



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

**ΙΩΑΝΝΗΣ Ν. ΜΑΜΜΑΣ**

# Ο ΙΟΣ ΤΟΥ ΘΗΛΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ ΗΡΝ ΣΕ ΕΝΗΛΙΚΕΣ ΚΑΙ ΠΑΙΔΙΑ:

ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΙΟΥ ΜΕ ΤΑ ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΑ *ras*  
ΣΤΟΝ ΤΡΑΧΗΛΟ ΤΗΣ ΜΗΤΡΑΣ  
ΚΑΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΟΥ ΣΕ ΑΔΕΝΟΕΙΔΕΙΣ  
ΚΑΙ ΑΜΥΓΔΑΛΟΕΙΔΕΙΣ ΕΚΒΛΑΣΤΗΣΕΙΣ ΣΕ ΠΑΙΔΙΑ

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**Τίτλος Διατριβής:** «Ο ιός του θηλώματος του ανθρώπου HPV σε ενήλικες και παιδιά: Αλληλεπίδραση του ιού με τα ογκογονίδια *ras* στον τράχηλο της μήτρας και ανίχνευση του σε αδenoειδείς και αμυγδαλοειδείς εκβλαστήσεις σε παιδιά»

**Επιβλέπων Καθηγητής:**

Δ.Α. Σπαντίδος, Καθηγητής Ιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Κρήτης

**Τριμελής Επιτροπή:**

Δ.Α. Σπαντίδος, Καθηγητής Ιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Κρήτης

Ε. Κουμαντάκης, Καθηγητής Γυναικολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Κρήτης

Γ. Σαμώνης, Καθηγητής Παθολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Κρήτης

**Επταμελής Επιτροπή:**

Δ.Α. Σπαντίδος, Καθηγητής Ιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Κρήτης

Ε. Κουμαντάκης, Καθηγητής Γυναικολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Κρήτης

Γ. Σαμώνης, Καθηγητής Παθολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Κρήτης

Γ. Σουρβίνος, Επίκουρος Καθηγητής Ιολογίας Ιατρικής Σχολής Κρήτης

Α. Ζαφειρόπουλος, Επίκουρος Καθηγητής Ιστολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Κρήτης

Ε. Γαλανάκης, Επίκουρος Καθηγητής Παιδιατρικής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Κρήτης

Χ. Τσατσάνης, Επίκουρος Καθηγητής Εργαστηριακής Ιατρικής Ιατρικής Σχολής Κρήτης

© **Εργαστήριο Κλινικής Ιολογίας,**

**Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Κρήτης,**

**Ηράκλειο Κρήτης,**

**Μάιος 2006**



*στους γονείς μου*

*στον καθηγητή μου κ. Δημήτριο Σπαντίδο*

## ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

**Ιωάννης Μαμμάς, Ιατρός,**

Υποψήφιος Διδάκτορας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Κρήτης

Ο Ιωάννης Μαμμάς γεννήθηκε στη Χαλκίδα της Εύβοιας. Το 1996 με πανελλήνιες εξετάσεις εισάγεται στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου της Κρήτης, και το 2002 έλαβε το πτυχίο της Ιατρικής με βαθμό 8,42. Από το Νοέμβριο του 2002 εκπονεί τη διδακτορική διατριβή του στο Εργαστήριο Ιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης με επιβλέποντα καθηγητή τον καθηγητή Ιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης κ. Δ.Α. Σπαντίδο. Το αντικείμενο της διατριβής του ήταν η μελέτη της αλληλεπίδρασης του ιού του θηλώματος του ανθρώπου HPV με τα ογκογονίδια *ras* στον τράχηλο της μήτρας και η ανίχνευση του ιού σε αδenoειδείς και αμυγδαλοειδείς εκβλαστήσεις σε παιδιά. Από το 2003 έως σήμερα είναι μέλος της οργανωτικής επιτροπής του World Congress on Advances in Oncology και του International Symposium on Molecular Medicine που διοργανώνει κάθε χρόνο το Εργαστήριο Ιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης. Από τον Δεκέμβριο του 2005 έως τον Φεβρουάριο του 2006 με υποτροφία του Ι.Κ.Υ. ήταν μέλος ως visiting postgraduate student στο 'Roy Castle' Lung Cancer Research Centre του Πανεπιστημίου του Λίβερπουλ της Μεγάλης Βρετανίας.

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Καταρχήν θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Δημήτριο Σπαντίδο, καθηγητή Ιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης για τη βοήθεια, την καθοδήγηση και τη στήριξη που μου προσέφερε καθόλη τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Τον ευχαριστώ ιδιαίτερα γιατί πέρα από την απaráμιλλη επιστημονική καθοδήγηση που μου προσέφερε, στάθηκε δίπλα μου σε δύσκολες περιόδους προσφέροντας μου ηθική στήριξη και αμέριστη συμπαράσταση.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον επίκουρο καθηγητή Ιστολογίας κ. Αλέξανδρο Ζαφειρόπουλο για την εποικοδομητική συνεργασία μας και την πολύτιμη ερευνητική εμπειρία που απέκτησα δίπλα του όλο αυτό το διάστημα.

Ευχαριστώ επίσης τους συνεπιβλέποντες Καθηγητές μου, Δασκάλους μου, κ. Ευγένιο Κουμαντάκη, καθηγητή της Γυναικολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης και κ. Γεώργιο Σαμώνη, καθηγητή της Παθολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης για τις δημιουργικές συμβουλές τους και τις γνώσεις που μου μετέδωσαν.

Θα ήθελα ακόμα να ευχαριστήσω τον κ. Γεώργιο Σουρβίνο, επίκουρο καθηγητή Ιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης για τη βοήθειά και τη συμπαράστασή του κατά τη διάρκεια ολοκλήρωσης της διατριβής.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλα τα μέλη της επταμελούς επιτροπής για το χρόνο που διέθεσαν και τα θετικά τους σχόλια.

Επιπλέον, ευχαριστώ τους Διδάκτορες του Πανεπιστημίου Κρήτης Σταύρο Σηφάκη, επιμελητή Α' ΕΣΥ του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου και Γιαννούλα Σούφλα

για τη συμβολή τους στη συλλογή των τραχηλικών δειγμάτων, την παθολογοανατόμο κ. Κατερίνα Μιχαήλ, Διευθύντρια του Παθολογοανατομικού Εργαστηρίου του Νοσοκομείου Παίδων ‘Π.&Α. Κυριακού’ και την παθολογοανατόμο Νότα Γιαμαρέλου, Επιμελήτρια Β’ ΕΣΥ για τη βοήθεια τους στη συλλογή των παιδιατρικών δειγμάτων της μελέτης, τους Διδάκτορες του Πανεπιστημίου Κρήτης Δημήτριο Αρβανίτη, Δέσποινα Δοκιανάκη, Βούλα Μπαριτάκη, Δημήτριο Πανουτσόπουλο, Νικόλαο Σουλιτζή, και Μανώλη Παπαδάκη, ειδικευόμενο στην Καρδιολογία στο ‘Βενιζέλειο’ Γενικό Νοσοκομείο Ηρακλείου για τη βοήθειά τους καθώς και όλα τα παιδιά του εργαστηρίου για την πολύ καλή συνεργασία μας στον εργαστηριακό πάγκο.

Ευχαριστώ ακόμα την ερευνήτρια του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας Δήμητρα Βαγγέλη, Διδάκτορα του Πανεπιστημίου Κρήτης για τη συνεργασία μας, τη βιοστατιστικό Ιωάννα Μοσχανδρέα, Διδάκτορα του Πανεπιστημίου Κρήτης για τη βοήθεια της στην στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων, τον πολύ καλό φίλο Διονύσιο Ουρανό για την άρτια επιμέλεια των σχημάτων της διατριβής καθώς και τη Βίκυ Αγγελοπούλου για τη συνεργασία μας κατά την έκδοση του παρόντος.

Θα ήθελα, επίσης, να μου επιτραπεί να ευχαριστήσω τους μεταδιδακτορικούς ερευνητές του ‘Roy Castle’ Lung Cancer Research Centre στο Πανεπιστήμιο του Λίβερπουλ της Μεγάλης Βρετανίας Τριαντάφυλλο Λιλόγλου, Διδάκτορα του Πανεπιστημίου Κρήτης και Γεώργιο Ξηναριανό, Διδάκτορα του Πανεπιστημίου του Λίβερπουλ, καθώς και τη μεταδιδακτορική ερευνήτρια του Royal Hospital of Liverpool Αθηνά Γιαννούδη, Διδάκτορα του Πανεπιστημίου του Λίβερπουλ, για την πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφεραν καθόλη τη διάρκεια της παραμονής μου στο Λίβερπουλ.

Κλείνοντας, θα ήταν παράληψή μου να μην ευχαριστήσω το φίλο, συμφοιτητή και συνεργάτη μου για αρκετά χρόνια, ιατρό και άξιο ερευνητή Γεώργιο Μπερτσιά, υποψήφιο

Διδάκτορα του Πανεπιστημίου Κρήτης, για τις δημιουργικές συζητήσεις μας όλο αυτό το διάστημα των ερευνητικών μας κοινών αναζητήσεων και αγωνιών.

Θα ήθελα, τέλος, να ευχαριστήσω τη Χρυσούλα και το Γιώργο Καρτσωνάκη καθώς και τη Μαρία και το Γιώργο Παπαδάκη για τη φιλοξενία τους και τέλος τους γονείς μου καθώς και την αδερφή μου για την στήριξη και την κατανόησή τους.

*Ιωάννης Μαμμάς, Ιατρός*

*Εργαστήριο Ιολογίας,  
Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Κρήτης*



8<sup>th</sup> World Congress on Advances in Oncology & 6<sup>th</sup> International Symposium on Molecular Medicine. Χερσόνησος, Κρήτη, 16 Οκτωβρίου 2003. Ο καθηγητής κ. Δ.Α. Σπαντίδος μαζί με την ερευνητική του ομάδα.



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι ιοί του θηλώματος του ανθρώπου (HPVs) είναι μικροί διπλής έλικας DNA ιοί, οι οποίοι συνιστούν μια οικογένεια από περισσότερους από 130 γενοτύπους. Οι ιοί HPVs έχουν παγκόσμια κατανομή και προκαλούν ένα ευρύ φάσμα από καλοήθεις και κακοήθεις αλλοιώσεις στον άνθρωπο. Παρά το γεγονός πως η λοίμωξη με τον ιό HPV θεωρείται σεξουαλικά μεταδιδόμενο νόσημα, οι ιοί HPVs μπορούν επίσης να μεταδοθούν μέσω και άλλων μη σεξουαλικών οδών όπως η κάθετη μετάδοση, ο αυτοενοφθαλμισμός και ο ετεροενοφθαλμισμός και πιθανόν η έμμεση μετάδοση μέσω φομιτών. Πρόσφατες μελέτες προτείνουν ότι η περιγενετική λοίμωξη και ο αυτοενοφθαλμισμός ή ο ετεροενοφθαλμισμός συμβαίνουν πολύ πιο συχνά από ό,τι πιστευόταν στο παρελθόν. Έχει βρεθεί πως η κάθετη μετάδοση του ιού HPV από HPV-θετικές μητέρες στα νεογέννητα βρέφη οδηγεί σε επιμένουσα λοίμωξη στα πρώτα 3 χρόνια της ζωής τους. Οι λοιμώξεις στα νεογέννητα προκαλούνται κυρίως από τους τύπους HPV 16 και 18 και ανιχνεύονται τόσο στη γενετική περιοχή όσο και στη στοματική τους κοιλότητα. Ωστόσο είναι ασαφές πόσο συχνά οι περιγεννητικές λοιμώξεις εξελίσσονται σε κλινικές αλλοιώσεις.

Οι ιοί HPV μπορούν να ταξινομηθούν σε δερματικούς και βλεννογόνιους ανάλογα με τη θέση της λοίμωξης. Οι δερματικοί HPV τύποι προσβάλλουν το επιθήλιο του δέρματος και προκαλούν καλοήθη δερματικά θηλώματα, όπως το κοινό θήλωμα, το ακροχορδώδες θήλωμα και το επίπεδο θήλωμα. Οι βλεννογόνιοι HPV τύποι προσβάλλουν το βλεννογόνο του τραχήλου της μήτρας, του ανώτερου αναπνευστικού σωλήνα και του οισοφάγου και αποτελούν τον κύριο αιτιολογικό παράγοντα για την ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία και τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Ωστόσο, παρά το γεγονός πως η παρουσία «υψηλού κινδύνου» ιών HPV έχει προταθεί ως αναγκαία συνθήκη για την αθανατοποίηση των επιθηλιακών κυττάρων, πειράματα *in vitro* έχουν δείξει πως η μόλυνση από μόνη της δεν

είναι ικανή να οδηγήσει στον κακοήγη μετασχηματισμό του τραχήλου της μήτρας. Οι παρατηρήσεις αυτές επιβεβαιώνονται στην κλινική πράξη λόγω τόσο της χαμηλής επίπτωσης του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας σε σχέση με την ευρεία διασπορά του ιού HPV παγκόσμια, όσο και λόγω του μεγάλου χρονικού διαστήματος που διαρκεί η εξέλιξη της HPV-επαγόμενης νεοπλασίας του τραχήλου της μήτρας. Επιπρόσθετοι περιβαλλοντικοί και γενετικοί παράγοντες, όπως η ενεργοποίηση ογκογονιδίων του κυττάρου ξενιστή είναι πιθανόν να συμμετέχουν στην εξέλιξη της HPV λοίμωξης σε καρκίνο του τραχήλου της μήτρας.

Η οικογένεια των ογκογονιδίων *ras* αποτελείται από τρία καλά χαρακτηρισμένα γονίδια, το Harvey (H)-*ras*, το Kirsten(K)-*ras* και το Neuroblastoma (N)-*ras*, τα οποία κωδικοποιούν μια πρωτεΐνη μεγέθους 21 kDa (p21) με ενεργότητα GTPάσης, η οποία συμμετέχει στην μετάδοση κυτταρικών μηνυμάτων. Η υπερέκφραση των ογκογονιδίων *ras* παίζει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της καρκινογένεσης και έχει παρατηρηθεί σε αρκετά είδη καρκίνου στον άνθρωπο, όπως στο καρκίνο του μαστού, του παχέος εντέρου, της κεφαλής-τραχήλου, της ουροδόχου κύστης και του πνεύμονα. Στόχος της παρούσας διατριβής ήταν να εκτιμηθούν οι ποσοτικές και οι ποιοτικές αλλαγές στην έκφραση των ογκογονιδίων *ras* σε γυναίκες με φυσιολογικό τράχηλο, με ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία CIN και με καρκίνο του τραχήλου της μήτρας και να εξεταστεί η σχέση των αλλαγών αυτών με την παρουσία του ιού HPV. Η έκφραση των επιπέδων mRNA των ογκογονιδίων *ras* εξετάστηκε με τη μέθοδο της αντίστροφης μεταγραφής-αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης RT-PCR. Επιπλέον, μελετήθηκε η συχνότητα ανεύρεσης σημειακών μεταλλάξεων στο κωδικόνιο 12 των ογκογονιδίων *ras* με τη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης PCR και της ανάλυσης πολυμορφισμού μεγέθους περιοριστικών θραυσμάτων RFLP. Η ανίχνευση και η τυποποίηση των ιών HPV έγινε με PCR με τη χρήση κατάλληλων γενικών και ειδικών εκκινητών. Τα επίπεδα έκφρασης mRNA

των ογκογονιδίων *H-ras* και *N-ras* ήταν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερα στην ομάδα ασθενών με καρκίνο του τραχήλου σε σχέση με τις ομάδες ασθενών με CIN και φυσιολογικό τράχηλο, ενώ τα αντίστοιχα επίπεδα έκφρασης mRNA του ογκογονιδίου *K-ras* δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις τρεις ομάδες των ασθενών της μελέτης. Στις HPV θετικές ασθενείς, τα επίπεδα έκφρασης των ογκογονιδίων *H-*, *K-* and *N-ras* ήταν μεγαλύτερα σε γυναίκες με καρκίνο της μήτρας θετικές για τους ιούς «υψηλού κινδύνου» HPV 16 ή 18. Διαφορές παρατηρήθηκαν επίσης στην έκφραση των ογκογονιδίων *ras* σε ασθενείς με καρκίνο του τραχήλου της μήτρας μεταξύ γυναικών με πολλαπλή και μονήρη HPV λοίμωξη. Τα ευρήματα της μελέτης μας παρουσιάζουν την έκφραση σε μεταγραφικό επίπεδο των ογκογονιδίων *ras* στον τράχηλο της μήτρας και υποδεικνύουν την πιθανή συμμετοχή της στην παθογένεια του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Τα αποτελέσματα μας ενισχύουν την υπόθεση της αλληλεπίδρασης των ογκογονιδίων *ras* του κυττάρου ξενιστή με τους ιούς «υψηλού κινδύνου» HPV 16 ή 18. Περαιτέρω έρευνα απαιτείται για τη μελέτη του ρόλου της ενεργοποίησης των ογκογονιδίων *ras* στη επιμονή και την εξέλιξη της HPV λοίμωξης.

Επίσης, μελετήσαμε τη συχνότητα της HPV λοίμωξης σε παιδιά με καλοήγη υπερπλασία των αδενοειδών ή/και των αμυγδαλοειδών εκβλαστήσεων. Μέχρι σήμερα αρκετοί ερευνητές έχουν αξιολογήσει την παρουσία του ιού HPV στην στοματική κοιλότητα στην παιδική ηλικία μελετώντας το σάλιο ή στοματικά εκπλύματα, ωστόσο τα δεδομένα σχετικά με την HPV λοίμωξη σε βιοψιακό υλικό του μη καρκινικού βλεννογόνου της στοματικής κοιλότητας είναι περιορισμένα. Στη μελέτη μας, το DNA του ιού HPV ανιχνεύτηκε με τη χρήση της αντίδρασης PCR με γενικούς εκκινητές και η τυποποίηση του ιού πραγματοποιήθηκε με PCR με τη χρήση ειδικών εκκινητών. Ο ιός HPV ανιχνεύτηκε σε 9 (8,5%) από τα 106 δείγματα που μελετήθηκαν. Ο ιός HPV 16 ήταν κυρίαρχος, ενώ ο ιός HPV 11 ανιχνεύτηκε λιγότερο συχνά. Η μέση ηλικία των παιδιών με HPV-θετικά δείγματα

ήταν μικρότερη σε σχέση με τα HPV–αρνητικά παιδιά. Δεν παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στη συχνότητα ανίχνευσης του ιού ανάμεσα στις αδενοειδείς και τις αμυγδαλοειδείς εκβλαστήσεις. Οι επιπτώσεις της παρουσίας του ιού HPV, παρά το γεγονός της χαμηλής της συχνότητας, στις αμυγδαλοειδείς και αδενοειδείς εκβλαστήσεις στα παιδιά απομένει να διευκρινισθεί. Περαιτέρω έρευνα όσον αφορά τη λοίμωξη με τον ιό στα παιδιά θα μας βοηθήσει στο να κατανοήσουμε τη φυσική ιστορία του ιού και τον πιθανό ρόλο του στην ανάπτυξη καλοήθους υπερπλασίας των αδενοειδών και των αμυγδαλοειδών εκβλαστήσεων στα παιδιά.

## ABSTRACT

Human Papilloma Viruses (HPVs) are small double-stranded DNA viruses, which comprise a family of more than 130 genotypes. HPVs occur worldwide and induce a broad spectrum of benign and malignant epithelial lesions in humans. Although HPV infection is considered as a sexual transmitted infection, HPVs may also be transmitted by other non-sexual routes including vertical transmission, autoinoculation and heteroinoculation, and, possibly, indirect transmission via fomites. Recent studies suggest that perinatal infection and autoinoculation or heteroinoculation may be much more likely than originally thought. It has been found that vertical HPV transmission from HPV positive mothers to their infants results in persistent infection in their first 3 years of life. Neonatal infections seem to be caused predominantly by HPV types 16 and 18 in the genital area as well as in buccal cavity. However, it is still unclear how frequently perinatal infections progress to clinical lesions.

HPVs can be classified into cutaneous or mucosal types according to their site of infection. Cutaneous HPV types infect the squamous epithelium of the skin and produce benign skin warts including common warts, plantar warts and flat warts. Mucosal HPV types infect the mucous membranes of the cervix, the upper respiratory tract and esophagus and have been considered as the principal etiologic factors of the development of cervical intraepithelial neoplasia and cervical carcinoma. However, although the presence of 'high risk' HPV types is proposed as a virtually necessary cause of primary epithelial cells immortalization, *in vitro* experiments have shown that HPV infection alone is not sufficient to engender a full tumorigenic conversion of cervical tissue. This is illustrated by the rare occurrence of cancer compared with the wide distribution of HPV infection worldwide and the long latency of HPV-induced cervical neoplasia. Additional environmental and genetic

factors, such as the activation of host cellular oncogenes are likely to be involved in the persistence and progression of HPV infection to cervical cancer.

The family of *ras* oncogenes consists of three well-characterized genes, Harvey (H)-*ras*, Kirsten(K)-*ras* and Neuroblastoma (N)-*ras*, genes that encode for a 21 kDa (p21) protein with GTPase activity which participates in cellular signal transduction. Overexpression of the *ras* oncogenes has also been suggested to play an important role in carcinogenesis and has been implicated in several human cancers including breast, colon, head and neck, bladder and lung. The purpose of this study was to evaluate the quantitative and qualitative changes of expression of the *ras* family oncogenes in women with normal cervix, with cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and with cervical cancer and to investigate their relationship with HPV infection. The expression of *ras* mRNA levels was examined using reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). In addition, we studied the incidence of point mutations in codon 12 of each *ras* gene using polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis. HPV detection and typing was performed using PCR with general and specific primers. The transcript levels for H-*ras* and N-*ras* were significantly higher in cancer cases compared to normal cervical tissues and CIN lesions, while the transcript levels for K-*ras* were similar in normal cervical tissue, CIN and cervical cancer. Among HPV positive patients, H-, K- and N-*ras* expression levels were higher in HPV 16/18-associated cases with cervical cancer. Differences in *ras* mRNA expression between multiple HPV and single HPV infection were also detected in patients with cervical cancer. Our findings indicate the expression pattern of the three *ras* oncogenes in cervical tissue and the involvement of H- and N-*ras* upregulation in the pathogenesis of cervical cancer. Our results support the hypothesis of a potential interactive effect between high-risk' HPV 16/18 and transcriptional activation of *ras*

oncogenes in cervical carcinogenesis. Further investigation is needed to determine the influence of *ras* oncogenes activation on HPV persistence and progression.

We also determined the frequency of HPV infection in children with benign adenoid or/and tonsillar hyperplasia. To date several researchers have evaluated the presence of HPV DNA in children's buccal cavity by studying oral swabs or washings of healthy children, however data on HPV infection in biopsy specimens of tumor free oral mucosa are limited. HPV DNA was detected using PCR with general primers and HPV typing was performed by PCR by using specific primers. HPV DNA was detected in 9 (8.5%) of 106 specimens. HPV 16 was predominant, while HPV 11 was detected less frequently. The mean age of children with HPV-positive specimens was lower than HPV-negative children. There was observed no statistical important difference in the prevalence of HPV infection between adenoid and tonsillar tissues. The consequences of the presence of HPV, although at low frequency, in children's tonsils and adenoids remain to be elucidated. Further research on oral HPV infection in children will enable as to understand HPV natural history and its possible role in the development of tonsillar and adenoid hyperplasia in children.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>Ευχαριστίες</b> .....	v
<b>Περίληψη</b> .....	viii
<b>Abstract</b> .....	xii
<b>Περιεχόμενα</b> .....	xv
<b>Εισαγωγή</b> .....	1
<b>A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	
<b>Κεφάλαιο 1. Εισαγωγή στην Κλινική Ιολογία</b>	
1.1. Εισαγωγή-Ιστορική Αναδρομή.....	6
1.2. Δομή των ιών.....	8
1.3. Ταξινόμηση.....	9
1.4. Αναπαραγωγή των ιών.....	10
1.4.1. Το στάδιο της προσρόφησης	
1.4.2. Το στάδιο της διεισδύσης	
1.4.3. Το στάδιο της απέκδυσης	
1.4.4. Το στάδιο της μεταγραφής	
1.4.5. Το στάδιο της σύνθεσης	
1.4.6. Το στάδιο της συναρμολόγησης	
1.4.7. Το στάδιο της απελευθέρωσης	
1.5. Αλληλεπίδραση ιού με το κύτταρο ξενιστή.....	13
1.5.1. Μετάδοση των ιογενών λοιμώξεων	
1.5.2. Ανοσολογική απάντηση του ξενιστή	
1.5.3. Επίδραση του ιού στον ξενιστή	
1.6. Διάγνωση ιογενών λοιμώξεων.....	15
1.7. Πρόληψη και θεραπεία ιογενών λοιμώξεων.....	18
1.7.1. Ενεργητική και παθητική ανοσοποίηση	
1.7.2. Τα αντικά φάρμακα	
<b>Κεφάλαιο 2. Ο ιός του θηλώματος του ανθρώπου HPV</b>	
2.1. Γενικά.....	22
2.1.1. Ταξινόμηση	
2.1.2. Ιστορική Αναδρομή	
2.2. Ο ιός του θηλώματος του ανθρώπου HPV.....	29
2.2.1. Η δομή του ιού του θηλώματος του ανθρώπου HPV	
2.2.2. Γονιδιακή έκφραση HPV	
2.2.3. Ο κύκλος αναπαραγωγής των ιών HPV	
2.3. Από τη μόλυνση στη φλεγμονή.....	40
2.3.1. Η μετάδοση του ιού HPV στο κύτταρο ξενιστή	
2.3.2. Η εξέλιξη της μόλυνσης σε λοίμωξη	



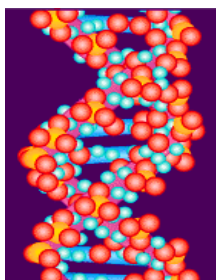
2.3.3. Η λανθάνουσα μόλυνση από τον ιό HPV	
2.3.4. Μη παραγωγική και παραγωγική φλεγμονή	
2.3.5. HPV και καρκινογένεση	
2.4. Παραγοντες εξέλιξης της μόλυνσης.....	47
2.4.1. Ανοσο-απόκριση	
2.4.2. Γενετικοί παράγοντες	
2.4.3. Άλλοι παράγοντες	
2.5. Διάγνωση HPV μόλυνσης.....	58
2.5.1. Έμμεσες και άμεσες διαγνωστικές προσεγγίσεις	
2.5.2 Τεχνικές υβριδισμού και HPV	
2.5.3. Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης και HPV	
2.6. Θεραπευτικές προσεγγίσεις-Πρόληψη.....	62
<b>Κεφάλαιο 3. Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας</b>	
3.1. Στοιχεία ανατομίας και ιστολογίας.....	65
3.2. Ιστοπαθολογοανατομικά στοιχεία.....	69
3.3. Επιδημιολογικά στοιχεία.....	72
3.3.1. Γεωγραφικά χαρακτηριστικά	
3.3.2. Ηλικια εμφάνισης	
3.4. Προκαρκινικές αλλοιώσεις: Ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία του τραχήλου.....	75
3.4.1. Γενικά	
3.4.2. Ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία του τραχήλου Τύπου 1 (CIN 1)	
3.4.3. Ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία του τραχήλου Τύπου 2 (CIN 2)	
3.4.4. Ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία του τραχήλου Τύπου 3 (CIN 3)	
3.4.5. Εξέταση κολποτραχηλικών επιχρισμάτων κατά Παπανικολάου	
3.4.6. Θεραπευτική αντιμετώπιση	
3.5. Αιτιοπαθογένεια-Προδιαθεσικοί παράγοντες.....	83
3.5.1. Ο ιός ιού του θηλώματος του ανθρώπου (HPV)	
3.5.2. Άλλοι παράγοντες	
3.6. Κλινική εικόνα, Σταδιοποίηση και Πρόγνωση.....	84
3.6.1. Κλινική εικόνα	
3.6.2 Σταδιοποίηση	
3.6.3. Πρόγνωση	
3.7. Θεραπεία.....	88
3.7.1. Χειρουργική αντιμετώπιση	
3.7.2 Ακτινοθεραπεία	
3.7.3 Χημειοθεραπεία	
3.7.4. Χημειοακτινοθεραπεία	
<b>Κεφάλαιο 4. Η μοριακή και γενετική βάση του καρκίνου</b>	
4.1. Γενικά.....	93
4.2. Παράγοντες καρκινογένεσης.....	105

1.2.1. Φυσικοί παράγοντες	
1.2.2. Χημικοί παράγοντες	
1.2.3. Ογκογόνοι Ιοί	
4.3. Ογκογονίδια.....	108
1.3.1. Αυξητικοί και αγγειογενετικοί παράγοντες	
1.3.2. Διαμεμβρανικοί υποδοχείς και κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες	
1.3.3. Μεταγραφικοί παράγοντες	
1.3.4. Πολυλειτουργικά ογκογονίδια	
4.4. Ογκοκατασταλτικά γονίδια.....	113
4.5. Γονιδιακή θεραπεία.....	114
<b>Κεφάλαιο 5. Τα γονίδια της οικογένειας <i>ras</i></b>	
5.1. Γενικά.....	117
5.2. Δομή των ογκογονιδίων <i>ras</i> .....	117
5.3. Ρύθμιση των ογκογονιδίων <i>ras</i> .....	119
5.4. Η πρωτεΐνη p21.....	121
5.5. Η ενεργοποίηση των ογκογονιδίων <i>ras</i> στον καρκίνο.....	126
2.5.1. Μεταλλάξεις των ογκογονιδίων <i>ras</i>	
2.5.2. Υπερέκφραση των ογκογονιδίων <i>ras</i>	
5.6. Ο πιθανός ογκοκατασταλτικός ρολός των ογκογονιδίων <i>ras</i> .....	131
5.7. Τα ογκογονίδια <i>raf</i> .....	133
<b>Κεφάλαιο 6. Ο ιός του θηλώματος του ανθρώπου HPV στην παιδική ηλικία</b>	
6.1. Γενικά.....	135
6.2. Τα θηλώματα στην παιδική ηλικία.....	136
6.2.1. Τα θηλώματα του δέρματος	
6.2.2. Τα θηλώματα της γεννητικής περιοχής	
6.2.3. Η θηλωμάτωση του λάρυγγα	
6.2.4. Τα θηλώματα στη στοματική κοιλότητα	
6.3. Μετάδοση του ιού HPV στα παιδιά.....	138
6.3.1. Οριζόντια μετάδοση	
6.3.2. Κάθετη μετάδοση	
6.4. Αντιμετώπιση παιδιών με θηλώματα της γεννητικής περιοχής.....	140
6.4.1. Η υποψία της σεξουαλικής κακοποίησης	
6.4.2. Το δίλημμα: Σεξουαλική κακοποίηση ή όχι;	
6.4.3. Η σημασία της ανίχνευση του ιού HPV	
6.4.4. Οδηγίες διαχείρισης και αντιμετώπισης	
6.5. Θεραπευτική αντιμετώπιση των θηλωμάτων στα παιδιά.....	145
6.6. Η σημασία του εμβολίου για τον ιο HPV στην παιδική ηλικία.....	145
 <b>B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	
<b>Κεφάλαιο 7. Αντικείμενο της διατριβής</b>	
7.1. Γενικά.....	146

7.2. Μελέτη της αλληλεπίδρασης του ιού του θηλώματος του ανθρώπου HPV με τα ογκογονίδια <i>ras</i> στον τράχηλο της μήτρας.....	146
7.3. Ανίχνευση του ιού HPV σε αδενοειδείς και αμυγδαλοειδείς εκβλαστήσεις σε παιδιά.....	150
<b>Κεφάλαιο 8. Μεθοδολογία και Υλικά</b>	
8.1. Προέλευση δειγμάτων.....	151
8.2. Εκχύλιση DNA και RNA από συμπαγή ιστό.....	153
8.2.1. Πρωτόκολλο εκχύλισης DNA από συμπαγή ιστό	
8.2.2. Πρωτόκολλο εκχύλισης RNA από συμπαγή ιστό	
8.3. Αλυσιδωτή αντίδραση με πολυμεράση (PCR).....	155
8.3.1. Αρχές της μεθόδου	
8.3.2. Ρυθμιστικοί παράγοντες της PCR	
8.3.3. Συνθήκες PCR και επιλογή εκκινητών	
8.4. Ανάλυση πολυμορφισμού μεγέθους περιοριστικών θραυσμάτων (RFLP).....	168
8.4.1. Αρχές της μεθόδου	
8.4.2. Ανίχνευση μεταλλάξεων ογκογονιδίων <i>ras</i> και τυποποίηση ιών HPV	
8.5. Αντίστροφη αλυσιδωτή αντίδραση με πολυμεράση (RT-PCR).....	175
8.5.1. Αρχές της μεθόδου	
8.5.2. Ποσοτικοποίηση επιπέδων mRNA ογκογονιδίων <i>ras</i>	
8.6. Ηλεκτροφόρηση.....	182
8.6.1. Αρχές της μεθόδου	
8.6.2. Πήκτωμα αγαρόζης	
8.6.3. Πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου	
8.7. Χρώσεις νουκλεϊκών οξέων.....	184
8.7.1 Χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο	
8.7.2. Χρώση με νιτρικό άργυρο	
8.5. Στατιστική ανάλυση.....	185
8.6. Υλικά και εταιρίες προέλευσης.....	187
<b>Κεφάλαιο 9. Αποτελέσματα</b>	
9.1. Ιστολογική διάγνωση-Ομαδοποίηση γυναικολογικών ασθενών.....	189
9.2. Μελέτη της μεταγραφικής ενεργοποίησης ογκογονιδίων <i>ras</i> σε ασθενείς με φυσιολογικό τράχηλο, με ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία και με καρκίνο τραχήλου της μήτρας.....	191
9.3. Ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων στο κωδικόνιο 12 των γονιδίων <i>ras</i> σε ασθενείς με φυσιολογικό τράχηλο, με ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία και με καρκίνο τραχήλου της μήτρας.....	195
9.4. Ανίχνευση και τυποποίηση ιών HPV σε ασθενείς με φυσιολογικό τράχηλο, με ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία και με καρκίνο τραχήλου της μήτρας.....	198
9.5. Μελέτη της σχέσης της παρουσίας υψηλού κινδύνου HPV 16/18 και της μεταγραφικής ενεργοποίησης των ογκογονιδίων <i>ras</i> .....	201
9.6. Μελέτη της σχέσης της παρουσίας πολλαπλής HPV λοίμωξης και της μεταγραφικής ενεργοποίησης	

των ογκογονιδίων <i>ras</i> .....	201
9.7. Μελέτη της σχέσης της παρουσίας HPV 16 ή 18 και της μεταγραφικής ενεργοποίησης των ογκογονιδίων <i>ras</i> .....	203
9.8. Ιστολογική διάγνωση-Ομαδοποίηση παιδιατρικών ασθενών.....	203
9.9. Ανίχνευση του ιού HPV σε αμυγδαλοειδείς και αδενοειδείς εκβλαστήσεις σε παιδιά με καλοήγη υπερπλασία των αδενοειδών ή/και των αμυγδαλοειδών τους εκβλαστήσεων.....	206
9.10. Τυποποίηση του ιού HPV σε αμυγδαλοειδείς και αδενοειδείς εκβλαστήσεις σε παιδιά.....	207
9.11. Συσχέτιση της παρουσίας του ιού HPV σε αμυγδαλοειδείς και αδενοειδείς εκβλαστήσεις σε παιδιά με την ηλικία τους.....	208
<b>Κεφάλαιο 10. Συζήτηση-Συμπεράσματα</b>	
10.1. Γενικά. Ο τράχηλος της μήτρας ως μοντέλο μελέτης του ιού HPV.....	211
10.2. Μεταγραφική ενεργοποίηση των ογκογονιδίων H- και N- <i>ras</i> στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας.....	213
10.3. Ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων ογκογονιδίων <i>ras</i> στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας και σε ενδοεπιθηλιακές νεοπλασματικές αλλοιώσεις.....	219
10.4. Ανίχνευση και τυποποίηση ιών HPV στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας και σε ενδοεπιθηλιακές νεοπλασματικές αλλοιώσεις.....	223
10.5. Συσχέτιση της παρουσίας του ιού HPV και της ενεργοποίησης των ογκογονιδίων <i>ras</i> .....	226
10.6. Ανίχνευση του ιού HPV σε αδενοειδείς και αμυγδαλοειδείς εκβλαστήσεις σε παιδιά με καλοήγη υπερπλασία των αδενοειδών ή/και των αμυγδαλοειδών εκβλαστήσεων.....	232
10.7. Συσχέτιση της παρουσίας του ιού HPV σε αδενοειδείς και αμυγδαλοειδείς εκβλαστήσεις σε παιδιά με την ηλικία τους.....	234
10.8. Τυποποίηση του ιού HPV σε αδενοειδείς και αμυγδαλοειδείς εκβλαστήσεις σε παιδιά.....	235
10.9. Συζήτηση των πιθανών τρόπων μετάδοσης του ιού HPV στη στοματική κοιλότητα στα παιδιά.....	236
10.10. Συμπεράσματα.....	238
<b>Βιβλιογραφία-Αναφορές.....</b>	<b>240</b>
<b>Λεξιλόγιο-Συντομογραφίες.....</b>	<b>267</b>

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ



Η «Μοριακή Ιατρική» αποτελεί έναν νέο ταχύτατα εξελισσόμενο κλάδο της σύγχρονης ιατρικής επιστήμης, ο οποίος έχει ως στόχο τη μελέτη της μοριακής βάσης κληρονομικών και μη νοσημάτων, τα οποία παρουσιάζονται τόσο στους ενήλικες όσο και στα παιδιά. Στην πρόοδο αυτή έχουν συμβάλει σημαντικά τα πρόσφατα επιτεύγματα της μοριακής βιολογίας, ιδιαίτερα τις τελευταίες δύο δεκαετίες, γεγονός που είχε ως αποτέλεσμα την προαγωγή της γνώσης σε επίπεδο βασικής έρευνας καθώς και την εφαρμογή στην κλινική πράξη νέων μοριακών τεχνικών και μεθόδων. Στο μέλλον η νέα γνώση για την παθοφυσιολογία των νοσημάτων σε μοριακό επίπεδο αναμένεται να προκαλέσει σημαντικές εξελίξεις στη διάγνωση και την πρόληψη των νοσημάτων. Επιπλέον οι εφαρμογές της «Μοριακής Ιατρικής» σε θεραπευτικό επίπεδο αναμένεται να οδηγήσουν στην αναθεώρηση αρκετών σημερινών θεραπευτικών προσεγγίσεων ιδιαίτερα σε περιπτώσεις νοσημάτων, όπως ο καρκίνος όπου η παραδοσιακή ιατρική αδυνατεί να προσφέρει αποτελεσματική θεραπεία.

Οι εξελίξεις της μοριακής Ιατρικής στο πεδίο της Ιολογίας έχουν ήδη καθιερωθεί τα τελευταία χρόνια στην καθημερινή κλινική πράξη. Σε διαγνωστικό επίπεδο, οι μοριακές τεχνικές εφαρμόζονται ευρέως για την ανίχνευση ιών σε διάφορα βιολογικά υγρά, κυρίως στο αίμα και το εγκεφαλονωτιαίο υγρό, παρέχοντας σημαντική βοήθεια για τη διαφορική διάγνωση και τη θεραπεία νοσημάτων, όπως η ιογενής μηνιγγίτιδα. Στο μέλλον, η βελτίωση της ευαισθησίας και

της ειδικότητας των μοριακών τεχνικών καθώς και η καθιέρωση νέων μεθόδων, όπως η μέτρηση του ικού φορτίου, αναμένεται να βοηθήσουν ακόμα περισσότερο τον κλινικό ιατρό με στόχο την αποτελεσματικότερη διαγνωστική και θεραπευτική προσέγγιση των ασθενών. Επίσης έχουν πραγματοποιηθεί σημαντικά βήματα στην κατανόηση των ικών γονιδιωμάτων καθώς και των μηχανισμών αλληλεπίδρασής σε μοριακό επίπεδο των ιών με το κύτταρο ξενιστή. Η κατανόηση των μηχανισμών αυτών έχει αποκαλύψει νέους μοριακούς στόχους για τη θεραπεία των ιογενών λοιμώξεων τόσο στους ενήλικες, όσο και στα παιδιά, όπου οι δυνατότητες της παραδοσιακής ιατρικής δυστυχώς είναι ιδιαίτερα περιορισμένες. Τέλος η καλύτερη κατανόηση των ιών σε μοριακό επίπεδο θα επιτρέψει την πιο αποτελεσματική εφαρμογή τους στη γονιδιακή θεραπεία και την αντιμετώπιση των προβλημάτων που καθιστούν σήμερα τη γονιδιακή θεραπεία ανεπιτυχή.

Το εργαστήριο της Ιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου της Κρήτης ήταν το πρώτο στον ελληνικό χώρο, όπου εφαρμόστηκε η τεχνική της PCR για την ανίχνευση του ιού του θηλώματος του ανθρώπου HPV. Ο ιός HPV αποτελεί ένα ερευνητικό αντικείμενο ιδιαίτερα ενδιαφέρον τόσο λόγω της επιβεβαιωμένης πλέον συσχέτισης της παρουσίας του ιού HPV με τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, όσο και της συσχέτισής του με καρκινικές και προκαρκινικές αλλοιώσεις και σε άλλες ανατομικές θέσεις, όπως ο οισοφάγος, το ανώτερο και το κατώτερο αναπνευστικό σύστημα. Ο τράχηλος της μήτρας αποτελεί άριστο ιστικό μοντέλο για την *in vivo* μελέτη του ιού HPV και του ρόλου του στην κακοήθη εξαλλαγή του κυττάρου ξενιστή. Η αλληλεπίδραση του ιού με το κυτταρικό γονιδίωμα φαίνεται πως αποτελεί σημαντικό παράγοντα εξέλιξης της HPV λοίμωξης και εμφάνισης καρκίνου. Ο ιός στην παιδική ηλικία ενοχοποιείται για την εμφάνιση θηλωμάτων στο δέρμα καθώς και στο λάρυγγα (θηλωμάτωση του λάρυγγα), ενώ τα τελευταία χρόνια γίνεται προσπάθεια να κατανοηθούν καλύτερα οι τρόποι

μετάδοσης και η φυσική ιστορία της HPV λοίμωξης στα παιδιά. Η εφαρμογή του εμβολίου για τον ιό HPV στην κλινική πράξη μετά την επιτυχή ολοκλήρωση των πρώτων κλινικών δοκιμών σχετικά με την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα του εμβολίου, αναμένεται τα επόμενα χρόνια να αναπολήσει το ενδιαφέρον των ερευνητών.

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκαν τόσο οι ποσοτικές και όσο και οι ποιοτικές αλλαγές στην έκφραση των ογκογονιδίων *ras* και εξετάστηκε η συσχέτισή τους με την ανίχνευση του ιού στην ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία και τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Επιπλέον ανιχνεύτηκε ο ιός HPV σε αμυγδαλοειδείς και αδενοειδείς εκβλαστήσεις σε παιδιά με καλοήγη υπερπλασία των αμυγδαλοειδών και των αδενοειδών τους εκβλαστήσεων, γεγονός που αναδεικνύει νέα ερωτήματα σχετικά με τη μετάδοση και τη φυσική πορεία της HPV λοίμωξης στην παιδική ηλικία. Τα αποτελέσματα της διατριβής έχουν δημοσιευτεί στα αναγνωρισμένα διεθνή περιοδικά *International Journal of Biological Markers* (2006) και *Gynecologic Oncology* (2004) και έχουν παρουσιαστεί σε διεθνή συνέδρια συμπεριλαμβανομένων των 8<sup>th</sup> World Congress on Advances in Oncology and 6<sup>th</sup> International Symposium on Molecular Medicine, Hersonissos, Crete, 16-18 October, 2003 και 18th Meeting of the European Association for Cancer Research, Innsbruck, Austria 3-6 July 2004.

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή αποτελείται από δύο μέρη, το γενικό και το ειδικό. Το **Γενικό Μέρος** αναφέρεται διεξοδικά:

α. στην εισαγωγή στην Κλινική Ιολογία, (**Κεφάλαιο 1**), όπου περιγράφονται τα γενικά γνωρίσματα των ιών και των λοιμώξεων που προκαλούν στον άνθρωπο,

β. στον ιό του θηλώματος του ανθρώπου HPV (**Κεφάλαιο 2**), όπου περιγράφεται η HPV λοίμωξη και ο ρόλος του ιού στην αιτιοπαθογένεια της νεοπλασίας του τραχήλου της μήτρας,

γ. στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας (**Κεφάλαιο 3**), όπου παρουσιάζονται οι παράγοντες που έχουν ενοχοποιηθεί για την πρόκλησή του, η διάγνωση, η πρόγνωση και η θεραπευτική αντιμετώπισή του,

δ. στη μοριακή βάση του καρκίνου (**Κεφάλαιο 4**), όπου παρουσιάζεται ο ρόλος των ογκογονιδίων και των ογκοκατασταλτικών γονιδίων,

ε. στην οικογένεια των ογκογονιδίων *ras* (**Κεφάλαιο 5**), όπου περιγράφονται τα γονίδια H-, K-και N-*ras*, η πρωτεΐνη Ras που κωδικοποιούν καθώς και ο διπλός τους ρόλος ως ογκογονίδια και ως ογκοκατασταλτικά γονίδια και

στ. στη σημασία του ιού HPV στην παιδική ηλικία (**Κεφάλαιο 6**), όπου περιγράφεται ο τρόπος μετάδοσης του ιού στην παιδική ηλικία και η ενοχοποίησή του στην εμφάνιση δερματικών και γεννητικών θηλωμάτων καθώς και την πρόκληση της θηλωμάτωσης του λάρυγγα.

