμα ολιγονουκλεοτιδίων	Στέλεχος HPV
A5_A6	51,56,66
A7	18,36,45,59,68
A9	16,31,33,35,52,58

Πίνακας 2: Στον πίνακα περιγράφεται το στέλεχος του HPV ιού που ανιχνεύει το κάθε μίγμα ολιγονουκλεοτιδίων, σύμφωνα με την φυλογενετική σχεδίαση του Cervista HR test



Ολιγονουκλεοτίδιο
Invader

Ανιχνευτής



Θέση
δράσης
Cleavease

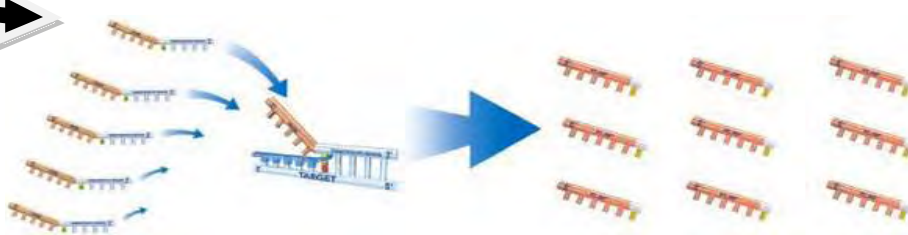


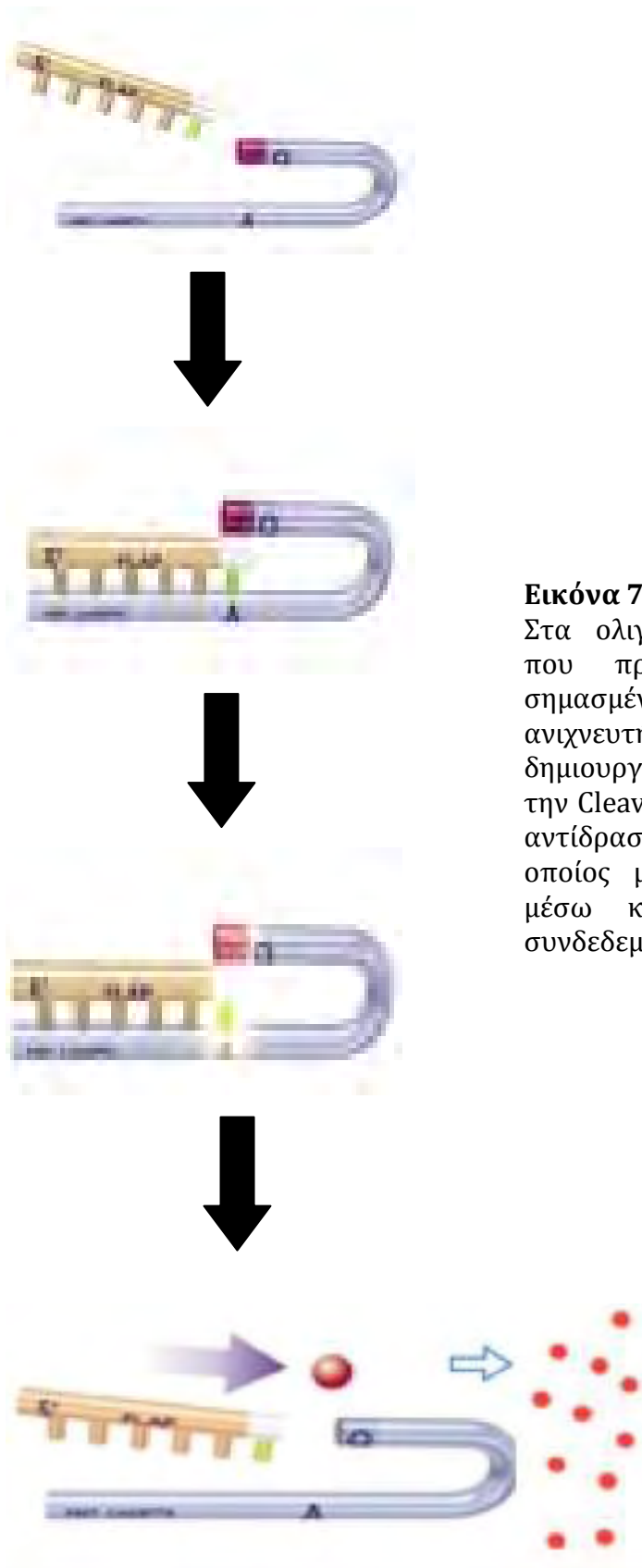
Εικόνα 6: Αντίδραση πρώτη:

Ο ανιχνευτής εντοπίζει την αλληλουχία στόχο και προσδένεται σε αυτήν.

Το Invader ολιγονουκλεοτίδιο προσδένεται και αυτό ειδικά στην αλληλουχία-στόχο. Η θέση που ο ανιχνευτής και το Invader ολιγονουκλεοτίδιο αλληλοεπικαλύπτονται, αναγνωρίζεται από την νουκλεάση Cleavease η οποία το αποκόπτει δημιουργώντας τμήματα λίγων βάσεων.

Έτσι σε πολλούς κύκλους της αντίδρασης δημιουργούνται αρκετά θραύσματα.





Εικόνα 7: Αντίδραση δεύτερη:

Στα ολιγονουκλεοτίδια σε υπερ-περίσσεια που προκύπτουν, προσδένεται ειδικός σημασμένος με φθορίζουσα χρωστική ανιχνευτής. Ακολούθως το σύμπλοκο που δημιουργείται αναγνωρίζεται και πάλι από την Cleavase η οποία το αποκόπτει. Κατά την αντίδραση αυτή παράγεται φθορισμός ο οποίος μετράται με κατάλληλο λογισμικό μέσω κλειστού συστήματος που είναι συνδεδεμένο με ηλεκτρονικό υπολογιστή.

4. Πειραματικό μέρος

4.1 Υλικά και μέθοδοι

Υλικά

Buffer T1 (Clart Human Papillomavirus 2 kit by Genomica)
Buffer B1 (Clart Human Papillomavirus 2 kit by Genomica)
Buffer B2 (Clart Human Papillomavirus 2 kit by Genomica)
Ένζυμο πρωτεϊνάση K (Clart Human Papillomavirus 2 kit by Genomica)
Buffer B5 (Clart Human Papillomavirus 2 kit by Genomica)
Buffer BE (Clart Human Papillomavirus 2 kit by Genomica)
Buffer Bw (Clart Human Papillomavirus 2 kit by Genomica)
Διάλλυμα υβριδισμού SH (Clart Human Papillomavirus 2 kit by Genomica)
Διάλλυμα καθαρισμού TL (Clart Human Papillomavirus 2 kit by Genomica)
Διάλλυμα CJ (Clart Human Papillomavirus 2 kit by Genomica)
Διάλλυμα RE (Clart Human Papillomavirus 2 kit by Genomica)
Διάλλυμα DC (Clart Human Papillomavirus 2 kit by Genomica)
Διάλλυμα ολιγονουκλεοτιδίων 1 (Cervista HPV HR kit)
Διάλλυμα ολιγονουκλεοτιδίων 2 (Cervista HPV HR kit)
Διάλλυμα ολιγονουκλεοτιδίων 3 (Cervista HPV HR kit)
Διάλλυμα ενζύμου Cleavase (Cervista HPV HR kit)
HPV Control (Cervista HPV HR kit)
Απεσταγμένο νερό
Αιθανόλη 95%
Διαλλυμα T1

Εξοπλισμός

Πιπέτες
Αποστειρωμένα γάντια
Συσκευή μικροσυστοιχιών
Φυγόκεντρος
Συσκευή πάγου
Eppendorf tubes
Thermoblock
Vortex

Ειδική συσκευή ανάγνωσης αποτελεσμάτων της Cervista
Ηλεκτρονικός υπολογιστής
Ειδικό λογισμικό για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων
Πλακέτα 96 πηγαδιών της Cervista
Cervista® HTA System

4.1.1 Βιολογικό υλικό

Τα πειράματα για την συγκεκριμένη εργασία πραγματοποιήθηκαν στο Κυτταρολογικό εργαστήριο του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου «Αττικόν». Στη πειραματική διαδικασία ελέγχθηκαν δείγματα 198 γυναικών διαφόρων ηλικιών με διαφορετική συχνότητα σεξουαλικών επαφών. Το κάθε δείγμα εξετάστηκε με την μέθοδο ανίχνευσης με μικροσυστοιχίες αλλά και με την μέθοδο invader signal amplification. Και οι δύο τεχνικές έγιναν τηρώντας με ακρίβεια τους κανόνες που έχουν θέσει οι δύο εταιρείες που παρασκευάζουν τα kit (Genomica, Cervista). Για το κάθε ένα από τα δείγματα είχε προηγηθεί κυτταρολογική εξέταση ώστε να διαπιστωθεί η ύπαρξη ή όχι κυτταρικής αλλοίωσης. Συγκεκριμένα στην πειραματική μας διαδικασία εξετάσαμε δείγματα με αρνητική κυτταρολογική διάγνωση, δείγματα με διάγνωση ASCUS, LSIL, ASCH, HSIL και τέλος δείγματα που είχε διαγνωσθεί η ύπαρξη καρκινικών αλλοιώσεων.

