

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΟΛΟΓΙΑΣ
(Διευθυντής: Καθηγητής Δ.Α. Σπαντίδος)**

ΚΑΛΛΙΟΠΗ Α. ΜΠΙΛΙΡΗ

**Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΕΡΠΗΤΟΙΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΙΩΝ ΤΟΥ
ΘΗΛΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ
ΔΕΡΜΑΤΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2004

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ABSTRACT

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Σελίδα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΚΑΙ ΙΟΙ

1.1 Νεοπλάσματα	1
1.2 Η πολυπαραγοντική φύση του καρκίνου	2
1.3 Ογκογονίδια	3
1.4 Ογκοκατασταλτικά γονίδια	4
1.5 Ογκογόνοι ιοί	4
1.5.1 RNA ογκογόνοι ιοί (Ρετροϊοί)	5
1.5.2 DNA ογκογόνοι ιοί	6

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

ΜΗ-ΜΕΛΑΝΩΜΑΤΙΚΟΣ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ

2.1 Εισαγωγή	8
2.2 Καλοήθεις και προκαρκινικές δερματικές παθήσεις	8
2.3 Ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα (SCC)	10
2.3.1 Αιτιολογία	10
2.3.2 Κλινική εικόνα	10
2.3.3 Ιστολογική εικόνα	11
2.3.4 Θεραπεία	11
2.4 Βασιλοκυτταρικό καρκίνωμα (BCC)	12
2.4.1 Αιτιολογία	12
2.4.2 Κλινική εικόνα	12
2.4.3 Κλινικοί τύποι BCC	13

2.4.4 Ιστολογική εικόνα	14
2.4.4 Θεραπεία	14

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3°

Ο ΙΟΣ ΤΟΥ ΘΗΛΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ (HPV)

3.1 Γενικά	15
3.2 Ονοματολογία και ταξινόμηση	16
3.3 Δομή των ικών σωματιδίων	17
3.3.1 Ιικά σωματίδια	17
3.3.2 Δομή και ρύθμιση του ικού γενώματος	18
3.4 Λειτουργίες των ικών πρωτεϊνών E6 και E7	19
3.4.1 E6 πρωτεΐνη	19
3.4.2 E7 πρωτεΐνη	20
3.5 Λειτουργίες των ικών πρωτεϊνών E1, E2, E4 και E5	21
3.6 Ανίχνευση του HPV	22
3.7 Μετάδοση και φυσική ιστορία των HPV λοιμώξεων	22
3.8 Μη κακοήθεις καταστάσεις που σχετίζονται με HPV λοιμώξεις	23
3.9 Οι ιοί του θηλώματος στον μη-μελανωματικό καρκίνο του δέρματος	24
3.10 Ο παγκόσμιος ρόλος των HPV-σχετιζόμενων καρκίνων	25

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4°

ΕΡΠΗΤΟΙΟΙ

4.1 Γενικά	26
4.2 Οι ιοί του απλού έρπητα HSV-1 και HSV-2	29
4.2.1 Γενικά	29
4.2.2 Κλινική εικόνα	30
4.2.3 Διάγνωση και θεραπεία	31
4.3 Ο ιός Epstein-Barr (EBV)	32
4.3.1 Γενικά	32
4.3.2 Κλινική εικόνα	34
4.3.3 Διάγνωση και θεραπεία	35
4.4 Ο κυτταρομεγαλοϊός (CMV)	36
4.4.1 Γενικά	36

4.4.2 Κλινική εικόνα	37
4.4.3 Διάγνωση και θεραπεία	38

B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5°

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

5.1 Γενικά	40
5.2 Εκχύλιση DNA	40
5.3 Αλυσιδωτή αντίδραση με πολυμεράση (PCR)	41
5.3.1 Αρχές της μεθόδου	41
5.3.2 Συστατικά και ρυθμιστικοί παράγοντες της PCR	43
5.3.3 Σχεδιασμός των εκκινητών και συνθήκες των αντιδράσεων PCR	45
5.3.3.1 Συνθήκες των αντιδράσεων PCR	45
5.3.3.2 Σχεδιασμός των εκκινητών	47
5.4 Ηλεκτροφόρηση DNA	48
5.5 Στατιστική ανάλυση-Ηλεκτρονική επεξεργασία εικόνας	49
5.6 Εταιρείες προέλευσης των υλικών	49

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6°

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

6.1 Αλλοιώσεις που μελετήθηκαν και ιστολογική διάγνωση	51
6.2 Ανίχνευση των ιών HPV σε δερματικές αλλοιώσεις	52
6.3 Ανίχνευση των ερπητοϊών HSV, EBV και CMV σε δερματικές αλλοιώσεις	53

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7°

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

7.1 Εισαγωγή	62
7.2 Ανίχνευση των ιών HPV σε προκαρκινικές αλλοιώσεις και καρκίνο δέρματος	62
7.2.1 Γενικά	62
7.2.2 Ανάλυση των αποτελεσμάτων	63
7.3 Ανίχνευση των ερπητοϊών σε προκαρκινικές αλλοιώσεις και καρκίνο δέρματος	65
7.3.1 Γενικά	65

7.3.2 Ανάλυση των αποτελεσμάτων 66

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 68

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Ατομικά στοιχεία

Επώνυμο	Μπιλίρη
Όνομα	Καλλιόπη
Ημερομηνία γεννήσεως	16/1/74
Τόπος γεννήσεως	Πειραιάς Αττικής
Διεύθυνση	Λυσικράτους 57, Άλιμος Αττικής
Οικογενειακή κατάσταση	Άγαμη

Σπουδές

- 1997. Πτυχίο της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης. Βαθμός πτυχίου 7.77 (Λίαν Καλώς)
- 1991. Απολυτήριο Γενικού Λυκείου, βαθμός 18.3
- 1989. Πτυχίο Γαλλικής Γλώσσας: Diplome d'Etudes Superieures, mention Bien
- 1988. Πτυχίο Αγγλικής Γλώσσας: First Certificate in English, Cambridge University, grade A
- 1988. Πτυχίο Γαλλικής Γλώσσας: Certificat Pratique de Langue Francaise, Universite de Sorbonne, mention Passable
- 1986. Πτυχίο Γαλλικής Γλώσσας: Certificat de Langue Francaise, mention Bien

Επαγγελματική εμπειρία

- 2002 Ειδικότητα Γενικής Χειρουργικής, ΤΖΑΝΕΙΟ Γενικό Νοσοκομείο Πειραιά (συμπεριλαμβάνονται 6 μήνες ειδικότητας Ουρολογίας)
- 1999-2001 Ειδικότητα Γενικής Χειρουργικής, Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ηρακλείου (συμπεριλαμβάνονται 6 μήνες ειδικότητας Χειρουργικής Θώρακος και Αγγείων).
- 1997-1999 Υπηρεσία Υπαίθρου στο Νομό Ηρακλείου (Κέντρο Υγείας Μοιρών).

Διδακτορική διατριβή

1997- Εκπόνηση διδακτορικής διατριβής στα εργαστήρια Ιολογίας του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Κρήτης (Καθ.Δ.Α.Σπαντίδος)

Ξενογλωσσες Δημοσιεύσεις

1. Zafiroopoulos A, Tselentierou E, **Billiri K** and Spandidos DA. Human herpes viruses in non-melanoma skin cancers. *Cancer Lett* 198:77-81,2003.
2. **Biliris KA**, Koumantakis E, Dokianakis DN, Sourvinos G and Spandidos DA. Human papillomavirus infection of non-melanoma skin cancers in immunocompetent hosts. *Cancer Lett* 161: 83-88,2000.
3. Dokianakis DN, Koumantaki E, **Billiri K** and Spandidos DA. P53 codon 72 polymorphism as a risk factor in the development of HPV-associated non-melanoma skin cancers in immunocompetent hosts. *Int J Mol Med* 5: 405-409,2000.

Ανακοινώσεις

1. Tsagatakis T, **Biliris KA**, Christodoulakis M, Askoxilakis J, De Bree E, Sanidas E and Tsiftsis D. Sentinel lymph node biopsy in 80 consecutive unselected patients with breast cancer: the first greek series. HSBCR 4th International Congress, Crete, 1999.
2. Χριστοδουλάκης Μ, **Μπιλίρη Κ**, Τσαγκατάκης Θ, De Bree E, Ασκοξυλάκης Ι, Σανιδάς Η και Τσιφτσής Δ. Άμεση ή απότερη κινητοποίηση του άνω άκρου σε ασθενείς με καρκίνο μαστού που υποβάλλονται σε λεμφαδενικό καθαρισμό μασχάλης. Προοπτική μελέτη 200 ασθενών. 10^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ογκολογίας, Θεσσαλονίκη, 1999.
3. **Μπιλίρη Κ**, Σανιδάς Η, Τσαγκατάκης Θ, Ασκοξυλάκης Ι, Μιχαλάκης Ι, Κουτσούμης Κ και Τσιφτσής Δ. Η βιοψία του λεμφαδένο φρουρού σε σειρά 100 μη επιλεγμένων ασθενών με καρκίνο του μαστού: αποτελέσματα και προοπτικές. 7^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Μαστολογίας, Αθήνα, 2000.

4. Δροσίτης Ι, Κώστας Θ, Ιωάννου Χ, Στασινόπουλος Χ, **Μπιλίρη Κ**, Χαλκιαδάκης Γ και Κατσαμούρης Α. Η θωρακοσκοπική χειρουργική στην δημιουργία περικαρδιακού παραθύρου. Η εμπειρία μας στα πλεονεκτήματα της νέας σχετικά μεθόδου. 10^ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, Κρήτη, 2000.
5. Κωνσταντινίδης Χ, Απαλής Π, Κουράνος Θ, **Μπιλίρη Κ**, Αβακιάν Ρ και Κυραγιάννης Β. Η επίπτωση και η πρόγνωση του αδενοκαρκινώματος του νεφρού. Δείγμα δύο διαφορετικών 5ετιών. 23^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής, Αθήνα, 2002.

Συμμετοχές σε συνέδρια

1. 9^ο Διαπανεπιστημιακό Ιατρικό Συμπόσιο, Κρήτη, 1995.
2. Εξελίξεις στην θεραπευτική της καρδιολογίας, Κρήτη, 1996.
3. 2nd International Congress on Lung Cancer, Κρήτη, 1996.
4. 7^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Μαιευτικής και Γυναικολογίας, Κρήτη, 1997.
5. Ελληνική Εταιρεία Τραύματος: Κλειστές και ανοικτές κακώσεις θώρακος, Κρήτη, 1999.
6. Οι κλινικές εφαρμογές του λεμφαδένος φρουρού, Κρήτη, 2000.
7. Advances and controversies in Surgical Oncology, Κρήτη, 2000.
8. Ορμόνες και καρκίνος του μαστού, Κρήτη, 2001.

Συμμετοχές σε οργανωτικές επιτροπές συνεδρίων

1. 3rd World Congress on advances in Oncology, Κρήτη, 1998.
2. 6^ο Ετήσιο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Χειρουργικής Ογκολογίας, Κρήτη, 2000.

Εμπειρία σε Η/Υ

Λειτουργικά συστήματα MS-DOS, MS-Windows

Εμπειρία σε σύστημα Macintosh

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο μη-μελανωματικός καρκίνος του δέρματος αποτελεί την συχνότερη κακοήθεια παγκοσμίως στους Καυκάσιους. Η αναλογία βασικοκυτταρικού προς ακανθοκυτταρικό καρκίνο του δέρματος είναι 5:1 και απαντάται κυρίως σε εκτεθειμένες στον ήλιο περιοχές του σώματος. Στην προσπάθεια ερμηνείας της πολυπαραγοντικής φύσης της καρκινογένεσης, φαίνεται ότι γενετικοί παράγοντες αλληλεπιδρούν με περιβαλλοντικούς παράγοντες και με ικά γονίδια ώστε να εκδηλωθεί τελικά η νεοπλασία. Η συμμετοχή ιών στην ανάπτυξη καρκίνου του δέρματος και η διαλεύκανση του ρόλου τους αποκτά ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω της υψηλής συχνότητας εμφάνισης αυτής της νεοπλασίας.

Οι περισσότερες μελέτες που αφορούν στους ιούς του θηλώματος του ανθρώπου (HPV) έχουν διενεργηθεί σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς. Στην παρούσα μελέτη έγινε προσπάθεια ανίχνευσης των HPV σε 108 δείγματα μη ανοσοκατεσταλμένων ασθενών με καρκίνο του δέρματος και προκαρκινωματώδεις αλλοιώσεις. Σε όλα τα δείγματα εφαρμόστηκε η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης με πολυμεράση (PCR). Οι ιοί HPV ανιχνεύθηκαν σε ποσοστό 27% των δειγμάτων. Ακολούθως, έγινε προσπάθεια ταυτοποίησης συγκεκριμένων τύπων HPV και βρέθηκε ότι οι συχνότερα απαντώμενοι τύποι ήταν οι HPV 8 (62%) και HPV 18 (48%). Επίσης διαπιστώθηκε μόλυνση αρκετών δειγμάτων με περισσότερους από έναν τύπους.

Στη συνέχεια, τα ίδια 108 δείγματα ελέγχθηκαν για την ύπαρξη ερπητοϊών και συγκεκριμένα εξετάστηκε η παρουσία σε αυτά των ιών του απλού έρπητα (HSV), του Epstein-Barr (EBV) και του κυτταρομεγαλοϊού (CMV). Εφαρμόστηκε και εδώ η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Όλα τα δείγματα ήταν αρνητικά για την ύπαρξη HSV και EBV. Αντιθέτως, ο κυτταρομεγαλοϊός ανιχνεύθηκε στο 39% των δειγμάτων. Επιπλέον, κάποια από τα δείγματα έφεραν μόλυνση ταυτόχρονα από HPV και CMV.

Από τα ανωτέρω προκύπτει ότι οι ιοί HPV και CMV είναι παρόντες σε προκαρκινικά και καρκινικά δείγματα και ενέχονται στην καρκινογενετική διαδικασία του μη μελανωματικού καρκίνου, διαδραματίζοντας σε συνδυασμό και με άλλους παράγοντες σημαντικό ρόλο στην δημιουργία αυτής της νεοπλασίας. Η μόλυνση αρκετών δειγμάτων με διαφορετικούς τύπους HPV υποδηλώνει ότι ο συνδυασμός ενός ογκογόνου και ενός δυνητικά ογκογόνου τύπου ο οποίος θεωρείται μη παθογόνος για τον γενικό πληθυσμό, θα μπορούσε να οδηγήσει στην ανάπτυξη κλινικά έκδηλης νόσου μέσω μηχανισμών ικής

αλληλεπίδρασης. Αντίστοιχα, η σύγχρονη μόλυνση με HPV και CMV υπονοεί μία συνεργική δράση αυτών των ογκογόνων ιών στην ανάπτυξη του καρκίνου του δέρματος.

ABSTRACT

Non-melanoma skin carcinoma (NMSC) is the most frequent occurring malignancy worldwide in the Caucasian population. The ratio of basal cell carcinoma (BCC) to squamous cell carcinoma (SCC) is 5:1 and occur mainly on sun-exposed sites of the body. In the multi-event nature of carcinogenesis, it seems that genetic factors interact with environmental ones as well as with viral genes in the development of human cancer. The viral participation in the development of skin cancer and the definition of their role is of particular interest due to the high frequency of this malignancy.

Most studies examining the involvement of human papillomaviruses (HPV) in the development of cutaneous carcinomas have been done on lesions from immunosuppressed patients. In the present study, we examined the presence of HPV DNA in 108 specimens of benign and malignant lesions obtained from immunocompetent hosts. All the specimens were examined using type-specific and sensitive polymerase chain reaction (PCR) assays. 27% of the skin lesions were found positive for HPVs. Consequently, we attempted to identify specific HPV types and it was found that the most common types were HPV 8 (62%) and HPV 18 (48%). HPV 8 (62%) και HPV 18 (48%). Moreover, in several specimens we detected more than one HPV type.

The same 108 specimens, were examined for the presence of herpesviruses DNA. Specifically, we examined them for the presence of herpes simplex virus (HSV) DNA, Epstein-Barr (EBV) DNA and cytomegalovirus (CMV) DNA by applying again the polymerase chain reaction. All the specimens were negative for HSVs and EBVs. On the contrary, 39% of the skin lesions were found positive for CMVs. Moreover, in some of the lesions we detected both HPV and CMV DNA.

The above mentioned suggest that HPVs as well as CMVs are present in precancerous and cancerous skin lesions and they participate in the carcinogenesis of non-melanoma skin carcinoma and that in combination with other factors, they play an important role in the development of this neoplasia. The multiple infections of several specimens with different HPV types suggest that the combination of an oncogenic HPV and a putative oncogenic HPV which is considered non-pathogenic for the general population, could result in the development of clinical disease through mechanisms of

virus/virus interaction. The same pattern could apply as far as HPV and CMV are concerned.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ιολογίας του Τμήματος Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης, κατά το χρονικό διάστημα 1997-2003.

Θέλω να ευχαριστήσω θερμά όσους με βοήθησαν στην πραγματοποίησή της, και κυρίως τον επιβλέποντα καθηγητή κ.Δ.Α. Σπαντίδο, για το αμέριστο ενδιαφέρον του, τις πολύτιμες συμβουλές του καθώς και την επιστημονική γνώση και εμπειρία που μου μετέφερε. Πολλές ευχαριστίες οφείλω και στα μέλη της τριμελούς επιτροπής αυτής της διατριβής καθηγήτρια κα Ε. Κουμαντάκη και ιδιαιτέρως τον αν.καθηγητή κ. Ο. Ζώρα για την υποστήριξή του και την σημαντική βοήθειά του.

Ευχαριστώ επίσης τα μέλη του εργαστηρίου Ιολογίας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης και ιδιαίτερα τους: Γ. Σουρβίνο, Δ. Δοκιανάκη, Μ. Τσοπανομίχαλου, Ι. Διαλυνά, Α. Ζαφειρόπουλο και Ζ. Σαριδάκη.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένειά μου για την βοήθεια και κατανόησή τους, και κυρίως τον πατέρα μου και την μητέρα μου στους οποίους οφείλω όσα έχω επιτύχει.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1°

ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΚΑΙ ΙΟΙ

1.1 Νεοπλάσματα

Ο κύκλος των φυσιολογικών κυττάρων διέπεται από θεμελιώδεις κανόνες. Κάθε κύτταρο προέρχεται από την διαίρεση ενός προϋπάρχοντος (κυτταρικός πολλαπλασιασμός) ενώ όλα, σε άλλοτε άλλη στιγμή το καθένα, θα πεθάνουν. Η ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, των επιμέρους λειτουργιών και του θανάτου, επιτελείται μέσω γενετικών πληροφοριών που τα κύτταρα φέρουν στο γονιδίωμά τους.

Νεόπλασμα ονομάζεται μία μάζα κυττάρων που προέρχονται από τον ανθρώπινο οργανισμό (ξενιστής), των οποίων όμως η ανάπτυξη δεν διέπεται από τους κανόνες που ισχύουν για τα φυσιολογικά κύτταρα, γεγονός που συνεπάγεται διαταραχές στη λειτουργία του ξενιστή. Τα νεοπλασματικά κύτταρα μπορεί να προέλθουν από οποιαδήποτε από τις τρεις ανθρώπινες εμβρυολογικές βλαστικές στοιβάδες: ενδόδερμα, εξώδερμα, και νευρόδερμα, ή και από συνδυασμό των ανωτέρω στοιβάδων (μικτοί όγκοι). Βάσει συγκεκριμένων παθολογοανατομικών κριτηρίων (αριθμός πυρηνοκινησιών, ατυπία κυττάρων κ.α.) τα νεοπλάσματα διακρίνονται σε καλοήθη και κακοήθη. Τα κακοήθη νεοπλάσματα ονομάζονται και καρκίνος.

Τα χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων είναι ότι δεν υπόκεινται σε κυτταρικό έλεγχο, διπλασιάζονται ανεξάρτητα, εισβάλλουν σε γειτονικούς ιστούς διασπώντας την βασική μεμβράνη και αποκτούν έτσι προσπέλαση προς τα λεμφικά και αιμοφόρα αγγεία, αυξάνοντας την πιθανότητα μετάστασης σε απομακρυσμένα όργανα.

Η κυτταρική αναπαραγωγή των καρκινικών κυττάρων που δεν συνοδεύεται από ωρίμανση και διαφοροποίηση αποτελεί κύριο χαρακτηριστικό του καρκίνου (Tannock,1992). Ο ακατάσχετος ρυθμός πολλαπλασιασμού και ο σχηματισμός νεόπλαστων αιμοφόρων αγγείων (αγγειογένεση) έχουν σαν αποτέλεσμα την προοδευτική εισβολή του όγκου σε παρακείμενους ιστούς.

Οι ιδιότητες αυτές των καρκινικών κυττάρων (αυξημένος ρυθμός πολλαπλασιασμού, αγγειογένεση) μπορεί να εκφράζονται και σε ορισμένες φυσιολογικές καταστάσεις, όπως

είναι η επούλωση τραυμάτων. Όμως τον καρκίνο χαρακτηρίζουν η έκταση του φαινομένου και το απρόσφορο της εμφάνισής του.

1.2 Η πολυπαραγοντική φύση του καρκίνου

Οι περισσότεροι όγκοι παρουσιάζουν κλωνική προέλευση, δηλαδή ξεκινούν από ένα κύτταρο. Αυτό φυσικά δεν σημαίνει ότι ένας κακοήθης όγκος αναπτύσσεται εξαιτίας ενός μόνο εξαλλακτικού γεγονότος. Αντίθετα απαιτείται μία σειρά διαδοχικών αλλοιώσεων. Η πολυσταδιακή φύση του καρκίνου δεικνύεται και με την ταυτοποίηση προκαρκινικών αλλοιώσεων οι οποίες στη συνέχεια εξελίσσονται σε κακοήθη νεοπλάσματα.

Η έναρξη της καρκινογένεσης απαιτεί κάποιο γεγονός το οποίο προκαλεί μη αναστρέψιμες αλλοιώσεις στα φυσιολογικά κύτταρα του ξενιστή. Ένα τέτοιο γεγονός είναι η εισαγωγή στο φυσιολογικό κύτταρο κάποιου ογκογονιδίου ή άλλου ιικού DNA. Το επόμενο στάδιο είναι η δράση ενός υποκινητή, δηλαδή κάποια δράση που ωθεί το κύτταρο σε κακοήθη κατάσταση. Παράγοντες που δρουν ως υποκινητές είναι το κάπνισμα, το ηλιακό φως, οι νιτροζαμίνες στην διατροφή κ.ά.

Ουσιαστικό ρόλο στις ανωτέρω επιδράσεις παίζει η ανταπόκριση του ξενιστή. Οι ανοσολογικοί μηχανισμοί του ξενιστή καθορίζουν σε σημαντικό βαθμό την πορεία της κακοήθους νόσου. Αυτό διαπιστώνεται και από το γεγονός ότι οι καρκίνοι παρουσιάζουν μεγαλύτερη επίπτωση σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς, πιθανότατα επειδή το ανοσοποιητικό σύστημα δεν δύναται να αναγνωρίσει ως «ξένα» τα κύτταρα που φέρουν τα καρκινικά αντιγόνα.

Κάποιες μορφές ανοσοκαταστολής οφείλονται σε ικές λοιμώξεις. Σε αυτές τις περιπτώσεις οι ιοί προάγουν έμμεσα την ογκογενετική διαδικασία. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελούν οι ιοί της επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας (HIV). Αυτοί οι ιοί δεν διαθέτουν ογκογονίδια αλλά προκαλώντας ανεπάρκεια του ανοσοποιητικού συστήματος, επιτρέπουν την ανάπτυξη όγκων οι οποίοι υπό φυσιολογικές συνθήκες θα καταστέλλονταν.

Επίσης, γενετικοί παράγοντες καθορίζουν την εμφάνιση κάποιων μορφών καρκίνου. Έτσι, ο καρκίνος του ρινοφάρυγγα μετά από μόλυνση με ιό Epstein-Barr συμβαίνει συχνότερα σε ασθενείς που κατάγονται από την νότια Κίνα. Τέλος, σε ορισμένες κακοήθειες ενέχονται και διαιτητικοί και ορμονικοί παράγοντες.

Οι αλλοιώσεις που ωθούν αθροιστικά ένα κύτταρο να γίνει καρκινικό φαίνεται ότι κληρονομούνται σταθερά σε κυτταρικό επίπεδο και επομένως θα πρέπει να έχουν γενετική βάση. Όντως, η ανάπτυξη του καρκίνου είναι ουσιαστικά συνέπεια μιας σειράς μεταλλάξεων που συμβαίνουν στους απόγονους ενός αρχικού εξαλλαγμένου κυττάρου και αφορούν την ανώμαλη λειτουργία συγκεκριμένων γονιδίων (Σπαντίδος,1992). Τα γονίδια αυτά παίζουν σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της αύξησης και της διαφοροποίησης του κυττάρου και διακρίνονται στα ογκογονίδια και στα ογκοκατασταλτικά γονίδια.

1.3 Ογκογονίδια

Ογκογονίδια είναι τα γονίδια των οποίων η δράση συνεισφέρει απευθείας στον καρκινικό φαινότυπο. Προέρχονται από φυσιολογικά κυτταρικά ή ιικά γονίδια (πρωτο-ογκογονίδια). Τα κυτταρικά ογκογονίδια (c-onc) ταυτοποιήθηκαν αρχικά ως ομόλογα ιικών γονιδίων (v-onc) ογκογόνων ρετροϊών, στη συνέχεια όμως διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για κυτταρικά γονίδια τα οποία απέσπασαν οι ρετροϊοί κατά την ενσωμάτωσή τους στο γονιδίωμα κυττάρων θηλαστικών.

Η ογκογενετική δράση ενός ογκογονιδίου καθορίζεται από τη δυνατότητα πρόκλησης μετασχηματισμού μετά την εισαγωγή του σε κατάλληλα κύτταρα-δέκτες. Τα ογκογονίδια δρουν κατά τρόπο επικρατή, δηλαδή η ενεργοποίηση ενός αλληλόμορφου αρκεί για τη φαινοτυπική έκφραση της κακοήθειας. Ενεργοποιούνται κυρίως στα σωματικά κύτταρα των νοσούντων, επομένως η ενεργοποίησή τους αποτελεί επίκτητο εναλλακτικό συμβάν (Spandidos,1986). Τα πρωτο-ογκογονίδια είναι δυνατόν να ενεργοποιηθούν με μια σειρά αλλοιώσεων, όπως είναι οι σημειακές μεταλλάξεις, η μετάθεση χρωμοσωμικού τμήματος και η αύξηση της μεταγραφικής έκφρασης του γονιδίου.

Έως σήμερα έχουν αναγνωριστεί περίπου 200 ογκογονίδια. Τα ογκογονίδια, από βιοχημικής πλευράς, μπορεί να είναι αυξητικοί παράγοντες (π.χ.TGF), κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες (π.χ.gas), πυρηνικά ογκογονίδια (π.χ.myc) κ.ά. Τα πρωτεϊνικά προϊόντα των πρωτο-ογκογονιδίων δρουν προάγοντας την κυτταρική ανάπτυξη και παρεμβαίνοντας στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού, της απόπτωσης, της σταθερότητας του DNA και της διαφοροποίησης.

Έχει δειχθεί η συνεργασία μεταξύ διαφορετικών ογκογονιδίων. Επίσης, έχει διαπιστωθεί ότι το ίδιο ογκογονίδιο μπορεί να εμπλέκεται σε διαφορετικά στάδια της διαδικασίας της καρκινογένεσης (Spandidos,1987).

1.4 Ογκοκατασταλτικά γονίδια

Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια προέρχονται όπως και τα ογκογονίδια, από φυσιολογικά γονίδια. Αποτελούν μια ιδιαίτερη τάξη γονιδίων που δρουν ως αρνητικοί ρυθμιστές των νεοπλασιών και η απενεργοποίησή τους οδηγεί στην ανάπτυξη όγκων. Σε αντίθεση με τα ογκογονίδια που δρουν ως επικρατή, τα ογκοκατασταλτικά γονίδια παρουσιάζουν υπολειπόμενη δράση. Επομένως, για να εκδηλωθεί η δράση τους απαιτείται η λειτουργική απενεργοποίηση και των δύο αλληλόμορφων ενός ογκοκατασταλτικού γονιδίου (Knudson,1986). Αυτό μπορεί να συμβεί κληρονομικά ή επίκτητα.

Οι λειτουργίες των προϊόντων των ογκοκατασταλτικών γονιδίων είναι ποικίλες. Ασκούνται σε διάφορα στάδια της κυτταρικής λειτουργίας, όπως είναι οι φάσεις της διαίρεσης, η κυτταρική προσκόλληση και η ρύθμιση της μεταγραφής. Επίσης, δρουν επιβραδύνοντας ή αναστέλλοντας τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (απόπτωση).

Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο δρώντας σε συγκεκριμένα σημεία ελέγχου όταν γενετικές βλάβες ή περιβαλλοντικές επιδράσεις καθιστούν επισφαλή την περαιτέρω κυτταρική διαίρεση. Αυτό επιτυγχάνεται είτε επηρεάζοντας την λειτουργία άλλων ογκοκατασταλτικών γονιδίων είτε αλληλεπιδρώντας με ογκογονίδια. Οι κυριότεροι εκπρόσωποι των ογκοκατασταλτικών γονιδίων είναι το p53 και το γονίδιο του ρετινοβλαστώματος rb.

1.5 Ογκογόνοι ιοί

Οι πρώτες ενδείξεις συμμετοχής ιών στην ογκογενετική διαδικασία προήλθαν πριν από έναν αιώνα από τον Rous στον οποίο και απονεμήθηκε το βραβείο Nobel το 1968. Το 1944 ο Avery έδειξε σε βακτηρίδια ότι η γενετική πληροφορία περιέχεται στο DNA, κάτι που οδήγησε στην ιδέα ότι οι καρκίνοι μπορεί να προέρχονται από μεταλλάξεις στο γενετικό υλικό των κυττάρων. Το 1963, οι Vogt και Dulbecco καλλιέργησαν φυσιολογικά κύτταρα in vitro τα οποία μετά από μόλυνση με τον πολυόμα ιό απέκτησαν πολλά από τα

χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων. Το γεγονός αυτό, γνωστό ως μεταμόρφωση, αποτέλεσε κλειδί στην μελέτη του προκαλούμενου από ιούς καρκίνου.

Σήμερα υπάρχει αποδεδειγμένη συμμετοχή ιογενών λοιμώξεων στην αιτιολογία ενός στους επτά καρκίνους που συμβαίνουν παγκοσμίως (zur Hausen,1999), με τον ιό του θηλώματος του ανθρώπου (HPV) και τους ηπατοτρόπους ιούς (HBV,HCV) να ευθύνονται για πάνω από 80% αυτών των περιπτώσεων. Οι ιοί που μπορούν να συμβάλλουν στην δημιουργία όγκων στον άνθρωπο μπορεί να είναι είτε DNA είτε RNA ιοί.