Το **Ειδικό Μέρος** αναφέρεται:

α. στο αντικείμενο της διατριβής (**Κεφάλαιο 7**), όπου περιγράφονται οι στόχοι της μελέτης,

β. στο υλικό και τη μεθοδολογία που ακολουθήσαμε (**Κεφάλαιο 8**), όπου περιγράφονται οι ασθενείς που συμπεριλήφθησαν στη μελέτη καθώς και η μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε κατά το πειραματικό μέρος και κατά τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων,

γ. στην παρουσίαση των αποτελεσμάτων (**Κεφάλαιο 9**), και

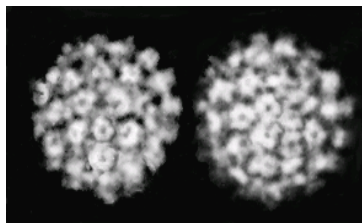


δ. στη συζήτηση των αποτελεσμάτων (**Κεφάλαιο 10**), όπου αυτά αναλύονται, τεκμηριώνονται επιστημονικά και συσχετίζονται με βάση τη διεθνή βιβλιογραφία.

Στη **Βιβλιογραφία-Αναφορές** παρουσιάζεται το σύνολο των βιβλιογραφικών αναφορών που έχουν χρησιμοποιηθεί στην ανασκόπηση της βιβλιογραφίας στο γενικό μέρος καθώς και για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων στο ειδικό.

Τέλος στο τμήμα **Λεξιλόγιο-Συντομογραφίες** έχουν συμπεριληφθεί ορισμοί βασικών εννοιών και όρων που συναντώνται και διαπραγματεύονται στη μελέτη.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1



### ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗΝ ΚΛΙΝΙΚΗ ΙΟΛΟΓΙΑ

- 1.1. Εισαγωγή-Ιστορική Αναδρομή
- 1.2. Δομή των ιών
- 1.3. Ταξινόμηση
- 1.4. Αναπαραγωγή των ιών
  - 1.4.1. Το στάδιο της προσρόφησης
  - 1.4.2. Το στάδιο της διεισδύσης
  - 1.4.3. Το στάδιο της απέκδυσης
  - 1.4.4. Το στάδιο της μεταγραφής
  - 1.4.5. Το στάδιο της σύνθεσης
  - 1.4.6. Το στάδιο της συναρμολόγησης
  - 1.4.7. Το στάδιο της απελευθέρωσης
- 1.5. Αλληλεπίδραση ιού με το κύτταρο ξενιστή
  - 1.5.1. Μετάδοση των ιογενών λοιμώξεων
  - 1.5.2. Ανοσολογική απάντηση του ξενιστή
  - 1.5.3. Επίδραση του ιού στον ξενιστή
- 1.6. Διάγνωση ιογενών λοιμώξεων
- 1.7. Πρόληψη και θεραπεία ιογενών λοιμώξεων
  - 1.7.1. Ενεργητική και παθηθητική ανοσοποίηση
  - 1.7.2. Τα αντικά φάρμακα

#### 1.1. Εισαγωγή-Ιστορική Αναδρομή

Οι ιοί αποτελούν τους μικρότερους γνωστούς λοιμογόνους οργανισμούς, οι οποίοι προσβάλλουν τον άνθρωπο προκαλώντας μια σειρά από ποικίλης βαρύτητας ασθένειες. Οι βασικές ιδιότητες που διακρίνουν τους ιούς από τους άλλους οργανισμούς είναι το μικρό τους μέγεθος, η απλή κατασκευή τους και η μεταβολική τους αδράνεια. Το μέγεθος τους κυμαίνεται

από 10nm μέχρι 300nm σε αντίθεση με τα βακτήρια, τα οποία έχουν διάμετρο περίπου 1000nm. Το ικό γονιδίωμα περιέχει ένα μόνο είδος πυρηνικού οξέος, το οποίο μπορεί να είναι δεοξυριβονουκλεοτίδιο (DNA) ή ριβονουκλεοτίδιο (RNA). Οι ιοί δεν παρουσιάζουν καμία μορφή κυτταρικής οργάνωσης και δε διαθέτουν ριβοσώματα ή άλλο μηχανισμό σύνθεσης πρωτεϊνών με αποτέλεσμα να μην έχουν καμία μεταβολική δραστηριότητα έξω από τα κύτταρα ξενιστές.

Με βάση τη μικροβιακή θεωρία της ασθένειας, η οποία διατυπώθηκε το δεύτερο μισό του 19 αιώνα, για κάθε ασθένεια θα ήταν δυνατόν να βρεθεί ένας μικροοργανισμός, ο οποίος θα ήταν ορατός στο μικροσκόπιο, θα μπορούσε να καλλιεργηθεί σε ένα θρεπτικό υλικό και θα ήταν δυνατόν να κατακρατηθεί με τη βοήθεια φίλτρων. Ωστόσο το 1892 ο Iwanowski και λίγα χρόνια αργότερα ο Beijerinck έδειξαν ότι το αιτιολογικό μέσο που προκαλούσε τη μωσαϊκή στον καπνό περνούσε από φίλτρα που συγκρατούσαν βακτήρια, δεν ήταν δυνατόν να παρατηρηθεί στο μικροσκόπιο, ούτε να καλλιεργηθεί όπως ένα βακτήριο. Οι παρατηρήσεις αυτές υποδείκνυαν την παρουσία ενός νέου τύπου μολυσματικού μέσου, το οποίο αρχικά ορίστηκε εντελώς με αρνητικούς όρους, των ιών, οι οποίοι όπως αποδείχθηκε αργότερα παίζουν σημαντικό ρόλο στη νοσολογία στον άνθρωπο τόσο στην παιδική όσο και στην ενήλικη ζωή. Ο πρώτος ιός, ο ιός της μωσαϊκής του καπνού, απομονώθηκε το 1933 από τον Schlessinger με τη μέθοδο της διαφορικής φυγοκέντρωσης, ενώ το 1935 ο Stanley απομόνωσε τον ιό σε παρακρυσταλλική μορφή. Η ανάπτυξη της ιολογίας ήλθε μετά το Β' Παγκόσμιο Πόλεμο με την εφεύρεση του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου, ενώ τις τελευταίες δύο δεκαετίες η εφαρμογή των αρχών της Μοριακής Βιολογίας στο χώρο της Ιολογίας έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη ενός νέου διαρκώς εξελισσόμενου κλάδου, εκείνου της Μοριακής Ιολογίας.

## 1.2. Δομή των ιών

Το σωματίδιο των ιών αποτελείται από το πυρηνικό οξύ (γονιδίωμα) και το πρωτεϊνικό περίβλημα (καψίδιο), το οποίο περιβάλλει το πυρηνικό οξύ του ιού. Το ιικό γονιδίωμα είναι DNA ή RNA και περιέχει όλες τις γενετικές πληροφορίες, οι οποίες αφορούν τον πολλαπλασιασμό και τη λοιμογόνο δύναμη του ιού. Μπορεί να είναι είτε μονόκλωνο, είτε δίκλωνο και να υπάρχει ως ένα ή και περισσότερα ευθύγραμμα τεμάχια ή με κυκλική μορφή. Το καψίδιο προστατεύει το γονιδίωμα του ιού από περιβαλλοντικούς παράγοντες, οι οποίοι το απενεργοποιούν, ενώ έχει αντιγονικές ιδιότητες, στις οποίες οφείλεται η ανοσολογική απάντηση του οργανισμού ξενιστή. Το καψίδιο του ιού αποτελείται από μορφολογικές μονάδες που ονομάζονται καψομερίδια, κάθε ένα από τα οποία περιέχει μια ή και περισσότερες πολυπεπτιδικές αλυσίδες. Σε ορισμένους ιούς το πρωτεϊνικό περίβλημα του ιού περιβάλλεται από τον φάκελο ή έλυτρο, το οποίο αποτελείται από δύο στιβάδες, μια λιπιδική, η οποία προέρχεται από την κυτταρική μεμβράνη και μια γλυκοπρωτεϊνική, η οποία παράγεται από τον ίδιο τον ιό. Οι γλυκοπρωτεΐνες του ιού προβάλλουν στην εξωτερική επιφάνεια του ιού και λαμβάνουν μέρος στο μηχανισμό προσκόλλησης του ιού στους κυτταρικούς υποδοχείς.

Τα σωματίδια των ιών παρουσιάζουν τρεις τύπους συμμετρίας: την κυβική, την ελικοειδή και τη σύνθετη. Στους ιούς με κυβική συμμετρία, το πυρηνικό οξύ περιβάλλεται από καψομερίδια, τα οποία είναι διευθετημένα σε εικοσάεδρα. Στους ιούς με ελικοειδή συμμετρία, το πυρηνικό οξύ έχει υποστεί επιμήκυνση και περιέλιξη με τη μορφή έλικας ή σπείρας, ενώ τα καψομερίδια είναι διατεταγμένα κατά μήκος της σπείρας του πυρηνικού οξέος. Οι ιοί με σύνθετη συμμετρία δεν παρουσιάζουν ούτε κυβική ούτε ελικοειδή συμμετρία.

### 1.3. Ταξινόμηση

Η ονομασία των ιών προέρχεται συνήθως από τη νόσο που προκαλούν (π.χ. ιός του θηλώματος του ανθρώπου, ιός της παρωτίτιδας, ιός της ιλαράς), από την τοποθεσία όπου απομονώθηκε για πρώτη φορά ο ιός (ιοί Coxsackie και Norwalk) καθώς και από το όνομα των επιστημόνων που απομόνωσαν για πρώτη φορά τον ιό (ιός Epstein-Barr). Η ταξινόμησή τους γίνεται με βάση τα χαρακτηριστικά του πυρηνικού τους οξέος -τύπος (DNA ή RNA), το Μοριακό Βάρος, τη μονόκλωνη ή δίκλωνη μορφή, τον αριθμό των ευθυγράμμων τεμαχίων και την ύπαρξη ενζύμων.

**Πίνακας 1.1.** DNA ιοί και νόσοι που προκαλούν.

Οικογένεια	Ιοί	Ασθένεια
Ποξ-ιοί	Ιός ευλογιάς Ιός μολυσματικής τερμίνθου	Ευλογιά Μολυσματική τέρμινθος
Ερπητοϊοί	Ιοί HSV-1 και HSV-2  Ιός VZV Ιός CMV (κυτταρομεγαλοϊός)	Έρπητας (επιχειλίος, οφθαλμικός, γεννητικός, νεογνικός) Ερπητική μηνιγγοεγκεφαλίτιδα Ανεμοβλογιά, Έρπητας ζωστήρα Λοιμώδης μονοπυρήνωση, εγκεφαλομηνιγγίτιδα, ηπατίτιδα, μόλυνση σε ανοσοκατεσταλμένους
	Ιός Epstein -Barr	Λοιμώδης μονοπυρήνωση, εγκεφαλομηνιγγίτιδα
Αδενοϊοί	Ιός HH6 Αδενοϊοί	Δερματικό εξάνθημα Λοίμωξη ανώτερου αναπνευστικού συστήματος
Ηπαντα-ιοί	Ιός HBV	Ηπατίτιδα
Παποβα-ιοί	Ιοί HPV	Θηλώματα δέρματος και βλεννογόνων, καρκίνος του τραχήλου της μήτρας
	Ιός JC	Προοδευτική πολυεστιακή λευκοεγκεφαλοπάθεια
Παρβο-ιοί	Ιός B19	Μολυσματικό ερύθημα, Απλασία ερυθράς σειράς

Πηγή: Δ.Α. Σπαντίδος, Κλινική Ιολογία-Αρχές, κλινικά και μοριακά στοιχεία, Εκδόσεις Λυχνία, Κρήτη 1998.

**Πίνακας 1.2.** RNA ιοί και νόσοι που προκαλούν.

Οικογένεια	Ιοί	Ασθένεια
Ορθομυξο-ιοί	Ιοί Influenza Α και Β	Γρίπη
Παραμυξο-ιοί	Ιός Parainfluenza	Λοίμωξη αναπνευστικού συστήματος
	Ιός Ιλαράς	Ιλαρά
	Ιός Παρωτίτιδας	Παρωτίτιδα
Κορονα-ιοί	Κορονα-ιός	Λοίμωξη αναπνευστικού συστήματος
Ραβδο-ιός	Ιός λύσσα	Λύσσα
Πικορνα-ιοί	Εντερο-ιοί	Μηνιγγοεγκεφαλίτιδα
	Ρινο-ιοί	Λοίμωξη αναπνευστικού συστήματος
	Ιός HAV	Ηπατίτιδα
Καλισι-ιοί	Ιοί SRSV	Γαστρεντερίτιδα
	Ιός HEV	Ηπατίτιδα
Αρμπο-ιοί	Αρμπο-ιοί	Εγκεφαλίτιδα, Αιμορραγικός πυρετός
Τογκα-ιοί	Ιός ερυθράς	Ερυθρά
Φλαβι-ιοί	Ιός HGV	ηπατίτιδα
	Ιός HCV	ηπατίτιδα
Μπουνια-ιοί	Ιός Χαϊντου	Μηνιγγοεγκεφαλίτιδα
Ρεο-ιοί	Ροτα-ιός	Γαστρεντερίτιδα
Αρένα-ιοί	Ιός Lassa	Αιμορραγικός πυρετός
Ρετρο-ιοί	HTLV-1	T-Λευχαιμία
	Ιός HIV	Σύνδρομο της επίκτητης ανοσοανεπάρκειας του ανθρώπου (AIDS)
Φιλο-ιοί	Ιός Marburg	Ασθένεια Marburg
	Ιός Ebola	Αιμορραγικός πυρετός Ebola

*Πηγή: Δ.Α. Σπαντίδος, Κλινική Ιολογία-Αρχές, κλινικά και μοριακά στοιχεία, Εκδόσεις Λυχνία, Κρήτη 1998.*

#### 1.4. Αναπαραγωγή του ιού

Η αναπαραγωγή των ιών συνίσταται στον αναδιπλασιασμό του γενετικού τους υλικού και τη δημιουργία νέων ιικών σωματιδίων με τη χρήση των μεταβολικών συστημάτων του κυττάρου ξενιστή. Περιλαμβάνει έξι στάδια: την προσρόφηση, τη διείσδυση, την απέκδυση, τη σύνθεση, τη συναρμολόγηση και την απελευθέρωση.

#### **1.4.1. Το στάδιο της προσρόφησης**

Στο στάδιο της προσρόφησης, ο ιός προσκολλάται σε ειδικούς υποδοχείς της κυτταροπλασματικής μεμβράνης του κυττάρου ξενιστή. Ο αριθμός των ειδικών υποδοχέων σε κάθε κύτταρο μπορεί να ανέλθει σε 500.000 και στις περισσότερες περιπτώσεις η μόλυνση του κυττάρου είναι πολλαπλή. Οι κυτταρικοί υποδοχείς είναι συνήθως γλυκοπρωτεΐνες και έχουν καθοριστική σημασία στην παθογένεια των νόσων που οφείλονται σε ιούς.

#### **1.4.2. Το στάδιο της διείσδυσης**

Η προσκόλληση του ιού στους ειδικούς μεμβρανικούς υποδοχείς έχει ως αποτέλεσμα την είσοδο του ιικού σωματιδίου στο εσωτερικό του κυττάρου. Στην περίπτωση παρουσίας ιικού ελύτρου, το έλυτρο ενσωματώνεται στην κυτταρική μεμβράνη και το νουκλεοκαψίδιο του ιού απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα. Όταν ο ιός δεν περιβάλλεται από έλυτρο, το νουκλεοκαψίδιο του εισέρχεται στο εσωτερικό του κυττάρου με εγκόλπωση της κυτταρικής μεμβράνης και σχηματισμό πινοκυτταρικής ενδοσωματικής φυσαλίδας, μέσα στην οποία βρίσκεται το σωματίδιο του ιού.

#### **1.4.3. Το στάδιο της απέκδυσης**

Στο στάδιο αυτό, το σωματίδιο του ιού αποβάλλει το καψίδιο και το πυρηνικό οξύ του ιού απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα. Η απελευθέρωση του πυρηνικού οξέος οφείλεται κυρίως στην επίδραση κυτταρικών λυσοσωμιακών ενζύμων στις πρωτεΐνες του καψιδίου.

#### **1.4.4. Το στάδιο της μεταγραφής**

Στο στάδιο αυτό παράγεται το αγγελιοφόρο RNA (mRNA) του ιού. Τα αρχικά mRNA που προκύπτουν από τη μεταγραφή υφίστανται μάτισμα, όπου απομακρύνονται ορισμένες

αλληλουχίες βάσεων και παραμένουν οι περιοχές εκείνες που εκφράζονται σε πρωτεΐνη. Τα πρότυπα της μεταγραφής διακρίνονται σε πρώιμο και όψιμο στάδιο με βάση την περιοχή του νουκλεϊκού οξέος του ιού που μεταγράφεται κάθε φορά. Το πρώιμο mRNA παράγεται πριν τη σύνθεση του ιικού γονιδιώματος και κωδικοποιεί συνήθως μη δομικές πρωτεΐνες-ένζυμα που παίζουν σημαντικό ρόλο στη σύνθεσή του. Το όψιμο mRNA παράγεται μετά τη σύνθεση του ιικού γονιδιώματος και κωδικοποιεί κυρίως τις δομικές πρωτεΐνες του ιού. Η παραγωγή του mRNA του ιού είναι η σπουδαιότερη λειτουργία του ιού και ο βασικός μηχανισμός που επιτρέπει στον ιό να κατευθύνει τις λειτουργίες του κυττάρου.

#### **1.4.5. Το στάδιο της σύνθεσης**

Το αγγελιοφόρο RNA (mRNA) του ιού μεταφράζεται στα ριβοσώματα του κυττάρου σε δύο τύπους πρωτεϊνών: τις δομικές, οι οποίες απαρτίζουν το ικό σωματίδιο και τις μη δομικές, οι οποίες δεν βρίσκονται στο ικό σωματίδιο, είναι όμως απαραίτητες για την αντιγραφή του ιικού γονιδιώματος. Στη συνέχεια ακολουθεί η σύνθεση του νουκλεϊκού οξέος του ιού χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο το πυρηνικό οξύ του ιού, DNA ή RNA, με τη βοήθεια των κατάλληλων πολυμερασών που κωδικοποιούνται από τον ιό ή από το κύτταρο.

#### **1.4.6. Το στάδιο της συναρμολόγησης**

Η συναρμολόγηση των θυγατρικών ιικών σωματιδίων του ιού συνίσταται στην ενσωμάτωση του πυρηνικού οξέος του ιού μέσα στο καψίδιο του. Στην περίπτωση των ιών με φάκελλο, το πλήρες ικό σωματίδιο σχηματίζεται κατά τη δίοδο του νουκλεοκαψιδίου από την κυτταρική μεμβράνη του κυττάρου ξενιστή.



#### **1.4.7. Το στάδιο της απελευθέρωσης**

Στο στάδιο αυτό τα ήδη σχηματισμένα θυγατρικά ιικά σωματίδια απελευθερώνονται στο περιβάλλον είτε με σύντηξη του ιού με την κυτταρική μεμβράνη στην περίπτωση των ιών με φάκελλο, είτε με κυτταρόλυση, στην περίπτωση των ιών χωρίς φάκελλο.

### **1.5. Αλληλεπίδραση ιού με το κύτταρο ξενιστή**

#### **1.5.1. Μετάδοση των ιογενών λοιμώξεων**

Η μετάδοση των ιογενών λοιμώξεων γίνεται είτε οριζόντια, από άτομο σε άτομο, είτε κάθετα, από τη μητέρα στο βρέφος. Στην οριζόντια μετάδοση, πύλες εισόδου του ιού στον ανθρώπινο οργανισμό είναι η αναπνευστική οδός, η στοματική-γαστρεντερική οδός, η γεννητική οδός και το δέρμα. Η αναπνευστική οδός αποτελεί ίσως τη συχνότερη οδό μετάδοσης των ιογενών λοιμώξεων από άνθρωπο σε άνθρωπο, ενώ η στοματική-γαστρεντερική οδός είναι δεύτερη κατά σειρά συχνότητας πύλη εισόδου των ιών στον άνθρωπο. Η γεννητική οδός αφορά κυρίως νόσους που μεταδίδονται με τη σεξουαλική επαφή μέσω λύσης της συνέχειας του βλεννογόνου.

Το δέρμα αποτελεί κύρια πύλη εισόδου για πολλούς ιούς μέσω αμυχών με ετερο-ενοφθαλμισμό ή αυτο-ενοφθαλμισμό, δηγμάτων από αρθρόποδα ή ζώα, μέσω φομιτών και ενοφθαλμισμό με βελόνες ή άλλα αιχμηρά αντικείμενα. Οι ιογενείς λοιμώξεις μεταδίδονται στον άνθρωπο και με μετάγχιση μολυσμένου αίματος ή παραγώγων του. Ορισμένοι ιοί διέρχονται τον πλακούντα και μπορούν να προκαλέσουν συγγενείς λοιμώξεις στο έμβρυο. Κάθετη μετάδοση της νόσου μπορεί να συμβεί επίσης κατά τη διάρκεια του τοκετού σε περιπτώσεις λοίμωξης του τραχήλου της μήτρας ή ακόμα και από το γάλα της μητέρας κατά το θηλασμό.

### 1.5.2. Ανοσολογική απάντηση του ξενιστή

Η άμυνα του ανθρώπινου οργανισμού στις ιώσεις διακρίνεται σε μη ειδική και ειδική (Biron, 1999). Η μη ειδική άμυνα προστατεύει τον οργανισμό όταν αυτός απειλείται από τους διάφορους παθογόνους παράγοντες, όμως δεν κατευθύνεται συγκεκριμένα έναντι των ικών στελεχών που προκαλούν λοίμωξη. Στη μη ειδική άμυνα ανήκει η συνέχεια του δέρματος, το κροσσωτό επιθήλιο της αναπνευστικής οδού, η βλέννη, το όξινο περιβάλλον του στομάχου καθώς και η διαδικασία της φαγοκυττάρωσης, η οποία επιτελείται από δύο τύπους κυττάρων, τα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα και τα μακροφάγα. Ιδιαίτερα σημαντικός είναι ο ρόλος των ιντερφερονών, κυτταροκινών, οι οποίες παράγονται από κύτταρα του οργανισμού (λευκοκύτταρα, ινοβλάστες και T-λεμφοκύτταρα) και παρεμποδίζουν τόσο τη μεταγραφή όσο και την πρωτεϊνική σύνθεση του ιού. Η ειδική άμυνα πραγματοποιείται τόσο με την παραγωγή αντισωμάτων (χυμική ειδική ανοσία), τα οποία συνδέονται με τον ιό και τον εξουδετερώνουν, όσο και μέσω των κυτταροτοξικών T-λεμφοκυττάρων (κυτταρική ειδική ανοσία), τα οποία έχουν ως στόχο την καταστροφή των μολυσμένων με τον ιό κυττάρων. Η άμυνα του ξενιστή εξαρτάται από την ηλικία, τη διατροφή καθώς και από γενετικούς παράγοντες, π.χ. το σύστημα ιστοσυμβατότητας HLA, παράγοντες που καθορίζουν την απόκριση του οργανισμού και την έκβαση της λοίμωξης.

### 1.5.3. Επίδραση του ιού στον ξενιστή

Η μόλυνση ενός κυττάρου από έναν ιό μπορεί να παραμείνει λανθάνουσα, χωρίς να επηρεάζει τη λειτουργία του κυττάρου. Μπορεί όμως να οδηγήσει στο θάνατο του κυττάρου ή ακόμα στην κακοήγη εξαλλαγή του και τη μετατροπή του σε καρκινικό. Στον **Πίνακα 1.3** παρουσιάζονται ιοί που έχουν ενοχοποιηθεί για την πρόκληση καρκινογένεσης στον άνθρωπο.

Οι ιογενείς λοιμώξεις στον άνθρωπο ποικίλουν σε βαρύτητα, ανάλογα με τη λοιμογόνο δύναμη του ιού καθώς και την ειδική και μη ειδική άμυνα του προσβληθέντος οργανισμού.

**Πίνακας 1.3.** Ιοί και η σχέση τους με την πρόκληση καρκίνου στον άνθρωπο. Ο ιός HIV θεωρείται πως προκαλεί καρκίνο όχι λόγω της απευθείας επίδρασής του στην κακοήγη εξαλλαγή του κυττάρου του ξενιστή αλλά έμμεσα μέσω της ανοσοκαταστολής που προκαλεί.

Άμεσα καρκινογόνοι ιοί
Ιός EBV (λέμφωμα Burkitt, καρκίνος ρινοφάρυγγα, νόσος Hodgkin)
Ιός HHV-8 (σάρκωμα Kaposi)
Ιοί HPV ‘υψηλού κινδύνου’ (καρκίνος του τραχήλου της μήτρας)
Ιός HBV (ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα)
Ιός HBV (ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα)
Ιός HTLV-1 (T-λευχαιμία)
Έμμεσα καρκινογόνοι ιοί
HIV (καρκίνος του δέρματος, σάρκωμα Kaposi, άλλοι καρκίνοι)

Η ιογενής λοίμωξη μπορεί να είναι τοπική ή συστηματική. Στην τοπική νόσο ο ιός προσβάλλει τους ιστούς που γειτονεύουν με την πύλη εισόδου του ιού, ενώ στις συστηματικές ο ιός εισέρχεται στην κυκλοφορία του αίματος και προσβάλλει πολλά όργανα και ιστούς. Στους παράγοντες που επιδρούν στην εξέλιξη μιας ιογενούς λοίμωξης περιλαμβάνονται παράγοντες που αφορούν το στέλεχος του ιού και τη λοιμογόνο του δράση, την άμυνα του ξενιστή καθώς και γενετικοί παράγοντες.

### 1.6. Διάγνωση ιογενών λοιμώξεων

Η διάγνωση μιας ιογενούς λοίμωξης στηρίζεται στην κλινική υποψία, επιβεβαιώνεται όμως με την εργαστηριακή διερεύνηση του ασθενή. Η εργαστηριακή διάγνωση των ιογενών λοιμώξεων, την τελευταία δεκαετία έχει εξελιχθεί με τη βελτίωση των υπαρχόντων τεχνικών

διάγνωσης των ιογενών λοιμώξεων και την καθιέρωση των τεχνικών της Μοριακής Βιολογίας στην καθημερινή κλινική πράξη (Storch, 2000, Read και συν, 2000, Niesters, 2004). Συνίσταται άμεσα στην ανίχνευση του γονιδιώματος ή των αντιγόνων του ιού είτε έμμεσα στην ανίχνευση των αντισωμάτων που δημιουργούνται στον οργανισμό ξενιστή λόγω της ανοσολογικής απάντησης του οργανισμού σ' αυτόν (**Πίνακας 1.4**). Ο προσδιορισμός των αντισωμάτων έναντι του ιού κατά τον χρόνο της παρουσίας των συμπτωμάτων της νόσου ή αμέσως μετά πραγματοποιείται κυρίως με τη μέθοδο ELISA. Τα αντισώματα του ιού μπορούν να είναι α) IgG, τα οποία είναι κοινά στον ανθρώπινο πληθυσμό και συνήθως παραμένουν υψηλά αρκετά χρόνια μετά τη μόλυνση, β) IgM, τα οποία αποτελούν τα πρώτα αντισώματα που εμφανίζονται σε μια ιογενή λοίμωξη και γι' αυτό αποτελούν δείκτη πρόσφατης μόλυνσης ή γ) IgA.

**Πίνακας 1.4.** Διαγνωστική Ιολογία.

Άμεση ανίχνευση του ιού
Ανίχνευση γονιδιώματος DNA ιού με τη μέθοδο PCR
Ανίχνευση γονιδιώματος RNA ιού με τη μέθοδο RT-PCR
Ανίχνευση αντιγόνων του ιού (ELISA, ανοσοφθορισμός)
Ηλεκτρονική μικροσκοπία
Ιστολογική ανίχνευση (ανοιστοχημεία, in situ υβριδισμός)
Καλλιέργεια
Έμμεση ανίχνευση του ιού
Προσδιορισμός IgG αντισωμάτων (ELISA)
Προσδιορισμός IgM αντισωμάτων (ELISA)
Προσδιορισμός IgA αντισωμάτων (ELISA)

Η ανίχνευση των αντισωμάτων είναι ενδεικτική για την παρουσία πρόσφατης ιογενούς λοίμωξης ή προ-υπάρχουσας ανοσίας, ενώ ιδιαίτερη διαγνωστική σημασία έχει η αύξηση των επιπέδων των αντισωμάτων καθώς και η επιμονή υψηλών τίτλων. Οι δοκιμές των ικών αντιγόνων, οι οποίες περιλαμβάνονται στις άμεσες διαγνωστικές μεθόδους ενός ιού, μπορούν

να γίνουν είτε με ELISA είτε με ανοσοφθορισμό. Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) έχει ως στόχο την ανίχνευση του ιικού γονιδιώματος των DNA ιών, ενώ στην περίπτωση των RNA ιών μπορεί να χρησιμοποιηθεί η μέθοδος της αντίστροφης μεταγραφάσης-αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (RT-PCR), όπου με τη χρήση της αντίστροφης μεταγραφάσης αρχικά το RNA γονιδίωμα του ιού μετατρέπεται σε DNA για να ακολουθήσει στη συνέχεια η αντίδραση PCR (Elnifro και συν, 2000). Στον **Πίνακα 1.5** παρουσιάζονται εφαρμογές της πολλαπλής αντίδρασης PCR στην κλινική πράξη κατά τη διαγνωστική διερεύνηση των ασθενών, όπου ταυτόχρονα ανιχνεύονται περισσότεροι του ενός ιοί (multiplex PCR).

**Πίνακας 1.5.** Διαγνωστική Ιολογία με τη μέθοδο της πολλαπλής (multiplex) αντίδρασης της Πολυμεράσης (PCR).

Νόσος	Δείγμα	Ανίχνευση ιών με PCR
Μηνιγγίτιδα, εγκεφαλίτιδα, μηνιγγοεγκεφαλίτιδα	Εγκεφαλονωτιαίο υγρό	HSV-1, HSV-2, CMV, VZV, HHV-6, HHV-7 EBV, EVs
Λοιμώξεις ανώτερου και κατώτερου αναπνευστικού	Φαρυγγικά, ρινικά, ρινοφαρυγγικά, τραχειακά, βρογχοκυψελικδικά εκπλύματα	Influenza A και B, PIV 1,2 &3, RSV A&B, Αδενοϊός
Επιπεφυκίτιδα, κερατίτιδα	Οφθαλμικά εκπλύματα	HSV-1, HSV-2, Αδενοϊός
Φυσαλιδώδης Δερματίτιδα	Φυσαλιδικό υγρό	HSV, VZV
Αλλοιώσεις γεννητικού συστήματος	Κολπικά, τραχηλικά εκπλύματα	HSV-1, HSV-2, HPVs
Ηπατίτιδα	Ορός, πλάσμα	HBV, HCV, HGV, GB
Ανοσοκαταστολή	Ορός, πλάσμα	HIV-1, HIV-2, HTLV-1, HTLV-2

Τα τελευταία χρόνια τόσο ερευνητικά όσο και στην κλινική πράξη εφαρμόζεται η αντίδραση της real time-PCR, η οποία στο μέλλον αναμένεται να αντικαταστήσει την παραδοσιακή αντίδραση PCR (Mackay και συν, 2002). Στο Κεφάλαιο 8 παρουσιάζονται αναλυτικά οι βασικές αρχές της αντίδρασης PCR καθώς και ο τρόπος με τον οποίο ανιχνεύονται

με τη χρήση της αντίδρασης PCR οι ιοί του θηλώματος του ανθρώπου HPV. Η απομόνωση των ιών μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη χρήση κυτταρικών καλλιεργειών, εμβρυοφόρων αυγών όρνιθας και σε πειραματόζωα, ωστόσο οι μέθοδοι αυτοί στην κλινική πράξη έχουν περιορισμένη αξία. Ιδιαίτερη επίπονη και μη ευαίσθητη στην κλινική πράξη είναι και η ηλεκτρονική μικροσκοπία, με την οποία η άνιχνευση του ιού απαιτεί την παρουσία τουλάχιστον 1.000 ιικών σωματιδίων /μλ.

## **1.7. Πρόληψη και θεραπεία ιογενών λοιμώξεων**

### **1.7.1. Ενεργητική και παθητική ανοσοποίηση**

Πάνω από έναν αιώνα μετά την παρασκευή του πρώτου εμβολίου, εναντίον του ιού της λύσσας, από τον Paster το 1885, η ανοσοποίηση του ανθρώπινου οργανισμού με τη χρήση των εμβολίων εξακολουθεί να αποτελεί στη σύγχρονη εποχή τον κύριο τρόπο πρόληψης έναντι των ιογενών λοιμώξεων (Chabot και συν, 2004, Scholtz και Dulcos, 2005). Η εξάλειψη της ευλογιάς, ως αποτέλεσμα διεθνούς και συστηματικής προσπάθειας μαζικής ανοσοποίησης του ανθρώπινου πληθυσμού, αποτελεί το καλύτερο παράδειγμα περιορισμού μιας ιδιαίτερα σοβαρής μολυσματικής ασθένειας για τον άνθρωπο.

Η εφαρμογή προγραμμάτων μαζικής ανοσοποίησης τις τελευταίες δεκαετίες οδήγησε στον έλεγχο ιογενών λοιμώξεων όπως της ιλαράς, της ερυθράς και της πολιομυελίτιδας στον ανεπτυγμένο κόσμο, ενώ μέχρι σήμερα πάνω από 168 χώρες παγκόσμια έχουν εφαρμόσει μαζικά προγράμματα εμβολιασμού κατά της ηπατίτιδας Β (Francois και συν, 2005). Η ανάπτυξη αποτελεσματικών και ταυτόχρονα ασφαλών εμβολίων τα τελευταία χρόνια με την τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA και τη χρήση εξελιγμένων τεχνικών της μοριακής βιολογίας αποτελεί μια από τις σημαντικότερες επιτυχίες της σύγχρονης βιοϊατρικής έρευνας. Η ανεύρεση και νέων εμβολίων και η εφαρμογή τους στην κλινική πράξη αναμένεται στο μέλλον

να προσφέρει λύση και σε άλλες περιπτώσεις επικίνδυνων για τη ζωή του ανρθώπου ιογενών λοιμώξεων, όπως είναι ο ιός της επίκτητης ανοσοανεπάρκειας του ανθρώπου (HIV).

Εκτός από τα εμβόλια στη μάχη κατά των ιών χρησιμοποιείται και η παθητική ανοσοποίηση με τη χρήση της φυσικής ανοσοσφαιρίνης, ενώ τα τελευταία χρόνια υπάρχει η δυνατότητα χρήσης στην κλινική πράξη και ειδικών ανοσοσφαιρινών για ιούς όπως ο ιός HBV, ο ιός VZV και ο ιός CMV. (Πίνακας 1.6).

**Πίνακας 1.6.** Ενεργητική και παθητική ανοσοποίηση έναντι των ιών.

Ιός	Τρόπος ανοσοποίησης
Ιός παρωτίτιδας	Εμβόλιο Sabin Εμβόλιο Salk
Ιός Ιλαράς	MMR Φυσική ανοσοσφαιρίνη HNIG
Ιός Ερυθράς	MMR Φυσική ανοσοσφαιρίνη HNIG
Ιός παρωτίτιδας	MMR
Ιός HAV	Εμβόλιο για τον ιό HAV Φυσική ανοσοσφαιρίνη HNIG
Ιός HBV	Εμβόλιο για τον ιό HBV Ειδική ανοσοσφαιρίνη HBIG
Ιοί Influenza A και B	Εμβόλιο για τον ιό HAV
Ιός VZV	Εμβόλιο για τον ιό VZV Ειδική ανοσοσφαιρίνη κατά του ιού VZV
Ιός CMV	Ειδική ανοσοσφαιρίνη κατά του ιού CMV
Ιός ευλογιάς	Εμβόλιο για τον ιό της ευλογιάς
Ιός κίτρινου πυρετού	Εμβόλιο για τον ιό του κίτρινου πυρετού
Ιός της λύσσας	Εμβόλιο για τον ιό της λύσσας Ειδική ανοσοσφαιρίνη κατά του ιού της λύσσας

*Πηγή: Εθνικό Συνταγολόγιο, ΕΟΦ, 2003 και BNF for children 2005.*

### 1.7.2. Τα ανττικά φάρμακα

Την τελευταία εικοσαετία μια σειρά από ανττικά φάρμακα είναι πλέον διαθέσιμα και

χρησιμοποιούνται σε ένα σημαντικό βαθμό έναντι των ιογενών λοιμώξεων (**Πίνακα 1.7**). Το πεδίο της φαρμακολογίας του ιού HIV αποτελεί ένα διαρκώς εξελισσόμενο ερευνητικό κλάδο, ο οποίος την τελευταία δεκαετία είχε ως αποτέλεσμα την άυξηση του προσδόκιμου επιβίωσης των ασθενών με HIV. Η ακυκλοβίρη αποτελεί το φάρμακο εκλογής για την αντιμετώπιση των ερπητικών λοιμώξεων και χορηγείται είτε τοπικά (επιχείλιος έρπης) είτε συστηματικά σε περιπτώσεις ανοσοκατεσταλμένων ασθενών, γεννητικού έρπητα, νεογνικού έρπητα, έρπητα ζωστήρα και ερπητικής μηνιγγοεγκεφαλίτιδας. Η γανσικλοβίρη είναι πιο αποτελεσματική για την αντιμετώπιση του ιού CMV, όμως σε σχέση με την ακυκλοβίρη είναι πιο τοξική. Η ιντερφερόνη α, η πεγινεραφρόνη α και η ριμπαβιρίνη χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα C. Η οσελταμιβίρη και η ζαναμιβίρη μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη θεραπεία ασθενών υψηλού κινδύνου με γρίπη λόγω των ιών Influenza A και B και η χορήγησή τους πρέπει

**Πίνακας 1.7.** Αντικοί παράγοντες.

Ιοί	Αντικοί παράγοντες	Ιοί	Αντικοί παράγοντες
Ιοί HSV-1, HSV-2, VZV	ακυκλοβίρη βαλακυκλοβίρη	Ιός HIV	αβασαβίρη ντιντανοσίδη εμπτρισιταβίνη
Ιός CMV	γανσικλοβίρη φωσκαρνέτη		λαμβουντίνη σταβουντίνη ζινοβουντίνη
Ιοί HBV και HCV	ιντερφερόνη α πεγιντεροφρόνη α ριμπαβιρίνη		αμπρεναβίρη αταζαναβίρη φοσαμπρεναβίρη
Ιοί Influenza A και B	οσελταμιβίρη ζαναμιβίρη		ινδιναβίρη νελφίναβίρη ριτοναβίρη



Ιός RSV	αμανταδίνη	σακουιναβίρη
	ριμπαβιρίνη	νεβιραπίνη
	παλιβιζουμάβη	ενφουβιτιδίη

---

*Πηγή: Εθνικό Συνταγολόγιο, ΕΟΦ, 2003 και BNF for children 2005.*

να γίνεται εντός 48 ωρών μετά την έναρξη των συμπτωμάτων. Στην περίπτωση παιδιών με RSV θετική βρογχολίτιδα δεν έχει αποδειχθεί κλινικά η χρησιμότητά της ριμπαβιρίνης, για το λόγο αυτό η χρήση της σήμερα είναι περιορισμένη και αφορά επιπλεγμένες περιπτώσεις βρογχολίτιδας. Η παλιβιζουμάβη είναι μονοκλωνικό αντίσωμα, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την πρόληψη RSV βρογχολίτιδας σε περίοδο αυξημένης επίπτωσης της σε παιδιά υψηλού κινδύνου.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2



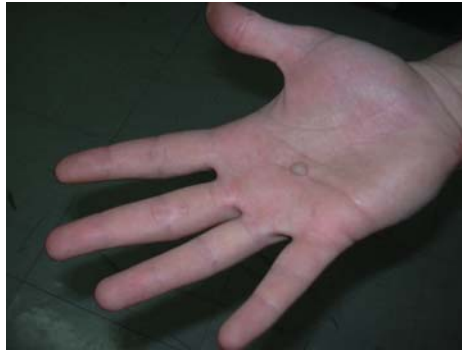
### Ο ΙΟΣ ΤΟΥ ΘΗΛΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ HPV

- 2.1. Γενικά
  - 2.1.1. Ταξινόμηση
  - 2.1.2. Ιστορική Αναδρομή
- 2.2. Ο ιός του θηλώματος του ανθρώπου HPV
  - 2.2.1. Η δομή του ιού του θηλώματος του ανθρώπου HPV
  - 2.2.2. Γονιδιακή έκφραση HPV
  - 2.2.3. Ο κύκλος αναπαραγωγής των ιών HPV
- 2.3. Από τη μόλυνση στη φλεγμονή
  - 2.3.1. Η μετάδοση του ιού HPV στο κύτταρο ξενιστή
  - 2.3.2. Η εξέλιξη της μόλυνσης σε λοίμωξη
  - 2.3.3. Η λανθάνουσα μόλυνση από τον ιό HPV
  - 2.3.4. Μη παραγωγική και παραγωγική φλεγμονή
  - 2.3.5. HPV και καρκινογένεση
- 2.4. Παραγοντες εξέλιξης της μόλυνσης
  - 2.4.1. Ανοσο-απόκριση
  - 2.4.2. Γενετικοί παράγοντες
  - 2.4.3. Άλλοι παράγοντες
- 2.5. Διάγνωση HPV μόλυνσης
  - 2.5.1. Έμμεσες και άμεσες διαγνωστικές προσεγγίσεις
  - 2.5.2 Τεχνικές υβριδισμού και HPV
  - 2.5.3. Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης και HPV
- 2.6. Θεραπευτικές προσεγγίσεις- Πρόληψη

#### 2.1. Γενικά

##### 2.1.1. Ταξινόμηση

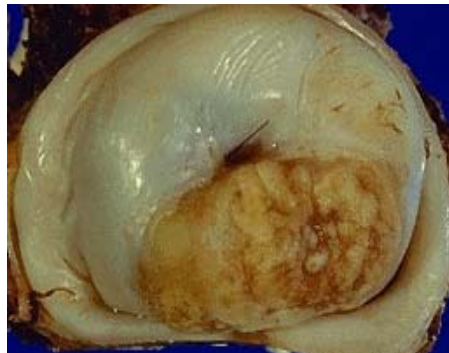
Οι ιοί του θηλώματος ανήκουν στην οικογένεια των Papovaviridae ιών. Οι ιοί του θηλώματος έχουν κοινά χαρακτηριστικά από άποψη δομής (διπλή κυκλική έλικα DNA περιβεβλημένη από εικοσάεδρη δομή) και ίδιες επιδράσεις στους διάφορους ξενιστές προκαλώντας όγκους και υπερπλασίες στο δέρμα και τους βλεννογόνους (**Εικόνες 2.1, 2.2 και 2.3**).



**Εικόνα 2.1.** Θήλωμα παλάμης σε νέο ενήλικα.



**Εικόνα 2.2.** Θήλωμα προσώπου σε νέο ενήλικα.



**Εικόνα 2.3.** Διηθητικός καρκίνος του τραχήλου της μήτρας.



**Εικόνα 2.4.** Θήλωμα λάρυγγα σε ασθενή με θηλωμάτωση του λάρυγγα.

Η ονομασία τους οφείλεται στην ιδιότητα τους να προκαλούν θηλώματα στον άνθρωπο και στα υπόλοιπα θηλαστικά. Ωστόσο παρουσιάζουν ειδικευση στον ξενιστή, με αποτέλεσμα οι ιοί του θηλώματος του ανθρώπου HPV (Human Papilloma Viruses) να μην προσβάλλουν τα ζώα και αντιστρόφως (Arends και συν, 1990).

Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί περισσότεροι από 130 γονότυποι HPV, οι οποίοι προκαλούν πλήθος αλλοιώσεων, καλοήθων και κακοήθων, στο δέρμα και τους βλεννογόνους (Πίνακας 2.1).

**Πίνακας 2.1.** Τύποι HPV σε διάφορες αλλοιώσεις του δέρματος και των βλεννογόνων.

Αλλοίωση	Συχνά	Σπάνια
Δέρματος		
-ακροχόρδωνες, θηλώματα	1, 2, 3, 5, 8, 10, 17, 20, 27	4, 6, 7, 10, 14, 15, 16, 19, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 28, 29, 36, 38, 41, 46, 47, 49, 50, 57, 60, 65
-Δυσπλασία επιδερμίδας EV	5, 8	14, 17, 20, 47
-Νόσος Bowen στο δέρμα		2, 16, 34
-Κακοήθεις όγκοι δέρματος		1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 11, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 23, 24, 25, 27, 29, 36, 38, 41, 47, 48
Γεννητικής και περιπρωκτικής χώρας		
-οξυτενή κονδυλώματα	6, 11	2, 16, 30, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 54, 55, 61
-CIN, VIN, PIN	6, 11, 16, 18, 31	30, 33, 34, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 56, 57, 58, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68, 69
-Καρκίνος τραχήλου μήτρας	16, 18, 31, 45	6, 10, 11, 26, 33, 35, 39, 51, 52, 55, 56, 58, 59, 66, 68
-Καρκίνος κόλπου, αιδοίου, περιπρωκτικής χώρας	16, 18	11, 31, 33
Αναπνευστικού/πεπτικού συστήματος		
-Θηλώματα, λευκοπλακία στόματος	2, 6, 11, 16	7
-Θηλώματα λάρυγγα, επιπεφυκότα	6, 11	
-Θηλώματα μύτης		6, 11, 57
-Καρκίνος λάρυγγα		6, 11, 16, 18, 35
-Καρκίνος στόματος		3, 6, 11, 16, 18, 57
-Καρκίνος γλώσσας, φάρυγγα		16, 18, 33
-Καρκίνος οισοφάγου		6, 11, 16, 18
-Καρκίνος μύτης		16, 57

Ο χαρακτηρισμός ενός γονοτύπου συνίσταται στην ανεύρεση αλληλουχίας που διαφέρει περισσότερο από 10% σε συγκεκριμένες περιοχές του γονιδιώματός του ιού σε σχέση με οποιοδήποτε άλλο γνωστό γονότυπο (Xi και συν, 1997). Οι ιοί, των οποίων το γονιδίωμα διαφέρει 2-10%, χαρακτηρίζονται ως υπότυποι, ενώ εκείνοι που διαφέρουν λιγότερο από 2% χαρακτηρίζονται ως ενδότυποι. Για τον ιό HPV 16 διακρίνονται 5 ενδότυποι με βάση τη μακρά περιοχή ελέγχου (LCR), οι οποίοι παρουσιάζουν διαφορετική γεωγραφική και φυλογενετική προέλευση (Yamada και συν, 1997, Stewart και συν, 1996). Οι ενδότυποι αυτοί είναι ο Ευρωπαϊκός (E), ο Ασιατικός (A), ο Ασιατικο-Αμερικανικός (AA), ο Αφρικανικός-1 (Af-1) και ο Αφρικανικός-2 (Af-2).