Αρνητική Κυτταρολ. διάγνωση	CLART RESULT	Cervista RESULT
s1892-11	33,51	A5_A6H
s1061-11	42,68,81	A7H
s1417-11	66	A5_A6H
s1881-11	31,71	A5_A6H
s868-11	16,18,31	A9H
s2075-11	16,31	A5_A6H,A9H
s1770-11	16,53	A9H
s27-12	06,11,16,59	A7H,A9H
s316-12	16,33	A9H
s1875-11	31,53	A5_A6H
s81-12	31,83	NEGATIVE
s1396-11	33	NEGATIVE
s114-12	62	NEGATIVE
s1424-11	16,59,61	NEGATIVE
s1883-11	31,51,53,58,61,71	NEGATIVE
s2132-11	33,51	NEGATIVE
s1752-11	82	NEGATIVE
s42-12	06	NEGATIVE
s1025-11	35,53	NEGATIVE

s1162-11	31	NEGATIVE
s1422-11	16,52,59	NEGATIVE
s1839-11	16,53	NEGATIVE
s1431-11	11,54	NEGATIVE
s1792-11	31	NEGATIVE
s346-11	40,42,61	NEGATIVE
1165-10	NEGATIVE	NEGATIVE
1143-10	NEGATIVE	NEGATIVE
1204-10	NEGATIVE	NEGATIVE
1220-10	NEGATIVE	NEGATIVE
1225-10	NEGATIVE	NEGATIVE
1132-10	NEGATIVE	NEGATIVE
1233-10	NEGATIVE	NEGATIVE
1236-10	NEGATIVE	NEGATIVE
1167-10	NEGATIVE	NEGATIVE
1173-10	NEGATIVE	NEGATIVE
1237-10	NEGATIVE	NEGATIVE
1238-10	NEGATIVE	NEGATIVE
1036-10	NEGATIVE	NEGATIVE
1221-10	NEGATIVE	NEGATIVE
1175-10	NEGATIVE	NEGATIVE
1259-10	NEGATIVE	NEGATIVE
1135-10	NEGATIVE	NEGATIVE
1234-10	NEGATIVE	NEGATIVE
1133-10	NEGATIVE	NEGATIVE
1261-10	NEGATIVE	NEGATIVE
1134-10	NEGATIVE	NEGATIVE
1142-10	NEGATIVE	NEGATIVE
1144-10	NEGATIVE	NEGATIVE
1269-10	NEGATIVE	NEGATIVE
1067-10	NEGATIVE	NEGATIVE
1164-10	NEGATIVE	NEGATIVE
1170-10	NEGATIVE	NEGATIVE
1155-10	NEGATIVE	NEGATIVE
1265-10	NEGATIVE	NEGATIVE
1128-10	NEGATIVE	NEGATIVE
1219-10	NEGATIVE	NEGATIVE
1183-10	NEGATIVE	NEGATIVE
1182-10	NEGATIVE	NEGATIVE
1161-10	NEGATIVE	NEGATIVE
1168-10	NEGATIVE	NEGATIVE
1139-10	NEGATIVE	NEGATIVE
1140-10	NEGATIVE	NEGATIVE
1129-10	NEGATIVE	NEGATIVE
1130-10	NEGATIVE	NEGATIVE

1136-10	NEGATIVE	NEGATIVE
1267-10	NEGATIVE	NEGATIVE
1174-10	NEGATIVE	NEGATIVE
1090-10	NEGATIVE	NEGATIVE
1138-10	NEGATIVE	NEGATIVE
Κυτταρολ. Διάγνωση ASCUS	CLART RESULT	Cervista RESULT
s1499-11	18	A7H
s1450-11	33,52,72,73	A7H
s131-12	51,53,61	A9H
s1871-11	31,53,54	A5_A6H
s2119-11	31,68	NEGATIVE
s1611-11	51,59,81	NEGATIVE
s175-12	16	NEGATIVE
s1773-11	16,45,51,53	NEGATIVE
s1835-11	06,31,53,62	NEGATIVE
s1948-11	31	NEGATIVE
s1254-11	NEGATIVE	NEGATIVE
s947-12	NEGATIVE	NEGATIVE
s949-12	NEGATIVE	NEGATIVE
s424-12	NEGATIVE	NEGATIVE
881-10	NEGATIVE	NEGATIVE
606-10	NEGATIVE	NEGATIVE
551-10	NEGATIVE	NEGATIVE
549-10	NEGATIVE	NEGATIVE
1662-10	NEGATIVE	NEGATIVE
s960-11	NEGATIVE	NEGATIVE
s8483	NEGATIVE	NEGATIVE
1189-10	NEGATIVE	NEGATIVE
s1963-11	NEGATIVE	NEGATIVE
s1806-11	NEGATIVE	NEGATIVE
Κυτταρολ. Διάγνωση LSIL	CLART RESULT	Cervista RESULT
s1428-11	56,61,62	A5_A6H
s2084-11	66	A5_A6H
s1064-11	58	A9H
s1768-11	61	A9H
s1024-11	31	A7H,A9H
s43-12	18,31,52	A7H,A9H
s1322-11	18,56,62	A5_A6H,A7H,A9H
s1695-11	16,18,31,33,52,5 3,66	A9H
s1397-11	11,56,58	A5_A6H,A9H

s1423-11	18,31	A7H
s827-12	66,73	A7H
s1784-11	06,31,33,42,53,59	A5_A6H
s1782-11	16,61	A9H
s743-12	11,18,31,44,52,54	A7H,A9H
s379-12	16,18,31,33,52	A9H
s1492-11	45	A7H
s1689-11	16	A9H
s1069-11	16	A5_A6H,A7H,A9H
s1073-11	31,33	A7H,A9H
s1439-11	31,53,82,85	A9H
s995-11	06,16	A9H
s1153-11	31	A9H
s1513-11	31,51,54,68,71	A9H
s1670-11	66	A5_A6H
s1827-11	16,31,58	A9H
s167-12	58	A9H
s1649-11	16	A9H
s391-12	06,31,52,59	A7H,A9H
s1720-11	16,81	A9H
s1419-11	51,84	A7H
s734-12	66	A5_A6H
s1755-11	31	A9H
s1726-11	31	A9H
s1738-11	31	A9H
s1765-11	31,51,59	A9H
s29-12	51	A5_A6H
s1217-11	16	A9H
s1452-11	31	A9H
s1425-11	16,45	A7H
s1043-11	33,51	A9H
s1586-11	53	A9H
s1758-11	16,68	A9H
s1399-11	53,56,66	A5_A6H,A7H
s1393-11	16	A5_A6H,A9H
s1584-11	06,31	A9H
s1747-11	16,18,31,70,84	A9H
s30-12	35,52	A9H
s31-12	31,51,83	A5_A6H,A9H
s1039-11	51,62,68,82	A5_A6H
s40-12	66	A5_A6H
s1377-11	16,33	A5_A6H,A9H
s2156-11	33	A9H