1.5.1 RNA ογκογόνοι ιοί (Ρετροϊοί)

Τα περισσότερα είδη ζώων καθώς και ο άνθρωπος είναι φυσικοί ξενιστές των αντίστοιχων για κάθε είδος ρετροϊών. Η μετάδοση συμβαίνει με τρεις τρόπους: οριζόντια, συγγενώς και γενετικώς. Στον οριζόντιο τρόπο μετάδοσης, ο ιός διαδίδεται με άμεση επαφή ή διαμέσου της αναπνευστικής οδού μεταξύ μολυσμένων και ευαίσθητων ζώων. Η συγγενής μετάδοση είναι κάθετος τρόπος μετάδοσης κατά τον οποίο ο ιός μεταδίδεται από την μητέρα στον απόγονο είτε με ενδομήτρια μόλυνση είτε μέσω του μητρικού γάλακτος. Τέλος, η γενετική μετάδοση αποτελεί επίσης κάθετο τρόπο μετάδοσης όπου ο ιός κληρονομείται στους απογόνους ως αντίγραφο του DNA του ιού (προϊός) το οποίο είναι ενσωματωμένο στο χρωμόσωμα των κυττάρων του σπέρματος του πατρικού ζώου (Σπαντίδος,1989).

Το γένωμα του ρετροϊού περιέχει βασικά 4 γονίδια:

1. Το γονίδιο **gag** κωδικοποιεί για τα πρωτεϊνικά αντιγόνα του εσωτερικού περιβλήματος του ιού.
2. Το γονίδιο **pol** κωδικοποιεί την αντίστροφη μεταγραφή.
3. Το γονίδιο **env** κωδικοποιεί για την γλυκοπρωτεΐνη του ελύτρου του ιού.
4. Το γονίδιο **onc** κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη που ευθύνεται για την εξαλλαγή των κυττάρων.

Οι RNA ογκογόνοι ιοί διακρίνονται ανάλογα με το ογκογενετικό τους δυναμικό σε δύο ομάδες. Η πρώτη περιλαμβάνει αυτούς που επάγουν αμέσως καρκινικό φαινότυπο σε όλα τα κύτταρα τα οποία μολύνουν (transducing viruses). Οι ιοί αυτής της κατηγορίας ενσωματώνουν στο γονιδιώμά τους φυσιολογικά κυτταρικά γονίδια (πρωτο-ογκογονίδια) τα οποία μετατρέπουν σε ενεργοποιημένα ογκογονίδια μέσα στο κύτταρο του ξενιστή. Η δεύτερη ομάδα περιλαμβάνει τους βραδέως εξαλάσσοντες (slowly transforming) ρετροϊούς οι οποίοι προκαλούν καρκινική εξαλλαγή πολύ αργότερα από τη λοίμωξη και

μετά από μεσολάβηση επιπρόσθετων αλλοιώσεων στο DNA του ξενιστή. Στην περίπτωση αυτή το RNA του ιού ενσωματώνεται κοντά σε κυτταρικά πρωτο-ογκογονίδια οδηγώντας σε αυξημένη μεταγραφή τους.

Οι ρετροϊοί που προκαλούν όγκους στα ζώα διακρίνονται σε ιούς που προκαλούν σάρκωμα και σε αυτούς που προκαλούν λευχαιμία. Όσον αφορά στον άνθρωπο, έχουν περιγραφεί τέσσερις τύποι ρετροϊών και όλοι τους μολύνουν κατά προτίμηση τα T-λεμφοκύτταρα. Οι ιοί αυτοί είναι οι HTLV-I, HTLV-II και HIV-I, HIV-II. Οι ιοί HTLV-I και HTLV-II έχουν απομονωθεί από λεμφικές κακοήθειες. Ο συχνότερος είναι ο HTLV-I ο οποίος προκαλεί λεμφώματα των T-κυττάρων κυρίως στην νότια Ιαπωνία και την Καραϊβική.

Οι ιοί HIV-I και HIV-II πρωτοεμφανίστηκαν στην κεντρική Αφρική και προκαλούν το σύνδρομο της επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας (AIDS). Το σύνδρομο αυτό χαρακτηρίζεται από αναστροφή των σχέσεων T4/T8 των T-λεμφοκυττάρων, σάρκωμα Kaposi και ευκαιριακές μολύνσεις με συνηθέστερη την πνευμονία από pneumocystis carinii. Άλλες μολύνσεις περιλαμβάνουν λοιμώξεις από έρπητα, κυτταρομεγαλοϊό, τοξόπλασμα, κρυπτοσπορίδια και μυκοβακτηρίδια.

1.5.2 DNA ογκογόνοι ιοί

Οι DNA ογκογόνοι ιοί έχουν την ικανότητα να ενσωματώνουν περιοχές του γονιδιώματός τους στο γενετικό υλικό των ξενιστών. Αν και σε ορισμένες περιπτώσεις ολόκληρο το γένωμα του ιού είναι ενσωματωμένο στο χρωμόσωμα του κυττάρου του ξενιστή, εν τούτοις στις περισσότερες περιπτώσεις παρευρίσκεται μόνο ένα μικρό τμήμα του DNA του ιού. Οι ιικές πρωτεΐνες εκφράζονται στα προσβεβλημένα κύτταρα τροποποιώντας την συμπεριφορά γονιδίων που εμπλέκονται στην καρκινογένεση. Με τέτοιο μηχανισμό προκύπτει απενεργοποίηση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53 στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, μετά από ενσωμάτωση του γονιδίου ORF X του ιού της ηπατίτιδας B, στα ηπατοκύτταρα των πασχόντων από την νόσο.

Οι DNA ογκογόνοι ιοί του ανθρώπου περιλαμβάνουν τους ηπατοτρόπους ιούς (HBV, HCV), τον Epstein-Barr (EBV), τον ιό του απλού έρπητα και τους ιούς του ανθρώπινου θηλώματος (HPV). Επίσης σε αυτήν την κατηγορία περιλαμβάνονται οι αδενοϊοί και οι πολυόμα ιοί οι οποίοι είναι ογκογόνοι in vitro και in vivo αλλά δεν έχουν συνδεθεί με όγκους που απαντούν στη φύση.

Οι HBV και HCV προκαλούν πρωτοπαθή ηπατοκυτταρικό καρκίνο. Αυτός ο καρκίνος είναι κοινός στην Αφρική και την Άπω Ανατολή. Οι περιοχές υψηλής συχνότητας συμπίπτουν με εκείνες στις οποίες υπάρχει υψηλή στάθμη των φορέων του ιού. Τα καρκινικά κύτταρα του ήπατος περιέχουν ενσωματωμένα στα χρωμοσώματά τους DNA της ηπατίτιδας.

Ο ιός EBV ευθύνεται για το λέμφωμα Burkitt και το ρινοφαρυγγικό καρκίνωμα. Ο ιός του απλού έρπητα ενέχεται στην παθογένεια του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας ενώ οι HPV ευθύνονται για μια πληθώρα καρκίνων μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας, ο δερματικός καρκίνος κ.ά. Οι ανωτέρω ιοί αναπτύσσονται διεξοδικά στα ακόλουθα κεφάλαια.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

ΜΗ-ΜΕΛΑΝΩΜΑΤΙΚΟΣ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ

2.1 Εισαγωγή

Το βασικοκυτταρικό καρκίνωμα (Basal Cell Carcinoma, BCC) και το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα (Squamous Cell Carcinoma, SCC) του δέρματος είναι οι συχνότερες κακοήθειες στους Καυκάσιους. Αποτελούν το ένα τρίτο όλων των καρκίνων στις ΗΠΑ με την εμφάνιση ανά έτος 600.000 νέων περιπτώσεων και 2000 θανάτων. Η αναλογία βασικοκυτταρικού προς ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα είναι 5:1. Οι ανοσοκατεσταλμένοι ασθενείς εμφανίζουν υψηλότερη επίπτωση καρκίνου του δέρματος. Σε αυτούς τους ασθενείς ο κίνδυνος ανάπτυξης SCC είναι 250 φορές μεγαλύτερος από ότι στον γενικό πληθυσμό, και ο κίνδυνος ανάπτυξης BCC είναι 10 φορές μεγαλύτερος.

Η μακροχρόνια έκθεση στο ηλιακό φως είναι ο κύριος αιτιολογικός παράγοντας των BCC και SCC, παρόλο που μπορούν να παρουσιαστούν και σε προστατευμένες από τον ήλιο περιοχές του σώματος, όπως τα γεννητικά όργανα. Στους αιτιολογικούς παράγοντες συγκαταλέγονται επίσης η έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία (UV), χημικά καρκινογόνα (ενώσεις αρσενικού, υδρογονάνθρακες), ιοί, η ιονίζουσα ακτινοβολία, το κάπνισμα, και ο χρόνιος ερεθισμός ή η ύπαρξη ελκών.

2.2 Καλοήθειες και προκαρκινικές δερματικές παθήσεις

Υπάρχει μια πλειάδα καλοήθων δερματικών βλαβών που είτε αποτελούν πρόδρομες εστίες για την ανάπτυξη κακοήθων όγκων είτε είναι δυσχερής η διάκρισή τους από τους καρκίνους. Οι σημαντικότερες από αυτές είναι οι ακόλουθες:

Κερατοακάνθωμα: Είναι καλοήθης όγκος ο οποίος εμφανίζεται συχνότερα σε ηλικιωμένα άτομα ως μονήρης ρόδινη ή ερυθρή βλατίδα και παρουσιάζει ταχεία ανάπτυξη και αυτόματη υποχώρηση. Με την αύξηση της βλάβης το οζίδιο γίνεται λείο, επιπεδώνεται στην κορυφή και έχει σαφή όρια. Μέσα σε λίγες εβδομάδες η διάμετρος του φτάνει τα 1-2 cm. Σε 4-5 εβδομάδες το κέντρο του οζιδίου αναπτύσσει έναν κρατήρα ο οποίος γεμίζει με εύθρυπτο υλικό. Η επούλωση μπορεί να συμβεί αυτόματα καταλείποντας μια αστεροειδή εσχάρα. Η εντόπιση της βλάβης στα 2/3 των περιπτώσεων είναι στο πρόσωπο. Στις

υπόλοιπες περιπτώσεις εντοπίζεται στα χέρια και στα αντιβράχια. Η διαφορική διάγνωση θα πρέπει να γίνει από το SCC και απαιτείται βιοψία που πρέπει να περιλαμβάνει τμήμα παρακείμενου υγιούς δέρματος για να επιβεβαιωθεί η διάγνωση. Αν και το κερατοακάνθωμα υποχωρεί αυτόματα, η θεραπεία είναι συνήθως απαραίτητη λόγω της δύσμορφης ουλής που εγκαταλείπει. Θεραπευτικά, εφαρμόζονται χειρουργική αφαίρεση της βλάβης, απόξεση και διαθερμοπηξία, ενώ επιτυχής είναι και η ακτινοθεραπεία.

Ακτινική Κεράτωση: Εμφανίζεται στις εκτεθειμένες στον ήλιο περιοχές του σώματος ασθενών μέσης ηλικίας, σαν μονήρεις πλάκες ή πολλαπλές λεπιδώδεις βλάβες οι οποίες έχουν την δυνατότητα να εξελιχθούν σε καρκίνωμα σε ποσοστό 20%. Στην δημιουργία της ακτινικής κεράτωσης συνεργάζονται δύο παράγοντες: η αθροιστική δράση της ηλιακής ακτινοβολίας στο δέρμα και η ικανότητα του δέρματος να προστατεύεται από τον ήλιο με την παραγωγή μελανίνης. Αρχικά οι βλάβες παρουσιάζονται σαν μια δερματική κηλίδα με τραχεία επιφάνεια και χρώμα κιτρινωπό, καφεοειδές ή ερυθρό. Εμφανίζονται κυρίως στο πρόσωπο, στο κεφάλι, στα αντιβράχια και στα πόδια. Αργότερα η επιφάνεια γίνεται λεπιδώδης. Το μέγεθος αρχικά είναι μικρό (λίγα mm), ακολούθως οι βλάβες παχύνονται και αναπτύσσεται υπερκεράτωση. Η πάχυνση της βάσης της ακτινικής κεράτωσης με αύξηση της ερυθρότητας είναι ύποπτα σημεία για καρκινωματούδη εξαλλαγή. Το καρκίνωμα που αναπτύσσεται είναι ένα καλώς διαφοροποιημένο ακανθοκυτταρικό με μικρή τάση να μεθίσταται. Θεραπευτικά, εφαρμόζονται χειρουργική αφαίρεση της βλάβης, διαθερμοπηξία, κρυοθεραπεία ή τοπικά 5-φθοριουρακίλη.

Ψευδοεπιθηλιωματώδης Υπερπλασία: Είναι μία ογκόμορφη υπερπλασία της επιδερμίδας η οποία μπορεί να συμβεί σε έδαφος οποιασδήποτε χρόνιας φλεγμονής του δέρματος. Μπορεί να συμβεί στις περιφέρειες χρόνιων ελκών, σε μυκητιασικά και άλλα κοκκιώματα του χορίου ή ακόμη σε συνδυασμό με διάφορους όγκους. Η εμφάνιση των βλαβών εξαρτάται από την πρωτοπαθή βλάβη. Έτσι, επάνω σε κοκκιώματα το δέρμα παχύνεται ανώμαλα και γίνεται τραχύ, ενώ στα χρόνια έλκη η βλάβη είναι ερυθρή και κοκκιωματώδης. Η διαφορική διάγνωση θα πρέπει να γίνει από το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα. Η θεραπεία συμπίπτει με την αντιμετώπιση της πρωτοπαθούς εστίας.

Νόσος του Bowen: Ιστολογικά πρόκειται για ένα ενδοεπιθηλιακό ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα του δέρματος. Κύριος αιτιολογικός παράγοντας θεωρείται η παρατεταμένη έκθεση στον ήλιο. Εστίες που αναπτύσσονται σε μη εκτεθειμένες στον ήλιο περιοχές συχνά οφείλονται σε λήψη αρσενικού και σχετίζονται με αυξημένη επίπτωση σπλαχνικού καρκίνου. Κλινικά η νόσος εκδηλώνεται σαν μία ερυθριματώδης πλάκα με παρυφή ανώμαλη, επίπεδη, λεπιδώδη, μυρμικιώδη και ορισμένες φορές διαβρωτική. Απαιτείται

πλήρης εκτομή της βλάβης διότι ασθενείς με νόσο του Bowen θα αναπτύξουν SCC σε ποσοστό 11%.

2.3 Ακανθοκυτταρικό Καρκίνωμα (SCC)

2.3.1 Αιτιολογία

Το SCC αποτελεί έναν συνηθισμένο όγκο της επιδερμίδας του οποίου τα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν ποικίλου βαθμού ικανότητα ωρίμανσης. Χαρακτηριστικό σημείο του αληθούς καρκινώματος αποτελεί η καταστροφή της βασικής μεμβράνης από μάζες καρκινικών κυττάρων. Η πλειονότητα των όγκων οφείλεται στην αθροιστική δράση των υπεριωδών ακτίνων σε γενετικώς προδιατεθειμένα άτομα. Έτσι, το SCC εμφανίζεται στις εκτεθειμένες στο φως θέσεις και ιδίως σε άτομα που εργάζονται στο ύπαιθρο (αγρότες, ναυτικοί, εργάτες) καθώς και στα ανοιχτόχρωμα άτομα που έχουν πτωχή ικανότητα μελάγχρωσης. Για το λόγο αυτόν το SCC είναι συχνό στο κάτω χείλος και πολύ σπάνιο στο άνω χείλος. Επίσης στους νέγρους είναι μικρή η επίπτωσή του ενώ στον αλφισμό είναι υψηλή. Μπορεί να αναπτυχθεί και σε εστίες ακτινικής κεράτωσης.

Το SCC μπορεί να προκαλείται από χημικά καρκινογόνα που δρουν τοπικά (πίσσες, λιπαντικά, έλαια, αιθάλη) ή συστηματικά (αρσενικό). Επίσης το SCC μπορεί να αναπτυχθεί σε παλιές ουλωτικές βλάβες (ουλές εγκαυμάτων, εμβολίων), σε άτονα έλκη, σε συρίγγια, σε βλάβες λευκοπλακίας, σε ουλές από φυματιώδη ή ερυθρηματώδη λύκο, και σε λειχήνα.

Άλλοι παράγοντες που μπορεί να εμπλέκονται είναι ανοσολογικής φύσεως. Πράγματι, σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς ο κίνδυνος ανάπτυξης SCC είναι 250 φορές μεγαλύτερος από ότι στον γενικό πληθυσμό. Επίσης εμπλέκονται και γενετικοί παράγοντες. Το SCC παρουσιάζει αυξημένη επίπτωση σε ασθενείς με μελαγχρωματική ξηροδερμία και ιχθύαση.

2.3.2 Κλινική εικόνα

Αρχικά παρατηρείται μία πάχυνση του δέρματος συνήθως σε ένα υπόστρωμα χρόνιας ακτινικής βλάβης ή σε συνδυασμό με προκαρκινική κατάσταση. Στο πρόσωπο και στα χέρια αρχίζει σαν μια σκληρή πάχυνση στη βάση της ακτινικής κεράτωσης η οποία

περιβάλλεται από ερύθημα. Ορισμένες φορές το SCC αναπτύσσεται σε κλινικά υγιές δέρμα οπότε η βλάβη είναι συνήθως ένα ερυθρό οζίδιο το οποίο μεγαθύνεται σχετικά γρήγορα. Το οζίδιο δεν έχει την σκληρία των πιο διαφοροποιημένων καρκινωμάτων και γρήγορα εξελκώνεται. Αυτές οι βλάβες τείνουν να μεθίστανται συχνά στους επιχώριους λεμφαδένες.

Οι μεταστάσεις στο SCC γίνονται κυρίως λεμφογενώς στους επιχώριους λεμφαδένες οι οποίοι γίνονται σκληροί και συμφύονται με τους πέριξ ιστούς. Η λεμφαδενική προσβολή στο SCC που αναπτύσσεται σε έδαφος ακτινικής βλάβης είναι της τάξης του 0.5%. Όταν όμως το SCC αναπτύσσεται σε νόσο του Bowen, σε περιοχές ουλών ή σε φυσιολογικό δέρμα, τότε οι μεταστάσεις στους επιχώριους λεμφαδένες είναι πολύ συχνότερες (έως 30%). Στη συνέχεια μπορεί να δώσει και απομακρυσμένες μεταστάσεις στα οστά, τον εγκέφαλο και τους πνεύμονες.

2.3.3 Ιστολογική εικόνα

Ιστολογικά παρατηρείται ανώμαλος πολλαπλασιασμός των ακανθωτών κυττάρων με σχηματισμό βλαστών οι οποίες επεκτείνονται προς τα κατώτερα στρώματα, προσβάλλοντας το χόριο και διασπώντας την δερμοεπιδερμική συνένωση. Ο βαθμός διαφοροποίησης (Grading) σχετίζεται με τον βαθμό κακοήθειας και την συχνότητα εμφάνισης μεταστάσεων. Όσο υψηλότερη είναι η διαφοροποίηση τόσο μικρότερη είναι η τάση μετάστασης και η πρόγνωση είναι καλύτερη.

Στους καλώς διαφοροποιημένους όγκους τα ακανθωτά κύτταρα κερατινοποιούνται σε ποικίλα στάδια, τα δεσμοσωμάτια είναι καλώς ανεπτυγμένα και παρατηρούνται μικρές περιοχές με ομόκεντρες στιβάδες ακανθωτών κυττάρων (κεράτινες σφαίρες). Στα αδιαφοροποίητα SCC δεν υπάρχει κερατινοποίηση και παρατηρείται εκσεσημασμένη κυτταρική ατυπία, καθιστώντας δυσχερή την διάκρισή τους από το αναπλαστικό μελάνωμα, το λέμφωμα και τους μεσεγγυματογενείς όγκους.

2.3.4 Θεραπεία

Αρχικώς προηγείται η επιβεβαίωση της διάγνωσης με τη λήψη βιοψίας. Η αποτελεσματικότητα της ίασης ανέρχεται στο 95%. Μικρές βλάβες αντιμετωπίζονται με διαθερμοπηξία ή κρυοπηξία. Μεγαλύτερες βλάβες μπορεί να αφαιρεθούν χειρουργικώς ή να καταστραφούν με κρυοπηξία (υγρό άζωτο). Η ακτινοθεραπεία ενδείκνυται κυρίως στα

πρωτοπαθή SCC σε ασθενείς ηλικιωμένους και υψηλού κινδύνου για χειρουργική αντιμετώπιση.

Σε SCC με προσβολή των λεμφαδένων συνιστάται χειρουργική θεραπεία κατά την οποία αφαιρείται η πρωτοπαθής εστία και οι προσβεβλημένοι λεμφαδένες. Επί απομακρυσμένων μεταστάσεων, εφαρμόζεται συστηματική χημειοθεραπεία με πτωχά όμως αποτελέσματα.

2.4 Βασικοκυτταρικό Καρκίνωμα (BCC)

2.4.1 Αιτιολογία

Η μακροχρόνια έκθεση στον ήλιο παίζει και εδώ ρόλο, όχι όμως με τρόπο ξεκάθαρο όπως στο SCC. Το BCC είναι σπάνιο στις σκουρόχρωμες φυλές ενώ είναι συχνό στα ανοιχτόχρωμα άτομα που ζουν σε κλίματα με μεγάλη ηλιοφάνεια. Συχνότερα παρουσιάζεται στο κεφάλι και στο λαιμό, όμως το 1/3 από αυτά βρίσκεται σε θέσεις που προστατεύονται από τον ήλιο. Τα βλέφαρα είναι μία συχνή θέση για BCC ενώ είναι σπάνια για SCC. Προφανώς εμπλέκονται και άλλοι λόγοι εκτός από τις υπεριώδεις ακτίνες. Η κατανομή του BCC ακολουθεί στενά την κατανομή των τριχοσμηγματογόνων μονάδων. Το BCC ουδέποτε συμβαίνει στον βλεννογόνο των χειλιών, στις παλάμες και στα πέλματα.

Το BCC σε αντίθεση με το SCC δεν αναπτύσσεται σε προκαρκινικές καταστάσεις. Η πλειονότητα των BCC συμβαίνει χωρίς να προηγηθεί καμία άλλη βλάβη. Επίσης συμμετέχουν γενετικοί παράγοντες. Έτσι, ασθενείς με μελαγχρωματική ξηροδερμία αναπτύσσουν πολλαπλά BCC, όπως SCC ή άλλους όγκους.

2.4.2 Κλινική εικόνα

Το τυπικό BCC εμφανίζεται σαν μία ζελατινοειδής ή κηρώδης βλατίδα διαμέτρου 2-3 mm. Ο όγκος ακόμα και σε αυτό το στάδιο της βλατίδας αφορίζεται σαφώς και λεπτά αγγεία διαγράφονται ακριβώς κάτω από την επιφάνεια. Η βλατίδα μεγθύνεται βραδέως και σε μήνες ή έτη μετατρέπεται σε οζίδιο ελαφρώς ωχρό, λείο και στιλπνό το οποίο παρουσιάζει συνήθως ένα κεντρικό εντύπωμα. Το κέντρο αργότερα διαβρώνεται αυτόματα ή μετά από τραυματισμό. Η διάβρωση μπορεί να επουλωθεί και αργότερα να

υποτροπιάσει. Συνήθως όμως παραμένει έτσι με εφελκίδες. Οι εφελκίδες αφαιρούνται εύκολα αφήνοντας σαρκώδη κρατήρα.

Η περιφέρεια της βλάβης είναι επηρμένη, στερεή και κηρώδης αποτελούμενη συνήθως από μαργαριταροειδή ογκίδια με μικρά αγγεία κάτω από την επιδερμίδα. Το εύρος της ανάπτυξης ποικίλλει αλλά αργά ή γρήγορα ο όγκος προσβάλλει τους υποκείμενους ιστούς, περιλαμβάνοντας χόνδρους, οστά ακόμη και μήνιγγες.

Οι μεταστάσεις είναι εξαιρετικά σπάνιες και αφορούν κυρίως σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα. Εστίες με αυξημένο κίνδυνο μετάστασης εντοπίζονται τυπικά στο κεφάλι και τον λαιμό, είναι μεγάλες και διηθούν τοπικά και υποτροπιάζουν παρά την θεραπεία. Οι περισσότερες μεταστάσεις ανευρίσκονται στους περιοχικούς λεμφαδένες, αν και μπορεί να υπάρξουν και απομακρυσμένες μεταστάσεις.

2.4.3 Κλινικοί τύποι BCC

Μελαγχρωματικό BCC (pigmented BCC): Ο όγκος μπορεί να έχει καφεοειδές ή μαύρο χρώμα και μπορεί να μοιάζει με μελάνωμα.

BCC υπό μορφή σκληροδερμίας (morphaea-form BCC): Η πλάκα του όγκου είναι ελαφρώς εμβυθισμένη, η επηρμένη περιφέρεια είναι λιγότερο εμφανής και εξελκώνεται σπάνια. Συνήθως εντοπίζεται στο πρόσωπο.

Επιπολής BCC (superficial BCC): Η επέκταση του όγκου γίνεται προς την επιφάνεια με μικρή τάση εν τω βάθει διείσδυσης με αποτέλεσμα να παίρνει μεγάλες διαστάσεις. Η επηρμένη περιφέρεια είναι λεπτή, νηματοειδής και δύσκολα γίνεται αντιληπτή εκτός εάν η περιοχή επεκταθεί. Συνήθως εντοπίζεται στον κορμό.

Οζοελκωτικό (noduloulcerative BCC): Χαρακτηρίζεται από μία οζώδη, κηρώδη εστία με εξελκωμένο κέντρο.

Ινοεπιθηλιακό (fibroepithelial BCC): Εκδηλώνεται ως οζίδιο στο χρώμα του δέρματος χωρίς σημεία φλεγμονής στον περίξ χώρο. Εντοπίζεται κυρίως στον κορμό.

Σύνδρομο πολλαπλών BCC (naevoid BCC syndrome): Παρατηρούνται πολλαπλά BCC σαν καφεοειδείς βλατίδες ή οζίδια κυρίως στο κεφάλι, λαιμό και κορμό. Η διαταραχή μεταβιβάζεται με ένα αυτοσωματικό επικρατούν γονίδιο με μικρή διεισδυτικότητα. Το σύνδρομο συνδυάζεται με διαταραχές και από άλλα όργανα και κυρίως από το σκελετό.

2.4.4 Ιστολογική εικόνα

Το BCC προέρχεται από τα κύτταρα της βασικής στιβάδας της επιδερμίδας και των παρακείμενων δομών. Τα κύτταρα των βλαστών του BCC έχουν ομοιόμορφη εμφάνιση. Ο πυρήνας είναι μεγάλος, βαθυχρωματικός και οβάλ ή επιμήκης. Το κυτταρόπλασμα είναι λιγυστό. Τα περισσότερα BCC είναι καλά διαφοροποιημένα. Οι μιτώσεις είναι σπάνιες.

Οι κυτταρικές μάζες του όγκου συχνά περιορίζονται από κύτταρα πασσαλοειδώς διευθετημένα όπου οι επιμήκεις πυρήνες τους κείνται ο ένας παράλληλα στον άλλον. Γύρω από τις βλάβες του όγκου υπάρχει ένα στρώμα συνδετικού ιστού.

2.4.5 Θεραπεία

Η ευθρυπτότητα του BCC επιτρέπει βλάβες μικρότερες του 0.5 cm να αφαιρούνται με απόξεση (αφαίρεση του όγκου με ξέστρο και καυτηρίαση σε λίγα χιλιοστά του περιβάλλοντος δέρματος και της βάσης). Για μεγαλύτερες βλάβες, ο όγκος αφαιρείται χειρουργικά. Επίσης εφαρμόζεται η κρυοθεραπεία με υγρό άζωτο. Τέλος, σε ηλικιωμένους ασθενείς και σε βλάβες στη μύτη και γενικά στο πρόσωπο, χρησιμοποιείται η ακτινοθεραπεία.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3ο

Ο ΙΟΣ ΤΟΥ ΘΗΛΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ (HPV)

3.1 Γενικά

Οι ιοί του θηλώματος του ανθρώπου (HPV) ανήκουν στην οικογένεια Papovaviridae και είναι μη ελυτροφόροι ιοί με εικοσαεδρική συμμετρία. Μέχρι σήμερα, στον άνθρωπο 77 διαφορετικοί τύποι HPV έχουν απομονωθεί από το βλεννώδες επιθήλιο και το δέρμα.

Στους ανθρώπους, οι ιοί του θηλώματος προκαλούν ποικίλες καλοήθεις παθήσεις: μυρμηγκιές, επιθηλιακές κύστες, ενδοεπιθηλιακές νεοπλασίες, θηλώματα της γεννητικής οδού, του λάρυγγα και του φάρυγγα, κερατοακανθώματα και άλλες υπερκερατώσεις. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η συμμετοχή τους στην αιτιολογία κάποιων σημαντικών ανθρώπινων καρκίνων: συγκεκριμένοι τύποι (HPV 16,18 και άλλοι) έχουν ταυτοποιηθεί ως αιτιολογικοί παράγοντες του 90% των καρκίνων του τραχήλου της μήτρας και επίσης συνδέονται με το 50% άλλων καρκίνων του γεννητικού συστήματος.

Η μολυσματική φύση των μυρμηγκιών (warts), τόσο στους ανθρώπους όσο και στα ζώα, δείχθηκε στις αρχές του εικοστού αιώνα (zur Hausen, 1996). Οι πρώτες πειραματικές απόπειρες συσχετισμού αυτών των μολύνσεων με την ανάπτυξη καρκίνου, πραγματοποιήθηκαν από τον Rous κατά το 1930 (Rous, 1934). Η δομή του γενώματος των ιών του θηλώματος δείχθηκε από τους Crawford και Crawford (Crawford, 1963). Παρ' όλα αυτά, η μη διαθεσιμότητα συστημάτων κυτταροκαλλιέργειών και η προφανής καλοήθης φύση των μυρμηγκιών δεν οδήγησαν σε αρκετά πειράματα τα επόμενα χρόνια.

Το ενδιαφέρον για τους ιούς του θηλώματος αναπτύχθηκε σταδιακά κατά το δεύτερο μισό της δεκαετίας του 1970, εξαιτίας της υπόθεσης ότι οι HPV ενδέχεται να παίζουν ρόλο στην αιτιολογία του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας (zur Hausen, 1974). Επιπλέον, η έρευνα για τους ιούς του θηλώματος, ενισχύθηκε με την ταυτοποίηση νέων τύπων HPV σε ασθενείς πάσχοντες από μυρμηγκιώδη επιδερμοδυσπλασία (Epidermodysplasia Verruciformis, EV). Πρόκειται για μία σπάνια νόσο που χαρακτηρίζεται από την παρουσία διάσπαρτων πολλαπλών μυρμηγκιωδών ή επίπεδων βλατίδων που εντοπίζονται στο πρόσωπο, στα άνω άκρα και στις κνήμες. Η μυρμηγκιώδης επιδερμοδυσπλασία περιγράφηκε από τους Lewandowsky και Lutz (Lewandowsky, 1922) και θεωρείται πολυπαραγοντική νόσος. Στην ανάπτυξή της έχουν ενοχοποιηθεί 23 τύποι HPV, ενώ

επιπλέον υπεισέρχονται και γενετικοί (αυτοσωματική υπολειπόμενη κληρονομικότητα), ανοσολογικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες (υπεριώδης ακτινοβολία). Στο ένα τρίτο των ασθενών με EV είναι δυνατή η ανάπτυξη ακανθοκυτταρικού καρκινώματος στις βλάβες που βρίσκονται σε περιοχές εκτεθειμένες στον ήλιο.