**Πίνακας 2.2.** Ταξινόμηση ιών HPV με βάση τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του τραχήλου της μήτρας.

Κατηγορία	Τύποι HPV
«Υψηλού κινδύνου» HPV	16, 18, 45, 56
«ενδιάμεσου κινδύνου» HPV	31, 33, 35, 51, 52, 58
«χαμηλού κινδύνου» HPV	6, 11, 42, 43, 44

Οι ιοί HPV μπορούν να διακριθούν σε βλεννογόνιους και σε δερματικούς (Scanclemente και Gill, 2002). Οι βλεννογόνιοι προσβάλλουν κυρίως το βλεννογόνο της γεννητικής περιοχής και του αναπνευστικού συστήματος, ενώ οι δερματικοί προσβάλλουν κυρίως το επιθήλιο του δέρματος και ανευρίσκονται σπάνια στη γεννητική περιοχή. Εξαιρέση αποτελούν ορισμένοι τύποι ιών που απαντούν κυρίως σε παιδιά τόσο στο βλεννογόνο της γεννητικής περιοχής όσο και στο δέρμα. Οι βλεννογόνιοι ιοί μπορούν να διαιρεθούν περαιτέρω με βάση τη συσχέτισή τους με την ανάπτυξη καρκίνου του τραχήλου

της μήτρας σε «υψηλού κινδύνου», σε «ενδιάμεσου κινδύνου» και σε «χαμηλού κινδύνου» HPV (Πίνακας 2.2).

Οι «υψηλού κινδύνου» HPV ανευρίσκονται κυρίως στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, ενώ οι «χαμηλού κινδύνου» HPV αποτελούν συχνό εύρημα σε καλοήθεις αλλοιώσεις του τραχήλου της μήτρας (Loninez και συν, 1992). Στον Πίνακα 2.3 παρουσιάζεται η συχνότητα ανίχνευσης παγκόσμια των διάφορων τύπων HPV ιών σε ασθενείς με καρκίνο του τραχήλου της μήτρας (Clifford και συν, 2003).

### 2.1.2. Ιστορική Αναδρομή

Η μολυσματική φύση των ανθρώπινων θηλωμάτων για πρώτη φορά δείχθηκε στις αρχές του 20<sup>ου</sup> αιώνα με βάση παρατηρήσεις για τη δημιουργία θηλωμάτων στον άνθρωπο μετά από ενδοδερμική ένεση μολυσμένων εκχυλισμάτων που είχαν απαλλαγεί από κύτταρα (Ciuffo, 1907). Τις δεκαετίες 1930-1940 στο Ινστιτούτο Ροκφέλλερ των Η.Π.Α. πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε πειραματόζωα, στα οποία συσχετίστηκε η παρουσία των ιών του θηλώματος με το φαινόμενο της καρκινογένεσης με τη βοήθεια συνεργών παραγόντων, όπως η πίσσα, το χλωραθένιο και η υπεριώδης ακτινοβολία (Rous και Beard, 1934, Rous και Kidd, 1938, Rous και Friedewald, 1944). Το 1949 αναφέρθηκε η πρώτη οπτικοποίηση σωματιδίων ιών του θηλώματος με μεθόδους ηλεκτρομικροσκοπίας από τους Strauss και συν (Strauss και συν, 1949), ενώ το 1963 αναπτύχθηκε η δομή του γονιδιώματος (DNA) των ιών του θηλώματος (Crawford, 1963).

Το 1974 πρώτος ο zur Hausen διατυπώνει τη υπόθεση πως οι ιοί του θηλώματος του ανθρώπου σχετίζονται με την αιτιοπαθογένεια του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας (zur Hausen και συν, 1974, zur Hausen, 1976). Μέχρι τότε, ενώ υπήρχαν παρατηρήσεις από τον προηγούμενο ακόμα αιώνα (Rigoni και Stern, 1842) πως ο καρκίνος του τραχήλου της

μήτρας έχει χαρακτήρες λοιμώδους νοσήματος, δεν είχε μελετηθεί ο ιός HPV ως πιθανός αιτιολογικός παράγοντας της νόσου.

**Πίνακας 2.3.** Συχνότητα (%) εμφάνισης HPV τύπων σε δείγματα καρκίνου του τραχήλου της μήτρας από διάφορες γεωγραφικές περιοχές του πλανήτη.

Περιοχή	HPV																		
	(+)	16	18	45	31	33	58	52	35	59	56	51	6	68	39	82	73	66	70
Αφρική	88,8	50,2	14,1	7,9	2,6	3,1	1,6	1,6	1,4	0,6	1,6	1,2	0,4	0,8	0,0	0,3	0,7	0,2	0,0
Ασία	83,1	43,4	15,3	4,5	2,0	3,4	5,4	4,2	1,0	1,1	0,4	1,0	0,5	0,5	0,2	0,4	0,1	0,3	0,3
Ευρώπη	85,9	56,0	17,5	2,9	4,2	4,4	0,8	0,5	0,5	0,1	0,6	0,0	0,3	0,4	0,3	0,0	0,3	0,1	0,0
ΗΠΑ/ Αυστραλία	87,5	54,9	22,1	3,3	3,9	3,2	0,2	0,6	0,4	0,0	0,2	0,0	1,1	0,2	0,1	0,0	0,2	0,1	0,0
Κεντρική/ Νότια Αμερική	89,3	51,7	10,6	5,5	7,0	4,0	2,9	3,3	2,0	1,9	0,7	0,7	0,5	0,5	1,7	0,4	0,0	0,4	0,4



Η διερεύνηση της σχέσης HPV και νεοπλασίας του τραχήλου της μήτρας είχε ως αποτέλεσμα τη σταδιακή ανάπτυξη ιδιαίτερου ενδιαφέροντος για τον ιό HPV. Το 1976 οι Meisels και Fortin (Meisels και Fortin, 1976) συσχέτισαν την εμφάνιση κοίλοκυτταρικής ατυπίας με τον ιό του θηλώματος. Ωστόσο η παρουσία του ιού κυρίως σε καλοήθειες κονδυλωματώδεις αλλοιώσεις και σε μετρίου βαθμού δυσπλασίες του τραχήλου είχε ως

αποτέλεσμα να προταθεί αρχικά ο διαχωρισμός των προκαρκινικών αλλοιώσεων σε καλοήθειες «ιογενείς», οι οποίες δεν εξελίσσονται σε καρκίνο και σε «μη-ιογενείς», οι οποίες εξελίσσονται.

Τα επόμενα χρόνια η ανάδειξη της ετερογένειας της οικογένειας των ιών του θηλώματος καθώς και η βελτίωση των μεθόδων της μοριακής βιολογίας είχαν ως αποτέλεσμα την αναθεώρηση της αρχικής υπόθεσης. Το 1978 ανακαλύπτονται από την ομάδα του Orth νέοι τύποι ιών σε καρκινώματα και σε ακροχορδονώδη δυσπλασία της επιδερμίδας (Orth και συν, 1978), ενώ το 1980 απομονώνονται από γεννητικές βλάβες οι τύποι HPV 6 και 11 (Gissmann 1980).

Το 1983 και το 1984 απομονώνονται για πρώτη φορά οι HPV τύποι 16 και 18 απευθείας από βιοψιακό υλικό καρκίνου του τραχήλου της μήτρας (Durst και σύν, 1983, Boshart και συν, 1984). Οι διεξοδικές μελέτες που ακολούθησαν ανέδειξαν το ρόλο της ενσωμάτωσης του ιικού γονιδιώματος στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή (Schwarz και συν, 1985) και της έκφρασης των ογκοπρωτεϊνών E6 και E7 (Munger και συν, 1989, von Knebel Doeberitz και συν, 1992) στην αθανατοποίηση και την κακοήγη εξαλλαγή των τραχηλικών κυττάρων. Μεγάλες επιδημιολογικές μελέτες επιβεβαίωσαν τα αποτελέσματα της βασικής έρευνας και ανέδειξαν τον ιό HPV ως τον κύριο αιτιολογικό παράγοντα του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας (Munoz και συν, 1992, Bosch και συν, 1995).

Σήμερα το ερευνητικό ενδιαφέρον εστιάζεται στην καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών της HPV-επαγόμενης καρκινογένεσης, στη μελέτη του ρόλου του HPV σε άλλες νεοπλασίες όπως του αναπνευστικού συστήματος και του οισοφάγου, καθώς και στη διερεύνηση και εφαρμογή στην κλινική πράξη του εμβολίου, το οποίο αναμένεται να αποτελέσει επανάσταση στην κατοπολέμηση του ιού HPV και των αλλοιώσεων που προκαλεί.

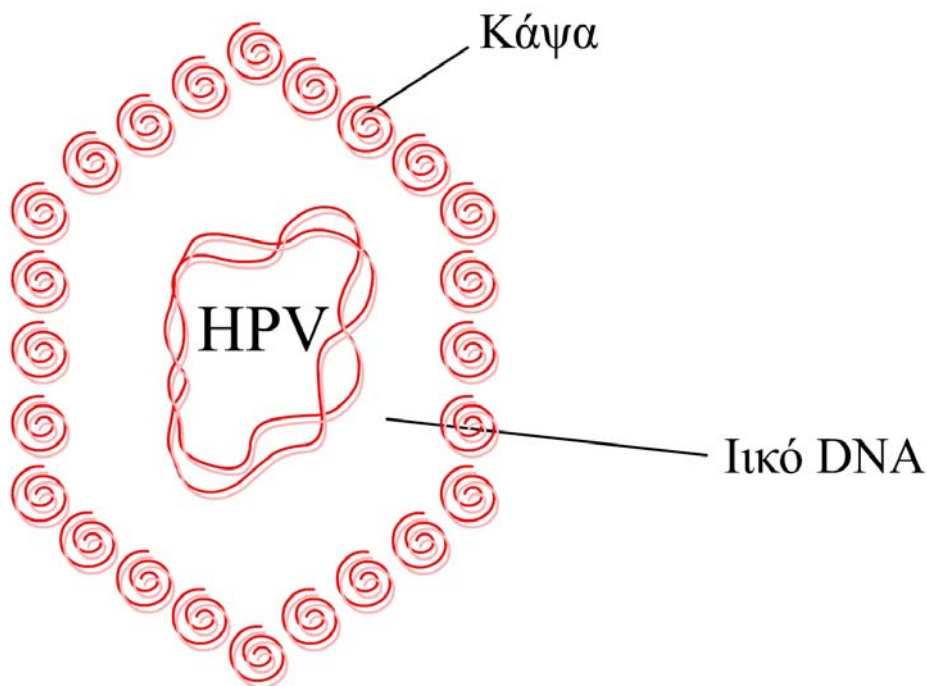


## 2.2. Ο ιός του θηλώματος του ανθρώπου HPV

### 2.2.1 Η δομή του ιού του θηλώματος του ανθρώπου HPV

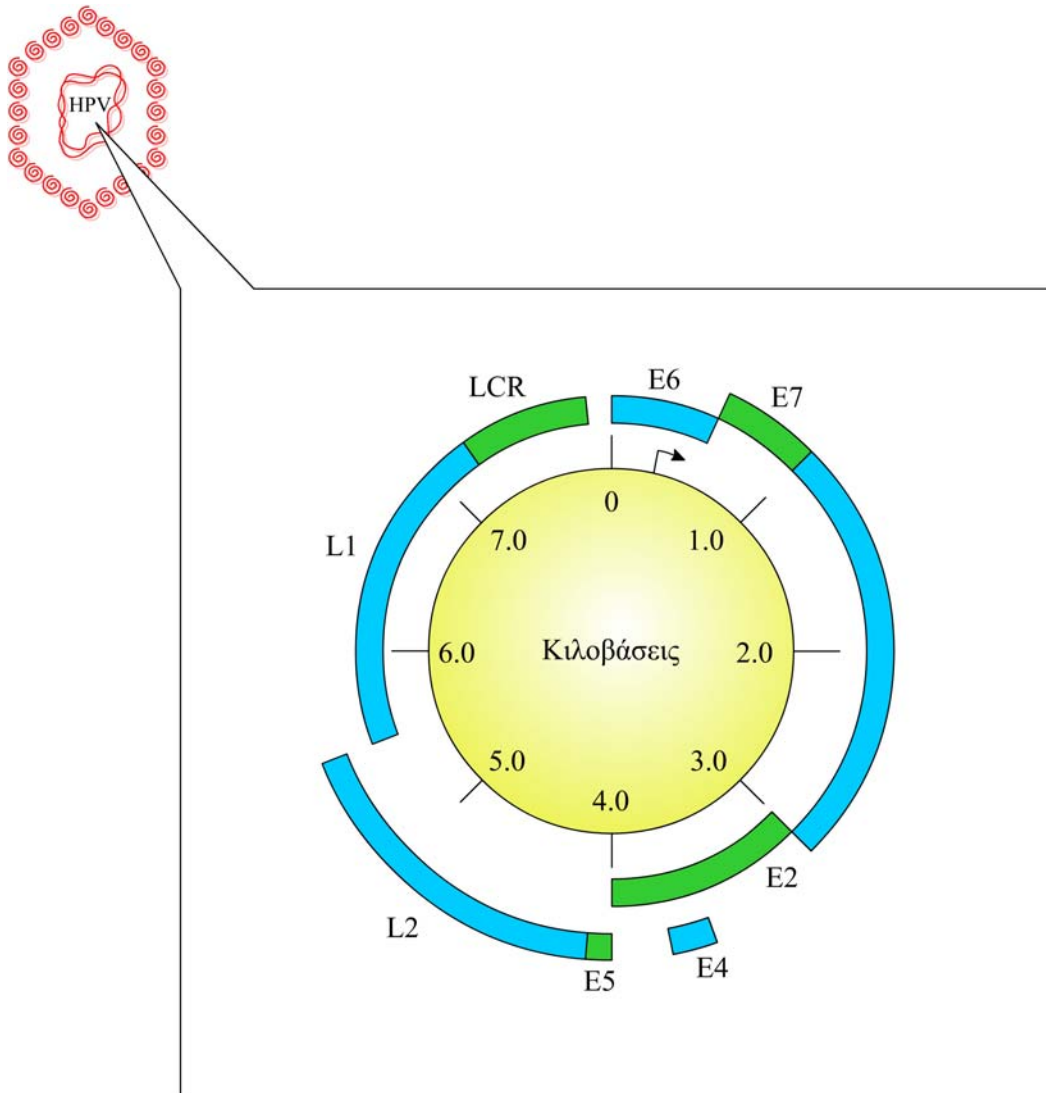
Το σωματίδιο ενός ιού HPV έχει διάμετρο περίπου 55-60nm και αποτελείται από το γονιδίωμα και την κάψα (Σχήμα 2.1). Το γονιδίωμα του ιού βρίσκεται εσωτερικά και αποτελείται από διπλής αλυσίδας κλειστό κυκλικό DNA. Το μέγεθος του είναι περίπου 7.200-8.000 ζεύγη βάσεων και περιέχει περίπου 20 «ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης». Ως «ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης» (Open Reading Frame-ORF) ορίζεται κάθε σειρά κωδικονίων στο DNA του γονιδιώματος του ιού, που κωδικοποιεί για την παραγωγή ενός πολυπεπτιδίου.

Σχήμα 2.1. Δομή του ιού HPV.



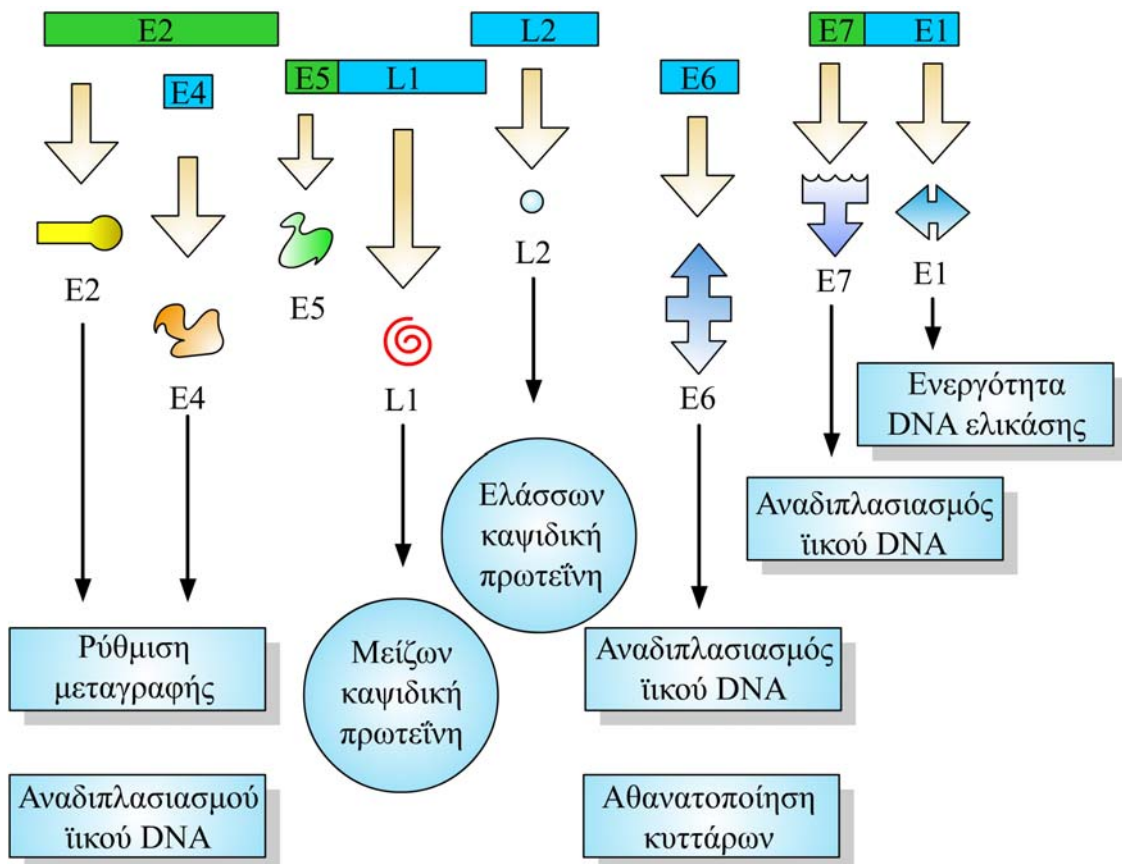
Το γονιδίωμα των ιών HPV μπορεί να χωριστεί σε τρεις περιοχές: α) τη μακρά περιοχή ελέγχου (LCR), που αποτελεί περίπου το 10% του γονιδιώματος, β) την πρώιμη (E) και γ) την όψιμη (L) περιοχή (Σχήμα 2.2).

**Σχήμα 2.2.** Οργάνωση γονιδιώματος ιού HPV.



Τα γονίδια της περιοχής L κωδικοποιούν για την παραγωγή των δομικών πρωτεϊνών του ιικού σωματιδίου, ενώ η περιοχή E κωδικοποιεί για την παραγωγή πρωτεϊνών που είναι απαραίτητες για την αντιγραφή του DNA και την ενεργοποίηση του λυτικού κύκλου (**Σχήμα 2.3**). Η πρώιμη περιοχή E αποτελείται από τα επιμέρους «ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης» E1, E2, E3, E4, E5, E6 και E7, ενώ η όψιμη περιοχή L αποτελείται από τα επιμέρους «ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης» L1 και L2. Η περιοχή LCR βρίσκεται ανάμεσα στις περιοχές E και L και έχει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης του ιού.

Σχήμα 2.3. Ιικό γονιδίωμα ιού HPV και ικές πρωτεΐνες.

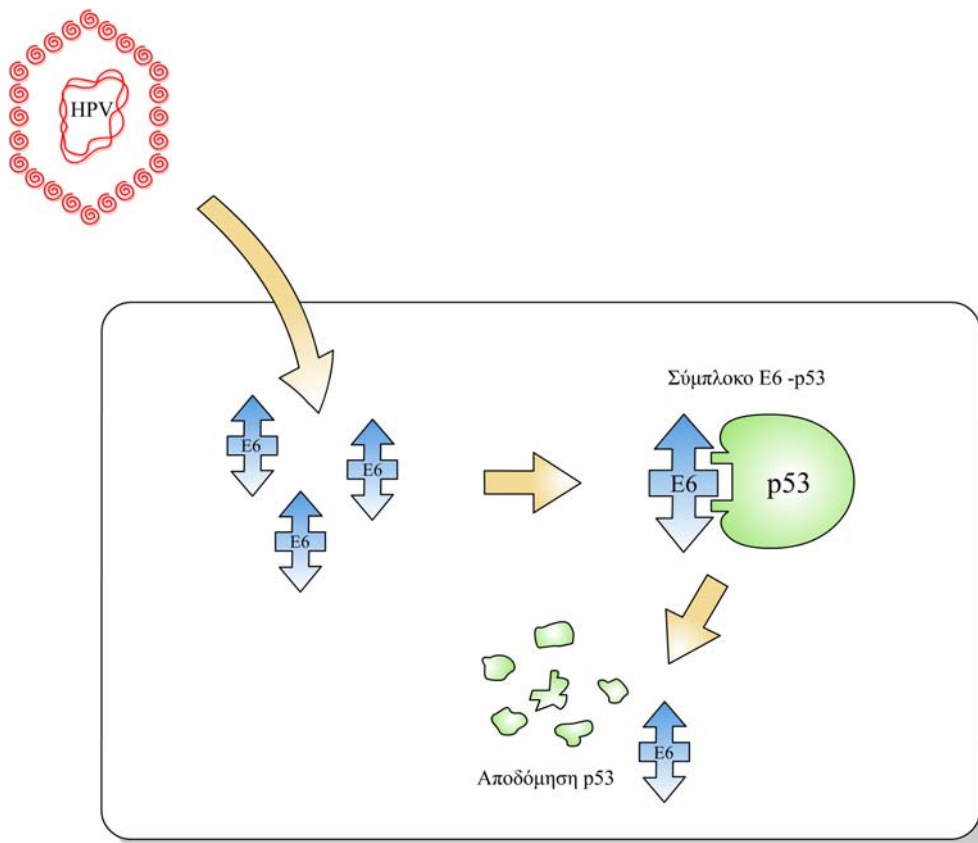


Το ιικό DNA γονιδίωμα σχετίζεται με πρωτεΐνες παρόμοιες με ιστόνες και περιβάλλεται από πρωτεϊνική κάψα. Η πρωτεϊνική κάψα του ιού HPV αποτελείται από 72 καψομερίδια με εικοσάεδρη συμμετρία. Η κύρια πρωτεΐνη του καψιδίου κωδικοποιείται από το L1 ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης του ιικού γονιδιώματος, έχει μοριακό βάρος περίπου 55.000 και έχει υψηλό βαθμό συντήρησης στους διαφορετικούς ιούς τους θηλώματος. Η δεύτερη δομική πρωτεΐνη του καψιδίου L2 κωδικοποιείται από το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης L2, έχει μοριακό βάρος περίπου 75.000 και είναι λιγότερο συντηρημένη. Η μη εισαγωγή τους σε φάκελο καθιστά τους ιούς HPV ανθεκτικούς στη θερμότητα και στους οργανικούς διαλύτες.

### 2.2.2. Γονιδιακή έκφραση HPV

Η πρωτεΐνη E6 του ιού HPV 16 περιέχει 151 αμινοξέα και εμφανίζει τέσσερα μοτίβα Cys-X-X-Cys μεσολαβώντας σε πρόσδεση με ψευδάργυρο που καταλήγει στο σχηματισμό δύο δομών «δακτύλων ψευδαργύρου» (Kanda και συν, 1991). Η πρωτεΐνη E6 αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη p53, όπως φαίνεται στο **Σχήμα 2.4** και επάγει την αποικοδόμησή της μέσω του συστήματος με ουμπικουτίνη (Werness και συν, 1990).

**Σχήμα 2.4.** Ο ιός HPV και η πρωτεΐνη p53. Η ιική πρωτεΐνη E6 αλληλεπιδρά με την κυτταρική πρωτεΐνη p53 και επάγει την αποικοδόμησή της μέσω του συστήματος με ουμπικουτίνη.

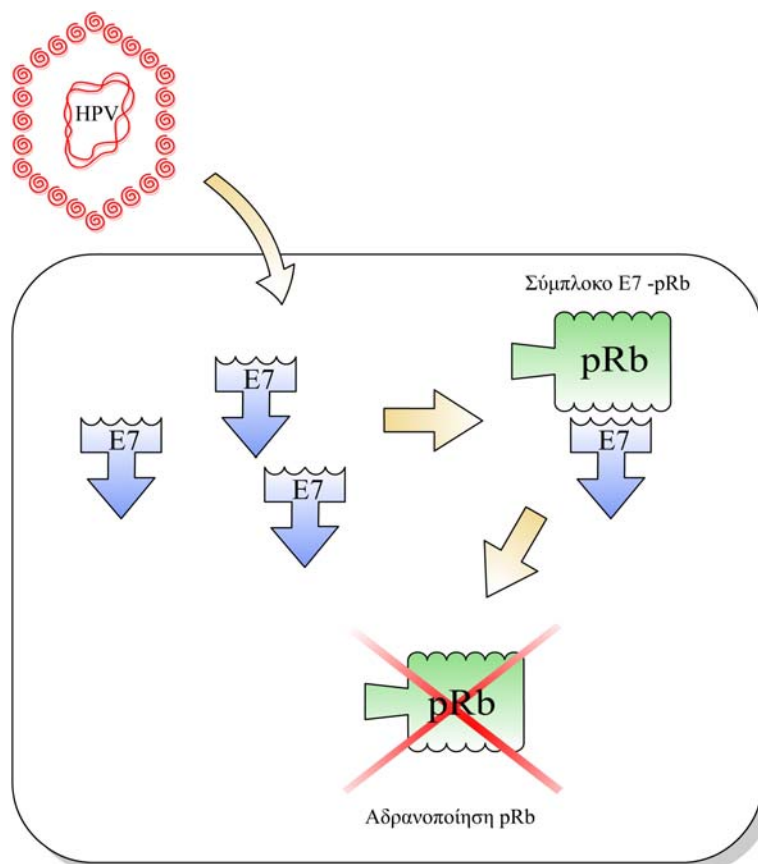


Η πρωτεΐνη p53 δρα ως μεταγραφικός ενεργοποιητής με την πρόσδεσή της σε ειδικές αλληλουχίες DNA και είναι απαραίτητη για την καθήλωση των κυττάρων στη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου και την παύση της αύξησης που ακολουθεί την καταστροφή του

κυτταρικού DNA. Η αποικοδόμηση της p53 καθώς και της πρωτεΐνης BAK που προκαλείται, έχουν ως αποτέλεσμα την αντίσταση των κυττάρων στον μηχανισμό της απόπτωσης καθώς και την χρωματοσωμιακή αστάθεια των μολυσμένων κυττάρων (Jackson και συν, 2000). Επιπρόσθετα η E6 επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό προκαλώντας την ενεργοποίηση της τελομεράσης και αναστέλλοντας την αποδόμηση των κινασών της οικογένειας SRC (Veldman και συν, 2001, Oda και συν, 1999).

Η πρωτεΐνη E7 του ιού HPV 16 αντιπροσωπεύει μια φωσφοπρωτεΐνη προσδεδεμένη με ψευδάργυρο σε δύο περιοχές Cys-X-X-Cys και αποτελείται από 98 αμινοξέα.

**Σχήμα 2.5.** Ο ιός HPV και η πρωτεΐνη pRb. Η πρωτεΐνη E7 σχηματίζει σύμπλοκο με την πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος pRB και την αδρανοποιεί.



Η πρωτεΐνη E7 παρουσιάζει δομικές ομοιότητες με την πρωτεΐνη E6 στοιχειοθετώντας μια πιθανή εξελικτική συσχέτιση των δύο πρωτεϊνών. Η πρωτεΐνη E7 σχηματίζει σύμπλοκο, όπως φαίνεται στο **Σχήμα 2.5**, με την πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος pRB και την αδρανοποιεί (Park και συν, 1995, Dyson και συν, 1989).

Η αδρανοποίηση της πρωτεΐνης pRB έχει ως αποτέλεσμα την αποδόμηση του συμπλέγματος της με το μεταγραφικό παράγοντα E2F και την υπερέκφραση της INK4A (Kiyono και συν, 1998). Ο μεταγραφικός παράγοντας E2F ευοδώνει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ενώ η ανεξέλεκτη δράση του λόγω της αποδόμησης του συμπλόκου του με την pRB προκαλεί την αθανатоποίηση των κυττάρων. Έχει βρεθεί πως η ικανότητα πρόσδεσης της E7 των ιών «υψηλού κινδύνου» στην pRB είναι περίπου 10 φορές μεγαλύτερη από αυτή των «χαμηλού κινδύνου» (Huibregde και συν, 1994). Επιπλέον η πρωτεΐνη E7 οδηγεί σε συνεχή έκφραση των γονιδίων της κυκλίνης E και της κυκλίνης A σε απουσία εξωτερικών αυξητικών παραγόντων, ενώ μπλοκάρει τη λειτουργία των αναστολέων των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών WAF1 και KIP1 (Zerfass και συν, 1995, Funk και συν, 1997, Zerfass-Thome και συν, 1996).

Στον **Πίνακα 2.4** παρουσιάζονται συνοπτικά οι ιικές πρωτεΐνες και οι λειτουργίες κάθε μιας από αυτές. Στον **Πίνακα 2.5** παρουσιάζονται με βάση τη βιβλιογραφία οι πρωτεΐνες του κυττάρου ξενιστή, με τις οποίες προσδέονται απευθείας οι πρωτεΐνες E6 και E7 των ιών HPV υψηλού κινδύνου.

Οι ιικές πρωτεΐνες E1 και E2 ρυθμίζουν τον αναδιπλασιασμό του ιικού γονιδιώματος και ελέγχουν τη μεταγραφή των «ανοιχτών πλαίσιων ανάγνωσης» E6 και E7. Κατά την χρωμοσωμιακή ενσωμάτωση του ιικού κυκλικού DNA στο κύτταρο ξενιστή, το γονιδίωμα του ιού διασπάται συνήθως στο «ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης» E2. Το γεγονός αυτό οδηγεί στην αδρανοποίηση των E1 και E2 με αποτέλεσμα την ανεξέλεγκτη μεταγραφή των E6 και E7 (Turek και Smith, 1996).

**Πίνακας 2.4.** Λειτουργίες πολυπεπτιδίων ιού HPV κωδικοποιούμενες από τα «ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης του ιικού γονιδιώματος.

Πολυπεπίδιο	Λειτουργία
E1	Ενεργότητα DNA ελικάσης. DNA-εξαρτώμενη ATP πρόσδεση, δράση ΑΤΡάσης. Συμμετοχή στην αντιγραφή του ιού και στη μεταγραφική καταστολή. Ρόλος στην καταστολή της ικανότητας αθανατοποίησης.
E2	Ρυθμιστής της αντιγραφής και της μεταγραφής του ιού. Έλεγχος της έκφρασης των πρώιμων «ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης». Απαραίτητη για την αντιγραφή του ιού σε συνεργασία με E1.
E3	Άγνωστη λειτουργία. Παρούσα μόνο σε μικρό αριθμό HPV τύπων.
E4	Έκφραση όψιμα κυρίως στο διαφοροποιημένο επιθήλιο. Ρόλος στην παραγωγική φάση της HPV φλεγμονής. Αλληλεπίδραση με την κερατίνη του κυτταροσκελετού. Πιθανός ρόλος στον καθορισμό της ιστοειδικότητας των διαφόρων HPV τύπων.
E5	Ρόλος στη ρύθμιση του κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε καλοήθεις αλλοιώσεις. Συμμετοχή στον κυτταρικό μετασχηματισμού κατά τα πρώιμα στάδια της εξαλλαγής.
E6	Ικανότητα κυτταρικού μετασχηματισμού. Συμμετοχή στη μεταγραφική ενεργοποίηση. Αποδόμηση πρωτεΐνης p53. Συνέργεια με E7.
E7	Ικανότητα κυτταρικού μετασχηματισμού. Απενεργοποίηση πρωτεΐνης Rb. Συνέργεια με E6.
E8	Άγνωστη λειτουργία. Παρούσα μόνο σε μικρό αριθμό HPV τύπων.
L1	Η κύρια πρωτεΐνη της ιικής κάψας του ώριμου ιικού σωματιδίου.
L2	Δομική πρωτεΐνη ιικής κάψας του ώριμου ιικού σωματιδίου. Ρόλος στη σταθεροποίηση της της δομής του.

**Πίνακας 2.5.** Πρωτεΐνες κυττάρου ξενιστή, με τις οποίες προσδένονται απευθείας οι πρωτεΐνες E6 και E7 των ιών HPV υψηλού κινδύνου.

Ερευνητική ομάδα	HPV ογκοπρωτεΐνη	Πρωτεΐνη πρόσδεσης κυττάρου ξενιστή
Werness και συν, 1990	E6	p53
Nagpal και συν, 2002	E6	p53
DeFilippis και συν, 2003	E6	p53
Scheffner και συν, 1993	E6	E6-συσχετιζόμενη πρωτεΐνη
Cehn και συν, 1995	E6	ERC55
Kiyono και συν, 1997	E6	hDLG
Tong και Howley, 1997	E6	Παξιλίνη
Vande Pol και συν, 1998	E6	Παξιλίνη
Rnponco και συν, 1998	E6	Ρυθμιστικός παράγοντας Ιντερφερόνης 3
Thomas και Banks 1999	E6	Bak
Gao και συν, 1999	E6	E6TPI
Masumoto και συν 2003,	E6	P16 (INK4A)
Dyson και συν, 1989	E7	pRb
Salcedo και συν, 2002	E7	pRb
DeFilippis και συν, 2003	E7	pRb
Dyson και συν, 1992	E7	Rb-συσχετιζόμενες πρωτεΐνες
Arroyo και συν, 1993	E7	E2F/κυκλίνη A σύμπλοκο
Davies και συν, 1993	E7	Κινάση ιστόνης H1
Massimi και συν, 1996	E7	TATA box-συνδεόμενη πρωτεΐνη
McIntyre και συν, 1996	E7	Κυκλίνη E
Berezutskaya και συν, 1997	E7	Υπομονάδα S4 τριφωσφατάσης της αδενοσίνης
Nead και συν, 1998	E7	c-jun
Schilling και συν, 1999	E7	hTid-1
Zwerschke και συν, 1999	E7	Mi2-κινάση πυρροβικού
Barnard και συν, 1999	E7	p48

*Τροποποιημένο από Motoyama και συν, 2004*



Παρά το γεγονός πως το «ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης» E4 βρίσκεται στην πρώιμη περιοχή E, ενεργοποιείται παράλληλα με την όψιμη περιοχή του ιικού γονιδιώματος. Συντελεί στην αποδιοργάνωση του δικτύου της κυτταροκερατίνης στις ανώτερες στιβάδες του επιθηλίου με αποτέλεσμα την απελευθέρωση των νέων ιικών σωματιδίων. Πιστεύεται πως το φαινόμενο της κοιλοκυττάρωσης οφείλεται στη συνδυασμένη δράση των E1 και E4. Η πρωτεΐνη E5 παρεμβαίνει στη ρύθμιση των κυτταρικών διαιρέσεων λόγω της επίδρασης που ασκεί στην κυτταρική μεμβράνη. Οι πρωτεΐνες L1 και L2 αποτελούν δομικά συστατικά της ιικής κάψας και έχουν ιδιαίτερη σημασία στην παρασκευή εμβολίου κατά των ιών HPV.

Η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης των ιών HPV είναι πολύπλοκη και ελέγχεται από ιικούς και κυτταρικούς μεταγραφικούς παράγοντες. Στην περιοχή LCR του γονιδιώματος του ιού HPV εδράζονται cis-active στοιχεία που ρυθμίζουν τη μεταγραφή των «ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης» E6 και E7. Έχει βρεθεί πως η πρωτεΐνη E2 παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης των E6 και E7, μέσω της πρόσδεσης της με την περιοχή LCR. Η περιοχή LCR του ιού HPV 16 περιέχει τέσσερις περιοχές πρόσδεσης της E2, μια στην περιοχή 5' της LCR, δύο εκατέρωθεν του κεντρικού τμήματος και μία στο 3' άκρο. Η πρωτεΐνη E2 προσδέεται σε δύο επιπλέον θέσεις πρόσδεσης στα εγγύς 90 ζεύγη βάσεων που αλληλοεπικαλύπτουν ένα TATA κουτί και τροποποιεί τη λειτουργία του υποκινητή των «ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης» E6 και E7 (Tan και συν, 1994). Στους κυτταρικούς μεταγραφικούς παράγοντες περιλαμβάνονται οι παράγοντες AP-1, Yin Yang-1, NF-1, KRF-1, Oct-1, SP-1 και ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών (Saunders και Frazer, 1998, Andersen και συν, 1997, Bauknecht και συν, 1992). Οι περισσότεροι παράγοντες προσδέονται στην κεντρική περιοχή LCR, και ρυθμίζουν τη μεταγραφή του υποκινητή των «ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης» E6 και E7 που εδράζει στο 3'-άκρο της περιοχής LCR. Έχει βρεθεί πως ορισμένοι παράγοντες διεγείρουν τον υποκινητή, ενώ άλλοι, όπως η

πρωτεΐνη YY-1 έχουν διττή διεγερτική και ανασταλτική επίδραση στον υποκινητή (Bauknecht και συν, 1995).

### 2.2.3. Ο κύκλος αναπαραγωγής των ιών HPV

Στο **Σχήμα 2.6** παρουσιάζεται ο κύκλος αναπαραγωγής του ιού, ο οποίος περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:

α. Προσήλωση σε κυτταρικούς υποδοχείς. Ο ιός HPV εισέρχεται στη βασική στιβάδα του επιθηλίου μέσω μικροαμυχών και προσδέεται σε υποδοχείς της κυτταροπλασματικής μεμβράνης του κυττάρου ξενιστή. Παρά το γεγονός πως δεν έχουν βρεθεί ειδικοί υποδοχείς για τον ιό HPV, υπάρχουν ενδείξεις για τη συμμετοχή των πρωτεϊνών της οικογένειας της α6-ιντεγκρίνης και της θευκής ηπαρίνης (Giroglou και συν, 2001, Evander και συν, 1997).

β. Διείσδυση του ιού στο κύτταρο ξενιστή, με εγκόλπωση του σωματιδίου του ιού από την κυτταρική μεμβράνη.

γ. Απέκδυση του ιικού DNA από το πρωτεϊνικό του περίβλημα με τη δράση κυτταρικών ενζύμων που βρίσκονται στα λυσοσώματα.

δ. Πρώιμη μεταγραφή, με αποτέλεσμα την παραγωγή πρώιμου mRNA του ιού.

ε. Πρώιμη μετάφραση, με αποτέλεσμα την παραγωγή των πρώιμων πρωτεϊνών του ιού, οι οποίες δρουν ως ένζυμα στη διαδικασία αναδιπλασιασμού του ιικού γονιδιώματος.

στ. Αναδιπλασιασμός του ιικού γονιδιώματος.

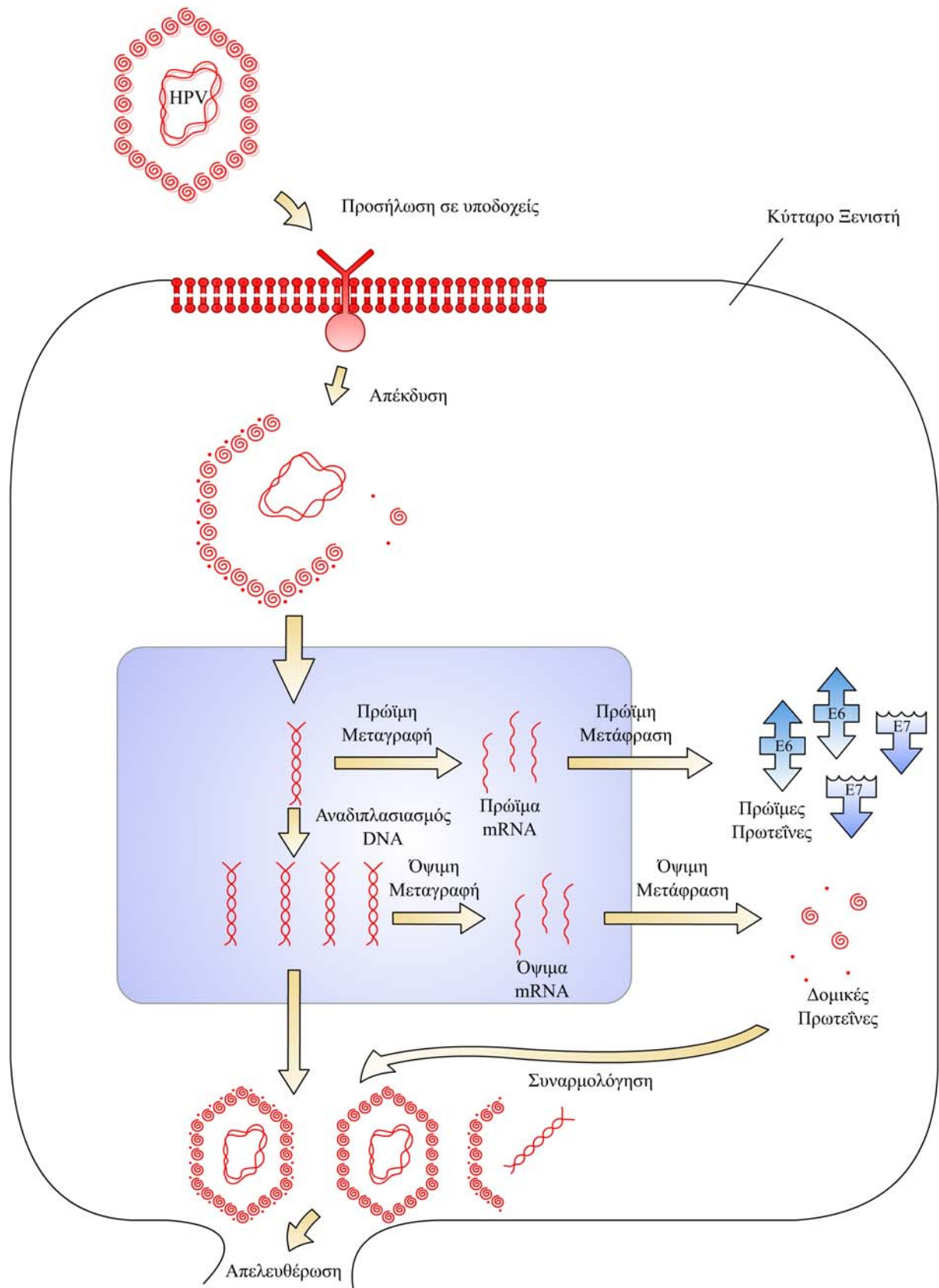
ζ. Όψιμη μεταγραφή, με αποτέλεσμα την παραγωγή όψιμου mRNA του ιού.

η. Όψιμη μετάφραση, με αποτέλεσμα την παραγωγή των δομικών πρωτεϊνών του ιού για την κατασκευή της κάψας.

θ. Συναρμολόγηση των νέων ιικών DNA μαζί με τις νεοπαραχθείσες πρωτεΐνες και το σχηματισμό νέων ιικών σωματιδίων.

ι. Απελευθέρωση των απογόνων HPV από το κύτταρο ξενιστή.