s986-11	52,68,73,81	NEGATIVE
s1391-11	51	NEGATIVE
s1572-11	16,31,33,51,52,5 3,61,71,82	NEGATIVE
s1613-11	31	NEGATIVE
s1027-11	31,35,59	NEGATIVE
s1809-11	35,51,68	NEGATIVE
s1717-11	51,68,81	NEGATIVE
s1842-11	61	NEGATIVE
s1762-11	31,51,71	NEGATIVE
s19-12	53	NEGATIVE
s987-11	06,31,53	NEGATIVE
s1285-11	18,53	NEGATIVE
s869-11	18	NEGATIVE
s1614-11	06,16,42,52,53,8 2	NEGATIVE
s320-12	59	NEGATIVE
s1886-11	31,53,61,71,82	NEGATIVE
s1652-11	18	NEGATIVE
s1015-11	51,54,61	NEGATIVE
s1741-11	31,33,59	NEGATIVE
s1841-11	61	NEGATIVE
s2862-10	NEGATIVE	NEGATIVE
s1639-11	NEGATIVE	NEGATIVE
s8676	NEGATIVE	NEGATIVE
s3049-10	NEGATIVE	NEGATIVE
1672-10	NEGATIVE	NEGATIVE
s0489	NEGATIVE	NEGATIVE
s8494	NEGATIVE	NEGATIVE
s9966	NEGATIVE	NEGATIVE
s485-12	NEGATIVE	NEGATIVE
s7585	NEGATIVE	NEGATIVE
502-10	NEGATIVE	NEGATIVE
213-10	NEGATIVE	NEGATIVE
s2480-10	NEGATIVE	NEGATIVE
795-10	NEGATIVE	NEGATIVE
s2213-10	NEGATIVE	NEGATIVE
Κυτταρολο. Διάγνωση ASCH	CLART RESULT	Cervista RESULT
s1612-11	06,31,51,66,81	A5_A6H, A9H
Κυτταρολο. Διάγνωση HSIL	CLART RESULT	Cervista RESULT
s113-12	16	A9H

s1597-11	16,31,59,62	A7H,A9H
s991-11	16	A9H
s1008-11	16,33	A9H
s1482-11	51	A5_A6H
s2104-11	06,18,31,52	A7H
s1282-11	16	A9H
s1754-11	39,59	A7H
s1379-11	16,18,31	A7H,A9H
s1514-11	16,52,59	A7H,A9H
s111-12	33	A9H
s1384-11	16	A9H
Καρκινικές αλλοιώσεις	CLART RESULT	Cervista RESULT
s1151-11	16,51,66	A9H
s1045-11	16	A9H
s2388-10	16	A9H
s2684	16	A9H
1611-10	16	A9H

Πίνακας 3: Στον πίνακα φαίνεται το σύνολο των 198 δειγμάτων που μελετήθηκαν. Τα δείγματα κατηγοροποιήθηκαν με βάση την κυτταρολογική εξέταση που είχε προηγηθεί (Αρνητική, ASCUS, LSIL, ASCH, HSIL και καρκίνο). Στην πρώτη στήλη αναγράφεται ο αριθμός πρωτοκόλλου του εργαστηρίου των δειγμάτων που μελετήθηκαν, στην δεύτερη στήλη το αποτέλεσμα (το στέλεχος του HPV που ανιχνεύτηκε στο δείγμα μας) με την μέθοδο των μικροσυστοιχιών και στη τρίτη το αποτέλεσμα με τη μέθοδο invader signal amplification. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω με την μέθοδο του Cervista το υπό διερεύνηση δείγμα ελέγχεται χρησιμοποιώντας τρία μίγματα ολιγονουκλεοτιδίων (A5_A6, A7H, A9H) που ανιχνεύουν τους προαναφερθέντες 14 HR HPV τύπους και είναι ομαδοποιημένα ανάλογα με τη φυλογενετική τους συσχέτιση.

4.2. Πρωτόκολλο μικροσυστοιχιών

4.2.1 Εκχύλιση DNA

Προετοιμασία

- 1) Προετοιμασία Buffer B3: Μεταφορά 12ml Buffer B1 σε 3ml Buffer B2. Στη συνέχεια αφού αναμείξουμε καλά το διάλυμα το αποθηκεύουμε σε σκοτεινό χώρο σε θερμοκρασία δωματίου.
- 2) Αναμιγνύουμε το ένζυμο πρωτεΐνάση K με απεσταγμένο νερό προς τελική συγκέντρωση 20 mg/ml. Την αποθηκεύουμε σε θερμοκρασία 4°C
- 3) Προετοιμασία Buffer B5: Προσθέτουμε αιθανόλη συγκέντρωσης 96-100% στο Buffer B5 πριν το χρησιμοποιήσουμε.
- 4) Ζεσταίνουμε το διάλυμα BE στους 70°C πριν από τη χρήση.

Σε όλη τη διάρκεια του πειράματος φοράμε ειδικά αποστειρωμένα γάντια, εργαστηριακή ποδιά και προστατευτικά γυαλιά.

Πρωτόκολλο πειραματικής διαδικασίας

- 1) Κουνάμε το δείγμα μας αρκετές φορές και ακολούθως αφαιρούμε 1ml το οποίο τοποθετούμε σε microcentrifuge tube.
- 2) Τοποθετούμε τα δείγματά μας σε μικροφυγόκεντρο για 10 λεπτά στις 12000rpm και ακολούθως αφαιρούμε το υγρό με πιπέτα χωρίς να πειραχτεί το ίζημα.
- 3) Ξαναβάζουμε 1ml απεσταγμένου νερού και τοποθετούμε ξανά τα δείγματά μας για φυγοκέντρωση 10 λεπτών στις 12000rpm. Ακολούθως αφαιρούμε εκ νέου το υγρό με πιπέτα αφήνοντας το ίζημα στο tube.
- 4) Προσθέτουμε διαλύματος T1 και 25μl πρωτεΐνάσης K και βάζουμε τα δείγματά μας σε therblock που έχουμε προθερμάνει στους 56°C. Τα αφήνουμε εκεί για 3 ώρες μέχρι να ολοκληρωθεί η λύση των κυττάρων. Παράλληλα

ανά 15 λεπτά κάνουμε vortex τα δείγματά μας για να επιταχυνθεί η λύση.

Ακολούθως τοποθετούμε 200μl διαλύματος B3 σε κάθε δείγμα και αφού τα ανακατέψουμε καλά με vortex τα βάζουμε σε thermoblock για 10 λεπτά στους 70°C.

- 5) Στη συνέχεια προετοιμάζουμε τις ειδικές κολόνες καθαρισμού. Μεταφέρουμε σε αυτές το δείγμα μας και το βάζουμε για φυγοκέντρηση για ένα λεπτό στις 12000rpm. Αφαιρούμε το υπερκείμενο.
- 6) Προσθέτουμε 600μl από το διάλυμα B5 και κάνουμε φυγοκέντρηση στις 12000rpm για 1 λεπτό. Αφαιρούμε εκ νέου το υπερκείμενο.
- 7) Βάζουμε ένα καθαρό tube περισυλλογής κάτω από την κολόνα και τοποθετούμε 100μl διαλύματος BE που έχουμε προθερμάνει στους 70°C. Κάνουμε φυγοκέντρηση στις 12000rpm για 1 λεπτό. Από το προϊόν που προκύπτει αφαιρούμε 5μl για τη συνέχεια του πειράματος και το υπόλοιπο αποθηκεύεται στους -20°C.

4.2.2 Οπτικοποίηση με μικροσυτοιχίες

Ανάβουμε το AT scanner. Αφήνουμε το διάλυμα υβριδισμού (SH) σε θερμοκρασία δωματίου.

Αποδιάταξη του DNA

Τοποθετούμε τα προϊόντα της PCR σε thermoblock στους 95°C για 10 λεπτά προκειμένου να αποδιατάξουμε το προϊόν της PCR. Αμέσως μετά τα τοποθετούμε σε πάγο. Προετοιμάζουμε το διάλυμα TL. Πλένουμε τα array tubes με 300μl TL. Αφαιρούμε το διάλυμα με πιπέτα.

