

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας και**  
**Βιοτεχνολογίας**  
**«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ- ΜΟΡΙΑΚΗ**  
**ΓΕΝΕΤΙΚΗ, ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ»**

**ΣΚΟΡΔΑΣ ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ**

**Στελέχη HPV υψηλού κινδύνου. Τα mRNAs των ογκογονιδίων E6 και E7 μπορούν να αποτελέσουν έναν μοριακό δείκτη για την εξέλιξη από CIN I και CIN II προς CIN III και CIN III προς το διηθητικό καρκίνο του τραχήλου ;**

**Λάρισα 2010**

**Στελέχη HPV υψηλού κινδύνου. Τα mRNAs των ογκογονιδίων E6 και E7 μπορούν να αποτελέσουν έναν μοριακό δείκτη για την εξέλιξη από CIN I και CIN II προς CIN III και CIN III προς το διηθητικό καρκίνο του τραχήλου ;**

Τριμελής επιτροπή :

Επιβλέπων καθηγητής : Μαρκουλάτος Παναγιώτης , Καθηγητής εφαρμοσμένης  
Μικροβιολογίας, με έμφαση στη βιοτεχνολογία

Μέλη : Κουρέτας Δημήτριος, Καθηγητής φυσιολογίας ζώων

Κομιώτης Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Οργανικής  
Χημείας, με έμφαση στη σύνθεση βιοδραστικών μορίων

Στους γονείς μου, Παναγιώτη και Άννα

Στη σύζυγό μου, Κατερίνα

<b>ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ</b>	<b>σελ</b>
Πρόλογος	7
Περίληψη	9
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. HPV- ΤΡΑΧΗΛΙΚΕΣ ΒΛΑΒΕΣ</b>	<b>10</b>
1.1 Ιστορική αναδρομή	10
1.2 Ιστολογική ταξινόμηση	11
1.3 Καρκίνος του τραχήλου της μήτρας.	14
1.4 Ιοί των ανθρωπίνων θηλωμάτων (Papillomaviruses)	16
1.5 HPV του ουρογεννητικού συστήματος: high risk, low risk	19
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ HPV</b>	<b>22</b>
2.1 Γένωμα.	22
2.2 Πρώιμη και όψιμη γονιδιακή έκφραση	24
2.2.1 Πρώιμη γονιδιακή έκφραση	24
2.2.2 Όψιμη γονιδιακή έκφραση (Late Gene Expression)	27
2.3 Ο κύκλος μόλυνσης του HPV	27
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΟΥ ΙΟΥ</b>	<b>30</b>
3.1 Μέθοδοι ανίχνευσης	30
3.1.2 Φυσική Ιστορία της ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας CIN	30
3.2 E6/E7	31
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	<b>34</b>
2.1 Κλινικά δείγματα	34
2.1.1 Επεξεργασία ιστών-τομές παραφίνης	36
2.2. Ταυτοποίηση	36
2.2.1 Απομόνωση DNA	36
2.2.2 Εκκινητές ( primers)	37
2.2.3 PCR-nested multiplex PCR ( nm PCR)	40
2.3 Ενίσχυση μεταγράφων E6/E7 ογκογονιδίων σε δείγματα HPV -16 (+)	41
2.3.1 Απομόνωση RNA	41
2.3.2 Πέψη DNA.	41
2.3.3 Εκκινητές ( primers)	41
2.3.4 Αντίστροφη μεταγραφή ( RT)	42
2.3.5 PCR, nested PCR (nPCR)	42
2.4 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων nested PCR	43
2.5 Εύρεση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των προϊόντων της PT-PCR	44

2.6 Μελέτη των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών – προγράμματα βιοπληροφορικής	44
2.7 Στατιστική Επεξεργασία	44
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	<b>45</b>
3.1 Ταυτοποίηση HPV –Περιγραφική στατιστική	45
3.1.1 . Αναλογία CIN	48
3.1.2 Κατανομή των τύπων HPV	48
3.2 Αναλυτική στατιστική –συσχετίσεις	50
3.2.1. HPV 16 και βαθμός CIN	50
3.2.2 Πολλαπλή HPV- μόλυνση και βαθμός CIN	50
3.3 Ανίχνευση μεταγράφων (mRNA) E6/E7 στα HPV 16 (+) δείγματα	52
3.4 Αποτελέσματα αλληλούχισης	54
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	<b>55</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	<b>59</b>

## Πρόλογος

Η επιλογή του θέματος της παρούσης εργασίας έγινε λόγω του αυξημένου ενδιαφέροντος που παρουσιάζει η έρευνα για τους τύπου του ιού HPV. Ο ανωτέρω ιός έχει δειχθεί σαν αίτιο πρόκλησης του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, ενός καρκίνου με μεγάλη συχνότητα και θνησιμότητα στον γυναικείο πληθυσμό.

Η μόλυνση με τον ιό HPV υπολογίζεται ότι αφορά ένα μεγάλο ποσοστό (περί το 50-80%) των γυναικών κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγικής ηλικίας – σεξουαλικής δραστηριότητας. Ένα μικρό ποσοστό αυτών των μολύνσεων θα προκαλέσει προκαρκινικές αλλοιώσεις (δυσπλασία) και ένα μικρότερο ακόμη θα εξελιχθεί σε καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Η προσπάθεια καθορισμού εκείνων των γυναικών που έχουν μολυνθεί και που εμφανίζουν σημαντικό κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του τραχήλου της μήτρας αποτελεί κύριο ερευνητικό στόχο και για τον σκοπό αυτό διερευνώνται πολλαπλές παράμετροι και επιχειρείται η επιλογή μοριακών δεικτών ή η ανακάλυψη νέων, ώστε να παρέχονται όσο το δυνατόν πιο ακριβή προγνωστικά στοιχεία.

Τα ανωτέρω έχουν ιδιαίτερη σημασία για την επιλογή των γυναικών εκείνων που θα οδηγηθούν σε θεραπεία καθώς και για την επιλογή της κατάλληλης θεραπευτικής μεθόδου. Στους νεότερους μοριακούς δείκτες ανήκουν και τα E6/E7 ογκογονίδια με την αντίστοιχη έκφραση των E6/E7mRNA, η ανεύρεση των οποίων υποδεικνύει αυξημένη πιθανότητα πρόκλησης υψηλόβαθμης δυσπλασίας και εξέλιξης σε καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, πράγμα που είναι αντικείμενο και της παρούσης εργασίας.

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται σήμερα για την ανίχνευση και ταυτοποίηση του ιού HPV είναι το test Παπανικολάου, ο «in situ» υβριδισμός, ανοσοϊστοχημικοί μέθοδοι και μέθοδοι αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR), ενώ για την διάγνωση και κατάταξη της δυσπλασίας και του καρκίνου χρησιμοποιούνται το test Παπανικολάου και η ιστολογική εξέταση της βιοψίας τραχήλου.

Το ερευνητικό εργαστηριακό μέρος πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Μικροβιολογίας-Ιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη και καθοδήγηση του Διευθυντή του εργαστηρίου καθηγητή κ. Παναγιώτη Μαρκουλάτου τον οποίον θέλω να ευχαριστήσω ιδιαίτερος, τόσο για την ανάθεση του θέματος, όσο και για την καθοδήγηση – συμπαράσταση καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής – ερευνητικής εργασίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή κ. Κουρέτα Δημήτριο και τον αναπληρωτή καθηγητή κ. Κομιώτη Δημήτριο για τη συμμετοχή τους στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή.

Πρέπει να ευχαριστήσω ακόμη τον κ. Τσακογιάννη Δημήτριο, πτυχιούχο της σχολής Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας και υποψήφιο διδάκτορα για τη συμβολή του στο τμήμα της εργασίας που αφορά στην ταυτοποίηση των HPV τύπων, θέμα με το οποίο έχει και ο ίδιος ασχοληθεί, καθώς και την βιολόγο και Διδάκτορα κα. Κυριακοπούλου Ζαχαρούλα για την ουσιαστική βοήθεια που παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια του εργαστηριακού μέρους.

Τέλος, αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω όλους τους διδάσκοντες στο θεωρητικό μέρος του μεταπτυχιακού προγράμματος, που παρέχοντας την τρέχουσα επιστημονική γνώση στο επίπεδο της μοριακής προσέγγισης και των αντίστοιχων νεότερων εργαστηριακών μεθόδων συνέβαλλαν στην διεύρυνση του επιστημονικού μου ορίζοντα και την πιο ολοκληρωμένη και διεπιστημονική αντίληψη της λειτουργίας των οργανισμών και της συσχέτισης νόσου- αιτίου.



## Περίληψη

**Σκοπός:** Η ταυτοποίηση HPV και ειδικότερα HPV 16 τύπου σε περιστατικά CIN (από CIN I έως CIN III και in situ Ca) μέσω PCR και nested multiplex PCR, και ακολούθως η ανίχνευση E6/E7 mRNA μέσω RT PCR και nested PCR.

**Υλικό και μέθοδοι:** Χρησιμοποιήθηκαν τομές τεμαχίων τραχήλου μήτρας (βιοψιών) από 57 κλινικά δείγματα. Στα δείγματα αυτά είχε γίνει ιστολογική εξέταση και είχε τεθεί η διάγνωση δυσπλασίας-ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας (CIN) σε βαθμούς από 1 έως 3 ή /και in situ Ca. Για την ταυτοποίηση τους πραγματοποιήθηκε αρχικά PCR για την ενίσχυση των γονιδίων E6/E7 όλων των τύπων HPV και στη συνέχεια τα PCR προϊόντα ενισχύθηκαν περαιτέρω με nm PCR (nested multiplex PCR) με την χρήση ειδικών για κάθε τύπο εκκινητών. Στα ανωτέρω προστέθηκαν και 7 δείγματα κολποτραχηλικών επιχρισμάτων (HSIL) ταυτοποιημένα ως HPV 16 (+). Στο σύνολο των HPV 16 (+) δειγμάτων έγινε απομόνωση RNA, αντίστροφη μεταγραφή, σύνθεση cDNA και ακολούθησαν PCR και nested PCR για την ενίσχυση και ανίχνευση E6/E7 mRNA.

**Αποτελέσματα:** Στα 57 βιοπτικά δείγματα ο HPV 16 ήταν ο συχνότερα απαντώμενος ιός (13/57, 23%), ενώ πολλαπλή μόλυνση ήταν παρούσα σε 10 δείγματα (10/57, 17,5%). Από τα 27 συνολικά δείγματα CIN-1, HPV ιός ανιχνεύτηκε σε 4, ενώ από τα 30 δείγματα βαθμού CIN > 1, HPV ιός ανιχνεύτηκε στα 15 δείγματα, διαφορά στατιστικά σημαντική. Βρέθηκε γραμμική συσχέτιση ανάμεσα στο βαθμό ενδοτραχηλικής νεοπλασίας CIN και στον αριθμό των τύπων των ιών των δειγμάτων. Από τα 20 συνολικά (βιοπτικά και κολποτραχηλικά) HPV16 (+) δείγματα, βρέθηκαν εναλλακτικά μετάγραφα E6/E7 σε 4 από αυτά.

**Συμπεράσματα:** Ο HPV 16 ήταν ο συχνότερος HPV γονότυπος στις υψηλόβαθμες HSIL (CIN 2 & 3) και η πολλαπλή μόλυνση ήταν συχνή και σχετιζόταν με το βαθμό της CIN. Εναλλακτικά μετάγραφα E6/E7 βρέθηκαν στο ένα πέμπτο των θετικών HPV δειγμάτων.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. HPV- ΤΡΑΧΗΛΙΚΕΣ ΒΛΑΒΕΣ

### 1.1 Ιστορική αναδρομή

Έχουν περάσει 150 έτη από την πρώτη περιγραφή του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, περί τον ένα αιώνα από την αναγνώριση των πρόδρομων αλλοιώσεων και εξήντα έτη από την γνωστή μέθοδο (Pap test) που πρότεινε ο Γεώργιος Παπανικολάου για την ανίχνευση της τραχηλικής νεοπλασίας .

Κατά τη διάρκεια όλης αυτής της περιόδου οι ερευνητές έχουν προτείνει μια ποικίλη ονοματολογία κυτταρολογικών ή ιστολογικών όρων για τις προκαρκινικές αλλοιώσεις του τραχήλου (πίνακας 1), έχουν επινοήσει μεθόδους για τη διάγνωση και έχουν αναγνωρίσει έναν αιτιολογικό παράγοντα, τον ιό του ανθρώπινου θηλώματος (HPV).

Το σύνολο των επιθηλιακών αλλοιώσεων του τραχήλου που καταλήγουν δυνητικά στον καρκίνο ονομάστηκε Τραχηλική Ενδοεπιθηλιακή Νεοπλασία (CIN: Cervical Intraepithelial Neoplasia) (1) και η ποικιλία της διαγνωστικής – θεραπευτικής προσέγγισης περιελάμβανε – test pap (2) κολποσκόπηση, βιοψία-ιστολογική εξέταση, κρυοθεραπεία, laser και προσφάτως ηλεκτροχειρουργική αφαίρεση διά ακκύλης (L.E.E.P : Loop Electrosurgical Excision Procedure) (3).

Με την βελτίωση των διαγνωστικών μεθόδων και την περαιτέρω διερεύνηση της φύσεως των τραχηλικών βλαβών (4) και της νεοπλασίας προέκυψε η κατηγοριοποίηση σε: α) ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις που περιλαμβάνουν κονδυλωματώδη βλάβη οφειλόμενη σε προσβολή από τον ιό του ανθρώπινου θηλώματος (HPV) και β) την ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία του τραχήλου (CIN) που χωρίζεται σε τρεις βαθμούς 1,2,3(5). Αναλυτικά :

A) Ο πιο συχνός τύπος κονδυλωματωδών αλλοιώσεων στον τράχηλο της μήτρας είναι τα επίπεδα κονδυλώματα, στα οποία η βασική στοιβάδα και η επιφανειακή στοιβάδα του επιθηλίου παραμένουν παράλληλες.

Τα θηλώδη ή εξωφυτικά κονδυλώματα παρουσιάζουν προσεκβολές του επιθηλίου στην επιφάνεια και φέρουν αγγειοσυνδετικό άξονα (εδώ ανήκουν τα οξυτενή κονδυλώματα).

Τα ενδοφυτικά κονδυλώματα αναπτύσσονται στο επιθήλιο των αδενικών κρυπτών του ενδοτραχήλου. Όλες οι μορφές των κονδυλωμάτων εμφανίζουν ιστολογικά ακάνθωση (υπερπλασία) και κοίλοκυττάρωση του πλακώδους επιθηλίου,

παρακεράτωση και δυσκεράτωση. Συχνά εμφανίζεται κονδυλωματώδης αλλοίωση μαζί με ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία. Η συνύπαρξη αυτή εμφανίζεται ιστολογικά σε τρεις μορφές.

Στην οριζόντια μορφή συνύπαρξης η κονδυλωματώδης αλλοίωση και η ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία ευρίσκονται πλησίον η μία της άλλης η σε εντελώς διαφορετικές περιοχές του επιθηλίου. Στην κάθετη μορφή η κονδυλωματώδης αλλοίωση ανευρίσκεται ακριβώς πάνω από την ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία.

Τέλος στην μικτή μορφή τα ίδια κύτταρα εμφανίζονται στο επιθήλιο να φέρουν τους κυτταρολογικούς χαρακτήρες τόσο της κονδυλωματώδους αλλοίωσης όσο και της ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας (άτυπο κονδύλωμα) (6).

B) Ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία του πλακώδους επιθηλίου του τραχήλου της μήτρας είναι η εμφάνιση πλακωδών κυττάρων με άτυπη ωρίμανση-διαφοροποίηση (δυσκαρύωση) -πίνακας 1- μέσα στα όρια του επιθηλίου. Το 1953 ο Reagan και οι συνεργάτες του χρησιμοποίησαν τον όρο δυσπλασία σαν συνώνυμο της άτυπης υπερπλασίας του επιθηλίου και τη διαχωρίζουν σε τρεις βαθμούς: ήπια, μέτρια, και έντονη.

Το 1969 οι Richart και Baron προτείνουν τον όρο τραχηλική ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία (Cervical Intraepithelial Neoplasia, CIN) και τη διαχωρίζουν σε τρεις βαθμούς: 1, 2, και 3. Ο βαθμός 1 (CIN1) αντιστοιχεί σε ήπιου βαθμού ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία, ο βαθμός 2 (CIN2) σε μέτριου βαθμού και ο βαθμός 3 (CIN3) σε έντονο βαθμό ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία και νεοπλασία με παρεμφερή όρο το καρκίνωμα *in situ* (7).

## **1.2 Ιστολογική ταξινόμηση**

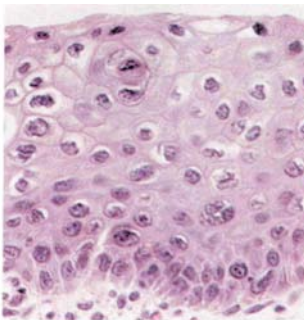
Στην ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία του τραχήλου της μήτρας, τα κύτταρα του φυσιολογικού πλακώδους και πλακωδώς μεταπλασθέντος επιθηλίου του τραχήλου αντικαθίστανται από νεοπλασματικά κύτταρα, τα οποία εμφανίζουν διαφόρου βαθμού διαφοροποίηση. Αδιαφοροποίητα κύτταρα βασικού ή παραβασικού τύπου μπορεί να καταλαμβάνουν όλο το πάχος του επιθηλίου ή μπορεί να εμφανίζουν ωρίμανση καθώς πλησιάζουν την επιφάνεια. Η ανοργάνωτη αυτή ανάπτυξη έχει σαν αποτέλεσμα την απώλεια προσανατολισμού. Η μιτωτική δραστηριότητα επίσης διαταράσσεται και δεν περιορίζεται στη βασική στοιβάδα .

Η ιστολογική ταξινόμηση της ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας του τραχήλου βασίζεται στο ποσοστό του πάχους του επιθηλίου, το οποίο καταλαμβάνεται από τα βασικού ή παραβασικού τύπου αδιαφοροποίητα κύτταρα.

A) Στην ελαφρού βαθμού ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία (CIN 1) καταλαμβάνεται ίσο ή λιγότερο από το κατώτερο τριτημόριο του πάχους του επιθηλίου (εικ 1, εικ 2).

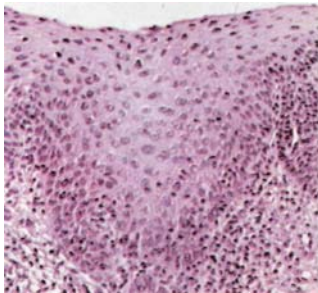
B) Στη μετρίου βαθμού ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία (CIN 2) καταλαμβάνεται ίσο ή λιγότερο από τα κατώτερα δύο τριτημόρια του πάχους του επιθηλίου (εικ 3, εικ 4).

Γ) Στην εντόνου βαθμού ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία (CIN 3 ή καρκίνο in situ) καταλαμβάνεται περισσότερο από τα κατώτερα δύο τριτημόρια ή όλο το πάχος του επιθηλίου (εικόνα 5).

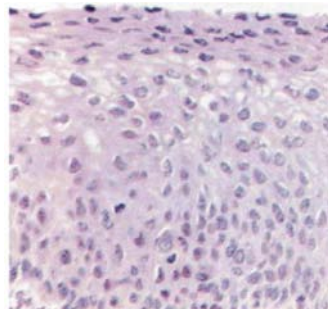


Εικ 1. Ελαφρού βαθμού ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία και φυσιολογικό επιθήλιο (CIN 1). Ιστολογική τομή X200.

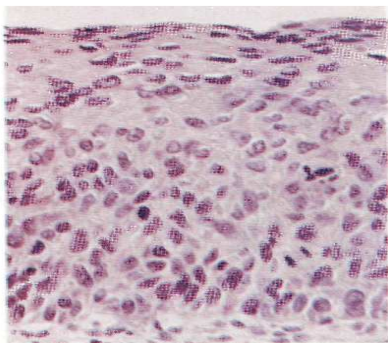
(Πηγή: Riotto G, Ghristopherson W, W.H.O., 1973)



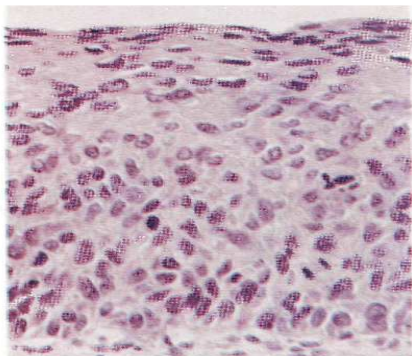
Εικ 2. Ελαφρού βαθμού ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία (CIN1). Ιστολογική τομή X400. (Πηγή : Riotto G, Ghristopherson W, W.H.O., 1973)



Εικ 3. Μετρίου βαθμού ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία (CIN2). Ιστολογική τομή X300. (Πηγή: Riotto G, Ghristopherson W, W.H.O., 1973)



Εικ 4. Μετρίου βαθμού ενδοεπιθηλιακού νεοπλασία (CIN2). Ιστολογική τομή X300. (Πηγή : Riotta G, Ghristopherson, W.H.O., 1973)



Εικ 5. Έντονου βαθμού ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία (CIN3), καρκίνωμα in situ. Ιστολογική τομή X400. (Πηγή : Riotta G, Ghristopherson W, W.H.O., 1973)

Για τον καθορισμό του βαθμού της ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας συνεκτιμούνται επίσης ο βαθμός ανωμαλίας του πυρήνα και η μιτωτική δραστηριότητα (αριθμός μιτώσεων, παρουσία τριπολικών και πολυπολικών μεταφάσεων).