Στη δεκαετία του 1980 απομονώθηκαν νέοι τύποι HPV, όπως οι 6 και 11 από γεννητικές βλάβες (Gissmann,1980) και ακολούθως από βιοψίες καρκίνου τραχήλου μήτρας απομονώθηκαν οι τύποι 16 και 18 (Durst,1983). Σήμερα, το ενδιαφέρον εστιάζεται στους μηχανισμούς της καρκινογένεσης από τους ιούς του θηλώματος: τον τρόπο με τον οποίο τα γονίδια αυτών των ιών επηρεάζουν την κυτταρική ανάπτυξη, πώς οι ογκοπρωτεΐνες τους αλληλεπιδρούν με τα στοιχεία του κυττάρου-ξενιστή, και μέχρι ποιού σημείου η αποτυχία συγκεκριμένων λειτουργιών του κυττάρου-ξενιστή σχετίζεται με την προκαλούμενη ογκογένεση από τους ιούς του θηλώματος. Η πρόσφατη αναγνώριση της συσχέτισης των HPV λοιμώξεων και με άλλους ευρέως διαδεδομένους ανθρώπινους καρκίνους, όπως είναι ο καρκίνος του δέρματος και του οροφάρυγγα, δείχνει την έκταση του προβλήματος. Οι ιοί του θηλώματος αναδεικνύονται ως οι συχνότεροι “ιοί καρκινώματος” και διαδραματίζουν ρόλο ως κύρια παθογόνα στην ανάπτυξη του καρκίνου (zur Hausen,1983).

3.2 Ονοματολογία και ταξινόμηση

Η γενετική ετερογένεια των ανθρώπινων ιών του θηλώματος έγινε περισσότερο εμφανής από το 1976 (Gissmann,1976). Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί 77 διαφορετικοί γονότυποι HPV στον άνθρωπο και οι αλληλουχίες του γονιδιώματός τους έχουν σχεδόν πλήρως αναλυθεί (de Villiers,1994).Σχεδόν 30 επιπλέον τμηματικές αλληλουχίες έχουν απομονωθεί από δυνητικά νέους τύπους HPV, προτείνοντας ότι ο συνολικός αριθμός τους υπερβαίνει τους 100.

Ως κριτήριο για την τυποποίηση των ιών του θηλώματος χρησιμοποιήθηκαν οι διαφορές του DNA στα ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης E6, E7 και L1 (deVilliers, 1989). Συνολική διαφορά άνω του 10% σε αυτά τα ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης χρησιμοποιήθηκε για τον ορισμό νέων τύπων. Από το 1995, για τον καθορισμό νέων τύπων χρησιμοποιήθηκαν οι διαφορές μόνο στο L1 ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης όταν αυτές υπερβαίνουν το 10%.

Βάσει της σύνθεσης του νουκλεϊκού οξέος τους, διακρίνονται υποομάδες των ιών του θηλώματος (Bernard,1994). Μία από τις μεγαλύτερες υποομάδες αποτελείται από τύπους που προσβάλλουν κυρίως τους βλεννογόνους, και μάλιστα συχνότερα της γεννητικής οδού. Περισσότεροι από 40 τύποι ανήκουν σε αυτήν την ομάδα, με κυριότερο εκπρόσωπο τον HPV 16. Μία άλλη υποομάδα αποτελείται από τους ιούς που εμφανίζονται σε βλάβες ασθενών με Epidermodysplasia Verruciformis. Εδώ, ο κυριότερος εκπρόσωπος είναι ο HPV 5. Οι ιοί αυτής της κατηγορίας ανιχνεύονται επίσης σε βλάβες ανοσοκατεσταλμένων ασθενών. Η τρίτη υποομάδα περιέχει ιούς που βρίσκονται κυρίως σε δερματικές βλάβες, με κύριο εκπρόσωπο τον HPV 4. Τέλος, η τέταρτη υποομάδα αποτελείται από ετερογενείς, μακρινά σχετιζόμενους τύπους ιών, όπως οι HPV 1, HPV 41 και HPV 63.

Μία άλλη διάκριση των HPV είναι ο διαχωρισμός τους σε τύπους υψηλού κινδύνου και τύπους χαμηλού κινδύνου, μια που οι διάφοροι τύποι ιών διαφέρουν σημαντικά όσον αφορά στο ογκογενετικό τους δυναμικό. Οι υψηλού κινδύνου ιοί μπορούν να προκαλέσουν αθανατοποίηση ανθρώπινων κερατινοκυττάρων (Durst,1987). Η πρόκληση χρωμοσωμικών απωλειών ως συνέπεια των ογκοπρωτεϊνών των υψηλού κινδύνου ιών, οι οποίες υπερπηδούν τους κυτταρικούς μηχανισμούς ρύθμισης, αναδεικνύεται ως η λειτουργικά κύρια διάκριση μεταξύ χαμηλού και υψηλού κινδύνου τύπων (Demers,1994). Χάρη σε αυτές τους τις ιδιότητες, οι υψηλού κινδύνου HPV μπορούν να δράσουν από μόνοι τους ως καρκινογόνα (zur Hausen,1991). Τα καρκινικά κύτταρα που περιέχουν γονιδίωμα HPV χαμηλού κινδύνου παρουσιάζουν συχνά τροποποιήσεις στο κυτταρικό γονίδιο p53 και εντοπίζονται σε περιοχές εκτεθειμένες σε χημικούς ή φυσικούς καρκινογόνους παράγοντες. Η μη ικανότητα αυτών των ιών να κωδικοποιούν μεταλλαξιόγόνες ογκοπρωτεΐνες, φαίνεται να είναι η κύρια αιτία της αποτυχίας τους να δράσουν από μόνοι τους ως καρκινογόνα. Έτσι, στηρίζονται στην αλληλεπίδρασή τους με άλλους μεταλλαξιόγόνους παράγοντες, προκειμένου να προκαλέσουν κακοήγη ανάπτυξη.

3.3 Δομή των ιικών σωματιδίων

3.3.1 Ιικά σωματίδια

Η διάμετρος των ιών του θηλώματος είναι περίπου 55 nm. Τα ιικά σωματίδια περιέχουν διπλής αλυσίδας κλειστό κυκλικό DNA. Το ικό DNA είναι συνδεδεμένο με πρωτεΐνες ανάλογες με τις ιστόνες (Favre,1977) και περιβάλλεται από καψίδιο αποτελούμενο από 72 καψομερή. Οι HPV δεν περικλείονται από φάκελο, γεγονός που τους καθιστά σχετικά

ανθεκτικούς στην θερμότητα και τους οργανικούς διαλύτες(Bonnez,1993). Η κύρια πρωτεΐνη του καψιδίου κωδικοποιείται από το L1 ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης. Η πρωτεΐνη L1 έχει μοριακό βάρος περίπου 55000 και είναι εξαιρετικά συντηρημένη μεταξύ των διαφόρων τύπων HPV. Το L2 ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης κωδικοποιεί για ένα πρόσθετο δομικό συστατικό του καψιδίου. Η πρωτεΐνη L2 είναι λιγότερο διατηρημένη, το μοριακό της βάρος είναι περίπου 75000, και παίζει ρόλο στην σταθεροποίηση της δομής του καψιδίου.

3.3.2 Δομή και ρύθμιση του ιικού γενώματος

Το γονιδίωμα αποτελείται από 7200-8000 ζεύγη βάσεων κλειστού κυκλικού δίκλωνου DNA, και περιέχει περίπου 10 ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης. Σε γενικές γραμμές, μόνο η μία αλυσσος είναι μεταγραφικά ενεργή, οπότε η μεταγραφή γίνεται μόνο προς την μία κατεύθυνση (Chen, 1982). Στο γονιδίωμα των ιών του θηλώματος διακρίνονται τρεις περιοχές: μία μακρά περιοχή ελέγχου (Long Control Region, LCR) η οποία καλύπτει το 10% του γονιδιώματος, μία πρώιμη (Early, E) και μία όψιμη (Late, L) περιοχή. Τα L γονίδια κωδικοποιούν για δομικές πρωτεΐνες, ενώ τα E γονίδια κυρίως για ρυθμιστικούς μηχανισμούς που σχετίζονται με την παρουσία του γονιδιώματος, την αντιγραφή του DNA, και την ενεργοποίηση του λυτικού κύκλου.

Η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης του ιού είναι πολύπλοκη και ελέγχεται από κυτταρικούς και ιικούς μεταγραφικούς παράγοντες. Οι περισσότερες από αυτές τις ρυθμίσεις ελέγχονται από την περιοχή LCR, της οποίας η νουκλεοτιδική σύσταση ποικίλλει σημαντικά μεταξύ των διαφόρων τύπων HPV. Στην LCR εδράζουν στοιχεία τα οποία ρυθμίζουν την μεταγραφή των γονιδίων E6 και E7, που αντιπροσωπεύουν τα γονίδια μετασχηματισμού για την αθανатоποίηση και την διατήρηση του κακοήθους φαινοτύπου στα HPV-θετικά κύτταρα καρκίνου τραχήλου μήτρας (Munger,1989).

Έχουν ταυτοποιηθεί αρκετοί μεταγραφικοί παράγοντες οι οποίοι προσδένονται στην LCR περιοχή του πλέον μελετημένου HPV 18. Τέτοιοι είναι οι NF-1, YY-1, AP1 και άλλοι (Chan 1989, Gloss 1989). Οι περισσότεροι από αυτούς τους παράγοντες προσδένονται στην κεντρική περιοχή του LCR, η οποία είναι περιοχή-ενισχυτής, και ρυθμίζουν την μεταγραφή του υποκινητή των γονιδίων E6 και E7 που εδράζει στο 3'-άκρο του LCR. Αν και πολλοί από τους παράγοντες διεγείρουν τον υποκινητή, εν τούτοις κάποιοι από αυτούς (ειδικά ο YY-1) έχουν διπλό ρόλο, δηλαδή διεγείρουν και καταστέλλουν τον ικό υποκινητή (Bauknecht 1992, May 1994, Bauknecht 1995).

Εκτός από την κυτταρική ρύθμιση, η ενδογονιδιακή ρύθμιση της γονιδιακής λειτουργίας των E6 και E7 από την ιική πρωτεΐνη E2 παίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση ή καταστολή αυτών των ογκογονιδίων. Η LCR του HPV 16 περιέχει 4 περιοχές πρόσδεσης για την E2. Η μία βρίσκεται στο 5'-άκρο του LCR, οι δύο εκατέρωθεν του κεντρικού τμήματος, και η άλλη στο 3'-άκρο. Η E2 περιοχή πρόσδεσης στο 3'-άκρο εμπλέκεται στην αναστολή της αντιγραφής και τροποποιεί την μεταγραφή των E6 και E7 (Thierry,1992). Το εγγύς τμήμα περιέχει την περιοχή-υποκινητή, ενώ η σύνδεση της E2 στις δύο κεντρικές περιοχές τροποποιεί την λειτουργία του υποκινητή, μεταθέτοντας το βασικό μεταγραφικό σύμπλοκο (Tan,1994).

3.4 Λειτουργίες των ιικών πρωτεϊνών E6 και E7

Οι πρωτεΐνες E6 και E7 εκφράζονται στα HPV θετικά καρκινικά κύτταρα. Μπορούν να προκαλέσουν αθανатоποίηση των ανθρώπινων κερατινοκυττάρων καθώς και άλλων κυτταρικών τύπων. Τα γονίδια E6 και E7 κωδικοποιούν για αυξητικές πρωτεΐνες και σχετίζονται με την μετάπτωση σε κακοήγη ανάπτυξη (Mansur,1993).Και οι δύο πρωτεΐνες των HPV υψηλού κινδύνου συνεργάζονται στην αθανатоποίηση και τον κυτταρικό μετασχηματισμό (Munger, 1989).

3.4.1 E6 πρωτεΐνη

Η πρωτεΐνη E6 του HPV 16 περιέχει 151 αμινοξέα. Η E6 των υψηλού κινδύνου HPV συνεργάζεται με την πρωτεΐνη E7 στην αθανатоποίηση ανθρώπινων κυττάρων. Η εισαγωγή του E6 γονιδίου σε κάποια ανθρώπινα κύτταρα μπορεί να οδηγήσει σε αθανатоποίησή τους, ακόμα και εν απουσία του E7 (Band,1990). Η E6 αυτών των HPV τύπων συνεργάζεται επίσης με τα ογκογονίδια ras στην αθανатоποίηση κυττάρων τρωκτικών (Storey,1993).

Μία σημαντική παρατήρηση σχετιζόμενη με την λειτουργία της πρωτεΐνης E6 έγινε αρχικά από τον Werness (Werness,1990), ο οποίος αποκάλυψε την πρόσδεση της E6 στην κυτταρική πρωτεΐνη p53. Η πρόσδεση αυτή επάγει την αποδόμηση της p53 μέσω του κυτταρικού πρωτεολυτικού συστήματος της ομπικουϊνίνης (Scheffner,1993). Η p53 συνδεδεμένη σε ειδικές αλληλουχίες DNA, δρά ως μεταγραφικός ενεργοποιητής και είναι απαραίτητη για την διακοπή της αύξησης που ακολουθεί την καταστροφή του κυτταρικού

DNA (Kern,1991).Τα κύτταρα που δεν διαθέτουν λειτουργική p53 δεν σταματούν όπως θα έπρεπε στην φάση G1 και εμφανίζουν γονιδιακή αστάθεια (Livingstone,1992). Η μεταγραφική ενεργοποίηση της p53 που επάγεται με την καταστροφή του DNA, αναστέλλεται από την E6 του HPV 18 (Gu,1994).

Η αλληλεπίδραση της E6 με την p53 είναι εμφανώς η κύρια αιτία πρόκλησης χρωμοσωμιακής αστάθειας σε κύτταρα μολυσμένα από υψηλού κινδύνου HPV (White,1994). Ευαισθητοποιεί τα ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα για την απόπτωση που επάγεται από την καταστροφή του DNA (Xu,1995).

Η αποδόμηση της p53 από την E6 δεν είναι η μοναδική λειτουργία αυτής της ιικής ογκοπρωτεΐνης. Η αποδόμηση της p53 δεν επαρκεί για την ενεργοποίηση της αυξητικής επίδρασης της E6 που παρατηρείται σε ανθρώπινους εμβρυικούς ινοβλάστες (Ishiwatari,1994). Επιπρόσθετα, η E6 αλληλεπιδρά και με άλλες κυτταρικές πρωτεΐνες.

3.4.2 E7 πρωτεΐνη

Η E7 πρωτεΐνη του HPV 16 αποτελείται από 98 αμινοξέα. Παρουσιάζει δομικές ομοιότητες με την E6 πρωτεΐνη, στοιχειοθετώντας μία πιθανή εξελικτική συσχέτιση μεταξύ των δύο πρωτεϊνών. Το αμινοτελικό τμήμα της E7 περιέχει δύο περιοχές που ανταποκρίνονται μερικώς στην συντηρημένη περιοχή 1 (CR-1) και πλήρως στην συντηρημένη περιοχή 2 (CR-2) των E1A πρωτεϊνών του αδενοϊού, (Phelps,1989). Οι περιοχές αυτές συμβάλλουν στο δυναμικό αθανатоποίησης της E7 (Phelps,1992).

Όπως συμβαίνει με την E1A, η E7 των υψηλού κινδύνου HPV σχηματίζει σύμπλοκο με την πρωτεΐνη pRB του ρετινοβλαστώματος (Whyte 1988, DeCaprio 1988, Dyson 1989). Η ικανότητα πρόσδεσης στην pRB της E7 των HPV υψηλού κινδύνου είναι δεκαπλάσια αυτής των χαμηλού κινδύνου (Huibregtse,1994), το οποίο πιθανώς οφείλεται στην τροποποίηση ενός μόνο αμινοξέος στην θέση 21 (Heck,1992). Εν τούτοις, η πρόσδεση στην pRB δεν προδιαθέτει γενικά σε αθανатоποίηση (Jewers,1992), κάτι που συνηγορεί σε επιπλέον λειτουργίες της E7. Το σύμπλοκο E7/pRB απελευθερώνει από το pRB τον μεταγραφικό παράγοντα E2F, ενεργοποιώντας την μεταγραφή γονιδίων που ρυθμίζουν την κυτταρική διαφοροποίηση (Bagchi 1990, Bandara 1991).

Η E7 πρωτεΐνη των υψηλού κινδύνου HPV ενώνεται με πρωτεΐνες όπως η p107 και η p130, καθώς επίσης και με την κυκλίνη A (Dyson 1992, Tommasino 1993). Η έκφραση της E7 οδηγεί σε συνεχή έκφραση των γονιδίων των κυκλινών E και A εν απουσία εξωτερικών αυξητικών παραγόντων (Zerfass,1995). Η E7 ενεργοποιεί τον υποκινητή της

κυκλίνης A μέσω μίας θέσης πρόσδεσης του E2F. Η κυκλίνη D1 δεν επηρεάζεται από την E7. Η ικανότητα της E7 για μετασηματισμό σχετίζεται με την ενεργοποίηση των κυκλινών E και A (Zerfass,1995). Η E7 πρωτεΐνη του HPV 16 μπορεί να συμπληρώνει λειτουργίες του E1A που απαιτούνται για την διέγερση των πρώιμων υποκινητών του αδενοϊού τύπου 5 (Wong,1996).

Οι πρωτεΐνες E7 των υψηλού κινδύνου HPV μπορούν να παρακάμψουν, σε μικρότερη έκταση συγκριτικά με τις E6, την διακοπή της αύξησης στην φάση G1 που επάγεται από την p53 μετά από βλάβη του DNA (Demers,1994). Αυτό αποτελεί έναν πιθανό μηχανισμό για τις χρωμοσωμικές ανωμαλίες που προκαλούνται από την E7 (Hashida,1991).

3.5 Λειτουργίες των ιικών πρωτεϊνών E1,E2,E4 και E5

Η πρωτεΐνη E1 κωδικοποιεί για ένα πολυκιστρονικό RNA, συνδέει και υδρολύει το ATP (Seo,1993), και διαθέτει ATP-εξαρτώμενη δραστηριότητα ελικάσης (Yang,1993). Η E1 είναι σημαντική για την αντιγραφή των ιών του θηλώματος (Ustav,1991). Μαζί με την περιοχή L1, το E1 ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης αντιπροσωπεύουν τις πλέον συντηρημένες περιοχές μεταξύ των διαφόρων τύπων HPV.

Το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης E2 κωδικοποιεί για δύο και πιθανώς τρεις πρωτεΐνες, οι οποίες δρουν όλες ως μεταγραφικοί παράγοντες (Bouvard,1994). Η καθεμιά από αυτές επιδρά διαφορετικά στην ιική γονιδιακή έκφραση και αντιπροσωπεύουν σημαντικούς ενδογονιδιακούς ρυθμιστές. Διαγραφή του E2 ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης παρατηρείται συχνά σε κύτταρα καρκίνου τραχήλου μήτρας (Schwarz,1985), οδηγώντας στην υπόθεση ότι αυτή η διαγραφή διευκολύνει την μεταμόρφωση ανθρώπινων κυττάρων και την μετάβασή τους σε κακοήγη κατάσταση. Επίσης, οι πρωτεΐνες E2 αλληλεπιδρώντας με την E1 διεγείρουν την αντιγραφή του ιικού DNA (Chiang 1992, Sverdrup 1994).

Η πρωτεΐνη E4 εντοπίζεται αποκλειστικά εντός της διαφοροποιημένης στοιβάδας του προσβεβλημένου επιθηλίου (Doorbar 1986, Palevsky 1991). Εικάζεται ότι αυτή η πρωτεΐνη ενέχεται στην παραγωγική λοίμωξη, πιθανώς μέσω παρεμπόδισης της φυσιολογικής διαφοροποίησης, δημιουργώντας έτσι τις ιδανικές συνθήκες για την ωρίμανση του ιού. Η αλληλεπίδραση της E4 με κυτταροκερατίνες πιθανώς ενέχεται στον καθορισμό της ιστοειδικότητας των διαφόρων τύπων του HPV (Doorbar 1991, Roberts 1993).

Η πρωτεΐνη E5 είναι υδρόφοβη και εντοπίζεται κυρίως εντός της συσκευής του Golgi, ενώ εν μέρει βρίσκεται και στην κυτταροπλασματική μεμβράνη (Burkhardt,1989). Στις HPV λοιμώξεις η E5 παρουσιάζει μικρή μόνο ικανότητα μεταμόρφωσης (Leptak 1991, Pim 1992). Θεωρείται ότι παίζει ρόλο στα αρχικά στάδια της HPV λοίμωξης, αλλά είναι προφανώς απαραίτητη για την διατήρηση της κακοήθους εξαλλαγής. Αλληλεπιδρά επίσης με τον αυξητικό παράγοντα των αιμοπεταλίων (PDGF) και την ΑΤΡάση (Hwang 1995, Conrad 1993).

3.6 Ανίχνευση του HPV

Η ανίχνευση του DNA του HPV και η τυποποίηση του ιού με μοριακές τεχνικές, μπορεί να γίνει:

Με ανάλυση κατά Southern (SB), μία τεχνική αρκετά ευαίσθητη (ανιχνεύει 0.1-1 αντίγραφο HPV/κύτταρο) και ειδική. Όμως, είναι αρκετά επίπονη και απαιτεί μεγάλες ποσότητες DNA.

Με ανάλυση dot blot/ViraPap, χρησιμοποιώντας είτε DNA (dot blot) είτε RNA ανιχνευτές (ViraPap). Η μέθοδος αυτή διαθέτει μικρότερη ευαισθησία (1-10 αντίγραφα/κύτταρο).

Με in situ υβριδισμό (ISH), με τον οποίο διατηρείται η μορφολογία του δείγματος και επιτρέπεται η εντόπιση του HPV μέσα στο κύτταρο. Διαθέτει όμως σχετικά χαμηλή ευαισθησία (20-50 αντίγραφα/κύτταρο).

Με in situ υβριδισμό σε φίλτρο (FISH), μία τεχνική που υστερεί σε ευαισθησία (10-100 αντίγραφα/κύτταρο), είναι όμως ταχεία.

Τέλος, χρησιμοποιείται η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης με πολυμεράση (PCR), η οποία διαθέτει την μεγαλύτερη ευαισθησία (1 αντίγραφο/δείγμα) και ταχύτητα, ενώ ταυτόχρονα δύναται να γίνει και τυποποίηση του ιού.

3.7 Μετάδοση και φυσική ιστορία των HPV λοιμώξεων

Η μετάδοση των ιών του θηλώματος διευκολύνεται από την παρουσία αμυχών ή πληγών στο επιθήλιο (Oriel,1971). Οι μολύνσεις της γεννητικής οδού μεταδίδονται κυρίως με την σεξουαλική επαφή. Ο αριθμός των σεξουαλικών συντρόφων σχετίζεται με την

επίπτωση της HPV λοίμωξης (Rosenfeld 1989, Bauer1993). Επίσης, μπορεί να υπάρξει μετάδοση με ιατρικά εργαλεία και με σωλήνες λείζερ (Garden 1988, Ferency 1990).

Οι δερματικές λοιμώξεις από τους ιούς του θηλώματος προέρχονται από επαφή με μολυσμένα αντικείμενα, όπως με τυχαίο τραυματισμό του επιθηλίου από μολυσματικό εξοπλισμό (Melchers,1993).

Η πλειοψηφία των μολύνσεων δεν οδηγεί σε εμφανείς βλάβες και στην πραγματικότητα μπορεί να αποβάλλονται ή να καταπολεμούνται από το ανοσοποιητικό σύστημα μέσα σε μικρό χρονικό διάστημα. Έτσι, σε περιπτώσεις σοβαρής καταστολής του ανοσοποιητικού εμφανίζεται υψηλή επίπτωση κλινικά εμφανών HPV λοιμώξεων (Frazer 1986, Palevsky 1990). Προφανώς, HPV λοιμώξεις που ανευρίσκονται σχεδόν αποκλειστικά σε ασθενείς με Epidermodysplasia Veruciformis πρέπει να είναι επίσης διαδεδομένες και στον γενικό πληθυσμό (Jablonska,1994).

Τέλος, η παρουσία του HPV έχει δείχθει και σε κλινικά ασυμπτωματικές επιδερμικές και βλεννώδεις περιοχές του τραχήλου της μήτρας, του δέρματος και του λάρυγγα (Steinberg 1983, Shamanin 1994).

3.8 Μη κακοήθεις καταστάσεις που σχετίζονται με HPV λοιμώξεις

Οι ιοί του θηλώματος προκαλούν ένα ευρύ φάσμα δερματικών, βλεννοδερματικών και βλεννωδών αλλοιώσεων. Υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των βλαβών και συγκεκριμένων τύπων HPV. Έτσι, στους σπίλους των πελμάτων ανιχνεύεται συνήθως ο HPV 1 (Orth,1977), ενώ στους σπίλους των χεριών οι HPV 2 και 4 (Orth 1977, Gissmann 1977). Επίσης, συγκεκριμένοι τύποι ιών σχετίζονται με βλάβες Bowen και άλλες ενδοεπιθηλιακές νεοπλασίες (Moy,1989).

Οι HPV λοιμώξεις της γεννητικής οδού εντοπίζονται σε βλεννώδεις ή βλεννοδερματικές περιοχές. Οι τύποι 6 και 11 που προκαλούν την μεγάλη πλειοψηφία των γεννητικών θηλωμάτων εδράζουν κυρίως σε βλεννοδερματικές περιοχές, όπως είναι τα οξυτενή κονδυλώματα των έξω γεννητικών οργάνων.

Οι στοματικές βλάβες μπορεί να περιέχουν γεννητικούς τύπους HPV. Οι τύποι 11 και 6 ανιχνεύονται συχνά στα θηλώματα του λάρυγγα (Gissmann,1982). Οι τύποι 13 και 32 έχουν ανευρεθεί αποκλειστικά στον στοματικό βλεννογόνο (Pfister 1983, Beaudenon 1987).

Η έκθεση στον ήλιο των HPV μολυσμένων περιοχών μπορεί να δράσει ως συνκαρκινογόνο ακόμα και σε μολύνσεις με τύπους χαμηλού κινδύνου (Shamanin,1996).

Η πλειονότητα των λοιμώξεων με HPV θεωρείται ότι παραμένει κλινικά ασυμπτωματική ή παράγονται μη εμφανείς μικροβλάβες.

3.9 Οι ιοί του θηλώματος στον μη-μελανωματικό καρκίνο του δέρματος

Οι αρχικές μελέτες για τους HPV διεξάχθηκαν σε ασθενείς πάσχοντες από την σπάνια κληρονομική ασθένεια Epidermodysplasia Verruciformis (EV) (Jablonska,1994). Στην νόσο αυτή η εμφάνιση των θηλωμάτων ξεκινάει στην ηλικία των 5 με 8 ετών. Στο ήμισυ των ασθενών οι βλάβες εξελίσσονται μέσα στα επόμενα 20 με 30 χρόνια. Σε ηλιοεκτεθειμένες περιοχές τους είναι δυνατή η ανάπτυξη ακανθοκυτταρικού καρκινώματος.

Περισσότεροι από 20 διαφορετικοί τύποι HPV έχουν αναγνωριστεί σε καλοήθειες βλάβες ασθενών με EV. Τα ακανθοκυτταρικά καρκινώματα που αναπτύσσονται σε αυτούς τους ασθενείς περιέχουν κυρίως τον HPV 5, κάποια από αυτά τον HPV 8, και σπανιότερα άλλους τύπους (Orth,1978). Ο αιτιολογικός ρόλος των HPV στην επαγωγή αυτών των καρκίνων δεν έχει πλήρως αποδειχτεί. Αυτό οφείλεται στις τεχνικές δυσκολίες των EV HPV-θετικών κυτταροκαλλιέργειών και στην μη ικανότητα αυτών των ιών να αθανατοποιούν ανθρώπινα κύτταρα. Με βάση το δεδομένο ότι οι περισσότερες κακοήθειες εστίες αναπτύσσονται σε περιοχές εκτεθειμένες στον ήλιο, είναι πιθανόν η αλληλεπίδραση μεταξύ της έκθεσης στον ήλιο και της HPV λοίμωξης να αποτελεί την κύρια αιτία για την ανάπτυξη κακοήθειας.

Το γενετικό υπόβαθρο προδιάθεσης σε EV δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί. Οι ασθενείς αυτοί δεν παρουσιάζουν αυξημένη ευαισθησία σε λοιμώξεις από τους γεννητικούς HPV τύπους. Έχει περιγραφεί ότι ασθενείς με EV εμφανίζουν μία αναστολή της λειτουργικότητας των natural killers κυττάρων (Majewski,1990) και των κυτταροτοξικών T κυττάρων (Cooper,1990). Βλάβες παρόμοιες με τις EV έχουν παρατηρηθεί και σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς μετά από μεταμόσχευση οργάνων (Lutzner,1980), ή μετά από λοίμωξη με τον ιό HIV (Prose,1990).

Η χρησιμοποίηση εκκινητών (primers) που καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα τύπων HPV οδήγησε στην ανίχνευση αυτών των ιών σε δερματικούς καρκίνους. Τύποι που συνδέονται με EV αλλά και ένας μεγάλος αριθμός νέων HPV τύπων εντοπίστηκαν σε περίπου 80% των ακανθοκυτταρικών και βασικοκυτταρικών καρκίνων σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς (Shamanin 1996, Berkhout 1995). Ακόμα και σε ανοσοεπαρκείς ασθενείς,

περίπου το 30% αυτών των όγκων περιείχε ταυτοποιήσιμο DNA, όταν ελέγχθηκε με 16 διαφορετικούς συνδυασμούς ζευγών εκκινητών (Shamanin,1996). Σε αυτούς τους όγκους βρέθηκε μία πληθώρα διαφορετικών HPV τύπων, χωρίς να υπερέχει κάποιος συγκεκριμένος τύπος. Το γεγονός αυτό παραμένει προς το παρόν δύσκολο να ερμηνευτεί. Εφόσον και αυτοί οι όγκοι αναπτύσσονται σε περιοχές εκτεθειμένες στον ήλιο, πάλι ως αιτιολογικός παράγοντας θα μπορούσε να εκληφθεί η αλληλεπίδραση μεταξύ της λοίμωξης από τον ιό και της UV ακτινοβολίας. Πιθανώς όλοι αυτοί οι τύποι HPV να αντιπροσωπεύουν λοιμώξεις χαμηλού κινδύνου και να είναι μη μεταλλαξιγόνοι για το DNA του κυττάρου-ξενιστή.

