



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ**

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ Κ. ΚΟΥΚΟΥΛΗΣ

***“ΜΕΛΕΤΗ ΠΑΘΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΣΗΜΑΣΙΑΣ  
ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΛΟΙΜΩΞΕΩΣ  
ΑΠΟ ΙΟ ΤΩΝ ΘΗΛΩΜΑΤΩΝ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ (HPV)  
ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΤΡΑΧΗΛΟΥ ΤΗΣ  
ΜΗΤΡΑΣ (ΠΡΟΔΡΟΜΕΣ ΑΛΛΟΙΩΣΕΙΣ ΚΑΙ  
ΔΙΗΘΗΤΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ)”***

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ ΑΠ. ΖΑΧΑΡΟΥΛΗ**  
**ΙΑΤΡΟΣ - ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΟΣ**

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των  
απαιτήσεων για την απόκτηση του  
Διδακτορικού Διπλώματος

**ΛΑΡΙΣΑ 2015**

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ**

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ Κ. ΚΟΥΚΟΥΛΗΣ

***“ΜΕΛΕΤΗ ΠΑΘΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΣΗΜΑΣΙΑΣ  
ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΛΟΙΜΩΞΕΩΣ  
ΑΠΟ ΙΟ ΤΩΝ ΘΗΛΩΜΑΤΩΝ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ (HPV)  
ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΤΡΑΧΗΛΟΥ ΤΗΣ  
ΜΗΤΡΑΣ (ΠΡΟΔΡΟΜΕΣ ΑΛΛΟΙΩΣΕΙΣ ΚΑΙ  
ΔΙΗΘΗΤΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ)”***

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ ΑΠ. ΖΑΧΑΡΟΥΛΗ**  
**ΙΑΤΡΟΣ - ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΟΣ**

**ΛΑΡΙΣΑ 2015**

© 2015 Κωνσταντίνα Ζαχαρούλη

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (Ν. 5343/32 αρ. 202 παρ. 2).

## **ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ**

- **ΚΟΥΚΟΥΛΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ**  
Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

- **ΚΟΥΚΟΥΛΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ**  
Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- **ΜΕΣΣΗΝΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ**  
Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- **ΚΩΣΤΟΠΟΥΛΟΥ ΕΥΑΝΘΙΑ**  
Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

## ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- ΚΟΥΚΟΥΛΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ  
Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- ΜΕΣΣΗΝΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ  
Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- ΔΑΠΟΝΤΕ ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ  
Αναπληρωτής Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- ΙΩΑΝΝΟΥ ΜΑΡΙΑ  
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- ΚΩΣΤΟΠΟΥΛΟΥ ΕΥΑΝΘΙΑ  
Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- ΓΚΑΡΑΣ ΑΝΤΩΝΙΟΣ  
Επίκουρος Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- ΣΑΜΑΡΑ ΜΑΡΙΑ  
Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής με έμφαση στη Μοριακή Ιστοπαθολογία Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

***Στους γονείς μου,  
Απόστολο & Κική Ζαχαρούλη***

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΝΟΤΗΤΑ	ΤΙΤΛΟΣ ΕΝΟΤΗΤΑΣ	ΣΕΛΙΔΑ
	<b>ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ</b>	10
	<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	11
1	Ιός των θηλωμάτων του ανθρώπου (HPV)	11
1.1.	Ιστορική προσέγγιση	11
1.2.	Τί είναι ο ιός HPV;	11
1.3.	Επιδημιολογία	12
1.4.	Η σχέση των στελεχών HPV με τη δυσπλασία και τον καρκίνο	14
1.4.1.	HPV και αλλοιώσεις του τραχήλου της μήτρας	15
1.4.2.	HPV και ανάπτυξη του καρκίνου	17
2.	Το γονιδίωμα του ιού HPV	18
3.	Οργάνωση του κυτταρικού κύκλου του HPV ιού	21
3.1.	Η αρχική λοίμωξη του επιθηλίου	22
3.2.	Η διατήρηση του γονιδιώματος και ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός στις κατώτερες στιβάδες του επιθηλίου	23
3.2.1.	Η E1 πρωτεΐνη	23
3.2.2.	Η E2 πρωτεΐνη	24
3.2.3.	Η ρύθμιση της αντιγραφής και της μεταγραφής του ιού HPV από την E2 πρωτεΐνη	25
3.2.4.	Οι επιδράσεις της E2 πρωτεΐνης στα κύτταρα που έχουν μετασχηματιστεί από τον HPV ιό	26
3.2.5.	Ο ρόλος της πρωτεΐνης E2 στη λοίμωξη από τον HPV ιό και στην ογκογένεση	28
3.3.	Η E4 πρωτεΐνη	30
3.4.	Η E5 πρωτεΐνη	31
3.5.	Ο ρόλος των E6 και E7 πρωτεϊνών στην εξάπλωση του ιού HPV στις κατώτερες στιβάδες του επιθηλίου	33
3.5.1.	Η E6 πρωτεΐνη	34
3.5.2.	Η E7 πρωτεΐνη	37
3.5.3.	Η αλληλεπίδραση των E6 και E7 πρωτεϊνών	39
3.6.	Το γονίδιο της πρωτεΐνης L1	40
3.6.1.	Η L1 πρωτεΐνη	41
3.6.2.	Οι αλληλεπιδράσεις της L1 με την δευτερεύουσα καψιδική πρωτεΐνη L2	42
3.6.3.	Ο ρόλος της L1 στην έναρξη της λοίμωξης	42
3.7.	Η L2 πρωτεΐνη	43
3.8.	Η ενίσχυση του γονιδιώματος του HPV ιού στις ανώτερες στιβάδες του επιθηλίου	44
3.9.	Η συγκέντρωση και η απελευθέρωση του HPV ιού	46
4.	Η απορρύθμιση του κύκλου ζωής του ιού HPV και η καρκινογένεση	47
5.	Η υποχώρηση, η λανθάνουσα περίοδος και η αποδρομή της βλάβης	50
6.	Οι ανοσοϊστοχημικοί δείκτες που χρησιμοποιούνται στη διάγνωση του ιού HPV	54
6.1.	Η p16 πρωτεΐνη	54

6.2.	Η κυκλίνη - B1	62
6.3.	Ο δείκτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού MIB-1	63
6.3.1.	Το πρότυπο ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού MIB-1 στο φυσιολογικό εξωτράχηλο και ενδοτράχηλο	63
6.3.2.	Ο διαχωρισμός της δυσπλασίας από την ατροφία	63
6.3.3.	Ο διαχωρισμός των κονδυλωμάτων από την πλακώδη μετάπλαση και τη φλεγμονή	64
6.3.4.	Η εκτίμηση του βαθμού δυσπλασίας	64
6.3.5.	Η εκτίμηση των ενδοτραχηλικών αλλοιώσεων	65
6.3.6.	Η εκτίμηση των βιοψιών με μηχανικές αλλοιώσεις και αλλοιώσεις καυτηριασμού	65
6.3.7.	Εφαρμογές στην κυτταρολογία	65
7.	Προσυμπτωματικός έλεγχος (screening) του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας	66
7.1.	Εφαρμογές του HPV-DNA test	67
7.1.1.	Ο προσυμπτωματικός έλεγχος (screening)	67
7.1.2.	Η διαλογή των αμφισβητούμενων Pap- τεστ	68
7.1.3.	Η παρακολούθηση μετά τη θεραπεία	68
7.1.4.	Ο εμβολιασμός για τον ιό HPV: Επιπτώσεις στον προσυμπτωματικό έλεγχο (screening)	69
	<b>ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ</b>	70
8.	Υλικά και μέθοδοι	71
8.1.	Μελέτη του πληθυσμού	71
8.2.	Τραχηλικά επιχρίσματα	71
8.3.	Ιστολογικά δείγματα	71
8.4.	Ανοσοϊστοχημεία	71
8.4.1.	Πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημικών χρώσεων για p16INK4a (κλώνος E6H4)	73
8.4.2.	Πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημικών χρώσεων για Κυκλίνη - B1 (κλώνος 7 A9)	74
8.4.3.	Πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημικών χρώσεων για Ki-67 (κλώνος MIB-1)	75
8.4.4.	Τρόπος παρασκευής διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν	76
8.5.	Απομόνωση DNA από τραχηλικά επιχρίσματα	76
8.6.	Απομόνωση DNA από βιοψίες τραχήλου μήτρας	76
8.6.1.	Έλεγχος της ποιότητας του γενωμικού DNA	77
8.7.	Ανίχνευση του ιού HPV	78
8.8.	RNA in situ υβριδισμός	83
	<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	89
9.	Επιδημιολογικά στοιχεία ατόμων που συμπεριλήφθησαν στη μελέτη	89
9.1.	Εκτίμηση ιστολογικών αλλοιώσεων και ανίχνευση – τυποποίηση του HPV ιού	91
9.2.	Ανοσοϊστοχημική έκφραση των δεικτών p16, κυκλίνη-B1 και MIB-1	94
9.3.	Συσχέτιση προτύπων έκφρασης των δεικτών p16, κυκλίνη - B1 και MIB-1 με παθολογοανατομικά και μοριακά ευρήματα	104
9.4.	Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων	107
	<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	115
10.	Ιστορικό μορφολογίας	115



10.1.	Η αρχική έρευνα για το λοιμώδες αίτιο του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας	115
10.2.	Η λοίμωξη του τραχήλου της μήτρας από τον ιό των κονδυλωμάτων: το ιστορικό της αναγνώρισής τους	115
10.3.	Τα ανατομικά χαρακτηριστικά των οξυτενών και «επίπεδων» κονδυλωμάτων	116
10.4.	Η συμπεριφορά των «επίπεδων» κονδυλωμάτων και η σπουδαιότητα του κοιλοκύτταρου	116
10.5.	Η σημασία της κοιλοκυττάρωσης	116
10.6.	Ο ιός των θηλωμάτων, τα κοιλοκύτταρα και η εμφάνιση κακοήθειας στον τράχηλο της μήτρας	117
10.7.	Ταξινόμηση των ενδοεπιθηλιακών αλλοιώσεων του πλακώδους επιθηλίου του τραχήλου της μήτρας	117
10.8.	Η επανάσταση στη μοριακή διάγνωση του ιού HPV	117
10.9.	Επιδημιολογικά στοιχεία της μελέτης μας	118
10.10.	Ανίχνευση και τυποποίηση του HPV- Συσχέτιση με τις ιστολογικές αλλοιώσεις	119
10.11.	Ανοσοϊστοχημική έκφραση των δεικτών p16, κυκλίνης-B1 και MIB-1. Συσχέτιση με τις ιστολογικές αλλοιώσεις	122
10.12.	Συσχέτιση HPV παρουσίας και ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των δεικτών p16, κυκλίνης-B1 και MIB-1.	123
	<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b>	126
	<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	128
	<b>SUMMARY</b>	130
	<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	132

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για την εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή μου κ. Γεώργιο Κ. Κουκούλη, Καθηγητή και Διευθυντή του Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου όλα αυτά τα χρόνια, καθώς και για την ηθική του υποστήριξη.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής κ. Ευανθία Κωστοπούλου και την Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής με έμφαση στη Μοριακή Ιστοπαθολογία κ. Μαρία Σαμαρά, για την πολύτιμη καθοδήγησή τους στο ιστολογικό και μοριακό 'κομμάτι' της μελέτης αυτής αντίστοιχα, καθώς και για την αμέριστη υποστήριξή τους καθ'όλη τη διάρκεια της ειδικότητάς μου στο Εργαστήριο της Παθολογικής Ανατομικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Θα επιθυμούσα να εκφράσω ιδιαίτερα θερμές ευχαριστίες στον Καθηγητή Μαιευτικής-Γυναικολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κ. Ιωάννη Ε. Μεσσήνη, στον Επίκουρο Καθηγητή, Μαιευτικής- Γυναικολογίας κ. Αντώνιο Γκαρά και στον Αναπληρωτή Καθηγητή Μαιευτικής- Γυναικολογίας κ. Αλέξανδρο Δαπόντε, για τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί υλικό της μελέτης και για την πολύτιμη βοήθεια την οποία προσέφεραν κατά τη διάρκεια της παρούσης μελέτης.

Για την πολύτιμη τεχνική υποστήριξη ευχαριστώ τις τεχνολόγους: κ. Μαρία Νέτσικα, κ. Ευαγγελία Γαρυφαλλοπούλου, κ. Ευαγγελία Σκόμπα, καθώς και τη βιοχημικό κ. Ζωή Λιάκου.

Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους: Dr. J.Doorbar - Dept. of Pathology-Cambridge, Dr. G.Negri MD,Phd,MIAC - Dept. of Pathology-Bolzano, Prof. and Chair Dr.LA Laimins - Dept. of Microbiology-Immunology-Northwestern-University-Chicago, Dr.H.Bernard - Dept. of Molecular Biology and Biochemistry-School of Biological Sciences-University of California, Dr.K. Gaston - School of Biochemistry - University of Bristol, και Dr.M. Drubin Mc Laughlin Phd - The Channing Laboratory-Brigham and Women's Hospital – Boston, για την συγκατάθεσή τους να χρησιμοποιήσω εικόνες και φωτογραφίες από προηγούμενες δημοσιεύσεις τους.

# ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1. Ιός των θηλωμάτων του ανθρώπου (HPV)

Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας αποτελεί την πιο συχνή μορφή καρκίνου που εμφανίζεται στις γυναίκες των αναπτυσσόμενων χωρών και κατέχει τη δεύτερη θέση παγκοσμίως. Κάθε χρόνο καταγράφονται 260.000 θάνατοι, το 80% των οποίων παρατηρείται σε αναπτυσσόμενες χώρες (*Castellague X. Gynecol. Oncol. 2008.*).

Η σχέση ανάμεσα στον ιό των θηλωμάτων του ανθρώπου (Human Papilloma Virus, HPV) και στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, εδώ και τριανταπέντε χρόνια περίπου, θεωρείται πλέον δεδομένη. Ιολογικές, μοριακές, κλινικές και επιδημιολογικές μελέτες περιέγραψαν πως ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας, χωρίς αμφιβολία, είναι αποτέλεσμα μιας μακροχρόνιας, μη αναστρέψιμης λοίμωξης από συγκεκριμένα στελέχη του ιού HPV. (*Bosch FX. et al. J. Clin. Pathol. 2002.*)

### 1.1. Ιστορική προσέγγιση

Στη δεκαετία του '70 η επανάσταση στο χώρο της σύγχρονης βιολογίας επέτρεψε το μοριακό χαρακτηρισμό της οικογένειας των ιών των ανθρωπίνων θηλωμάτων. Συγκεκριμένα, τα πρώτα πειράματα που προσπάθησαν να αποδείξουν τη σχέση ανάμεσα στις λοιμώξεις από τον ιό HPV και τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας πραγματοποιήθηκαν το 1972.

Είχαν ως βάση τους μη δημοσιευμένες μελέτες στην ιατρική βιβλιογραφία, οι οποίες αναφέρονταν σε σπάνια κακοήγη εξαλλαγή των οξυτενών κονδυλωμάτων (*condylomata acuminata*) σε πλακώδες καρκίνωμα (*zur Hausen H. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 1977*), καταλήγοντας έτσι στην υπόθεση ότι ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας μπορεί να έχει ως αφετηρία του τις ήπιες αλλοιώσεις (κονδυλώματα), που έχουν δημιουργηθεί από τον ιό. (*zur Hausen H. Virology. 2009*).

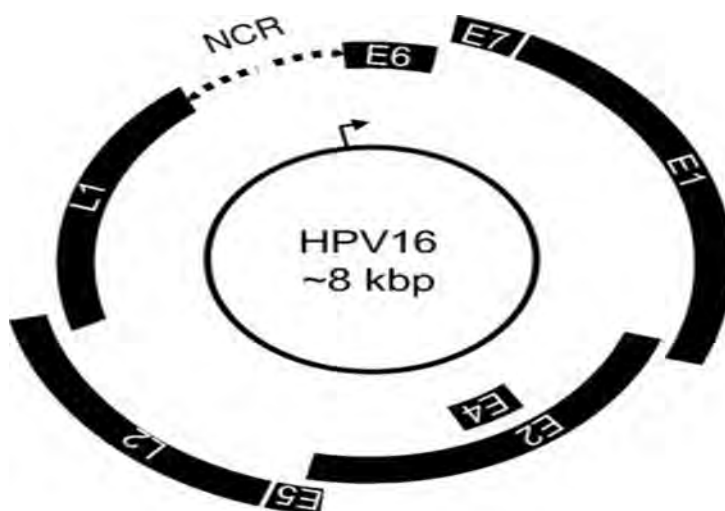
Επιπλέον, βρέθηκε ότι κλώνοι από το γονιδίωμα του ιού HPV μπορούν να χρησιμοποιηθούν, προκειμένου να εξεταστούν διάφορες παθολογικές διαδικασίες, οι οποίες αποδεικνύουν τη σχέση μεταξύ αλλοίωσης και ιού (*Stoler M. Int. Gynecol. Pathol. 2000*). Η ανάλυση των γονιδιωμάτων που προέρχονται από τις συγκεκριμένες αλλοιώσεις αποκαλύπτουν το πλήθος των διαφόρων στελεχών του ιού HPV, βάσει των διαφορών στο γενετικό του υλικό (DNA) (*Gissmann L. et al. Virology. 1977, Gissmann L. et al. Int. J. Cancer. 1982*).

### 1.2. Τί είναι ο ιός HPV;

Οι ιοί των θηλωμάτων του ανθρώπου (HPV) αποτελούν μέλη της οικογένειας των παρνοναϊρίων. Η οικογένεια των παρνοναϊρίων έχει πάρει το όνομα της από τις δύο πρώτες συλλαβές των κυρίων ουσιαστικών: *papilloma*, *polyoma* μαζί με τον πιθηκοειδή κενοτοπιώδη ιό (*Stoler M. Int. J. Gynecol. Pathol. 2000*).

Ο ιός HPV ανήκει στην κατηγορία των ογκοϊών που φέρουν δίκλωνο, κυκλικό DNA ως γενετικό υλικό, μήκους περίπου 8000 ζευγών βάσεων και αναγνωρίζεται πλέον ως ο κύριος αιτιολογικός παράγοντας του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας (Εικ. 1).

Μέχρι σήμερα, έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερα από 100 διαφορετικά στελέχη του ιού, που εκφράζουν χαρακτηριστικό τροπισμό και περίπου 40 έχουν χαρακτηριστεί ως «ιοί της γεννητικής χώρας» ή σεξουαλικά μεταδιδόμενοι.



**Εικ. 1.** Σχηματική αναπαράσταση του γονιδιώματος του στελέχους HPV16. Το δίκλωνο κυκλικό DNA αναπαρίσταται από τον κεντρικό κύκλο. Τα πρώιμα (E) και όψιμα (L) γονίδια κωδικοποιούνται από μια μόνο έλικα του DNA και στα τρία ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης. Ο κύριος πρώιμος υποκινητής εδράζεται στη μη κωδική περιοχή (Non Coding Region, NCR), η οποία αναφέρεται επίσης ως περιοχή ελέγχου (Long Control Region, LCR) ή ανοδική ρυθμιστική περιοχή (Upstream Regulatory Region, URR) και αναπαριστάται με το βέλος. Τα πρώιμα και όψιμα γονίδια μεταγράφονται προς μία κατεύθυνση. \***Oncogenic activities of human papillomaviruses. Virus Research. Review. 2009. 143; 195-208.**

Μερικοί τύποι HPV, όπως τα στελέχη 1, 4, 5, 8, 41, 48, 60, 63 και 65, δείχνουν τάση να προσβάλλουν το δέρμα. Ανιχνεύονται στις παλαμιαίες και πελματικές μυρμηκίες, σε ασθενείς με μυρμηκιοειδή επιδερμοδυσπλασία, στις δερματικές αλλοιώσεις των ανοσοκατασταλμένων ασθενών μετά από μεταμόσχευση και σε μερικούς επιθηλιακούς όγκους. Μια άλλη ομάδα των ιών HPV χαρακτηρίζονται ως βλεννοτροπικοί, καθώς δείχνουν τάση να προσβάλλουν τον βλεννογόνο, όπως τα στελέχη 6, 11, 13, 44, 55, 16, 31, 33, 35, 52, 58, 67, 18, 39, 45, 59, 68, 70, 26, 51, 69, 30, 53, 56, 66, 32, 42, 34, 64, 73, 54 και ανιχνεύονται σε καλοήθεις και κακοήθεις αλλοιώσεις της γεννητικής περιοχής και των δυο φύλων. Σε ορισμένες περιπτώσεις, αυτοί οι τύποι του ιού ανιχνεύονται σε ιστούς και αλλοιώσεις της στοματικής κοιλότητας, του οροφάρυγγα, του λάρυγγα και του οισοφάγου. Τέλος, μια άλλη ομάδα των ιών HPV και συγκεκριμένα τα στελέχη 2, 3, 7, 10, 27, 28, 29, 40, 43, 57, 61, 62 και 72, μπορούν και προσβάλλουν τόσο το δέρμα όσο και τον βλεννογόνο προκαλώντας αλλοιώσεις. Ωστόσο, η σχέση τους με τη δημιουργία κακοήθους βλάβης είναι λιγότερο αποδεδειγμένη (Castellague et al. *Gynecol. Oncol.* 2008).

### 1.3. Επιδημιολογία

Η λοίμωξη από τον ιό HPV είναι η πιο συχνή, σεξουαλικά μεταδιδόμενη νόσος. Τόσο οι γυναίκες όσο και οι άνδρες, εμπλέκονται στην επιδημιολογική αλυσίδα της λοίμωξης και

είναι ικανοί, την ίδια χρονική στιγμή να εμφανιστούν ως ασυμπτωματικοί φορείς, δότες και ως θύματα της ιογενούς λοίμωξης (*Castellague'X. et al. Salud. Publica. Mex. 2003*).

Οι παράγοντες κινδύνου (risk factors), που συνδέονται με τη λοίμωξη από τον ιό HPV, σχετίζονται ξεκάθαρα με τη σεξουαλική συμπεριφορά του ατόμου. Οι πιο σημαντικοί είναι: η έναρξη της σεξουαλικής δραστηριότητας σε μικρή ηλικία, ο υψηλός αριθμός σεξουαλικών συντρόφων, οι σεξουαλικές επαφές με άτομα υψηλού κινδύνου (στους μεν άνδρες οι συχνές επαφές με ιερόδουλες, στις δε γυναίκες, οι συχνές επαφές με άνδρες που έχουν πολλαπλές σεξουαλικές συντρόφους) (*Castellague'X. et al. N. Engl. J. Med. 2002, Bleeker M. et al. Int. J.Cancer. 2003, Hogewoning CJ. et al. Int. J.Cancer. 2003*).

Έρευνα που πραγματοποιήθηκε το 2002 έδειξε πως η περιτομή έχει προστατευτική επίδραση στον άνδρα. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε μειωμένος κίνδυνος εμφάνισης HPV λοίμωξης στην περιοχή των ανδρικών γεννητικών οργάνων, ακόμη και στην περίπτωση ανδρών με ιστορικό πολλαπλών σεξουαλικών συντρόφων, γεγονός που οδήγησε στη συνέχεια σε μείωση της εμφάνισης του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας στις τωρινές σεξουαλικές συντρόφους τους (*Castellague'X. et al. N. Engl. J. Med. 2002*). Επίσης, η σωστή και συστηματική χρήση του προφυλακτικού βοηθά στην υποχώρηση των τραχηλικών αλλοιώσεων και των κονδυλωμάτων στο πέος (*Bleeker M. et al. Int. J.Cancer, 2003, Hogewoning CJ. et al. Int. J. Cancer. 2003*).

Πολλές εργασίες καταδεικνύουν ότι τα μέτρα προφύλαξης δεν παρέχουν απόλυτη προστασία από τον ιό HPV. Ο λόγος που συμβαίνει αυτό είναι ότι το προφυλακτικό χρησιμοποιείται μόνο σε παροδικές σχέσεις, ενώ σε πιο μόνιμες σχέσεις οι συχνές επαφές και η απουσία πραγματικής προστασίας στο δέρμα της γεννητικής χώρας εκθέτουν περισσότερο στη λοίμωξη (*Singh N. Indian. J. of Med. and Paed. Oncol. 2005*).

Στις ομάδες υψηλής επικράτησης του ιού μεταξύ των κοινωνικών στρωμάτων, συγκαταλέγονται οι ιερόδουλες και τα άτομα που έχουν μολυνθεί από τον ιό HIV. Όπως είναι γνωστό, ο ιός HPV μεταδίδεται κυρίως με την σεξουαλική επαφή και τα όργανα που είναι πιο ευαίσθητα στη λοίμωξη, με δυνατότητα εμφάνισης νεοπλασματικής εξαλλαγής, είναι ο τράχηλος της μήτρας (ζώνη μετάπτωσης) και η οδοντωτή γραμμή του πρωκτικού σωλήνα. Στις ηλικίες με τη μεγαλύτερη σεξουαλική δραστηριότητα, η επικράτηση των υποκλινικών λοιμώξεων από τον ιό HPV (παρουσία του γεννητικού υλικού του ιού μαζί με φυσιολογική μορφολογία ή με μικρές αλλαγές), μπορεί να φτάσει μέχρι το 40% του γυναικείου πληθυσμού, με ρυθμό χρόνιας λοίμωξης 10-15%. Σε ηλικίες κάτω των 30 ετών, η επικράτηση μειώνεται στο 5-10% (*Castellague'X. Gynecol. Oncol. 2008*).

Άλλοι τρόποι μετάδοσης είναι σπάνιοι και περιλαμβάνουν σεξουαλικές πράξεις χωρίς συνουσία. Επίσης, η περιγεννητική μετάδοση είναι δυνατή, όπως έχουν δείξει ορολογικές εργασίες και εργασίες με HPV-DNA στο στόμα και το δέρμα των νεογνών, αλλά είναι εξαιρετικά σπάνια και συνήθως παροδική. Ο Smith και οι συνεργάτες του, σε μελέτη 574 ζευγαριών μητέρας- νεογνού, με τυποποίηση HPV-DNA στο δέρμα και στο στόμα 65 ώρες μετά τον τοκετό, βρήκαν HPV-DNA στο 1,6% των νεογνών που ταίριαζε με τον τύπο της μητέρας μόνο στο 1%. Σε τρεις μήνες όλα τα νεογνά ήταν αρνητικά (*Παπανικολάου Α. Επιδημιολογία και φυσική ιστορία της HPV λοίμωξης στον τράχηλο της μήτρας. Λοίμωξη από τον ιό των ανθρωπίνων θηλωμάτων HPV. 2008*).

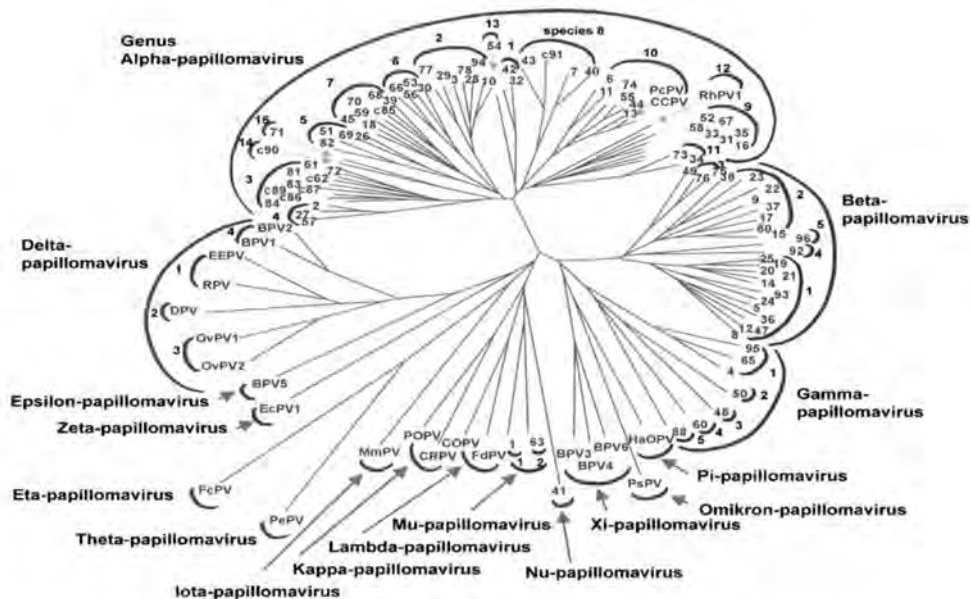
Στις περισσότερες επιδημιολογικές μελέτες, παράγοντες όπως το κάπνισμα, η παρατεταμένη χρήση αντισυλληπτικών, η πολυτοκία, η συνύπαρξη άλλων σεξουαλικών μεταδιδόμενων νοσημάτων, όπως η λοίμωξη από χλαμύδια (*Chlamydia trachomatis*) (*Smith JS. et al. Int. J. Cancer. 2004*), ο ιός του έρπητος (*Herpes simplex type 2, HSV-2*) (*Smith JS. et al. J. Natl.Cancer Inst. 2002*) και το δισαιολόγιο φτωχό σε φρούτα και λαχανικά, (*Garcia- Closas R. et al. Int. J. Cancer. 2005*) λειτουργούν συνεργατικά.

#### 1.4. Η σχέση των στελεχών του HPV με τη δυσπλασία και τον καρκίνο.

Προηγούμενες μελέτες σχετικά με το φυλογενετικό δένδρο της οικογένειας των HPV ιών, κατέδειξαν την κατάταξη των ιών σε στελέχη χαμηλού και υψηλού κινδύνου ανάλογα με τη δράση τους (Thomison J III. et al. *Hum. Pathol.* 2008). Ως στελέχη υψηλού κινδύνου χαρακτηρίζονται εκείνα που σχετίζονται με τις προκαρκινικές και καρκινικές αλλοιώσεις. Αντίθετα, τα στελέχη χαμηλού κινδύνου ανιχνεύονται σπάνια σε αυτές τις αλλοιώσεις (Stoler MH. *Int. J. Gynecol. Pathol.* 2000).

Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί ότι οι πιο πολλές λοιμώξεις με στελέχη υψηλού κινδύνου, υποχωρούν και δεν καταλήγουν στην ανάπτυξη δυσπλασίας ή καρκίνου. Τα πιο γνωστά στελέχη υψηλού κινδύνου είναι τα στελέχη HPV-16 και HPV-18 (Doorbar J. J. *Clin. Virol.* 2005). Το στέλεχος HPV16 ταξινομείται στο γένος 9 με τα συναφή στελέχη υψηλού κινδύνου: 31, 33, 35, 52, 58 και 67 (de Villiers EM. et al. *Virology.* 2004, Stoler MH. *Int. J. Gynecol. Pathol.* 2000).

Το στέλεχος HPV-18 ανήκει στο γένος 7, το οποίο περιλαμβάνει επίσης υψηλού κινδύνου στελέχη όπως τα στελέχη 38, 45, 59 και 68. Τα στελέχη χαμηλού κινδύνου είναι περισσότερα και στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα HPV-6 και HPV-11 στελέχη. Στο φυλογενετικό δένδρο των διαφορετικών HPV τύπων τα υψηλού κινδύνου στελέχη βρίσκονται στις ομάδες A5, A6, A7, A9 και A11 (Εικ.2) (de Villiers EM. et al. *Virology.* 2004, Doorbar J. *Disease Markers.* 2007).

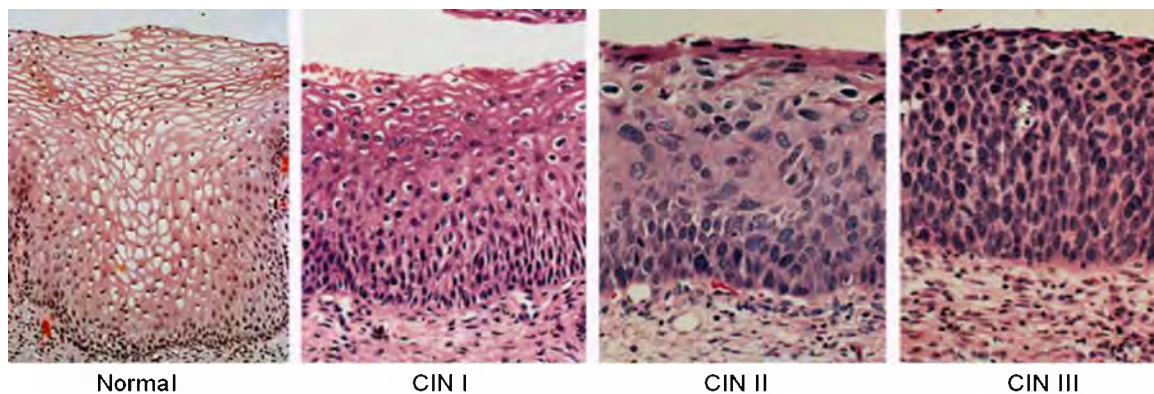


**Εικ. 2.** Φυλογενετικό δένδρο 118 ειδών του ιού των θηλωμάτων. Οι L1 αλληλουχίες ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης χρησιμοποιήθηκαν σε τροποποιημένη έκδοση της έκδοσης Phylip 3.572 με βάση σταθμισμένη έκδοση της γειτονικής συνδετικής ανάλυσης (neighbor-joining analysis). Το δένδρο σχεδιάστηκε με βάση το πρόγραμμα Treeview του Πανεπιστημίου της Γλασκώβης. Οι αριθμοί στα άκρα κάθε μίας αγκύλης προσδιορίζουν τον τύπο του ιού HPV. Οι c-αριθμοί αναφέρονται σε υποψήφια στελέχη του ιού HPV. Οι άλλες συντομογραφίες αφορούν τους ιούς των θηλωμάτων στα ζώα. \*Classification of papillomaviruses. *Virology. Minireview.* 2004. 324; 17-27.

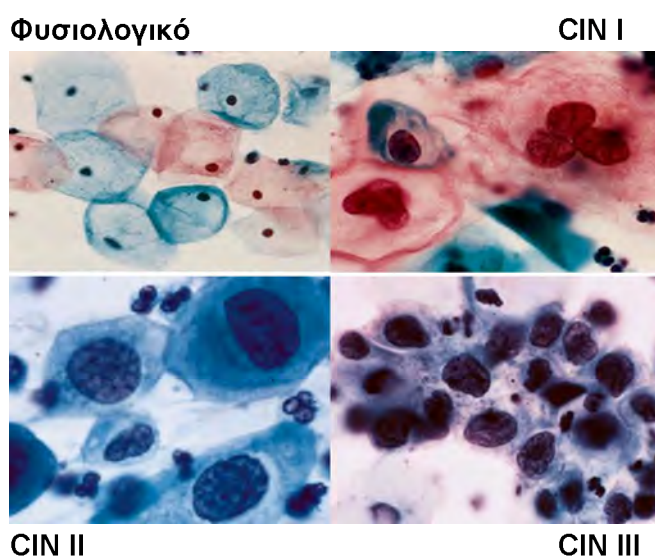
#### 1.4. 1. HPV και αλλοιώσεις του τραχήλου της μήτρας.

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι οι περισσότεροι τύποι του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας αναπτύσσονται στην πλακώδη-κυλινδρική συμβολή (squamo-columnar junction) και στη ζώνη μετατροπής (transformation zone) μεταξύ του κυλινδρικού επιθηλίου του ενδοτραχήλου και του πλακώδους επιθηλίου του εξωτραχήλου. Το 1956, πρώτος ο Koss ήταν εκείνος που χρησιμοποίησε τον όρο *κοιλοκυτταρική ατυπία* (Koss LG. *et al. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1956*). Από τότε πέρασαν περίπου 20 χρόνια, ώσπου να μπορέσουν οι ερευνητές να αποδείξουν ότι αυτό το μορφολογικό εύρημα οφείλονταν στην παρουσία του HPV (Thomison J III. *et al. Human. Pathol. 2008*).

Είναι γνωστό πλέον, ότι ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας φαίνεται να είναι αποτέλεσμα εξέλιξης τραχηλικών ενδοεπιθηλιακών νεοπλασιών (Cervical Intraepithelial Neoplasia, CIN), οι οποίες ανάλογα με τον βαθμό των επιθηλιακών ανωμαλιών κατατάσσονται σε τρεις βαθμίδες: CIN I, CIN II, και CIN III (Cuzick J. *et al. Vaccine. 2008*).



**Εικ. 3.** Αλλοιώσεις CIN σε βιοψίες τραχήλου. \* **Robbins Basic Pathology, Female genital system and breast. 2011. 769**



**Εικ. 4.** Αλλοιώσεις CIN σε τεστ Παπανικολάου (PAP test). \* **Robbins Basic Pathology, Female genital system and breast. 2011. 770.**

Οι CIN I αλλοιώσεις χαρακτηρίζονται από κοιλοκυττάρωση, κυρίως στις επιφανειακές στιβάδες του επιθηλίου. Η κοιλοκυττάρωση αφορά σε υπερχρωματικούς, ανώμαλους γωνιώδεις, σαν σταφίδα, πυρήνες που περιβάλλονται από περιπυρηνική άλω, η οποία δημιουργείται από την επίδραση του HPV ιού. Στις CIN II αλλοιώσεις, η δυσπλασία είναι σοβαρότερη με καθυστέρηση της ωρίμανσης των κερατινοκυττάρων έως το μέσο τρίτημόριο του πάχους του επιθηλίου. Σχετίζεται με κάποιου βαθμού ποικιλομορφία στο μέγεθος του πυρήνα και του κυττάρου, ετερογένεια στη χρωματίνη του πυρήνα και παρουσία μιτώσεων πάνω από τη βασική στιβάδα, επεκτεινόμενες προς το μέσο τρίτημόριο του πάχους του επιθηλίου. Η επιφανειακή στιβάδα των κυττάρων δείχνει κάποιο βαθμό διαφοροποίησης και σε μερικές περιπτώσεις, εμφανίζει τις περιγραφείσες κοιλοκυτταρικές αλλοιώσεις.

Τέλος, οι CIN III αλλοιώσεις, χαρακτηρίζονται από ακόμα μεγαλύτερη ποικιλομορφία στο μέγεθος των κυττάρων και των πυρήνων, με έντονη ετερογένεια της χρωματίνης, ακατάστατο προσανατολισμό των κυττάρων και παρουσία φυσιολογικών ή άτυπων μιτώσεων. Οι αλλοιώσεις αυτές παρατηρούνται σε όλο το πάχος του επιθηλίου και χαρακτηρίζονται από απώλεια ωρίμανσης (Εικ. 3, 4) (*Robbins Basic. Pathology, Female genital system and breast. 2011*).

Σε αρκετές μέχρι σήμερα μελέτες, η ιστολογική διάγνωση στις ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις του πλακώδους επιθηλίου του τραχήλου της μήτρας (Squamous Intraepithelial Lesions, SILs), παρουσιάζει πολλά προβλήματα, ιδιαίτερα στις χαμηλόβαθμες δυσπλασίες. Γίνονται προσπάθειες για ευκολότερο διαχωρισμό της χαμηλόβαθμης δυσπλασίας από το φυσιολογικό ή αντιδραστικό επιθήλιο (*Ceballos KM. et al. Int. J of Gynecol. Pathol. 2007*).

Ειδικότερα, για τις CIN I αλλοιώσεις, αν και έχουν αναγνωριστεί ως η αρχική ιστολογική εκδήλωση της λοίμωξης από HPV που είναι αυτοπεριοριζόμενη, συχνά δεν είναι εύκολη η διάκρισή τους από τις CIN II αλλοιώσεις. Αυτό μπορεί ενδεχομένως να οφείλεται στη διαγνωστική πρόκληση του διαχωρισμού της CIN I από τη CIN II αλλοίωση, καθώς και από τα αρνητικά ιστολογικά ευρήματα που μπορεί να αναπαράγονται (*Castle PE. et al. Obstet. and Gynecol. 2011*).

Παρά το γεγονός ότι οι περισσότερες έρευνες έδειξαν ότι οι χαμηλόβαθμες ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις (Low Grade SILs) είναι ήπιες, το σύστημα ταξινόμησης της CIN και η ιδέα ότι οι μη θεραπεύσιμες CIN I αλλοιώσεις έχουν μεγάλη πιθανότητα να εξελιχθούν σε καρκίνο, έγιναν ευρέως αποδεκτά και ξεκίνησαν να αποτελούν τη βάση για την επιθετική αντιμετώπιση αυτών των αλλοιώσεων. Επιπλέον, πολλές CIN II αλλοιώσεις, ειδικά εκείνες που παρατηρούνται σε νέες γυναίκες, εμφανίζονται να αποτελούν την πρόωμη συνέπεια λοίμωξης από υψηλού κινδύνου HPV ιό.

Ο Winer και οι συνεργάτες του πραγματοποίησαν έρευνα σε 603 φοιτήτριες του Πανεπιστημίου της Ουάσιγκτον, στο Σιάτλ προκειμένου να μελετήσουν την ανάπτυξη, τη διάρκεια της συχνότητας της λοίμωξης από HPV ιό και τη σχέση της με την ανάπτυξη διαφόρων βαθμών CIN, με μέση διάρκεια τους 38,8 μήνες. Ανάμεσα στις γυναίκες με HPV λοίμωξη, η 36μηνη αθροιστική επίπτωση στις τραχηλικές SILs ήταν 47,2% με μέση τιμή καθάρσης τους 5,5 μήνες. Στις γυναίκες με λοίμωξη από τα στελέχη HPV16 ή HPV18, η 36μηνη αθροιστική επίπτωση στις CIN II αλλοιώσεις ήταν 20% και στις CIN III αλλοιώσεις ήταν 6,7%. Σημαντικό εύρημα αποτέλεσε το γεγονός, ότι ο χρόνος μεταξύ της πρώτης ανίχνευσης του ιού και των κυτταρολογικών ανωμαλιών που αυτός προκαλεί ήταν όμοιος για όλους τους βαθμούς της CIN (*Winer RL. et al. J. Infect. Dis. 2005*).

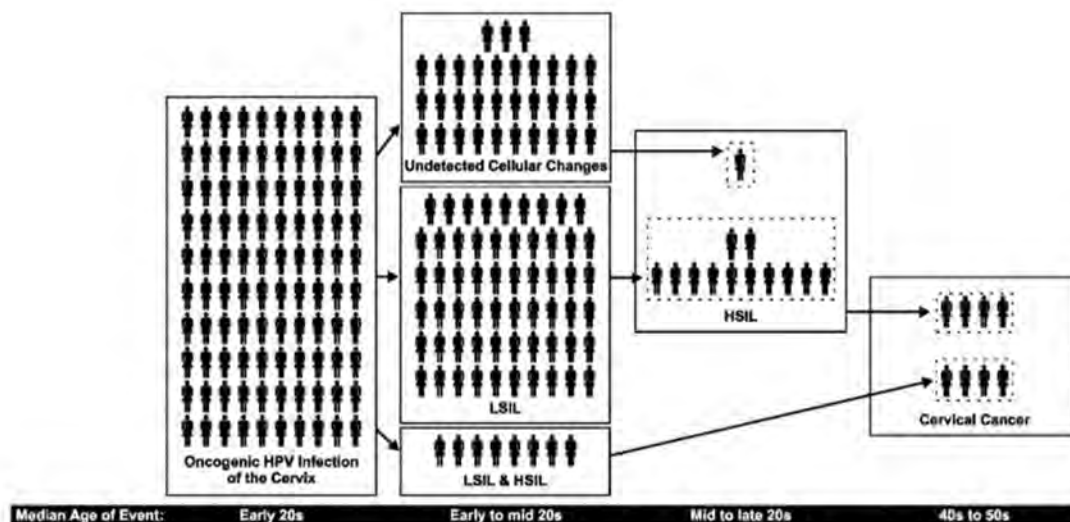
Το γεγονός ότι οι μισές βιοψίες με αλλοιώσεις χαρακτηριζόμενες σαν CIN II-III προέκυψαν σε διάστημα 14 μηνών από την υπάρχουσα λοίμωξη HPV, υποδηλώνει, αντίθετα με τη θεωρία, ότι η μεγάλη σε διάρκεια λοίμωξη από στέλεχος υψηλού κινδύνου είναι αναγκαία για την εξέλιξη σε υψηλού βαθμού νεοπλασία, οι υψηλού βαθμού



ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις αποτελούν συχνά την πρώτη εκδήλωση της λοίμωξης από τον ιό του HPV στις νέες γυναίκες (Sabath AP. et al. *Pathol.Case Reviews*. 2010).

#### 1.4. 2. HPV και ανάπτυξη του καρκίνου.

Τα γνωστά βήματα της καρκινογένεσης στον τράχηλο της μήτρας περιλαμβάνουν: λοίμωξη από ογκογόνο ιό, δημιουργία υψηλόβαθμης ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης (High Grade Squamous Intraepithelial Lesion, HGSIL), την εξέλιξή της σε καρκίνωμα in situ και κατόπιν σε διηθητικό καρκίνωμα (Εικ.5).



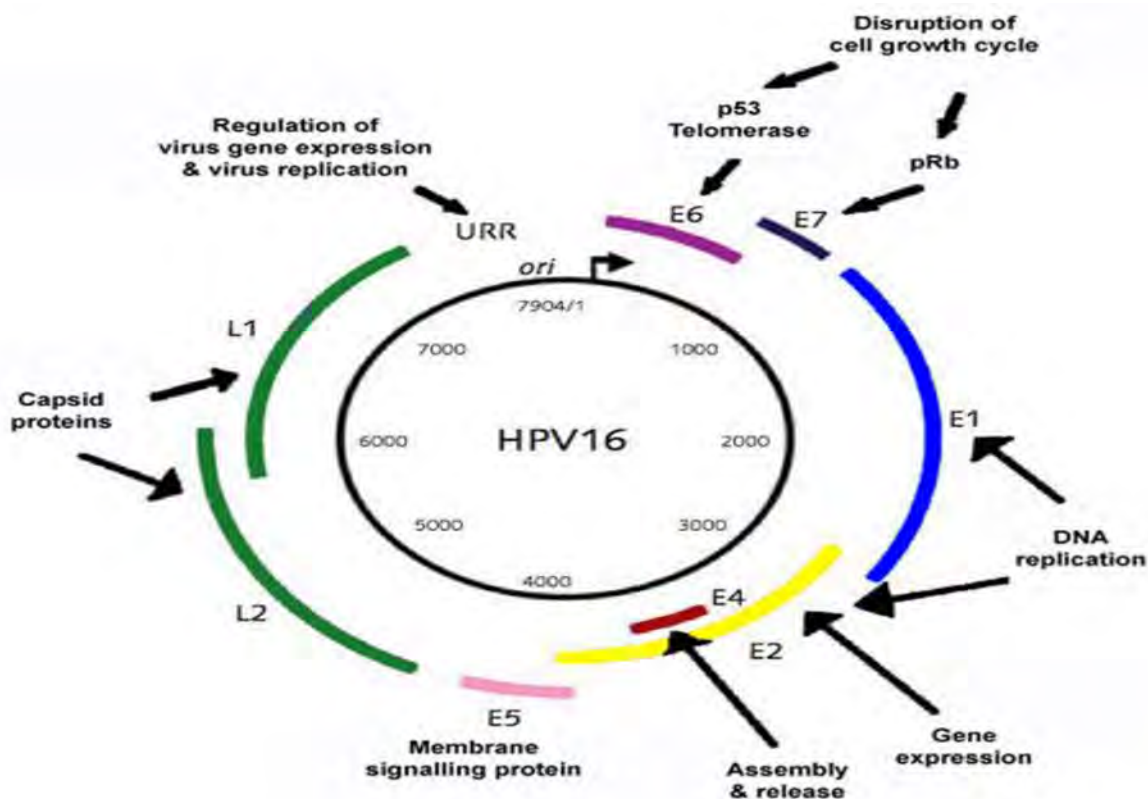
**Εικ. 5.** Η φυσική ιστορία του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. \**The epidemiology of human papillomavirus infections. Journal of Clinical Virology. Review. 2005. 32S; 16-24.*

Αξίζει να σημειωθεί ότι στις CIN III αλλοιώσεις, ο κίνδυνος εξαλλαγής τους σε καρκίνο είναι αρκετά μεγάλος, εφόσον δεν ανακαλύπτονται και δεν θεραπεύονται εγκαίρως. Η διαδικασία μετατροπής τους σε καρκίνο συνήθως κρατά χρόνια ή δεκαετίες, δίνοντας έτσι την ευκαιρία για την ανίχνευσή τους με κυτταρολογικές μεθόδους. Πιο συγκεκριμένα, η μέση ηλικία των γυναικών με διηθητικό καρκίνωμα του τραχήλου της μήτρας είναι περίπου τα 50 έτη, ενώ των γυναικών με HGSIL είναι περίπου τα 28 έτη, μαρτυρία που υποδηλώνει μια μεγάλη διάρκειας προκαρκινική κατάσταση (Baseman J. et al. *J. of Clin. Virol.* 2005).

Οι περισσότερες μέχρι σήμερα μελέτες, αφορούν το στέλεχος HPV16 και έχουν δείξει ότι ο μέσος όρος του αριθμού αντιγράφων των ιικών DNA μορίων αυξάνει σημαντικά με τη βαθμίδα της CIN αλλοίωσης για τον συγκεκριμένο τύπο ιού, αλλά δεν παρατηρείται το ίδιο και για άλλα στελέχη υψηλού κινδύνου, γεγονός που υποδηλώνει μια εξειδικευμένη γονοτυπικά σύνδεση ανάμεσα στο ιικό φορτίο και στην εξέλιξη της νεοπλασίας. Οι πρώτες μελέτες σχετικά με την ενσωμάτωση του ιικού DNA έδειξαν ότι το HPV γονιδίωμα στις περισσότερες ήπιες και CIN I αλλοιώσεις ήταν σε επισωματική μορφή, αντίθετα με περιπτώσεις καρκίνου του τραχήλου στις οποίες το ιικό DNA ήταν ενσωματωμένο στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή (Jeon S. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995, El Awady MK. et al. *Virology.* 1987, Cullen AP. et al. *J. Virol.* 1991). Ωστόσο, μεταγενέστερες μελέτες σε κυτταροκαλλιέργειες, υποδηλώνουν ότι η ενσωμάτωση, ίσως είναι ένα πρώιμο γεγονός στην όλη διαδικασία (Peitsaro P. et al. *J.Clin. Microbiol.* 2002).

## 2. Το γονιδίωμα του ιού HPV.

Το γονιδίωμα του ιού HPV είναι δίκλωνο, κυκλικό DNA μήκους περίπου 8000 ζευγών βάσεων και οργανώνεται σε τρεις λειτουργικές περιοχές (Εικ. 6):



**Εικ. 6.** Οργάνωση του γονιδιώματος του στελέχους HPV16.\*[www.microbiologybytes.com](http://www.microbiologybytes.com)

α) τη μη κωδική ρυθμιστική περιοχή [Non-Coding Region, NCR ή Upstream Regulatory Region, URR (ανοδική ρυθμιστική περιοχή) ή Late Control Region, LCR (περιοχή ελέγχου), η οποία ευθύνεται για τον καθορισμό του φάσματος των ξενιστών και τον τροπισμό κάθε τύπου του ιού HPV. Επιπλέον, ρυθμίζει την έκφραση του γενετικού υλικού του ιού μετά τη λοίμωξη. Αυτή η περιοχή περιλαμβάνει τη θέση έναρξης της αντιγραφής του ιικού γονιδιώματος, τέσσερις θέσεις πρόσδεσης της πρωτεΐνης E2 και πολλαπλές θέσεις πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων (Butz K. et al. *J. Virol.* 1993, Kurvinen K. et al. *Eur. J. Cancer.* 2000).

β) Την πρώιμη περιοχή που περιλαμβάνει οχτώ ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (Open Reading Frames, ORFs), τις κωδικές περιοχές για τις πρωτεΐνες E1, E2, E4, E5, E6 και E7 και γ) την όψιμη περιοχή που κωδικοποιεί τις πρωτεΐνες της κάψας του ιού, L1 και L2. (Πίνακας 1)(Hamid A. et al. *Cell. Mol. Life. Sci.* 2009).

**Πίνακας 1. Οι πρωτεΐνες του HPV ιού και οι λειτουργίες τους**

Πρωτεΐνη	Λειτουργία
<b>E1</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ ΑΤΡάση, DNA ελικάση</li> <li>▪ Αναγνωρίζεται και συνδέεται ως εξαμερές σύμπλοκο στη θέση αντιγραφής του ιικού DNA</li> <li>▪ Απαραίτητη για την αντιγραφή του ιικού DNA</li> </ul>
<b>E2</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Κύριος ρυθμιστής της μεταγραφής του ιού</li> <li>▪ Συνδέεται ως διμερές με το μεταγραφικό υποκινητή του ιού</li> <li>▪ Εμπλέκεται στην αντιγραφή του ιικού DNA</li> <li>▪ Αλληλεπιδρά με την E1</li> </ul>
<b>E4</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Δρά ως όψιμη πρωτεΐνη του ιικού κυτταρικού κύκλου</li> <li>▪ Ρήξη των δικτύων κυτοκερατίνης/παύση της κυτταρικής ανάπτυξης</li> <li>▪ Εντοπίζεται στην πυρηνική περιοχή 10s</li> <li>▪ Προκαλεί G2 αναστολή</li> <li>▪ Θεωρείται ότι διευκολύνει τη συναρμολόγηση και την απελευθέρωση των ιών</li> </ul>
<b>E5</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Προάγει μη προγραμματισμένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό</li> <li>▪ Αλληλεπιδρά με τη c-υποομάδα της ΑΤΡάσης των κενοτοπίων</li> <li>▪ Ενεργοποιεί τον υποδοχέα του αυξητικού παράγοντα και άλλες πρωτεϊνικές κινάσες</li> <li>▪ Αναστέλλει την απόπτωση</li> <li>▪ Αναστέλλει τη διακίνηση των συμπλόκων μείζονας ιστοσυμβατότητας προς την επιφάνεια του κυττάρου</li> </ul>
<b>E6</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Προάγει την σύνθεση του DNA</li> <li>▪ Προάγει την τελομεράση</li> <li>▪ Αναστέλλει την κυτταρική διαφοροποίηση</li> <li>▪ Αλληλεπιδρά με τέσσερις τάξεις κυτταρικών πρωτεϊνών: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Μεταγραφικούς συνενεργοποιητές,</li> <li>- πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην πολικότητα και την κινητικότητα του κυττάρου,</li> <li>- ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες, προαγωγείς της απόπτωσης, κυρίως τον p53,</li> <li>- παράγοντες αντιγραφής και επιδιόρθωσης του DNA</li> </ul> </li> </ul>
<b>E7</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Προάγει μη προγραμματισμένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό</li> <li>▪ Αλληλεπιδρά με ακετυλοτρασεράση της ιστόνης</li> <li>▪ Αλληλεπιδρά με αρνητικούς ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου και ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες, κυρίως τον p105Rb</li> </ul>
<b>L1</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Μείζονα δομική πρωτεΐνη</li> <li>▪ Συναθροίζεται σε καψομερίδια και καψίδια</li> <li>▪ Αλληλεπιδρά με την L2 πρωτεΐνη</li> <li>▪ Αλληλεπιδρά με κυτταρικούς υποδοχείς</li> <li>▪ Κωδικοποιεί επιτόπους ουδετεροποίησης</li> </ul>
<b>L2</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Ελάσσονα δομική πρωτεΐνη</li> <li>▪ Αλληλεπιδρά με το DNA του ιού</li> <li>▪ Αλληλεπιδρά με την πυρηνική περιοχή 10s</li> <li>▪ Αλληλεπιδρά με κυτταρικούς υποδοχείς</li> <li>▪ Κωδικοποιεί γραμμικούς επιτόπους ουδετεροποίησης</li> </ul>

Η ρυθμιστική περιοχή LCR περιέχει έναν πρώιμο υποκινητή που επάγει την έκφραση των πρώιμων και των όψιμων γονιδίων του ιού, ενώ ο όψιμος υποκινητής, που βρίσκεται στο ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης της E7 περιοχής επάγει την έκφραση των όψιμων γονιδίων κυρίως. Πολλές φορές η κατάσταση αυτή δεν είναι ξεκάθαρη, καθώς μερικά από τα γονίδια της πρώιμης περιοχής ενεργοποιούνται μέσω του όψιμου υποκινητή και αντιστρόφως (Spink KM. *et al. J. Virol.* 2005).

Συνοπτικά, η πρωτεΐνη E1 είναι αναγκαία για την αντιγραφή του ιού και διατηρείται σε υψηλό βαθμό μεταξύ των διαφόρων τύπων του ιού HPV (Ustav M. *et al. EMBO J.* 1991, Svedrup F. *et al. J. Virol.* 1994). Επίσης, εκφράζεται σε όλο τον κυτταρικό κύκλο και είναι σε ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα κατά τη διάρκεια της μη ενεργούς φάσης, όπου ο όψιμος υποκινητής εξακολουθεί να είναι ενεργός (Klumpp DJ. *et al. Virology.* 1999, Ozbun MA. *et al. Virology.* 1998). Έχει ελικοειδή δράση και προσδένεται στη θέση έναρξης της αντιγραφής του ιικού γονιδιώματος, πριν ξεκινήσει η αντιγραφή του DNA (Hughes FJ. *et al. Nucleic Acids Res.* 1993). Η σύνδεση της E1 στην περιοχή της αντιγραφής δεν είναι ισχυρή (Mohr IJ. *et al. Science.* 1990).

Η πρωτεΐνη E2 έχει σημαντικές ιδιότητες στην αντιγραφή και μεταγραφή του ιού. Η E2 πρωτεΐνη προσδένεται σε συγκεκριμένη αλληλουχία στην LCR περιοχή και μέσω της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών στρατολογεί την E1 στη αρχή του κυτταρικού κύκλου του ιού. Επιπλέον, παίζει σημαντικό ρόλο στον μηχανισμό της μεταγραφής του γονιδιώματος του ιού και στο διαχωρισμό του γονιδιώματος των διαφόρων τύπων HPV, μεταξύ των θυγατρικών κυττάρων που προκύπτουν από την κυτταρική διαίρεση (Zheng PS. *et al. J. Virol.* 2005, Bastien N. *et al. Virology.* 2000, You J. *et al. Cell.* 2004, Parish JL. *et al. Mol. Cell.* 2006).

Οι πρωτεΐνες E6 και E7 έχουν ιδιότητες μετασχηματισμού και παίζουν σημαντικό ρόλο στην αναπαραγωγή του ιού και στη δημιουργία όγκων. Σχετίζονται με τη δράση των ογκογονιδίων και την αδρανοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Η E6 καταστέλλει την ικανότητα μεταγραφής του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53, εξασφαλίζοντας την αποδόμηση της p53 πρωτεΐνης στα πρωτεοσωμάτια, μέσω της οδού της ουμπικουιλίνης. Αλληλεπιδρά με άλλες κυτταρικές πρωτεΐνες και ενεργοποιεί την τελομεράση οδηγώντας σε ακαθόριστη κυτταρική διαίρεση (Singh N. *Indian. J. of Med. and Paed. Oncol.* 2005).

Η πρωτεΐνη E7 δρα ανάλογα, με πρόσδεση και ενεργοποίηση της λειτουργίας της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος (pRb) και των σχετιζόμενων πρωτεϊνών. Υπερνικά το «εμπόδιο» της Rb πρωτεΐνης, ελευθερώνει τον μεταγραφικό παράγοντα E2F και παίζει ρόλο «κλειδί» στην επαγωγή της σύνθεσης τόσο του κυτταρικού όσο και του ιικού γονιδιώματος. Επιπρόσθετα, ενώνεται και ενεργοποιεί τα συμπλέγματα CDK2 της κυκλίνης και με τον τρόπο αυτό ελέγχει την πορεία του κυτταρικού κύκλου. Η μεταγραφή των E6 και E7 γονιδίων ελέγχεται από στοιχεία που εδράζονται στην περιοχή LCR του HPV γονιδιώματος (Singh N. *Indian. J. of Med. and Paed. Oncol.* 2005).

Η πρωτεΐνη E5 έχει πρόσθετη δράση στις ιδιότητες μετασχηματισμού των E6 και E7 πρωτεϊνών. Φαίνεται πως δρα ως ογκογονίδιο, καθώς σε πειράματα που έχουν πραγματοποιηθεί, έχει την ικανότητα σε συνδυασμό με την E7 να μετασχηματίζει τους ινοβλάστες των ποντικών και τα κερατινοκύτταρα (Leechanachai P. *et al. Oncogene.* 1992, Leptak C. *et al. J. Virol.* 1991). Η ιδιότητα της E5 πρωτεΐνης, πιθανότατα σχετίζεται με την ικανότητα των πρωτεϊνών να διαμορφώνουν την κυτταρική σηματοδότηση, πιθανά μέσω σύνδεσης με την αντλία πρωτονίων με ενεργότητα ATPάσης στα κενοτόπια και την επακόλουθη καθυστέρηση της ενδοσωμικής οξίνισης.

Ωστόσο, έλλειψη της πρωτεΐνης E5, στο γενικότερο πλαίσιο του συνολικού γονιδιώματος των HPV16 και HPV31 στελεχών, δε δείχνει σαφείς επιπτώσεις, γεγονός που

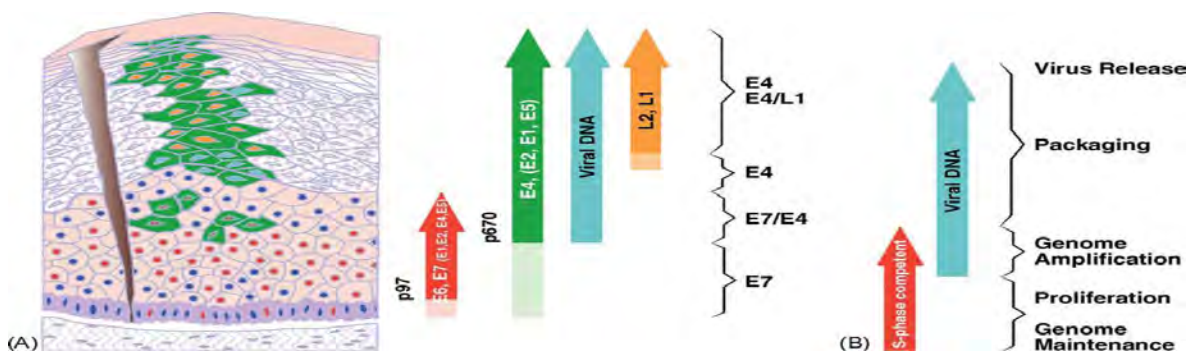
υποδηλώνει ότι ο ρόλος της συγκεκριμένης πρωτεΐνης είναι περισσότερο συμπληρωματικός όσον αφορά στον μετασχηματισμό (Genther SM. et al. J. Virol. 2003, Fehrmann F. et al. J. Virol. 2003).

Ο ακριβής ρόλος της πρωτεΐνης E4 εξακολουθεί να μην είναι ξεκάθαρος. Η E4 πρωτεΐνη φαίνεται να σχετίζεται με την κατάρρευση του κυτταρικού δικτύου κυτοκερατίνης, γεγονός που διευκολύνει την απελευθέρωση του ιού. Όπως και στην περίπτωση της E5, έτσι και η E4 πρωτεΐνη διαδραματίζει ένα μικρό ρόλο στον κυτταρικό κύκλο του ιού. Δεδομένου ότι βρίσκεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στα τελικά στάδια της λοίμωξης, χαρακτηρίζεται ως όψιμη πρωτεΐνη (Fang L. et al. Virology. 2006, Nakahara T. et al. J. Virol. 2005, Wilson R. et al. J. Virol. 2005). Η όψιμη περιοχή του HPV ιού περιλαμβάνει δύο ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες της κάψας του ιού, την L1 (μείζονα καψιδική πρωτεΐνη) και την L2 (ελάσσονα καψιδική πρωτεΐνη) (Hamid A. et al. Cell. Mol. Life. Sci. 2009).

### 3. Οργάνωση του κυτταρικού κύκλου του HPV ιού

Ανεξάρτητα από την εξελικτική τους προέλευση, όλοι οι ιοί των θηλωμάτων ολοκληρώνουν τον κύκλο ζωής τους στον επιθηλιακό ιστό που μολύνουν και παράγουν λοιμώδη σωματίδια, που τελικά εκκρίνονται από την επιφάνεια του επιθηλίου. Για να επιτευχθεί κάτι τέτοιο, είναι αναγκαία η συγχρονισμένη και συντονισμένη έκφραση των διαφόρων γονιδιακών παραγώγων του ιού, καθώς τα κύτταρα που έχουν μολυνθεί, μετακινούνται προς την επιφάνεια του επιθηλίου. Αυτός ο εξαιρετικά καθορισμένος τρόπος γονιδιακής έκφρασης, επιτρέπει στα διάφορα στάδια του κυτταρικού κύκλου του ιού, να ολοκληρωθούν κατάλληλα και δημιουργεί τη βάση για την επιλογή βιοδεικτών, που μπορεί να χρησιμεύσουν στη διάγνωση (Doorbar J. Disease Markers. 2007).

Όπως έχει αναφερθεί επανειλημμένως, οι περισσότερες μελέτες έχουν επικεντρωθεί στην ανάλυση των στελεχών υψηλού κινδύνου και ιδιαίτερα στο στέλεχος HPV16, που αποτελεί την πρωταρχική αιτία για την εμφάνιση του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. (Doorbar J. J. of Clin. Virol. 2005). Από τις μελέτες αυτές, όπως και από την ανάλυση συγγενικών στελεχών του ιού (συμπεριλαμβανομένων των στελεχών HPV11 και HPV1), έχει αναπτυχθεί ένα γενικό πρότυπο έκφρασης του ιϊκού γονιδιώματος, που με τροποποιήσεις μπορεί να εφαρμοσθεί σε ιούς ανθρωπίνων θηλωμάτων άλλων ομάδων. Ο κυτταρικός κύκλος μπορεί να διαιρεθεί σε διάφορες φάσεις που επισημαίνονται παρακάτω (Εικ. 7).



**Εικ. 7.** Η οργάνωση του κύκλου ζωής της παραγωγικής λοίμωξης από διάφορα στελέχη του HPV ιού της Α υπερικογένειας. (Α) Διαγραμματική αναπαράσταση του δέρματος για την αποκάλυψη του

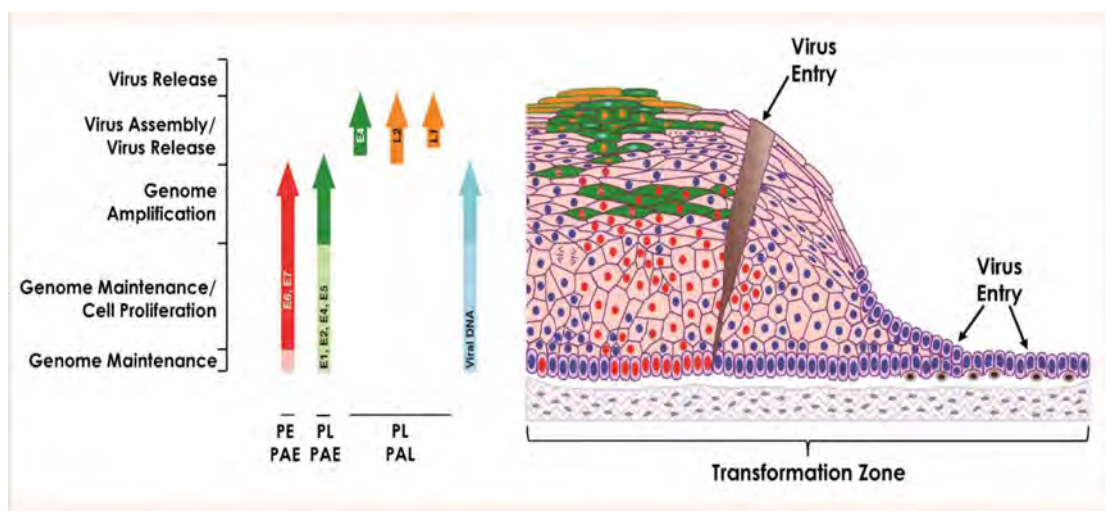
προτύπου γονιδιακής έκφρασης του στελέχους HPV16, καθώς τα λοιμώδη κύτταρα μετατοπίζονται προς την επιφάνεια του κυττάρου. Ιοί της υπερικογένειας A, όπως τα στελέχη HPV2 και HPV11 ακολουθούν παρόμοιο πρότυπο. Μετά τη λοίμωξη, ένας χαμηλός αριθμός ιικών αντιγράφων διατηρείται σε επισωματική μορφή. Κατά τη διάρκεια της επιθηλιακής διαφοροποίησης, ο υποκινητής p97 κατευθύνει την έκφραση των γονιδίων E6 και E7 που είναι απαραίτητα για την είσοδο της φάσης S (κόκκινο χρώμα). Ο υποκινητής p670 ρυθμίζεται ανοδικά στις ανώτερες επιθηλιακές στιβάδες και οι πρωτεΐνες αντιγραφής του ιού (E1, E2, E4, E5) αυξάνονται (πράσινο χρώμα), διευκολύνοντας την ενίσχυση του DNA γονιδιώματος (μπλε χρώμα). Αλλαγές στο μάτισμα του mRNA επιτρέπουν την εμφάνιση της E4 πρωτεΐνης στις ανώτερες στιβάδες του επιθηλίου, όπου βρίσκονται οι καψιδικές πρωτεΐνες L1, L2 του ιού (κίτρινο χρώμα). (B) Τα κύτταρα στις κατώτερες στιβάδες του επιθηλίου βρίσκονται στη φάση S του κυτταρικού κύκλου. Η ενίσχυση του γονιδιώματος του ιού αρχίζει στα κύτταρα αυτά, αλλά σταματά όταν χάσουν την ικανότητα τους να εκφράζουν πρωτεΐνες της φάσης S. Αν και τα ενισχυμένα γονιδιώματα μπορούν να εντοπίζονται σε όλες τις ανώτερες στιβάδες του επιθηλίου, κύτταρα που στηρίζουν ενεργά την ενίσχυση του γονιδιώματος, φαίνεται να περιορίζονται σε συγκεκριμένη περιοχή, όπου η έκφραση της E7 πρωτεΐνης συμπίπτει με τα υψηλά επίπεδα της E4 πρωτεΐνης, και πιθανά με αυξημένα επίπεδα των E1, E2 πρωτεϊνών.\* **The papillomavirus life cycle. Journal of Clinical Virology. Review. 2005. 32S; S7-S15.**

### 3.1. Η αρχική λοίμωξη του επιθηλίου

Η αρχική λοίμωξη παρουσιάζεται όταν σωματίδια του ιού αποκτούν πρόσβαση στη βασική στιβάδα του επιθηλίου, η οποία στην φυσιολογική επιδερμίδα περιέχει κύτταρα μιτωτικά ενεργά. Τα κύτταρα αυτά έχουν διεγερθεί και διαιρούνται φυσιολογικά από αυξητικούς παράγοντες που προέρχονται από τον υποκείμενο ιστό και στο φυσιολογικό επιθήλιο. Η συνεχής διαίρεση των κυττάρων αυτών, επιτρέπει την ανανέωση της επιθηλίου μετά τη διαδικασία της απολέπισης. Πιστεύεται ότι τα ιικά σωματίδια συνδέονται με πρωτεογλυκάνες στην επιφάνεια του κυττάρου, καθώς επίσης και με δευτερογενείς υποδοχείς, που διευκολύνουν την είσοδο του ιού στο κύτταρο (*Joyce JG. et al. J. Biol. Chem. 1999, McMillan NA. et al. Virology. 1999, Patterson NA. et al. J. Virol. 2005, Shafti - Keramat S. et al. J. Virol. 2003*).

Η πρόσβαση στη βασική στιβάδα προϋποθέτει ρωγμή στη συνοχή του επιθηλιακού περιβλήματος. Η κατάσταση αυτή απαιτεί την παρουσία μικροτραυματισμών ή πιο εμφανών βλαβών στο επιθήλιο, ωστόσο ο ιός μπορεί και προκαλεί μόλυνση σε περιοχές με τέτοιο τρόπο ώστε η πρόσβασή του στη βασική μεμβράνη να διευκολύνεται (Εικ. 8). Η προσκόλληση και η είσοδος του ιού, επιτυγχάνονται με τη βοήθεια των α6β1 και α6β4 ιντεγκρινών που εκφράζονται στην επιφάνεια των βασικών κυττάρων. Τέτοιες περιοχές είναι η βάση του θύλακα της τρίχας και η λεγόμενη t ζώνη μετασχηματισμού, δηλαδή η ζώνη μετατροπής του κυλινδρικού επιθηλίου του ενδοτραχήλου σε πλακώδες επιθήλιο του εξωτραχήλου. Μια λοίμωξη ήπιας μορφής, θεωρείται επιτυχημένη, όταν οδηγεί στην εγκατάσταση του HPV γονιδιώματος σε επισωματική μορφή, η οποία διατηρείται σε μικρό αριθμό αντιγράφων, χωρίς όμως να ενσωματώνεται στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή (*Doorbar J. Dis Markers. 2007*).





**Εικ. 8.** Η βιολογία και ο κύκλος ζωής των ιών των ανθρωπίνων θηλωμάτων. \*The biology and life-cycle of human papillomaviruses. Vaccine. Review. 2012. 30S; 55-70.

### 3.2. Η διατήρηση του γονιδιώματος και ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός στις κατώτερες στιβάδες του επιθηλίου.

Ανεξάρτητα από την ιδιότητα των κυττάρων της βασικής μεμβράνης που έχουν προσβληθεί από τον ιό HPV, είχε επικρατήσει η άποψη πως η λοίμωξη ακολουθείται από μια αρχική φάση ενίσχυσης του ιϊκού γονιδιώματος και τον μετέπειτα πολλαπλασιασμό της επισωματικής μορφής του ιού σε μικρό αριθμό αντιγράφων (Pyeon D. et al. PLoS Pathol. 2009, Parish JL. et al. Mol. Cell. 2006, McBride AA. et al. Adv. Ver. Res. 2008).

Πρόσφατη μελέτη του Doorbar και των συνεργατών του, σε επισωματικές κυτταρικές σειρές προερχόμενες από αλλοιώσεις του τραχήλου της μήτρας, προτείνει ότι ο αριθμός των ιϊκών αντιγράφων/ανά κύτταρο είναι γύρω στα 200 (Doorbar J. et al. Vaccine. 2012).

Οι ιϊκές πρωτεΐνες E1 και E2 θεωρούνται απαραίτητες για την αρχική φάση ενίσχυσης του ιϊκού γονιδιώματος. Επιπλέον, ενδέχεται να είναι απαραίτητες για τη διατήρηση της αντιγραφής των επισωματικών μορφών μόλις σταθεροποιηθεί ο αριθμός των αντιγράφων (Kim K. et al. Virology. 2002, Angeletti PC. et al. J. Virol. 2002, Egawa N. et al. J. of Virol. 2012). Ο ακριβής ρόλος των E1 και E2 πρωτεϊνών στη βασική μεμβράνη κατά τη διάρκεια της λοίμωξης χρειάζεται επιπλέον διευκρίνιση, αν και είναι σαφής ο ρόλος της E2 πρωτεΐνης στο διαχωρισμό του γονιδιώματος.

#### 3.2.1. Η E1 πρωτεΐνη.

Η E1 πρωτεΐνη αποτελεί μια από τις πιο καλά συντηρημένες πρωτεΐνες, μεταξύ των διαφορετικών στελεχών του HPV ιού. Εμφανίζει ικανότητα πρόσδεσης στο DNA καθώς και θέση πρόσδεσης στην περιοχή έναρξης της αντιγραφής, που εντοπίζεται στη ρυθμιστική περιοχή (LCR) (Davy Vanden Broeck. Human Papillomavirus and Related Diseases- From Bench to Bedside – A Clinical Perspective. Chapter 1. Human Papillomavirus: Biology and Pathogenesis. 2012).

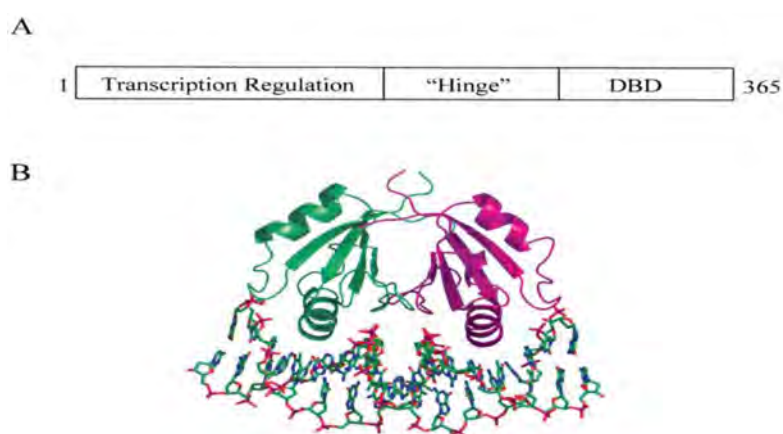
Οργανώνεται σε εξαμερές σύμπλεγμα που υποστηρίζεται από την E2 πρωτεΐνη. Το τελικό σύμπλεγμα έχει ενεργότητα ελίκωσης και ξεκινά το ξετύλιγμα του DNA και προς τις

δύο κατευθύνσεις, γεγονός απαραίτητο για την αντιγραφή του ιού (*Davy Vanden Broeck Human Papillomavirus and Related Diseases- From Bench to Bedside – A Clinical Perspective. Chapter 1. Human Papillomavirus: Biology and Pathogenesis. 2012*).

Η καρβοξυτελική περιοχή της E1 πρωτεΐνης έχει ενεργότητα ATPάσης /ελικάσης και είναι αναγκαία και επαρκής για ολιγομερισμό. Η συγκεκριμένη περιοχή αλληλεπιδρά με την E2 πρωτεΐνη και την υποομάδα p70 της πολυμεράσης  $\alpha$  του DNA, αλλά δεν είναι επαρκής για να υποστηρίξει την αντιγραφή. Η περιοχή που προσδένεται στο DNA αποτελείται από 160 περίπου αμινοξέα και βρίσκεται πριν την περιοχή με ενεργότητα ATPάσης/ελικάσης. Ένα τμήμα μήκους 50 αμινοξέων, στο αμινοτελικό άκρο της E1 πρωτεΐνης, δρα ως ρυθμιστική περιοχή εντοπισμού (LCR) και περιέχει αλληλουχία πυρηνικής εξόδου (Nuclear Export Sequence, NES) και ένα σήμα πυρηνικής εντόπισης (Nuclear Signal Location, NSL) που ρυθμίζεται μέσω φωσφορυλίωσης (*Deng SJ. et al. J. Virol. 2004*).