**Σχήμα 2.6.** Ο κύκλος αναπαραγωγής του ιού HPV στο κύτταρο ξενιστή.



### **2.3. Από τη μόλυνση στη φλεγμονή**

#### **2.3.1. Η μετάδοση του ιού HPV στο κύτταρο ξενιστή**

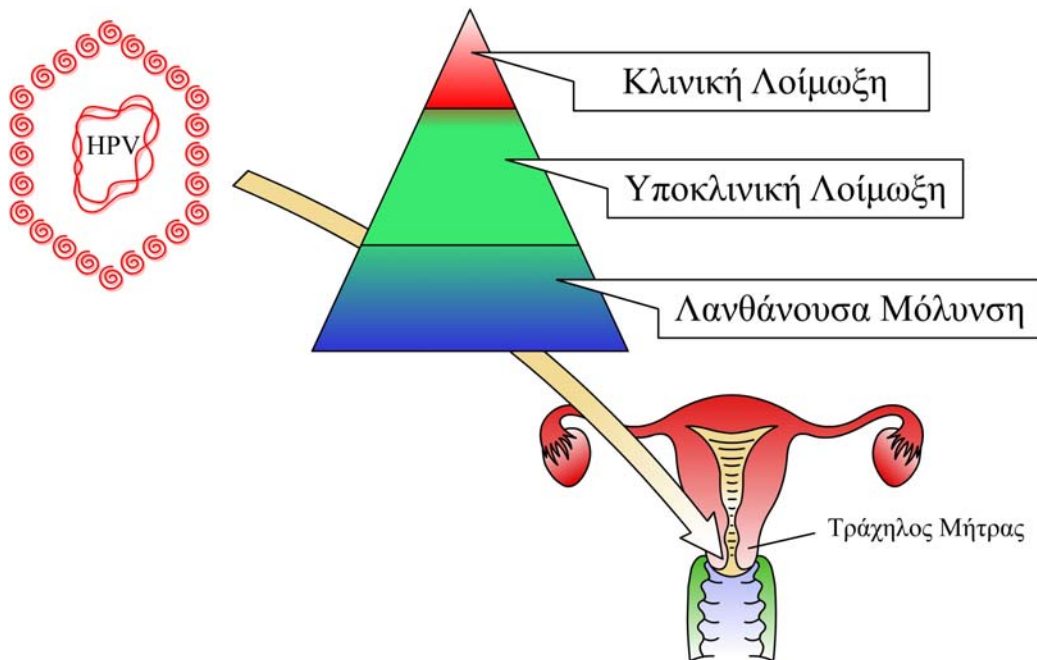
Στόχο του ιού HPV αποτελεί η βασική στιβάδα του επιθηλίου, όπου πραγματοποιούνται οι κυτταρικές διαιρέσεις. Η πρόσβαση των ιών στη στιβάδα αυτή εξασφαλίζεται μέσω μικροτραυματισμών του δέρματος ή του βλεννογόνου που έχουν ως αποτέλεσμα τη λύση της συνέχειας του επιθηλίου. Ο τραυματισμός του επιθηλίου δίνει την ευκαιρία στον ιό να διεισδύσει στα κύτταρα της βασικής στιβάδας, ενώ επιπλέον διευκολύνει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων λόγω της διαδικασίας επούλωσης και αποκατάστασης του ιστού που ακολουθεί (Ferenczy και Jenson, 1996).

Η μετάδοση του ιού στο δέρμα και στους βλεννογόνους γίνεται τόσο μέσω της σεξουαλικής επαφής, όσο και μέσω ετερο-ενοφθαλμισμού, αυτο-ενοφθαλμισμού ή φομιτών. Έχει επίσης περιγραφεί η κάθετη μετάδοση του ιού σε βρέφη από τη μητέρα τους κατά τον τοκετό (Hadlich και Kohl, 1998). Στους παράγοντες που σχετίζονται με τη μετάδοση του ιού HPV στον τράχηλο της μήτρας περιλαμβάνονται ο αριθμός των σεξουαλικών συντρόφων, η παρουσία γεννητικών θηλωμάτων στους συντρόφους καθώς και το ιστορικό σεξουαλικά μεταδιδόμενης νόσου στο παρελθόν (Friis και συν, 1997). Στο Κεφάλαιο 6 παρουσιάζονται αναλυτικότερα οι τρόποι μετάδοσης του ιού στην παιδική ηλικία.

#### **2.3.2. Η εξέλιξη της μόλυνσης σε λοίμωξη**

Η μόλυνση του επιθηλίου από τον ιό HPV μπορεί είτε να παραμείνει λανθάνουσα είτε να εξελιχθεί σε λοίμωξη με τη δημιουργία κλινικής ή υποκλινικής νόσου (**Σχήμα 2.7**). Ως κλινική νόσος ορίζεται η ύπαρξη οποιαδήποτε αλλοίωσης που είναι ορατή με γυμνό οφθαλμό κατά την κλινική εξέταση. Παράδειγμα κλινικής νόσου από τον ιό HPV αποτελούν τα θηλώματα της περιοχής των γεννητικών οργάνων, τα οποία μπορούν να έχουν τυπική (οξυτενή κονδυλώματα) ή μη τυπική μορφολογία.

**Σχήμα 2.7.** Φυσική ιστορία HPV μόλυνσης στον τράχηλο της μήτρας. Αναλογία λανθάνουσας μόλυνσης, υποκλινικής και κλινικής λοίμωξης με τον ιό HPV στον τράχηλο της μήτρας.



Όταν οι αλλοιώσεις δεν αναγνωρίζονται με γυμνό οφθαλμό αλλά εντοπίζονται μόνο με τεχνική βοήθεια (κολποσκόπιο ή μικροσκόπιο), τότε η νόσος λέγεται υποκλινική. Στην λανθάνουσα μορφή δεν έχουμε ούτε μακροσκοπικές ούτε μικροσκοπικές αλλοιώσεις, απλώς ανιχνεύεται το DNA του ιού. Σε μολυσμένα άτομα είναι συνήθης η μετάπτωση της νόσου από τη μια μορφή στην άλλη (λανθάνουσα, υποκλινική και κλινική) καθώς και η συνύπαρξη της κλινικής νόσου με την υποκλινική.

### 2.3.3. Η λανθάνουσα μόλυνση από τον ιό HPV

Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι στην πλειοψηφία των περιπτώσεων η μόλυνση του κυττάρου ξενιστή δεν εξελίσσεται σε φλεγμονή και παραμένει σε λανθάνουσα μορφή επί άλλοτε άλλο χρονικό διάστημα. Στην περίπτωση αυτή δεν υπάρχει ενεργός πολλαπλασιασμός των ικών σωματιδίων. Το ικό DNA αναδιπλασιάζεται παράλληλα με τις κυτταρικές διαιρέσεις, όμως ο αριθμός των ικών DNA παραμένει σταθερός. Είναι πιθανό, σε

κάποια φάση η μόλυνση να εξελιχθεί σε υποκλινική φλεγμονή, για να κατασταλεί στη συνέχεια και να μεταπέσει και πάλι σε λανθάνουσα. Στους έφηβους και στους νέους ενήλικες η διαδικασία αυτή είναι συνήθης με αποτέλεσμα η προσβολή από τον ιό HPV να είναι παροδική (Hildesheim και συν, 1994). Η μολυσματικότητα της λανθάνουσας μόλυνσης αμφισβητείται.

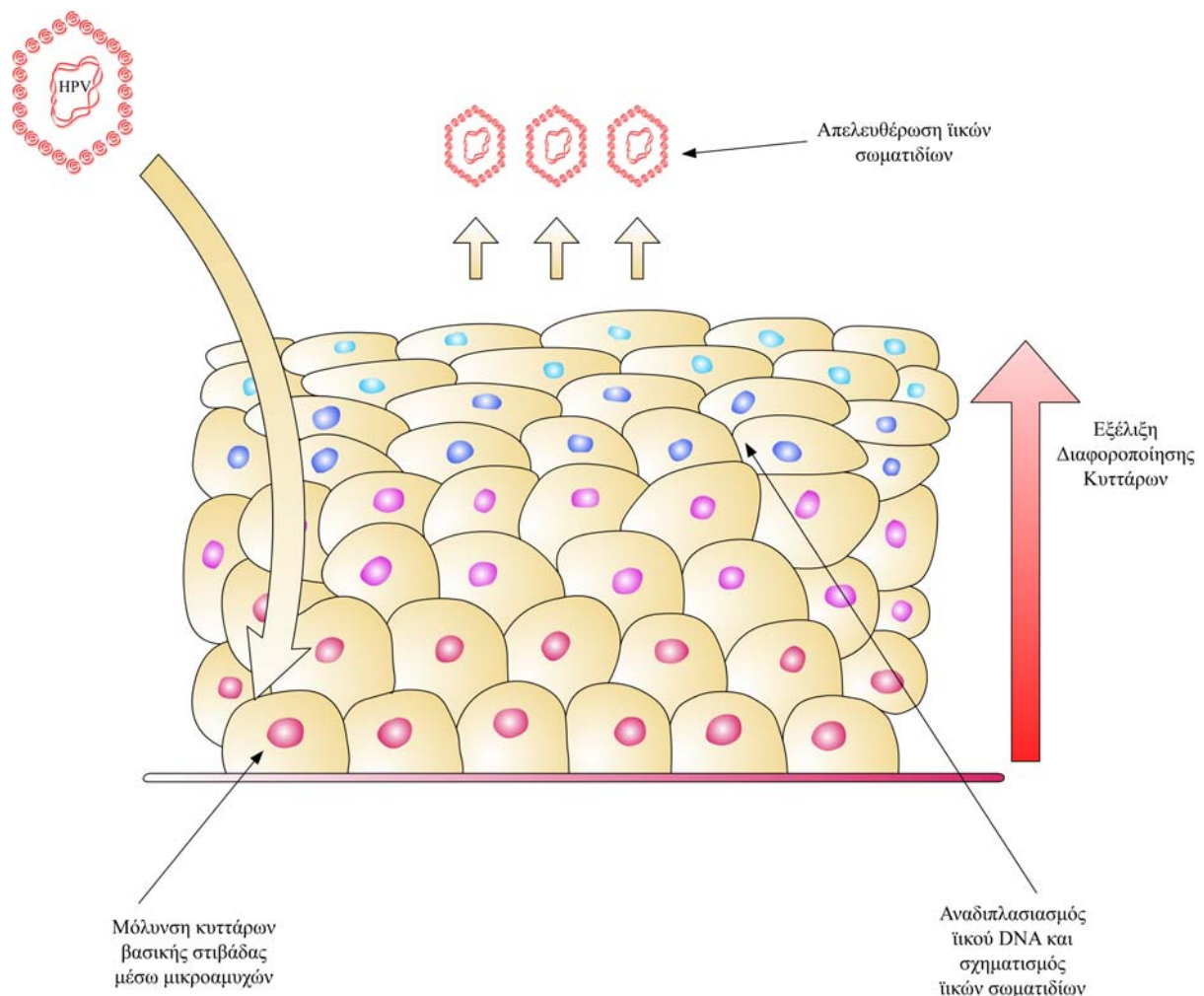
#### **2.3.4. Μη παραγωγική και παραγωγική φλεγμονή**

Οι δύο φάσεις μεταγραφής και μετάφρασης του ιικού σωματιδίου (πρώιμη και όψιμη) βρίσκονται σε αρμονία με τη διαδικασία διαφοροποίησης του πλακώδους επιθηλίου (Brescia και συν, 1986). Στη βασική στιβάδα του επιθηλίου, ο ιός αναδιπλασιάζεται ως επίσωμα εκμεταλλεζόμενος τις κυτταρικές διαιρέσεις που πραγματοποιούνται στη στιβάδα αυτή, ενώ ταυτόχρονα επιδρά στην αύξηση του ρυθμού των κυτταρικών διαιρέσεων. Στο στάδιο αυτό (μη παραγωγική φλεγμονή) δεν συντίθενται δομικές πρωτεΐνες με αποτέλεσμα να είναι ανέφικτη η συναρμολόγηση ιικών σωματιδίων και η απελευθέρωσή τους στο εξωτερικό περιβάλλον του κυττάρου ξενιστή (Chow και Broker, 1994). Σε δεύτερη φάση, καθώς τα κύτταρα διαφοροποιούμενα ανέρχονται στις επιφανειακές στιβάδες, συντίθεται οι δομικές πρωτεΐνες της κάψας του ιού. Όταν πλέον το εκφυλισμένο ώριμο κερατινοκύτταρο φθάσει στην επιφανειακή στιβάδα, έχει ολοκληρωθεί η συναρμολόγηση των νέων ιικών σωματιδίων, τα οποία εγκαταλείπουν το κύτταρο ξενιστή (παραγωγική φλεγμονή). Στο **Σχήμα 2.8** παρουσιάζεται η σχέση του κύκλου του ιού HPV με τη διαφοροποίηση των επιθηλιακών κυττάρων του ξενιστή.

Με την παραγωγή θυγατρικών κυττάρων και τη μετανάστευσή τους στις επιπολείς στιβάδες του επιθηλίου ακολουθεί η παραγωγική φλεγμονή. Η εξέλιξη της λανθάνουσας μόλυνσης σε φλεγμονή παραγωγικού τύπου συμβαίνει συνήθως μετά 2 εβδομάδες έως 8 μήνες από την αρχική μόλυνση (φάση επώασης). Στην παραγωγική φλεγμονή το γονιδίωμα

του ιού αναδιπλασιάζεται ως πλασμίδιο (επίσωμα) ξεχωριστά από τα χρωμοσώματα του ξενιστή. Παράγεται μεγάλος αριθμός ικών γονιδιωμάτων στις βασικές στιβάδες, ενώ παράλληλα παράγονται πρωτεΐνες της ικής κάψας στις επιφανειακές στιβάδες του επιθηλίου. Η υπερπαραγωγή νέων ικών σωματιδίων HPV οδηγεί στην εξάπλωση της μόλυνσης αφενός και στην εξέλιξη της αφετέρου.

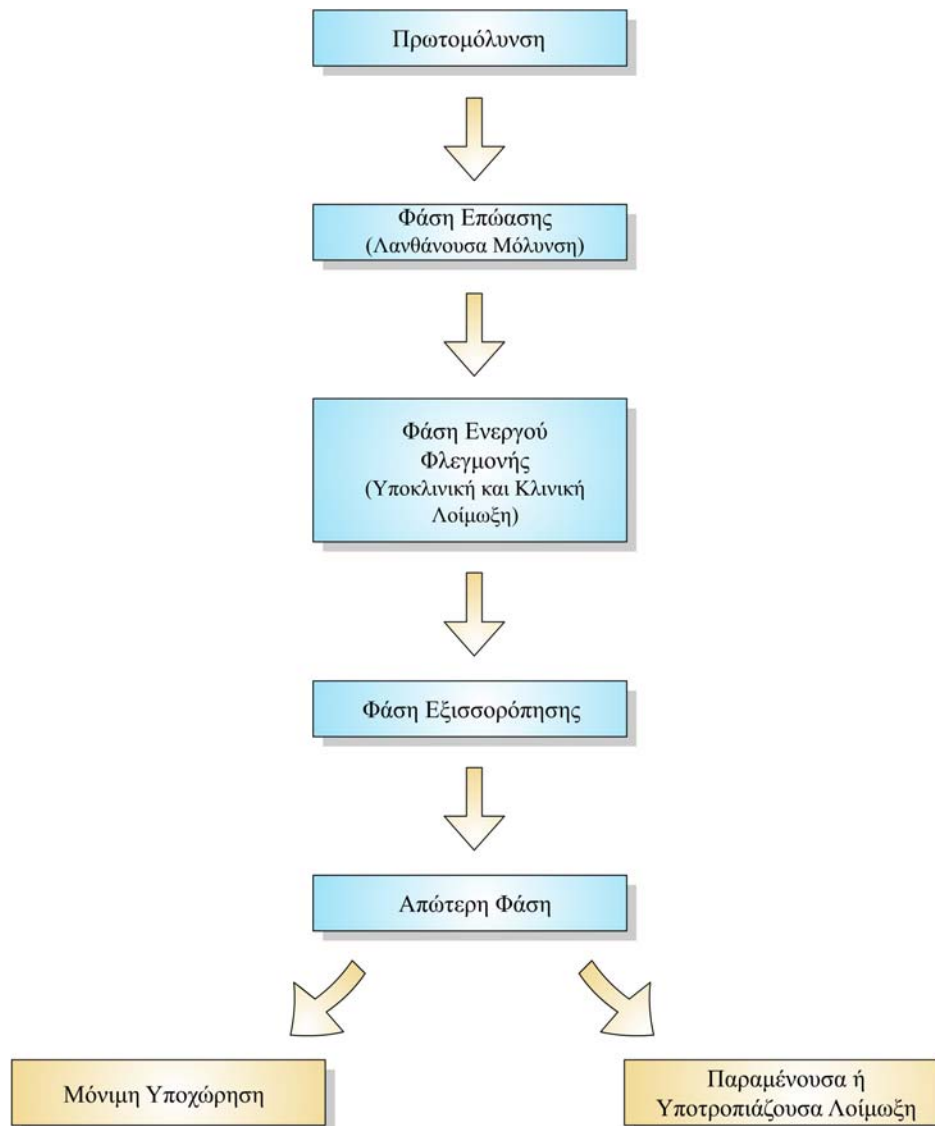
**Σχήμα 2.8.** Ο ιός HPV και η σχέση του με τη διαφοροποίηση των επιθηλιακών κυττάρων του ξενιστή.



Οι ιοί HPV προκαλούν αύξηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων του επιθηλίου καθώς και μορφολογικές και λειτουργικές αλλαγές στα χαρακτηριστικά τους με αποτέλεσμα την εμφάνιση υποκλινικών ή κλινικών αλλοιώσεων (φάση ενεργού φλεγμονής).

Ιστολογικά η ενεργός φλεγμονή εκδηλώνεται με υπερπλασία του επιθηλίου της ακανθωτής στιβάδας (ακάνθωση) και εμφάνιση κοιλοκυττάρωσης στις επιφανειακές στιβάδες. Η υπερπλασία του τοιχώματος των τριχοειδών αγγείων συμβάλει στην εκδήλωση κλινικών αλλοιώσεων, ενώ όταν δεν υπάρχει, η αλλοίωση παραμένει επίπεδη και υποκλινική παρά την εμφάνιση ακάνθωσης και κοιλοκυττάρωσης.

**Σχήμα 2.9.** Η εξέλιξη της HPV μόλυνσης σε μη παραγωγική και παραγωγική φλεγμονή.



Η φάση της ενεργού φλεγμονής διαρκεί περίπου 3-6 μήνες. Μετά τη φάση αυτή ακολουθεί η φάση της εξισορρόπησης από το ανοσοποιητικό σύστημα, όπου δεν παρατηρείται εμφάνιση νέων αλλοιώσεων, ενώ συχνά αυτοιώνονται οι ήδη υπάρχουσες. Τέλος



ακολουθεί μια απώτερη φάση (9 μήνες έως 2 έτη από την πρωτομόλυνση), κατά την οποία έχουμε παρατεταμένη ύφεση ή παραμένουσα νόσο με υποτροπές. Στο **Σχήμα 2.9** συνοψίζεται η εξέλιξη της HPV μόλυνσης σε μη παραγωγική και παραγωγική φλεγμονή.

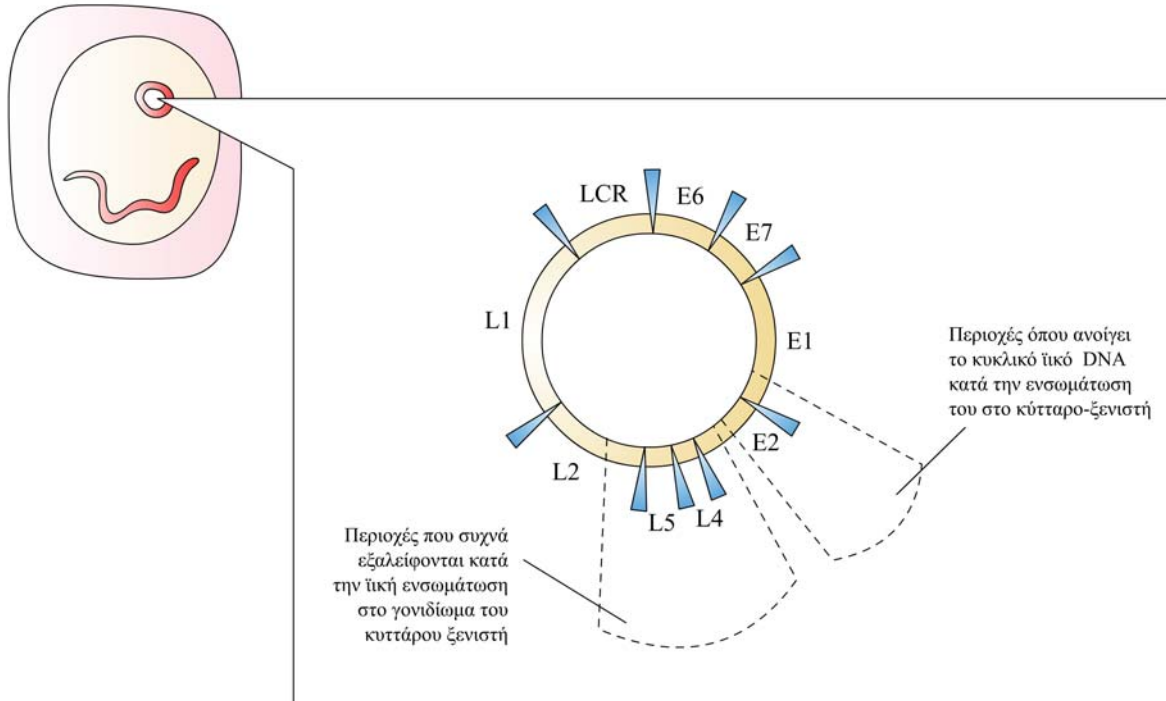
### **2.3.5. HPV και καρκινογένεση**

Η μόλυνση από τους ιούς HPV «υψηλού κινδύνου» μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση φλεγμονής μη παραγωγικού τύπου, κατά την οποία το γονιδίωμα του ιού ενσωματώνεται στο γενετικό υλικό του κυττάρου ξενιστή (Durst και συν, 1985). Παρά το γεγονός πως η ενσωμάτωση φαίνεται πως συμβαίνει τυχαία στα χρωμοσώματα του κυττάρου ξενιστή, η ανεύρεση ειδικών τόπων ενσωμάτωσης ενδεχομένως να ευθύνεται για την ενεργοποίηση ή απενεργοποίηση συγκεκριμένων γονιδίων. Κατά την ενσωμάτωση του DNA του ιού παρατηρείται απώλεια των «ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης» E1 και E2, όπως φαίνεται στο **Σχήμα 2.10**, γεγονός που εξαλείφει την ανασταλτική επίδραση των πρωτεϊνών E1 και E2 στην έκφραση των ιικών πρωτεϊνών E6 και E7 και οδηγεί στην ανεξέλεγκτη παραγωγή τους (Frinzer και συν, 2002).

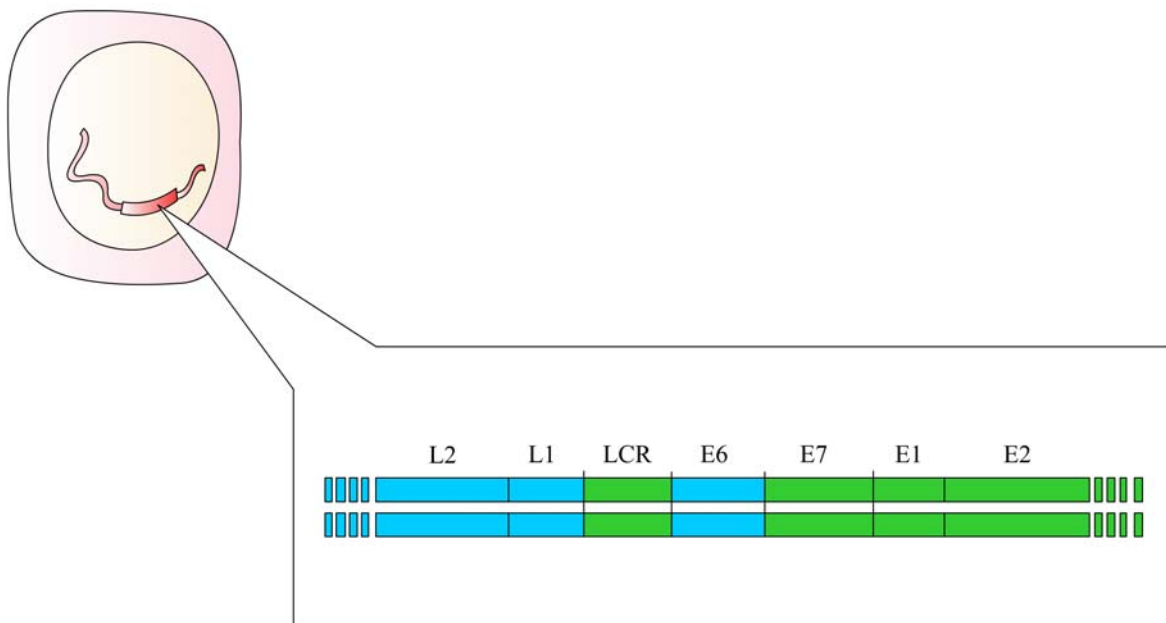
Η ενσωμάτωση του DNA του ιού στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή, επίσης, έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της σταθερότητας των E6 και E7 mRNA (Jeon και Lambert, 1995). Οδηγεί σε μη αντιστρεπτή απορρύθμιση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων p53 και Rb, χρωμοσωμιακή αστάθεια και αθανатоποίηση των κυττάρων (Ferenczy και Franco, 2002). Το ιικό γονιδίωμα αναδιπλασιάζεται, όμως η μη έκφραση της όψιμης περιοχής L για την παραγωγή των δομικών πρωτεϊνών της ιικής κάψας, καθιστά αδύνατη τη συναρμολόγηση ιικών σωματιδίων. Η διάκριση μεταξύ της επισωματικής και της ενσωματωμένης μορφής του ιικού γονιδιώματος μπορεί να πραγματοποιηθεί με διάφορες μεθόδους, όπως η DIPS-PCR και η APOT (Luft και συν, 2001, Klaes και συν, 1999).

**Σχήμα 2.10.** Επισωματική και ενσωματωμένη μορφή του γονιδιώματος του ιού HPV στα κύτταρα του ξενιστή.

Επισωματική Μορφή



Ενσωματωμένη Μορφή



Σε καλοήθειες αλλοιώσεις το γονιδίωμα του ιού HPV βρίσκεται σε επισωματική μορφή, ενώ σε κακοήθειες αλλοιώσεις είναι ενσωματωμένο στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή, όπως φαίνεται στο **Σχήμα 2.11**. Η συχνότητα της ενσωμάτωσης αυξάνει με το βαθμό της σοβαρότητας της νεοπλασίας του τραχήλου της μήτρας (Klaes και συν, 1999). Έχει προταθεί πως η ενσωμάτωση του ιικού DNA στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή αποτελεί απαραίτητη συνθήκη για την κακοήθη εξαλλαγή του κυττάρου.

Η υπερπαραγωγή των ιικών πρωτεϊνών E6 και E7 προκαλούν αλλαγές στο ρυθμό πολλαπλασιασμού των μολυσμένων κυττάρων με αποτέλεσμα την αθανατοποίηση των κυττάρων και την κακοήθη εξαλλαγή τους (**Σχήμα 2.12** και **2.13**). Η ουσιαστική διαφορά μεταξύ των «υψηλού κινδύνου» και των «χαμηλού κινδύνου» HPV συνίσταται στο ότι οι E6 και E7 των «χαμηλού κινδύνου» HPV δεν έχουν μεγάλη χημική συγγένεια με τις πρωτεΐνες p53 και Rb και επομένως δεν μπορούν να προκαλέσουν κακοήθη εξαλλαγή. Τόσο η πρωτεΐνη E6, όσο και πρωτεΐνη E7 των HPV «υψηλού κινδύνου» μπορούν ανεξάρτητα να προκαλέσουν αθανατοποίηση των επιθηλιακών κυττάρων (Halbert και συν, 1991). Ωστόσο η συνδυασμένη δράση τους φαίνεται πως δρα συνεργιστικά (**Σχήμα 2.14**). Η E7 παρακάμπτει την αναστολή της E6 από την INK4A μέσω της απευθείας ενεργοποίησης των κυκλινών A και E, ενώ η E6 με τη σειρά της εποδίζει τη E7-επαγόμενη απόπτωση αποδομώντας τις πρωτεΐνες p53 και BAK (Thomas και Banks, 1998, Zerfass και συν, 1995).

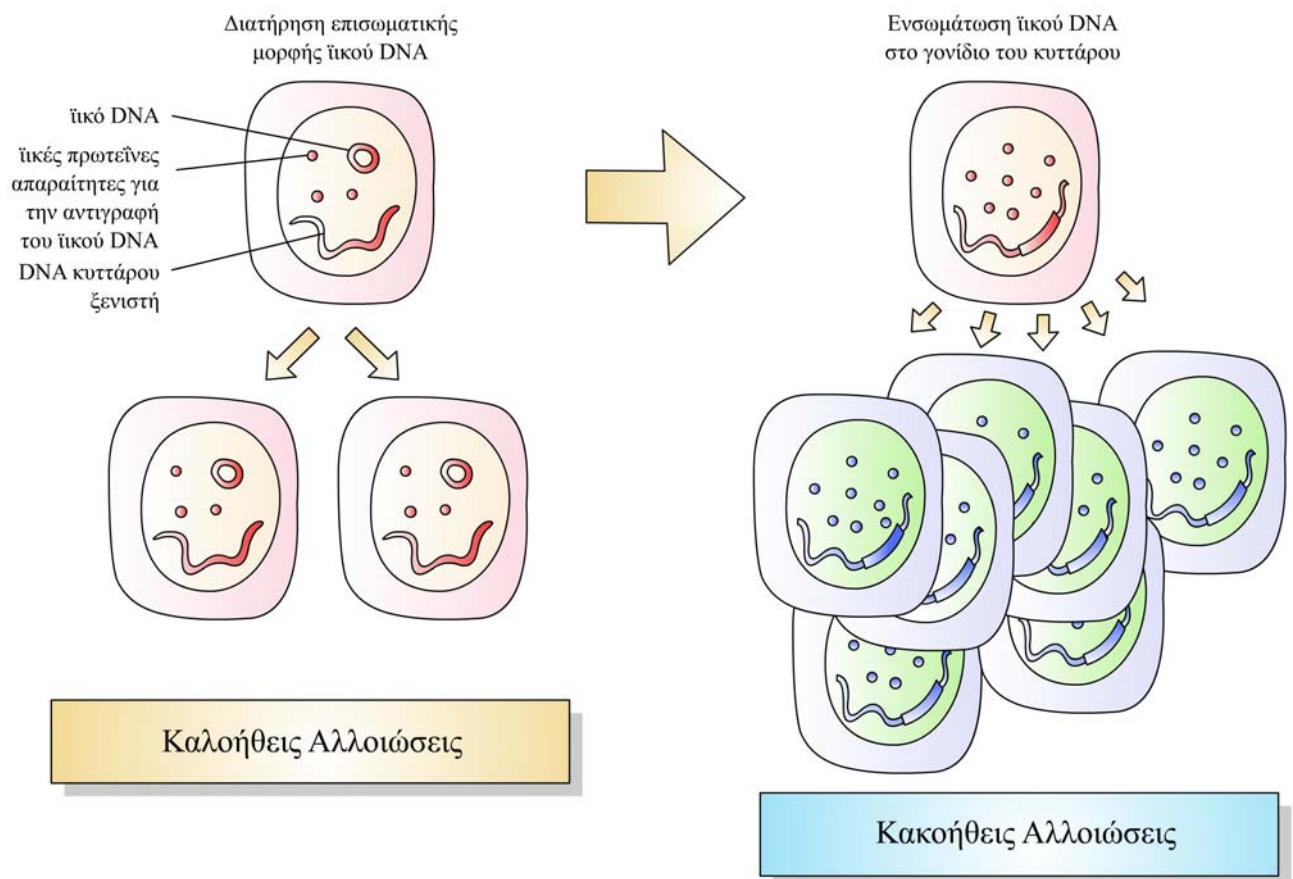
## **2.4. Παραγοντες εξέλιξης της μόλυνσης**

### **2.4.1. Ανοσο-απόκριση**

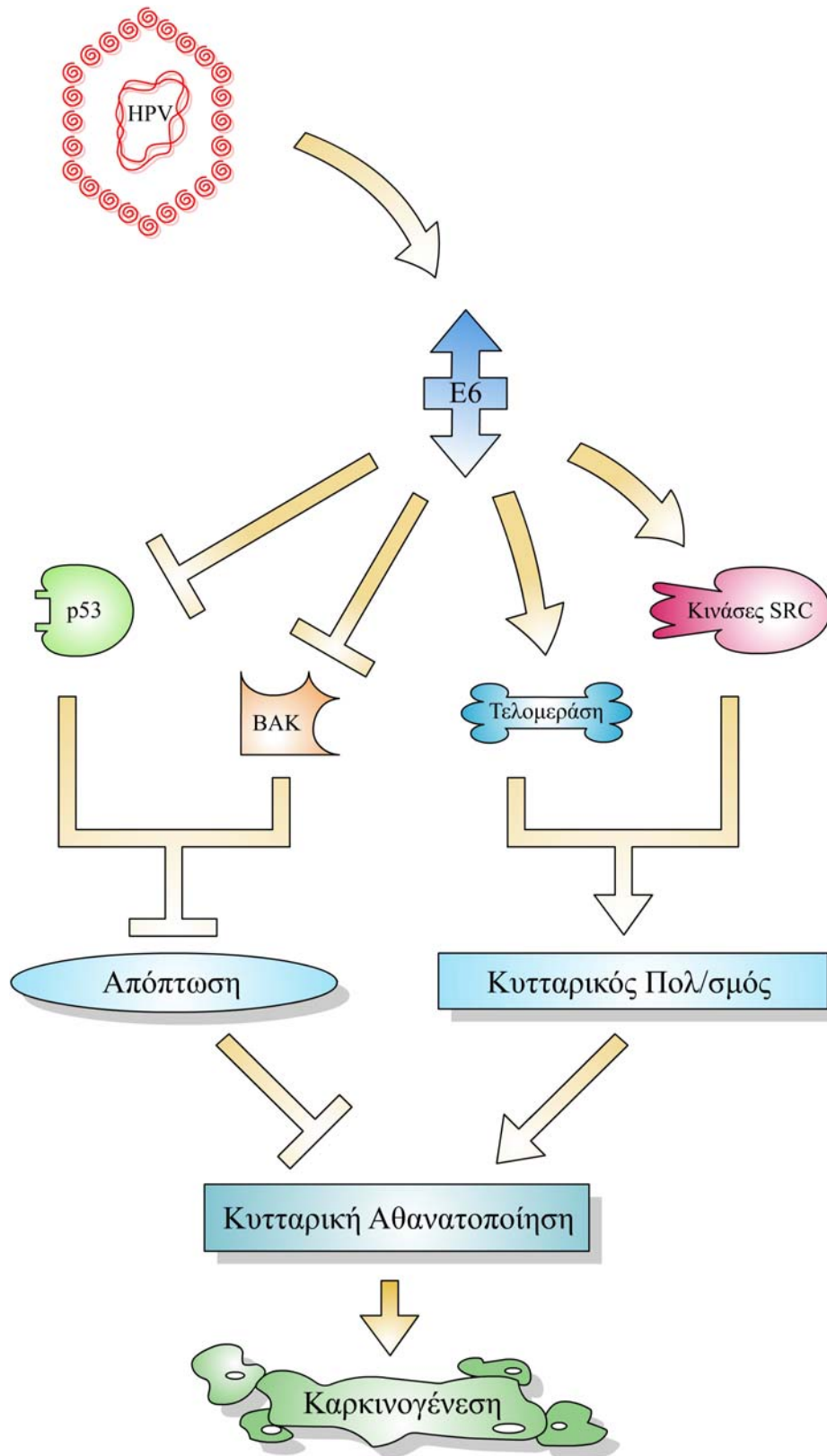
Το ανοσοποιητικό σύστημα μέσω του κυτταρικού και μέσω του χυμικού του σκέλους αποτελεί τον κύριο ρυθμιστή της εξέλιξης της HPV μόλυνσης συμμετέχοντας ενεργά στην αντιμετώπιση της (**Σχήμα 2.15**). Το γεγονός αυτό μπορεί έμμεσα να διαπιστωθεί εξαιτίας της αυξημένης επίπτωσης ενδοεπιθηλιακών νεοπλασματικών αλλοιώσεων (SIL) στον τράχηλο

της μήτρας ανοσοκατεσταλμένων γυναικών (Petry και συν, 1994). Επιπλέον έχει βρεθεί πως ασθενείς με κονδυλωματοειδή επιδερμοδυσπλασία, οι οποίοι πάσχουν από ανοσοανεπάρκεια αναπτύσσουν πολύ συχνά καρκίνο του δέρματος (Benton και συν, 1992).

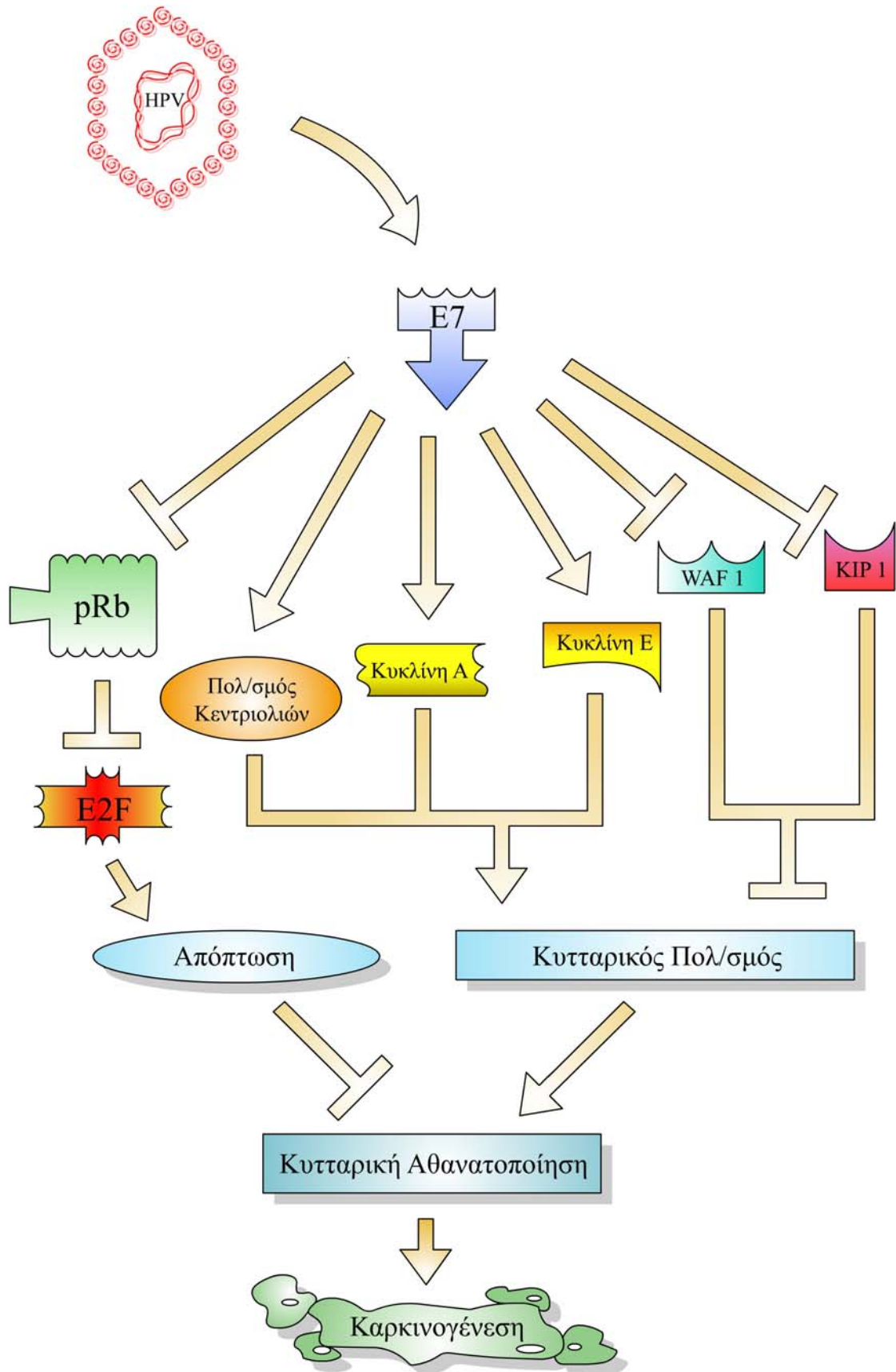
**Σχήμα 2.11.** Η σχέση της επισωματικής και της ενσωματωμένης μορφής του γονιδιώματος του ιού HPV στα κύτταρα του ξενιστή με την ανάπτυξη καλοήθων και κακοήθων αλλοιώσεων.



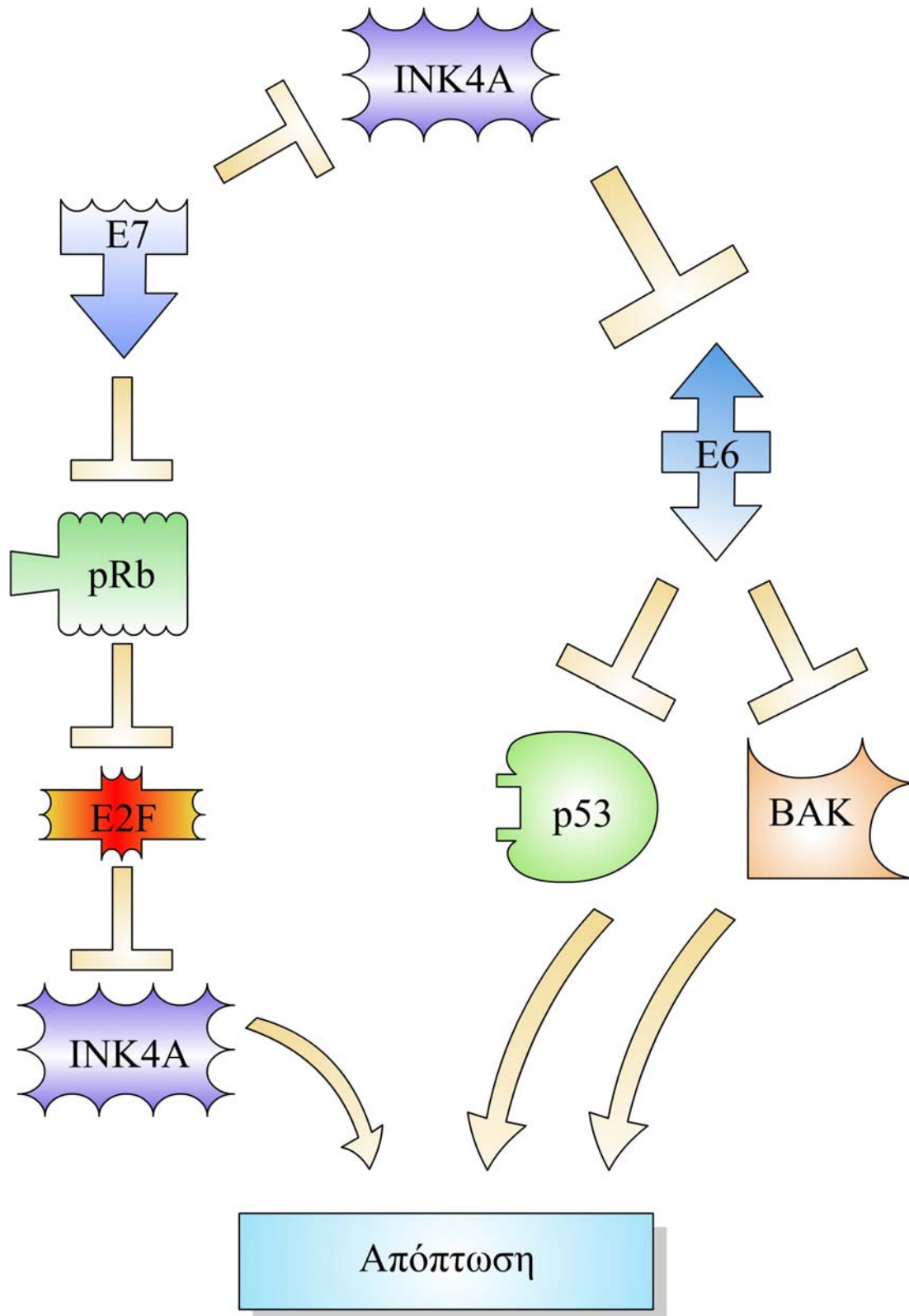
Σχήμα 2.12. Ογκοπρωτεΐνη E6 και καρκινογένεση.



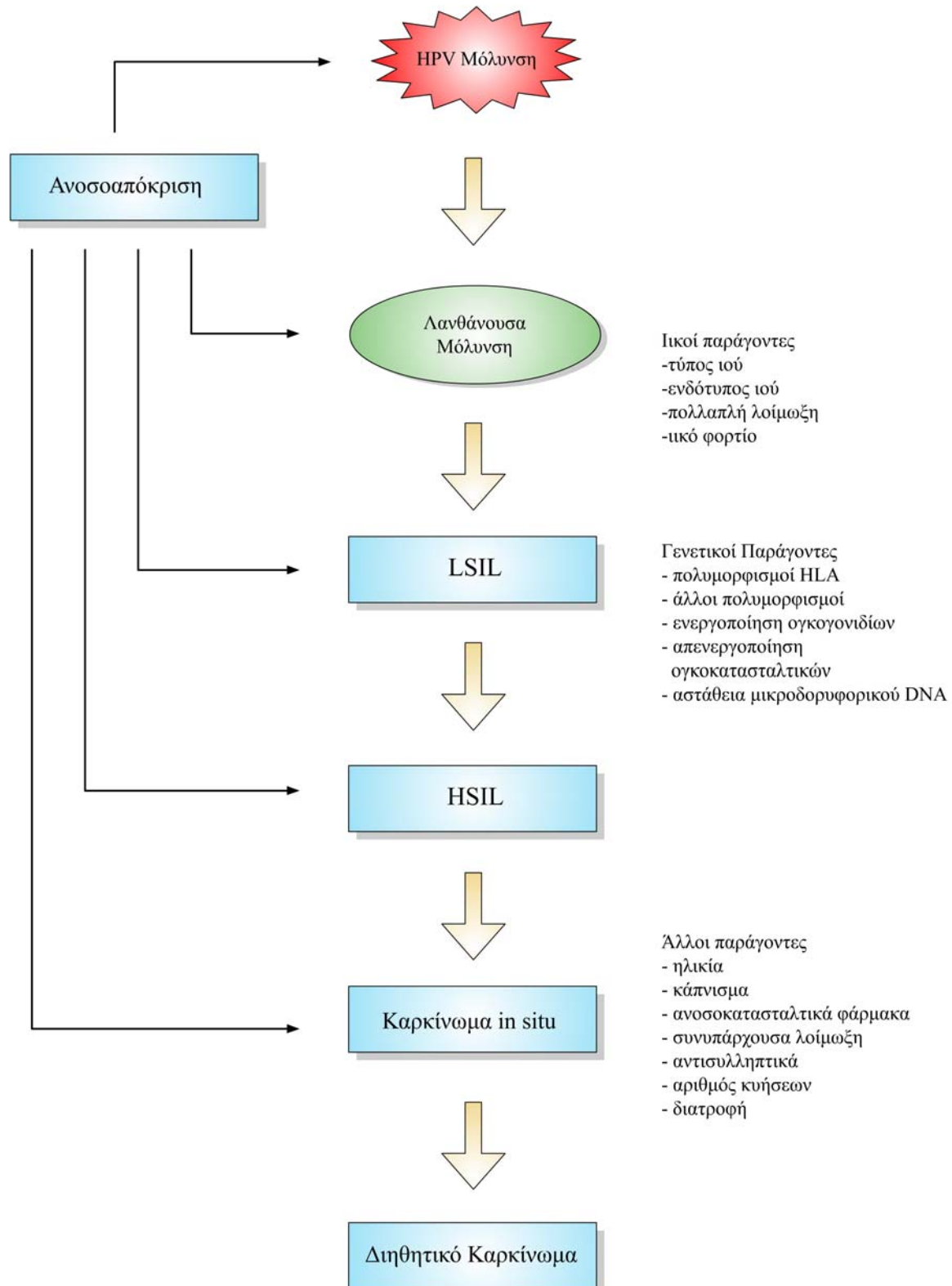
Σχήμα 2.13. Ογκοπρωτεΐνη E7 και καρκινογένεση.