Υβριδισμός

Βάζουμε 100μl διαλύματος SH που είναι σε θερμοκρασία δωματίου σε κάθε array tube. Στη συνέχεια βάζουμε 5μl από το προϊόν της PCR το οποίο βρίσκεται σε μονόκλινη κατάσταση και ανακατεύουμε πολύ καλά. Τα τοποθετούμε στο thermoblock και τα αφήνουμε για 1 ώρα σε θερμοκρασία 55°C και σε 550rpm. Μετά

την επώαση αφαιρούμε το SH και βάζουμε το thermomixer στους 30°C

Καθαρισμός

Βάζουμε σε κάθε tube 300μl διαλύματος TL και ανακινούμε καλά. Στη συνέχεια αφαιρούμε το διάλυμα και περιμένουμε το thermoblock να φτάσει τους 30°C. Βάζουμε σε κάθε tube 300μl διάλυμα CJ. Το συγκεκριμένο διάλυμα το προετοιμάζουμε 15 λεπτά πριν την ώρα του υβριδισμού και το κρατάμε μέχρι την ολοκλήρωσή του. Το διάλυμα παρασκευάζεται αναμιγνύοντας 100μl DC διαλύματος και 1 μl διαλύματος CJ. Βάζουμε τα δείγματά μας σε vortex και τα ανακινούμε πολύ καλά. Στη συνέχεια αφαιρούμε γρήγορα το διάλυμα χρησιμοποιώντας πιπέτα. Ακολούθως, βάζουμε γρήγορα 300μl καθαριστικού διαλύματος TL και ανακατεύουμε πολύ καλά. Είναι πολύ σημαντικό να αφαιρεθεί με αυτόν το τρόπο όλο το διάλυμα CJ που έχουμε χρησιμοποιήσει. Αφαιρούμε το TL διάλυμα με πιπέτα και βάζουμε 100μl από το διάλυμα RE. Ακολούθως τοποθετούμε τα δείγματά μας σε thermoblock και τα αφήνουμε εκεί για 10 λεπτά στους 25°C. Αφαιρούμε πλήρως το Buffer RE και βάζουμε τα δείγματά μας στη συσκευή των μικροσυχοιχίων για να διαβάσουμε τα αποτελέσματα.

Διαβάζοντας τα αποτελέσματα.

Η διαδικασία ανάγνωσης των αποτελεσμάτων είναι πλήρως αυτοματοποιημένη. Συγκεκριμένα κατά την ανάγνωση παρατηρούμε την ύπαρξη τριών στηλών. Στην πρώτη φαίνονται οι τύποι του HPV που μπορούν να ανιχνευθούν, στην δεύτερη φαίνεται ο τύπος του ιού που έχει το δείγμα μας και τέλος στην τρίτη αν το δείγμα μας έχει ποσότητα DNA δηλαδή μας πιστοποιεί την ορθότητα της διαδικασίας.

4.3. Πρωτόκολλο Invader signal amplification

- Αρχικά τοποθετούμε 2ml βιολογικού υλικού σε κάθε ένα από τα 96 κελιά της ειδικής πλάκας που χρησιμοποιούμε.
- Βάζουμε τα δείγματά μας για φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 1750rpm.
- Προετοιμάζουμε το ένζυμο πρωτεϊνάση K. Το ένζυμο που θα χρησιμοποιήσουμε έρχεται σε σκόνη και σκοπός μας είναι να το διαλυτοποιήσουμε. Για να γίνει αυτό προσθέτουμε 1ml απεσταγμένου νερού και το αναδεύουμε στο vortex πολύ καλά μέχρι να διαλυτοποιηθεί πλήρως. Ακολούθως μοιράζουμε την πρωτεϊνάση K σε erpendorf βάζοντας 200μl σε κάθε ένα από αυτά.
- Προετοιμασία για το δείγμα. Προετοιμάζουμε το διάλυμα που αποτελείται από Lisis Buffer και από αυτό της πρωτεϊνάσης K. Για να υπολογίσουμε την ακριβή ποσότητα που θα χρησιμοποιήσουμε υπάρχουν οι εξής τύποι υπολογισμού των ποσοτήτων. Συγκεκριμένα για την μεν πρωτεϊνάση χρησιμοποιούμε $10,8 * n$ μl ενώ για το LB 480* n μl. Όπου n ο αριθμός των δειγμάτων.
- Ρυθμίζουμε το thermoblock στους 37°C.
- Ακολούθως ξεπλένουμε πολύ καλά τη συσκευή αναρρόφησης χρησιμοποιώντας απεσταγμένο νερό. Γυρίζουμε επίσης την αντλία προς το πλάι για να απομακρυνθεί όλη η ποσότητα του νερού και να μην μείνουν υπολείμματα.
- Απομακρύνουμε το υπερκείμενο από τα 96 κελιά με την πιπέτα βάζοντας στο επάνω μέρος το πλαστικό των 96 κελιών και στο κάτω μέρος μαγνήτη. Ακολούθως με το κατεβάζουμε το καπάκι και αφαιρούμε το υπερκείμενο πολύ προσεχτικά γυρίζοντας την αντλία προς το πλάι.
- Προσθέτουμε 400μl διαλύματος LB και πρωτεϊνάσης K σε κάθε κελί.
- Στη συνέχεια βάζουμε τα δείγματά μας στο thermoblock για επώαση στους 37°C για 15 λεπτά στις 1000 rpm.
- Ξεπλένουμε το aspiratore με απεσταγμένο νερό.
- Όταν ολοκληρωθεί η επώαση απομακρύνουμε τα δείγματά μας και ρυθμίζουμε το thermoblock στους 24°C.

- Όταν η θερμοκρασία φτάσει στο επιθυμητό αποτέλεσμα βγάζουμε από το ψυγείο το B.B και αναδεύουμε πολύ καλά.
- Προσθέτουμε 200μl Buffer B σε κάθε κελί.
- Βάζουμε τα δείγματά μας για επώαση σε thermoblock για 2 λεπτά στους 24°C και 1000rpm.
- Όταν ολοκληρωθεί η επώαση απομακρύνουμε τα δείγματά μας και τοποθετούμε τα 96 κελιά πάνω σε μαγνητική πλάκα και τα αφήνουμε εκεί για 4 λεπτά.
- Αφού ολοκληρωθεί ο διαχωρισμός απομακρύνουμε τα υπερκείμενα με τον εξής τρόπο: Από την πάνω πλευρά βάζουμε τον μαγνήτη ενώ από την κάτω βρίσκεται η βάση. Ακολούθως κατεβάζουμε με το χέρι το καπάκι και αναρροφούμε πολύ προσεχτικά.
- Εφαρμόζουμε την τεχνική της PCR
- Ξεπαγώνουμε το κιτ τουλάχιστον 1 ώρα πριν αρχίσουμε την ανίχνευση.
- Περιέχει: 1) Το ένζυμο Clevase το οποίο είναι το μπουκαλάκι με το μοβ καπάκι
2) Τα ολιγονουκλεοτίδια τα οποία είναι στα μπουκαλάκια με τα χρωματιστά καπάκια.
3) Τα control για το πείραμά μας τα οποία είναι στα μπουκαλάκια με τα λευκά καπάκια.
- Προετοιμάζω τα ολιγονουκλεοτίδια και το ένζυμο Clevase με βάση τους εξής τύπους:
 - 10* (n+4) μl όπου n το σύνολο των δειγμάτων για τα ολιγονουκλεοτίδια.
 - 2,5* (n+4) μl όπου n το σύνολο των δειγμάτων για το ένζυμο Clevase.
- Ακολούθως φορτώνουμε την πλάκα με τον εξής τρόπο:

Η πλάκα που χρησιμοποιούμε αποτελείται από 8 οριζόντιες γραμμές και από 12 κάθετες στήλες. Το φόρτωμα της πλάκας γίνεται σε τριπλέτες και η διαδικασία είναι η εξής:

HPV control 1: Βάζουμε 10μl στις 3 πρώτες στήλες της πρώτης γραμμής.

HPV control 2: Βάζουμε 10μl στις 3 πρώτες στήλες της δεύτερης γραμμής.

HPV control 3: Βάζουμε 10μl στις 3 πρώτες στήλες της τρίτης γραμμής.

NTC control : Βάζουμε 10μl στις 3 πρώτες στήλες της τέταρτης γραμμής.