### 3.2. 2. Η E2 πρωτεΐνη.

Η E2 πρωτεΐνη έχει μέγεθος περίπου 360 αμινοξέα και περιλαμβάνει τρεις λειτουργικές περιοχές (Εικ. 9Α, Β): α) την καρβοξυτελική περιοχή πρόσδεσης του DNA (DNA Binding Domain, DBD), β) την περιοχή ενεργοποίησης (Transactivation Domain TAD) που φέρει θέσεις πρόσδεσης για άλλες πρωτεΐνες και γ) την κεντρική περιοχή για το σχηματισμό ενός εύκαμπτου άξονα. Τα μοριακά μοντέλα των N- και C-τελικών περιοχών που έχουν παραχθεί, βασίζονται σε αποτελέσματα κρυσταλλογραφίας με ακτίνες X και σε μελέτες φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance, NMR). Η καρβοξυτελική περιοχή πρόσδεσης στο DNA σχηματίζει ένα διμερές, στο οποίο αμινοξέα και από τις δύο υποομάδες δημιουργούν μια  $\beta$ - θήκη με τέσσερις επιφανειακές  $\alpha$ -έλικες, εκ των οποίων οι δύο αλληλεπιδρούν με το DNA (*de Prat-Gray G. et al. Front. Biosci. 2008*). Η περιοχή πρόσδεσης στο DNA της E2 πρωτεΐνης ενώνεται με τις αλληλουχίες του DNA που προσαρμόζονται στην αλληλουχία 5'aACCGN4CGGTt 3' όπου N οποιαδήποτε από τις τέσσερις αζωτούχες βάσεις (*Sanchez IE. et al. Nucleic Acids. Res. 2008*).



**Εικ. 9. Α.** Η κύρια δομή της E2 πρωτεΐνης. **Β.** Το σύμπλεγμα HPV6 E2DNA περιοχή πρόσδεσης-DNA του ιού HPV6. Δε φαίνονται η συζευκτική περιοχή και η περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής. **\*The regulation of cell proliferation by the papillomavirus early proteins. Cellular and Molecular life Sciences. Review. 2009. 66; 1700-17.**



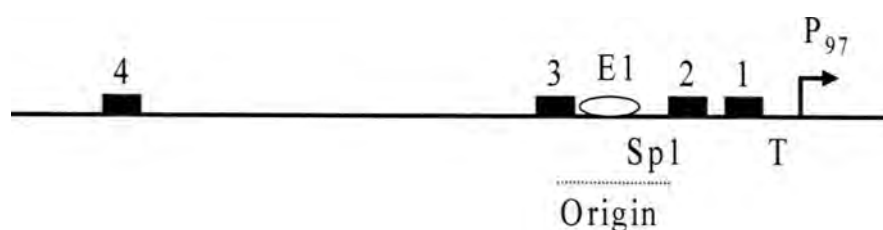
Οι κρυσταλλικές δομές της περιοχής πρόσδεσης στο DNA, σε συνδυασμό με τα σημεία πρόσδεσης της E2 πρωτεΐνης έχουν καθοριστεί. Η αμινοτελική περιοχή αποτελείται από α-έλικες πλούσιες σε γλουταμίνη και από β-φύλλα. Επιπλέον, εμφανίζεται ικανή για διμερισμό. Ωστόσο, λόγω της αλληλοσυνδεόμενης φύσης του β-κυλίνδρου στο DNA φαίνεται να είναι υποχρεωτικά διμερές. Η αλληλεπίδραση μεταξύ επιμέρους N-τελικών περιοχών είναι ασθενής και θα ήταν απίθανο να συμβεί αν η περιοχή πρόσδεσης στο DNA δεν έφερνε τις περιοχές αυτές σε κοντινή απόσταση (*Harris SF. et al. Science. 1999, Antson AA. et al. Nature. 2000*).

Η αμινοτελική περιοχή είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση με την E1 πρωτεΐνη και τους παράγοντες μεταγραφής του κυττάρου-ξενιστή, όπως οι Brd4, Sp1, TFIIIB και AMF-1. Επίσης, κατέχει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της μεταγραφής των πρωτεϊνών E6 και E7 (*Abbate EA. et al. Mol Cell. 2006*).

Η κεντρική περιοχή του άξονα, ενώνει αυτές τις δύο περιοχές και είναι σημαντική για τις διάφορες λειτουργικές πλευρές της E2 πρωτεΐνης, περιλαμβάνοντας την πρωτεϊνική σταθερότητα (*Garcia – Alai MM. et .al. Structure. 2006*) και εντόπιση της πρωτεΐνης (*Dao. LD. et al. J. Virol. 2006*).

### 3.2.3. Η ρύθμιση της αντιγραφής και της μεταγραφής του ιού HPV από την E2 πρωτεΐνη.

Η πρωτεΐνη E2 είναι αναγκαία για την αποτελεσματική αντιγραφή του ιού και διαδραματίζει βασικό ρόλο στην αντιγραφή, στην ενεργότητα και στην καταστολή του ιού. Υπάρχουν 4 θέσεις πρόσδεσης της E2 πρωτεΐνης μέσα στην LCR περιοχή (Εικ.10).



**Εικ. 10.** Τα σημεία πρόσδεσης των E2 και E1 πρωτεϊνών εντός της URR του στελέχους HPV16 εμφανίζονται ως γεμάτα ορθογώνια κουτιά και ένα οβάλ, αντίστοιχα. Η περιοχή έναρξης της μεταγραφής του p97 υποκινητή σημειώνεται με βέλος. Οι T και Sp1 ενδείξεις υποδεικνύουν τα σημεία πρόσδεσης του TATA box και Sp1, αντίστοιχα. **\*The regulation of cell proliferation by the papillomavirus early proteins. Cellular and Molecular life Sciences. Review. 2009. 66; 1700-17.**

Ο ρόλος της E2 πρωτεΐνης στην αντιγραφή του ιού είναι σχετικά καλά κατανοητός. Η πρόσδεσή της στις εγγύς θέσεις του υποκινητή στρατολογεί την E1 πρωτεΐνη στη θέση έναρξης της αντιγραφής του ιού. Με την πρόσδεση της E1 πρωτεΐνης, η E2 μετατοπίζεται από τη θέση της και η αντιγραφή ξεκινά.

Αντίθετα, ο ρόλος της E2 πρωτεΐνης στον έλεγχο της έκφρασης των γονιδίων του HPV ιού είναι λιγότερο κατανοητός. Έχουν προταθεί διάφορα μοντέλα για να περιγράψουν τον τρόπο με τον οποίο η συγκεκριμένη πρωτεΐνη ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων του ιού κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Όταν τα σημεία πρόσδεσης της E2 πρωτεΐνης τοποθετηθούν, πριν από τον κατώτατο υποκινητή στην LCR περιοχή, τότε η E2 πρωτεΐνη μπορεί να ενεργοποιήσει την μεταγραφή του ιού. Ωστόσο, όταν η E2 πρωτεΐνη προσδένεται στην περιοχή LCR, μπορεί να καταστείλει την αντιγραφή (*Bouvard V. et al. EMBO J. 1994*).

Συγκεκριμένα, δυο κοντινές στον υποκινητή θέσεις πρόσδεσης της E2 πρωτεΐνης βρίσκονται δίπλα από την περιοχή πρόσδεσης του Sp1 μεταγραφικού παράγοντα και την αλληλουχία TATA-box. Όταν η E2 προσδένεται στις θέσεις που προαναφέρθηκαν (boxes 1,2) προκαλεί την μετατόπιση των μεταγραφικών παραγόντων Sp1 και TFIID και οδηγεί στην καταστολή της μεταγραφής (Εικ.10).

Επιπλέον, η E2 πρωτεΐνη μπορεί και αλληλεπιδρά με τον Sp1 μεταγραφικό παράγοντα και την πρωτεΐνη που προσδένεται στο TATA box (TATA- box binding protein, TBP). Έχει παρατηρηθεί ότι στα αρχικά στάδια της λοίμωξης, τα επίπεδα έκφρασης της E2 πρωτεΐνης είναι χαμηλά, γεγονός που ευνοεί την πρόσδεση της με έναν υψηλότερης συγγένειας απομακρυσμένο υποκινητή, προκαλώντας την ενεργοποίηση της μεταγραφής. Αντίθετα, στα τελικά στάδια της λοίμωξης, τα επίπεδα της E2 πρωτεΐνης είναι υψηλά και η E2 μπορεί και προσδένεται στον κοντινό υποκινητή, οδηγώντας στην καταστολή της μεταγραφής (Hamid A. et al. *Cell. Mol. Life. Sci.* 2009).

Έχει βρεθεί ότι ενώ η E2 πρωτεΐνη του στελέχους HPV6 προσδένεται ισχυρά στον κοντινό υποκινητή μέσω της θέσης πρόσδεσης στο γονιδίωμά του, στο στέλεχος HPV11 η E2 πρωτεΐνη ενώνεται εξίσου καλά σε όλα τα σημεία της στο γονιδίωμά του HPV11 ιού, γεγονός που αποδεικνύει ότι οι διάφοροι τύποι του HPV ιού έχουν διαφορετικούς μηχανισμούς ελέγχου της μεταγραφής (Dell G. et. al. *J. Mol.Biol.* 2003).

Υπάρχουν λίγες σχετικά πληροφορίες για τη ρύθμιση της δράσης της LCR περιοχής από την E2 πρωτεΐνη κατά τη διάρκεια της λοίμωξης. Η E2 πρωτεΐνη αλληλεπιδρά με ένα μεγάλο αριθμό ιικών και κυτταρικών πρωτεϊνών, που μπορούν να ρυθμίζουν τις ιδιότητες αντιγραφής και μεταγραφής του ιού. Όπως έχει προαναφερθεί, ενώνεται με τις πρωτεΐνες E1, E6, E7 και L2 του HPV ιού και με τις πρωτεΐνες TBP, Sp1 και p53 του κυττάρου. Η σύνδεση του p53 με την E2 πρωτεΐνη εμποδίζει την αντιγραφή του DNA του ιού και μπορεί να αλλάξει την μεταγραφική ιδιότητα της E2 (Massimi P. et al. *Oncogene.* 1999, Brown C. et al. *Viol. J.* 2008).

Κατά τον ίδιο τρόπο, η E2 αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη πρόσδεσης στην Τοποϊσομεράση II (Topoisomerase II Binding Protein, TopBp1), προκαλώντας επιπτώσεις στην αντιγραφή και στη ρύθμιση της μεταγραφής του DNA του ιού. Επίσης, μπορεί να ρυθμίζει την δράση πολλών πρωτεϊνών του κυττάρου. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν οι ενεργοποιητές APC (Anaphase Promoting Complex) όπως η καντχερίνη-1 (Cadherin 1, Cdh1) και η πρωτεΐνη κυτταρικής διαίρεσης 20 (Cell-division cycle protein 20, Cdc), μέσω των οποίων οι E2 πρωτεΐνες των υψηλού κινδύνου HPV στελεχών μπορούν να προκαλέσουν γονιδιακή αστάθεια (Bellanger S. et al. *Cell Cycle.* 2005).

#### **3.2.4. Οι επιδράσεις της E2 πρωτεΐνης στα κύτταρα που έχουν μετασχηματιστεί από τον HPV ιό.**

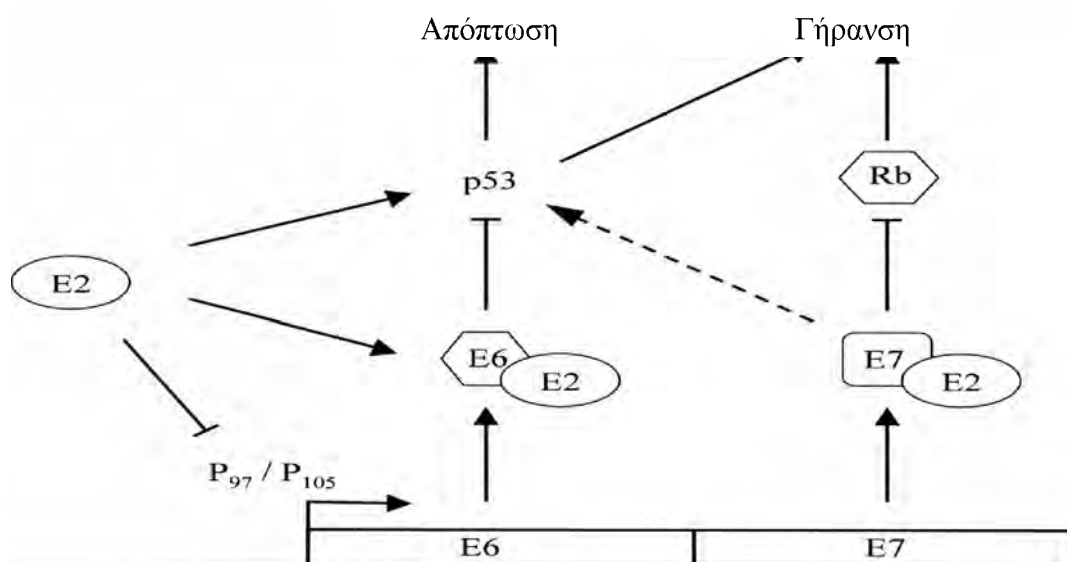
Η αποδιοργάνωση των γονιδίων της E2 ή E1 πρωτεΐνης παρατηρείται συχνά στους όγκους του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, οδηγώντας στην έλλειψη της E2 και στην απορύθμιση των E6 και E7 πρωτεϊνών.

Ωστόσο, σε πειράματα στα οποία μόλυναν κύτταρα HeLa - κυτταρική σειρά καρινώματος τραχήλου που περιέχει DNA από το στέλεχος HPV18 - με ανασυνδυασμένο ιό που εκφράζει την E2 πρωτεΐνη βοός, παρατήρησαν καταστολή της μεταγραφής των ενσωματωμένων γονιδίων των E6 και E7 πρωτεϊνών, διακοπή της ανάπτυξης, απόπτωση και γήρανση των κυττάρων (Goodwin EC. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000, Francis DA. et al. *J. Virol.* 2000, Nishimura A. et al. *J Virol.* 2000, Dowhanick JJ. et al. *J. Virol.* 1995).

Όπως θα ανέμενε κανείς, η επανείσοδος της E2 πρωτεΐνης, εξαρτάται από τον τύπο του ιού και το σύστημα που χρησιμοποιείται για την έκφραση της πρωτεΐνης. Μελέτες έχουν δείξει πως στο στέλεχος HPV18, η εισαγόμενη E2 πρωτεΐνη καταστέλλει τη μεταγραφή δρώντας στον υποκινητή p105 ενώ στο στέλεχος HPV16 μέσω του υποκινητή p97, οι οποίοι ρυθμίζουν την έκφραση των E6 και E7 πρωτεϊνών. Η καταστολή των υποκινητών αυτών αποκαθιστά τις φυσιολογικές λειτουργίες των p53 και pRb πρωτεϊνών, όπως και άλλους στόχους των E6 και E7 (Εικ.11).

Πειράματα επανεισαγωγής της E2 πρωτεΐνης σε συνδυασμό είτε με την E6, είτε με την E7, υπό τον έλεγχο ενός ανεξάρτητου από την E2 πρωτεΐνη-υποκινητή, έχουν χρησιμοποιηθεί προκειμένου να διευκρινιστούν περισσότερο οι λειτουργίες των E6 και E7 πρωτεϊνών στα κύτταρα που έχουν μετασχηματιστεί από τον HPV ιό (Goodwin EC. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000, Goodwin EC. *et al. J. Virol.* 1998, Horner SM. *et al. J. Virol.* 2004, Hwang ES. *et al. J. Virol.* 1993).

Η καταστολή της E7 πρωτεΐνης από μόνη της ενεργοποιεί το μονοπάτι της Rb πρωτεΐνης, όχι όμως και της p53 και προκαλεί τη γήρανση του κυττάρου. Από την άλλη πλευρά, η καταστολή της E6 από μόνη της, είναι ικανή να ενεργοποιήσει το μονοπάτι του p53 και να προκαλέσει τη γήρανση και την απόπτωση του κυττάρου (DeFilippis RA. *et al. J. Virol.* 2003).



**Εικ. 11.** Η E2 επηρεάζει την απόπτωση και τη γήρανση των κυττάρων μέσω πολλαπλών μονοπατιών. Η E2 καταστέλλει τη γονιδιακή έκφραση του HPV ιού και ως εκ τούτου ρυθμίζει έμμεσα την απόπτωση και τη γήρανση των κυττάρων μέσω των επιπέδων έκφρασης των E6 και E7 πρωτεϊνών. Η E2 μπορεί επίσης και επιδρά άμεσα στις E6, E7 και p53 πρωτεΐνες. **\*The regulation of cell proliferation by the papillomavirus early proteins. Cellular and Molecular life Sciences. Review. 2009. 66; 1700-17.**

Η απόπτωση εμφανίζεται ως αρχική συνέπεια της έκφρασης της E2 πρωτεΐνης, που παρατηρείται μέσα σε λίγες ώρες ή ημέρες και δείχνει ότι τα κύτταρα που επιβιώνουν στο αρχικό στάδιο αυτής της διαδικασίας, εξακολουθούν να εμφανίζουν καταστολή της ανάπτυξης και γήρανση. Οι E2 πρωτεΐνες των υψηλού κινδύνου στελεχών HPV έχουν μεγάλη ικανότητα να προκαλέσουν απόπτωση, γεγονός που οδηγεί στην ιδέα ότι αυτές οι πρωτεΐνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην θεραπεία του καρκίνου (Green KL. *et al. Hum. Gene. Ther.* 2007, Green KL. *et al. BioDrugs* 2006). Αντίθετα, μελέτη για τις E2

πρωτεΐνες στελεχών χαμηλού κινδύνου, όπως είναι τα στελέχη HPV6 και HPV11 έδειξε ότι δεν προκαλούν απόπτωση (*Parish JL. et al. Virol. 2006*).

Οι E2 πρωτεΐνες προκαλούν απόπτωση μέσω πολλαπλών οδών. Συγκεκριμένα, στο υψηλού κινδύνου στέλεχος HPV18, η απόπτωση εξαιτίας της E2 πρωτεΐνης παρατηρείται απουσία της Bax πρωτεΐνης, που είναι ένα από τα γονίδια-στόχους της p53 πρωτεΐνης που μπορεί να προκαλέσει απόπτωση. Συνεπώς, η δράση της στην προκειμένη περίπτωση επιτυγχάνεται μέσω ενός μονοπατιού ανεξάρτητου της p53 πρωτεΐνης. Σε συμφωνία με το συμπέρασμα αυτό, η E2 πρωτεΐνη μπορεί και προκαλεί απόπτωση στα κύτταρα που δεν εκφράζουν p53, τουλάχιστον όταν η έκφραση της είναι σε υψηλά επίπεδα. Η απόπτωση που προκαλείται ανεξάρτητα της οδού της p53 πρωτεΐνης, περιλαμβάνει την ενεργοποίηση της κασπάσης 8, ενεργοποιώντας έτσι την εξωγενή οδό του μηχανισμού της απόπτωσης.

Οι E2 πρωτεΐνες των στελεχών υψηλού κινδύνου ενεργοποιούν την κασπάση 8 και αποτελούν από μόνες τους, το υπόστρωμα αυτής της πρωτεάσης. Ωστόσο, οι ίδιες E2 πρωτεΐνες μπορούν και προκαλούν απόπτωση με τη βοήθεια μηχανισμών που εξαρτώνται από την p53 πρωτεΐνη. Ο Webster και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι όταν τα επίπεδα έκφρασης των E2 πρωτεϊνών του στελέχους HPV16 είναι χαμηλά, δεν προκαλούν απόπτωση στα κύτταρα Saos 2, τα οποία δεν εκφράζουν την p53 πρωτεΐνη, εκτός και αν οι πρωτεΐνες E2 και p53 συνεκφράζονται (*Webster K. et al. J. Biol. Chem. 2000*).

Επιπλέον, μεταλλάξεις στην E2 πρωτεΐνη παρεμποδίζουν την αλληλεπίδρασή της στην περιοχή πρόσδεσης στο DNA (E2 DNA Binding Domain, DBD) και της p53, προκαλώντας την αναστολή της απόπτωσης μέσω της E2 στα κύτταρα αυτά. Μια επιπλέον απόδειξη, ότι η απόπτωση εξαιτίας της E2, μέσω οδού εξαρτώμενης της p53 πρωτεΐνης, προκύπτει από το γεγονός ότι σε ορισμένα πειράματα, η πρόκληση της απόπτωσης από την E2 πρωτεΐνη μπορεί να μπλοκαριστεί από την υπερέκφραση της πρωτεΐνης E6 του ιού HPV16. Η κατάσταση αυτή γίνεται πιο σύνθετη, καθώς η p53 πρωτεΐνη προκαλεί απόπτωση τόσο με εξαρτώμενους όσο και με μη-εξαρτώμενους από τη μεταγραφή οδούς (*Hamid A. et al. Cell. Mol. Life. Sci. 2009*).

Ο μηχανισμός με τον οποίο η E2 πρωτεΐνη επιφέρει μείωση των επιπέδων της p53 πρωτεΐνης δεν είναι γνωστός. Ωστόσο, υποστηρίζεται ότι οι E2 πρωτεΐνες επιδρούν άμεσα στα επίπεδα έκφρασης της p53 πρωτεΐνης αλλά και έμμεσα μέσω ρύθμισης της έκφρασης της E6 πρωτεΐνης.

### **3.2.5. Ο ρόλος της E2 πρωτεΐνης στη λοίμωξη από τον HPV ιό και στην ογκογένεση.**

Η κατασταλτική δράση της E2 πρωτεΐνης στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων που έχουν μετασχηματιστεί από τον HPV ιό, υποδηλώνει ότι η E2 πιθανά επηρεάζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό κατά τη διάρκεια του κύκλου ζωής του ιού. Καθώς τα κύτταρα που έχουν προσβληθεί από τον ιό ανέρχονται μέσω του επιθηλίου, υφίστανται τελική διαφοροποίηση, μια διαδικασία που έχει πολλά κοινά χαρακτηριστικά με την απόπτωση. Πιθανά η E2 πρωτεΐνη εμπλέκεται στην καθυστέρηση της τελικής διαφοροποίησης, στα αρχικά στάδια της λοίμωξης και/ ή προκαλεί τελική διαφοροποίηση στα τελικά στάδια της λοίμωξης. Ακόμη, είναι πιθανό στα αρχικά στάδια της λοίμωξης να προκαλέσει πραγματική απόπτωση (*Roulston A. et al. Annu. Rev. Microbiol. 1999*).

Το γεγονός αυτό μπορεί να διευκολύνει την μετάδοση του HPV γονιδιώματος μεταξύ των γειτονικών κυττάρων, με τη βοήθεια της φαγοκυττάρωσης αποπτωτικών σωματιδίων που περιέχουν το DNA του ιού. Ωστόσο, δεν υπάρχει απόδειξη που να τεκμηριώνει ότι υπάρχει σημαντική απόπτωση σε αλλοιώσεις που έχουν προκληθεί από τον HPV ιό. Επομένως, φαίνεται ότι η E2 πρωτεΐνη, ανεξάρτητα από το αν προκαλεί απόπτωση ή

αναστολή της ανάπτυξης, δρά σε συνδυασμό με τις E6 και E7 πρωτεΐνες και πιθανότατα και με άλλες πρωτεΐνες, διευκολύνοντας τον κύκλο ζωής του ιού (*Nair P. et al. Pathol. Oncol. Res. 1999*).

Η E2 μπορεί και επιδρά στην επιβίωση των κυττάρων που έχουν προσβληθεί από τον HPV ιό με δύο τουλάχιστον μηχανισμούς: έμμεσα, με ρύθμιση της έκφρασης των E6 και E7 πρωτεϊνών, ή άμεσα με την προσκόλλησή της στις ιϊκές και κυτταρικές πρωτεΐνες ή σε αλληλουχίες DNA του προσβεβλημένου κυττάρου. Η E2 πρωτεΐνη δρα άμεσα ή έμμεσα στα κύτταρα που έχουν μολυνθεί από τον HPV ιό, αλλά μπορεί και να απουσιάζει (*Hamid A. et al. Cell. Mol. Life. Sci. 2009*).

Όπως έχει προαναφερθεί, μικρός αριθμός πειραμάτων έχει αποδώσει το ρόλο της E2 πρωτεΐνης στον έλεγχο της μεταγραφής των E6 και E7 πρωτεϊνών, κατά τη διάρκεια της λοίμωξης από τον ιό. Οι αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης της E2 πρωτεΐνης, ο αριθμός των αντιγράφων του HPV γονιδιώματος και οι αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης και στις λειτουργίες των E6 και E7 πρωτεϊνών, αποτελούν παράγοντες που επηρεάζουν τον τρόπο με τον οποίο η E2 πρωτεΐνη ελέγχει την μεταγραφή των E6 και E7 πρωτεϊνών και επιδρούν στον πολλαπλασιασμό του κυττάρου. Πολλές φορές λόγω των χαμηλών επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών ή λόγω της έλλειψης αντισωμάτων, δεν έχουμε μια ξεκάθαρη εικόνα για τον τρόπο με τον οποίο τα σχετικά επίπεδα των πρωτεϊνών αυτών μεταβάλλονται κατά τη διάρκεια της λοίμωξης. Τα επίπεδα της E2 πρωτεΐνης παρουσιάζουν αύξηση καθώς τα κύτταρα, που έχουν μολυνθεί από τον ιό, μετακινούνται προς την επιφάνεια του επιθηλίου. Επίσης, φαίνεται ότι και τα επίπεδα των E6 και E7 πρωτεϊνών παρουσιάζουν αύξηση. Όμως, μέχρι τώρα δεν έχει γίνει λεπτομερής σύγκριση ανάμεσα στα επίπεδα των πρωτεϊνών και του DNA του ιού (*Maitland NJ. et al. J. Pathol. 1998*).

Η σύνδεση των E6-E2 πρωτεϊνών γίνεται με τη βοήθεια της E2 περιοχής πρόσδεσης στο DNA (E2 DNA Binding Domain, DBD). Η σύνδεση αυτή εμποδίζει την αποδόμηση των πρωτεϊνών PDZ (ακρωνύμιο που συνδυάζει τα αρχικά γράμματα τριών πρωτεϊνών, PSD95, Dlg1 και Zo-1, που πρωτοανακαλύφθηκε ότι μοιράζονται την ίδια περιοχή) από την E6 και έχει μικρή επίδραση στην αποικοδόμηση της p53 πρωτεΐνης. Αυτό επιτρέπει στα κύτταρα που έχουν προσβληθεί από τον HPV ιό να διαφύγουν την καταστολή της αντιγραφής – αναπαραγωγής του ιού από την p53 πρωτεΐνη. Επιπλέον η σύνδεση των E6-E2 πρωτεϊνών αλλάζει την εντόπιση της E2 πρωτεΐνης, προκαλώντας την άθροισή της σε στίγματα στον πυρήνα και αυξάνει τη μεταγραφική της ικανότητα. Τα ευρήματα αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η έλλειψη της E2 πρωτεΐνης έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της δραστηριότητας της E6 πρωτεΐνης, γεγονός που φαίνεται να ευνοεί την κακοήγη εξαλλαγή. Ωστόσο, το αποτέλεσμα αυτής της αλληλεπίδρασης στη δράση της LCR ρυθμιστικής περιοχής δεν έχει ακόμη καταγραφεί (*Grm HS. et al. Oncogene. 2005*).

Η προσκόλληση της E2 στην E7 πρωτεΐνη αυξάνει τη σταθερότητα της τελευταίας αλλά αναστέλλει το δυναμικό μετασχηματισμού της. Επομένως, η έλλειψη της E2 μπορεί να έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της μεταγραφής της E7 πρωτεΐνης (*Gammoh N. et al. J. Virol. 2006*).

Μέχρι σήμερα δεν είναι γνωστό εάν η αλληλεπίδραση μεταξύ των E2 και E7 πρωτεϊνών αλλάζει την ικανότητα της E2 πρωτεΐνης να ρυθμίζει τη δράση της LCR ρυθμιστικής περιοχής. Επιπλέον, δεν έχει διευκρινιστεί, εάν οι E6 και E7 πρωτεΐνες προσκολλώνται ταυτόχρονα στην E2 πρωτεΐνη, ή οι αλληλεπιδράσεις αυτές διαχωρίζουν την E2 πρωτεΐνη σε δύο πληθυσμούς. Θα έχει ενδιαφέρον να διευκρινιστεί εάν οι E6, E7 πρωτεΐνες των στελεχών χαμηλού κινδύνου του HPV ιού ενώνονται με την E2 πρωτεΐνη των ιών αυτών. Ενδεχομένως αυτό να συμβαίνει, αλλά η έλλειψη των αλληλεπιδράσεων τους δεν προκαλεί το μετασχηματισμό των κυττάρων, λόγω της μειωμένης μεταγραφικής ενεργότητας των πρωτεϊνών αυτών. Είναι επομένως ολοφάνερο πως η επανεισαγωγή της E2 στα κύτταρα

που έχουν προσβληθεί από τον ιό HPV, θα επαναφέρει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των E2-E6 και E2-E7 (Hamid A. et al. Cell. Mol. Life. Sci. 2009).

Τα επίπεδα της p53 πρωτεΐνης μειώνονται στα κύτταρα που εκφράζεται η E6 πρωτεΐνη. Ωστόσο, η E2 πρωτεΐνη επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, εξαιτίας της αλληλεπίδρασής της με την E6 πρωτεΐνη. Στο στελέχος HPV31, απουσία της E6, η E2 πρωτεΐνη μπορεί να απορυθμίσει τα επίπεδα της p53 πρωτεΐνης και να προκαλέσει απόπτωση. Έχει διαπιστωθεί ότι και η E2 πρωτεΐνη του στελέχους HPV16 μπορεί να προκαλέσει απόπτωση, όταν παρατηρείται έλλειψη της E6 και άλλων πρωτεϊνών του ιού, μέσω της οδού της p53 πρωτεΐνης. Αναλόγως, η E2 πρωτεΐνη θα μπορούσε να επηρεάσει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό με τη βοήθεια και άλλων πρωτεϊνών του κυττάρου (Webster K. et al. J. Biol. Chem. 2000).

Η ανίχνευση της ενσωματωμένης μορφής του ιού στο κύτταρο προσδίδει σ' αυτό το πλεονέκτημα της ρύθμισης των επιπέδων έκφρασης των E6 και E7 πρωτεϊνών. Στα στελέχη υψηλού κινδύνου, η αύξηση της αστάθειας του γονιδιώματος προκαλείται από την πρόσδεση των E2 πρωτεϊνών στις πρωτεΐνες καντχερίνη 1 (cadherin 1, Cdh1) και Cdc20 (cell-division cycle protein 20) και μπορεί να οδηγήσει στην ενσωμάτωση του γονιδιώματος. Ωστόσο, η ενσωματωμένη και επισωματική μορφή του ιού, είναι πιθανό να συνυπάρχουν για μεγάλα χρονικά διαστήματα κατά τη διάρκεια λοίμωξης από στελέχη υψηλού κινδύνου του ιού των ανθρωπίνων θηλωμάτων. Η συνεχής έκφραση της E2 πρωτεΐνης από την επισωματική μορφή γονιδιώματος του HPV ιού μπορεί να συμβάλλει στην εμφάνιση κυττάρων με αποκλειστικά την ενσωματωμένη μορφή του γονιδιώματος του HPV ιού (Hamid A. et al. Cell. Mol. Life. Sci. 2009).

Το ανοσοποιητικό σύστημα μπορεί να παίξει ρόλο στο στάδιο αυτό, καθώς η E2 πρωτεΐνη συμβάλλει στη δράση του ανοσοποιητικού συστήματος και τα κύτταρα που την εκφράζουν μπορεί να αποτελέσουν στόχο για ανοσολογική απάντηση (Bontkes HJ. et al. J. Gen. Virol. 1999) και (Davidson EJ. et al. Int. J. Cancer. 2001).

Τελικά, αν και η έκταση με την οποία η E2 πρωτεΐνη ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων του κυττάρου είναι υπό συζήτηση, πιθανά ρυθμίζει την έκφραση πρωτεϊνών που κατέχουν ρόλο «κλειδί» στον κυτταρικό κύκλο. Πειράματα σε διαγονιδιακά ποντίκια έδειξαν ότι η έκφραση της E2 πρωτεΐνης του στελέχους HPV8, απουσία άλλων πρωτεϊνών, μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία όγκων στο δέρμα (Pfefferle R. et al. J. Invest. Dermatol. 2008). Ο μηχανισμός με τον οποίο η E2 πρωτεΐνη δρα ως ογκογονίδιο δεν είναι γνωστός. Ωστόσο, έχει καταγραφεί ότι άλλες E2 πρωτεΐνες καταστέλλουν τη δράση του υποκινητή της τελομεράσης hTERT, αν και θα περίμενε κανείς να εμποδίσουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων (Lee CJ. et al. Exp. Cell. Res. 2002).

### 3.3. Η E4 πρωτεΐνη.

Η E4 θεωρείται πρώιμη πρωτεΐνη, ωστόσο, βρίσκεται αποκλειστικά στις διαφοροποιημένες στιβάδες του επιθηλίου που έχουν μολυνθεί από τον ιό (zur Hausen H. Biochimica et Biophysica Acta. 1996). Η έκφρασή της παρατηρείται σε καλώς διαφοροποιημένα κύτταρα που εκφράζουν τα γονίδια των πρωτεϊνών του καψιδίου και συνθέτουν νέα ιϊκά σωματίδια μαζί με το περίβλημά τους. Ωστόσο, δε βρίσκεται στα σωματίδια του ιού μαζί με το περίβλημά τους. Ο ρόλος της συγκεκριμένης πρωτεΐνης στον κυτταρικό κύκλο του ιού δεν έχει καθοριστεί πλήρως. Η E4 πρωτεΐνη δεν είναι απαραίτητη για το μετασχηματισμό ή την επισωματική μορφή του DNA του ιού, αλλά αλληλεπιδρά με τα δίκτυα κερατίνης και προκαλεί την διάσπασή τους (Doorbar J. et al. Nature. 1991).

Σε προηγούμενες μελέτες βρέθηκε ότι η έκφραση των E1 και E4 πρωτεϊνών των στελεχών 16 και 18 του HPV ιού, στα επιθηλιακά κύτταρα που πολλαπλασιάζονται σε μονοστιβάδα καλλιέργειας, οδηγεί σε διακοπή του G2 σταδίου του κυτταρικού κύκλου με παρόμοια ευρήματα να καταγράφονται και για τις πρωτεΐνες E1, E4 του στελέχους HPV1 (Davy CE. *et al. J. Virol.* 2005, Nakahara T. *et al. J. Virol.* 2002, Davy CE. *et al. J. Virol.* 2002, Knight JL. *et al. J. Virol.* 2004 και Knight JL. *et al. J. Virol.* 2006).

Για τα στελέχη υψηλού κινδύνου του ιού των ανθρωπίνων θηλωμάτων, η δράση των E1, E4 πρωτεϊνών στη αναστολή του G2 σταδίου μπορεί να αναμένεται να αναστείλει το λόγο E6/E7 που χρειάζεται για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων στις μεσαίες στιβάδες του επιθηλίου, συμβάλλοντας στην έναρξη της ενίσχυσης του ιϊκού γονιδιώματος. Το γεγονός ότι μεταλλαγμένα γονιδιώματα του στελέχους 16 του HPV ιού, εκφράζοντας μια μορφή ατελούς αναστολής της E4 πρωτεΐνης δείχνουν χαμηλότερα επίπεδα ενίσχυσης του γονιδιώματος σε ειδικές *in vitro* καλλιέργειες, ενισχύει την υπόθεση. Για το στέλεχος 18 του HPV ιού η συνεισφορά της E4 πρωτεΐνης στην αναστολή της G2 φάσης φαίνεται να είναι λιγότερο σημαντική, γεγονός που αντανάκλα διαφορές στην έκταση του πολλαπλασιασμού των παραβασικών κυττάρων (Doorbar J. *Virology.* 2013).

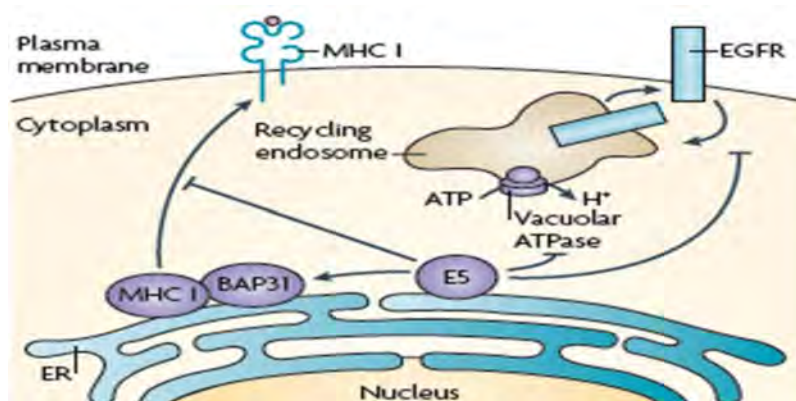
Η E4 πρωτεΐνη αλληλεπιδρώντας με τις κυτταρικές κινάσες συμβάλλει στην ενίσχυση του ιϊκού γονιδιώματος. Οι κινάσες που τροποποιούν τη λειτουργία των E1 και E4 πρωτεϊνών του στελέχους 16 είναι ίδιες με εκείνες που ρυθμίζουν τη συγκέντρωση της E1 πρωτεΐνης στον πυρήνα (McIntosh PB. *et al. J. Cell. Sci.* 2010, Wang Q. *et al. J. Virol.* 2009). Πιθανά η ικανότητα της E4 πρωτεΐνης να διαχωρίζει κάποια μέλη των οικογενειών MAP (Mitogen- activated protein) και κυκλινο- εξαρτώμενων κινάσων οδηγεί σε λειτουργικό μετασχηματισμό των ποικίλων ιϊκών και κυτταρικών γονιδιακών προϊόντων μεταξύ των οποίων και η E1 πρωτεΐνη (Davy CE. *et al. J. Virol.* 2002, Davy CE. *et al. J. Virol.* 2005, Nakahara T. *et al. J. Virol.* 2002).

Διαφορές στην περιοχή της κινάσης και στην ευαισθησία ως προς τη φωσφορυλίωση, που είναι εμφανείς στις E1 και E4 πρωτεΐνες του στελέχους 18 του HPV ιού, αντανάκλουν λεπτές διαφορές στον επιθηλιακό τροπισμό του συγκεκριμένου στελέχους και των σχετιζόμενων στελεχών (Knight GL. *et al. Virology.* 2011, Ding Q. *et al. Mol. Cell. Biochem.* 2013).

Ο ρόλος της E4 πρωτεΐνης στην απελευθέρωση του ιού υποστηρίζεται από τη σχέση της πρωτεΐνης με τον κερατινοποιημένο κυτταρικό φάκελο (CCE), μια ισχυρά ανθεκτική περιοχή κάτω από την κυτταροπλασματική μεμβράνη των κερατινοκυττάρων της κερατίνης στιβάδας. Επιπλέον, η E4 πρωτεΐνη ενδέχεται να παίζει ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων και έχει αποδειχτεί ότι προκαλεί αναστολή του σταδίου G2 του κυτταρικού κύκλου σε διάφορα είδη κυττάρων (Longworth MS. *et al. Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 2004).

### 3.4. Η E5 πρωτεΐνη.

Αν και οι E6 και E7 πρωτεΐνες συντηρούν τις αρχικές ενέργειες μεταγραφής των στελεχών υψηλού κινδύνου του HPV ιού, η E5 πρωτεΐνη επαυξάνει τη λειτουργία τους και συμβάλλει στην ανάπτυξη του καρκίνου (Εικ. 12).

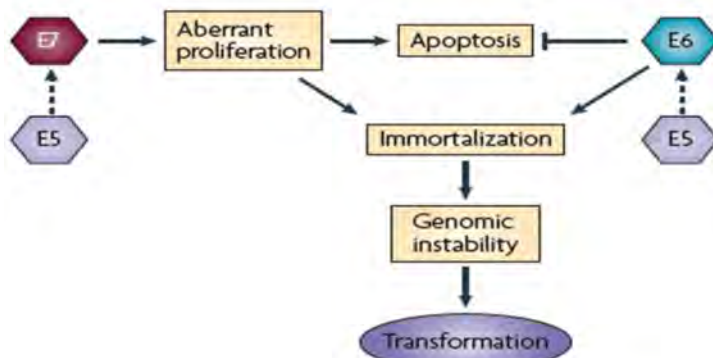


**Εικ. 12.** Η δράση της E5 πρωτεΐνης στα κυτταρικά μονοπάτια. **Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation.** *Nature Reviews Cancer.* Review. 2010. 10; 550-60.

Οι E5 πρωτεΐνες των στελεχών υψηλού κινδύνου είναι μικρά, υδρόφοβα πεπτιδία 83 αμινοξέων περίπου σε μέγεθος που αρχικά εδράζονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Όταν η E5 πρωτεΐνη εκφραστεί μόνη της έχει μικρή μεταγραφική ενεργότητα, σε αντίθεση με την πανομοιότυπη της στα βοοειδή BPV1E5, η οποία παρουσιάζει ισχυρή μεταγραφική δράση (Petti. L. et al. *EMBO. J.* 1991).

Προηγούμενες μελέτες με διαγονιδιακά ποντίκια έδειξαν ότι υψηλά επίπεδα έκφρασης της E5 πρωτεΐνης του στελέχους HPV16 στο δέρμα, αυξάνουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του επιθηλίου, οδηγώντας σε αυτόματο σχηματισμό όγκων (Maufort JP. et al. *Cancer. Res.* 2007). Σε ποντίκια στα οποία γινόταν θεραπεία με οιστρογόνα, αποδείχτηκε ότι η E5 πρωτεΐνη μπορεί και προκαλεί καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, υποστηρίζοντας την ογκογόνο δράση του συγκεκριμένου γονιδίου (Maufort JP. et al. *Cancer Res.* 2010).

Σε πολλές περιπτώσεις, σε κύτταρα του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας λόγω του στελέχους HPV16, ο ιός συνυπάρχει σε επισωματική και ενσωματωμένη μορφή. Πιθανά υπάρχουν πολλά μονοπάτια, μέσω των οποίων ο ιός προκαλεί καρκινογένεση. Ένα από αυτά οφείλεται στα υψηλά επίπεδα έκφρασης των E6 και E7 πρωτεϊνών και οδηγεί στην ενσωμάτωση του ιού στο κύτταρο ξενιστή και στην επακόλουθη αδρανοποίηση της E2 πρωτεΐνης. Ένα άλλο μονοπάτι παρατηρείται σε κύτταρα στα οποία ο ιός εξακολουθεί να βρίσκεται σε επισωματική μορφή. Στα κύτταρα αυτά, η έκφραση των E1 και E2 πρωτεϊνών προκαλεί αστάθεια του γονιδιώματος, μέσω διαταραχής στη διαδικασία αντιγραφής του HPV ιού, όταν αυτός βρίσκεται σε ενσωματωμένη μορφή. Επιπλέον, η έκφραση της E5 πρωτεΐνης επαυξάνει τη δραστηριότητα των E6 και E7 πρωτεϊνών, καταλήγοντας έτσι στην ανάπτυξη του καρκίνου (Εικ. 13).



**Εικ. 13.** Μοριακοί μηχανισμοί μέσω των οποίων οι ογκοπρωτεΐνες του ιού των θηλωμάτων του ανθρώπου συνεργάζονται για να προκαλέσουν καρκινογένεση στον τράχηλο της μήτρας. **Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation.** *Nature Reviews Cancer.* Review. 2010. 10; 550-60.



Η εντόπιση της E5 πρωτεΐνης στο ενδοπλασματικό δίκτυο υποδηλώνει ότι η δράση της, μπορεί να συνδέεται με την κυκλοφορία των πρωτεϊνών της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, μέσω αυτού του κυτταρικού διαμερίσματος. Το γεγονός αυτό, συμφωνεί με την αναγνώριση του υποδοχέα των κυττάρων Β, που σχετίζεται με την πρωτεΐνη 31 (BAP31), ενός ρυθμιστή της μεταφοράς των πρωτεϊνών της μεμβράνης που συνδέεται με την E5 πρωτεΐνη (Regan JA. *et al. J. Virol.* 2008).

Επίσης, έχει αναφερθεί ότι η E5 πρωτεΐνη μεταβάλλει τη δραστηριότητα του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR). Η πρόσδεση στην ΑΤΡάση των κενοτοπίων, μεταβάλλει το ενδοσωμικό ΡΗ, γεγονός που καταλήγει στην επίδρασή της στον EGF υποδοχέα. Άλλες λειτουργίες που αποδίδονται στην E5 πρωτεΐνη είναι η ελάττωση της επιφανειακής στάθμης του συμπλέγματος μεγίστης ιστοσυμβατότητας των πρωτεϊνών τάξης Ι (Major Histocompatibility Complex, MHC), η διαμόρφωση του MAPK μονοπατιού και η αλλαγή των επιπέδων της καβεολίνης 1. Συνεπώς, ο ρόλος της E5 στη δημιουργία του καρκίνου, διεγείρει την περιέργεια και αποτελεί αντικείμενο συνεχούς μελέτης (Suprynawicz FA. *et al. Oncogene.* 2008).

### **3.5. Ο ρόλος των E6 και E7 πρωτεϊνών στην εξάπλωση του HPV ιού στις κατώτερες στιβάδες του επιθηλίου.**

Ο ακριβής ρόλος των E6 και E7 πρωτεϊνών, στα κύτταρα που έχουν προσβληθεί από τον HPV ιό είναι αβέβαιος, ειδικότερα για χαμηλού κινδύνου στελέχη (HPV6, HPV11), που δε σχετίζονται με την εμφάνιση νεοπλασίας και τα οποία οδηγούν τελικά στη δημιουργία αλλοιώσεων, λόγω της λοίμωξης των αρχέγονων κυττάρων της βασικής στιβάδας στην περιοχή τραυματισμού ή μικροτραυματισμού της (Doorbar J. *et al. Vaccine.* 2012).

Σ' αυτά τα στελέχη του HPV ιού, ο ρόλος της απόκρισης στον τραυματισμό έναντι της καθοδήγησης του αρχικού πολλαπλασιασμού του κυττάρου ή των κυττάρων που έχουν προσβληθεί από τον ιό μπορεί να αποβεί κρίσιμος, λόγω της επίδρασης σήματος από το τοπικό μικροπεριβάλλον στην έκφραση του γεννητικού υλικού του ιού και στις λειτουργίες των πρωτεϊνών (Valencia C. *et al. J. Invest. Dermatol.* 2008, Rosenberg S. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010).

Στην περίπτωση στελεχών υψηλού κινδύνου του ιού (high-risk types), οι E6 και E7 πρωτεΐνες έχουν ξεκάθαρο ρόλο στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων της βασικής και της παραβασικής στιβάδας σε σημεία του τραχήλου της μήτρας όπου μπορεί να δημιουργηθεί νεοπλασία (Doorbar J. *Clin. Sci.[LOND].* 2006).

Υπάρχουν λειτουργικές διαφορές των E6 και E7 πρωτεϊνών ανάμεσα στα στελέχη υψηλού και χαμηλού κινδύνου του ιού (Εικ.14). Προσθέτοντας και τις διαφορές στην ενεργότητα του υποκινητή και στους τρόπους έκφρασης των γονιδίων, συντελούν στην ανάπτυξη διαφόρων παθολογικών καταστάσεων που σχετίζονται με τον ιό HPV και παρατηρούνται *in vivo* (Klingelhutz AJ. *et al. Virology.* 2012).

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η απορρύθμιση της έκφρασης του λόγου E6/E7, ακόμη και σε περίπτωση μη ενσωμάτωσης του γονιδιώματος, αποτελεί σημαντικό γεγονός για τον καθορισμό του βαθμού κακοήθειας (Isaacson Wechsler E. *et al. J. Virol.* 2012). Ο βαθμός κακοήθειας ταξινομείται σύμφωνα με το βαθμό που τα κύτταρα προχωρούν στις ανώτερες στιβάδες του επιθηλίου (Jenkins D. *Dis. Markers.* 2007).

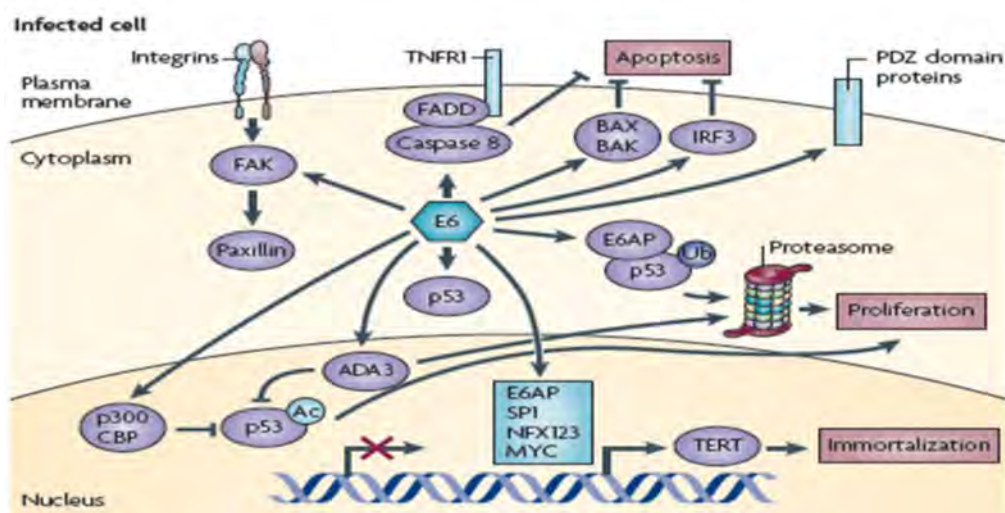
	High-Risk Alpha	Low-Risk Alpha
<b>E6</b>	encodes E6* products	no E6* products
	binding and degradation of... •p53 •specific PDZ-domain proteins (e.g. Dlg, MAGI-1, Scribble)	weaker binding (no degradation) of... •p53 •no binding of PDZ-domain proteins
	interact with the E6AP ubiquitin ligase inhibition of p53 transactivation and acetylation	
	inhibition of apoptosis	unknown
	bypass of growth arrest following DNA damage	normal growth arrest following DNA damage
	inhibition of keratinocyte differentiation	unknown
	inhibition of interferon response	weaker inhibition of interferon response
	activation of signaling pathways... •Akt •Wnt •Notch •mTORC1	unknown
	telomerase activation	no activation
	c-myc activation	no activation
<b>E7</b>	binding and degradation of... •pRb •p107 •p130	weaker binding (no degradation) of... •pRb •p107 •E2F1
	binding (no degradation) of... •E2F1 •Cullin2 •HDAC	binding of... •p130
	binding of regulatory proteins including E2F6, p600, HAT, PP2A induction of cell cycle entry and DNA synthesis role in genome amplification	
	induction of genome instability	no stimulation of instability
	suppression of STAT-1 function	no suppression
	immortalization and transformation functions	no such functions
	activation of signaling pathways... •Akt	unknown

**Εικ. 14.** Λειτουργίες των πρωτεϊνών και πρότυπα γονιδιακής έκφρασης των στελεχών υψηλού και χαμηλού κινδύνου του HPV ιού. Σημαντικές διαφορές των πρωτεϊνών E6/E7 μεταξύ των στελεχών υψηλού και χαμηλού κινδύνου του HPV ιού στη ρύθμιση και στα πρότυπα ματίσματος του mRNA. Οι διαφορές αυτές επηρεάζουν την έκφραση των E6 και E7γονιδίων. **\*The biology and life-cycle of human papillomaviruses. Vaccine. Review. 2012. 30S; 55-70.**

### 3.5.1. Η E6 πρωτεΐνη.

Η E6 πρωτεΐνη έχει μέγεθος 160 αμινοξέα περίπου και περιέχει δύο μοτίβα πρόσδεσης ψευδαργύρου. Οι E6 πρωτεΐνες των στελεχών υψηλού κινδύνου του HPV ιού, εντοπίζονται στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα, ενώ εκείνες των στελεχών χαμηλού κινδύνου βρίσκονται κυρίως στο κυτταρόπλασμα, εξαιτίας της απουσίας δύο εντοπισμένων πυρηνικών σημάτων (NLS-nuclear localization signals), που δεν βρίσκονται στα δικά τους αντίγραφα (Tao M. et al. J. Virol. 2003).

Η πιο κατανοητή λειτουργία της E6 πρωτεΐνης στα στελέχη υψηλού κινδύνου, είναι η ικανότητά της να προκαλέσει την «αποικοδόμηση» της p53 πρωτεΐνης. Αυτό επιτυγχάνεται με διάφορους μηχανισμούς, που χρησιμοποιεί η συγκεκριμένη πρωτεΐνη των στελεχών αυτών, προκειμένου να παρέμβει στις λειτουργίες της p53 πρωτεΐνης (Εικ.15).



**Εικ. 15.** Κυτταρικές πρωτεΐνες και σηματοδοτικά μονοπάτια που επηρεάζονται από την E6 ογκοπρωτεΐνη του ιού των ανθρωπίνων θηλωμάτων.

Οι E6 πρωτεΐνες των στελεχών υψηλού κινδύνου αναστέλλουν την εξαρτώμενη, από την p53 πρωτεΐνη, διακοπή της κυτταρικής ανάπτυξης και την απόπτωση, μέσω πολλαπλών μηχανισμών, με αποτέλεσμα την ενίσχυση της γενομικής αστάθειας και τη συσσώρευση μεταλλάξεων στο κύτταρο. Ο σχηματισμός ενός τριμερούς συμπλέγματος E6–E6-συνδεόμενης πρωτεΐνης (E6AP)–p53 οδηγεί στην αποικοδόμηση της p53 πρωτεΐνης. Η αλληλεπίδραση της E6 πρωτεΐνης με τις ακετυλοτρανσφεράσες ιστόνης, p300, CREB συνδεόμενη πρωτεΐνη (CBP) και ADA3 προλαμβάνει την ακετυλίωση (Ac) της p53 πρωτεΐνης, αναστέλλοντας την μεταγραφή των εμπλεκόμενων γονιδίων.

Η E6 πρωτεΐνη αναστέλλει επίσης την αποπτωτική σηματοδότηση ανταποκρινόμενη σε κατασταλτικές κυτοκίνες. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω αλληλεπίδρασης με τον α-υποδοχέα του παράγοντα νέκρωσης του όγκου (Tumour Necrosis Factor-α Receptor, TNFR1), της FAS-συνδεόμενης πρωτεΐνης (FAS-associated protein with death domain (FADD) και της κασπάσης 8, σε συνδυασμό με την αποικοδόμηση των προαποπτωτικών BAX και BAK πρωτεϊνών.

Η αλληλεπίδραση της E6 πρωτεΐνης με μεταγραφικούς παράγοντες όπως οι SP1, MYC, παράγοντας πυρηνικής μεταγραφής (Nuclear Transcription Factor), X-συνδεόμενη πρωτεΐνη 123 (X box-binding protein-123, NFY123) και E6AP ενεργοποιεί την αντίστροφη μεταγραφάση της τελομεράσης (Telomerase Reverse Transcriptase, TERT) και την τελομεράση, προλαμβάνοντας τη βράχυνση των τελομεριδίων.

Η αποδόμηση των PDZ πρωτεϊνών από την E6 πρωτεΐνη οδηγεί σε απώλεια της κυτταρικής πολικότητας και προκαλεί υπερπλασία. Η αλληλεπίδραση της E6 πρωτεΐνης με την πρωτεΐνη παξιλλίνη (paxillin) και την πρωτεΐνη της εξωκυττάριας ουσίας φιβουλίνη (fibulin) προλαμβάνει την απόπτωση και επιτρέπει την κυτταρική ανάπτυξη χωρίς να χρειάζεται προσκόλληση στην εξωκυττάρια ουσία. Η E6 πρωτεΐνη αναστέλλει την απόκριση της ιντερφερόνης (IFN) μέσω της αλληλεπίδρασης με το ρυθμιστικό παράγοντα 3 της ιντερφερόνης (IRF3) και μέσω αναστολής της δράσης της p53 πρωτεΐνης. **Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. Nature Reviews. Cancer. Review. 2010. 10; 550-60.**

Οι E6 πρωτεΐνες συγκρατούν την κυτταρική E3 λιγάση της ουμπικουιτίνης που σχετίζεται με την E6 πρωτεΐνη (E6AP), ένα πρωτότυπο μέλος της ομάδας HECT (ομόλογη της ομάδας τελικής καρβοξυλίωσης E6AP), σε ένα τριμερές σύμπλεγμα με την p53 πρωτεΐνη, που οδηγεί στη διαδικασία ουμπικουιτυλίωσης (ubiquitylation) και στην πρωτεοσωμική «αποικοδόμηση» της p53 πρωτεΐνης. Επιπρόσθετα, οι E6 πρωτεΐνες ενώνονται απευθείας με την p53 πρωτεΐνη και μπλοκάρουν τη μεταγραφή, παρεμβαίνοντας στην διαδικασία προσκόλλησης του DNA. Οι E6 πρωτεΐνες των στελεχών χαμηλού κινδύνου του HPV ιού σχετίζονται με την E6AP, αλλά δεν προκαλούν την «αποικοδόμηση»

της p53 πρωτεΐνης, γεγονός που υποδηλώνει ότι άλλοι κυτταρικοί παράγοντες είναι οι στόχοι για το σύμπλεγμα E6-E6AP πρωτεϊνών των στελεχών χαμηλού κινδύνου (Brimer N. *et al. Virology*. 2007, Li X. *et al. J. Virol.* 1996).

Η «αποικοδόμηση» της p53 πρωτεΐνης από το E6-E6AP σύμπλεγμα μειώνει τα επίπεδά της, αλλά η ποσότητα που παραμένει ενεργοποιείται αντιδρώντας στην καταστροφή του DNA και άλλων παραγόντων που προκαλούν συνθήκες “στρες” στο κύτταρο. Επιπλέον, η E6 πρωτεΐνη παρεμβαίνει στη λειτουργία της p53 πρωτεΐνης, συνδεόμενη με τις δύο σχετιζόμενες ακετυλοτρανσφεράσες των ιστονών p300 και CREB-συνδεόμενη πρωτεΐνη (CREB-Binding Protein, CBP), εμποδίζοντας την ικανότητα των παραγόντων αυτών να τροποποιήσουν την p53 πρωτεΐνη και να αυξήσουν τη σταθερότητά της. Παράλληλα, η E6 πρωτεΐνη συνδέεται με την ακετυλοτρανσφεράση των ιστονών ADA3, η οποία με τον ίδιο τρόπο επιδρά στη λειτουργία της p53 πρωτεΐνης (Kumar A. *et al. Mol. Cell. Biol.* 2002). Αξίζει να σημειωθεί, ότι η E6 πρωτεΐνη απενεργοποιεί την ADA3 σε αντίθεση με τις p300 και CBP, δημιουργώντας έτσι τον στόχο για την «αποικοδόμηση». Οι E6 πρωτεΐνες των στελεχών χαμηλού κινδύνου του HPV ιού αναστέλλουν τη μεταγραφική ενεργότητα της p53 πρωτεΐνης μέσω άμεσης πρόσδεσης, γεγονός που μπορεί να αποτελέσει τον επικρατέστερο μηχανισμό, με τον οποίο τα στελέχη αυτά εμποδίζουν την ανάπτυξη κατασταλτικών παραγόντων που προσβάλλουν την p53 πρωτεΐνη (Lechner MS. *et al. J. Virol.* 1994, Crook T. *et al. Oncogene*. 1994).

Ο βασικός λόγος για τον οποίο οι E6 πρωτεΐνες των στελεχών υψηλού κινδύνου του HPV ιού, εμποδίζουν την λειτουργία της p53 πρωτεΐνης, είναι η διευκόλυνση της παραγωγής αντιγράφων του ιού, γεγονός που επιδρά στην ανάπτυξη όγκων. Καθώς η λοίμωξη από τον ιό παραμένει για μεγάλο χρονικό διάστημα, η αδρανοποίηση της λειτουργίας της p53 πρωτεΐνης, επιτρέπει την συσσώρευση γενετικών μεταλλάξεων, που σε φυσιολογικές συνθήκες θα είχαν διορθωθεί. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η E6 πρωτεΐνη δεν ενώνεται και δεν προάγει την «αποικοδόμηση» των ομολόγων της p53 πρωτεΐνης, p73 και p63, υποδηλώνοντας ότι η αδρανοποίηση των πρωτεϊνών αυτών δεν είναι απαραίτητη για την μεταγραφή (Marin MC. *et al. Mol. Cell. Biol.* 1998).

Οι μεταλλαγμένες E6 πρωτεΐνες παρόλο που έχουν μειωμένο ρόλο στην «αποικοδόμηση» της p53 πρωτεΐνης, εξακολουθούν να αθανατοποιούν τα κύτταρα, υποδηλώνοντας ότι οι αλληλεπιδράσεις και με άλλους κυτταρικούς παράγοντες είναι αναγκαίες για την ανάπτυξη του καρκίνου. Ανάμεσα στους στόχους που είναι ανεξάρτητοι της p53 πρωτεΐνης, ανήκουν οι PDZ πρωτεΐνες, οι οποίες σχετίζονται μόνο με τις E6 πρωτεΐνες των στελεχών υψηλού κινδύνου του HPV ιού (Thomas M. *et al. Oncogene*. 2008). Μετάλλαξη στην περιοχή πρόσδεσης των PDZ πρωτεϊνών με την E6 πρωτεΐνη οδηγεί στη μείωση του ρυθμού ανάπτυξης, στην έλλειψη της επισωματικής μορφής του ιού και στη συχνή ενσωμάτωση του γονιδιώματος του ιού στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει η διαπίστωση ότι σε διαγονιδιακά ποντίκια που κωδικοποιούν E6 πρωτεΐνες, οι οποίες παρουσιάζουν προβλήματα στην πρόσδεση τους με τις PDZ πρωτεΐνες, δεν αναπτύσσεται υπερπλασία ή καρκίνος (Nguyen ML. *et al. J. Virol.* 2003).

Σε μελέτες υπερέκφρασης παρατήρησαν ότι η E6 πρωτεΐνη έχει την ικανότητα να συνδέεται με μια σειρά από άλλους παράγοντες που συμβάλλουν στη μεταγραφή. Ανάμεσα σε αυτούς, ανήκουν η πρωτεΐνη E6BP γνωστή και ως ρετικουλοκαλβίνη (reticulocalbin), η πρωτεΐνη E6TP1 (E6 στοχεύουσα πρωτεΐνη 1, γνωστή και ως SIPA1-like protein 1), η πρωτεΐνη ενεργοποίησης της GTPάσης και ο παράγοντας MCM7, που συμβάλει στην ρύθμιση της αντιγραφής (Howie H. *et al. Virology*. 2009).

Μια από τις λειτουργίες των E6 πρωτεϊνών των στελεχών HPV υψηλού κινδύνου, που συμβάλλει στη διατήρηση των προσβεβλημένων κυττάρων στη ζωή, είναι η ικανότητά τους να ενεργοποιούν την έκφραση της καταλυτικής υποομάδας της τελομεράσης, hTERT. Η

δράση της τελομεράσης ανιχνεύεται στα εμβρυϊκά κύτταρα και είναι απύσχα στα σωματικά κύτταρα. Καθώς τα φυσιολογικά κύτταρα διαιρούνται, οι περιοχές των τελομερών γίνονται βραχύτερες σε κάθε κύκλο διαίρεσης, οδηγώντας σε χρωμοσωμική αστάθεια και γήρανση (*Campisi J. et al. Exp. Gerontol. 2001*). Ωστόσο, έχει αποδειχτεί ότι οι πρωτεΐνες των στελεχών υψηλού κινδύνου διατηρούν τα τελομερή. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η υπερέκφραση της καταλυτικής υποομάδας της τελομεράσης hTERT, σε συνδυασμό με την E7, είναι αρκετή για να αθανатоποιήσουν τα ανθρώπινα κερατινοκύτταρα. Η πρωτεΐνη E2 καταστέλλει την ενεργότητα της hTERT. Ωστόσο, η αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών E6 - E2 κατά τη διάρκεια της ρύθμισης της καταλυτικής υποομάδας της τελομεράσης δεν είναι ξεκάθαρη (*Kiyono T. et al. Nature. 1998, Lee D. et al. J. Biol. Chem. 2002*).

### 3.5.2. Η E7 πρωτεΐνη.

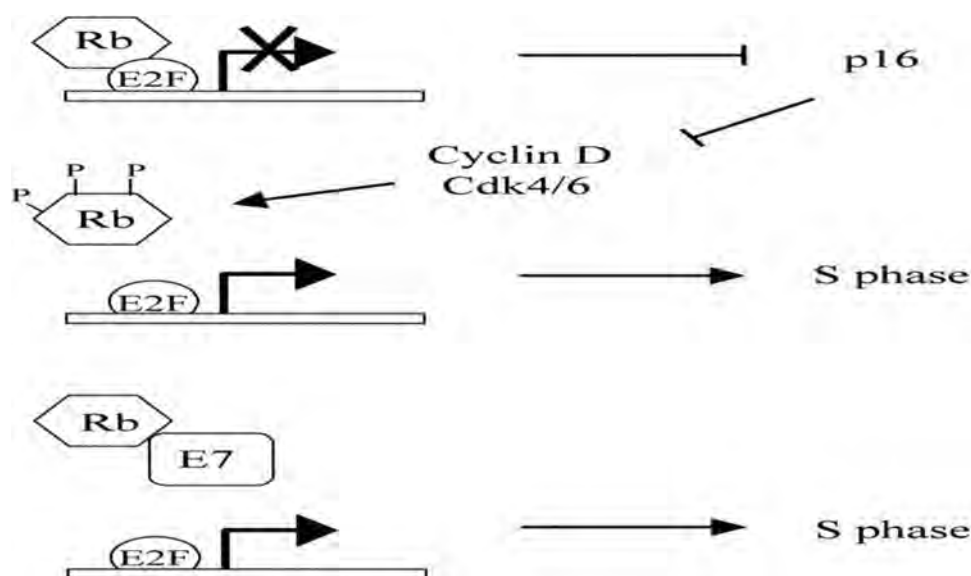
Η πρωτεΐνη E7 είναι μεγέθους περίπου 100 αμινοξέων και περιέχει τρεις διατηρημένες περιοχές: τις CR1, CR2 και CR3. Σε αντίθεση με τις E7 πρωτεΐνες των στελεχών χαμηλού κινδύνου, οι E7 πρωτεΐνες των υψηλού κινδύνου στελεχών συμβάλλουν στην αθανатоποίηση των κυττάρων και προκαλούν το μετασχηματισμό αυτών. Η περιοχή CR2 περιέχει ένα LXCXE μοτίβο, το οποίο συμβάλλει στη σύνδεση των E7 πρωτεϊνών με μέλη της ομάδας πρωτεϊνών με δομή "θήκης" όπως οι πρωτεΐνες pRb, p107 και p130. Η pRb παίζει σημαντικό ρόλο στην αντιγραφή και στη διατήρηση του DNA, στην αποφυγή της απόπτωσης, στη διαφοροποίηση και στη γήρανση των κυττάρων (*Barbosa MS. et al. EMBO. J. 1990, Dyson N. et al. J. Virol. 1992, Halbert CL. et al. J. Virol. 1991, Dyson N. et al. Science. 1989*).

Οι πρωτεΐνες E7 των στελεχών του HPV ιού ενώνονται με την Rb πρωτεΐνη με διαφορετική συγγένεια. Η σύνδεση των E7 πρωτεϊνών υψηλού κινδύνου είναι 10 φορές ισχυρότερη από εκείνη των E7 πρωτεϊνών των στελεχών χαμηλού κινδύνου. Το γεγονός αυτό προκύπτει λόγω ενός διαφορετικού αμινοξέος στην E7 πρωτεΐνη, η οποία καθορίζει την ικανότητά της να συνεργάζεται με το ενεργό ογκογονίδιο *ras*, στα κύτταρα που μετασχηματίζονται. Στην υποφωσφορυλιωμένη μορφή, η Rb πρωτεΐνη ελέγχει τη μετάβαση στη G1/ S φάση του κυτταρικού κύκλου με την πρόσδεσή της στην οικογένεια των E2F μεταγραφικών παραγόντων που έχει ως αποτέλεσμα την καταστολή της μεταγραφής των γονιδίων στόχων που ενεργοποιούνται από τους E2F μεταγραφικούς παράγοντες.

Στα φυσιολογικά κύτταρα, η Rb πρωτεΐνη είναι σε υποφωσφορυλιωμένη μορφή στην αρχική G1 φάση και η φωσφορυλίωσή της αρχίζει να αυξάνεται με τη δράση των D/CDK4/6 συμπλεγμάτων της κυκλίνης στη φάση S του κυτταρικού κύκλου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση των E2F μεταγραφικών παραγόντων που ενεργοποιούν τη μεταγραφή συγκεκριμένων γονιδίων εξασφαλίζοντας τη μετάβαση στη φάση S του κυτταρικού κύκλου. Ωστόσο, οι E7 πρωτεΐνες των στελεχών υψηλού κινδύνου μπορούν και «αγνοούν» τον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου με την πρόσδεση τους στην Rb πρωτεΐνη και την απελευθέρωση των E2F μεταγραφικών παραγόντων (*Dyson N. et al. Science. 1989*). Επιπλέον, προκαλούν την «αποικοδόμηση» της Rb πρωτεΐνης μέσω μιας εξαρτώμενης από τα πρωτεοσωμάτια οδού, σε αντίθεση με τις πρωτεΐνες E7 των στελεχών χαμηλού κινδύνου, που δεν στοχεύουν στην «αποικοδόμηση».

Η αδρανοποίηση της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος (pRb) παίζει σημαντικό ρόλο στη δημιουργία του καρκίνου (*Boyer SN. et al. Cancer. Res. 1996, Giarre M. et al. J. Virol. 2001*). Μια από τις κύριες λειτουργίες της Rb πρωτεΐνης είναι να καταστέλλει τη μεταγραφή του εξαρτώμενου από την κυκλίνη, αναστολέα της κίνησης p16. Ο αναστολέας p16 μπορεί

κάτω από φυσιολογικές συνθήκες να εμποδίσει τη φωσφορυλίωση της pRb πρωτεΐνης μέσω του συμπλέγματος της κυκλίνης D/κινάσης CDK4, προκαλώντας με τον τρόπο αυτό το σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου. Η πρόσδεση των E7 πρωτεϊνών των στελεχών υψηλού κινδύνου προσδένονται στην pRb πρωτεΐνη. Η δέσμευσή τους οδηγεί στην απελευθέρωση του E2F μεταγραφικού παράγοντα επιτρέποντας τη μεταγραφή συγκεκριμένων γονιδίων και την είσοδο του κυττάρου στην επόμενη φάση του κυτταρικού κύκλου (Hamid A. et al. *Cell. Mol. Life. Sci.* 2009)(Εικ. 16).



**Εικ. 16.** Η στόχευση της Rb από την E7. Η Rb πρωτεΐνη ελέγχει τη δράση του E2F μεταγραφικού παράγοντα και ρυθμίζει την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου. Η πρόσδεση της E7 στην Rb απελευθερώνει τον E2F και οδηγεί τον κυτταρικό κύκλο σε απορρύθμιση. **\*The regulation of cell proliferation by the papillomavirus early proteins. Cellular and Molecular life Sciences. Review. 2009. 66; 1700-17.**

Οι πρωτεΐνες p107 και p130, με δομή “θήκης”, στοχεύουν τους E2F μεταγραφικούς παράγοντες. Συγκεκριμένα, η p107 πρωτεΐνη σχετίζεται με την E2F4 πρωτεΐνη και η p130 πρωτεΐνη σχετίζεται με τις E2F4 και E2F5 πρωτεΐνες αντίστοιχα. Εμπλέκονται στον έλεγχο πρόσθετων σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου. Η p130 είναι ενεργή κατά τη διάρκεια της μετάβασης από τη φάση G0 στη G1, ενώ η p107 είναι ενεργή στη μετάβαση από τη φάση G1 στη φάση S και στη φάση G2 (Cobrinik D. *Oncogene*. 2005, Dimova DK. et al. *Oncogene*. 2005).

Οι E7 πρωτεΐνες των στελεχών του HPV ιού ενώνονται με την p130 στοχεύοντας στην «αποικοδόμησή» της. Η απορρύθμιση της p130 πρωτεΐνης είναι αναγκαία για την ολοκλήρωση του κύκλου ζωής του ιού, καθώς τα κύτταρα που έχουν προσβληθεί από αυτόν μετακινούνται προς τις ανώτερες στιβάδες του επιθηλίου (Zhang B. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006). Η αποικοδόμηση της p107 πρωτεΐνης επιτυγχάνεται με τις E7 πρωτεΐνες των στελεχών υψηλού κινδύνου, γεγονός που υποδεικνύει ότι η αδρανοποίηση της p107 πρωτεΐνης δεν είναι απαραίτητη για την ολοκλήρωση του κύκλου ζωής του ιού. (Banerjee NS. et al. *J. Virol.* 2006).

Αξίζει να σημειωθεί ότι η πρωτεΐνη E7 μπορεί να διαταράξει τον τρόπο με τον οποίο ελέγχει το φυσιολογικό κυτταρικό κύκλο, ανεξάρτητα από τις επιδράσεις της στις πρωτεΐνες με δομή “θήκης”. Οι E7 πρωτεΐνες των στελεχών υψηλού και χαμηλού κινδύνου αναστέλλουν τη γήρανση του κυττάρου, που προκαλείται από την πρωτεΐνη της

προμυελοκυτταρικής λευχαιμίας (PML). Η γήρανση των κυττάρων περιορίζει το δυναμικό αντιγραφής τους και πρέπει να υπερσχύσει κατά τη διάρκεια της ογκογένεσης. Η E7 πρωτεΐνη ενώνεται με την PML πρωτεΐνη και εμποδίζει την ικανότητα της πρωτεΐνης αυτής να προκαλέσει γήρανση. Μεταλλάξεις που εμποδίζουν την πρόσδεση της E7 με την pRb πρωτεΐνη, οδηγούν σε μειωμένη δράση αυτής και αδυναμία να εμποδίσει την PML πρωτεΐνη να προκαλέσει γήρανση (*Bischof O. et al. Mol. Cell. Biol. 2005*).

Επιπλέον, οι E7 πρωτεΐνες των στελεχών υψηλού κινδύνου ενώνονται με τον E2F-1 μεταγραφικό παράγοντα και ενεργοποιούν την εξαρτώμενη από τον E2F-1 μεταγραφή. Η συγγένεια πρόσδεσης της E7 στον E2F-1 παράγοντα φαίνεται να συνδέεται με το δυναμικό ογκογένεσης του ιού. Έχει αναφερθεί ότι οι E7 πρωτεΐνες των στελεχών υψηλού κινδύνου του HPV ιού παρουσιάζουν μεγαλύτερη συγγένεια πρόσδεσης σε σχέση με τα στελέχη χαμηλού κινδύνου. Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι η πρωτεΐνη E7 προσδένεται με τα συμπλέγματα της κυκλίνης-κινάσης και με τους αναστολείς της κινάσης που εξαρτώνται από την κυκλίνη. Η E7 ενώνεται άμεσα με την κυκλίνη A/cdk2, και αλληλεπιδρά έμμεσα με το σύμπλεγμα της κυκλίνης E/cdk2, με τη βοήθεια της p107 πρωτεΐνης (*Tommasino M. et al. Oncogene. 1993, McIntyre MC. et al. Virology. 1996*).

Η E7 πρωτεΐνη μπορεί και προσδένεται στην p21 και εμποδίζει τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου που επάγεται από αυτή. Παράλληλα εμποδίζει την αναστολή του πολλαπλασιασμού των πυρηνικών αντιγόνων (PCNA), που εξαρτώνται από τη δράση του συμπλέγματος κυκλίνης E/cdk2, καθώς επίσης και από την άμεση αναστολή της λειτουργίας του E2F μεταγραφικού παράγοντα (*Funk JO. et al. Genes Dev. 1997*).

Οι E7 πρωτεΐνες των στελεχών του HPV ιού σχετίζονται με το μετασχηματισμό της χρωματίνης. Έχοντας ως στόχο το μετασχηματισμό του συμπλέγματος αποακετυλάσης της ιστόνης της χρωματίνης, οι πρωτεΐνες E7 μπορούν να μεταβάλλουν τη δομή της χρωματίνης των γονιδίων επηρεάζοντας την έκφραση τους. Οι αποακετυλάσες της ιστόνης (HDAC) εκφράζονται σε όλους τους ιστούς και με τη δράση τους αφαιρούν τις ακετυλομάδες από το πλούσιο σε λυσίνη αμινοτελικό άκρο των ιστονών. Οι E7 πρωτεΐνες των στελεχών υψηλού κινδύνου ενώνονται με την HDAC-1 έμμεσα, μέσω του Mi2β. Το τελευταίο αποτελεί συστατικό νουκλεοσωματίου, που μετασχηματίζει το σύμπλεγμα αποακετυλίωσης. Οι E7 πρωτεΐνες που έχουν υποστεί μετάλλαξη, αποτυγχάνουν να προσκολληθούν στο Mi2β, αλλά προσδένονται φυσιολογικά με την Rb πρωτεΐνη. Ωστόσο, αποτυγχάνουν να υπερνικήσουν τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου (*Brehm A. et al. EMBO.J. 1999*).

Η E7 προσδένεται και σταθεροποιεί την p53 πρωτεΐνη και προκαλεί απόπτωση. Στη στοχευμένη Rb, η E7 πρωτεΐνη προκαλεί απορύθμιση της δράσης του E2F και ο E2F-1 μεταγραφικός παράγοντας μπορεί και προκαλεί απόπτωση παρουσία της p53 πρωτεΐνης. Ο E2F-1 παράγοντας ενεργοποιεί την έκφραση της p19ARF, η οποία αναστέλλει την Mdm2 και σταθεροποιεί την p53. Ωστόσο, η απόπτωση που προκαλείται από την E7 πρωτεΐνη, μπορεί να παρατηρηθεί και σε κυτταρικές σειρές που δεν εκφράζουν τον p19ARF παράγοντα, υποδηλώνοντας την εμπλοκή και άλλων μονοπατιών (*Seavey SE. et al. J. Virol. 1999*).

### 3.5.3. Η αλληλεπίδραση των E6 και E7 πρωτεϊνών.

Στην πλειοψηφία των καρκινικών κυττάρων του τραχήλου της μήτρας, οι πρωτεΐνες E6 και E7 εκφράζονται συνεχώς, διαδικασία απαραίτητη για τη μεταγραφή. Πριν την ενσωμάτωση του ιού, οι δύο αυτές πρωτεΐνες φαίνεται να συνεργάζονται, προκειμένου να υπερσχύσουν στον έλεγχο του φυσιολογικού κυτταρικού κύκλου. Η έκφραση των E6 και E7

πρωτεϊνών από τα στελέχη υψηλού κινδύνου είναι αυτή που επιφέρει την αθανатоποίηση των κυττάρων (Munger K. et al. J. Virol. 1989, Hawley-Nelson P. et al. EMBO J. 1989, Sedman S. et al. J. Virol. 1991).

Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι οι πρωτεΐνες E6 και E7 του στελέχους HPV16 συνεργάζονται προκειμένου να αθανатоποιήσουν τα ανθρώπινα κερατινοκύτταρα και τα επιθηλιακά κύτταρα. Η E6 πρωτεΐνη, μόνη της, δεν είναι ικανή να προκαλέσει αθανатоποίηση των κερατινοκυττάρων. Οι E6 και E7 πρωτεΐνες των στελεχών χαμηλού κινδύνου του ιού δεν αθανатоποιούν τα κύτταρα, ωστόσο, οι πρωτεΐνες E6 των στελεχών χαμηλού κινδύνου και οι E7 πρωτεΐνες των στελεχών υψηλού κινδύνου του ιού HPV ή οι πρωτεΐνες E6 των στελεχών υψηλού κινδύνου και οι πρωτεΐνες E7 των στελεχών χαμηλού κινδύνου συνεργάζονται προκειμένου να επιφέρουν την αθανатоποίηση των κυττάρων (Halbert CL. et al. J. Virol. 1992). Πειράματα με διαγονιδιακά ποντίκια έδειξαν ότι τόσο η έκφραση των E6 πρωτεϊνών των στελεχών υψηλού κινδύνου του ιού, όσο και η έκφραση των E7 πρωτεϊνών των στελεχών υψηλού κινδύνου του ιού, είναι ικανές να προκαλέσουν υπερπλασία και ογκογένεση (Hawley-Nelson P. et al. EMBO J. 1989, Sedman S. et al. J. Virol. 1991, Halbert CL. et al. J. Virol. 1992).

Η E7 πρωτεΐνη προκαλεί πολλούς και κυρίως καλοήθεις και διαφοροποιημένους όγκους, ενώ η E6 πρωτεΐνη οδηγεί στη δημιουργία αρκετών όγκων, οι οποίοι είναι στην πλειοψηφία τους κακοήθεις. Η διαπίστωση αυτή, αποδεικνύει ότι η E6 πρωτεΐνη ενισχύει την ανάπτυξη των όγκων. Έρευνες σε ποντίκια έδειξαν ότι οι κακοήθεις όγκοι αναπτύσσονται σε εκείνα που εκφράζουν και τις δυο πρωτεΐνες (Song S. et al. J. Virol. 1999, Song S. et al. Virology. 2000). Οι E6 και E7 πρωτεΐνες των στελεχών υψηλού κινδύνου του ιού, συνεργάζονται μεταξύ τους για να δημιουργήσουν πλήθος ανώμαλων κεντροσωματίων, διαταραχή στον σχηματισμό του ατρακτοειδή πόλου της μίτωσης και γενομική αστάθεια (Duensing S. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000, Duensing S. et al. Prog. Cell Cycle. Res. 2003).

### 3.6. Το γονίδιο της πρωτεΐνης L1.

Το γονίδιο που κωδικοποιεί την L1 πρωτεΐνη μεταφράζεται από RNA μόρια των οποίων η μεταγραφή πιστεύεται ότι ξεκινά από την κοινή ρυθμιστική περιοχή (URR). Για να φτάσει στην όψιμη περιοχή του γονιδιώματος, η μηχανή μεταγραφής πρέπει να περάσει από περιοχές πρώιμων γονιδίων, ενώ αποτυγχάνει να συμμετάσχει στην πρώιμη πολυαδενυλίωση που οδηγεί σε τερματισμό των mRNA των πρώιμων γονιδίων (Buck CB. et al. Virology. 2013). Τα αγγελιοφόρα μόρια RNA (mRNAs) που μεταγράφουν την γενετική πληροφορία του γονιδίου της L1 πρωτεΐνης, προκύπτουν από περιοχές ματίσματος στις οποίες απομακρύνονται οι αλληλουχίες των πρώιμων γονιδίων που υπάρχουν στο πρόωρο mRNA (Wang X. et al. J. Virol. 2011). Δεν υπάρχουν γνωστά παραδείγματα γεγονότων ματίσματος που συμβαίνουν στο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (Open Reading Frame, ORF) της L1.

Το κωδικόνιο ATG, από το οποίο θεωρητικά ξεκινά η μετάφραση της L1 πρωτεΐνης, βρίσκεται μόνιμα στο 3' άκρο της περιοχής του ματίσματος του δέκτη (consensus splice acceptor site), υποδηλώνοντας ότι το κωδικόνιο έναρξης για τη μετάφραση της L1 πρωτεΐνης βρίσκεται πάντα αμέσως μετά από ένα εσώνιο (Buck CB. et al. Virology. 2013).



### 3.6.1. Η L1 πρωτεΐνη.

Η L1 πρωτεΐνη αποτελεί την κύρια πρωτεΐνη της κάψας του ιού. Σχηματίζεται από πέντε μονομερείς ομάδες μεγέθους 55 kDa, οι οποίες ενώνονται για να σχηματίσουν μια πενταμερή δομή που αποτελείται από 72 οζώδεις σχηματισμούς (Εικ. 17).



**Εικ. 17.** Η πενταμερής δομή της μείζονος δομικής πρωτεΐνης L1 του στελέχους HPV -11.\*[rcsb.org](https://rcsb.org)

Τα άμινο- και καρβοξυ-τελικά άκρα διατάσσονται ως εκτεταμένοι, διαπερνώντας βραχίονες δημιουργώντας το έδαφος ανάμεσα στους οζώδεις σχηματισμούς του καψομεριδίου.

Το καρβοξυτελικό άκρο της L1 πρωτεΐνης είναι περίπλοκο. Κάθε καρβοξυτελικό άκρο του διαπερνόντος βραχίονα περιβάλλει την επιφάνεια του διαπερατού καψομεριδίου που μοιάζει με κανάλι (canyon facing surface) σε ένα σημείο κοντά στην εξωτερική κορυφή του οζώδους σχηματισμού. Σ' αυτό το υψηλότερο σημείο της κορυφής σχηματίζεται ένας έσω δισουλφιδικός δεσμός ανάμεσα στα γειτονικά καψομερίδια (*Buck CB. et al. Virology. 2013*).

Στο στέλεχος 16 του HPV ιού, ο έσω δισουλφιδικός δεσμός του καψομεριδίου δημιουργείται ανάμεσα στην κυστεΐνη της θέσης 175 της L1 του διαπερατού καψομεριδίου και την κυστεΐνη της θέσης 428 του διαπερνόντος καρβοξυτελικού άκρου της L1 πρωτεΐνης. Ομόλογα και των δύο αυτών κυστεϊνών διατηρούνται στις L1 πρωτεΐνες όλων των γνωστών ιών των θηλωμάτων (*Modis Y. et al. EMBO. J. 2002*).

Η πτυχή του κέντρου της L1 πρωτεΐνης, που σχηματίζει τον όζο του καψομεριδίου, είναι ένας β- ζελατινώδης κύλινδρος οχτώ αλυσίδων, δομή κοινή στις εικοσαεδρικές καψιδικές πρωτεΐνες και άλλων ιών, συμπεριλαμβανομένης της κύριας καψιδικής πρωτεΐνης VP1 των ιών πολιομυελίτιδας και μιας μεγάλης ποικιλίας άλλων ιικών οικογενειών (*Chen XS. et al. Mol. Cell 2000, Stehle T. et al. Structure. 1996*).

Μοναδικό κοινό χαρακτηριστικό των ιών των θηλωμάτων και των ιών της πολιομυελίτιδας είναι ότι το ιϊκό DNA πακετάρεται μαζί με ένα πλήρες σύμπλεγμα ιστονών που προέρχονται από το κύτταρο. Ωστόσο παραμένει άγνωστο αν η L1 πρωτεΐνη ή η καψιδική πρωτεΐνη VP1 των ιών της πολιομυελίτιδας αντιδρά με τις ιστόνες (*Buck CB. et al. Virology. 2013*).

Η ανώτερη επιφάνεια του καψομεριδικού όζου αποτελείται από θηλώδεις δομές. Τα περισσότερα από τα μονοκλωνικά αντισώματα ουδετεροποιούν τη μολυσματικότητα των ειδών των ιών των θηλωμάτων, προσδένοντας μία ή περισσότερες επιφανειακές θηλές (*Christensen ND. et al. Virology. 2001, Ryding J. et al. J. Gen. Virol. 2007*). Οι επιφανειακές θηλές είναι φτωχά συντηρημένες ακόμη και μεταξύ στενά σχετιζόμενων ειδών του ιού των θηλωμάτων. Η συσσώρευση μεταλλάξεων στους ιούς των θηλωμάτων φαίνεται να είναι

αποτέλεσμα επιλεκτικής πίεσης, ώστε να εμποδίζουν την πρόσδεση αντισωμάτων εξουδετέρωσης που αναπτύσσονται κατά τις αρχικές λοιμώξεις. Η ιδέα υποστηρίζεται από την παρατήρηση ότι οι απαντήσεις πολυκλωνικού αντισώματος αυξάνουν έναντι των L1 σωματιδίων του ιού (VLPs – virus like particles) από στελέχη του HPV ιού, που εξουδετερώνουν τους πιο στενά σχετιζόμενους τύπους του ιού HPV με δραματικά χαμηλότερους τίτλους αλλά όχι τους λιγότερο συγγενικούς τύπους του ιού (*Culp TD. et al. Virology. 2007, Kemp T.J. et al. Vaccine. 2012, Orozco J.J. et al. J. Virol. 2005*).

### 3.6.2. Οι αλληλεπιδράσεις της L1 με τη δευτερεύουσα καψιδική πρωτεΐνη L2.

Το καψίδιο του ιού των θηλωμάτων μπορεί να φιλοξενεί μέχρι 72 μόρια της δευτερεύουσας καψιδικής πρωτεΐνης L2. Αν και η συγκεκριμένη πρωτεΐνη εκτίθεται ελάχιστα στην επιφάνεια του ώριμου σωματιδίου του ιού, αναδύεται από αυτό κατά την έναρξη της λοίμωξης (*Day PM. et al. J. Virol. 2008a*). Η L2 πρωτεΐνη εκτίθεται, τουλάχιστον παροδικά, στα ανώριμα σωματίδια του ιού (*Richards RM. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2006*).

Προηγούμενες μελέτες, για το στέλεχος 16 του HPV ιού, έδειξαν ότι υπάρχουν συντηρημένες αλυσίδες στις πλευρές του καψιδικού αυλού. Τα αμινοξικά κατάλοιπα της L1 πρωτεΐνης στις θέσεις 113-130 (β-φύλλο D) και 247-269 (β-φύλλο F) πιθανά συμμετέχουν στην πρόσδεση της L2 πρωτεΐνης (*Lowe J. et al. J. Virol. 2008*). Το σημείο ή τα σημεία, μέσω των οποίων αναδύεται η L2 πρωτεΐνη από το κέλυφος της L1 κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης και της έναρξης της λοίμωξης παραμένουν άγνωστα.

### 3.6.3. Ο ρόλος της L1 στην έναρξη της λοίμωξης.

Η αρχική αλληλεπίδραση του καψιδίου του ιού των θηλωμάτων με τον ξενιστή είναι αποτέλεσμα αλληλεπιδράσεων της L1 πρωτεΐνης με τους υδρογονάνθρακες της θειϊκής ηπαρίνης που εκθέτουν πρωτεογλυκάνες. Αυτό υποστηρίζεται κατά την αναστολή της πρόσδεσης του ιϊκού σωματιδίου και την έναρξη της λοίμωξης από τη διαλυτή ηπαρίνη ή από την ενζυμική απομάκρυνση της θειϊκής ηπαρίνης με ηπαρινάση *in vivo* και *in vitro*, σε καλλιέργειες κυτταρικών σειρών (*Giroglou T. et al. J. Virol. 2001, Johnson KM. et al. J. Virol. 2009, Joyce JG. et al. J. Biol. Chem. 1999*).

*In vivo*, η αλληλεπίδραση της πρωτεογλυκάνης της θειϊκής ηπαρίνης παρατηρείται στην εξωκυττάρια βασική μεμβράνη, ενώ σε *in vitro* πειράματα η αλληλεπίδραση συμβαίνει κυρίως στην κυτταρική επιφάνεια και σε μικρότερο βαθμό στο εξωκυττάριο υλικό (*Selinka HC. et al. J. Virol. 2007*).

Για το στέλεχος 31 του HPV ιού υπάρχουν αντίθετες αναφορές σχετικά με την εξάρτηση της λοίμωξης από την πρωτεογλυκάνη της θειϊκής ηπαρίνης σε *in vitro* πειράματα. Ωστόσο, μελέτες *in vivo* έδειξαν απόλυτη εξάρτηση από την πρόσδεση της συγκεκριμένης πρωτεογλυκάνης (*Johnson KM. et al. J. Virol. 2009*).

Η αλληλεπίδραση του καψιδίου με την πρωτεογλυκάνη της θειϊκής ηπαρίνης οδηγεί σε έκθεση του αμινοτελικού άκρου της δευτερεύουσας καψιδικής πρωτεΐνης L2. Η έκθεση αυτή επιτρέπει την αποκοπή της L2 πρωτεΐνης από την φουρινική πρωτεάση (*Richards RM. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2006*).

*In vivo*, η αποκοπή συμβαίνει στη βασική μεμβράνη, που βρίσκεται κάτω από τα κερατινοκύτταρα (*Kines RC. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2009*). Προκαλείται μια πρόσθετη αλλαγή στη διαμόρφωση του μορίου, που επιτρέπει στο ιϊκό σωματίδιο να

προσδεθεί σε ένα δευτερογενή υποδοχέα στην επιφάνεια του κερατινοκυττάρου. Ο δευτερογενής υποδοχέας των κερατινοκυττάρων δεν έχει προσδιοριστεί. Η αββ4 ιντεγκρίνη θεωρείται υποψήφιος υποδοχέας του HPV ιού (Abban CY. *et al. Virology*. 2010). Η έντονη έκφραση της ιντεγκρίνης στα βασικά κερατινοκύτταρα και η σχέση της με την πρωτεογλυκάνη της θεϊκής ηπαρίνης την καθιστά υποψήφια. Ωστόσο, το γεγονός ότι αββ4 αρνητικές κυτταρικές σειρές μπορούν να μολυνθούν δηλώνει ότι η έκφρασή της δεν είναι υποχρεωτική για τη λοίμωξη (Shafiti – Keramat S. *et al. J. Virol*. 2003).

Πρόσφατη μελέτη εμπλέκει την αννεξίνη A2 ως πιθανό δευτερογενή υποδοχέα, μέσω της αλληλεπίδρασής της με την L2 πρωτεΐνη (Woodham AW. *et al. PloS One*. 2012). Ωστόσο, έχουν βρεθεί κυτταρικές σειρές που αν και δεν εκφράζουν την αννεξίνη A2 μπορούν να μολυνθούν (Puisieux A. *et al. Biochem. J*. 1996, Raff AB *et al. J. Virol*. 2013).

Οι μηχανισμοί ενδοκυττάρωσης του ιού των θηλωμάτων δεν έχουν επιλυθεί πλήρως για τα διάφορα στελέχη του HPV ιού. Οι περισσότερες μελέτες έχουν επικεντρωθεί στην είσοδο του στελέχους HPV16. Τα μέχρι τώρα αποτελέσματα είναι αντικρουόμενα και πρόσφατη εργασία από τον Schelhaas και τους συνεργάτες του υποδηλώνει ένα μηχανισμό ενδοκυττάρωσης εξαρτώμενο από ακτίνη και ανεξάρτητο από τις οδούς κλαθρίνης και καβεολίνης, που μοιάζει πολύ στην μακροπινοκύτωση (Schelhaas M. *et al. PLoS Pathog*. 2012).

Τα σωματίδια των L1 και L1/L2 πρωτεϊνών εμφανίζουν αρχικά παρόμοιο τρόπο κυκλοφορίας, περνώντας μέσω των πρώιμων ενδοσωματίων στα όψιμα ενδοσωμάτια (Day PM. *et al. Virology*. 2003, Kämpfer, N. *et al. J. Virol*. 2006). Το χαμηλό pH σε συνδυασμό με τα συστατικά των όψιμων ενδοσωματίων είναι αναγκαία για την έκθεση του ιικού DNA. Ωστόσο, δεν είναι ξεκάθαρο αν πρόκειται για άμεση επίδραση στην L1 πρωτεΐνη ή για έμμεση επίδραση στους κυτταρικούς παράγοντες (Buck C.B. *et al. Virology* 2013).

Μετά την κυκλοφορία του ιικού σωματιδίου στα ενδοσωμικά διαμερίσματα, η συνεισφορά της L1 πρωτεΐνης στη διαδικασία εισόδου φαίνεται να τερματίζεται. Ο διαχωρισμός του συμπλέγματος L2/γονιδιώματος από την L1 φαίνεται να επιτυγχάνεται με τη μεσολάβηση της δράσης κυτταρικών πρωτεϊνών που λέγονται κυκλοφυλίνες και την αλληλεπίδραση της L2 πρωτεΐνης με την πρωτεΐνη SNX17 (Sorting NeXin-17) (Bergant M. *et al. J. Virol*. 2013, Bergant MM. *et al. Traffic*. 2012, Bienkowska-Haba M. *et al. PLoS Pathog*. 2009, Bienkowska-Haba M. *et al. J. Virol*. 2012).

### 3.7. Η L2 πρωτεΐνη.

Η L2 πρωτεΐνη αποτελεί δευτερεύον συστατικό του ιικού καψιδίου και υπάρχει σε ποικίλο αριθμό αντιγράφων ανά καψίδιο. Εντοπίζεται στην έσω επιφάνεια της κεντρικής κοιλότητας, κάτω από τα πενταμερή της L1, που τακτοποιούνται για να σχηματίσουν το καψίδιο (Buck CB. *et al. Journal of Virology*. 2008). Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη δεν έχει απλά δομικό ρόλο αλλά επιτελεί και άλλες λειτουργίες. Η L2 πρωτεΐνη συμβάλλει στην πρόσδεση του ιικού σωματιδίου στον κυτταρικό υποδοχέα, ευνοώντας την πρόσληψη του, τη μεταφορά του στον πυρήνα και τη διανομή του ιικού DNA στα κέντρα αντιγραφής. Επίσης συμβάλλει στο πακετάρισμα του ιικού DNA στα καψίδια. Εξαιτίας της παρουσίας μια συνηθισμένης επιτόπου εξουδετέρωσης στις L2 πρωτεΐνες σε πολλούς ιούς των θηλωμάτων, μπορεί να είναι καθοριστική στην παροχή ανοσίας ανάμεσα στους διάφορους τύπους του HPV ιού. Δυο διακριτές περιοχές στο αμινοτελικό άκρο της L2 πρωτεΐνης αλληλεπιδρούν με την επιφάνεια του κυττάρου, μετά από μια χαμηλής εξειδίκευσης αλληλεπίδραση μεταξύ της L1 πρωτεΐνης και της επιφάνειας του κυττάρου. Ακολουθεί αλλαγή στη διαμόρφωση του καψιδίου εκθέτοντας τους επιτόπους της L2 πρωτεΐνης και

προωθώντας αλληλεπιδράσεις με έναν πιο ειδικό δευτερογενή υποδοχέα (Davy Vanden Broeck. *Human Papillomavirus and Related Diseases-From Bench to Bedside – A Clinical Perspective. Chapter 1. Human Papillomavirus: Biology and Pathogenesis. 2012*).

Η αποκοπή του αμινοτελικού άκρου της L2 πρωτεΐνης είναι απαραίτητη για την πρόσδεση της L1 στο δευτερογενή υποδοχέα, γεγονός που υποδηλώνει ότι η L2 πρωτεΐνη παίζει σημαντικό ρόλο στη λοίμωξη από τον HPV ιό (Schiller JT. *et al. Gynecologic Oncology. 2010*).

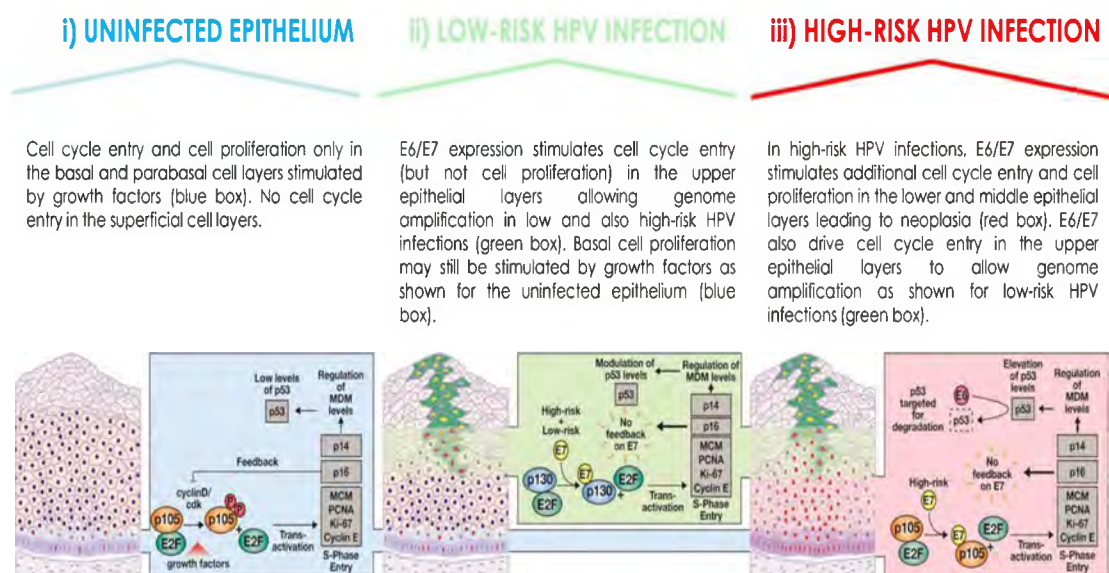
### **3.8. Η ενίσχυση του γονιδιώματος του HPV ιού στις ανώτερες στιβάδες του επιθηλίου.**

Η διατήρηση του γονιδιώματος του ιού στα κύτταρα της βασικής στιβάδας του επιθηλίου που πολλαπλασιάζονται συνεχώς, καθώς και στα κύτταρα των κατώτερων στιβάδων του, αποτελεί κοινό χαρακτηριστικό όλων των ιών των θηλωμάτων. Κατά τη διάρκεια της παραγωγικής φάσης της λοίμωξης, η ενίσχυση του γονιδιώματος προκαλείται, καθώς τα κύτταρα που έχουν προσβληθεί από τον ιό διαφοροποιούνται και μετακινούνται προς την επιφάνεια του επιθηλίου, λόγω της διαίρεσης των κυττάρων που βρίσκονται στις κατώτερες επιθηλιακές στιβάδες (Doorbar J. *Dis Markers. 2007*).

Ο πολλαπλασιασμός των βασικών και των παραβασικών κυττάρων, που επιτυγχάνεται με την έκφραση των E6/E7 πρωτεϊνών, λόγω λοίμωξης από στελέχη υψηλού κινδύνου του ιού, διευκολύνει την επέκταση του μεγέθους της βλάβης, η οποία εν μέρει συνδέεται με τις ειδικές λειτουργίες των πρωτεϊνών E6 και E7 των στελεχών υψηλού κινδύνου του ιού. Οι διαφορές, ανάμεσα στα διάφορα στελέχη του ιού είναι εμφανείς, όταν συγκρίνονται βλάβες από την ίδια περιοχή του επιθηλίου (Doorbar J. *et al. Vaccine. 2012*).

Η ενίσχυση του γονιδιώματος του HPV ιού εξαρτάται εν μέρει από τις αλλαγές στο περιβάλλον του κυττάρου, καθώς τα κύτταρα που έχουν προσβληθεί από τον ιό, μετατοπίζονται προς την επιφάνεια του επιθηλίου (Doorbar J. *Dis. Markers. 2007*). Μία από τις κύριες λειτουργίες των E6 και E7 πρωτεϊνών, στα περισσότερα στελέχη του ιού HPV, είναι η διέγερση της επανεισόδου του κυτταρικού κύκλου στις μεσαίες στιβάδες του επιθηλίου, γεγονός που έχει ως κατάληξη την ενίσχυση του γονιδιώματος του ιού (Doorbar J *et al. Vaccine. 2012*).

Η έκφραση των E6 και E7 πρωτεϊνών στις ανώτερες στιβάδες του επιθηλίου, επιτρέπει στα κύτταρα που έχουν προσβληθεί από τον ιό να ξαναμπούν στη φάση S του κυτταρικού κύκλου αυξάνοντας παράλληλα τον αριθμό των αντιγράφων του γονιδιώματος. Χρειάζεται επίσης, να αυξηθούν σε ποσότητα οι E1 και E2 πρωτεΐνες ακολουθώντας την ανοδική ρύθμιση του όψιμου ή εξαρτώμενου από τη διαφοροποίηση HPV υποκινητή (Εικ. 18) (Bodily J. *et al. Trends Microbiol. 2011*).



**Εικ. 18.** Ο μηχανισμός ρύθμισης της εισόδου στον κυτταρικό κύκλο και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε προσβεβλημένο και μη επιθήλιο. Οι λειτουργίες των πρωτεϊνών του ιού αποτελούν τη βάση για το φαινότυπο της νόσου. Αυτό είναι εμφανές όταν ο ρόλος των πρωτεϊνών E6 και E7 των στελεχών υψηλού και χαμηλού κινδύνου του HPV ιού εξετάζεται στα πλαίσια της νόσου. **The biology and life-cycle of human papillomaviruses. Vaccine. Review. 2012. 30S; 55-70.**

Η δράση του υποκινητή, η οποία δεν εξαρτάται από την ενίσχυση του γονιδιώματος, οδηγεί στην αύξηση των πρωτεϊνών του ιού που είναι απαραίτητες για την αντιγραφή, συμπεριλαμβανομένων των E1, E2, E4 και E5. Η πρωτεΐνη E4 βρίσκεται σε αφθονία και ανιχνεύεται εύκολα με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας στις ανώτερες στιβάδες του επιθηλίου. Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες σχετικά με τη δράση των πρωτεϊνών του ιού, τα κύτταρα στα οποία παρατηρείται ενίσχυση του γονιδιώματος του ιού, παρουσιάζουν θετική ανοσοχρώση για τις πρωτεΐνες E7 και E4 (*Spink KM. et al. J. Virol. 2005*).

Αν και υπήρχε η άποψη ότι η έκφραση των E1, E2 και E5 πρωτεϊνών συνοδεύεται από την ταυτόχρονη έκφραση της E4 πρωτεΐνης, έχει αποδειχτεί ότι οι πρωτεΐνες αυτές δύσκολα ανιχνεύονται σε αλλοιώσεις που προκαλούνται από τον HPV ιό. Για την E1 πρωτεΐνη υπάρχει η άποψη ότι πρόκειται για ένα ελάχιστο γονιδιακό προϊόν που ανιχνεύεται με δυσκολία, ενώ η E2 εκφράζεται περισσότερο (*Maitland NJ. et al. J. Pathol. 1998, Stevenson M. et al. J. Gen. Virol. 2000*).

Τα τμήματα του mRNA που κωδικοποιούν τις E1, E2 και E4 πρωτεΐνες τερματίζουν στο αρχικό σημείο πολυαδενυλίωσης και πολλά από αυτά που ανήκουν στους ιούς της υπερικογένειας Α περιλαμβάνουν την E5 πρωτεΐνη ως δικό τους δεύτερο ή τρίτο ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης. Η E5 είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη, η οποία εντοπίζεται κυρίως στο ενδοπλασματικό δίκτυο του κυττάρου. Σχετίζεται με τη δράση της ATPάσης στα κενοτόπια και μπορεί να καθυστερήσει την οξίνιση στα ενδοσωμάτια, γεγονός που επιδρά στην ανακύκλωση των EGF υποδοχέων στην επιφάνεια του επιθηλίου. Το γεγονός αυτό, έχει ως συνέπεια την αύξηση των σημάτων που ελέγχονται από τον EGFR υποδοχέα, γεγονός που συμβάλλει στη διατήρηση της αντιγραφής κατά τη διάρκεια ενίσχυσης του γονιδιώματος. Ο ρόλος της E5 πρωτεΐνης υποστηρίζεται από μελέτες που αφορούν σε πειράματα σε καλλιέργειες στις οποίες έγινε ανάλυση γονιδιωμάτων των μεταλλαγμένων E5 πρωτεϊνών των στελεχών 16 και 31 του HPV ιού, συγκριτικά με τα γονιδιώματα των μη

μεταλλαγμένων στελεχών του ιού (*Fehrmann F. et al. J. Virol. 2003, Genther SM. et al. J. Virol. 2003*).

Η ανίχνευση της E5 πρωτεΐνης δεν είναι εύκολη με τη βοήθεια της ανοσοϊστοχημείας καθώς η συγκεκριμένη πρωτεΐνη προσδένεται στη μεμβράνη, γεγονός που περιορίζει τη διαθεσιμότητα των αντιγονικών καθοριστών. Μελέτη σε βιοψίες τραχήλου μήτρας, στις οποίες ταυτοποιήθηκε το στέλεχος HPV16 του ιού, έδειξε ότι η E5 πρωτεΐνη βρίσκεται στις κατώτερες στιβάδες του επιθηλίου και όχι συγκεκριμένα στα βασικά κύτταρα. Ωστόσο, ο αριθμός των *in vivo* μελετών για τις E2 και E5 πρωτεΐνες είναι περιορισμένος και είναι δύσκολο να εκτιμηθεί ο τρόπος έκφρασής τους (*Chang JL. et al. J. Biomed. Sci. 2001*).

Τα μοριακά δεδομένα για το ρόλο των E1 και E2 πρωτεϊνών στην αντιγραφή, είναι αρκετά κατανοητά, ωστόσο, δεν υπάρχουν πολλές πληροφορίες για το ρόλο της E4 πρωτεΐνης. Η E4 πρωτεΐνη του στελέχους HPV16 μπορεί και αναστέλλει την προώθηση του κυτταρικού κύκλου, σε συνδυασμό με τα συμπλέγματα κυκλίνης B/ κινάσης Cdk και κυκλίνης A/ κινάσης Cdk κατά τη διάρκεια της φάσης G2, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα την διακοπή του κυτταρικού κύκλου στο στάδιο της G2/M (*Davy CE. et al. J. Virol. 2005*). Υπάρχει η άποψη ότι η συνεχής έκφραση της E7 πρωτεΐνης σε κύτταρο στο οποίο η E4 πρωτεΐνη υπάρχει σε αφθονία μπορεί να οδηγήσει στη διατήρηση ενός περιβάλλοντος όμοιο με τη φάση S, το οποίο επιτρέπει την συγκέντρωση του γονιδιώματος του ιού. Η σχέση ανάμεσα στην έκφραση της E4 πρωτεΐνης και στην ενίσχυση του γονιδιώματος αποτελεί ένα σταθερό χαρακτηριστικό όλων των τύπων των ιών των θηλωμάτων που έχουν μελετηθεί. Σε πολλά πανομοιότυπα συστήματα η απουσία έκφρασης της E4 πρωτεΐνης καταλήγει στη μείωση της υποστηρικτικής ικανότητας ενίσχυσης του γονιδιώματος (*Nakahara T. et al. J. Virol. 2005*).

Αν και η ακριβής συμβολή της E4 πρωτεΐνης αναμένεται να αποδειχτεί, η σχέση της με τις κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες και την E2 εξακολουθούν να παίζουν σημαντικό ρόλο. Αξίζει να σημειωθεί ότι η αυξημένη έκφραση της E2 πρωτεΐνης, για την οποία υπήρχε η άποψη ότι συνόδευε την E4, τελικά οδηγεί στη καθοδική ρύθμιση του αρχικού υποκινητή του ιού, ο οποίος ρυθμίζει την παραγωγή της E7 πρωτεΐνης και την είσοδο στη φάση S του κυτταρικού κύκλου. Η σταθερή αύξηση στην E2 πρωτεΐνη οδηγεί στην ενίσχυση του γονιδιώματος και αδρανοποιείται όταν αυτή ολοκληρωθεί. Ένα τέτοιο σενάριο υποστηρίζεται από ανοσοϊστοχημικές πληροφορίες και παρουσιάζει μόνο μια μικρή επικάλυψη, ανάμεσα στα κύτταρα που εκφράζουν την E7 πρωτεΐνη και εκείνων που εκφράζουν την E4 πρωτεΐνη (*Doorbar J. Dis. Markers. 2007*).

### 3.9. Η συγκέντρωση και η απελευθέρωση του HPV ιού.

Η ολοκλήρωση του κύκλου ζωής του HPV ιού περιλαμβάνει την έκφραση της ελάσσονος πρωτεΐνης του περιβλήματος του ιού L2, την έξοδο του κυττάρου από τον κυτταρικό κύκλο και την έκφραση της μείζονος πρωτεΐνης του περιβλήματος L1 ώστε να ολοκληρωθεί το πακετάρισμα του ιϊκού γονιδιώματος. Αυτό προϋποθέτει κυρίως μια αλλαγή στη χρήση της περιοχής ματίσματος, παρά ενεργοποίηση του υποκινητή, οδηγώντας σε παραγωγή μεταγράφων που ξεκινούν στον P670 υποκινητή (για το στέλεχος 16 του HPV ιού) και τερματίζουν στην όψιμη περιοχή τελικής πολυαδενυλίωσης, γεγονός που υποβοηθείται από υψηλά επίπεδα έκφρασης E2 πρωτεΐνης (*Doorbar J. Clin. Sci. [LOND] 2006, Johansson C. et al. EMBO. J. 2012*).

Η παραπάνω διαδικασία έχει ως αποτέλεσμα τη μετατροπή της παραγωγής του μηνύματος E1<sup>+</sup>E4, E5 σε μήνυμα E1<sup>+</sup>E4, L1, καθώς η ενίσχυση του γονιδιώματος ακολουθείται από το πακετάρισμα αυτού. Η διαδικασία με την οποία το νουκλεικό οξύ του

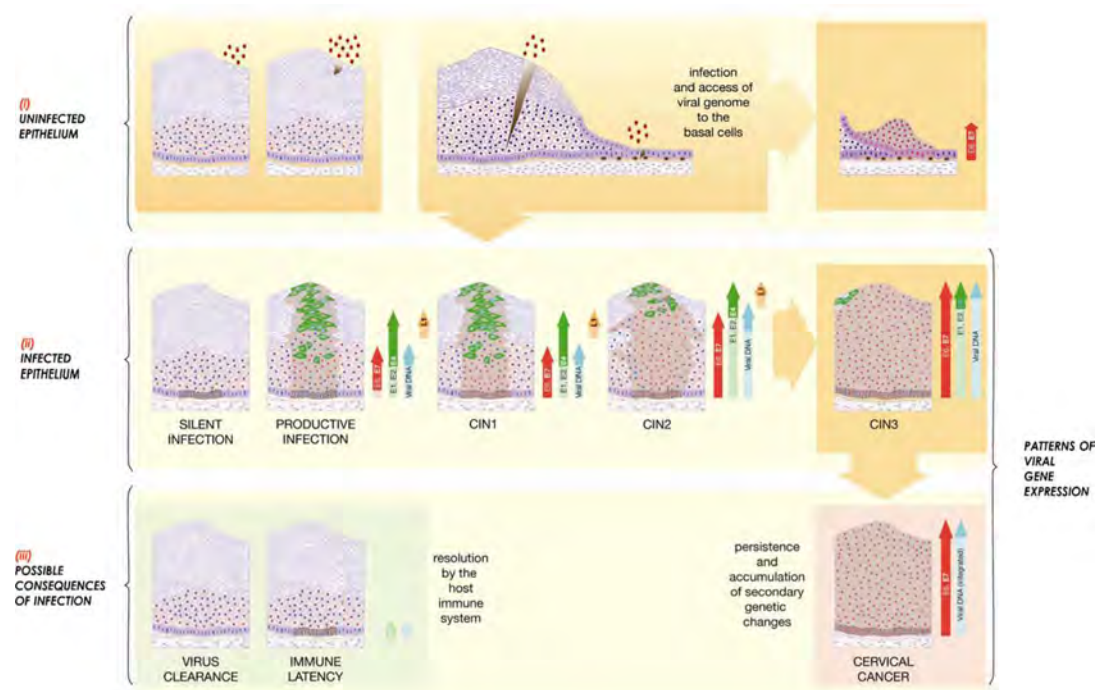


HPV ιού περικλείεται σε κάψα, περιλαμβάνει την παρουσία της L2 πρωτεΐνης στις περιοχές αντιγραφής, μέσω της πρωτεΐνης E2, πριν την έκφραση της L1 και τη συγκέντρωση του εικοσαεδρικού καψιδίου στον πυρήνα. Η ωρίμανση του ιού παρατηρείται στα πιο επιφανειακά νεκρά κερατινοκύτταρα, τα οποία χάνουν τη μιτοχονδριακή οξειδωτική φωσφορυλίωση, γεγονός που οδηγεί στην μετατροπή ενός αναγωγικού περιβάλλοντος σε οξειδωμένο λίγο πριν την απελευθέρωση του ιού. Η κατάσταση αυτή διευκολύνει την προοδευτική συγκέντρωση δισουλφιδικών δεσμών ανάμεσα στις L1 πρωτεΐνες, οδηγώντας στην παραγωγή πολύ σταθερών σωματιδίων του ιού μαζί με το περίβλημα του (Finnen RL. *et al. J. Virol.* 2003, Buck CB. *et al. J. Virol.* 2005). Τα συναρμολογημένα σωματίδια περιέχουν 360 μόρια της L1 πρωτεΐνης οργανωμένα σε 72 πενταμερή καψομερίδια, με ένα πολύ μικρότερο και μεταβλητό αριθμό L2 μορίων (Buck CB *et al. J. Virol.* 2008).

Έχει διατυπωθεί η άποψη ότι η αφθονία της E4 πρωτεΐνης μπορεί να συμβάλλει στην απελευθέρωση των σωματιδίων του ιού μαζί με το περίβλημά του και στη λοίμωξη των ανώτερων στιβάδων του επιθηλίου. Αυτό υποστηρίζεται από το γεγονός ότι συγκεντρώνεται στις αμυλοειδείς ίνες που διασπούν τη δομή της κερατίνης, επηρεάζοντας τη φυσιολογική απελευθέρωση του κερατινοποιημένου φακέλου (McIntosh PB. *et al. J. Virol.* 2008).

#### 4. Η απορρύθμιση του κύκλου ζωής του ιού HPV και η καρκινογένεση.

Η ρύθμιση της έκφρασης του ιϊκού γονιδιώματος, που οδηγεί στην παραγωγή σωματιδίων, διακόπτεται σε περιπτώσεις νεοπλασίας που οφείλονται στον HPV ιό (Εικ. 19).



**Εικ. 19.** Λοίμωξη από στελέχη υψηλού κινδύνου του HPV ιού και πιθανές συνέπειες: (i) Η ανίχνευση του ιϊκού DNA σε βιοψία ή σε αποφολιωμένα κύτταρα του τραχήλου της μήτρας μπορεί να υποδεικνύει λοίμωξη (παραγωγική (CIN1) ή αποτυχημένη (CIN3), όπως φαίνεται στο (ii)) η παρουσία ιϊκών σωματιδίων στην επιφάνεια του επιθηλίου χωρίς λοίμωξη (π.χ από πρόσφατη μεταφορά), η μια λανθάνουσα ή «σιωπηλή» λοίμωξη, όπως φαίνεται στο (ii). Χρησιμοποιούνται δείκτες έκφρασης των ιϊκών γονιδίων (όπως mRNA ή πρωτεΐνες) για την επιβεβαίωση της παρουσίας ενεργού νόσου. Η λοίμωξη απαιτεί την είσοδο των σωματιδίων του ιού στα μιτωτικά δραστικά κύτταρα της βασικής στιβάδας του κερατινοποιημένου επιθηλίου μέσω μικροτραυματισμού.

Σε κυτταρικές σειρές, η άποψη ότι η λοίμωξη διευκολύνεται από την εγγύτητα του κυττάρου στόχου στην επιφάνεια του επιθηλίου, μπορεί να επιτρέψει την προσέγγιση σε ένα είδος κυττάρου, που είναι ανίκανο να υποστηρίξει τον ολοκληρωμένο, παραγωγικό κυτταρικό κύκλο (δεξιά). Η σημασία της λοίμωξης διαφόρων ειδών κυττάρων απομένει να εκτιμηθεί σωστά.

(ii) Ακολουθώντας τη λοίμωξη (όπως φαίνεται στο (i)), η έκφραση του ιϊκού γονιδιώματος μπορεί μερικές φορές να κατασταλεί (π.χ. μέσω της μεθυλίωσης του γονιδιώματος) οδηγώντας σε μια «σιωπηλή» λοίμωξη στην οποία τα ιϊκά γονιδιώματα διατηρούνται στη βασική στιβάδα χωρίς εμφανή νόσο. Η λοίμωξη μπορεί να οδηγήσει εναλλακτικά σε ένα διατεταγμένο πρότυπο της γονιδιακής έκφρασης οδηγώντας στην σύνθεση του ιού και στην απελευθέρωση από τις ανώτερες στιβάδες του επιθηλίου (παραγωγική λοίμωξη ή CIN1), ή στην απορρυθμισμένη έκφραση του ιϊκού γονιδιώματος και στην υψηλού βαθμού νεοπλασία (CIN2/CIN3). Η εμμένουσα υψηλού βαθμού νόσος CIN2/3 σχετίζεται με τον αυξημένο κίνδυνο ενσωμάτωσης του γονιδιώματος στο γενετικό υλικό του κυττάρου ξενιστή και την εξέλιξη σε καρκίνο. Τα κύτταρα στον κύκλο επισημαίνονται με την παρουσία κόκκινων κυττάρων. Τα κύτταρα που εκφράζουν την E4 σημαίνονται με πράσινο, ενώ εκείνα που εκφράζουν την L1 με κίτρινο. Η καφέ σκίαση στη διαγραμματική αναπαράσταση του επιθηλίου προσδιορίζει όλα τα κύτταρα (διαφοροποιημένα και μη) που περιέχουν ιϊκά γονιδιώματα.

(iii) Στις περισσότερες περιπτώσεις, οι λοιμώξεις από τον HPV ιό επιλύονται ως αποτέλεσμα της κυτταρικής ανοσολογικής απόκρισης (αριστερά). Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε ιογενή κάθαρση ή λανθάνουσα κατάσταση και στη διατήρηση των ιϊκών επισωμάτων στη βασική στιβάδα του επιθηλίου, χωρίς την ολοκλήρωση του κύκλου ζωής του ιού. Τα πρότυπα της γονιδιακής έκφρασης κατά τη λανθάνουσα φάση δεν έχουν χαρακτηριστεί καλά. Η έκφραση των E1, E2 έχει τεκμηριωθεί, όπως προτάθηκε από μοντέλα ζώων. Η απορρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης διατηρείται, όπως συμβαίνει στη CIN3 και μετά την ενσωμάτωση του ιού και οδηγεί στη συσσώρευση δευτερευόντων γενετικών αλλαγών στο προσβεβλημένο από τον ιό κύτταρο και στην ανάπτυξη του καρκίνου, που διευκολύνεται με την υπερέκφραση των E6 και E7 πρωτεϊνών στελεχών υψηλού κινδύνου.

Τα κύτταρα στον κύκλο παριστάνονται με κόκκινους πυρήνες. Η καφέ σκίαση στη λανθάνουσα ανοσολογική κατάσταση υποδεικνύει τα κύτταρα που φιλοξενούν ιϊκό γονιδίωμα σε επισωματική μορφή. Στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας το ιϊκό γονιδίωμα είναι συχνά ενσωματωμένο με έλλειψη των πλήρους μήκους E1, E2, E4, E5 και L1, L2 καψιδικών πρωτεϊνών και με την απορρυθμισμένη έκφραση των E6, E7 πρωτεϊνών. **The biology and life-cycle of human papillomaviruses. Vaccine. Review. 2012. 30S; 55-70.**

Στις παθήσεις του τραχήλου της μήτρας, όπου έχει πραγματοποιηθεί μεγάλος αριθμός μελετών, υπήρχε η άποψη ότι τα επίπεδα έκφρασης των E6 και E7 πρωτεϊνών αυξάνονται σύμφωνα με το βαθμό της ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης του τραχήλου της μήτρας, δηλαδή από CIN1 σε CIN3 και ότι οι αλλαγές στην έκφραση των γονιδίων υποδηλώνουν άμεσα το νεοπλαστικό φαινότυπο (*Doorbar J. et al. Vaccine. 2012*).

Στις αλλοιώσεις τύπου CIN1 διατηρείται η ικανότητα ολοκλήρωσης του κύκλου ζωής του HPV ιού και η παραγωγή σωματιδίων του. Οι αλλοιώσεις αυτές μοιάζουν με επίπεδα κονδυλώματα, που έχουν ένα χαμηλότερο επίπεδο πολλαπλασιασμού του κυττάρου στη βασική και στις παραβασικές στιβάδες του επιθηλίου. Η αύξηση των επιπέδων έκφρασης των E6 και E7 πρωτεϊνών σε λοιμώξεις από στελέχη υψηλού κινδύνου του ιού, που οδηγεί στην εμφάνιση CIN2+ αλλοιώσεων, ρυθμίζει μια σειρά γενετικών αλλαγών στο κύτταρο συμβάλλοντας στη δημιουργία καρκίνου. Σύμφωνα, με την υπόθεση αυτή, τα σχετικά χαμηλά επίπεδα έκφρασης των E6 και E7 πρωτεϊνών στις CIN1 αλλοιώσεις δεν αποτελούν κίνδυνο για την ανάπτυξη καρκίνου. Η απορρύθμιση του ιού που παρατηρείται στις αλλοιώσεις CIN2/3+, διευκολύνει την ενσωμάτωση της επισωματικής μορφής του ιού στο γεννητικό υλικό του κυττάρου ξενιστή, γεγονός που στην συνέχεια απορρυθμίζει την έκφραση των E6 και E7 πρωτεϊνών, που συχνά αναφέρονται ως ογκογονίδια του ιού (*Middleton K. et al. J. Virol. 2003*).

Δεν είναι σαφές πώς η έκφραση των γονιδίων της επισωματικής μορφής του ιού απορρυθμίζεται στις αρχόμενες CIN αλλοιώσεις. Ωστόσο, πληροφορίες από τις δοκιμές των



εμβολίων έχουν δείξει ότι CIN2+ αλλοιώσεις παρατηρούνται σε νέες γυναίκες πολύ σύντομα μετά τη λοίμωξη (Paavonen J. et al. *Lancet*. 2007, Paavonen J. et al. *Lancet*. 2009, Szarewski A. et al. *Int. J. Cancer*. 2012, Quint W. et al. *J. Pathol*. 2012). Σε αυτά τα περιστατικά, η απορρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης μπορεί να προκαλείται από αλλαγές του κυτταρικού σήματος λόγω ορμονικών αλλαγών ή επιγενετικών τροποποιήσεων όπως η μεθυλίωση του DNA του ιού, η οποία μπορεί να εξαρτάται από το είδος των προσβεβλημένων επιθηλιακών κυττάρων (Ding DC. et al. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol*. 2009). Η LCR περιοχή του στελέχους 16 του HPV ιού περιέχει ορμονικά, αντιδραστικά στοιχεία που μπορούν και ενεργοποιούνται από τα οιστρογόνα, αποδεικνύοντας την ύπαρξη συνεργασίας ανάμεσα στα οιστρογόνα και στον HPV ιό τόσο στον άνθρωπο, όσο και σε άλλα μοντελικά συστήματα (Gariglio P. et al. *Arch. Med. Res*. 2009).

Σε CIN αλλοιώσεις η LCR ρυθμιστική περιοχή φαίνεται να μεθυλιώνεται διαφορετικά, σύμφωνα με τη σοβαρότητα της νόσου, υποδηλώνοντας ότι οι επιγενετικές αλλαγές μπορούν και ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων και κατά συνέπεια την εμφάνιση της νόσου. Επίσης υπήρχε η άποψη, για το στέλεχος HPV16 τουλάχιστον, ότι η πρωτεΐνη E7 μπορεί και επιφέρει επιγενετικές αλλαγές, που συνεισφέρουν στις αλλαγές της έκφρασης του γενετικού υλικού του κυττάρου (McLaughlin –Drubin ME. et al. *Rroc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011, Laurson J. et al. *Carcinogenesis*. 2010, Hyland PL. et al. *J. Virol*. 2011).

Αν και οι συνήθεις εύθραυστες περιοχές (Common Fragile Sites, CFS) στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή αποτελούν τα σημεία ενσωμάτωσης, σε γενικές γραμμές η ενσωμάτωση αποτελεί τυχαίο γεγονός, που μερικές φορές οδηγεί στη διακοπή των ιικών γονιδίων που ρυθμίζουν τη φυσιολογική μεταγραφή τους από την LCR περιοχή. Σημαντικό ρόλο διαδραματίζει η E2 πρωτεΐνη που αποτελεί έναν κωδικοποιημένο παράγοντα μεταγραφής του ιού. Φυσιολογικά ρυθμίζει το λόγο E6/E7 με την πρόσδεση της σε σημεία της LCR περιοχής. Η πλειοψηφία των καρκίνων του τραχήλου της μήτρας περιλαμβάνει ένα ή περισσότερα αντίγραφα του HPV ιού, που ενσωματώνονται τυχαία, λιγότερο ή περισσότερο, στο γενετικό υλικό του κυττάρου ξενιστή, μαζί με την περιοχή ενσωμάτωσης του ιού που βρίσκεται στις E1 και E2 ρυθμιστικές πρωτεΐνες. Η ενσωμάτωση και η έλλειψη της ρύθμισης του λόγου των πρωτεϊνών E6/E7 διευκολύνει τη σταθερή έκφραση των πρωτεϊνών αυτών σε υψηλά επίπεδα και τη συσσώρευση των γενετικών λαθών που οδηγούν τελικά στη δημιουργία καρκίνου (Jeon S. et al. *J. Virol*. 1995, Jeon S. et al. *PNAS USA*. 1995, Pett MR. et al. *Cancer. Res*. 2004).

Πρόσφατα, έχει διερευνηθεί το δίλημμα εάν η πρώιμη ενσωμάτωση του ιού σε CIN1 αλλοιώσεις οδηγεί μέσω των CIN2, CIN3 αλλοιώσεων σε καρκίνο, ή αν ως ένα βαθμό, η απορρύθμιση της έκφρασης του γονιδιώματος του ιού υποδηλώνει την εμφάνιση CIN2, CIN3 αλλοιώσεων σε αρχικό στάδιο. Επιπλέον έχει διερευνηθεί εάν η χρωμοσωμική αστάθεια διευκολύνει τελικά την ενσωμάτωση (Doorbar J. et al. *Vaccine*. 2012).

Γενικότερα, έχει επικρατήσει η άποψη ότι η ενσωμάτωση του ιού παρατηρείται στις υψηλού βαθμού αλλοιώσεις (CIN 2/3) και ότι από την στιγμή που θα συμβεί αυτό, η ήδη απορρυθμισμένη έκφραση των E6 και E7 πρωτεϊνών αυξάνεται περισσότερο ή παραμένει σε σταθερά επίπεδα (Hafner N. et al. *Oncogene*. 2008).

Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας προκύπτει από κύτταρα που περιέχουν αποκλειστικά την επισωματική μορφή του ιού. Συγκεκριμένα, για το στέλεχος HPV16, περίπου το 30% των καρκίνων του τραχήλου της μήτρας αναπτύσσονται με αυτό τον τρόπο. Περίπου το 70% των καρκίνων του τραχήλου της μήτρας που σχετίζονται με το στέλεχος HPV16 περιέχουν ενσωματωμένες αλληλουχίες του συγκεκριμένου στελέχους, ενώ για το στέλεχος HPV18 το γονιδίωμα βρίσκεται σχεδόν αποκλειστικά σε ενσωματωμένη μορφή (Fehrmann F. et al. *Oncogene*. 2003, Badaracco G. et al. *J. Med. Virol*. 2002, Woodman CB. et al. *Lancet*. 2003, Cullen AP. et al. *J. Virol*. 1991,

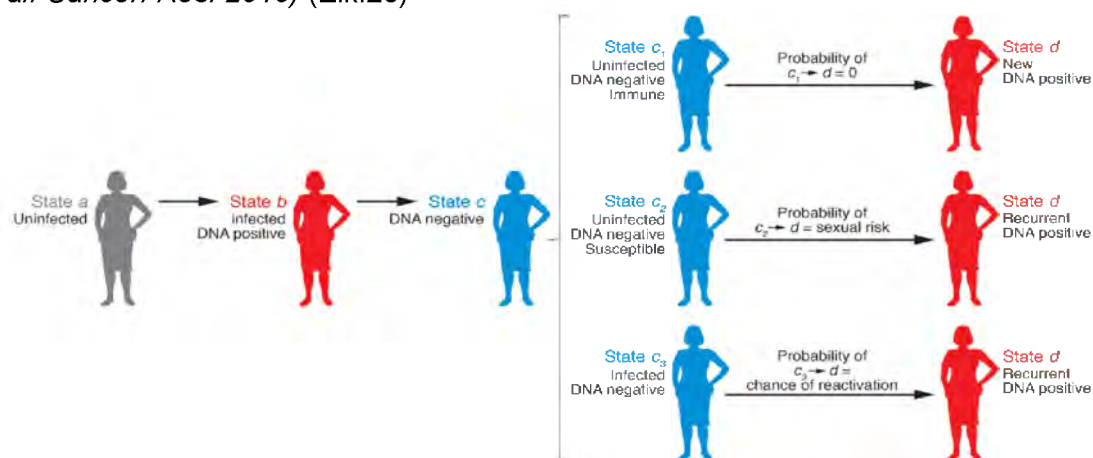
Pirami L. et al. J. Clin. Pathol. 1997). Ωστόσο και στις δυο περιπτώσεις η παρατεταμένη έκφραση των E6, E7 πρωτεϊνών, η εν μέρει υπερέκφρασή τους και η συσσώρευση γενετικών λαθών, είναι οι παράγοντες εκείνοι που συμβάλουν στην εξέλιξη της CIN3 σε καρκίνο του τραχήλου της μήτρας.

## 5. Η υποχώρηση, η λανθάνουσα περίοδος και η αποδρομή της βλάβης.

Η λοίμωξη από στελέχη υψηλού κινδύνου του ιού HPV είναι συχνή, καθώς πάνω από το 80% των γυναικών προσβάλλεται σε κάποιο στάδιο της ζωής τους. Ωστόσο ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας εμφανίζεται σπάνια ως αποτέλεσμα της λοίμωξης. Οι περισσότερες λοιμώξεις εξαφανίζονται λόγω της κυτταρικής ανοσίας και δεν παραμένουν για μεγάλο χρονικό διάστημα (Doorbar J. et al. Vaccine. 2012).

Δύο παράμετροι «κλειδιά» παραμένουν ακαθόριστες: α) αν όντως τα αντισώματα, που ανιχνεύονται στον ορό μετά τη λοίμωξη από τον ιό, παρέχουν προστασία σε περίπτωση νέας λοίμωξης από το ίδιο στέλεχος του ιού και β) αν η μη ανίχνευση του DNA αντιπροσωπεύει την ίαση από τον ιό ή ανοσολογικό έλεγχο της λοίμωξης κάτω από τα όρια ανίχνευσης των πρόσφατων δοκιμών. Εξαιτίας της αβεβαιότητας που υπάρχει γύρω από αυτές τις παραμέτρους, έχουν αναπτυχθεί μοντέλα που εμπλέκουν αναλύσεις ευαισθησίας, στις οποίες οι υποθέσεις για ανοσία και σε μικρότερη έκταση για λανθάνουσα φάση ποικίλουν. Επιπλέον, έχει αποδειχτεί ότι η ανίχνευση με τη βοήθεια αυτών των μοντέλων εμφανίζει υψηλή ευαισθησία απέναντι στις συγκεκριμένες υποθέσεις (Gravitt P. J. Clin. Invest. 2011).

Μεθοδολογικά προβλήματα μας εμποδίζουν να έχουμε σαφή επιδημιολογική απόδειξη. Ένα βασικό πρόβλημα αποτελεί η κυριολεκτική ερμηνεία της λοίμωξης από τον HPV ιό, που βασίζεται αποκλειστικά στην ανίχνευση του DNA σε δείγματα κυττάρων του τραχήλου της μήτρας που έχουν αποφολιδωθεί. Γυναίκες με θετικό HPV-DNA τεστ θεωρούνται προσβεβλημένες από τον ιό HPV, ενώ γυναίκες με αρνητικό HPV-DNA τεστ, θεωρούνται μη προσβεβλημένες. Μελέτες με επαναλαμβανόμενες μετρήσεις του HPV-DNA, ανά τακτά χρονικά διαστήματα, έχουν δείξει ότι οι γυναίκες εμφανίζουν πολλαπλές μεταπτώσεις που βασίζονται στην ανίχνευση τραχηλικού DNA, ακόμα και όταν η νόσος δεν εξελίσσεται (Insigna RP. et al. Cancer. Epidemiol. Biomarkers Prev. 2010, Trottier H. et al. Cancer. Res. 2010) (Εικ.20)



**Εικ. 20.** Οι άγνωστες παράμετροι στη φυσική ιστορία του ιού HPV. \*J. Clin. Invest. Review. 2011. 121; 4593-99.

Το συγκεκριμένο παράδειγμα αφορά στο DNA του στελέχους 16 του HPV ιού (Εικ. 20). Η γυναίκα που βρίσκεται στο στάδιο a δεν έχει προσβληθεί από τον ιό, αφού δεν έχει έρθει σε σεξουαλική επαφή. Η μετάβαση από το στάδιο a στο στάδιο b καθορίζεται από τον κίνδυνο έκθεσης της γυναίκας στον HPV ιό. Εκτιμήσεις από μελέτες νέων γυναικών, συμπεριλαμβανομένου της πρώτης σεξουαλικής επαφής, υποδηλώνουν ότι η αρχική μετάβαση από το στάδιο a στο στάδιο b είναι συχνή και 24 μήνες μετά την πρώτη έκθεση τους στον ιό αυξάνεται σε ποσοστό  $\geq 30\%$ . Μελέτες έχουν δείξει ότι το 90% των γυναικών μεταβαίνουν από το στάδιο b στο στάδιο c με αρνητικό DNA τεστ του στελέχους HPV 16 μέσα σε διάστημα δύο ετών από την αρχική ανίχνευση του DNA του ιού. Οι μεταβάσεις αυτές ερμηνεύονται ως υπάρχουσες λοιμώξεις και ως λοιμώξεις σε αποδρομή αντίστοιχα (Bosch FX. et al. Vaccine. 2008).

Η μεγαλύτερη αβεβαιότητα περιλαμβάνει την ερμηνεία της μετάβασης από το στάδιο c στο στάδιο d. Συγκεκριμένα, μια γυναίκα που βρίσκεται στο στάδιο c θεωρητικά δε φέρει κάποιο στέλεχος του ιού από προηγούμενη λοίμωξη και δεν έχει προσβληθεί από τον ιό, στο στάδιο αυτό. Βέβαια, πολλές φορές λόγω της αβεβαιότητας που υπάρχει γύρω από την κατανόηση της φυσικής ανοσίας έναντι νέας λοίμωξης από τον HPV ιό και της λανθάνουσας φάσης αυτού, το στάδιο c στην πραγματικότητα αντιπροσωπεύει τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα στάδια. Το στάδιο c1, αναφέρεται σε γυναίκα με προηγούμενη λοίμωξη, η οποία έχει ιαθεί πλήρως από τον ιό και έχει αναπτύξει ανοσία έναντι νέας προσβολής. Το στάδιο c2, αντιπροσωπεύει μια περίπτωση παρόμοια με εκείνη του σταδίου c1, αλλά στο στάδιο αυτό η γυναίκα εξακολουθεί να είναι επιρρεπής σε νέα προσβολή από τον ιό HPV και τέλος το στάδιο c3, αναφέρεται σε γυναίκα με λοίμωξη από τον HPV ιό, με αρνητικό HPV- DNA τεστ, η οποία αναπτύσσει ανοσία σε νέα προσβολή από τον ιό. (Gravitt P. J. Clin. Invest. 2011).

Δεν υπάρχει τρόπος να κατηγοριοποιήσουμε τις γυναίκες που ανήκουν στο στάδιο c στις τρεις υποομάδες και η πιθανότητα μετάβασης, από το στάδιο c στο στάδιο d, ενδεχομένως να περιλαμβάνει υποομάδες που έχουν καθοριστεί. Για παράδειγμα, η αναμενόμενη πιθανότητα μετάβασης από το στάδιο c1 στο στάδιο d θα μπορούσε να είναι μηδενική, έχοντας ως προϋπόθεση τη φυσική ανοσία, ενώ η αναμενόμενη πιθανότητα μετάβασης από το στάδιο c2 στο στάδιο d θα μπορούσε να θεωρηθεί ως επακόλουθο της σεξουαλικής έκθεσης. Η μετάβαση από το στάδιο c3 με αρνητικό HPV-DNA τεστ στο στάδιο d με θετικό HPV-DNA τεστ σε γυναίκα που έχει προσβληθεί από τον ιό θα μπορούσε να αποτελέσει μια λειτουργία από μη χαρακτηριζόμενες προκλήσεις επανεργοποίησης εκθέτοντας την ανοσολογική μνήμη και ή τον αυτοενοφθαλμισμό. Η ανικανότητα διαφοροποίησης μεταξύ των διάφορων σταδίων c, περιορίζει τη δυνατότητα να εξαγάγουμε συμπεράσματα που αφορούν τους κινδύνους ανάπτυξης από τον HPV ιό.

Οι περιορισμοί ισχύουν σε κάθε τυχαίο γεγονός εμφάνισης του ιού και όχι μόνο στην περίπτωση επανεμφάνισης μια προηγούμενης ανίχνευσης του στελέχους του ιού. Επιπλέον, η κατανομή των γυναικών στα διάφορα στάδια c μπορεί να μην είναι ομοιόμορφη. Είναι λογικό να υποθέσει κανείς ότι η σχετική αναλογία μετάβασης από το στάδιο c1 στο στάδιο c3 μειώνεται καθώς αυξάνεται η ηλικία εξαιτίας της συσσωρευτικής έκθεσης σε προηγούμενη λοίμωξη από τον ιό HPV την ίδια χρονική στιγμή που μειώνεται ο κίνδυνος της σεξουαλικής συμπεριφοράς (Gravitt P. J. Clin. Invest. 2011).

Έρευνες έχουν αποδείξει ότι το στέλεχος 16 του HPV ιού έχει μεγαλύτερο εύρος ανθεκτικότητας σε σχέση με άλλα στελέχη υψηλού κινδύνου, γεγονός που αυξάνει τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του τραχήλου της μήτρας (Schiffman M. et al. Cancer Res. 2010). Οι ελάχιστες κατανοητές διαφορές του κυτταρικού τροπισμού και των διάφορων προτύπων προόδου της νόσου που σχετίζονται με τα διάφορα στελέχη του ιού, υποδηλώνουν τη μεγαλύτερη συσχέτιση του στελέχους 18 του ιού με το αδενοκαρκίνωμα

παρά με το πλακώδες καρκίνωμα και τη σχετικά μη συχνή παρουσία του στις αλλοιώσεις CIN2. Πρόσφατοι προβληματισμοί αποδεικνύουν ότι τα στελέχη 16, 18 και 45 του ιού, που αποτελούν την πρωταρχική αιτία ανάπτυξης αδενοκαρκινώματος, μπορούν και προσβάλλουν κύτταρα με δυνατότητα αδενικής διαφοροποίησης και γι' αυτό το λόγο μια ανεπιτυχής ή μια ημιανθεκτική λοίμωξη των κυττάρων αυτών είναι σημαντική για την ανάπτυξη αδενοκαρκινώματος (*de Sanjose S. et al. Lancet. Oncol. 2010*). Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η λοίμωξη συγκεκριμένων κυττάρων στην περιοχή μετάπτωσης μεταξύ ενδοτραχήλου και εξωτραχήλου υποδηλώνει την ανάπτυξη καρκίνου του τραχήλου της μήτρας (*Herfs M. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2012*).

Οι λοιμώξεις από τον HPV ιό στη γεννητική περιοχή είναι συχνές, ιδιαίτερα σε νέες γυναίκες, σεξουαλικά ενεργές, με την πλειοψηφία αυτών να έχουν αυτοϊαθεί πριν προλάβει να αναπτυχθεί η νόσος κλινικά (*Doorbar J. et al. Vaccine. 2012*).

Όσες γυναίκες εμφανίσουν καλοήθεις αλλοιώσεις, τελικά θα αναπτύξουν κυτταρική ανοσία με αποτέλεσμα την υποχώρηση της βλάβης. Η υποχώρηση των κονδυλωμάτων συνοδεύεται ιστολογικά από την CD4+ T κυτταρική επικρατούσα Th1 (Τύπου 1 αντίδραση των T- βοηθητικών κυττάρων) αντίδραση, η οποία παρατηρείται και σε ζωικά μοντέλα που σχετίζονται με ασθένειες προκαλούμενες από τους ιούς των θηλωμάτων (*Nicholls PK. et al. Virology. 1999, Nicholls PK. et al. Virology. 2001, Wilgenburg BJ. et al. Comp. Med. 2005, Monnier-Benoit S. et al. Gynecologic Oncol. 2006*). Τέτοιου είδους μοντέλα, αποτελούν απόδειξη ότι η αντίδραση αυτή ρυθμίζεται από μηχανισμούς που εξαρτώνται από ειδικά αντιγόνα των CD4+ T κυττάρων. Η αποτυχία ανάπτυξης αποτελεσματικής κυτταρικής ανοσίας θα οδηγήσει σε εμμένουσα λοίμωξη. Στην περίπτωση στελεχών υψηλού κινδύνου του HPV ιού που προκαλούν καρκίνο, αυξάνεται η πιθανότητα μετάβασης από την υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία σε διηθητικό καρκίνωμα (*Doorbar J. et al. Vaccine. 2012*).

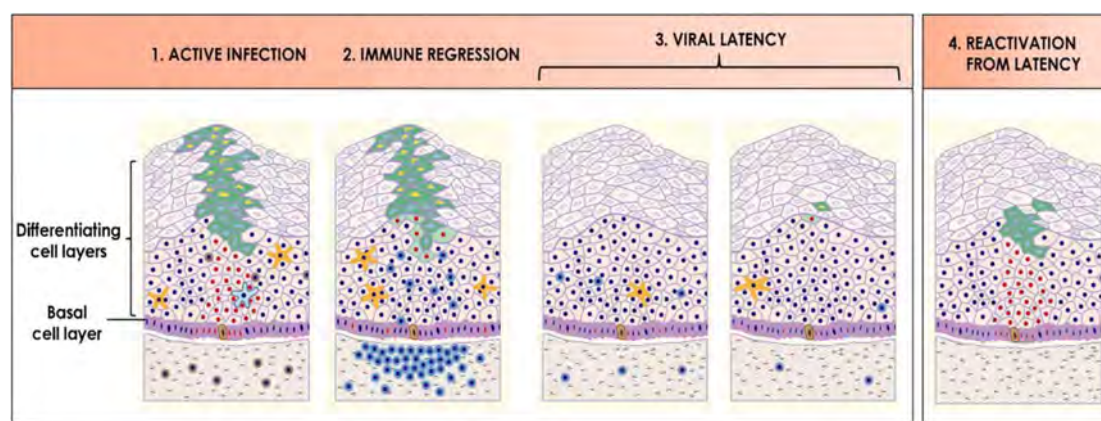
Ο κύκλος αναπαραγωγής του ιού είναι αποκλειστικά ενδοεπιθηλιακός. Δεν υπάρχει ιαίμα ή λύση του κυττάρου εξαιτίας του ιού και η αναπαραγωγή και η απελευθέρωσή του δε σχετίζονται με τη λοίμωξη (*Stanley MA. Clin. Microbiol. Reviews. 2012*). Ο HPV ιός συνολικά, απορρυθμίζει τα σήματα των ανοσολογικών μονοπατιών στα προσβεβλημένα κερατινοκύτταρα. Επιπλέον, οι προ- της λοίμωξης κυτοκίνες και ειδικότερα οι τύπου 1 ιντερφερόνες δεν απελευθερώνονται. Τα σήματα για την ενεργοποίηση των κυττάρων Langerhans, η μετανάστευση και η αναγκαιότητα των στρωματικών δένδριτικών κυττάρων και των μακροφάγων είτε πλέον δεν είναι παρούσες, είτε ανεπαρκείς (*Kanodia S. et al. Curr. Canc. Drug. Targ. 2007*).

Επιπρόσθετα, τα προσβεβλημένα κύτταρα, που αναπαράγονται συνεχώς και εκφράζουν τις ιϊκές πρωτεΐνες, αποβάλλονται από την επιφάνεια του επιθηλίου και απομακρύνονται από τα ανοσολογικά κύτταρα που βρίσκονται στην κυκλοφορία του αίματος. Για τα στελέχη υψηλού κινδύνου της υπεροικογένειας Α, έχουν αναπτυχθεί πολλοί μηχανισμοί ανοσολογικής αποφυγής. Είναι γνωστό, ότι η πρωτεΐνη E6 του στελέχους 16 του HPV ιού παρεμβαίνει στη λειτουργία της τυροσινικής κινάσης 2 (Tyrosine kinase 2, Tyk2), γεγονός που επιδρά στη σηματοδότηση του STAT μονοπατιού (*Li S. et al. Oncogene. 1999, Nees M. et al. J. Virol. 2001*). Αντίστοιχα, η πρωτεΐνη E7 επιδρά με τον επαγόμενο στην ιντερφερόνη παράγοντα απόκρισης-1. Οι πρωτεΐνες E6, E7 έχει αναφερθεί ότι μειώνουν τα επιφανειακά επίπεδα της E-καντχερίνης, γεγονός που πιστεύεται ότι ευθύνεται για το μικρότερο αριθμό των κυττάρων Langerhans (επιθηλιακά δένδριτικά κύτταρα) στην περιοχή της αλλοίωσης (*Perea SE. et al. Int. J. Mol. Med. 2000, Um SJ. et al. Cancer Lett. 2002, Caberg JH. et al. Carcinogenesis. 2008, Matthews K. et al. J. Virol. 2003*).

Επιπρόσθετα, η υψηλού κινδύνου Ε5 πρωτεΐνη μπορεί να επηρεάσει την επεξεργασία των κλασικών ΜCH μορίων στην επιφάνεια του κυττάρου και να δυσχεράνει την έκθεση των ιικών πεπτιδίων στην επιφάνεια των προσβεβλημένων επιθηλιακών κυττάρων (Ashrafi GH. et al. *Int. J. Cancer*. 2006). Η παρουσία αντιγόνων του ιού σε χαμηλά επίπεδα, κατά την απουσία της φλεγμονής, θα μπορούσε να μιμηθεί την ανοσολογική ανοχή περισσότερο από την αντίδραση των κυτταροτοξικών Τ κυττάρων που απομακρύνουν τη νόσο (Doorbar J. et al. *Vaccine*. 2012).

Αν και τέτοιες τακτικές συμβάλλουν στη διατήρηση της αλλοίωσης, στις περισσότερες περιπτώσεις οι αλλοιώσεις υποχωρούν. Η διάλυση της λοίμωξης απαιτεί διασταυρούμενη εκκίνηση των δενδριτικών κυττάρων ακολουθούμενη από διείσδυση Τ-κυττάρων στη θέση της λοίμωξης και αδρανοποίηση της έκφρασης του ιικού γονιδιώματος. Η έκφραση των γονιδίων του HPV ιού περιορίζεται στα κερατινοκύτταρα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη διασταυρούμενη έκθεση των αντιγόνων του ιού από τα κύτταρα Langerhans και είναι αναγκαία για την εισαγωγή ενός δραστικού Τ-κυττάρου. Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι τα δενδριτικά κύτταρα του δέρματος και τα μακροφάγα που ανακτώνται στο προσβεβλημένο επιθήλιο, παίζουν ρόλο κλειδί στην αναγνώριση των αντιγόνων του ιού HPV και στην εισαγωγή αποτελεσματικών αντιδράσεων. Ωστόσο, η μη βέλτιστη χρήση των κωδικονίων από τον HPV ιό, που οδηγεί σε πολύ χαμηλά επίπεδα πρωτεΐνης στα προσβεβλημένα κύτταρα, θα μπορούσε να παρέχει έναν επιπλέον περιορισμό σχετικά με την αποτελεσματικότητα της διασταυρούμενης έκθεσης από τα ενδοεπιθηλιακά δενδριτικά κύτταρα (Doorbar J. et al. *Vaccine*. 2012).

Προηγούμενες έρευνες υποστηρίζουν ότι η αλλοίωση υποχωρεί με αντικατάσταση των ενεργών κυττάρων που έχουν προσβληθεί από τον ιό, με τα φαινομενικά «φυσιολογικά κύτταρα», καθώς τα κύτταρα της βασικής στιβάδας συνεχίζουν να διαιρούνται. Αυτά τα φαινομενικά «φυσιολογικά» κύτταρα, ενδέχεται να περιέχουν ακόμη το γονιδίωμα του ιού, χωρίς όμως επακόλουθη έκφραση των γονιδίων του. Επιπλέον, υπάρχει η άποψη ότι ο κύκλος ζωής του ιού μπορεί να ενεργοποιηθεί ξανά, μετά από ανοσολογική καταστολή ή αλλαγές στα επίπεδα των ορμονών (Εικ. 21). (Doorbar J. et al. *Vaccine*. 2012).



**Εικ. 21.** Η εκκαθάριση του ανοσοποιητικού συστήματος, η λανθάνουσα περίοδος και η πιθανή επανενεργοποίηση.

Αρκετές πρωτεΐνες του HPV ιού παίζουν ρόλο στην ανοσοποιητική διαφυγή καθώς και στην είσοδο στο κύτταρο, συνεισφέροντας στην ικανότητα του ιού να παραμένει στο προσβεβλημένο επιθήλιο. Η ανοσολογική υποχώρηση συμβαίνει στην πλειονότητα των ενεργών λοιμώξεων πιθανότατα ως αποτέλεσμα διασταυρούμενης εκκίνησης των κυττάρων Langerhans (πορτοκαλί στο στάδιο 1). Η ενεργός λοίμωξη (ενεργοποιημένα κύτταρα Langerhans με ανοιχτό μπλε) και η ενεργοποίηση των Τ- κυττάρων (Τ κύτταρα σε ηρεμία με καφέ). Η επακόλουθη ενεργοποίηση της ανοσολογικής απόκρισης μέσω κυττάρων οδηγεί στη συγκέντρωση των ενεργοποιημένων Τ

κυττάρων (μπλε κύκλοι) στην περιοχή της βλάβης (στάδιο 2). Πραγματοποιείται ανοσολογική υποχώρηση με κάποιο βαθμό λεμφοκυτταρικής διήθησης. Η έκφραση των γονιδίων του ιού (χαρακτηρίζεται από κύτταρα άνωθεν της βασικής στιβάδας με κόκκινους πυρήνες, πράσινο κυτταρόπλασμα και κίτρινους πυρήνες) σύμφωνα με κάθε διαφορετικό στάδιο του βιολογικού κύκλου διακόπτεται υπό την παρουσία διηθητικών λεμφοκυττάρων (πιθανότατα ως αποτέλεσμα σηματοδότησης των κυτοκινών), αλλά τα ιικά σωματίδια του ιού δεν προκύπτουν από τη βασική στιβάδα, με περιστασιακές “εκρήξεις” της παραγωγής του ιού (στάδιο 3). Αυτό το μοντέλο επιτρέπει την πιθανότητα επανενεργοποίησης που μπορεί να συμβεί μετά την αλλαγή στην ανοσολογική κατάσταση (στάδιο 4). Έχει προταθεί ότι το ιικό επίσωμα παραμένει για παρατεταμένη περίοδο στα βραδέως ανανεώσιμα επιθηλιακά βλαστοκύτταρα σε απουσία φαινομενικής νόσου. **\*The biology and life-cycle of human papillomaviruses. Vaccine. Review. 2012. 30S; 55-70.**

Πρόσφατες μελέτες σε πειραματικά συστήματα αποδεικνύουν ότι η ύπαρξη του γονιδιώματος στο επιθήλιο της βασικής στιβάδας, για διάστημα πάνω από ένα χρόνο, έχει ως αποτέλεσμα την ύφεση και προτείνουν ένα μοντέλο, στο οποίο το γενετικό υλικό του ιού, διατηρείται στα αρχέγονα κύτταρα (Maglennon GA. et al. *Virology*. 2011). Η έκφραση των γονιδίων σε χαμηλά επίπεδα και ο αριθμός των γονιδιακών αντιγράφων έχουν καταγραφεί σταθερά σε μελέτες ασυμπτωματικής λοίμωξης και ανοσο-επηρεαζόμενης λανθάνουσας φάσης σε ανθρώπους και ζωικά μοντέλα (Schmitt A. et al. *J. Virol.* 1996, Zhang P. et al. *Virology*. 1999, Maran A. et al. *Virology*. 1995, Abramson AL. et al. *J. Med. Virol.* 2004, Kalantari M. et al. *Virology*. 2009).

Μελέτες βασισμένες στην ανοσοκαταστολή υποστηρίζουν ότι η επανενεργοποίηση μπορεί να συμβεί σε περιοχή με προηγούμενη λοίμωξη. Η ύπαρξή της μετά από υποχώρηση, έχει υποδηλωθεί στους ανθρώπους, αν και η διάρκειά της δεν έχει καθοριστεί καλά (Gravitt P. J. *Clin. Invest.* 2011). Επομένως, είναι ξεκάθαρο, ότι για την ανάπτυξη του καρκίνου, ο ιός πρέπει να αποφύγει την ανοσολογική ανίχνευση για χρονικό διάστημα έως ότου συσσωρευθούν οι γενετικές ανωμαλίες (Doorbar J. et al. *Vaccine*. 2012).

Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας έχει μειωμένη ή ανύπαρκτη T- κυτταρική απόκριση στα αντιγόνα στελεχών του HPV ιού. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η ύπαρξη του καρκίνου μπορεί να συνδέεται με αποτυχία της ανοσολογικής απόκρισης ή με ανικανότητα αναγνώρισης των αντιγόνων του ιού. Ωστόσο, δεν υπάρχει ξεκάθαρη σύνδεση ανάμεσα στα είδη των HLA και άλλων δεικτών ευαισθησίας (Ades S. et al. *Int. J. Cancer*. 2008).

## **6. Οι ανοσοϊστοχημικοί δείκτες που χρησιμοποιούνται στη διάγνωση του ιού HPV.**

Η ταύτιση δεικτών, που συνδέουν τη λοίμωξη από στελέχη υψηλού κινδύνου του ιού HPV με τις μοριακές αλλαγές που συμβαίνουν κατά τη νεοπλασματική διαδικασία, μπορεί θεωρητικά να αυξήσει την εξειδίκευση στην ανίχνευση των αλλοιώσεων του τραχήλου της μήτρας. Μεταξύ αυτών των δεικτών συμπεριλαμβάνονται οι πρωτεΐνες: p16, η κυκλίνη B1, και ο δείκτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67 (MIB-1).