Ο βαθμός της επιθηλιακής ανωμαλίας συχνά ποικίλλει από τη μία ζώνη στην άλλη και δεν είναι σπάνιο ν' ανευρίσκονται στην ίδια βιοψία περιοχές με CIN1, CIN2, και CIN3.

Η ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία αναπτύσσεται σχεδόν πάντα στη ζώνη μετάπλασης του τραχήλου της μήτρας (transformation zone).

Για λόγους που θα γίνουν κατανοητοί στη συνέχεια αναπτύχθηκε και το σύστημα Bethesda (8), σύμφωνα με το οποίο οι ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις διακρίνονται σε:

A) Χαμηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακή αλλοίωση πλακώδους επιθηλίου ( Low Grade Squamous Intraepithelial Lesion LGSI) η οποία περιλαμβάνει την κονδυλωματώδη αλλοίωση (HPV) και την ελαφρού βαθμού ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία (CIN1).

B) υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακή αλλοίωση πλακώδους επιθηλίου (High Grade Squamous Intraepithelial Lesion LGSI) η οποία περιλαμβάνει την επιθηλιακή νεοπλασία μετρίου και εντόνου βαθμού (CIN2 και CIN3) ή καρκίνωμα in situ.

Γ) Χρησιμοποιείται ακόμη ο όρος ASCUS (Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance: άτυπα πλακώδη κύτταρα απροσδιόριστης σημασίας), όταν οι ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις είναι μη διαγνωστικές για δυσπλασία.

Η πρακτική σημασία όλων αυτών είναι ότι ένα ποσοστό των ανωτέρω βλαβών μπορεί να εξελιχθεί και να μεταπέσει σε διηθητικό καρκίνωμα του τραχήλου, μάλιστα εν γένει η πιθανότητα αυτή είναι περί το εκατονταπλάσιο σε σχέση με ένα φυσιολογικό επιθήλιο (9).

### **1.3 Καρκίνος του τραχήλου της μήτρας.**

Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας είναι η δεύτερη σε συχνότητα κακοήθεια παγκοσμίως, με περίπου 500.000 νέες περιπτώσεις να διαγιγνώσκονται κάθε έτος και περίπου 275.000 θανάτους ετησίως (10,11). Παρά την παγκόσμια κατανομή του, η συχνότητα του καρκίνου της μήτρας ποικίλει σημαντικά, όντας περίπου τέσσερις φορές μεγαλύτερη σε κάποιες χώρες, σε σχέση με άλλες (12). Περίπου το 80 % των περιπτώσεων εμφανίζεται σε αναπτυσσόμενες χώρες, όπου συχνά είναι ο συνηθέστερος γυναικολογικός καρκίνος, καθώς ευθύνεται για το ένα τέταρτο του συνόλου των γυναικολογικών καρκίνων. Στις ΗΠΑ, περίπου 12000 νέες περιπτώσεις διαγιγνώσκονται κάθε χρόνο και περίπου το 1/3 από αυτές τις γυναίκες θα πεθάνουν λόγω της κακοήθους νόσου. Η επίπτωση του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας στις ΗΠΑ διαφέρει σημαντικά ανάμεσα στις διάφορες εθνικές και κοινωνικοοικονομικές ομάδες, με την αναλογία να είναι διπλάσια μεταξύ των μαύρων γυναικών σε σχέση με τις λευκές (13).

Οι περισσότεροι καρκίνοι εμφανίζονται στη ζώνη μετάπτωσης του τραχήλου, όπου τα κυλινδρικά κύτταρα του ενδοθηλίου σχηματίζουν ένα σύνδεσμο με το πολύστοιβο πλακώδες επιθήλιο του εξωτραχήλου. Οι περισσότερες από τις άλλες

περιπτώσεις είναι αδενοκαρκινώματα, με έναν μικρό αριθμό να αφορά σε μικροκυτταρικούς νευροενδοκρινικούς όγκους.

Αλλοιώσεις που προορίζονται να εξελιχθούν σε καρκινώματα από πλακώδες επιθήλιο τυπικά υπόκεινται σε μια σειρά δυσπλαστικών μεταβολών που διαρκούν πολλά έτη (14). Η σοβαρότητα της αλλοίωσης καθορίζεται από το βαθμό στον οποίο το πλακώδες επιθήλιο αντικαθίσταται από βασικού τύπου κύτταρα, αντικατάσταση που στις πιο σοβαρές περιπτώσεις αφορά στο σύνολο του πάχους του επιθηλίου.

Οι περισσότερες δυσπλασίες δεν εξελίσσονται και στην πραγματικότητα, υποστρέφουν αυτόματα, με την πιθανότητα της υποστροφής να περιορίζεται, αναλόγως της σοβαρότητας της δυσπλασίας. Οι περισσότερο σοβαρές δυσπλασίες ωστόσο, προέρχονται γενικά από λιγότερο δυσπλαστικές αλλοιώσεις, μετά από μερικά χρόνια εξέλιξης (14-16), αν και ένας μέρος των υψηλού βαθμού δυσπλαστικών αλλοιώσεων μπορεί να αναπτυχθεί γρήγορα, χωρίς να μεσολαβήσει το ενδιάμεσο χαμηλού βαθμού στάδιο (17,18). Επειδή μεσολαβεί μεγάλο χρονικό διάστημα ανάμεσα στην ανάπτυξη της τραχηλικής δυσπλασίας και στην ανάπτυξη του διηθητικού καρκίνου, τα προγράμματα μαζικού προληπτικού ελέγχου με την εξέταση του τραχηλικού επιχρίσματος κατά Παπανικολάου, μπορούν να εντοπίσουν την πλειονότητα των προκαρκινωματώδων αλλοιώσεων.

Η σωστή παρακολούθηση των γυναικών με αυτές τις ανωμαλίες, μαζί με την κατάλληλη θεραπεία, μπορούν συνεπώς να προλάβουν την ανάπτυξη του καρκίνου στις περισσότερες περιπτώσεις. Ωστόσο, σε χώρες που διαθέτουν προγράμματα προσυμπτωματικού ελέγχου η επίπτωση του αδενοκαρκινώματος και του αδενοπλακώδους καρκινώματος έχει αυξηθεί, μαρτυρώντας ότι το Pap –test μπορεί να είναι λιγότερο αποτελεσματικό στην ανίχνευση των προκαρκινωματώδων αλλοιώσεων αυτού του τύπου (9).

Ο καρκίνος του τραχήλου έχει από δεκαετίες αναγνωριστεί ως σεξουαλικά μεταδιδόμενη νόσος, πολύ πριν ο HPV εμπλακεί στην παθογένεση του. Πολλές μελέτες έχουν καταλήξει στο συμπέρασμα ότι ο καρκίνος δεν εμφανίζεται σε γυναίκες που δεν έχουν αρχίσει τη σεξουαλική τους ζωή. Είναι συχνότατος ανάμεσα στις εκδιδόμενες γυναίκες και συσχετίζεται με τον αριθμό των σεξουαλικών συντρόφων στη διάρκεια της ζωής. Πράγματι, οι πιο πολλές από αυτές τις μεγάλες διαφορές στην επίπτωση, που παρατηρούνται στους διαφόρους πληθυσμούς, αποδίδονται στις σεξουαλικές πρακτικές των ανδρών και των γυναικών σε αυτούς

τους πληθυσμούς και στη διαθεσιμότητα, η όχι, αποτελεσματικών προγραμμάτων προληπτικού ελέγχου με Pap test.

Στη μέση της δεκαετίας του 1970 οι Meisels και Fortin (19) αναγνώρισαν σε μορφολογικό επίπεδο ότι η μόλυνση του τραχήλου με τον ιό HPV συνέβαινε συχνά σε συσχέτιση με τα ιστολογικά χαρακτηριστικά του CIN1. Αυτές οι παρατηρήσεις συνδυάστηκαν με την πρόταση του Zur Hausen (20) ότι η HPV μόλυνση ήταν ο σεξουαλικά μεταδιδόμενος παράγοντας υπεύθυνος για τον καρκίνο του τραχήλου. Η ταυτοποίηση από τους Zur Hausen και συν (21), (22), των HPV-16 και HPV-18 οδήγησε στην παρατήρηση ότι αυτοί ανευρίσκονται στους περισσότερους καρκίνους του τραχήλου. Στη συνέχεια, πολλαπλές μελέτες από μεγάλο αριθμό ερευνητών έδειξαν να οδηγούν στην κατανόηση της φυσικής ιστορίας της HPV μόλυνσης του γεννητικού συστήματος, τον προσδιορισμό του βιολογικού δυναμικού των διαφορετικών HPV τύπων, και τελικά του ρόλου των HPV στην παθογένεια της τραχηλικής νόσου καθώς και την ανεύρεση μη ιογενών παραγόντων που μπορούν να επηρεάσουν την εξέλιξη της HPV μόλυνσης.

#### **1.4 Ιοί των ανθρωπίνων θηλωμάτων (Papillomaviruses)**

Οι ιοί των θηλωμάτων (Papillomaviruses) αποτελούν μια ομάδα επιθηλιοτρόπων DNA ιών που προκαλούν καλοήθεις βλάβες στο δέρμα (μηρμυκίες) και τους βλεννογόνους (κονδυλώματα), κάποιοι δε από αυτούς εμπλέκονται στην ανάπτυξη επιθηλιακής κακοήθειας και ειδικότερα του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας και άλλων όγκων του ουρογεννητικού συστήματος. Η ύπαρξή τους ήταν γνωστή από παλαιά αλλά η έναρξη της συστηματικής μελέτης τους τοποθετείται στη δεκαετία του 1970 που έγινε κατορθωτή η κλωνοποίηση τους(23-25). Αρχικά οι PV κατηγοριοποιούνταν μαζί με τους polyoma ιούς σαν μια οικογένεια, τους Papovaviridae, λόγω του ότι μοιράζονταν αρκετά στοιχεία, κυρίως δομικά. Η αλληλουχία του γενώματος των PV όμως έδειξε ότι διαφέρει αρκετά και δεν έχει μεγάλη ομολογία αλληλουχίας με το γένωμα των Polyoma ιών. Έτσι, ταξινομήθηκαν (οι PV) σε ξεχωριστή οικογένεια, τους Papillomaviridae, από τη Διεθνή επιτροπή Ταξινόμησης των Ιών (26).

Οι Papillomaviridae (PV) έχουν απομονωθεί από πολλά είδη θηλαστικών και πουλιών σε εκατοντάδες τύπων λόγω του ότι οι PV είναι ειδο-ειδικοί και πολλοί από αυτούς μολύνουν ένα συγκεκριμένο είδος (27,28). Οι HPV (Human Papilloma Virus)



μελετώνται φυσικά με μεγαλύτερο ενδιαφέρον και έχουν αλληλουχηθεί πλήρως 96 τύποι ενώ πάνω από 100 επιπλέον έχουν αλληλουχηθεί μερικώς (26).

Οι PV έχουν συχνά ταξινομηθεί κυρίως σύμφωνα με το είδος του ξενιστή και τις θέσεις ή τις ασθένειες με τις οποίες σχετίζονται. Η αλληλούχιση του DNA πολλών από αυτούς οδήγησε στην φυλογενετική κατηγοριοποίηση σύμφωνα με το ποσοστό ομολογίας του L<sub>1</sub>ORF, που κωδικοποιεί την μείζονα δομική ιική πρωτεΐνη και είναι η περισσότερο συντηρημένη γενωμική περιοχή.

Παρόμοιες φυλογενετικές συγγένειες παρατηρήθηκαν επίσης όταν συγκρίθηκαν ομολογίες μεταξύ άλλων περιοχών του γενώματος, λόγω του ότι οι PV φαίνεται να δημιουργούνται κυρίως μέσω διάσπαρτων σημειακών μεταλλάξεων παρά μέσω ανασυνδυασμού (29). Αυτές οι ομοιότητες συμβαδίζουν με το συμπέρασμα ότι οι PV συνοδεύουν τα είδη – ξενιστές κατά τη διάρκεια της εξέλιξης και εξελίσσονται με αυτά (30).

Η τρέχουσα ταξινόμηση, προσπαθώντας να καλύψει το βαθμό ομοιότητας του γενώματος συγκρίνοντας την ομολογία ως προς την L<sub>1</sub> διαχωρίζει τους PV σε γένη, είδη, τύπους υποτύπους και παραλλαγές (variants) με την ευρύτερη κατηγορία να είναι τα γένη. Έτσι οι PV χωρίζονται σε 12 γένη, ένα εκ των οποίων χαρακτηρίζεται με ένα γράμμα της Ελληνικής Αλφαβήτου. Σε ένα δεδομένο γένος η L<sub>1</sub> περιοχή όλων των μελών έχει ομολογία σε ποσοστό περί το 60%, σε ένα είδος. Η L<sub>1</sub> ομολογία σε ένα είδος κυμαίνεται από 60-70%, σε ένα τύπο 71-89%, σε έναν υπότυπο 90-98% και στις παραλλαγές περισσότερο του 98%. Χρησιμοποιώντας αυτή την ταξινόμηση οι HPV κατηγοριοποιούνται άμεσα στα 5 από τα 12 γένη: στα alpha, beta, gamma, mu και nu, με τα άλλα 7 γένη να αποτελούνται από ιούς ζώων. Οι HPV με το μεγαλύτερο ενδιαφέρον είναι αυτοί που σχετίζονται με τον καρκίνο του ουρογεννητικού συστήματος και άλλων βλεννογόνων και είναι μέλη του alpha γένους (31). Υπάρχουν και μέλη του alpha γένους που μολύνουν το δέρμα άλλων περιοχών (πλην των γεννητικών) όπως και τα μέλη των άλλων HPV γενών.

Ενδεικτικά αναφέρονται κατωτέρω HPV τύποι και οι βλάβες που προκαλούν (32) (πίνακας 1).

Βλάβες	HPV τύποι
Θηλώματα πέλματος (μυρμηκίες)	1,2,4,63
Επίπεδα θηλώματα (verrucae plana)	3,10,27,28,38,41,49
Θηλώματα κοινά σε άτομα που χειρίζονται κρέας, ψάρια και πουλερικά	1,2,3,4,7,10,28
Μωσαϊκό θήλωμα	2,27,57
Επιδερμοειδές καρκίνωμα των ονύχων	16
Μυρμηκιώδης επιδερμοδυσπλασία με καλοήγη συμπεριφορά	2,3,10,12,15,19,36,46,47,50
Μυρμηκιώδης επιδερμοδυσπλασία με καλοήγη ή κακοήγη βιολογική συμπεριφορά	5,8,9,10,14,17,20,21,22,23,24,25,37,38
Μη θηλωματώδεις βλάβες του δέρματος	37,38
Αναπνευστικά θηλώματα	6,11
Πλακώδες καρκίνωμα του πνεύμονα	6,11,16,18
Θήλωμα του λάρυγγα	6,11,30
Καρκίνωμα του λάρυγγα	16,18
Θήλωμα του γναθιαίου άντρου	57
Πλακώδες καρκίνωμα των παραρινικών κόλπων	16,18
Θηλώματα του επιπεφυκότα	6,11
Καρκίνωμα του επιπεφυκότα	16,
Εστιακή στοματική επιθηλιακή δυσπλασία (νόσος του Heck)	13,32
Καρκίνωμα στοματικής κοιλότητας	57,16,18
Λευκοπλακία της στοματικής κοιλότητας	16,18
Καρκίνωμα του οισοφάγου από πλακώδες επιθήλιο	16,18,16,18
Οξυτενή κονδυλώματα	6,11,30,42,43,44,45,51,52,54
Μπουουνοειδής (Bowenoid) βλατίδωση	16,18,34,39,42,45
Νόσος του Bowen	16,18,31,34
Γιγαντιαία οξυτενή κονδυλώματα των	16,11

---

Bushke και Löwenstein)	
Μη ειδική ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία	30,34,39,40,53,57,59,61,62,64,66,67,68,69
Χαμηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία	6,11,43
Ενδιάμεση ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία	31,33,35,42,44,45,51,52,
Υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία	16,18,56,58
Καρκίνωμα του αιδοίου, Κακοήθεις Αιδοϊκές αλλοιώσεις	6,11,16,18
Καρκίνωμα του κόλπου	16
Καρκίνωμα του τραχήλου της μήτρας	16,18,31
Καρκίνωμα του πρωκτού	16,31,32,33
Καρκίνωμα in situ του πέους (ερυθροπλασία του Queyrat)	16
Καρκίνωμα του πέους	16,18
Κοινές μυρμηκίες (verrucae vulgaris)	1,2,4,26,27,29,41,57,65
Μυρμηκίες (μη γεννητικών περιοχών)	

---

### **Πίνακας 1. HPV τύποι και οι βλάβες που προκαλούν.**

#### **1.5 HPV του ουρογεννητικού συστήματος: high risk, low risk**

Από τους ανωτέρω HPV μελετώνται σημαντικότερα οι τύποι εκείνοι που σχετίζονται με την πρόκληση καρκίνου του ουρογεννητικού συστήματος (κόλπου, αιδοίου, πέους, τραχήλου) και ειδικότερα του τραχήλου της μήτρας.

Σήμερα έχει αποδειχθεί πλήρως η συσχέτιση του HPV με τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας με την απομόνωση κάποιων τύπων του ιού στο σύνολο σχεδόν των περιπτώσεων. Σε πολυάριθμες μελέτες βρέθηκε HPV DNA που κυμαίνεται σε περισσότερο από 90 % (33) των περιστατικών καρκίνων του τραχήλου έως και 99% σε κάποιες σειρές (34), με χαρακτηριστική την μελέτη (35) όπου σε 511 δείγματα δεν ανευρέθηκε κανένα περιστατικό σοβαρού βαθμού δυσπλασίας (CINIII) ή καρκίνου αρνητικού σε HPV DNA.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι συγκεκριμένοι τύποι του HPV έχουν υψηλή ογκογενετική επίδραση στο γεννητικό επιθήλιο και χαρακτηρίζονται σαν

υψηλής επικινδυνότητας (high risk) ενώ άλλοι τύποι προκαλούν συνήθως καλοήθεις βλάβες και χαρακτηρίζονται σαν χαμηλής επικινδυνότητας (low risk) με την παρουσία και μιας ενδιάμεσης κατηγορίας (intermediate risk) (36-39) ( πίνακας 2).

Στους τύπους υψηλής επικινδυνότητας (high risk) περιλαμβάνονται οι 16, 18, 31, 33, 25, 34, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 87.

Στους τύπους χαμηλής επικινδυνότητας( low risk) περιλαμβάνονται οι 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81.

Στους ενδιάμεσης επικινδυνότητας αναφέρονται οι 26, 53, 66. (40,41)

Κατηγορία	HPV τύπος	Επισημάνσεις
Υψηλού κινδύνου	16	Το πρότυπο υψηλού κινδύνου του HPV, ο πλέον συνήθης HPV σε όλες τις SIL (περίπου 25%) και υψηλού βαθμού (50-60%): η αναλογία υψηλού/χαμηλού βαθμού είναι 15:1. Ο επιπολασμός του καρκίνου βαίνει παράλληλα με την υψηλού βαθμού SIL
	18	Ισχυρή συσχέτιση με το αδενοκαρκίνωμα (50%), αδιαφοροποίητο μικροκυτταρικό καρκίνωμα (80%) και άλλα μη αμιγώς πλακώδη αδενοκαρκινώματα. Παρόν σε λιγότερο από 10% των αμιγώς πλακωδών καρκινωμάτων. Παρόν στο 5 % των SIL (περίπου 10%). Περίπου 10 % ταξινομείται ως υψηλού βαθμού (περίπου 3:1).
	31	Ο δεύτερος συχνότερος τύπος στις SIL (περίπου 10 %). Περίπου 60% ταξινομείται ως υψηλού βαθμού. Ο δείκτης στον καρκίνο (3-5%) σημαντικά χαμηλότερος σε σχέση με τη SIL, δηλώνοντας ενδιάμεσο κίνδυνο
	33	Χαμηλή συχνότητα στη SIL, συσχετίζεται συχνότερα με καρκίνο
	35	Χαμηλή συχνότητα στη SIL, κυρίως υψηλός έναντι χαμηλού βαθμού, η συχνότητα στις SIL παρακολουθεί τη συχνότητα (5%) των καρκίνων
	39	Συσχετίζεται με υψηλού και χαμηλού βαθμού SIL( περίπου 2:1)
	45	Συσχέτιση με καρκίνο, λιγιστά δεδομένα

51	Συσχέτιση με καρκίνο, λιγοστά δεδομένα
52	Συσχέτιση με καρκίνο, λιγοστά δεδομένα
56	Συσχέτιση με καρκίνο, λιγοστά δεδομένα
6,11	Το πρότυπο των χαμηλού κινδύνου HPV, σχετικά συνήθεις στον τράχηλο (5-10%) ισχυρή συσχέτιση με κονδυλώματα και θηλωματώδη (άτυπη) ανώριμη μεταπλασία
42-44	Κλωνοποιημένοι από χαμηλού βαθμού βλάβες και ταξινομημένοι ως χαμηλού κινδύνου. Ασυνήθεις.
B <sup>a</sup>	Αταξινόμητος HPV, ταυτοποιημένος σε μια μελέτη, ισχυρή συσχέτιση με χαμηλού βαθμού SIL.

A. Ένας μεγάλος αριθμός από γεννητικούς HPV-τύπους δεν έχουν ακόμα ταξινομηθεί ακριβώς σε όρους κινδύνου, είτε γιατί είναι σπάνιοι , είτε γιατί δεν έχουν συσχετιστεί με τη μορφολογία. Περιλαμβάνουν τους τύπους 53-55 και 57-59

Συντομογραφίες: SIL: Squamous Intraepithelial Lesion (Πλακώδης Ενδοεπιθηλιακή Νεοπλασία)

(Πηγή : Crum CP, Cibas ES, Lee K.Pathology of Early Cervical Neoplasia. Churchill Livingstone , USA 1997, σελ 8)

## Πίνακας 2. Υψηλού και χαμηλού κινδύνου HPV-τύποι

Από αυτούς, μεγαλύτερη ογκογενετική δράση έχουν οι HPV-16 και HPV-18 εμπλεκόμενοι στο 50% και το 20% αντιστοίχως των καρκίνων του τραχήλου της μήτρας (42-45).