Τέλος φορτώνουμε τα δείγματα μας στις επόμενες τριπλέτες (στήλες) της κάθε γραμμής.

- Πάνω από τα δείγματα προσθέτουμε 20μl Mineral oil χρησιμοποιώντας πιπέτα. Προσέχουμε στο στάδιο αυτό να μην πάμε πολύ βαθιά στο κάθε πηγάδι καθώς θέλουμε να δημιουργήσουμε ένα ενιαίο στρώμα.
- Ακολούθως καλύπτουμε με την ειδική μεμβράνη και τοποθετούμε την πλάκα των 96 πηγαδιών στην συσκευή της PCR.
Στο βήμα αυτό πρέπει να είμαστε πολύ προσεχτικοί στο χρόνο που αφήνουμε τα δείγματά μας στην συσκευή της PCR. Συγκεκριμένα όταν η συσκευή φτάσει στους 63°C και ο χρόνος δείχνει 59 λεπτά και 58 δευτερόλεπτα σταματάμε την διαδικασία και προσθέτουμε τα ολιγονουκλεοτίδια.
- Προετοιμασία ολιγονουκλεοτιδίων.

Σε τρία erpendorf βάζουμε την ακριβή ποσότητα από το κάθε set ολιγονουκλεοτιδίων. Η ποσότητα υπολογίζεται με βάση τον τύπο που περιγράφηκε παραπάνω. Παράλληλα βάζουμε στο κάθε erpendorf την ακριβή ποσότητα ενζύμου Clevase με βάση τον τύπο που περιγράφηκε παραπάνω. Ακολούθως φορτώνουμε με την πολυκάναλη πιπέτα 10μl του κάθε μίγματος (ολιγονουκλεοτιδίων και Clevase) σε κάθε ένα από τα δείγματά μας. Βάζουμε εκ νέου το γκρι πλαστικό και ξαναβάζουμε τα δείγματά μας στην συσκευή PCR και συνεχίζουμε την αλυσιδωτή αντίδραση.

- Όταν ολοκληρωθεί η αντίδραση της PCR παίρνουμε την πλάκα και την τοποθετούμε στην ειδική συσκευή ανίχνευσης των αποτελεσμάτων.

4.3.1 Ανάγνωση των αποτελεσμάτων

Προσέχουμε πάντα τα δείγματά μας να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου πριν ξεκινήσουμε την ανάγνωση των αποτελεσμάτων. Βάζουμε την πλάκα όπου έχει γίνει η αντίδραση στην ειδική συσκευή ανάγνωσης αφού αφαιρέσουμε την προστατευτική ταινία. Στην συνέχεια πραγματοποιείται ανάγνωση της πλάκας αφού τοποθετηθεί σε κατάλληλη συσκευή που μετρά φθορισμό και με τη βοήθεια του ειδικού λογισμικού που χρησιμοποιεί η εταιρεία Cervista. Πραγματοποιούνται δύο διαφορετικές αναγνώσεις. Η πρώτη διαβάζει τον FAM (πράσινο) φθορισμό (Διέγερση=485nm, Εκπομπή=530 nm) και η δεύτερη διαβάζει τον RED (κόκκινο) φθορισμό (Διέγερση=560nm, Εκπομπή=612 nm). Αρχικά η συσκευή ρυθμίζεται κατάλληλα ώστε να ανιχνεύει τον πράσινο φθορισμό από όπου λαμβάνεται η πληροφορία για την ύπαρξη DNA του ιού HPV στο δείγμα. Στη συνέχεια με δεύτερη ρύθμιση ανιχνεύεται ο κόκκινος φθορισμός και λαμβάνεται η πληροφορία για την ύπαρξη DNA στο δείγμα. Οι αριθμητικές τιμές που λαμβάνονται συλλέγονται μέσω του κλειστού συστήματος και με κατάλληλο λογισμικό μετατρέπονται σε τιμές που σχετίζονται με κατώφλιες τιμές που έχουν ήδη οριστεί από την κατασκευάστρια εταιρεία, ώστε να προκύψει το αποτέλεσμα που αξιολογείται από το χρήστη. Έτσι στο τέλος της διαδικασίας γνωρίζουμε αν: 1) λειτούργησε κανονικά η αντίδραση και 2) ποιος από τους τρεις τύπους ολιγονουκλεοτιδίων ανιχνεύθηκαν, άρα από ποιον τύπο HPV ιού έχει μολυνθεί το δείγμα μας. Τα A5/A6 ολιγονουκλεοτίδια αντιστοιχούν στους τύπους 51,56,66, τα A7 στους τύπους 18,39,45,59,68 και τα A9 στους 16,31,33,35,52,58.

5. Αποτελέσματα

Τα πειράματα για την συγκεκριμένη εργασία πραγματοποιήθηκαν στο Κυτταρολογικό εργαστήριο του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου «Αττικόν». Στη πειραματική διαδικασία ελέγχθηκαν δείγματα 198 γυναικών διαφόρων ηλικιών με διαφορετική συχνότητα σεξουαλικών επαφών. Το κάθε δείγμα εξετάστηκε και με την μέθοδο ανίχνευσης με μικροσυστοιχίες αλλά και με την μέθοδο invader signal amplification. Και οι δύο μέθοδοι έγιναν τηρώντας με ακρίβεια τους κανόνες που έχουν θέσει οι δύο εταιρείες που παρασκευάζουν τα kit (Genomica, Cervista). Για το κάθε ένα από τα δείγματα είχε προηγηθεί κυτταρολογική εξέταση ώστε να διαπιστωθεί η ύπαρξη ή όχι κυτταρικής αλλοίωσης. Συγκεκριμένα στην πειραματική μας διαδικασία εξετάσαμε δείγματα με αρνητική κυτταρολογική διάγνωση, δείγματα με διάγνωση ASCUS, LSIL, ASCH, HSIL και τέλος δείγματα που είχε διαγνωσθεί η ύπαρξη καρκινικών αλλοιώσεων.

	Negative	ASCUS	LSIL	ASCH	HSIL	Ca	Σύνολο	
Clart+	25	10	72	1	12	5	125	63,13%
Clart-	44	14	15	0	0	0	73	36,87%
Συνολο	69	24	87	1	12	5	198	100,00%
%	35%	12%	44%	1%	6%	3%	100%	
Clart +	36,2%	41,7%	82,8%	100,0%	100,0%	100,0%	63,1%	
Clart -	63,8%	58,3%	17,2%	0,0%	0,0%	0,0%	36,9%	

Πίνακας 4: Στον πίνακα φαίνονται τα αποτελέσματα της πειραματικής διαδικασίας με τη χρήση της μεθόδου των μικροσυστοιχιών του CLART® HPV2. Τα αποτελέσματα έχουν κατηγοριοποιηθεί ανάλογα με την κυτταρολογική διάγνωση του κάθε δείγματος (Αρνητικά, ASCUS, LSIL, ASCH, HSIL και καρκίνος)

	Negative	ASCUS	LSIL	ASCH	HSIL	Ca	Σύνολο	
Cervista +	10	4	52	1	12	5	84	42,42 %
Cervista -	59	20	35	0	0	0	114	57,58 %
Σύνολο	69	24	87	1	12	5	198	100,00 %
%	35%	12%	44%	1%	6%	3%	100%	
Cervista +	14,5%	16,7%	59,8%	100,0%	100,0%	100,0%	42,4%	
Cervista -	85,5%	83,3%	40,2%	0,0%	0,0%	0,0%	57,6%	

Πίνακας 5: Στον πίνακα φαίνονται τα αποτελέσματα της πειραματικής διαδικασίας με τη χρήση της μεθόδου Invader signal amplification της Cervista HR. Τα αποτελέσματα έχουν κατηγοριοποιηθεί ανάλογα με την κυτταρολογική διάγνωση του κάθε δείγματος (Αρνητικά, ASCUS, LSIL, ASCH, HSIL και καρκίνος)