### **6.1. Η p16 πρωτεΐνη.**

Η p16 πρωτεΐνη αποτελεί μια από τις ρυθμιστικές πρωτεΐνες του κυτταρικού κύκλου, που επιδρά ανασταλικά στον πολλαπλασιασμό του κυττάρου, μέσω αλληλεπίδρασης με την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος (Rb). Ο ρόλος της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος (Rb) είναι να εμποδίζει την είσοδο των κυττάρων στη φάση S του

κυτταρικού κύκλου και κατ' επέκταση να αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Murphy N. et al. *J. Clin. Pathol.* 2003). Η λειτουργία αυτή τροποποιείται μέσω φωσφορυλίωσης από την κυκλίνη D1 σε συνδυασμό με τις CDK4 και CDK6 κυκλινω-εξαρτώμενες κινάσες. Παρουσία της E7 ογκοπρωτεΐνης του HPV ιού η πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος αδρανοποιείται, γεγονός που εξασφαλίζει τη μεταγραφή των γονιδίων που είναι αναγκαία για την αντιγραφή του DNA και τη μετάβαση από το σημείο G1/S στη φάση S του κυτταρικού κύκλου. Η αδρανοποίηση της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος (Rb), από την E7 ογκοπρωτεΐνη, οδηγεί στην υπερέκφραση της p16 πρωτεΐνης (Wang JL. et al. *Mod. Pathol.* 2005, Sano T. et al. *Am. J. Pathol.* 1998, Tringler B. et al. *Hum. Pathol.* 2004, Murphy N. et al. *J. Clin. Pathol.* 2003).

Η έντονη υπερέκφραση της p16 πρωτεΐνης αποδεικνύεται ανοσοϊστοχημικά χρησιμοποιώντας μονοκλωνικά αντισώματα. Συγκεκριμένα, σε μελέτες που αφορούν τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας και προκαρκινικές αλλοιώσεις αυτού, από στελέχη υψηλού κινδύνου του ιού όπως τα στελέχη 16 και 18, παρατηρείται έντονη και διάχυτη, πυρηνική και κυτταροπλασματική χρώση της p16 πρωτεΐνης (Sano T. et al. *Am. J. Pathol.* 1998, Tringler B. et al. *Hum. Pathol.* 2004, Murphy N. et al. *J. Clin. Pathol.* 2003, Agoff SN. et al. *Mod. Pathol.* 2003, Wang SS. et al. *Cancer. Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2004, Christal JL. et al. *Pathol. Case. Rev.* 2006).

Τα υψηλού κινδύνου στελέχη 16, 18 του HPV ιού αποτελούν κλινικά τους σημαντικότερους ογκογόνους τύπους που ενοχοποιούνται για την ανάπτυξη του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Αλλοιώσεις που σχετίζονται με στελέχη χαμηλού κινδύνου, όπως τα στελέχη 6 και 11, παρουσιάζουν εστιακή και ασθενή ανοσοϊστοχημική έκφραση για την p16 πρωτεΐνη και δε σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του τραχήλου της μήτρας (Redman R. et al. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2008).

Η αξία της p16 πρωτεΐνης, ως διαγνωστικού δείκτη, στις δυσπλαστικές αλλοιώσεις και στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας είναι πλέον αποδεδειγμένη. Διάχυτη χρώση της p16 παρατηρείται ανοσοϊστοχημικά σε όλες σχεδόν τις προκαρκινικές αλλοιώσεις που προκαλούνται από στελέχη υψηλού κινδύνου του ιού, καθώς και σε καρκινώματα του πλακώδους και του αδενικού επιθηλίου του τραχήλου της μήτρας. Ωστόσο, σε αντιδραστικές καταστάσεις, η χρώση στις περισσότερες περιπτώσεις μπορεί να είναι αρνητική ή εστιακά θετική (Keating JT. et al. *Am. J. Surg. Pathol.* 2001, Klaes R. et al. *Int. J. Cancer.* 2001, Negri G. et al. *Am. J. Surg. Pathol.* 2003, O'Neill CJ. et al. *Adv. Anat. Pathol.* 2006).

Σε βιοψίες τραχήλου με αλλοιώσεις τύπου CIN I, η p16 ανοσοϊστοχημικά εκφράζεται διάχυτα στο 60% των περιπτώσεων και σχετίζεται ειδικότερα με στελέχη υψηλού κινδύνου του ιού, παρόλο που τα συγκεκριμένα στελέχη μπορεί να ανιχνευτούν και σε αλλοιώσεις με αρνητική p16 χρώση (Agoff SN. et al. *Mod. Pathol.* 2003, Benevolo M. et al. *Mod. Pathol.* 2006, Klaes R. et al. *Int. J. Cancer.* 2001). Αξίζει να σημειωθεί ότι η ανοσοϊστοχημική χρώση για την p16 πρωτεΐνη εμφανίζει μεγαλύτερη εξειδίκευση και λιγότερη ευαισθησία για τις CIN αλλοιώσεις. Ασθενής ή αρνητική χρώση δεν αποκλείει την πιθανότητα δυσπλασίας του πλακώδους επιθηλίου του τραχήλου της μήτρας (Branca M. et al. *Int. J. Gynecol. Pathol.* 2004). Πιθανές εξηγήσεις για την ασθενή ή μη ανοσοχρώση περιλαμβάνουν τόσο προβλήματα τεχνικής φύσεως όσο και το γεγονός ότι όλες οι δυσπλαστικές αλλοιώσεις δεν προκαλούνται από στελέχη υψηλού κινδύνου (Burger RA. et al. *J. Natl. Cancer Inst.* 1996, Bosch FX. et al. *J. Natl. Cancer Inst.* 1995, Didlot-Rousseau MN. et al. *Br. J. Cancer.* 2006).

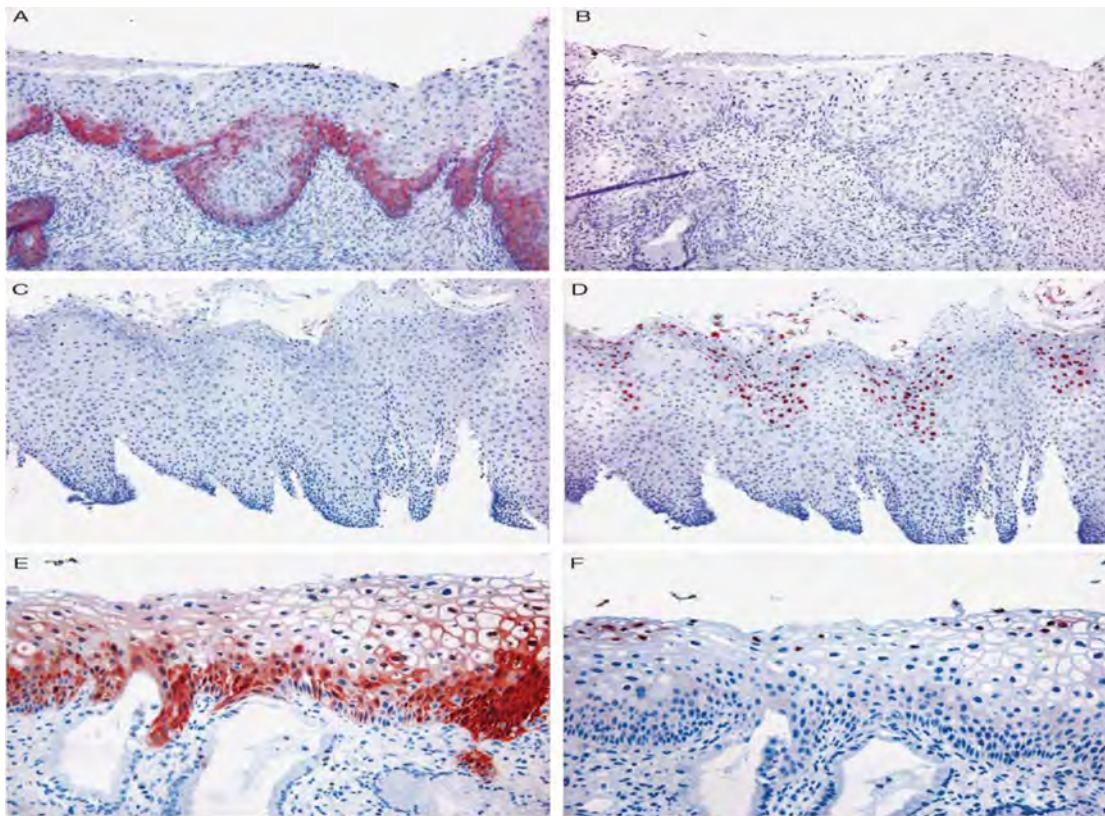
Επιπλέον, άλλη πιθανή εξήγηση αποτελεί το γεγονός ότι κάποια από τα στελέχη υψηλού κινδύνου ή άλλοι τύποι του ιού, απορρυθμίζουν τα ίδια κυτταρικά μονοπάτια, ή ότι



η κλωνική εξέλιξη έχει ως κατάληξη την έλλειψη της έκφρασης της p16 (*Mulvany N. et al. Pathology. 2008*).

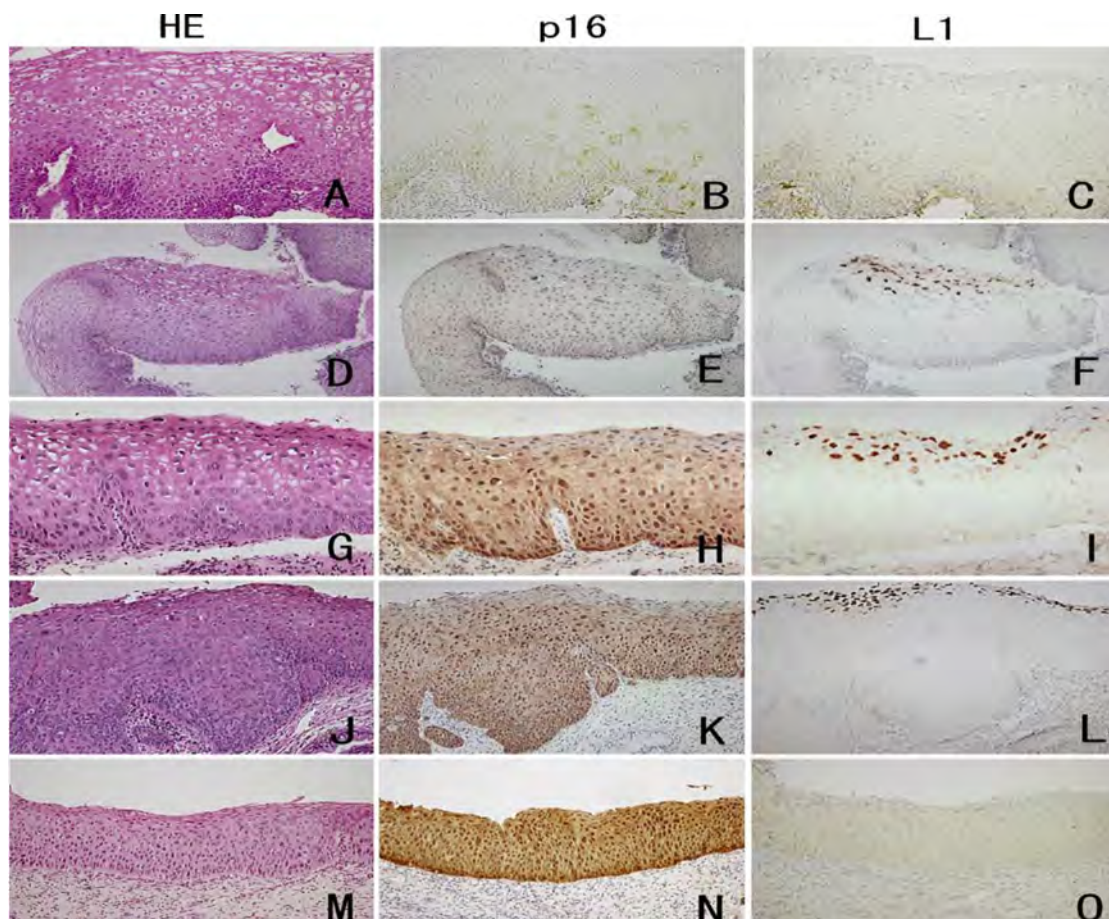
Το 2008, ο Negri και οι συνεργάτες του μελέτησαν τη σχέση που υπάρχει ανάμεσα στις πρωτεΐνες p16 και L1 του ιού HPV στις CIN αλλοιώσεις. Η L1 είναι πρωτεΐνη της κάψας του ιού, που εκφράζεται στην αρχή της παραγωγικής φάσης της καρκινογένεσης και προοδευτικά χάνεται στην τελική φάση του πολλαπλασιασμού, όταν η p16 υπερεκφράζεται. Η έκφραση της p16 στις αλλοιώσεις τύπου CIN I, είναι πυρηνική και/ή κυτταροπλασματική και εντοπίζεται στο κατώτερο 1/3 του επιθηλίου, ενώ στις αλλοιώσεις τύπου CIN III η χρώση της p16 εκτείνεται σε όλο το πάχος του επιθηλίου (Εικ. 22). Όταν η πρωτεΐνη L1 εκφράζεται, παρουσιάζει πυρηνική χρώση στα επιφανειακά κύτταρα του δυσπλαστικού επιθηλίου, συνοδευόμενη συχνά από κοιλοκυττάρωση. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης, αποδεικνύουν ότι ο συνδυασμός των πρωτεϊνών L1 και p16 μπορεί να χρησιμεύσει στην εκτίμηση του βιολογικού ρίσκου των χαμηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακών αλλοιώσεων του τραχήλου της μήτρας. Σε σύγκριση με τη χρώση p16 μεμονωμένα, η συσχέτιση με την L1 μπορεί να είναι χρήσιμη στην εκτίμηση εκείνων των αλλοιώσεων που βρίσκονται ακόμη στην παραγωγική φάση της καρκινογένεσης. Τα αποτελέσματα μπορούν να ενταχθούν σε τέσσερις κατηγορίες: α) p16 θετική, L1 αρνητική: Οι αλλοιώσεις αυτές δεν είναι πλέον παραγωγικές για την L1, αφού έχει γίνει ήδη αναστολή του «μονοπατιού» της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος (Rb) και επακόλουθη θετικότητα για την p16. Το πρότυπο αυτό παρατηρείται σε όλες τις τύπου CIN III αλλοιώσεις και στις περισσότερες τύπου CIN I αλλοιώσεις και μπορεί να χαρακτηριστεί ως πρότυπο υψηλού κινδύνου. β) p16 θετική, L1 θετική: Στην περίπτωση αυτή, οι αλλοιώσεις εξακολουθούν να είναι παραγωγικές για την L1 παρόλο που το «μονοπάτι» του ρετινοβλαστώματος (Rb) είναι ήδη σε καταστολή και το πρότυπο χαρακτηρίζεται ακαθόριστο. γ) p16 αρνητική, L1 θετική: Οι αλλοιώσεις με τα χαρακτηριστικά αυτά εξακολουθούν να είναι παραγωγικές με ενεργό ακόμη το «μονοπάτι» του pRB. Μπορεί να προκαλούνται από στελέχη χαμηλού ή υψηλού κινδύνου του ιού HPV. Στην περίπτωση αυτή το πρότυπο χαρακτηρίζεται ως πρότυπο χαμηλού κινδύνου. δ) p16 αρνητική, L1 αρνητική: Στην περίπτωση αυτή οι αλλοιώσεις δεν είναι παραγωγικές και δεν παρατηρείται καταστολή του Rb μονοπατιού και το πρότυπο είναι αρνητικό (*Negri G. et al. Am. J. Surg. Pathol. 2008*).





**Εικ. 22.** Ανοσοϊστοχημεία των p16 και L1 πρωτεϊνών σε αλλοιώσεις τύπου CIN I. Α και Β: CIN I με διάχυτη θετική χρώση p16 στο κατώτερο 1/3 του δυσπλαστικού επιθηλίου (Α), L1 (Β) δεν εκφράζεται (πρότυπο υψηλού κινδύνου). C και D: CIN I με έντονη έκφραση των HPV L1 (D), p16 (C) δεν εκφράζεται (πρότυπο χαμηλού κινδύνου). Ε και F: CIN I με έκφραση της p16 (Ε) και της L1 (F) (απροσδιόριστο πρότυπο) **\*p16 INK4a and HPV L1 immunohistochemistry is helpful for estimating the behavior of low-grade dysplastic lesions of cervix uteri. Am. J. Surg. Pathol. 2008. 32; 1715-20.**

Επιπλέον, η μελέτη του Hoshikawa και των συνεργατών του, που ασχολήθηκε με τη σχέση ανάμεσα στην καψιδική πρωτεΐνη L1 του ιού και της p16 απέδειξε, ότι το πρότυπο L1(-)/p16(-) σχετίζεται με τη φάση εξασθένησης στις αλλοιώσεις CIN I-II, ενώ το πρότυπο L1(+)/p16(-), παρατηρήθηκε μόνο σε τυχαία επιλεγμένες περιπτώσεις και στις περιπτώσεις υποχώρησης της βλάβης, και όχι στις αλλοιώσεις CIN III. Επομένως, τα πρότυπα αυτά μπορούν να χαρακτηριστούν ως αρχικά ή χαμηλού κινδύνου. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι αλλοιώσεις με L1(+)/p16(+), της υποκατηγορίας των περιπτώσεων εξέλιξης μετατράπηκαν σε L1(-)/p16(+), κατά την επανάληψη της βιοψίας μετά την παρακολούθηση. Ωστόσο κάποιες τύπου CIN III αλλοιώσεις που εξακολουθούν να είναι HPV παραγωγικές και εμφανίζουν το πρότυπο L1(+)/p16(+) εξακολουθούν να υπάρχουν, ενώ η υποομάδα των φυσιολογικών και των χαμηλού βαθμού δυσπλαστικών αλλοιώσεων με πρότυπο L1(-)/p16(-) μπορεί να εξελιχθεί κατευθείαν σε αλλοιώσεις τύπου CIN III με L1(-)/p16(+), εκτός εάν εκείνες οι αλλοιώσεις περνούν μέσω μιας L1(+) φάσης, ενδεικτικής παραγωγικού σταδίου για τον ιό (Εικ 23). (Hoshikawa S. et. al. *Pathol- Res.Pract.* 2010).

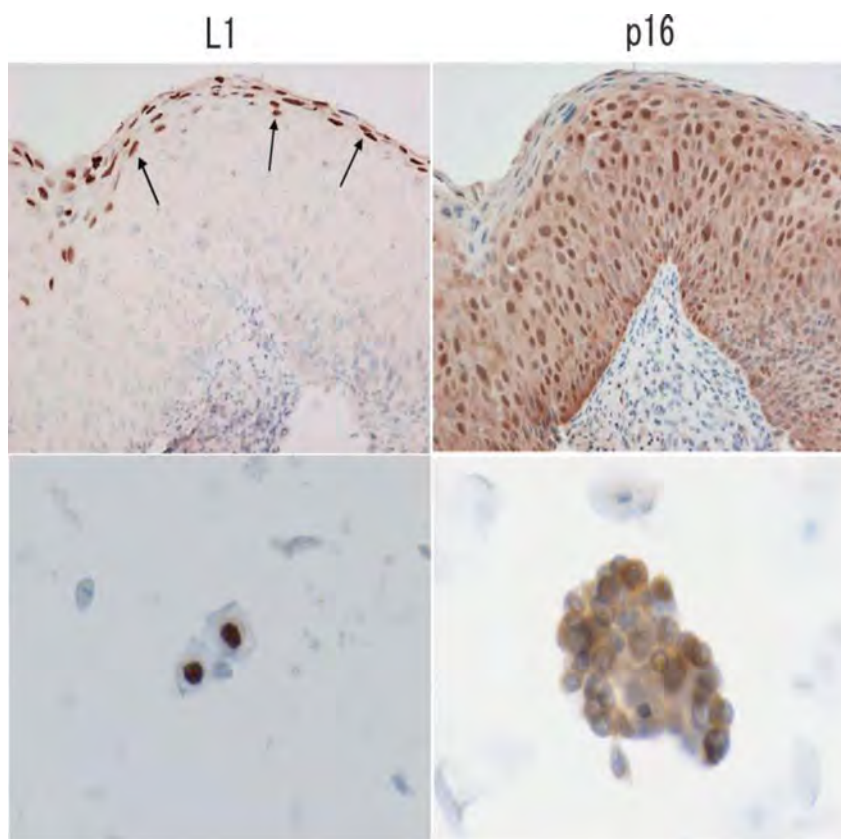


**Εικ. 23.** Χρώση H/E (αριστερή στήλη) και ανοσοϊστοχημική έκφραση των p16 (μεσαία στήλη) και L1 (δεξιά στήλη) πρωτεϊνών. (A–C) CIN I, (D–F) CIN I, (G–I) CIN II, (J–L) CIN III, (M–O) CIN III. Στη μεσαία στήλη (H, K, N) παρατηρείται θετική ανοσοχρώση για την p16 πρωτεΐνη στα δυσπλαστικά κύτταρα της ενδιάμεσης προς τη βασική στιβάδα του επιθηλίου. (B) παρατηρείται μόνο ασθενή ανοσοχρώση του p16 στην ενδιάμεση κυτταρική στιβάδα, και (E) αρνητική ανοσοχρώση για p16. Στη δεξιά στήλη, (F, I, L) παρατηρείται θετική ανοσοχρώση για την L1 καψιδική πρωτεΐνη στους πυρήνες των κυττάρων στην επιφανειακή στιβάδα του επιθηλίου. (C, O) είναι αρνητικές για την L1 πρωτεΐνη. **Immunohistological analysis of HPV L1 capsid protein and p16 protein in low grade dysplastic lesions of the uterine cervix. Pathol Res. Pract. 2010. 206; 816-20.**

Μια άλλη μελέτη που εστίασε στη σχέση των πρωτεϊνών p16 και L1 σε κυτταρολογικά δείγματα από αλλοιώσεις του τραχήλου της μήτρας, έδειξε την ελάττωση της πρωτεΐνης L1, καθώς η βλάβη μεταπίπτει από LGSIL σε HGSIL και τελικά σε πλακώδες καρκίνωμα, ενώ η χρώση για την p16 πρωτεΐνη παρέμεινε θετική σε όλες τις HGSIL αλλοιώσεις και στις αλλοιώσεις με πλακώδες καρκίνωμα (Yoshida T. *et al. Cancer. 2008*).

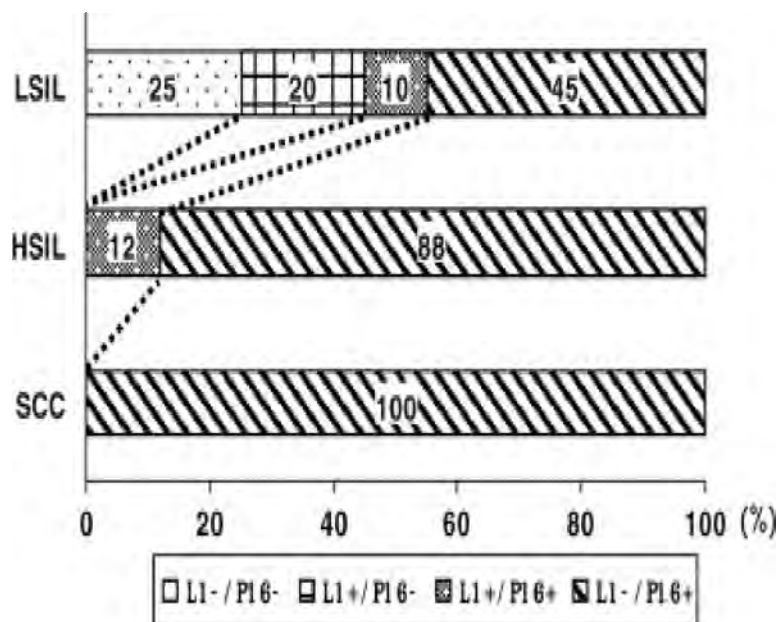
Ανοσοϊστοχημικά παρατηρήθηκε έκφραση της p16 πρωτεΐνης στα δυσπλαστικά κύτταρα που εντοπίζονται στην περιοχή της βασικής στιβάδας μέχρι και την επιφανειακή στιβάδα του επιθηλίου. Αντίθετα, έκφραση της L1 πρωτεΐνης παρατηρήθηκε στα κύτταρα ανώτερων στιβάδων του επιθηλίου και όχι στα κύτταρα της βασικής- παραβασικής στιβάδας (Εικ. 24).





**Εικ. 24.** Ανοσοϊστοχημική έκφραση της καψιδικής πρωτεΐνης L1 και της p16. Οι ανώτερες εικόνες δείχνουν ιστολογική περίπτωση CIN III ως θετικός μάρτυρας, ενώ οι κάτω εικόνες δείχνουν υψηλόβαθμη πλακώδη ενδοεπιθηλιακή βλάβη (HSIL) σε κυταρολογικό υλικό (Liquid-Based Cytology, LBC). Οι αριστερές εικόνες δείχνουν θετική ανοσοχρώση για την καψιδική πρωτεΐνη L1 στους πυρήνες των κυττάρων στην επιφανειακή στιβάδα του επιθηλίου σε ιστολογικό δείγμα με αλλοίωση τύπου CIN III (μαύρα τόξα) και σε κύτταρα LBC δείγματος (κάτω). Στις δεξιές εικόνες παρατηρείται θετική ανοσοχρώση για p16 στα δυσπλαστικά κύτταρα της ενδιάμεσης προς τη βασική στιβάδα ιστολογικού δείγματος με αλλοίωση τύπου CIN III (άνω) και δυσκαρυωτικά κύτταρα HSIL σε LBC δείγμα (κάτω). **Immunochemical analysis of HPV- L1capsid protein and p16 protein in liquid –based cytology samples from uterine cervical lesions. Cancer. 2008. 114; 83-88.**

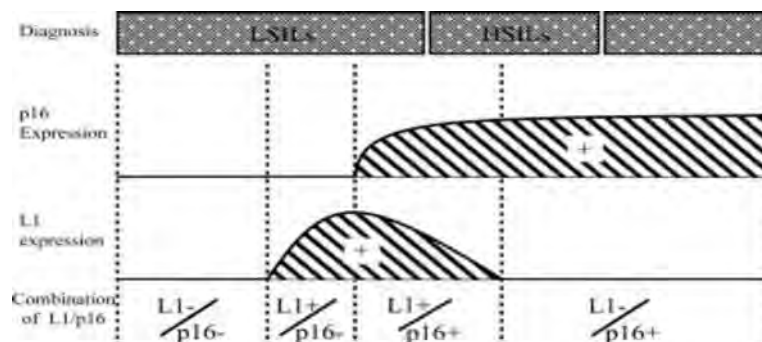
Η συνδυασμένη ανάλυση της έκφρασης των πρωτεϊνών L1 και p16 οδήγησε στην κατάταξη του προτύπου ανοσοϊστοχημικής έκφρασης σε τέσσερις ομάδες: α) L1(-)/p16(-), β) L1(+)/p16(-), γ) L1(+)/p16(+) και δ) L1(-)/p16(+) (Εικ. 25).



**Εικ. 25.** Έκφραση των p16 και L1 πρωτεϊνών σε δείγματα υγρής κυταρολογίας (LBC). Και οι 4 κατηγορίες L1/p16 ανιχνεύονται μεταξύ των LSILs, αλλά μόνο οι L1(+)/p16(+) και L1(-)/p16(+) περιπτώσεις ανιχνεύονται μεταξύ των HSILs. Όλες οι περιπτώσεις των πλακωδών καρκινωμάτων (SCC) εμφανίζουν το συνδυασμό L1(-)/p16(+). **Immunohistochemical analysis of HPV-L1 capsid protein and p16 protein in liquid-based cytology samples from uterine cervical lesions. Cancer. 2008. 114; 83-88.**

Το πρότυπο L1(-)/p16(-), δείχνει την ύπαρξη ιϊκού DNA, χωρίς αναπαραγωγή του ιού ή αλλαγή του κυτταρικού κύκλου, υποδηλώνοντας ότι η αλλοίωση βρίσκεται σε λανθάνουσα ή μη δυσπλαστική φάση. Το πρότυπο L1(+)/p16(-), δείχνει ότι το γενετικό υλικό του ιού βρίσκεται σε παραγωγική ή ενεργό μορφή, χωρίς μεταβολή του κυτταρικού κύκλου, γεγονός που υποδηλώνει ότι η αλλοίωση βρίσκεται σε παραγωγική αλλά μη δυσπλαστική κατάσταση. Το πρότυπο L1(+)/p16(+), υποδηλώνει αλλαγή στον κυτταρικό κύκλο του ιού με παραγωγική και/ή ενεργό μορφή του ιού και δείχνει ότι η βλάβη βρίσκεται σε αρχικό στάδιο δυσπλασίας. Τέλος, το πρότυπο L1(-)/p16(+) αποδεικνύει είτε λοίμωξη σε λανθάνουσα φάση είτε ενσωμάτωση του ιϊκού DNA στο γενετικό υλικό του κυττάρου ξενιστή, υποδηλώνοντας ότι η βλάβη βρίσκεται σε τελικό ή πιο προχωρημένο στάδιο δυσπλασίας (Yoshida T. et al. Cancer. 2008).

Επομένως, η αλληλουχία της έκφρασης του λόγου L1/p16 μπορεί και αλλάζει με την σειρά L1(-)/p16(-), L1(+)/p16(-), γ) L1(+)/p16(+) και L1(-)/p16(+), σε συνδυασμό με την αύξηση του βαθμού της αλλοίωσης (Εικ. 26).



**Εικ. 26.** Προτεινόμενο σχήμα για την αλληλουχία της L1 καψιδικής πρωτεΐνης και των επιπέδων έκφρασης της p16 με ταυτόχρονη αύξηση του βαθμού των αλλοιώσεων του τραχήλου της μήτρας. Η έκφραση της p16 παρατηρείται σε υποσύνολο των LSILs και σχεδόν σε όλες τις HSILs και τα SCCs, υποδεικνύοντας αλλαγή του κυτταρικού κύκλου στις αλλοιώσεις αυτές. Έκφραση της L1 πρωτεΐνης, που αναπαριστά την παραγωγή του HPV ιού, με ή χωρίς έκφραση της p16, παρατηρείται στα υποσύνολα των LSILs και HSILs και φαίνεται να υποδηλώνει αρχικό στάδιο λοίμωξης από τον ιό HPV. *\*Immunochemical analysis of HPV-L1 capsid protein and p16 protein in liquid-based cytology samples from uterine cervical lesions. Cancer. 2008. 114; 83-88.*

Η έλλειψη της L1 καψιδικής πρωτεΐνης, μπορεί να αντανakλά μεταβολές στα «μονοπάτια» του παράγοντα μεταγραφής, ο οποίος μπορεί να ευθύνεται για τη διαταραχή στην ωρίμανση των κυττάρων της βασικής μεμβράνης. Επειδή η καψιδική πρωτεΐνη L1 είναι ο μέγιστος στόχος των ανοσολογικών αντιδράσεων, η έλλειψη της στα αρχικά στάδια της διαδικασίας μεταμόρφωσης μπορεί να οδηγήσει σε μη αποτελεσματική πρόκληση των ανοσολογικών αντιδράσεων. Συνεπώς, η έλλειψη της L1 μπορεί να συμβαίνει προκειμένου να ελαττωθούν οι ανοσολογικές αντιδράσεις, ώστε να εξασφαλιστεί η μεταμόρφωση των ανώριμων επιθηλιακών κυττάρων (*McMurray HR. et al. Int. J. Exp. Path. 2001, Hagensee ME. et al. J. Infect. Dis. 2000*).

Ο συνδυασμός της ανοσοϊστοχημικής χρώσης της καψιδικής L1 πρωτεΐνης και της p16 σε κυτταρολογικά δείγματα αλλοιώσεων του τραχήλου της μήτρας, φαίνεται να είναι χρήσιμος για την έγκαιρη διάγνωση προκαρκινικών αλλοιώσεων, γιατί η έκφραση του κλάσματος L1/ p16, βοηθά στην ανίχνευση ατόμων με κίνδυνο υποτροπής, καθώς και στην παρακολούθηση των ασθενών (*Yoshida T. et al. Cancer. 2008*).

Μια άλλη μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριό μας, στο Τμήμα Παθολογικής Ανατομικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας, βασίστηκε στην εξέταση μιας σειράς βιοψιών τραχήλου μήτρας και παρασκευασμάτων LEEP (Loop Electrosurgical Excision Procedure) με λεπτομερή τυποποίηση του HPV ιού, για διάφορα πρότυπα ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του p16, και πιθανούς συνδυασμούς με τη μορφολογία και τα διάφορα στελέχη του ιού. Επιπλέον, έγινε ανασκόπηση της βιβλιογραφίας για την ανοσοϊστοχημική έκφραση της p16 πρωτεΐνης, σε βιοψίες με ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις του πλακώδους επιθηλίου του τραχήλου της μήτρας και μη νεοπλαστικών επιθηλίων με σκοπό να συνοψιστούν οι υπάρχουσες πληροφορίες και τα ερωτήματα που εξακολουθούν να υπάρχουν σε πρακτικό και θεωρητικό επίπεδο (*Kostopoulou E. et al. Eur. J. Gynaec. Oncol. 2011*).

Η μελέτη αυτή, σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες στη βιβλιογραφία απέδειξε ότι η ανοσοϊστοχημική έκφραση της p16 πρωτεΐνης, αυξάνεται στις ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις. Όλες οι υψηλού βαθμού αλλοιώσεις, σε όλες τις θετικές περιπτώσεις, έχουν χαρακτηριστεί από διάχυτη ανοσοϊστοχημική έκφραση της p16 στο δυσπλαστικό επιθήλιο. Υπάρχει επαναλαμβανόμενη καταγραφή της σχέσης της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της p16 πρωτεΐνης, της ανίχνευσης του ιού και της ανίχνευσης των αλλοιώσεων SIL. Ωστόσο, η ύπαρξη ενός δείκτη που δείχνει ανοσοθετικότητα σε κάθε ενδοεπιθηλιακή αλλοίωση του πλακώδους επιθηλίου στον τράχηλο της μήτρας ή σε κάθε σχετιζόμενη υψηλού κινδύνου-HPV αλλοίωση δεν είναι πάντοτε επαναλήψιμη. Παρά τη μη αμφισβητούμενη επίδραση των τεχνικών προβλημάτων και των διαφορών λόγω γεωγραφικής ετερογένειας των διαφόρων στελεχών του HPV ιού, πάντα εμφανίζεται μια μικρή ομάδα HSIL αλλοιώσεων που δεν παρουσιάζουν καμία ανοσοέκφραση (*Kostopoulou E. et al. Eur. J. Gynaec. Oncol. 2011*).

Η παραπάνω μελέτη ενισχύει το ρόλο της p16 ανοσοχρώσης ως βοηθητικό τεστ σε συνδυασμό με προσεκτική μορφολογική εκτίμηση. Η ανοσοϊστοχημική χρώση για την p16 πρωτεΐνη έχει προβληθεί αρκετά τα τελευταία χρόνια ως βοηθητικό, οικονομικό τεστ, το

οποίο θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί αντί του HPV-DNA τεστ σε βιοψίες που είναι προβληματικές στη διάγνωση. Ωστόσο, στις περισσότερες περιπτώσεις, στερείται ευαισθησίας ή εξειδίκευσης στο 100%. Η αντίληψη των διαφόρων προτύπων θετικότητας και οι περιορισμοί της μπορεί να επιτρέψουν μια πιο κατάλληλη χρήση σε συγκεκριμένες κλινικοπαθολογικές ομάδες, με τη βοήθεια της τυποποίησης της χρώσης και της εκτίμησης των πρωτοκόλλων (*Kostopoulou E. et al. Eur. J. Gynaec. Oncol. 2011*).

## 6.2. Η κυκλίνη-B1.

Η κυκλίνη-B1 αποτελεί ρυθμιστική υποομάδα της κινάσης CDC2 (Cell Division Control protein kinase 2). Εκφράζεται στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου και η συγκέντρωση της στο στάδιο G2 του κυτταρικού κύκλου είναι προαιπατούμενη για την έναρξη της μίτωσης. Η έκφραση της κυκλίνης-B1 έχει βρεθεί ότι εξαρτάται από τον τύπο του ιού HPV. Μπορεί να υπερεκφράζεται στα στελέχη υψηλού κινδύνου του ιού, σε αντίθεση με την cdc2 που εκφράζεται πάντα, ανεξαρτήτως στελέχους του ιού (*Cho NH. et al. Cancer Lett. 2006*).

Η μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριό μας, στο Τμήμα Παθολογικής Ανατομικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας, έδειξε ότι η έκφραση της κυκλίνης-B1 ανοσοϊστοχημικά, αυξάνεται στις ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις του τραχήλου της μήτρας, γεγονός που συμφωνεί με τις περισσότερες μέχρι τώρα μελέτες. Επιπλέον, σε σχέση με τη μελέτη του *Southerns και των συνεργατών του* (*Southerns SA. et al. Lab. Invest. 2000*), παρατηρήθηκε έντονη αύξηση της κυκλίνης-B1 στο δυσπλαστικό επιθήλιο ανοσοϊστοχημικά. Το πρότυπο ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της κυκλίνης-B1 στις LGSIL αλλοιώσεις, σχετίζεται έντονα με την παρουσία του HPV ιού (*Kostopoulou E. et al. Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol. 2009*).

Στη μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο τμήμα μας, παρατηρήσαμε έναν αξιόλογο αριθμό δυσπλαστικών κυττάρων που εκφράζει την κυκλίνη-B1 στις ανώτερες στιβάδες του επιθηλίου. Στις HGSIL αλλοιώσεις, η ανοσοϊστοχημική έκφραση αντανakλά μέρος της αύξησης στο νεοπλασματικό κυτταρικό πληθυσμό. Το εύρημα αυτό ήταν χαρακτηριστικό για τις HGSIL αλλοιώσεις και σπάνια παρατηρήθηκε σε άλλες αλλοιώσεις. Επομένως, στις περιπτώσεις που η μορφολογία από μόνη της δεν μπορεί να βοηθήσει στη διάκριση των HGSIL από τις LGSIL αλλοιώσεις, η χρήση ενός συμπληρωματικού δείκτη όπως η κυκλίνη B1 μπορεί να συμβάλλει ουσιαστικά στη διάγνωση. Τα παραπάνω ευρήματα συμφωνούν με το ρόλο της κυκλίνης στον κυτταρικό κύκλο, καθώς και με μελέτες που έχουν χρησιμοποιήσει τον δείκτη MIB-1 προκειμένου να εκτιμήσουν το κλάσμα εξάπλωσης των δυσπλαστικών αλλοιώσεων στο πλακώδες επιθήλιο του τραχήλου της μήτρας (*Kostopoulou E. et al. Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol. 2009*).

Στις χαμηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις και σε ορισμένες περιπτώσεις ASCUS, παρατηρήθηκε διαφορετική κατανομή της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της κυκλίνης-B1. Το χαρακτηριστικό του προτύπου αυτού, περιλαμβάνει μια σποραδική χρώση της κυκλίνης-B1 στα ώριμα, πλακώδη, πολυγωνικά κύτταρα που βρίσκονται λίγο πιο πάνω από τη βασική στιβάδα. Το συγκεκριμένο αυτό πρότυπο (πρότυπο Β στη μελέτη), πιθανά αντανakλά τα αρχικά στάδια στην αναστολή της μετάβασης από τη φάση G2 στη φάση M του κυτταρικού κύκλου, φαινόμενο που είναι γνωστό σε όλη τη διάρκεια της λοίμωξης από τον HPV ιό σε *in vitro* πειράματα. Τα συγκεκριμένα κύτταρα που εκφράζουν την κυκλίνη-B1 μπορούν να χαρακτηριστούν ως «προκοιλοκύτταρα» (*Kostopoulou E. et al. Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol. 2009*).

Η εξέλιξη των «προκοιλοκυττάρων» σε κοιλοκύτταρα εξαρτάται από ποικίλους παράγοντες. Τα κοιλοκύτταρα αντιπροσωπεύουν μια κλασσική μορφολογική εκδήλωση της

λοίμωξης από τον HPV ιό, που ενδέχεται να αναγνωριστεί ή όχι σε συγκεκριμένο δείγμα και επομένως έρευνα για τα «προκοιλοκύτταρα» σε συνδυασμό με τη χρώση της κυκλίνης-B1, μπορεί να φανεί χρήσιμη σε συγκεκριμένες περιπτώσεις (*Kostopoulou E. et al. Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol. 2009*).

### 6.3. Ο δείκτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού MIB-1

Ο δείκτης MIB-1 ανιχνεύεται με μονοκλωνικό αντίσωμα που σχετίζεται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό του πυρηνικού αντιγόνου Ki-67 και εκφράζεται σε όλες τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου, με εξαίρεση τη G0 φάση.

Ο ρόλος του δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού MIB-1 στη διάγνωση της παθολογίας του τραχήλου της μήτρας συνοψίζεται στα παρακάτω (*Mittal K. Adv. Anat. Pathol. 1999*):

- 1) Πρότυπο ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του MIB-1 στο φυσιολογικό εξωτράχηλο και ενδοτράχηλο.
- 2) Διαχωρισμός δυσπλασίας και ατροφίας.
- 3) Διαχωρισμός των κονδυλωμάτων από την πλακώδη μετάπλαση και τη φλεγμονή.
- 4) Εκτίμηση του βαθμού δυσπλασίας.
- 5) Εκτίμηση των ενδοτραχηλικών αλλοιώσεων.
- 6) Εκτίμηση των βιοψιών με μηχανικές αλλοιώσεις και αλλοιώσεις καυτηριασμού.
- 7) Εφαρμογές στην κυτταρολογία.

#### 6.3.1. Το πρότυπο ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού MIB-1 στο φυσιολογικό εξωτράχηλο και ενδοτράχηλο.

Η έκφραση του MIB-1 στο φυσιολογικό εξωτράχηλο εντοπίζεται κυρίως στα κύτταρα των παραβασικών στιβάδων του επιθηλίου. Περίπου 5-30% των κυττάρων δίνουν θετική ανοσοχρώση για το δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού MIB-1 στο 1/3 της βασικής στιβάδας του επιθηλίου (*Mittal K. Adv. Anat. Pathol. 1999*).

Τα βασικά κύτταρα λειτουργούν ως αποθεματικά κύτταρα, δε διαιρούνται συχνά και η έκφραση του MIB-1 κυμαίνεται σε χαμηλά επίπεδα (0-7%). Η μισή επιφάνεια του επιθηλίου είναι αρνητική για τη χρώση του MIB-1 σε περιοχές με πάχος τουλάχιστον εννέα στιβάδων. Ωστόσο, απαιτείται προσοχή στην εκτίμηση των αλλοιώσεων, σε βιοψίες στις οποίες απουσιάζει το επιθήλιο, καθώς ορισμένα θετικά κύτταρα για MIB-1 ανοσοχρώση ενδέχεται να βρίσκονται στο μέσο ή στην επιφάνεια του επιθηλίου. Κυκλική διάταξη των κυττάρων αυτών αποτελεί ένδειξη της εντόπισης τους δίπλα στις υποεπιθηλιακές θηλές. Στο φυσιολογικό ενδοτράχηλο ο δείκτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού MIB-1 εκφράζεται σε ποσοστό μικρότερο του 10% των κυττάρων (*van Hoesven KH. et al. Int. J. Gynecol. Pathol. 1997*).

#### 6.3.2. Ο διαχωρισμός της δυσπλασίας από την ατροφία.

Η δυσπλασία και η ατροφία εκφράζουν έλλειψη της ωρίμανσης και υπάρχει κίνδυνος μη διαχωρισμού των περιπτώσεων αυτών με παρατήρηση της χρώσης αιματοξυλίνης – ηωσίνης (H/E). Ωστόσο, οι αλλοιώσεις αυτές εμφανίζουν διάφορα πρότυπα έκφρασης του δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού MIB-1, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για το διαχωρισμό τους (*Mittal K. Adv. Anat. Pathol. 1999*).

Το δυσπλαστικό επιθήλιο παρουσιάζει αυξημένη έκφραση του δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού MIB-1 αντίστοιχη με την έλλειψη ωρίμανσης. Η απουσία έκφρασης του MIB-1 αποτελεί εύρημα σε περιπτώσεις ατροφίας. Αντίθετα, έκφραση της χρώσης σε ποσοστό  $\geq 20\%$  στο 1/3 της βασικής στιβάδας του επιθηλίου,  $\geq 5\%$  στο μέσο 1/3 του επιθηλίου και οποιοδήποτε κυττάρου στο 1/3 της επιφάνειας του επιθηλίου είναι χαρακτηριστικά δυσπλασίας και όχι ατροφίας (Mittal K. *Adv. Anat. Pathol.* 1999).

Ακόμη κι όταν λείπει ο σωστός προσανατολισμός, η απουσία έκφρασης του δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού MIB-1 υποστηρίζει τη διάγνωση ατροφίας, ενώ έκφραση του MIB-1 σε ποσοστό  $\geq 20\%$  των κυττάρων στις μεταεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, που δεν βρίσκονται σε θεραπεία αντικατάστασης των οιστρογόνων, υποστηρίζει τη διάγνωση της δυσπλασίας (Mittal K. *Adv. Anat. Pathol.* 1999).

### 6.3.3. Ο διαχωρισμός των κονδυλωμάτων από την πλακώδη μετάπλαση και τη φλεγμονή.

Συχνά, η διάκριση των αλλαγών που παρατηρούνται στις αλλοιώσεις των κονδυλωμάτων έναντι της φλεγμονής ή της πλακώδους μετάπλασης στον τράχηλο της μήτρας δεν είναι εύκολη. Ωστόσο γνωρίζουμε ότι τα κονδυλώματα εμφανίζουν αυξημένη δραστηριότητα πολλαπλασιασμού (Mittal K. *et al. Int. J. Gynecol. Pathol.* 1998).

Ο Mittal και οι συνεργάτες του, στη μελέτη με τίτλο “Utility of proliferation – associated marker MIB-1 in evaluating lesions of the uterine cervix. *Adv. Anat. Pathol. Review.* 1999. 6;177-85” κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι  $>6$  μιτώσεις/ 10 HPF και έκφραση του δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού MIB-1 στο μισό της επιφάνειας του επιθηλίου σε ποσοστό  $\geq 15\%$  των βασικών κυττάρων, υποστηρίζει διάγνωση υπέρ κονδυλώματος σε σχέση με τις μεταπλαστικές ή τις φλεγμονώδεις αλλαγές. Ωστόσο, χρειάζεται να διευκρινιστεί εάν η αυξημένη έκφραση του δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού MIB-1, κατά την απουσία των συνηθισμένων αλλαγών στα κονδυλώματα, υποδηλώνει την παρουσία της λοίμωξης από τον HPV ιό. Επιπλέον, δεδομένου ότι τα κονδυλώματα προκαλούνται από συνήθεις τύπους του ιού HPV, μπορούν να χρησιμοποιηθούν πιο ευαίσθητες μέθοδοι ανίχνευσης όπως η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) (Mittal K. *et al. Int. J. Gynecol. Pathol.* 1998).

### 6.3.4. Η εκτίμηση του βαθμού δυσπλασίας.

Αύξηση των επιπέδων έκφρασης του δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού MIB-1 παρατηρείται με ταυτόχρονη αύξηση του βαθμού δυσπλασίας (Mittal K. *Adv. Anat. Pathol.* 1999).

Στην περίπτωση της δυσπλασίας, οι αλλαγές της πυρηνικής διόγκωσης και του πλειομορφισμού παρατηρούνται στα βασικά κύτταρα και εκτείνονται για μια μεταβλητή απόσταση προς την επιφάνεια του επιθηλίου εξαρτώμενες πάντα από το βαθμό της δυσπλασίας (Mittal K. *Adv. Anat. Pathol.* 1999).

Πρότυπα ανοσοέκφρασης του δείκτη MIB-1 ίσως αποδειχτούν πιο αξιόπιστα από τα πρόσφατα μορφολογικά κριτήρια για τη διαβάθμιση της δυσπλασίας στην πρόβλεψη της εξέλιξης σε διηθητικό καρκίνωμα. Σε μια μελέτη προγνωστικής σημασίας για τη χρώση του MIB-1 σε περιπτώσεις μετρίου και υψηλού βαθμού δυσπλασίας, παρατηρήθηκε χαμηλή έκφραση του δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού MIB-1 στις αλλοιώσεις που υποχωρούν,



ενώ αντίθετα, υψηλό ποσοστό θετικών κυττάρων υπάρχει στις αλλοιώσεις που παραμένουν και εξελίσσονται (*Garzetti GG. et al. Gynecol. Obst. Invest. 1996*).

### 6.3.5. Η εκτίμηση των ενδοτραχηλικών αλλοιώσεων.

Όπως αναμένεται, η έκφραση του δείκτη MIB-1 αυξάνεται στην περίπτωση της νεοπλασίας των ενδοτραχηλικών αδένων. Μελέτη των Cina και συνεργατών του, έδειξε ότι ο συνδυασμός της μέτριας και έντονης χρώσης του Ki-67 δείκτη (11-40%) και της θετικότητας του καρκινοεμβρυϊκού αντιγόνου (CEA), περιορίζεται σε περιπτώσεις διηθητικού αδενοκαρκινώματος και αδενοκαρκινώματος *in situ* (*Cina SJ. et al. Mod. Pathol. 1997*).

Επιπλέον, ο van Hoesen και οι συνεργάτες του πρότειναν τη διακύμανση ενός δείκτη σήμανσης (labeling index) της τάξης του 57-96% στις περιπτώσεις αδενοκαρκινώματος, με μέση τιμή στο 80% (*van Hoesen KH. et al. Int. J. Gynecol. Pathol. 1997*).

Οι φυσιολογικοί αδένες εμφανίζουν δείκτη σήμανσης με μέση τιμή 2.4%, ενώ σε περιπτώσεις τραχηλίτιδας και μικροαδενικής υπερπλασίας η μέση τιμή είναι 5.7% και 8.5 % αντίστοιχα. Με βάση τα παραπάνω ευρήματα, ανοσοχρώση του δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού MIB-1 σε ποσοστό  $\geq 20\%$  των κυττάρων θα μπορούσε να συνηγορεί υπέρ αδενοκαρκίνωματος (*Mittal K. Adv. Anat. Pathol. 1999*).

### 6.3.6. Η εκτίμηση των βιοψιών με μηχανικές αλλοιώσεις και αλλοιώσεις καυτηριασμού.

Ο καυτηριασμός και οι αλλοιώσεις συνθλίψεως μπορεί να δυσκολέψουν την ερμηνεία των μικρών βιοψιών. Η ανοσοϊστοχημική χρώση του MIB-1 μπορεί να φανεί χρήσιμη σε τέτοιου είδους περιπτώσεις, αφού η έκφρασή της διατηρείται (*Mittal K. Adv. Anat. Pathol. 1999*).

Προηγούμενη μελέτη έδειξε ότι η έκφραση του συγκεκριμένου δείκτη σε κωνοειδείς εκτομές, με όρια που έχουν αλλοιώσεις καυτηριασμού, είναι παρόμοια με εκείνη που παρατηρείται στον παρακείμενο, χωρίς αλλοιώσεις καυτηριασμού ιστό. Τα ευρήματα αυτά μπορούν να έχουν εφαρμογή, όχι μόνο στα όρια των κωνοειδών εκτομών, αλλά και σε άλλες βιοψίες, όπου η μορφολογία των περιοχών που μας ενδιαφέρουν διαταράσσεται από αλλοιώσεις καυτηριασμού ή μηχανικές αλλοιώσεις (*Mittal K. Int. J. Gynecol. Pathol. 1999*).

Επιπρόσθετα, η έκφραση του MIB-1 είναι χρήσιμη όταν η επιφάνεια του επιθηλίου έχει αποβληθεί και έχει παραμείνει μόνο η βασική στιβάδα. Έκφραση του MIB-1, σε ποσοστό  $\geq 15\%$  των κυττάρων στη συγκεκριμένη περιοχή, υποδηλώνει την παρουσία κονδυλώματος. Επιπλέον, αν παρατηρείται σημαντική πυρηνική ατυπία των κυττάρων της βασικής στιβάδας, τότε καθίσταται ενδεδειγμένη η διάγνωση της δυσπλασίας (*Mittal K. Adv. Anat. Pathol. 1999*).

### 6.3.7. Εφαρμογές στην κυτταρολογία.

Η ανοσοϊστοχημική χρώση για το δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού MIB-1 μπορεί να χρησιμοποιηθεί προκειμένου να αξιοποιηθούν τα όχι και τόσο ικανοποιητικά επιχρίσματα PAP. Κύτταρα με θετικούς MIB-1 πυρήνες ξεχωρίζουν ακόμη κι αν καλύπτονται με αίμα και φλεγμονώδη κύτταρα (*Boon ME. et al. Diag. Cytopathol. 1996*).

## 7. Προσυμπτωματικός έλεγχος (screening) του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας.

Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας αποτελεί τη δεύτερη αιτία θανάτου στις γυναίκες παγκοσμίως (*Parkin DM. et al. Chapter 2: The burden of HPV-related cancers. Vaccine. 2006, Woodman CB. et al. Nat Rev. Cancer. 2007*). Το διηθητικό καρκίνωμα του τραχήλου της μήτρας προκύπτει από πρόδρομες αλλοιώσεις, οι οποίες χαρακτηρίζονται από διαταραχές στην ωρίμανση των κυττάρων, πολυστιβάδωση και πυρηνικές ατυπίες και μπορούν να ταξινομηθούν ιστολογικά, ως τραχηλική ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία (CIN) ή κυτταρολογικά, ως πλακώδεις ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις, σύμφωνα με την ονοματολογία κατά Bethesda (Εικ. 27). Εξαιτίας, της καλά ορισμένης προκαρκινικής φάσης, ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας, εν μέρει υπόκειται σε έλεγχο (*Baldwin P. et al. Nat. Rev. Cancer. 2003*).

Cytological classification (used for screening)		Histological classification (used for diagnosis)	
Pap	Bethesda system	CIN	WHO descriptive classifications
Class I	Normal	Normal	Normal
Class II	ASC-US ASC-H	Atypia	Atypia
Class II	LSIL	CIN 1 including flat condyloma	Koilocytosis
Class III	HSIL	CIN 2	Moderate dysplasia
Class III	HSIL	CIN 3	Severe dysplasia
Class IV	HSIL	CIN 3	Carcinoma in situ
Class V	Invasive carcinoma	Invasive carcinoma	Invasive carcinoma

**Εικ. 27.** Η αντιστοιχία ανάμεσα στην κυτταρολογική ταξινόμηση κατά Bethesda και στην ιστολογική ταξινόμηση των αλλοιώσεων CIN.\*[www.google.com](http://www.google.com)

Η κλασσική μέθοδος προσυμπτωματικού ελέγχου βασίζεται στην κυτταρολογική εκτίμηση του τεστ Παπανικολάου (PAP-τεστ). Κατά τη διάρκεια των τελευταίων πενήντα ετών, τα προγράμματα προληπτικού ελέγχου που βασίζονται στη κυτταρολογία PAP έχουν αναμφισβήτητα μειώσει τη νοσηρότητα και τη θνησιμότητα. Ωστόσο, το PAP-τεστ αποτελεί μια υποκειμενική μέθοδο, με ευαισθησία που περιορίζεται στο 50% και υψηλή ευπάθεια ως προς την μεταβλητότητα μεταξύ του ιδίου και διαφορετικών ατόμων (*Baldwin P. et al. Nat. Rev. Cancer. 2003, Wright TC. Jr. Clin. Obst. Gynecol. 2007, Lie AK. et al. Gynecol. Oncol. 2005*).

Δεδομένου ότι ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας αποτελεί το μόνο καρκίνο που μπορεί σχεδόν πλήρως να προληφθεί, με τη βοήθεια του συστηματικού προσυμπτωματικού ελέγχου και με την έγκαιρη θεραπεία, η απόδειξη και η επέκταση των στρατηγικών του ελέγχου και της τεχνολογίας αποτελεί βασικό στόχο του Ευρωπαϊκού Συμβουλίου Συστάσεων για τον προσυμπτωματικό έλεγχο του καρκίνου (European Council Recommendation) (*Boulet GA. et al. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 2008*).

## 7.1 Εφαρμογές του HPV-DNA τεστ.

Η καθιέρωση του HPV ιού ως η κύρια και απαραίτητη αιτία για την ανάπτυξη καρκίνου του τραχήλου της μήτρας οδήγησε στην ανάπτυξη διαφόρων μοριακών τεχνικών για την ανίχνευση του ιού, προκειμένου να ξεπεραστούν οι περιορισμοί που συνδέονται με το κυτταρολογικό προληπτικό έλεγχο (Bosch FX. *et al. J. Clin. Pathol.* 2002, Molijn A. *et al. J. Clin. Virol.* 2005).

Το HPV-DNA τεστ, συμβάλλει στην αναγνώριση των γυναικών που βρίσκονται σε κίνδυνο ανάπτυξης νεοπλασίας στον τράχηλο της μήτρας, χωρίς την υποκειμενικότητα της κυτταρολογικής εκτίμησης. Γι' αυτό το λόγο, έχουν προταθεί, για τον πρωταρχικό προληπτικό έλεγχο, η διαλογή των αμφιλεγόμενων PAP-τεστ ή των αλλοιώσεων χαμηλού βαθμού και η παρακολούθηση μετά τη θεραπεία των αλλοιώσεων CIN (Davies P. *et al. Int. J. Cancer.* 2005, Arbyn M. *et al. Chapter 9: clinical applications of HPV testing: a summary of meta analysis. Vaccine.* 2006, Koliopoulos G. *et al. Gynecol. Oncol.* 2007, ASCUS-LSIL Triage Study Group. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2003, Arbyn M. *et al. J. Natl. Cancer. Inst.* 2004, Paraskevaidis E. *et al. Cancer Treat. Rev.* 2004, Zielinski GD. *et al. Obstet. Gynecol. Surv.* 2004, Arbyn M. *et al. Gynecol. Oncol.* 2005).

### 7.1.1. Ο προσυμπτωματικός έλεγχος (screening).

Πρόσφατες, ανεξάρτητες μελέτες υποδηλώνουν ότι το HPV-DNA τεστ, ως πρωταρχική μέθοδος προληπτικού ελέγχου έχει υψηλή ευαισθησία και υψηλά αρνητική προγνωστική αξία για την ανίχνευση της προδιηθητικής νόσου, σε σχέση με την κυτταρολογία. Γι' αυτό το λόγο στις ΗΠΑ, πολύ πρόσφατα αποφασίστηκε η προσθήκη του HPV-DNA τεστ στον κυτταρολογικό έλεγχο μετά την ηλικία των 30, και σε μεσοδιάστημα τριών ετών, εφόσον τα δύο τεστ είναι αρνητικά (Wright TC Jr. *Cervical cancer screening in the 21<sup>st</sup> century: is it time to retire the PAP smear? Clin. Obst. Gynecol.* 2007, Arbyn M. *et al. Chapter 9: Clinical applications of HPV testing: a summary of meta analysis. Vaccine.* 2006).

Σημαντικό μειονέκτημα του HPV-DNA σε επίπεδο προσυμπτωματικού ελέγχου, σε σύγκριση με τον κυτταρολογικό έλεγχο, είναι η χαμηλή του εξειδίκευση και η πολύ μικρή θετική του αξία για τις υψηλού βαθμού CIN αλλοιώσεις, εξαιτίας της επικράτησης σε μεγάλο βαθμό των προσωρινών λοιμώξεων (Franco EL. *et al. Future. Oncol.* 2007, Arbyn M. *et al. Chapter 9: Clinical applications of HPV testing: a summary of meta analysis. Vaccine.* 2006).

Μέχρι σήμερα, η καταλληλότητα του HPV-DNA τεστ ως μοναδική, τυπική μέθοδος προσυμπτωματικού ελέγχου, έχει εκτιμηθεί σε αντιπροσωπευτικές συγκρίσεις ή/και επιδημιολογικές μελέτες. Χρειάζεται να γίνουν δοκιμές σε μεγάλο αριθμό περιστατικών ώστε να αξιολογηθεί η επίδραση του προληπτικού ελέγχου για τον HPV ιό στην επίπτωση του καρκίνου και στη θνησιμότητα. Στην Ευρώπη, πολλές κλινικές δοκιμές έχουν οδηγήσει στην καθιέρωση του HPV-DNA τεστ ως μέθοδος προσυμπτωματικού ελέγχου του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Η κύρια έκβαση των συγκεκριμένων δοκιμών είναι η ελαχιστοποίηση της αθροιστικής επίπτωσης των υψηλού βαθμού αλλοιώσεων τύπου CIN, 3 έως 5 χρόνια μετά τον προληπτικό έλεγχο μεταξύ γυναικών με αρνητικό HPV-DNA τεστ και γυναικών με αρνητικό κυτταρολογικό τεστ. Μέχρι τη δημοσίευση των αποτελεσμάτων το 2008, το Pap-τεστ συνεχίζει να αποτελεί σταθερή μέθοδο προληπτικού ελέγχου στην Ευρωπαϊκή Ένωση (Wright TC. Jr. *Clin. Obst. Gynecol.* 2007, Davies P. *et al. Int. J.*

*Cancer. 2005, Arbyn M. et al. Chapter 9: Clinical applications of HPV testing: a summary of meta analysis. Vaccine. 2006).*

Η χρήση του HPV-DNA τεστ έχει αρκετά πλεονεκτήματα. Οι δοκιμές εξασφαλίζουν ένα αυτόματο, αντικειμενικό και υψηλής ευαισθησίας τεστ. Η χρήση της κυτταρολογίας θα μπορούσε να μειωθεί, αποδεικνύοντας έτσι την ποιότητα του, η μη αναγκαιότητα διαλογής των αμφισβητούμενων και χαμηλού βαθμού αλλοιώσεων, θα μπορούσε να αποφευχθεί και το διάστημα προσυμπτωματικού ελέγχου θα μπορούσε να επιμηκυνθεί με ασφάλεια, αποδεικνύοντας την οικονομική αποδοτικότητα και την ευκολία χρήσης του (*Boulet GA. et al. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 2008*).

### **7.1.2. Η διαλογή των αμφισβητούμενων PAP – τεστ.**

Οι χαμηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις του πλακώδους επιθηλίου (LSIL) και τα άτυπα, πλακώδη κύτταρα απροσδιορίστου σημασίας (ASCUS) αντιπροσωπεύουν το μεγαλύτερο κλάσμα ανωμαλιών στον έλεγχο του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας και περιλαμβάνουν τις περισσότερες ιστολογικά επιβεβαιωμένες, υψηλού βαθμού ανωμαλίες. Το HPV-DNA τεστ προτάθηκε για την αποτελεσματική διαχείριση αυτών των διαγνωστικών κατηγοριών. Μελέτες σε περιστατικά με ASCUS-LSIL έχουν πραγματοποιηθεί με τρεις μεθόδους: την άμεση κολποσκόπηση, την εφαρμογή του HPV-DNA τεστ και τον επαναλαμβανόμενο κυτταρολογικό έλεγχο. Το HPV-DNA τεστ φαίνεται να είναι τουλάχιστον τόσο ευαίσθητο, όσο και η άμεση κολποσκόπηση στην ανίχνευση των υψηλού βαθμού αλλοιώσεων τύπου CIN, ενώ ο αριθμός των γυναικών που παραπέμφθηκε για κολποσκόπηση περιορίστηκε στο ήμισυ. Συνεπώς, προκύπτει ότι η εφαρμογή του HPV-DNA τεστ συνιστά την καλύτερη μέθοδο διαχείρισης των γυναικών με ASCUS (*Arbyn M. et al. J. Natl. Cancer. Inst. 2004*).

Παράλληλα, επειδή η κυτταρολογική ερμηνεία των LSIL μπορεί να αναπαραχθεί πλήρως, και η πλειοψηφία των περιπτώσεων αυτών είναι θετικές για τον ιό, η χρήση του HPV-DNA τεστ για την αντιμετώπισή τους είναι χαμηλού κόστους, αφού η πλειοψηφία των γυναικών αυτών θα παραπεμφθεί ξανά για κολποσκόπηση. Δεν έχει ξεκαθαριστεί ακόμη εάν έχει μεγαλύτερη αξιοπιστία η ανίχνευση DNA και τυποποίηση του HPV ιού ή η εκτίμηση του ιϊκού φορτίου στην επιλογή των LSIL (*ASCUS-LSIL Triage Study Group. Am. J. Obstet. Gynecol. 2003*).

### **7.1.3. Η παρακολούθηση μετά τη θεραπεία.**

Οι γυναίκες που έχουν θεραπευτεί για αλλοιώσεις τύπου CIN, θα πρέπει να παρακολουθούνται συστηματικά. Το HPV-DNA τεστ προτάθηκε για να προβλέψει τις αλλοιώσεις τύπου CIN που παραμένουν ή είναι επαναλαμβανόμενες σε γυναίκες που έχουν θεραπευτεί για υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι το HPV-DNA τεστ υποδηλώνει την αλλοίωση που παραμένει πιο γρήγορα, με μεγαλύτερη ευαισθησία και παρόμοια σαφήνεια, σε σχέση με την κυτταρολογική επαναλαμβανόμενη παρακολούθηση ή ιστολογική εκτίμηση των ορίων εκτομής. Ένα αρνητικό HPV-DNA τεστ επιτρέπει μείωση της περιόδου επιτήρησης μετά τη διάρκεια της θεραπείας, αλλά μεγαλύτερες σε διάρκεια μελέτες είναι απαραίτητες για να παρουσιάσουν λεπτομερείς αλγόριθμους παρακολούθησης (*Paraskevaidis E. et al. Cancer Treat. Rev. 2004, Zielinski GD. et al. Obstet. Gynecol. Surv. 2004, Arbyn M. et al. Gynecol. Oncol. 2005*).

#### 7.1.4. Ο εμβολιασμός για τον ιό HPV: Επιπτώσεις στον προσυμπτωματικό έλεγχο.

Η ισχυρή σχέση ανάμεσα στον HPV ιό και στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας αυξάνει την πιθανότητα της αρχικής πρόληψης με τη δημιουργία προφυλακτικών εμβολίων, ενάντια στις λοιμώξεις που προκαλούνται από τα στελέχη υψηλού κινδύνου του ιού. Η δημιουργία των εμβολίων αυτών βασίζεται σε σωματίδια παρόμοια με τον ιό (Virus Like Particles, VLP) που αποτελούνται από τις ανασυνδυασμένες, καψιδικές πρωτεΐνες του ιού, L1 και L2. Σήμερα, υπάρχουν δυο αποτελεσματικά VLP L1 εμβόλια, τα οποία είναι ικανά να προκαλέσουν την ουδετεροποίηση αντισωμάτων από σωματίδια του ιού μαζί με το περίβλημά τους. Το Cervarix είναι ένα διπλό εμβόλιο ενάντια στα στελέχη 16 και 18 του HPV ιού, που κατασκευάστηκε από τη GlaxoSmithKline και το αναγνωρισμένο από τον οργανισμό FDA, τετραπλό εμβόλιο Gardasil, ενάντια στα στελέχη 16/18/6/11 του ιού, που κατασκευάστηκε από την εταιρεία Merck. Τα τέσσερα αυτά στελέχη του ιού, ευθύνονται για την πλειοψηφία των νοσημάτων της γεννητικής περιοχής. Τα στελέχη 16 και 18 του HPV ιού υπολογίζεται ότι ευθύνονται σε ποσοστό 62-77% για την ανάπτυξη καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, λαμβάνοντας πάντα υπόψη τη γεωγραφική ετερογένεια που υπάρχει. Αντίθετα, τα στελέχη 6 και 11 του ιού είναι υπεύθυνα για τη δημιουργία αλλοιώσεων CIN χαμηλού βαθμού, σε ποσοστό πάνω από 90% (*Bryan JT. Vaccine. 2007*).

Η καθιέρωση προγραμμάτων εμβολιασμού, σε λογικά πλαίσια κάλυψης, δεν υπονοεί ότι τα προγράμματα προσυμπτωματικού ελέγχου θα πρέπει να διακόπτονται. Ένας λόγος είναι ότι ο πρωταρχικός πληθυσμός ελέγχου αποτελείται από κορίτσια ηλικίας 9-13 ετών και η προσπάθεια του εμβολιασμού να προστατέψει μεγαλύτερες γυναίκες, θα μπορούσε τυχαία να έχει επιτυχία σε πολύ χαμηλότερα ποσοστά κάλυψης. Επιπλέον, ο εμβολιασμός δεν προστατεύει από όλα τα ογκογόνα στελέχη του ιού, αν και σε κάποιες περιπτώσεις μπορεί να επιτευχθεί διασταυρούμενη προφύλαξη απέναντι σε άλλα στελέχη υψηλού κινδύνου του ιού, μέσω του εμβολιασμού για τα στελέχη HPV 16 και 18 (*Franco EL. et al. Future Oncol. 2007, Chan JK. et al. J. Clin. Oncol. 2007, Dillner J. et al. Clin. Exp. Immunol. 2007*).

## ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Ένα σημαντικό γεγονός στην πορεία της νεοπλασίας τραχήλου μήτρας αποτελεί η ενσωμάτωση του γονιδιώματος του ιού των θηλωμάτων του ανθρώπου (HPV) σε εκείνο του κυττάρου. Οι περισσότερες μελέτες αφορούν το στελέχος 16. Στα πλαίσια εφαρμογής εμβολιασμού έναντι συγκεκριμένων στελεχών του ιού HPV (6, 11, 16, 18) είναι αναγκαία η τυποποίηση των στελεχών του ιού που απαντώνται στις ποικίλου βαθμού δυσπλασίες και η περαιτέρω συσχέτισή τους με τα ιστολογικά ευρήματα. Επίσης είναι ενδιαφέρον να γίνουν παρόμοιες μελέτες και για άλλα στελέχη τόσο υψηλού όσο και χαμηλού κινδύνου λαμβάνοντας υπόψη ότι το στελέχος 16 είναι παρόν είτε μεμονωμένα είτε σε πολλαπλές μολύνσεις ακόμη και σε περιπτώσεις που η βιοψία ή το τεστ Παπανικολάου δε δείχνει αλλοιώσεις. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον θα πρέπει να δοθεί στις περιπτώσεις χαμηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακών αλλοιώσεων και ήπιων κονδυλωμάτων που δε δείχνουν εμφανείς κυτταρολογικές αλλοιώσεις σε τεστ Παπανικολάου ή βιοψίες καθώς επίσης και στη μελέτη των παραπάνω παραμέτρων σε στελέχη του ιού HPV εκτός του στελέχους 16, στο οποίο αναφέρονται οι περισσότερες μέχρι τώρα μελέτες, δεδομένου ότι η κατανομή και η συχνότητα εμφάνισης των διαφόρων στελεχών του ιού HPV παρουσιάζει γεωγραφική ετερογένεια τόσο εκτός όσο και εντός γεωγραφικών συνόρων.

## **8. Υλικά και μέθοδοι.**

### **8.1. Μελέτη του πληθυσμού.**

Συνολικά μελετήθηκαν 134 γυναίκες, ηλικίας 18 - 63 ετών, στο διάστημα από το Νοέμβριο του 2008 μέχρι και τον Ιούνιο του 2010. Η μελέτη αφορά σε γυναίκες που προσήλθαν για έλεγχο λόγω κυτταρολογικών αλλοιώσεων στο τεστ Παπανικολάου (PAP-τεστ), στο χρονικό διάστημα του ενός μηνός, στο τμήμα Κολποσκόπησης της Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας.

Από το σύνολο του γυναικείου πληθυσμού, αξιολογήθηκαν 118 γυναίκες από τις οποίες έγινε λήψη τραχηλικού επιχρίσματος και βιοψίας από περιοχές του τραχήλου της μήτρας, που ήταν ύποπτες για αλλοιώσεις τύπου CIN. Η επεξεργασία των δειγμάτων αυτών πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Από το σύνολο των 134 γυναικών αποκλείστηκαν 11 γυναίκες από τις οποίες συλλέξαμε μόνο τραχηλικό επίχρισμα, και 5 γυναίκες από τις οποίες οι 3 αποκλείστηκαν βάση της ιστολογικής διάγνωσης που έδειξε φλεγμονή και ελάχιστο ή ανύπαρκτο επιθήλιο, ενώ οι άλλες 2 διότι η βιοψία τους περιλάμβανε μόνο ενδοτραχηλικό βλεννογόνο.

### **8.2. Τραχηλικά επιχρίσματα.**

Η λήψη των επιχρισμάτων από τον τράχηλο της μήτρας, πραγματοποιήθηκε με ειδικό βουρτσάκι. Το βουρτσάκι στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε σωληνάριο των 15 ml τύπου falcon, το οποίο περιείχε 2 ml διαλύματος PBS (Phosphate-Buffered Saline) και κατόπιν τα δείγματα μεταφέρθηκαν στο Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για ανίχνευση και τυποποίηση των στελεχών του ιού HPV.

### **8.3. Ιστολογικά δείγματα.**

Η λήψη των βιοψιών έγινε κατά τη διάρκεια της κολποσκόπησης με τη βοήθεια ειδικού ψαλιδιού. Η μέθοδος της κολποσκόπησης ενδείκνυται σε περιπτώσεις μη φυσιολογικού PAP- τεστ με αλλοιώσεις ASCUS, LGSIL ή HGSIL, ή σε περιπτώσεις παρουσίας στελέχους του ιού HPV.

Οι βιοψίες ελήφθησαν από την πιο οξυφίλη περιοχή, μετά τη χρήση οξικού οξέος 3% στη ζώνη μετάπτωσης. Τα δείγματα στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε φορμόλη, ακολούθησε η διαδικασία εμπέδωσης σε κύβους παραφίνης, η κοπή τομών πάχους 3 μm και η χρώση αιματοξυλίνης –ηωσίνης (H/E) για μικροσκοπική παρατήρηση στο Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

### **8.4. Ανοσοϊστοχημεία.**

Με τη χρήση μικροτόμου παρασκευάστηκαν αντιπροσωπευτικές τομές πάχους 3 μm από το κάθε κύβο παραφίνης, οι οποίες καθηλώθηκαν σε ηλεκτροστατικά φορτισμένες

αντικειμενοφόρες πλάκες και τοποθετήθηκαν σε κλίβανο θερμοκρασίας 65°C όλη τη νύχτα. Ακολούθησε η εμβάπτιση των τομών σε διάλυμα ξυλόλης για 30 λεπτά και η ενυδάτωσή τους σε κατιούσα σειρά αλκοολών. Για την ανοσοϊστοχημική μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω αντισώματα:

Πρωτογενές Αντίσωμα	Κλώνος	Ισότυπος Ανοσοσφαιρίνης	Εταιρεία	Κωδικός
P16INK4a	E6H4	IgG <sub>2a</sub> Ποντικού	CINtec	9527
Cyclin - B1	7A9	IgG1 Ποντικού	Novocastra	NCL-CYCLIN B1
Ki-67	MIB-1	IgG1 Ποντικού	Dako	M7240

Η αποκάλυψη των αντιγονικών θέσεων έγινε με εμβάπτιση των τομών, είτε σε υδατικό διάλυμα Tris-EDTA (pH9), είτε σε διάλυμα κιτρικού νατρίου (pH6), με τη χρήση υδατόλουτρου και φούρνου μικροκυμάτων, ανάλογα με το πρωτογενές αντίσωμα. Ακολούθησε επώαση των τομών για 10 λεπτά σε υδατικό διάλυμα 0,3% υπεροξειδίου του υδρογόνου για να αδρανοποιηθεί η δραστηριότητα της ενδογενούς υπεροξειδάσης.

Οι τομές επιστρώθηκαν με τα πρωτογενή αντισώματα σε αραίωση και σε συνθήκες επώασης που δίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Πρωτογενές Αντίσωμα	Αραίωση	Χρόνος Επώασης	Συνθήκες Επώασης
p16INK4a (E6H4)	έτοιμο προς χρήση (RTU)	30 λεπτά	θερμοκρασία δωματίου
Cyclin - B1 (7A9)	1:50	30 λεπτά	θερμοκρασία δωματίου
Ki-67 (MIB-1)	1:80	30 λεπτά	θερμοκρασία δωματίου



#### 8.4.1. Πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημικών χρώσεων για p16INK4a (κλώνος E6H4).

1. Αποπαραφίνωση των τομών (κλίβανος 65°C overnight, ξυλόλη 30 λεπτά)
2. Ενυδάτωση των τομών σε κατιούσα αλκοολών (100°, 96°, 80°). Οι τομές παραμένουν αρχικά για 5 λεπτά σε απόλυτη αιθυλική αλκοόλη (100°) (x 2 φορές), 2 λεπτά στα υπόλοιπα διαλύματα της αιθυλικής αλκοόλης και 5 λεπτά σε απεσταγμένο νερό.
3. Ανάκτηση αντιγόνου με θερμική επεξεργασία του ιστού με τη χρήση φούρνου μικροκυμάτων (Morris, LG, 850 watt). Οι τομές τοποθετούνται στο φούρνο μικροκυμάτων σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-EDTA του CIntec® Histology Kit (Cat.No. 9517) (100 mmol/L Tris buffer, 10 mmol/L EDTA, pH 9) για 20 λεπτά στα 850 watt. Στη συνέχεια, παραμένουν στο διάλυμα σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά.
4. Έκπλυση των τομών με απεσταγμένο νερό για 2 λεπτά.
5. Κατανάλωση ενδογενούς υπεροξειδάσης σε υδατικό διάλυμα 0,3% υπεροξειδίου του υδρογόνου για 10 λεπτά.
6. Έκπλυση των τομών με διάλυμα TBST pH=8,4 για 5 λεπτά (X 3 φορές).
7. Επώαση με το πρωτοταγές αντίσωμα p16INK4a (E6H4) (Ready to use) του CIntec® Histology kit (Cat.No. 9517) για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
8. Έκπλυση των τομών με TBST pH=8,4 για 5 λεπτά (x 2 φορές).
9. Επώαση για 30 λεπτά με το πολυμερές Visualization του CIntec® Histology Kit (Cat.No. 9517).
10. Έκπλυση των τομών για 5 λεπτά (x 2 φορές) με διάλυμα TBST pH=8,4.
11. Η ανίχνευση των περιοχών δραστηρικής υπεροξειδάσης πραγματοποιείται με επώαση των τομών σε διάλυμα Tris υπεροξειδίου του υδρογόνου και τετραϋδροχλωρικής 3,3 – διαμινοβενζιδίνης (DAB) για 5 λεπτά. Το χρωμογόνο DAB δίνει ένα καφέ παράγωγο ανθεκτικό στην αλκοόλη και την ξυλόλη.
12. Έκπλυση των τομών με απεσταγμένο νερό και χρώση με αιματοξυλίνη Harris για 1 λεπτό.
13. Έκπλυση με απεσταγμένο νερό.
14. Αφυδάτωση του ιστού σε ανιούσα αλκοολών (80°, 96°, 100°). Σε κάθε διάλυμα ο ιστός παραμένει για 1 περίπου λεπτό.
15. Διαύγαση των τομών σε ξυλόλη για 5 λεπτά και επικόλληση καλυπτρίδων με χρήση διαλυτού στην ξυλόλη μέσου (Entellan Merch, Germany).
16. Παρατήρηση σε οπτικό μικροσκόπιο.