Κύριοι εκπρόσωποι της low risk κατηγορίας είναι οι 6, 11 που προκαλούν συνήθως τα απλά κονδυλώματα.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ HPV

### 2.1 Γένωμα.

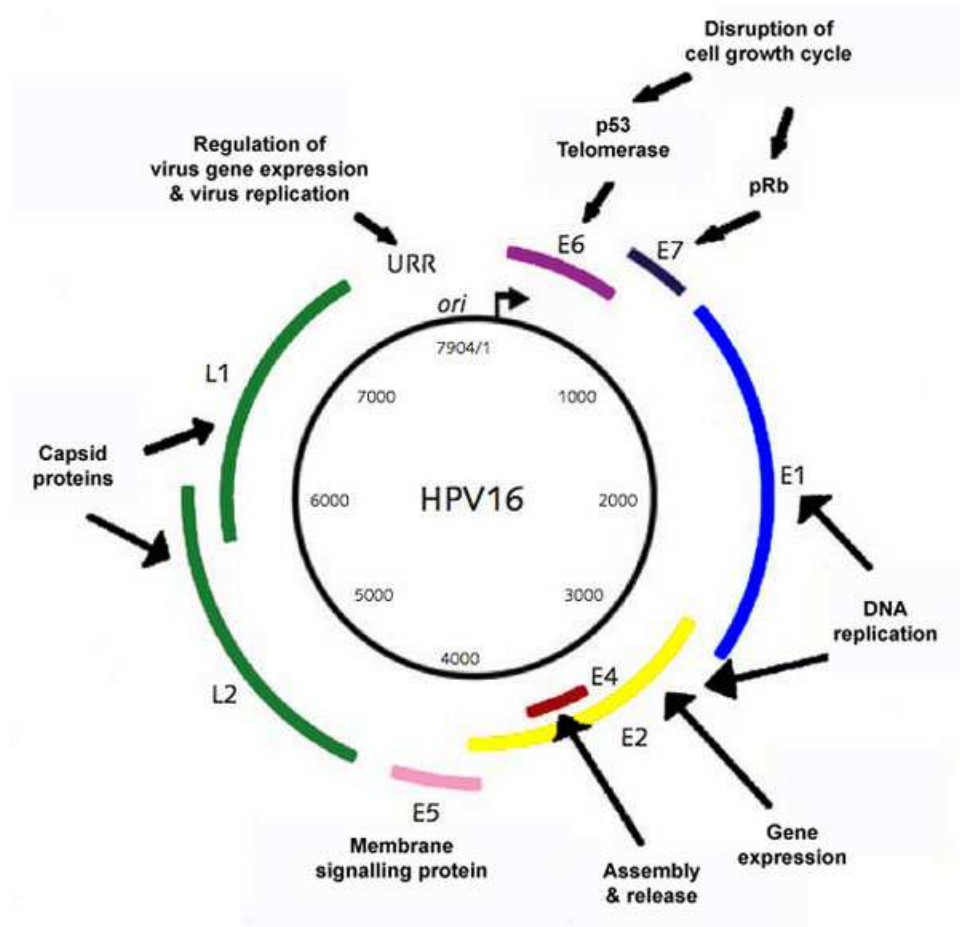
Οι PV είναι μικροί (άνευ φακέλου) ιοί με δίκλωνο κυκλικό DNA και μέγεθος περί τα 8000 ζεύγη βάσεων (bp) με μοριακό βάρος περί τα  $5 \times 10^6$  daltons. Εγκλείονται σε ένα εικοσαεδρικό καψίδιο που συντίθενται από 72 καψομερίδια που περιβάλλουν το DNA.

Το καψίδιο αποτελείται από δύο δομικές πρωτεΐνες, την μείζονα ( $L_1$ ) και την ελάσσονα ( $L_2$ ) (46-48). Το γένωμα πολλών από τους ανθρώπους HPV και τους PV ζώων έχει αλληλουχηθεί πλήρως και η οργάνωσή του είναι παρόμοια με διαφορές ωστόσο ως προς τα ORF ανάμεσα στα είδη. Ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα της οργάνωσης του γενώματος όλων των PV είναι ότι όλα τα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (ORF: Open Reading Frames) είναι τοποθετημένα στον ένα κλώνο του δίκλωνου DNA, υποδεικνύοντας ότι όλα τα γονίδια ευρίσκονται στον ένα κλώνο. Επιπλέον, μελέτες έχουν δείξει ότι μόνο ο ένας κλώνος χρησιμοποιείται σαν εκμαγείο για την μεταγραφή (εικ 6).

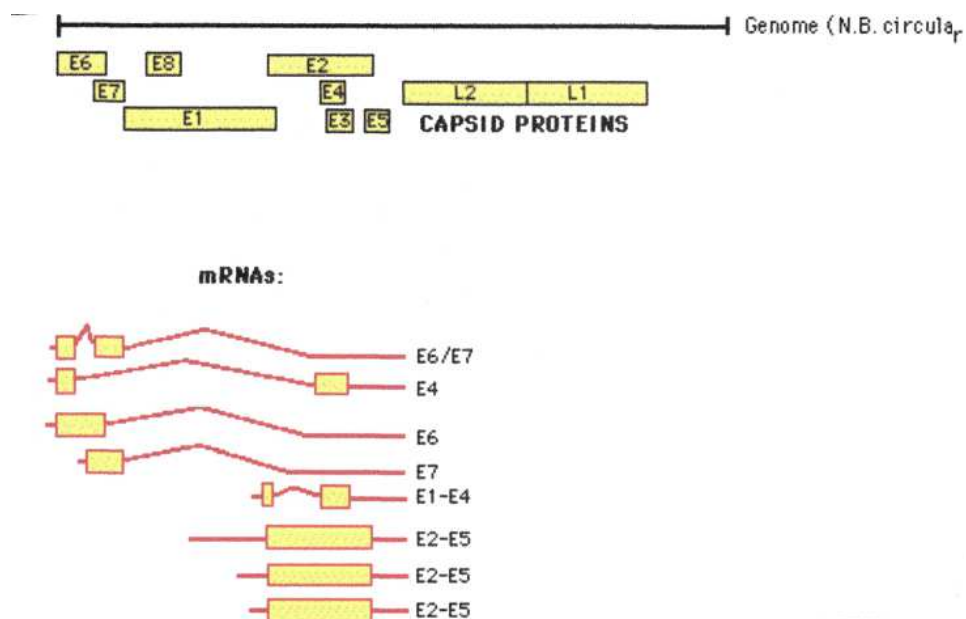
Στους PV ο κωδικεύων κλώνος περιέχει οκτώ έως δέκα ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης (ORF), που κατηγοριοποιούνται σε πρώιμα (E: early) και όψιμα (L:late) ανάλογα με τη θέση τους. Τα γονίδια της E περιοχής κωδικοποιούν ρυθμιστικές ιικές πρωτεΐνες περιλαμβάνοντας και τις απαραίτητες για την αντιγραφή του ιικού DNA (κυριότερα τα E1, E2, E4, E5, E6, E7)(εικ 7). Τα  $L_1$  και  $L_2$  ORF κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες του ιικού καψιδίου και εκφράζονται μόνο σε κύτταρα με παραγωγική μόλυνση.

Τέλος μια περιοχή περί 1000 bp που δεν περιέχει ORFs αναφέρεται με διάφορους όρους όπως LCR (Long Control Region) ή απλώς μη κωδικοποιούσα περιοχή (non coding region). Αυτή η περιοχή περιλαμβάνει τη θέση έναρξης της αντιγραφής του DNA, καθώς και θέσεις που αφορούν στη ρύθμιση της μεταγραφής (50).

Εικ. 6. Σχηματική απεικόνιση του HPV 16 DNA



Εικ 7. Έκφραση των πρώιμων πρωτεϊνών του HPV 16.



## 2.2 Πρώιμη και όψιμη γονιδιακή έκφραση

### 2.2.1 Πρώιμη γονιδιακή έκφραση

Το E1 γονίδιο κωδικοποιεί για ική πρωτεΐνη που έχει δραστηριότητα ΑΤΡάσης και ελικάσης. Προσδενόμενη σε ειδικές περιοχές του DNA επιτρέπει το ξετύλιγμά του και δρα σαν παράγοντας επιμήκυνσης για την αντιγραφή του (50).

Το E2 γονίδιο κωδικοποιεί την E2 πρωτεΐνη που είναι υπεύθυνη για την αναγνώριση και την πρόσδεση στην θέση έναρξης της αντιγραφής. Ευρίσκεται σε δύο μορφές: την μορφή πλήρους μήκους που συμβάλει στην μεταγραφή, και την μη πλήρους μήκους που δρα σαν καταστολέας της μεταγραφής.

Η αναλογία αυτών των μορφών που ευρίσκονται σε ένα ετεροτριμερές σύμπλοκο συνδεδεμένο με την E1, ρυθμίζει την μεταγραφή του ιικού DNA. Έτσι η σύνδεση με την E1 οδηγεί στην έναρξη της αντιγραφής, η συνέργεια με την CBP (C/EBP Binding Protein) ενεργοποιεί την μεταγραφή, ενώ η πρόσδεση του μη πλήρους μήκους E1 σε ανοδικές θέσεις κοντά στους υποκινητές των γονιδίων E6 και E7 (51,52) οδηγεί σε καταστολή της έκφρασής τους.

Σε πειραματικές μελέτες εισαγωγή του γονιδίου E2 του βόειου PV, μέσω ενός πλασμιδιακού φορέα σε σειρά τραχηλικών καρκινικών κυττάρων καταστέλλει την έκφραση των ενσωματωμένων HPV-18 E6 και E7 γονιδίων και προκαλεί σχεδόν 99% αναστολή της σύνθεσης του κυτταρικού DNA μέσα σε 2 ημέρες (53-55). Διάφοροι PV όπως ο HPV-31 εκφράζουν επιπρόσθετα της E2 μια E8 E2C πρωτεΐνη όπου η E8 περιοχή αντικαθιστά την ενεργό E2 (56).

E3: δεν έχει μελετηθεί επαρκώς.

E4: κωδικοποιεί την E4 πρωτεΐνη σε όψιμη φάση του κύκλου ζωής του ιού. Με την C-τελική περιοχή να προσδένεται στα ενδιάμεσα των κερατινοκυττάρων ινίδια προκαλώντας την καταστροφή τους και την απελευθέρωση έτσι των κυττάρων που περιέχουν και τα σωμάτια του ιού. Εμπλέκεται ακόμη στην μετατροπή των κυττάρων του ξενιστή απορυθμίζοντας οδούς που σηματοδοτούν τη μιτωτική δραστηριότητα (50).



E5: κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη E5 που φαίνεται να παρεμποδίζει τους μηχανισμούς που καταστέλλουν την αύξηση π.χ. EGF υποδοχέας: ενεργοποίηση μιτογόνων σηματοδοτικών οδών μέσω μεταγραφικών παραγόντων: (c Jun, c-fos) (σημαντικών στην αποδόμηση μέσω ουβικιτινίωσης του p53 μέσω E6).

E6: κωδικοποιεί για την E6 πρωτεΐνη. Ο κύριος στόχος της E6 των HPV-16 και HPV-18 είναι η p53 πρωτεΐνη που είναι ένας ογκοκαταστολέας (57). Η p53 επιδρά στην έκφραση πρωτεϊνών που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο όπως π.χ. επάγει την έκφραση της p21 που αναστέλλει τον κυτταρικό κύκλο. Έτσι σε περίπτωση γενοτοξικών παραγόντων ή βλάβης του DNA τα επίπεδα της p53 αυξάνουν, ώστε να επιφέρουν την αναστολή του κυτταρικού κύκλου ή την απόπτωση, όντας μέρος του κυτταρικού μηχανισμού άμυνας ώστε ή το κύτταρο να επιδιορθώσει τις βλάβες του DNA πριν την αντιγραφή ή να απομακρυνθεί.

Τα επίπεδα της p53 σε σειρές κυττάρων που έχουν αθανатоποιηθεί από την E6 ή σε HPV θετικά καρκινικά τραχηλικά κύτταρα είναι εν γένει δύο έως τρεις φορές χαμηλότερα του συνήθους και γενικά τα κύτταρα που εκφράζουν E6 δεν είναι σε θέση να ενεργοποιήσουν μία μέσω της p53 κυτταρική απάντηση σε DNA βλάβη (58,59).

Ο μηχανισμός με τον οποίο επιδρά η E6 στην p53 είναι η δημιουργία συμπλόκου μεταξύ E6, p53 και μιας λιγάσης της ουβικιτίνης της E6AP. Η E6 προσδέεται στην E6AP και την κατευθύνει έτσι στην p53, οδηγώντας έτσι στην ουβικιτινίωση και αποδομή της στο 26S πρωτεόσωμα (56,60).

Μελέτες έχουν δείξει ακόμη ότι η E6AP δεν εμπλέκεται σε ουβικιτινίωση της p53 σε κύτταρα που δεν περιέχουν E6 (61,62). Σε απουσία της E6, η κύρια οδός αποδόμησης της p53 είναι η σύνδεση με την λιγάση της ουβικιτίνης Mdm<sup>2</sup> (63,64). Επί καρκινικών κυττάρων HPV- θετικών, η ανωτέρω οδός απενεργοποιείται και η αποδόμηση της p53 ελέγχεται πλήρως από την E6 που την στοχοποιεί ακόμη κι όταν δεν χρειάζεται (π.χ. σε DNA βλάβη) οδηγώντας έτσι σε συσσώρευση μεταλλάξεων στα μολυσμένα κύτταρα και τελικά πρόκληση κακοήθειας (61,65). Η E6 στις HPV δύναται να συνδέεται με τον μεταγραφικό συνεργοποιητή της p53 του p300/ CBP (Creb Binding Protein) εμποδίζοντας έτσι την μεταγραφή της.

Άλλες διενέργειες της E6 των υψηλής επικινδυνότητας HPV είναι η αλληλεπίδραση με ένα σύνολο πρωτεϊνών μεταξύ των άλλων και την προαποπτωτική πρωτεΐνη Bax οδηγώντας στην αποδόμησή της (66). Ειδικά στον HPV-16 η E6

προσδένεται στην FADD, πρωτεΐνη που δρα στη Fas αποπτωτική οδό, έχοντας σαν αποτέλεσμα την αναστολή της απόπτωσης (μέσω της αποδόμησης της FADD). Επιπλέον η E6 επιδρά με τον αναστολέα της κυκλινοεξαρτώμενης κινάσης  $P_{16}^{ink4}$  μια συνέργεια που οδηγεί στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου (67). Τέλος η E6 έχει δειχθεί ότι ενεργοποιεί την τελομεράση παράγοντας την αθανατοποίηση των κυττάρων (57).

Το E7 γονίδιο κωδικοποιεί την E7 πρωτεΐνη που συμμετέχει στην πρόσδεση πρωτεϊνών σημαντικών για τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου όπως η PRB (πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος) και οι σχετιζόμενες πρωτεΐνες p107 και p130 (68,69).

Το επίπεδο της φωσφορυλίωσης της PRB μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, όντας ενεργή στην μη φωσφορυλιωμένη μορφή της και αδρανοποιημένη στην φωσφορυλιωμένη μορφή της. Στην ενεργό μορφή συνδέεται με τον E2F μεταγραφικό παράγοντα και τον μπλοκάρει, αναστέλλοντας έτσι τον κυτταρικό κύκλο. Η E7 των high risk HPV καταλαμβάνει την θέση πρόσδεσης του E2F απελευθερώνοντάς τον και προωθώντας έτσι τον κυτταρικό κύκλο. Στη συνέχεια στο σύμπλοκο E7/RB οδηγείται στην πρωτεόλυση μέσω της ουβικιτίνης. Η E7 επιδρά ακόμη στους αναστολείς των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών, τους p21 και p27 εμποδίζοντας την αναστολή του κυτταρικού κύκλου (70-72). Η E7 των high risk HPV προκαλεί γενωμική αστάθεια στα φυσιολογικά ανθρώπινα κύτταρα και οδηγεί σε ανώμαλες πολυπολικές μιτώσεις και ανευπλοειδία (73) ή ανώμαλο διπλασιασμό του κεντροσωματίου, χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων (73,74). Τέλος η E7 είναι αναγκαία για την σταθερή παρουσία του επισωματικού HPV στα επιθηλιακά κύτταρα.

Έτσι ο ρόλος της E7 συνεπικουρούμενος και από την E6 είναι κεντρικός στην στρατηγική του ιού γιατί πρέπει να ενεργοποιήσουν τον κυτταρικό μηχανισμό του ξενιστή για την αντιγραφή του ιικού DNA εξαρτώμενου από τους αντιγραφικούς παράγοντες του ξενιστή (DNA πολυμεράση, PCNA κα). Αυτοί οι παράγοντες είναι πρωτεΐνες που εκφράζονται μόνο στη φάση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, τον μηχανισμού του οποίου πυροδοτεί η E7.

### 2.2.2. Όψιμη γονιδιακή έκφραση (Late Gene Expression)

L<sub>1</sub> : Κωδικοποιεί για την μείζονα καψιδιακή πρωτεΐνη. Σχηματίζει τα ιικά σωματίδια.

L<sub>2</sub>: Κωδικοποιεί για την ελάσσονα καψιδιακή πρωτεΐνη που πιθανώς εμπλέκεται στο πακετάρισμα του DNA (50).

### 2.3 Ο κύκλος μόλυνσης του HPV

Ο κύκλος αναπαραγωγής του ιού είναι το κλειδί για την κατανόηση της παθογένεσης αυτών των ιών. Η γνώση μας αναφορικά με αυτή τη διεργασία είναι περιορισμένη και αρκετά κρίσιμα ζητήματα δεν έχουν διαλευκανθεί, κυρίως επειδή δεν είναι δυνατόν να μολυνθούν με τον ιό κύτταρα ιστοκαλλιέργειας και να επιτευχθεί ένας πλήρους λοιμώδους ικός κύκλος *in vitro*.

Η λοίμωξη και η βλαστική (vegetative) ανάπτυξη του ιού εξαρτώνται απολύτως από ένα ολοκληρωμένο πρόγραμμα διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων. Οι ιοί μολύνουν τις προβαθμίδες των κερατινοκυττάρων της βασικής μεμβράνης, πιθανώς στοχεύοντας τα βλαστικά τους κύτταρα, αλλά υψηλού βαθμού έκφραση των πρωτεϊνών του ιού και συγκρότησή του λαμβάνουν χώρα μόνο στα ανώτερα επίπεδα της ακανθωτής και της κοκκιώδους στοιβάδας του πλακώδους επιθηλίου (75). Η έκφραση των γονιδίων του ιού περιορίζεται στα κερατινοκύτταρα και δεν υπάρχει ένδειξη ότι τα γονίδια του ιού εκφράζονται σε κάποια άλλα κύτταρα, πλην των κερατινοκυττάρων. Υπάρχει ένα πρότυπο έκφρασης στο χώρο και το χρόνο των γονιδίων του HPV εντός του προσβεβλημένου επιθηλίου. Ο ιός μολύνει μια υποομάδα των πρόδρομων κυττάρων της βασικής στοιβάδας, πιθανόν τα βλαστικά κύτταρα, με ένα χαμηλό αριθμό αντιγράφων. Κάποια στιγμή μετά τη λοίμωξη ακολουθεί μια φάση αναπαραγωγής του DNA του ιού, η οποία φαίνεται να είναι ανεξάρτητη του κυτταρικού κύκλου και η οποία ενισχύει τον αριθμό των αντιγράφων σε περίπου 50-100 αντίγραφα / κύτταρο. Στη συνέχεια, το μολυσμένο κύτταρο πιστεύεται ότι εγκαταλείπει αυτό το αρχικό κυτταρικό διαμέρισμα για να εισέλθει στο διαμέρισμα των πολλαπλασιαζομένων και ωριμαζόντων κυττάρων του επιθηλίου. Έπειτα έρχεται η φάση της διατήρησης ή του επισώματος, όπου η ιική έκφραση ελαχιστοποιείται και ειδικά, η έκφραση των ογκογονιδίων E6 και E7 βρίσκεται κάτω από ασφυκτικό έλεγχο, με τα E6/E7 μετάγραφα μόλις να είναι ανιχνεύσιμα. Όταν τα μολυσμένα κερατινοκύτταρα ανέρχονται στις ανώτερες στοιβάδες διαφοροποιούνται και λαμβάνει χώρα μια αύξηση της γονιδιακής έκφρασης του ιού, ενίσχυση του ρυθμού αντιγραφής το

λιγότερο σε 1000 αντίγραφα ανά κύτταρο, έκφραση των πρώιμων γονιδίων E6 και E7, αλλά και έκφραση των όψιμων γονιδίων από τον όψιμο επαγωγή (76).