Όλα τα ανωτέρω απαιτούν περαιτέρω διερεύνηση. Προς το παρόν, η μη διαθεσιμότητα κατάλληλων *in vitro* συστημάτων για την ανάλυση της βιολογικής λειτουργίας των δερματικών HPV λοιμώξεων, δυσχεραίνει την αξιολόγηση του ρόλου τους στην εξέλιξη του δερματικού καρκίνου.

3.10 Ο παγκόσμιος ρόλος των HPV-σχετιζόμενων καρκίνων

Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας αποτελεί την δεύτερη σε συχνότητα κακοήθεια στις γυναίκες παγκοσμίως με περίπου 440000 νέες περιπτώσεις ετησίως. Περίπου το 10% των καρκίνων παγκοσμίως μπορεί να οφείλονται στους HPV, αν λάβουμε υπ'όψιν ότι το 50% των καρκίνων του αιδοίου, του πέους και του πρωκτού, καθώς επίσης ότι το 20% των καρκίνων του λάρυγγα, της μύτης και του στόματος σχετίζονται με τους γεννητικούς HPV τύπους.

Επίσης, υπάρχουν στοιχεία που ενοχοποιούν τους χαμηλού κινδύνου HPV στον μη-μελανωματικό καρκίνο του δέρματος, σε συνέργεια με ένα φυσικό καρκινογόνο όπως είναι η ηλιακή ακτινοβολία. Ο μη-μελανωματικός καρκίνος του δέρματος αποτελεί την πιο συχνή κακοήθεια στους καυκάσιους.

Τελικά, η πραγματική συνεισφορά των μολύνσεων από ιούς θηλώματος στους ανθρώπινους καρκίνους μπορεί να υπερβαίνει το 10% (zur Hausen,1996). Το γεγονός αυτό κατατάσσει συγκεκριμένα μέλη της ικής αυτής ομάδας ως τους πιο σημαντικούς προδιαθεσικούς παράγοντες για την ανάπτυξη καρκίνου στον άνθρωπο. Επίσης, ανοίγονται νέες προοπτικές στην πρόληψη του καρκίνου με την ενδεχόμενη εφαρμογή αντίστοιχων εμβολίων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4°

ΕΡΠΗΤΟΪΟΙ

4.1 Γενικά

Οι ερπητοΐοι οφείλουν το όνομά τους στην ελληνική λέξη «έρπω», λόγω των λανθανουσών, χρόνιων και υποτροπιαζόντων λοιμώξεων που προκαλούν. Η οικογένεια Herpesviridae περιλαμβάνει περίπου 100 ιούς. Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί 8 από αυτούς ως υπεύθυνοι για λοιμώξεις στον άνθρωπο. Υπάρχουν 3 υποοικογένειες: η υποοικογένεια **Alphaherpesvirinae** περιλαμβάνει τον ιό του απλού έρπητα τύπου 1 (HSV-1), τον ιό του απλού έρπητα τύπου 2 (HSV-2) και τον ερπητοΐο του ανθρώπου τύπου 3 ή Varicella-Zoster (VZV). Η υποοικογένεια **Betaherpesvirinae** περιλαμβάνει τον ερπητοΐο του ανθρώπου τύπου 5 ή κυτταρομεγαλοϊός (CMV), τον ερπητοΐο του ανθρώπου τύπου 6 (HHV-6) και τον ερπητοΐο του ανθρώπου τύπου 7 (HHV-7). Η υποοικογένεια **Gammaherpesvirinae** περιλαμβάνει τον ερπητοΐο του ανθρώπου τύπου 4 ή ιός Epstein-Barr (EBV) και τον ερπητοΐο του ανθρώπου τύπου 8 (HHV-8).

Για πολλά χρόνια, η επιδημιολογία των κοινών λοιμώξεων από ερπητοΐους ήταν ασαφής. Το 1950, οι Burnet και Buddingh έδειξαν ότι ο ιός του απλού έρπητα μετά την πρωτοπαθή λοίμωξη, μπορούσε να μεταπέσει σε λανθάνουσα κατάσταση και να επανενεργοποιηθεί αργότερα μετά από κάποιο εκλυτικό αίτιο. Το 1954 ο Weller απομόνωσε τον ιό του έρπητα ζωστήρα και από την ανεμευλογιά και από τον έρπητα ζωστήρα, δείχνοντας ότι και για τις δύο νόσους υπεύθυνος είναι ο ίδιος ιός.

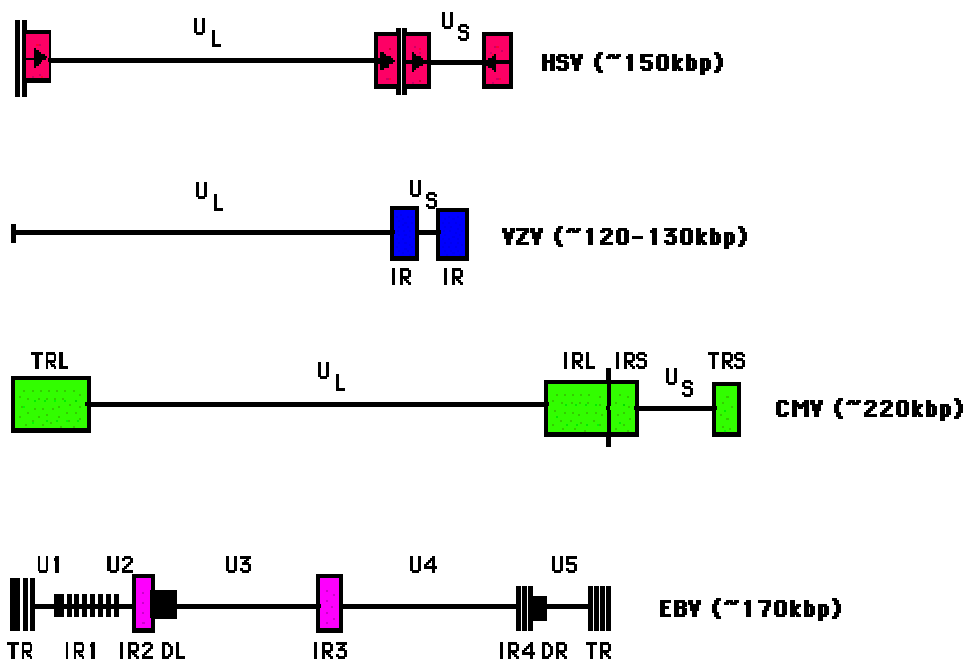
Η μορφολογία όλων των ερπητοϊών είναι παρόμοια και χαρακτηριστική. Αν και έχουν αρκετά κοινά αντιγόνα, μπορεί να γίνει διάκριση μεταξύ τους λόγω διαφορών στο γονιδιώμά τους, καθώς και με ορολογικές δοκιμασίες. Η διάμετρος των σωματιδίων των ερπητοϊών είναι 180-200 nm. Σε ένα πληθυσμό βιρίων, πολλά σωματίδια δεν έχουν έλυτρο και πολλά είναι άδεια καψίδια. Τα συστατικά του βιρίου διατάσσονται ως εξής: 1. DNA με ένα εσωτερικό κέλυφος διαμέτρου 75 nm, 2. ένα εικοσαεδρικό καψίδιο διαμέτρου 95-105 nm το οποίο αποτελείται από 162 εξαγωνικά καψομερίδια, 3. μία περιβάλλουσα κοκκιώδη ζώνη (tegument) αποτελούμενη από σφαιρικές πρωτεΐνες και 4. ένα περιβάλλον έλυτρο το οποίο περιέχει γλυκοπρωτεΐνες. Όπως και οι άλλοι ιοί με

έλυτρο, οι ερπητοϊοί είναι ασταθείς σε θερμοκρασία δωματίου και απενεργοποιούνται εύκολα από λιπιδικούς διαλύτες.

Το DNA είναι ένα μεγάλο γραμμικό δίκλωνο μόριο, βάρους 130-230 kbp. Το γονιδιώμά τους φέρει μοναδικές μεγάλες (UL) και μοναδικές μικρές (US) κωδικοποιούσες περιοχές, οι οποίες περιβάλλονται από τελικές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (IR). Οι επαναλαμβανόμενες αυτές αλληλουχίες αναστρέφονται επιτρέποντας την αναδιάταξη των περιοχών UL και US. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να υπάρχει το γονιδιώμα των ερπητοϊών σε τέσσερις ισομερείς μορφές (εικ.4.1). Επίσης η ύπαρξη αυτών των αλληλουχιών επιτρέπει την κυκλοποίηση του DNA, που απαιτείται κατά την διάρκεια του διπλασιασμού.

Το μεγάλο γονιδιώμα των ερπητοϊών κωδικοποιεί για 100 περίπου πεπτίδια. Από αυτά πολλά είναι ένζυμα που ενέχονται στη σύνθεση του DNA, όπως η DNA πολυμεράση, ενώ άλλα εμπλέκονται στην διαδικασία της πρωτεϊνοσύνθεσης, όπως είναι οι πρωτεϊνικές κινάσες.

Το έλυτρο των ερπητοϊών περιέχει γλυκοπρωτεΐνες οι περισσότερες από τις οποίες φαίνεται να είναι απαραίτητες για να εκδηλωθεί η μολυσματική δράση του ιού. Η αλληλεπίδραση αυτών των γλυκοπρωτεϊνών με κυτταρικούς υποδοχείς του ξενιστή οδηγεί στην άμεση σύντηξη του ελύτρου με την κυτταρική μεμβράνη.



Εικόνα 4.1. Η δομή του γονιδιώματος των ερπητοϊών.

Ενδοκύττωση δεν είναι απαραίτητη, αλλά μπορεί να συμβεί (εναλλακτικός τρόπος διείσδυσης). Η σύντηξη εναποθέτει το καψίδιο μέσα στο κυτταρόπλασμα, και στη συνέχεια το καψίδιο μεταναστεύει στον πυρήνα. Το εσωτερικό κέλυφος του ιού εισέρχεται μέσω μίας πυρηνικής οπής και ακολούθως το DNA του ιού κυκλοποιείται. Από την RNA polymerase II του κυττάρου-ξενιστή παράγονται περίπου 50 αγγελιοφόρα RNAs (mRNAs). Διακρίνονται 3 ξεχωριστές κατηγορίες παραγόμενων mRNAs: τα α -mRNAs (ή άμεσα πρώιμα) είναι οι πρωτεΐνες που συντίθενται πρώτες και επιτρέπουν την μεταγραφή του mRNA για την επόμενη ομάδα πρωτεϊνών (β ή πρώιμες). Τα β -mRNAs επιτρέπουν την συνέχιση της μεταγραφής του DNA, η οποία ακολουθείται από την εμφάνιση των τελευταίων πρωτεϊνών (γ -mRNAs ή όψιμων).

Η γονιδιακή έκφραση ρυθμίζεται ως εξής: εάν η μετάφραση διακοπεί νωρίς μετά την λοίμωξη, τα α -mRNAs συσσωρεύονται στον πυρήνα, και δεν μεταγράφονται άλλα ιικά mRNAs. Η σύνθεση των πρώιμων γονιδιακών προϊόντων απενεργοποιεί τα α -mRNAs και αποτελεί την έναρξη για την αντιγραφή του DNA. Κάποιες από τις όψιμες πρωτεΐνες παράγονται ανεξάρτητα από την αντιγραφή του DNA ενώ άλλες παράγονται μόνο μετά την αντιγραφή.

Τόσο οι α όσο και οι β πρωτεΐνες είναι απαραίτητες για τον γονιδιακό διπλασιασμό. Στην αντιγραφή εμπλέκονται μία εξαρτώμενη από το DNA του ιού DNA πολυμεράση και μία πρωτεΐνη συνδέουσα το DNA, σε συνδυασμό με μία πλειάδα ενζύμων όπως είναι η κινάση της θυμιδίνης, τα οποία τροποποιούν την κυτταρική βιοχημεία του ξενιστή. Επιπλέον, για την αντιγραφή του ιικού γενώματος απαιτούνται και κυτταρικές πρωτεΐνες, και για αυτόν τον λόγο η αντιγραφή του HSV λαμβάνει χώρα στον πυρήνα. Τελικώς μόνο το 25% του ιικού DNA/παραγόμενη πρωτεΐνη ενσωματώνεται σε βίρια. Τα υπόλοιπα συσσωρεύονται μέσα στο κύτταρο του ξενιστή το οποίο τελικά πεθαίνει. Το αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας είναι η παραγωγή χαρακτηριστικών σωματιδίων με πυρηνικά έγκλειστα. Η αντιγραφή του ιικού DNA αποτελεί τον στόχο αρκετών επιτυχών αντιικών φαρμάκων, όπως η ακυκλοβίρη.

4.2 Οι ιοί του απλού έρπητα HSV-1 και HSV-2

4.2.1 Γενικά

Οι ιοί του απλού έρπητα 1 και 2 αποτελούν τους πλέον σημαντικούς παθογόνους για τον άνθρωπο εκπροσώπους της οικογένειας των ερπητοϊών. Ο τύπος HSV-1 συνδέεται με λοιμώξεις του προσώπου και εγκεφαλίτιδα, ενώ ο τύπος HSV-2 προκαλεί λοιμώξεις στα γεννητικά όργανα και μπορεί να μεταδοθεί από την μητέρα στο έμβρυο. Και οι δύο ιοί καταλείπουν λανθάνουσες λοιμώξεις στους αισθητικούς νευρώνες, και κατά την επανενεργοποίησή τους προκαλούν εστίες κοντά στα σημεία εισόδου τους στο σώμα (Whitley,2001).

Οι HSV-1 και HSV-2 έχουν διαφορετικούς τρόπους μετάδοσης, η επίπτωσή τους είναι παγκόσμια και ανεξάρτητη από τις εποχιακές συνθήκες, και μολύνουν μόνον ανθρώπους. Οι περισσότεροι άνθρωποι έχουν έρθει κάποια στιγμή της ζωής τους σε επαφή με τον ιό και σε αυτούς ο ιός παραμένει σε λανθάνουσα κατάσταση και μπορεί να επανενεργοποιηθεί. Η ορομετατροπή μετά από μόλυνση με HSV-1 σε λιγότερο αναπτυγμένες χώρες λαμβάνει χώρα σε ασθενείς νεαρότερης ηλικίας (30% των παιδιών κάτω των 5 ετών και 70-80-% των εφήβων). Η λοίμωξη με HSV-2 είναι σεξουαλικά μεταδιδόμενη. 20-30 % των εφήβων είναι οροθετικοί για τον HSV-2 και το ποσοστό αυτό αυξάνει στο 35-60% για ασθενείς ηλικίας 60 ετών. Παράγοντες που σχετίζονται με την λοίμωξη από HSV-2 περιλαμβάνουν το φύλο (συχνότερα σε γυναίκες), την φυλή (συχνότερα σε Αφρο-Αμερικανούς), την οικογενειακή κατάσταση και τον αριθμό των σεξουαλικών συντρόφων (Nahmias,1990).

Οι βιολογικές ιδιότητες του HSV που καθορίζουν την πορεία της λοίμωξης από αυτόν είναι η ικανότητά του να εισδύει στα νευρικά κύτταρα, η νευροτοξικότητα και η ικανότητα παραμονής του σε λανθάνουσα κατάσταση στα ραχιαία γάγγλια και σε άλλες θέσεις του κεντρικού νευρικού συστήματος. Για την έναρξη της λοίμωξης, ο ιός πρέπει να έρθει σε επαφή με τους βλεννογόνους ή με δέρμα που να παρουσιάζει λύση της συνέχειάς του. Ο τύπος της λοίμωξης που θα επακολουθήσει είναι συνάρτηση της κατάστασης του ανοσοποιητικού συστήματος. Έτσι, ασθενείς που δεν έχουν έρθει ποτέ σε επαφή με τον ιό (είναι δηλαδή οροαρνητικοί), μετά την πρώτη τους έκθεση σε αυτόν θα αναπτύξουν «πρωτοπαθή» λοίμωξη. Η «αρχική» λοίμωξη λαμβάνει χώρα όταν ένας ασθενής που έχει

αντισώματα είτε για τον HSV-1 είτε για τον HSV-2, μολυνθεί για πρώτη φορά με τον άλλο τύπο του ιού (Whitley).

Ακολούθως, ο ιός από την αρχική θέση προσβολής μεταναστεύει εντός 48 ωρών στους αισθητικούς νευρώνες, όπου παραμένει σε λανθάνουσα κατάσταση. Αυτό πρακτικά φανερώνει την αδυναμία των διαφόρων αντιερπητικών φαρμάκων και εμβολίων να προστατεύσουν ή να προλάβουν την λανθάνουσα κατάσταση του ιού. Η εγκατάσταση του ιού στα γάγγλια γίνεται πιθανώς για να προφυλαχθεί ο ιός από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή. Κατά την λανθάνουσα φάση, το DNA του ιού βρίσκεται σε επισωματική μορφή εντός των νευρώνων και εκφράζονται από τον ιό μόνο περιορισμένες πρωτεΐνες που απαιτούνται για την διατήρηση αυτής της λανθάνουσας φάσης.

Παράγοντες που επανενεργοποιούν τον ιό ώστε να επανέλθει στην περιφέρεια και να εκδηλώσει την λοιμογόνο δράση του (υποτροπή της νόσου) περιλαμβάνουν κόπωση, ανοσοκαταστολή, εξασθένηση, stress, υπερϊώδης ακτινοβολία και ιστική καταστροφή. Για την ενεργοποίηση του ιού συμμετέχει ενεργά το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη ICPO, οπότε ο ιός μεταπίπτει στην ενεργό (λυτική) φάση. Άλλες πρωτεΐνες που ενέχονται στην ενεργοποίηση του ιού είναι οι VP16, ICP4 και ICP27 (Ward,1994).

4.2.2 Κλινική εικόνα

Οι πρωτοπαθείς, οι αρχικές και οι υποτροπιάζουσες ερπητικές λοιμώξεις μπορεί να είναι ασυμπτωματικές. Η συμπτωματική πρωτοπαθής λοίμωξη από τον HSV-1 χαρακτηρίζεται από εστίες στον βλεννογόνο του στόματος και των ούλων (διάρκειας 2-3 εβδομάδων) και εμπύρετο (38.3-40°C) το οποίο υποχωρεί εντός 3-5 ημερών. Οι φυσαλίδες εμφανίζονται σαν λευκωπές πλάκες στη γλώσσα, την υπερώα και τον φάρυγγα, οι οποίες στη συνέχεια εξελκώνονται και καλύπτονται από ψευδομεμβράνες. Συνυπάρχει λεμφαδενοπάθεια. Εξελκωμένες εστίες εντός της στοματικής κοιλότητας είναι ενδεικτικές πρωτολοίμωξης, ενώ εστίες στην περιοχή των χειλέων υποδηλώνουν υποτροπιάζουσα λοίμωξη.

Οι υποτροπιάζουσες λοιμώξεις από τον HSV-1 χαρακτηρίζονται από άλγος, καύσος και κνησμό τα οποία προηγούνται της εμφάνισης των εστιών κατά λίγες ώρες. Ακολούθως, εμφανίζονται οι φυσαλίδες με συνηθέστερες θέσεις εντόπισής τους τα χείλη, τα ρουθούνια, οι παρειές και τα βλέφαρα. Το υγρό των φυσαλίδων αρχικά είναι διαυγές και αργότερα γίνεται οροπυώδες. Στην συνέχεια οι φυσαλίδες σπάνε, σχηματίζονται εφελκίδες και οι βλάβες επουλώνονται μέσα σε 8-10 ημέρες (Spruance,1977).

Η πρωτοπαθής λοίμωξη των οφθαλμών από τον HSV-1 προκαλεί ερπητική κερατοεπιπεφυκίτιδα που χαρακτηρίζεται από έντονη πυώδη επιπεφυκίτιδα με θολερότητες και επιπολής εξελκώσεις του κερατοειδούς (γεωγραφικά έλκη). Οι πρωταίιοι λεμφαδένες είναι διογκωμένοι και οι υποτροπές συχνές.

Η ερπητική εγκεφαλίτιδα χαρακτηρίζεται από εμπύρετο, παραισθήσεις και παραλύσεις. Ο HSV μπορεί να προσβάλλει όλες τις περιοχές του νευρικού συστήματος προκαλώντας μηνιγγίτιδα και μυελίτιδα. Η νόσος είναι συχνά θανατηφόρος.

Οι πρωτοπαθείς γεννητικές λοιμώξεις από τον HSV-2 εμφανίζονται σαν κυστίδια τα οποία στη συνέχεια διαπυούνται και εξελκώνονται. Συνυπάρχει καυσαλγία και λεμφαδενοπάθεια. Στον άνδρα εντοπίζονται στη βάλανο, στην ακροποσθία ή στο σώμα του πέους. Στην γυναίκα, οι βλάβες βρίσκονται στα έξω γεννητικά όργανα, στον κόλπο και στον τράχηλο της μήτρας (Corey,1983). Οι μη πρωτοπαθείς αρχικές γεννητικές λοιμώξεις προκαλούν ηπιότερα συμπτώματα από τις πρωτοπαθείς διότι τα αντισώματα έναντι στον HSV-1 ελαττώνουν την βαρύτητα της νόσου από τον HSV-2.

Οι υποτροπιάζουσες γεννητικές ερπητικές λοιμώξεις στους άνδρες παρουσιάζονται ως 3-5 φουσαλίδες στο σώμα του πέους. Στις γυναίκες εμφανίζονται ως κυστικές και ελκωτικές βλάβες στην περιοχή των γεννητικών οργάνων. Η διάρκεια της νόσου είναι 8-10 ημέρες και το 1/3 των ασθενών θα παρουσιάσει πάνω από 6 επεισόδια υποτροπών ετησίως.

Η νεογνική ερπητική λοίμωξη συνήθως συμβαίνει κατά την διέλευση του νεογνού από τον γεννητικό σωλήνα, όταν υπάρχουν ερπητικές βλάβες στα γεννητικά όργανα της μητέρας. Σπανιότερα δύναται να μεταδοθεί από την μητέρα στο έμβρυο κατά την κύηση ή στην περίοδο που ακολουθεί τον τοκετό (Brown,1995). Η κλινική εικόνα είναι δραματική και χαρακτηρίζεται από υψηλό πυρετό, ίκτερο, δερματικές ερπητικές βλάβες, εγκεφαλίτιδα, εκτεταμένες σπλαχνικές νεκρώσεις, αιμορραγία και θάνατο.

4.2.3 Διάγνωση και θεραπεία

Η διάγνωση τίθεται με απομόνωση του ιού σε κυτταρικές καλλιέργειες ή με ανίχνευση του DNA του ιού με PCR. Οι κυτταροκαλλιέργειες είναι φθηνότερες από την PCR. Οι ορολογικές μέθοδοι διάγνωσης χρησιμεύουν μόνο για να καθορίσουν την προηγούμενη έκθεση στον ιό και δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον σχεδιασμό της θεραπείας. Για την διάγνωση των ερπητικών λοιμώξεων του νευρικού συστήματος, η μέθοδος εκλογής είναι η ανάλυση με PCR του εγκεφαλονωτιαίου υγρού (Lakeman,1995).

Η κλασική θεραπεία για την ερπητική λοίμωξη είναι η ακυκλοβίρη, ένα συνθετικό ανάλογο πουρίνης το οποίο δρα στο επίπεδο της αντιγραφής του ιικού DNA. Απαραίτητη για την ενεργοποίηση της ακυκλοβίρης είναι η κινάση της θυμιδίνης, ένα ένζυμο φωσφορυλίωσης που κωδικοποιείται από τους HSV. Οι HSV μπορούν να αναπτύξουν ανοχή στην ακυκλοβίρη μέσω μεταλλάξεων στο ιικό γονίδιο που κωδικοποιεί την κινάση της θυμιδίνης, δημιουργώντας στελέχη είτε με έλλειψη του ενζύμου είτε στελέχη στα οποία το ένζυμο δεν μπορεί να φωσφορυλιώσει την ακυκλοβίρη (Erlich,1989). Φάρμακα ανάλογα της ακυκλοβίρης είναι η βαλακυκλοβίρη και η φαμκυκλοβίρη (Balfour,1999).

Η ακυκλοβίρη μπορεί να χορηγηθεί τοπικά, από το στόμα ή ενδοφλεβίως. Η χορήγησή της δεν ελαττώνει την συχνότητα των υποτροπών. Χρησιμοποιείται προφυλακτικά σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς στους οποίους ελαττώνει το ποσοστό των συμπτωματικών HSV λοιμώξεων από 70% σε 5-20% (Saral,1981). Η ενδοφλέβια χορήγηση ακυκλοβίρης ελαττώνει το ποσοστό των θανάτων από ερπητική εγκεφαλίτιδα και 38% αυτών των ασθενών επανακτούν φυσιολογική νευρολογική λειτουργία (Whitley,1986). Η ερπητική επιπεφυκίτιδα αντιμετωπίζεται με χορήγηση ακυκλοβίρης ή τριφλουριδίνης. Παρενέργειες έχουν περιγραφεί μόνο από την ενδοφλέβια χορήγηση ακυκλοβίρης και συνίστανται σε νεφροτοξικότητα και διαταραχές του ΚΝΣ (διέγερση, παραισθήσεις, αποπροσανατολισμός και τρόμος).

Έχουν γίνει προσπάθειες για την δημιουργία εμβολίων έναντι του HSV αλλά η ιδιότητά του να υποτροπιάζει μέσω κυτταρικών μηχανισμών ανοσίας, τα καθιστά δυσχερή ως θεραπευτική επιλογή (Burke,1993). Οι έρευνες στρέφονται τώρα στη γονιδιακή θεραπεία, με στόχο την δημιουργία μεταλλαγμένων στελεχών HSV τα οποία χαρακτηρίζονται από αλλοιώσεις σημαντικών γονιδίων τους και θα χρησιμεύσουν ως φορείς αυτών των μεταλλάξεων στα κύτταρα του κεντρικού νευρικού συστήματος (Markert,2000).

4.3 Ο ιός Epstein-Barr (EBV)

4.3.1 Γενικά

Ο ιός EBV ή ερπητοϊός του ανθρώπου τύπου 4 ανήκει στους γ ερπητοϊούς. Είναι ευρέως διαδεδομένος παγκοσμίως και άνω του 90% του ανθρώπινου πληθυσμού έχει έρθει σε επαφή με τον ιό. Δεν υπάρχει ζώο που να λειτουργεί ως ξενιστής, αλλά οι

ιδιότητές του έχουν μελετηθεί εκτενώς σε σειρές μεταμορφωμένων ανθρώπινων κυττάρων. Παρουσιάζει διπλό κυτταρικό τροπισμό: για τα ανθρώπινα Β-λεμφοκύτταρα (μη παραγωγική λοίμωξη) και για τα επιθηλιακά κύτταρα (παραγωγική λοίμωξη). Βάσει του πολυμορφισμού του EBNA-2 γονιδίου του διακρίνεται σε δύο τύπους: τον τύπο 1 (ή τύπο Α) και τον τύπο 2 (ή τύπο Β). Έχει αναφερθεί ότι ο τύπος 2 συνδέεται συχνά με Τ-λεμφώματα, ακόμα και σε περιοχές όπου ο τύπος 1 παρουσιάζει μεγαλύτερη επίπτωση (Miyashita,1991).

Η πρωτοπαθής λοίμωξη από τον EBV αρχίζει στο επιθήλιο του στοματοφάρυγγα, όπου τα βίρια του ιού αντιγράφονται και στην συνέχεια απελευθερώνονται από τα επιθηλιακά κύτταρα μέσα στη σίελο (Cohen,1997). Ακολούθως, τα βίρια εισχωρούν στα Β-λεμφοκύτταρα τα οποία φέρουν υποδοχείς για τον ιό κοινούς με συστατικά του συμπληρώματος, και παραμένουν εντός του πυρήνα σε επισωματική μορφή. Αν και τα κύρια κύτταρα-στόχοι του ιού είναι τα ανθρώπινα Β-λεμφοκύτταρα, προσβάλλει επίσης τα επιθηλιακά κύτταρα, τα κύτταρα των πόρων των σιελογόνων αδένων, τα Τ-λεμφοκύτταρα, τα NK κύτταρα, τα μακροφάγα, τα κύτταρα των λείων μυϊκών ινών και τα ενδοθηλιακά κύτταρα (Iwatsuki,2000).

Τα προσβεβλημένα από τον ιό Β-κύτταρα εκφράζουν ποικίλα EBV αντιγόνα τα οποία δρουν ως μόρια-στόχοι που αναγνωρίζονται από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, μόνο ένα μικρό ποσοστό των προσβεβλημένων Β-κυττάρων παραμένει σε λανθάνουσα κατάσταση χάρη στον ανοσοποιητικό μηχανισμό, ο οποίος δρα μέσω του συστήματος MHC-I παράγοντας ειδικά για τα αντιγόνα του EBV κυτταροτοξικά Τ-κύτταρα. Όταν εξασθενήσει η ανοσοποιητική άμυνα του οργανισμού, επανενεργοποιούνται τα προσβεβλημένα Β-κύτταρα με επακόλουθο πολυκλωνικό πολλαπλασιασμό και εξάπλωση του EBV σε άλλους ιστούς.

Η λανθάνουσα EBV λοίμωξη διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην επαγωγή του κακοήθους φαινοτύπου και την μεταμόρφωση των μολυσμένων κυττάρων (Shimizu,1994). Κάποια παράγωγα ικών γονιδίων τα οποία συνδέονται με την λανθάνουσα μόλυνση, χαρακτηρίζονται από βιολογικές ιδιότητες που ενέχονται στην κυτταρική αθανатоποίηση (Komano,1997). Θεωρείται ότι πολλοί ιοί χρησιμοποιούν μία πλειάδα μηχανισμών που τους επιτρέπει να διαφεύγουν από τους ανοσοποιητικούς μηχανισμούς του ξενιστή και να εγκαταστήσουν λανθάνουσα λοίμωξη. Τέτοιοι μηχανισμοί είναι η αναστολή της έκφρασης των ικών αντιγόνων, η απάλειψη των ειδικών για τον ιό Τ-κυττάρων, η δημιουργία μεταλλαγμένων ιών που παράγουν μη-αντιγονικούς

επίτοπους, η παρέμβασή τους στην αντιγονική διαδικασία και η ανοσολογική ανοχή λόγω λοίμωξης σε νεαρή ηλικία (McMichael,1998).

Στην λανθάνουσα λοίμωξη, τα EBV πυρηνικά αντιγόνα (EBNA) αποτελούνται από τα EBNA-1, 2, 3A, 3B, 3C. Μετά την έκφραση των EBNA, έπεται η έκφραση των λανθανόντων μεμβρανικών πρωτεϊνών (LMPs), συμπεριλαμβανομένων των LMP-1, 2A και 2B. Όλα τα EBNAs και LMPs, εκτός από το EBNA-1, είναι μόρια-στόχοι για τα ειδικά για τον EBV κυτταροτοξικά T-κύτταρα (Cohen,1997).