#### 8.4.2. Πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημικών χρώσεων για Κυκλίνη - B1 ( κλώνος 7A9).

1. Αποπαραφίνωση των τομών (κλίβανος 65°C overnight, ξυλόλη 30 λεπτά).
2. Ενυδάτωση των τομών σε κατιούσα αλκοολών (100°, 96°, 80°). Οι τομές παραμένουν αρχικά για 5 λεπτά σε απόλυτη αιθυλική αλκοόλη (100°) ( x 2 φορές), 2 λεπτά στα υπόλοιπα διαλύματα της αιθυλικής αλκοόλης και 5 λεπτά απεσταγμένο νερό.
3. Ανάκτηση αντιγόνου με θερμική επεξεργασία του ιστού με τη χρήση υδατόλουτρου (PT module, Labvision). Οι τομές τοποθετούνται στο υδατόλουτρο σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-EDTA (10mM Tris Base, 1mM EDTA, 0.05% Tween 20, pH 9.0) το οποίο βρίσκεται στους 98°C για 25 λεπτά. Στη συνέχεια, οι τομές παραμένουν στο διάλυμα σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά.
4. Έκπλυση των τομών με απεσταγμένο νερό για 2 λεπτά.
5. Κατανάλωση ενδογενούς υπεροξειδάσης σε υδατικό διάλυμα 0,3% υπεροξειδίου του υδρογόνου για 10 λεπτά.
6. Έκπλυση των τομών με διάλυμα TBST pH=8,4 για 5 λεπτά (X 3 φορές).
7. Επώαση με το πρωτοταγές αντίσωμα (αραίωση 1:50) για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
8. Έκπλυση των τομών με TBST pH=8,4 για 5 λεπτά (X 2 φορές).
9. Επώαση για 30 λεπτά με το kit πολυμερούς Envision (Dako, K5007).
10. Έκπλυση των τομών για 5 λεπτά (X 2 φορές) με διάλυμα TBST pH=8,4.
11. Η ανίχνευση των περιοχών δραστηκής υπεροξειδάσης πραγματοποιείται με επώαση των τομών σε διάλυμα Tris (pH=6) υπεροξειδίου του υδρογόνου και τετραϋδροχλωρικής 3,3 – διαμινοβενζιδίνης (DAB) για 5 λεπτά. Το DAB δίνει ένα καφέ παράγωγο ανθεκτικό στην αλκοόλη και την ξυλόλη.
12. Έκπλυση των τομών με απεσταγμένο νερό και χρώση με αιματοξυλίνη Harris για 1 λεπτό.
13. Έκπλυση με απεσταγμένο νερό.
14. Αφυδάτωση του ιστού σε ανιούσα αλκοολών (80°, 96°, 100°). Σε κάθε διάλυμα ο ιστός παραμένει για 1 περίπου λεπτό.
15. Διαύγαση των τομών σε ξυλόλη για 5 λεπτά και επικόλληση καλυπτρίδων με χρήση διαλυτού στην ξυλόλη μέσου (Entellan Merch, Germany).
16. Παρατήρηση σε οπτικό μικροσκόπιο.

#### 8.4.3. Πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημικών χρώσεων για Ki-67 (κλώνος MIB-1).

1. Αποπαραφίνωση των τομών (κλίβανος 65°C overnight, ξυλόλη 30 λεπτά).
2. Ενυδάτωση των τομών σε κατιούσα αλκοολών (100°, 96°, 80°). Οι τομές παραμένουν αρχικά για 5 λεπτά σε απόλυτη αιθυλική αλκοόλη (100°) (x 2 φορές), 2 λεπτά στα υπόλοιπα διαλύματα της αιθυλικής αλκοόλης και 5 λεπτά σε απεσταγμένο νερό.
3. Ανάκτηση αντιγόνου με θερμική επεξεργασία του ιστού με τη χρήση υδατόλουτρου (PT module, Labvision). Οι τομές τοποθετούνται στο υδατόλουτρο σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-EDTA (10mM Tris Base, 1mM EDTA, 0.05% Tween 20, pH 9.0) το οποίο βρίσκεται στους 98°C για 25 λεπτά. Στη συνέχεια, οι τομές παραμένουν στο διάλυμα σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά.
4. Έκπλυση των τομών με απεσταγμένο νερό για 2 λεπτά.
5. Κατανάλωση ενδογενούς υπεροξειδάσης σε υδατικό διάλυμα 0,3% υπεροξειδίου του υδρογόνου για 10 λεπτά.
6. Έκπλυση των τομών με διάλυμα TBST pH=8,4 για 5 λεπτά (X 3 φορές).
7. Επώαση με το πρωτοταγές αντίσωμα (αραίωση 1:80) για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
8. Έκπλυση των τομών με TBST pH=8,4 για 5 λεπτά (X 2 φορές).
9. Επώαση για 30 λεπτά με το πολυμερές Envision (Dako, K5007).
10. Έκπλυση των τομών για 5 λεπτά (X 2 φορές) με διάλυμα TBST pH=8,4.
11. Η ανίχνευση των περιοχών δραστηρικής υπεροξειδάσης πραγματοποιείται με επώαση των τομών σε διάλυμα Tris (pH=6) υπεροξειδίου του υδρογόνου και τετραϋδροχλωρικής 3,3 – διαμινοβενζιδίνης (DAB) για 5 λεπτά. Το DAB δίνει ένα καφέ παράγωγο ανθεκτικό στην αλκοόλη και την ξυλόλη.
12. Έκπλυση των τομών με απεσταγμένο νερό και χρώση με αιματοξυλίνη Harris για 1 λεπτό.
13. Έκπλυση με απεσταγμένο νερό.
14. Αφυδάτωση του ιστού σε ανιούσα αλκοολών ( 80°, 96°, 100°). Σε κάθε διάλυμα ο ιστός παραμένει για 1 περίπου λεπτό.
15. Διαύγαση των τομών σε ξυλόλη για 5 λεπτά και επικόλληση καλυπτρίδων με χρήση διαλυτού στην ξυλόλη μέσου (Entellan Merch, Germany).
16. Παρατήρηση σε οπτικό μικροσκόπιο.

#### 8.4.4. Τρόπος παρασκευής διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν:

*Tris-EDTA Buffer (10mM Tris Base, 1mM EDTA Solution, 0.05% Tween 20, pH 9.0):*

- Tris Base -----1.21 g
- EDTA -----0.37 g
- Tween 20 -----0.5 ml
- Απεσταγμένο νερό -----1000 ml

*10X TBS-Tween 20 (0.5M Tris Base, 9% NaCl, 0.5% Tween 20, pH 8.4):*

- Trizma base ----- 61 g
- NaCl ----- 90 g
- Απεσταγμένο νερό -----1000 ml
- Ρυθμίζεται το pH στο 8.4 χρησιμοποιώντας συμπυκνωμένο HCl και στη συνέχεια προστίθονται 5 ml Tween 20.

#### 8.5. Απομόνωση DNA από τραχηλικά επιχρίσματα.

Η απομόνωση του DNA από τα τραχηλικά επιχρίσματα έγινε με τη χρήση του QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Όλα τα ειδικά βουρτσάκια με τα οποία έγινε η λήψη των επιχρισμάτων για την ανίχνευση του DNA του ιού, ξεπλύθηκαν με 2 ml διαλύματος PBS. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 1900 στροφές (rpm) για 15 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου και αφαίρεση του υπερκείμενου διαλύματος PBS προκειμένου να κρατηθούν τα κύτταρα (ίζημα). Ακολούθησε μεταφορά του ιζήματος σε σωληνάρια τύπου eppendorf των 2ml, προσθήκη λυτικού διαλύματος για να σπάσουν τα κύτταρα και πρωτεϊνάσης K προκειμένου να απελευθερωθεί και να απομονωθεί στη συνέχεια το DNA.

#### 8.6. Απομόνωση DNA από βιοψίες τραχήλου μήτρας.

Έγινε επιλογή του υλικού με παρατήρηση σε πλακίδιο αιματοξυλίνης-ηωσίνης (H/E) και ακολούθησε η διαδικασία απομόνωσης γενωμικού DNA σύμφωνα με την ακόλουθη διαδικασία:

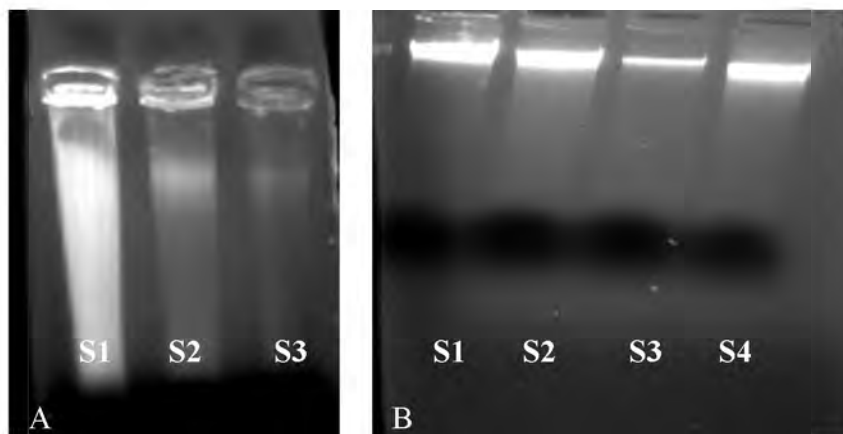
1. 10 τομές παραφίνης πάχους 10  $\mu\text{m}$  κόβονται και τοποθετούνται σε σωληνάριο τύπου eppendorf των 2ml.
2. Προσθήκη 1 ml ξυλόλης και παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά με ενδιάμεση ανακίνηση (vortex).
3. Φυγοκέντρηση στις 12.000 στροφές (rpm) για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Αφαίρεση του υπερκείμενου και επανάληψη των βημάτων 2, 3 και 4.
5. Προσθήκη 1 ml απόλυτης αιθανόλης (100%) για την απομάκρυνση της ξυλόλης.
6. Φυγοκέντρηση στις 12.000 στροφές (rpm) για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
7. Αφαίρεση του υπερκείμενου και επανάληψη των βημάτων 5, 6 και 7.

8. Προσθήκη 400 μl λυτικού διαλύματος (ATL), 100 μl SDS απορρυπαντικού και 100 μl πρωτεΐνης K για την απομάκρυνση των πρωτεϊνών και την απελευθέρωση του DNA.
9. Επώαση σε υδατόλουτρο στους 37°C για 2 ημέρες.
10. Μετά το πέρας της δεύτερης ημέρας, ακολουθεί προσθήκη 400μl διαλύματος AL και καλή ανακίνηση (vortex).
11. Τοποθέτηση των δειγμάτων σε κλίβανο στους 70°C για 10 λεπτά.
12. Προσθήκη 400 μl απόλυτης αιθανόλης (100%) και καλή ανακίνηση (vortex).
13. Περνάμε από στήλη με φίλτρο 650 μl του παραπάνω διαλύματος και φυγοκεντρούμε στις 8000 στροφές (rpm) για 10 λεπτά.
14. Αφαιρούμε το υγρό που εκλούεται από τη στήλη, περνάμε το υπόλοιπο διάλυμα από την ίδια στήλη και επαναλαμβάνουμε τα βήματα 13 και 14.
15. Προσθήκη 500 μl διαλύματος πλύσης AW1 και φυγοκέντρωση στις 8000 στροφές (rpm) για 1 λεπτό.
16. Αφαίρεση του υγρού που εκλούεται από τη στήλη, προσθήκη σε αυτή 500 μl διαλύματος πλύσης AW2 και φυγοκέντρωση στις 14000 στροφές (rpm) για 5 λεπτά.
17. Τοποθετούμε τις στήλες σε νέα αποστειρωμένα σωληνάρια τύπου errendorf και προσθέτουμε 60 μl δις απεσταγμένου νερού (ddH<sub>2</sub>O).
18. Παραμονή για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρωση στις 14000 στροφές (rpm) για 5 λεπτά.
19. Προσθήκη εκ νέου 60 μl δις απεσταγμένου νερού (ddH<sub>2</sub>O), παραμονή για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρωση στις 14000 στροφές (rpm) για 5 λεπτά.
20. Το DNA που εκλούεται διαλυμένο σε νερό, συλλέγεται και φυλάσσεται στους 4°C ή στους -20°C για μεγάλο χρονικό διάστημα.

#### 8.6.1. Έλεγχος της ποιότητας του γενωμικού DNA.

Η ποιότητα του DNA που απομονώσαμε, τόσο από τις βιοψίες όσο και από τα επιχρίσματα, ελέγχεται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% (Εικ. 28). Φωτομέτρηση του DNA στα 260/280 nm, και εκτίμηση του λόγου  $\lambda = OD_{260}/OD_{280}$  μας δίνει την καθαρότητα. Η συγκέντρωση υπολογίζεται με βάση τον τύπο:

$$C (\mu\text{g/ml}) = OD_{260} \times 40 \times (1/\text{αραίωση})$$



**Εικ. 28.** Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης 1% από βιοψίες (A) και επιχρίσματα (B).

### 8.7. Ανίχνευση του ιού HPV.

Για την ανίχνευση και τυποποίηση του ιού των ανθρωπίνων θηλωμάτων (HPV) στα δείγματά μας χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR). Σε όλα τα δείγματα πραγματοποιήθηκε ενίσχυση τμήματος της L1 περιοχής του ιικού γονιδιώματος με τη χρήση 18 εκκινητών (PGMY 09/11) (Πίνακας 2 ). Ο τελικός όγκος της PCR αντίδρασης είναι 100  $\mu$ l και περιέχει: 10 $\mu$ l DNA από κάθε δείγμα, 35.4  $\mu$ l μίγματος αντιδραστηρίων και 54.6  $\mu$ l απεσταγμένου νερού (ddH<sub>2</sub>O).

#### **Μίγμα αντιδραστηρίων**

10x ρυθμιστικό διάλυμα	: 10 $\mu$ l (1X τελική συγκέντρωση)
Διάλυμα MgCl <sub>2</sub>	: 4 $\mu$ l (2 mM τελική συγκέντρωση)
MY18 μίγμα εκκινητών	: 18 $\mu$ l
dNTPs 40 mM	: 3 $\mu$ l
Platinum Taq DNA πολυμεράση	: 0.4 $\mu$ l

**Τελικός όγκος μίγματος αντιδραστηρίων: 35.4  $\mu$ l**

**Πίνακας 2.** PGMY09/11 εκκινητές (5'→3' αλληλουχία):

PGMY11-A .....	GCA CAG GGA CAT AAC AAT GG
PGMY11-B.....	GCG CAG GGC CAC AAT AAT GG
PGMY11-C .....	GCA CAG GGA CAT AAT AAT GG
PGMY11-D.....	GCC CAG GGC CAC AAC AAT GG
PGMY11-E.....	GCT CAG GGT TTA AAC AAT GG
PGMY09-F.....	CGT CCC AAA GGA AAC TGA TC
PGMY09-G.....	CGA CCT AAA GGA AAC TGA TC
PGMY09-H.....	CGT CCA AAA GGA AAC TGA TC
PGMY09-Ia .....	G CCA AGG GGA AAC TGA TC
PGMY09-J.....	CGT CCC AAA GGA TAC TGA TC
PGMY09-K .....	CGT CCA AGG GGA TAC TGA TC
PGMY09-L.....	CGA CCT AAA GGG AAT TGA TC
PGMY09-M.....	CGA CCT AGT GGA AAT TGA TC

PGMY09-N .....CGA CCA AGG GGA TAT TGA TC

PGMY09-Pa ..... G CCC AAC GGA AAC TGA TC

PGMY09-Q.....CGA CCC AAG GGA AAC TGG TC

PGMY09-R .....CGT CCT AAA GGA AAC TGG TC

HMB01b.....GCG ACC CAA TGC AAA TTG G

Η PCR λαμβάνει χώρα σε θερμικό κυκλοποιητή Eppendorff και περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια:

1ο : 94°C για 5 λεπτά (αρχική αποδιάταξη)

2ο : 94°C για 1 λεπτά (αποδιάταξη)

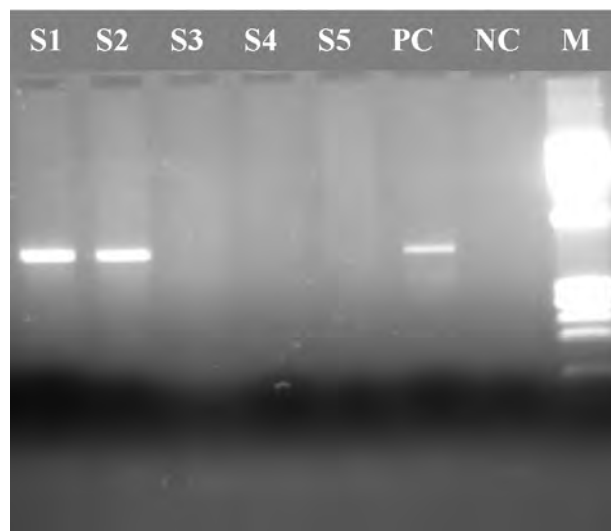
3ο : 55°C για 1 λεπτό (υβριδοποίηση)

4ο : 72°C για 1.30 λεπτά (επιμήκυνση)

40 κύκλοι επαναλαμβανόμενων σταδίων 2, 3 και 4

5ο: 72°C για 10 λεπτά (τελική επιμήκυνση)

Το προϊόν της PCR αντίδρασης έχει μέγεθος 450 ζεύγη βάσεων και ελέγχεται με ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης 2% (Εικ 29).

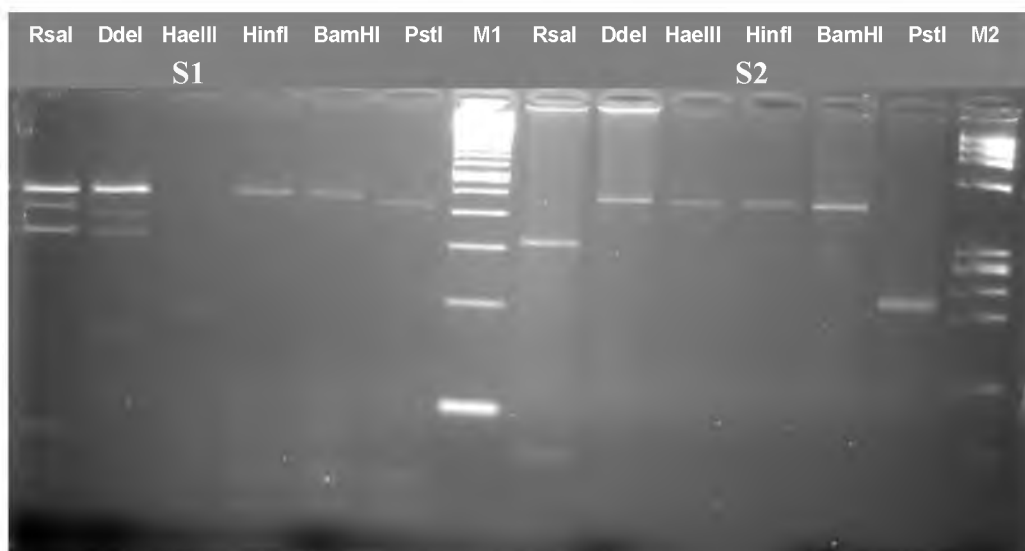


**Εικ. 29.** Ηλεκτροφόρηση PGMY18 PCR προϊόντων (μεγέθους 450 ζεύγη βάσεων) σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. S1, S2, S5: θετικά δείγματα, S3, S4: αρνητικά δείγματα. PC: θετικός μάρτυρας, NC: αρνητικός μάρτυρας, M: μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους pBRMspl (New England Biolabs).

Η ύπαρξη ορατής ζώνης μεγέθους 450 ζευγών βάσεων κατά την ηλεκτροφόρηση αποτυπώνει τα θετικά δείγματα στα οποία ανιχνεύεται ιϊκό DNA (L1 τμήμα).

Ακολουθεί επώαση των θετικών δειγμάτων με κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα για τυποποίηση του στελέχους του HPV ιού. Στις επωάσεις χρησιμοποιήσαμε τα περιοριστικά ένζυμα RsaI, DdeI, HaeIII, HinfI, BamHI και PstI, που αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων και κόβουν σε συγκεκριμένες θέσεις, οδηγώντας σε τυποποίηση συγκεκριμένου στελέχους του ιού HPV. Η επώαση πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 60 μl και περιέχει: 20 μl προϊόντος PCR, 6 μl κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος, 31 μl δις απεσταγμένου νερού (ddH<sub>2</sub>O) και 3 μl περιοριστικού ενζύμου με συγκέντρωση 10.000 units (RsaI, DdeI, HaeIII, HinfI). Τα ένζυμα BamHI και PstI έχουν συγκέντρωση 15.000 units και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων διαμορφώνονται ως εξής: 20 μl προϊόντος PCR, 6 μl κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος, 1.5 μl περιοριστικού ενζύμου και 32.5 μl δις απεσταγμένου νερού (ddH<sub>2</sub>O).

Οι πέψεις τοποθετούνται σε υδατόλουτρο στους 37°C για τουλάχιστον 16 ώρες (overnight). Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πέψης σε πήκτωμα αгарόζης 3%. (Εικ. 30).



**Εικ. 30.** Ηλεκτροφόρηση προϊόντων πέψης σε πήκτωμα αгарόζης 3%. S1, S2: Δείγματα 1, 2. M1= 100 bp μάρτυρας, M2= pBR/MspI μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους (New England Biolabs).

Στα δείγματα που ήταν αρνητικά στην PCR για την ανίχνευση της L1 περιοχής του ιϊκού γονιδιώματος του ιού HPV προχωρήσαμε σε PCR αντιδράσεις με εκκινητές ειδικούς για τα στελέχη 6/11, 16, 18, 31 και 33 του ιού HPV. Οι 5'→3' αλληλουχίες των συγκεκριμένων εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν δίνονται στη συνέχεια:

**16A: 5' GTGGACCGGTCGATGTATGT 3'**

**16B: 5' CATGCAATGTAGGTGTATCT 3'**

**18A: 5' GCAGCACAGAAAACAGTCCA 3'**

**18B: 5' CGCCATTTGTAGTTACCTGA 3'**



**6/11A: 5' ATGTTATGGCAGCACAGTTA 3'**

**6/11B: 5' TTGCACTATAGGCGTAGCTG 3'**

**31A: 5' ATGGTGATGTACACAACACC 3'**

**31B: 5' GTAGTTGCAGGACAACTGAC 3'**

**33A: 5' ACT AAT TTC CTg CAA CgT AA 3'**

**33B: 5' AgT CAA AAT ggC gAC ACA AA 3'**

Ο τελικός όγκος της PCR αντίδρασης για τα συγκεκριμένα στελέχη είναι 50 µl και περιέχει: 5µl DNA από κάθε δείγμα, 10.9 µl μίγματος αντιδραστηρίων και 34.1 µl δις απεσταγμένου νερού (ddH<sub>2</sub>O).

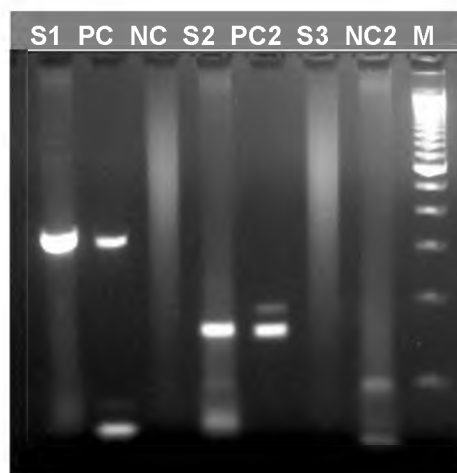
**Μίγμα αντιδραστηρίων**

10x ρυθμιστικό διάλυμα	: 5 µl (1X τελική συγκέντρωση)
Διάλυμα MgCl <sub>2</sub>	: 1.5 µl (1.5 mM τελική συγκέντρωση)
16/18/6-11/31/33 A εκκινητής	: 1µl
16/18/6-11/31/33 B εκκινητής	: 1µl
dNTPs 40 mM	: 2 µl
Platinum Taq DNA πολυμεράση	: 0.4 µl
<b>Τελικός όγκος μίγματος αντιδραστηρίων : 10.9 µl</b>	

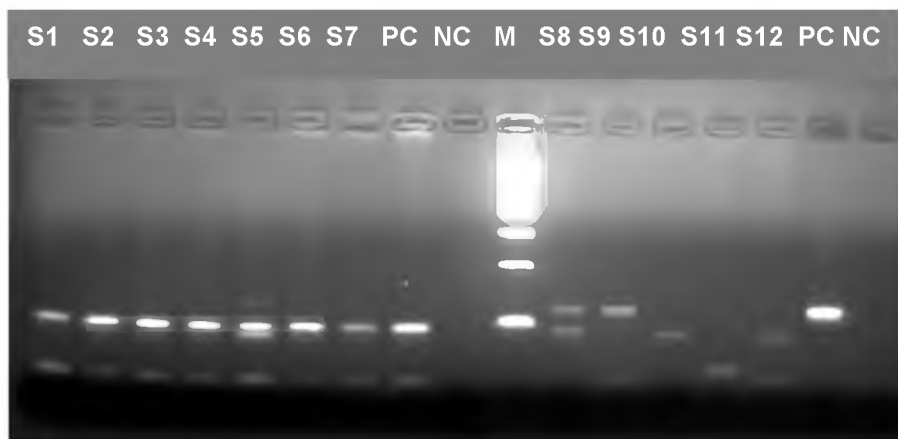
Η PCR λαμβάνει χώρα σε θερμικό κυκλοποιητή Eppendorff και περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια:

- 1ο: 94°C for 5 λεπτά (αρχική αποδιάταξη)
- 2ο: 94°C for 1λεπτό (αποδιάταξη)
- 3ο: 55°C for 1λεπτό (υβριδοποίηση)
- 4ο: 72°C for 1.30 λεπτά (επιμήκυνση)
- 40 κύκλοι επαναλαμβανόμενων σταδίων 2, 3 και 4
- 5ο: 72°C for 10 λεπτά (τελική επιμήκυνση)

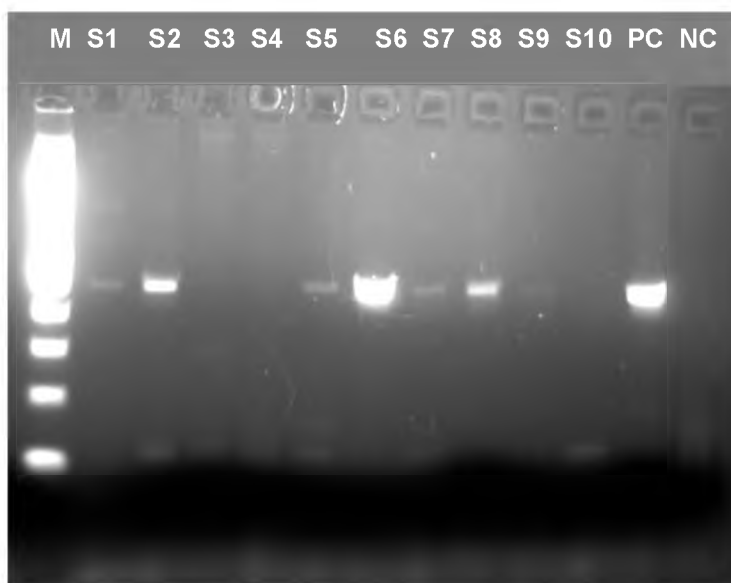
Τα προϊόντα της PCR αντίδρασης για τα συγκεκριμένα στελέχη 6/11, 16, 18, 31 και 33 έχουν μεγέθη 306 ζεύγη βάσεων, 93 ζεύγη βάσεων, 185 ζεύγη βάσεων, 514 ζεύγη βάσεων και 118 ζεύγη βάσεων αντίστοιχα, τα οποία είναι ορατά με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης 3% (Εικ 31).



**Εικ. 31.** Ηλεκτροφόρηση PCR προϊόντων με ειδικούς εκκινητές για τα στελέχη HPV6/11 (306 ζεύγη βάσεων) και HPV18 (185 ζεύγη βάσεων) σε πήκτωμα αγαρόζης 3%. S1 θετικό δείγμα για τα στελέχη 6/11, S2 θετικό δείγμα, S3 αρνητικό δείγμα για το στέλεχος 18 του ιού HPV. PC, PC2: θετικοί μάρτυρες για τα στελέχη 6/11 και 18 του ιού HPV, NC, NC2: αρνητικοί μάρτυρες για τα στελέχη 6/11 και 18 του ιού HPV, M: μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους 100bp ladder (New England Biolabs).



**Εικ. 32.** Ηλεκτροφόρηση PCR προϊόντων με ειδικούς εκκινητές για τα στελέχη HPV16 (93 ζεύγη βάσεων) και HPV33 (118 ζεύγη βάσεων) σε πήκτωμα αγαρόζης 3%. PC: θετικός μάρτυρας, NC: αρνητικός μάρτυρας, M: μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους 100bp ladder (New England Biolabs).



**Εικ. 33.** Ηλεκτροφόρηση PCR προϊόντων με ειδικούς εκκινητές για το στέλεχος HPV31 (514 ζεύγη βάσεων) σε πήκτωμα αγαρόζης 3%. S1, S2, S5, S6, S7, S8, S9 θετικά δείγματα, S3, S4, S10 αρνητικά δείγματα. PC: θετικός μάρτυρας, NC: αρνητικός μάρτυρας, M: μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους 100bp ladder (New England Biolabs).

## 8.8. RNA in situ υβριδισμός.

Προκειμένου να δούμε την ενεργότητα των στελεχών του HPV ιού στα δείγματά μας, μέσω της ανίχνευσης ιικών μορίων mRNA απευθείας στα κύτταρα, εφαρμόσαμε τη μέθοδο του RNA in situ υβριδισμού με χρήση του kit RNAscope™ FFPE Assay, σε ένα μικρό υποσύνολο των δειγμάτων. Το συγκεκριμένο kit αποτελεί ένα σύστημα αντίδρασης το οποίο σχεδιάστηκε προκειμένου να σχηματιστεί ξεκάθαρη εικόνα για τα κυτταρικά μόρια στόχους του ιικού RNA σε τομές ιστών που θα τοποθετηθούν στη φορμόλη και στη συνέχεια θα εμπεδωθούν σε κύβους παραφίνης. Η διαδικασία του RNA in situ υβριδισμού πραγματοποιήθηκε ως εξής:

### 1. Αποπαραφίνωση

- Τοποθετούμε τα πλακίδια σε κατάλληλο στατώ και τα εμβαπτίζουμε στο πρώτο δοχείο που περιέχει ξυλόλη.
- Επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και συχνή ανακίνηση.
- Απομάκρυνση των πλακιδίων από την πρώτη ξυλόλη και τοποθέτηση σε κατάλληλο δοχείο με δεύτερη ξυλόλη.
- Επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και συχνή ανακίνηση.

- Απομάκρυνση των πλακιδίων από την ξυλόλη, τοποθέτηση σε απόλυτη αιθανόλη (100%) σε θερμοκρασία δωματίου για 3 λεπτά και συχνή ανακίνηση, προκειμένου να απομακρυνθεί η ξυλόλη που μπορεί να έχει απομείνει.
- Αφαίρεση της αιθανόλης και προσθήκη νέας απόλυτης αιθανόλης (100%) μέσα στην οποία τοποθετούμε τα πλακίδια για 3 λεπτά.
- Απομάκρυνση των πλακιδίων από την αιθανόλη.
- Αφήνουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά για να στεγνώσουν.
- Δημιουργούμε ένα υδρόφοβο όριο γύρω από την τομή, χρησιμοποιώντας ένα ειδικό στυλό (ImmEdge Hydrophobic Barrier Pen).

## **2. Αποκλεισμός ενδογενούς υπεροξειδάσης:**

- Αφήνουμε τα πλακίδια στον πάγκο και προσθέτουμε 8-10 σταγόνες του πρώτου διαλύματος προετοιμασίας (Pretreat 1) σε κάθε τομή και επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά.
- Απομάκρυνση του διαλύματος προετοιμασίας (Pretreat 1)
- Ξέπλυμα των πλακιδίων με απεσταγμένο νερό.

## **3. Προεπεξεργασία των ιστών:**

- Τοποθέτηση 700 ml διαλύματος 1X διαλύματος προετοιμασίας (Pretreat 2) σε ποτήρι ζέσεως όγκου 1000 ml και τοποθέτηση σε βραστήρα ώστε να βράσει 10-12 λεπτά. Ελέγχουμε συνεχώς τη θερμοκρασία, έτσι ώστε αυτή να μην υπερβεί το σημείο βρασμού.
- Τοποθετούμε τα πλακίδια σε κατάλληλο στατώ και συμπληρώνουμε τις κενές θέσεις με άδεια πλακίδια ώστε να συμπληρωθούν όλες οι θέσεις στο στατώ. Τοποθετούμε προσεκτικά το στατώ μέσα στο διάλυμα προετοιμασίας 1X Pretreat 2 που βράζει, σκεπάζουμε με αλουμινόχαρτο και βράζουμε για 15 λεπτά.
- Απομάκρυνση του στατώ και εμβάπτιση σε δοχείο με απεσταγμένο νερό.
- Ξέπλυμα με φρέσκο απεσταγμένο νερό και ανακίνηση.

## **4. Επώαση με το ένζυμο της πρωτεάσης:**

- Απομάκρυνση της μεγαλύτερης ποσότητας του διαλύματος που έχει μείνει πάνω στις τομές, χωρίς όμως να τις στεγνώσουμε εντελώς.
- Τοποθετούμε τα πλακίδια στο ειδικό στατώ πλακιδίων.
- Προσθέτουμε 3-4 σταγόνες διαλύματος προετοιμασίας 3 (Pretreat 3) σε κάθε τομή.
- Τοποθετούμε το στατώ με τα πλακίδια σε θήκη με ελεγχόμενη υγρασία, καλύπτουμε και επωάζουμε σε κατάλληλο φούρνο (Hybez™) για 30 λεπτά στους 40°C.

## **5. Διακοπή επώασης του ενζύμου της πρωτεάσης:**

- Βγάζουμε τα πλακίδια από τον φούρνο και αφαιρούμε το διάλυμα επεξεργασίας 3 (Pretreat 3).
- Τοποθετούμε τα πλακίδια στο στατώ και το εμβαπτίζουμε σε δοχείο που περιέχει 250 ml απεσταγμένου νερού.
- Αφαίρεση του νερού και ξέπλυμα με φρέσκο απεσταγμένο νερό.

#### **6. Υβριδοποίηση του στόχου:**

- Απομάκρυνση του απεσταγμένου νερού από τις τομές χωρίς όμως να τις στεγνώσουμε εντελώς.
- Τοποθέτηση των πλακιδίων στο ειδικό στατώ και προσθήκη 3-4 σταγόνων από τον ανιχνευτή (probe) σε κάθε τομή.
- Τοποθέτηση των πλακιδίων στον φούρνο για 2 ώρες στους 40°C.
- Κατά τη διάρκεια της επώασης, γεμίζουμε ένα δοχείο με 200 ml φρέσκου διαλύματος πλύσης 1X (Wash buffer).

#### **7. Ξέπλυμα:**

- Απομάκρυνση των πλακιδίων από τον φούρνο.
- Αφαίρεση του ανιχνευτή (probe) και επώαση των πλακιδίων στο δοχείο που περιέχει το διάλυμα πλύσης για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με ταυτόχρονη ανακίνηση.
- Αντικατάσταση του διαλύματος πλύσης με φρέσκο διάλυμα και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ακόμη λεπτά με ανακίνηση.

#### **8. Προ-ενίσχυση της υβριδοποίησης:**

- Αφαίρεση του διαλύματος πλύσης από τα πλακίδια, χωρίς να στεγνώσουν εντελώς οι τομές.
- Τοποθέτηση των πλακιδίων στο φούρνο και προσθήκη 3-4 σταγόνων έτοιμου προς χρήση ενισχυτικού διαλύματος (Amp1) σε κάθε τομή.
- Επώαση των πλακιδίων για 30 λεπτά στους 40°C.

#### **9. Ξέπλυμα:**

- Επανάληψη του σταδίου 7.

#### **10. Ενίσχυση σήματος:**

- Αφαίρεση του διαλύματος πλύσης από τα πλακίδια, χωρίς να στεγνώσουν τελείως οι τομές.
- Τοποθέτηση των πλακιδίων στο ειδικό στατώ και προσθήκη 3-4 σταγόνων του ενισχυτικού διαλύματος Amp 2 σε κάθε τομή.
- Επώαση στον φούρνο για 15 λεπτά στους 40°C.

#### **11. Ξέπλυμα:**

- Επανάληψη του σταδίου 7.

#### **12. Ενίσχυση του υβριδισμού:**

- Αφαίρεση του ενισχυτικού διαλύματος από τα πλακίδια, χωρίς να στεγνώσουν τελείως οι τομές.
- Τοποθέτηση των πλακιδίων στο ειδικό στατώ και προσθήκη 3-4 σταγόνων του ενισχυτικού διαλύματος Amp 3 σε κάθε τομή.
- Επώαση στον φούρνο για 30 λεπτά στους 40°C.

#### **13. Ξέπλυμα:**

- Επανάληψη του σταδίου 7.

**14. Σήμανση του ανιχνευτή υβριδοποίησης:**

- Αφαίρεση του διαλύματος πλύσης από τα πλακίδια, χωρίς να στεγνώσουν τελείως οι τομές.
- Τοποθέτηση των πλακιδίων στο ειδικό στατώ και προσθήκη 3-4 σταγόνων του διαλύματος σήμανσης Amp σε κάθε τομή.
- Επώαση στον φούρνο για 15 λεπτά στους 40°C.

**15. Ξέπλυμα:**

- Επανάληψη του σταδίου 7.

**16. Χρωματομετρική αντίδραση:**

- Ανάμιξη ίσης ποσότητας των διαλυμάτων DAB-A και DAB-B και καλή ανακίνηση του DAB μίγματος.
- Αφαίρεση των πλακιδίων και τοποθέτηση σε στεγνό χαρτί με την τομή του ιστού ορατή (facing up).
- Προσθήκη 120 μl μίγματος DAB σε κάθε τομή.
- Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά.
- Αφαίρεση και απόρριψη του διαλύματος DAB σε δοχείο απορριμάτων που περιέχει 20% λευκαντικό.
- Ξέπλυμα των πλακιδίων με απεσταγμένο νερό και καλή ανακίνηση.

**17. Αντιχρώση:**

- Τοποθέτηση των πλακιδίων σε δοχείο που περιέχει 25% Gill's αιματοξυλίνη και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά.
- Ξέπλυμα των πλακιδίων σε απεσταγμένο νερό και καλή ανακίνηση μέχρι να αποχρωματιστούν τα πλακίδια αλλά όχι οι τομές του ιστού.
- Αφαίρεση του απεσταγμένου νερού, εμβάπτιση του στατώ με τα πλακίδια σε διάλυμα αμμωνίας 0,01% και καλή ανακίνηση.
- Ξέπλυμα με φρέσκο απεσταγμένο νερό και καλή ανακίνηση.

**18. Αφυδάτωση:**

- Τοποθέτηση των πλακιδίων σε δοχείο που περιέχει 50% αιθανόλη για 1-2 λεπτά και καλή ανακίνηση.
- Τοποθέτηση των πλακιδίων σε δοχείο που περιέχει 70% αιθανόλη για 1-2 λεπτά και καλή ανακίνηση.
- Τοποθέτηση των πλακιδίων σε δοχείο που περιέχει 100% αιθανόλη για 5-10 λεπτά και καλή ανακίνηση.
- Τοποθέτηση των πλακιδίων σε δοχείο που περιέχει ξυλόλη για 1-5 λεπτά και καλή ανακίνηση.
- Αφαίρεση των πλακιδίων από το στατώ και τα αφήνουμε να στεγνώσουν.

**19. Κάλυψη των τομών:**

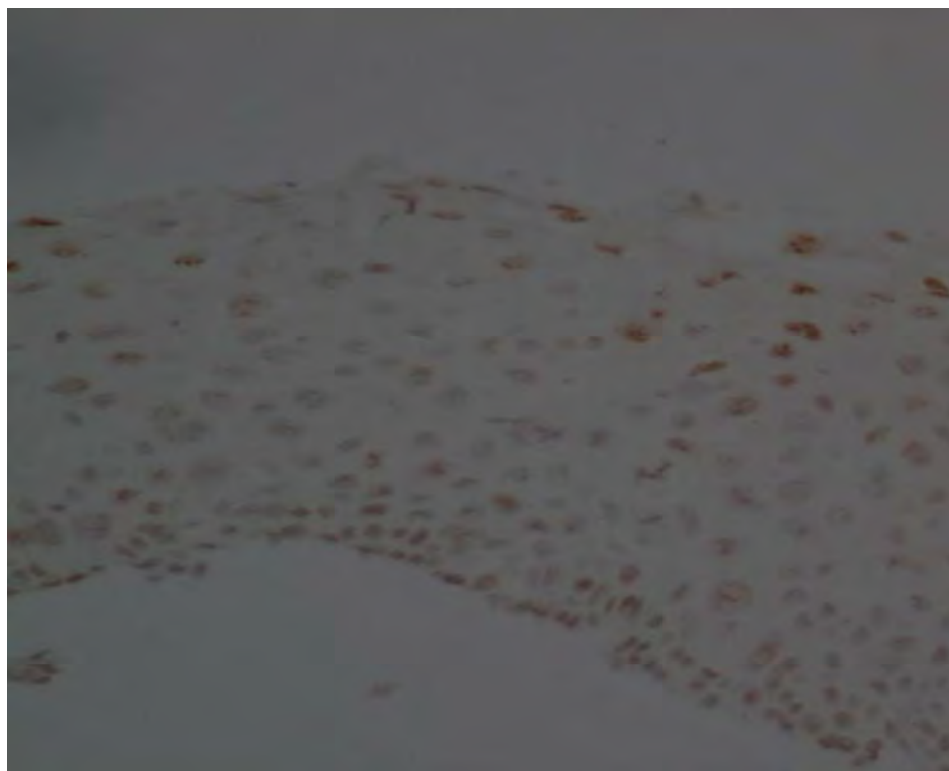
- Σε κάθε τομή προσθέτουμε 1-2 σταγόνες καλυπτικού διαλύματος (Cytoseal mounting medium).
- Προσθήκη καλυπτρίδας διαστάσεων 50X22 mm και απομάκρυνση φυσαλίδων.
- Στέγνωμα πλακιδίων.

## 20. Έλεγχος της χρώσης:

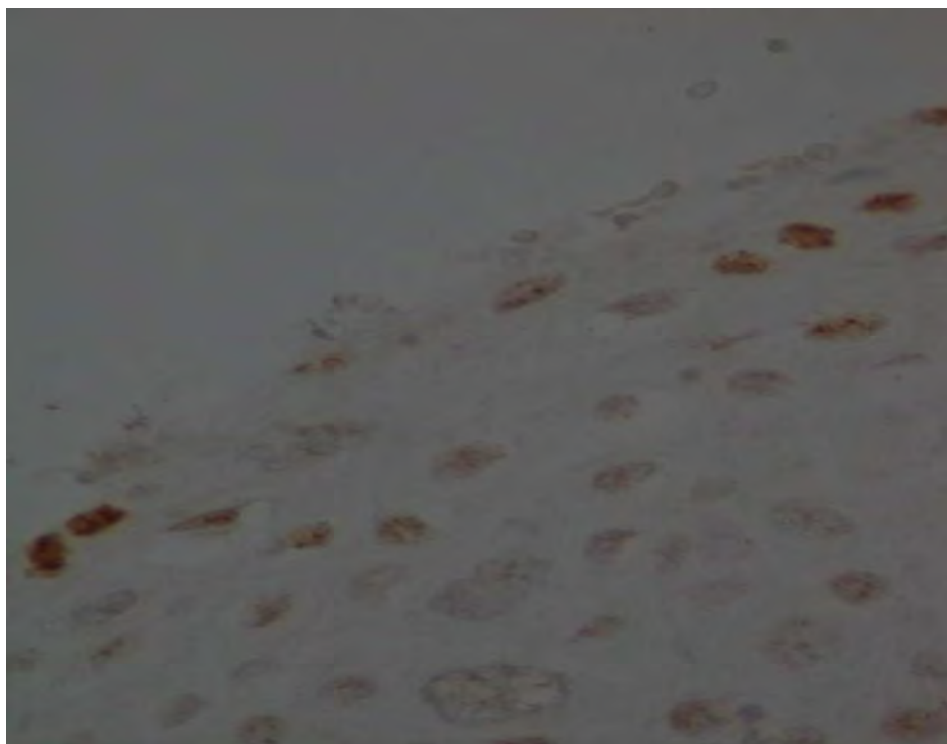
- Ελέγχουμε την χρώση με παρατήρηση σε οπτικό μικροσκόπιο και σύμφωνα με τις προτεινόμενες οδηγίες για τη διαβάθμιση.

Η ένταση της χρώσης της συγκεκριμένης μεθόδους ταξινομείται σε πέντε βαθμούς: 0, 1+, 2+, 3+ και 4+. Οι βαθμοί αυτοί αξιολογούνται με βάση τα ακόλουθα κριτήρια.

Ένταση χρώσης	Κριτήρια
0	Καμία χρώση
1	Δυσκολία στην ανίχνευση της χρώσης σε μεγέθυνση μικρότερη του 40X
2	Δυσκολία στην ανίχνευση της χρώσης σε μεγέθυνση μικρότερη του 20X, αλλά εύκολη ανίχνευση σε μεγέθυνση μικρότερη του 40X
3	Δυσκολία στην ανίχνευση της χρώσης σε μεγέθυνση μικρότερη του 10X, αλλά εύκολη ανίχνευση σε μεγέθυνση μικρότερη του 20X
4	Δυσκολία στην ανίχνευση της χρώσης σε μεγέθυνση μικρότερη του 10X



**Εικ. 34.** RNA in situ υβριδισμός σε βιοψία τραχήλου μήτρας με αλλοιώσεις HGSIL (X 20). Στην συγκεκριμένη περίπτωση ανιχνεύθηκε το στέλεχος 16 του ιού HPV με τη μέθοδο της PCR.



**Εικ. 35.** RNA in situ υβριδισμός σε βιοψία τραχήλου μήτρας με αλλοιώσεις HGSIL (X 40). Στην συγκεκριμένη περίπτωση ανιχνεύθηκε το στέλεχος 16 του ιού HPV με τη μέθοδο της PCR.



## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 9. Επιδημιολογικά στοιχεία ατόμων που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη.

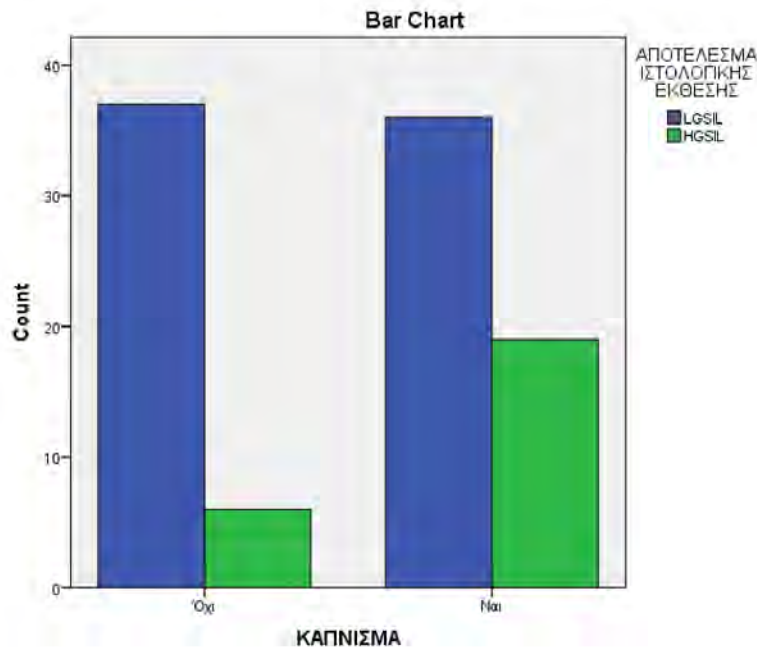
Στην παρούσα μελέτη συμπεριλήφθηκαν συνολικά 134 γυναίκες. Στην πλειοψηφία των γυναικών έγινε λήψη ιστορικού και συλλογή τραχηλικού επιχρίσματος και βιοψίας. Από την μελέτη εξαιρέθηκαν 11 γυναίκες από τις οποίες έγινε λήψη τραχηλικού επιχρίσματος αλλά όχι και βιοψίας. Ακολούθησε ιστολογική διάγνωση και εκτίμηση των αλλοιώσεων που παρουσίαζαν οι γυναίκες, ενώ γενετικό υλικό (DNA) απομονώθηκε τόσο από τα τραχηλικά επιχρίσματα όσο και από τις βιοψίες μετά τη μονιμοποίησή τους. Λαμβάνοντας υπόψη την ιστολογική διάγνωση, εξαιρέθηκαν από τη μελέτη 5 επιπλέον γυναίκες καθώς οι βιοψίες των 3 έδειξαν φλεγμονή και ελάχιστο ή ανύπαρκτο επιθήλιο και των άλλων 2 αντιστοιχούσαν σε ενδοτραχηλικό βλεννογόνο.

Στο σύνολο των 118 δειγμάτων πραγματοποιήθηκε απομόνωση γενετικού υλικού (DNA) και ακολούθησε η ανίχνευση της παρουσίας του HPV ιού και η τυποποίησή του με μοριακές τεχνικές. Ο ιός των ανθρωπίνων θηλωμάτων ανιχνεύθηκε σε 110/118 γυναίκες (93,22%), ενώ σε 8/118 γυναίκες (6,78%) δεν ανιχνεύθηκε ο HPV ιός.

Οι γυναίκες που συμμετείχαν στη μελέτη συμπλήρωσαν ερωτηματολόγιο ανώνυμα προκειμένου να διασφαλιστούν τα προσωπικά τους δεδομένα. Κατά την συμπλήρωση του ερωτηματολογίου ελήφθη άδεια χρήσεως του υλικού για τη μελέτη, μετά από πλήρη ενημέρωση των συμμετεχόντων και διαβεβαίωση ότι θα διασφαλιστεί η ανωνυμία τους και τα προσωπικά τους δεδομένα. Συγκεντρώσαμε πληροφορίες που αφορούν στο μορφωτικό τους επίπεδο, στο κάπνισμα, στην ύπαρξη παθολογικού τεστ Παπανικολάου (Pap), στην ύπαρξη προηγούμενης λοίμωξης από HPV ιό, χλαμύδια (*Chlamydia trachomatis*).

Όσον αφορά το επίπεδο μόρφωσης, 50/118 γυναίκες (42,4%) έχουν Τριτοβάθμια εκπαίδευση, 41/118 (34,7%) έχουν Δευτεροβάθμια εκπαίδευση, 10/118 γυναίκες (8,5%) έχουν Πρωτοβάθμια εκπαίδευση, ενώ 17/118 γυναίκες (14,4%) δεν απάντησαν στην ερώτηση.

Στην ερώτηση αν καπνίζουν ή όχι, 57/118 γυναίκες (48,3%) δήλωσαν ότι καπνίζουν, 44/118 γυναίκες (37,3%) δεν καπνίζουν και ένα ποσοστό 14,4% (17/118) δεν απάντησε στην ερώτηση. Από τον έλεγχο Pearson Chi Square προκύπτει ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των υψηλού βαθμού αλλοιώσεων (HGSIL) και του καπνίσματος ( $p=0.02$ ). Παρατηρείται δηλαδή ότι αναλογικά περισσότερα HGSIL αποτελέσματα καταγράφονται στις ασθενείς που είναι καπνίστριες συγκριτικά με τα HGSIL των μη καπνιστριών. Η συσχέτιση αποδίδεται γραφικά από το ραβδόγραμμα που ακολουθεί.



**Διάγραμμα 1:** Απεικόνιση του βαθμού αλλοιώσεων σε σχέση με το κάπνισμα. Στατιστικά σημαντική συσχέτιση HGSIL αλλοιώσεων με κάπνισμα ( $p=0.02$ ).

Προκειμένου να συλλέξουμε πληροφορίες σχετικά με τον HPV ιό, οι γυναίκες απάντησαν σε ερωτήσεις σχετικά με το αν είχαν προηγούμενο παθολογικό τεστ Παπανικολάου, καθώς και εάν είχαν προηγούμενη λοίμωξη από HPV ιό ή/και χλαμύδια. 87/118 γυναίκες (73,7%) είχαν παθολογικό τεστ Παπανικολάου, 17/118 (14,4%) δεν είχαν παθολογικό τεστ Παπανικολάου, ενώ 14/118 γυναίκες (11,9%) δεν θυμόταν/ δεν απάντησαν στην ερώτηση.

Αναφορικά με την ύπαρξη προγενέστερης λοίμωξης από τον HPV ιό, 33,9% των γυναικών (40/118) είχαν προηγούμενη λοίμωξη από ένα ή περισσότερα στελέχη του HPV ιού, 51,7% (61/118) δεν είχαν προσβληθεί από τον ιό ή δεν είχαν κάνει HPV DNA τεστ, ενώ 14,4% των γυναικών (17/118) δεν απάντησαν στην ερώτηση. Όσον αφορά στην ερώτηση αν είχαν προσβληθεί από χλαμύδια (*Chlamydia trachomatis*) 5/118 γυναίκες (4,2%) απάντησαν θετικά, 95/118 (80,5%) απάντησαν αρνητικά και 18/118 γυναίκες (15,3%) δεν θυμόταν/ δεν απάντησαν στην ερώτηση. Δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση.

### 9.1. Εκτίμηση ιστολογικών αλλοιώσεων και ανίχνευση – τυποποίηση του HPV ιού.

Η κατάταξη των δειγμάτων της μελέτης, έχοντας ως κριτήριο τις ιστολογικές αλλοιώσεις που ανιχνεύτηκαν, παρουσιάζεται στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 3):

**Πίνακας 3.**

Ιστολογική Ταξινόμηση	Αριθμός δειγμάτων	Ποσοστό (%)
LGSIL	87	70,73
HGSIL	28	22,76
Καρκίνοι	3	2,44
Φλεγμονές*	3	2,44
Ενδοτραχηλικός βλεννογόνος*	2	1,63
ΣΥΝΟΛΟ	123	100

\* : εξαιρέθηκαν από τη μελέτη

Η ιστολογική διάγνωση έδειξε χαμηλού βαθμού δυσπλασία σε 87 γυναίκες. Η μοριακή ανάλυση των δειγμάτων με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) έδειξε την παρουσία στελεχών του HPV ιού σε 79 γυναίκες (90,81%) ενώ σε 8 γυναίκες (9,19%) δεν ανιχνεύθηκε ο ιός (Πίνακας 4).

**Πίνακας 4.**

LGSIL	Αριθμός δειγμάτων	Ποσοστό (%)
Θετικά	79	90,81
Αρνητικά	8	9,19
ΣΥΝΟΛΟ	87	100

Η ιστολογική διάγνωση έδειξε υψηλού βαθμού δυσπλασία σε 28 γυναίκες. Η μοριακή ανάλυση των δειγμάτων με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) έδειξε την παρουσία στελεχών του HPV ιού σε όλες τις γυναίκες (100%) (Πίνακας 5).

**Πίνακας 5.**

HGSIL	Αριθμός δειγμάτων	Ποσοστό (%)
Θετικά	28	100
Αρνητικά	0	0
ΣΥΝΟΛΟ	28	100

Σε δύο γυναίκες που συμπεριλήφθησαν στη μελέτη μας ανιχνεύθηκε καρκίνωμα πλακωδών κυττάρων και σε μία γυναίκα ανιχνεύθηκε αδενοκαρκίνωμα. Η μοριακή ανάλυση

των δειγμάτων με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) έδειξε την παρουσία στελεχών του HPV ιού και στις τρεις γυναίκες (100%).

Στο σύνολο των 110 θετικών δειγμάτων για τον HPV ιό, σε 101 δείγματα ταυτοποιήθηκε το στέλεχος του HPV ιού, ενώ στα υπόλοιπα 9 θετικά δείγματα αποκλείστηκαν, με τη χρήση εξειδικευμένων εκκινητών, τα στελέχη 6,11, 16, 18, 31 και 33. Αυτά τα 9 θετικά δείγματα έφεραν κάποιον άλλο τύπο του ιού, όμως λόγω μη επαρκούς ενίσχυσης του PCR προϊόντος δεν έγινε δυνατή η τυποποίηση.

Στις βιοψίες με χαμηλού βαθμού αλλοιώσεις (LGSIL) τα συχνότερα στελέχη του HPV ιού που ταυτοποιήθηκαν παρουσιάζονται με τη σειρά παρακάτω: 16, 18, 31, 33, 51 και 6,11 (Πίνακας 6).

**Πίνακας 6.**

<b>LGSIL Βιοψίες, 79 HPV(+)</b>	<b>Στελέχη</b>	<b>Αριθμός δειγμάτων</b>
	<b>16</b>	<b>27</b>
	<b>18</b>	<b>12</b>
	<b>31</b>	<b>9</b>
	<b>Θετικά</b>	<b>8</b>
	<b>33</b>	<b>6</b>
	<b>51</b>	<b>5</b>
	<b>6,11</b>	<b>5</b>
	<b>56</b>	<b>3</b>
	<b>61</b>	<b>2</b>
	<b>59</b>	<b>1</b>
	<b>MM8</b>	<b>1</b>
	<b>52</b>	<b>1</b>
	<b>45</b>	<b>1</b>
	<b>39</b>	<b>1</b>
	<b>67</b>	<b>1</b>
	<b>53</b>	<b>1</b>
	<b>CP8304</b>	<b>1</b>
	<b>62</b>	<b>1</b>

Στις βιοψίες με υψηλού βαθμού αλλοιώσεις (HGSIL) τα συχνότερα στελέχη του HPV ιού που ανιχνεύτηκαν είναι τα ακόλουθα: 16, 31, 18, 33, 6,11 και 59 (Πίνακας 7).

**Πίνακας 7.**

HGSIL Βιοψίες, 28 HPV(+)	Στελέχη	Αριθμός δειγμάτων
	16	20
	31	7
	18	5
	33	4
	*6,11	4
	59	3
	56	1
	MM9	1
	58	1
	Θετικά	1

\*Τα τέσσερα δείγματα με στελέχη 6,11 συμμετέχουν σε πολλαπλές λοιμώξεις.

Η μοριακή ανάλυση των δειγμάτων με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης έδειξε λοίμωξη από ένα ή περισσότερα στελέχη του HPV ιού. Στον παρακάτω πίνακα βλέπουμε τον αριθμό των γυναικών που φέρουν πολλαπλές λοιμώξεις σε σχέση με αυτές που έχουν προσβληθεί από ένα και μόνο στέλεχος του ιού (Πίνακας 8).

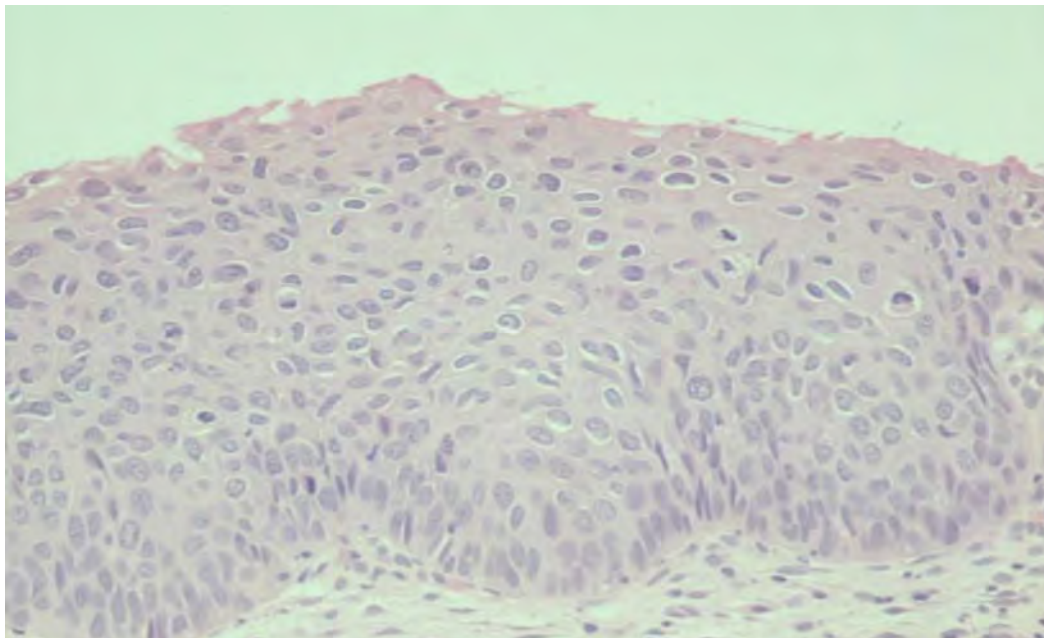
Παρατηρούμε ότι στις χαμηλού βαθμού δυσπλασίες (LGSIL), τα 2/3 των γυναικών έχουν προσβληθεί από ένα και μόνο στέλεχος του HPV ιού και μόνο το 1/3 των γυναικών που μελετήσαμε φέρει πολλαπλές λοιμώξεις. Αντίθετα, στις υψηλόβαθμες δυσπλασίες (HGSIL), οι πολλαπλές λοιμώξεις αυξάνουν σημαντικά και πλησιάζουν το 50% των προσβεβλημένων από τον ιό γυναικών. Στις περιπτώσεις των γυναικών με καρκίνο και οι δύο γυναίκες έχουν το στέλεχος 16 του HPV ιού.

**Πίνακας 8.**

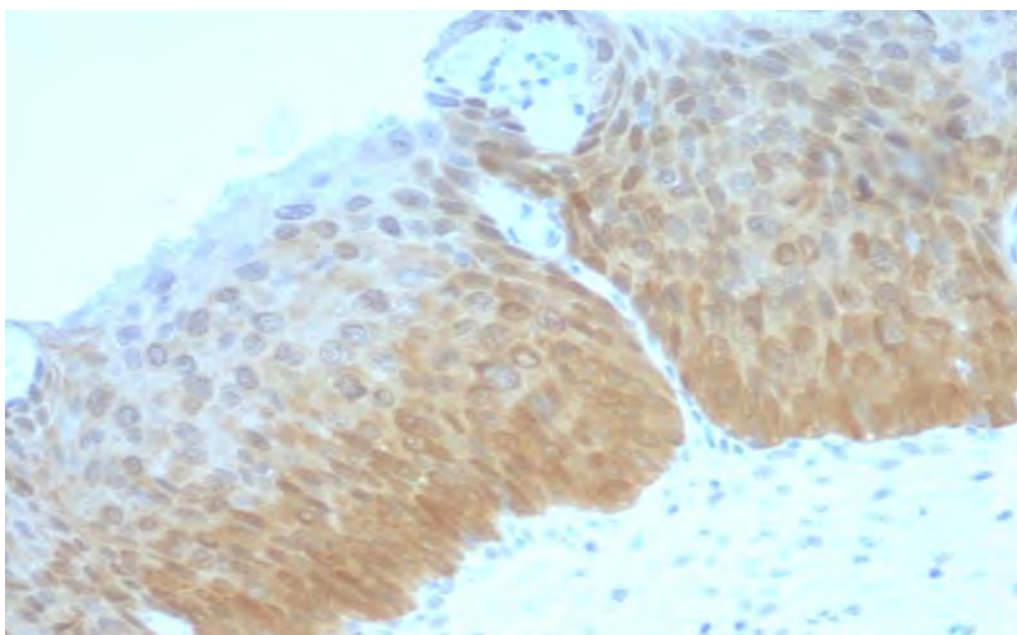
HPV Θετικά - Ταυτοποιημένο στέλεχος	Μονές λοιμώξεις (%)	Πολλαπλές λοιμώξεις (%)
LGSIL	56/71 (78,87)	15/71 (21,13)
HGSIL	14/27 (51,85)	13/27 (48,15)
Καρκίνοι	3/3 (100)	0 (0)
Σύνολο	73/101 (72,28)	28/101 (27,72)

## 9.2. Ανοσοϊστοχημική έκφραση των δεικτών p16, κυκλίνης-B1 και MIB-1.

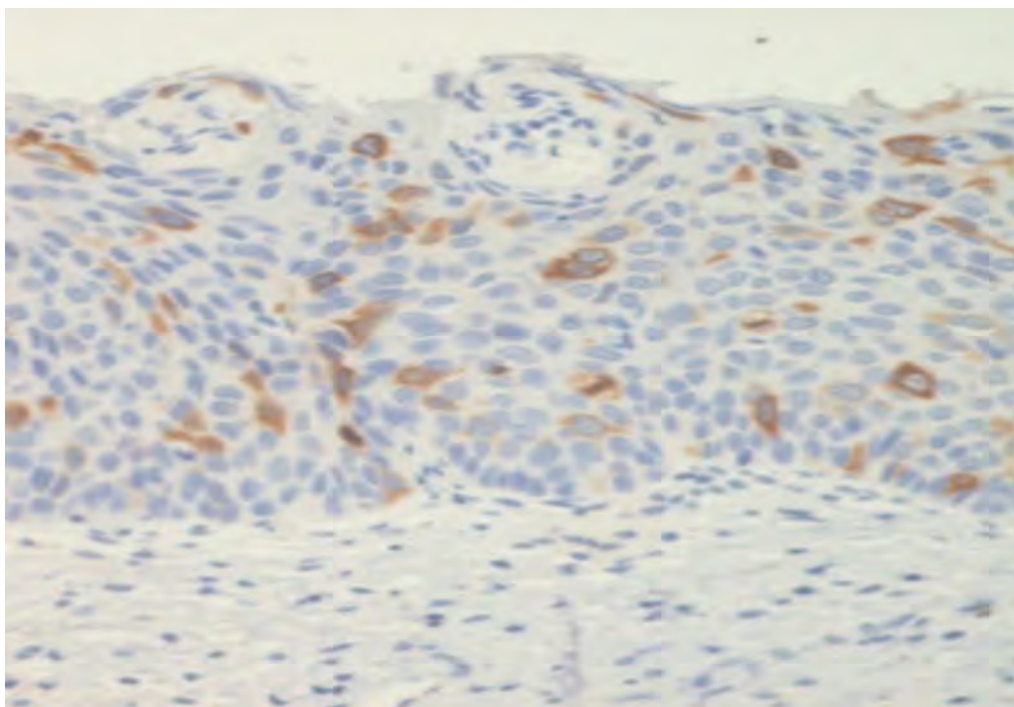
Στις βιοψίες των 118 γυναικών που περιλαμβάνονται στη μελέτη μας, μελετήθηκαν παράλληλα οι ανοσοϊστοχημικοί δείκτες p16, κυκλίνη-B1 και MIB-1. Στη συνέχεια παρατίθενται εικόνες από τα πρότυπα έκφρασης των συγκεκριμένων χρώσεων.



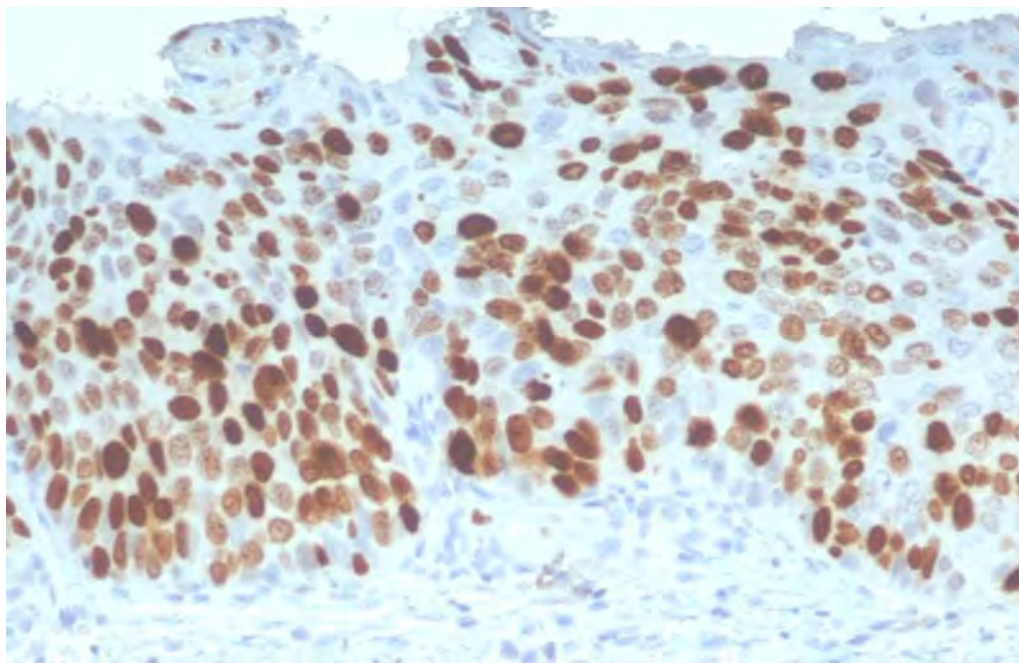
**ΕΙΚΟΝΑ 1:** Χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης (H/E) σε βιοψία τραχήλου μήτρας με HGSIL αλλοιώσεις (Χ20). \* Στην συγκεκριμένη περίπτωση παρατηρήθηκε πολλαπλή λοίμωξη από τα στελέχη 16, 31, 33 και 18 του HPV ιού με τη μέθοδο της PCR.



**ΕΙΚΟΝΑ 2:** Ανοσοϊστοχημική χρώση για το p16 (Χ20). Παρατηρείται διάχυτη θετικότητα σε όλες στιβάδες του επιθηλίου (pattern C). \* Στη συγκεκριμένη περίπτωση παρατηρήθηκε πολλαπλή λοίμωξη από τα στελέχη 16, 31, 33 και 18 του HPV ιού με τη μέθοδο της PCR.

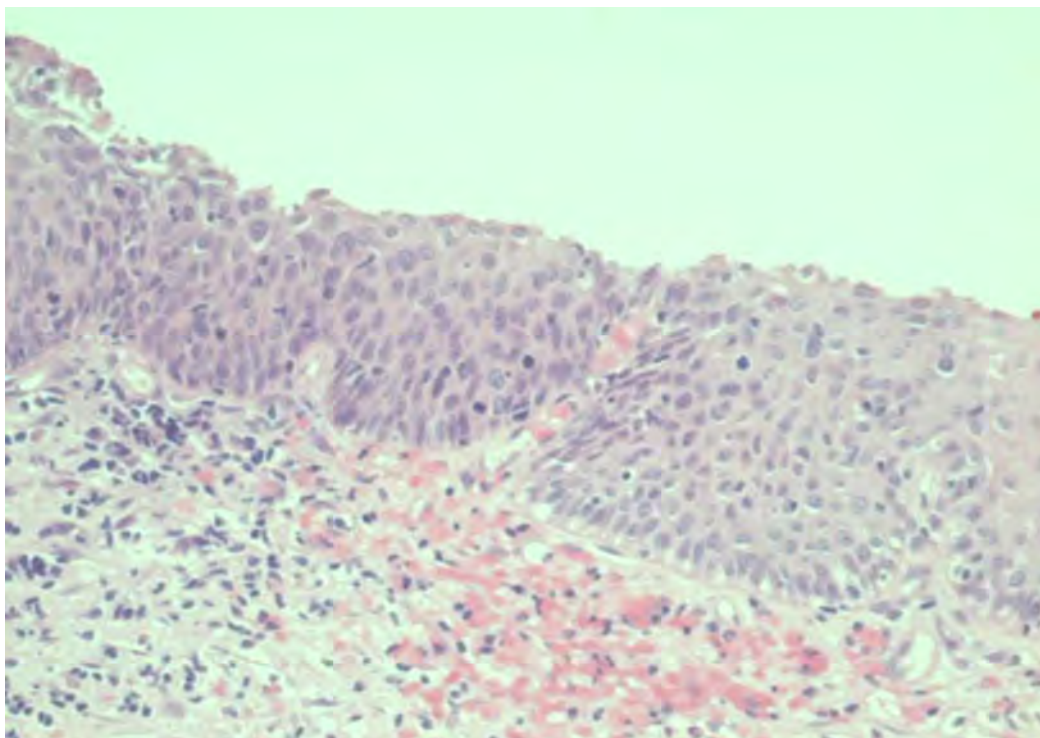


**ΕΙΚΟΝΑ 3:** Ανοσοϊστοχημική χρώση για την κυκλίνη – B1 (X20). Παρατηρείται σημαντικός αριθμός δυσπλαστικών κυττάρων στις ανώτερες στιβάδες του επιθηλίου (pattern C).

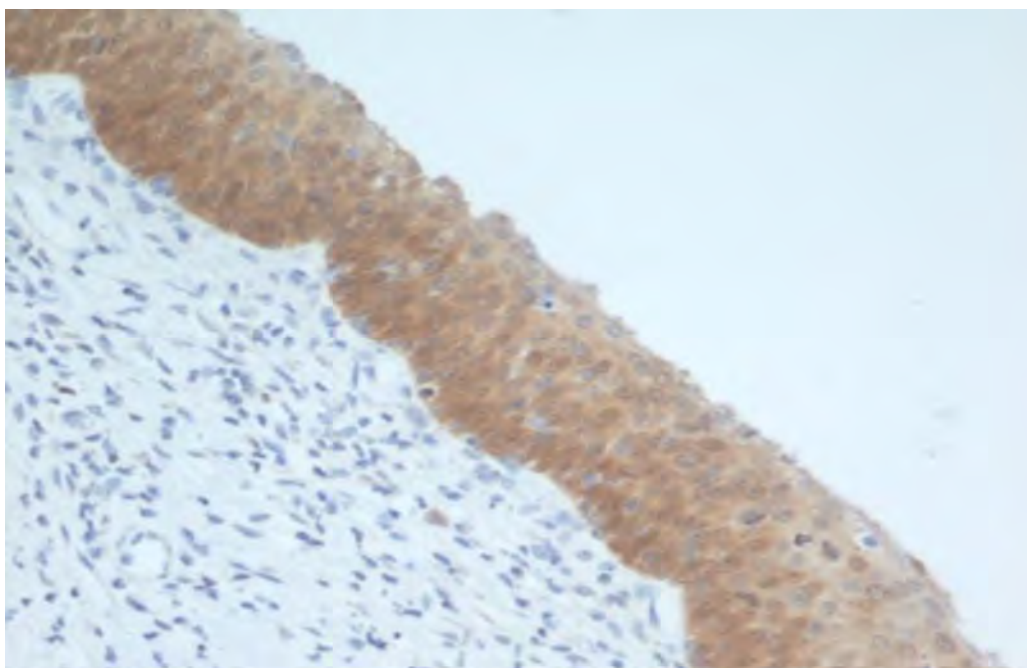


**ΕΙΚΟΝΑ 4:** Ανοσοϊστοχημική χρώση για το MIB-1 (X20). Παρατηρείται θετικότητα σε όλες στιβάδες του επιθηλίου (3/3).



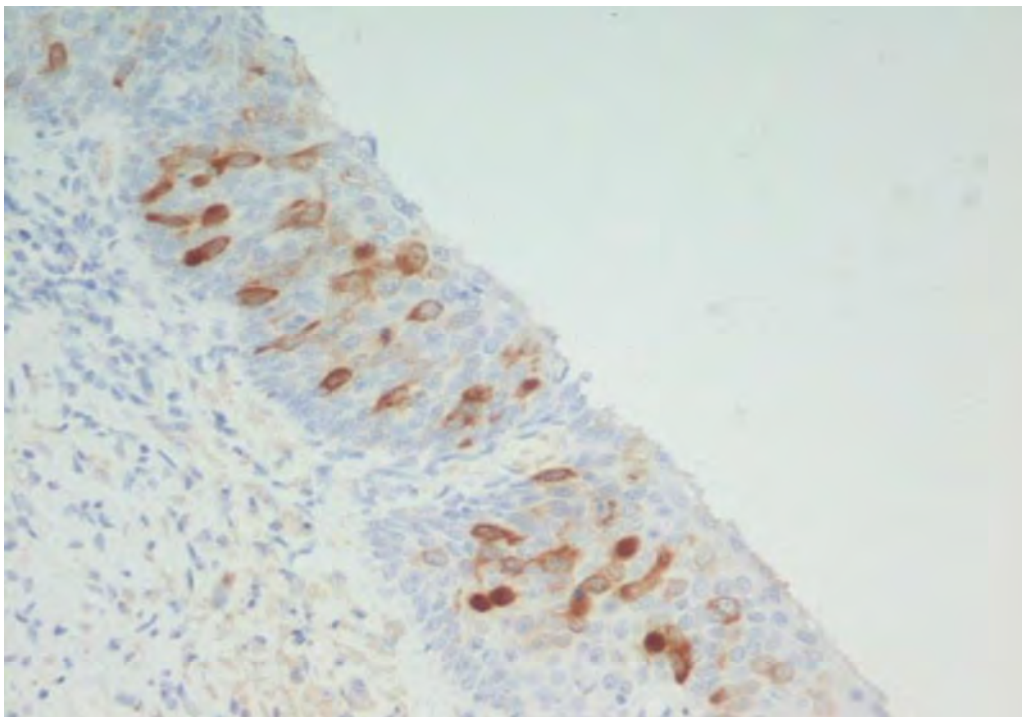


**ΕΙΚΟΝΑ 5:** Χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης (H/E) σε βιοψία τραχήλου μήτρας με HGSIL αλλοιώσεις (Χ20). \*Στη συγκεκριμένη περίπτωση παρατηρήθηκε λοίμωξη από το στέλεχος 16 του HPV ιού με τη μέθοδο της PCR.

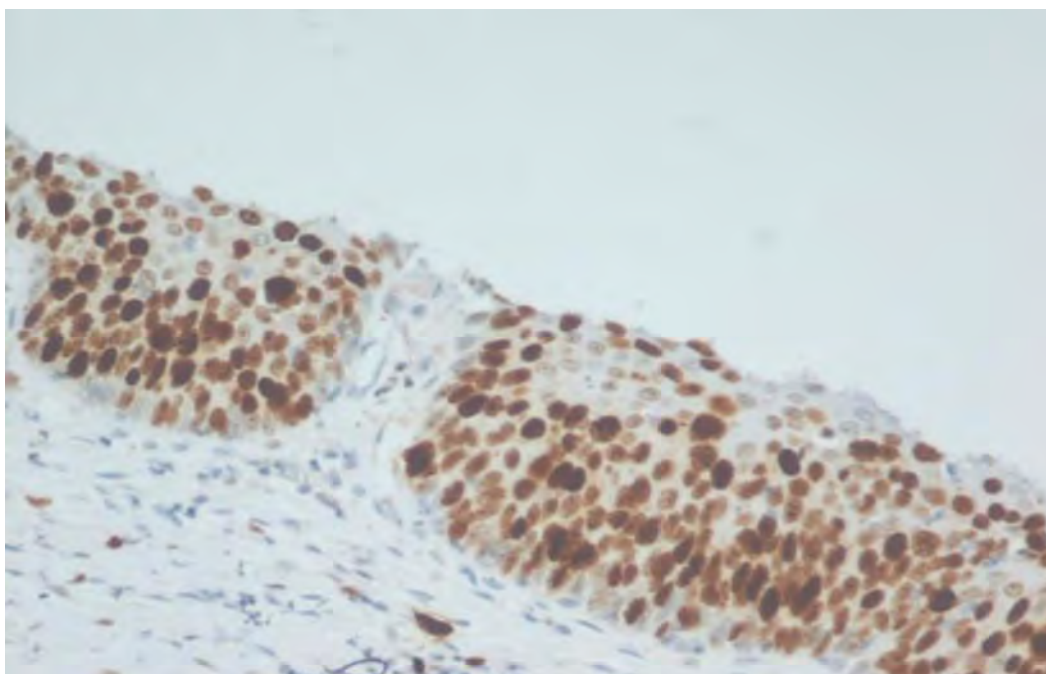


**ΕΙΚΟΝΑ 6:** Ανοσοϊστοχημική χρώση για το p16 (Χ20). Παρατηρείται διάχυτη θετικότητα σε όλες στιβάδες του επιθηλίου (pattern C).