Είναι σημαντικό να αναγνωριστεί ότι αυτά τα γεγονότα εμφανίζονται σε κύτταρα που διαφοροποιούνται και έχουν εξέλθει του κυτταρικού κύκλου. Το πρόβλημα για τον ιό είναι ότι οι πολυμεράσες του κυτταρικού DNA και οι παράγοντες αντιγραφής παράγονται σε κύτταρα που βρίσκονται σε μίτωση. Για να αντιμετωπίσει αυτό το πρόβλημα, ο ιός κωδικοποιεί πρωτεΐνες οι οποίες, στο πλαίσιο του κύκλου ζωής του ιού, ενεργοποιούν ξανά τη σύνθεση του DNA σε κύτταρα εκτός κυτταρικού κύκλου, αναστέλλουν την απόπτωση και επιβραδύνουν το πρόγραμμα διαφοροποίησης των μολυσμένων κερατινοκυττάρων, δημιουργώντας ένα ευνοϊκό περιβάλλον για την αντιγραφή του DNA (77). Οι ακριβείς λεπτομέρειες του πως επιτυγχάνεται αυτό δεν έχουν κατανοηθεί πλήρως, αλλά τα γονίδια του ιού που διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στη διεργασία αυτή είναι τα E6 και E7. Ένα ατυχές και σπάνιο παραπροϊόν αυτής της διεργασίας σε υψηλού κινδύνου HPV-αντιγραφή είναι η απορρύθμιση του ελέγχου της ανάπτυξης του προσβεβλημένου κυττάρου και η ανάπτυξη καρκίνου.

Ο κύκλος αναπαραγωγής του ιού διαρκεί πολύ χρόνο: ακόμα και στην καλύτερη περίπτωση, ο χρόνος που μεσολαβεί από τη στιγμή της λοίμωξης μέχρι την απελευθέρωση του ιού ανέρχεται σε περίπου 3 εβδομάδες, αφού αυτός είναι ο χρόνος που χρειάζεται το κερατινοκύτταρο για να διαφοροποιηθεί πλήρως και να αποπέσει. Στην πραγματικότητα, η περίοδος ανάμεσα στη λοίμωξη και την εμφάνιση των αλλοιώσεων ποικίλει πολύ και μπορεί να ποικίλει από εβδομάδες μέχρι μήνες. Έτσι ο ιός εισέρχεται στο κερατινοκύτταρο στην αρχή της ωρίμανσης του ως πρόδρομο βασικό κύτταρο του επιθηλίου και παραμένει μέχρι το τέλος της διαδρομής του ως διαφοροποιημένο πλακώδες κύτταρο. Πρόκειται για μια στρατηγική αντιγραφής, κατά την οποία η αντιγραφή του ιικού DNA και η συγκρότηση σε ιό εμφανίζεται σε ένα κύτταρο που ήδη προορίζεται για θάνατο από φυσικά αίτια. Δεν υπάρχει επαγόμενη από ιό κυτταρόλυση ή νέκρωση και γι'αυτό δεν υπάρχει φλεγμονή. Έτσι, για το μεγαλύτερο μέρος του μολυσματικού κύκλου του HPV, υπάρχει ελάχιστη ή και μηδενική απελευθέρωση προφλεγμονωδών κυτταροκινών στο τοπικό μικροπεριβάλλον, που να είναι σημαντικές για την ενεργοποίηση των δενδριτικών κυττάρων (Dendritic Cells-DC) και τη μετανάστευσή τους. Συνεπώς ελλείπουν τα ουσιώδη σήματα για το εναρκτήριο λάκτισμα της ανοσιακής απάντησης στα πλακώδη επιθήλια (78). Δεν υπάρχει φάση αιματογενούς διασποράς στον κύκλο

ζωής του HPV και μικρές μόνο ποσότητες αντιγράφων εκτίθενται στην ανοσιακή άμυνα του οργανισμού. Ως συνέπεια, ο ιός είναι πρακτικά αόρατος για τον ξενιστή. Πρόκειται για μια στρατηγική του ιού που οδηγεί σε επίμονη χρόνια λοίμωξη, καθώς ο ξενιστής αγνοεί το παθογόνο για μακρά περίοδο.

Κατά τη διάρκεια της αρχικής φάσης της λοίμωξης, ο HPV υπάρχει ως κυτταρικό επίσωμα, αλλά η ενσωμάτωση της υψηλής επικινδυνότητας HPV-DNA στο γένωμα του ξενιστή είναι ένα σημαντικό βήμα στη νεοπλασματική εξέλιξη στον τράχηλο (79). Η ενσωμάτωση συνήθως προκαλεί απάλειψη ή ρήξη στο ιικό ρυθμιστικό γονίδιο E2, ενώ διακρατείται ένα μεταβλητό τμήμα, που περιλαμβάνει τα E6 και E7 ογκογονίδια και την ανιούσα ρυθμιστική περιοχή. Η υπερέκφραση του E2 από ετερόλογους υποκινητές σε κύτταρα που φιλοξενούν το ενσωματωμένο υψηλού κινδύνου HPV-DNA μπορεί να καταστείλει τον πρώιμο υποκινητή του ενσωματωμένου ιού, προκαλώντας μια απότομη μείωση στην έκφραση των E6 και E7 (55). Η ενσωμάτωση του υψηλού κινδύνου HPV με τη συνακόλουθη απάλειψη/ρήξη του E2 οδηγεί σε αυξημένη έκφραση των ογκογονιδίων του ιού (80-82). Τα κύτταρα που περιέχουν τον υψηλού κινδύνου HPV αποκτούν ένα ισχυρό αναπτυξιακό πλεονέκτημα έναντι των κυττάρων που φιλοξενούν τον επισωματικό υψηλού κινδύνου HPV και αναπτύσσονται κλωνικά. Αυτά τα κύτταρα παρουσιάζουν επίσης αυξημένη αστάθεια του γενόματός τους (83,84) και γι' αυτό έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να αποκτήσουν δευτερογενείς γονιδιακές ανωμαλίες που μπορεί να οδηγήσουν σε κακοήθη εξέλιξη (85).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΟΥ ΙΟΥ

### 3.1 Μέθοδοι ανίχνευσης

Η κολποσκόπηση, η κυτταρολογική εξέταση (test pap) και η ιστολογική εξέταση διαπιστώνουν αλλοιώσεις που αντιστοιχούν σε προσβολή του επιθηλίου από τον ιό του ανθρώπινου θηλώματος και τις κατατάσσουν σε CIN1, CIN2, CIN3 in situ ή και διηθητικό καρκίνωμα. Η ανίχνευση όμως του ιού, των σωματιδίων ή και των τύπων αυτού, γίνεται με τις ακόλουθες μεθόδους:

Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (H/M)

Ανοσοϊστοχημεία

DNA υβριδισμός (in situ, southern blot)

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction PCR)

Το H/M και η Ανοσοϊστοχημεία ανιχνεύουν σωματίδια του ιού και ειδικό αντιγόνο σε ενεργό λοίμωξη σε ποσοστό 50%. Η τυποποίηση του ιού γίνεται με DNA υβριδισμού ή με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), μια σχετική μέθοδο δε, την nested multiplex PCR, την εφαρμόσαμε και εμείς κατά τη διάρκεια της εργασίας μας για την ταυτοποίηση των HPV τύπων.

#### 3.1.2 Φυσική Ιστορία της ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας CIN

Οι βλάβες που σχετίζονται με συγκεκριμένους HPV τύπους συνήθως διατρέχουν μια καλοήγη πορεία π.χ. η συσχέτιση HPV6/11 με την πρόκληση τραχηλικού καρκίνου είναι πολύ σπάνια. Ενδοεπιθηλιακές βλάβες που προκαλούνται από ενδιαμέσου και υψηλού κινδύνου HPV τύπους έχουν μια αστάθμητη πορεία(86).

Ο διηθητικός καρκίνος συνήθως συνοδεύεται από βλάβη τύπου CINIII που πιθανότατα προηγείται (87,88). Μελέτες που ερευνούν τα πρώτα ανώμαλα επιχρίσματα (test pap) που προηγήθηκαν τραχηλικού καρκίνου έδειξαν ότι 80% περιέχουν CIN III ακόμα και έως 20 έτη πριν τη διάγνωση. Πολλές γυναίκες όμως με CIN III δεν αναπτύσσουν καρκίνο με την πιθανότητα του κινδύνου να κυμαίνεται από 20% έως περισσότερο από 70% ανάλογα με τις σειρές (89,90). Ο high risk HPV-16 συσχετίζεται ισχυρά με βλάβες CIN II, CIN III ή και καρκίνωμα(22,91). Άλλοι HPV τύποι που συσχετίζονται με τον καρκίνο (π.χ. HPV<sub>31</sub>, HPV<sub>33</sub>) ανευρίσκονται με ίδια συχνότητα σε βλάβες CIN I, CIN II και CIN III. Δεν είναι ξεκάθαρο αν οι βλάβες CIN I που σχετίζονται με high risk HPV έχουν μεγάλη πιθανότητα να εξελιχθούν σε

καρκίνο. Ένας σημαντικός βαθμός βλαβών που οφείλονται σε high ή intermediate risk HPV types υποστρέφει ή δεν εξελίσσεται σε καρκίνο (92,93).

Σε άλλες μελέτες βρέθηκε 40 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα ανάπτυξης CIN I και 100 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα ανάπτυξης CIN II, ή CIN III σε HPV16/18 μολύνσεις (92), ενώ όπως αναφέρθηκε και σε άλλο σημείο η πιθανότητα πρόκλησης διηθητικού καρκίνου σε πληθυσμό με κυτταρολογική διάγνωση δυσπλασίας (CIN) ήταν και 100 φορές μεγαλύτερη από τον πληθυσμό με φυσιολογικά επιχρίσματα (9).

Νεότερες μελέτες έδειξαν ότι η πιθανότητα κατά τη διάρκεια της ζωής της γυναίκας να μολυνθεί με κάποιο τύπο του HPV φθάνει έως και το 80% (94,95). Σε μελέτη στη Νορβηγία (96) η HPV μόλυνση είναι πολύ συχνή ιδίως στις νέες γυναίκες με τις περισσότερες μολύνσεις να είναι πρόσκαιρες και ασυμπτωματικές με ένα ποσοστό τραχηλικού καρκίνου πάντως της τάξης των 13/100.000 στην περίοδο 1995-99 και στις ηλικίες 25-29 ετών. Η συχνότητα της HPV μόλυνσης ήταν 30-60% σε γυναίκες < των 30 ετών ενώ το ποσοστό έπεφτε σε 5-10% μετά τα 30 έτη γεγονός που δείχνει την εξαφάνιση (Clearing) της μόλυνσης στις περισσότερες περιπτώσεις (97,98).

Τελικά η εξέλιξη μιας δεδομένης HPV μόλυνσης δεν μπορεί να προβλεφθεί με ακρίβεια ακόμη και σε βλάβες CIN III που οφείλονται σε high risk HPV. Έτσι, με δεδομένο και τον μεγάλο αριθμό που μολύνονται κατά τη διάρκεια του βίου, καταβάλλονται προσπάθειες για να βρεθούν νέοι δείκτες που να υποδεικνύουν με μεγαλύτερη σαφήνεια τις γυναίκες εκείνες που εμφανίζουν μεγαλύτερο κίνδυνο πρόκλησης τραχηλικού καρκίνου ώστε να υποβληθούν σε θεραπεία.

### **3.2 E6/E7**

Οι E6 και E7 εμπλέκονται σ' αυτή τη διαδικασία. Το ογκογενετικό δυναμικό των high risk HPV έχει τεκμηριωθεί ότι οφείλεται κυρίως στις ογκοπρωτεΐνες E6 και E7 η έκφραση των οποίων είναι απαραίτητη (όχι ικανή από μόνη της) για την εξέλιξη σε κακοήθεια.

Προτείνεται επομένως ότι η ανίχνευση των μεταγράφων E6 και E7 του high risk HPV τύπων θα μπορούσε να δίνει μια καλύτερη εκτίμηση του κινδύνου εξέλιξης σε CIN III ή καρκίνωμα. Έτσι, σε μελέτηδείχθηκε ότι η ανίχνευση των high risk HPV E6/E7 mRNA σε τραχηλικά επιχρίσματα αναγνωρίζει τις CIN III βλάβες με σχεδόν 10% ευαισθησία και έχει μια πολύ υψηλή αρνητική προγνωστική αξία για την εξέλιξη της νόσου (99).

Σε άλλη μελέτη φάνηκε ότι τα επίπεδα έκφρασης των HPV E6/E7 mRNA ήταν ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας (δεύτερος σε σπουδαιότητα) για την πορεία του διηθητικού τραχηλικού καρκίνου(100). Τέλος 779 τραχηλικά δείγματα θετικά σε high risk HPV DNA που εμφάνιζαν όλους τους βαθμούς CIN μεταξύ των οποίων και CIN 0 (μη δυσπλαστικό τραχηλικό επιθήλιο) εξετάστηκαν για την ανίχνευση E6/E7 μεταγράφων μέσω της nested RT-PCR μεθόδου (101). Το αποτέλεσμα ήταν να ανιχνευθούν ματισμένα E6/E7 μετάγραφα όλων των high risk HPV σε μεγάλο αριθμό δειγμάτων με μέση συχνότητα 47%.Εξ αυτών, σε 227 περιπτώσεις όπου υπήρχε και συμφωνία κυτταρολογικής και ιστολογικής διάγνωσης η συχνότητα ανίχνευσης E6/E7 m RNA αυξανόταν σύμφωνα με το βαθμό της βλάβης και ήταν: CIN 0-18%, CIN I -58%, CIN II- 77%, CIN III- 84%.

Οι μηχανισμοί μεταγραφής έχουν μελετηθεί κυρίως στους HPV 16 και HPV 18 τύπους. Αμφότερα τα ογκογονίδια E6 και E7 μεταγράφονται από έναν κοινό υποκινητή ο οποίος συνήθως καταστέλλεται από την ιική E2. Στον HPV 16 γίνεται εναλλακτικό μάτισμα με τη χρήση μιας κοινής θέσης ματίσματος στα 226 nt και δύο διαφορετικών θέσεων ματίσματος στα 409 nt και τα 526 nt, οδηγώντας σε τρία διαφορετικά μετάγραφα. Μόνο το πλήρους μήκους E6/E7 μετάγραφο κωδικοποιεί την E6 πρωτεΐνη ενώ τα προϊόντα του εναλλακτικού ματίσματος E6 \* I και πιθανόν E6 \* II κωδικοποιούν την E7 πρωτεΐνη (102).

Ομοιομορφία αυτού του μοντέλου έχει αποδειχθεί σε τραχηλικό καρκίνο (πλακώδους τύπου) και σε CIN βλάβες. Σε άλλους high risk HPV τύπους (18,31,33,35,51,52,56,58,59) μόνο ένα προϊόν ματίσματος έχει περιγραφεί, ενώ σε άλλους (39,45,66,68) δεν έχει ακόμη περιγραφεί. Συνοψίζοντας, το κύριο πρόβλημα με το HPV DNA test σε συνδυασμό με το test pap είναι η υψηλή συχνότητα HPV στις γυναίκες με φυσιολογικό pap επίχρισμα στις γυναίκες με pap επίχρισμα ASCUS (Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance: άτυπα πλακώδη κύτταρα απροσδιόριστης σημασίας), καθώς και στις γυναίκες με Pap επίχρισμα χαμηλόβαθμου CIN, δεδομένου του μικρού σχετικά αριθμού που θα αναπτύξουν τελικά υψηλόβαθμο CIN.

Η ανίχνευση του E6 και E7 mRNA πιθανόν να έχει διαγνωστικό και προγνωστικό πλεονέκτημα σε σχέση με την ανίχνευση του HPV DNA, υποδεικνύοντας βλάβες που είναι πιθανότερο να επιμείνουν ή να εξελιχθούν ενδεχομένως δε και το μοντέλο ματίσματος – έκφρασης του mRNA να σχετίζεται με την ανάπτυξη ή εξέλιξη της δυσπλασίας (CIN).



Αυτό θα προσπαθήσουμε να μελετήσουμε στην εργασία μας ανιχνεύοντας τους HPV 16 τύπους σε περιστατικά CIN (από CIN I έως CIN III και in situ Ca) μέσω PCR και nested multiplex PCR και στη συνέχεια προσπαθώντας να ανιχνεύσουμε το E6/E7 mRNA μέσω RT PCR και nested RT PCR.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Κλινικά δείγματα

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 57 κλινικά δείγματα από το ιδιωτικό παθολογοανατομικό ( ιστοπαθολογικό) εργαστήριο του εκπονούντος τη μελέτη. Αυτά αφορούσαν σε βιοψίες τραχήλου μήτρας κατά το χρονικό διάστημα 2006-2009.

Στα ανωτέρω δείγματα έχει γίνει ιστολογική εξέταση και έχει τεθεί η διάγνωση δυσπλασίας-ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας (CIN) σε βαθμούς από 1 έως 3 ή /και in situ Ca.

Στον πίνακα 1 παρουσιάζονται τα δείγματα βιοψιών τραχήλου που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, ο βαθμός CIN και η χρονολογία ιστολογικής διάγνωσης.

Δείγμα	Κωδικός εργαστηρίου	Βαθμός CIN	Χρονολογία ιστολογικής διάγνωσης
B20-6/09	Δ1	CIN-1	20/2/09
E7-1-5γ/09	Δ2	CIN-3	7/5/09
Z1-4δ/09	Δ3	CIN-3	1/7/09
Z22-1-4γ/09	Δ4	CIN-3	22/7/09
Z22-1-6α/09	Δ5	CIN-3- in situ	22/7/09
Λ23-1-4/08	Δ6	CIN-2	23/12/08
Στ-5-2-1/08	Δ7	CIN-2	5/6/08
A23-1-5/09	Δ8	CIN-1	23/1/09
A15-1-1/09	Δ9	CIN-1	15/1/09
Θ2-1-9A/09	Δ10	CIN-2	2/9/09
E16-1-1/08	Δ11	CIN-2	16/5/08
E13-5-6/09	Δ12	CIN-1	13/5/09
E9-2-6-AB/08	Δ13	CIN-3	2/9/08
H21-1-3A/08	Δ14	CIN-3	21/8/08
Θ2-1-5/08	Δ15	CIN-3	1/9/08
Θ1-1-3/09	Δ16	CIN-3	1/9/09
Στ-9-1-4B/03	Δ17	CIN-2	9/6/09
ΣΤ5-1-8B,Γ/09	Δ18	CIN-2	5/6/09
E9-1-5/08	Δ19	CIN-2	9/5/08
H18-1-4/08	Δ20	CIN-2	18/8/08
G21-5/09	Δ21	CIN-3	21/3/09
Δ13-1-1/07	Δ22	CIN-1	13/4/02
Δ16-4-1/07	Δ23	CIN-1	16/4/07
Δ17-5-1/07	Δ24	CIN-1	17/4/07

E23-3-3/07	Δ25	CIN-1	23/3/07
I30-1-3/08	Δ26	CIN-1	30/10/08
K4-1-5/08	Δ27	CIN-1	4/11/08
K6-1-9/08	Δ28	CIN-1	6/11/08
A4-4/07	Δ29	CIN-2	4/1/07
I15-1-4/07	Δ30	CIN-2	15/10/07
I15-1-5/07	Δ31	CIN-2	15/10/07
I26-1-4/07	Δ32	CIN-2	26/10/07
E9-1-1/07	Δ33	CIN-3	9/5/07
K10-1-1/09	Δ34	LGSIL	10/11/09
E14-6-1/09	Δ35	CIN-1	14/5/09
Γ28-2-1/07	Δ36	CIN-1	28/3/07
B15-3/08	Δ37	CIN-1	15/2/08
Γ7-1-6/07	Δ38	CIN-1	7/3/07
Λ11-2/06	Δ39	CIN-1	11/12/06
K21-1/06	Δ40	CIN-1	21/12/06
K7-2-3/06	Δ41	CIN-1	7/12/06
I17-4-2/06	Δ42	CIN-2	17/10/06
Θ22-3/06	Δ43	CIN-1	22/9/06
H1-1-1/06	Δ44	CIN-1	1/8/06
Z11-1/06	Δ45	CIN-1	11/7/06
Στ 14-3/06	Δ46	CIN-1	14/6/06
E9-3-5B/06	Δ47	CIN -3	9/5/06
E4-3-3/06	Δ48	CIN -1	4/5/00
Δ27-2-8/06	Δ49	CIN -1	27/14/06
Δ4-4-3Γ- Δ/06	Δ50	CIN-3	4/4/06
Γ21-2-1/06	Δ51	CIN-1	21/3/06
Γ14-4-1/06	Δ52	CIN -3	14/3/06
Γ10-4-1/06	Δ53	CIN -1	10/4/00
A24-2-3B- Δ/06	Δ54	CIN -2	24/1/06
A23-4-1/06	Δ55	CIN-1	23/1/06
A19-2/06	Δ56	CIN-1	19/2/06
A10-4-1B- Γ/06	Δ57	CIN -2	10/1/06

### Πίνακας 1. Δείγματα βιοψιών τραχήλου

Χρησιμοποιήθηκαν ακόμη επτά (7) δείγματα HPV-16 (+) με διάγνωση HSIL( υψηλόβαθμη ενδοεπιθηλιακή βλάβη), που προέρχονται από κολποτραχηλικά επιχρίσματα Thin Prep του Νοσοκομείου «Άγιος Σάββας» Αθηνών της περιόδου 2003-2005 και είχαν ταυτοποιηθεί προγενέστερα στο εργαστήριο Μικροβιολογίας - Ιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Παν/μίου Θεσσαλίας( Πίνακας 1.1).

<b>Δείγματα</b>	<b>Βαθμός</b>
<b>thin prep</b>	<b>ενδοεπιθηλιακής βλάβης</b>
739	HSIL
858	HSIL
868	HSIL
793	HSIL
795	HSIL
796	HSIL
747	HSIL

### **Πίνακας 1.1 Δείγματα HPV -16 (+)**

**Νοσοκομείου «Άγιος Σάββας»**

#### **2.1.1 Επεξεργασία ιστών-τομές παραφίνης**

Χρησιμοποιήθηκαν τομές τεμαχίων τραχήλου μήτρας μονιμοποιηθείσες σε φορμόλη πυκνότητας 36%, αραιωμένης σε αναλογία 1/8 με απεσταγμένο νερό. Στη συνέχεια οι τομές αφυδατώθηκαν σε ιστοκινέττα σε διαλύματα αλκοόλης βαθμού 70%, 80%, 96% και 100%, εγκλείστησαν σε λιωμένη παραφίνη (paraplast plus) και σκηνώθηκαν σε κύβους (block) παραφίνης.