Το LMP-1 έχει ογκογενετική δράση προκαλώντας αυξημένη έκφραση κυτταρικών γονιδίων και αναστέλλοντας την απόπτωση με την επαγωγή του bcl-2 (Henderson,1991). Πρόσφατα διαπιστώθηκε ότι το LMP-1 είναι ένα ικό ανάλογο της οικογένειας των υποδοχέων του TNF και είναι σημαντικό για την μεταμόρφωση των B-κυττάρων (Liebowitz,1998).

Το EBNA-1 είναι σημαντικό για την αντιγραφή των επισωματικών μορφών του EBV κατά την λανθάνουσα φάση. Το EBNA-2 μπορεί να επάγει την μεταμόρφωση των B-κυττάρων αυξάνοντας την έκφραση των LMPs.

Βασιζόμενοι στα διάφορα πρότυπα έκφρασης των EBV προϊόντων της λανθάνουσας φάσης, διακρίνουμε 3 ξεχωριστούς τύπους λανθάνουσας λοίμωξης *in vivo* (Rowe,1992). Στον τύπο I εκφράζεται μόνο το EBNA-1. Με αυτόν τον τρόπο, ο ιός παραμένει αόρατος για το ανοσοποιητικό σύστημα γιατί η κυτταρική ανοσία κατευθύνεται έναντι άγνωστων πρωτεϊνών και δεν είναι προγραμματισμένη να αναγνωρίζει το ξένο νουκλεϊκό οξύ. Ο τύπος I ισχύει στα νεοπλασματικά κύτταρα ασθενών με λέμφωμα Burkitt. Στον τύπο II, εκφράζονται το EBNA-1 και τα LMPs. Η αναστολή της έκφρασης των υπόλοιπων γονιδίων επιτρέπει στα μολυσμένα κύτταρα να διαφεύγουν από την ανοσοποιητική επιτήρηση, όπως συμβαίνει στα κύτταρα ασθενών με καρκίνωμα του ρινοφάρυγγα και T-λεμφώματα. Τέλος, σε ασθενείς με AIDS και B-λεμφώματα καθώς και σε ανοσοκατεσταλμένους εκφράζονται όλα τα αντιγόνα (τύπος III) αλλά είναι εξασθενημένη η ανοσολογική απάντηση του ξενιστή (Iwatsuki,2000).

4.3.2 Κλινική εικόνα

Η πρωτοπαθής λοίμωξη συνήθως προκαλεί μία ήπια, αυτοπεριοριζόμενη ασθένεια και συμβαίνει κυρίως στην αρχή της παιδικής ηλικίας. Στα νεαρά άτομα η οξεία λοίμωξη προκαλεί λοιμώδη μονοπυρήνωση, ενώ σπανιότερο είναι το σύνδρομο Gianotti-Crosti (Strauss,1993). Επειδή η EBV λοίμωξη στην Ασία και την Αφρική λαμβάνει χώρα κατά

την παιδική ηλικία, η συμπτωματική λοιμώδης μονοπυρήνωση είναι λιγότερο συχνή σε αυτές τις χώρες από ότι στις δυτικές χώρες και τις ΗΠΑ, όπου η πρωτοπαθής EBV λοίμωξη συμβαίνει στην εφηβεία.

Κατά την οξεία EBV λοίμωξη, η έντονη ανοσοποιητική αντίδραση από τα ενεργοποιημένα T-κύτταρα έναντι των προσβεβλημένων B-κυττάρων, προκαλεί χαρακτηριστική κλινική εικόνα με εμπύρετο, κυνάγχη, λεμφαδενοπάθεια και λεμφοκυττάρωση. Στο ήμισυ των περιπτώσεων συνυπάρχει σπληνομεγαλία. Περιστασιακά εμφανίζεται κηλιδοβλατιδώδες ή πετεχειώδες εξάνθημα. Συνήθης εκδήλωση της λοιμώδους μονοπυρήνωσης είναι η ηπατίτιδα με ηπατομεγαλία και ίκτερο. Σπανιότερα υπάρχει προσβολή του ΚΝΣ με κεφαλαλγία και επώδυνη νευρίτιδα.

Σε ανοσοκατεσταλμένους ή ανοσοανεπαρκείς ασθενείς (ασθενείς με AIDS ή με μεταμόσχευση νεφρού) προκαλείται μία πλειάδα νόσων που σχετίζονται με τον λεμφοκυτταρικό πολλαπλασιασμό (Liloglou,1994). Η λανθάνουσα λοίμωξη από τον EBV έχει συνδεθεί με διάφορες κακοήθειες καταστάσεις σε μη ανοσοκατεσταλμένα άτομα, στις οποίες περιλαμβάνονται το αφρικανικό λέμφωμα Burkitt, το καρκίνωμα του ρινοφάρυγγα, περιφερικά λεμφώματα T-κυττάρων, ο γαστρικός καρκίνος κ.ά. (Jones 1988,Harabuchi 1996).

4.3.3 Διάγνωση και θεραπεία

Στις περιπτώσεις πρωτοπαθούς λοίμωξης, ανιχνεύονται υψηλοί τίτλοι ειδικών για τον ιό IgM και IgG αντισωμάτων κατά των αντιγόνων της κάψας του ιού (Virus Capsid Antigen,VCA). Τα IgG αντισώματα ανιχνεύονται εφ'όρου ζωής. Αύξηση των τίτλων των IgG αντισωμάτων υποδηλώνει ενεργοποίηση του EBV. Σε περιπτώσεις χρόνιας λοίμωξης, ανιχνεύονται υψηλοί τίτλοι IgG αντισωμάτων. Τα IgA αντισώματα αυξάνονται σε ασθενείς με καρκίνωμα του ρινοφάρυγγα. Στις περισσότερες περιπτώσεις EBV λεμφοπολλαπλασιαστικών διαταραχών δεν παρατηρείται σημαντική αύξηση των τίτλων των αντισωμάτων (Strauss,1993). Η ανίχνευση των EBV αντισωμάτων γίνεται με την δοκιμασία Paul Bunnell (δοκιμασία συγκόλλησης ερυθρών αιμοσφαιρίων προβάτου) και με τεχνικές ανοσοφθορισμού.

Η εφαρμογή της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) επιτρέπει την ανίχνευση του DNA του ιού ακόμα κι όταν αυτό υπάρχει σε μικρές ποσότητες. Λόγω της υψηλής της ευαισθησίας, τα αποτελέσματα της PCR θα πρέπει να ερμηνεύονται

προσεκτικά διότι δείγματα επιμολυσμένα με EBV ή η παρουσία παρακείμενων EBV μολυσμένων κυττάρων μπορούν να δώσουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα (Khanim,1996).

Θεραπευτικά, όσον αφορά στην οξεία EBV λοίμωξη δεν υπάρχει ειδική θεραπεία. Χρησιμοποιούνται συμπτωματικά μέτρα και χορηγούνται μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη, ενώ σε βαριά πάσχοντες μπορεί να είναι αποτελεσματικά και τα κορτικοστεροειδή. Οι επιπλοκές (ηπατίτιδα, μυοκαρδίτιδα, εγκεφαλίτιδα) αντιμετωπίζονται συμπτωματικά.

Ως προς τα λεμφώματα που οφείλονται σε EBV, χορηγούνται διάφορα χημειοθεραπευτικά σχήματα που περιλαμβάνουν δοξορουμπικίνη, πρεδνιζόνη και κυκλοφωσφαμίδη. Εν τούτοις, τα επιθετικά EBV λεμφώματα παρουσιάζουν αντίσταση στη συμβατική χημειοθεραπεία. Αυτό πιθανώς οφείλεται στο σύνδρομο συστηματικής αιμοφαγοκυττάρωσης και σε έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με ανθεκτικότητα σε πολλαπλά φάρμακα (Su,1995). Προς το παρόν για αυτές τις περιπτώσεις δεν υπάρχει καθιερωμένο θεραπευτικό πρωτόκολλο. Σε επίπεδο κλινικών δοκιμών χρησιμοποιούνται αντί-CD19 μονοκλωνικά αντισώματα τα οποία σταματούν τον κυτταρικό κύκλο σε κυτταρικές σειρές λεμφώματος Burkitt in vitro.

4.4 Ο Κυτταρομεγαλοϊός (CMV)

4.4.1 Γενικά

Ο κυτταρομεγαλοϊός (CMV) ή ερπητοϊός του ανθρώπου τύπου 5 ανήκει στους β-ερπητοϊούς. Ο ιός CMV, αντίθετα από τον ιό HSV, δεν αναστέλλει την βιοσύνθεση μακρομορίων στο κύτταρο-ξενιστή αλλά διεγείρει την σύνθεση κυτταρικού DNA, RNA και πρωτεϊνών (α ή άμεσα πρώιμες, β ή πρώιμες, γ ή όψιμες). Ένα από τα πιο μελετημένα γονίδια του CMV είναι το άμεσα πρώιμο γονίδιο IE2 το οποίο ενεργοποιεί τόσο την ιική όσο και την κυτταρική έκφραση γονιδίων, και ταυτόχρονα έχει ικανότητα πρόσδεσης με την πρωτεΐνη του ογκοκατασταλτικού γονιδίου Rb με τρόπο παρόμοιο με αυτόν των πρωτεϊνών των ογκογόνων ιών, π.χ. αδενοϊός (E1A), HPV (E7) κ.ά.

Κατά την λοίμωξη με τον CMV, ιικά σωματίδια με έλυτρο παρατηρούνται με την μορφή κενοδοπίων στο κυτταρόπλασμα και συντήκονται με τις κυτταρικές μεμβράνες επιτρέποντας την έξοδο των ώριμων σωματιδίων του ιού. Ιικά σωματίδια ωριμάζουν επίσης στο σύστημα Golgi και εξέρχονται από το μολυσμένο κύτταρο κατά τον ίδιο τρόπο,

παρασύροντας κατά την έξοδό τους γλυκοπρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης του κυττάρου-ξενιστή, που είναι ειδικές για τον ιό.

Άνω του 80% των ενηλίκων είναι οροθετικοί, γεγονός που είναι ενδεικτικό προηγηθείσας έκθεσης στον ιό (Kano,2000).Ο ιός CMV έχει την ικανότητα μόλυνσης τόσο με κάθετη όσο και με οριζόντια μεταφορά του, κατά την πρωτοπαθή μόλυνση, επαναμόλυνση ή επανενεργοποίησή του. Οι σιελογόνοι αδένες, οι νεφροί και τα λευκοκύτταρα είναι οι κύριες θέσεις πολλαπλασιασμού του ιού κατά την πρωτοπαθή λοίμωξη. Ο ιός μπορεί να ανευρεθεί και σε κολπικές εκκρίσεις, σπέρμα, μητρικό γάλα, ούρα και αίμα.

Κάθετη μετάδοση συμβαίνει με ενδομήτρια μόλυνση μέσω του πλακούντα ή λόγω αιμίας της εγκύου καθώς και με περιγεννητική μόλυνση από μολυσμένες γεννητικές εκκρίσεις της μητέρας ή κατά τον θηλασμό με μητρικό γάλα που περιέχει τον ιό (Stagno,1983). Η στενή προσωπική επαφή είναι απαραίτητη για την οριζόντια μετάδοση του ιού και οι πιθανότητες μόλυνσης αυξάνονται σε περιβάλλον με μη υγιεινές συνθήκες διαβίωσης και σε κοινωνίες με χαμηλό κοινωνικο-οικονομικό επίπεδο (Collier,1995). Πρωτοπαθής μόλυνση μπορεί να προκύψει και μετά από μετάγγιση αίματος ή μεταμόσχευση οργάνων (Ergazaki,1994). Σε ασθενείς με AIDS παρατηρείται σημαντικά αυξημένο ποσοστό παραγωγικής CMV λοίμωξης.

Μετά την πρωτοπαθή λοίμωξη το DNA του CMV, όπως συμβαίνει και με τους άλλους ερπητοϊούς, έχει την ικανότητα ενσωμάτωσης στα κύτταρα του ξενιστή και παραμονής σε λανθάνουσα κατάσταση. Ωστόσο, ευκαιριακά ο ιός επανενεργοποιείται από την λανθάνουσα μορφή και τότε μολυσματικά βίρια εμφανίζονται στην σίελο και τα ούρα. Όταν η επανενεργοποίηση συμβεί κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης είναι ιδιαίτερα επικίνδυνο για το έμβρυο.

4.4.2 Κλινική εικόνα

Περίπου 5% των συγγενώς μολυσμένων νεογνών γεννιούνται με κλινικά συμπτώματα. Η συνδρομή που εμφανίζουν είναι γνωστή ως «νόσος των μεγαλοκυτταρικών εγκλείστων» και η πρόγνωσή τους είναι κακή. Το υπόλοιπο 95% φαίνεται να είναι φυσιολογικό κατά τη γέννηση, όμως ένα μικρό ποσοστό εμφανίζει συμπτώματα με την πρόοδο της ηλικίας (Preece,1984). Συμπτωματικά νεογνά που γεννιούνται με αυτό το σύνδρομο εμφανίζουν αναστολή της ανάπτυξης, ίκτερο, ηπατοσπληνομεγαλία, θρομβοκυττοπενία και εγκεφαλίτιδα, με ή χωρίς μικροκεφαλία. Σε

ποσοστό 1% των συγγενώς μολυσμένων βρεφών, ο ιός προκαλεί σοβαρές βλάβες με αποτέλεσμα να πεθαίνουν κατά την νηπιακή ηλικία. Εάν το νεογνό επιζήσει είναι σχεδόν βέβαιο ότι θα εμφανίσει γενετικές ανωμαλίες με την πάροδο των ετών. Η βλάβη του εγκεφάλου δύναται να εκδηλωθεί ως μικροκεφαλία, διανοητική καθυστέρηση, σπαστική παράλυση ή σπασμούς και αισθητή βλάβη του οργάνου, όπως τύφλωση ή κώφωση. Όσον αφορά στα νεογνά που είναι ασυμπτωματικά κατά την γέννηση, το 15 % πιθανόν να εμφανίσει προβλήματα ακοής ή διανοητική καθυστέρηση.

Η CMV λοίμωξη σε μη ανοσοκατεσταλμένους ενήλικες συνήθως διαδράμει υποκλινικά. Όμως μπορεί να εκδηλωθεί και ως CMV λοιμώδης μονοπυρήνωση. Αυτό μπορεί να συμβεί και κατά την επανενεργοποίηση του CMV αλλά είναι λιγότερο συχνό από ότι κατά την πρωτοπαθή λοίμωξη. Ο CMV ευθύνεται για το 8% των μονοπυρήνώσεων και η CMV λοιμώδης μονοπυρήνωση μοιάζει με αυτήν που προκαλείται από τον EBV, αλλά τα συμπτώματα είναι λιγότερο σοβαρά και συνίστανται σε επίμονο εμπύρετο, μυαλγία, αμυγδαλίτιδα και τραχηλική λεμφοαδενοπάθεια (Watanabe,1997). Μετά την πρόδρομη περίοδο εμφανίζεται δερματικό εξάνθημα το οποίο δύναται να συνδυαστεί με σύνδρομο Guillain-Barre, μηνιγγίτιδα, ηπατίτιδα, πνευμονία, αιμολυτική αναιμία και θρομβοκυττοπενία (Cohen,1985). Χαρακτηριστικά εργαστηριακά ευρήματα αποτελούν η παρουσία στο περιφερικό αίμα άτυπων λεμφοκυττάρων και υψηλών τρανσαμινασών. Τα άτυπα λεμφοκύτταρα είναι κυρίως CD8+ T κύτταρα που εκφράζουν CD57 αντιγόνα (Wang,1993).

Ανοσοκατεσταλμένοι ασθενείς έχουν αυξημένες πιθανότητες να εμφανίσουν μολύνσεις από CMV. Συνήθως παρουσιάζουν δεκατική πυρετική κίνηση η οποία υποχωρεί εντός ολίγων ημερών. Ορισμένοι αναπτύσσουν ιαιμία η οποία μοιάζει με σηψαιμία και μπορεί να συνοδεύεται από ηπατίτιδα και πνευμονία. Στις περιπτώσεις που επιπλέκονται με πνευμονία η πρόγνωση είναι κακή (80-90% θνησιμότητα). Επίσης, το σάρκωμα Karosi έχει συσχετισθεί ορολογικά και ιολογικά με μόλυνση από CMV.

4.4.3 Διάγνωση και θεραπεία

Τα ούρα, η σίελος, ηπαρινισμένα δείγματα αίματος και βιοψίες ιστών από τις βλάβες αποτελούν τα καταλληλότερα δείγματα για την απομόνωση του CMV. Ο κυτταρομεγαλοϊός αναγνωρίζεται σε ιστολογικά παρασκευάσματα από τα χαρακτηριστικά ενδοπυρήνικά έγκλειστα, γνωστά ως «μάτια κουκουβάγιας». Τα έγκλειστα αυτά παρατηρούνται σε κύτταρα των νεφρικών σωληναρίων, των χοληφόρων, στο πνευμονικό

και ηπατικό παρέγχυμα αλλά σπάνια σε εγκεφαλικό ιστό. Η μέθοδος αυτή παρουσιάζει μικρή ευαισθησία (Tong,1997). Βιοψίες ιστών δύνανται να περιέχουν κύτταρα μολυσμένα με CMV τα οποία γίνονται ορατά μετά από χρώση, χρησιμοποιώντας ειδικά για τον ιό μονοκλωνικά αντισώματα.

Όσον αφορά στις κυτταροκαλλιέργειες, χρησιμοποιούνται ινοβλάστες του ανθρώπου. Οι καλλιέργειες θα πρέπει να διατηρούνται τουλάχιστον 21 ημέρες πριν χαρακτηριστούν ως αρνητικές, επειδή το τυπικό για τον CMV κυτταροπαθητικό αποτέλεσμα αργεί να εμφανιστεί λόγω της βραδείας ανάπτυξης του ιού. Αυτό αποτελεί και το βασικό μειονέκτημα αυτής της μεθόδου.

Στην διάγνωση χρησιμοποιούνται και ορολογικές μέθοδοι με την χρήση της δοκιμασίας καθήλωσης του συμπληρώματος και με ανίχνευση ειδικών για τον ιό IgM και IgG αντισωμάτων. Χρησιμοποιούνται ευρέως για την ανίχνευση παλαιότερης λοίμωξης, αν και η παρουσία στον ορό τετραπλάσιας αύξησης των IgM τίτλων είναι ένδειξη πρωτοπαθούς μόλυνσης. Ανοσοκατεσταλμένοι ασθενείς αδυνατούν να προκαλέσουν τυπική ανοσοαπόκριση και οι περιπτώσεις αυτές δεν μπορούν να ταυτοποιηθούν με ορολογικές μεθόδους.

Επίσης έχουν χρησιμοποιηθεί και μέθοδοι μοριακού πολλαπλασιασμού όπως είναι η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Λόγω της υψηλής της ευαισθησίας, τα αποτελέσματα της PCR θα πρέπει να ερμηνεύονται προσεκτικά διότι μια τόσο ευαίσθητη τεχνική μπορεί να ανιχνεύσει την παρουσία των ιών, χωρίς να υπάρχει αιτιολογική συσχέτιση με την νόσο. Επίσης θα πρέπει να ληφθούν προφυλάξεις για την αποφυγή της επιμόλυνσης που θα οδηγήσει σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα.

Η ταχύτερη διαθέσιμη τεχνική στην διάγνωση της CMV λοίμωξης είναι η δοκιμασία άμεσης αντιγοναιμίας pp65. Συνίσταται στην άμεση ανίχνευση του CMV αντιγόνου στον πυρήνα των λευκοκυττάρων του περιφερικού αίματος, με την χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων κατά της CMV πρωτεΐνης pp65 (Sharma,1997).

Ως προς την θεραπεία, δύο αντι-υικοί παράγοντες με αποτελεσματική δράση κατά του κυτταρομεγαλοϊού είναι η γκανσικλοβίρη ή DHPG (ανάλογο της ακυκλοβίρης) και σε πειραματικό στάδιο ο παράγοντας Foscarnet. Η διάρκεια της θεραπείας είναι 14-21 ημέρες, ενώ για ασθενείς με AIDS η θεραπεία είναι εφ'όρου ζωής. Οι επιπλοκές περιλαμβάνουν ουδετεροπενία από την γκανσικλοβίρη και νεφρική δυσλειτουργία λόγω του Foscarnet (Drew,1988).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5°

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

5.1 Προέλευση των δειγμάτων

Για την παρούσα διατριβή μελετήθηκαν 108 ασθενείς με δερματικές βλάβες που αφορούσαν σε μη-μελανωματικό καρκίνο του δέρματος και σε προκαρκινικές αλλοιώσεις. Οι δερματολογικοί όγκοι συλλέχθηκαν μετά από τυπική χειρουργική εξαίρεση και ακολούθως καταψύχθηκαν σε θερμοκρασία -70°C στην οποία και παρέμειναν μέχρι την εκχύλιση του DNA. Όλα τα δείγματα προήλθαν από το Νοσοκομείο Αφροδίσιων και Δερματικών Νόσων «Α. Συγγρός». Από τους ασθενείς που εξετάστηκαν, οι 64 ήταν άνδρες και οι 44 γυναίκες. Όλες οι βλάβες που εξετάστηκαν προέρχονταν από περιοχές του σώματος εκτεθειμένες στην ηλιακή ακτινοβολία. Ως τέτοιες χαρακτηρίζονται η κεφαλή και ο τράχηλος, ενώ για τους άνδρες είναι και ο θώρακας και οι ώμοι, και για τις γυναίκες περιλαμβάνονται τα κάτω άκρα. 22 από τα 23 δείγματα ακανθοκυτταρικού καρκινώματος προέρχονταν από την κεφαλή και τον τράχηλο και ένα από το κάτω άκρο μίας γυναίκας ασθενούς. 3 από τα 5 δείγματα νόσου Bowen εντοπίζονταν στην κεφαλή και τον τράχηλο, ενώ τα άλλα δύο στον θώρακα ανδρών ασθενών. 50 από τα 72 δείγματα βασικοκυτταρικού καρκίνου εντοπίζονταν στην κεφαλή, 8 στον τράχηλο, 2 στον θώρακα, 3 στους ώμους και 4 στα κάτω άκρα.

5.2 Εκχύλιση DNA

Για την εκχύλιση χρωμοσωμικού DNA από φρέσκους ιστούς, οι οποίοι διατηρούνται στους -70°C έως ότου χρησιμοποιηθούν, προηγείται τεμάχισμα του όγκου σε πολύ μικρά τμήματα τα οποία μεταφέρονται σε σωλήνα Eppendorf 1.5 ml όπου στην συνέχεια προστίθενται 400 μl διαλύματος λύσης και 0.1 mg/ml πρωτεΐνάση K. Το διάλυμα λύσης αποτελείται από 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA και 0.5% SDS. Τα δείγματα επωάζονται στους 60°C για τρεις ημέρες. Κατά την επώαση, προστίθεται φρέσκια πρωτεΐνάση K τρεις φορές την ημέρα.

Ακολουθεί εκχύλιση των δειγμάτων με φαινόλη-χλωροφόρμιο. Η διαδικασία αυτή χρησιμοποιείται για την απομάκρυνση των πρωτεϊνών από υδατικά διαλύματα DNA. Το

υδατικό διάλυμα αναμιγνύεται με ίσο όγκο φαινόλης, φυγοκεντρείται στις 13.000 στροφές για 15 λεπτά ώστε να διαχωριστεί η υδατική φάση από την οργανική, και στην συνέχεια μεταφέρεται σε καινούριο Eppendorf και επανεκχυλίζεται με ίσο όγκο μίγματος φαινόλης-χλωροφορμίου 1:1. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται και η υδατική φάση επανεκχυλίζεται με ίσο όγκο χλωροφορμίου.

Ακολούθως, το DNA κατακρημνίζεται με προσθήκη 1/20 όγκου NaCl 5M και 2.5 όγκων ψυχρής (-20°C) απόλυτης αιθανόλης. Το DNA επανακτάται με φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές για 15 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C και ακολουθεί έκπλυση του κατακρημνισμένου DNA με αιθανόλη 70%. Το DNA αφήνεται να στεγνώσει, επαναδιαλύεται σε 50 µl δις απεσταγμένου ύδατος και διατηρείται σε θερμοκρασία -20°C. Η ποσότητα του DNA καθώς και η καθαρότητά του υπολογίζονται έπειτα από φωτομέτρηση στα 260 και 280 nm.

5.3 Αλυσιδωτή αντίδραση με πολυμεράση (PCR)

5.3.1 Αρχές της μεθόδου

Το 1985 ο Mullis και οι συνεργάτες του ανέπτυξαν μία τεχνική πολλαπλασιασμού του DNA βασιζόμενοι σε *in vitro* διαδικασίες. Η τεχνική αυτή ονομάστηκε αλυσιδωτή αντίδραση με πολυμεράση (PCR) (Saiki,1985) και έφερε επανάσταση στην μοριακή βιολογία, αντικαθιστώντας τις υπάρχουσες μεθόδους ανάλυσης του DNA σε ερευνητικά και διαγνωστικά εργαστήρια. Για την σημαντική συμβολή της PCR στην έρευνα αλλά και για τις πολλές δυνατότητες εφαρμογής της στην διάγνωση, τους απονεμήθηκε το 1993 το βραβείο Nobel Χημείας.

Η μέθοδος αυτή επιτυγχάνει, σε χρόνο που δεν υπερβαίνει τις 2-3 ώρες, την ειδική ενίσχυση συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA με εκθετικό τρόπο, ώστε να είναι δυνατή η περαιτέρω μελέτη τους. Η τεράστια απόδοση της αντίδρασης κάνει δυνατή την ενίσχυση αλληλουχιών ακόμα και όταν αυτές βρίσκονται σε ελάχιστο αριθμό αντιγράφων ή το DNA έχει υποστεί μια σχετική αποδιάταξη. Στην ουσία, η τεχνική αυτή εκμεταλλεύεται τον ημισυντηρητικό τρόπο διπλασιασμού του DNA. Η αντίδραση χαρακτηρίζεται από ευαισθησία, ειδικότητα και ταχύτητα.

Το υπόστρωμα DNA επωάζεται σε ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει μια θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση, μίγμα δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) και το

ζεύγος των εκκινητών (primers). Οι εκκινητές είναι ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες που παρουσιάζουν ομολογία ως προς δυο θέσεις εκατέρωθεν της DNA αλληλουχίας που πρόκειται να ενισχυθεί και προσδένονται σε αυτές.

Αρχικά γίνεται θερμική αποδιάταξη του δίκλωνου DNA στους 95°C για 5 min, ώστε να διαχωριστούν οι αλυσίδες και να μπορέσει να γίνει ο υβριδισμός. Ο υβριδισμός σηματοδοτεί την έναρξη της προσθήκης, από την DNA πολυμεράση, δεοξυριβονουκλεοτιδίων ομόλογων προς τις αντίστοιχες θέσεις της μητρικής αλυσίδας. Ακολουθούν 30-35 κύκλοι ο καθένας από τους οποίους αποτελείται από τρία στάδια: αποδιάταξη στους 94°C, υβριδισμός των εκκινητών στους 55-60°C και πολυμερισμός στους 72°C. Η διάρκεια κάθε σταδίου είναι 30-40 sec. Η χρονική διάρκεια όλων των σταδίων θα πρέπει να διατηρείται όσο το δυνατόν μικρότερη προς αποφυγήν παραγωγής μη ειδικών προϊόντων. Ο χρόνος της επέκτασης του τελευταίου κύκλου είναι συνήθως μεγαλύτερος (5-10 min) ώστε να έχουν επεκταθεί πλήρως όλα τα νεοσυντιθέμενα μόρια.

Το προϊόν PCR το οποίο παράγεται αποτελείται εξολοκλήρου από μόρια DNA. Επειδή τα προϊόντα κάθε κύκλου συμπεριλαμβάνονται στη συνέχεια στο υπόστρωμα του επόμενου κύκλου, αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την εκθετική αύξηση του αριθμού των αντιγράφων του DNA. Όταν όμως η συγκέντρωση του προϊόντος ξεπεράσει κάποια τιμή, τότε σταματάει η παραγωγή και η αντίδραση μπαίνει σε φάση κορεσμού.

Οι εφαρμογές της PCR στην διαγνωστική Ιατρική περιλαμβάνουν την ανίχνευση παθογόνων οργανισμών, τον προσδιορισμό μεταλλάξεων που είναι υπεύθυνες για διάφορες ασθένειες, την ανάλυση του DNA μέσω αποτυπώματος (DNA fingerprinting) με εφαρμογή στον προγεννητικό και ιατροδικαστικό έλεγχο. Επίσης με την χρήση της PCR, είναι δυνατή η ανίχνευση γενετικού πολυμορφισμού ορισμένων γονιδίων όπως είναι τα αντιγόνα ιστοσυμβατότητας του ανθρώπου HLA II. Η εύρεση πολυμορφισμού των HLA είναι ιδιαίτερα σημαντική στην περίπτωση μεταμόσχευσης για την πιστοποίηση συμβατότητας μεταξύ του δότη και του δέκτη ώστε να αποφευχθεί η απόρριψη. Η ταχύτητα, η ευαισθησία και η εξειδίκευση της PCR σε συνδυασμό με την ευκολία στην εφαρμογή της μεθόδου έχουν ως αποτέλεσμα την ευρεία χρήση της τόσο στον τομέα της βασικής έρευνας όσο και στον χώρο της διαγνωστικής Ιατρικής.

5.3.2 Συστατικά και ρυθμιστικοί παράγοντες της PCR

Τα βασικά συστατικά μιας PCR αντίδρασης είναι το DNA (ή RNA) που θα χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα, η DNA πολυμεράση, τα dNTPs, οι εκκινητές και το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα.

Όσον αφορά στο **υπόστρωμα**, η τεχνική απαιτεί ελάχιστη ποσότητα αρχικού υλικού: για DNA γονιδιώματος είναι αρκετή ποσότητα μικρότερη του μικρογραμμαρίου. Θεωρητικά υπάρχει η δυνατότητα της ενζυμικής ενίσχυσης ενός και μόνο μορίου DNA, ωστόσο σε αυτά τα πειράματα θα πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στην αποφυγή επιμολύνσεων. Το αρχικό υλικό DNA δεν είναι απαραίτητο να έχει την υψηλή καθαρότητα και ακεραιότητα που απαιτούνται για άλλες τεχνικές (όπως Southern blot και *in situ* υβριδισμός). Οι πηγές απομόνωσης του DNA ποικίλλουν και μπορεί να είναι υλικό βιοψιών, ιστοί μονιμοποιημένοι σε παραφίνη, κυτταρολογικό υλικό ή σωματικά υγρά (αίμα, ούρα, προστατικό έκκριμα κ.ά.). Ως υπόστρωμα της αντίδρασης μπορεί να χρησιμοποιηθεί και RNA, εφόσον προηγηθεί ανάστροφη μεταγραφή του σε cDNA (RT PCR αντίδραση).