Όπως φαίνεται στους πίνακες υπάρχουν διαφωνίες μεταξύ των δύο τεχνικών. Συγκεκριμένα στα δείγματα με αρνητική κυτταρολογική διερεύνηση η τεχνική του invader signal amplification (Cervista HPV HR) διαπίστωσε την ύπαρξη HPV λοίμωξης στο 14,5%, ενώ είχαμε αρνητικό αποτέλεσμα στο 85,5% του συνόλου των 69 δειγμάτων με αρνητική κυτταρολογική διάγνωση που μελετήθηκαν. Από την άλλη μεριά παρατηρούμε ότι με την τεχνική των μικροσυστοιχιών (CLART® HPV2) είχαμε θετικά σε HPV δείγματα στο 36,2% των δειγμάτων με αρνητική κυτταρολογική διερεύνηση. Παράλληλα μελετήθηκαν 24 δείγματα με κυτταρολογική διερεύνηση ASCUS και διαπιστώθηκε ότι με το Cervista HR είχαμε 4 θετικά δείγματα σε HPV λοίμωξη ενώ με το CLART® HPV2 είχαμε θετικά σε HPV 10 δείγματα. Επιπλέον εξετάσαμε 87 δείγματα με κυτταρολογική διερεύνηση LSIL. Από αυτά, με την τεχνική invader signal amplification, διαπιστώθηκε η ύπαρξη HPV λοίμωξης στο 59,8% ενώ με την τεχνική των μικροσυστοιχιών είχαμε HPV στο 82,8% των 87 δειγμάτων. Παράλληλα μελετήσαμε 12 δείγματα με HSIL κυτταρολογική διερεύνηση και 5 όπου η κυτταρολογική εξέταση έδειξε καρκινικές αλλοιώσεις. Το σύνολο αυτών των 17 δειγμάτων ήταν θετικά σε HPV λοίμωξη τόσο με την τεχνική του Cervista HR όσο και από αυτή του CLART® HPV2.

6. Συζήτηση

Ύστερα από την πειραματική μελέτη που ακολουθήσαμε τα συμπεράσματα μεταξύ των δύο τεχνικών ποικίλουν. Όπως παρατηρούμε και από τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν παραπάνω η διαφωνία των δύο μεθόδων τόσο στις αρνητικές κυτταρολογικές διερευνήσεις αλλά όσο στις Low Risk κυτταρολογικές διερευνήσεις είναι αξιοσημείωτη. Το γεγονός αυτό μπορεί να εξηγηθεί αν λάβουμε υπόψιν μας ότι το μεν CLART® HPV2 έχει την ικανότητα να ανιχνεύει 35 τύπους του HPV ιού ενώ το Cervista ανιχνεύει μόνο τους 14 High-Risk τύπους του HPV. Παρατηρούμε μια αυξημένη ειδικότητα του Cervista η οποία δικαιολογείται από το γεγονός ότι ανιχνεύει λιγότερους τύπους του ιού. Πιθανόν λόγω της μεγαλύτερης ευαισθησίας που η μέθοδος των μικροσυστοιχιών διαθέτει είναι πιθανή η ύπαρξη ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων. Από την άλλη μεριά στα δείγματα με καρκινικές αλλοιώσεις ή με High-Risk κυτταρολογική διερεύνηση διαπιστώθηκε πλήρης συμφωνία μεταξύ των δύο τεχνικών. Παράλληλα οι δύο τεχνικές έχουν αρκετές διαφορές ως προς την ευκολία εφαρμογής τους.

Χαρακτηριστικό αυτής της διαφοράς είναι ο χρόνος που χρειάζεται για την ολοκλήρωση των δύο τεχνικών. Συγκεκριμένα η τεχνική του Cervista HR υπερέχει σε αυτήν την κατηγορία καθώς χρειάζεται 8 ώρες (ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων) για να ολοκληρωθεί και να έχουμε ακριβή αποτελέσματα, σε αντίθεση με την τεχνική του CLART® HPV2 όπου η ολοκλήρωσή της δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί στη διάρκεια μίας εργαστηριακής ημέρας. Αυτός είναι πολύ σημαντικός παράγοντας αν σκεφτεί κανείς την ταχύτητα που απαιτούν οι κλινικές διαγνωστικές μέθοδοι. Παράλληλα, υπάρχει διαφορά και ως προς τον χώρο και την ευκολία που χρειάζονται για να εφαρμοσθούν, καθώς η τεχνική του Cervista HR είναι πολύ εύκολα πραγματοποιήσιμη στην ρουτίνα των νοσοκομειακών εργαστηρίων. Οι δύο τελευταίες διαφορές είναι βέβαια λογικές αν σκεφτούμε το γεγονός ότι η τεχνική του Cervista HR είναι πιο καινούρια και ως εκ τούτου έχει προσαρμοσθεί περισσότερο στις ανάγκες της καθημερινότητας του εργαστηρίου. Το CLART® HPV2 πλεονεκτεί στο ότι μπορεί να ανιχνεύσει 35 τύπους του ιού έχει επίσης την ικανότητα να διαγνώσει πολλαπλή

μόλυνση από διαφορετικά στελέχη του HPV. Αυτό αποτελεί μεγάλο πλεονέκτημα τόσο για την οικονομία του χρόνου όσο και για την μεγαλύτερη αποτελεσματικότητά του ως κλινική διαγνωστική μέθοδος.

Συμπεραίνουμε ότι χρησιμοποιώντας υγρό κυτταρολογίας υγρής φάσης για τη δημιουργία εναιωρήματος κολποτραχηλικών κυττάρων όπως στην παρούσα εργασία, έχουμε τη δυνατότητα εφαρμογής πολλαπλών μοριακών τεχνικών. Συγκρίνοντας τις τεχνικές των μικροσυστοιχιών και του invader signal amplification για την ανίχνευση του ιού HPV, μπορούμε να πούμε ότι αν και παρουσιάζουν μια σχετική διαφωνία αυτή δεν εντοπίζεται στα περιστατικά με υψηλόβαθμες αλλοιώσεις άρα θεωρούμε ότι έχουν υψηλή θετική προγνωστική αξία και μπορούν να χρησιμοποιούνται σε εργαστήρια που ασχολούνται με την ανίχνευση και τυποποίηση του ιού HPV.

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (1) Graham SV. Human papillomavirus: gene expression, regulation and prospects for novel diagnostic methods and antiviral therapies. (2010) *Future Microbiol* 5:1493-1506.
- (2) Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Human papillomavirus-associated cancers - United States, 2004-2008. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2012 Apr 20;61:258-61.
- (3) De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur HH. Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004 Jun 20;324(1):17-27
- (4) Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. (2003) *N Engl J Med* 348:518–527.
- (5) Harwood CA, Proby CM. Human papillomaviruses and non-melanoma skin cancer. *Curr Opin Infect Dis* 2002 Apr;15(2):101-14.
- (6) Pfister H. Chapter 8: Human papillomavirus and skin cancer. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003;(31):52-6.
- (7) Brentjens MH, Yeung-Yue KA, Lee PC, Tyring SK. Human papillomavirus: a review. *Dermatol Clin* 2002 Apr;20(2):315-31.
- (8) Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2002 Apr;55(4):244-65
- (9) Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999 Sep;189(1):12-9.
- (10) Oriel JD. Natural history of genital warts. *Br J Vener Dis* 1971 Feb;47(1):1- 13.
- (11) Dec Bogaards JA, Kretzschmar M, Xristidou M, Meijer CJ, Berkhof J, Wallinga J. Sex-specific immunization for sexually transmitted infections such as human papillomavirus: insights. *PLoS Med*. 2011
- (12) Lenselink CH, Melchers WJG, Quint WGV, Hoebbers AMJ, Hendriks JCM, et al. (2008) Sexual Behaviour and HPV Infections in 18 to 29 Year Old Women in the Pre-Vaccine Era in the Netherlands. *PLoS ONE* 3(11): e3743.