Στη συνέχεια κόπηκαν σε μικροτόμο και ελήφθησαν τομές πάχους 5-6 μ που επιστρώθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες.

#### **2.2. Ταυτοποίηση**

##### **2.2.1 Απομόνωση DNA**

Από το ανωτέρω υλικό έγινε εκχύλιση DNA ως εξής: Οι τομές αποξύθηκαν με αποστειρωμένο νυστέρι (ξεχωριστό για κάθε δείγμα) και το υλικό που προέκυψε συγκεντρώθηκε σε φιαλίδια των 0,5 ml. Έγινε ήπια φυγοκέντρηση (spin down) για τη συγκέντρωση του περιεχομένου στον πυθμένα.

**Αποπαραφίνωση :** Στο δείγμα προστέθηκαν 400 μl ξυλόλης, έγινε καλή ανάδευση για 30 sec και στη συνέχεια φυγοκέντρηση σε 14.000xg για 5 min. Αφαιρέθηκε η ξυλόλη. Προστέθηκαν 400 μl αιθανόλης 100%, έγινε καλή ανάδευση και στη

συνέχεια φυγοκέντρωση σε 14.000xg για 5 min. Αφαιρέθηκε η αιθανόλη προσεκτικά με πιπέτα. Το ίζημα που παρέμεινε ξηράθηκε σε θερμοκρασία δωματίου.

Στο ίζημα προστέθηκαν 50-200 μl διαλύματος εκχύλισης (extraction buffer) ανάλογα με την ποσότητα του ιστού. Το διάλυμα εκχύλισης (extraction buffer) αποτελείται από :

890 μl αποσταγμένο και αποστειρωμένο νερό (ultra pure water)

100 μl 10 x paq 5000 reaction buffer ( stratagene)

10 μl proteinase K

σε συνολικό όγκο 1000 μl.

Τα φιαλίδια με το ανωτέρω μίγμα επώαστηκαν στους 55° για 3h. Ακολούθησε θέρμανση στους 95° C για 10-15 min και ήπια φυγοκέντρωση.

Έγινε συλλογή του υπερκείμενου διαλύματος, στο οποίο προστέθηκαν 10 μl γλυκογόνου αποθηκευμένου στους -20° C, και 300 μl λυτικού διαλύματος (lysis buffer) αποτελούμενου από : 300μl Lysis Buffer αποτελούμενου από 4M GuSCN, 0,5% N-lauroyl sacrosine, 1mM dithiothreitol, 25mM sodium citrate. Έγινε ανάδευση και στη συνέχεια επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 20 min. Προστέθηκαν 400 μl ισοπροπανόλης αποθηκευμένης στους -20° C, έγινε ανάδευση και επώαση σε πάγο για 20 min. Έγινε φυγοκέντρωση για 10 min σε 14000xg και απορρίφθηκε το υπερκείμενο.

Το ίζημα εκπλύθηκε με προσθήκη 50 μl αιθανόλης 70%. Έγινε ανάδευση, φυγοκέντρωση σε 14000xg για 10 min και απόρριψη του υπερκείμενου.

Τέλος στο εναπομείναν ίζημα προστέθηκαν 100 μl ddH<sub>2</sub>O και, αφού έγινε ανάδευση, το δείγμα αποθηκεύθηκε στους -20° C.

### 2.2.2 Εκκινητές ( primers)

Η ταυτοποίηση HPV πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο της μελέτης των Sotlar και συν(104).

Για την ταυτοποίηση έγινε στόχευση των E6/E7 γονιδίων που περιέχονται στους HPV με PCR, χρησιμοποιώντας σαν εκκινητές (primers) τον GPE6-3F (forward) με αλληλουχία GGG WGG KAC TGA AAT CGG T και τους GPEG-5B και GPE6-6B (reverse) με αλληλουχίες CTG AGC TCT CAR NTA ATT GCT CA και TCC TCT GAG TYG YCT AAT TGC TC αντίστοιχα.

Το προϊόν της PCR ενισχύθηκε περαιτέρω με nested multiplex PCR, ώστε αφ' ενός να καταστεί ανιχνεύσιμο αφ' ετέρου να επιτευχθεί η ταυτοποίηση των HPV.

Συγκεκριμένα, για την ανεύρεση του τύπου του HPV που περιέχεται στο υπό εξέταση δείγμα χρησιμοποιήθηκαν μείγματα εσωτερικών εκκινητών (primer mix), ειδικά για κάθε τύπο του ιού, σχεδιασμένα έτσι ώστε να στοχεύουν τα PCR ενισχυμένα τμήματα των γονιδίων E6, E7.

Οι ανωτέρω εκκινητές αφορούν 14 από τους συχνότερους HPV τύπους μεταξύ των οποίων αρκετούς από τους υψηλής επικινδυνότητας (high risk), των HPV<sub>16</sub> και HPV<sub>18</sub> συμπεριλαμβανομένων.

Στον πίνακα 2 παρουσιάζονται οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση των HPV, τα μείγματα στα οποία οργανώθηκαν, η αλληλουχία τους, η θέση τους στο γονιδίωμα του ιού, η πολικότητά τους και το μήκος των προϊόντων τους.

Εκκινητές (Primers)	HPV γονότυπος	Μήκος PCR προϊόντος (bp)	Πολικότητα	Αλληλουχία(5'-3')	Θέση (bp)
<b>PRIMER MIX 1</b>					
HPV 16 F	16	457	F*	CAC AGT TAT GCA GAG AGC TGC	141-161
HPV 16 R			R**	CAT ATA TTC ATG CAA TCT AGG TGT	597-573
HPV 68 F	68	333	F	GCA GAA GGC AAC TAC AAC GG	4049-4068
HPV 68 R			R	GTT TAC TGG TCC AGC AGT GG	4381-4362
HPV 31 F	31	263	F	GAA ATT GCA TGA ACT AAG CTC G	137-158
HPV 31 R			R	CAC ATA TAC CTT TGT TTG TCA A	399-378
HPV 59 F	59	215	F	CAA AGG GGA ACT GCA AGA AAG	159-179
HPV 59 R			R	TAT AAC AGC GTA TCA GCA GC	373-354
<b>PRIMER MIX 2</b>					
HPV 33 F	33	398	F	ACT ATA CAC AAC ATT GAA CTA	172-192

HPV 33 R				R	GTT TTT ACA CGT CAC AGT GCA	569-549
HPV 6/11 F	6/11		334	F	TGC AAG AAT GCA CTG ACC AC	201-220
HPV 6/11 R				R	TGC ATG TTG TCC AGC AGT GT	534-515
HPV 58 F	58		274	F	GTA AAG TGT GCT TAC GAT TGC	297-317
HPV 58 R				R	GTT GTT ACA GGT TAC ACT TGT	570-550
HPV 52 F	52		229	F	TAA GGC TGC AGT GTG TGC AG	178-197
HPV 52 R				R	CTA ATA GTT ATT TCA CTT AAT GGT	406-383
<b>PRIMER MIX 3</b>						
HPV 35 F	35		358	F	CAA CGA GGT AGA AGA AAG CAT C	157-178
HPV 35R				R	CCG ACC TGT CCA CCG TCC ACC G	514-493
HPV 51F	51		223	F	GAG TAT AGA CGT TAT AGC AGG	319-339
HPV 51 R				R	TTT CGT TAC GTT GTC GTG TAC G	541-520
HPV 66 F	66		172	F	TTC AGT GTA TGG GGC AAC AT	353-372
HPV 66 R				R	AAA CAT GAC CCG GTC CAT GC	520-501
HPV 45 F	45		151	F	GTG GAA AAG TGC ATT ACA GG	82-101
HPV 45 R				R	ACC TCT GTG CGT TCC AAT GT	373-354
HPV 18 F	18		322	F	CAC TTC ACT GCA AGA CAT AGA	170-190
HPV 18 R				R	GTT GTG AAA TCG TCG TTT TTC A	491-470

\* Forward, \*\* Reverse

## Πίνακας 2: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την HPV-ταυτοποίηση.

[ Πηγή: Sotlar K et al, 2004 (104)]

### 2.2.3 PCR-nested multiplex PCR ( nm PCR)

Για την αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκαν 3 μl DNA δείγματος σε μείγμα που αποτελείτο από 3 μl εκκινητών (primers) (GPE6 3F-5B-6B) συγκέντρωσης 25 pmoles, 6 μl μείγματος νουκλεοτιδίων (dNTPs) 10mM, 5 μl ρυθμιστικού διαλύματος ραg Buffer 10x, 0,5 μl (5u/μl) Ραg 5000 DNA πολυμεράση (stratagene) και 32,5 μl απεσταγμένου και αποστειρωμένου νερού ελεύθερου νουκλεασών. Ο τελικός όγκος του διαλύματος ήταν 50 μl.

Για την αντίδραση nm PCR χρησιμοποιήθηκαν 2μl DNA δείγματος, 4 μl μείγματος εκκινητών (Primer mix 1 ή 2 ή 3) 25 pmoles, 6 μl dNTPs 10mM, 5 μl ραg Buffer 10x, 0,5 μl (5u/μl) Ραg 5000 DNA πολυμεράση ( stratagene) και 32,5 ddH<sub>2</sub>O μl σε τελικό όγκο διαλύματος 50 μl.

Οι ανωτέρω αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στον θερμικό κυκλοποιητή erppendorf master cycler. Προηγήθηκε αποδιάταξη του DNA στους 95° C για 5 min και στη συνέχεια ακολούθησε η εφαρμογή των συνθηκών ανάλογα με τα ζεύγη εκκινητών (primers) όπως περιγράφονται στον πίνακα 3. Οι αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης (PCR και nmPCR) ολοκληρώθηκαν με ένα τελευταίο στάδιο επώασης σε 72° C θερμοκρασία για 5 min.

Ζεύγη εκκινητών	Συνθήκες Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης ( PCR)
CPG63F-5B-6B	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95° C για 30 sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 50° C για 30 sec } 35 κύκλοι Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72° C για 1 min
Μείγμα εκκινητών 1 (primer mix 1)	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95° C για 30 sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 50° C για 30 sec } 40 κύκλοι Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72° C για 1 min
Μείγμα εκκινητών 2 (primer mix 2)	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95° C για 30 sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 55° C για 30 sec } 40 κύκλοι Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72° C για 1 min
Μείγμα εκκινητών 3 (primer mix 3)	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95° C για 30 sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 50° C για 30 sec } 40 κύκλοι Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72° C για 1 min

**Πίνακας 3. Συνθήκες PCR -nm PCR για ανίχνευση-ταυτοποίηση HPV**



## 2.3 Ενίσχυση μεταγράφων E6/E7 ογκογονιδίων σε δείγματα HPV -16 (+)

### 2.3.1 Απομόνωση RNA

Σε όλα τα HPV -16 (+) δείγματα των πινάκων 1 και 1.1 έγινε εκχύλιση RNA με τη χρήση του kit Nucleospin RNA XS, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

### 2.3.2 Πέψη DNA.

Ακολούθησε επεξεργασία των υλικών στα οποία ταυτοποιήθηκε ο τύπος HPV-16, αρχικά με DNase για πέψη και αφαίρεση του DNA, ώστε να παραμείνει δείγμα ελεύθερο DNA με περιεχόμενο μόνο RNA.

Η πέψη έγινε σε διάλυμα 10 μl, αποτελούμενο από 3μl δείγματος, 1 μl ρυθμιστικού διαλύματος CRQ1 Buffer 1 X και 2 μl RQ1 DNase (1mg/ μl) ( Promega Phase RQ1 ) και 4μl H<sub>2</sub>O ελεύθερο νουκλεασών.

Ακολούθησε επώαση στους 37°C για 30 min. Στη συνέχεια, για την απενεργοποίηση της DNάσης προστέθηκε 1μl διαλύματος (RQ1 DNase stop solution) και έγινε επώαση στους 65° C για 10min.

### 2.3.3 Εκκινητές ( primers)

Για την ενίσχυση των μεταγράφων των E6/E7 ογκογονιδίων χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές ( primers) που περιγράφονται στον πίνακα 4.

Εκκινητές ( Primers)	HPV γονότυπος	Μήκος PCR προϊόντος (bp)	Πολι-κότητα	Αλληλουχία(5'-3')	Θέση (bp)
HPV 16 -192	16		F	GTG TGT ACT GCA AGC AAC AG	192- 211
HPV 16-R		405	R	CAT ATA TTC ATG CAA TCT AGG TGT	597- 573
HPV 16 F	16		F	CAC AGT TAT GCA GAG AGC TGC	141- 161
HPV 16 668			R	TCC TCC TCC TCT GAG CTG TC	668- 649

**Πίνακας 4. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των E6/E7 μεταγράφων [Πηγή :Sotlar et al, 2004(101)]**

### 2.3.4 Αντίστροφη μεταγραφή ( RT)

Το RNA των δειγμάτων υποβλήθηκε στη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής (RT) για τη σύνθεση cDNA ως εξής :

Σε μείγμα που περιείχε 1 μl antisense εκκινητή (primer) HPV16 668 50pmoles, 1μl μίγμα νουκλεοτιδίων (dNTPs) 40mM, και 5 μl H<sub>2</sub>O ελευθερονουκλεασών (nuclease free), προστέθηκαν 5 μl RNA δείγματος. Ακολούθησε επώαση στους 65° C για 5 min .

Στη συνέχεια προστέθηκαν στο μείγμα 4μl 5x first strand Buffer, 2 μl DTT 0,1 M, 1μl RNase out (40u/ μl) και 1μl αντίστροφη μεταγραφάση (200u/ μl)(superscript II invitrogen).

Ακολούθησε επώαση στους 42° C για 52 min και στους 70° C για 15 min για την απενεργοποίηση της RT.

### 2.3.5 PCR,nested PCR( nPCR)

Στα ανωτέρω συντεθέντα cDNAs των HPV16 θετικών δειγμάτων πραγματοποιήθηκε κατ' αρχάς μια PCR με εκκινητές (primers) τους HPV16F / HPV16-668 ( πίνακας 4), ώστε να επιτευχθεί η ενίσχυσή του και στη συνέχεια μια nested PCR για περαιτέρω ενίσχυση χρησιμοποιώντας τους εκκινητές (primers) HPV16-192 / HPV16 R( πίνακας 4).

Για τις ανωτέρω αντιδράσεις, όσον αφορά τόσο την PCR όσο και τη nested PCR χρησιμοποιήθηκαν 3μl cDNA δείγματος, 5μl pcr Buffer 10x, 5 μl dNTPs 10mM, 0,5 μl (5u/μl) Pcr 5000 DNA πολυμεράση ( stratagene), 2μl primers 50pmoles και 34,5 μl H<sub>2</sub>O (water for injection),σε συνολικό όγκο διαλύματος 50μl. Οι ανωτέρω αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στον θερμοκυκλοποιητή eppendorf master cycler. Προηγήθηκε αποδιάταξη του cDNA στους 95° C για 2min. Στη συνέχεια ακολούθησε η εφαρμογή των συνθηκών ανάλογα με το ζεύγος των εκκινητών, όπως φαίνεται στον πίνακα 5. Οι ανωτέρω αντιδράσεις PCR ολοκληρώθηκαν με ένα τελευταίο στάδιο επώασης στους 72° C για 5min.

---

---

HPV16F/ HPV16-668	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95° C για 30 sec
	Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 55° C για 30 sec } 30 κύκλοι
	Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72° C για 1 min

---

HPV16-192 / HPV 16 R	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95° C για 30 sec
	Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 50° C για 30 sec } 40 κύκλοι
	Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72° C για 1 min

---

**Πίνακας 5. Συνθήκες PCR και nPCR για ενίσχυση μεταγράφων E6/E7 ογκογονιδίων**

#### **2.4 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων nested PCR**

Η επιβεβαίωση και διερεύνηση των αποτελεσμάτων όλων των αντιδράσεων αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR και nested PCR) έγινε με ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων σε πήκτωμα αγαρόζης (Invitrogen Life Technologies, Paisley, UK) συγκέντρωσης 2% σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE 1X (Tris-Boric acid-EDTA) που περιέχει βρωμιούχο αιθίδιο σε συγκέντρωση 1μg/ml. Από τα PCR προϊόντα χρησιμοποιήθηκαν 10μl έκαστου τα οποία, αφού αναμείχθηκαν με 2μl χρωστικής, μεταφέρθηκαν στο πήκτωμα και αναλύθηκαν σε συσκευή ηλεκτροφόρησης Biograd όπου εφαρμόστηκε τάση 120V.

Η οπτική παρατήρηση της διαδρομής των PCR προϊόντων στο ανωτέρω πήκτωμα έγινε μέσω συσκευής εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας. (Foto / Phoresis I, Fotodyne), ενώ για τον προσδιορισμό του μεγέθους των nPCR-προϊόντων χρησιμοποιήθηκε μάρτυρας μοριακού βάρους (Invitrogen 100bp DNA ladder).

## 2.5 Εύρεση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των προϊόντων της RT-PCR

Από τα nPCR προϊόντα, 40μl ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2%, που περιείχε βρωμιούχο αιθίδιο σε συγκέντρωση 1μg/ml. Οι αντίστοιχες στα προϊόντα της nPCR ζώνες στο πήκτωμα αγαρόζης κόπηκαν από το πήκτωμα και μεταφέρθηκαν σε αποστειρωμένους σωλήνες Eppendorf master cycler των 1.5ml. Ακολούθησε καθαρισμός των προϊόντων της nPCR από το πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιώντας το προϊόν Nucleospin Extraction Kit (Macherey-Nagel), ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η εύρεση της αλληλουχίας του καθαρού πλέον DNA έγινε από την Macrogen Inc, (Seoul, Korea) χρησιμοποιώντας τον εκκινητή HPV 16-192.

## 2.6 Μελέτη των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών – προγράμματα βιοπληροφορικής

Η μελέτη και η επεξεργασία των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των προϊόντων έγινε με τη χρήση προγραμμάτων βιοπληροφορικής. Τα προγράμματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν :

- BLAST: Είναι πρόγραμμα σύγκρισης αγνώστων νουκλεοτιδικών και αμινοξικών αλληλουχιών με μια πληθώρα γνωστών αλληλουχιών που είναι καταχωρημένες στις παγκόσμιες γονιδιακές τράπεζες δεδομένων (GenBank).
- MEGA 3.1 : Είναι πρόγραμμα πολλαπλής στοίχισης και σύγκρισης αλληλουχιών νουκλεοτιδίων και αμινοξέων.
- GenRunner : Είναι πρόγραμμα επεξεργασίας αλληλουχιών.

## 2.7 Στατιστική Επεξεργασία

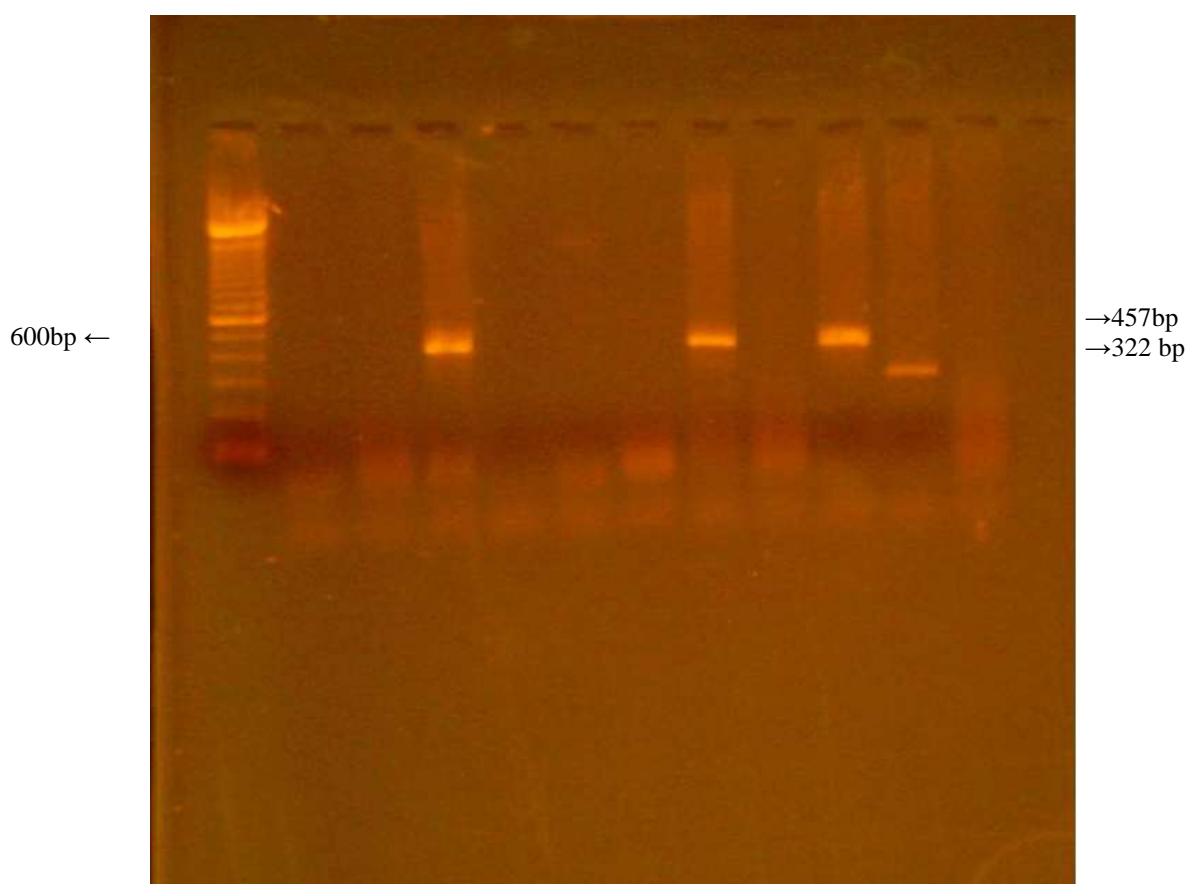
Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πρόγραμμα S.P.S.S.17.0. Έγινε περιγραφική και αναλυτική στατιστική. Ο βαθμός δυσπλασίας διχοτομήθηκε σε κατηγορία I και κατηγορία > I. Εφαρμόστηκε το Fischer's exact test για τη συσχέτιση παρουσίας HPV 16 και βαθμού δυσπλασίας (105) .Κατασκευάστηκε επίσης μοντέλο γραμμικής παλινδρόμησης πρόβλεψης του βαθμού δυσπλασίας με βάση το πλήθος των τύπων των ιών που ταυτοποιήθηκαν. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε σε  $p=0,05$ .