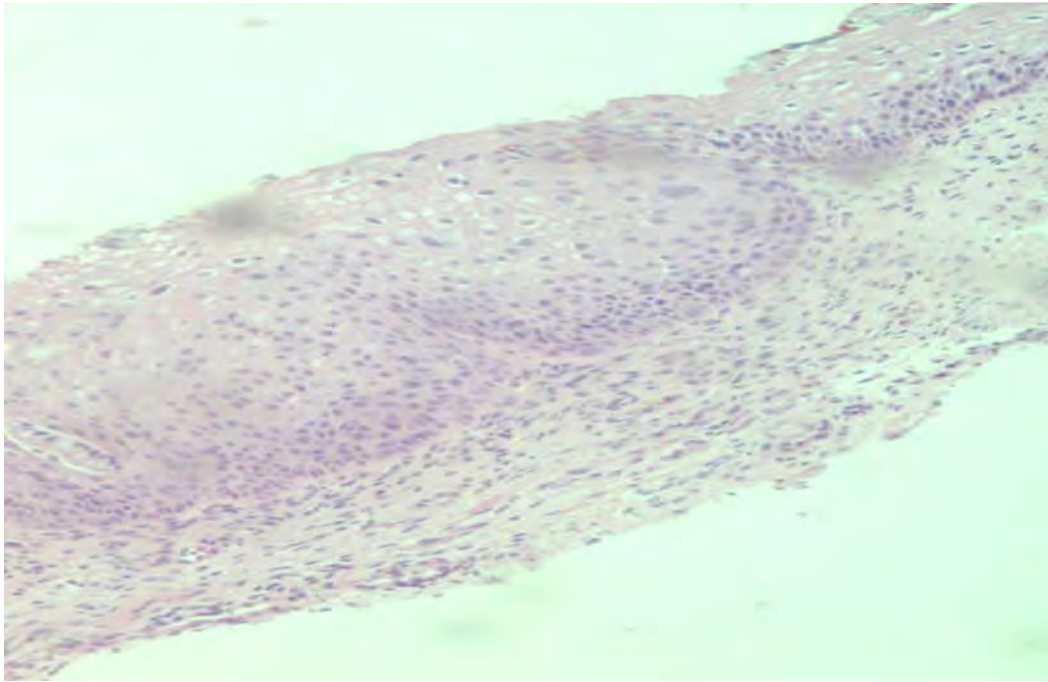




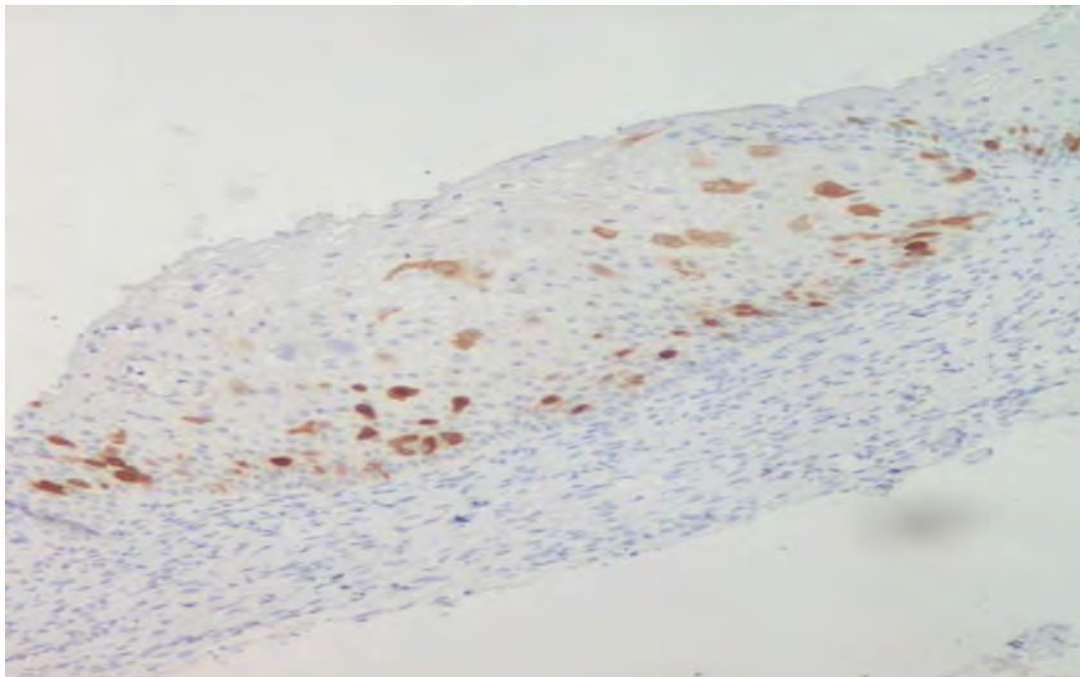
**ΕΙΚΟΝΑ 7:** Ανοσοϊστοχημική χρώση για την κυκλίνη– B1 (X20). Παρατηρείται σημαντικός αριθμός δυσπλαστικών κυττάρων στις ανώτερες στιβάδες του επιθηλίου (pattern C).



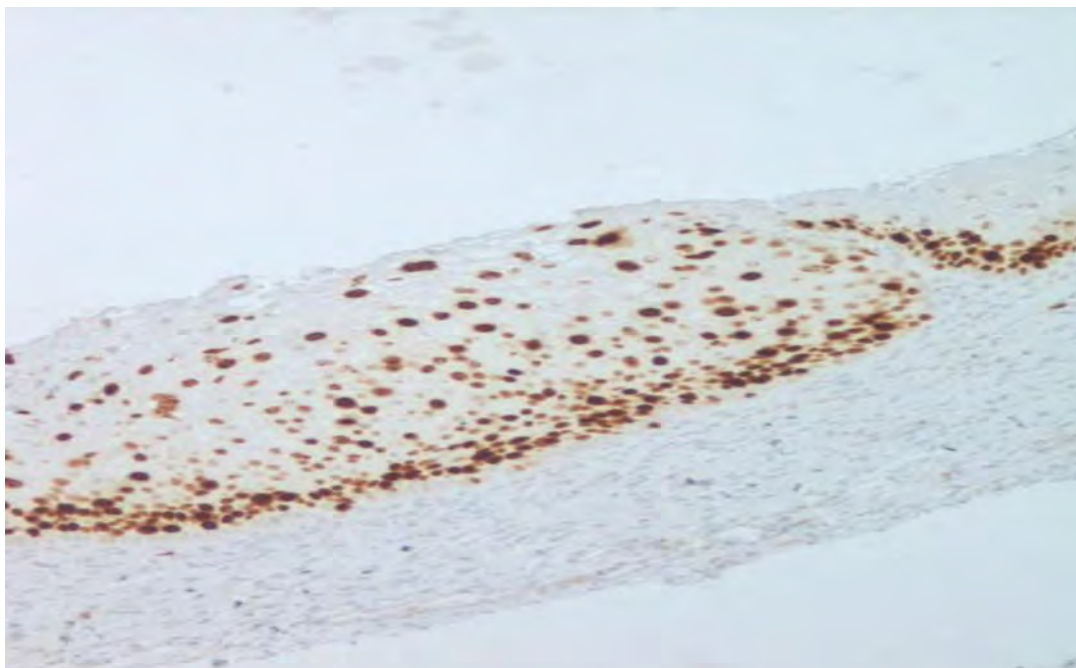
**ΕΙΚΟΝΑ 8:** Ανοσοϊστοχημική χρώση για το MIB-1 (X20). Παρατηρείται θετικότητα σε όλες στιβάδες του επιθηλίου (3/3).



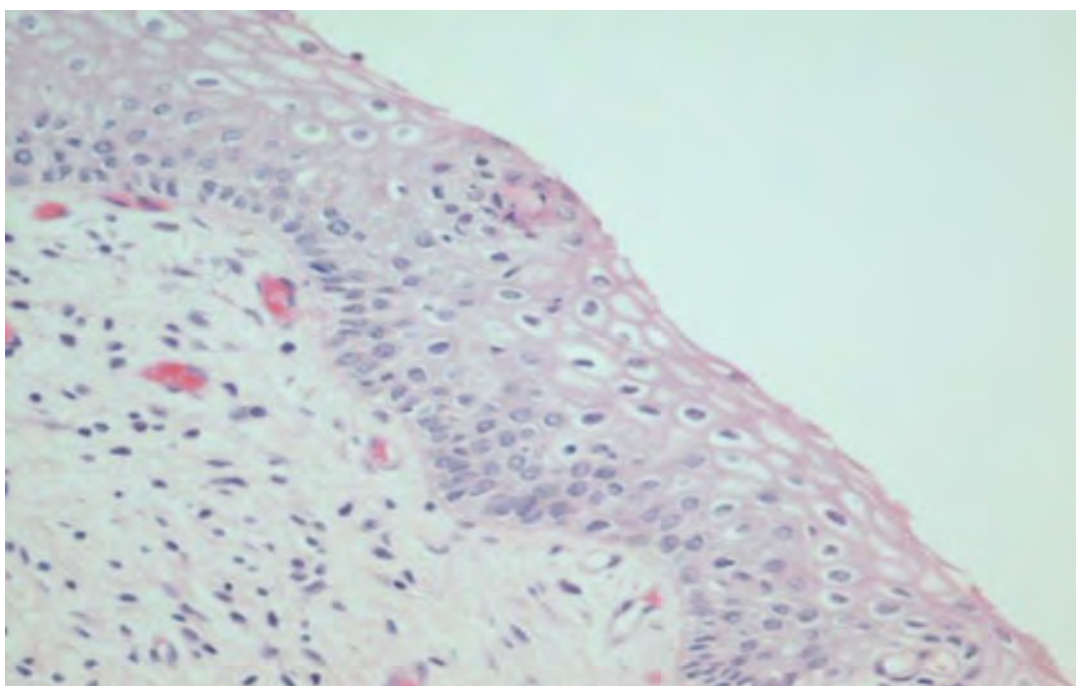
**ΕΙΚΟΝΑ 9:** Χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης (H/E) σε βιοψία τραχήλου μήτρας με LGSIL αλλοιώσεις (X10)\*. Στη συγκεκριμένη περίπτωση παρατηρήθηκε λοίμωξη από το στέλεχος 31 του HPV ιού με τη μέθοδο της PCR.



**ΕΙΚΟΝΑ 10:** Ανοσοϊστοχημική χρώση για την κυκλίνη– B1 (X10). Παρατηρείται σημαντικός αριθμός δυπλαστικών κυττάρων στις ανώτερες στιβάδες του επιθηλίου (pattern C).

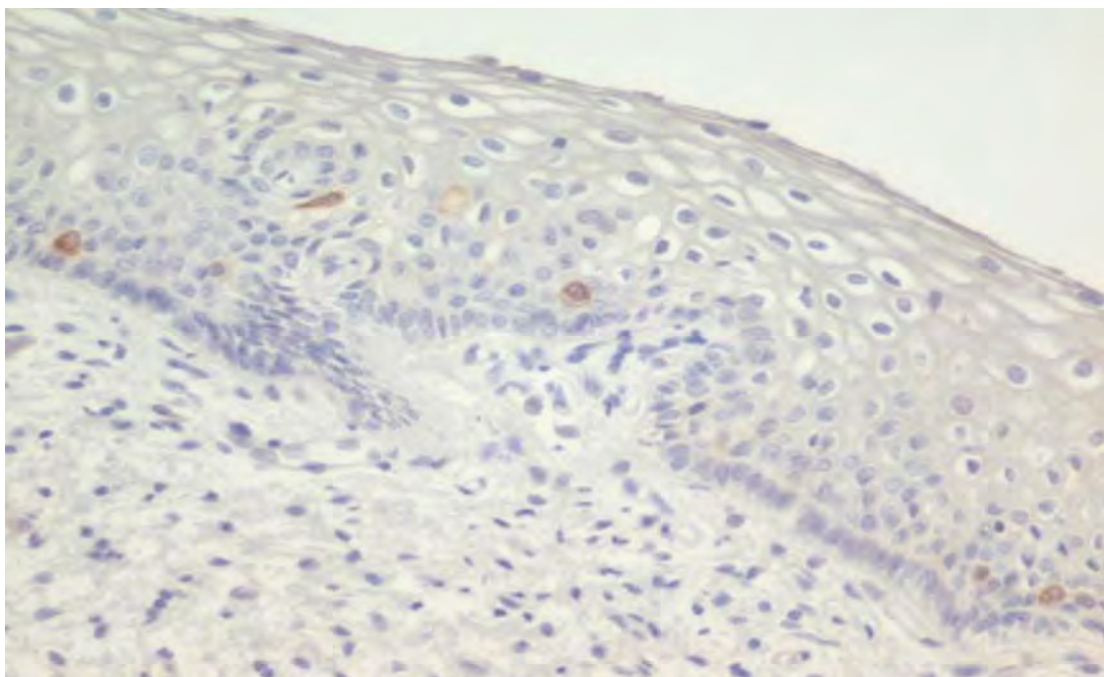


**ΕΙΚΟΝΑ 11:** Ανοσοϊστοχημική χρώση για το MIB-1 (X10). Παρατηρείται θετικότητα σε όλες στιβάδες του επιθηλίου (3/3).

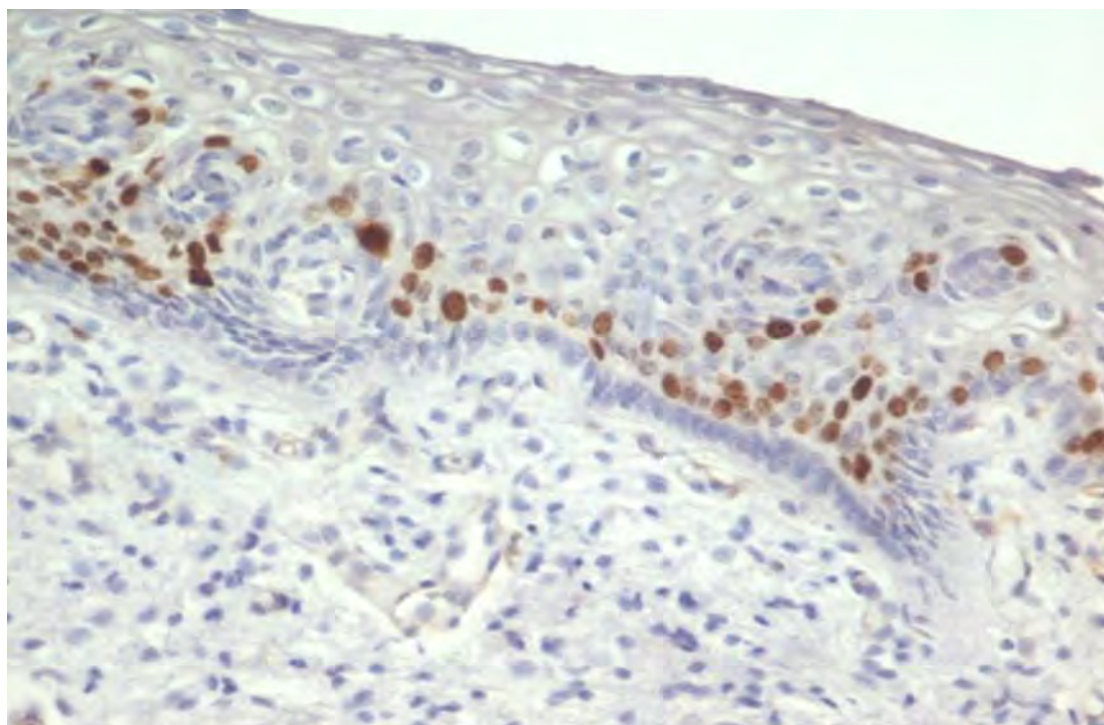


**ΕΙΚΟΝΑ 12:** Χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης (H/E) σε βιοψία τραχήλου μήτρας με LGSIL αλλοιώσεις και κοιλοκυττάρωση (X20). Στην συγκεκριμένη περίπτωση δεν ανιχνεύτηκε λοίμωξη από τον ιό HPV με τη μέθοδο της PCR.

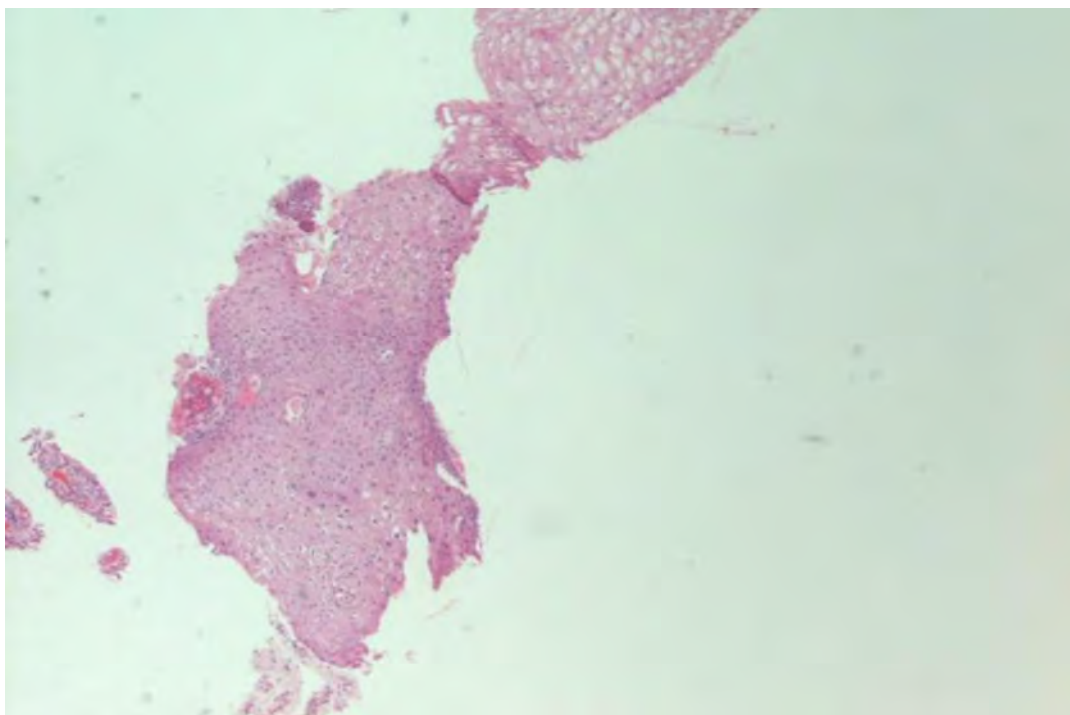




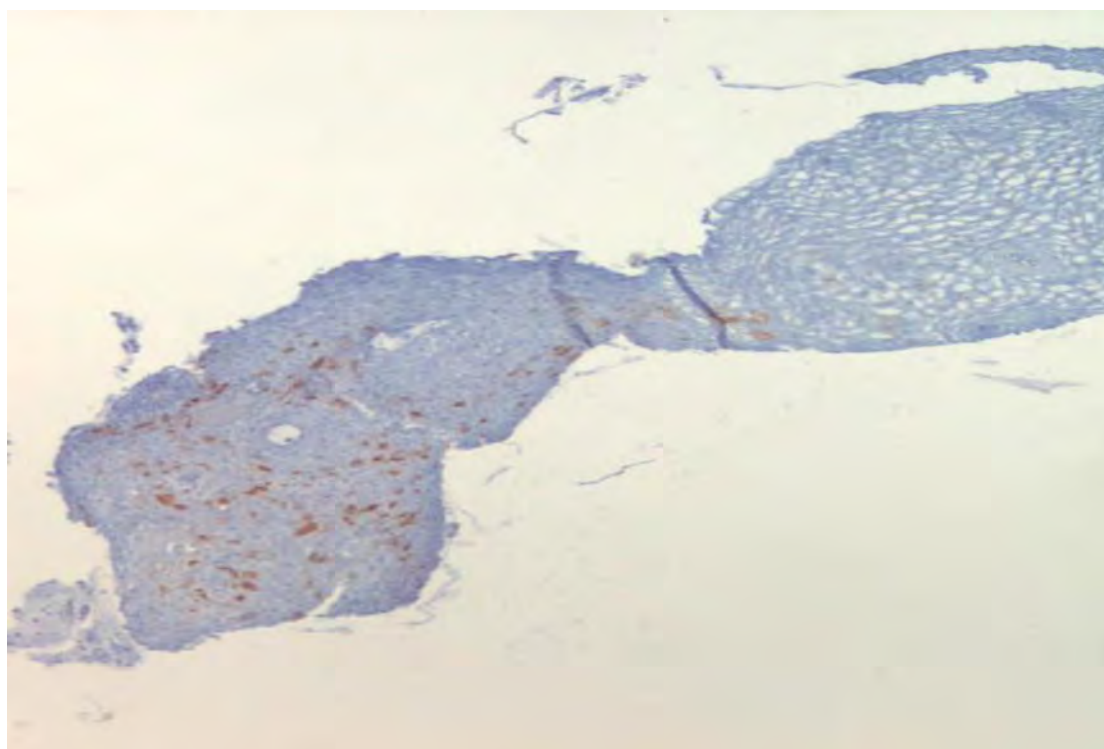
**ΕΙΚΟΝΑ 13:** Ανοσοϊστοχημική χρώση για την κυκλίνη-B1 (X20). Παρατηρείται σποραδική θετικότητα σε ώριμα, πολυγωνικά κύτταρα, ακριβώς πάνω από τη βασική στιβάδα του πλακώδους επιθηλίου (pattern B).



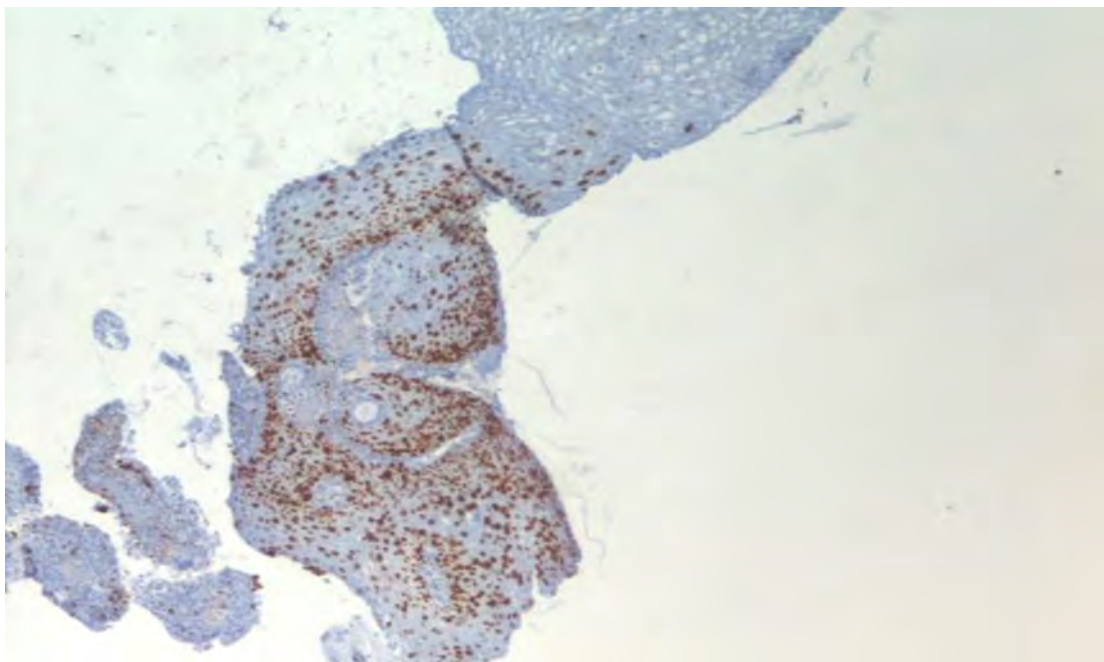
**ΕΙΚΟΝΑ 14:** Ανοσοϊστοχημική χρώση για το MIB-1 (X20). Παρατηρείται θετικότητα στο κατώτερο 1/3 του επιθηλίου.



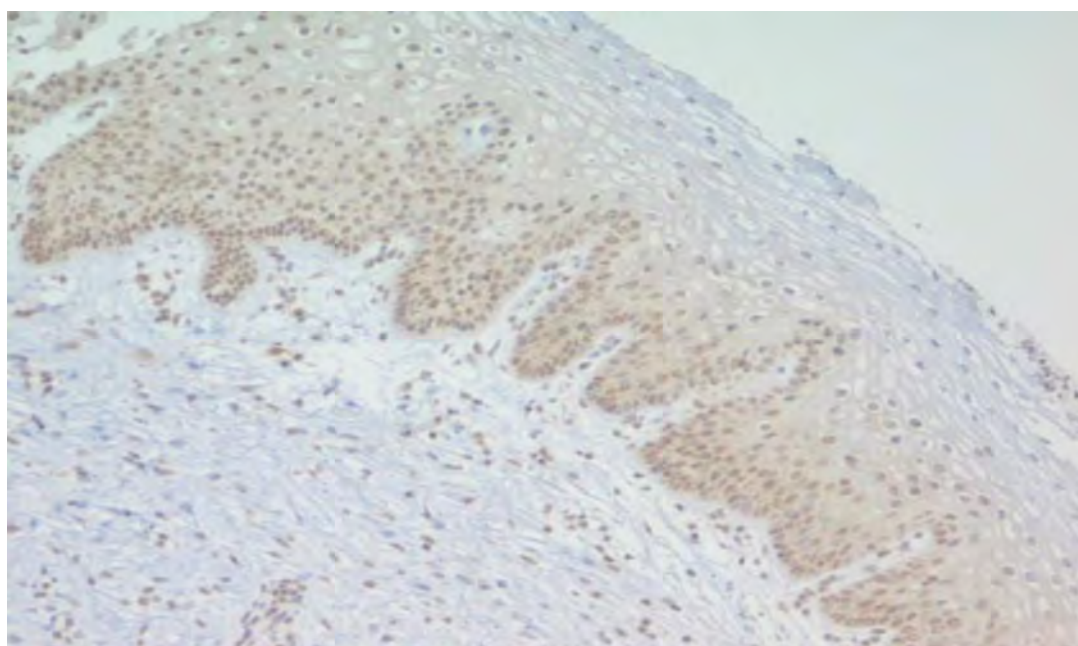
**ΕΙΚΟΝΑ 15:** Χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης (H/E) σε βιοψία τραχήλου μήτρας με LGSIL αλλοιώσεις και κοιλοκυττάρωση (X4). \* Στη συγκεκριμένη περίπτωση παρατηρήθηκε πολλαπλή λοίμωξη από τα στελέχη 16, 51 του HPV ιού με τη μέθοδο της PCR.



**ΕΙΚΟΝΑ 16:** Ανοσοϊστοχημική χρώση για την κυκλίνη- B1 (X4). Παρατηρείται σημαντικός αριθμός δυσπλαστικών κυττάρων στις ανώτερες στιβάδες του επιθηλίου (pattern C).

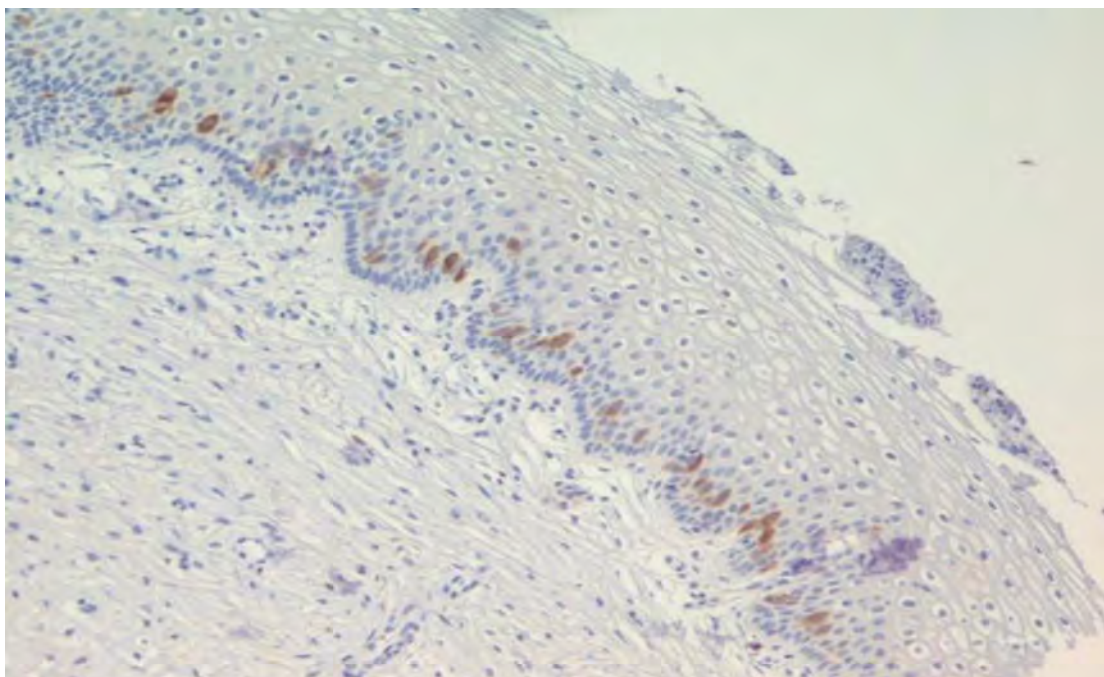


**ΕΙΚΟΝΑ 17:** Ανοσοϊστοχημική χρώση για το MIB-1 (X4). Παρατηρείται θετικότητα σε όλες στιβάδες του επιθηλίου (3/3).

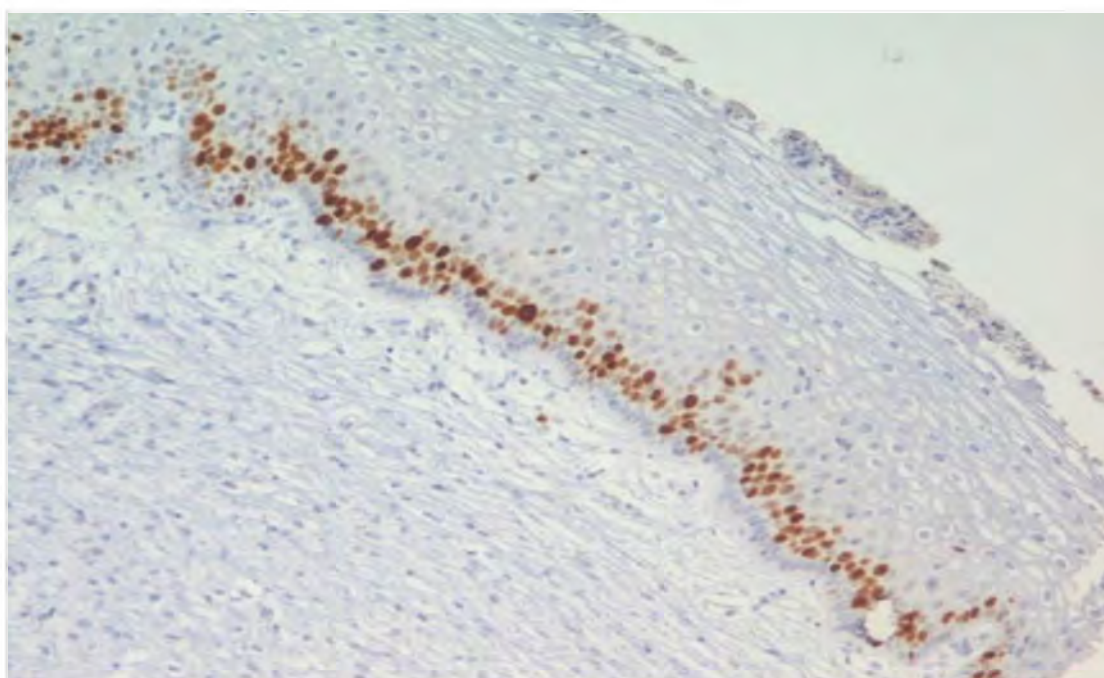


**ΕΙΚΟΝΑ 18:** Ανοσοϊστοχημική χρώση για το p16 (X10). Παρατηρείται διάχυτη θετικότητα στη βασική, παραβασική και στις ενδιάμεσες στιβάδες του επιθηλίου, χωρίς ωστόσο να εκτείνεται στο ανώτερο 1/3 του επιθηλίου (pattern B). Στη συγκεκριμένη περίπτωση παρατηρήθηκε λοίμωξη από τα στελέχη 16 και 33 του HPV ιού με τη μέθοδο της PCR.





**ΕΙΚΟΝΑ 19:** Ανοσοϊστοχημική χρώση για την κυκλίνη-B1 (X10). Παρατηρείται σποραδική θετικότητα σε ώριμα, πολυγωνικά κύτταρα, ακριβώς πάνω από τη βασική στιβάδα του πλακώδους επιθηλίου (pattern B).



**ΕΙΚΟΝΑ 20:** Ανοσοϊστοχημική χρώση για το MIB-1 (X10). Παρατηρείται θετικότητα στο κατώτερο 1/3 του επιθηλίου.

### 9.3. Συσχέτιση προτύπων έκφρασης των δεικτών p16, κυκλίνης-B1 και MIB-1 με παθολογονατομικά και μοριακά ευρήματα.

Η διαβάθμιση για την ανοσοϊστοχημική χρώση p16 με κριτήριο την έκταση της ανοσολογικής αντίδρασης χαρακτηρίζεται από τέσσερα πρότυπα έκφρασης (patterns). Το pattern A περιλαμβάνει μεμονωμένα θετικά κύτταρα διασκορπισμένα ή σε μικρές ομάδες, συνήθως πάνω από την παραβασική στιβάδα. Το pattern A low διακρίνεται από το pattern A λόγω της παρουσίας διασκορπισμένων θετικών κυττάρων που παρατηρούνται κυρίως στις κατώτερες στιβάδες του επιθηλίου διασκορπισμένα ή σε μικρές ομάδες. Το pattern B αποτελείται από διάχυτη θετικότητα στο οριζόντιο επίπεδο, το οποίο περιλαμβάνει τη βασική, την παραβασική και τις ενδιάμεσες στιβάδες του επιθηλίου, χωρίς να επεκτείνεται στο άνω 1/3 του επιθηλίου. Τέλος το pattern C χαρακτηρίζεται από διάχυτη θετικότητα σε όλες τις στιβάδες του επιθηλίου. Για ορισμένες συγκρίσεις το pattern A και το pattern A low θεωρούνται μαζί ως εστιακή θετικότητα, ενώ το pattern B και το pattern C θεωρούνται μαζί ως διάχυτη θετικότητα για περαιτέρω ανάλυση (Πίνακας 9).

**Πίνακας 9.**

p 16	Pattern A	Pattern A low	Pattern B	Pattern C	ΑΠΗΛΗΤΙΚΑ	ΣΥΝΟΛΟ
LGSIL	25	30	11	2	19	87
HGSIL	1	0	4	22	1	28
Ca	0	0	0	3	0	3

Σε 68/87 βιοψίες με LGSIL αλλοιώσεις (78,2%) παρατηρήθηκε εστιακή και διάχυτη θετικότητα (pattern A+ A low+B+C) για τη χρώση p16, ενώ στις βιοψίες με αλλοιώσεις HGSIL εστιακή και διάχυτη θετικότητα (pattern A+ A low+B+C) για την ίδια χρώση παρατηρήθηκε σε 27 από τις 28 βιοψίες (96,43%). Διάχυτη θετικότητα (pattern B+C) για το p16 παρατηρήθηκε σε 13/68 βιοψίες με LGSIL αλλοιώσεις (19,12%), ενώ για τις βιοψίες με HGSIL αλλοιώσεις διάχυτη θετικότητα (pattern B+C) για το p16 παρατηρείται σε 26/28 περιπτώσεις (92,86%), (Πίνακας 9β).

**Πίνακας 9β.**

p 16	Pattern B+C	Συχνότητα (%)
LGSIL	13/68	19,12
HGSIL	26/28	92,86

Η διαβάθμιση για την ανοσοϊστοχημική χρώση της κυκλίνης-B1 χαρακτηρίζεται από τρία πρότυπα έκφρασης (patterns). Το pattern A παρατηρείται στο φυσιολογικό επιθήλιο του τραχήλου της μήτρας και περιλαμβάνει μεμονωμένα θετικά κύτταρα με κατακόρυφο προσανατολισμό, που δεν εκτείνονται πάνω από τη παραβασική στιβάδα. Το pattern B



αποτελείται από σποραδική χρώση της κυκλίνης-B1 σε ώριμα, πλακώδη, πολυγωνικά κύτταρα ακριβώς πάνω από τη βασική στιβάδα και το pattern C χαρακτηρίζεται από ένα σημαντικό αριθμό δυσπλαστικών κυττάρων που εκφράζουν την κυκλίνη-B1 στις ανώτερες στιβάδες του επιθηλίου. Τα patterns B και C θεωρούνται θετικά για περαιτέρω ανάλυση.

Η ανοσοχρώση για την κυκλίνη B1 ήταν θετική σε 111/118 βιοψίες (94,07%). Η κυκλίνη B1 είναι θετική σε όλες τις βιοψίες με HGSIL αλλοιώσεις (100%), ενώ στις βιοψίες με LGSIL αλλοιώσεις θετική ανοσοχρώση για κυκλίνη B1 έδωσαν 80/87 βιοψίες (91,95%) (Πίνακας 10).

**Πίνακας 10.**

Κυκλίνη –B1	Pattern A	Pattern B	Pattern C	ΣΥΝΟΛΟ
LGSIL	7	74	6	87
HGSIL	0	6	22	28
Ca	0	2	1	3

Το pattern A δεδομένου ότι παρατηρείται στο φυσιολογικό επιθήλιο του τραχήλου της μήτρας και περιλαμβάνει μεμονωμένα θετικά κύτταρα με κατακόρυφο προσανατολισμό, που δεν εκτείνονται πάνω από τη παραβασική στιβάδα, δεν θεωρείται θετικό. Σε 80/87 βιοψίες με LGSIL αλλοιώσεις (91,95%) παρατηρήθηκε θετική ανοσοχρώση (pattern B+C) για την κυκλίνη-B1, ενώ στις βιοψίες με HGSIL αλλοιώσεις παρατηρήθηκε θετική ανοσοχρώση (pattern B+C) για την κυκλίνη-B1 σε 28/28 βιοψίες (100%).

Η σχέση μεταξύ p16 ανοσοχρώσης και παρουσίας HPV DNA αντικατοπτρίζεται στους πίνακες 11, 12 για τις χαμηλόβαθμες και υψηλόβαθμες δυσπλασίες αντίστοιχα.

**Πίνακας 11.**

	HPV	p 16	Αριθμός δειγμάτων	Συχνότητα (%)
LGSIL	(+)	(+)	61/87	70,11
	(-)	(-)	1/87	1,15
	(+)	(-)	18/87	20,69
	(-)	(+)	7/87	8,05

**Πίνακας 12.**

	HPV	p 16	Αριθμός δειγμάτων	Συχνότητα %
HGSIL	(+)	(+)	27/28	96,43
	(-)	(-)	0	0
	(+)	(-)	1/28	3,57
	(-)	(+)	0	0

Η σχέση μεταξύ κυκλίνης-B1 ανοσοχρώσης και παρουσίας HPV DNA αντικατοπτρίζεται στους πίνακες 13, 14 για τις χαμηλόβαθμες και υψηλόβαθμες δυσπλασίες αντίστοιχα.

**Πίνακας 13.**

	HPV	Κυκλίνη- B1	Αριθμός δειγμάτων	Συχνότητα (%)
<b>LGSIL</b>	(+)	(+)	<b>75/87</b>	<b>86,21</b>
	(-)	(-)	<b>3/87</b>	<b>3,45</b>
	(+)	(-)	<b>4/87</b>	<b>4,59</b>
	(-)	(+)	<b>5/87</b>	<b>5,75</b>

**Πίνακας 14.**

	HPV	Κυκλίνη- B1	Αριθμός δειγμάτων	Συχνότητα (%)
<b>HGSIL</b>	(+)	(+)	<b>28/28</b>	<b>100</b>
	(-)	(-)	<b>0</b>	<b>0</b>
	(+)	(-)	<b>0</b>	<b>0</b>
	(-)	(+)	<b>0</b>	<b>0</b>

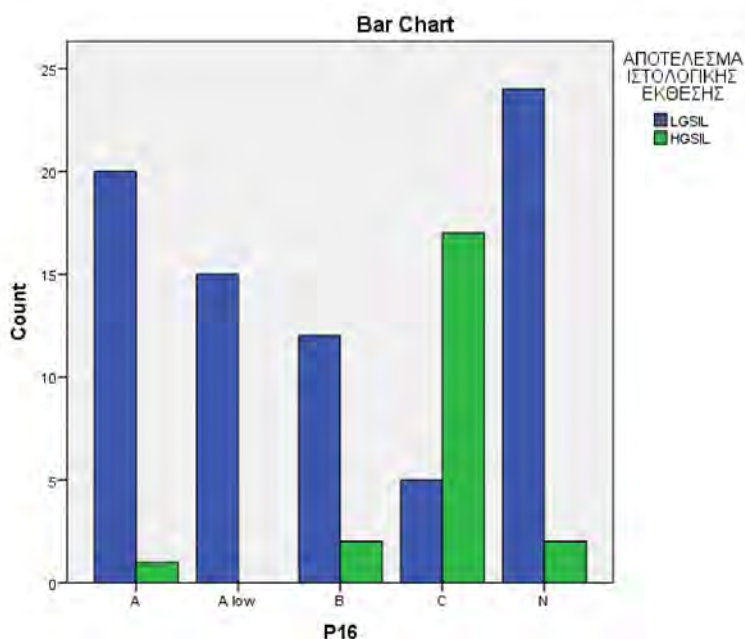
Η έκφραση του MIB-1 δείκτη παρουσιάζει τρία πρότυπα έκφρασης (patterns 1/3, 2/3, 3/3). Στις βιοψίες με LGSIL αλλοιώσεις η πλειοψηφία των δειγμάτων παρουσίασε θετική ανοσοχρώση στο 1/3 του επιθηλίου. Αντίθετα, στις υψηλόβαθμες δυσπλασίες η ανοσοχρώση για τον MIB-1 δείκτη ήταν θετική και κυμαίνονταν μεταξύ 2/3 και 3/3 του επιθηλίου. Οι τρεις καρκίνοι που εξετάστηκαν είχαν επίσης θετική ανοσοχρώση για τον MIB-1 δείκτη σε όλη την έκταση του επιθηλίου (3/3). Ωστόσο, η μη επιτυχής χρώση σε ορισμένες περιπτώσεις δεν επέτρεψε την εκτενή αξιολόγηση του MIB-1 δείκτη και την περαιτέρω συσχέτισή του με συγκεκριμένα στελέχη του HPV ιού (Πίνακας 15).

**Πίνακας 15.**

MIB-1	Pattern 1/3	Pattern 2/3	Pattern 3/3
<b>LGSIL</b>	<b>52</b>	<b>10</b>	<b>1</b>
<b>HGSIL</b>	<b>1</b>	<b>7</b>	<b>11</b>
<b>Ca</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>3</b>

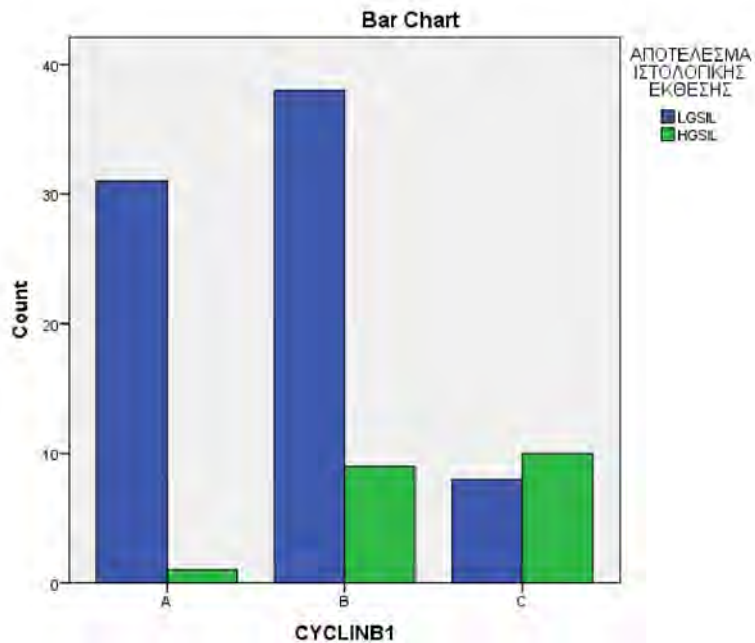
#### 9.4. Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

Από τον έλεγχο Fisher's exact test προκύπτει ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του βαθμού δυσπλασίας και θετικής χρώσης για το p16 ( $p < 0,05$ ). Παρατηρείται δηλαδή ότι η πλειοψηφία των γυναικών με αλλοιώσεις HGSIL παρουσιάζει θετική χρώση p16 διάχυτου τύπου (pattern C). Η συσχέτιση αποδίδεται γραφικά από το ραβδόγραμμα που ακολουθεί (Διάγραμμα 2).



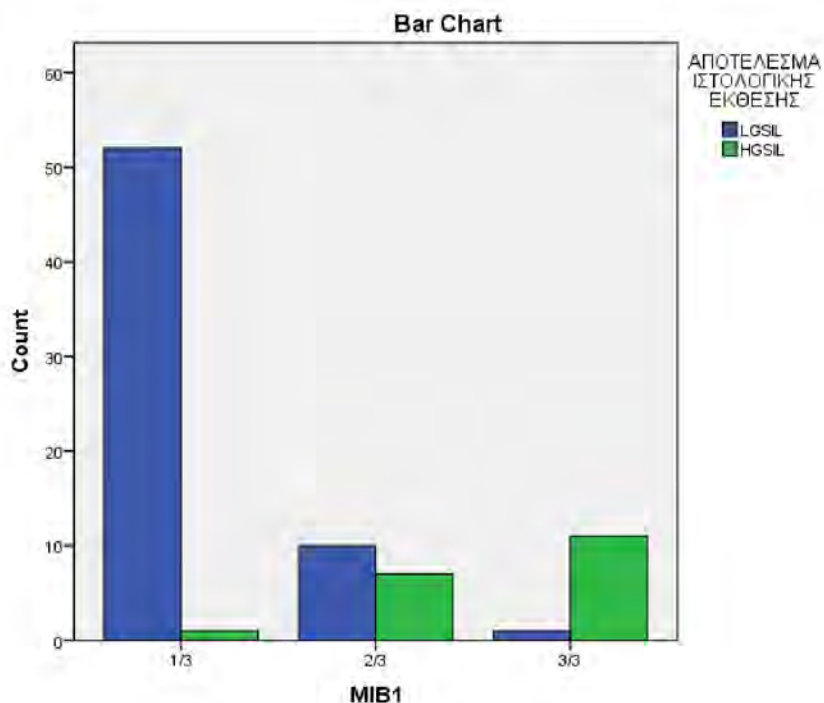
**Διάγραμμα 2:** Απεικόνιση του βαθμού δυσπλασίας σε σχέση με τη θετική χρώση για p16. Παρατηρείται στατιστικά σημαντική συσχέτιση ( $p < 0,05$ ).

Από τον έλεγχο με Pearson Chi Square προκύπτει στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του βαθμού δυσπλασίας και της θετικής ανοσοχρώσης για την κυκλίνη- B1 ( $p < 0,05$ ). Παρατηρούνται δηλαδή περισσότερα HGSIL αποτελέσματα στους ασθενείς με κατηγορία C σε σχέση με τους ασθενείς με κατηγορία A και με κατηγορία B στην κυκλίνη-B1. Παράλληλα η διαφορά ισχύει και για τους ασθενείς της κατηγορίας B συγκριτικά με την A. Θα μπορούσαμε να σημειώσουμε συνολικά ότι για από την A στη B και από τη B στη C παρατηρείται αύξηση στα HGSIL συγκριτικά με τα LGSIL. Η συσχέτιση αποδίδεται γραφικά από το ραβδόγραμμα που ακολουθεί (Διάγραμμα 3).



**Διάγραμμα 3:** Απεικόνιση του βαθμού δυσπλασίας σε σχέση με τη θετική χρώση για κυκλίνη-B1. Παρατηρείται στατιστικά σημαντική συσχέτιση ( $p < 0,05$ ).

Από τον έλεγχο με Fisher's exact test προκύπτει στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του βαθμού δυσπλασίας και της θετικής ανοσοχρώσης για τον MIB-1 δείκτη. Παρατηρείται δηλαδή ότι στην πλειοψηφία των γυναικών με αλλοιώσεις HGSIL η χρώση καταλαμβάνει τα 3/3 του επιθηλίου. Η συσχέτιση αποδίδεται γραφικά στο επόμενο ραβδόγραμμα (Διάγραμμα 4).

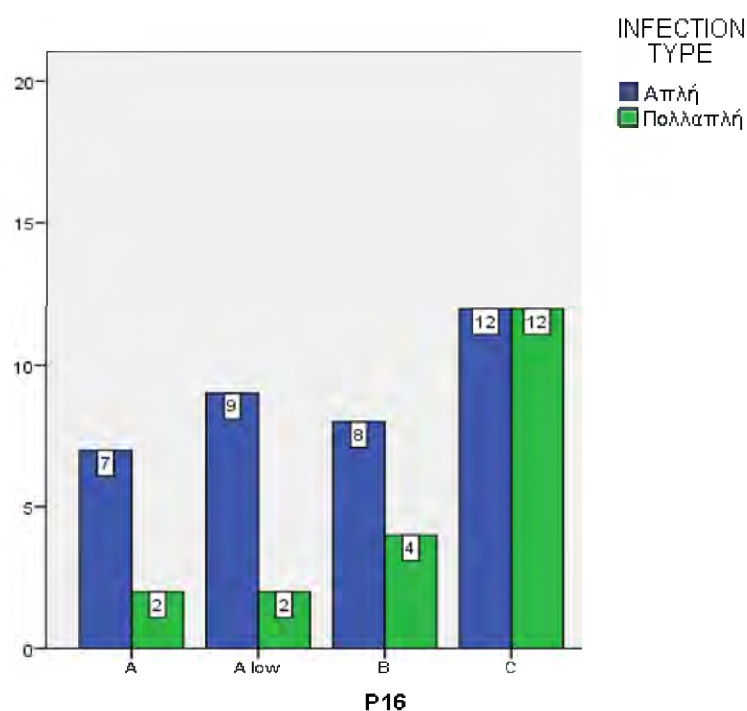


**Διάγραμμα 4:** Απεικόνιση του βαθμού δυσπλασίας σε σχέση με τη θετική χρώση για MIB-1. Παρατηρείται στατιστικά σημαντική συσχέτιση ( $p < 0,05$ ).

Στο μοντέλο λογιστικής παλινδρόμησης φαίνεται ότι οποιαδήποτε από τις ανοσοϊστοχημικές χρώσεις MIB-1, κυκλίνη-B1, ή p16 δίνει ανάλογα αποτελέσματα και καθιστά όλους τους άλλους προγνωστικούς παράγοντες μη σημαντικούς, ακόμα και αν αυτοί ήταν αρχικά όπως π.χ. το κάπνισμα.

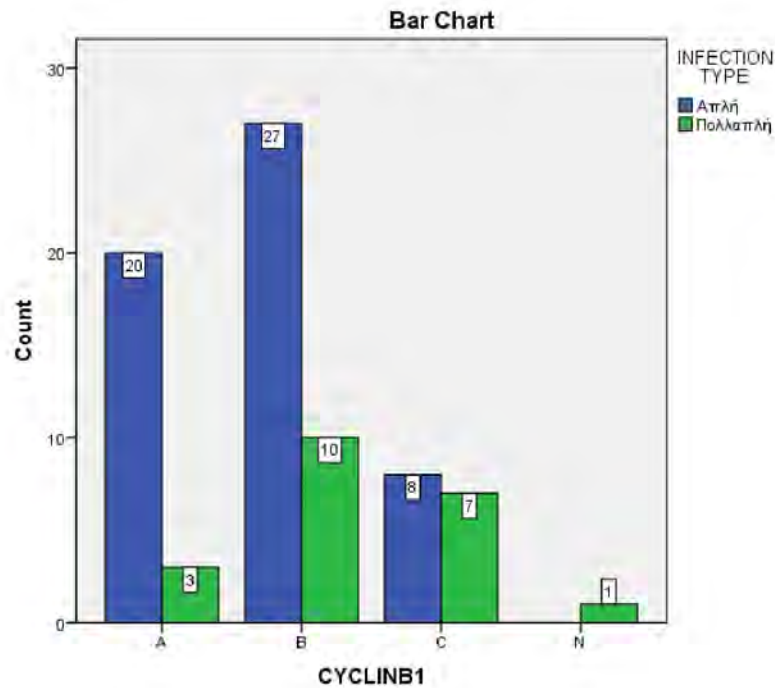
Η πλειοψηφία των γυναικών με HGSIL αλλοιώσεις παρουσιάζει θετική ανοσοϊστοχημική χρώση MIB-1 που καταλαμβάνει τα 3/3 του επιθηλίου. Αντίστοιχα, η πλειοψηφία των γυναικών με HGSIL αλλοιώσεις παρουσιάζει κυρίως pattern C για τους ανοσοϊστοχημικούς δείκτες p16 και κυκλίνη-B1. Ακολούθησε συσχέτιση και στατιστική επεξεργασία των υποκατηγοριών κάθε χρώσης (A, B, C, 1/3, 2/3, 3/3) και της ύπαρξης μονών ή πολλαπλών λοιμώξεων.

Όπως φαίνεται στο ακόλουθο διάγραμμα η παρουσία ενός μόνο στελέχους του HPV ιού παρουσιάζει ομοιόμορφη κατανομή μεταξύ των προτύπων έκφρασης της p16 ανοσοχρώσης (patterns A + A low + B + C) ενώ η παρουσία πολλαπλών λοιμώξεων φαίνεται να σχετίζεται κυρίως με pattern C της χρώσης για p16. Η πλειοψηφία των γυναικών με πολλαπλές HPV λοιμώξεις φαίνεται να παρουσιάζει κυρίως διάχυτη χρώση p16 (pattern C), όπως αποδίδεται στο επόμενο διάγραμμα και η συσχέτιση αυτή είναι στατιστικά σημαντική ( $p=0,005$ ).



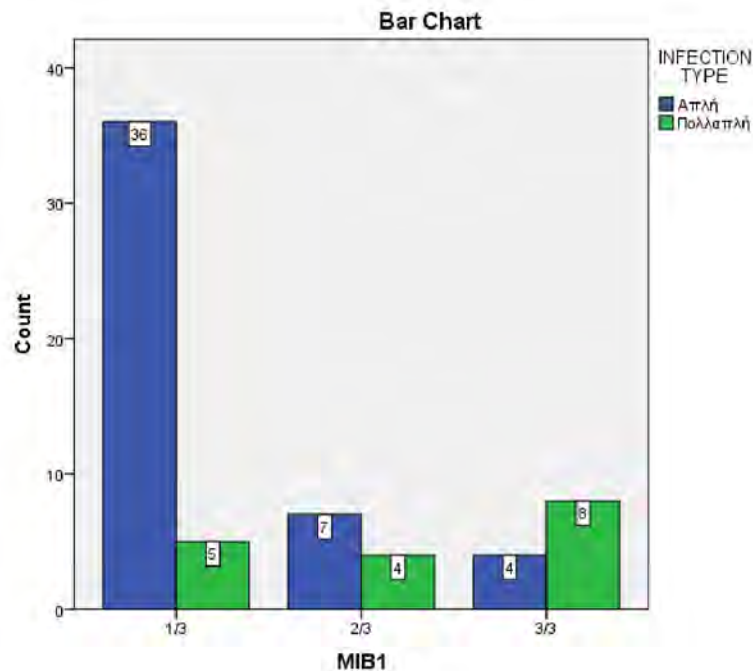
**Διάγραμμα 5:** Απεικόνιση της σχέσης μεταξύ πολλαπλών λοιμώξεων και προτύπου έκφρασης C για την θετική χρώση για p16. Παρατηρείται στατιστικά σημαντική συσχέτιση ( $p=0,005$ ).

Όσον αφορά στην ανοσοχρώση για την κυκλίνη-B1, η ύπαρξη πολλαπλών HPV λοιμώξεων φαίνεται να συνδέεται με θετική χρώση για την κυκλίνη-B1 με πρότυπα έκφρασης B + C, όπως παρουσιάζεται στο ακόλουθο διάγραμμα ( $p=0,04$ ) (Διάγραμμα 6).



**Διάγραμμα 6:** Απεικόνιση της σχέσης μεταξύ πολλαπλών λοιμώξεων και προτύπου έκφρασης B+C για θετική χρώση για την κυκλίνη-B1. Παρατηρείται στατιστικά σημαντική συσχέτιση ( $p=0,04$ ).

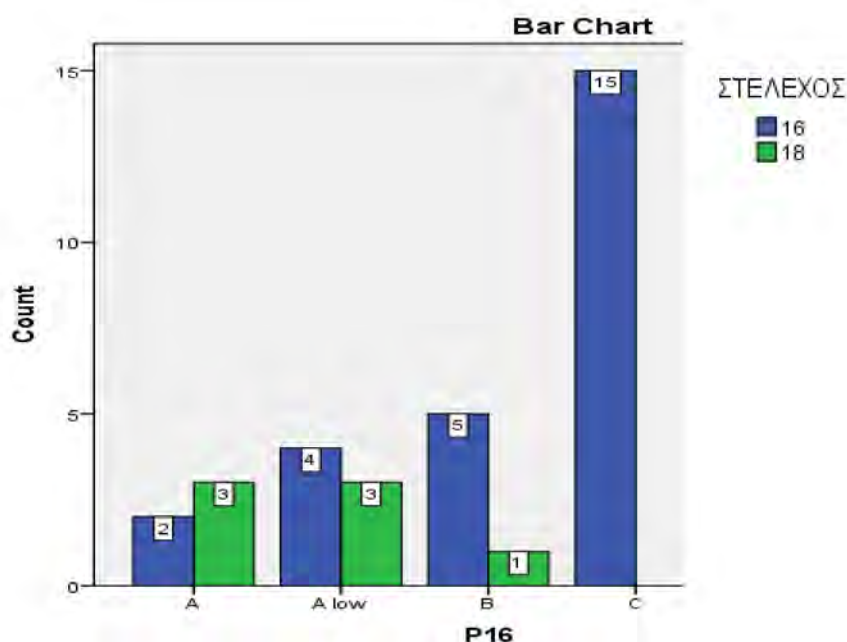
Η πλειοψηφία των γυναικών με απλές HPV λοιμώξεις παρουσιάζει στατιστικά σημαντική κατανομή της χρώσης MIB-1 στο 1/3 του επιθηλίου ( $p=0,001$ ) (Διάγραμμα 7).



**Διάγραμμα 7:** Απεικόνιση της σχέσης μεταξύ απλής λοίμωξης και κατανομής της MIB-1 χρώσης στο 1/3 του επιθηλίου. Παρατηρείται στατιστικά σημαντική συσχέτιση ( $p=0,001$ ).

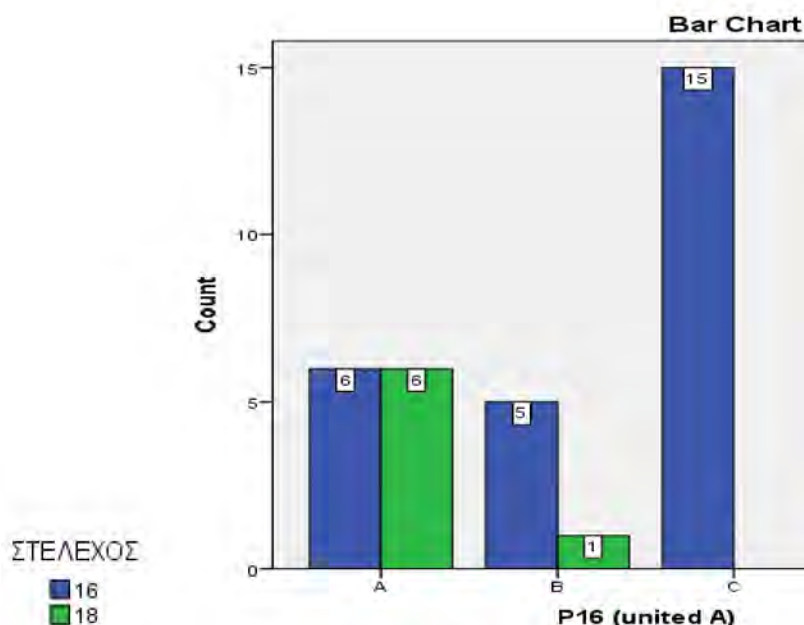
Ακολούθησε συσχέτιση και στατιστική ανάλυση μεμονωμένα των στελεχών 16 και 18 με τις υποομάδες κάθε χρώσης. Στο διάγραμμα που ακολουθεί συγκρίνεται το πρότυπο έκφρασης για το p16 συγκριτικά με τα υψηλού κινδύνου στελέχη 16 και 18 του HPV ιού.

Όπως φαίνεται, η πλειοψηφία των γυναικών με στέλεχος 16 του ιού HPV παρουσιάζει διάχυτου τύπου χρώση p16 (pattern C) ( $p=0,015$ ) (Διάγραμμα 8).



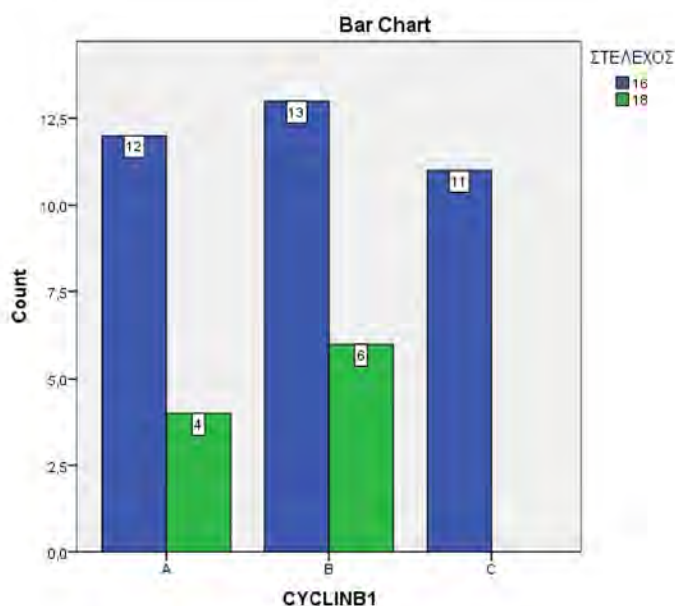
**Διάγραμμα 8:** Απεικόνιση της σχέσης μεταξύ διάχυτου προτύπου έκφρασης του p16 (pattern C) και της παρουσίας των υψηλού κινδύνου στελεχών 16 και 18 του HPV ιού. Παρατηρείται στατιστικά σημαντική συσχέτιση ( $p=0,015$ ).

Ανάλογα είναι τα αποτελέσματα ομαδοποιώντας τα πρότυπα έκφρασης A και A low ως A πρότυπο έκφρασης, όπως παρουσιάζεται στο επόμενο διάγραμμα. Και σε αυτή την περίπτωση, η πλειοψηφία των γυναικών με στέλεχος 16 του HPV ιού παρουσιάζει διάχυτου τύπου χρώση p16 (pattern C) ( $p=0,013$ ) (Διάγραμμα 9).



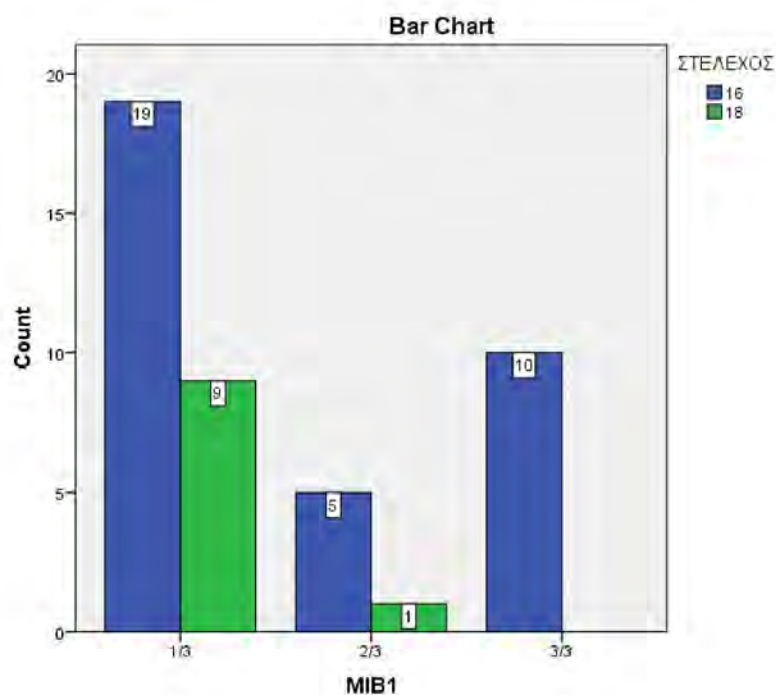
**Διάγραμμα 9:** Απεικόνιση της σχέσης μεταξύ διάχυτου προτύπου έκφρασης του p16 (pattern C) και της παρουσίας του υψηλού κινδύνου στελεχούς 16 του HPV ιού. Παρατηρείται στατιστικά σημαντική συσχέτιση ( $p=0,013$ ).

Σύγκριση των προτύπων έκφρασης για την ανοσοχρώση κυκλίνη-B1 και της ύπαρξης των υψηλού κινδύνου στελεχών 16 και 18 δεν έδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ( $p=0,105$ ), όπως φαίνεται στο διάγραμμα που ακολουθεί (Διάγραμμα 10).



**Διάγραμμα 10:** Απεικόνιση της σχέσης μεταξύ του προτύπου έκφρασης της κυκλίνης-B1 και της παρουσίας των υψηλού κινδύνου στελεχών 16 και 18 του HPV ιού. Δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική συσχέτιση ( $p=0,105$ ).

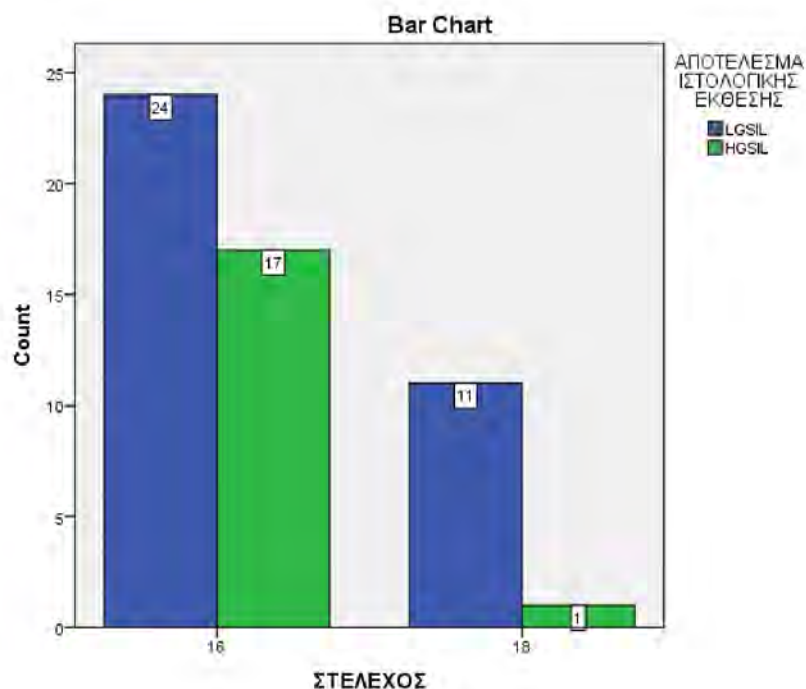
Σύγκριση των προτύπων έκφρασης για τον MIB-1 δείκτη και της ύπαρξης των υψηλού κινδύνου στελεχών 16 και 18 δεν έδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ( $p=0,085$ ), όπως φαίνεται στο διάγραμμα που ακολουθεί (Διάγραμμα 11).



**Διάγραμμα 11:** Απεικόνιση της σχέσης μεταξύ του προτύπου έκφρασης του MIB-1 δείκτη και της παρουσίας των υψηλού κινδύνου στελεχών 16 και 18 του HPV ιού. Δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική συσχέτιση ( $p=0,085$ ).

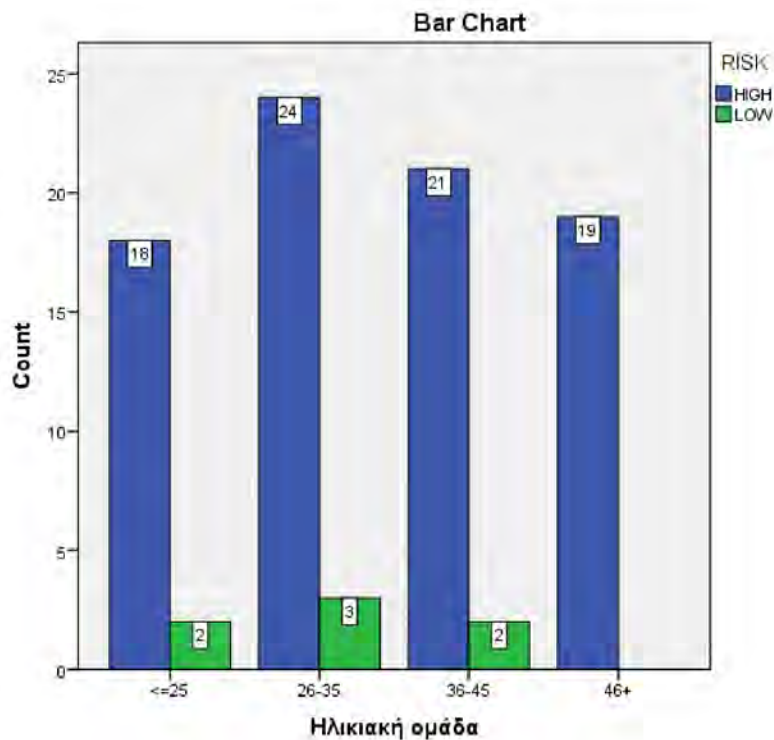


Συγκρίνοντας το αποτέλεσμα της ιστολογικής έκθεσης, δηλαδή την ύπαρξη χαμηλού ή υψηλού βαθμού αλλοιώσεων και την αναζήτηση πιθανής σύνδεσης με συγκεκριμένα στελέχη υψηλού κινδύνου, έδειξε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των χαμηλόβαθμων αλλοιώσεων και της παρουσίας του στελέχους 18 του HPV ιού ( $p=0,033$ ) (Διάγραμμα 12).

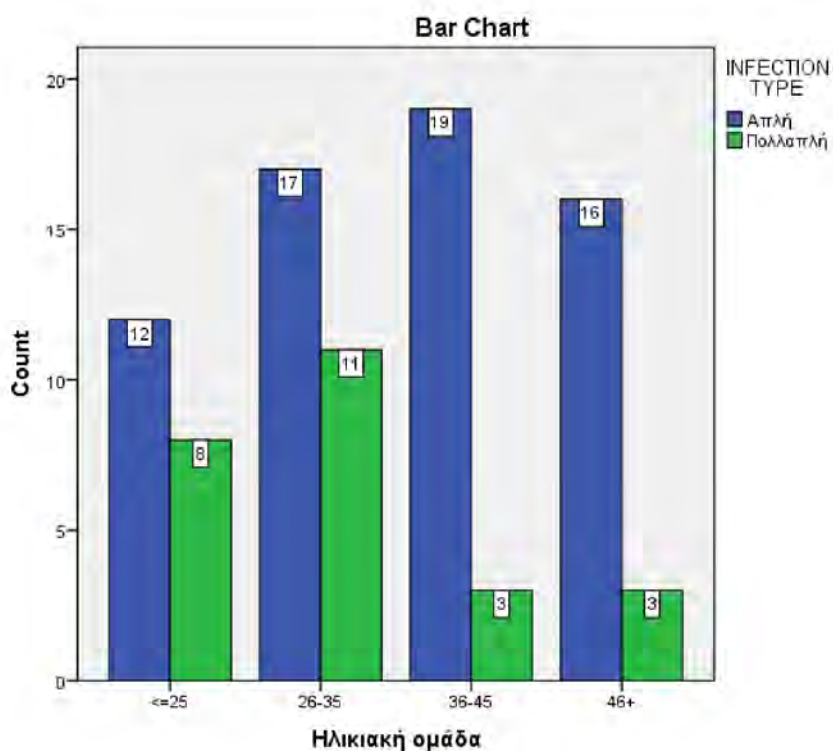


**Διάγραμμα 12:** Απεικόνιση της σχέσης μεταξύ των χαμηλόβαθμων αλλοιώσεων σε συνάρτηση με την παρουσία του υψηλού κινδύνου στελέχους 18 του HPV ιού. Παρατηρείται στατιστικά σημαντική συσχέτιση ( $p=0,033$ ).

Η κατανομή των γυναικών στις ηλικιακές ομάδες <25, 26-35, 36-45 και >46, προκειμένου να διερευνηθούν τυχόν συσχετίσεις μεταξύ των αλλοιώσεων και της ύπαρξης τόσο μονών ή πολλαπλών λοιμώξεων, όσο και παρουσίας υψηλού ή χαμηλού κινδύνου στελεχών, δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις όπως φαίνεται στα επόμενα διαγράμματα. Ωστόσο, φαίνεται ότι υψηλότερο κίνδυνο διατρέχουν οι γυναίκες που ανήκουν στην ηλικιακή ομάδα των 26-35 ετών τόσο για παρουσία υψηλού κινδύνου HPV στελεχών, όσο και για την παρουσία πολλαπλών λοιμώξεων. Οι πολλαπλές λοιμώξεις είναι σε ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα στις ηλικιακές ομάδες, 25 και 26-35, γεγονός που συνδέεται με την έντονη σεξουαλική δραστηριότητα και την εναλλαγή συντρόφων στις ηλικίες αυτές (Διαγράμματα 13, 14).



**Διάγραμμα 13:** Απεικόνιση της σχέσης μεταξύ των διαφόρων ηλικιακών ομάδων και της παρουσίας υψηλού ή χαμηλού κινδύνου στελεχών του HPV ιού. Δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική συσχέτιση.



**Διάγραμμα 14:** Απεικόνιση της σχέσης μεταξύ των διαφόρων ηλικιακών ομάδων και της παρουσίας απλής ή πολλαπλής λοίμωξης του HPV ιού. Δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική συσχέτιση.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### 10. Ιστορικό μορφολογίας.

#### 10.1 Η αρχική έρευνα για το λοιμώδες αίτιο του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας.

Το 1842, ο Ιταλός ιατρός Rigoni –Stern αναλύοντας τα πιστοποιητικά θανάτου των γυναικών στη Βερόνα, κατά το χρονικό διάστημα 1760-1839 διαπίστωσε τη μεγάλη συχνότητα του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας στις παντρεμένες γυναίκες, στις χήρες και στις ιερόδουλες και τη σπάνια εμφάνιση του στις παρθένες και στις καλόγριες. Με βάση τη διαπίστωση αυτή, κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η ανάπτυξη αυτής της μορφής καρκίνου θα πρέπει να σχετίζεται με την σεξουαλική επαφή (*zur Hausen H. Virology. 2009*).

Η γρήγορη ανάπτυξη της βακτηριολογίας στο δεύτερο μισό του 19<sup>ου</sup> αιώνα, οδήγησε στις αρχικές προσπάθειες σύνδεσης του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας με τα γεγονότα των σεξουαλικά μεταδιδόμενων λοιμώξεων, χωρίς ανανεώσιμες πληροφορίες μέχρι το τέλος του 1960. Στο διάστημα αυτό, οι πρώτες μελέτες που έγιναν ενοχοποίησαν τον ιό Herpes simplex type 2 (HSV2), ως υποψήφιο αίτιο της εκδήλωσης του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας (*Rawls WE. et al. Science. 1968, Naib ZM. et al. Cancer. 1969, Nahmias AJ. et al. Am. J. Epidemiol. 1970*).

Οι πρώτες μελέτες για τον πιθανό ρόλο του ιού HPV στην εμφάνιση του καρκίνου ξεκίνησαν στις αρχές του 1970 (*zur Hausen H. Virology. 2009*).

#### 10.2. Η λοίμωξη του τραχήλου της μήτρας από τον ιό των κονδυλωμάτων: το ιστορικό της αναγνώρισης τους.

Το 1976, οι Meisels και Fortin, κατά την ανασκόπηση της κυτταρολογικής αποφολίδωσης του ιού των οξυτενών κονδυλωμάτων, υποστήριξαν ότι δεν έχει ανιχνευθεί κάποιο ξεκάθαρο κυτταρολογικό πρότυπο, που θα μπορούσε να επιτρέψει τη μη αμφισβητούμενη ανίχνευση των οξυτενών κονδυλωμάτων στο κυτταρικό δείγμα. Στη συνέχεια, δημοσίευσαν τη σχέση ανάμεσα στις γνωστές κυτταρολογικές εμφανίσεις των οξυτενών κονδυλωμάτων και την οποιαδήποτε αλλοίωση στο κόλπο και στον τράχηλο της μήτρας, που θα μπορούσε να διαπιστωθεί με την κολποσκόπηση και τη λήψη βιοψίας (*Fletcher S. J. Clin. Pathol. 1983*).

Η κυτταρολογική περιγραφή περιλαμβάνει δυσκερατωσικά κύτταρα, διπύρρηνα ή πολυπύρρηνα και κύτταρα, τα οποία οι Meisels και Fortin ονόμασαν «balloon cells». Το χαρακτηριστικό των κυττάρων αυτών ήταν μια προεξέχουσα, περιπυρηνική άλω, η οποία δεν χρωματίζεται με την ηωσίνη και τη χρώση PAS. Όμοια κύτταρα, περιγράφηκαν το 1933 από τον Παπανικολάου σε κολπικά επιχρίσματα, ο οποίος επισήμανε, πως η τοπογραφική προέλευση τους δεν είναι πάντα ξεκάθαρη (*Papanicolaou GN. Am J. Anat. 1933*).