**Σχήμα 2.14.** Αλληλεπίδραση ογκοπρωτεϊνών E6 και E7. Η E7 παρακάμπτει την αναστολή της E6 από την INK4A μέσω της απευθείας ενεργοποίησης των κυκλινών A και E, ενώ η E6 με τη σειρά της εποδίζει τη E7-επαγόμενη απόπτωση αποδομώντας τις πρωτεΐνες p53 και BAK.



**Σχήμα 2.15.** Η ανοσο-απόκριση και άλλοι παράγοντες εξέλιξης της HPV μόλυνσης σε διηθητικό καρκίνο του τραχήλου της μήτρας.





Μια σειρά από μελέτες έχουν δείξει τη συμμετοχή τόσο της κυτταρικής όσο και της χυμικής ανοσίας σε περιπτώσεις υποτροπιάζουσων HPV λοιμώξεων (Hopfl, και συν, 2000). Η παρουσία κυττάρων NK έχει συσχετιστεί με την υποχώρηση HPV επαγόμενων τραχηλικών λοιμώξεων (Garzetti και συν, 1995). Η διήθηση του επιθηλίου με μονοπύρρηνα σε ασθενείς με υποτροπιάζουσες αλλοιώσεις έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων των κυτταροκινών, όπως IFN- $\gamma$ , IL-2 και IL-12, με αποτέλεσμα την υποχώρηση των αλλοιώσεων (Frazer, 1996). Τα κύτταρα Langerhans, τα πιο σημαντικά αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα των επιθηλιακών κυττάρων για τα T-λεμφοκύτταρα σε υποτροπιάζουσες HPV επαγόμενες αλλοιώσεις είναι μειωμένα. Ωστόσο φαίνεται πως η T-κυτταρική ανοσία ευθύνεται κατά κύριο λόγο στην καταστολή της λοίμωξης (Tindle και Frazer, 1994). Η παραγωγή αντισωμάτων έναντι των πρωτεϊνών L1 και L2 της ιικής κάψας είναι επίσης σημαντική τόσο στην προφύλαξη της λοίμωξης, όσο και στην υποχώρηση των HPV σχετιζόμενων αλλοιώσεων (Schiller και συν, 2000, Sun και συν, 1999). Το γεγονός, όμως, πως ο ιός προσβάλλει τα επιθηλιακά κύτταρα του ξενιστή που διαφοροποιούνται χωρίς όμως να προκαλεί τη λύση τους, έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη παραγωγή αντισωμάτων τόσο τοπικά όσο και στον ορό.

Η παράκαμψη των μηχανισμών ανοσο-απόκρισης του κυττάρου έχει βρεθεί πως αποτελεί βασικό παράγοντα της εξέλιξης της HPV λοίμωξης σε προκαρκινικές αλλοιώσεις και καρκίνο (Spataro και συν, 1998, Graderi και συν, 2000). Η μεγάλη διάρκεια των HPV λοιμώξεων καθώς και οι συνεχείς υποτροπές τους σε ανοσοεπαρκείς ασθενείς υποδηλώνουν τη μη αποτελεσματική ανοσοαπόκριση των κυττάρων του ξενιστή. Ο ιός HPV δεν εξουδετερώνεται από τους ανοσολογικούς μηχανισμούς του ξενιστή όταν δεν αναγνωρίζεται λόγω υποέκφρασης των αντιγόνων HLA, όταν διαταράσσεται η επικοινωνία μεταξύ του μολυσμένου HPV κυττάρου και των κυττάρων άμυνας λόγω μειωμένης έκφρασης κυτταροκινών, καθώς και όταν δεν επάγονται οι μηχανισμοί απόπτωσης των μολυσμένων

κυττάρων (Finger και συν, 2002). Ο μη κυτταρολυτικός χαρακτήρας της HPV λοίμωξης και η χαμηλή έκφραση ικών πρωτεϊνών στις βασικές στιβάδες του επιθηλίου καθυστερούν την αποτελεσματική αντιμετώπιση του ιού. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός πως ο ίδιος ο ιός HPV έχει την ικανότητα να τροποποιεί την ανοσο-απόκριση των κυττάρων του ξενιστή. Έχει βρεθεί πως η πρωτεΐνη E5 μειώνει τα επίπεδα CD95 υποδοχέων στην κυτταρική μεμβράνη των επιθηλιακών κυττάρων, οι οποίοι ενέχονται στην επαγωγή των αποπτωτικών μηχανισμών (Kabsch και Alonso, 2002). Δεδομένου ότι η πρωτεΐνη E5 συνήθως εξαλείφεται κατά την ενσωμάτωση του ιικού DNA στο κυτταρικό γονιδίωμα, η συσχέτιση μειωμένων υποδοχέων CD95 και HPV φαίνεται πως περιορίζεται στο φυσιολογικό κύκλο του ιού όπου η αναστολή της απόπτωσης εξασφαλίζει τον πολλαπλασιασμό του ιού και τη συναρμολόγηση των ικών σωματιδίων. Επιπλέον η υπερέκφραση της πρωτεΐνης E7 αναστέλλει τη λειτουργία των δενδριτικών κυττάρων επιδρώντας στη διαφοροποίηση των κυττάρων αυτών (Frazer και συν, 1999).

#### **2.4.2. Γενετικοί παράγοντες**

Το σύστημα ιστοσυμβατότητας του ανθρώπου HLA είναι υπεύθυνο για την παρουσίαση των ικών αντιγόνων στο ανοσοποιητικό σύστημα και την ενεργοποίησή του με στόχο την αναγνώριση και εξουδετέρωση των κυττάρων που έχουν μολυνθεί (Hildesheim και Wang, 2002). Κύριο χαρακτηριστικό των γονιδίων του συστήματος HLA είναι η παρουσία πολυμορφισμών, οι οποίοι ευθύνονται για τη διαφορετική συγγένια των μορίων HLA με τα διάφορα αντιγόνα, μεταξύ των οποίων και τα αντιγόνα του ιού HPV. Πολλές μελέτες έχουν εξετάσει τη σχέση συγκεκριμένων πολυμορφισμών του συστήματος HLA με την εμφάνιση HPV-εξαρτώμενου καρκίνου του τραχήλου της μήτρας με περισσότερο καλά μελετημένους τους απλότυπους των μορίων της κλάσης II DQB1\*03 (DQB1\*0301,

DQB1\*0302, DQB1\*0303), DRB1\*1501, DQB1\*0602, DRB1\*13 (DRB1\*1301, DRB1\*1302, DRB1\*1303 DRB1\*1304 και DRB1\*1305) και DQB1\*0603.

Μελέτες σε διαφορετικούς πληθυσμούς τόσο στην Αμερική όσο και στην Ευρώπη έχουν δείξει πως οι απλότυποι DRB1\*13 και DQB1\*0603 παρέχουν προστασία για την εμφάνιση καρκίνου του τραχήλου της μήτρας (Wang και συν, 2001, Odunsi και συν, 1996, Apple και συν, 1994). Η αρνητική συσχέτιση των απλοτύπων αυτών με την εμφάνιση καρκίνου του τραχήλου της μήτρας είναι πιο έντονη σε γυναίκες θετικές στον ιό HPV-16 (Hildesheim και συν, 1998, Apple και συν, 1994). Ωστόσο δεν είναι ακόμα σαφές ποιός από τους απλότυπους DRB1\*13 (DRB1\*1301, DRB1\*1302, DRB1\*1303 DRB1\*1304 και DRB1\*1305) ή κατά πόσο ο συνδυασμός DRB1\*13 και DQB1\*0603 μεταξύ τους ή με άλλους πολυμορφισμούς ευθύνονται για το μειωμένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Αντίθετα, οι απλότυποι DQB1\*03 (DQB1\*0301, DQB1\*0302, DQB1\*0303) έχουν συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο σε πληθυσμούς από την Αμερική, την Ευρώπη, την Αφρική και την Ιαπωνία (Beskow και συν, 2001, Lin και συν, 2001, Cuzick και συν, 2000, Neuman και συν, 2000, Sastre και συν, 1996, Sanjeevi και συν, 1996, Nawa και συν, 1995). Με αυξημένο κίνδυνο έχουν συσχετιστεί και οι απλότυποι DRB1\*1501, DQB1\*0602 ιδιαίτερα σε HPV 16 θετικές γυναίκες (Beskow και συν, 2001, Sanjeevi και συν, 1996, Apple και συν, 1994), ωστόσο η συσχέτιση αυτή δεν επιβεβαιώνεται από άλλους ερευνητές (Wang και συν, 2001, Hildesheim και συν, 1998, Odunsi και συν, 1996).

Για τα μόρια κλάσης I του συστήματος HLA, η πλειοψηφία των μελετών στηρίζεται σε ορολογικές μεθόδους, οι οποίες δεν επιτρέπουν την ανίχνευση ειδικών απλοτύπων. Έχει βρεθεί πως οι τύποι B44 και B7 σχετίζονται θετικά με την ανάπτυξη καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, ενώ ο τύπος B15 έχει προστατευτική δράση (Wang και συν, 2001, Brady και συν, 1999, Hildesheim και συν, 1998, Bontkes και συν, 1998). Ο μικρός αριθμός των

μελετών καθώς και η αναφορά αντίθετων συσχετίσεων από άλλες μελέτες καθιστά αναγκαία στο μέλλον τη διερεύνηση των συσχετίσεων αυτών.

Αρκετοί ερευνητές έχουν μελετήσει τους πολυμορφισμούς του γονιδίου της πρωτεΐνης p53 στο κωδικόνιο 72 σε σχέση με την ανάπτυξη HPV σχετιζόμενου καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Ασθενείς ομόζυγοι Arg+/Arg+ στη θέση 72 που φέρουν ιό HPV υψηλού κινδύνου εμφανίζουν μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του τραχήλου της μήτρας σε σχέση με ασθενείς ομόζυγους ή ετερόζυγους (Pro+/Pro+, Pro+/Arg+) για την p53 προλίνη (Storey και συν, 1998). In vivo πειράματα έχουν δείξει πως η μορφή της πρωτεΐνης p53 με αργινίνη στη θέση 72 είναι πιο επιρρεπής στην αποικοδόμηση που μεσολαβείται από την πρωτεΐνη E6 του ιού HPV σε σχέση με τη μορφή με προλίνη στην αντίστοιχη θέση (Storey και συν, 1998).

Παρά το γεγονός πως ο πολυμορφισμός Arg+/Arg+ έχει προταθεί ως προδιαθεσικός παράγοντας για τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, δεν έχει επιβεβαιωθεί (Ngan και συν, 1999, Minaguchi και συν, 1998). Άλλοι ερευνητές έχουν, επίσης, συσχετίσει την παρουσία πολυμορφισμών και σε άλλα γονίδια, π.χ. MTHFR, WAF1 και IL-10, με την ανάπτυξη καρκίνου του τραχήλου της μήτρας (Goodman και συν, 2001, Harima και συν, 2001, Stanczuk και συν, 2001). Η διερεύνηση τα τελευταία χρόνια και άλλων μοριακών μηχανισμών, όπως η απώλεια της ετεροζυγωτίας (LOH), του φαινομένου της υπερμεθυλίωσης και της αστάθειας του μικροδορυφορικού DNA συμβάλλει περαιτέρω στην κατανόηση της αλληλεπίδρασης των γενετικών υλικών του ιού και του κυττάρου ξενιστή (Virmani και συν, 2001, Chung και συν, 1999, Lazo, 1999).

### **2.4.3. Άλλοι παράγοντες**

Διάφοροι άλλοι παράγοντες έχει βρεθεί πως δρουν συνεργιστικά στην εξέλιξη της HPV μόλυνσης σε λοίμωξη και στην καρκινογένεση (**Πίνακας 2.6**).

**Πίνακας 2.6.** Παράγοντες εξέλιξης HPV λοίμωξης.

ΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ		
Τύπος ιού HPV	-«υψηλού κινδύνου» HPV -«ενδιάμεσου κινδύνου» HPV -«χαμηλού κινδύνου» HPV	
Ενδότυπος ιού HPV	-Ευρωπαϊκός ενδότυπος -μη Ευρωπαϊκοί ενδότυποι	
Πολλαπλή λοίμωξη HPV		
Ικό φορτίο HPV		
ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ		
Ανοσοαπόκριση ξενιστή	-κυτταρική ειδική ανοσία -χυμική ειδική ανοσία -κυτταρική εγγενής ανοσία -χυμική εγγενής ανοσία	
Πολυμορφισμοί HLA	-DRB1*1301-5, DQB1*0603 -DQB1*0301-3	
Άλλοι πολυμορφισμοί	-p53 -MTHFR -WAF1 -IL-10	
Άλλοι γενετικοί παράγοντες	-Ενεργοποίηση ογκογονιδίων -Απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων -αστάθεια μικροδορυφορικού DNA	
ΆΛΛΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ		
Ηλικία		
Κάπνισμα		
Ανοσοκατασταλτικά φάρμακα		
Συνοπάρχουσες λοιμώξεις	-HIV -Σεξουαλικά μεταδιδόμενα νοσήματα	
Αντισυλληπτικά δισκία		
Αριθμός κυήσεων	-περισσότερες από 7 -λιγότερες από 7	
Διατροφή		

Στους παράγοντες αυτούς περιλαμβάνονται ικοί παράγοντες όπως ο τύπος του ιού (Matsumoto και συν, 2000, Xi και συν, 1997, Chan και συν, 2002, Villa και συν, 2000, Berumen και συν, 2001) και παρουσία πολλαπλής μόλυνσης (Critchlow και συν, 1995), αλλά και διάφοροι συνεργιστικοί παράγοντες όπως η ηλικία (Bosch και Munoz, 2002), το

κάπνισμα (Hildesheim και συν, 2001, Deacon και συν 2000, Szarewski και Cuzick, 1998, Kjaer και συν, 1998, Schiffman και συν, 1993), οι συνυπάρχουσες μολύνσεις, ο αριθμός των κυήσεων (Munoz και συν, 2002, Hildesheim και συν, 2001, Thomas και συν, 2001 Deacon και συν 2000, Schiffman και συν, 1993), η λήψη αντισυλληπτικών ή άλλων εξωγενών ορμονών (Moneno και συν, 2002) και η χρήση ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων (Bosch και Munoz, 2002). Επιπλέον, αξίζει να σημειωθεί πως υπάρχουν μεγάλες διακυμάνσεις από ξενιστή σε ξενιστή όσον αφορά τη χρονική διάρκεια της κάθε φάσης της HPV λοίμωξης αλλά και τεράστια ποικιλία στην έκταση της νόσου, στην ανατομική της κατανομή και στην εμφάνιση αλλοιώσεων.

## **2.5. Διάγνωση HPV μόλυνσης**

### **2.5.1. Έμμεσες και άμεσες διαγνωστικές προσεγγίσεις**

Η διάγνωση της HPV μόλυνσης γίνεται τόσο έμμεσα με την ανίχνευση των μορφολογικών αλλαγών που προκαλεί ο ιός στα κύτταρα και τους ιστούς, όσο και άμεσα με την ανίχνευση του ιικού DNA με μοριακές τεχνικές (**Πίνακα 2.7**). Η πρώτη ομάδα διαγνωστικών μεθόδων περιλαμβάνει την κλινική εξέταση, την κυτταρολογική εξέταση κατά Παπανικολάου επιχρισμάτων του τραχήλου της μήτρας, την κολποσκόπηση και την ιστολογική εξέταση των βιοψιών από κλινικές και υποκλινικές αλλοιώσεις. Η διάγνωση βασίζεται στην εκτίμηση της μορφολογίας των αλλοιώσεων είτε μακροσκοπικά είτε μικροσκοπικά. Παράδειγμα HPV-σχετιζόμενης μορφολογικής αλλοίωσης αποτελεί η ανεύρεση κοιλοκυττάρων, καλώς διαφοροποιημένων κυττάρων της διάμεσης και της επιπολής στιβάδας του επιθηλίου, χωρίς μιτωτική δραστηριότητα, με κυτταροπλασματικό κενोटόπιο. Ωστόσο σε αρκετές περιπτώσεις η ασφαλής διάγνωση δεν είναι εφικτή, ενώ συχνά υπερεκτιμώνται μεταπλαστικές ή ατροφικές αλλοιώσεις και χαρακτηρίζονται HPV φλεγμονές (Cox, 1996).

Ο συνδυασμός των έμμεσων διαγνωστικών προσεγγίσεων με τη χρήση μοριακών τεχνικών που έχουν ως στόχο την άμεση ανίχνευση του ιού HPV έχει ως αποτέλεσμα τον περιορισμό τόσο των ψευδώς αρνητικών, όσο και των ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων (Cox, 1998). Στις μοριακές τεχνικές που έχουν χρησιμοποιηθεί μέχρι σήμερα για την ανίχνευση του HPV DNA περιλαμβάνονται οι τεχνικές υβριδισμού και η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης PCR. Η αναζήτηση αντισωμάτων ανοσοϊστοχημικά τόσο τοπικά, όσο και στον ορό δίνει θετικά αποτελέσματα σε περιορισμένο αριθμό ασθενών λόγω της χαμηλής αντιγονικότητας της ιικής κάψας. Η ανεύρεση αντισωμάτων έναντι των πρωτεϊνών E6 και E7 στον ορό ασθενών με καρκίνο του τραχήλου της μήτρας μπορεί στο μέλλον να αποκτήσει κλινική εφαρμογή. Η χρήση του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου δεν είναι εφικτή σε καθημερινή χρήση, όπως είναι ανέφικτη η επίτευξη κυτταροκαλλιιεργειών για τον ιό HPV.

**Πίνακας 2.7.** Διάγνωση HPV λοίμωξης στην κλινική πράξη.

Είδος προσέγγισης	Μέθοδος
Έμμεσες διαγνωστικές προσεγγίσεις	<ul style="list-style-type: none"> <li>κυτταρολογική εξέταση επιχρισμάτων κατά Παπανικολάου</li> <li>κολποσκόπηση</li> <li>ιστολογική εξέταση</li> </ul>
Άμεσες διαγνωστικές προσεγγίσεις	<ul style="list-style-type: none"> <li>PCR               <ul style="list-style-type: none"> <li>Specific PCR</li> <li>Multiplex PCR</li> <li>PCR-RFLP</li> </ul> </li> <li>Υβριδισμός               <ul style="list-style-type: none"> <li>ανάλυση Southern Blot</li> <li>ανάλυση Dot Blot</li> <li>υβριδισμός FISH</li> <li>υβριδισμός ISH</li> <li>υβριδισμός σε διάλυμα</li> <li>τεχνική Hybric Capture II</li> </ul> </li> </ul>

### 2.5.2 Τεχνικές υβριδισμού και HPV

Η μέθοδος του υβριδισμού συνίσταται στην αρχική διάσπαση του δίκλωνου DNA και ακολούθως στη δέσμευση των κλώνων του DNA του ιού από σεσημασμένο DNA- ή RNA-ανιχνευτή. Ο ανιχνευτής σχηματίζει με τον κλώνο του DNA υβρίδιο σύμφωνα με την αρχή συμπληρωματικότητας των βάσεων. Μέχρι σήμερα έχουν χρησιμοποιηθεί αρκετές μέθοδοι με βάση την αρχή του υβριδισμού μεταξύ των οποίων η ανάλυση Southern Blot, η ανάλυση Dot Blot, ο υβριδισμός FISH (Filter In Situ Hybridation), ο υβριδισμός ISH (In Situ Hybridation) και ο υβριδισμός σε διάλυμα (Solution Hybridation).

Με την ανάλυση Southern Blot, η οποία επινοήθηκε το 1976, ανιχνεύεται το DNA του ιού HPV σε κυτταρολογικό και ιστολογικό υλικό, το οποίο αρχικά υφίσταται ομοιογενοποίηση και επεξεργασία με περιοριστικά ένζυμα ώστε να εξαχθεί το DNA, ακολούθως τα τμήματα του DNA μετά από ηλεκτροφόρηση μετουσιώνονται και στη συνέχεια προστίθενται DNA-ανιχνευτής. Πρόκειται για μια τεχνική αρκετά ευαίσθητη (0,1-1 αντίγραφο HPV/κύτταρο) και ειδική, που είναι όμως αρκετά επίπονη, χρονοβόρα, ενώ επιπλέον απαιτεί μεγάλες ποσότητες DNA (5-10ng). Η ανάλυση Dot Blot/ViraPap συνίσταται στη χρήση DNA ανιχνευτών (Dot Blot) ή RNA ανιχνευτών (ViraPap) χωρίς να προηγηθεί η απαλλαγή του υλικού από το κυτταρικό DNA και ο αποχωρισμός των τμημάτων DNA με ηλεκτροφόρηση, όπως συμβαίνει στην ανάλυση Southern Blot. Η ανάλυση Dot Blot/ViraPap είναι μια τεχνική γρήγορη και η εφαρμογή της δεν απαιτεί ιδιαίτερο οικονομικό κόστος, ωστόσο σε σχέση με την ανάλυση Southern Blot έχει μικρότερη ευαισθησία (1-10 αντίγραφα/κύτταρο), γεγονός που την καθιστά αναξιόπιστη στη κλινική πράξη. Με τον *in situ* υβριδισμό (ISH) διατηρείται η μορφολογία του δείγματος και μπορεί η εντόπιση του HPV να πραγματοποιηθεί τόσο σε κυτταρολογικό, όσο και σε ιστολογικό υλικό. Βασικό μειονέκτημα της μεθόδου αποτελεί η χαμηλή ευαισθησία της (20-50 αντίγραφα/κύτταρο). Η τεχνική του *in situ* υβριδισμού με φίλτρο (FISH) είναι πιο απλή από την ανάλυση Dot



Blot/ViraPap και τον *in situ* υβριδισμό (ISH). Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση του ιού HPV μόνο σε κυτταρικό υλικό, ενώ η ευαισθησία της μεθόδου είναι ιδιαίτερα χαμηλή (10-100 αντίγραφα/κύτταρο).

Ο υβριδισμός σε διάλυμα (Solution Hybridation) συνίσταται στην επιλογή δύο τμημάτων του ιικού γονιδιώματος, από τα οποία το ένα ακινητοποιείται πάνω σε ειδικό υλικό, ενώ το άλλο τμήμα υφίσταται σήμανση και χρησιμοποιείται ως ανιχνευτής. Εξελιγμένη μορφή της μεθόδου αυτής αποτελεί η τεχνική Hybrid Capture II (HC-II). Το υλικό συλλέγεται από τον τράχηλο της ασθενούς και τοποθετείται σε σωλήνα με ειδικό υγρό. Ακολουθεί ο υβριδισμός του DNA του ιού HPV με ειδικούς RNA-ανιχνευτές και η ακινητοποίηση του συμπλέγματος από ειδικά αντισώματα που υπάρχουν στην εσωτερική επιφάνεια του σωλήνα. Ακολουθεί έκπλυση και αντίδραση των ακινητοποιημένων υβριδίων με ειδικά αντι DNA/RNA μονοκλωνικά αντισώματα συνδεδεμένων με αλκαλική φωσφατάση. Η αντίδραση που πραγματοποιείται στη συνέχεια μετά από επώαση σε ειδικό υλικό έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή φωτός, η ένταση του οποίου είναι ανάλογη της ποσότητας του ιικού DNA.

Η τεχνική HC-II συγκρίνεται σε ακρίβεια και ευαισθησία με την ανάλυση Southern Blot. Η αναλυτική ευαισθησία της μεθόδου μπορεί να φθάσει σε 0,2pg HPV DNA/ml, ποσότητα που ισοδυναμεί με 1000 αντίγραφα/δείγμα.

### **2.5.3. Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης και HPV**

Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR), συνίσταται, όπως περιγράφεται αναλυτικά στο Κεφάλαιο 8, στον πολλαπλασιασμό του αρχικού HPV DNA σε διαδοχικούς κύκλους με τη χρήση του ενζύμου της πολυμεράσης. Υπάρχουν δύο συστήματα εκκινητών που χρησιμοποιούνται στην αντίδραση PCR, οι εκκινητές που μπορούν να προσδιορίσουν μια ομάδα διαφορετικών τύπων (general primers ή consensus primers) και οι

εκκινητές που είναι ειδικοί για ένα συγκεκριμένο τύπο ιού (type specific primers). Συγκριτικά με τις υπόλοιπες μεθόδους, η τεχνική της PCR διαθέτει τη μεγαλύτερη ευαισθησία (1 αντίγραφο/δείγμα) και ταχύτητα, ενώ ταυτόχρονα παρέχει τη δυνατότητα και τυποποίησης του ιού HPV. Η μεγάλη ευαισθησία της μεθόδου αποτελεί το μεγάλο πλεονέκτημα της παρέχοντας τη δυνατότητα να εντοπιστεί με μεγάλη ακρίβεια ελάχιστη ποσότητα DNA HPV. Ωστόσο το γεγονός αυτό επιβάλλει ιδιαίτερη προσοχή κατά την εφαρμογή της λόγω της αυξημένης πιθανότητας επιλοιμώξεων. Τα τελευταία χρόνια γίνονται προσπάθειες για την εξέλιξη της αντίδρασης της PCR με στόχο την ημιποσοτική ή ποσοτική εκτίμηση του ιικού φορτίου του δείγματος.

## **2.6. Θεραπευτικές προσεγγίσεις-Πρόληψη**

Στον **Πίνακα 2.8** παρουσιάζονται οι διαφορετικοί τρόποι θεραπευτικής προσέγγισης της HPV λοίμωξης. Η λογική της παραδοσιακής θεραπευτικής αντιμετώπισης των HPV λοιμώξεων βασίζεται στην καταστροφή των αλλοιώσεων που προκαλεί ο ιός (Baker και Tying, 1997). Για τις προκαρκινικές αλλοιώσεις (HSIL) στον τράχηλο της μήτρας συνίσταται η αφαίρεσή τους με κωνοειδή εκτομή, ή η καταστροφή τους με κρυοπηξία ή εξάχνωση με laser. Στην περίπτωση των οξυτενών κονδυλωμάτων μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφορες φαρμακευτικές ουσίες, όπως η ποδοφυλλίνη, η ποδοφυλοτοξίνη, το τριχλωρο-οξικό οξύ και η κρέμα imiquimod. Η χρήση της 5-φθοριο-ουρακίλης και τοπικών ενέσεων ιντερφερόνης σήμερα έχει εγκαταλειφθεί. Η μη απόκριση στην αγωγή ή εμφάνιση υποτροπών απαιτεί την καταστροφή των κονδυλωμάτων με κρυοπηξία, διαθερμία, ή laser ή τη χειρουργική εκτομή τους. Η συστηματική χορήγηση ιντερφερόνης συνίσταται σε υποτροπιάζοντα οξυτενή κονδυλώματα με συνεχείς υποτροπές ως συμπληρωματική αγωγή της καταστροφής τους με laser. Η αντιμετώπιση των θηλωμάτων του δέρματος μπορεί να γίνει είτε με τη χρήση ποδοφυλλίνης, είτε με κρυοπηξία με υγρό άζωτο. Υποτροπιάζοντα θηλώματα του λάρυγγα

αφαιρούνται χειρουργικά, ενώ πρέπει να αποφεύγεται η ακτινοβολία εξαιτίας του κινδύνου πρόκλησης κακοήθους εξαλλαγής.

**Πίνακας 2.8.** Θεραπευτικές προσεγγίσεις HPV λοίμωξης.

Είδος προσέγγισης	Θεραπεία
Φαρμακευτική	ποδοφυλλίνη ποδοφυλοτοξίνη τριχλωρο-οξικό οξύ imiquimod ιντερφερόνη Εμβόλιο/ανοσοθεραπεία
Χειρουργική	Κρυοπηξία με υγρό άζωο διαθερμία laser Χειρουργική εξαίρεση

Τα τελευταία χρόνια το ερευνητικό ενδιαφέρον έχει εστιαστεί στην παραγωγή εμβολίων, τα οποία περιέχουν φυσικές ή ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες της κάψας του ιού HPV (Mandic και Vujkon, 2004). Τα εμβόλια αυτά έχουν προφυλακτικό ρόλο βελτιώνοντας το χυμικό σκέλος της ανοσίας του κυττάρου ξενιστή και η εφαρμογή τους στην κλινική πράξη αναμένεται στο μέλλον να περιορίσει τις λοιμώξεις από τους ιούς HPV με αποτέλεσμα τη μείωση της επίπτωσης του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας στις γυναίκες. Τα πρώτα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση κεκαθαρμένων ζωικών HPV δομικών πρωτεϊνών (VLPs) με αποτέλεσμα την προστασία έναντι της HPV λοίμωξης στα πειραματόζωα, στα οποία χορηγήθηκαν (Breitburd και συν, 1995, Suzich και συν, 1995). Η ανάπτυξη εμβολίων χρησιμοποιώντας ανθρώπινα VLPs από τις δομικές πρωτεΐνες L1 και L2 είχε πολύ καλά ανοσοποιητικά αποτελέσματα και ήταν καλά ανεκτή, χωρίς παρενέργειες στον ξενιστή (Harro και συν, 2001). Αυτή τη στιγμή έχουν γίνει ή βρίσκονται σε εξέλιξη

κλινικές δοκιμές για τους ιούς HPV 11, 6, 16 και 18 με τη χορήγηση VLP για έναν ιό ή για συνδυασμό ιών. Το 2002, τα αποτελέσματα κλινικής δοκιμής φάσης III για τη χρήση VLP για τον ιό HPV 16, έδειξαν πως το εμβόλιο μειώνει σημαντικά την επίπτωση εμφάνισης CIN στις HPV-αρνητικές κατά τη στιγμή χορήγησής του γυναίκες με παρακολούθηση 17 μηνών (Koutsky και συν, 2002). Παρόμοια αποτελέσματα κλινικής δοκιμής φάσης III παρουσιάστηκαν το 2005 για το συνδυασμένο εμβόλιο VLPs για τους ιούς HPV 16, 18, 6 και 11 σε 13.000 γυναίκες ηλικίας 16 έως 26 έτη μετά από τη χορήγηση τριών δόσεων του εμβολίου και με 17 μήνες παρακολούθηση. Την επόμενη διετία αναμένεται να εγκριθούν από τον Αμερικανικό Οργανισμό Φαρμάκων (FDA) το εμβόλιο VLPs για τους ιούς HPV 16 και 18 (Cervarix, GlaxoSmithKline plc) καθώς και το εμβόλιο VLPs για τους ιούς HPV 16, 18, 6 και 11 (Gardasil, Merck&Co Inc). Στο μέλλον αναμένεται να διευκρινισθεί η αποτελεσματικότητα των εμβολίων αυτών για την πρόληψη του καρκίνου της μήτρας, η διάρκεια της προστασίας που προσφέρουν καθώς και η αναγκαιότητα εισαγωγής εμβολίου κατά του ιού HPV στα εθνικά προγράμματα εμβολιασμού.

Παράλληλα γίνεται προσπάθεια για την παραγωγή θεραπευτικών εμβολίων σε ασθενείς με καρκίνο του τραχήλου της μήτρας (Adams και συν, 2001). Στην τελευταία περίπτωση χρησιμοποιούνται πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από την πρόιμη περιοχή E του ιικού γονιδιώματος (πχ E6 και E7), με ιδιαίτερα ελπιδοφόρα θεραπευτικά αποτελέσματα. Ωστόσο τα εμβόλια αυτά δεν έχουν περάσει ακόμα στη φάση των κλινικών δοκιμών. Η ανάπτυξη νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων με τη χρήση διάφορων ανοσορρυθμιστικών π.χ. TGF-β και IL-1 ή χημειοθεραπευτικών π.χ. ουσιών ή την ανεύρεση πιθανών μορίων στόχων για την εφαρμογή της γονιδιακής θεραπείας αποτελεί μελλοντική πρόκληση για την θεραπευτική αντιμετώπιση των HPV λοιμώξεων και των αλλοιώσεων που προκαλούν.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3



### Ο ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΤΡΑΧΗΛΟΥ ΤΗΣ ΜΗΤΡΑΣ

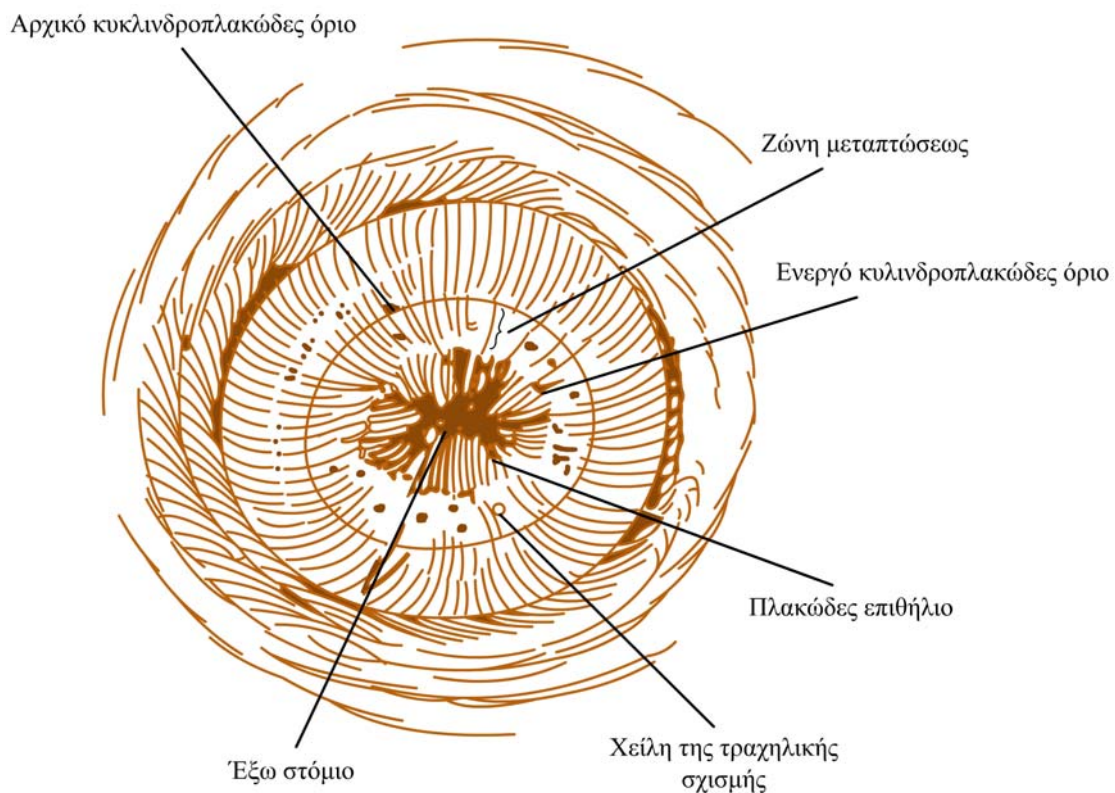
- 3.1. Στοιχεία ανατομίας και ιστολογίας
- 3.2. Ιστοπαθολογοανατομικά στοιχεία
- 3.3. Επιδημιολογικά στοιχεία
  - 3.3.1. Γεωγραφικά χαρακτηριστικά
  - 3.3.2. Ηλικια εμφάνιση
- 3.4. Προκαρκινικές αλλοιώσεις: Ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία του τραχήλου
  - 3.4.1. Γενικά
  - 3.4.2. Ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία του τραχήλου Τύπου 1 (CIN 1)
  - 3.4.3. Ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία του τραχήλου Τύπου 2 (CIN 2)
  - 3.4.4. Ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία του τραχήλου Τύπου 3 (CIN 3)
  - 3.4.5. Εξέταση κολποτραχηλικών επιχρισμάτων κατά Παπανικολάου
  - 3.4.6. Θεραπευτική αντιμετώπιση
- 3.5. Αιτιοπαθογένεια-Προδιαθεσικοί παράγοντες
  - 3.5.1. Ο ιός ιού του θηλώματος του ανθρώπου (HPV)
  - 3.5.2. Άλλοι παράγοντες
- 3.6. Κλινική εικόνα, Σταδιοποίηση και Πρόγνωση
  - 3.6.1. Κλινική εικόνα
  - 3.6.2 Σταδιοποίηση
  - 3.6.3. Πρόγνωση
- 3.7. Θεραπεία
  - 3.7.1. Χειρουργική αντιμετώπιση
  - 3.7.2 Ακτινοθεραπεία
  - 3.7.3 Χημειοθεραπεία
  - 3.7.4. Χημειοακτινοθεραπεία

#### 3.1. Στοιχεία ανατομίας και ιστολογίας

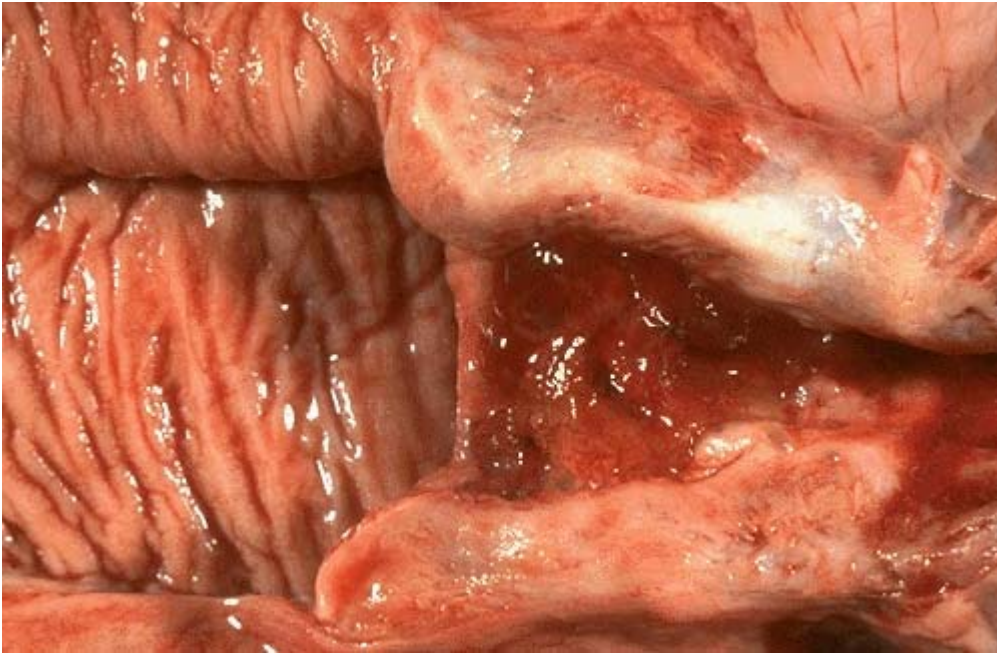
Η μήτρα είναι ένα κοίλο μυώδες όργανο, το οποίο βρίσκεται στο πρόσθιο μέρος της πυελικής κοιλότητας. Διαιρείται σε τρία τμήματα: τον πυθμένα, το σώμα και τον τράχηλο. Στον πυθμένα της μήτρας εισέρχονται ο δεξιός και ο αριστερός ωαγωγός. Ο τράχηλος της μήτρας αποτελεί το χαμηλότερο τμήμα της μήτρας και καταλήγει στον κόλπο. Είναι κυλινδρικός, συμμετρικός, με μήκος 3cm περίπου και διάμετρο 2-2,5cm. Η κοιλότητα του

τραχήλου της μήτρας έχει σχήμα ατρακτοειδές και επικοινωνεί με την κοιλότητα του σώματος με το έσω στόμιο της μήτρας και με την κοιλότητα του κόλπου με το έξω στόμιο της μήτρας (**Σχήμα 3.1**).

**Σχήμα 3.1** Το έξω στόμιο της μήτρας. Με το έξω στόμιο της μήτρας, ο τράχηλος επικοινωνεί με τον κόλπο.

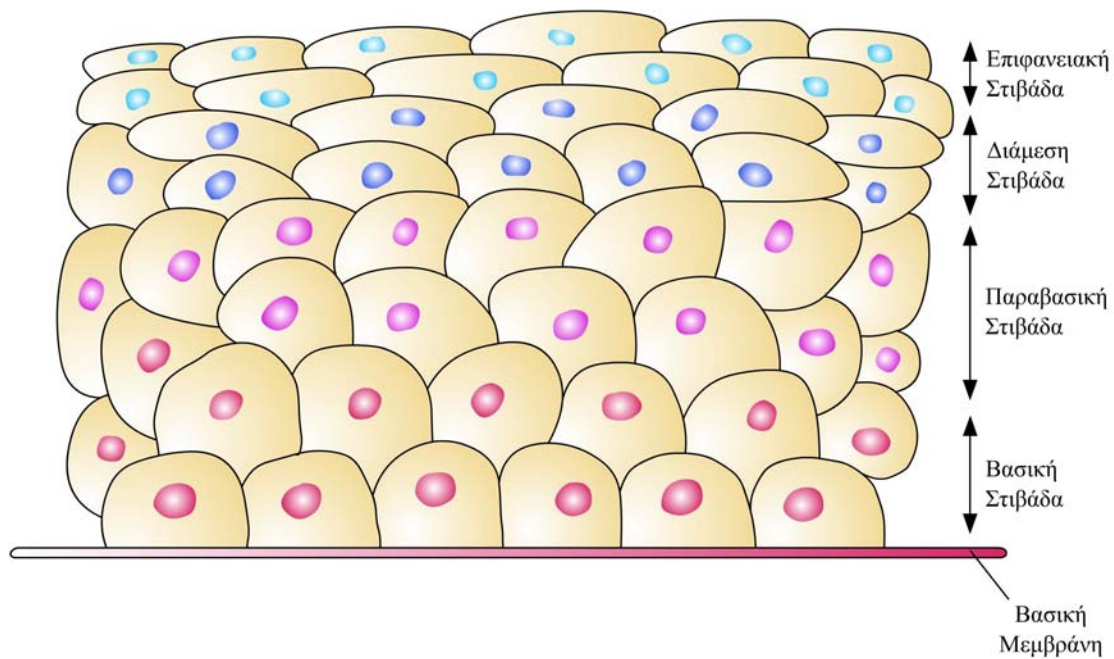


Ο τράχηλος της μήτρας διακρίνεται στον εξωτράχηλο και στον ενδοτράχηλο (**Εικόνα 3.1**). Ο εξωτράχηλος καλύπτεται από πολύστιβο πλακώδες επιθήλιο, το οποίο αποτελείται από αρκετές στιβάδες επιθηλιακών κυττάρων, όπως φαίνεται στο **Σχήμα 3.2**. Τα κύτταρα που βρίσκονται στη επιφάνεια του επιθηλίου έχουν επίπεδη, πλακώδη εμφάνιση, ενώ τα κύτταρα στη βασική στιβάδα και στις μεσαίες στιβάδες έχουν σχήμα πυραμιδικό ή πολυγωνικό.