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 3.1 Ταυτοποίηση HPV – Περιγραφική στατιστική

Για την ταυτοποίηση των 57 κλινικών βιοπτικών δειγμάτων που περιγράφηκαν (πίνακας 1) έγινε αρχικά PCR με εκκινητές τους GPG6-3F / GPG6-5G-6B για την ενίσχυση των γονιδίων E6/E7 όλων των τύπων HPV και στη συνέχεια τα ανωτέρω PCR προϊόντα ενισχύθηκαν περαιτέρω με nm PCR (nested multiplex PCR) με την χρήση ειδικών για κάθε τύπο εκκινητών.

	Δ <sub>1</sub>	Δ <sub>2</sub>	Δ <sub>3</sub>	ddH <sub>2</sub> O	Δ <sub>4</sub>	Δ <sub>5</sub>	Δ <sub>6</sub>	ddH <sub>2</sub> O	747	825	ddH <sub>2</sub> O	
			↓				↓					
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13



#### Φωτ.1. Nested PCR με το μίγμα 1 ( primer mix 1) των εκκινητών.

Εικόνα της nmPCR αντίδρασης με την χρήση του πρώτου μίγματος εκκινητών σε 6 κλινικά βιοπτικά δείγματα. Στη θέση 1 είναι ο μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους. Στις θέσεις 2,3,4 έχουν τοποθετηθεί τα δείγματα Δ1, Δ2, Δ3. Στις θέσεις 5, 9, 12 οι αρνητικοί μάρτυρες (απεσταγμένο-αποστειρωμένο H<sub>2</sub>O) στις θέσεις 6, 7, 8 τα δείγματα Δ4, Δ5, Δ6 και στις θέσεις 10 και 11 οι θετικοί μάρτυρες (δείγματα 747 και 825 θετικό για τον HPV16 και HPV18 αντίστοιχα).

Στην ανωτέρω εικόνα (1) βλέπουμε τα PCR προϊόντα 6 ενδεικτικών κλινικών δειγμάτων που ενισχύθηκαν στη συνέχεια με το πρώτο μείγμα εκκινητών.

Παρατηρούμε ότι δύο από αυτά τα Δ3 και Δ6 παρουσιάζουν σήμα ενίσχυσης το οποίο αντιστοιχεί στα 457 bp και σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (104) ταυτοποιεί τον HPV16.

Αυτό επαληθεύεται και από τον θετικό μάρτυρα 747 στη θέση 10, γνωστό για HPV16(+). Ο θετικός μάρτυρας 825 στη θέση 11 έδωσε το αναμενόμενο σήμα στις 322 bp, γνωστός σαν HPV18(+).

Οι αρνητικοί μάρτυρες (dd H<sub>2</sub>O) στις θέσεις 5,9,12 δεν έδωσαν σήμα ενίσχυσης. Από τα ανωτέρω συνάγεται ότι οι αντιδράσεις PCR και nmPCR τελέστηκαν με επιτυχία.

Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε και με τα τρία μείγματα εκκινητών και στα 57 κλινικά βιοπτικά δείγματα και τα αποτελέσματα περιγράφονται στον πίνακα 6. Παρατηρούμε ότι ανιχνεύτηκε HPV σε 19 δείγματα. Συνολικά τα HPV-16 θετικά δείγματα ήταν 13, με 8 από αυτά να είναι CIN -3, 4 CIN - 2, και 1 LSIL (low grade squamous intraepithelial lesion: χαμηλόβαθμη ενδοεπιθηλιακή βλάβη (πίνακας 6).

Δείγμα	Ιστολογική διάγνωση	Τύπος HPV που ανιχνεύθηκε
Δ1	CIN-1	HPV-33
Δ2	CIN-3	HPV-16, HPV-66
Δ3	CIN-3	HPV-16,HPV-33,HPV-66
Δ4	CIN-3	HPV-16,HPV-6/11
Δ5	CIN-3- in situ	-*
Δ6	CIN-2	HPV-16, HPV-68
Δ7	CIN-2	HPV-16, HPV-45
Δ8	CIN-1	-
Δ9	CIN-1	HPV-6/11
Δ10	CIN-2	HPV-35
Δ11	CIN-2	-
Δ12	CIN-1	-
Δ13	CIN-3	HPV-16,HPV-33, HPV-66
Δ14	CIN-3	HPV-16,HPV-33, HPV-66
Δ15	CIN-3	HPV-16,HPV-33, HPV-66
Δ16	CIN-3	HPV-16,HPV-33, HPV-66
Δ17	CIN-2	HPV-66
Δ18	CIN-2	-
Δ19	CIN-2	-
Δ20	CIN-2	-
Δ21	CIN-3	-

Δ22	CIN-1	-
Δ23	CIN-1	-
Δ24	CIN-1	-
Δ25	CIN-1	HPV-35
Δ26	CIN-1	-
Δ27	CIN-1	-
Δ28	CIN-1	-
Δ29	CIN-2	-
Δ30	CIN-2	HPV-16
Δ31	CIN-3	-
Δ32	CIN-3	-
Δ33	CIN-3	-
Δ34	LGSIL	HPV-16,HPV-66
Δ35	CIN-1	-
Δ36	CIN-1	HPV-33
Δ37	CIN-1	-
Δ38	CIN-1	-
Δ39	CIN-1	-
Δ40	CIN-1	-
Δ41	CIN-1	-
Δ42	CIN-2	HPV-16
Δ43	CIN-1	-
Δ44	CIN-1	-
Δ45	CIN-1	-
Δ46	CIN-1	-
Δ47	CIN-3	-
Δ48	CIN-1	-
Δ49	CIN 1	-
Δ50	CIN 3	-
Δ51	CIN 1	-
Δ52	CIN 3	HPV-16
Δ53	CIN 1	-
Δ54	CIN-2	-
Δ55	CIN-1	-
Δ56	CIN-1	-
Δ57	CIN-2	-

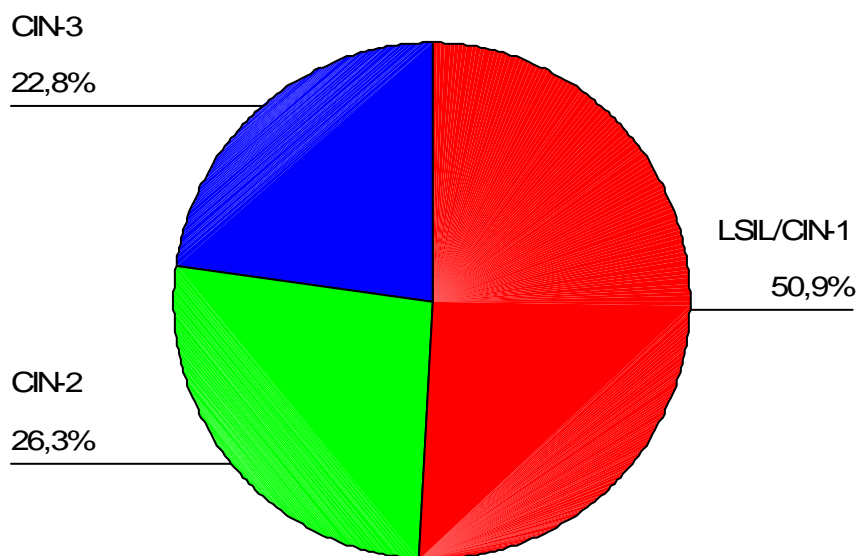
---

\*Αρνητικό για HPV

**Πίνακας 6. Αποτελέσματα ταυτοποίησης.**

### 3.1.1 . Αναλογία CIN

Αναφορικά με την αναλογία των βαθμών CIN στο σύνολο των 57 βιοπτικών δειγμάτων, το ήμισυ περίπου ήταν LSIL/CIN-1 και το άλλο ήμισυ ήταν HSIL(CIN-2 ή CIN-3) ( γράφημα 1).

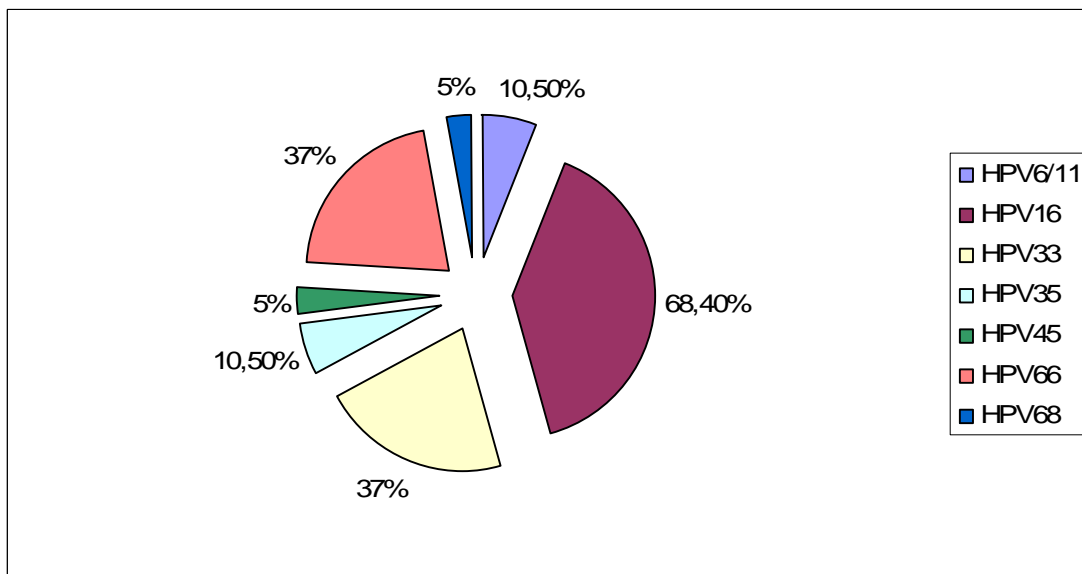


**Γράφημα 1.** Σύνολο δειγμάτων : 57. LSIL/CIN -1:29 δείγματα (50,9%), CIN 2:15 δείγματα (26,3%), CIN 3 : 13 δείγματα (22,8%).

### 3.1.2 Κατανομή των τύπων HPV

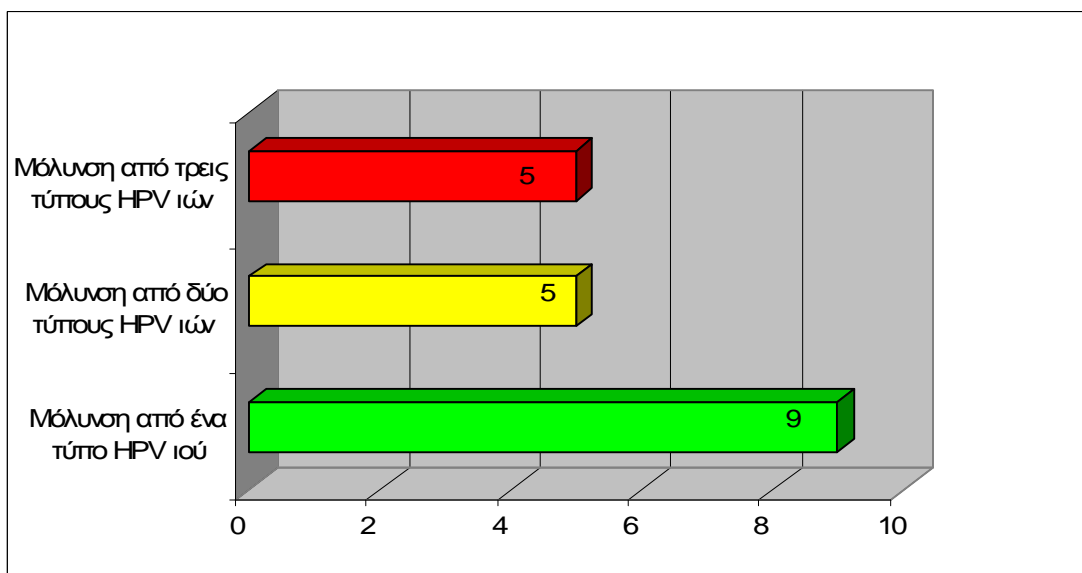
Η ποσοστιαία κατανομή των τύπων HPV στο σύνολο των θετικών βιοπτικών δειγμάτων φαίνεται στο γράφημα 2. Ο HPV-16 ήταν παρών σε 13 δείγματα (22,8% επί του συνόλου ή 68,4% επί των θετικών. Δεύτεροι σε συχνότητα ήταν οι τύποι HPV-33 και HPV-66 με αναλογία 37% επί των θετικών (γράφημα 2).





**Γράφημα 2. Ποσοστιαία κατανομή των τύπων HPV στο σύνολο των θετικών δειγμάτων.**

Σε εννέα δείγματα ανιχνεύτηκε ένας μόνο τύπος του ιού, με τον HPV- 16 να εμφανίζεται σε 3 από αυτά. Πολλαπλή μόλυνση από δυο ή τρεις τύπους του ιού, ανιχνεύτηκε σε 10 δείγματα με τον HPV 16 να είναι και στα 10 ο ένας από τους HPV τύπους (γράφημα 3).



**Γράφημα 3. HPV μόλυνση ( ένας , δύο ή τρεις τύποι).**

## 3.2 Αναλυτική στατιστική –συσχετίσεις

### 3.2.1. HPV 16 και βαθμός CIN

Από τα 29 συνολικά δείγματα CIN-1/LSIL του πίνακα 1, HPV 16 ιός ανιχνεύτηκε σε 1 δείγμα (3,4%) , ενώ από τα 28 δείγματα βαθμού CIN > 1, HPV 16 ιός ανιχνεύτηκε στα 13 δείγματα (στο 46,4%), διαφορά στατιστικά σημαντική, όπως φαίνεται στον πίνακα 7.

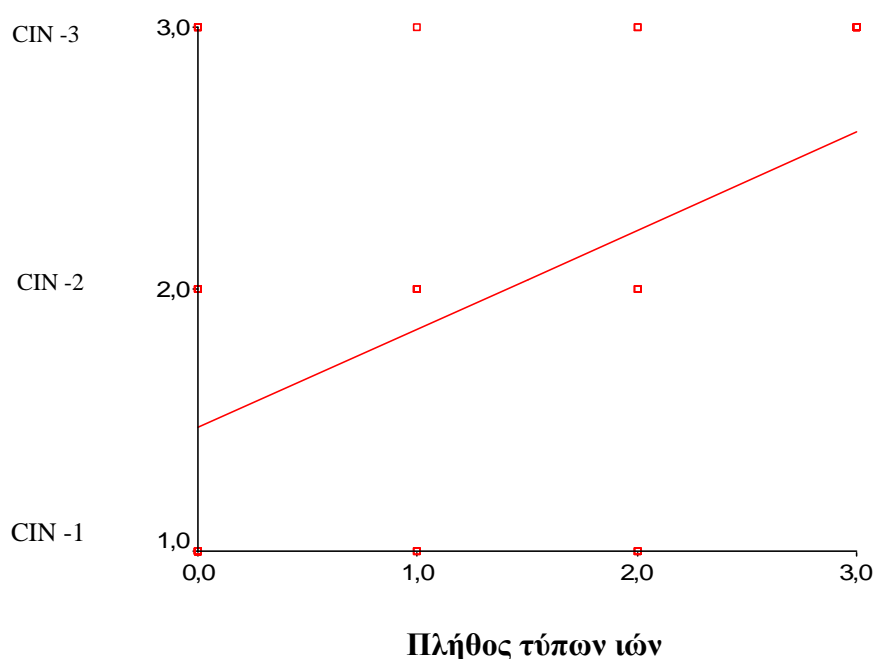
		C I N		Σύνολο
		1 ( &LSIL)	> 1	
Παρουσία	OXI	28	15	43
ιού HPV 16	NAI	1	13	14
Σύνολο		29	28	57

Fisher's Exact Test,  
p= 0.000

Πίνακας 7. Συσχέτιση HPV 16 με βαθμό CIN

### 3.2.2 Πολλαπλή HPV- μόλυνση και βαθμός CIN

Στα δείγματά μας (βιοπτικά) βρέθηκε ακόμη γραμμική συσχέτιση ανάμεσα στο βαθμό ενδοτραχηλικής νεοπλασίας CIN και στο πλήθος του τύπου των ιών. Η πολλαπλή μόλυνση αντιστοιχούσε σε μεγαλύτερου βαθμού CIN (γράφημα 4).



**Γράφημα 4.** Απεικόνιση της γραμμικής σχέσης σε σύστημα συντεταγμένων: Άξονας Y βαθμός δυσπλασίας, άξονας X πλήθος τύπων ιών.

Οι συντελεστές της εξίσωσης στο μοντέλο γραμμικής παλινδρόμησης φαίνονται στον πίνακα 8 .

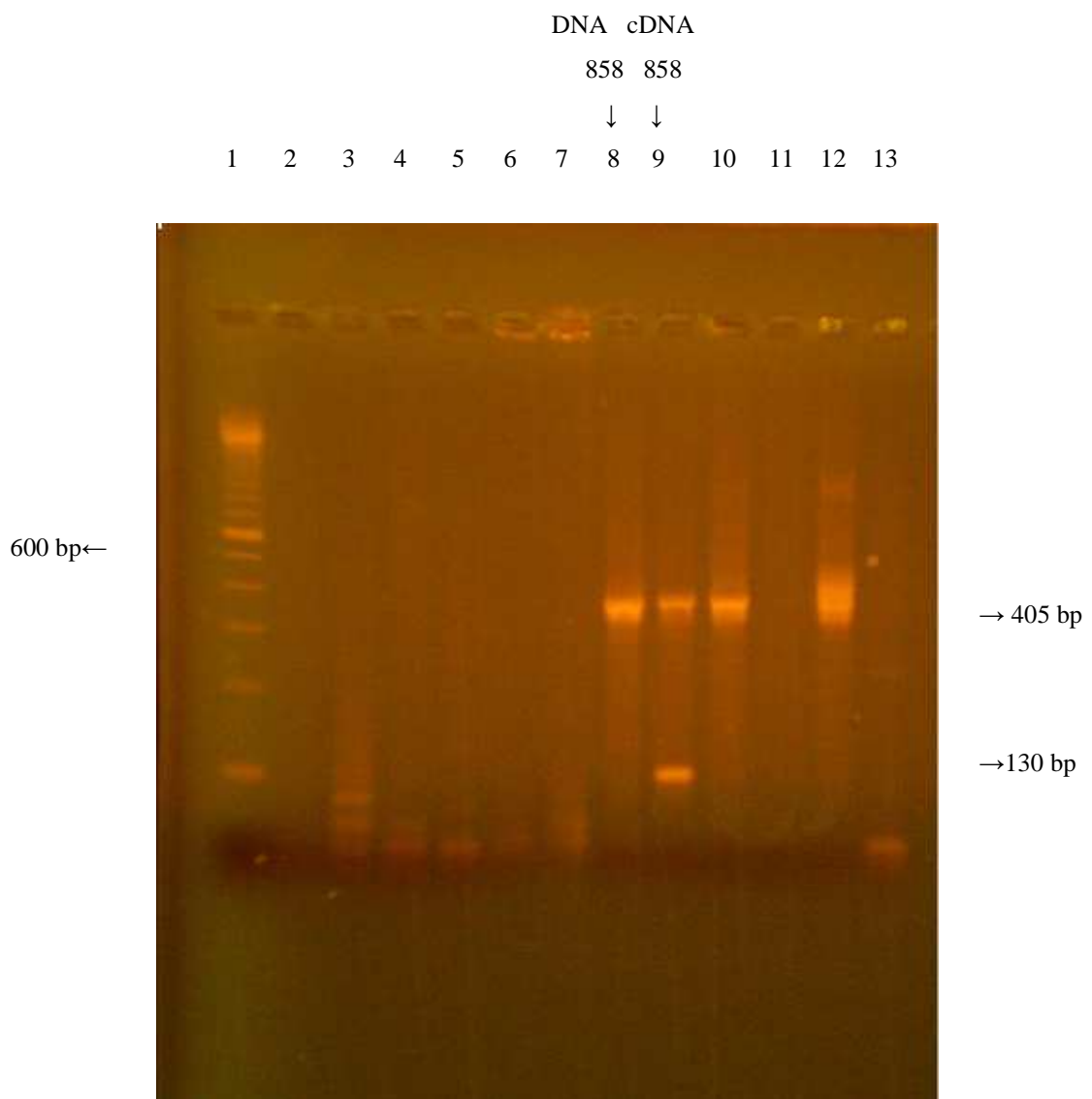
**Πίνακας 8. Μοντέλο γραμμικής παλινδρόμησης πρόβλεψης του βαθμού CIN (ανεξάρτητη μεταβλητή) με βάση το πλήθος των τύπων των ιών σε περίπτωση πολλαπλής μόλυνσης .**