- (13) Syrjanen S. Current concepts on human papillomavirus infections in children. *APMIS* 2010; 118: 494–509.
- (14) Matsushita K, Sasagawa T, Miyashita M, Ishizaki A, Morishita A, Hosaka N, Saikawa K, Hoshina S, Bi X, Ichimura H. Oral and cervical human papillomavirus infection among female sex workers in Japan. *Jpn J Infect Dis.* 2011;64(1):34-9.
- (15) Kuznetsov L, Reitmaier-Weber CM, Ruzicka T, Kuznetsov AV. Awareness of Human Papillomavirus Infection, Genitoanal Warts and Cancer in a Dermatological Outpatient Clinic Setting. *Acta Derm Venereol.* 2012 Aug 29
- (16) Hyun Park , Si W Lee , In H Lee , Hyun M Ry , A R Chi, Young S Kang, Sung R Hong , Sung S KiM, Seok J Seong , Son M Shin and Tae J Kim. Rate of vertical transmission of human papillomavirus from mothers to infants: Relationship between infection rate and mode of delivery. *Virology* 2012 Apr 12;9:80
- (17) Pyeon D, Lambert PF, Ahlquist P. Production of infectious human papillomavirus independently of viral replication and epithelial cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005 Jun 28;102(26):9311-6
- (18) zur Hausen, H. (1995). Are human papillomavirus infections not necessary or sufficient causal factors for invasive cancers of the cervix? *Int. J. Cancer* 63, 315-316.
- (19) Bernard HU. Gene expression of genital human papillomaviruses and considerations on potential antiviral approaches. *Antivir Ther.* 2002;7:219-237
- (20) Hickman AB, Dyda F. Binding and unwinding: SF3 viral helicases. *Curr Opin Struct Biol.* (2005). 15(1):77-85.
- (21) Enemark EJ, Joshua-Tor L. Mechanism of DNA translocation in a replicative hexameric helicase. (2006). *Nature.* 442(7100):270-5.
- (22) Enemark EJ, Stenlund A, Joshua-Tor L. Crystal structures of two intermediates in the assembly of the papillomavirus replication initiation complex. (2002). *EMBO J.*21(6):1487-96.
- (23) Bonne-Andria, C., Santucci, S. and Clertant, P. Bovine papillomavirus E1 protein can, by itself efficiently drive multiple rounds of DNA synthesis in vitro. (1995) *J. Virol.* 69(5), 3201-3205.
- (24) Graham SV. Human papillomavirus: gene expression, regulation and

prospects for novel diagnostic methods and antiviral therapies. (2010) *Future Microbiol* 5:1493-1506.

(25) Stubenrauch, F., Hock, B.L., Laimonis, A.L.. Differential requirements for conserved E2 binding sites in the life cycle of oncogenic human papillomavirus Type 31. (1998) *J. Virol.* 72, 1071-1077

(26) Desaints, C., Demeret, C., Goyat, S., Vaniv, M. Thierry, F. Expression of the papillomavirus E2 protein in HeLa cells leads to apoptosis. (1997) *The EMBO J.* 16(3), 505-514.

(27) Parish JL, Kowalczyk A, Chen HT, Roeder GE, Sessions R, Buckle M, Gaston K. E2 proteins from high- and low-risk human papillomavirus types differ in their ability to bind p53 and induce apoptotic cell death. (2006). *J Virol.* 80(9):4580-90.

(28) Webster K, Parish J, Pandya M, Stern PL, Clarke AR, Gaston K. The human papillomavirus (HPV) 16 E2 protein induces apoptosis in the absence of other HPV proteins and via a p53-dependent pathway. (2000). *J Biol Chem.* 275(1):87-94.

(29) Peh WL, Brandsma JL, Christensen ND, Claden NM, Wu X, Doorbar J. The viral E4 protein is required for the completion of the cottontail rabbit papillomavirus productive cycle in vivo. *J Virol.* 2004 Feb;78(4):2142-51.

(30) Middleton K, Peh W, Southern S, Griffin H, Sotlar K, Nakahara T, El-Sherif A, Morris L, Seth R, Hibma M, Jenkins D, Lambert P, Coleman N, Doorbar J. Organization of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers. *J. Virol* 2003 Oct;77(19):10186-201.

(31) Nakahara T, Peh WL, Doorbar J, Lee D, Lambert PF. Human papillomavirus type 16 E1circumflexE4 contributes to multiple facets of the papillomavirus life cycle. (2005). *J Virol.* 79(20):13150-65.

(32) Wilson R, Fehrmann F, Laimins LA. Role of the E1--E4 protein in the differentiation-dependent life cycle of human papillomavirus type 31.(2005). *J Virol.* 79(11):6732-40

(33) Wilson R, Ryan GB, Knight GL, Laimins LA, Roberts S. The full-length E1E4 protein of human papillomavirus type 18 modulates differentiation-dependent viral DNA amplification and late gene expression. (2007). *Virology.*362(2):453-60.

- (34) Longworth, M. S. & Laimins, L. A. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. (2004) *Microbiol Mol Biol Rev* 68, 362-72.
- (35) B. N. Fields, Knipe D. M., Howley P. M. Philadelphia: The viruses and their replication virology (1996), 3 edn, pp. 947-978.
- (36) Chang JL, Tsao YP, Liu DW, Huang SJ, Lee WH, Chen SL. The expression of HPV- 16 E5 protein in squamous neoplastic changes in the uterine cervix. (2001). *J Biomed Sci.* 8:206–13.
- (37) Kell, B., Jewers, R.J., Cason, J., Pakarian, F., Kaye. J.N. and Best, J.M. Detention of E5 oncoprotein in human papillomavirus type 16-positive cervical scrapes using antibodies raised to synthetic peptides. *J. Gen. Virol.* 75, 2451-2456.
- (38) Genther Williams SM, Disbrow GL, Schlegel R, Lee D, Threadgill DW, Lambert PF. Requirement of epidermal growth factor receptor for hyperplasia induced by E5, a high-risk human papillomavirus oncogene. (2005). *Cancer Res.* 65:6534–42.
- (39) DiMaio D, Mattoon D. Mechanisms of cell transformation by papillomavirus E5 proteins. (2001). *Oncogene.* 20:7866–73
- (40) Zhang H, Berezov A, Wang Q, Zhang G, Drebin J, Murali R, Greene MI. ErbB receptors: from oncogenes to targeted cancer therapies. (2007). *J Clin Invest.* 117(8):2051-8.
- (41) Yugi Liu, Jonathan J., Cherry, Joseph V. Dineen, Elliot J. , Androphy and James D. Baleja. Determinants of Stability for the E6 Protein of Papillomavirus Type 16. *J Mol Biol.* 2009 March 6; 386(4): 1123–1137.
- (42) Duffy CL, Phillips SL, Klingelutz AJ. Microarray analysis identifies differentiation-associated genes regulated by human papillomavirus type 16 E6. *Virology.* 2003 Sep 15;314(1):196-205.
- (43) Wazer, D.E., Liu, X.L., Chu, Q., Gao, Q. And Band, V.. Immortalization of distinct human mammary epithelial cell types by human papilloma virus 16 E6 or E7. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (9), 3687-3691.
- (44) Zimmermann H. , Degenkolbe R., Bernard H. The Human Papillomavirus Type 16 E6 Oncoprotein Can Down-Regulate p53 Activity by Targeting the Transcriptional Coactivator CBP/p300. *J Virol.* 1999 August; 73(8): 6209–6219.
- (45) Gaiffe E., Pretet J., Launay S., Jacquin E., Ssaunier M. ,Hetzl G. , Oudet P. , Mouglin C. . Apoptotic HPV Positive Cancer Cells Exhibit Transforming Properties. *PLoS One.* 2012; 7(5): e36766. Published online 2012 May 4. doi: 10.1371/journal.pone.0036766