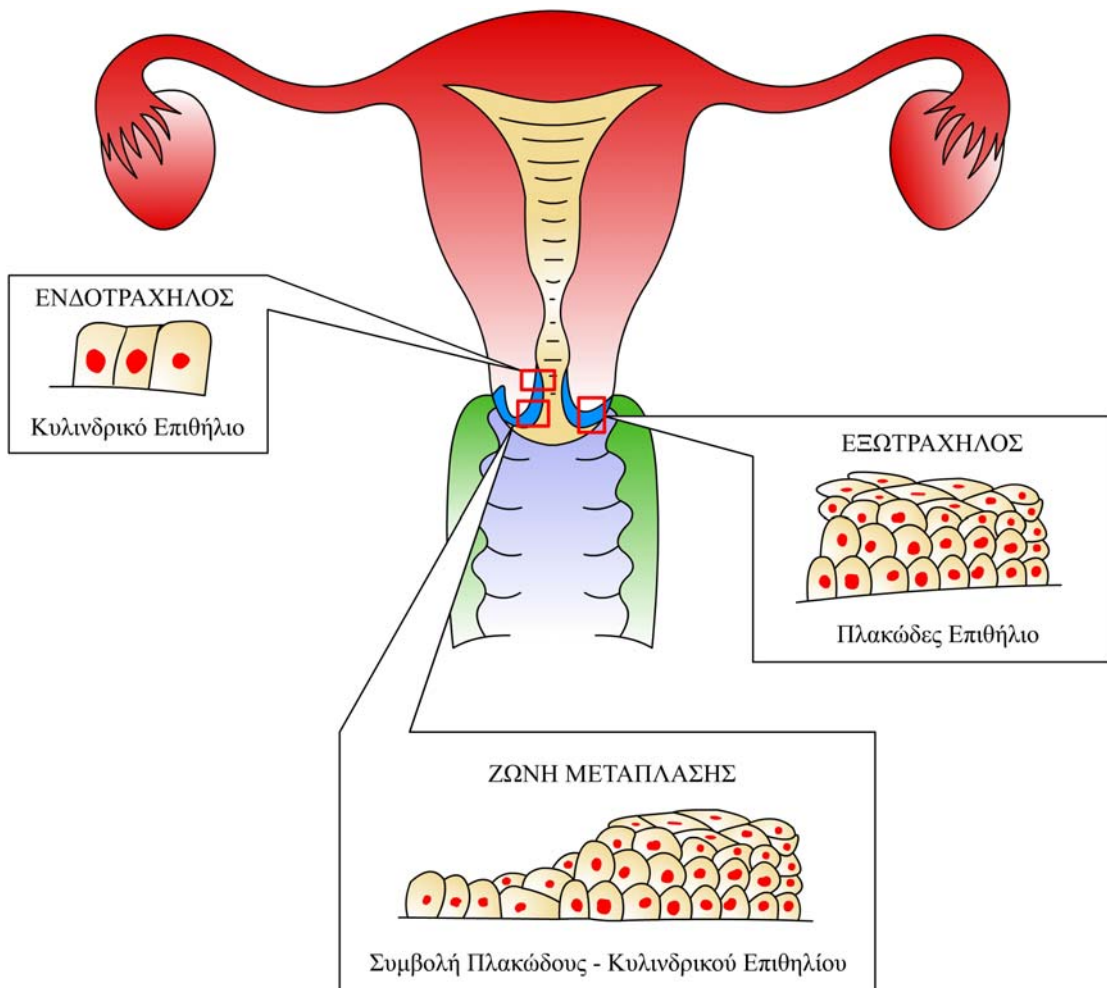
**Εικόνα 3.1.** Ανατομικό παρασκεύασμα τραχήλου της μήτρας. Διακρίνεται το έξω στόμιο της μήτρας (εξωτράχηλος), το οποίο επικοινωνεί με την κοιλότητα του κόλπου και το έσω στόμιο της μήτρας (ενδοτράχηλος), το οποίο επικοινωνεί με την κοιλότητα του σώματος της μήτρας.

**Σχήμα 3.2.** Στιβάδες πολύστιβου πλακώδους επιθηλίου τραχήλου της μήτρας (εξωτράχηλος).



Ο ενδοτράχηλος καλύπτεται από μονόστιβο κυλινδρικό επιθήλιο όπου τα κύτταρα έχουν ύψος 2—3 φορές μεγαλύτερο από το πλάτος τους. Οι πυρήνες των κυλινδρικών κυττάρων εντοπίζονται στο βασικό τους τμήμα και είναι διευθετημένοι σε μια κανονική στιβάδα. Στα σημεία όπου το κυλινδρικό μονόστιβο επιθήλιο του ενδοτραχήλου συνέχεται με το πολύστιβο πλακώδες επιθήλιο του εξωτραχήλου συχνά παρατηρείται μεταπλασία, αντικατάσταση δηλαδή του κυλινδρικού επιθηλίου από πολύστιβο πλακώδες. Η ζώνη μετάπλασης, μετάπτωσης ή μετατροπής (**Σχήμα 3.3**) που σχηματίζεται αποτελεί την πιο συχνή θέση ανάπτυξης του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας καθώς και των αλλοιώσεων της ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας του τραχήλου της μήτρας.

**Σχήμα 3.3.** Ο τράχηλος της μήτρας και η ζώνη μετάπλασης, ή μετάπτωσης ή μετατροπής.





Το επιθήλιο του τραχήλου της μήτρας προσκολλάται στον υποκείμενο στηρικτικό ιστό του τραχήλου μέσω μιας εξειδικευμένης στιβάδας εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, της βασικής μεμβράνης. Η βασική μεμβράνη περιέχει πέντε κύρια συστατικά: κολλαγόνο τύπου IV, λαμινίνη, θειική ηπαράνη, εντακτίνη και ινονεκτίνη. Έχει πάχος μόλις 0,05μm και γι' αυτό σε χρώσεις A & H ανιχνεύεται ασθενώς. Λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς της σε γλυκοπρωτεΐνες χρωματίζεται με την ιστοχημική μέθοδο PAS. Στο φωτομικροσκόπιο η βασική μεμβράνη έχει την εμφάνιση γραμμικής δομής, ενώ με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο στη βασική μεμβράνη διακρίνονται διάφορες στιβάδες (πυκνός υμένας, διαυγής υμένας και ινοδικτυωτός υμένας). Η προσκόληση των επιθηλιακών κυττάρων στη βασική μεμβράνη πραγματοποιείται μέσω εξειδικευμένων συνάψεων, όπως είναι τα ημιδεσμοσώματα, τα οποία συνδέουν τον κυτταροσκελετό των ενδιάμεσων νηματίων των κυττάρων με τη βασική μεμβράνη και οι περιοχές εστιακής επαφής, που συνδέουν τον κυτταροσκελετό της ακτίνης με τη βασική μεμβράνη. Η βασική μεμβράνη με τη σειρά της συνδέεται στενά με την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία του υποκείμενου στηρικτικού ιστού κυρίως μέσω ινιδίων αγκυροβολίας κολλαγόνου τύπου IV. Η μελέτη της βασικής μεμβράνης στη νεοπλασία του τραχήλου της μήτρας είναι πρωταρχικής σημασίας για τη διάκριση μεταξύ ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας και διηθητικού καρκίνου. Στην ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία του τραχήλου η βασική μεμβράνη παραμένει ανέπαφη, ενώ όταν διασπαστεί και διηθηθεί με καρκινικά κύτταρα αναπτύσσεται διηθητικό καρκίνωμα.

### **3.2. Ιστοπαθολογοανατομικά στοιχεία**

Στο μεγαλύτερο ποσοστό (80%) ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας είναι ακανθοκυτταρικός και προέρχεται από το πολύστιβο πλακώδες επιθήλιο της έξω επιφάνειας της ενδοκολπικής μοίρας του τραχήλου (Vizcaino και συν, 2000). Τα αδενοκαρκινώματα αντιπροσωπεύουν ποσοστό 5-8% και προέρχονται από το μονόστιβο κυλινδρικό επιθήλιο

του τραχηλικού σωλήνα και τους αδένες του, ενώ το υπόλοιπο ποσοστό καλύπτεται από μικτές μορφές ή αδιαφοροποίητες. Στον **Πίνακα 3.1** παρουσιάζεται η ιστολογική ταξινόμηση του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας.

**Πίνακας 3.1.** Ιστολογική ταξινόμηση του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας.

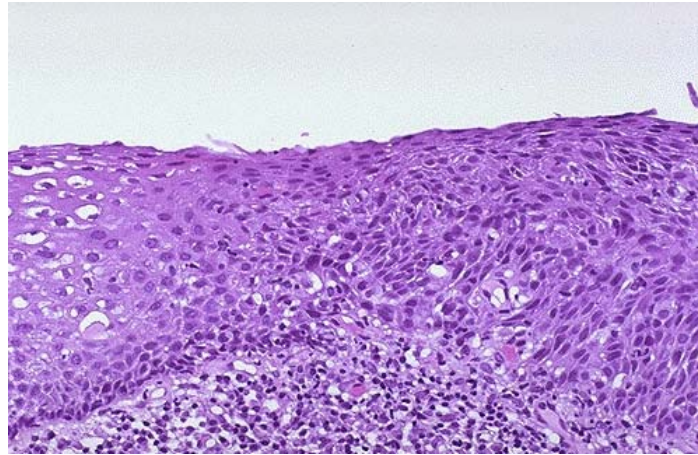
Ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα
ακανθολυτικό
ατρακτοκυτταρικό
βασικοκυτταρικό
με διαφοροποίηση προς δερματικά εξαρτήματα
θηλώδες
τύπου λεμφοεπιθηλιώματος
ακροχορδονώδες
Αδενοκαρκίνωμα
ενδοτραχηλικού τύπου
Ορώδες θηλώδες
ενδομητριοειδές
διαγοκυτταρικό
μεσонеφρικό
Εντερικού τύπου
Αδενομαλπιγιακό καρκίνωμα
Αδενοκυστικό καρκίνωμα
Μικροκυτταρικό καρκίνωμα
νευροενδοκρινικό
βασικοκυτταρικό
εφεδρικών κυττάρων
PNET

Με βάση το βαθμό διαφοροποίησης των κυττάρων, το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα, το αδενοκαρκίνωμα και το αδενομαλπιγιακό καρκίνωμα διακρίνονται σε χαμηλής, μετρίου και υψηλής διαφοροποίησης.

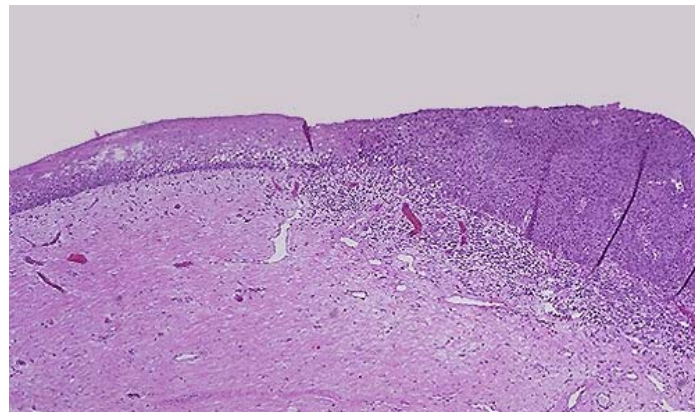
Το διηθητικό καρκίνωμα (**Εικόνα 3.2**) επεκτείνεται με άμεση διήθηση των ιστών, καθώς και με λεμφογενείς και με αιματογενείς μεταστάσεις. Με τη λεμφική οδό τα νεοπλασματικά κύτταρα μεταφέρονται στους επιχώριους λεμφαδένες (παραμήτριους, υπογάστριους, έξω λαγόνιους και ιερούς). Το ήπαρ αποτελεί την πιο συνηθισμένη εντόπιση

αιματογενούς διασποράς της νόσου. Μέσω της αιματογενούς διασποράς μπορούν να προσβληθούν το ήπαρ, οι πνεύμονες, ο εγκέφαλος, τα οστά, τα επινεφρίδια, ο σπλήνας και το πάγκρεας.

A.



B.



**Εικόνα 3.2.** Ιστολογικές τομές διηθητικού καρκίνου του τραχήλου της μήτρας σταδίου IA. Τα καρκινικά κύτταρα έχουν χάσει την ικανότητα της πολύστιβης διάταξής τους, έχουν μεγάλο πυρήνα σε σχέση με το κυτταρόπλασμα, εμφανίζουν μεγάλη ποικιλία σχήματος και μεγάλους, καθώς και σημαντικά αυξημένη μιτωτική δραστηριότητα (A). Στο διηθητικό καρκίνο του τραχήλου της μήτρας σε αντίθεση με την ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία και τον καρκίνο *in situ* παρατηρείται ρήξη της βασικής μεμβράνης, με αποτέλεσμα τα καρκινικά κύτταρα να εισβάλλουν στο τραχηλικό στρώμα (B).

### 3.3. Επιδημιολογικά στοιχεία

#### 3.3.1. Γεωγραφικά χαρακτηριστικά

Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας αποτελεί τη δεύτερη σε συχνότητα κακοήθη νεοπλασία, μετά τον καρκίνο του μαστού, στις γυναίκες σε παγκόσμιο επίπεδο (Waggoner, 2003). Στον **Πίνακα 3.2** παρουσιάζονται οι περιοχές, στις οποίες με βάση τη διεθνή βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί οι υψηλότεροι και οι χαμηλότεροι δείκτες επίπτωσης (ανά 100.000 γυναίκες και έτος) καρκίνου τραχήλου της μήτρας.

**Πίνακας 3.2.** Υψηλότεροι και χαμηλότεροι δείκτες επίπτωσης (ανά 100.000 γυναίκες και έτος) καρκίνου τραχήλου της μήτρας στην παγκόσμια βιβλιογραφία.

Περιοχή	Χρονική περίοδος	Επίπτωση (ανά 100.000) γυναίκες και έτος)
<b>Υψηλότεροι δείκτες επίπτωσης</b>		
Ζιμπάμπουε, Χαράρ	1990-92	67,21
Βραζιλία, Μπελέμ	1989-91	64,78
Περού, Τρουτζίλο	1988-90	53,48
Ουγκάντα, Κιαντόντο	1991-93	40,76
Ινδία, Μαντράς	1988-92	38,91
Βραζιλία, Γκοϊάνια	1990-93	37,13
Κολομβία, Καλί	1987-91	34,41
Νέα Ζηλανδία (γυναίκες Μαόρι)	1988-92	32,21
Αργεντινή, Κονκορντία	1990-94	32,05
Εκουαδόρ, Κουίτο	1988-92	31,66
<b>Χαμηλότεροι δείκτες επίπτωσης</b>		
Ισπανία, Ναβάρρα	1987-91	4,68
Η.Π.Α., Χαβάη (κινέζες)	1988-92	4,55
Κίνα, Τιαντζίν	1988-92	4,39
Ισραήλ (εβραίες Η.Π.Α. ή Ευρώπης)	1988-92	4,07
Η.Π.Α., Λος Άντζελες (ιαπωνέζες)	1988-92	4,05
Φιλανδία	1987-92	3,62
Κίνα, Σανγκάη	1988-92	3,26
Ισραήλ (μη εβραίες)	1988-92	2,99
Ιταλία, Μασεράτα	1991-92	2,77
Κίνα, Κιντόνγκ	1988-92	2,64

*Τροποποιημένο από Parkin και συν, 1997.*

Υπολογίζεται πως το 80% περίπου των νέων περιπτώσεων καρκίνου του τραχήλου της μήτρας προέρχεται από λιγότερο αναπτυγμένες χώρες. (Parkin και συν, 1997). Στις αναπτυγμένες χώρες, η συστηματική εφαρμογή του προληπτικού ελέγχου των τραχηλοκολπικών επιχρισμάτων με τη μέθοδο Παπανικολάου είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της συχνότητας του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Στις Η.Π.Α. η επίπτωση του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας μειώθηκε από 14,2 ανά 100.000 γυναίκες το 1973 σε 7,8 ανά 100.000 γυναίκες το 1994. Ωστόσο, παρά τη μείωση αυτή, ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας εξακολουθεί να αποτελεί βασική αιτία θανάτου στις γυναίκες (Landis και συν, 1999). Στις Η.Π.Α. το 2002 διαγνώστηκαν 13.000 νέες περιπτώσεις καρκίνου του τραχήλου της μήτρας και 4.100 γυναίκες πέθαναν λόγω της ασθένειας αυτής (Jemal και συν, 2002).

**Πίνακας 3.3.** Δείκτες επίπτωσης γυναικολογικών καρκίνων (τραχήλου της μήτρας, σώματος της μήτρας, ωοθηκών και μαστού) ανά 100.000 γυναίκες σε χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης το έτος 1990.

Χώρα	Επίπτωση (ανά 100.000 γυναίκες) το έτος 1990			
	Καρκίνος τραχήλου μήτρας	Καρκίνος σώματος μήτρας	Καρκίνος ωοθηκών	Καρκίνος Μαστού
Αυστρία	16,19	19,77	18,57	81,85
Βέλγιο	10,09	15,82	12,91	108,29
Δανία	19,44	20,77	18,76	99,92
Φιλανδία	4,77	18,21	14,68	88,52
Γαλλία	12,28	13,90	11,11	80,10
Γερμανία	15,25	15,97	14,36	89,85
Ελλάδα	11,09	9,22	7,84	54,45
Ιρλανδία	11,25	16,94	17,55	91,22
Ιταλία	11,09	14,98	11,82	73,02
Λουξεμβούργο	9,72	28,44	15,47	98,86
Ολλανδία	9,07	15,48	15,39	110,50
Πορτογαλία	17,80	18,54	8,11	66,73
Ισπανία	10,75	15,72	9,11	61,95
Σουηδία	10,92	19,77	17,87	99,94
Ην. Βασίλειο	15,28	12,53	16,84	92,97

*Τροποποιημένο από Black και συν, 1997.*

Στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης η επίπτωση του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας το έτος 1990 ήταν 4,77-17,80 και η αντίστοιχη θνησιμότητα ήταν 2,17-6,46 ανά 100.000 γυναίκες (Black και συν, 1997). Όπως φαίνεται στον **Πίνακα 3.3**, το Ηνωμένο Βασίλειο, η Γερμανία, η Αυστρία και η Δανία χαρακτηρίζονται από υψηλούς δείκτες επίπτωσης ενώ στη Φιλανδία η επίπτωση είναι ιδιαίτερα χαμηλή. Στις νότιες ευρωπαϊκές χώρες (Ελλάδα, Ιταλία, Ισπανία και Γαλλία) τα αντίστοιχα ποσοστά είναι χαμηλά, εκτός από την Πορτογαλία, που έχει ιδιαίτερα υψηλό δείκτη επίπτωσης και θνησιμότητας στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Στην Ελλάδα, ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας καταλαμβάνει ανάμεσα στους γυναικολογικούς καρκίνους τη δεύτερη θέση σε συχνότητα, μετά τον καρκίνο του μαστού και την τρίτη θέση σε θνησιμότητα, μετά τον καρκίνο του μαστού και των ωοθηκών (**Πίνακες 3.3 και 3.4**).

**Πίνακας 3.4.** Δείκτες θνησιμότητας γυναικολογικών καρκίνων (τραχήλου της μήτρας, σώματος της μήτρας, ωοθηκών και μαστού) ανά 100.000 γυναίκες σε χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης το έτος 1990.

Χώρα	Θνησιμότητα (ανά 100.000 γυναίκες) το έτος 1990			
	Καρκίνος τραχήλου μήτρας	Καρκίνος σώματος μήτρας	Καρκίνος ωοθηκών	Καρκίνος Μαστού
Αυστρία	7,64	3,57	11,74	32,03
Βέλγιο	5,18	3,61	9,88	37,94
Δανία	7,83	4,06	14,03	39,63
Φιλανδία	2,17	3,67	9,76	24,34
Γαλλία	5,17	2,91	8,35	28,31
Γερμανία	6,26	3,31	10,89	31,18
Ελλάδα	3,75	1,68	4,27	20,92
Ιρλανδία	4,76	3,32	12,08	36,36
Ιταλία	4,75	3,39	6,91	29,31
Λουξεμβούργο	5,23	9,85	12,82	39,56
Ολλανδία	3,76	3,48	11,27	38,37
Πορτογαλία	6,46	3,57	4,87	25,51
Ισπανία	4,32	3,23	5,14	24,20
Σουηδία	4,08	3,27	10,63	25,37
Ην. Βασίλειο	6,44	2,95	12,40	40,37

*Τροποποιημένο από Black και συν, 1997.*

Το 1995, το Κέντρο Καταγραφής Καρκίνου Κρήτης κατέγραψε στην Κρήτη 812 νέες περιπτώσεις γυναικών με κακοήγη νεοπλάσματα, από τις οποίες 23 (2,8%) με καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Την ίδια χρονιά, ο συνολικός αριθμός των γυναικών που πέθαναν από κακοήγη νεοπλάσματα στην Κρήτη ήταν 333, από τις οποίες 7 (2,1%) ήταν από καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Σε σχέση με την υπόλοιπη Ελλάδα, για τον πληθυσμό της Κρήτης η επίπτωση του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας είναι χαμηλή (8,2 ανά 100.000 γυναίκες), ενώ δεν παρατηρούνται αξιόλογες διαφορές στους δείκτες θνησιμότητας (Vlachonikolis και συν, 1997, Vlachonikolis και συν, 1998).

### **3.3.2. Ηλικια εμφάνισης**

Η μέση ηλικία των γυναικών που προσβάλλονται από διηθητικό καρκίνο είναι τα 47 έτη, ενώ η μέση ηλικία προσβολής από προδιηθητικό καρκίνο είναι σημαντικά μικρότερη (Waggoner, 2003). Έχει υπολογιστεί ότι περίπου 2% των γυναικών ηλικίας άνω των 40 ετών έχουν πιθανότητα να αναπτύξουν καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Στις Η.Π.Α. η εφαρμογή των προγραμμάτων προσυμπτωματικού ελέγχου έχει ως αποτέλεσμα το ½ των γυναικών, στις οποίες γίνεται διάγνωση καρκίνου του ταχήλου της μήτρας να είναι μικρότερες από 35 χρονών, όμως αφορά πρώιμα στάδια καρκίνου. Αντίθετα σε γυναίκες μεγαλύτερες των 55 χρονών, η διάγνωση πραγματοποιείται όταν ο καρκίνος βρίσκεται σε προχωρημένο στάδιο, γεγονός που έχει άμεση επίδραση στην θνησιμότητα των γυναικών αυτών (Sung και συν, 2000).

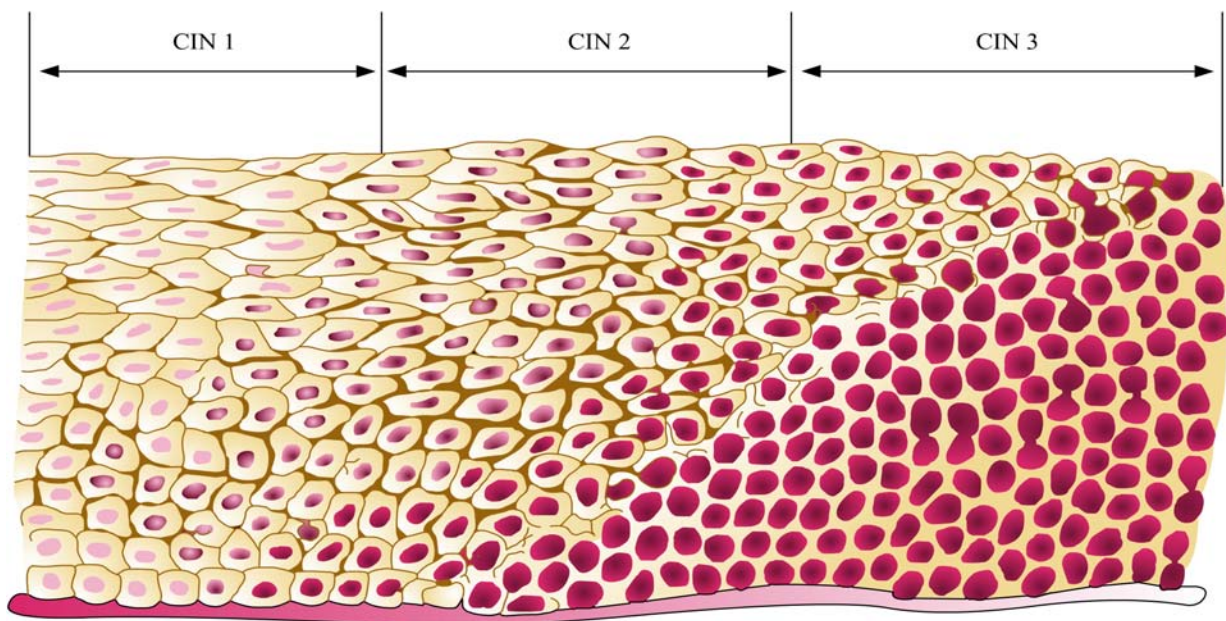
## **3.4. Προκαρκινικές αλλοιώσεις: Ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία του τραχήλου**

### **3.4.1. Γενικά**

Ο διηθητικός καρκίνος αποτελεί το αποτέλεσμα της εξέλιξης προκαρκινικών αλλοιώσεων του τραχήλου της μήτρας, στις οποίες περιλαμβάνονται η δυσπλασία και το

καρκίνωμα *in situ*. Η δυσπλασία χαρακτηρίζεται από διαταραχές στη ωρίμανση των κυττάρων του πλακώδους επιθηλίου και διακρίνεται σε ελαφρού, μέσου και σοβαρού βαθμού. Στο καρκίνωμα *in situ* οι δυσπλαστικές αλλοιώσεις εντοπίζονται σε όλο το πάχος του επιθηλίου χωρίς όμως να παρατηρείται διήθηση της βασικής μεμβράνης. Η δυσπλασία και το καρκίνωμα *in situ* αποτελούν την ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία του τραχήλου της μήτρας (CIN), η οποία διακρίνεται, όπως φαίνεται στο **Σχήμα 3.4** σε τρεις τύπους: α) τον Τύπο 1 (CIN 1), β) τον Τύπο 2 (CIN 2) και γ) τον Τύπο 3 (CIN 3).

**Σχήμα 3.4.** Βαθμοί ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας τραχηλικού επιθηλίου CIN. Στο σχήμα διακρίνεται η βασική μεμβράνη, η οποία και στους τρεις βαθμούς CIN παραμένει ακεραία.



### 3.4.2. Ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία του τραχήλου Τύπου 1 (CIN 1)

Χαρακτηρίζεται από ελαφράς μορφής δυσπλαστικές αλλοιώσεις του πλακώδους επιθηλίου του τραχήλου της μήτρας. Τά άνω 2/3 του πλακώδους επιθηλίου παρουσιάζουν καλή διαφοροποίηση των κυττάρων, ενώ στο κατώτερο 1/3 του επιθηλίου υπάρχουν παθολογικοί πυρήνες και μιτωτικές εικόνες, οι οποίες όμως είναι λίγες. Η διάγνωση της



ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία του τραχήλου της μήτρας Τύπου 1 (CIN 1) απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή και εμπειρία κατά την ερμηνεία της ιστολογικής εικόνας δεδομένου ότι συχνά συγγέεται με τις αλλοιώσεις CIN 2 και CIN 3 καθώς και με την εικόνα του φυσιολογικού τραχήλου (Stoler και συν, 2001).

Στην ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία του τραχήλου Τύπου 1 (CIN 1) το ποσοστό αυτόματης υποχώρησης των αλλοιώσεων είναι υψηλό, ενώ το ποσοστό εξέλιξης της σε καρκίνο του τραχήλου της μήτρας είναι ιδιαίτερα χαμηλό (Melnikow και συν, 1998). Έχει υπολογιστεί πως στο 57% των ασθενών με CIN 1 παρατηρείται αυτόματη υποχώρηση, ενώ στο 11% των ασθενών η αλλοίωση εξελίσσεται σε CIN 2, CIN 3 ή καρκίνο. Το ποσοστό εμφάνισης διηθητικού καρκίνου σε ασθενείς με CIN 1 είναι μόλις 0,3% (Ostor, 1993).

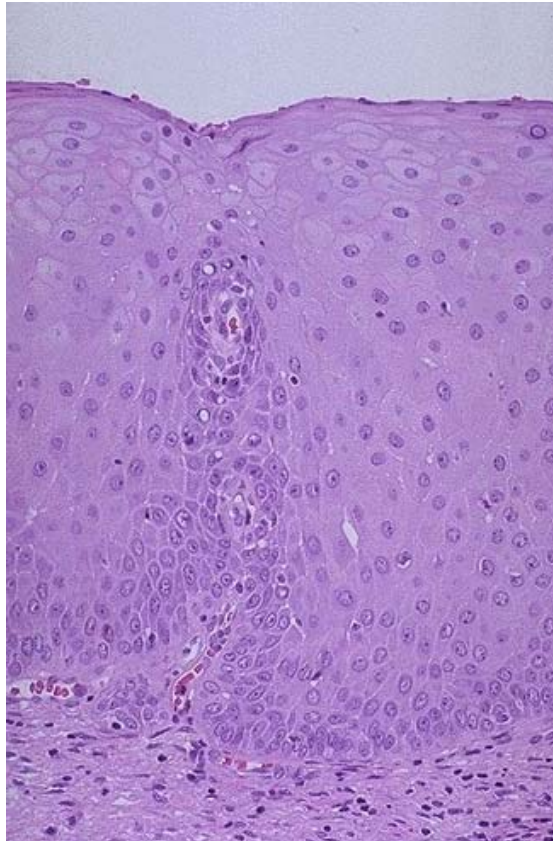
### **3.4.3. Ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία του τραχήλου Τύπου 2 (CIN 2)**

Στο πλακώδες επιθηλίο του τραχήλου της μήτρας παρουσιάζονται μέτριας μορφής δυσπλαστικές αλλοιώσεις. Το άνω ½ του επιθηλίου είναι ώριμο και καλά διαφοροποιημένο, αλλά με μερική ατυπία στους πυρήνες των κυττάρων. Οι παθολογικοί πυρήνες είναι πιο εκσημασμένοι και βρίσκονται πιο επιπολής από ό,τι στην CIN 1. Παθολογικές μιτωτικές εικόνες παρατηρούνται στα κατώτερα 2/3 του επιθηλίου.

Η ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία του τραχήλου Τύπου 2 (CIN 2) χαρακτηρίζεται από υψηλά ποσοστά εξέλιξης της σε καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Έχει υπολογιστεί πως στο 43% των ασθενών με CIN 2 οι αλλοιώσεις υποχωρούν χωρίς την εφαρμογή θεραπείας, στο 35% των ασθενών επιμένουν, ενώ στο 22% εξελίσσονται σε καρκίνωμα *in situ* ή σε διηθητικό καρκίνο (Mitchell και συν, 1996).

### **3.4.4. Ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία του τραχήλου Τύπου 3 (CIN 3)**

Περιλαμβάνει τη σοβαρή δυσπλασία του τραχήλου της μήτρας και το καρκίνωμα *in*



**Εικόνα 3.3.** Ιστολογική τομή ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας του τραχήλου της μήτρας CIN 3. Τα τραχηλικά κύτταρα έχουν χάσει τη φυσιολογική τους πολύστιβη αρχιτεκτονική, η αναλογία πυρήνα προς κυτταρόπλασμα είναι αυξημένη και παρατηρείται μιτωτική δραστηριότητα, ωστόσο η βασική μεμβράνη παραμένει ανέπαφη.

*situ*. Χαρακτηρίζεται από την παρουσία σε όλο το πάχος του επιθηλίου παθολογικών πυρήνων καθώς και μιτωτικών εικόνων. Η ύπαρξη ωριμότητας στα κύτταρα εντοπίζεται στο πάνω επιπολής 1/3 του επιθηλίου ή λείπει εντελώς. Στην περίπτωση του καρκινώματος *in situ*, εκτός από την προσβολή ολόκληρου του επιθηλίου από δυσπλαστικά κύτταρα, υπάρχουν επίσης και αλλοιώσεις στην πόλωση των κυττάρων, πολύ αυξημένες μιτωτικές εικόνες και πολυμορφισμός (**Εικόνα 3.3**).

Όπως και στην ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία του τραχήλου Τύπου 2 (CIN 2), το ποσοστό εξέλιξης της αλλοίωσης σε καρκίνο του τραχήλου της μήτρας είναι υψηλό. Έχει υπολογιστεί πως στο 32% των ασθενών με CIN 3, οι αλλοιώσεις υποχωρούν χωρίς θεραπεία,

στο 56% επιμένουν, ενώ στο 14% εξελίσσονται σε καρκίνο του τραχήλου της μήτρας (Wright και συν, 2002).

### **3.4.5. Εξέταση κολποτραχηλικών επιχρισμάτων κατά Παπανικολάου**

Η μεταβατική περίοδος μεταξύ της προκαρκινικής και της κακοήθους κατάστασης του τραχήλου της μήτρας υπολογίζεται σε 5-10 χρόνια στην πλειονότητα των περιπτώσεων. Το γεγονός αυτό συμβάλλει στη δυνατότητα έγκαιρης ανίχνευσης και θεραπευτικής αντιμετώπισης των προκαρκινικών αλλοιώσεων με αποτέλεσμα την πτωτική πορεία του αριθμού των θανάτων από διηθητικό καρκίνο του τραχήλου της μήτρας.

Η ανίχνευση των προκαρκινικών αλλοιώσεων του τραχήλου της μήτρας πραγματοποιείται με την εξέταση των κολποτραχηλικών επιχρισμάτων κατά Παπανικολάου (Papanikolaou και Traut, 1941). Η εξέταση αυτή ανακαλύφθηκε από τον έλληνα ιατρό Γεώργιο Παπανικολάου (**Εικόνα 3.4**), ο οποίος καταγόταν από την Κύμη της Εύβοιας και έγινε γνωστή παγκόσμια με το όνομα test-Pap. Η καθιέρωση της εξέτασης αυτής σε προγράμματα πληθυσμιακού προσυμπτωματικού ελέγχου κυρίως στις αναπτυγμένες χώρες είχε ως αποτέλεσμα στις χώρες αυτές τη μείωση της επίπτωσης του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας.

Κατά τη λήψη των κολποτραχηλικών επιχρισμάτων, μια σπάτουλα Ayre περιστρέφεται 360° γύρω από τον τράχηλο για να λάβει δείγματα από εξωτραχηλικά κύτταρα, τα οποία στη συνέχεια απλώνονται ταχύτατα πάνω σε γυάλινη πλάκα. Μια βούρτσα ειδική για λήψη κυττάρων εισέρχεται μέσα στο κανάλι του ενδοτραχήλου και περιστρέφεται για να συγκεντρώσει ενδοτραχηλικά κύτταρα, τα οποία επίσης μεταφέρονται σε άλλη γυάλινη πλάκα. Μόλις τα κύτταρα απλωθούν στη γυάλινη πλάκα πρέπει αμέσως να σταθεροποιηθούν για να προληφθούν τεχνικά σφάλματα. Ένα επίχρισμα θεωρείται επαρκές όταν λαμβάνεται ικανός αριθμός από ενδοτραχηλικά και εξωτραχηλικά κύτταρα.



**Εικόνα 3.4.** Ο Γεώργιος Παπανικολάου (Κύμη Ευβοίας, 1883-Η.Π.Α., 1962).

Η διάγνωση των κυτταρολογικών αλλοιώσεων βασίζεται στην αλλαγή των μορφολογικών χαρακτηριστικών των κυττάρων, στο μέγεθος και στην εμφάνιση του πυρήνα τους. Κατά την εξέταση των κυττάρων διακρίνονται πέντε κατηγορίες ή τάξεις κυττάρων: Η κατηγορία I χαρακτηρίζεται από κύτταρα που είναι φυσιολογικά, ενώ στην κατηγορία II τα κύτταρα είναι φλεγμονώδη. Στην κατηγορία III τα κύτταρα παρουσιάζουν δυσκαρυωτικές αλλοιώσεις, οι οποίες συνίστανται στην παρουσία παθολογικών πυρήνων. Υπάρχουν τρεις βαθμοί δυσκαριώσης: α) η ελαφρά, β) η μέτρια και γ) η βαριά. Ο βαθμός καθορίζεται με βάση τη σχέση μεγέθους πυρήνα προς κυτταρόπλασμα, το βαθμό ωριμότητας του κυτταροπλάσματος και τη μιτωτική εικόνα των πυρήνων. Οι αλλοιώσεις αυτές

χαρακτηρίζουν την ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία του τραχήλου της μήτρας. Στον διηθητικό καρκίνο απαντώνται καρκινικά κύτταρα αραιά (κατηγορία IV) ή κατά σωρούς (κατηγορία V). Σε μερικές περιπτώσεις καρκινώματος *in situ* ανευρίσκονται μεμονωμένα καρκινικά κύτταρα κατηγορία IV. Τα καρκινικά κύτταρα έχουν χάσει τη φυσιολογική τους πολύστιβη αρχιτεκτονική, έχουν μεγάλο πυρήνα σε σχέση με το κυτταρόπλασμα, εμφανίζουν μεγάλη ποικιλία σχήματος και μεγέθους και παρουσιάζουν σημαντικά αυξημένη μιτωτική δραστηριότητα. Στον Πίνακα 3.5 παρουσιάζεται η αντιστοιχία της κατά Παπανικολάου ορολογίας με την κυτταρολογική διάγνωση με βάση το Σύστημα κατά Bethesda και με βάση τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας στη νεοπλασία του τραχήλου της μήτρας.

**Πίνακας 3.5.** Αντιστοιχία της κατά Παπανικολάου ορολογίας με την κυτταρολογική διάγνωση με βάση το Σύστημα κατά Bethesda και με βάση τον Π.Ο.Υ. στην ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία του τραχήλου της μήτρας.

	Φυσιολογικός Τράχηλος		CIN 1	CIN2	CIN 3	
Κυτταρολογική διάγνωση (Σύστημα Bethesda)	Αντιδραστικές/ επανορθωτικές αλλοιώσεις	ASCUS	Χαμηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακές βλάβες	Υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακές βλάβες		
Κυτταρολογική διάγνωση (Π.Ο.Υ.)	Φυσιολογική/ καλοήθεις καταστάσεις	Πλακώδης μεταπλασία (ατυπία)	Ελαφριά δυσπλασία	Μέτρια δυσπλασία	Σοβαρή δυσπλασία	Καρκίνωμα <i>in situ</i>
Επίχρισμα Παπανικολάου	Κατηγορία I ή II		Κατηγορία III	Κατηγορία III ή IV		

*ASCUS: ατυπία κυττάρων πλακώδους επιθηλίου απροσδιόριστης σπουδαιότητας, Π.Ο.Υ.: Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας.*

Παρά την αδιαμφισβήτητη αξία της εξέτασης των κολποτραχηλικών επιχρισμάτων κατά Παπανικολάου, ένα ποσοστό περιπτώσεων δυσπλασίας και καρκίνου που ποικίλλει δεν ανακαλύπτεται. Η ακατάλληλη προετοιμασία του επιχρίσματος, η μη ακριβής ανάγνωση του και η παρουσία φλεγμονωδών κυττάρων ή ερυθροκυττάρων που παρεμποδίζουν την οπτική εικόνα των τραχηλικών κυττάρων συντελούν σε ψευδώς αρνητικές εικόνες.

Υπολογίζεται πως τα 2/3 των περιπτώσεων ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων οφείλεται σε σφάλμα κατά τη δειγματοληψία, ενώ το υπόλοιπο 1/3 οφείλεται σε σφάλμα κατά την ανάγνωση του δείγματος. Η ευαισθησία και η ειδικότητα της εξέτασης των κολποτραχηλικών επιχρισμάτων κατά Παπανικολάου για την ανίχνευση των νεοπλαστικών αλλοιώσεων του τραχήλου της μήτρας έχει υπολογιστεί πως είναι 84,6% και 37% αντίστοιχα (Nanda και συν, 2000). Τα τελευταία χρόνια έχουν προταθεί βελτιωμένες συσκευές για τη λήψη των κολποτραχηλικών επιχρισμάτων, νέες τεχνικές σταθεροποίησης των κυττάρων (ThinPrep) καθώς και αυτόματοι αναλυτές (PAPNET, AutoPAP) για την εξέταση των επιχρισμάτων (Buntinx και Brouwers, 1996, Bolck και Hellman, 1998, Nanda και συν, 2000).

#### **3.4.6. Θεραπευτική αντιμετώπιση**

Η παρουσία παθολογικής εξέτασης κατά Παπανικολάου απαιτεί την περαιτέρω διερεύνηση της ασθενούς με κολποσκόπηση και λήψη βιοψιακού υλικού από τον τράχηλο της μήτρας. Μετά από την ιστολογική επιβεβαίωση της διάγνωσης της ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας του τραχήλου, η θεραπευτική προσέγγιση περιλαμβάνει την κρυοθεραπεία, την ηλεκτροκαυτηρίαση, την εξάχνωση με laser, την κωνοειδή εκτομή του τραχήλου και την ολική υστερεκτομή. Η εντόπιση και έκταση της βλάβης, όπως φαίνεται κατά την κολποσκόπηση, η υποψία διηθητικού καρκίνου, η δυνατότητα παρακολούθησης της γυναίκας καθώς και η επιθυμία της για μελλοντική κύηση καθορίζουν την επιλογή της θεραπευτικής προσέγγισης.

Σε ασθενείς με CIN 1 συνίσταται απλά η παρακολούθηση της βλάβης ή η συντηρητική αντιμετώπισή της με κρυοθεραπεία, ηλεκτροκαυτηρίαση, ή εξάχνωση με laser, ενώ η κωνοειδής εκτομή συνίσταται όταν επανεμφανιστεί η βλάβη μετά την αρχική συντηρητική αντιμετώπιση της (Shafi και συν, 1997, Spitzer και συν, 1998). Σε ασθενείς με

CIN 2 και CIN 3 ενδείκνυνται τόσο οι συντηρητικές μέθοδοι (κρυοθεραπεία, ηλεκτροκαυτηρίαση, ή εξάχνωση με laser), όσο και η κωνοειδής εκτομή με στόχο τον καυτηριασμό ή την αφαίρεση του συνόλου της δυσπλαστικής βλάβης (Mitchell και συν, 1998, Zaitoun και συν, 2000). Η υστερεκτομή συνίσταται όταν υπάρχει μεγάλη διαγνωστική υποψία για κακοήθεια, όταν τα όρια της κωνοειδούς εκτομής είναι επί μη υγιών ιστών καθώς και όταν επανεμφανίζονται παθολογικά επιχρίσματα μετά από κωνοειδή εκτομή (Gardeil και συν, 1997).

### **3.5. Αιτιοπαθογένεια-Προδιαθεσικοί παράγοντες**

#### **3.5.1. Ο ιός ιού του θηλώματος του ανθρώπου (HPV)**

Η ανίχνευση του ιού του θηλώματος του ανθρώπου (HPV) σε νεοπλασματικές βλάβες, τόσο δυσπλαστικές όσο και κακοήθειες καθιστά τον ιό HPV ως τον βασικό αιτιολογικό παράγοντα του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας στις γυναίκες (Bosch και Munoz, 2002). Η μόλυνση με ιούς HPV-υψηλού κινδύνου (HPV-16, 18, 31, 35, 39, 45, 51, 52, 56 και 58) και κυρίως με τους ιούς HPV-16 και HPV-18 συμβάλλει στην ανάπτυξη των περισσότερων διηθητικών καρκίνων του τραχήλου της μήτρας. Στο Κεφάλαιο 2 παρουσιάζονται αναλυτικά τα χαρακτηριστικά του ιού του θηλώματος του ανθρώπου (HPV), ο κύκλος της ζωής του καθώς και οι μηχανισμοί με τους οποίους προκαλεί την κακοήθη εξαλλαγή του τραχήλου της μήτρας.

#### **3.5.2. Άλλοι παράγοντες**

Φαίνεται ωστόσο ότι η μόλυνση με τον ιό HPV αποτελεί αναγκαία πλην όμως όχι ικανή συνθήκη για κακοήθη εξαλλαγή, καθώς η αθανατοποίηση ανθρώπινων κερατινοκυττάρων που προκαλεί δεν οδηγεί σε όλες τις περιπτώσεις σε καρκίνο (Hurlin και

συν, 1991). Το γεγονός αυτό υποδεικνύει την παρουσία και άλλων αιτιολογικών παραγόντων που συμβάλλουν στην ανάπτυξη του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας.

Μερικοί ερευνητές υποστηρίζουν την ενοχοποίηση του ιού του έρπητα τύπου 2 καθώς και των χλαμυδίων του τραχώματος (Bosch και Munoz, 2002). Μεταβολές στο ανοσολογικό σύστημα της γυναίκας φαίνεται πως παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των νεοπλασματικών αλλοιώσεων στον τράχηλο της μήτρας. Έχει βρεθεί πως ασθενείς που λαμβάνουν ανοσοκατασταλτική φαρμακευτική αγωγή λόγω μεταμόσχευσης νεφρού ή ασθενείς φορείς του ιού HIV έχουν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του τραχήλου της μήτρας.

Το κάπνισμα αποτελεί επίσης ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση σημαντικού βαθμού δυσπλασίας και διηθητικού καρκίνου του τραχήλου της μήτρας (Kjellberg και συν, 2000, Daly και συν, 1998). Έχει βρεθεί πως οι καρκινογόνοι παράγοντες που βρίσκονται στον καπνό των τσιγάρων συγκεντρώνονται εκλεκτικά στον τραχηλικό βλεννογόνο (Prokoczyk και συν, 1997). Τέλος έχει προταθεί πως μια σειρά από μοριακοί μηχανισμοί, όπως είναι η ενεργοποίηση ογκογονιδίων (*ras*, *c-myc*, *c-erbB-2*) και η απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων π.χ. του p-53, έχουν συνεργιστική δράση στην εξέλιξη της καρκινογένεσης στον τράχηλο της μήτρας (Koffa και Spandidos, 1997). Στην παρούσα διατριβή εξετάζεται ο ρόλος της ενεργοποίησης των ογκογονιδίων *ras* σε μεταγραφικό επίπεδο καθώς και η πιθανή αλληλεπίδραση της με τον ιό HPV.

### **3.6. Κλινική εικόνα, Σταδιοποίηση και Πρόγνωση**

#### **3.6.1. Κλινική εικόνα**

Τόσο η ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία όσο και ο διηθητικός καρκίνος του τραχήλου της μήτρας αποτελούν ασυμπτωματικές καταστάσεις. Σε ασθενείς με προχωρημένη νόσο (Εικόνα 3.5) ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας εκδηλώνεται συνήθως με μητρορραγία, η



οποία μπορεί να έχει τη μορφή αιματηρής κολπικής έκκρισης, σταγονοειδούς αιμόρροιας ή μεγάλης αιμορραγίας. Μπορούν επίσης να παρουσιαστούν δύσοσμες κολπικές εκκρίσεις, αιματηρές ή πυώδεις, χωρίς όμως την εμφάνιση κνησμού, καθώς και ετερόπλευρο πυελικό άλγος, το οποίο ακτινοβολεί συνήθως στο ισχίο ή το μηρό.