Το 1949 παρόμοια κύτταρα περιγράφηκαν από τον Ayre, που τα χαρακτήρισε ως «halo cells» και από τους Koss και Durfee που τα χαρακτήρισαν κοιλοκύτταρα, χωρίς μέχρι στιγμής να γνωρίζουν περί τίνος πρόκειται. Ωστόσο, το 1960, παράρτημα του *Atlas of exfoliative cytology* του Παπανικολάου, συσχετίζει για πρώτη φορά τα λεγόμενα «halo cells» με τα οξυτενή κονδυλώματα. Πολύ σύντομα, μελέτη των Naib και Masukawa ανακάλυψε αποφολιδωμένα κοιλοκύτταρα στις επιπολής στιβάδες των οξυτενών κονδυλωμάτων του τραχήλου. Το 1968 οι Dunn και Ogilvie με τη μελέτη τους «*Intanuclear virus particles in human genital wart tissue. Observations on the ultrastructure of the epidermal layer*», επιβεβαίωσαν προηγούμενη εργασία, δείχνοντας τον ιό στους πυρήνες των κυττάρων της ενδιάμεσης κεράτινης στιβάδας των οξυτενών κονδυλωμάτων.

### 10.3. Τα ανατομικά χαρακτηριστικά των οξυτενών και «επίπεδων» κονδυλωμάτων.

Τα χαρακτηριστικά των οξυτενών κονδυλωμάτων ανακύπτουν πολύ εύκολα μέσω της ορολογίας τους. Ο όρος «κονδύλωμα» προέρχεται από την ελληνική λέξη κόνδυλος, ενώ ο όρος «acuminatum» από τη λατινική λέξη acuminare. Οι συγκεκριμένες αλλοιώσεις είναι εξωφυτικές και εμφανίζουν τάση διόγκωσης. Αντίθετα, στα «επίπεδα» κονδυλώματα που έχουν περιγραφεί από τους Meisels και Fortin, κάθε εξωφυτική τάση ή προσεκβολή είναι απύσχα (*Meisels A. et al. Acta. Cytol. 1976*).

Μικροσκοπικά, στην επιφάνεια παρατηρούνται κοιλοκύτταρα που συνοδεύονται από την περιστασιακή παρουσία δυσκερατωσικών κυττάρων. Τα κύτταρα που βρίσκονται σε βαθύτερα στρώματα, παρουσιάζουν μικρού βαθμού υπερπλαστικές αλλοιώσεις της βασικής στιβάδας και ίσως περιστασιακά διπύρηνη μορφή. Οι παραπάνω αλλοιώσεις είναι δυσπλαστικές για τα οξυτενή κονδυλώματα, ενώ παρατηρούνται ελάχιστα στα «επίπεδα» κονδυλώματα (*Meisels A et al. Acta. Cytol. 1977*).

### 10.4. Η συμπεριφορά των «επίπεδων» κονδυλωμάτων: η σπουδαιότητα του κοιλοκύτταρου.

Σε μελέτη που δημοσιεύτηκε το 1977, υπήρξε η άποψη ότι το «επίπεδο» κονδύλωμα αποτελεί την πρόδρομη μορφή του οξυτενούς κονδυλώματος (*Meisels A. et al. Acta. Cytol. 1977*).

Στις μέρες μας, έχει διαμορφωθεί πλέον η άποψη, ότι είναι ελάχιστες οι επίπεδες αλλοιώσεις που θα εξελιχθούν σε οξυτενή κονδυλώματα και ειδικότερα ότι πρόκειται για δυο διαφορετικά είδη αλλοιώσεων. Σε προηγούμενη μελέτη, με χρήση της μεθόδου υβριδισμού του DNA, παρατήρησαν ότι το στέλεχος 6 του ιού HPV που προκαλεί τα οξυτενή κονδυλώματα, ανιχνεύτηκε σε δύο από έξι επίπεδα κονδυλώματα, γεγονός που ερμηνεύτηκε ότι η έλλειψη υβριδισμού στα υπόλοιπα οφείλεται, είτε στην απουσία του, είτε σε λοίμωξη με διαφορετικό στέλεχος (*Reid R. et al. Obstet. Gynecol. 1980, Gissman L. et al. Int.. J. Cancer. 1982*).

### 10.5. Η σημασία της κοιλοκυττάρωσης.

Η κοιλοκυττάρωση αποτελεί κοινό εύρημα των οξυτενών και των «επίπεδων» κονδυλωμάτων. Έρευνες έχουν αποδείξει ότι η περιπυρηνική άλωση των κοιλοκυττάρων είναι αξιόπιστος, ιστοπαθολογικός δείκτης λοίμωξης από τον ιό των θηλωμάτων. Τα κοιλοκύτταρα, είναι κύτταρα που εκφυλίζονται και έχουν ως προορισμό το θάνατο ή την αποβολή τους από το επιθήλιο. Η λοίμωξη από τον ιό των κονδυλωμάτων επιταχύνει το θάνατο των κυττάρων-στόχων του μέσω των σχισμών του πλακώδους επιθηλίου. Το θανατηφόρο αυτό κυτταρικό αποτέλεσμα επιβεβαιώνεται από το πλήθος των σωματιδίων του ιού μαζί με το περίβλημά τους, τα οποία διαχέονται από τον πυρήνα και πληρούν το κυτταρόπλασμα, καθώς και με το γνωστό λυτικό τρόπο της απελευθέρωσης των εικοσαεδρικών DNA ιών (*Fletcher S. J. Clin. Pathol. 1983*).

Είναι σαφές ότι τα επιφανειακά πλακώδη κύτταρα πεθαίνουν, φυσιολογικά ή πρόωρα, λόγω της λοίμωξης από τον ιό των κονδυλωμάτων. Τα κοιλοκύτταρα συχνά σχετίζονται με τη δυσπλασία και η σύνδεση αυτή μπορεί να είναι καθοριστική (*Fletcher S. J. Clin. Pathol. 1983*).

## 10.6. Ο ιός των θηλωμάτων, τα κοιλοκύτταρα και η εμφάνιση κακοήθειας στον τράχηλο της μήτρας.

Το 1977 έρευνα των Meisels Fortin και Roy, η οποία στηρίχτηκε σε μελέτες που υποστήριζαν ότι τα οξυτενή κονδυλώματα μπορεί να υποστούν κακοήγη εξαλλαγή, υποστήριξε ότι τα «επίπεδα κονδυλώματα», μπορούν να εμφανίσουν παρόμοια συμπεριφορά (Meisels A. et al. *Acta. Cytol.* 1977, Dawson DF. et al. *Arch. Pathol.* 1965, Gardner HL. et al. *Clin Obst. Gynecol.* 1965, Kovi J. et al. *Am. J. Clin. Pathol.* 1974).

Επιπλέον, θεώρησαν ότι τα «επίπεδα κονδυλώματα» αποτελούν ένα πρώιμο στάδιο στην ανάπτυξη των οξυτενών κονδυλωμάτων. Λαμβάνοντας υπόψη ότι και οι δύο μορφές μπορούν να αποτελέσουν «βήμα προς την κακοήθεια», πρότειναν ένα υποθετικό μοντέλο αιτιολογικών παραγόντων για τις δυσπλαστικές καταστάσεις: α) οξυτενές κονδυλώμα, β) ήπια και μετρίου βαθμού δυσπλασία γ) δυσπλασία σοβαρού βαθμού και καρκίνωμα in-situ, δ) διηθητικό καρκίνωμα του πλακώδους επιθηλίου (Meisels A. et al. *Acta. Cytol.* 1977, Meisels A. et al. *Gynecol. Oncol.* 1981).

## 10.7. Ταξινόμηση των ενδοεπιθηλιακών αλλοιώσεων του πλακώδους επιθηλίου του τραχήλου της μήτρας.

Έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορα συστήματα ταξινόμησης για την περιγραφή των ενδοεπιθηλιακών αλλοιώσεων του πλακώδους επιθηλίου του τραχήλου της μήτρας και το καθένα από αυτά αντανakλά εν μέρει τις υπάρχουσες θεραπευτικές επιλογές.

Το παλαιότερο σύστημα, είναι το σύστημα: δυσπλασία – καρκίνωμα in situ (CIS), που περιλαμβάνει την ήπια βαθμού δυσπλασία και την υψηλού βαθμού δυσπλασία (CIS). Η θεραπεία για την ήπια βαθμού δυσπλασία είναι η παρακολούθηση, για τη μετρίου βαθμού δυσπλασία η κωνοειδής εκτομή, ενώ για την υψηλόβαθμη δυσπλασία/CIS η υστερεκτομή (Stenberg's *Diagnostic Surgical Pathology, Chapter 52: The Cervix.* 2010).

Άλλο σύστημα ταξινόμησης είναι η ταξινόμηση CIN με την ήπια βαθμού δυσπλασία να χαρακτηρίζεται ως CIN I και τις αλλοιώσεις CIS ως CIN III. Η ταξινόμηση αυτή, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι υπάρχει παρόμοια βιολογία μεταξύ όλων των βαθμών της πρόδρομης αλλοίωσης και συνοδεύτηκε από λιγότερο τραυματικές τεχνικές για την απομάκρυνση της, όπως η κρυοθεραπεία και η αφαίρεση με laser. Στο συγκεκριμένο σύστημα, η πρωταρχική διάκριση έγινε στις αλλοιώσεις CIN II και CIN III, με τις αλλοιώσεις CIN II και τις πιο ήπιες από αυτές να θεραπεύονται με κρυοθεραπεία και τις αλλοιώσεις CIN III ή τις πιο σοβαρές να θεραπεύονται με κρυοθεραπεία ή με κωνοειδή εκτομή.

Επιπλέον, ένα τρίτο σύστημα ταξινομεί αυτές τις οντότητες σε δύο κατηγορίες: τις low grade SILs αλλοιώσεις (LSILs) και τις high grade SILs αλλοιώσεις (HSILs). Σε περιπτώσεις που ο διαχωρισμός μεταξύ τους ήταν κρίσιμος ως προς την αντιμετώπιση, οι μεν πρώτες ελέγχθηκαν με τεστ Παπανικολάου και οι δε τελευταίες με LEEP (Stenberg's *Diagnostic Surgical Pathology, Chapter 52: The Cervix.* 2010).

## 10.8. Η επανάσταση στη μοριακή διάγνωση του ιού HPV.

Είναι ξεκάθαρη η συμβολή του HPV ιού στην ανάπτυξη χαμηλόβαθμων και υψηλόβαθμων αλλοιώσεων που μπορεί να οδηγήσουν στην ανάπτυξη καρκίνου στον τράχηλο της μήτρας. Επομένως, είναι επιτακτική η ανάγκη να αναπτυχθούν αξιόπιστες τεχνικές που θα εξασφαλίζουν με μεγάλη ευαισθησία και εξειδίκευση την ανίχνευση και τυποποίηση των στελεχών του HPV ιού.

Τα τελευταία 25 χρόνια έχει αναπτυχθεί ένας μεγάλος αριθμός μεθόδων για την ανίχνευση του ιϊκού γονιδιώματος του HPV ιού. Η πρώτη μέθοδος που εφαρμόστηκε για την ανίχνευση του ιού ήταν η Southern blot ανάλυση. Η συγκεκριμένη μέθοδος χρησιμοποιεί ένζυμο που σπάνε την αλυσίδα του ιϊκού DNA που απομονώνεται από το δείγμα. Ωστόσο πρόκειται για χρονοβόρο διαδικασία και με μικρή ευαισθησία.

Ο *in situ* υβριδισμός αποτελεί μια άμεση ανιχνευτική μέθοδο που αξιολογεί την παρουσία ενός νουκλεϊκού οξέος στόχου ή του προϊόντος γονιδιακής έκφρασης (mRNA μετάγραφο), τόσο σε μονιμοποιημένους ιστούς, που έχουν εμπεδωθεί σε παραφίνη, όσο και σε τραχηλικά επιχρίσματα. Τα πλεονεκτήματα της συγκεκριμένης μεθόδου είναι ότι το DNA του ιού μπορεί να ανιχνευτεί σε διάφορα είδη κυττάρων είτε σε ενσωματωμένη μορφή, είτε σε επισωματική μορφή (*Hopman AH et al. Int. J. Cancer. 2005*). Η χαμηλή ευαισθησία και ειδικότητα (30% και 72% αντίστοιχα), η αποδόμηση των νουκλεϊκών οξέων κατά την επεξεργασία των δειγμάτων και ο χρόνος που απαιτείται για την πειραματική διαδικασία, είναι οι κύριοι λόγοι που κάνουν τις τεχνικές αυτές προβληματικές στην εκτέλεση τους (*Seedlacek TV. Clin. Obstet. Gynecol. Review. 1999*).

Η διάγνωση της λοίμωξης από τον HPV ιό στηρίζεται στην ανίχνευση του ιϊκού DNA σε κλινικά δείγματα, στα οποία η ακριβής ανίχνευση και η γονοτυπική ανάλυση του ιού έχουν μεγάλη σημασία για τον προσδιορισμό της συχνότητας των διαφόρων στελεχών του ιού σε ένα συγκεκριμένο πληθυσμό, καθώς και στον προσδιορισμό των κινδύνων που σχετίζονται με λοιμώξεις από ένα συγκεκριμένο στέλεχος (*Roberts CC et al. J. Clin. Microbiol. 2011*).

Η πρώτη εκτίμηση της χρήσης του HPV–DNA τεστ σε μια πιθανή κλινική εφαρμογή αναφέρθηκε το 1989 από τον Tidy και τους συνεργάτες του και περιλάμβανε την ανίχνευση του στελέχους 16 του HPV ιού με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) σε φυσιολογικά και δυσκαρυστικά επιχρίσματα 21 γυναικών. Τα αποτελέσματα ήταν αρκετά ικανοποιητικά και υποστήριξαν ότι το HPV–DNA τεστ θα μπορούσε να αποτελέσει συμπληρωματική μέθοδο για την κυτταρολογική ανάλυση των τραχηλικών επιχρισμάτων που ελέγχονται (*Cox JT. J. Clin. Virol. 2009*).

Η ενίσχυση της L1 περιοχής του γονιδιώματος του ιού με τη μέθοδο της PCR είναι ευρέως διαδεδομένη. Για την ενίσχυση έχουν χρησιμοποιηθεί πολλοί συνδυασμοί εκκινητών όπως τα ζεύγη MY09/11, GP5+/ GP6+, SPF1/2 και το σύνολο 18 εκκινητών PGMY09/11 που παρουσιάζει μεγαλύτερη ευαισθησία και εξειδίκευση σε σχέση με τα προηγούμενα που χρησιμοποιήθηκαν (*Boulet G. et al. Cancer. Epidemiol. Biomarkers Prev. Minireview. 2008*).

Η εμφάνιση επιμολύνσεων σε συνδυασμό με την ύπαρξη ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων και τον σημαντικό αριθμό διαφορετικών στελεχών του HPV ιού, γεγονότα που αυξάνουν σημαντικά το κόστος λόγω επαναλήψεων, έχει συμβάλλει στην ανάπτυξη πιο αυτοματοποιημένων τεχνικών ανίχνευσης και τυποποίησης του ιϊκού DNA, όπως είναι το Hybrid Capture System. Με τη μέθοδο αυτή είναι δυνατό να αναγνωριστούν 13 τύποι υψηλού κινδύνου και 5 τύποι χαμηλού κινδύνου καθώς και να μετρηθεί ημι-ποσοτικά το ιϊκό φορτίο. Ωστόσο, λόγω του υψηλού κόστους η εφαρμογή αυτή περιορίζεται σε μικρό αριθμό εργαστηρίων.

## 10.9. Επιδημιολογικά στοιχεία της μελέτης μας.

Στην παρούσα εργασία συλλέξαμε δείγματα από 134 γυναίκες, ηλικίας 18 έως 63 ετών, που προσήλθαν στο τμήμα Κολποσκόπησης της Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας λόγω κυτταρολογικών αλλοιώσεων στο τεστ Παπανικολάου (PAP τεστ).

Έγινε λήψη τραχηλικού επιχρίσματος και βιοψίας από περιοχές του τραχήλου της μήτρας, που ήταν ύποπτες για αλλοιώσεις τύπου CIN, ενώ παράλληλα οι γυναίκες ενημερώθηκαν για την μελέτη και συμπλήρωσαν σχετικό ερωτηματολόγιο. Η επεξεργασία των δειγμάτων αυτών πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Εξαιρέθηκαν από τη μελέτη 11 γυναίκες από τις οποίες συλλέξαμε τελικά μόνο τραχηλικό επίχρισμα. Με βάση την ιστολογική διάγνωση αφαιρέσαμε επιπλέον 3 γυναίκες καθώς η ιστολογική εκτίμηση έδειξε φλεγμονή, ενώ 2 ακόμη εξαιρέθηκαν καθώς η βιοψία τους περιλάμβανε μόνο ενδοτραχηλικό βλεννογόνο.

Με βάση τα ερωτηματολόγια, συγκεντρώσαμε πληροφορίες σχετικά με το μορφωτικό επίπεδο των γυναικών, την ύπαρξη προηγούμενου παθολογικού τεστ Παπανικολάου, την ύπαρξη προηγούμενης λοίμωξης από HPV ιό ή χλαμύδια ενώ εξετάσαμε και αν το κάπνισμα ενοχοποιείται ως παράγοντας κινδύνου. Με εξαίρεση το κάπνισμα, η στατιστική επεξεργασία των υπολοίπων παραμέτρων δεν έδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση τόσο με το βαθμό δυσπλασίας όσο και με την παρουσία ιϊκού γονιδιώματος στα επιχρίσματα και στις βιοψίες των γυναικών που εξετάστηκαν.

Αντιθέτως, ο βαθμός δυσπλασίας και η παρουσία του HPV ιού παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική συσχέτιση με το κάπνισμα. Οι υψηλού βαθμού αλλοιώσεις είναι πολύ περισσότερες σε καπνίστριες γυναίκες σε σχέση με τις μη καπνίστριες ( $p=0,020$ ). Ωστόσο, όταν εξετάσουμε όλα μας τα αποτελέσματα σε ένα μοντέλο πολλαπλής λογιστικής παλινδρόμησης, προκύπτουν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ του βαθμού δυσπλασίας και της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των δεικτών MIB-1, p16 και κυκλίνης-B1, που καθιστούν όλους τους άλλους προγνωστικούς παράγοντες, όπως παραδείγματος χάρι το κάπνισμα, μη σημαντικούς, ακόμη και αν ήταν αρχικά.

Υπάρχουν πολλές μελέτες που αναφέρουν τη σύνδεση μεταξύ της λοίμωξης από τον HPV ιό και το κάπνισμα σε χώρες όπως η Ρωσία, η Λετονία, η Λευκορωσία (Syrjänen K, *et al. Eur J Epidemiol* 2007), η Γερμανία (Remschmidt C. *et al. Int J Gynecol Cancer*. 2013) και ο Καναδάς (Sellors JW., *et al. CMAJ*. 2000).

Ανάλογα αποτελέσματα προκύπτουν από τη μελέτη του Monsonego και των συνεργατών του (Monsonego J. *et al. Vaccine*. 2012) στη Γαλλία οι οποίοι έδειξαν ότι το κάπνισμα σχετίζεται με τη λοίμωξη από HPV ιό ( $p<0.001$ ).

Ωστόσο, στη δική μας μελέτη, αν και φαίνεται το κάπνισμα να αποτελεί σημαντικό προγνωστικό δείκτη και να σχετίζεται τόσο με την παρουσία του HPV ιού, όσο και με το βαθμό δυσπλασίας των ιστολογικών αλλοιώσεων, η προσθήκη των ανοσοϊστοχημικών δεικτών το καθιστά λιγότερο σημαντικό, γεγονός που συνηγορεί στη συνεργατική δράση του καπνίσματος στην ήδη υπάρχουσα λοίμωξη από τον HPV ιό. Σε συμφωνία με τα αποτελέσματά μας είναι η μελέτη των Χατζησταματίου και των συνεργατών του (Chatzistamatiou K., *et al. World J. Obstet. Gynecol*. 2013). Στη μελέτη τους σε κυτταρολογικά υλικά (Thinprep) παρατήρησαν ότι καπνίστριες γυναίκες ηλικίας 25-34 ετών με αρνητικό τεστ Παπανικολάου είχαν μεγαλύτερες πιθανότητες να έχουν προσβληθεί από HR-HPV στέλεχος σε σχέση με τις μη καπνίστριες. Το γεγονός αυτό φαίνεται να υποδηλώνει ότι το κάπνισμα ίσως ενισχύει τη λοίμωξη από HPV ιό στα αρχικά στάδια, πριν την ανάπτυξη προδιηθητικών αλλοιώσεων.

Επιπλέον, μολονότι η λοίμωξη από τον HPV ιό είναι παροδική, υπάρχουν μελέτες (Louie KS., *et al. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2011, Sierra-Torres CH., *et al. Int J Gynecol. Cancer* 2003, Hussain SK., *et al. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008), που υποστηρίζουν ότι η εμμένουσα λοίμωξη και η εξέλιξη σε υψηλόβαθμες αλλοιώσεις πιθανά διευκολύνονται από το κάπνισμα μέσω τοπικής ανοσοκαταστολής που αυτό προκαλεί.

#### **10.10. Ανίχνευση και τυποποίηση του HPV – Συσχέτιση με τις ιστολογικές αλλοιώσεις.**

Στην παρούσα εργασία εξετάστηκαν τελικά 118 γυναίκες. Με βάση την ιστολογική διάγνωση 87 γυναίκες είχαν χαμηλού βαθμού αλλοιώσεις (LGSIL), 28 γυναίκες είχαν υψηλού βαθμού αλλοιώσεις (HGSIL), ενώ σε 3 γυναίκες ανιχνεύθηκε καρκίνος (δύο εμφάνισαν καρκίνωμα πλακωδών κυττάρων και μία αδenoκαρκίνωμα). Στις γυναίκες αυτές έγινε απομόνωση του ιϊκού γονιδιώματος τόσο στα τραχηλικά επιχρίσματα όσο και στις βιοψίες που ελήφθησαν.

Σε σύνολο 118 δειγμάτων, στα 110 δείγματα ανιχνεύθηκε ο HPV ιός (93,22%). Σε 8 δείγματα (6,78%) δεν ανιχνεύθηκε ο ιός, ενώ όλα τα HPV (-) δείγματα έδειξαν χαμηλού βαθμού δυσπλασία (LGSIL).

Σε 79/87 γυναίκες με χαμηλόβαθμη δυσπλασία (90,81%) ανιχνεύθηκε η παρουσία HPV ιού. Όσον αφορά τις γυναίκες με υψηλόβαθμη δυσπλασία και με καρκίνο, στο σύνολο αυτών (28 και 3 αντίστοιχα) ανιχνεύθηκε η παρουσία HPV ιού. Σε 8/87 γυναίκες με LGSIL αλλοιώσεις (9,19%) δεν ανιχνεύθηκε ο HPV ιός.

Παρόμοια αποτελέσματα έδωσε η μελέτη του Cobo και των συνεργατών του στην Ισπανία (Cobo F. *et al. The Open Virology Journal*, 2009). Στην εργασία τους που αφορούσε στη μελέτη γυναικών με κυτταρολογικές αλλοιώσεις στο τεστ Παπανικολάου μελέτησαν την κατανομή των HPV στελεχών και τη σχέση τους με τις κυτταρολογικές και ιστολογικές εκτιμήσεις. Η ανίχνευση του HPV ιού σε δείγματα με LGSIL αλλοιώσεις κυμαίνονταν σε ποσοστό 92,6% (50/54), ενώ HPV DNA ανιχνεύθηκε στο σύνολο των περιπτώσεων με HGSIL αλλοιώσεις (21/21, 100%).

Τα αποτελέσματά μας είναι επίσης σε συμφωνία με τη μελέτη του Αγοραστού και των συνεργατών του (Agorastos T., *et al. and the HERMES study group. PLoS ONE* 10 (3): e0119755, 2015), σύμφωνα με τα οποία, σε LGSIL αλλοιώσεις ο HPV ιός ανιχνεύθηκε σε 71/83 γυναίκες (85,54%). Στην ίδια μελέτη η ανίχνευση του HPV DNA ήταν δυνατή στο σύνολο των βιοψιών με HGSIL αλλοιώσεις, γεγονός που συμφωνεί με τα δικά μας αποτελέσματα.

Παρόμοια αποτελέσματα, με χαμηλότερα βέβαια ποσοστά από τα δικά μας, αναφέρονται στη μελέτη του Chen και των συνεργατών του (Chen CA., *et al. Int J Gynecol Cancer* 2006), στην οποία συσχέτιση ανάμεσα στην ιστολογική εκτίμηση και στο HPV status σε κυτταρολογικά LSIL γυναίκες, έδειξε ότι σε LGSIL αλλοιώσεις η παρουσία HPV DNA ήταν σε ποσοστό 84,7%, ενώ στο 15,3% δεν ανιχνεύθηκε HPV ιός, ενώ στις HGSIL αλλοιώσεις/ καρκίνους τα θετικά HPV δείγματα κυμαίνονταν στο 89,4%.

Τα 110 θετικά δείγματα αναλύθηκαν περαιτέρω προκειμένου να ταυτοποιήσουμε τα στελέχη του HPV ιού. Η μοριακή ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση των γενικών PGMY09/11 εκκινητών. Πρόκειται για ένα σύνολο 18 εκκινητών που ενισχύουν τμήμα της L1 περιοχής και συγκεκριμένα μεταξύ 6582–7033 ζευγών βάσεων, οδηγώντας σε ένα γονιδιακό προϊόν 450 ζευγών βάσεων με υψηλή ευαισθησία και εξειδίκευση (Gravitt PE., *et al. J. Clin. Microbiol.* 2000).

Η μοριακή ανάλυση των HPV (+) δειγμάτων ταυτοποίησε τα HPV στελέχη σε 101 δείγματα. Σε 9 HPV (+) δείγματα δεν ήταν δυνατή η περαιτέρω ταυτοποίηση καθώς η ενίσχυση της L1 γονιδιακής περιοχής δεν ήταν επαρκής για να ακολουθήσει η περαιτέρω ταυτοποίηση των δειγμάτων αυτών με τη χρήση περιοριστικών ενζύμων.

Εκτός από τη χρήση των PGMY09/11 εκκινητών, χρησιμοποιήθηκαν ειδικοί εκκινητές για τα συχνότερα υψηλού κινδύνου στελέχη 16, 18, 31 και 33 αλλά και για τα χαμηλού κινδύνου στελέχη 6, 11 που είναι υπεύθυνα για τα κονδυλώματα. Σε κανένα από τα HPV (+) δείγματα που δεν έδωσαν επαρκή ενίσχυση με τους PGMY εκκινητές δεν ανιχνεύθηκε κάποιο από τα στελέχη 16, 18, 31, 33, 6 και 11, γεγονός που σημαίνει ότι τα δείγματα αυτά έφεραν κάποιο άλλο στέλεχος του HPV ιού.

Αξιζει να αναφέρουμε ότι η ενίσχυση της L1 γονιδιακής περιοχής με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), ανιχνεύει την πλειοψηφία των χαμηλού κινδύνου στελεχών αλλά ενδέχεται να υποεκτιμήσει την ανίχνευση υψηλού κινδύνου στελεχών όπως τα στελέχη 16 και 18. Ο κατακερματισμός του DNA σε μονιμοποιημένους ιστούς επηρεάζει την ενίσχυση της L1 γονιδιακής περιοχής (Park JS., *et al. Mod. Pathol.* 1991). Επιπλέον, η ενσωμάτωση του ιικού γονιδιώματος, καθώς και η ύπαρξη μεταλλάξεων στην L1 περιοχή, ενδέχεται να επηρεάσουν την πρόσδεση των εκκινητών και να οδηγήσουν σε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα (Karlsen F. *et al. J Clin Microbiol* 1996, Smits HL., *et al. J Clin Microbiol* 1995. Morris, BJ. *Clin. Chem.Lab .Med.* 2005).

Συνεπώς, η ύπαρξη των 8 HPV (-) δειγμάτων ενδέχεται να είναι αποτέλεσμα της πιθανής ενσωμάτωσης του ιικού γονιδιώματος ή της ύπαρξης μεταλλάξεων σε θέση πρόσδεσης των εκκινητών. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μην επιτρέπεται η πρόσδεση και η ενίσχυση της συγκεκριμένης γονιδιακής περιοχής, οδηγώντας σε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα.



Επιπρόσθετα, κατά τη λήψη της βιοψίας από τις εξεταζόμενες γυναίκες, ένα μέρος της βιοψίας χρησιμοποιούνταν για την ιστολογική διάγνωση και το υπόλοιπο μέρος για την ανίχνευση του HPV ιού. Επομένως, η απουσία HPV ιού θα μπορούσε να δικαιολογηθεί από την παρουσία μικρής έκτασης LGSIL αλλοιώσεων ή την εστιακή θέση τους.

Όσον αφορά τη συχνότητα των HPV στελεχών, που τυποποιήθηκαν τόσο στις LGSIL αλλοιώσεις όσο και στις HGSIL αλλοιώσεις, τα συχνότερα κατά σειρά στελέχη είναι τα 16, 18, 31, 33 και 16, 31, 18 και 33 αντίστοιχα. Το στέλεχος 51 ακολουθεί σε συχνότητα στις LGSIL βιοψίες, ενώ το στέλεχος 59 ακολουθεί μετά το στέλεχος 33 στις HGSIL αλλοιώσεις. Τόσο στις χαμηλού, όσο και στις υψηλού βαθμού αλλοιώσεις, ανιχνεύονται και τα χαμηλού κινδύνου στελέχη 6 και 11, τα οποία συνυπάρχουν σε πολλαπλές λοιμώξεις. Τα αποτελέσματά μας συμφωνούν με τη διεθνή βιβλιογραφία, καθώς το στέλεχος 16 είναι το συχνότερο παγκοσμίως και τα υπόλοιπα στελέχη απαντώνται σε υψηλές συχνότητες. Τυχόν διαφορές εντοπίζονται κυρίως στην υπάρχουσα γεωγραφική ετερογένεια.

Αξίζει να σημειώσουμε ότι το στέλεχος 31 κατέχει τη δεύτερη σε συχνότητα θέση στις HGSIL και την τρίτη σε συχνότητα στις LGSIL αλλοιώσεις, γεγονός που καθιστά ιδιαίτερα σημαντική την ανάπτυξη εμβολίων που να καλύπτουν και το συγκεκριμένο στέλεχος, καθώς τα εμβόλια που υπάρχουν σήμερα καλύπτουν μόνο τα υψηλού κινδύνου 16 και 18 στελέχη του HPV ιού.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη της παρουσίας απλών ή πολλαπλών λοιμώξεων. Στα δείγματα της μελέτης μας παρατηρήσαμε σε σημαντικό βαθμό πολλαπλές λοιμώξεις. Πιο συγκεκριμένα, στις LGSIL βιοψίες το 79% αυτών σχετίζεται με λοίμωξη από ένα στέλεχος του HPV ιού, ενώ οι πολλαπλές λοιμώξεις ανιχνεύονται σε ποσοστό 21% περίπου στις LGSIL βιοψίες. Στη μελέτη των Κρούπη και των συνεργατών του (*Kroupis C., et al. Epidemiol. Infect. 2007*), παρατηρείται επίσης υψηλό ποσοστό εμφάνισης πολλαπλών λοιμώξεων το οποίο φτάνει το 21,2% στο σύνολο των δειγμάτων. Στη μελέτη επίσης, του Cobo και των συνεργατών του, πολλαπλές λοιμώξεις ανιχνεύονται σε ποσοστό 19% του συνόλου των HPV (+) δειγμάτων, ενώ επιμέρους σε LGSIL και HGSIL αλλοιώσεις τα ποσοστά διαμορφώνονται 28% και 14,3% αντίστοιχα.

Ωστόσο, στη δική μας εργασία, στις HGSIL αλλοιώσεις η παρουσία περισσοτέρων του ενός στελεχών του HPV ιού φτάνει το 48% των περιπτώσεων, ενώ το 52% περίπου των HGSIL περιπτώσεων παρουσιάζει λοίμωξη από ένα στέλεχος του HPV ιού. Στους τρεις καρκίνους τυποποιήθηκε η παρουσία ενός μόνο στελεχών του HPV ιού σε κάθε περίπτωση.

Διαφορετικά ποσοστά έχουν αναφερθεί σε διάφορες μελέτες και φαίνεται να υποστηρίζουν ότι οι διαφορές αυτές μπορεί να είναι αποτέλεσμα της γεωγραφικής ετερογένειας, των ηλικιακών ομάδων που εξετάζονται σε κάθε μελέτη και της χρήσης διαφορετικών μεθοδολογικών προσεγγίσεων.

Αξίζει να αναφέρουμε ότι οι πολλαπλές λοιμώξεις είναι ιδιαίτερα υψηλές στις ηλικιακές ομάδες < 25 ετών και 26-35 ετών. Σε αυτές τις ηλικιακές ομάδες οι γυναίκες φαίνονται να διατρέχουν υψηλότερο κίνδυνο για λοίμωξη από υψηλού κινδύνου στελέχη του HPV ιού. Ωστόσο, δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική συσχέτιση των παραμέτρων αυτών.

Στη μελέτη της Mejlhede και των συνεργατών της σε πληθυσμό γυναικών της Δανίας (*Mejlhede N., et al. APMIS. 2009*) αναφέρεται ότι το μεγαλύτερο ποσοστό (61%) πολλαπλών λοιμώξεων παρατηρείται σε νεαρές γυναίκες (< 30 έτη), ενώ διαμορφώνεται σε ποσοστό 44% σε ηλικίες 30-44 ετών και φτάνει στο 30% σε γυναίκες ηλικίας > 45 ετών.

Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με μελέτη των Pista και συνεργατών του, οι οποίοι μελέτησαν τη συχνότητα απλών και πολλαπλών HPV λοιμώξεων σε πληθυσμό της Πορτογαλίας (*Pista A., et al. Clin Microbiol Infect. 2011*). Στη μελέτη τους έδειξαν ότι το ποσοστό των πολλαπλών λοιμώξεων σε LGSIL (CIN I) περιπτώσεις πλησιάζει το 32,9% και αυξάνεται στο 38% στις HGSIL αλλοιώσεις, ενώ φαίνεται να παρουσιάζει στατιστικά σημαντική αύξηση ( $p=0,005$ ) ανάλογα με το βαθμό δυσπλασίας. Ωστόσο, όπως και στη δική μας εργασία, ανιχνεύονται κυρίως στις ηλικιακές ομάδες κάτω των 35 ετών, χωρίς ωστόσο να υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση.

Αντίθετα, η διερεύνηση του βαθμού δυσπλασίας και η πιθανή συσχέτιση με τα υψηλού κινδύνου HPV στελέχη 16 και 18, έδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των LGSIL

αλλοιώσεων και της παρουσίας του στελέχους 18 του HPV ιού ( $p=0,033$ ). Ωστόσο, συνιστάται περαιτέρω διερεύνηση λόγω του μικρού αριθμού δειγμάτων.

#### 10.11. Ανοσοϊστοχημική έκφραση των δεικτών p16, κυκλίνης-B1 και MIB-1 - Συσχέτιση με τις ιστολογικές αλλοιώσεις.

Παράλληλα με τη μοριακή ανάλυση των δειγμάτων με τη μέθοδο της PCR, εξετάσαμε την έκφραση των ανοσοϊστοχημικών δεικτών p16, κυκλίνης-B1 και του δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού MIB-1.

Αναφορικά με την ανοσοχρώση για την p16 πρωτεΐνη, τα δείγματα ταξινομήθηκαν σε τέσσερις κατηγορίες ανάλογα με το πρότυπο έκφρασης που παρουσίαζαν (patterns). Το pattern A περιλαμβάνει μεμονωμένα θετικά κύτταρα διασκορπισμένα ή σε μικρές ομάδες, συνήθως πάνω από την παραβασική στιβάδα. Το pattern A low διακρίνεται από το pattern A λόγω της παρουσίας διασκορπισμένων θετικών κυττάρων που παρατηρούνται κυρίως στις κατώτερες στιβάδες του επιθηλίου διασκορπισμένα ή σε μικρές ομάδες. Το pattern B αποτελείται από διάχυτη θετικότητα στο οριζόντιο επίπεδο, το οποίο περιλαμβάνει τη βασική, την παραβασική και τις ενδιάμεσες στιβάδες του επιθηλίου, χωρίς να επεκτείνεται στο άνω 1/3 του επιθηλίου. Τέλος το pattern C χαρακτηρίζεται από διάχυτη θετικότητα σε όλες τις στιβάδες του επιθηλίου. Τα patterns A και A low θεωρούνται ως εστιακή θετικότητα, ενώ τα patterns B και C θεωρούνται ως διάχυτη θετικότητα.

Στις χαμηλού βαθμού δυσπλασίες θετική ανοσοχρώση για την p16 πρωτεΐνη παρουσίασε το 78,2% των περιπτώσεων. Στο 21,8% των LGSIL περιπτώσεων η χρώση απέβη αρνητική. Αντιθέτως, στις υψηλόβαθμες δυσπλασίες, θετική ανοσοχρώση είχαμε σε 27/28 περιπτώσεις (96,43%), ενώ σε μία περίπτωση η χρώση ήταν αρνητική. Διάχυτη θετικότητα (patterns B + C) παρατηρήθηκε στο 19,12% των LGSIL αλλοιώσεων και στο 92,86% των HGSIL αλλοιώσεων. Οι τρεις καρκίνοι έδειξαν θετική ανοσοχρώση για την p16 πρωτεΐνη με διάχυτο πρότυπο έκφρασης (pattern C).

Σε προηγούμενες μελέτες τα ποσοστά θετικής ανοσοχρώσης ποικίλουν από 5,6% έως 100% σε LGSIL αλλοιώσεις και από 45,2% έως 100% σε HGSIL αλλοιώσεις. Σε προηγούμενη εργασία που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριό μας, (Kostopoulou E. et al. *Eur. J. Gynaec. Oncol.* 2011) χρησιμοποιώντας το ίδιο αντίσωμα που χρησιμοποιήσαμε και στη συγκεκριμένη εργασία, ανιχνεύσαμε θετική ανοσοχρώση για την p16 πρωτεΐνη στο 96% των βιοψιών με HGSIL αλλοιώσεις και στο 74,5% των βιοψιών με LGSIL αλλοιώσεις. Τα αποτελέσματά μας παρουσιάζουν θετική ανοσοχρώση στο 96,43% των HGSIL βιοψιών και στο 78,2% των βιοψιών με LGSIL αλλοιώσεις. Ανάλογα αποτελέσματα δίνουν και άλλες μελέτες, που χρησιμοποίησαν το ίδιο αντίσωμα για την χρώση (Hariri J., et al. *Int. J. Gynecol Pathol.* 2007. 26; 223–8, Negri, G., et al. *Virchows Arch.* 2004).

Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων με Fisher's exact test ανέδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση του βαθμού δυσπλασίας με το πρότυπο έκφρασης της ανοσοχρώσης για την p16 πρωτεΐνη ( $p<0,05$ ). Η πλειοψηφία των γυναικών με HGSIL αλλοιώσεις παρουσιάζει διάχυτου τύπου θετική χρώση (pattern C).

Για την εκτίμηση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της κυκλίνης-B1 χρησιμοποιήσαμε τρία πρότυπα έκφρασης (patterns). Το pattern A παρατηρείται στο φυσιολογικό επιθήλιο του τραχήλου της μήτρας και περιλαμβάνει μεμονωμένα θετικά κύτταρα με κατακόρυφο προσανατολισμό, που δεν εκτείνονται πάνω από τη παραβασική στιβάδα. Το pattern B αποτελείται από σποραδική χρώση της κυκλίνης-B1 σε ώριμα, πλακώδη, πολυγωνικά κύτταρα ακριβώς πάνω από τη βασική στιβάδα και το pattern C χαρακτηρίζεται από σημαντικό αριθμό δυσπλαστικών κυττάρων που εκφράζουν την κυκλίνη-B1 στις ανώτερες στιβάδες του επιθηλίου. Τα patterns B και C θεωρούνται θετικά για περαιτέρω ανάλυση, ενώ το pattern A δεν θεωρείται θετικό.

Το 2000, ο Southern και οι συνεργάτες του (Southern SA., et al. *Lab Invest.* 2000. 80; 539–44), απέδειξαν αυξημένη έκφραση της κυκλίνης-B1 σε βιοψίες με υψηλού βαθμού δυσπλασία.

Το 94,07% του συνόλου των βιοψιών (111/118) έδειξε θετική ανοσοχρώση για την κυκλίνη-B1. Όλες οι HGSIL αλλοιώσεις (100%) είχαν θετική ανοσοχρώση. Συγκεκριμένα, 22/28 είχαν πρότυπο έκφρασης C και 6/28 είχαν πρότυπο έκφρασης B. Οι δύο καρκίνοι είχαν πρότυπο έκφρασης B και ο ένας είχε πρότυπο έκφρασης C. Στις LGSIL αλλοιώσεις θετική ανοσοχρώση για κυκλίνη-B1 (πρότυπα έκφρασης B + C) έδωσαν 80/87 βιοψίες (91,95%). Πιο συγκεκριμένα, 74/87 βιοψίες με LGSIL αλλοιώσεις είχαν B πρότυπο έκφρασης και μόνο 6/87 είχαν πρότυπο έκφρασης C. 7 περιπτώσεις χαμηλόβαθμης δυσπλασίας δεν έδωσαν θετική ανοσοχρώση για την κυκλίνη-B1 (πρότυπο έκφρασης A).

Σε προηγούμενη εργασία από το εργαστήριό μας (Kostopoulou E. et al. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 2009), δείξαμε θετική ανοσοχρώση για την κυκλίνη-B1 στο 100% των βιοψιών με HGSIL αλλοιώσεις και στο 98,07% των βιοψιών με LGSIL αλλοιώσεις. Τα αποτελέσματά μας είναι σε συμφωνία με τη συγκεκριμένη εργασία καθώς στα δείγματά μας θετική ανοσοχρώση για την κυκλίνη-B1 έδειξε το σύνολο (100%) των βιοψιών με HGSIL αλλοιώσεις και το (91,95%), 80/87 βιοψίες με LGSIL αλλοιώσεις.

Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων με Pearson Chi Square ανέδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του βαθμού δυσπλασίας και της θετικής ανοσοχρώσης για την κυκλίνη-B1 ( $p < 0,05$ ). Η πλειοψηφία των γυναικών με HGSIL αλλοιώσεις παρουσιάζει θετική ανοσοχρώση (pattern C). Φαίνεται ότι καθώς αυξάνεται ο βαθμός δυσπλασίας αυξάνει η έκταση της χρώσης στις ανώτερες στιβάδες του επιθηλίου.

Επιπρόσθετα, εξετάσαμε την ανοσοϊστοχημική έκφραση για τον δείκτη του κυτταρικού πολλαπλασιασμού MIB-1. Γνωρίζουμε ότι η ανοσοθετικότητα για τον δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού MIB-1 αυξάνεται σε συνάρτηση με την αύξηση του βαθμού αλλοίωσης (Arafa M., et al. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 2008, Conesa-Zamora P., et al. *Am J Clin Pathol.* 2009).

Οι βιοψίες ταξινομήθηκαν σε τρεις ομάδες ανάλογα με τα πρότυπα έκφρασης (patterns 1/3, 2/3, 3/3). Οι βιοψίες με LGSIL αλλοιώσεις είχαν πρότυπο έκφρασης 1/3 στην πλειοψηφία τους. Αντίθετα, η πλειοψηφία των βιοψιών με HGSIL αλλοιώσεις είχε πρότυπα έκφρασης της ανοσοχρώσης για τον MIB-1 δείκτη μεταξύ 2/3 και 3/3. Όσον αφορά τους καρκίνους, πρότυπο έκφρασης 3/3 παρατηρήθηκε και στους τρεις.

Δεδομένου ότι μικρός αριθμός περιστατικών έδωσε θετική ανοσοχρώση για τον MIB-1 δείκτη, η χρώση δεν αξιολογήθηκε περαιτέρω. Αξίζει ωστόσο να αναφέρουμε ότι έλεγχος με Fisher's exact test έδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του βαθμού δυσπλασίας και της θετικής ανοσοχρώσης για τον MIB-1 δείκτη. Παρατηρείται δηλαδή ότι στην πλειοψηφία των γυναικών με αλλοιώσεις HGSIL η χρώση καταλαμβάνει τα 3/3 του επιθηλίου ( $p < 0,05$ ), γεγονός που συμφωνεί με τα αποτελέσματα των μελετών που προαναφέραμε.

#### 10.12. Συσχέτιση HPV παρουσίας και ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των δεικτών p16, κυκλίνης-B1 και MIB-1.

Στη συνέχεια, προσπαθήσαμε να συσχετίσουμε την p16 ανοσοχρώση και την παρουσία του HPV ιού στα δείγματά μας. Στις βιοψίες με LGSIL αλλοιώσεις παρατηρήσαμε ότι η παρουσία HPV ιού και θετικής ανοσοχρώσης για την p16 πρωτεΐνη συνυπάρχει σε 61/87 περιπτώσεις (70,11%). Απουσία του HPV ιού και αρνητική χρώση για p16 παρατηρείται σε μία βιοψία με LGSIL αλλοιώσεις. Ωστόσο, 18/87 περιπτώσεις (20,69%) είχαν αρνητική χρώση για την p16 πρωτεΐνη αλλά είχαν λοίμωξη από HPV ιό, ενώ 7/87 περιπτώσεις (8,05%) των LGSIL περιπτώσεων είχαν θετική ανοσοχρώση για την p16 πρωτεΐνη αλλά δεν ανιχνεύθηκε η παρουσία του HPV ιού στα συγκεκριμένα δείγματα με την τεχνική της PCR.

Προηγούμενες μελέτες σε χαμηλού βαθμού δυσπλαστικές αλλοιώσεις (Negri G. et al. *Am. J. Surg Pathol.* 2008., Yoshida T. et al. *Cancer.* 2008) έδειξαν ότι το πρότυπο L1(-)/p16(-), δείχνει την ύπαρξη ιϊκού DNA, χωρίς αναπαραγωγή του ιού ή αλλαγή του κυτταρικού κύκλου, υποδηλώνοντας ότι η αλλοίωση βρίσκεται σε λανθάνουσα ή μη

δυσπλαστική φάση. Το πρότυπο L1(+)/p16(-), δείχνει ότι το γενετικό υλικό του ιού βρίσκεται σε παραγωγική ή ενεργό μορφή, χωρίς μεταβολή του κυτταρικού κύκλου, γεγονός που υποδηλώνει ότι η αλλοίωση βρίσκεται σε παραγωγική αλλά μη δυσπλαστική κατάσταση. Το πρότυπο L1(+)/p16(+), υποδηλώνει αλλαγή στον κυτταρικό κύκλο του ιού με παραγωγική και/ή ενεργό μορφή του ιού και δείχνει ότι η βλάβη βρίσκεται σε αρχικό στάδιο δυσπλασίας. Τέλος, το πρότυπο L1(-)/p16(+) αποδεικνύει είτε λοίμωξη σε λανθάνουσα φάση είτε ενσωμάτωση του ιικού DNA στο γενετικό υλικό του κυττάρου ξενιστή, υποδηλώνοντας ότι η βλάβη βρίσκεται σε τελικό ή πιο προχωρημένο στάδιο δυσπλασίας.

Μολονότι οι παραπάνω μελέτες είναι ανοσοϊστοχημικές και εξετάζουν τις L1 και p16 πρωτεΐνες, θα μπορούσε να συσχετιστεί με τα δικά μας αποτελέσματα, καθώς η παρουσία στελεχών του HPV ιού έγινε με γενικούς εκκινητές που ενισχύουν τμήμα της L1 γονιδιακής περιοχής. Η ενίσχυση της συγκεκριμένης περιοχής εξασφαλίζει την παρουσία της και κατά συνέπεια την έκφραση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης.

Όσον αφορά στις βιοψίες με HGSIL αλλοιώσεις, 27/28 HPV (+) περιπτώσεις (96,43%) είχαν θετική χρώση για την p16 πρωτεΐνη, υποδηλώνοντας ενεργό μορφή του ιού και αλλαγή στον κυτταρικό κύκλο. Μόνο μία περίπτωση δεν έδωσε θετική χρώση για p16, ενώ ανιχνεύθηκε HPV DNA.

Παράλληλα στατιστική επεξεργασία των προτύπων έκφρασης της ανοσοχρώσης για την p16 πρωτεΐνη σε συνάρτηση με τη λοίμωξη από ένα ή περισσότερα στελέχη του HPV ιού έδειξε ότι η παρουσία πολλαπλής λοίμωξης (> από 1 HPV στελέχη) σχετίζεται με διάχυτο πρότυπο έκφρασης της ανοσοχρώσης (pattern C) και η συσχέτιση αυτή είναι στατιστικά σημαντική ( $p=0,005$ ).

Επιπλέον, από την ανάλυση των αποτελεσμάτων προέκυψε ότι η πλειοψηφία των γυναικών με στέλεχος 16 του HPV ιού παρουσιάζει διάχυτου τύπου χρώση p16 (pattern C). Η συσχέτιση αυτή είναι στατιστικά σημαντική ( $p=0,015$ ).

Ανάλογα συσχετίσαμε τα πρότυπα έκφρασης της ανοσοχρώσης για την κυκλίνη-B1 με την παρουσία του HPV ιού. Στις βιοψίες με LGSIL αλλοιώσεις παρατηρήσαμε ότι η παρουσία HPV ιού και θετικής ανοσοχρώσης για την κυκλίνη-B1 συνυπάρχει σε 75/87 περιπτώσεις (86,21%). Απουσία του HPV ιού και αρνητική χρώση για την κυκλίνη-B1 παρατηρείται σε τρεις βιοψίες με LGSIL αλλοιώσεις (3,45%). Ωστόσο, 4/87 περιπτώσεις (4,59%) είχαν λοίμωξη από HPV ιό, αλλά αρνητική χρώση για την κυκλίνη-B1, ενώ 5/87 περιπτώσεις (5,75%) των LGSIL περιπτώσεων είχαν θετική ανοσοχρώση, αλλά δεν ανιχνεύθηκε η παρουσία του HPV ιού στα συγκεκριμένα δείγματα με την τεχνική της PCR. Όσον αφορά στις βιοψίες με HGSIL αλλοιώσεις, όλες (100%) είχαν HPV (+) ιό και θετική χρώση για την κυκλίνη-B1.

Παράλληλα, στατιστική επεξεργασία των προτύπων έκφρασης της ανοσοχρώσης για την κυκλίνη-B1 σε συνάρτηση με τη λοίμωξη από ένα ή περισσότερα στελέχη του HPV ιού έδειξε ότι η παρουσία πολλαπλής λοίμωξης (> από 1 HPV στελέχη) σχετίζεται με θετική χρώση για κυκλίνη-B1 (patterns B + C) και η συσχέτιση αυτή είναι στατιστικά σημαντική ( $p=0,04$ ). Η ανάλυση των αποτελεσμάτων δεν έδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των υψηλού κινδύνου στελεχών 16 και 18 του HPV ιού και της ανοσοχρώσης για κυκλίνη-B1 ( $p=0,105$ ).

Μολονότι μικρός αριθμός περιστατικών έδωσε θετική ανοσοχρώση για τον δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού MIB-1, με βάση τα περιστατικά αυτά κάναμε κάποιες συσχετίσεις. Όπως προέκυψε από τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, συσχέτιση του προτύπου έκφρασης της συγκεκριμένης ανοσοχρώσης και της παρουσίας απλών ή πολλαπλών λοιμώξεων έδειξε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των λοιμώξεων από ένα στέλεχος του HPV ιού και της έκφρασης του MIB-1 κατά 1/3 ( $p=0,001$ ). Αντίθετα, δεν φαίνεται να υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των προτύπων χρώσης για τον δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού MIB-1 και της παρουσίας των υψηλού κινδύνου στελεχών 16 και 18 του HPV ιού ( $p=0,085$ ).

Συνοψίζοντας, μπορούμε να πούμε ότι η ασυμφωνία ανάμεσα στην ιστολογική διάγνωση και στην ανίχνευση συγκεκριμένων στελεχών του HPV ιού, δείχνει ότι ο HPV θα μπορούσε να παρευρίσκεται στα επιθηλιακά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας, χωρίς να παράγει άτυπες αλλοιώσεις ή ελάχιστες κυτταρολογικές αλλαγές. (Cobo F. et al. *Open. Virol. J.* 2009).

Η ιστολογική αξιολόγηση των τραχηλικών αλλοιώσεων περιοριζόταν στη μορφολογική ερμηνεία με ελάχιστες ή καθόλου πληροφορίες σχετικά με την παραμονή, την εξέλιξη ή την υποχώρηση της λοίμωξης. Ωστόσο, η χρήση ανοσοϊστοχημικών δεικτών που μπορούν να λειτουργήσουν ως προγνωστικοί παράγοντες κινδύνου έχει ενισχύσει σημαντικά την ιστολογική εκτίμηση των βιοψιών τραχήλου της μήτρας με αποτέλεσμα να εξακολουθεί να θεωρείται ως το gold standard στην αξιολόγηση των τραχηλικών αλλοιώσεων, προκειμένου οι ασθενείς να λάβουν την κατάλληλη θεραπευτική αντιμετώπιση (*Hwang SJ. et al. J. Oncol. 2012. 9*).

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

### Από την παρούσα διδακτορική διατριβή προέκυψαν τα ακόλουθα συμπεράσματα:

- Δεν προκύπτουν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ βαθμού δυσπλασίας και παρουσίας HPV ιού με ύπαρξη προηγούμενου παθολογικού τεστ Παπανικολάου, προηγούμενη λοίμωξη από HPV ιό ή χλαμύδια.
- Αντιθέτως, προκύπτει στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ βαθμού δυσπλασίας (HGSIL) και καπνίσματος ( $p=0,020$ ). Ωστόσο, οι στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ του βαθμού δυσπλασίας και MIB-1, κυκλίνης-B1 και p16, καθιστούν το κάπνισμα, λιγότερο σημαντικό παράγοντα.
- Ο HPV ιός εντοπίστηκε σε ποσοστό 93,22% των γυναικών που εξετάστηκαν (110/118).
- Συσχέτιση της παρουσίας του HPV ιού και του βαθμού δυσπλασίας ανέδειξε 87 γυναίκες με χαμηλόβαθμη δυσπλασία (LGSIL) και 28 γυναίκες με υψηλόβαθμη δυσπλασία (HGSIL). Ο ιός ανιχνεύτηκε στο 90,81% και στο 100% των γυναικών με χαμηλόβαθμη και υψηλόβαθμη δυσπλασία αντίστοιχα.
- Στις χαμηλόβαθμες δυσπλασίες τα συχνότερα στελέχη του HPV ιού ήταν τα στελέχη 16, 18, 31, 33 και 51, ενώ στις υψηλόβαθμες δυσπλασίες συχνότερα καταγράφηκαν τα στελέχη 16, 31, 18, 33 και 59 του HPV ιού. Το σύνολο των καρκίνων που εξετάστηκαν έφεραν το στέλεχος 16 του HPV ιού.
- Μελέτη της παρουσίας απλών και πολλαπλών λοιμώξεων ανέδειξε πολλαπλές λοιμώξεις σε ποσοστό περίπου 21% σε LGSIL αλλοιώσεις, ενώ στις HGSIL αλλοιώσεις, το ποσοστό αυτό ανέρχεται στο 48% περίπου.
- Δεν καταγράφηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση των πολλαπλών λοιμώξεων με την ηλικία των γυναικών που εξετάστηκαν, ωστόσο οι πολλαπλές λοιμώξεις είναι ιδιαίτερα υψηλές σε ηλικίες < 35 ετών, όπου καταγράφεται και υψηλός κίνδυνος για λοίμωξη από υψηλού κινδύνου στελέχη.
- Συσχέτιση του βαθμού δυσπλασίας, της παρουσίας του HPV ιού και της ανοσοϊστοχημικής χρώσης για την p16 πρωτεΐνη ανέδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ βαθμού δυσπλασίας και θετικής χρώσης για το p16 ( $p<0,05$ ).
- Η πλειοψηφία των γυναικών με HGSIL αλλοιώσεις παρουσιάζει θετική χρώση p16 διάχυτου τύπου (pattern C).
- Υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση της διάχυτης χρώσης p16 (pattern C), τόσο με την παρουσία πολλαπλών HPV λοιμώξεων ( $p=0,005$ ), όσο και με την παρουσία των υψηλού κινδύνου στελεχών 16 και 18 ( $p=0,015$ ).
- Σύγκριση του βαθμού δυσπλασίας, της παρουσίας του HPV ιού και της ανοσοϊστοχημικής χρώσης για την κυκλίνη-B1 ανέδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ βαθμού δυσπλασίας και θετικής χρώσης για το p16 ( $p<0,05$ ).
- Επιπλέον, αναδείχθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των πολλαπλών HPV λοιμώξεων και της θετικής χρώσης για κυκλίνη-B1 (patterns B+C) ( $p=0,04$ ), ενώ η

παρουσία των υψηλού κινδύνου στελεχών 16 και 18 σε σχέση με την θετική χρώση για την κυκλίνη B1 δεν παρουσιάζει στατιστικά σημαντική συσχέτιση ( $p=0,105$ ).

- Ταυτόχρονη μελέτη του βαθμού δυσπλασίας, της παρουσίας του HPV ιού και της ανοσοϊστοχημικής χρώσης για τον δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού MIB-1, ανέδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ βαθμού δυσπλασίας και της θετικής χρώσης για τον MIB-1 δείκτη ( $p<0,05$ ).
- Η θετική χρώση για τον δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού MIB-1 κατά 1/3 παρουσιάζει στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την παρουσία απλών HPV λοιμώξεων ( $p=0,001$ ).
- Δεν αναδεικνύεται στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της θετικής χρώσης για τον MIB-1 δείκτη και της παρουσίας των υψηλού κινδύνου στελεχών 16, 18 του HPV ιού ( $p=0,085$ ).
- Συνοψίζοντας, η εφαρμογή διαφορετικών μοριακών μεθοδολογικών προσεγγίσεων, σε συνδυασμό με τη γεωγραφική ετερογένεια που παρατηρείται παγκοσμίως ως προς την κατανομή των HPV στελεχών και τον υποβοηθητικό ρόλο που φέρουν οι ανοσοϊστοχημικές χρώσεις για τους δείκτες p16, κυκλίνη-B1 και MIB-1, συμπεραίνουμε ότι η μορφολογία παραμένει “Gold Standard” στην αξιολόγηση των ιστολογικών αλλοιώσεων συμβάλλοντας στην αποτελεσματική αντιμετώπιση και θεραπευτική αντιμετώπιση των γυναικών.



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας είναι η δεύτερη πιο συχνή μορφή καρκίνου που εμφανίζεται στις γυναίκες παγκοσμίως. Η εμμένουσα λοίμωξη από στελέχη υψηλού κινδύνου του ιού HPV (HR-HPV) αποτελεί την κύρια αιτία. Η διαδικασία της ογκογένεσης που προκαλείται από τον HPV συνδέεται με καθορισμένα στάδια, με μοναδικά χαρακτηριστικά το καθένα. Τα στελέχη υψηλού κινδύνου βρίσκονται σε ποσοστό πάνω από 99% στους καρκίνους του τραχήλου της μήτρας και στην πλειονότητα των περιπτώσεων ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας υψηλού βαθμού. Επομένως, εκτός από το τεστ Παπανικολάου, έχει προταθεί ότι η ανίχνευση του HPV μπορεί να είναι ένα χρήσιμο εργαλείο στην ταυτοποίηση των γυναικών που βρίσκονται σε κίνδυνο να αναπτύξουν καρκίνο του τραχήλου της μήτρας.

Τα τελευταία χρόνια η έρευνα επικεντρώνεται τόσο στην δημιουργία εμβολίων του ιού HPV, που είναι ζωτικής σημασίας για την πρόληψη του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, όσο και στον προσδιορισμό μοριακών δεικτών που θα χρησιμοποιηθούν ως πιθανά εργαλεία διαλογής στην πρώιμη ανίχνευση των πρόδρομων αλλοιώσεων στον τράχηλο της μήτρας. Η κατανομή των διαφόρων στελεχών του ιού παρουσιάζει γεωγραφική ετερογένεια και οι περισσότερες μελέτες αφορούν το στέλεχος 16 του ιού.

Στην παρούσα μελέτη εκτιμήθηκε η παρουσία της HPV λοίμωξης σε 134 γυναίκες που προσήλθαν στο τμήμα Κολποσκόπησης του Πανεπιστημιακού νοσοκομείου Λάρισας, με παθολογικό τεστ Παπανικολάου, το χρονικό διάστημα 2008-2010. Η πλειοψηφία των γυναικών συμπλήρωσε ερωτηματολόγιο που αφορούσε την ηλικία τους, το μορφωτικό τους επίπεδο, το κάπνισμα, προηγούμενη λοίμωξη από ιό HPV ή από χλαμύδια (*Chlamydia trachomatis*). Ακολούθησε η λήψη τραχηλικού επιχρίσματος και βιοψίας. Σε 11 γυναίκες δεν έγινε λήψη βιοψίας και επομένως οι γυναίκες αυτές αποκλείστηκαν από τη μελέτη. Ακολούθησε η ιστολογική διάγνωση των βιοψιών. Με βάση την ιστολογική διάγνωση αποκλείστηκαν επιπλέον 3 γυναίκες καθώς η ιστολογική διάγνωση έδειξε φλεγμονή και ελάχιστο ή ανύπαρκτο επιθήλιο, ενώ 2 ακόμη εξαιρέθηκαν από τη μελέτη, καθώς η βιοψία τους περιλάμβανε ενδοτραχηλικό βλεννογόνο. Κατόπιν, έγινε απομόνωση DNA και μοριακή ανάλυση των δειγμάτων με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Η περιοχή L1 του ιού ανιχνεύτηκε με τη χρήση PGMY εκκινητών. Ειδικοί εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν για τα στελέχη χαμηλού κινδύνου HPV 6,11 και για τα στελέχη υψηλού κινδύνου του HPV 16, 18, 31, 33. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημεία (IHC), προκειμένου να εκτιμηθεί το πρότυπο έκφρασης των δεικτών p16, κυκλίνης-B1 και MIB-1. Οι χρώσεις αυτές αποτελούν υποβοηθητικούς δείκτες στη εμμένουσα λοίμωξη από στελέχη υψηλού κινδύνου του ιού.

Η στατιστική ανάλυση του ερωτηματολογίου δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ( $p < 0,05$  θεωρείται στατιστικά σημαντική), για καμία από τις παραμέτρους που συμπεριλήφθηκαν εκτός του καπνίσματος. Αλλοιώσεις με υψηλόβαθμη δυσπλασία παρατηρήθηκαν με μεγαλύτερη συχνότητα στις καπνίστριες σε σχέση με τις μη καπνίστριες ( $p = 0,020$ ). Εντούτοις, σε μοντέλο πολλαπλής λογιστικής ανάλυσης, εκτιμώντας όλες τις παραμέτρους, το κάπνισμα εξακολουθεί να δρα συνεργατικά στη HPV λοίμωξη.

Με βάση την ιστολογική διάγνωση 87 γυναίκες εμφάνισαν LGSIL αλλοιώσεις, 28 γυναίκες εμφάνισαν HGSIL αλλοιώσεις ενώ 3 γυναίκες εμφάνισαν καρκίνο. Παρουσία του ιού HPV ανιχνεύτηκε σε ποσοστό 90,81% των LGSIL αλλοιώσεων (79/87 γυναίκες) Ο ιός HPV ανιχνεύτηκε σε όλες τις HGSIL αλλοιώσεις καθώς και σε όλα τα δείγματα με καρκίνο. Σε 110/118 περιστατικά (93,22%) παρατηρήθηκε θετικότητα για τον ιό. Στα θετικά δείγματα ακολούθησε τυποποίηση του ιού

Τόσο στις LGSIL αλλοιώσεις, όσο και στις HGSIL αλλοιώσεις τα πιο συχνά στελέχη του ιού που ανιχνεύτηκαν ήταν τα: 16, 18, 31 και 33. Τα στελέχη χαμηλού κινδύνου του ιού HPV 6, 11 ανιχνεύτηκαν σε πολλαπλές λοιμώξεις. Αξίζει να σημειωθεί η παρουσία του στελέχους HPV51 στις LGSIL αλλοιώσεις και του στελέχους HPV59 στις αλλοιώσεις HGSIL. Επίσης, εξετάσαμε τη συχνότητα των μονών και των πολλαπλών λοιμώξεων στα δείγματα μας. Στην παρούσα μελέτη σε ποσοστό 21% των LGSIL αλλοιώσεων παρατηρήθηκαν πολλαπλές λοιμώξεις, ενώ όσον αφορά τις HGSIL αλλοιώσεις, στις μισές περίπου παρατηρήθηκαν πολλαπλές λοιμώξεις.



Διαφορές ως προς τη συχνότητα μεταξύ μονών και πολλαπλών λοιμώξεων έχουν επισημανθεί, ανεξάρτητα από την άποψη ότι τόσο η γεωγραφική ετερογένεια, όσο και οι διαφορετικές μέθοδοι μπορεί να ευθύνονται ως προς αυτή τη κατεύθυνση. Πολλές λοιμώξεις παρατηρήθηκαν σε γυναίκες ηλικίας κάτω των 35 ετών.

Στη συνέχεια έγινε εκτίμηση των ανοσοϊστοχημικών δεικτών p16, κυκλίνης-B1 και MIB-1. Τα δείγματα που ανέδειξαν θετική χρώση p16 ταξινομήθηκαν σε 4 κατηγορίες (πρότυπο A, A low, B, C). Θετική χρώση για p16 παρατηρήθηκε στο 78,2% των LGSIL, στο 96,43% των HGSIL, καθώς και στους 3 καρκίνους. Ωστόσο παρατηρήθηκαν διαφορές στα πρότυπα έκφρασης, αφού στην πλειονότητα των LGSIL παρατηρήθηκε εστιακή χρώση για p16 (πρότυπο A, A low), ενώ διάχυτη χρώση (πρότυπο, B, C) παρατηρήθηκε στο 92,86% των HGSIL και στο 100% των καρκίνων.

Για την εκτίμηση της κυκλίνης-B1 τα δείγματα ταξινομήθηκαν σε 3 κατηγορίες (πρότυπο A, B, C). Το πρότυπο A χαρακτηρίστηκε αρνητικό, ενώ το πρότυπο B και C θετικό. Σε ποσοστό 94,07 % των δειγμάτων παρατηρήθηκε θετική χρώση για κυκλίνη-B1. Όλες οι HGSIL αλλοιώσεις και οι καρκίνοι ανέδειξαν πρότυπο B και C για την κυκλίνη-B1. Στις LGSIL αλλοιώσεις παρατηρήθηκε θετική χρώση σε ποσοστό 91,95% (80/87 γυναίκες). Η πλειονότητα των LGSIL αλλοιώσεων ανέδειξαν πρότυπο B, ενώ αντίστοιχα των HGSIL πρότυπο C.

Για την εκτίμηση του δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού MIB-1 τα δείγματα ταξινομήθηκαν σε 3 κατηγορίες (πρότυπο 1/3, 2/3, 3/3). Στις LGSIL αλλοιώσεις παρατηρήθηκε πρότυπο 1/3, ενώ η πλειονότητα των HGSIL αλλοιώσεων ανέδειξε πρότυπο 2/3 και 3/3. Όλοι οι καρκίνοι ανέδειξαν πρότυπο 3/3.

Η στατιστική ανάλυση των ανοσοϊστοχημικών αποτελεσμάτων έδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των δεικτών p16 (πρότυπο C), κυκλίνης-B1 (πρότυπο C) και MIB-1 (πρότυπο 3/3) και της δυσπλασίας υψηλού βαθμού (HGSIL cases) ( $p < 0,05$ ).

Συσχετίσεις μεταξύ της έκφρασης των ανοσοϊστοχημικών δεικτών p16, κυκλίνης-B1 και MIB-1 και της παρουσίας του ιού HPV μελετήθηκαν περαιτέρω. Η στατιστική ανάλυση ανέδειξε σημαντική συσχέτιση μεταξύ διάχυτης χρώσης p16, (πρότυπο C) και πολλαπλής λοίμωξης ( $p = 0,005$ ), καθώς με το στέλεχος HPV16 ( $p = 0,015$ ). Η συσχέτιση κυκλίνης-B1 (πρότυπο B, C) και πολλαπλής λοίμωξης έδειξε ανάλογα αποτελέσματα ( $p = 0,04$ ). Δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στην κυκλίνη-B1 και στα στελέχη υψηλού κινδύνου όπως των HPV 16, HPV18 ( $p = 0,105$ ). Τελικά το πρότυπο 1/3 της χρώσης MIB-1 παρατηρήθηκε ως επί το πλείστον στις μονές λοιμώξεις ( $p = 0,001$ ) και δεν παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ του MIB-1 B1 και στα στελέχη υψηλού κινδύνου όπως των HPV 16, HPV18 ( $p = 0,085$ ). Ωστόσο η αξιολόγηση περισσότερων περιπτώσεων είναι αναγκαία.

Συμπερασματικά, οι ανοσοϊστοχημικοί δείκτες p16, κυκλίνη-B1 και MIB-1 φαίνεται να έχουν υποβοηθητικό ρόλο στην ιστολογική διάγνωση που παραμένει το "gold standard" στην αξιολόγηση των αλλοιώσεων του τραχήλου της μήτρας, έτσι ώστε οι ασθενείς να λαμβάνουν την κατάλληλη θεραπεία.

## SUMMARY

Cervical cancer is the second most common type of cancer in women worldwide. High-risk human papillomavirus (HR-HPV) persistent infection is the main causative agent. The HPV-induced process of tumorigenesis is associated with well-defined clinical stages, each with unique features. HR-HPV types are present in over than 99% of cervical cancers and in the vast majority of cases with high grade cervical intraepithelial neoplasia. Therefore, it has been suggested that HPV detection might be a useful tool in identification of women who are at risk to develop cervical cancer, in addition to Pap smears.

In recent years, research is being focused on both the development of HPV vaccines crucial for the prevention of cervical disease and the identification of molecular markers to be used as potential screening tools in the early detection of cervical cancer precursors. HPV type distribution presents geographical heterogeneity and most of the studies are related to HPV 16 type.

Therefore, in our study we evaluated the prevalence of HPV infection among 134 Greek women with Pap test abnormalities, who visited the external colposcopy clinic of the University General Hospital of Larissa between 2008 and 2010. The majority of the women completed a questionnaire about their age, educational level, smoking habits, previous abnormal Pap test or previous infection from HPV virus or Chlamydia trachomatis. Both cervical smears and biopsies were collected. A biopsy sample was not collected from 11 women, thus they were excluded from the study. Biopsies were histological diagnosed and 3 women diagnosed with inflammation and 2 more having only endocervical mucosa in their biopsy were further excluded. Biopsies and cervical smears were further analyzed for HPV presence. DNA was extracted and PCR amplification was performed. A specific L1 HPV region was amplified with consensus PGMY primer set. Specific primers for low-risk HPV types 6, 11 and high-risk HPV types 16, 18, 31 and 33 were also used. Immunohistochemistry (IHC) was also performed in order to evaluate expression patterns of p16, cyclin B1 and MIB-1 markers. These cellular proteins are thought to be surrogate biomarkers for persistent infection with high-risk HPV viruses.

Statistical analysis of the questionnaires did not reveal significant associations ( $p < 0.05$  was considered statistically significant) for any of the parameters included except for smoking habits. High grade dysplasia lesions were much more frequent in smokers than non smokers ( $p=0,020$ ). However, in a multiple logistic regression model, evaluating all parameters, smoking cease to be statistically important, supporting its synergistic action to the existing HPV infection.

Based on histological diagnosis 87 women had low grade squamous intraepithelial lesion (LGSIL), 28 women showed high grade squamous intraepithelial lesion (HGSIL) and 3 women had cancer. HPV virus was present in 90,81% of LGSIL samples (79/87 women). HPV was present in all HGSIL and cancer cases. 110/118 samples (93,22%) were HPV positive. Positive samples were further analyzed for HPV typing.

In both LGSIL and HGSIL biopsies the most common HPV types were 16, 18, 31 and 33. Low-risk 6, 11 HPV types were also present at multiple infections. It is worth mentioning that HPV51 was present in LGSILs, while HPV59 was more frequent in HGSIL cases. We also examined the frequency of simple and multiple HPV infections in our samples. In our study, 21% of LGSIL cases showed multiple infections, while in HGSIL cases almost half of them had multiple HPV infection. Differences in the frequencies of simple and multiple HPV infections have been mentioned before suggesting that both geographical heterogeneity and different methodological approaches could be responsible. Multiple HPV infections are more frequent in women aged less than 35 years old.

Immunohistochemistry was performed for p16, cyclin-B1 and MIB-1 evaluation. Samples positive for p16 staining were classified in four groups (patterns A, A low, B, C). 78,2% of LGSIL and 96,43% of HGSIL cases and all 3 of the cancers showed positive p16 staining. However, there were differences in the expression patterns, since the majority of LGSIL cases showed focal p16 staining (A, A low patterns), while diffuse staining (patterns B, C) was present in 92,86% of HGSIL cases and in 100% of cancers.

Samples were classified in three groups (patterns A, B, C) for cyclin-B1 evaluation. Pattern A was characterized as negative, while patterns B, C were characterized as positive. 94,07% of the samples showed positive staining for cyclin- B1. All HGSIL cases and cancers showed B and C patterns for cyclin-B1. In LGSIL cases, positive staining for cyclin-B1 was present in 91,95% (80/87 women). The majority of LGSIL cases showed pattern B, while the majority of HGSIL cases showed pattern C.

For MIB-1 staining evaluation, samples were also classified in three groups (patterns 1/3, 2/3, 3/3). LGSIL cases presented mostly pattern 1/3, while the majority of HGSIL cases presented patterns 2/3 and 3/3. All 3 cancers showed pattern 3/3 for MIB-1 staining.

Statistical analysis of the results obtained by immunohistochemistry showed significant correlations between p16 (pattern C), cyclin-B1 (pattern C) and MIB-1 (pattern 3/3) staining and the degree of dysplasia (HGSIL cases) ( $p < 0,05$ ).

Correlations between p16, cyclin-B1 and MIB-1 protein expression patterns with HPV presence were further evaluated. Statistical analysis revealed significant correlation between diffuse p16 staining (pattern C) and multiple HPV infection ( $p = 0,005$ ), as well as with HPV16 type ( $p = 0,015$ ). Correlation between cyclin-B1 staining (patterns B, C) and multiple HPV infection showed analogous results ( $p = 0,04$ ). There was no significant correlation for cyclin B1 staining and high-risk HPV types such as HPV16, HPV18 ( $p = 0,105$ ). Finally, MIB-1 pattern 1/3 was present mostly in simple infections ( $p = 0,001$ ) and there was no significant correlation between MIB-1 immunostaining and high-risk HPV16 and HPV18 types ( $p = 0,085$ ). However, evaluation in a larger group is needed.