Οι **DNA πολυμεράσες** είναι ένζυμα που καταλύουν την αντίδραση σύνθεσης πολυνουκλεοτιδικών αλυσίδων από μονομερή τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs) χρησιμοποιώντας ως μήτρα την μία από τις δύο αρχικές αλυσίδες DNA. Η εισαγωγή των θερμοανθεκτικών DNA πολυμερασών στην τεχνική της PCR αποτέλεσε μία από τις βασικότερες τεχνολογικές βελτιώσεις της. Πριν την ανακάλυψή τους, επειδή οι πολυμεράσες που χρησιμοποιούνταν ήταν ευαίσθητες στις υψηλές θερμοκρασίες που απαιτούνταν για την αποδιάταξη του DNA, ήταν αναγκαία η συνεχής προσθήκη φρέσκου ενζύμου σε κάθε PCR κύκλο. Η συχνότερα χρησιμοποιούμενη πολυμεράση στην PCR είναι η Taq που προέρχεται από τον οργανισμό *Thermus aquaticus*. Η πολυμεράση Tth προερχόμενη από το βακτήριο *Thermus thermophilus* μπορεί να δράσει ως ανάστροφη μεταγραφάση του RNA.

Κατά την διάρκεια του πολυμερισμού απαιτούνται υψηλής καθαρότητας **dNTPs** σε συγκεντρώσεις 100-200 μM . Σε μικρότερες συγκεντρώσεις (10-100 μM) η πολυμεράση παρουσιάζει μεγαλύτερη πιστότητα, ωστόσο η βέλτιστη συγκέντρωση των dNTPs εξαρτάται και από την συγκέντρωση των ιόντων μαγνησίου (**MgCl₂**). Τα ιόντα μαγνησίου δημιουργούν ένα διαλυτό σύμπλεγμα με τα dNTPs το οποίο είναι απαραίτητο για την ενσωμάτωσή τους στην νεοσυντιθέμενη αλυσίδα DNA, ενώ συγχρόνως είναι απαραίτητα για την ενεργότητα της πολυμεράσης. Απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή στην ποσότητά τους

διότι μικρότερες συγκεντρώσεις ιόντων μαγνησίου ελαττώνουν την απόδοση της PCR αντίδρασης, ενώ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ελαττώνουν την ειδικότητα της αντίδρασης και προκαλούν την παραγωγή μη ειδικών προϊόντων. Οι συνήθεις ιδανικές συγκεντρώσεις ιόντων μαγνησίου είναι περίπου 25 mM/αντίδραση (Myers,1991).

Ως προς τους **εκκινητές (primers)**, πρόκειται για συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια τα οποία χρησιμεύουν ως εκκινητές της DNA πολυμεράσης για την αντίδραση επέκτασης και ταυτόχρονα εξασφαλίζουν την ειδικότητα της αντίδρασης. Η γνώση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας γύρω από την περιοχή που επιθυμούμε να ενισχύσουμε αποτελεί την βάση για τον σχεδιασμό του ζεύγους των εκκινητών. Στις περισσότερες περιπτώσεις οι εκκινητές σχεδιάζονται έτσι ώστε να έχουν πλήρη ομολογία με την αλληλουχία-στόχο. Είναι στατιστικώς αποδεδειγμένο ότι όταν μία αλληλουχία DNA έχει μήκος τουλάχιστον 20bp τότε είναι μοναδική στο γονιδίωμα. Συνεπώς, η επιλογή εικοσαμερών για εκκινητές επιτρέπει την ειδική ενίσχυση αλληλουχιών. Πράγματι, αυτό είναι και το μέσο μήκος των εκκινητών στην συντριπτική πλειοψηφία των εφαρμογών. Τους δίνει τέτοια θερμοδυναμική σταθερότητα ώστε σε θερμοκρασία περίπου 55°C να αποδιατάσσονται. Η συνήθης συγκέντρωση ενός εικοσαμερούς εκκινητή σε μία PCR αντίδραση είναι 0.5 μM.

Η θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών υπολογίζεται από τα αντίστοιχα T_m των ολιγονουκλεοτιδίων ως εξής: $(\text{αριθμός των βάσεων A+T}) \times 2^\circ\text{C} + (\text{αριθμός των βάσεων G+C}) \times 4^\circ\text{C}$ (Suggs,1981), και συνήθως κυμαίνεται μεταξύ 37°C και 60°C. Ανάμεσα σε αυτές τις τιμές βρίσκεται η ιδανική θερμοκρασία υβριδισμού T_m κατά την οποία το 50% των μορίων είναι αποδιαταγμένο. Υψηλές θερμοκρασίες επιτυγχάνουν πιο εξειδικευμένο υβριδισμό, χαμηλότερης όμως απόδοσης. Η επιλογή χαμηλότερης θερμοκρασίας αυξάνει την απόδοση εις βάρος της ειδικότητας, με αποτέλεσμα τον κίνδυνο δημιουργίας παραπροϊόντων της PCR αντίδρασης, εάν οι εκκινητές προσδεθούν σε άλλες μόνο θέσεις του γονιδιώματος με σχετική μόνο ομολογία ως προς αυτούς.

Για την PCR χρησιμοποιούνται διάφορα **ρυθμιστικά διαλύματα** που ρυθμίζουν την τιμή του pH και ταυτόχρονα προμηθεύουν τους απαραίτητους παράγοντες και σταθεροποιητικές ουσίες για την μέγιστη απόδοση της πολυμεράσης. Στο εμπόριο υπάρχουν διαθέσιμα αρκετά ρυθμιστικά διαλύματα. Ένα τυπικό ρυθμιστικό διάλυμα περιλαμβάνει τα εξής: Tris-HCl σε τελική συγκέντρωση 10 mM και pH 8.4, 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0.01% ζελατίνη, 0.01% NP40 και 0.01% Tween 20. Τα μη ιονικά απορρυπαντικά μπορούν να αντικατασταθούν από 0.1% Triton X-100, ενώ είναι δυνατόν να διαφέρει και η συγκέντρωση των αλάτων.

5.3.3 Σχεδιασμός των εκκινητών και συνθήκες των αντιδράσεων PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση με πολυμεράση είναι μία *in vitro* ενζυμική σύνθεση τμημάτων DNA με την βοήθεια δύο ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών που βρίσκονται εκατέρωθεν της περιοχής του δίκλωνου DNA που πρόκειται να επιμηκυνθεί (Saiki,1988).

1 μl από το εκχυλισμένο DNA κάθε δείγματος υφίσταται ενζυμική ενίσχυση σε τελικό όγκο 50 μl. Η αντίδραση περιλαμβάνει 5 μl ρυθμιστικού διαλύματος, 200 μM από το κάθε dNTP, 0.5 μM από κάθε εκκινητή και 0.25 U Taq πολυμεράση. Σε κάθε αντίδραση χρησιμοποιούνται δύο δείγματα με όλα τα υλικά της PCR εκτός του εκχυλισμένου DNA ως ελεγκτικά στοιχεία (μάρτυρες) για πιθανή επιμόλυνση στην αντίδραση. Το μίγμα προεπωάζεται για 1 min στους 95°C και ακολουθούν 35 κύκλοι ενίσχυσης με τις συνθήκες που παρατίθενται ακολούθως.

5.3.3.1 Συνθήκες των αντιδράσεων PCR

β-σφαιρίνη: Για τον έλεγχο της ποσότητας του DNA που εκχυλίζεται από φρέσκους ιστούς και της ικανότητάς του να χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα από την Taq πολυμεράση, τα δείγματα ελέγχονται με ενίσχυση μίας περιοχής 110 bp του γονιδίου της β-σφαιρίνης, το οποίο χρησιμοποιείται ως γονίδιο μάρτυρας. Οι συνθήκες οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής: 94°C για 50 sec, 56°C για 40 sec και 72°C για 40 sec, αυξάνοντας τον χρόνο επέκτασης 1 sec ανά κύκλο.

HPV: Για την ανίχνευση του ιού χρησιμοποιήθηκαν οι γενικοί εκκινητές GP5 και GP6 (Snijders,1990), οι οποίοι παρουσιάζουν ομολογία με μία συντηρητική περιοχή του L1 ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης (ORF) των εξής τύπων του ιού HPV: 6,11,16,18,31 και 33, ενώ με αρκετές διαφορές στην συμπληρωματικότητα των εκκινητών μπορούν να ενισχυθούν και οι τύποι:1,2,5 και 8. Οι συνθήκες της PCR αντίδρασης χρησιμοποιώντας τους γενικούς εκκινητές είναι οι εξής: 94°C για 50 sec, 52°C για 45 sec και 72°C για 45 sec, αυξάνοντας τον χρόνο επέκτασης 1 sec ανά κύκλο. Το προϊόν της PCR αντίδρασης έχει μήκος περίπου 150 bp και ακολουθεί ανάλυση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% και έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία.

Επίσης, η ανίχνευση των τύπων **11,16,18** και **33** του ιού, οι οποίοι απαντώνται συχνότερα σε αλλοιώσεις του γεννητικού συστήματος, γίνεται με ένα «ταυτόχρονο»

(multiplex) PCR στο οποίο συνυπάρχουν εκκινητές ειδικοί για τον κάθε τύπο ιού, ενισχύοντας τμήματα DNA διαφορετικού μήκους. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζουν πλήρη ομολογία με την αντίστοιχη νουκλεοτιδική αλληλουχία του Ε6 πρώιμου γονιδίου του κάθε τύπου ιού (Arends,1991). Οι συνθήκες της PCR αντίδρασης χρησιμοποιώντας τους ειδικούς εκκινητές είναι οι εξής: 94°C για 1 min, 55°C για 50 sec και 72°C για 50 sec, αυξάνοντας τον χρόνο επέκτασης 1 sec ανά κύκλο. Για την ταυτοποίηση της ειδικότητας της αντίδρασης, χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες τα πλασμίδια που φέρουν το DNA των HPV τύπων. Τα προϊόντα της PCR αντίδρασης αναλύονται σε πήκτωμα αγαρόζης 2% και έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία ώστε να πιστοποιηθεί η επιθυμητή ενίσχυση των 236 bp για τον HPV 11, 315 bp για τον HPV 16, 143 bp για τον HPV 18 και 171 bp για τον HPV 33.

Για την ανίχνευση του ιού HPV 18, χρησιμοποιήθηκαν επιπρόσθετα κάποιοι ειδικοί για τον ιό εκκινητές (HPV 18-1 και HPV 18-2). Οι συνθήκες οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής: 94°C για 40 sec, 61°C για 40 sec και 72°C για 50 sec, αυξάνοντας τον χρόνο επέκτασης 1 sec ανά κύκλο. Το προϊόν της PCR αντίδρασης έχει μήκος περίπου 200 bp και ακολουθεί ανάλυση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% και έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία.

Για την ανίχνευση των τύπων **2,5** και **8** του ιού που απαντώνται συχνότερα σε δερματικές βλάβες, σχεδιάστηκε αντίστοιχα ένα δεύτερο multiplex PCR. Εδώ, οι συνθήκες της PCR αντίδρασης είναι οι εξής: 95°C για 55 sec, 58°C για 45 sec και 72°C για 45 sec, αυξάνοντας τον χρόνο επέκτασης 1 sec ανά κύκλο. Τα προϊόντα της PCR αντίδρασης αναλύονται σε πήκτωμα αγαρόζης 2% και έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία ώστε να πιστοποιηθεί η επιθυμητή ενίσχυση των 303 bp για τον HPV 2, 279 bp για τον HPV 5 και 220 bp για τον HPV 8.

Για την ανίχνευση του ιού HPV **1**, χρησιμοποιήθηκαν ειδικοί εκκινητές (HPV 1-1 και HPV 1-2). Οι συνθήκες οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής: 95°C για 55 sec, 55°C για 45 sec και 72°C για 45 sec, αυξάνοντας τον χρόνο επέκτασης 1 sec ανά κύκλο. Το προϊόν της PCR αντίδρασης έχει μήκος περίπου 136 bp και ακολουθεί ανάλυση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% και έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία.

HSV-1 και HSV-2: Χρησιμοποιήθηκαν γενικοί εκκινητές HSVa και HSVb (Rogers,1991) οι οποίοι παρουσιάζουν ομολογία με μία συντηρητική περιοχή του ιού και ενισχύουν και τους δύο τύπους. Οι συνθήκες της ενζυμικής ενίσχυσης είναι οι εξής: 94°C για 50 sec, 64°C για 40 sec και 72°C για 50 sec, αυξάνοντας τον χρόνο επέκτασης 1 sec

ανά κύκλο. Το προϊόν της PCR αντίδρασης έχει μήκος περίπου 478 bp και ακολουθεί ανάλυση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% και έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία.

EBV: Χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές EBV-1 και EBV-2 (Rogers,1990). Οι συνθήκες της ενζυμικής ενίσχυσης είναι οι εξής: 94°C για 50 sec, 72°C για 30 sec και 72°C για 30 sec, αυξάνοντας τον χρόνο επέκτασης 1 sec ανά κύκλο. Το προϊόν της PCR αντίδρασης έχει μήκος περίπου 375 bp και ακολουθεί ανάλυση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% και έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία.

CMV: Χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές CMV-1 και CMV-2 με συνθήκες ενζυμικής ενίσχυσης: 94°C για 50 sec, 60°C για 40 sec και 72°C για 40 sec για 10 κύκλους και εν συνεχεία 94°C για 50 sec, 58°C για 40 sec και 72°C για 40 sec για 25 κύκλους, αυξάνοντας τον χρόνο επέκτασης 1 sec ανά κύκλο. Ακολούθησε nested PCR στο οποίο χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα το προϊόν της προηγούμενης PCR αντίδρασης και εκκινητές οι CMV-3 και CMV-4. Οι συνθήκες της ενζυμικής ενίσχυσης είναι οι εξής: 94°C για 40 sec, 57°C για 30 sec και 72°C για 30 sec για 8 κύκλους και εν συνεχεία 94°C για 40 sec, 55°C για 30 sec και 72°C για 30 sec για 27 κύκλους, αυξάνοντας τον χρόνο επέκτασης 1 sec ανά κύκλο. Το προϊόν της PCR αντίδρασης έχει μήκος περίπου 167 bp και ακολουθεί ανάλυση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% και έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία.

5.3.3.2 Σχεδιασμός των εκκινητών

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στις PCR αντιδράσεις που περιγράφηκαν ανωτέρω είναι οι ακόλουθοι:

GP5: 5-TTTGTTACTGTGGTAGATAC-3

GP6: 5-GAAAAATAAACTGTAAATCA-3

HPV 18-1: 5-TGCAACCGAAATAGGTTGGGC-3

HPV 18-2: 5-GCACAGATCAGGTAGCTTGTA-3

HSVα: 5-CAGTACGGCCCCGAGTTCGTGA-3

HSVβ: 5-GTAGATGGTGCGGGTGATGTT-3

EBV-1: 5-GTGTGCGTTCGTGCCGGGGCAGCCAC-3

EBV-2: 5-ACCTGGGAGGGCCATCGCAAGCTCC-3

CMV-1: 5-AATCCACGTCCCATGCAGGTTAGT-3

CMV-2: 5-CGGTACGTGTTCGGGGTTTGTG-3

CMV-3: 5-GTGACCAAGGCCACGACGTT-3

CMV-4: 5-TCTGCCAGGACATCTTTCTC-3

5.4 Ηλεκτροφόρηση DNA

Το DNA ηλεκτροφορείται σε πήκτωμα αγαρόζης ή ακρυλαμιδίου. Η επιλογή του συγκεκριμένου πηκτώματος εξαρτάται από το μέγεθος του DNA που πρόκειται να ηλεκτροφορηθεί και από την διακριτική ικανότητα που θέλουμε να επιτύχουμε. Το πήκτωμα αγαρόζης είναι καταλληλότερο για την ηλεκτροφόρηση μεγάλων τμημάτων DNA καθώς και για μεγάλες διαφορές μεγέθους τμημάτων που πρόκειται να διαχωριστούν. Η συνήθης συγκέντρωση του πηκτώματος αγαρόζης είναι 1 έως 2%. Αντίθετα, το πήκτωμα ακρυλαμιδίου επιλέγεται για μικρότερα τμήματα DNA και για διάκριση μικρών μεταξύ τους διαφορών μεγέθους. Το πήκτωμα ακρυλαμιδίου αποτελείται από μείγμα ακρυλαμιδίου/bis-ακρυλαμιδίου σε αναλογία 19:1. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, για τους ανωτέρω λόγους, η ηλεκτροφόρηση του DNA έγινε σε πηκτώματα αγαρόζης.

Όσον αφορά στον τρόπο παρασκευής του πηκτώματος αγαρόζης, η επιθυμητή ποσότητα αγαρόζης διαλύεται σε διάλυμα 0.5 X TBE και η αγαρόζη τήκεται με βρασμό σε φούρνο μικροκυμάτων για περίπου 2 λεπτά. Το TBE είναι ρυθμιστικό διάλυμα με pH 8.3 το οποίο αποτελείται από 10.8 g/l Tris, 5.5 g/l βορικό οξύ και 0.002M EDTA. Ακολούθως, η αγαρόζη αφήνεται να κρυσώσει έως τους 60°C και προστίθεται βρωμιούχο εθίδιο (EtBr) σε τελική συγκέντρωση 0.5 µg/ml. Το διάλυμα αυτό τοποθετείται σε δοχείο που περιέχει «κτένα» η οποία δημιουργεί τα «πηγάδια» για το φόρτωμα των δειγμάτων. Η πήξη για την αγαρόζη επιτυγχάνεται με την πτώση της θερμοκρασίας της.

Το στερεοποιημένο πήκτωμα μετά την αφαίρεση της «κτένας», εμβαπτίζεται σε συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιέχει 0.5 X TBE. Το δείγμα DNA που πρόκειται να ηλεκτροφορηθεί, επαναιωρείται σε διάλυμα φόρτωσης (loading buffer) και εφαρμόζεται

ηλεκτρική τάση. Το διάλυμα φόρτωσης περιέχει 0.25% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0.25% κυανό του ξυλενίου και 25% φικόλη. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης οι ζώνες του DNA γίνονται άμεσα ορατές με έκθεση του πηκτώματος σε υπεριώδη (UV) ακτινοβολία.

5.5 Στατιστική ανάλυση-Ηλεκτρονική επεξεργασία εικόνας

Η στατιστική επεξεργασία των εργαστηριακών ευρημάτων και κλινικοπαθολογικών δεδομένων έγινε με την χρήση της δοκιμασίας SPSS 6.0 for Windows και ως στατιστικά σημαντικές θεωρήθηκαν οι συσχετίσεις με μονοδύναμο επίπεδο σημαντικότητας $P < 0.05$ ή $P = 0.05$. Όλα τα παραπάνω έγιναν σε ηλεκτρονικό υπολογιστή.

5.6 Εταιρείες προέλευσης των υλικών

Άγαρ- Difco

Αγαρόζη- Gibco BRL

Αιθανόλη- Merck

Βορικό οξύ- BDH

Βρωμιούχο Εθίδιο- Sigma

Γλυκερόλη- Gibco BRL

Διαιθυλ-πυροκαρβονικό οξύ- BDH

Διθειοθρεϊτόλη- Sigma

Διμεθυλσουλφοξείδιο- BDH

Δεσοξυριβονουκλεοτίδια- Gibco BRL

Θεικό αμμώνιο- BDH

Ισοπροπανόλη- Merck

Κιτρικό νάτριο- BDH

Κυανό της βρωμοφαινόλης- Sigma

Λυσοζύμη- Sigma

Μεθανόλη- Merck

Οξικό αμμώνιο- Sigma

Οξικό κάλιο- Sigma

Οξικό νάτριο- Sigma

Οξικό οξύ- BDH

Πρωτεΐνάση K- Gibco BRL
Ριβονουκλεάση A- Gibco BRL
SDS- Sigma
Ταq πολυμεράση- Gibco BRL
Tris base- BDH
Triton-X-100- Sigma
Tween-20- Sigma
Υδροξείδιο του νατρίου- Sigma
Υδροχλωρικό οξύ- BDH
Υπερθευικό αμμώνιο- Gibco BRL
Υπεροξείδιο του υδρογόνου- BDH
Φαινόλη- Gibco BRL
Φορμαλδεΰδη- BDH
Φορμαμίδιο- Gibco BRL
Χλωριούχο καΐσιο- Sigma
Χλωριούχο κάλιο- Sigma
Χλωριούχο λίθιο- Sigma
Χλωριούχο μαγγάνιο- Sigma
Χλωριούχο μαγνήσιο- Sigma
Χλωριούχο νάτριο- Sigma
Χλωροφόρμιο- Fluka

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6°

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

6.1 Αλλοιώσεις που μελετήθηκαν και ιστολογική διάγνωση

Μελετήθηκαν 108 δερματολογικές βλάβες. Από την ιστολογική τους εξέταση προκύπτουν τα ακόλουθα: 72 περιπτώσεις βασικοκυτταρικού καρκίνου (BCC), 23 περιπτώσεις ακανθοκυτταρικού καρκίνου (SCC), 5 περιπτώσεις αφορούσαν σε νόσο του Bowen και 8 περιπτώσεις ήταν προκαρκινικές βλάβες. Ως προς τις προκαρκινικές βλάβες, αναλυτικά είναι οι εξής: 2 δείγματα με υπερκεράτωση, 1 περίπτωση δακτυλιοειδούς κοκκιώματος, 2 υπερκερατωσικά εκζέματα, 1 δείγμα ατροφικού λειχήνα και 2 κερατοακανθώματα.

Στο δεύτερο κεφάλαιο της παρούσας διατριβής αναφέρθηκα αναλυτικά στα κυριότερα χαρακτηριστικά των δερματολογικών καρκίνων (βασικοκυτταρικός και ακανθοκυτταρικός) αλλά και στην νόσο του Bowen. Ακολουθώς, παραθέτονται κάποια στοιχεία και για τις σημαντικότερες από τις προκαρκινικές βλάβες που προέκυψαν από την ιστολογική εξέταση των δειγμάτων.

Το κερατοακάνθωμα είναι όγκος ο οποίος εμφανίζεται συχνότερα σε ηλικιωμένα άτομα. Η διαφορική διάγνωση θα πρέπει να γίνει από το SCC και απαιτείται βιοψία που πρέπει να περιλαμβάνει τμήμα παρακείμενου υγιούς δέρματος για να επιβεβαιωθεί η διάγνωση. Αν και το κερατοακάνθωμα υποχωρεί αυτόματα, η θεραπεία είναι συνήθως απαραίτητη λόγω της δύσμορφης ουλής που εγκαταλείπει.

Ο λειχήνας χαρακτηρίζεται από ένα βλατιδώδες εξάνθημα το οποίο εντοπίζεται χαρακτηριστικά στις καμπτικές επιφάνειες των άκρων, στα γεννητικά όργανα και στους βλεννογόνους. Η αιτιολογία της νόσου παραμένει άγνωστη, οι υπάρχουσες όμως ενδείξεις συγκλίνουν ότι ο λειχήνας παριστά μία αντίδραση της κυτταρικής ανοσίας. Η ατροφία του λειχήνα είναι γενικά ασυνήθης, όμως μπορεί να εμφανισθεί σε ορισμένες μορφές του λειχήνα όπως είναι ο ελκωτικός και ο υπερτροφικός. Σε βλάβες λειχήνα δύναται να αναπτυχθεί ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα.

Η υπερκεράτωση αποτελεί και αυτή προκαρκινική κατάσταση μια που οι βλάβες αυτές έχουν την δυνατότητα να εξελιχθούν σε καρκίνωμα σε ποσοστό 20%. Αρχικά οι βλάβες παρουσιάζονται σαν μια δερματική κηλίδα με τραχεία επιφάνεια και χρώμα

κιτρινωπό. Εντοπίζονται κυρίως στο πρόσωπο, στο κεφάλι, στα αντιβράχια και στα πόδια. Το καρκίνωμα που αναπτύσσεται είναι ακανθοκυτταρικό καλώς διαφοροποιημένο.

Τέλος, το έκζεμα εκδηλώνεται ως κνησμώδες, εξιδρωματικό ή λειχηνοειδές εξάνθημα στο πρόσωπο, τον αυχένα, το άνω μέρος του κορμού, τα χέρια και τις πτυχές των γονάτων και των αγκώνων. Υπάρχει ατομικό ή οικογενειακό ιστορικό αλλεργικών εκδηλώσεων, π.χ. άσθμα, αλλεργική ρινίτιδα κ.ά. η νόσος εμφανίζει τάση υποτροπής, ενώ υφίεται μετά την εφηβεία.

6.2 Ανίχνευση των ιών HPV σε δερματικές αλλοιώσεις

Εξετάσθηκε η παρουσία των ιών HPV στα ανωτέρω 108 δείγματα δερματολογικών αλλοιώσεων. Από τους 108 ασθενείς βρέθηκαν θετικοί για τον ιό οι 29 (27%) (εικόνα 6.1). Η μόλυνση με τον ιό HPV ανευρέθηκε σε 22 περιπτώσεις με βασικοκυτταρικό καρκίνο δέρματος (BCC), σε 3 δείγματα ασθενών με ακανθοκυτταρικό καρκίνο δέρματος (SCC), σε 2 περιπτώσεις ασθενών με νόσο Bowen και σε 2 περιπτώσεις ασθενών με προκαρκινικές αλλοιώσεις. Τα ανωτέρω συνοψίζονται στον πίνακα 6.1.

Όπως προκύπτει και από τον πίνακα 6.1, ο ιός παρουσιάζει την υψηλότερη επίπτωση (40%) στους ασθενείς με νόσο Bowen, μια που οι 2 στους 5 εμφανίζουν μόλυνση με τον ιό. Ακολουθούν οι ασθενείς με βασικοκυτταρικό καρκίνο δέρματος (επίπτωση 31%), ενώ στους ασθενείς με ακανθοκυτταρικό καρκίνο δέρματος και προκαρκινικές αλλοιώσεις η επίπτωση είναι χαμηλότερη (ποσοστά 13 και 25% αντίστοιχα).

Από την τυποποίηση του ιού χρησιμοποιώντας multiplex PCR με τους ειδικούς εκκινητές, ο HPV-8 ήταν ο πλέον συχνά ανιχνεύσιμος τύπος, μια που ανιχνεύθηκε σε 18 από τα 29 θετικά δείγματα, με επίπτωση 62%. Σε χαμηλότερα ποσοστά ανιχνεύθηκαν οι τύποι HPV-18 (48%), HPV-5 (24%) και HPV-11 (3.5%) (εικόνες 6.3 και 6.4). Οι HPV τύποι 1, 2, 16 και 33 δεν ανιχνεύθηκαν σε καμία εστία. Επίσης, όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο της μεθοδολογίας, για τον HPV-18 εκτός από το multiplex PCR, χρησιμοποιήθηκαν και κάποιοι ειδικοί για τον ιό εκκινητές δίνοντας προϊόν PCR αντίδρασης 200 bp (εικόνα 6.2). Τα αποτελέσματα της ταυτοποίησης των HPV χρησιμοποιώντας ειδικούς για κάθε τύπο εκκινητές παρουσιάζονται στους πίνακες 6.2 (για τους τύπους 11, 16, 18 και 33 που απαντώνται συχνότερα στους βλεννογόνους και στον γυναικολογικό καρκίνο) και 6.3 (για τους τύπους 1, 2, 5 και 8 που απαντώνται συχνότερα στο δέρμα).

Σε αρκετά δείγματα ανιχνεύθηκαν περισσότεροι του ενός τύποι HPV. Οι πολλαπλές αυτές μολύνσεις αφορούσαν κυρίως σε ταυτόχρονη μόλυνση από HPV DNA των τύπων 8 και 18 σε ποσοστό 24%. Σε χαμηλότερα ποσοστά ανιχνεύθηκαν ταυτόχρονες μολύνσεις από HPV DNA των τύπων 5 και 8 (7%), 5 και 18 (3.5%), 8 και 11 (3.5%). Επίσης, σε ένα δείγμα ακανθοκυτταρικού καρκίνου βρέθηκε DNA τριών διαφορετικών HPV τύπων. Η πλειονότητα των δειγμάτων που παρουσίασαν μόλυνση με περισσότερους του ενός τύπους HPV ήταν BCC. Αναλυτικά, η συνύπαρξη άνω του ενός τύπου σε συνδυασμό με την ιστολογική διάγνωση παραθέτονται στον πίνακα 6.4.

6.3 Ανίχνευση των ερπητοϊών HSV, EBV και CMV σε δερματικές αλλοιώσεις

Τα 108 δείγματα δερματικών βλαβών που εξετάστηκαν για την ύπαρξη των ιών HPV, ελέγχθηκαν στην συνέχεια για την παρουσία σε αυτά DNA των ερπητοϊών. Συγκεκριμένα τα δείγματα ελέγχθηκαν για τον ιό του απλού έρπητα (HSV), τον ιό Epstein-Barr (EBV), και τον κυτταρομεγαλοϊό (CMV).

Όσον αφορά στον ιό του απλού έρπητα, δεν ανιχνεύθηκε η ύπαρξη DNA του ιού σε κανένα από τα δείγματα που εξετάστηκαν (εικόνα 6.5). Ίδιο είναι το αποτέλεσμα και ως προς τον ιό Epstein-Barr (εικόνα 6.6).

Αντίθετα, για τον κυτταρομεγαλοϊό βρέθηκαν 42 θετικά δείγματα ποσοστό (39%) (εικόνα 6.7). Η μόλυνση με τον ιό CMV ανευρέθηκε σε 27 περιπτώσεις με βασικοκυτταρικό καρκίνο δέρματος (BCC), σε 8 δείγματα ασθενών με ακανθοκυτταρικό καρκίνο δέρματος (SCC), σε 1 περίπτωση ασθενούς με νόσο Bowen και σε 6 περιπτώσεις ασθενών με προκαρκινικές αλλοιώσεις. Τα ανωτέρω συνοψίζονται στον πίνακα 6.5.

Όπως προκύπτει και από τον πίνακα 6.5, ο ιός παρουσιάζει την υψηλότερη επίπτωση (75%) στους ασθενείς με προκαρκινικές αλλοιώσεις, μια που οι 6 στους 8 εμφανίζουν μόλυνση με τον ιό. Ακολουθούν οι ασθενείς με βασικοκυτταρικό καρκίνο δέρματος (επίπτωση 37.5%) και οι ασθενείς με ακανθοκυτταρικό καρκίνο δέρματος (επίπτωση 35%), ενώ στους ασθενείς με νόσο Bowen η επίπτωση είναι χαμηλότερη (ποσοστό 20%). Όπως φαίνεται από τα παραπάνω, η επίπτωση του CMV είναι σημαντικά υψηλότερη στους ασθενείς με προκαρκινικές αλλοιώσεις, ενώ είναι αρκετά υψηλή και στους ασθενείς με καρκίνο δέρματος χωρίς να παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στους δύο ιστολογικούς τύπους του καρκίνου.

Σε αρκετά δείγματα, εκτός από το DNA του ιού CMV, ανιχνεύθηκε και DNA του ιού HPV. Έτσι, 11 ασθενείς εμφάνισαν ταυτόχρονη μόλυνση με τους δύο αυτούς ιούς. Όσον αφορά στον ιστολογικό τύπο, η πλειονότητα αυτών των ασθενών (8) έπασχε από βασικοκυτταρικό καρκίνο CMV δέρματος, ενώ δύο από αυτούς εμφάνιζαν προκαρκινικές αλλοιώσεις και 1 νόσο Bowen. Τα ανωτέρω συνοψίζονται στον πίνακα 6.6.