Η διήθηση των πυελικών λεμφαδένων συνοδεύεται με πιεστικά φαινόμενα στο φλεβικό πλέγμα, με αποτέλεσμα την εμφάνιση ετερόπλευρου οιδήματος στα κάτω άκρα. Επίσης μπορεί να συμβεί απόφραξη των ουρητήρων, γεγονός που παρουσιάζεται κλινικά ως υδρονέφρωση ή πυελονεφρίτιδα. Η απώλεια ούρων ή κοπράνων αποτελούν σημείο σχηματισμού συριγγίου λόγω της νόσου, ενώ η αιματουρία αποτελεί το αποτέλεσμα της προσβολής της ουροδόχου κύστης. Σημαντική απώλεια βάρους και αναιμία είναι χαρακτηριστικά των τελευταίων σταδίων της νόσου. Ο θάνατος συνήθως επέρχεται λόγω νεφρικής ανεπάρκειας και ουραιμίας, εξαιτίας αμφοτερόπλευρης απόφραξης των ουρητήρων.

A. Φυσιολογικός τράχηλος



B. Καρκίνος του τραχήλου της μήτρας



**Εικόνα 3.5.** Δείγματα τραχήλου της μήτρας από ασθενή με φυσιολογικό τράχηλο της μήτρας (A) και από ασθενή με διηθητικό καρκίνο προχωρημένου Σταδίου III του τραχήλου της μήτρας (B).

### 3.6.2 Σταδιοποίηση

Μετά την ιστολογική διαγνώση, η οποία γίνεται με τη λήψη βιοψιακού υλικού, ακολουθεί η σταδιοποίηση της νόσου με στόχο την εκτίμηση της έκτασής της. Η σταδιοποίηση πραγματοποιείται με βάση τον Διεθνή Οργανισμό Μαιευτικής και

Γυναικολογίας (FIGO) και είναι ιδιαίτερα σημαντική τόσο στην πρόγνωση όσο και στον καθορισμό της θεραπευτικής αγωγής.

**Πίνακας 3.6.** Σταδιοποίηση του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας με βάση τον Διεθνή Οργανισμό Μαιευτικής και Γυναικολογίας (FIGO).

Στάδιο	Περιγραφή
<b>0</b>	Καρκίνωμα <i>in situ</i>
<b>Στάδιο I</b>	Καρκίνος περιορισμένος στον τράχηλο της μήτρας
Στάδιο IA	Διήθητικό καρκίνωμα μικροσκοπικά διαγνωσθέν
IA1	Ελάχιστη διήθηση του στρώματος <3mm σε βάθος και <7mm οριζοντίως
IA2	Διήθηση του στρώματος >3mm και <5mm σε βάθος και <7mm οριζοντίως
Στάδιο IB	Προκλινική βλάβη >IA2 ή κλινική βλάβη περιορισμένη στον τράχηλο της μήτρας
B1	Κλινική βλάβη <4cm σε μέγεθος
IB2	Κλινική βλάβη >4cm σε μέγεθος
<b>Στάδιο II</b>	Καρκίνος πέρα του τραχήλου της μήτρας, αλλά όχι στα πλάγια τοιχώματα της πυέλου ή το κάτω τριτημόριο του κόλπου
Στάδιο IIA	Χωρίς διήθηση των παραμητρίων
Στάδιο IIB	Με διήθηση των παραμητρίων
<b>Στάδιο III</b>	Καρκίνος στα πλάγια τοιχώματα της πυέλου ή το κάτω τριτημόριο του κόλπου
Στάδιο IIIA	Επέκταση στο κάτω τριτημόριο του κόλπου, αλλά όχι στα πλάγια τοιχώματα της πυέλου
Στάδιο IIIB	Επέκταση στα πλάγια τοιχώματα της πυέλου ή υδρονέφρωση ή μη λειτουργών νεφρός
<b>Στάδιο IV</b>	Απομακρυσμένες μεταστάσεις ή διήθηση παρακειμένων οργάνων
Στάδιο IVA	Διήθηση της κύστης ή του ορθού
Στάδιο IVB	Απομακρυσμένες μεταστάσεις

Στον **Πίνακα 3.6** παρουσιάζεται η σταδιοποίηση FIGO για τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας με βάση την τροποποίηση της το 1994. Στις Η.Π.Α. περίπου το 60% των ασθενών, στις οποίες γίνεται διάγνωση καρκίνου του τραχήλου της μήτρας βρίσκονται στο Στάδιο I, το 25% στο Στάδιο II, το 10% στο Στάδιο III, ενώ μόλις 5% στο Στάδιο IV (Waggoner και συν, 2003). Αντίθετα, σε λιγότερο αναπτυγμένες χώρες η διάγνωση του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας στις περισσότερες περιπτώσεις πραγματοποιείται σε προχωρημένα στάδια (Στάδιο III και Στάδιο IV).

Η σταδιοποίηση του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας γίνεται με βάση την εκτίμηση των αποτελεσμάτων της βιοψίας καθώς και των ευρημάτων μιας σειράς κλινικών και απεικονιστικών εξετάσεων (γυναικολογική εξέταση, κολποσκόπηση, υστεροσκόπηση, κυστεοσκόπηση, ορθοσκόπηση, σιγμοειδοσκόπηση, ακτινογραφία θώρακα, ενδοφλέβια πυελογραφία, βαριούχος υποκλυσμός), με τις οποίες εκτιμάται η έκταση της νόσου και η παρουσία μεταστάσεων.

Αν και υπολογιστική τομογραφία (CT), η μαγνητική τομογραφία και η τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων (PET) δε συμπεριλαμβάνονται στις απαιτούμενες για τη σταδιοποίηση εξετάσεις, οι πληροφορίες που παρέχουν σχετικά με τη διήθηση των πυελικών λεμφαδένων έχουν άμεση επίδραση στην επιλογή της θεραπευτικής αντιμετώπισης της νόσου (Grigsby και συν, 2001, Wagenaar και συν, 2001).

### **3.6.3. Πρόγνωση**

Η αποτελεσματικότητα της θεραπευτικής αγωγής, η οποία έχει ως κύριο στόχο τη μακρόχρονη ελεύθερης νόσου επιβίωση της ασθενούς, εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, στους οποίους περιλαμβάνονται η ηλικία της ασθενούς, το Στάδιο κατά FIGO, η παρουσία λεμφαδενικών διηθήσεων και ο ιστολογικός τύπος. Έχει βρεθεί πως ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας ο οποίος εμφανίζεται σε μικρότερες ηλικίες έχει πιο επιθετική εξέλιξη (Fenton, 1992). Η πενταετής επιβίωση στις ασθενείς με καρκίνο του τραχήλου της μήτρας Σταδίου IA πλησιάζει το 100%, στις ασθενείς Σταδίου IB1 και IIA είναι 70-85%, στις ασθενείς Σταδίου IB2 και IIB είναι 50-70%, 30-50% για το Στάδιο III και μόλις 5-15% για το Στάδιο IV (Benedet και συν, 2003). Η πενταετής επιβίωση σε ασθενείς που έχουν έναν λεμφαδένα διηθημένο είναι 91%, ενώ μειώνεται στο 44% όταν είναι διηθημένοι δύο λεμφαδένες και στο 36% όταν είναι διηθημένοι τρεις λεμφαδένες (Kamura και συν, 1992). Ο ιστολογικός τύπος αποτελεί επίσης σημαντικό προγνωστικό παράγοντα. Έχει βρεθεί πως

ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα του τραχήλου της μήτρας ή με αδеноμαλπιγιακό ή με μικροκυτταρικό νευροενδοκρινικό καρκίνωμα εμφανίζουν μεγαλύτερη συχνότητα υποτροπών και μικρότερο ποσοστό πενταετούς επιβίωσης από ό,τι οι ασθενείς με αμιγώς ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα (Grisaru και συν, 2001).

### **3.7. Θεραπεία**

Η θεραπευτική προσέλαση του καρκίνου της μήτρας περιλαμβάνει τις ακόλουθες μεθόδους: α) χειρουργική αντιμετώπιση, β) ακτινοθεραπεία, γ) χημειοθεραπεία και δ) χημειοακτινοθεραπεία. Η επιλογή της κατάλληλης θεραπευτικής μεθόδου καθώς και ο προσδιορισμός της θεραπευτικής στρατηγικής, η οποία ενδεχομένως να συνδυάζει περισσότερες από μια θεραπευτικές μεθόδους γίνεται κατα κανόνα με βάση τη Σταδιοποίηση κατά FIGO (**Πίνακας 3.7**). Στη λήψη της θεραπευτικής απόφασης συμβάλουν, επίσης, η ιστολογική εικόνα, η έκταση της λεμφαδενικής νόσου, ο θεραπευτικός κίνδυνος από την εγχείρηση, την ακτινοθεραπεία και τα κυτταροτοξικά φάρμακα καθώς και η προτίμηση της ασθενούς ως προς τη διατήρηση της γονιμότητάς της, αποφεύγοντας τη υστερεκτομή, εφόσον υπάρχει εναλλακτική θεραπεία.

#### **3.7.1. Χειρουργική αντιμετώπιση**

Η χειρουργική θεραπεία μπορεί να εφαρμοστεί στα πρώιμα Στάδια της νόσου (I και IIΑ) και έχει ως στόχο την τοπική εξαίρεση της νόσου. Στο Στάδιο IA1 η κωνοειδής εκτομή αποτελεί τη θεραπεία εκλογής σε γυναίκες που επιθυμούν να κυοφορήσουν στο μέλλον, ενώ σε αυτές που δεν επιθυμούν διενεργείται απλή εξωκαψική κοιλιακή ή κοιλιακή υστερεκτομή (Tseng και συν, 1997). Σε γυναίκες Σταδίου IA2, IB και IIΑ διενεργείται ριζική υστερεκτομή με πυελική λεμφαδεκτομή. Στο Στάδιο IA2 εξαιτίας της μικρής πιθανότητας προσβολής των παραμητρίων μπορεί να εφαρμοστεί τροποποιημένη η επέμβαση, κατά την οποία αφαιρείται

**Πίνακας 3.7.** Θεραπευτική αντιμετώπιση καρκίνου τραχήλου της μήτρας με βάση τη Σταδιοποίηση κατά FIGO.

Στάδιο	Θεραπεία
IA1	Αν η ασθενής επιθυμεί κύηση, κωνοειδής εκτομή Αν η ασθενής δεν επιθυμεί κύηση, απλή υστερεκτομή (κοιλιακή ή κοιλιακή) Υστερεκτομή με ή χωρίς πυελική λεμφαδενεκτομή, όταν υπάρχει διήθηση του λεμφοτριχοειδικού χώρου
IA2	Ριζική υστερεκτομή με πυελική λεμφαδενεκτομή Ριζική υστερεκτομή με πυελική λεμφαδενεκτομή και χημειοακτινοθεραπεία όταν υπάρχουν παθολογοανατομικοί παράγοντες πτωχής πρόγνωσης* Ακτινοθεραπεία
IB1	Ριζική υστερεκτομή με πυελική λεμφαδενεκτομή και χημειοακτινοθεραπεία όταν υπάρχουν παθολογοανατομικοί παράγοντες πτωχής πρόγνωσης* Ακτινοθεραπεία
IB2	Ριζική υστερεκτομή με πυελική λεμφαδενεκτομή και χημειοακτινοθεραπεία όταν υπάρχουν παθολογοανατομικοί παράγοντες πτωχής πρόγνωσης* Χημειοακτινοθεραπεία Χημειοακτινοθεραπεία και υστερεκτομή
IIA	Ριζική υστερεκτομή με πυελική λεμφαδενεκτομή Χημειοακτινοθεραπεία
IIB	Χημειοακτινοθεραπεία
IIIA	Χημειοακτινοθεραπεία
IVA	Χημειοακτινοθεραπεία Πυελική εξεντέρωση
IVB	Παρηγορητική χημειοακτινοθεραπεία Χημειοακτινοθεραπεία

*\*Διήθηση ορίων εκτομής, διήθηση πυελικών λεμφαδένων, ανεύρεση μεγάλου μεγέθους όγκου, βαθιά διήθηση, διήθηση λεμφοτριχοειδικού χώρου.*

μικρότερη ποσότητα παραμήτριου ιστού και κόλπου γεγονός που περιορίζει μετεγχειρητικές επιπλοκές, όπως η δυσλειτουργία της ουροδόχου κύστης, ενώ η αφαίρεση των παρααορτικών λεμφαδένων δεν είναι αναγκαία παρά μόνο όταν τεθεί υποψία προσβολής τους (Jones και συν, 1993). Η ριζική κοιλιακή τραχηλεκτομή με συνοδή λαπαροσκοπική λεμφαδενεκτομή μπορεί να εφαρμοστεί σε νέες γυναίκες Σταδίου IA που επιθυμούν να διατηρήσουν τη γονιμότητά τους, ωστόσο η πιθανότητα υποτροπής της νόσου (0-4%) καθιστά αναγκαία τη στενή παρακολούθηση της γυναίκας μετεγχειρητικά (Dargent και συν, 2000). Σε ασθενείς Σταδίου IV εφαρμόζονται παρηγορητικές μαζικές εγχειρήσεις πυελικής εξεντέρωσης, όπου

εκτός από την υστερεκτομία και τον λεμφαδενικό καθαρισμό εξαιρούνται η ουροδόχος κύστη, το ορθό και ο κόλπος (Shingleton και συν, 1989). Στις μετεγχειρητικές επιπλοκές της ριζικής υστερεκτομής περιλαμβάνονται η δυσλειτουργία της κύστης (3%), η δημιουργία ουρητηροκολπικού ή κύστεοκολπικού συριγγίου (1-2%), η πνευμονική εμβολή (1-2%), η απόφραξη του λεπτού εντέρου (1%), ο σχηματισμός λεμφοκύστεων (5%), ο τραυματισμός νεύρων και η αιμορραγία. Τα τελευταία χρόνια η εφαρμογή τροποποιημένων χειρουργικών προσπελάσεων σε ασθενείς με καρκίνο του τραχήλου τις μήτρας έχει ως στόχο τον περιορισμό της εγχειρητικής και μετεγχειρητικής νοσηρότητας και της θνητότητας (Margina και συν, 1995, Landoni και συν, 2001).

### **3.7.2 Ακτινοθεραπεία**

Ο συνδυασμός εξωτερικής ακτινοθεραπείας και ενδοκοιλοτικής βραχυθεραπείας αποτελεί την ενδεικνυόμενη θεραπευτική αντιμετώπιση στο διηθητικό καρκίνο του τραχήλου της μήτρας είτε ως προεγχειρητική ή μετεγχειρητική αγωγή, είτε ως αποκλειστική θεραπευτική προσέγγιση. Η ακτινοθεραπευτική αγωγή εξατομικεύεται σύμφωνα με το στάδιο, το μέγεθος του όγκου, τη γεωμετρική διάταξη των οργάνων της πυέλου, την ηλικία της ασθενούς και το δείκτη Karnofsky.

Κατά την εξωτερική ακτινοθεραπεία ακτινοβολείται με ραδιενεργό κοβάλτιο Co 60 ή με δέσμες φωτονίων υψηλής ενέργειας (γραμμικός επιταχυντής) ολόκληρη η πυέλος (πρωτοπαθής εστία και επιχώριοι λεμφαδένες). Σε προχωρημένα στάδια, με διήθηση των παραμητρίων, τα πεδία της εξωτερικής ακτινοθεραπείας συμπεριλαμβάνουν τους κοινούς λαγόνιους λεμφαδένες, ενώ όταν υπάρχει υποψία διήθησης των παρααορτικών λεμφαδένων, τότε και αυτοί συνακτινοβολούνται μαζί με την πυέλο ή με χωριστό πεδίο ακτινοβολίας. Η ενδοκοιλοτική βραχυθεραπεία συνίσταται στην τοπική ακτινοβολία της περιοχής του τραχήλου με ραδιενεργές πηγές (καισίου, ιριδίου, κοβαλτίου), οι οποίες τοποθετούνται

ενδοκοιλοτικά στον αυλό του τραχήλου της μήτρας. Με βάση τη σχέση δόσης της ακτινοβολίας και χρόνου έκθεσης σε αυτή διακρίνουμε δύο είδη βραχυθεραπείας με παρόμοια αποτελεσματικότητα (Petereit και συν, 1999). Κατά τη βραχυθεραπεία χαμηλής δόσης (4-20 Gy/h) χορηγείται χαμηλή δόση ακτινοβολίας για μια περίοδο περίπου 3 ημερών, ενώ στη βραχυθεραπεία υψηλής δόσης (2 Gy/h) χορηγείται υψηλή δόση ακτινοβολίας για μικρή χρονική περίοδο σε εβδομαδιαίες συνήθως συνεδρίες.

Οι επιπλοκές της ακτινοθεραπείας διακρίνονται σε άμεσες επιπλοκές, όπως η μετακτινική κολίτιδα με κύριο σύμπτωμα τη διάρροια και σε απότερες επιπλοκές, οι οποίες εμφανίζονται συνήθως 2-5 χρόνια μετά το τέλος της θεραπείας. Στις απότερες επιπλοκές περιλαμβάνονται η στένωση του κόλπου, η αιμορραγία από το ορθό, η απόφραξη του εντέρου, η μετακτινική κυστίτιδα καθώς και η ανάπτυξη συριγγίων. Τα τελευταία χρόνια, η διασφάλιση των συνθηκών ακτινοβολήσης και της ποιότητας της χορηγούμενης ακτινοβολίας με τη βοήθεια εξομοιωτών, υπολογιστών δοσιμετρίας και συστημάτων ακινητοποίησης έχει σαν αποτέλεσμα το υψηλό ποσοστό ελέγχου της τοπικής νόσου και τη σημαντική μείωση των απότερων επιπλοκών (Perez και συν, 1995).

### **3.7.3 Χημειοθεραπεία**

Η χημειοθεραπεία εφαρμόζεται σε προχωρημένα στάδια καρκίνου τραχήλου της μήτρας σε συνδυασμό με τη χειρουργική αντιμετώπιση ή την ακτινοθεραπεία, καθώς και σε περιπτώσεις υποτροπής της νόσου όπου έχει παρηγορητικό χαρακτήρα. Από τους κυτταροτοξικούς παράγοντες που έχουν χρησιμοποιηθεί μεμονωμένα ή σε συνδυασμό στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, η cis-platin κατέχει την κυρίαρχη θέση (Park και Thigpen, 1993, Rose και συν, 1999). Σημαντικό παράγοντα αποτελεσματικότητας της χημειοθεραπείας σε περιπτώσεις αντιμετώπισης υποτροπών της νόσου αποτελεί το εάν η περιοχή της υποτροπής είχε ακτινοβοληθεί ή όχι κατά την αρχική της αντιμετώπιση. Το 25%

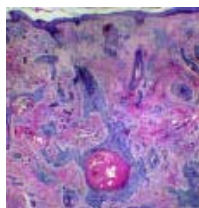
των ασθενων με υποτροπή σε περιοχή εκτός του πεδίου ακτινοβολήσης απαντά στη χημειοθεραπεία, ενώ στην περίπτωση που η περιοχή της υποτροπής δεν έχει ακτινοβοληθεί το αντίστοιχο ποσοστό φθάνει μόλις το 5% (Brader και συν, 1998).

#### **3.7.4. Χημειοακτινοθεραπεία**

Η χημειοακτινοθεραπεία, η οποία συνίσταται στον ταυτόχρονο συνδυασμό χημειοθεραπείας και ακτινοθεραπείας, μπορεί να εφαρμοστεί είτε ως μονοθεραπεία σε ανεγχείρητα στάδια (IIΒ, III και IV) είτε σε συνδυασμό με τη χειρουργική αντιμετώπιση (IA2, IB και IIA). Παρά την εμφάνιση πιο σοβαρών αιματολογικών και γαστρεντερικών επιπλοκών, η χημειοακτινοθεραπεία πλεονεκτεί τόσο της μεμονωμένης ακτινοθεραπείας όσο και της χημειοθεραπείας, η οποία ακολουθείται από ακτινοθεραπεία (Grenn και συν, 2001).



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4



### ΜΟΡΙΑΚΗ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΒΑΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

#### 4.1. Γενικά

#### 4.2. Παράγοντες καρκινογένεσης

##### 4.2.1. Φυσικοί παράγοντες

##### 4.2.2. Χημικοί παράγοντες

##### 4.2.3. Ογκογόνοι Ιοί

#### 4.3. Ογκογονίδια

##### 4.3.1. Αυξητικοί και αγγειογενετικοί παράγοντες

##### 4.3.2. Διαμεμβρανικοί υποδοχείς και κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες

##### 4.3.3. Μεταγραφικοί παράγοντες

##### 4.3.4. Πολυλειτουργικά ογκογονίδια

#### 4.4. Ογκοκατασταλτικά γονίδια

#### 4.5. Γονιδιακή θεραπεία

#### 4.1. Γενικά

Το κύτταρο αποτελεί τη βασική δομική και λειτουργική μονάδα της ζωής. Ο ανθρώπινος οργανισμός αποτελείται από εκατομμύρια κύτταρα, η ανάπτυξη και ο πολλαπλασιασμός των οποίων ρυθμίζεται με στόχο την ομαλή και αρμονική λειτουργία του ανθρώπινου οργανισμού. Η ρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού επιτελείται μέσω γενετικών πληροφοριών που τα κύτταρα φέρουν στο γονιδίωμά τους (DNA).

Στα Σχήματα που ακολουθούν ανασκοπούνται η δομή του δίκλωνου μορίου του δεοξυριβονουκλεϊκού οξέως (DNA), όπου είναι αποθηκευμένη η γενετική πληροφορία του κυττάρου (Σχήμα 4.1), η δομή του μονόκλωνου μορίου του ριβονουκλεϊκού οξέως (RNA), όπου μεταγράφεται η γενετική πληροφορία του μορίου DNA (Σχήμα 4.2), μέσω της

διαδικασίας της μεταγραφής (**Σχήμα 4.3**), για να ακολουθήσει στη συνέχεια η διαδικασία της μετάφρασης, όπου συντίθενται τα πρωτεϊνικά μόρια του κυττάρου (**Σχήμα 4.4**).

Στο **Σχήμα 4.5** παρουσιάζονται οι θέσεις, στις οποίες πραγματοποιείται η σύνθεση των πρωτεϊνών στο ευκαρυωτικό κύτταρο και στο **Σχήμα 4.6** ο γενετικός κώδικας, με βάση τον οποίο η γενετική πληροφορία της αλληλουχίας των αμινοξέων των σχηματιζόμενων πρωτεϊνικών μορίων κωδικοποιείται στην αλληλουχία των βάσεων των ριβονουκλεϊκών οξέων.

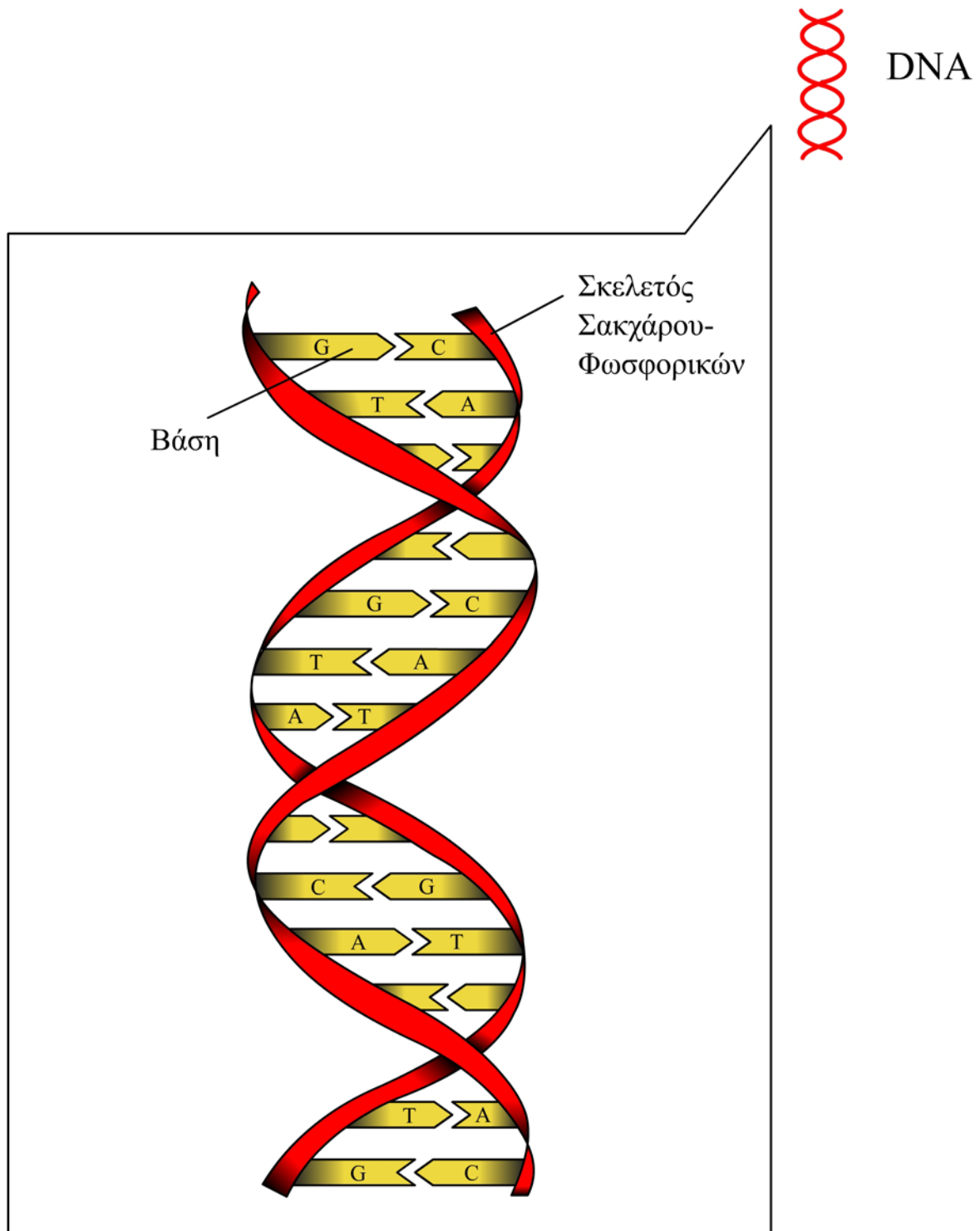
Στο **Σχήμα 4.7** ανασκοπείται η ροή της γενετικής πληροφορίας και στο **Σχήμα 4.8** παρουσιάζονται οι φάσεις του κυτταρικού κύκλου σε σχέση με την αντιγραφή του DNA.

Η καρκινική εξαλλαγή ενός κυττάρου είναι το αποτέλεσμα μιας πολυσταδιακής και πολυπαραγοντικής διαδικασίας μετάβασης από την κατάσταση φυσιολογικού ελέγχου της κυτταρικής ανάπτυξης σε μια κατάσταση απώλειας ελέγχου της (Spandidos, 2004).

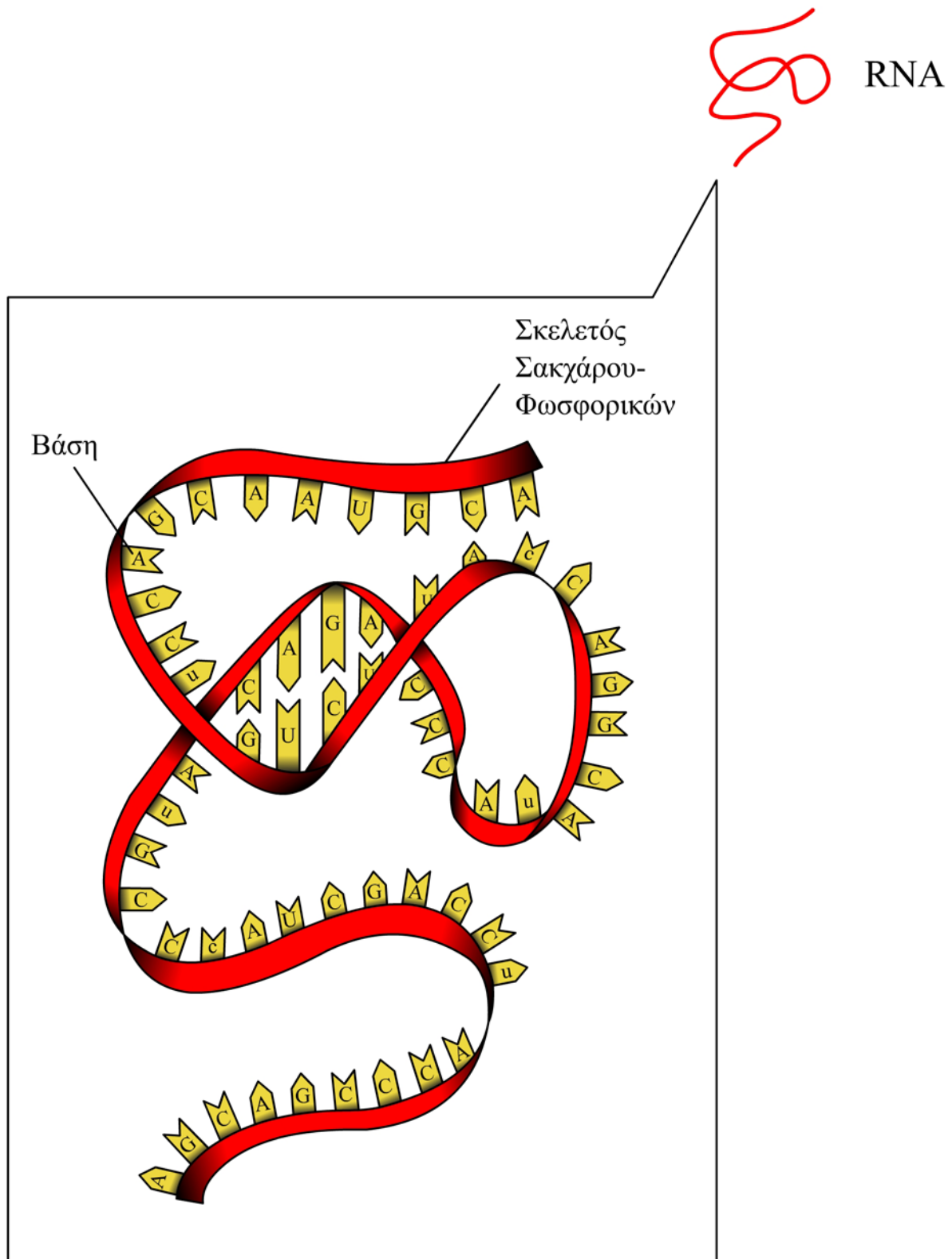
Τα καρκινικά κύτταρα, σε αντίθεση με τα φυσιολογικά, διπλασιαζονται ανεξέλεγκτα (αθανатоποίηση) και εισβάλλουν σε γειτονικούς ιστούς διασπώντας τη βασική μεμβράνη (διήθηση), όπως φαίνεται στο **Σχήμα 4.9**.

Με τον τρόπο αυτό στη συνέχεια, μέσω των λεμφικών και αιμοφόρων αγγείων, μεθίστανται σε απομακρυσμένα όργανα (μετάσταση). Σε *in vitro* πειράματα έχει δειχθεί πως τα καρκινικά κύτταρα επιδεικνύουν μειωμένη εξάρτηση στους εξωγενείς αυξητικούς παράγοντες (αύξηση ανεξάρτητη παρουσίας αυξητικών παραγόντων), ενώ για τον πολλαπλασιασμό τους δεν απαιτείται η προσκόλλησή τους σε κάποια επιφάνεια (αύξηση ανεξάρτητη πρόσφυσης).

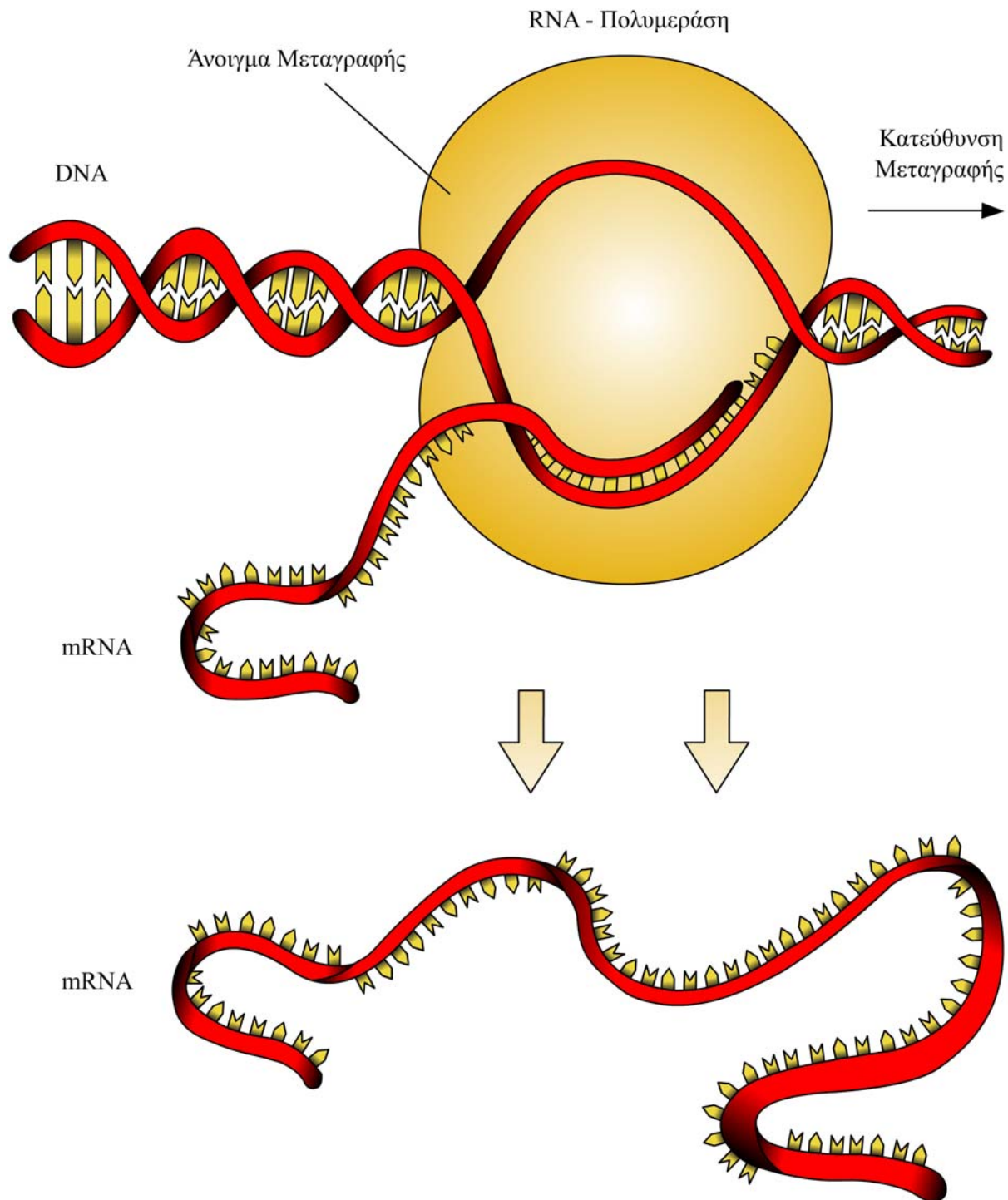
**Σχήμα 4.1.** Το δίκλωνο μόριο δεοξυριβονουκλεϊκού οξέως (DNA). A: Αδενίνη, C: Κυτοσίνη, T:Θυμίνη, G: Γουανίνη.



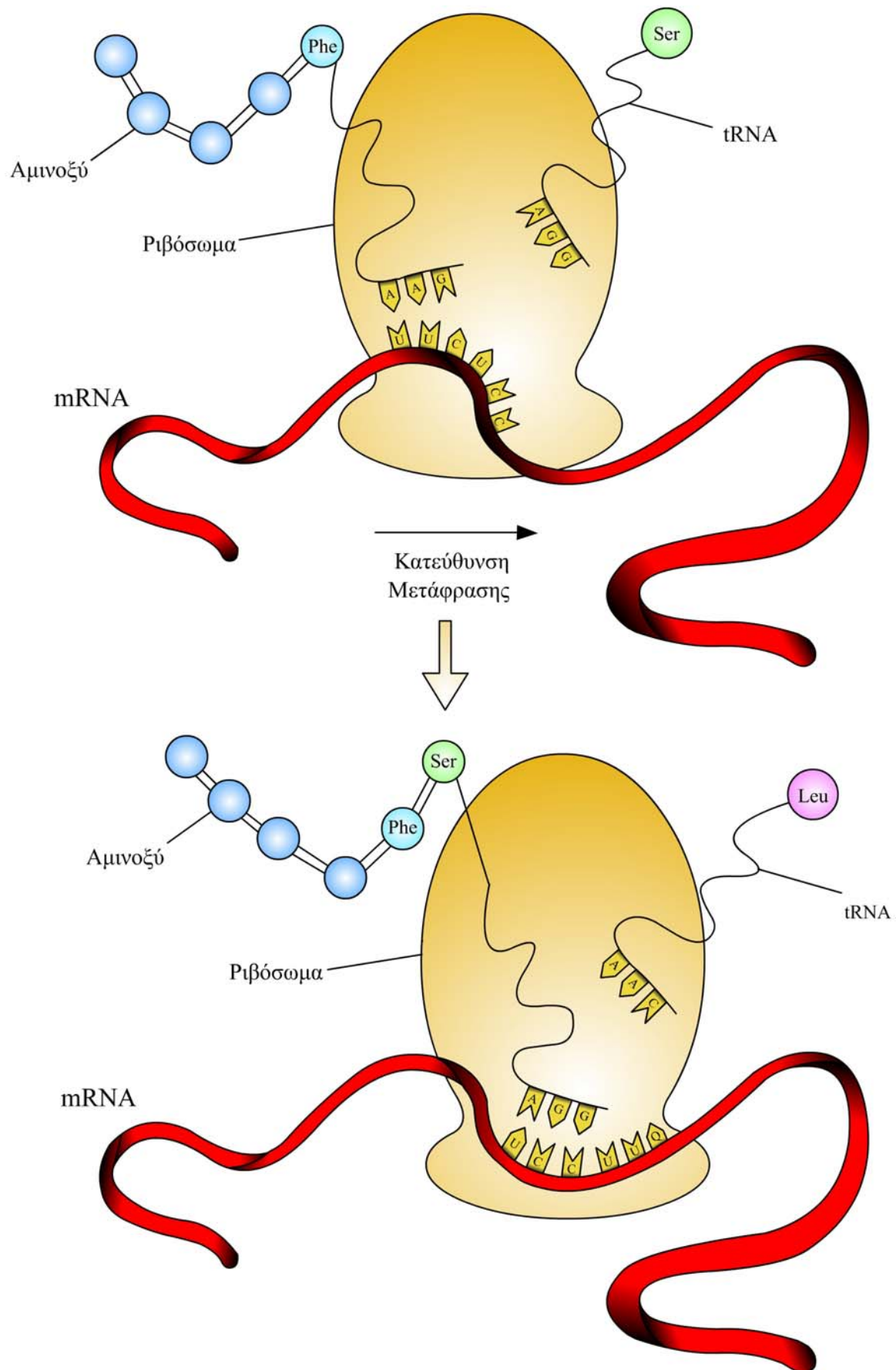
**Σχήμα 4.2.** Το μονόκλωνο μόριο ριβονουκλεϊκού οξέως (RNA). A: Αδενίνη, C: Κυτοσίνη, U: Ουρακίλη, G: Γουανίνη.



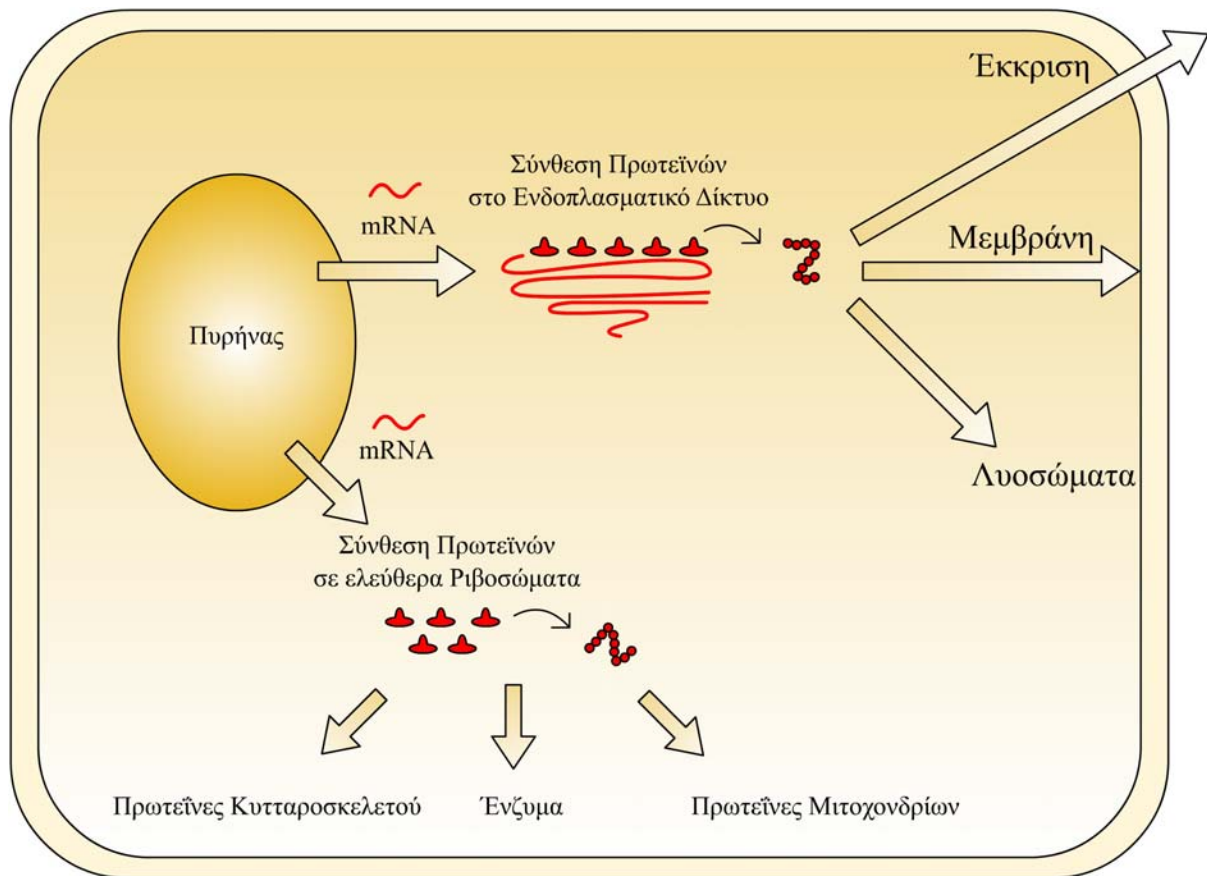
Σχήμα 4.3. Μεταγραφή DNA σε mRNA.



Σχήμα 4.4. Μετάφραση σε mRNA σε πρωτεΐνη.



Σχήμα 4.5. Θέσεις πρωτεϊνικής σύνθεσης ευκαρυωτικού κυττάρου.

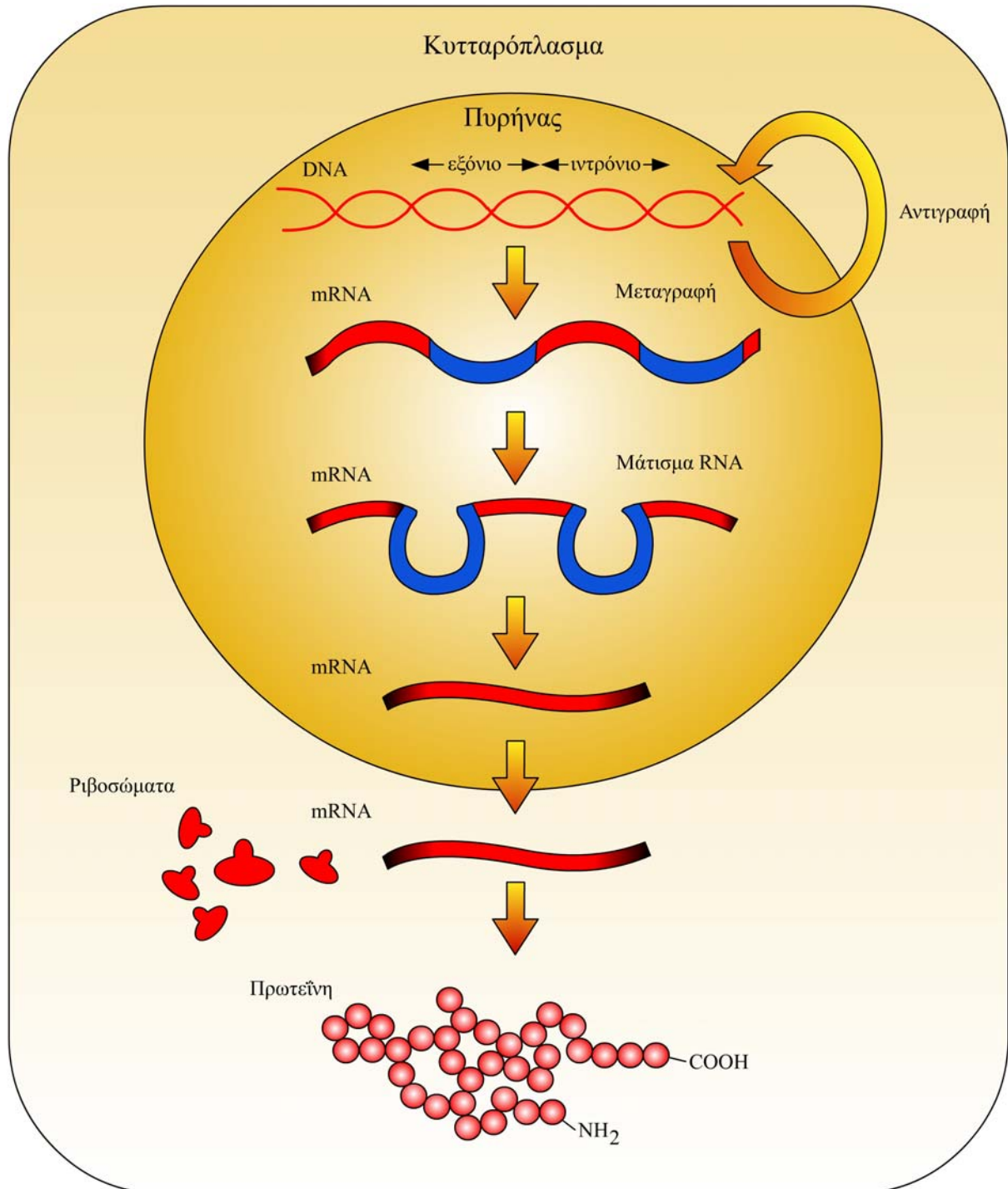


**Σχήμα 4.6.** Ο γενετικός κώδικας. Ala: αλανίνη, Arg: αργινίνη, Asn: ασπαραγίνη, Asp: ασπαρατικό οξύ, Cys: κυστεΐνη, Gln: γλουταμίνη, Glu: γλουταμικό οξύ, Gly: γλυκίνη, His: ιστιδίνη, Ile: ισολευκίνη, Leu: λευκίνη, Lys: λυσίνη, Met: μεθειονίνη, Phe: φαινολαλανίνη, Pro: προλίνη, Ser: σερίνη, Thr: θρεονίνη, Trp: τρυπτοφάνη, Tyr: τυροσίνη, Val: βαλίνη.