- (46) Yi Zhang,^{1,†} Jhimli Dasgupta,^{1,†} Runlin Z. Ma,² Lawrence Banks,³ Miranda Thomas,³ and Xiaojiang S. Chen. Structures of a Human Papillomavirus (HPV) E6 Polypeptide Bound to MAGUK Proteins: Mechanisms of Targeting Tumor Suppressors by a High-Risk HPV Oncoprotein. *J Virol.* 2007 April; 81(7): 3618–3626
- (47) White, A., Livanos, E.M., Tlsty, T.D.. Differential disruption of genome integrity and cell cycle refutation in normal human fibroblasts by the HPV oncoproteins. *Genes Dev.* 8 1994, 666-677.
- (48) Syrjanen, S.M. and Syrjanen, K New concepts on the role of human papillomavirus in cell cycle regulation. (1999) *Ann Med*, 31,175-87
- (49) Maldonado E, Cabrejos ME, Banks L, Allende JE. Human papillomavirus-16 E7 protein inhibits the DNA interaction of the TATA binding transcription factor. *J Cell Biochem.* 2002;85(4):663-9.
- (50) Kyo, S., Klumpp, D.J., Inoue, M., Kanaya, T., Laimins. L.A.. Expression of AP1 during cell differentiation determines human papillomavirus E6/E7 expression in stratified epithelial cells. (1997) *J. Gen. Virol.* 78, 401-411.
- (51) Cardeal LB, Boccardo E, Termini L, Rabachini T, Andreoli MA, di Loreto C, Longatto Filho A, Villa LL, Maria-Engler SS. HPV16 oncoproteins induce MMPs/RECK-TIMP-2 imbalance in primary keratinocytes: possible implications in cervical carcinogenesis. *PLoS One.* 2012;7(3):e33585. Epub 2012 Mar 16.
- (52) Funk, J.O., Harry, T.B., Espling, E., Stillman, B. And Galloway, D.A. Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. (1997). *Genes and Dev.* 11, 2090-2100.
- (53) Pittayakhajonwut D, Angeletti PC. Analysis of cis-elements that facilitate extrachromosomal persistence of human papillomavirus genomes. (2008) *Virology* 374:304-314.
- (54) Bossis I, Roden RB, Gambhira R, Yang R, Tagaya M, Howley PM, Meneses PI. Interaction of tSNARE syntaxin 18 with the papillomavirus minor capsid protein mediates infection. (2005). *J Virol.* 79:6723-6731.
- (55) Richards RM, Lowy DR, Schiller JT, Day PM. Cleavage of the papillomavirus minor capsid protein, L2, at a furin consensus site is necessary for infection. (2006). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(5):1522-7.

- (56) Shailja Pande, Neeraj Jain, Bhupesh K Prusty, Suresh Bhambhani , Sanjay Gupt, Rajyashri Sharma, Swaraj Batra , Bhudev C. Das. HPV-16 Variant Analysis of E6, E7, L1 Genes and Long Control Region in Cervical Cancer Patients from North India. 2008 . J. Clin. Microbiol. doi:10.1128/JCM.02202-07
- (57) Mark O'Connor, Shih-Yen Chan, and Hans-Ulrich Bernard. Transcription Factor Binding Sites in the Long Control Region of Genital HPVs. (2006) Institute of Molecular and Cell Biology, National University of Singapore.
- (58) Dillner J. The serological response to papillomaviruses. *Semin Cancer Biol* 1999 Dec;9(6):423-30.
- (59) Brink AA, Snijders PJ, Meijer CJ. HPV detection methods. *Dis Markers* 2007;23(4):273-81
- (60) Arkom Chaiwongkot, Chamsai Pientong, Tipaya Ekalaksananan, Bunkerd Kongyingyoes, Jadsada Thinkhamrop, Pissamai Yuenyao, Supanee Sriamporn. Evaluation of Primers and PCR Performance on HPV DNA Screening in Normal and Low Grade Abnormal Cervical Cells.(2008). Cervical Carcinoma in a Muslim Community
- (61) Gregoire L, Arella M, Campione-Piccardo J, Lancaster WD. Amplification of human papillomavirus DNA sequences by using conserved primers. *J Clin Microbiol* 1989 Dec;27(12):2660-5.
- (62) Kleter B, van Doorn LJ, Schrauwen L, Molijn A, Sastrowijoto S, ter SJ, et al. Development and clinical evaluation of a highly sensitive PCR-reverse hybridization line probe assay for detection and identification of anogenital human papillomavirus. *J Clin Microbiol* 1999 Aug;37(8):2508-17.
- (63) Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, Wheeler CM, Coutlee F, Hildesheim A, et al. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol* 2000 Jan;38(1):357-61.
- (64) Monsonego J, Bohbot JM, Pollini G, Krawec C, Vincent C, Merignargues I, et al. Performance of the Roche AMPLICOR human papillomavirus (HPV) test in prediction of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) in women with abnormal PAP smear. *Gynecol Oncol* 2005 Oct;99(1):160-8.
- (65) Josefsson A, Livak K, Gyllensten U. Detection and quantitation of human papillomavirus by using the fluorescent 5' exonuclease assay. *J Clin Microbiol* 1999 Mar;37(3):490-6.
- (66) Hesselink AT, van den Brule AJ, Groothuismink ZM, Molano M, Berkhof J, Meijer CJ, et al. Comparison of three different PCR methods for quantifying human papillomavirus type 16 DNA in cervical scrape specimens. *J Clin Microbiol* 2005 Sep;43(9):4868-71.

(67) Moberg M, Gustavsson I, Gyllensten U. Real-time PCR-based system for simultaneous quantification of human papillomavirus types associated with high risk of cervical cancer. *J Clin Microbiol* 2003 Jul;41(7):3221-8.

(68) Josefsson AM, Magnusson PK, Ylitalo N, Sorensen P, Qwarforth-Tubbin P, Andersen PK, et al. Viral load of human papilloma virus 16 as a determinant for development of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study. *Lancet* 2000 Jun 24;355(9222):2189-93.

(69) Ylitalo N, Sorensen P, Josefsson AM, Magnusson PK, Andersen PK, Ponten J, et al. Consistent high viral load of human papillomavirus 16 and risk of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study. *Lancet* 2000 Jun 24;355(9222):2194-8.

(70) van DM, Snijders PJ, Schrijnemakers HF, Voorhorst FJ, Rozendaal L, Nobbenhuis MA, et al. Human papillomavirus 16 load in normal and abnormal cervical scrapes: an indicator of CIN II/III and viral clearance. *Int J Cancer* 2002 Apr 1;98(4):590-5.

(71) Snijders PJ, Hogewoning CJ, Hesselink AT, Berkhof J, Voorhorst FJ, Bleeker MC, et al. Determination of viral load thresholds in cervical scrapings to rule out CIN 3 in HPV 16, 18, 31 and 33-positive women with normal cytology. *Int J Cancer* 2006 Sep 1;119(5):1102-7.

(72) Snijders PJ, van den Brule AJ, Meijer CJ. The clinical relevance of human papillomavirus testing: relationship between analytical and clinical sensitivity. *J Pathol* 2003 Sep;201(1):1-6.

(73) Sotlar K, Stubner A, Diemer D, Menton S, Menton M, Dietz K, et al. Detection of high-risk human papillomavirus E6 and E7 oncogene transcripts in cervical scrapes by nested RT-polymerase chain reaction. *J Med Virol* 2004 Sep;74(1):107-16.

(74) Klaes R, Woerner SM, Ridder R, Wentzensen N, Duerst M, Schneider A, et al. Detection of high-risk cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer by amplification of transcripts derived from integrated papillomavirus oncogenes. *Cancer Res* 1999 Dec 15;59(24):6132-6.

(75) Schiffman M, Khan MJ, Solomon D, Herrero R, Wacholder S, Hildesheim A, et al. A study of the impact of adding HPV types to cervical cancer screening and triage tests. *J Natl Cancer Inst* 2005 Jan 19;97(2):147-50

(76) Castle PE, Schiffman M, Burk RD, Wacholder S, Hildesheim A, Herrero R, et al. Restricted cross-reactivity of hybrid capture 2 with nononcogenic human papillomavirus types. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002 Nov;11(11):1394-9.

(77) Qureshi MN, Rudelli RD, Tubbs RR, Biscotti CV, Layfield LJ. Role of HPV DNA testing in predicting cervical intraepithelial lesions: comparison of HC HPV and ISH HPV. *Diagn Cytopathol* 2003 Sep;29(3):149-55.

(78) Hesselink AT, van den Brule AJ, Brink AA, Berkhof J, van Kemenade FJ, Verheijen RH, et al. Comparison of hybrid capture 2 with in situ hybridization for the detection of high-risk human papillomavirus in liquid-based cervical samples. *Cancer* 2004 Feb 25;102(1):11-8.

(79) Hopman AH, Smedts F, Dignef W, Ummelen M, Sonke G, Mravunac M, et al. Transition of high-grade cervical intraepithelial neoplasia to micro-invasive carcinoma is characterized by integration of HPV 16/18 and numerical chromosome abnormalities. *J Pathol* 2004 Jan;202(1):23-33.