Ειδικότερα, ως προς τον τύπο του HPV που ανιχνεύθηκε στους 11 ασθενείς με την ταυτόχρονη HPV και CMV μόλυνση, 5 εμφάνισαν μόλυνση από HPV 8, 3 εμφάνισαν μόλυνση από HPV 18, 1 εμφάνισε μόλυνση από HPV 8 και 18 και 1 εμφάνισε μόλυνση από HPV 8 και 11. Σε έναν ασθενή με BCC που ήταν θετικός για CMV δεν ταυτοποιήθηκε ο τύπος του HPV με τον οποίο παρουσίαζε ταυτόχρονη μόλυνση. Τα ανωτέρω παρουσιάζονται στον πίνακα 6.7.

Πίνακας 6.1

Ανίχνευση του ιού HPV με την χρήση PCR σε ασθενείς με δερματικές βλάβες

Ιστολογική διάγνωση	Αριθμός ασθενών	HPV θετικοί (%)
BCC	72	22 (31)
SCC	23	3 (13)
Νόσος Bowen	5	2 (40)
Προκαρκινικές αλλοιώσεις	8	2 (25)
Σύνολο	108	29 (27)

Πίνακας 6.2

Ταυτοποίηση των HPV τύπων 11,16,18,33 με την χρήση PCR σε ασθενείς με δερματικές βλάβες

Ιστολογική διάγνωση	HPV 18	HPV 16	HPV 33	HPV 11
BCC	10	–	–	–
SCC	1	–	–	–
Νόσος Bowen	2	–	–	–
Προκαρκινικές αλλοιώσεις	1	–	–	1
Σύνολο	14(48)	–	–	1(3.5)

Πίνακας 6.3

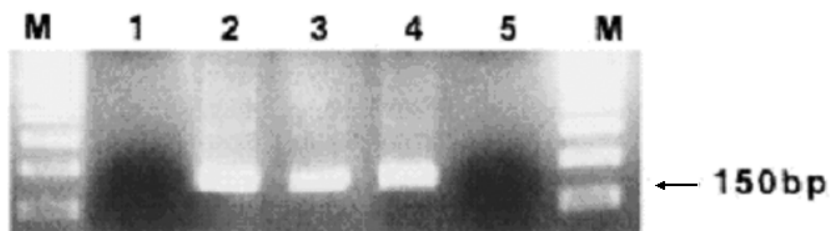
Ταυτοποίηση των HPV τύπων 1,2,5,8 με την χρήση PCR σε ασθενείς με δερματικές βλάβες

Ιστολογική διάγνωση	HPV 1	HPV 2	HPV 5	HPV 8
BCC	–	–	4	15
SCC	–	–	2	1
Νόσος Bowen	–	–	1	1
Προκαρκινικές αλλοιώσεις	–	–	–	1
Σύνολο	–	–	7(24)	18(62)

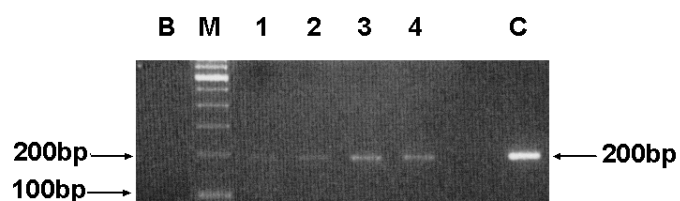
Πίνακας 6.4

Συνύπαρξη άνω του ενός HPV τύπων σε ασθενείς με δερματικές βλάβες

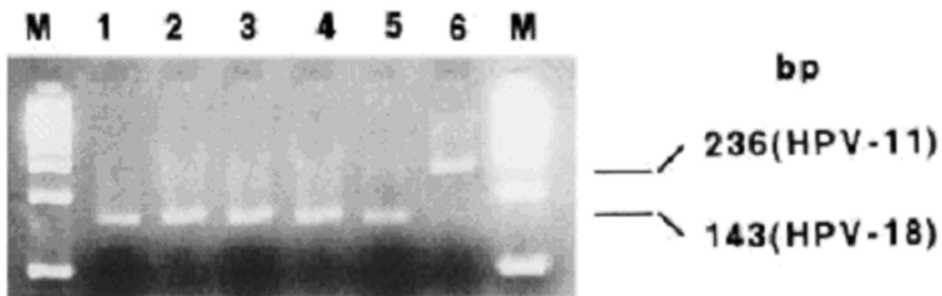
Ιστολογική διάγνωση	HPV5,8	HPV5,18	HPV8,18	HPV8,11	HPV5,8,18
BCC	2	–	6	–	–
SCC	–	–	–	–	1
Νόσος Bowen	–	1	1	–	–
Προκαρκινικές αλλοιώσεις	–	–	–	1	–
Σύνολο	2	1	7	1	1



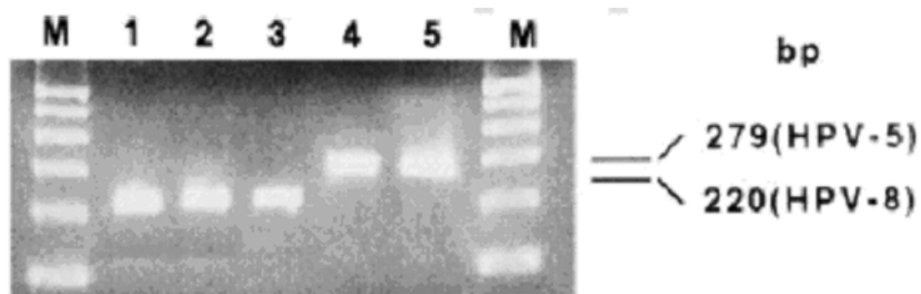
Εικόνα 6.1. Ανίχνευση του ιού HPV. Οι ηλεκτροφορητικές στήλες 2,3 και 4 αντιστοιχούν σε δείγματα που εμφανίζουν τον ιό HPV ενώ οι στήλες 1 και 5 αντιστοιχούν σε δείγματα που δεν εμφανίζουν τον ιό. Οι στήλες M αντιστοιχούν σε δείκτη μοριακών βαρών 100bp DNA ladder.



Εικόνα 6.2. Ανίχνευση του ιού HPV. Οι ηλεκτροφορητικές στήλες 1,2,3 και 4 αντιστοιχούν σε δείγματα που εμφανίζουν τον ιό HPV ενώ η στήλη B αντιστοιχεί σε προϊόν PCR που δεν περιέχει δείγμα. Η στήλη C αντιστοιχεί σε πλασμίδιο το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας. Η στήλη M αντιστοιχεί σε δείκτη μοριακών βαρών 100bp DNA ladder.



Εικόνα 6.3. Ταυτοποίηση των ιών HPV 11 και 18 με multiplex PCR. Οι ηλεκτροφορητικές στήλες 1,2,3,4 και 5 αντιστοιχούν σε δείγματα που εμφανίζουν τον ιό HPV-18 (143 bp) ενώ η στήλη 6 αντιστοιχεί σε δείγμα που εμφανίζει τον ιό HPV-11 (236 bp). Οι στήλες M αντιστοιχούν σε δείκτη μοριακών βαρών 100bp DNA ladder.



Εικόνα 6.4. Ταυτοποίηση των ιών HPV 5 και 8 με multiplex PCR. Οι ηλεκτροφορητικές στήλες 1,2 και 3 αντιστοιχούν σε δείγματα που εμφανίζουν τον ιό HPV-8 (220 bp) ενώ οι στήλες 4 και 5 αντιστοιχούν σε δείγματα που εμφανίζουν τον ιό HPV-5 (279 bp). Οι στήλες M αντιστοιχούν σε δείκτη μοριακών βαρών 100bp DNA ladder.

Πίνακας 6.5

Ανίχνευση του ιού CMV με την χρήση PCR σε ασθενείς με δερματικές βλάβες

Ιστολογική διάγνωση	Αριθμός ασθενών	CMV θετικοί (%)
BCC	72	27 (37.5)
SCC	23	8 (35)
Νόσος Bowen	5	1 (20)
Προκαρκινικές αλλοιώσεις	8	6 (75)
Σύνολο	108	42 (39)

Πίνακας 6.6

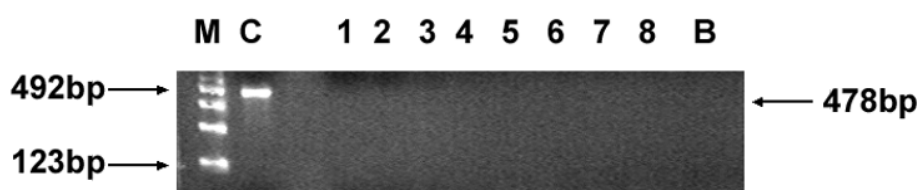
Συνύπαρξη των ιών CMV και HPV σε ασθενείς με δερματικές βλάβες

Ιστολογική διάγνωση	CMV θετικοί	CMV και HPV θετικοί
BCC	27	8
SCC	8	–
Νόσος Bowen	1	1
Προκαρκινικές αλλοιώσεις	6	2
Σύνολο	42	11

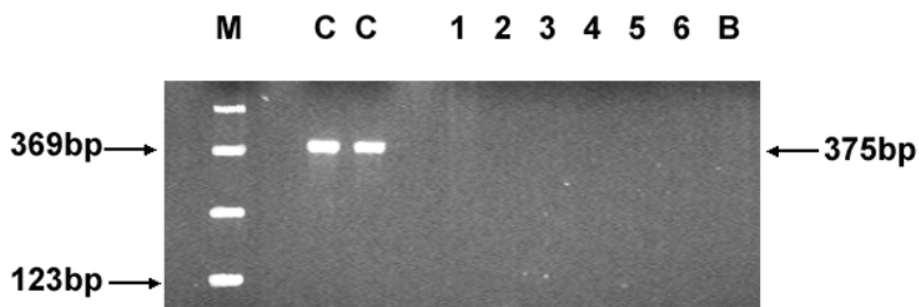
Πίνακας 6.7

Συνύπαρξη των ιών CMV και ειδικών τύπων HPV σε ασθενείς με δερματικές βλάβες

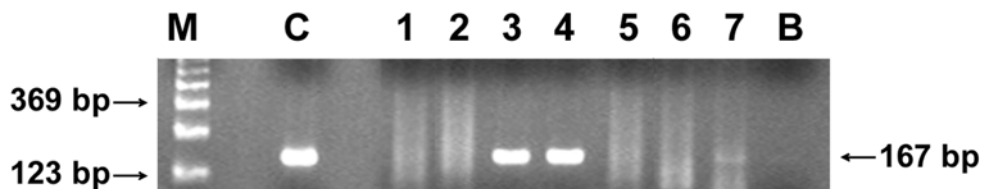
Ιστολογική διάγνωση	CMV,HPV8	CMV,HPV18	CMV,HPV8,18	CMV,HPV8,11
BCC	5	1	1	–
SCC	–	–	–	–
Νόσος Bowen	–	1	–	–
Προκαρκινικές αλλοιώσεις	–	1	–	–
Σύνολο	5	3	1	1



Εικόνα 6.5. Ανίχνευση του ιού HSV. Η ηλεκτροφορητική στήλη C αντιστοιχεί σε πλασμίδιο το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας. Η στήλη B αντιστοιχεί σε προϊόν PCR που δεν περιέχει δείγμα. Η στήλη M αντιστοιχεί σε δείκτη μοριακών βαρών 123bp DNA ladder. Οι στήλες 1 έως και 8 αντιστοιχούν σε δείγματα που δεν εμφανίζουν τον ιό HSV.



Εικόνα 6.6. Ανίχνευση του ιού EBV. Οι ηλεκτροφορητικές στήλες C αντιστοιχούν σε πλασμίδια τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Η στήλη B αντιστοιχεί σε προϊόν PCR που δεν περιέχει δείγμα. Η στήλη M αντιστοιχεί σε δείκτη μοριακών βαρών 123bp DNA ladder. Οι στήλες 1 έως και 6 αντιστοιχούν σε δείγματα που δεν εμφανίζουν τον ιό EBV.



Εικόνα 6.7. Ανίχνευση του ιού CMV. Οι ηλεκτροφορητικές στήλες 3 και 4 αντιστοιχούν σε δείγματα που εμφανίζουν τον ιό CMV ενώ οι στήλες 1,2,5,6 και 7 αντιστοιχούν σε δείγματα που δεν εμφανίζουν τον ιό. Η στήλη B αντιστοιχεί σε προϊόν PCR που δεν περιέχει δείγμα. Η στήλη C αντιστοιχεί σε πλασμίδιο το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας. Η στήλη M αντιστοιχεί σε δείκτη μοριακών βαρών 123bp DNA ladder.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7^ο

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

7.1 Εισαγωγή

Η πολυσταδιακή φύση της καρκινογένεσης έχει οδηγήσει στην μελέτη όχι μόνο ογκογονιδίων και ογκοκατασταλτικών γονιδίων, αλλά και ποικίλων ιών που έχουν βρεθεί να σχετίζονται με την δημιουργία όγκων στον ανθρώπινο οργανισμό. Έτσι, τα ιικά γονίδια E6 και E7 του HPV έχουν αναφερθεί ως εμπλεκόμενα στον κακοήγη μετασχηματισμό κυττάρων του τραχήλου της μήτρας αλλά και του δέρματος, παρόλο που ο ακριβής ρόλος των παραγόντων αυτών στην καρκινογένεση του ανθρώπου δεν έχει πλήρως διαλευκανθεί (Durst 1983, zur Hausen 1996). Διάφοροι ιοί έχουν ενοχοποιηθεί να παίζουν ρόλο στην ογκογένεση είτε δρώντας μόνοι τους είτε σε συνδυασμό με άλλους παράγοντες όπως για παράδειγμα περιβαλλοντικοί παράγοντες (υπεριώδης ακτινοβολία κ.ά.).

7.2 Ανίχνευση των ιών HPV σε προκαρκινικές αλλοιώσεις και καρκίνο δέρματος

7.2.1 Γενικά

Παλαιότερες μελέτες έχουν επιβεβαιώσει τον ρόλο που διαδραματίζουν οι υψηλού κινδύνου γεννητικοί HPV τύποι 16 και 18 στην ανάπτυξη καρκίνων της γεννητικής οδού. Οι HPV 16,18 καθώς και άλλοι τύποι έχουν ανιχνευθεί στο 95% όλων των βιοψιών καρκίνου τραχήλου της μήτρας παγκοσμίως (zur Hausen,1996). Οι τύποι 16 και 18 του ιού είναι ικανά να αθανατοποιούν πρώιμα κερατινοκύτταρα, ενώ ο χαμηλού κινδύνου HPV 11 πιθανότατα στηρίζεται και σε εξωτερικούς παράγοντες για την επαγωγή μεταλλάξεων που θα οδηγήσουν σε αθανατοποίηση κυττάρων.

Όσον αφορά στον καρκίνο του δέρματος, η πλειοψηφία των μελετών έχει διεξαχθεί σε ασθενείς με Epidermodysplasia Verruciformis (EV) και σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς, π.χ. ασθενείς με μεταμόσχευση νεφρού (Berkhout, 2000). Σε 80% των ανοσοκατεσταλμένων ασθενών με μη-μελανωματικό καρκίνο του δέρματος (NMSC) ανιχνεύθηκε HPV DNA (zur Hausen,1996). Άνω του 30% των ασθενών με EV, κατά την

τρίτη και τέταρτη δεκαετία της ζωής τους θα αναπτύξουν καρκίνο του δέρματος σε εκτεθειμένες στον ήλιο περιοχές του σώματός τους (Harris,1997). Στους ασθενείς με EV οι εστίες του μη-μελανωματικού καρκίνου του δέρματος, περιέχουν ως επί το πλείστον HPV τύπους 5 και 8, οι οποίοι θεωρούνται δυνητικά ογκογόνοι και μοιάζουν με τους χαμηλού κινδύνου γεννητικούς τύπους ως προς τον μηχανισμό της δράσης τους (Harwood, 1999).

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η ανίχνευση DNA των ιών HPV σε προκαρκινικές και καρκινικές δερματολογικές αλλοιώσεις που προήλθαν από ανοσοεπαρκείς ασθενείς. Χρησιμοποιώντας την τεχνική της PCR, διαπιστώσαμε την ύπαρξη HPV DNA στα 29 από τα 108 (27%) δείγματα. Τα αποτελέσματα αυτά συνάδουν με τα αντίστοιχα των Shamanin και συν. (Shamanin,1996) που ταυτοποίησαν την παρουσία HPV DNA σε 32% των μη-μελανωματικών καρκίνων του δέρματος ανοσοεπαρκών ασθενών. Τα ανωτέρω μας οδηγούν στην υπόθεση της συμβολής των HPV μολύνσεων στην αιτιοπαθογένεια των NMSCs σε ανοσοεπαρκείς ασθενείς.

7.2.2 Ανάλυση των αποτελεσμάτων

Η υψηλότερη επίπτωση (40%) του ιού HPV ανευρέθη στους ασθενείς με εξωγεννητική νόσο του Bowen και ακολουθούν οι ασθενείς με βασικοκυτταρικό καρκίνο (31%). Αν και ο αριθμός των δειγμάτων με νόσο του Bowen που εξετάστηκαν είναι περιορισμένος λόγω της σπανιότητας της ασθένειας, εν τούτοις τα συμπεριλάβαμε στην μελέτη μας ως στοιχεία όσον αφορά στον πιθανό ρόλο των HPV στην αιτιοπαθογένεια αυτής της νόσου.

Επίσης, παλαιότερες μελέτες που έχουν διεξαχθεί σχετικά με τους ιούς HPVs και την νόσο του Bowen είτε περιελάμβαναν λιγότερα από 12 δείγματα (Lampert 2000, Pham-Huu 1999, Mitsuishi 1997) είτε επρόκειτο για αναφορές μεμονωμένων περιστατικών (Park,1998).

Στην μελέτη μας, εξετάσαμε την παρουσία των κοινών υψηλού κινδύνου γεννητικών τύπων HPV 16,18 και 33, καθώς και την ύπαρξη του χαμηλού κινδύνου γεννητικού τύπου HPV 11. Για να ανιχνεύσουμε αυτούς τους τύπους εφαρμόσαμε τεχνικές PCR ευαίσθητες και ειδικές για κάθε τύπο. Ο υψηλού κινδύνου γεννητικός τύπος HPV 18 ανιχνεύθηκε στο 48% των βλαβών. Οι Dokianakis και συν. (Dokianakis,1998) επίσης βρήκαν υψηλότερο ποσοστό μόλυνσης με HPV 18 στις Ελληνίδες σε εστίες προερχόμενες από την αναπαραγωγική οδό, κάτι που αποδόθηκε στην γεωγραφική κατανομή των ασθενών.

Οι HPV τύποι 16 και 33 δεν ανιχνεύθηκαν ενώ ο τύπος 11 ανιχνεύθηκε στο 3.5% των βλαβών. Η υψηλή συχνότητα του βλεννογονικού HPV DNA σε δερματικές βλάβες δείχνει ότι οι ιοί του ανθρώπινου θηλώματος είναι περισσότερο ευρέως διαδεδομένοι, από ότι μέχρι πρότινος πιστεύαμε. Μια άλλη πιθανή εξήγηση είναι η ύπαρξη μίας αρχικής λοίμωξης της γεννητικής οδού και η μετάδοση στις δερματικές εστίες λαμβάνει χώρα μέσω αυτοεμβολιασμού. Επιπλέον, η μικρή συχνότητα του χαμηλού κινδύνου γεννητικού HPV 11 ο οποίος ανιχνεύθηκε μόνο σε προκαρκινικές βλάβες, σε αντίθεση με την μεγάλη συχνότητα του υψηλού κινδύνου HPV 18 ο οποίος ανιχνεύθηκε ως επί το πλείστον σε ασθενείς με βασικοκυτταρικό καρκίνο, μπορεί να υποδεικνύουν μία άμεση συμβολή αυτού του ογκογόνου ιού στην ανάπτυξη μη-μελανωματικού καρκίνου του δέρματος.

Εφαρμόσαμε την τεχνική της PCR χρησιμοποιώντας ειδικούς για κάθε τύπο εκκινητές για να εντοπίσουμε την ύπαρξη DNA των πιο κοινών δερματικών HPV τύπων 1 και 2, καθώς και των κατ'εξοχήν συνδεόμενων με την νόσο EV τύπων 5 και 8. Οι τύποι 1 και 2, οι οποίοι συνήθως ανευρίσκονται στις μυρμηγκιές και στους κοινούς σπύλους, δεν ανιχνεύθηκαν με την τεχνική που χρησιμοποιήθηκε. Αντιθέτως, οι ειδικοί για την EV τύποι 5 και 8 οι οποίοι θεωρούνται ακίνδυνοι για τον γενικό πληθυσμό ανιχνεύθηκαν σε ποσοστά 24% και 62% αντίστοιχα.

Ο τύπος HPV 8 ήταν ο πλέον συχνά ανιχνεύσιμος τύπος από όλους τους τύπους που βρέθηκαν, και εντοπίστηκε κυρίως σε εστίες βασικοκυτταρικού καρκινώματος. Το ογκογενετικό δυναμικό του HPV 8 και πιθανώς του HPV 5 θα μπορούσαν να παίζουν έναν αιτιολογικό ρόλο στην ανάπτυξη των εστιών του βασικοκυτταρικού καρκινώματος, πιθανότατα σε συνδυασμό με άλλους παράγοντες όπως είναι η υπεριώδης ακτινοβολία. Η σημασία ενός συν-καρκινογόνου παράγοντα στην επαγωγή του καρκίνου του δέρματος προκύπτει και από τον ογκογενετικό μηχανισμό των HPVs που σχετίζονται με την EV: DNA από τους ειδικούς για την EV HPV τύπους παραμένει κυρίως σε επισωματική μορφή εντός των αρχικών δερματικών όγκων αντί να ενσωματώνεται στο κυτταρικό DNA. Η ενσωμάτωση λαμβάνει χώρα συνήθως στους γεννητικούς υψηλού κινδύνου HPVs (Harris,1997).

Σε αρκετά δείγματα (41%) αναγνωρίστηκαν περισσότεροι του ενός τύποι HPV. Οι πολλαπλές μολύνσεις αφορούσαν κυρίως σε DNA των τύπων 8 και 18 (24%), ενώ σε χαμηλότερη συχνότητα οι συν-μολύνσεις αφορούσαν στους τύπους 5 και 8 (7%), 5 και 18 (3.5%), 8 και 11 (3.5%). Επίσης, ένα δείγμα ακανθοκυτταρικού καρκίνου παρουσίασε μόλυνση με 3 διαφορετικούς τύπους: τους HPVs 5,8 και 18. Η πλειονότητα των εστιών που παρουσίασε τους τύπους 8 και 18 ήταν βασικοκυτταρικά καρκινώματα. Θα

μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι ο συνδυασμός ενός ογκογόνου HPV, όπως ο HPV 18, με έναν δυνητικά ογκογόνο HPV, όπως ο HPV 8, ο οποίος θεωρείται μη παθογόνος για τον γενικό πληθυσμό, θα μπορούσε να έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη κλινικής νόσου μέσω μηχανισμών αλληλεπίδρασης μεταξύ των ιών.

Σε προηγηθείσες μελέτες κατά τις οποίες εξετάστηκαν δείγματα φυσιολογικού δέρματος από υγιή άτομα, είτε ανιχνεύθηκαν HPV αλληλουχίες σε πολύ χαμηλή συχνότητα είτε απέτυχαν να ανιχνεύσουν γονιδίωμα του HPV (Kagie,1997). Λαμβάνοντας υπ' όψιν αυτά τα δεδομένα, τα ευρήματά μας παρέχουν στοιχεία ότι συγκεκριμένοι τύποι HPV είναι παρόντες τόσο σε καρκινικά όσο και σε προκαρκινικά δείγματα και είναι δυνατόν να ενέχονται στην ογκογενετική διαδικασία του μη-μελανωματικού καρκίνου του δέρματος. Απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για να καθοριστούν οι λειτουργίες με τις οποίες αυτοί οι HPVs δύνανται να επάγουν καρκινογόνες μεταλλάξεις σε μη ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς, στους οποίους το ανοσοποιητικό σύστημα φυσιολογικά αναστέλλει την ανάπτυξη κλινικά εμφανών βλαβών.

7.3 Ανίχνευση των ερπητοϊών σε προκαρκινικές αλλοιώσεις και καρκίνο του δέρματος

7.3.1 Γενικά

Η οικογένεια των ερπητοϊών έχει ενοχοποιηθεί στο παρελθόν ως αιτιολογικός παράγοντας πολλών καρκίνων του ανθρώπου. Όσον αφορά στους ιούς του απλού έρπητα (HSV), ο ιός HSV-2 έχει συνδεθεί μέσω ορολογικών και μοριακών μελετών με τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας (Rawls 1977, McDougall 1980). Ο ανθρώπινος ερπητοϊός 6 (HHV-6) συνδέεται με νόσους που σχετίζονται με τον λεμφοκυτταρικό πολλαπλασιασμό (Ablashi,1988). Επίσης, το σάρκωμα Kaposi προκαλείται από τον ανθρώπινο ερπητοϊό 8 (HHV-8), γνωστό και ως KS (Moore,1996). Ο ιός Epstein-Barr εμπλέκεται στην αιτιοπαθογένεια του καρκινώματος του ρινοφάρυγγα και το αφρικανικό λέμφωμα Burkitt (zur Hausen,1970). Ο κυτταρομεγαλοϊός CMV έχει ενοχοποιηθεί για τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας (Pacsa,1975), το αδenoκαρκίνωμα του προστάτη (Sanford,1977) και του παχέος εντέρου (Huang,1978) και το σάρκωμα Kaposi (Giraldo,1980).

7.3.2 Ανάλυση των αποτελεσμάτων

Όλα τα δείγματα που εξετάστηκαν ήταν αρνητικά για την ύπαρξη DNA των ιών του απλού έρπητα (HSV) και του ιού Epstein-Barr. Παρόλο που όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, οι ιοί του απλού έρπητα και ο ιός Epstein-Barr έχουν ενοχοποιηθεί για την ανάπτυξη μιας πλειάδας καρκινικών και μη βλαβών, εν τούτοις στην παρούσα μελέτη με την μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε (PCR), δεν επιβεβαιώθηκε η συμμετοχή τους στην εμφάνιση του μη-μελανωματικού καρκίνου του δέρματος.

Αντίθετα, 39% των δειγμάτων βρέθηκαν θετικά για τον κυτταρομεγαλοϊό (CMV). Η υψηλότερη επίπτωση του CMV (75%) παρουσιάστηκε στα δείγματα με προκαρκινικές αλλοιώσεις. Ακολούθως, σε ασθενείς με βασικοκυτταρικό καρκίνο η επίπτωση ήταν 37.5%, ενώ στους ασθενείς με ακανθοκυτταρικό καρκίνο και σε αυτούς με νόσο Bowen ήταν αντίστοιχα 35% και 20%. Η ανίχνευση του CMV δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά σχετικά με το φύλο των ασθενών ή με την εντόπιση των βλαβών.

Λόγω της ευρείας κατανομής του ιού CMV και το υψηλό ποσοστό του πληθυσμού που έχει έρθει κάποια στιγμή σε επαφή με τον ιό (προκαλώντας υψηλό τίτλο αντισωμάτων στο αίμα), είναι δύσκολο να εδραιωθεί μία αιτιολογική συσχέτιση μεταξύ της λοίμωξης με CMV και του καρκίνου στον άνθρωπο. Ο ιός CMV είναι ένας βήτα-ερπητοϊός ο οποίος μολύνει το 50-90% των ενηλίκων και παραμένει σε λανθάνουσα κατάσταση. Σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς μπορεί να επανεργοποιηθεί και να προκαλέσει ακόμα και εστιακές επιθηλιακές βλάβες (Brit,1996).

Εν τούτοις, υπάρχουν στοιχεία βασισμένα σε ιολογικές, επιδημιολογικές και μοριακές μελέτες τα οποία δεικνύουν την παρουσία ιικού DNA ή αντιγόνων σε καρκινικούς ιστούς, υποδηλώνοντας την συμμετοχή του CMV σε συγκεκριμένους όγκους. Στελέχη τόσο του λοιμογόνου ιού CMV αλλά και του απενεργοποιημένου με υπεριώδη ακτινοβολία CMV, έχει δειχθεί ότι είναι ικανά να μεταμορφώσουν κύτταρα θηλαστικών *in vitro*, και ότι αυτά τα μεταμορφωμένα κύτταρα είναι καρκινογόνα σε ποντίκια. Επιπλέον, η μόλυνση με τον CMV τροποποιεί την έκφραση διαφόρων πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και στην απόπτωση, προκαλώντας ερωτήματα για την εμπλοκή συγκεκριμένων γονιδίων του CMV στην κυτταρική μεταμόρφωση.

Έχει δειχθεί ότι οι πρωτεΐνες του CMV προάγουν την μεταλλαξιγένεση, τροποποιούν τον κυτταρικό κύκλο και την αγγειογένεση (Cinatl,1996). Έχει αναφερθεί η ανίχνευση CMV DNA στον καρκίνο του παχέος εντέρου (Huang,1978). Επιπλέον, μία πρόσφατη μελέτη έδειξε τόσο την ύπαρξη του ιικού γονιδιώματος όσο και την έκφραση των ιικών

πρωτεϊνών IE1-72 σε πολύποδες του παχέος εντέρου και σε αδενοκαρκινώματα. Στην ίδια μελέτη, οι παρακείμενοι μη νεοπλασματικοί ιστοί δεν εμφάνιζαν τα ανωτέρω (Harkins,2002).

Τα στοιχεία αυτά αποτελούν ισχυρή ένδειξη του σημαντικού ρόλου που διαδραματίζει ο CMV στην πολυσταδιακή διαδικασία της μεταμόρφωσης ενός φυσιολογικού κυττάρου σε κακόηθες. Στην παρούσα διατριβή δείχθηκε μια σημαντική συχνότητα μόλυνσης με CMV σε ασθενείς με μη-μελανωματικό καρκίνο του δέρματος. Είναι γεγονός ότι ο CMV δύναται να μολύνει επιθηλιακά κύτταρα αλλά δεν έχει εδραιωθεί η ικανότητα του να τα μεταμορφώνει. Εφόσον στον μη-μελανωματικό καρκίνο του δέρματος ο κύριος αιτιολογικός παράγοντας θεωρούνται οι μεταλλάξεις που επάγονται από την υπεριώδη ακτινοβολία, θα μπορούσε να υποτεθεί ότι η λοίμωξη με τον ιό CMV ο οποίος έχει αποδεδειγμένη μεταλλαξιογόνο δράση (Shen,1997), θα μπορούσε να συμβάλλει στην γονιδιακή αστάθεια, αυξάνοντας με αυτόν τον τρόπο την πιθανότητα απορύθμισης των γονιδίων του κυτταρικού κύκλου.