In conclusion, immunostaining for p16, cyclin-B1 and MIB-1 seems to have a supportive role in histological diagnosis which remains the “gold standard” in the evaluation of cervical lesions so that patients receive appropriate treatment.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abban Cy., Meneses P.I. Usage of heparin sulfate, integrins, and FAK in HPV16 infection. *Virology* 2010, 403; 1–16
- Abbate EA., Voitenleitner C., Botchan MR. Structure of the papillomavirus DNA-tethering complex E2:Brd4 and a peptide that ablates HPV chromosomal association. *Mol Cell*. 2006. 24; 877-89
- Abramson AL., Nouri M, Mullooly V, Fisch G, Steinberg BM. Latent human papillomavirus infection is comparable in the larynx and trachea. *J. Med. Virol.* 2004. 72; 473-7
- Ades S., Koushik A, Duarte-Franco E, Mansour N, Arseneau J, Provencher D, Gilbert L, Gotlieb W, Ferenczy A, Coutlée F, Roger M, Franco EL. Biomarkers of Cervical Cancer Risk (BCCR) Study Team. Selected class I and class II HLA alleles and haplotypes and risk of high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Int. J. Cancer* 2008. 122; 2820-6
- Agoff SN, Lin P, Morihara J, Mao C, Kiviat NB, Koutsky LA. p16 INK4a expression correlates with degree of cervical neoplasia: a comparison with Ki-67 expression and detection of high-risk HPV types. *Mod. Pathol.* 2003. 16; 665-73
- Agorastos T., Chatzistamatiou K., Katsamagkas T., Koliopoulos G., Daponte A., Constantinidis T., Constantinidis T.C., and the HERMES study group. Primary Screening for Cervical Cancer Based on High-Risk Human Papillomavirus (HPV) Detection and HPV 16 and HPV 18 Genotyping, in Comparison to Cytology. *PLoS ONE* 10 (3): e0119755, 2015
- Angeletti PC., Kim K., Fernandes FJ., Lambert PF. Stable replication of papillomavirus genomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Virol.* 2002. 76; 3350-8
- Antson AA., Burns JE., Moroz OV., Scott DJ., Sanders CM., Bronstein IB., Dodson GG., Wilson KS., Maitland NJ. Structure of the intact transactivation domain of the human papillomavirus E2 protein. *Nature*. 2000. 403; 805-9
- Arafa, M., Boniver J., Delvenne P. Detection of HPV-induced cervical (pre) neoplastic lesions: a tissue microarray (TMA) study. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 2008. 16; 422-32
- Arbyn M. Buntinx F, Van Ranst M, Paraskevaidis E, Martin-Hirsch P, Dillner J. Virologic versus cytologic triage of women with equivocal PAP smears: a meta-analysis of the accuracy to detect high-grade intraepithelial neoplasia. *J. Natl. Cancer. Inst.* 2004. 96; 280-93

- Arbyn M., Paraskevidis E, Martin-Hirsch P, Prendiville W, Dillner J. Clinical utility of HPV-DNA detection: triage of minor cervical lesions, follow-up of women treated for high-grade CIN: an update of pooled evidence. *Gynecol. Oncol.* 2005. 99; 7-11
- Arbyn M., Sasieni P, Meijer CJ, Clavel C, Koliopoulos G, Dillner J. Chapter 9: Clinical applications of HPV testing : a summary of meta analyses. *Vaccine. Review.* 2006.24S3:S3/78-S3/89
- ASCUS-LSIL Triage Study Group. Results of a randomized trial on the management of cytology interpretations of atypical squamous lesions, follow-up of women treated for high-grade CIN. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2003. 188; 1383-92,
- Ashrafi GH., Haghshenas M, Marchetti B, Campo MS. E5 protein of human papillomavirus 16 downregulates HLA class I and interacts with the heavy chain via its first hydrophobic domain.*Int. J. Cancer* 2006.119; 2105-12
- Badaracco G. Venuti A, Sedati A, Marcante ML. HPV16 and HPV18 in genital tumors: Significantly different levels of viral integration and correlation to tumor invasiveness. *J. Med. Virol.* 2002.67; 574-82
- Baldwin P, Laskey R, Coleman N. Translational approaches to improving cervical screening. *Nat. Rev.Cancer.* 2003. 3; 217-26
- Banerjee NS.,Genovese NJ., Noya F. Chien WM.,Broker TR.,Chow LT. Conditionally activated E7 proteins of low- and high- risk human papillomaviruses induce S phase in postmitotic , differentiated human keratinocytes. *J. Virol.* 2006, 80; 6517-24
- Barbosa MS.,Edmonds C, Fisher C, Schiller JT, Lowy DR, Vousden KH. The region of the HPV E7 oncoprotein homologous to adenovirus E1a and Sv40 largeT antigen contains separate domains for Rb binding and casein kinase II phosphorylation. *EMBO. J.* 1990. 9; 153-60
- Baseman J.,Koutsky LA. The epidemiology of human papillomavirus infections .*J. of Clin.Virol. Review.*2005.32S; 16-24
- Bastien N.,McBride AA. Intreraction of the papillomavirus E2 protein with mitotic chromosomes. *Virology.* 2000. 270; 124-34
- Bellanger S.,Blachon S.,Mechali F., Bonne Andrea C.,Thierry F.High-risk but not low-risk HPV E2 proteins bind to the APC activators Cdh1 and Cdc20 and cause genomic instability. *Cell Cycle.* 2005.4;1608-15
- Benevolo M.,Mottolese M, Marandino F, Vocaturo G, Sindico R, Piperno G, Mariani L, Sperduti I, Canalini P, Donnorso RP, Vocaturo A. Immunohistochemical expression of

p16INK4a is predictive of HR-HPV infection in cervical low –grade lesions. *Mod. Pathol.* 2006.19; 384-89

- Bergant M.,Banks L. SNX17 facilitates infection with diverse papillomavirus types. *J.Virol.* 2013.87;1270–73.
- Bergant MM, Ozbun MA, Campos SK, Myers MP, Banks L. Human papillomavirus L2 facilitates viral escape from late endosomes via sorting nexin 17. *Traffic.* 2012. 13, 455–67.
- Bienkowska-Haba M, Patel HD, Sapp M. Target cell cyclophilins facilitate human papillomavirus type 16 infection. *PLoS pathog.* 2009. 5,e1000524.
- Bienkowska-Haba M.,Williams C, Kim SM, Garcea RL, Sapp M..Cyclophilins facilitate dissociation of the human papillomavirus type 16 capsid protein L1 from the L2/DNA complex following virus entry. *J.Virol.* 2012. 86, 9875–87
- Bischof O, Nacerddine K., Dejean A. Human papillomavirus oncoprotein E7 targets the promyelocytic leukemia protein and circumvents cellular senescence via the Rb and p53 tumor suppressor pathways. *Mol. Cell. Biol.* 2005. 25; 1013-24
- Bleeker M, Hogewoning CJ, Voorhorst FJ, van den Brule AJ, Snijders PJ, Starink TM, Berkhof J, Meijer CJ. Condom use promotes regression of human papillomavirus – associated penile lesions in male sexual partners of women with cervical intraepithelial neoplasia. *Int. J.Cancer.* 2003. 107; 804-10
- Bodily J., Laimins LA. Persistence of human papillomavirus infection: keys to malignant progression. *Trends Microbiol.* 2011. 19; 33-39
- Bontkes HJ., deCruijl TD., Bijl A., Verheijen RH., Meijer CJ., Scheper RJ.,Stern PL., Burns JE., Maitland NJ. Walboomers JM.,Human papillomavirus type 16E2-specific T- helper lymphocyte responses in patients with cervical intraepithelial neoplasia *J.Gen. Virol.* 1999. 80; 2453-59
- Boon ME., Kleinschmidt-Guy ED, Wijsman-Grootendorst A, Hoogeveen MM. Upgrading unsatisfactory cervical smears with the MiB-1 method. *Diag. Cytopathol.* 1996.15; 270-76
- Bosch FX. Lorincz A, Munoz N, Meijer CJLM, Shah KV. The causal between human papillomavirus and cervical cancer. *J. Clin. Pathol.* 2002. 55; 244-65
- Bosch FX., Burchell AN.,Schiffman M.,Giullano AR., de Sanjose S., Bruni L., Tortolero-Luna G.,Kjaer SK.,Munoz N. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. *Vaccine.* 2008.26 (suppl.10):K1-K16
- Bosch FX.,Manos MM, Muñoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman MH, Moreno

V, Kurman R, Shah KV. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer : a worldwide perspective J. Natl. Cancer Inst. 1995. 87; 796-802

- Bosch X.,Harper D. Prevention strategies of cervical cancer in the HPV vaccine era. Gynecol. Oncol. 2006.103; 21-24
- Boulet GA.,Horvath CA, Berghmans S, Bogers J. Human papillomavirus in cervical cancer screening: Important role as biomarker. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. Minireview.2008.17; 810-17
- Bouvard V., Storey A, Pim D, Banks L. Characterization of the human papillomavirus E2 protein: evidence of trans-activation and trans-repression in cervical keratinocytes. EMBO. J. 1994. 13; 5451- 59
- Boyer SN.,Wazer DE., Band V. E7 protein of human papillomavirus16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin- proteasome pathway. Cancer Res.1996. 56;4620-24
- Branca M.,Ciotti M, Santini D, Di Bonito L, Giorgi C, Benedetto A, Paba P, Favalli C, Costa S, Agarossi A, Alderisio M, Syrjänen K. p16INK4a expression is related to grade of CIN and high-risk human papillomavirus but does not predict virus clearance after conization or disease outcome. Int J.Gynecol. Pathol. 2004. 23; 354-65
- Brehm A., Nielsen SJ., Miska EA., McCance DJ., Reid JL., Bannister AJ., Kouzarides T. The E7 oncoprotein associates with Mi2 and histone deacetylase activity to promote cell growth EMBO.J. 1999. 18; 2449-58
- Brimer N., Lyons C.,Vande Pol SB. Association of E6AP (UBE3A) with human papillomavirus type11 E6 protein. Virology. 2007.358;303-10
- Brown C.,Kowalczyk AM.,Taylor ER.,Morgan IM.,Gaston K. P53 represses human papillomavirus type 16 DNA replication via the viral E2 protein. Virol. J. 2008. 5; 5
- Bryan JT. Developing an HPV vaccine to prevent cervical cancer and genital warts. Vaccine. 2007.25; 3001-6
- Buck CB., Thompson CD., Pank YY., Lowy DR., Schiller JT. Maturation of papillomavirus capsids. J. Virol. 2005. 79;2839-46
- Buck CB.,Cheng N.,Thompson CD., Lowy DR., Steven AC.,Schiller JT.,Trus BL. Arrangement of L2 within the papillomavirus capsid. J. Virol. 2008. 82; 5190-97
- Buck CB.,Day PM, Trus BL.The papillomavirus major capsid protein L1.Virology 2013.445; 169-74



- Burger RA., Monk BJ, Kurosaki T, Anton-Culver H, Vasilev SA, Berman ML, Wilczynski SP. Human papillomavirus type 18: Association with poor prognosis in early stage cervical cancer. *J. Natl. Cancer Inst. Review.* 1996. 88; 1361-68,
- Butz K., Hoppe- Seyler F. Transcriptional control of human papillomavirus (HPV) oncogene expression: composition of the HPV type 18 upstream regulatory region. *Viol.* 1993.67; 6476-86.
- Caberg JH., Hubert PM, Begon DY, Herfs MF, Roncarati PJ, Boniver JJ, Delvenne PO. Silencing of E7 oncogene restores functional E-cadherin expression in human papillomavirus 16- transformed keratinocytes. *Carcinogenesis* 2008. 29;1441-7.
- Campisi J., Kim SH., Lim CS., Rubio M. Cellular senescence, cancer and aging: the telomere connection. *Exp. Gerontol.* 2001. 36; 1619-37
- Castellaugué X. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecol. Oncol.* 2008, 110; 4-7
- Castellaugué X., Bosch FX., Munoz N., Meijer CJ., de Sanjose S., Eluf-Neto J., Nqelangel CA., Chichareon S., Smith JS., Herrero R., Moreno V., Franceschi S. International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Male circumcision , penile human papilloma virus infection and cervical cancer in female partners. *N. Engl. J. Med.* 2002, 346; 1105-12
- Castellaugué X., Bosch FX., Munoz N. The male role in cervical cancer. *Salud. Publica. Mex.* 2003, 45; suppl. 3, 345-53
- Castellsague X., Iftner T, Roura E, Vidart JA, Kjaer SK, Bosch FX, Muñoz N, Palacios S, San Martin Rodriguez M, Serradell L, Torcel-Pagnon L, Cortes J; CLEOPATRE Spain Study Group. Prevalence and genotype distribution of human papillomavirus infection of the cervix in Spain: The Cleopatre study. *J. Med. Virol.* 2012. 84; 947-56
- Castellsague X., Muñoz N. Chapter 3: Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis role of parity , oral contraceptives and tobacco smoking. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr. Review.* 2003 . 31; 20-28
- Castle PE., Jeronimo J, Schiffman M, Herrero R, Rodríguez AC, Bratti MC, Hildesheim A, Wacholder S, Long LR, Neve L, Pfeiffer R, Burk RD. Age- related changes of the cervix influence human papillomavirus type distribution. *Cancer. Res.* 2006.66;1218-24
- Castle PE., Gage JC., Wheeler CM., Schiffman M. The clinical meaning of a cervical intraepithelial neoplasia grade 1 biopsy. *Obstet. and Gynecol.* 2011. 118; 1222-9
- Cavalcante DM., Linhares IM, Pompeu MM, Giraldo PC, Eleutério J. The utility of p16 INK4a

and Ki-67 to identify high-grade squamous intraepithelial lesion in adolescents and young women. *Indian J. Pathol. Microbiol.* 2012. 55; 339-42

- Ceballos KM., Chapman W., Daya D., Julian JA., Lytwyn A., McLachlin CM., Elit L. Reproducibility of the histological diagnosis of cervical dysplasia among pathologists from 4 continents *Int. J. of Gynecol. Pathol.* 2007. 27; 101-7
- Chan JK., Berek JS. Impact of the human papillomavirus vaccine on cervical cancer. *J. Clin. Oncol. Review.* 2007. 25; 2975-82
- Chang JL., Tsao YP., Liu DW., Huang SJ., Lee WH., Chen SL. The expression of HPV 16 – E5 protein in squamous neoplastic changes in the uterine cervix. *J. Biomed. Sci.* 2001. 8; 206- 13
- Chatzistamatiou K., Katsamagas T., Zafrakas M., Zachou K., Orologa A., Fitsiou F., Theodoridis T., Konstantinidis T., Konstantinidis TC., Agorastos Th. Smoking and genital human papilloma virus infection in women attending cervical cancer screening in Greece. *World J Obstet Gynecol.* 2013. 2; 53-61
- Chen CA., Liu CY, Chou HH., Chou CY, Ho CM., Twu NF., Kan YY., Chuang MH., Chu TY & Hsieh CY. The distribution and differential risks of human papillomavirus genotypes in cervical preinvasive lesions: a Taiwan Cooperative Oncologic Group Study, *Int J Gynecol Cancer* 2006, 16, 1801–8
- Chen, XS. Garcea RL, Goldberg I, Casini G, Harrison SC. Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papilloma- virus 16. *Mol.Cell* 2000.5; 557–567.
- Cho NH.,Kang S, Hong S, An HJ, Choi YH, Jeong GB, Choi HK. Elevation of cyclin B1, active cdc2 and HuR in cervical neoplasia with human papillomavirus type 18 infection.*Cancer Lett.* 2006. 232;170-78
- Christal JL, Valente PT. The utility of p16 immunohistochemistry in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Pathol. Case. Rev.* 2006. 11; 117-20
- Christensen ND., Cladel NM, Reed CA, Budgeon LR, Embers ME, Skulsky DM, McClements WL, Ludmerer SW, Jansen KU. Hybrid papillomavirus L1 molecules assemble into virus-like particles that reconstitute conformational epitopes and induce neutralizing antibodies to distinct HPV types. *Virology.* 2001. 291; 324-34
- Cina SJ.,Richardson MS, Austin RM, Kurman RJ. Immunohistochemical staining for Ki-67 antigen, carcinoembryonic antigen, and p53 in the differential diagnosis of glandular lesions of the cervix. *Mod. Pathol.* 1997. 10; 176-80

- Cladel NM, Reed CA, Budgeon LR, Embers ME, Skulsky DM, McClements WL. Hybrid papillomavirus L1 molecules assemble into virus-like particles that reconstitute conformational epitopes and induce neutralizing antibodies to distinct HPV types. *Virology*. 2001;291; 324–34.
- Cobo F., Concha A., Ortiz M. Human papillomavirus (HPV) type distribution in females with abnormal cervical cytology. A correlation with histological study. *Open. Virol. J.* 2009. 3; 60-66
- Cobrinik D. Pocket proteins and cell cycle control. *Oncogene*. 2005. 24; 2796-809
- Conesa-Zamora P., Doménech-Peris A, Orantes-Casado FJ, Ortiz-Reina S, Sahuquillo-Frías L, Acosta-Ortega J, García-Solano J, Pérez-Guillermo M. Effect of human papillomavirus on cell cycle-related proteins p16, Ki-67, Cyclin D1, p53, and ProEx C in precursor lesions of cervical carcinoma: a tissue microarray study. *Am J Clin Pathol*. 2009. 132; 378-90.
- Cox JT. History of the use of HPV testing in cervical screening and in the management of abnormal cervical screening results. *J. Clin. Virol.* 2009. S1(45) S3 S12
- Crook T., Fisher C., Masterson PJ., Vousden KH. Modulation of transcriptional regulatory properties of p53 by HPV E6. *Oncogene*. 1994. 9; 1225-30
- Cullen AP., Reid R., Campion M., Lorincz AT. Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. *J. Virol* 1991;65; 606-12
- Culp, TD., Spatz CM, Reed CA, Christensen ND.. Binding and neutralization efficiencies of monoclonal antibodies, Fab fragments, and scFv specific for L1 epitopes on the capsid of infectious HPV particles. *Virology*. 2007;361; 435–46
- Cuzick J., Arbyn M., Sankaranarayanan R., Tsu V., Mayrand MH., Dillner J., Meijer CJ. Overview of human papillomavirus- based and other novel options for cervical cancer screening in developed and developing countries. *Vaccine* 2008;26S; 29-41.
- Dao LD., Duffy A., Van Tine BA., Wu SY., Chianq CM., Broker TR., Chow LT. Dynamic localization of the human papillomavirus type 11 origin binding protein E2 through mitosis while in association with the spindle apparatus. *J. Virol*. 2006. 80; 4792-4800
- Davidson EJ., Brown MD., Burt DJ., Parish JL. Gaston K., Kitchener HC., Stacey SN., Stern PL. Human T cell responses to HPV 16 E2 generated with monocyte – derived dendritic cells. *Int. J. Cancer* 2001. 94; 807-12
- Davies P. Arbyn M, Dillner J, Kitchener HC, Meijer CJ, Ronco G, Hakama M. A report on

the current status of European research on the use of human papillomavirus testing for primary cervical cancer screening. *Int. J. Cancer. Review.* 2005. 118; 794-96

- Davy CE., Jackson DJ., Rai K., Peh WL., Southern SA., Das P., Sorathia R., Laskey P., Middleton K., Nakahara T., Wang Q., Masterson PJ., Lambert PF., Cuthill S., Millar JB., Doorbar J. Human papillomavirus Type 16 E1<sup>E4</sup> – induced G2 arrest is associated with cytoplasmic retention of active Cdk1/Cyclin B1 complexes. *J. Virol.* 2005. 79; 3998-4011
- Davy Vanden Broeck Human Papillomavirus and Related Diseases- From Bench to Bedside – A Clinical Perspective. Chapter.1. Human Papillomavirus : Biology and Pathogenesis. 2012. 3-40
- Davy, CE., Jackson DJ, Wang Q, Raj K, Masterson PJ, Fenner NF, Southern S, Cuthill S, Millar JB, Doorbar J. Identification of a G(2) arrest domain in the E1<sup>E4</sup> protein of human papillomavirus type 16. *J. Virol.* 2002. 76; 9806–18
- Dawson DF., Duckworth JK, Bernhardt H, Young JM. Giant condyloma and verrucous carcinoma of the genital area. *Arch. Pathol.* 1965. 79; 225-31.
- Day P.M. Lowy DR, Schiller JT. Papillomaviruses infect cells via a clathrin- dependent pathway. *Virology.* 2003. 307; 1–11
- Day P.M., Thompson CD, Schowalter RM, Lowy DR, Schiller JT. Identification of a role for the trans-golgi net work in human papillomavirus 16 pseudovirus Infection. *J. Virol.* 2013. 87; 3862–70
- Day, PM., Gambhira R, Roden RB, Lowy DR, Schiller JT. Mechanisms of human papillomavirus type 16 neutralization by I2 cross-neutralizing and I1 type-specific antibodies. *J. Virol.* 2008a 82; 4638–46
- de Prat-Gay G., Gaston K., Cicero DO. The papillomavirus E2 DNA binding domain. *Front. Biosci.* 2008. 13; 6006-21
- de Sanjose S., Quint WG, Alemany L, Geraets DT, Klaustermeier JE, Lloveras B, Tous S, Felix A, Bravo LE, Shin HR, Vallejos CS, de Ruiz PA, Lima MA, Guimera N, Clavero O, Alejo M, Llombart-Bosch A, Cheng-Yang C, Tatti SA, Kasamatsu E, Iljazovic E, Odida M, Prado R, Seoud M, Grce M, Usubutun A, Jain A, Suarez GA, Lombardi LE, Banjo A, Menéndez C, Domingo EJ, Velasco J, Nessa A, Chichareon SC, Qiao YL, Lerma E, Garland SM, Sasagawa T, Ferrera A, Hammouda D, Mariani L, Pelayo A, Steiner I, Oliva E, Meijer CJ, Al-Jassar WF, Cruz E, Wright TC, Puras A, Llave CL, Tzardi M, Agorastos T, Garcia-Barriola V, Clavel C, Ordi J, Andújar M, Castellsagué X, Sánchez GI, Nowakowski AM, Bornstein J, Muñoz N, Bosch FX; Retrospective International Survey and HPV Time Trends Study Group. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical

cancer : a retrospective cross- sectional worldwide study. *Lancet. Oncol.* 2010. 11; 1048-56

- de Villiers EM., Fauquet C., Broker TR., Bernard HU., zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology. Minireview.* 2004, 324; 17-27,
- DeFilippis RA., Goodwin EC., Wu L., DiMaio D. Endogenous human papillomavirus E6 and E7 proteins differentially regulate proliferation, senescence and apoptosis in HeLa cervical carcinoma cells. *J. Virol.* 2003. 77; 1551-63
- Dell G., Wilkinson KW., Tranter R., Parish J., Leo BR., Gaston K. Comparison of the structure and DNA-binding properties of the E2 proteins from an oncogenic and non-oncogenic human papillomavirus. *J. Mol. Biol.* 2003. 334; 979-91
- Deng, SJ., Pearce KH, Dixon EP, Hartley KA, Stanley TB, Lobe DC, Garvey EP, Kost TA, Petty RL, Rocque WJ, Alexander KA, Underwood MR. Identification of peptides that inhibit the DNA binding, trans-activator, and DNA replication functions of the human papillomavirus type 11 E2 protein. *J. Virol.* 2004. 78; 2637-41
- Didlot-Rousseau MN., Nagot N, Costes-Martineau V, Vallès X, Ouedraogo A, Konate I, Weiss HA, Van de Perre P, Mayaud P, Segondy M; Yereon Study Group. Human papillomavirus genotype distribution and cervical squamous intraepithelial lesions among high-risk women with and without HIV-1 infection in Burkina Faso. *Br. J. Cancer.* 2006. 95; 355-62
- Dillner J., Arbyn M, Dillner L. Translational mini-review series on vaccines: monitoring of human papillomavirus vaccination. *Clin. Exp. Immunol. Review.* 2007. 148; 199-207
- Dimova DK., Dyson NJ. The E2F transcriptional network: old acquaintances with new faces. *Oncogene.* 2005. 24; 2810-26
- Ding DC., Chianq MH. Lai HC., Hsiung CA., Hsieh CY., Chu TY. Methylation of the long control region of HPV 16 is related to the severity of cervical neoplasia. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2009. 147; 215-20
- Ding, Q., Li, L., Whyte, P. Human papillomavirus 18E1<sup>E4</sup> protein interacts with cyclinA/CDK2 through an RXL motif. *Mol. Cell. Biochem.* 2013. 373; 29–40.
- Doorbar J. Molecular Biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin. Sci. [LOND].* 2006. 110; 525-41
- Doorbar J. Papillomavirus life cycle organization and biomarker selection. *Dis. Markers.* 2007. 23 ;297-313
- Doorbar J. Quint W., Banks L., Bravo IG., Stoler M., Broker TR., Stanley MA. The biology

and life –cycle of human papillomaviruses. *Vaccine. Review.* 2012. 30S; 55-70

- Doorbar J. The E4 protein; structure, function and patterns of expression. *Virology.* 2013. 445; 80-98
- Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *J. Clin. Virol. Review.* 2005. 32; S7-S15
- Doorbar J., Ely S, Sterling J, McLean C, Crawford L. Specific interaction between HPV- 16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature.* 1991.352;824-27
- Dowhanick JJ., McBride AA, Howley PM. Suppression of cellular proliferation by the papillomavirus E2 protein. *J. Virol.* 1995. 69; 7791-99
- Duensing S., Lee LY, Duensing A, Basile J, Piboonniyom S, Gonzalez S, Crum CP, Munger K. 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. 10002-7
- Duensing S.,Münger K. Centrosome abnormalities and genomic instability induced by human papillomavirus oncoproteins. *Prog. Cell Cycle. Res. Review.* 2003. 5; 383-91
- Dun AE, Ogilvie MM. Intracellular virus particles in human genital wart tissue. Observations on the ultrastructure of the epidermal layer. *J. Ultrastruct. Res.* 1968. 22; 282-95
- Dyson N., Guida P, Münger K, Harlow E. Homologous sequences in adenovirus E1A and human papillomavirus E7 proteins mediate interaction with the same set of cellular proteins. *J. Virol.* 1992.66; 6893-6902
- Dyson N., Howley PM., Munger K.,Harlow E. The human papilloma-virus 16-E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science.* 1989.243; 934-37
- Egawa N.,Nakahara T.,Ohno S.,Narisawa-Saito M.,Yugawa T.,Fujita M.,Yamato K.,Natori Y.,Kiyono T. The E1 protein of human papillomavirus type 16 is dispensable for maintenance replication of the viral genome. *J. Virol.* 2012. 86; 3276-83
- El Awady MK., Kaplan JB.,O' Brien SJ.,Burk PD. Molecular analysis of integrated human papillomavirus 16 sequences in the cervical cancer cell line SiHa. *Virology.* 1987. 159;389-98
- Fang L.,Budgeon LR., Doorbar J.,Briggs ER.,Howett MK. The human papillomavirus type 11E1-E4 protein is not essential for viral genome amplification. *Virology.* 2006. 351; 271-79.

- Fehrmann F., Laimins LA. Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. *Oncogene. Review.* 2003. 22; 5201-7
- Fehrmann F., Klumpp. DJ., Laimins LA. Human papillomavirus type 31 E5 protein supports cell cycle progression and activates late viral functions upon epithelial differentiation. *J. Virol.* 2003. 77; 2819-31
- Finnen RL., Erickson KD., Chen XS., Garcea RL. Interactions between papillomavirus L1 and L2 capsid proteins. *J. Virol.* 2003. 77; 4818-26
- Fletcher S. Histopathology of papilloma virus infection of the cervix uteri: the history, taxonomy, nomenclature and reporting of koilocytic dysplasias. *J. Clin. Pathol.* 1983. 36; 616-24
- Francis DA., Schmid SL, Howley PM. Repression of the integrated papillomavirus E6/E7 promoter is required for growth suppression of cervical cancer cells. *J. Virol.* 2000. 74; 2679-86
- Franco EL., Ferenczy A. Cervical cancer screening following the implementation of prophylactic human papillomavirus vaccination. *Future. Oncol. Review.* 2007. 3; 319—27
- Funk JO., Waga S., Harry JB., Espling E., Stillman B., Galloway DA. Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes Dev.* 1997. 11; 2090- 2100
- Gammoh. N., Grm HS., Massimi P., Banks L. Regulation of human papillomavirus type 16 E7 activity through direct protein interaction with the E2 transcriptional activator. *J. Virol.* 2006. 80; 1787-97
- Garcia – Alai MM., Gallo M., Salame M., Wetzler DE., McBride AA., Paci M., Cicero DO., de Prat- Gay G. Molecular basis for phosphorylation-dependent PEST- mediated protein turnover. *Structure.* 2006. 14; 309-19
- Garcia- Closas R., Castellsague X., Bosch X., Gonzalez CA The role of diet and nutrition in cervical carcinogenesis: A review of recent evidence. *Int. J. Cancer.* 2005. 117; 629-37
- Gardner HL., Kaufman RH. Tumors of the vulva and vagina Condylomata acuminata. *Clin Obst. Gynecol.* 1965. 8; 938-45
- Gariglio P., Gutierrez J., Cortes E., Vazquez J. The role of retinoid deficiency and estrogens as cofactors in cervical cancer. *Arch. Med. Res.* 2009. 40; 449-65
- Garzetti GG., Ciavattini A, De Nictolis M, Lucarini G, Goteri G, Romanini C, Biagini G. MIB-1 immunostaining in cervical intraepithelial neoplasia: prognostic significance in mild and

moderate lesions. *Gynecol. Obst. Invest.* 1996. 42; 261-66

- Genther SM., Sterling S., Duensing S., Munger K., Sattler C., Lambert PF. Quantitative role of human papillomavirus type 16 E5 gene during the productive stage of the viral life cycle. *J. Virol.* 2003. 77; 2832-42
- Ghittoni R., Accardi R., Hasan U., Gheit T., Sylla B., Tommasino M. The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human papillomaviruses. *Virus Genes.* 2010. 40; 1-13. feat. 71, 72
- Giarre M., Caldeira S., Malanchi I., Ciccolini F., Leao MJ., Tomassino M. Induction of pRb degradation by the human papillomavirus type 16 E7 protein is essential to efficiently overcome p16INK4a-imposed G1 cell cycle arrest. *J. Virol.* 2001. 75; 4705-12
- Girolglou T., Florin L., Schäfer F., Streeck RE, Sapp M. Human papilloma- virus infection requires cell surface heparin sulfate. *J. Virol.* 2001. 75; 1565–70
- Gissmann L., Pfister H., zur Hausen H. Human papilloma viruses. (HPV): characterization of four different isolates. *Virology.* 1977. 76; 569-80
- Gissmann L., de Villiers EM, zur Hausen H. Analysis of human genital warts ( condylomata acuminata) and other genital tumors for human papilloma virus type 6 DNA. *Int . J. Cancer.* 1982. 29; 143-46
- Goodwin EC., Naeger LK., Breiding DE., Androphy EJ., DiMaio D. Transactivation-competent bovine papillomavirus E2 protein is specifically required for efficient repression of human papillomavirus oncogene expression and for acute growth inhibition of cervical carcinoma cell lines. *J. Virol.* 1998 72; 3925-34
- Goodwin EC., DiMaio D. Repression of human papillomavirus oncogenes in HeLa cervical carcinoma cells causes the orderly reactivation of dormant tumor suppressor pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. 97; 12513-18
- Gravitt P. The knowns unknown of HPV natural history. *J. Clin. Invest. Review.* 2011. 121; 4593-9
- Gravitt PE., Peyton CL., Alessi TQ., Wheeler CM., Coutlée F., Hildesheim A., Schiffman MH., Scott DR., and Apple RJ. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J. Clin. Microbiol.* 2000. 38; 357–61
- Green KL., Brown C., Roeder GE., Southgate TD., Gaston K. A cancer cell-specific inducer of apoptosis. *Hum. Gene Ther.* 2007. 18; 547-61
- Green KL., Gaston K. Development of a topical protein therapeutic for human



papillomavirus and associated cancers. *BioDrugs*. 2006.20;209-18

- Grm HS.,Massimi P.,Gammoh N., Banks L. Crosstalk between the human papillomavirus E2 transcriptional activator and the E6 oncoprotein Oncogene. 2005. 24; 5149-64
- Hafner N., Driesch C.,Gajda M.,Jansen L.,Kirchmayr R.,Runnebaum IB.,Durst M. Integration of the HPV 16 genome does not invariably result in high levels of viral oncogene transcripts. *Oncogene*. 2008. 27;1610-17
- Hagensee ME., Koutsky LA, Lee SK, Grubert T, Kuypers J, Kiviat NB, Galloway DA. Detection of cervical antibodies to human papillomavirus type 16 (HPV-16) capsid antigens in relation to detection of HPV16 DNA and cervical lesions. *J. Infect.Dis.* 2000.181;1234-39
- Halbert CL.,Demers GW, Galloway DA. The E7 gene of human papillomavirus type 16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells. *J. Virol.* 1991. 65; 473-78
- Halbert CL.,Demers GW., Galloway DA. The E6 and E7 genes of human papillomavirus type 6 have weak immortalizing activity in human epithelial cells. *J. Virol.*1992. 66; 2125-34
- Hamid A. Brown C.,Gaston K. The regulation of cell proliferation by the papillomavirus early proteins.*Cell. Mol.Life. Sci. Review*. 2009. 66;1700-17
- Hariri J., Oster A. The negative predictive Value of p16INK4a to assess the outcome of cervical intraepithelial neoplasia 1 in the uterine cervix. *Int. J Gynecol Pathol*. 2007. 26; 223–8
- Harris SF., Botchan MR. Crystal structure of the human papillomavirus type 18 E2 activation domain *Science*. 1999. 284; 1673-77.
- Hawley-Nelson P., Vousden KH., Hubbert NL., Lowy DR., Schiller JT. HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize keratinocytes in situ. *EMBO J*. 1989. 8; 3905-10
- Herfs M.,Yamamoto Y, Laury A, Wang X, Nucci MR, McLaughlin-Drubin ME, Munger K, Feldman S, McKeon FD, Xian W, Crum CP. A discrete population of squamocolumnar junction cells implicated in the pathogenesis of cervical cancer.*Proc. Natl, Acad. Sci USA*. 2012.109;10516-21
- Ho Gy., Kadish AS, Burk RD, Basu J, Palan PR, Mikhail M, Romney SL. HPV16 and cigarette smoking as risk factors for high grade cervical intraepithelial neoplasia. *Int. J. Cancer* 1998. 78; 281-85
- Hogewoning CJ. Bleeker MC.,van de Brule AJ,Voorhorst FJ. Snijders PJ., Berkhof J.,Westenerd PJ., Meijer CJ. Condom use promotes regression of cervical intraepithelial neoplasia and clearance of human papillomavivirus: a randomized clinical trial. *Int.*

J.Cancer, 2003, 107; 811-6

- Hopman AH.,Kamps MA, Smedts F, Speel EJ, Herrington CS, Ramaekers FC. HPV in situ hybridization:impact of different protocols on the detection of integrated HPV. *Int. J. Cancer.* 2005.115;419-28
- Horner SM.,DeFilippisRA.,Manuelidis L.,DiMaio D. Repression of the human papillomavirus E6 gene initiates p53- dependent,telomerase independent senescence and apoptosis in HeLa cervical carcinoma cells *J. Virol.* 2004. 78; 4063-73
- Hoshikawa S.,Sano T, Yoshida T, Ito H, Oyama T, Fukuda T. Immunohistological analysis of HPV L1 capsid protein and p16 protein in low grade dysplastic lesions of the uterine cervix. *Pathol- Res.Pract.* 2010. 206; 816-20
- Howie HL., Katzenellenbogen RA., Galloway DA. Papillomavirus E6 proteins. *Virology.* 2009.384;324-34
- Hughes FJ. Romanos MA. E1 protein of human papillomavirus is a DNA helicase/ATPase. *Nucleic Acids.Res.* 1993. 21; 5817-23
- Hussain SK, Madeleine MM, Johnson LG, Du Q, Malkki M, Wilkerson HW, Farin FM, Carter JJ, Galloway DA, Daling JR, Petersdorf EW, Schwartz SM. Cervical and vulvar cancer risk in relation to the joint effects of cigarette smoking and genetic variation in interleukin 2. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008. 17; 1790-99
- Hwang SJ., Shroyer KR. Biomarkers of cervical dysplasia and carcinoma. *J. Oncol.* 2012. 9 doi:10.1155/2012/507286
- Hwang ES., Riese DJ., Settleman J. Nilson LA., Honig J., Flynn S., DiMaio D. Inhibition of cervical carcinoma cell line proliferation by the introduction of a bovine papillomavirus regulatory gene. *J. Virol.*1993.67; 3720-29
- Hyland PL., McDade SS., McCloskey R, Dickson GJ., Arthur K., McCance DJ., Patel D. Evidence for alteration of EZH2, BMI1 and KDM6A and epigenetic reprogramming in human papillomavirus type 16E6/E7-expressing keratinocytes. *J. Virol.* 2011. 85; 10999-1006
- Insigna RP., Perez G.,Wheeler CM., Koutsky LA.,Garland SM.,Leodolter S., Joura EA., Ferris DG.,Steben M.,Brown DR.,Elbasha EH.,Paavonen J.,Haupt RM; FUTURE I Investigators. Incidence, duration and reappearance of type specific cervical human papillomavirus infections in young women. *Cancer.Epidemiol. Biomarkers Prev.*2010.19;1585-94
- Isaacson Wechsler E.,Wang Q.,Roberts I,Pagliarulo E.,Jackson D.,Untersperger C.,

Coleman N., Griffin H, Doorbar J. Reconstruction of human papillomavirus type 16-mediated early-stage neoplasia implicates e6/e7 deregulation and the loss of contact inhibition in neoplastic progression. *J. Virol.* 2012. 86; 6358-64

- Jenkins D. Histopathology and cytopathology of cervical cancer. *Dis. Markers.* 2007. 23;199-212
- 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; 2989-97,
- Jeon S., Lambert PF. Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 1995. 92; 1654-58
- Johansson C., Somberg M.,Li X., Backstrom Winqvist E., Fay J., Ryan F., Pim D., Banks L., Schwartz S. HPV16 E2 contributes to induction of HPV-16 late gene expression by inhibiting early polyadenylation .*EMBO. J.* 2012. 31; 3212-27.
- Johnson KM.,Kines RC, Roberts JN, Lowy DR, Schiller JT, Day PM. Role of heparin sulphate in attachment to and infection of the murine female genital tract by human papillomavirus.*J.Virol.* 2009 .83; 2067–74
- Joyce JG,Tung JS, Przysiecki CT, Cook JC, Lehman ED, Sands JA, Jansen KU, Keller PM.The L1 major capsid protein of human papillomavirus type11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycoaminoglycans on human keratinocytes. *J .Biol.Chem.* 1999. 274; 5810–22
- Kalantari M., Garcia-Carranca A, Morales-Vazquez CD, Zuna R, Montiel DP, Calleja-Macias IE, Johansson B, Andersson S, Bernard HU. Laser capture microdissection of cervical human papillomavirus infections: copy number of the virus in cancerous and normal tissue and heterogeneous DNA methylation.*Virology* 2009. 390; 261-7
- Kämper N., Day PM, Nowak T, Selinka HC, Florin L, Bolscher J, Hilbig L, Schiller JT, Sapp M. A membrane-destabilizing peptide in capsid protein L2 is required for egress of papillomavirus genomes from endosomes. *J. Virol.* 2006. 80;759–68
- Kanodia S.,Fahey LM., Kast WM. Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response. *Curr.Canc. Drug. Targ.* 2007. 7;79-89
- Karlsen F, Kalantari M, Jenkins A, Pettersen E, Kristensen G, Holm R. Johansson B., Hagmar B. Use of multiple PCR primer sets for optimal detection of human papillomavirus. *J Clin Microbiol* 1996. 34; 2095–100

- Keating JT., Cviko A, Riethdorf S, Riethdorf L, Quade BJ, Sun D, Duensing S, Sheets EE, Munger K, Crum CP. Ki-67, cyclin E and p16INK4 are complimentary surrogate biomarkers for human papilloma virus –related cervical neoplasia. *Am. J. Surg. Pathol.* 2001. 25; 884- 91
- Kelesidis T., Aish L, Steller MA, Aish IS, Shen J, Foukas P, Panayiotides J, Petrikos G, Karakitsos P, Tsiodras S. Human papillomavirus detection using in situ hybridization in histologic samples: correlations with cytologic changes and polymerase chain reaction HPV detection. *Am J. Clin. Pathol.* 2011. 136; 119-27
- Kemp TJ. Kinetic and HPV infection effects on cross-type neutralizing antibody and avidity responses induced by Cervarix . *Vaccine.* 2012. 31, 165–70.
- Kim K., Lambert PF. E1 protein of bovine papillomavirus 1 is not required for the maintenance of viral plasmid DNA replication. *Virology* 2002. 293; 10-14
- Kines RC., Thompson CD, Lowy DR, Schiller JT, Day PM. The initial steps leading to papillomavirus infection occur on the basement membrane prior to cell surface binding. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 2009. 106; 20458–63
- Kiyono T., Foster SA, Koop JI, McDougall JK, Galloway DA, Klingelutz AJ. Both Rb/p16 INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature.* 1998. 396; 84-88
- Klaes R. Friedrich T, Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U, Dallenbach-Hellweg G, Schmidt D, von Knebel Doeberitz M. Overexpression of p16INK4a as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int. J. Cancer.* 2001. 92;276-84
- Klingelutz AJ., Roman A. Cellular transformation by human papilloma-viruses: lessons learned by comparing high and low risk viruses. *Virology.* 2012. 424; 77-98
- Klumpp DJ., Laimins LA. Differentiation-induced changes in promoter usage for transcripts encoding the human papillomavirus type 31 replication protein E1. *Virology.* 1999. 257; 239-46
- Knight JL., Grainger JR, Gallimore PH, Roberts S. Cooperation between different forms of the human papillomavirus type 1E4 protein to block cell progression and cellular DNA synthesis. *J. Virol.* 2004. 78; 13920-33.
- Knight JL., Turnell AS, Roberts S. Role for Wee1 in inhibition of G2 to M transition through the cooperation of distinct human papillomavirus type 1 E4 proteins. *J. Virol.* 2006. 80; 7416-26
- Knight, GL., Pugh AG, Yates E, Bell I, Wilson R, Moody CA, Laimins LA, Roberts S. A

cyclin-binding motif in human papilloma virus type18 (HPV18) E1<sup>E4</sup> is necessary for association with CDK-cyclin complexes and G2/ M cell cycle arrest of keratinocytes, but is not required for differentiation- dependent viral genome amplification or L1 capsid protein expression. *Virology*. 2011. 412; 196–210.

- Koliopoulos G., Arbyn M., Martin-Hirsch P., Kyrgiou M., Prendiville W., Paraskevaidis E. Diagnostic accuracy of human papillomavirus in primary cervical screening: a systematic review and meta-analysis of non –randomized studies. *Gynecol. Oncol. Review*. 2007. 104; 232-36
- Koss LG.,Durfee GR. Unusual patterns of squamous epithelium of the uterine cervix: cytologic and and pathologic study of koilocytotic atypia. *Ann. N Y Acad Sci* 1956, 63; 1245-61
- Kostopoulou E.,Samara M., Kollia P., Zacharouli K., Mademtzis I., Daponte A., Messinis IE., Koukoulis G. Correlation between cyclin – B1 immunocytochemistry in cervical biopsies and HPV detection by PCR. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol*. 2009. 17; 115-20
- Kostopoulou E.,Samara M., Kollia P., Zacharouli K., Mademtzis I., Daponte A., Messinis IE., Koukoulis G. Different patterns of p16 immunoreactivity in cervical biopsies: correlation to lesion grade and HPV detection , with a review of the literature. *Eur. J. Gynaec. Oncol. Review*. 2011. 31; 54-61
- Kovi J.,Tillman RL, Lee SM. Malignant transformation of condyloma acuminatum. A light microscopic and ultrastructural study. *Am.J. Clin. Pathol*. 1974. 61; 702-10
- Kroupis C., Thomopoulou G., Papathomas TG., Vourlidis N., Lazaris AC. Population-based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in Athens, Greece. *Epidemiol Infect*. 2007. 135; 943-50
- Kumar A., Zhao Y., Meng G., Zeng M.,Srinivasan S.,Delmolino LM.,Gao Q., Dimri G.,Weber GF.,Wazer DE., Band H.,Band V. Human papillomavirus oncoprotein E6 inactivates the transcriptional coactivator human ADA3. *Mol. Cell. Biol*. 2002. 22; 5801-12
- Kurvinen K., Yliskoski M.,Saarikoski S.,Syrjanen K.,Syrjanen S. Variants of the long control region of human papillomavirus type 16. *Eur.J.Cancer*. 2000. 36; 1402-10
- Laurson J., Khan S., Chung R., Cross K, Raj K. Epigenetic repression of E-cadherin by human papillomavirus 16 E7 protein. *Carcinogenesis*. 2010. 31; 918-26
- Le Donne M.,Giuffrè G, Caruso C, Nicotina PA, Alibrandi A, Scalisi R, Simone A, Chiofalo B, Triolo O. Human papillomavirus types distribution in Eastern Sicilian females with cervical lesions. A correlation with colposcopic and histological findings. *Pathol. Oncol*.

Res. 2013. 19; 481-87

- Lechner MS., Laimins LA. Inhibition of p53 DNA binding by human papillomavirus E6 proteins. *J. Virol.* 1994. 68; 4262-73
- Lee CJ., Suh EJ., Kang HT., Im JS., Um SJ., Park JS., Hwang ES. Induction of senescence- like state and suppression of telomerase activity through inhibition of HPV E6/E7 gene expression in cells immortalized by HPV16DNA. *Exp. Cell Res.* 2002. 277; 173-182
- Lee D., Kim HZ., Jeong KW., Shim YS., Horiwaka I., Barrett JC., Choe J. Human papillomavirus E2 down –regulates the human telomerase reverse transcriptase promoter. *J. Biol. Chem.* 2002 277; 27748-56
- Leechanachai P., Banks L., Moreau F., Matlashewski G. The E5 gene from human papillomavirus type 16 is an oncogene which enhances growth factor-mediated signal transduction to the nucleus. *Oncogene.* 1992. 7; 19-25
- Leptak C., Cajal S., Kulke R., Horwitz BH., Riese DJ., Dotto GP., DiMaio D. Tumorigenic transformation of murine keratinocytes by the E5 genes of bovine papillomavirus type 1 and human papillomavirus type 16. *J. Virol.* 1991. 65; 7078-83
- Li S., Labrecque S., Gauzzi MC., Cuddihy AR., Wong AH., Pellegrini S., Matlashewski GJ., Koromilas AE. The human papillomavirus HPV 18 E6 oncoprotein physically associates with Tyk2 and impairs Jak – STAT activation by interferon –alpha. *Oncogene* 1999. 18; 5727-37
- Li X., Coffino P. High risk human papillomavirus has two distinct binding sites within p53, of which only one determines degradation. *J. Virol.* 1996. 70; 4509-16
- Lie AK., Risberg B, Borge B, Sandstad B, Delabie J, Rimala R, Onsrud M, Thoresen S. DNA-versus RNA –based methods for human papillomavirus detection in cervical neoplasia. *Gynecol. Oncol.* 2005. 97; 908-15
- Longworth MS., Laimins LA. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 2004. 68; 362 –72
- Louie KS., Castellsague X., de Sanjose S., Herrero R., Meijer CJ., Shah K., Munoz N., Bosch FX. Smoking and passive smoking in cervical cancer risk: pooled analysis of couples from the IARC multicentric case-control studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011. 20; 1379-90
- Lowe J. Panda D, Rose S, Jensen T, Hughes WA, Tso FY, Angeletti PC. Evolutionary and structural analyses of alpha-papillomavirus capsid proteins yields novel insights into L2

structure and interaction with L1. *J. Virol.* 2008. 5; 150

- Maglennon GA.,McIntosh P., Doorbar J., Persistence of viral DNA in the epithelial basal layer suggests a model for papillomavirus latency following immune regression. *Virology.* 2011. 414; 153-63
- Maitland NJ.,Conway S.,Wilkinson NS.,Ramsdale J.,Morris JR., Sanders CM.,Burns JE.,Stern PL., Wells M. Expression patterns of the human papillomavirus type 16 transcription factor E2 in low- and high –grade cervical intraepithelial neoplasia *J. Pathol.* 1998. 186; 275-80
- Maran A.,Amella CA, Di Lorenzo TP, Auburn KJ, Taichman LB, Steinberg BM. Human papillomavirus type 11 transcripts are present at low abundance in latently infected respiratory tissues. *Virology.* 1995. 212;285-94.
- Marin MC.,Jost CA., Irwin MS., DeCaprio JA., Caput D., Kaelin WG Jr. Viral oncoproteins discriminate between p53 and the p53-homolog p73. *Mol. Cell. Biol.* 1998.18; 6316-24
- Massimi P.,Pim.D.,Bertoli C.,Bouvard V.,Banks L. Interaction between the HPV-16 E2 Transcriptional activator and p53. *Oncogene.*1999. 18; 7748-54
- Matthews K.,Leong CM, Baxter L, Inglis E, Yun K, Bäckström BT, Doorbar J, Hibma M. Depletion of Langerhans cells in human papillomavirus 16 infected skin is associated with E6- mediated down regulation of E-cadherin. *J.Virol.*2003. 77; 8378- 85
- Maufort J.P., Shai A., Pitot HC., Lambert PF. A role for HPV 16 E5 in cervical carcinogenesis.*Cancer Res.* 2010. 70; 3924-31
- Maufort J.P.,Williams SM., Pitot HC, Lambert PF. Human papillomavirus 16 E5 oncogene contributes to two stages of skin carcinogenesis. *Cancer. Res.* 2007. 67; 6106-12
- McBride AA. Replication and partitioning of papillomavirus genomes. *Adv. Vir.Res.*2008. 72; 155-205
- McIntosh PB, Martin SR.,Jackson DJ., Khan J., Isaacson ER., Calder L., Raj K.,Griffin HM., Wang Q., Laskey P.,Eccleston JF., Doorbar J. Structural analysis reveals an amyloid form of the human papillomavirus type 16 E1-E4 protein and provides a molecular basis for its accumulation. *J. Virol.* 2008. 82; 8196-203
- McIntosh PB., Laskey P, Sullivan K, Davy C, Wang Q, Jackson DJ, Griffin HM, Doorbar J. E1 ^E4-mediated keratin phosphorylation and ubiquitylation: a mechanism for keratin depletion in HPV16-infected epithelium. *J.Cell Sci.* 2010. 123; 2810–22
- McIntyre MC.,Ruesch MN.,Laimins LA. Human papillomavirus E7 oncoproteins bind a

single form of cyclin E in a complex with cdk2 and p107. *Virology*.1996. 215;73-82

- McLaughlin –Drubin ME., Crum CP, Münger K. Human papillomavirus E7 oncoprotein induces KDM6A and KDM6B histone demethylase expression and causes epigenetic reprogramming. *Roc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011. 108; 2130-35
- McMillan NA., Payne E., Frazer IH., Evander M. Expression of the alpha 6 integrin confers papillomavirus binding upon receptor -negative B-cells. *Virology*. 1999. 261; 271-79
- McMurray HR., Nguyen D, Westbrook TF, McAnce DJ. Biology of human papillomaviruses. *Int..J. Exp.Path.* 2001.82;15-33
- Meisels A., Fortin R, Roy M. Condylomatous lesions of the cervix. II. Cytologic, colposcopic and histopathologic study. *Acta. Cytol.*1977.21;379-90
- Meisels A., Fortin R. Condylomatous lesions of the cervix and vagina. I. Cytologic patterns . *Acta. Cytol.* 1976. 20; 505-9
- Meisels A., Morin C. Human papillomavirus and cancer of the uterine cervix. *Gynecol. Oncol. Review*. 1981. 12; 111-23
- Mejlhede N., Bonde J., Fomsgaard A. High frequency of multiple HPV types in cervical specimens from Danish women, *APMIS* 2009.117;108–114
- Middleton K. Peh W, Southern S, Griffin H, Sotlar K, Nakahara T, El-Sherif A, Morris L, Seth R, Hibma M, Jenkins D, Lambert P, Coleman N, Doorbar J. Organization of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers *J. Virol.* 2003. 77; 10186-201
- Mittal K. Utility of proliferation – associated marker MIB-1 in evaluating lesions of the uterine cervix. *Adv. Anat. Pathol. Review*. 1999. 6; 177-85
- Mittal K., Demopoulos RI, Tata M. Comparison of proliferative activity and atypical mitosis in cervical condylomas with various human papillomavirus types. *Int. J. Gynecol. Pathol.* 1998. 17; 24-28
- Mittal.K. Utility of MIB-1 in evaluating cauterized cervical cone biopsy margins *Int. J. Gynecol. Pathol.* 1999. 18; 211-14
- Modis Y., Trus BL, Harrison SC. Atomic model of the papillomavirus capsid. *EMBO. J.* 2002. 21; 4754-62
- Mohr IJ., Clark R., Sun S., Andorphy EJ., MacPherson P., Botchan MR. Targeting the E1 replication protein to the papillomavirus origin of replication by complex formation with the E2 transactivator. *Science*. 1990. 250; 1694-99



- Molijn A., Kleter B, Quint W, van Doorn LJ. .Molecular diagnosis of human papillomavirus ( HPV) infections. J.Clin. Virol. Review. 2005. 32S; S43-51
- Monnier-Benoit S., Mauny F, Riethmuller D, Guerrini JS, Căpîlna M, Félix S, Seillès E, Mougin C, Prétet JL. Immunohistochemical analysis of CD4+ and CD8+ T-cell subsets in high risk human papillomavirus – associated pre- malignant and malignant lesions of the uterine cervix. Gynecologic Oncol. 2006. 102; 22-31
- Monsonego J., Zerat L., Syrjanen K., Zerat JC., Smith J.S., Halfon P. Prevalence of type-specific human papillomavirus infection among women in France: Implications for screening, vaccination, and a future generation of multivalent HPV vaccines, Vaccine 2012 30; 5215– 21
- Moody CA ., Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins: Pathways to transformation. Nat. Rev.Cancer. Review. 2010. 10; 550-60
- Morris BJ. Cervical human papillomavirus screening by PCR: advantages of targeting the E6/E7 region. Clin. Chem. Lab.Med. Review. 2005. 43; 1171-77
- Mulvany N.,Allen DG., Wilson SM. Diagnostic utility of p16INK4a : A reappraisal of its use in cervical biopsies. Pathology. Review. 2008. 40;335-44
- Munger K., Phelps WC., Bubb V.,Howley PM., Schlegel R. The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes J. Virol.1989 63;4417- 21
- Murphy N., Ring M, Killalea AG, Uhlmann V, O'Donovan M, Mulcahy F, Turner M, McGuinness E, Griffin M, Martin C, Sheils O, O'Leary JJ. p16 INK4a as a marker of dyskaryosis: CIN and cGIN in cervical biopsies and ThinPrep smears J. Clin. Pathol.2003. 56; 56-63
- Nahmias AJ.,Josey WE, Naib ZM, Luce CF, Guest BA. Antibodies to Herpesvirus hominis types 1 and 2 in humans. II. Women with cervical cancer. Am. J. Epidemiol.1970. 91;547-52
- Naib ZM., Nahmias AJ, Josey WE, Kramer JH. Genital herpetic infection. Association with cervical dysplasia and carcinoma. Cancer. 1969.23; 940-45
- Nair P., Nair KM., Jayaprakash PG., Pillai MR. Decreased programmed cell death in the uterine cervix associated with high risk human papillomavirus infection. Pathol. Oncol. Res.1999. 5; 95-103
- Nakahara T.,Peh WL.,Doorbar J.,Lee D.,Lambert PF. Human papillomavirus type 16 E1 circumflex E4 contributes to multiple facets of the papillomavirus life cycle. J. Virol. 2005.

- Nakahara,T.,Nishimura A, Tanaka M, Ueno T, Ishimoto A, Sakai H.. Modulation of the cell division cycle by human papillomavirus type18 E4. J.Virol. 2002. 76; 10914–20
- Nees M.,Geoghegan JM, Hyman T, Frank S, Miller L, Woodworth CD. Papillomavirus type 16 oncogenes downregulate expression of interferon – responsive genes and upregulate proliferation- associated an NF- kappaB- responsive genes in cervical keratinocytes. J.Virol. 2001. 75; 4283- 96.
- Negri G., Egarter-Vigl E, Kasal A, Romano F, Haitel A, Mian C. p16INK4a is a useful marker for the diagnosis of adenocarcinoma of the cervix uteri and its precursors: an immunohistochemical study with immunocytochemical correlations. Am. J. Surg. Pathol. 2003. 27; 187-93
- Negri G.,Bellisano G, Zannoni GF, Rivasi F, Kasal A, Vittadello F, Antoniazzi S, Faa G, Ambu R, Egarter-Vigl E. p16 INK4a and HPV L1 immunohistochemistry is helpful for estimating the behavior of low-grade dysplastic lesions of cervix uteri. Am. J. Surg. Pathol. 2008.32; 1715-20
- Negri, G., Vittadello, F., Romano, F., Kasal, A., Rivasi, F., Girlando, S., Mian C., Egarter–Vigl E. P16INK4a expression and progression risk of low-grade intraepithelial neoplasia of the cervix uteri. Virchows Arch. 2004. 445; 616–20
- Nguyen ML.,Nguyen MM., Lee D., Griep AE., Lambert PF. The PDZ ligand domain of the human papillomavirus type 16 E6 protein is required for E6's induction of epithelial hyperplasia in vivo. J. Virol. 2003. 77; 6957-64
- Nicholls PK. Klaunberg BA, Moore RA, Santos EB, Parry NR, Gough GW, Stanley MA. Naturally occurring ,nonregressing canine oral papillomavirus infection: host immunity, virus characterization and experimental infection. Virology. 1999. 265; 365-74,
- Nicholls PK., Moore PF, Anderson DM, Moore RA, Parry NR, Gough GW, Stanley MA. Regression of canine oral papillomas is associated with infiltration of CD4+ and CD8+ lymphocytes. Virology. 2001. 283; 31-9
- Nirchio V.,Lipsi R, Fusilli S, Ciccone E, Murino L, Santangelo A, Romano F, Di Taranto AM, Pedà D, Castriota M, Antonetti R, Bondi A. HPV infection: comparison between morphological studies and molecular biology. Pathologica. 2008. 100;149-55
- Nishimura A., Ono T, Ishimoto A, Dowhanick JJ, Frizzell MA, Howley PM, Sakai H. Mechanisms of human papillomavirus E2-mediated repression of viral oncogene expression and cervical cancer cell growth inhibition. J Virol. 2000. 74; 3752-60

- O'Neill CJ., McCluggage WG. p16 expression in the female genital tract and its value in diagnosis. *Adv. Anat. Pathol. Review.* 2006. 13; 1-8
- Orozco, J.J., Carter JJ, Koutsky LA, Galloway DA..Humoral immune response recognizes a complex set of epitopes on human papillomavirus type 6 L1capsomers.*J.Virol.* 2005. 79, 9503–14
- Ozbun MA., Meyers C. Human papillomavirus type 31b E1 and E2 transcript expression correlates with vegetative viral genome amplification. *Virology.* 1998. 248; 218-30
- Paavonen J., Naud P, Salmerón J, Wheeler CM, Chow SN, Apter D, Kitchener H, Castellsague X, Teixeira JC, Skinner SR, Hedrick J, Jaisamrarn U, Limson G, Garland S, Szarewski A, Romanowski B, Aoki FY, Schwarz TF, Poppe WA, Bosch FX, Jenkins D, Hardt K, Zahaf T, Descamps D, Struyf F, Lehtinen M, Dubin G; HPV PATRICIA Study Group. Efficacy of human papillomavirus (HPV)-16/18 AS04 adjuvanted vaccine against cervical infection and precancer caused by oncogenic HPV types (PATRICIA): final analysis of a double blind, randomized study in young women. *Lancet.* 2009. 374; 301-14
- Paavonen J.Jenkins D, Bosch FX, Naud P, Salmerón J, Wheeler CM, Chow SN, Apter DL, Kitchener HC, Castellsague X, de Carvalho NS, Skinner SR, Harper DM, Hedrick JA, Jaisamrarn U, Limson GA, Dionne M, Quint W, Spiessens B, Peeters P, Struyf F, Wieting SL, Lehtinen MO, Dubin G; HPV PATRICIA study group. Efficacy of a prophylactic adjuvanted bivalent L1 virus-like- particle vaccine against infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: an interim analysis of a phase III double blind, randomized controlled trial. *Lancet.* 2007. 369; 2161-70
- Paba P., Ascone C, Criscuolo AA, Marcuccilli F, Ciccozzi M, Sesti F, Piccione E, Perno CF, Ciotti M. Human papillomavirus molecular testing in women with low grade cervical lesions : experience from an Italian hospital. *Anticancer Res.* 2012. 32;1253-57
- Papanicolaou GN. The sexual cycle in the human female as revealed by vaginal smears. *Am J. Anat.* 1933. 52; 519-637
- Paraskevidis E.,Arbyn M, Sotiriadis A, Diakomanolis E, Martin-Hirsch P, Koliopoulos G, Makrydimas G, Tofoski J, Roukos DH. The role of HPV DNA testing in the follow-up period after treatment for CIN: a systematic review of the literature. *Cancer Treat. Rev. Review.* 2004. 30; 205-11
- Parish JL., Bean AM.,Park RB.,Andorphy EJ. ChIR1 is required for loading papillomavirus E2 onto mitotic chromosomes and viral genome maintenance. *Mol. Cell.* 2006. 24; 867-76
- Parish JL., Kowalczyk A.,Chen HT.,Roeder GE., Sessions R., Buckle M., Gaston K. E2 proteins from high- and low-risk human papillomavirus types differ in their ability to bind

p53 and induce apoptotic cell death. *Virology*. 2006. 80; 4580-90

- Park JS., Leake JF., Sharma BK., Toki T., Kessis TD., Ambros RA., Shah KV. Variability in b-globin and HPV DNA amplification by PCR from fixed tissues. *Mod. Pathol.* 1991. 4; 667–70
- Parkin DM., Bray F. Chapter 2: The burden of HPV-related cancers. *Vaccine*. 2006. 24; S11-25
- Patterson NA., Smith JL., Ozbun MA. Human papillomavirus type 31b infection of human keratinocytes does not require heparan sulfate. *J. Virol.* 2005. 79; 6838-47
- Peitsaro P., Johansson B., Syrjänen S. Integrated human papillomavirus type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative real-time PCR technique. *J. Clin. Microbiol.* 2002. 40; 886-91
- Perea SE., Massimi P., Banks L. Human papillomavirus type 16 E7 impairs the activation of the interferon regulatory factor-1. *Int. J. Mol. Med.* 2000. 5; 661-6
- Pett MR., Alazawi WO., Roberts I., Downen 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; 1359-68
- Petti L., Nilson LA., DiMaio D. Activation of the platelet-derived growth factor receptor by the bovine papillomavirus E5 transforming proteins. *EMBO J.* 1991, 10; 845-55
- Pfefferle R., Marcuzzi GP., Akgül B., Kasper HU., Schulze F., Haase I., Wickenhauser C., Pfister H. The human papillomavirus type 8 E2 protein induces skin tumor in transgenic mice. *J. Invest. Dermatol.* 2008. 128; 2310-15
- Pinto AP, Schlecht NF, Woo TY, Crum CP, Cibas ES. Biomarker (ProEx™, p16INK4a and MiB-1) distinction of high grade squamous intraepithelial lesion from its mimics. *Mod Pathol.* 2008. 21; 1067-74
- Pirami L., Giachè V., Becciolini A. Analysis of HPV 16, 18, 31 and 35 DNA in pre-invasive and invasive lesions of the uterine cervix. *J. Clin. Pathol.* 1997. 50; 600-4
- Pista A., Oliveira A., Verdasca N., Ribeiro F. Single and multiple human papillomavirus infections in cervical abnormalities in Portuguese women. *Clin. Microbiol. Infect.* 2011. 17; 941–46
- Puisieux A., Ji J., Öztürk M. Annexin II up-regulates cellular levels of p11 protein by a post-translational mechanism. *Biochem. J.* 1996. 313; 51-55
- Pyeon D., Pearce SM., Lankk SM., Ahlquist P., Lambert PF. Establishment of human

papillomavirus infection requires cell cycle progression. PLoS Pathol. 2009. 5, e: 1000318. 1-9

- Quint W., Jenkins D, Molijn A, Struijk L, van de Sandt M, Doorbar J, Mols J, Van Hoof C, Hardt K, Struyf F, Colau B. One virus one lesion –Individual components of CIN lesions contain a specific HPV type. J. Pathol. 2012. 227; 62-71
- Raff AB., Woodham AW, Raff LM, Skeate JG, Yan L, Da Silva DM, Schelhaas M, Kast WM. The evolving field of human papillomavirus receptore research: a review of binding and entry. J. Virol. Review. 2013. 87; 6062-72
- Rawls WE., Tompkins WA, Figueroa ME, Melnick JL. Herpesvirus type 2: association with carcinoma of the cervix. Science. 1968. 161; 1255-56
- Redman R., Rufforny I, Liu C, Wilkinson EJ, Massoll NA. The utility of p16Ink4a in discriminating between cervical intraepithelial neoplasia 1 and nonneoplastic equivocal lesions of the cervix. Arch. Pathol. Lab. Med. 2008. 132; 795-99
- Regan JA., Laimins LA. Bap 31 is a novel target of the human papillomavirus E5 protein. J. Virol. 2008. 82; 10042-51
- Reid R., Lavery CR, Coppleson M, Isarangkul W, Hills E. Non-condylomatous cervical wart virus infection. Obstet. Gynecol. Review. 1980. 55; 476-83
- Remschmidt C, Kaufmann AM, Hagemann I, Vartazarova E, Wichmann O, Deleré Y. Risk factors for cervical human papillomavirus infection and high-grade intraepithelial lesion in women aged 20 to 31 years in Germany. Int J Gynecol Cancer 2013. 23; 519-26
- Richards R.M., Lowy DR, Schiller JT, Day PM. Cleavage of the papilloma- virus minor capsid protein, L2, at a furin consensus site is necessary for infection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2006. 103; 1522–27
- Robbins Basic Pathology, Female genital system and breast. 2011. 769
- Roberts CC., Swoyer R, Bryan JT, Taddeo FJ. Comparison of real- time multiplex human papillomavirus (HPV) PCR assays with the linear array HPV genotyping PCR and influence of DNA extraction method on HPV detection . J. Clin. Microbiol. 2011. 49; 1899-906
- Rosenberg S., De-Castro Arce J., Langbein L., Steenbergen RD., Rosl F. Alternative splicing of human papillomavirus type -16 E6/E6\* early mRNA is coupled to EGF signaling via Erk1/2 activation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010. 107; 7006-11
- Roteli-Martins CM., Panetta K, Alves VA, Siqueira SA, Syrjänen KJ, Derchain SF. Cigarette smoking and high-risk HPV-DNA as predisposing factors for high –grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN) in young Brazilian women. Acta. Obstet. Gynecol. Scand.

1998.77; 678-82

- Roulston A., Marcellus RC., Branton PE. Viruses and apoptosis. *Annu. Rev Microbiol.* 1999. 53;577- 628
- Ryding J., Dahlberg L, Wallen-Ohman M, Dillner J. Deletion of a major neutralizing epitope of human papillomavirus type 16 virus-like particles. *J. Gen. Virol.* 2007. 88; 792–802
- Sabath AP., Kiviat NB. Detection and classification of cervical neoplasia in the era of HPV. *Pathol. Case Reviews. Review.* 2010. 15; 135-40
- Sanchez IE., Dellarole M., Gaston K., de Prat-Gay G. Comprehensive comparison of the interaction of the E2 master regulator with its cognate target DNA sites in 73 human papillomavirus types by sequence statistics. *Nucleic. Acids. Res.* 2008. 36, 756-69
- Sano T., Oyama T, Kashiwabara K, Fukuda T, Nakajima T. Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. *Am. J. Pathol.* 1998. 153; 1741-48.
- Schelhaas M., Shah B, Holzer M, Blattmann P, Kühling L, Day PM, Schiller JT, Helenius A. Entry of human papillomavirus type 16 by actin-dependent, clathrin- and lipid raft-independent endocytosis. *PLoS pathog.* 2012. 8, e1002657
- Schiffman M., Rodriguez AC., Chen Z., Wacholder S., Herrero R., Hildesheim A., Desalle R., Befano B., Yu K., Safaeian M., Sherman ME., Morales J., Guillen D., Alfaro DM., Hutchinson M., Solomon D., Castle PE., Burk RD. A population-based prospective study of carcinogenic human papillomavirus variant lineages, viral persistence and cervical neoplasia. *Cancer Res.* 2010. 70; 3159-69
- Schiller, JT, Day PM, Kines RC.. Current understanding of the mechanism of HPV infection. *Gynecologic Oncology*, 2010. 118 .Suppl 1, S12-17
- Schmitt A., Rochat A, Zeltner R, Borenstein L, Barrandon Y, Wettstein FO, Iftner T. The primary target cells of the high-risk cottontail rabbit papillomavirus colocalize with hair follicle stem cells. *J. Virol.* 1996. 70; 1912-22
- Seavey SE., Holubar M., Saucedo LJ., Perry ME. The E7 oncoprotein of human papillomavirus type 16 stabilizes p53 through a mechanism independent of p19(ARF). *J. Virol.* 1999. 73; 7590-98
- Sedlacek TV. Advances in the diagnosis and treatment of human papillomavirus infections. *Clin. Obstet. Gynecol. Review.* 1999. 42; 206-20
- Sedman S., Barbosa MS., Vass WC., Hubbert NL., Haas JA., Lowy DR., Schiller JT. The full-length E6 protein of human papillomavirus type 16 has transforming and trans-

activating activities and cooperates with E7 to immortalize keratinocytes in culture. J. Virol. 1991. 65; 4860-66

- Selinka, HC., Florin L, Patel HD, Freitag K, Schmidtke M, Makarov VA, Sapp M. Inhibition of transfer to secondary receptors by heparin sulfate- binding drug or antibody induces non infectious uptake of human papilloma- virus. J. Virol. 2007. 81, 10970–80
- Sellors JW, Mahony JB, Kaczorowski J, Lytwyn A, Bangura H, Chong S, Lorincz A, Dalby DM, Janjusevic V, Keller JL. Prevalence and predictors of human papillomavirus infection in women in Ontario, Canada. Survey of HPV in Ontario Women (SHOW) Group. CMAJ 2000. 163; 503-8
- Shafit- Keramat S., Handisurya A., Kriehuber E., Meneguzzi G., Slupetzky K., Kirnbauer R. Different heparan sulfate proteoglycans serve as cellular receptors for human papillomaviruses. J. Virol. 2003. 77; 13125-35
- Sierra-Torres CH., Tying SK., Au WW. Risk contribution of sexual behavior and cigarette smoking to cervical neoplasia. Int J Gynecol Cancer. 2003. 13; 617-25
- Singh N. HPV and cervical cancer- Prospects for prevention through Vaccination. Indian. J. of Med. and Paed. Oncol. Review. 2005. 26; 20-23
- Smith JS., Bossetti C, Munoz N., Herrero R., Bosch FX., Eluf - Neto J., Meijer CJ., Van de Brule AJ., Franceschi P. Chlamydia trachomatis and invasive cervical cancer: a pooled analysis of the IARC multicentric case- control study. Int. J. Cancer. 2004, 111; 431-9
- Smith JS., Herrero R., Bossetti C., Munoz N., Bosch FX., Eluf -Neto J., Castellague X., Meijer CJ., Van de Brule AJ., Franceschi S., Ashley International Agency for Research on Cancer (IARC) Multicentric Cervical Cancer Study Group. Herpes simplex virus-2 as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer. J. Natl. Cancer Inst. 2002, 94; 1604-13
- Smits HL., Bollen LJ., Tjong-A-Hung SP., Vonk J., Van Der Velden J., Ten Kate FJ., Kaan JA., Mol BW., Ter Schegget J. Intermethod variation in detection of human papillomavirus DNA in cervical smears. J Clin Microbiol 1995. 33; 2631–6
- Song S., Pitot HC., Lambert PF. The human papillomavirus type 16 E6 gene alone is sufficient to induce carcinomas in transgenic animals J. Virol. 1999. 73; 5887- 93
- Song S., Liem A., Miller JA. Lambert PF. Human papillomavirus types 16 E6 and E7 contribute differently to carcinogenesis. Virology. 2000. 267; 141-50
- Southern SA, McDicken IW, Herrington CS. Evidence for keratinocyte immortalization in high-grade squamous intraepithelial lesions of the cervix infected with high-risk human

papillomaviruses. Lab. Invest.2000.80; 539-44

- Spink KM.,Laimins LA. Induction of the human paillomavirus type 31 late promoter requires differentiation but not DNA amplification. J.Virol. 2005. 79; 4918-26
- Stanley MA. Epithelial cell responses to infection with human papillomavirus. Clin. Microbiol. Reviews. 2012. 25; 215-22
- Stehle,T.Gamblin SJ, Yan Y, Harrison SC. The structure of simian virus 40 refined at 3.1Å resolution. Structure 1996. 4;165–82
- Stenberg’s Diagnostic Surgical Pathology. Section X : Female Reproductive System and Peritoneum, Chapter 52: The Cervix. 2010.2133-34
- Stevenson M., Hudson LC, Burns JE, Stewart RL, Wells M, Maitland NJ. Inverse relationship between the expression of the human papillomavirus type 16 transcription factor E2 and virus DNA copy number during the progression of cervical intraepithelial neoplasia. J. Gen. Virol. 2000. 81; 1825-32
- Stoler M. Human papilloma viruses and Cervical neoplasia: A Model for Carcinogenesis. Int. Gynecol. Pathol 2000,19; 16-28
- Suprynowicz FA., Disbrow GL., Krawczyk E., Simic V., Lantzky K., Schlegel R. HPV-16 E5 oncoprotein upregulates lipid raft components caveolin – 1 and ganglioside GM1 at the plasma membrane of cervical cells. Oncogene. 2008. 27; 1071-78
- Svedrup F.,Khan SA. Replication of human papillomavirus (HPV) DNAs supported by the HPV type 18 E1 and E2 proteins. J. Virol. 1994. 68; 505-9
- Syrjänen K, Shabalova I, Petrovichev N, Kozachenko V, Zakharova T, Pajanidi J, Podistov J, Chemeris G, Sozaeva L, Lipova E, Tsidaeva I, Ivanchenko O, Pshepurko A, Zakharenko S, Nerovjna R, Kljukina L, Erokhina O, Branovskaja M, Nikitina M, Grunberga V, Grunberg A, Juschenko A, Santopietro R, Cintorino M, Tosi P, Syrjänen S. Smoking is an independent risk factor for oncogenic human papillomavirus (HPV) infections but not for high-grade CIN. Eur J Epidemiol. 2007. 22; 723-35
- Szarewski A., Poppe WA, Skinner SR, Wheeler CM, Paavonen J, Naud P, Salmeron J, Chow SN, Apter D, Kitchener H, Castellsagué X, Teixeira JC, Hedrick J, Jaisamrarn U, Limson G, Garland S, Romanowski B, Aoki FY, Schwarz TF, Bosch FX, Harper DM, Hardt K, Zahaf T, Descamps D, Struyf F, Lehtinen M, Dubin G; HPV PATRICIA Study Group.Efficacy of human papillomavirus (HPV)-16/18 AS04 adjuvanted vaccine in women aged 15-25 years with and without serological evidence of previous exposure to HPV-16/18. Int. J. Cancer. 2012. 131; 106-16



- Tao M.,Kruhlak M., Xia S., Andorphy E., Zheng ZM. Signals that dictate nuclear localization of human papillomavirus type16 oncoprotein E6 in living cells. *J. Virol.*2003. 77; 13232-47
- Thomas M., Narayan N., Pim D., Tomai'c V., Massimi P.,Nagasaka K.,Kranjec C.,Gammoh N., Banks L. Human papillomaviruses, cervical cancer and cell polarity. *Oncogene*. 2008. 27;7018-30
- Thomison J III., Thomas LK., Shroyer KR. Human papillomavirus: molecular and cytologic/histologic aspects related to cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma. *Hum. Pathol*. 2008. 39; 154-66
- Tjalma W., Depuydt CE. Don't forget HPV-45 in cervical cancer screening. *Am.J. Clin. Pathol*. 2012. 137; 161-63
- Tommasino M.,Adamczewski JP.,Carlotti F., Barth CF., Manetti R., Contorni M.,Cavalieri F., Hunt T., Crawford L. HPV16 E7 protein associates with the protein kinase p33CDK2 and cyclin A. *Oncogene*. 1993 8;195-202
- Tringler B., Gup CJ, Singh M, Groshong S, Shroyer AL, Heinz DE, Shroyer KR. Evaluation of p16 INK4a and Rb expression in cervical squamous and glandular neoplasia. *Hum. Pathol*. 2004. 35; 689-96
- Trottier H., Ferreira S., Thomann P.,Costa MC.,Sobrinho JS.,Prado JC.,Rohan TE., Villa LL., Franco EL. Human papillomavirus infection and reinfection in adult women: the role of sexual activity and natural immunity.*Cancer. Res*. 2010. 70; 8569-77
- Tsoumpou I., Arbyn M, Kyrgiou M, Wentzensen N, Koliopoulos G, Martin-Hirsch P, Malamou-Mitsi V, Paraskevaidis E. p16INK4a immunostaining in cytological and histological specimens from the uterine cervix: A systematic review an meta-analysis. *Cancer Treat. Rev. Review*.2009. 35; 210-20
- Um. SJ., Rhyu JW., Kim EJ., Jeon KC., Hwang ES., Park JS. Abrogation of IRF-1 response by high- risk E7 protein in vivo. *Cancer Lett*. 2002. 179; 205-12.
- Ustav M., Stenlud A. Transient replication of BPV-1 requires two viral polypeptides encoded by the E1 and E2 open reading frames. *EMBO.J*. 1991. 10; 449-57
- Valencia C., Bonilla- Delgado J., Oktaba K., Ocadiz- Delgado R., Gariglio P.,Covarrubias L. Human papilloma virus E6/E7 oncogenes promote mouse ear regeneration by increasing the rate of wound re- epithelization and epidermal growth. *J. Invest. Dermatol*. 2008. 128; 2894-903.
- van Hoeven KH, Ramondetta L, Kovatich AJ, Bibbo M, Dunton CJ. Quantitative image analysis of MIB-1 reactivity in inflammatory,hyperplastic,and neoplastic endocervical

lesions. *Int.J.Gynecol.Pathol.* 1997.16; 15-21

- Wang JL., Zheng BY, Li XD, Nokelainen K, Angström T, Lindström MS, Wallin KL. p16 INK4a and p14ARF expression pattern by immunohistochemistry in human papillomavirus-related cervical neoplasia *Mod. Pathol.* 2005. 18; 629-37
- Wang SS., Trunk M, Schiffman M, Herrero R, Sherman ME, Burk RD, Hildesheim A, Bratti MC, Wright T, Rodriguez AC, Chen S, Reichert A, von Knebel Doeberitz C, Ridder R, von Knebel Doeberitz M. Validation of p16 INK4a as a marker of oncogenic human papillomavirus in cervical biopsies from a population-based cohort in Costa Rica. *Cancer. Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2004. 13; 1355-60
- Wang X., Meyers C, Wang HK, Chow LT, Zheng ZM. Construction of a full transcription map of human papillomavirus type 18 during productive viral infection. *J. Virol.* 2011. 85; 8080–92
- Wang, Q., Kennedy A, Das P, McIntosh PB, Howell SA, Isaacson ER, Hinz SA, Davy C, Doorbar J. Phosphorylation of the human papillomavirus type 16 E1<sup>E4</sup> protein at T57 by ERK triggers a structural change that enhances keratin binding and protein stability. *J. Virol.* 2009. 83; 3668–83.
- Webster K., Parish J., Pandya M., Stern PL., Clarke AR., Gaston K. The human papillomavirus HPV16 E2 protein induces apoptosis in the absence of other HPV proteins and via p53- dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 2000. 275; 87-94
- Wilgenburg BJ., Budgeon LR, Lang CM, Griffith JW, Christensen ND. Characterization of immune responses during regression of rabbit oral papilloma virus infections. *Comp. Med.* 2005. 55; 431-39
- Wilson R., Fehrmann F., Laimins LA. Role of the E1-E4 protein in the differentiation - dependent life cycle of human papillomavirus type 31. *J. Virol.* 2005. 79; 6732-40
- Winer RL., Kiviat NB., Hughes JP., Adam DE., Lee SK., Kuypers JM., Koutsky LA. Development and duration of human papillomavirus lesions, after initial infection. *J. Infect. Dis.* 2005. 191; 731-738
- Woodham AW, Da Silva DM, Skeate JG, Raff AB, Ambroso MR, Brand HE, Isas JM, Langen R, Kast WM. The S100 A10 subunit of the annexin A2 heterotetramer facilitates L2-mediated human papillomavirus infection. *PloS one.* 2012. 7, e 43519
- Woodman CB., Collins S, Rollason TP, Winter H, Bailey A, Yates M, Young LS. Human papillomavirus type 18 and rapidly progressing cervical intraepithelial neoplasia. *Lancet.* 2003. 361; 40-43
- Woodman CB., Collins SI, Young LS. The natural history of cervical HPV infection:

unresolved issues. *Nat Rev. Cancer*. 2007. 7; 11-22

- Wright TC.Jr. Cervical cancer screening in the 21<sup>st</sup> century: is it time to retire the PAP smear? *Clin. Obst.Gynecol*. 2007. 50; 313-23
- Yoshida T., Sano T, Kanuma T, Owada N, Sakurai S, Fukuda T, Nakajima T. Immunochemical analysis of HPV- L1 capsid protein and p16 protein in liquid –based cytology samples from uterine cervical lesions . *Cancer*. 2008.114 ; 83-88
- You J., Croyle JL, Nishimura A, Ozato K, Howley PM. Interaction of the bovine papillomavirus E2 protein with Brd4 tethers the viral DNA to host mitotic chromosomes. *Cell*. 2004. 117; 349-60
- Zhang B., Chen W., Roman A. The E7 proteins of low- and high- risk human papillomaviruses share the ability to target the pRb family member p130 for degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA* 2006. 103; 437-42
- Zhang P., Nouri M, Brandsma JL, Iftner T, Steinberg BM. Induction of E6/E7 expression in cottontail rabbit papillomavirus latency following UV activation. *Virology*. 1999.263;388-94
- Zheng PS., Brokaw J., McBride AA. Conditional mutations in the mitotic chromosome binding function of the bovine papillomavirus type E1 protein *J.Virol*. 2005. 79; 1500-9
- Zielinski GD, Bais AG, Helmerhorst TJ, Verheijen RH, de Schipper FA, Snijders PJ, Voorhorst FJ, van Kemenade FJ, Rozendaal L, Meijer CJ. HPV testing and monitoring of women after treatment of CIN 3: review of the literature and meta-analysis. *Obstet. Gynecol. Surv. Review*. 2004. 59; 543-53
- zur Hausen H. Human papilloma viruses and their possible role in squamous cell carcinomas. *Curr. Top. Microbiol. Immunol*. 1977. 78; 1-30
- zur Hausen H. Papilloma viruses in the causation of human cancers – a brief historical account. *Virology. Minireview*. 2009. 384; 260-65
- zur Hausen H. Papillomavirus infections- a major cause of human cancers. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1996.1288;55-78
- Παπανικολάου Α. Επιδημιολογία και φυσική ιστορία της HPV λοίμωξης στον τράχηλο της μήτρας. Λοίμωξη από τον ιό των ανθρωπίνων θηλωμάτων HPV. 2008. 20