Model		Συντελεστές <sup>a</sup>			t	Sig.	95,0% Διάστημα	
		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients			Εμπιστοσύνης για B	
		B	Std. Error	Beta			Κατώτερο όριο	Ανώτερο όριο
1	(Σταθερά)	1,476	0,116		12,763	,000	1,244	1,707
	Αριθμός ιών	0,375	0,097	0,463	3,870	,000	0,181	0,570

A Ανεξάρτητη μεταβλητή : πλήθος τύπων ιών , Εξαρτημένη: βαθμός ενδοτραχηλικής νεοπλασίας CIN  
,R=0,463, R<sup>2</sup>=0,214

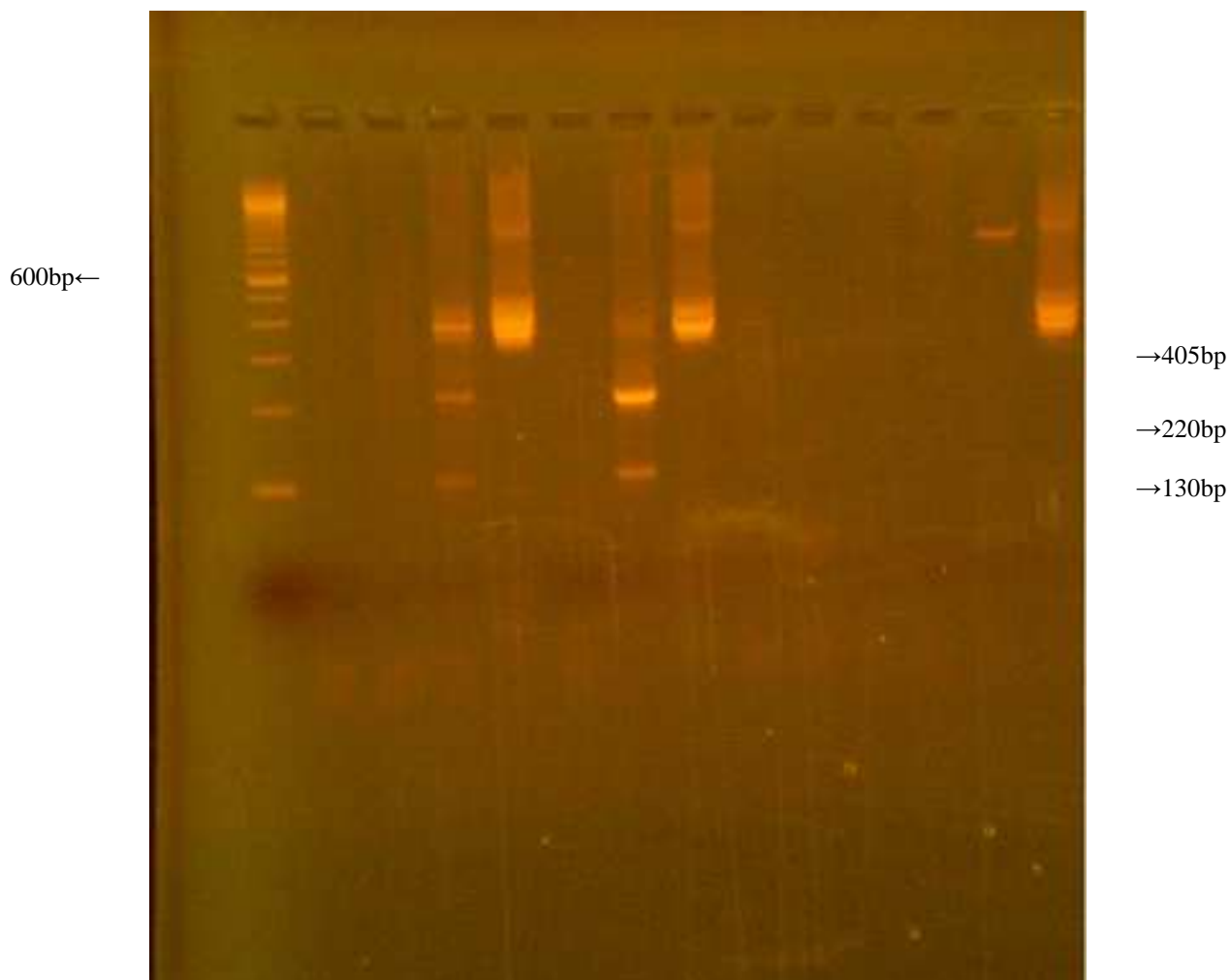
### 3.3 Ανίχνευση μεταγράφων (mRNA) E6/E7 στα HPV 16 (+) δείγματα

Σε όλα τα HPV16 θετικά δείγματα, ήτοι στα 13 βιοπτικά και στα 7 των κολποτραχηλικών επιχρισμάτων (thin prep) έγινε RT-PCR και nested PCR για την ανίχνευση μεταγράφων του ιού. Από τα 20 συνολικά HPV16 θετικά βρέθηκαν εναλλακτικά μετάγραφα σε 4 από αυτά, στο Δ42 των βιοπτικών δειγμάτων και στα 793, 858, 868 των Thin Prep. Συγκεκριμένα, στο Δ42 βρέθηκε ένα μετάγραφο μεγέθους 190 bp, στο 858 ένα μετάγραφο μεγέθους 130bp, ενώ στα 793 και 868 βρέθηκαν δυο εναλλακτικά μετάγραφα στο κάθε ένα με μέγεθος 130bp και 220bp. Ενδεικτικά παρατίθενται οι φωτογραφίες 2 & 3



**Φωτ 2.** Βλέπουμε στη θέση 9 (δείγμα 858) δυο ενδείξεις σήματος η μια στις 405 bp που αντιστοιχεί στο DNA και η άλλη στις 130 bp που αντιστοιχεί στο mRNA μετάγραφο.

				cDNA	DNA		cDNA	DNA							
				868	868		793	793							
				↓			↓								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	



**Φωτ 3.**Βλέπουμε στις θέσεις 4 και 7 (δείγματα 868 και 793) τρεις ενδείξεις σήματος η μια στις 405 bp που αντιστοιχεί στο DNA και οι άλλες δυο στις 130 bp και στις 220 bp που αντιστοιχούν στα εναλλακτικά μετάγραφα (mRNA) (φωτ.3).

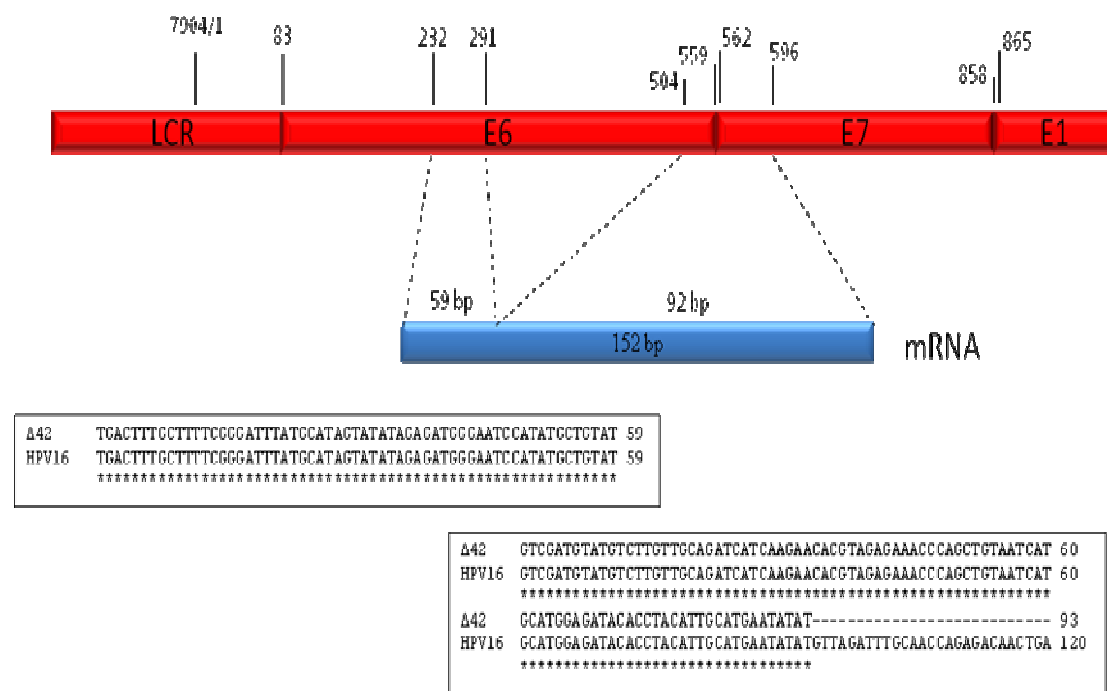
### 3.4 Αποτελέσματα αλληλούχισης

Τα αποτελέσματα της ανίχνευσης HPV 16, E6/E7 μεταγράφων επιβεβαιώθηκαν με αλληλούχιση των nested PCR προϊόντων. Στο δείγμα Δ 42, για το οποίο είναι διαθέσιμα τα οριστικά αποτελέσματα αλληλούχισης, βρέθηκε nPCR προϊόν, μεγέθους 190 bp, από το οποίο αλληλουχήθηκαν 151 bp.

Από αυτές, 59 bp εντοπίστηκαν σε περιοχή (A) στο εσωτερικό του E6 γονιδίου και 92bp σε περιοχή (B) που αντιστοιχεί σε τμήμα του E6 γονιδίου και τμήμα του E7 γονιδίου.

Οι αντίστοιχες συντεταγμένες ήταν για το τμήμα (A) από το 232 nt έως το 291 nt και για το τμήμα (B) από το 504nt έως το 596nt, με τις θέσεις ματίσματος να είναι στο 291nt και στο 504nt, όπως φαίνονται στην εικόνα 1 (μέγεθος ιντρονίου που παραλείφθηκε 212bp).

Στην ομοπαράθεση που έγινε υπήρξε 100% ομολογία, τόσο της Δ42(A), όσο και της Δ42(B) αλληλουχίας, σε σύγκριση με τα ομόλογα τμήματα της γνωστής HPV 16 αλληλουχίας.



**Εικ 1. E6/E7 mRNA**

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας είναι μια από τις συχνές κακοήθειες παγκοσμίως, η επίπτωση της οποίας παραμένει υψηλή κυρίως στις αναπτυσσόμενες χώρες (106). Στις αναπτυγμένες χώρες και συγκεκριμένα στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής, ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας ήταν η κύρια αιτία θανάτου από κακοήθεια στις γυναίκες πενήντα χρόνια πριν. (107).

Σήμερα, το ποσοστό αυτό έχει μειωθεί, τουλάχιστον κατά τα 2/3, αντιστοιχώντας στην όγδοη αιτία θανάτου από κακοήθεια στις γυναίκες (μετά από τις κακοήθειες νόσους του πνεύμονος, του μαστού, του εντέρου, του παγκρέατος, των ωοθηκών, των λεμφαδένων και του αίματος) (108). Για τη μείωση αυτή ευθύνεται η ευρεία χρήση των διαγνωστικών μεθόδων μαζικού ελέγχου του πληθυσμού (σε ασυμπτωματικούς ασθενείς-δευτερογενής πρόληψη) .

Η αιτία που οι διαγνωστικές αυτές μέθοδοι είναι τόσο αποτελεσματικές, είναι ότι τα περιστατικά καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, στο σύνολό τους σχεδόν, αποτελούν εξέλιξη μιας προκαρκινωματώδους βλάβης (CIN). Η βλάβη αυτή μπορεί να προϋπάρχει του καρκίνου έως και 20 χρόνια πριν και έτσι μπορεί να ανιχνευθεί σε μεγάλο ποσοστό (109) και να θεραπευτεί επιτυχώς. Οι προκαρκινικές αυτές αλλοιώσεις, αλλά και ο καρκίνος του τραχήλου έχουν συσχετισθεί σαφώς με τον ιό HPV (33,35).

Η διάγνωση της μόλυνσης με τον ιό HPV γίνεται στα πλαίσια μαζικού προληπτικού ελέγχου με το test pap και τις βελτιωμένες εκδοχές του, βασιζόμενη στις μορφολογικές αλλοιώσεις των πλακωδών κυττάρων του κολποτραχηλικού επιχρίσματος.

Ακριβής διάγνωση, όσον αφορά τις μορφολογικές παραμέτρους, τίθεται στη συνέχεια με την ιστολογική εξέταση, όπου καθορίζεται η παρουσία ή μη, καθώς και ο βαθμός της επιθηλιακής δυσπλασίας (CIN).

Η HPV μόλυνση επιβεβαιώνεται με την ανίχνευση του ιικού DNA με κάποια από τις μοριακές μεθόδους που χρησιμοποιούνται σήμερα (PCR, υβριδισμός, microarrays), όπου μάλιστα υπάρχει η δυνατότητα ταυτοποίησής του, ανεύρεση δηλαδή του συγκεκριμένου HPV τύπου.

Τα μέχρι τώρα ερευνητικά δεδομένα δείχνουν μια σαφή συσχέτιση του τύπου HPV και του βαθμού CIN(6), με μια ομάδα HPV να θεωρείται ως υψηλού κινδύνου (high risk) (44). Ανάμεσά τους, κυρίαρχη είναι η θέση του HPV16 (40, 110).

Στην εργασία μας χρησιμοποιήσαμε την PCR και nested multiplex PCR μέθοδο ταυτοποίησης των HPV(104) και τα αποτελέσματα συμφωνούν με τα βιβλιογραφικά δεδομένα (40,βλ και πιν.3 γενικού μέρους παρούσας εργασίας), δείχνοντας μόλυνση με HPV 16 σε 13 δείγματα, εκ των οποίων 12 ήταν HSIL(CIN 2 ή 3), και μόνο 1 LSIL. Έτσι, η συσχέτιση του βαθμού της ενδοεπιθηλιακής βλάβης με τον HPV 16 τύπο φαίνεται να είναι ισχυρή.

Η κατάσταση περιπλέκεται, διότι δεν υπάρχει απόλυτη συσχέτιση της εξέλιξης των ανωτέρων βλαβών σε καρκίνο ανάλογα με το CIN τους (5). Τα περισσότερα περιστατικά καρκίνου αφορούν την εξέλιξη υψηλόβαθμης δυσπλασίας (HSIL), από την άλλη μεριά όμως ένα μικρό ποσοστό HSIL θα εξελιχθεί σε καρκίνο (96,109). Ανευρίσκονται ακόμη ολιγάριθμα περιστατικά καρκίνου με προηγηθείσα LSIL.

Συνεπώς, για να αποφευχθεί η υπερβολική θεραπευτική παρέμβαση (overtreatment) το ιδανικό θα ήταν να μπορούν να επιλεγούν με μεγαλύτερη ακρίβεια ποιες γυναίκες έχουν σημαντική πιθανότητα να εμφανίσουν καρκίνο του τραχήλου της μήτρας (94). Για τον σκοπό αυτό γίνεται προσπάθεια επιλογής ή επινόησης νέων μοριακών δεικτών που να διευκολύνουν την ως άνω κατηγοριοποίηση. Ένας από αυτούς τους δείκτες είναι η έκφραση των E6, E7 γονιδίων που έχει σαφώς δειχθεί ότι είναι αναγκαία (όχι όμως και ικανή) συνθήκη για την καρκινογένεση (94). Η ανίχνευση των E6/E7 mRNA φαίνεται να ανταποκρίνεται καλύτερα στην εκτίμηση του βιολογικού δυναμικού της HPV μόλυνσης, συσχετιζόμενη με πιο υψηλόβαθμες ενδοεπιθηλιακές βλάβες και τον καρκίνο (99,111,112).

Τα μέχρι στιγμής ερευνητικά δεδομένα απέχουν ακόμη από το να καθιερώσουν την ανίχνευση των E6/E7 mRNA σαν νέους μοριακούς διαγνωστικούς ή προγνωστικούς δείκτες. Ωστόσο έχουν φανεί ισχυρές ενδείξεις ότι μπορούν να υπάρχουν εξελίξεις ως προς αυτή την κατεύθυνση (99).

Σημειώνεται ακόμη το ερευνητικό ενδιαφέρον για τον τρόπο ματίσματος, που δεν έχει διευκρινισθεί πλήρως σε όλους τους high risk HPV τύπους, συνήθως δε εμπεριέχει μια θέση. Ειδικά στον HPV 16 ανευρέθησαν δυο θέσεις ματίσματος που δίνουν εναλλακτικά μετάγραφα (101). Μελετάται δε η συσχέτιση της άλλοτε άλλης έκφρασης με την πρόκληση και τον βαθμό της ενδοεπιθηλιακής βλάβης και τελικά της εξέλιξης σε καρκίνο.

Στην παρούσα εργασία, με την χρήση RT-PCR και nested PCR όπως περιγράφηκε διαπιστώσαμε εναλλακτικά μετάγραφα E6, E7 σε 4 δείγματα, τα οποία αφορούν σε υψηλόβαθμη ενδοεπιθηλιακή βλάβη.



Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης δείχνουν επίσης ότι η πολλαπλή HPV λοίμωξη είναι μάλλον συχνή (10/19, περίπου 53 % στα δείγματα της παρούσας μελέτης) ανάμεσα στις γυναίκες που υποβάλλονται σε βιοψία του τραχήλου της μήτρας. Η πολλαπλή HPV λοίμωξη φαίνεται να συνδέεται με στατιστικά σημαντικά αυξημένο κίνδυνο υψηλού βαθμού CIN , συγκριτικά με λοίμωξη από έναν μόνο τύπο HPV(113,114). Αναφορικά με τη συχνότητα της πολλαπλής HPV λοίμωξης, το ποσοστό πλησιάζει εκείνα διεθνών μελετών, στις οποίες η συχνότητα ανεύρεσης πολλαπλών τύπων HPV σε βιοπτικό υλικό φθάνει το 62 %, με κάποιες μελέτες να δείχνουν ποσοστά 30-50%, ενώ η μελέτη ALTS έδειξε ποσοστό πολλαπλής μόλυνσης 56 % (115,116).

Ας σημειωθεί ότι σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε στη Δανία και σε δείγμα 12.000 γυναικών βρέθηκε ότι 59 % των HPV θετικών δειγμάτων εμφάνιζαν πολλαπλή μόλυνση, αποκαλύπτοντας έτσι ότι η ανίχνευση πολλαπλών τύπων HPV είναι σύνηθες φαινόμενο και στο γενικό πληθυσμό (117). Πιθανόν αυτό το φαινόμενο να αποκτήσει σημασία τα επόμενα χρόνια για τη δημόσια υγεία, αν τελικά αποδειχτεί ότι πολλαπλή μόλυνση συνεπάγεται και αυξημένου βαθμού δυσπλασία, κατεύθυνση προς την οποία συνηγορούν τα ευρήματα της παρούσας μελέτης, τα οποία δείχνουν επιπρόσθετα και γραμμική συσχέτιση του βαθμού των δυσπλαστικών αλλοιώσεων και του πλήθους των τύπων των ιών που ανιχνεύτηκαν.

Η συσχέτιση ανάμεσα στην πολλαπλή HPV λοίμωξη και τον αυξημένο κίνδυνο προκαρκινικών αλλοιώσεων του τραχήλου της μήτρας, έχει ήδη διαπιστωθεί σε προγενέστερες μελέτες (113). Ωστόσο, η επίδραση της πολλαπλής μόλυνσης στην επίπτωση της ιστολογικά βεβαιωμένης υψηλόβαθμης CIN είναι περισσότερο αμφιλεγόμενη. Οι Wheeler και συν, δεν κατόρθωσαν να αποδείξουν μια σταθερή σχέση ανάμεσα στην πολλαπλή μόλυνση και την επίπτωση υψηλόβαθμης CIN (118). Είναι εύλογο πάντως να υποθέσει κανείς, εφόσον η πολλαπλή μόλυνση συνδυάζεται με αυξημένα ποσοστά λοίμωξης και αυξημένη διάρκειά της, οι πιθανότητες να ανιχνευτούν οι βλάβες σε έλεγχο ρουτίνας αυξάνει, αυξάνοντας έτσι και την αντιπροσώπευση των σοβαρών λοιμώξεων και συνακόλουθα το ποσοστό των υψηλόβαθμων CIN (30,114). Μένει να διερευνηθεί το κατά πόσο αυτό αποτελεί απλά μια αυξημένη αποτύπωση του επιπολασμού της πολλαπλής HPV λοίμωξης ή συνιστά μια αιτιολογική σχέση. Διαχρονικές μελέτες σε μεγαλύτερους πληθυσμούς αναμένεται στο μέλλον να απαντήσουν στο ερώτημα αυτό.

## Περιορισμοί

Πολλά από τα βιοπτικά δείγματα στην παρούσα μελέτη απέβησαν HPV (-), πιθανόν λόγω της μόλυνσης από άλλους τύπους HPV, οι οποίοι δεν ανιχνεύονταν με τους εκκινητές μας, οι οποίοι εξάλλου ήταν ειδικοί, κυρίως για high risk HPV.

Οι εκκινητές μας ήταν τυπο-ειδικοί, μόνον για τους 6/11 low risk HPV τύπους(που ανευρίσκονται κυρίως σε LSIL), ενώ ανίχνευαν 13 από τους high risk τύπους( που ανευρίσκονται κυρίως σε HSIL). Αυτό αποτυπώθηκε στον πίνακα 6 και στα γραφήματα 1 & 2 της παρούσας εργασίας.