Τέλος, σε αρκετά δείγματα CMV θετικών ασθενών (26%) ανιχνεύθηκε η ταυτόχρονη ύπαρξη HPV. Οι πολλαπλές μολύνσεις αφορούσαν κυρίως σε HPV DNA των τύπων 8 και 18. Θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι ο συνδυασμός του κυτταρομεγαλοϊού με έναν ογκογόνο HPV, όπως ο HPV 18, ή έναν δυνητικά ογκογόνο HPV, όπως ο HPV 8, θα μπορούσε να έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη κλινικής νόσου μέσω μηχανισμών αλληλεπίδρασης μεταξύ των ιών, επιβεβαιώνοντας για μια ακόμη φορά την πολυπαραγοντική και πολυσύνθετη φύση της διαδικασίας της καρκινογένεσης.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ablashi DV, Josephs SF, Buchbinder A, Hellman K, Nakamura S and Llana T. Human B-lymphotropic virus (human herpesvirus-6). *J Virol Methods* 21:29,1988.
- Arends MJ, Donaldson YK, Duvall E, Wyllie AH and Bird CC. HPV in full thickness cervical biopsies: high prevalence in CIN 2 and CIN 3 detected by a sensitive PCR method. *J Path* 165: 301-309,1991.
- Bagchi S, Raychaudhuri P and Nevins JR. Adenovirus E1A proteins can dissociate heteromeric complexes involving the E2F transcription factor: a novel mechanism for E1A trans-activation. *Cell* 62:659-669,1990.
- Balfour HH Jr. Antiviral drugs. *N Engl J Med* 340: 1255-1268,1999.
- Band V, Zaychowski D, Kulesa V and Sager R. Human papilloma virus DNAs immortalize normal human mammary epithelial cells and reduce their growth factor requirements. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:463-467,1990.
- Bandara LR, Adamczewski JP, Hunt T and La Thangue NB. Cyclin A and the retinoblastoma gene product complex with a common transcription factor. *Nature* 352:249-251,1991.
- Bauer HM, Hildesheim A, Schiffman MH, Glass AG, Rush BB, Scott DR, Cadell DR, Cadell DM, Kurman RJ and Manso MM. *Sex Transm Dis* 20:274-278,1993.
- Bauknecht T, Angel P, Royer HD and zur Hausen H. Identification of a negative regulatory domain in the human papillomavirus type 18 promoter: interaction with the transcriptional repressor YY1. *EMBO J* 11:4607-4617,1992.
- Bauknecht T, Jundt F, Herr I, Oehler T, Delius H, Shi Y, Angel P and zur Hausen H. A switch region determines the cell type-specific positive or negative action of YY1 on the activity of the human papillomavirus type 18 promoter. *J Virol* 69:1-12,1995.
- Beaudenon S, Praetorius F, Kremsdorf D, Lutzner M, Worsae N, Petnau-Arnaudet G and Orth G. *J Invest Dermatol* 88:130-135,1987.
- Berkhout RJ, Tieben LM, Smits HL, Bouwes Bavinck JN, Vermeer BJ and ter Schegget J. *J Clin Microbiol* 33:690-695,1995.
- Berkhout RJ, Bouwes Bavinck JN and ter Schegget J. Persistence of human papillomavirus DNA in benign and (pre)malignant skin lesions from renal transplant recipients. *J Clin Microbiol* 38:2087-2096,2000.
- Bernard HU, Chan SY and Delius H. Evolution of papillomaviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 186:33-54,1994.
- Bonnez W, Elswick RK Jr, Bailey Farchione A, Hallahan D, Bell R, Isenberg R, Stoler MH and Reichman RC. *Am J Med* 96:420-425,1993.

- Bouvard V, Storey A, Pim D and Banks L. *EMBO J* 13:5451-5459,1994.
- Brit WJ and Alford CA. Cytomegalovirus. *Fields Virology*, Lippincot, Williams and Wilkins, Philadelphia, PA:2493,1996.
- Brown ZA, Benedetti JK and Watts DH. A comparison between detailed and simple histories in the diagnosis of genital herpes complicating pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 172; 1299-1303,1995.
- Burke RL. Current status of HSV vaccine development. *The human herpes viruses*, Raven press, 1993.
- Burkhardt A, Willingham M, Gay C, Jeang KT and Schlegel R. *Virology* 170:334-339,1989.
- Chan WK, Klock G and Bernard HU. Progesterone and glyocorticoid response elements occur in the long control regions of several human papillomaviruses involved in anogenital neoplasia. *J Virol* 63:3261-3269,1989.
- Chen EY, Howley PM, Levinson AD and Seeburg PH. The primary structure and genetic organisation of the bovine papillomavirus type 1 genome. *Nature* 299:529-534,1982.
- Chiang CM, Ustav M, Stenlund A, Ho TF, Broker TR and Chow LT. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:5799-5803,1992.
- Cinatl Jr J, Cinatl J, Vogel JU, Rabenau H, Kornhuber B and Doerr HW. Modulatory effects of human cytomegalovirus infection on malignant properties of cancer cells. *Intervirology* 39:259,1996.
- Cohen JI and Corey GR. Cytomegalovirus infection in the normal host. *Medicine* 64:100-114,1985.
- Cohen JI. Epstein-Barr virus and the immune system: hide and seek. *J Am Med Assoc* 278: 510-513,1997.
- Collier AC, Handsfield HH, Ashley R, Roberts PL, DeRouen T, Meyers JD and Corey L. Cervical but not urinary excretion of cytomegalovirus is related to sexual activity and contraceptive practices in sexually active women. *J Infect Dis* 171: 33-38,1995.
- Conrad M, Bubb VJ and Schlegel R. *J Virol* 67:6170-6178,1993.
- Cooper KD, Androphy EJ, Lowy DR and Katz SI. *J Invest Dermatol* 94:769-776,1990.
- Corey L, Adams H, Brown ZA and Holmes K. Genital herpes simplex virus infections: clinical manifestations, course and complications. *Ann Intern Med* 98: 958-972,1983.
- Crawford LV and Crawford EM. *Virology* 21:258-263,1963.
- DeCaprio JA, Ludlow JW, Figge J, Shew JY, Huang CM, Lee WH, Marsilio E, Paucha E and Livingston DM. SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene. *Cell* 54:275-283,1988.

Demers GW, Foster SA, Halbert CL and Galloway DA. Proc Natl Acad Sci USA 91:4382-4386,1994.

de Villiers EM. Heterogeneity of the human papillomavirus group. J Virol 63 :4898-4903,1989.

de Villiers EM. Human pathogenic papillomavirus types :an update. Curr Topics Microbiol Immunol 86:1-12,1994.

Dokianakis DN, Sourvinos G, Sakkas S, Athanasiadou E and Spandidos DA. Detection of HPV and *ras* gene mutations in cervical smears from female genital lesions. Oncol Rep 5:1195-1198,1998.

Doorbar J, Campbell D, Grand RJA and Gallimore PH. EMBO J 5:355-362,1986.

Doorbar J, Ely S, Sterling J and Crawford L. Nature 352:824-827,1991.

Drew WL, Buhles W and Erlich KS. Herpesvirus infections (cytomegalovirus, herpes simplex virus, varicella-zoster virus): how to use ganciclovir (DHPG) and acyclovir. Infect Dis Clin North Am 2:495,1988.

Durst M, Gissmann L, Ikenberg H and zur Hausen H. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. Proc Natl Acad Sci USA 80:3812-3815,1983.

Durst M, Dzarlieva-Petrusevska RT, Boukamp P, Fusenig NE and Gissmann L. Oncogene 1:251-256,1987.

Dyson N, Howley PM, Munger K and Harlow E. The human papilloma virus 16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. Science 243:934-937,1989.

Dyson N, Guida P, Munger K and Harlow E. Homologous sequences in adenovirus E1A and human papillomavirus E7 proteins mediate interaction with the same set of cellular proteins. J Virol 66:6893-6902,1992.

Ergazaki M, Xinarianos G, Koffa M, Liloglou T and Spandidos DA. Detection of human cytomegalovirus by the polymerase chain reaction in immunosuppressed and immunocompromised patients. Oncol Reports 1: 805-808,1994.

Erlich KS, Mills J and Chatis P. Aciclovir-resistant herpes simplex virus infections in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. N Engl J Med 320: 293-296,1989.

Favre M, Breitburd F, Croissant O and Orth G. J Virol 21:1205-1209,1977.

Ferency A, Bergeron C and Richart RM. Carbon dioxide laser energy disperses human papillomavirus deoxyribonucleic acid onto treatment fields. Am J Obstet Gynecol 163:1271-1274,1990.

Frazer IH, Medley G, Crapper RM, Brown TC and Mackay IR. Lancet ii: 657-660,1986.

Garden JM, O'Banion MK, Shelnitz MS, Pinski KS, Bakus AD, Reichmann ME and Sundberg JP. Papillomavirus in the vapor of carbon dioxide laser-treated verrucae. *J Am Med Assoc* 259:1199-1202,1988.

Giraldo G, Beth E and Huang ES. Kaposi's sarcoma and its relationship to cytomegalovirus (CMV). III. CMV DNA and CMV early antigens in Kaposi's sarcoma. *Int J Cancer* 26:23,1980.

Gissmann L and zur Hausen H. Human papilloma virus DNA: physical mapping and genetic heterogeneity. *Proc Natl Acad Sci USA* 73:1310-1313,1976.

Gissmann L, Pfister H and zur Hausen H. *Virology* 76:569-580,1977.

Gissmann L and zur Hausen H. Partial characterization of viral DNA from human genital warts (condylomata accuminata). *Int J Cancer* 25:605-609,1980.

Gissmann L, Diehl V, Schultz-Coulon H and zur Hausen H. Molecular cloning and characterization of human papillomavirus DNA derived from a laryngeal papilloma. *J Virol* 44:393-400,1982.

Gloss B, Yeo-Gloss M, Meisterernst M, Rogge L, Winnacker EL and Bernard HU. Clusters of nuclear factor I binding sites identify enhancers of several papillomaviruses but alone are not sufficient for enhancer function. *Nucl Acids Res* 9:3519-3533,1989.

Gu Z, Pim D, Labrecque S, Banks L and Matlashewski G. DNA damage induced p53 mediated transcription is inhibited by human papillomavirus type 18 E6. *Oncogene* 9:629-633,1994.

Harabuchi Y, Imai S and Wakashima J. Nasal T-cell lymphoma causally associated with Epstein-Barr virus. Clinicopathologic, phenotypic and genotypic studies. *Cancer* 77: 2137-2149,1996.

Harkins L, Volk AL, Samanta M, Mikolaenko I, Brit WJ and Bland KI. Specific localisation of human cytomegalovirus nucleic acids and proteins in human colorectal cancer. *Lancet* 360:1557,2002.

Harris AJ, Purdie K, Leigh IM, Proby C and Burge S. A novel human papillomavirus identified in epidermodysplasia verruciformis. *Br J Dermatol* 136:587-591,1997.

Harwood CA, McGregor JM, Proby C and Breuer J. Human papillomavirus and the development of non-melanoma skin cancer. *Clin Pathol* 52:249-253,1999.

Hashida T and Yasumoto S. *J Gen Virol* 72:1569-1577,1991.

Heck DV, Yee C, Howley PM and Munger K. Efficiency of binding the retinoblastoma protein correlates with the transforming capacity of the E7 oncoproteins of the human papillomaviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:4442-4446,1992.

- Henderson S, Row M and Gregory C. Induction of bcl-2 expression by Epstein-Barr latent membrane proteins protects infected B-cells from programmed cell death. *Cell* 65: 1107-1115,1991.
- Huang ES and Roche JK. Cytomegalovirus DNA and adenocarcinoma of the colon: evidence for latent viral infection. *Lancet* 1:957,1978.
- Huibregtse JM and Scheffner M. *Seminars Virol* 5:357-367,1994.
- Human Virology. Oxford Medical Publications,1993.
- Hwang ES, Nottoli T and DiMaio D. *Virology* 211:227-233,1995.
- Ishiwatari H, Hayasaka N, Inoue H, Yutsudo M and Hakura A. Degradation of p53 only is not sufficient for the growth stimulatory effect of human papillomavirus 16 E6 oncoprotein in human embryonic fibroblasts. *J Med Virol* 44:243-249,1994.
- Jablonska S and Majewski S. *Curr Topics Microbiol Immunol* 186:157-175,1994.
- Jewers RJ, Hildebrandt P, Ludlow JW, Kell B and McCance DJ. Regions of human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein required for immortalization of human keratinocytes. *J Virol* 66:1329-1335,1992.
- Jones JF, Shurim S and Abramowsky C. T-cell lymphomas containing Epstein-Barr viral DNA in patients with chronic Epstein-Barr virus infection. *New Engl J Med* 318: 733-741,1988.
- Iwatsuki K, Xu Z, Ohtsuka M and Kaneko F. Cutaneous lymphoproliferative disorders associated with Epstein-Barr virus infection: a clinical overview. *J Derm Sci* 22: 181-195,2000.
- Kagie MJ, Kenter GG, Zomerdijk-Nooijen Y, Hermans J, Schuurin E, Timmers PJ, Trimbos JB and Fleuren GJ. Human papillomavirus infection in squamous cell carcinoma of the vulva, in various synchronous epithelial changes and in normal vulvar skin. *Gynecol Oncol* 67:178-183,1997.
- Kano Y and Shiohara T. Current understanding of cytomegalovirus infection in immunocompetent individuals. *J Derm Sci* 22: 196-204,2000.
- Kern SE, Kinzler KW, Bruskin A, Jarosz D, Friedman P, Prives C and Vogelstein B. Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein. *Science* 252:1708-1711,1991.
- Khanim F, Tao QY and Niedobitek G. Analysis of Epstein-Barr virus gene polymorphism in normal donors and in virus-associated tumors from different geographic locations. *Blood* 88: 3491-3501,1996.
- Knudson AG Jr. Genetics of human cancer. *Annu Rev Genet* 20:231-251,1986.

- Lakeman FD, Whitley RJ and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Collaborative Antiviral Study Group. Diagnosis of herpes simplex encephalitis: application of polymerase chain reaction to cerebrospinal fluid from brain biopsied patients and correlation with disease. *J Infect Dis* 172: 857-863,1995.
- Komano J and Takata K. The structure and function of EBV genes. *Jpn J Clin Med* 55: 2-5, 1997.
- Lampert A, Pauwels C, Duboucher C, Morel G, Poveda JD and Perie G. Detection of human papillomavirus in cutaneous extragenital Bowen's disease in immunocompetent patients. *Ann Dermatol Venereol* 127:40-45,2000.
- Leptak C, Ramon y Cajal S, Kulke R, Horwitz BH, Riese I, Dotto GP and DiMaio D. *J Virol* 65:7078-7083,1991.
- Lewandowsky F and Lutz W. *Arch Dermatol Syph (Berlin)* 141:193-203,1922.
- Liebowitz D. Epstein-Barr virus and a cellular signaling pathway in lymphomas from immunosuppressed patients. *New Engl J Med* 338:1413-1421,1998.
- Liloglou T, Giannoudis A, Ergazaki M, Koffa M and Spandidos DA. Detection of the Epstein-Barr virus by the polymerase chain reaction in immunosuppressed and immunocompromised patients. *Oncol Reports* 1: 809-811,1994.
- Livingstone LR, White A, Sprouse J, Livanos E, Jacks T and Tlsty TD. Altered cell cycle arrest and gene amplification potential accompany loss of wild-type p53. *Cell* 70:923-935,1992.
- Lutzner M, Croissant O, Ducasse MF, Kreis H, Crosnier J and Orth G. *J Invest Dermatol* 75:353-356,1980.
- Majewski S, Malejczyk J, Jablonska S, Misiewicz J, Rudnicka L, Obalek S and Orth G. *J Am Acad Dermatol* 22:423-427,1990.
- Mansur CP and Androphy EJ. Cellular transformation by papillomavirus oncoproteins. *Biochim Biophys Acta* 1155:323-345,1993.
- Markert JM, Gillespie YG, Weichselbaum RR, Roizman B and Whitley RJ. Genetically engineered HSV in the treatment of glioma: a review. *Rev Med Virol* 10: 17-30,2000.
- May M, Dong XP, Beyer-Finkler E, Stubenrauch F, Fuchs PG and Pfister H. The E6/E7 promoter of extrachromosomal HPV 16 DNA in cervical cancers escapes from cellular repression by mutation of target sequences for YY1. *EMBO J* 13:1460-1466,1994.
- McDougall JK, Galloway DA and Fenoglio CM. Cervical carcinoma: detection of herpes simplex virus RNA in cells undergoing neoplastic change. *Int J Cancer* 25:1,1980.
- McMichael A. T-cell responses and viral escape. *Cell* 93: 673-676,1998.

Melchers W, de Mare S, Kuitert E, Galama J, Walboomers J and van den Brule AJC. *J Clin Microbiol* 31:2547-2549,1993.

Mitsuishi T, Sata T, Matsukura T, Iwasaki T and Kawashima M. The presence of mucosal human papillomavirus in Bowen's disease of the hands. *Cancer* 79:1911-1917,1997.

Miyashita T, Kawauchi H, Asada M, Mizutani S and Ibuka T. Epstein-Barr virus type B in patients with T-cell lymphoma. *Lancet* 337: 1045-1046,1991.

Moore PS, Gao SJ, Dominguez G, Cesarman E, Lungu O and Knowles DM. Primary characterization of a herpesvirus agent associated with Kaposi's sarcomae. *J Virol* 70:549,1996.

Moy RL, Eliezri YD, Nuovo GJ, Zitelli JA, Bennett RG and Silverstein S. Human papillomavirus type 16 DNA in periungual squamous cell carcinomas. *J Am Med Assoc* 261:2669-2673,1989.

Munger K, Phelps WC, Bubb V, Howley PM and 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* 63:4417-4423,1989.

Myers TW and Gelfand DH. Reverse transcription and DNA amplification by a *Thermus thermophilus* DNA polymerase. *Biochem* 30: 7661-7666, 1991.

Nahmias AJ, Lee FK and Bechman-Nahmias S. Sero-epidemiological and sociological patterns of herpes simplex virus infection in the world. *Scand J Infect Dis* 69: 19-36,1990.

Oriel JD. *Br J Vener Dis* 47:1-13,1971.

Orth G, Favre M and Croissant O. Characterization of a new type of human papillomavirus that causes skin warts. *J Virol* 24:108-120,1977.

Orth G, Jablonska S, Favre M, Jarzabek-Chorzelska M and Rzeska G. *Proc Natl Acad Sci USA* 75:1537-1541,1978.

Pacsa AS, Kummerlander L, Pejtsik B and Pali K. Herpesvirus antibodies and antigens in patients with cervical anaplasia and in controls. *J Natl Cancer Inst* 55:775,1975.

Palevsky JM, Gonzales J, Greenblatt RM, Ahn DK and Hollander H. *J Am Med Assoc* 263:2911-2916,1990.

Palevsky JM, Holly EA, Gonzales J, Berline J, Ahn DK and Greenspan JS. *Cancer Res* 51:1014-1019,1991.

Park KC, Kim KH, Youn SW, Hwang JH, Park KH, Ahn JS, Kim YG, Kim SD, Lee DY, Choe JH, Chung JH and Cho KH. Heterogeneity of human papillomavirus DNA in a patient with Bowenoid papulosis that progressed to squamous cell carcinoma. *Br J Dermatol* 139:1087-1091,1998.

Pfister H, Hettich I, Runne U, Gissmann L and Chilf GN. *J Virol* 44:363-366,1983.

Pham-Huu V, Derancourt C, Clavel C, Durlach A, Birembaut P and Bernard P. Oncogenic mucosal human papillomaviruses in Bowen's disease of the hands. *Ann Dermatol Venereol* 126:808-812,1999.

Phelps WC, Yee CL, Munger K and Howley PM. Functional and sequence similarities between HPV 16 E7 and adenovirus E1A. *Curr Top Microbiol Immunol* 144:153-166,1989.

Phelps WC, Munger K, Yee CL, Barnes JA and Howley PM. Structure-function analysis of the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *J Virol* 66:2418-2427,1992.

Pim D, Collins M and Banks L. *Oncogene* 7:27-32,1992.

Preece PM, Pearl KN and Peckham CS. Congenital cytomegalovirus infection. *Arch Dis Childh* 59:1120-1126,1984.

Prose N, von Knebel Doeberitz C, Miller S, Milburn PB and Heilman E. *J Am Acad Dermatol* 23:978-981,1990.

Rawls WE, Bacchetti S and Graham FL. Relation of herpes simplex viruses to human malignancies. *Curr Top Microbiol Immunol* 77:71,1977.

Roberts S, Ashmole I, Johnson GD, Kreider JW and Gallimore PH. *Virology* 197:176-187,1993.

Rogers BB, Alpert LC, Hine EAS and Buffone GJ. Analysis of DNA in fresh and fixed tissue by the PCR. *Am J Pathol* 136: 541-548,1990.

Rogers BB, Josephson SL and Mak SK. Detection of herpes simplex virus using the polymerase chain reaction followed by endonuclease cleavage. *Am J Pathol* 139: 1-6,1991.

Rosenfeld WD, Vermund SH, Wentz SJ and Burk RD. *Am J Dis Child* 143:1443-1447,1989.

Rous P and Beard JW. *Proc Soc Exp Biol Med* 32:578-580,1934.

Rowe M, Lear AL, Cloom-Carter D, Davies AH and Rickinson AB. Three pathways of Epstein-Barr virus gene activation from EBNA-1-positive latency in B lymphocytes. *J Virol* 66: 122-131,1992.

Σπαντίδος ΔΑ. Ιολογία. Ιατρικές εκδόσεις Λίτσας,1991.

Σπαντίδος ΔΑ. Μοριακή και κυτταρική ογκολογία. Ιατρικές εκδόσεις Λίτσας,1992.

Sanford EJ, Geder L, Laychock A, Rohner Jr TJ and Rapp F. Evidence for the association of cytomegalovirus with carcinoma of the prostate. *J Urol* 118:789,1977.

Saral R, Burns WH, Laskin OL, Santos GW and Leitman PS. Aciclovir prophylaxis of herpes simplex virus infections: a randomized, double-blind, controlled trial in bone-marrow-transplant recipients. *N Engl J Med* 305:63-67,1981.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA and Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350-1354,1985.

Saiki RK, Chang CA, Levenson CH, Warren TC, Boehm CD, Kazazian HH Jr and Erlich HA. Diagnosis of sickle cell anemia and beta-thalassemia with enzymatically amplified DNA and nonradioactive allele-specific oligonucleotide probes. *N Engl J Med* 319: 537-541, 1988.

Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD and Howley PM. *Cell* 75:495-505,1993.

Schwarz E, Freese UK, Gissmann L, Mayer W, Roggenbuck B and zur Hausen H. *Nature* 314:111-114,1985.

Seo YS, Muller F, Lusky M, Gibbs E, Kim HY, Phillips B and Hurwitz J. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:2865-2869,1993.

Shamanin V, Glover M, Rausch C, Proby C, Leigh IM, zur Hausen H and de Villiers EM. *Cancer Res* 54:4610-4613,1994.

Shamanin V, zur Hausen H, Lavergne D, Proby C, Leigh IM, Neumann C, Hamm H, Goos M, Hausteiner UF, Jung EG, Plewig G, Wolff H and de Villiers EM. Human papillomavirus infections in nonmelanoma skin cancers from renal transplant recipients and nonimmunosuppressed patients. *J Natl Cancer Inst* 88:802-811,1996.

Sharma AK, Taylor JD, Tong W, Brown RA, Sells RA and Bakran A. Utility of the pp65 antigenemia test in the diagnosis of cytomegalovirus (CMV) in renal transplant recipients. *Transplant Proc* 29:799,1997.

Shen Y, Zhu H and Shenk T. Human cytomegalovirus IE1 and IE2 proteins are mutagenic and mediate "hit-and-run" oncogenic transformation in cooperation with the adenovirus E1A proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:3341,1997.

Shimizu N, Tanabe-Tochikura A, Kuroiwa Y and Takada K. Isolation of Epstein-Barr (EBV)-negative cell clones from the EBV-positive Burkitt's lymphoma (BL) line Akata: malignant phenotypes of BL cells are dependent on EBV. *J Virol* 68: 6069-6073,1994.

Snijders PJ, Schulten EA, Mullink H, ten Kate RW, Jiwa M, van der Waal I, Meijer CJ and Walboomers JM. Detection of human papillomavirus and Epstein-Barr virus DNA sequences in oral mucosa of HIV-infected patients by the polymerase chain reaction. *Am J Pathol* 137: 659-666,1990.

Spandidos DA. A unified theory for the development of cancer. *Biosci Rep* 6 (8):691-708,1986.

Spandidos DA and Anderson MLM. A study of mechanisms of carcinogenesis by gene transfer of oncogenes into mammalian cells. *Mutations Res* 185: 271-291,1987.

Spruance SL, Overall JC Jr, Kern ER, Krueger GG, Pliam V and Miller W. The natural history of recurrent herpes simplex labialis- implications for antiviral therapy. *N Engl J Med* 297:69-75,1977.

Stagno S, Pass RF, Dworsky ME and Alford CA. Congenital and perinatal cytomegalovirus infections. *Sem Perin* 7: 31-42,1983.

Steinberg BM, Topp WC, Schneider PS and Abramson AL. Laryngeal papillomavirus infection during clinical remission. *N Engl J Med* 308:1261-1264,1983.

Storey A and Banks L. Human papillomavirus type 16 E6 gene cooperates with EJ-ras to immortalize primary mouse cells. *Oncogene* 8:919-924,1993.

Strauss SE, Cohen JI, Tosato G and Meier J. Epstein-Barr virus infections: biology, pathogenesis and management. *Ann Intern Med* 118: 45-58,1993.

Su IJ, Wang CH, Cheng AL and Chen RL. Hemophagocytic syndrome in Epstein-Barr virus-associated T-lymphoproliferative disorders: disease spectrum, pathogenesis, and management. *Leuk Lymphoma* 19: 401-406,1995.

Suggs SV, Wallace RB, Hirose T, Kawashima EH and Itakura K. Use of synthetic oligonucleotides as hybridization probes: isolation of cloned cDNA sequences for human β 2-microglobulin. *PNAS USA* 78: 6613-6615,1981.

Sverdrup F and Khan SA. *J Virol* 68:505-509,1994.

Tan SH, Leong LE, Walker PA and Bernard HU. The human papillomavirus type 16 E2 transcription factor binds with low cooperativity to two flanking sites and represses the E6 promoter through displacement of Sp1 and TFIID. *J Virol* 68:6411-6420,1994.

Tannock IF, Cummings BJ. Neoadjuvant chemotherapy in head and neck cancer: no way to preserve a larynx. *J Clin Oncol* 10 (2): 343-345,1992.

The M.D. Anderson surgical oncology handbook. Lippincott Press,1999.

Tommasino M, Adameczewski JP, Carlotti F, Barth CF, Manetti R, Contorni M, Cavalieri F, Hunt T and Crawford L. HPV 16 E7 protein associates with the protein kinase p33CDK2 and cyclin A. *Oncogene* 8:195-202,1993.

Tong CMW. Diagnosis of cytomegalovirus infection and disease. *J Med Microbiol* 46:717-719,1997.

Thierry F, Spyrou G, Yaniv M and Howley PM. Two AP1 sites binding JunB are essential for human papillomavirus type 18 transcription in keratinocytes. *J Virol* 66:3740-3748,1992.

Ustav M and Stenlund A. *EMBO J* 10:449-457,1991.

Wang ECY, Taylor-Wiedemann J, Perera P, Fisher J and Borysiewicz LK. Subsets of CD8+, CD57+ cells in normal healthy individuals: correlations with human cytomegalovirus (HCMV) carrier status, phenotypic and functional analyses. *Clin Exp Immunol* 94:297-305,1993.

Ward PL, Roizman B. Herpes simplex genes: the blueprint of a successful human pathogen. *Trends Genet* 10:267-274,1994.

Watanabe S, Arima K, Nishioka M, Yoshino S, Hasui H and Fujikawa M. Comparison between sporadic cytomegalovirus hepatitis and Epstein-Barr virus hepatitis in previously healthy adults. *Liver* 17:63-69,1997.

Werness BA, Levine AJ and Howley PM. *Science* 248:76-79,1990.

White AE, Livanos EM and Tlsty TD. Differential disruption of genomic integrity and cell cycle regulation in normal human fibroblasts by the HPV oncoproteins. *Genes Dev* 8:666-677,1994.

Whitley RJ. Herpes simplex virus. *Fields' virology*, 4th edn, Lippincott press.

Whitley RJ, Alford CA and Hirsch MS. Vidarabine versus aciclovir therapy in herpes simplex encephalitis. *N Engl J Med* 314: 144-149,1986.

Whitley RJ and Roizman B. Herpes simplex virus infections: a review. *Lancet* 357: 1513-1518,2001.

Whyte P, Buchkovich KJ, Horowitz JM, Friend SH, Raybuck M, Weinberg RA and Harlow E. Association between an oncogene and an anti-oncogene: the adenovirus E1A proteins bind to the retinoblastoma gene product. *Nature* 334:124-129,1988.

Wong HK and Ziff EB. The human papillomavirus type 16 E7 protein complements adenovirus type 5 E1A amino-terminus-dependent transactivation of adenovirus type 5 early genes and increases ATF and Oct-1 DNA binding activity. *J Virol* 70:332-340,1996.

Χατζής Ι. Βασική δερματολογία και αφροδισιολογία, εκδόσεις Λίτσας,1994.

Xu C, Meikrantz W, Schlegel R and Sager R. The human papilloma virus 16 E6 gene sensitizes human mammary epithelial cells to apoptosis induced by DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:7829-7833,1995.

Yang L, Mohr I, Fouts E, Lim DA, Nohaile M and Botchan M. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:5086-5090,1993.

Zerfass K, Schulze A, Spitkovsky D, Friedman V, Henglein B and Jansen-Durr P. Sequential activation of cyclin E and cyclin A gene expression by human papillomavirus type 16 E7 through sequences necessary for transformation. *J Virol* 69:6389-6399,1995.

zur Hausen H, Schulte-Holthausen H, Klein G, Henle W, Henie G and Clifford P. EBV DNA in biopsies of Burkitt tumors and anaplastic carcinomas of the nasopharynx. *Nature* 228:1056,1970.

zur Hausen H, Meinhof W, Scheiber W and Bornkamm GW. Attempts to detect virys-specific DNA in human tumors. Nucleic acid hybridization with complementary RNA of human wart virus. *Int J Cancer* 13:650-656,1974.

zur Hausen H. Robert Koch Found Bull Commun 6:9-17,1983.

zur Hausen H. Human papillomaviruses in the pathogenesis of anogenital cancer. *Virology* 184:9-13,1991.

zur Hausen H. Papillomavirus infections-a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta* 1288:55-78,1996.

zur Hausen H. Immortalization of human cells and their malignant conversion by high risk human papillomavirus genotypes. *Semin Cancer Biol* 9 (6): 405-411,1999.