Επιπλέον, η δυνατότητα της RNA ανίχνευσης φαίνεται να είναι περιορισμένη στις τομές παραφίνης (tissue blocks), όπου υπάρχουν ενδείξεις ότι χρειάζεται αρκετά μεγάλη ποσότητα υλικού [πάχος τομής 60μm(100)], για την εξαγωγή συμπερασμάτων ως προς το mRNA , ενώ δεν φαίνεται να επηρεάζεται η ανίχνευση DNA.

**Συμπερασματικά**, η παρούσα μελέτη έδειξε την παρουσία HPV high risk τύπων κυρίως σε υψηλόβαθμες ενδοεπιθηλιακές βλάβες και ειδικά HPV16.

Η πολλαπλή μόλυνση ήταν συχνή και συσχετίστηκε θετικά με το βαθμό CIN.

Επιβεβαιώθηκε η ανίχνευση HPV16 μεταγράφων E6/E7 και μάλιστα εναλλακτικών μορφών.

Η βελτίωση της τεχνικής και η εξαγωγή περισσότερων αποτελεσμάτων και συμπερασμάτων ως προς την έκφραση των E6/E7 mRNA στον HPV16 αποτελούν πεδίο συνεχιζόμενης και μελλοντικής ερευνητικής εργασίας.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. Richart RM. The natural history of cervical intraepithelial neoplasia. *Clin Obstet Gynecol* 1968, 5 : 748
2. Richart RM. The patient with the abnormal Pap smear-m screening techniques and management. *N Engl J Med* 1980, 302:332
3. Wright TC Jr, Gagnon S, Richart RM, et al. Treatment of cervical intraepithelial neoplasia using the loop electrosurgical excision procedure. *Obstet Gynecol*. 1992 Feb;79(2):173-8.
4. Koss L. *Diagnostic Cytology and its Histopathologic Bases*. Ed. Lippincott Co., 4<sup>th</sup> ed vol. 1 Philadelphia, Toronto, 1992.
5. Vooijs P. Benign Proliferative reactions, intra-epithelial neoplasia and invasive cancer of the uterine cervix. *Comprehensive Cytopathology*. Ed. Bibbo M. Saunders Co., p.p. 153-230, Philadelphia, 1991
6. Giuntoli R, Atkinson B, Ernst C, et al. *Atkinson's correlative Atlas of Colposcopy, Cytology and Histopathology*. Ed. Lippincott Co., Philadelphia, 1987
7. Coleman D, Evans D. *Biopsy Pathology and Cytology of the Cervix*. Ed. Chapman and Hall Medical, London, 1989.
8. Genest DR, Stein L, Cibas E, et al. A binary (Bethesda) system for classifying cervical cancer precursors: criteria, reproducibility, and viral correlates. *Hum Pathol*. 1993 , 24(7):730-6.
9. Koss LG. Concept of genesis and development of carcinoma of the cervix. *Obstet Gynecol Surv*. 1969, 24(7 Pt 2):850-60.
10. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics, 2002, *CA Cancer J Clin* 2005, 55: 74-108.

11. Pisani P, Parkin DM, Bray F, et al. Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. *Int J Cancer*. 1999 , 83(1):18-29.
12. Yang BH, Bray FI, Parkin DM, et al. Cervical cancer as a priority for prevention in different world regions: an evaluation using years of life lost. *Int J Cancer*. 2004 ,109(3):418-24.
13. Freeman H, Wingrove B. Excess Cervical Cancer Mortality: A marker for low access to health care in poor communities. NIH. Pub. No. 05-5282. Rockville, MD: National Cancer Institute, Center to reduce Cancer Health Disparities 2005.
14. Wright TC, Kurman RJ, Ferenczy A. Precancerous lesions of the cervix. In: Kurman RJ, ed. *Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract*. New York : Springer-Verlag: 1994, 229-277
15. Koutsky LA, Holmes KK, Critchlow CW, et al. A cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to papillomavirus infection. *N Engl J Med* 1992 , 327 :1272-1278
16. Richart RM, Barron BA. A follow-up study of patients with cervical dysplasia. *Am J Obstet Gynecol* 1969, 105:386-393
17. Solomon D, Davey D, Kurman R, et al. Forum Group Members; Bethesda 2001 Workshop. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA*. 2002 ,24;287(16):2114-9. Review.
18. Austin RM, Onisko A, Druzdzel MJ. The Pittsburgh Cervical Cancer Screening Model: a risk assessment tool. *Arch Pathol Lab Med*. 2010 ,134(5):744-50.
19. Meisels A, Fortin R. Condylomatous lesions of the cervix and vagina. I. Cytologic patterns. *Acta Cytol*. 1976, 20(6):505-
20. zur Hausen H. Condylomata acuminata and human genital cancer. *Cancer Res*. 1976, 36 : 530.

21. Boshart M, Gissman L, Ikenberg H, et al. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J* 1984, 3:1151-1157
22. Durst M, Gissmann L, Ikenberg H, et al. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983, 80: 3812-3815
23. Chen EY, Howley PM, Levinson AD, et al. The primary structure and genetic organization of the bovine papillomavirus type 1 genome. *Nature*. 1982 7,299(5883):529-34.
24. Danos O, Engel LW, Chen EY, et al. Comparative analysis of the human type 1a and bovine type 1 papillomavirus genomes. *J Virol*. 1983,46(2):557-66.
25. Danos O, Katinka M, Yaniv M. Human papillomavirus 1a complete DNA sequence: a novel type of genome organization among papovaviridae. *EMBO J*. 1982,1(2):231-6.
26. De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, et al. Classification of papillomavirus. *Virology* 2004, 324:17-27
27. Antonsson A, Erfurt C, Hazard K, et al. prevalence and type spectrum of human papillomaviruses in healthy skin samples collected in three continents. *J Gen Virol* 2003, 84:1881-1886.
28. Chan SY, Bernard HU, Ratterree M, et al. Genomic diversity and evolution of papillomavirus in rhesus monkeys. *J Virol* 1997,71:4938-4943
29. Chan SY, Delius H, Halpern AL, et al. Analysis of genomic sequences of 95 papillomavirus types: uniting typing, phylogeny, and taxonomy. *J Virol* 1995, 69:3074-3083

30. Bernard HU, Calleja-Macias IE, Dunn ST. Genome variation of human papillomavirus types: phylogenetic and medical implications. *Int J Cancer* 2006, 118:1071-1076
31. Chen Z, Terai M, Fu L et al. Diversifying Selection in Human Papillomavirus Type 16 Lineages Based on Complete Genome Analyses. *J Virol* 2005, 79(11):7014-7023
32. [http://www.ebi.ac.uk/2can/genomes/viruses/Human\\_papillomavirus.html](http://www.ebi.ac.uk/2can/genomes/viruses/Human_papillomavirus.html), διαθέσιμο στις 6.6.2010
33. Bosch FX, Manos MM, Munoz N, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide prospective. *J Natl Cancer Inst* 1995, 87:796-802
34. International Agency for Research on Cancer (IARC). Human papillomavirus, Vol. 64. Geneva: World Health Organization, 1995
35. Bohmer G, van der Brule AJ, Brummer O, et al. No confirmed cases of human papillomavirus DNA-negative cervical intraepithelial neoplasia grade 3 or invasive primary cancer of the uterine cervix among 511 patients. *Am J Obstet Gynecol* 2003, 189:118-120
36. Burger MP, Hollema H, Pieters WJ, et al. Predictive value of human papillomavirus type for histological diagnosis of women with cervical cytological abnormalities. *BMJ* 1995, 310 : 94-95.
37. Cuzick, J, Sasieni P, Singer A. Risk factors for invasive cervix cancer in young women. *Eur J Cancer* 1996, 32 : 836-841.
38. Lorinez AT, Reid R, Jenson AB, et al. Hum. papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. *Obstet Gynecol* 1992, 79 : 328-337.

- 39.zur-Hausen H. Papillomavirus infection-a major cause of human cancers. *Biochem Biophys Acta* 1996, 1288 : F55-F78.
- 40.Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003, 348 : 518-527.
- 41.Schiffman M, Herrero R, Desalle R, et al. The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution. *Virology* 2005, 337 : 76-84.
- 42.Clifford GM, Rana RK, Franceschi S, et al. Human papillomavirus genotype distribution in low- grade cervical lesions: comparison by geographic region and with cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005, 14:1157-1164
- 43.Khan MJ, Castle PE, Lorincz AT, et al. The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type specific HPV testing in clinical practice. *J Natl Cancer Inst* 2005,97:1072-1079
- 44.Munoz N, Bosch XF, Jensen MO. Human Papillomavirus and cervical cancer. International agency for Research on Cancer( WHO), No 94, 9-53, Lyon, 1989.
- 45.Gissman L. Linking H.P.V. to cancer. *Clin Obst Gyn.* 1989, 32(1) : 141-147.
46. Favre M, Breitburd F, Croissant O, et al. Structural polypeptides of rabbit, bovine, and human papilloma viruses. *J Virol* 1975, 15 : 1239-1247.
- 47.Gissmann L, Pfister H, Zur Hausen H. Human papilloma viruses (HPV): characterization of four different isolates.*Virology.* 1977 ,76(2):569-80.
- 48.Pfister H, Gissman L, zur Hausen H. Partial characterization of proteins of human papilloma viruses (HPV) 1-3. *Virology* 1977, 83 : 131-137.
- 49.Baker CC, Howley PM. Differential promoter utilization by the bovine papillomavirus in transformed cells and productively infected wart tissues.*EMBO J.* 1987 ,6(4):1027-35.

50.<http://www.microbiologybytes.com/virology/Papillomaviruses.html>, διαθέσιμο στις 6.6.2010

51.Smotkin D, Wettstein FO. Transcription of human papillomavirus type 16 early genes in cervical cancer and a cervical cancer derived cell line and identification of the E7 protein. Proc Natl Acad Sci USA 1986, 83 : 4680-4684.

52.Thierry F, Yaniv M. The BPV1-E2 trans-acting protein can be either an activator or a repressor of the HPV18 regulatory region.EMBO J. 1987,6(11):3391-7.

53.Mabruk M. The mystery of human papillomaviruses in carcinogenesis.Expert Rev Mol Diagn. 2008,8(1):1-4.

54.Grm HS, Massimi P, Gammoh N, et al. Crosstalk between the human papillomavirus E2 transcriptional activator and the E6 oncoprotein. Oncogene 2005, 24(33) : 5149-5164.

55. Dowhanick JJ, McBride AA, Howley PM. Suppression of cellular proliferation by the papillomavirus E2 protein. J Virol 1995, 69 : 7791-7799.

56.Baker CC. The genomes of the papillomaviruses. In: S. J. O' Brien, ed. Genetic Maps: Locus Maps of Complex Genomes, 6<sup>th</sup> ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1993: 1.134-1.146

57.Wise-Draper TM, Wells SI. Papillomavirus E6 and E7 proteins and their cellular targets.Front Biosci. 2008 , 13:1003-17.

58. Scheffner M, Munger K, Byrne JC, et al. The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. Proc Natl Acad Sci USA 1991, 88 : 5523-5527.

59.Kastan MB, Zhan Q, El Deiry W-S et al. A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD 45 is defective in ataxia-telangiectasia. Cell 1992, 71 : 587-597.



60. Baker CC, Cowser LM. The genomes of the papillomaviruses: genetic maps. Locus of Complex Genomes. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1990
61. Beer- Romano P, Glass S, Rolfe M. Antisense targeting of E6AP elevates P53 in HPV- infected cells but not in normal cells. *Oncogene* 1997,14:595-602
62. Talis AL, Huibregtse JM, Howley PM. The role of E6AP in the regulation of p53 protein levels in human papillomavirus (HPV) positive and HPV negative cells. *J Biol Chem* 1998, 273 : 6439-6445.
63. Haupt Y, Maya R, Kazanietz A et al. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 1997,387:296-299
64. Kubbutat MHG, Jones SN, Vousden KH. Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* 1997, 387 : 299-303.
65. Hengstermann A, Linares K, Ciechanover A, et al. Complete switch from Mdm2 to human papillomavirus E6 mediated degradation of p53 in cervical cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 2001, 98 : 1218-1223.
66. Leverrier S, Bergamaschi D, Ghali L et al. Role of HPV E6 proteins in preventing UVB-induced release of pro-apoptotic factors from the mitochondria. *Apoptosis* 2007, 12(3) : 549-560.
67. Filippova M, Parkhurst L, Duerksen-Hughes PJ. The human papillomavirus 16 E6 protein binds to Fas-associated death domain and protects cells from Fas-triggered apoptosis. *J Biol Chem* 2004, 279(24) : 25729-25744
68. De Caprio JA, Ludlow JW, Figge J, et al. SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene. *Cell* 1988, 54 : 275-283.

69. Whyte P, Williamson NM, Harlow E. Cellular targets for transformation by the adenovirus E1A proteins. *Cell*. 1989,13;56(1):67-75.
70. Zerfass-Thome K, Zwerschke W, Mannhardt B, et al. Inactivation of the cdk inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Oncogene* 1996, 13 : 2323-2330.
71. Funk JO, Waga S, Harry JB, et al. Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes Dev* 1997,11:2090-2100
72. Jones DL, Alani RM, MC' Onger K. The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21 cip1-mediated inhibition of cdk2. *Genes Dev* 1997, 11:2101-2111
73. Duensing S, Lee LY, Duensing A, et al. The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins cooperate to induce mitotic defects and genomic instability by uncoupling centrosome duplication from the cell division cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000,97:10002-10007
74. White A, Livanos EM, Tlsty TD. Differential disruption of genomic integrity and cell cycle regulation in normal human fibroblasts by the HPV oncoproteins. *Genes Dev* 1994, 8 : 666-677.
75. Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol*. 2005,32 Suppl 1:S7-15.
76. Middleton K, Peh W, Southern S, et al. Organization of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers. *J Virol*. 2003,77(19):10186-201.
77. Münger K, Howley PM. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res*. 2002,89(2):213-28.

- 78.Kupper TS, Fuhlbrigge RC. Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences.Nat Rev Immunol. 2004,4(3):211-22.
- 79.Wentzensen N, Vinokurova S, von Knebel Doeberitz M. Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract.Cancer Res. 2004 ,64(11):3878-84.
- 80.Alazawi W, Pett M, Arch B, Scott L, Freeman T, Stanley MA, Coleman N. Changes in cervical keratinocyte gene expression associated with integration of human papillomavirus 16. Cancer Res. 2002 ,62(23):6959-65.
- 81.Dowen SE, Neutze DM, Pett MR, Cottage A, Stern P, Coleman N, Stanley MA. Amplification of chromosome 5p correlates with increased expression of Skp2 in HPV-immortalized keratinocytes. Oncogene. 2003,22(16):2531-40.
- 82.Jeon S, Allen-Hoffmann BL, Lambert PF. Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells. J Virol. 1995,69(5):2989-97.
- 83.Duensing S, Münger K. The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins independently induce numerical and structural chromosome instability.Cancer Res. 2002,62(23):7075-82.
- 84.Pett MR, Alazawi WO, Roberts I, Dowen S, Smith DI, Stanley MA, Coleman N. Acquisition of high-level chromosomal instability is associated with integration of human papillomavirus type 16 in cervical keratinocytes.Cancer Res. 2004 ,64(4):1359-68.
- 85.Kirkland JA, Stanley MA, Cellier KM. Comparative study of histologic and chromosomal abnormalities in cervical neoplasia. Cancer. 1967 ,20(11):1934-52.

86. Lorincz AT, Reid R, Jenson B et al. Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. *Obstet Gynecol* 1992, 79 : 328-337.
87. Robertson JH, Woodend B, Elliot H. Cytological changes preceding cervical cancer. *J Clin Pathol* 1994, 47 : 278-279.
88. Stanbridge CM, Suleman BA, Persad RV et al. A cervical smear review in women developing cervical carcinoma with particular reference to age, false negative cytology and the histologic type of the carcinoma. *Int J Gynecol Cancer* 1992, 2 : 92-100.
89. Koss LG. Concept of genesis and development of carcinoma of the cervix. *Obstet Gynecol Surv* 24 : 853, 1969 (includes reference to Kottmeier, 25/34 untreated CIS progressed to invasion).
90. Wilson S, Woodman CBJ. Costs and benefits of cervical screening. pp. 61-70. In Luesley D, Jordan J, Richart RM (eds): *Intraepithelial Neoplasia of the Lower Female Genital Tract*. Churchill Livingstone, New York, 1995.
91. Crum CP, Mitao M, Levine RU et al. Cervical papillomavirus segregate within morphologically distinct precancerous lesions. *J Virol* 1983, 80 : 3812-3815
92. Schiffman MH, Glass AG, Cadell DM et al. Preliminary results from a natural history study of HPV infection and incident cervical neoplasia (meeting abstract). *International Cervical Cancer Symposium*, November 26-30, 1991. Saint Lucia, West Indies, 29-30, 1991.
93. Ostör AG. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *Int J Gynecol Pathol*. 1993,12(2):186-92
94. Kraus I, Molden T, Holm R, et al. Presence of E6 and E7 mRNA from human papillomavirus types 16, 18, 31, 33, and 45 in the majority of cervical carcinomas. *J Clin Microbiol*. 2006,44(4):1310-7.

- 95.Syrjanen, K., and S. Syrjanen. Papillomavirus infections in human pathology. John Wiley & Sons, Ltd., Chicester, United Kingdom,2000
- 96.Molden T, Kraus I, Karlsen F, et al. Human papillomavirus E6/E7 mRNA expression in women younger than 30 years of age.Gynecol Oncol. 2006,100(1):95-100.
- 97.Forslund O, Antonsson A, Edlund K et al. Population-based type-specific prevalence of high-risk human papillomavirus infection in middle-aged Swedish women. J Med Virol 2002, 66 : 535-541.
- 98.Peto J, Gilham C, Deacon J et al. Cervical HPV infection and neoplasia in a large population-based prospective study: the Manchester cohort. Br J Cancer 2004, 91 : 942-953.
- 99.Varnai AD, Bollmann M, Bankfalvi A, et al. Predictive testing of early cervical pre-cancer by detecting human papillomavirus E6/E7 mRNA in cervical cytologies up to high-grade squamous intraepithelial lesions: diagnostic and prognostic implications. Oncol Rep. 2008 ,19(2):457-65.
- 100.de Boer MA, Jordanova ES, Kenter GG, et al. High human papillomavirus oncogene mRNA expression and not viral DNA load is associated with poor prognosis in cervical cancer patients.Clin Cancer Res. 2007 J;13(1):132-8.
- 101.Sotlar K, Stubner A, Diemer D, 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. 2004,74(1):107-16.
- 102.Smotkin D, Prokoph H, Wettstein FO. Oncogenic and nononcogenic human genital papillomaviruses generate the E7 mRNA by different mechanisms.J Virol. 1989,63(3):1441-7.
- 103.Cornelissen MT, Smits HL, Briët MA, et al. Uniformity of the splicing pattern of the E6/E7 transcripts in human papillomavirus type 16-transformed human fibroblasts, human cervical premalignant lesions and carcinomas.J Gen Virol. 1990,71 ( Pt 5):1243-6.

- 104.Sotlar K, Diemer D, Dethleffs A, et al. Detection and typing of human papillomavirus by e6 nested multiplex PCR.J Clin Microbiol. 2004,42(7):3176-84.
- 105.Stanton G. Primer in Biostatistics , McGrawHill, USA 2001
- 106.Ferlay J., Bray F. , Pisani P . Globoca 2002 : Cancer Incidence, mortality and prevalence worldwide.IARC CANCER Base No.5 . version 2.0 IARC Press, Lyon .2004
- 107.Sternberg S.Diagnostic Surgical Pathology. 3<sup>rd</sup> ed, V.2, Lippincott & Williams , 1999
- 108.Cancer Manual, 9<sup>th</sup> ed. Boston. American Cancer Society, Massachusetts Division, 1996.
- 109.Crum Ch, Cibas E, Lee K. Pathology of early cervical neoplasia. Churchill Livingstone, 1997
- 110.Di Luca D, Pilotti S, Stefanon B, et al. Human papillomavirus type 16 DNA in genital tumours: a pathological and molecular analysis. J Gen Virol. 1986, 67 ( Pt 3):583-9.
- 111.Stanley MA, Pett MR, Coleman N. HPV: from infection to cancer.Biochem Soc Trans. 2007,35(Pt 6):1456-60.
- 112.Cattani P, Siddu A, D'Onghia S, et al. RNA (E6 and E7) assays versus DNA (E6 and E7) assays for risk evaluation for women infected with human papillomavirus.J Clin Microbiol. 2009,47(7):2136-41.
- 113.Trottier H, Mahmud S, Costa MC, et al. Human papillomavirus infections with multiple types and risk of cervical neoplasia.Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2006,15(7):1274-80.
- 114.Spinillo A, Dal Bello B, Gardella B, et al.Multiple human papillomavirus infection and high grade cervical intraepithelial neoplasia among women with

cytological diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance or low grade squamous intraepithelial lesions. *Gynecol Oncol.* 2009,113(1):115-9.

115.Cuschieri KS, Cubie HA, Whitley MW, et al. Multiple high risk HPV infections are common in cervical neoplasia and young women in a cervical screening population. *J Clin Pathol.* 2004,57(1):68-72.

116.ALTS Group. Results of a randomized trial on the management of cytologic interpretations of atypical squamous cells of undetermined significance. *Am J Obstet Gynecol* 2003,188:1381–92.

117.Nielsen A, Kjaer SK, Munk C, Iftner T. Type specific HPV infection and multiple HPV types: prevalence and risk factor profile in nearly 12,000 younger and older Danish women. *Sex Transm Dis* 2008,35:276–82.

118.Wheeler CM, Hunt WC, Schiffman M, et al. Human papillomavirus genotypes and the cumulative 2-year risk of cervical precancer. *J Infect Dis* 2006,194:1291–9.