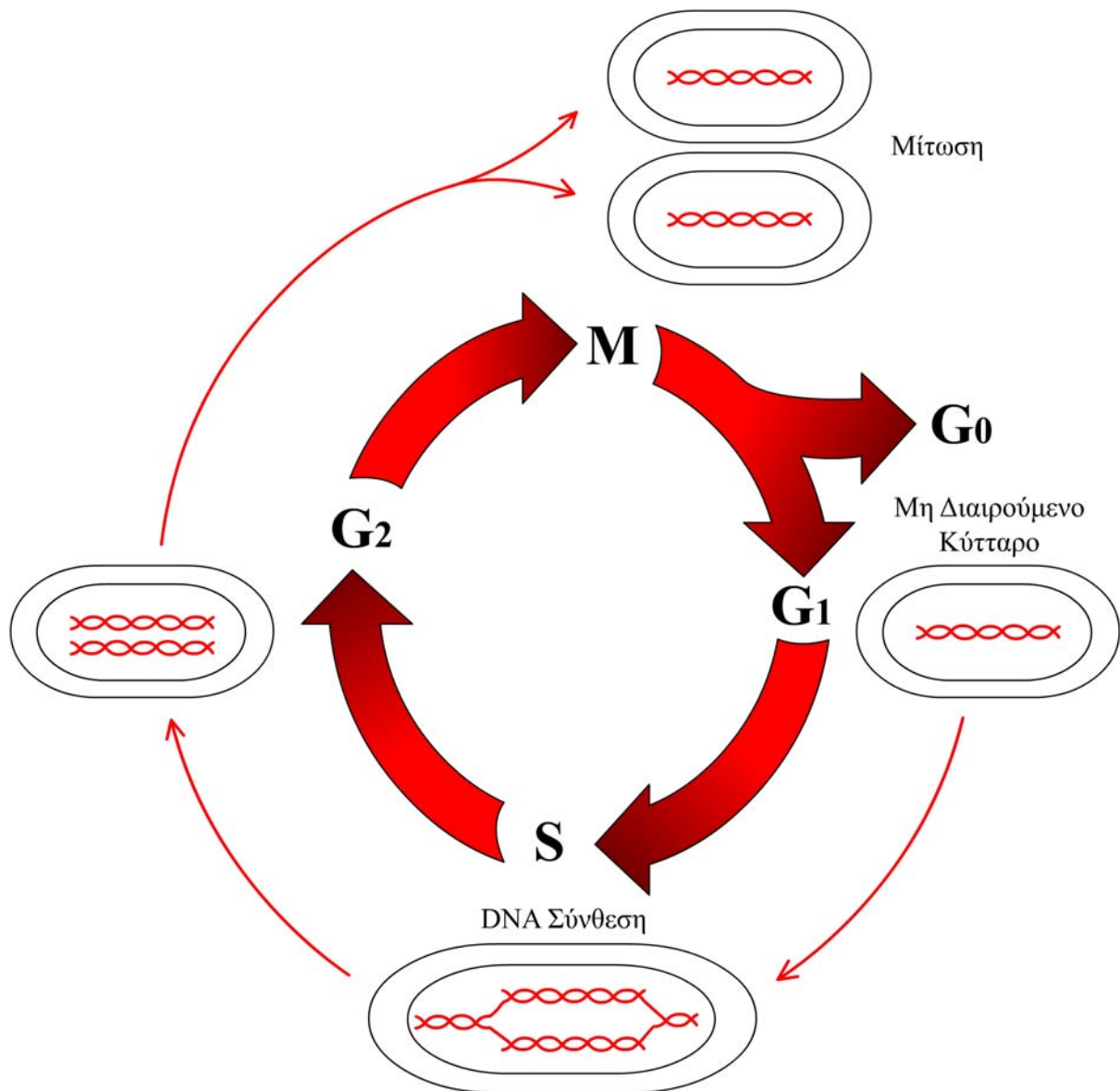
5'	U	C	A	G	3'
U	Phe	Ser	Tyr	Gys	U
	Phe	Ser	Tyr	Gys	C
	Leu	Ser	Stop	Stop	A
	Leu	Ser	Stop	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G



**Σχήμα 4.7.** Η ροή της γενετικής πληροφορίας στο ευκαρυωτικό κύτταρο. Η αντιγραφή DNA, η μεταγραφή, όπου φαίνεται και η διαδικασία του ματίσματος του mRNA και η σύνθεση των πρωτεϊνών.

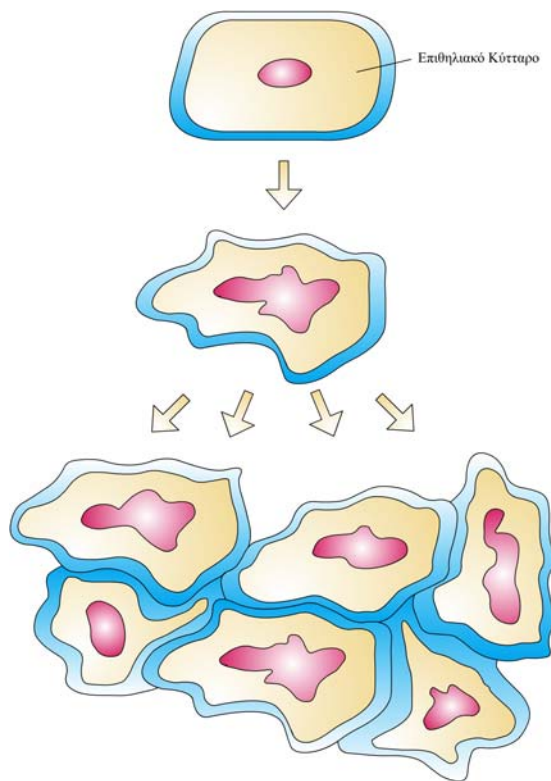


Σχήμα 4.8. Ο κυτταρικός κύκλος

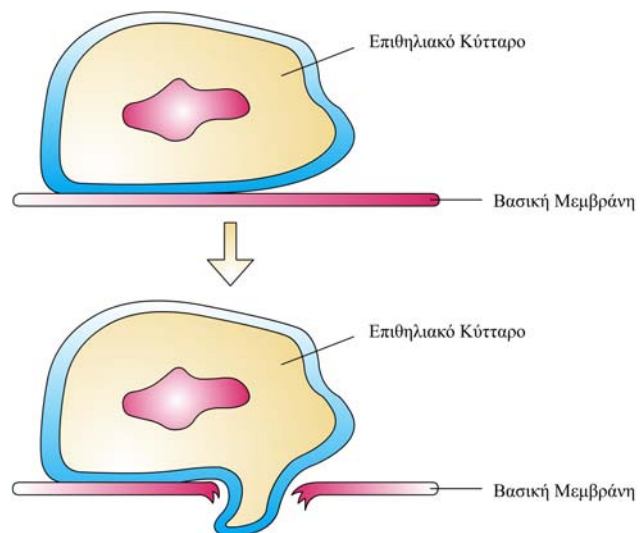


**Σχήμα 4.9.** Ιδιότητες κακοήθους κυττάρου.

A. Απώλεια ελέγχου του πολλαπλασιασμού.

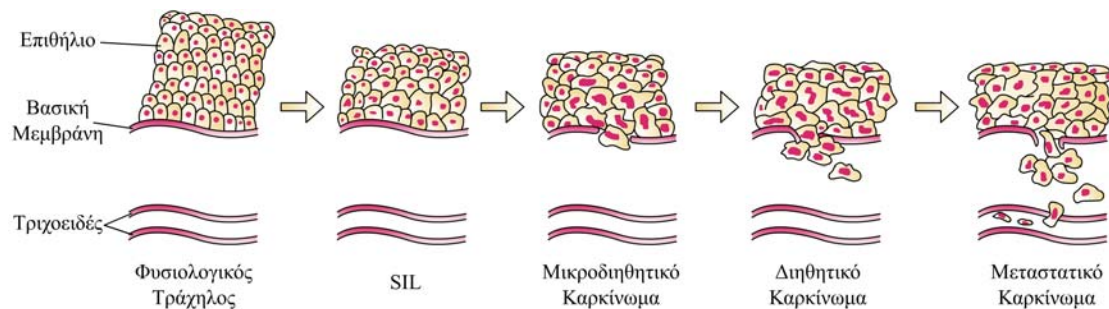


B. Διάσπαση της βασικής μεμβράνης.



Η διαδικασία της καρκινογένεσης είναι πολυσταδιακή. Διακρίνονται τρία στάδια καρκινογένεσης: το στάδιο έναρξης (initiation), το στάδιο προαγωγής (promotion) και το στάδιο μετεξέλιξης (progression), κατά τη διάρκεια των οποίων πραγματοποιείται προοδευτικά η καρκινική εξαλλαγή των κυττάρων. Σε ορισμένες περιπτώσεις καρκίνου, υπάρχουν προκαρκινικές αλλοιώσεις, οι οποίες στη συνέχεια εξελίσσονται σε κακοήθη νεοπλάσματα. Στο **Σχήμα 4.10** παρουσιάζονται τα στάδια της καρκινογένεσης στον τράχηλο της μήτρας, ενώ περισσότερα στοιχεία αναλύονται στο Κεφάλαιο 3.

**Σχήμα 4.10.** Στάδια καρκινογένεσης στον τράχηλο της μήτρας.



Η διαδικασία της καρκινογένεσης είναι πολυπαραγοντική. Μια σειρά από περιβαλλοντικούς, γενετικούς και επιγενετικούς παράγοντες (**Πίνακας 4.1**) επιδρούν στην μετατροπή του φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό. Οι γενετικές αλλοιώσεις που δημιουργούνται, αντιστρεπτές και μη, αυξάνουν το ογκογενετικό δυναμικό των κυττάρων και αθροιστικά τα ωθούν στην κακοήθη εξαλλαγή. Οι αλλοιώσεις αυτές αφορούν την ποιοτική και ποσοτική λειτουργία συγκεκριμένων γονιδίων, τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της αύξησης και της διαφοροποίησης του κυττάρου. Τα γονίδια αυτά διακρίνονται σε δύο βασικές κατηγορίες: τα ογκογονίδια (oncogenes) και τα ογκοκατασταλτικά γονίδια (onco-suppressor genes).

**Πίνακας 4.1.** Παράγοντες καρκινογένεσης.

Φυσικοί Παράγοντες που ενέχονται στην καρκινογένεση
Ακτινοβολία
Ιοντίζουσα ακτινοβολία
Υπεριώδης ακτινοβολία
Ξένα Σώματα
Αμίαντος
Schistosoma haematobium
Εμφυτεύματα
Χημικοί Παράγοντες που ενέχονται στην καρκινογένεση
Αλκοόλ
Καπνός
Μέταλλα
Κάδμιο
Χρόμιο
Νικέλιο
Αρσενικό
Χρωστικές ανιλίνης
Διεθλοστιβεστρόλη
Φαιντοίνη
Βενζόλιο
Αλκυλιωτικοί παράγοντες
Αφλατοξίνες
Βινυλογλωρίδιο
Βιολογικοί Παράγοντες που ενέχονται στην καρκινογένεση
DNA ιοί
HPV
HBV
Epstein-Barr
RNA ιοί (Ρετροϊοί)

## 4.2. Παράγοντες καρκινογένεσης

### 4.2.1. Φυσικοί παράγοντες

Αν και η ευαισθησία των ιστών διαφέρει, η ιονίζουσα ακτινοβολία μπορεί να προκαλέσει όλες τις μορφές καρκίνου στον άνθρωπο, ενώ η υπεριώδης ακτινοβολία προκαλεί καρκίνο του δέρματος συμπεριλαμβανομένου και του μελανώματος. Η ακτινοβολία φαίνεται πως προκαλεί άμεσα γενετικές βλάβες, όπως απαλείψεις και μεταθέσεις χρωμοσωμικών τμημάτων και σπανιότερα σημειακές μεταλλάξεις. Η υπεριώδης ακτινοβολία

προκαλεί επιπλέον αλλοιώσεις στη δομή και τη λειτουργία γονιδίων που είναι υπεύθυνα για τη διόρθωση βλαβών που φυσιολογικά συμβαίνουν κατά την αντιγραφή του DNA. Ο μηχανισμός αυτός συμβάλλει στη δημιουργία κακοήθων δερματικών όγκων σε πάσχοντες από το σύνδρομο της μελαγχρωστικής ξηροδερμίας (xeroderma pigmentosum).

Η έκθεση σε ίνες αμιάντου προκαλεί καρκίνο στους πνεύμονες και τον υπεζωκότα. Το καρκίνωμα του πλακώδους επιθηλίου της ουροδόχου κύστης είναι στενά συνδεδεμένο με τη χρόνια φλεγμονώδη αντίδραση που προκαλείται από μόλυνση της ουροδόχου κύστης από το *Schistosoma haematobium*. Η μεταμόσχευση τεχνητού μέλους σπάνια συνδέεται με την ανάπτυξη σαρκώματος.

#### **4.2.2. Χημικοί παράγοντες**

Παρά το γεγονός πως οι περισσότερες χημικές ουσίες δεν είναι καρκινογόνες, τα χημικά καρκινογόνα ενέχονται στην καρκινογένεση των περισσότερων μορφών καρκίνου στον άνθρωπο. Οι ουσίες αυτές συνήθως μετατρέπονται από συγκεκριμένα ενζυμικά συστήματα του κυττάρου (π.χ. το κυτόχρωμα P-450 ) σε ενεργούς μεταβολίτες που δρουν άμεσα στο DNA του κυττάρου προκαλώντας από σημειακές γονιδιακές μεταλλάξεις έως μείζονες χρωμοσωμικές ανωμαλίες (Stanley, 1995).

Το αλκόολ και το κάπνισμα έχουν συσχετιστεί με την εκδήλωση αρκετών τύπων καρκίνου, όπως ο καρκίνος κεφαλής και του τραχήλου, του αναπνευστικού, του ανώτερου γαστρεντερικού και της ουροδόχου κύστης. Σε λιγότερο αναπτυγμένες χώρες το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα προκαλείται από αφλατοξίνες, οι οποίες παράγονται από μύκητες. Η σύγχρονη διατροφή αποτελεί βασικό παράγοντα καρκινογένεσης. Η χαμηλή διατροφική πρόσληψη ινών έχει συσχετιστεί με τον καρκίνο του παχέος εντέρου, ενώ η χρήση συντηρητικών στα τρόφιμα έχει ενοχοποιηθεί για διάφορους τύπους καρκίνου. Παλαιότερα ο κίνδυνος καρκινογένεσης από χημικές ουσίες σχετιζόταν με την έκθεση των

ανθρώπων σε βιομηχανικά προϊόντα όπως διάφορες χρωστικές, το βενζόλιο και το χλωριούχο βινύλιο.

#### 4.2.3. Ογκογόνοι Ιοί

Οι πρώτες ενδείξεις για τη συμμετοχή ιών στην ογκογενετική διαδικασία προήλθαν πριν σχεδόν έναν αιώνα (Rous και συν, 1911) και η αξία της πληροφορίας αυτής αναγνωρίστηκε με την απονομή του βραβείου Nobel το 1968 στον εμπνευστή της ιδέας. Σήμερα υπάρχει αποδεδειγμένη συμμετοχή ιογενών λοιμώξεων στην αιτιολογία ενός στους επτά καρκίνους που συμβαίνουν παγκοσμίως, με τον ιό του θηλώματος του ανθρώπου (HPV) και τους ηπατοτρόπους ιούς (HBV) να ευθύνονται για πάνω από το 80% των περιπτώσεων (zur Hausen και συν, 1999). Τόσο DNA ιοί όσο και RNA ιοί (ρετροιοί) μπορούν να προκαλέσουν καρκίνο στον άνθρωπο, είτε άμεσα μέσω απευθείας επίδραση στον κακοήγη μετασχηματισμό του κυττάρου, είτε έμμεσα όπως ο ιός HIV μέσω της ανοσοκαταστολής που προκαλεί.

Η μόλυνση με τον ιό της ηπατίτιδας B (HBV) οδηγεί στην ανάπτυξη του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος, ενώ ο ιός του θηλώματος του ανθρώπου (HPV) θεωρείται ότι συμμετέχει στη δημιουργία του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας στον άνθρωπο. Ο ιός Epstein-Bar (EBV) με βάση επιδημιολογικά δεδομένα θεωρείται βασικός αιτιολογικός παράγοντας του Αφρικάνικου λεμφώματος Burkitt και καρκινώματος στο ρινοφάρυγγα. Πρόσφατα οι ρετρο-ιοί του ανθρώπου έχει αναφερθεί ότι προκαλούν κακοήθειες των T-λεμφοκυττάρων στον άνθρωπο. Οι δυνητικά ογκογόνοι ιοί παρουσιάζονται συνοπτικά στον **Πίνακα 1.3.** στο Κεφάλαιο 1.

Οι DNA ιοί καθώς και ορισμένοι ρετρο-ιοί έχουν την ικανότητα να ενσωματώνουν περιοχές του γονιδιώματός τους στο γενετικό υλικό των ξενιστών. Στο Κεφάλαιο 2 στην Παράγραφο 2.2.5 γίνεται λεπτομερής αναφορά στην ενσωμάτωση του γονιδιώματος του ιού

HPV στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή και στη σημασία του γεγονότος αυτού στην κακοήγη εξαλλαγή του κυττάρου. Στην περίπτωση των ρετρο-ιών απαιτείται η μετατροπή του RNA του ιού σε DNA με τη δράση της αντίστροφης μεταγραφάσης του ιού, η οποία φέρεται στα σωματίδιά του ιού. Οι ικές πρωτεΐνες που εκφράζονται στα προσβεβλημένα κύτταρα τροποποιούν τη συμπεριφορά των γονιδίων του ξενιστή και εμπλέκονται στην καρκινογένεση.

### 4.3. Ογκογονίδια

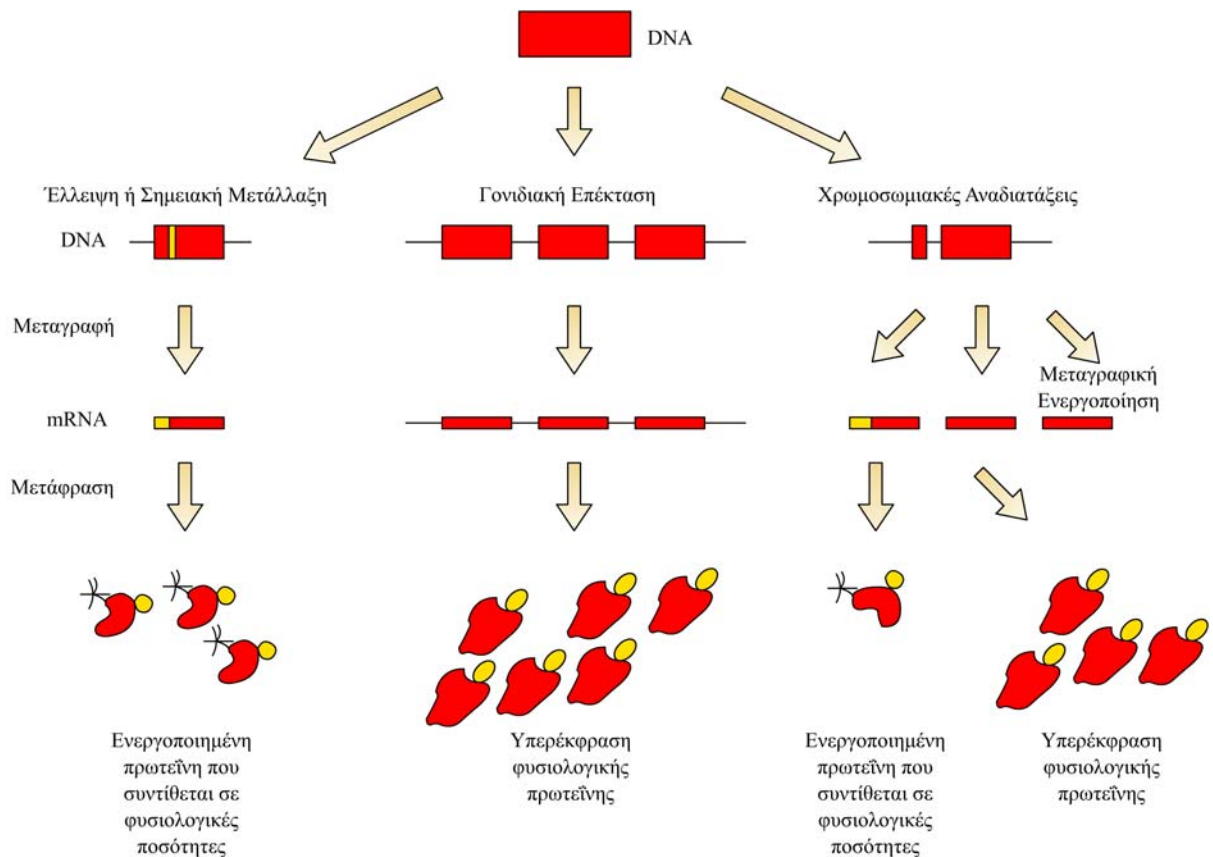
Τα ογκογονίδια είναι γονίδια, κυτταρικά ή ιικά, των οποίων η δράση συνεισφέρει στην κακοήγη εξαλλαγή του κυττάρου. Τα κυτταρικά ογκογονίδια ταυτοποιήθηκαν αρχικά ως ομόλογα ικών γονιδίων ογκογόνων ρετρο-ιών, οι οποίοι εμφανίζουν την ικανότητα επαγωγής όγκων σε πειραματόζωα και μετασχηματισμού κυτταρικών σειρών *in vitro*. Στη συνέχεια όμως αποδείχτηκε ότι τα γονίδια των ρετροιών είναι κυτταρικά γονίδια, τα οποία απέσπασαν εξελικτικά οι ρετρο-ιοί κατά την ενσωμάτωσή τους στο κυτταρικό γονιδίωμα των θηλαστικών. Αντίθετα, τα ογκογονίδια των DNA ιών δεν παρουσιάζουν μεγάλη ομολογία με τα κυτταρικά ογκογονίδια.

Τα ογκογονίδια προέρχονται από την ενεργοποίηση φυσιολογικών κυτταρικών ή ικών γονιδίων (πρωτο-ογκογονίδια) λόγω της επίδρασης των παραγόντων καρκινογένεσης. Η ενεργοποίηση των πρωτο-ογκογονιδίων μπορεί να πραγματοποιηθεί με μια σειρά από αλλοιώσεις (**Σχήμα 4.11**), όπως οι σημειακές μεταλλάξεις, η γονιδιακή επέκταση, η μετάθεση χρωμοσωμιακού τμήματος, η αύξηση του αριθμού των χρωμοσωμάτων, η ενσωμάτωση ικών αλληλουχιών και η αύξηση της έκφρασης του γονιδίου λόγω μετεγραφικών, μετα-μεταγραφικών, μεταφραστικών και μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων. Η ενεργοποίηση εντοπίζεται τόσο σε ποιοτικό όσο και σε ποσοτικό επίπεδο, με αποτέλεσμα είτε την απευθείας αλλοίωση του γονιδιακού προϊόντος και την παραγωγή



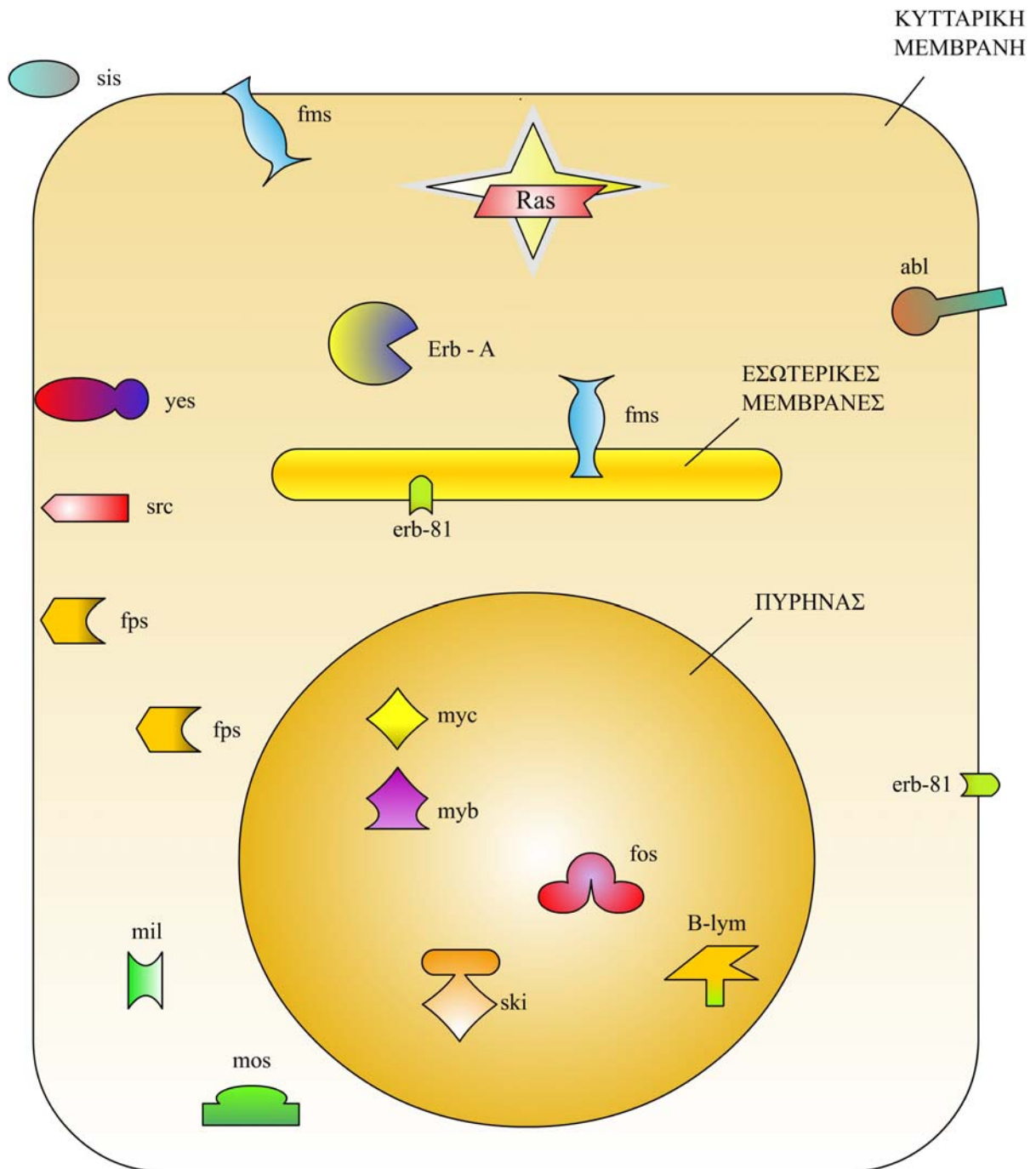
μεταλλαγμένης πρωτεΐνης, είτε την παραγωγή σε υπερβολικές ποσότητες (υπερέκφραση) της φυσιολογικής πρωτεΐνης, ενώ είναι επίσης δυνατή η ενεργοποίηση και στα δύο επίπεδα.

**Σχήμα 4.11.** Τρόποι ενεργοποίησης ενός πρωτο-ογκογονιδίου σε ογκογονίδιο.



Τα πρώτο-ογκογονίδια στο φυσιολογικό κύτταρο κωδικοποιούν μια σειρά από πρωτεΐνες (Σχήμα 4.12), οι οποίες παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της απόπτωσης, της σταθερότητας του DNA και της διαφοροποίησης συμμετέχοντας σε ένα πολύπλοκο μηχανισμό επαγωγής σημάτων στον ανθρώπινο οργανισμό. Τα πρωτεϊνικά προϊόντα των πρωτο-ογκογονιδίων, είναι κυρίως αυξητικοί και αγγειογενετικοί παράγοντες, διαμεμβρανικοί ή ενδοκυττάριοι υποδοχείς και πρωτεΐνες που ρυθμίζουν ως μεταγραφικοί παράγοντες τη μεταγραφή του κυττάρου.

Σχήμα 4.12. Κυτταρική εντόπιση πρωτεϊνικών προϊόντων διάφορων ογκογονιδίων.



#### 4.3.1. Αυξητικοί και αγγειογενετικοί παράγοντες

Παραδείγματα αυξητικών παραγόντων που κωδικοποιούνται από ογκογονίδια αποτελούν ο αυξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων (PDGF), ο οποίος παράγεται από το

ογκογονίδιο *sis*, οι επιδερμοειδείς αυξητικοί παράγοντες (EGFs) και ο αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών (FGF), προϊόν του ογκογονιδίου *int-2* καθώς και διάφοροι αγγειογενετικοί παράγοντες, όπως ο VEGF, οι οποίοι επάγουν τη διαδικασία της αγγειογένεσης. Η ενεργοποίηση των ογκογονιδίων αυτών είναι κυρίως συνέπεια της μεταγραφικής τους απορύθμισης, με αποτέλεσμα την υπερέκφραση των φυσιολογικών πρωτεϊνών τους. Με τον τρόπο αυτό το κύτταρο δέχεται έναν μεγάλο αριθμό μιτογονικών σημάτων τόσο από το ίδιο (αυτοκρινής επαγωγή) ή το μικροπεριβάλλον του, όσο και από πλέον μακρινά σημεία, γεγονός που επιδρά στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και του καρκινικού μετασχηματισμού του κυττάρου.

#### 4.3.2. Διαμεμβρανικοί υποδοχείς και κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες

Οι καλύτερα μελετημένοι υποδοχείς είναι αυτοί, οι οποίοι χαρακτηρίζονται από μια εξωτερική περιοχή πρόσδεσης, μια διαμεμβρανική περιοχή και ένα κυτταροπλασματικό επίτοπο, ο οποίος παρουσιάζει ενεργότητα κινάσης της τυροσίνης. Παραδείγματα ογκογονιδίων που κωδικοποιούν διαμεμβρανικούς υποδοχείς με δράση κινάσης της τυροσίνης αποτελούν τα γονίδια *erbB-1*, *erbB-2* και *fms*, ενώ το γονίδιο *erbA* κωδικοποιεί έναν ενδοκυττάριο υποδοχέα με δράση κινάσης της τυροσίνης. Άλλοι διαμεμβρανικοί υποδοχείς που ενοχοποιούνται για την καρκινογένεση είναι οι υποδοχείς που δεσμεύουν νουκλεοτίδια γουανίνης, υποδοχείς με ενεργότητα κινάσης της σερίνης/θρεονίνης, υποδοχείς για λεμφοκίνες, κυτταροκίνες και αυξητικούς παράγοντες (π.χ. ιντερλευκίνη-1, ιντερλευκίνη-2, GM-CSF, ερυθροποιητίνη), υποδοχείς με ενεργότητα φωσφατάσης της φωσφοτυροσίνης, οι οποίοι δύνανται να αντιπροσωπεύουν ένα ανταγωνιστικό σύστημα έναντι των υποδοχέων της κινάσης της τυροσίνης καθώς και κανάλια ιόντων.

Παραδείγματα ογκογονιδίων που κωδικοποιούν κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες που δεσμεύουν νουκλεοτίδια γουανίνης αποτελούν τα γονίδια *ras*, ενώ τα γονίδια *raf* και *mos*

κωδικοποιούν κυτταροπλασματικές κινάσες της σερίνης/θρεονίνης. Τα γονίδια *scr*, *abl*, *yes* κωδικοποιούν κυτταροπλασματικές κινάσες της τυροσίνης. Οι πρωτεΐνες αυτές φαίνεται να συμμετέχουν στη μετάδοση σημάτων που δέχεται το κύτταρο μέσω των υποδοχέων του, τα οποία είναι απαραίτητα για τον έλεγχο της κυτταρικής αύξησης και της κυτταρικής διαφοροποίησης. Στο κεφάλαιο 5 παρουσιάζονται τα γονίδια της οικογένειας *ras*, καθώς και ο σημαντικός ρόλος τους στην καρκινική εξαλλαγή του κυτταρου.

#### 4.3.3. Μεταγραφικοί παράγοντες

Μια σημαντική κατηγορία ογκογονιδίων κωδικοποιεί πρωτεΐνες που παρεμβαίνουν ρυθμιστικά στη διαδικασία μεταγραφής του γενετικού υλικού. Παραδείγματα αποτελούν τα γονίδια *myc*, *jun*, *fos*, *myb* και *ski*, τα προϊόντα των οποίων προσδένονται και αλληλεπιδρούν με συγκεκριμένες αλληλουχίες του DNA επιδρώντας ως μεταγραφικοί παράγοντες στον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης του κυττάρου. Το γονίδιο *myc* κωδικοποιεί μια πυρηνική πρωτεΐνη 62 kDa με ικανότητα πρόσδεσης στο DNA. Η έκφραση του γονιδίου εμπλέκεται στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και τη διαφοροποίηση των κυττάρων. Η απώλεια της γονιδιακής ρύθμισης του γονιδίου λόγω γονιδιακής επέκτασης, ανακατατάξεων στο 5' άκρο του, μετατοπίσεων οδηγεί σε αυξημένη έκφραση του γονιδίου που θεωρείται βασικός παράγοντας καρκινογένεσης.

#### 4.3.4. Πολυλειτουργικά ογκογονίδια

Πρόσφατα έχουν βρεθεί ογκογονίδια, οι πρωτεΐνες των οποίων έχουν την ικανότητα να εκτελούν πολλαπλές συγκεκριμένες λειτουργίες. Παράδειγμα αποτελεί το ογκογονίδιο *bcr*, η αμινοτελική περιοχή της πρωτεΐνης του οποίου έχει δράση κινάσης της σερίνης, η καρβοξυτελική έχει δράση GTPάσης, ενώ η ενδιάμεση περιοχή παρουσιάζει ομολογία με τον παράγοντα ανταλλαγής νουκλεοτιδίων. Ο ακριβής ρόλος των πολυλειτουργικών

ογκογονιδίων δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί, είναι ωστόσο πιθανό ότι οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούν λειτουργούν ως γέφυρες σε συγκεκριμένα σημεία του μηχανισμού της ρύθμισης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

#### **4.4. Ογκοκατασταλτικά γονίδια**

Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια είναι κυτταρικά γονίδια, η απενεργοποίηση των οποίων οδηγεί στην καρκινική εξαλλαγή του κυττάρου. Στο φυσιολογικό κύτταρο τα προϊόντα των γονιδίων αυτών ασκούν αρνητικό έλεγχο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ενώ παράλληλα εμπλέκονται στη ρύθμιση των μηχανισμών του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωση).

Σε αντίθεση με τα ογκογονίδια, τα οποία δρουν ως επικρατή, τα ογκοκατασταλτικά γονίδια παρουσιάζουν υπολειπόμενη ογκογενετική δράση, υπό την έννοια ότι απαιτείται μετάλλαξη ή έλλειψη και στα δύο αλληλόμορφα (απώλεια ετεροζυγωτίας) του γονιδίου για την καταστολή της φυσιολογικής του δράσης. Η απώλεια της ετεροζυγωτίας μπορεί να είναι το αποτέλεσμα ενδιάμεσων ελλείψεων, απάλειψης χρωμοσώματος ή μη φυσιολογικών ανασυνδυασμών και αποτελεί σύνηθες χαρακτηριστικό πολλών νεοπλασιών όπου ενοχοποιείται η απενεργοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Η απενεργοποίηση ενός ογκοκατασταλτικού γονιδίου δύναται να πραγματοποιηθεί και με τη βοήθεια σημειακών μεταλλάξεων. Αυτές οι μεταλλάξεις έχουν συνήθως επικρατούντα αρνητικό χαρακτήρα, που σημαίνει πως η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη μπορεί να προσδένεται με τη φυσιολογική και την απενεργοποιεί.

Οι πιο γνωστοί αντιπρόσωποι της ομάδας των ογκοκατασταλτικών γονιδίων είναι το γονίδιο του ρετινοβλαστώματος *rb* και το γονίδιο *p53*. Το γονίδιο του ρετινοβλαστώματος *rb* ήταν το πρώτο ογκοκατασταλτικό γονίδιο που κλωνοποιήθηκε και χαρακτηρίστηκε η αλληλουχία του. Η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί είναι μια πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη που

προσδένεται στο DNA και παίζει σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση του κυττάρου. Η απενεργοποίηση του γονιδίου ευνοεί τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τον καρκινικό μετασχηματισμό και παρατηρείται κυρίως στο ρετινοβλάστωμα καθώς και σε καρκίνους της ουροδόχου κύστεως και του πνεύμονα.

Το γονίδιο p53 κωδικοποιεί για μια πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη, που προσδένεται στο DNA και ενεργοποιεί τη μεταγραφή γονιδίων, τα οποία συμμετέχουν στην αύξηση και τη διαφοροποίηση του κυττάρου. Η πρωτεΐνη αυτή ενοπίστηκε για πρώτη φορά εξαιτίας της πρόσδεσής της στο μεγάλο T αντιγόνο του ιού SV40. Η πρόσδεση αυτή προκαλεί την απενεργοποίηση της p53 με άμεσες ογκογενετικές συνέπειες για το κύτταρο, το οποίο προσβάλλεται από το DNA του ογκογόνου ιού. Απενεργοποίηση του γονιδίου p53 εμφανίζεται σε πολλούς τύπους καρκίνου, όπως του παχέος εντέρου, του πνεύμονα, του οστεοσαρκώματος, ενώ κληρονομούμενες μεταλλάξεις του γονιδίου φαίνεται πως συνδέονται με το κληρονομικό σύνδρομο καρκίνου Li-Fraumeni.

Άλλα ογκοκατασταλτικά γονίδια είναι το γονίδιο WT-1, το οποίο είναι υπεύθυνο για μια ποικιλία όγκων του Wilms, το NF-1, το οποίο είναι υπεύθυνο για την νευροϊνωμάτωση τύπου I, το γονίδιο APC το οποίο σχετίζεται με την προδιάθεση για καρκίνο του παχέος εντέρου, το p16, το οποίο εμπλέκεται στον καρκίνο του μαστού και του τραχήλου της μήτρας και το MTS1, η έλλειψη του οποίου εμφανίζεται συχνά σε κυτταρικές σειρές από όγκους του πνεύμονα, του μαστού, του δέρματος, των ωοθηκών και των λεμφοκυττάρων.

#### **4.5. Γονιδιακή θεραπεία**

Η κατανόηση της μοριακής και γενετικής βάσης της καρκινογένεσης αναζωπυρώνει την ελπίδα για νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις εναντίον του καρκίνου. Η ανεύρεση μοριακών στόχων σε διάφορους καρκίνους στον άνθρωπο καθώς και η ανάπτυξη μεθόδων γονιδιακής μεταφοράς με υψηλή αποτελεσματικότητα οδήγησε στη διαμόρφωση της ιδέας

ότι η γονιδιακή θεραπεία μπορεί να χρησιμοποιηθεί στο μέλλον για τη θεραπεία του καρκίνου (Mulligan, 1993). Με τον όρο γονιδιακή θεραπεία αναφερόμαστε στην παρέμβαση στο γενετικό υλικό του ανθρώπου με στόχο τη διόρθωση των γενετικών αλλοιώσεων, οι οποίες ενοχοποιούνται για την εκδήλωση μιας νόσου. Αρχικό στόχο των πρώτων κλινικών μελετών γονιδιακής θεραπείας αποτέλεσαν κληρονομικές νόσοι που οφείλονται σε ελαττωματικά γονίδια, όπως ανοσοανεπάρκειες π.χ. λόγω της έλλειψης της απαμινάσης της αδενοσίνης. Σήμερα, λόγω του συνεχώς αυξανόμενου ερευνητικού ενδιαφέροντος στο χώρο της ογκολογίας, η πλειοψηφία των κλινικών μελετών γονιδιακής θεραπείας αφορούν τον καρκίνο. Στην αντιστροφή αυτή συνέβαλε και το γεγονός ότι οι στρατηγικές που έχουν εφαρμοστεί για τη γονιδιακή θεραπεία του καρκίνου δεν επηρεάζονται σημαντικά από τεχνικές δυσκολίες, που συνδέονται με τη γονιδιακή θεραπεία κληρονομούμενων γενετικών νόσων, για την οποία απαιτείται μακροχρόνια και ρυθμιζόμενη έκφραση του μεταφερόμενου γονιδίου στα κύτταρα.

Οι ιοί αποτελούν τα πιο συνηθισμένα οχήματα μεταφοράς γονιδίων με κύριους εκπρόσωπους τους ρετρο-ιούς και τους αδενοϊούς. Οι ρετρο-ιοί έχουν χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα λόγω της ικανότητάς τους να προσδίδουν σταθερή υψηλού επιπέδου γονιδιακή έκφραση λόγω της ενσωμάτωσής τους μέσα στο γενετικό υλικό των κυττάρων στόχων. Μειονέκτημά τους αποτελεί το γεγονός ότι ενσωματώνονται και εκφράζουν το μεταφερόμενο γονίδιο μόνο σε ενεργώς πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα. Οι αδενοϊοί σε σχέση με τους ρετρο-ιούς δεν απαιτούν ενεργώς πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα για να επιτευχθεί η κυτταρική έκφραση του μεταφερόμενου γονιδίου και παράγονται ευκολότερα σε υψηλούς τίτλους. Μειονέκτημά των αδενοϊών αποτελεί η ανοσογονικότητά τους, δεδομένου ότι προκαλούν ήπια αυτοπεριοριζόμενη νόσο του ανώτερου αναπνευστικού, ενώ το 80% περίπου του γενικού πληθυσμού έχει αντισώματα έναντι των ιών αυτών. Εκτός από τους ιούς έχουν αναπτυχθεί και άλλα συστήματα μεταφοράς γονιδίων. Παράδειγμα αποτελεί η χρήση

κατιοντικών λιπιδίων, τα οποία δημιουργούν σύμπλεγμα με το αρνητικά φορτισμένο DNA, διευκολύνοντας έτσι την ενδοκυττάρωσή του και περιορίζοντας την αποδομή του μέσα στα λυσοσωμάτια.

Στον **Πίνακα 4.2.** παρουσιάζονται οι στρατηγικές, οι οποίες έχουν χρησιμοποιηθεί στη γονιδιακή θεραπεία του καρκίνου. Βασική προϋπόθεση για την επιτυχία των στρατηγικών αυτών αποτελεί η ικανότητα των οχημάτων γονιδιακής μεταφοράς να αναγνωρίζουν μόνο τα κύτταρα-στόχους καθώς και η ασφάλειά τους με την πρόκληση όσο το δυνατόν λιγότερων ανεπιθύμητων ενεργειών.

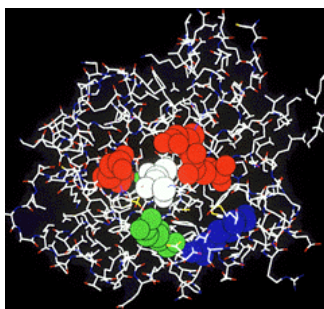
**Πίνακας 4.2.** Προσεγγίσεις στη γονιδιακή θεραπεία του καρκίνου.

Αποκατάσταση λειτουργίας ογκοκατασταλτικών γονιδίων/ογκογονιδίων	Αντικατάσταση μεταλλαγμένων ογκοκατασταλτικών γονιδίων, π.χ. p53, BRCA1 Αντικατάσταση μεταλλαγμένων ογκογονιδίων, π.χ. ras, myc
Γονιδιακή μεταφορά ως κυτταροτοξική θεραπεία	Χρήση γονιδίων «αυτοκτονίας», π.χ. απαμινάση της κυτοσίνης, κινάση της θυμιδίνης του ιού του έρπητα
Γονιδιακή μεταφορά ως μέσο ανοσοθεραπείας	Χρήση γονιδίων της ιντερλευκίνης-2 ή του αυξητικού παράγοντα GM-CSF
Γονιδιακή μεταφορά ως μέσο τροποποίησης της απόκρισης στη χημειοθεραπεία	Τροποποίηση αιμοποιητικών κυττάρων με την εισαγωγή του γονιδίου MDR-1, που επιφέρει αντίσταση στη χημειοθεραπεία

Στο μέλλον, η βελτίωση των οχημάτων γονιδιακής μεταφοράς όσο αφορά την αποτελεσματικότητα, την εκλεκτικότητα και την ασφάλειά τους αναμένεται να οδηγήσουν στη βελτίωση της κλινικής αποτελεσματικότητας της γονιδιακής θεραπείας. Επιπλέον, ο σχεδιασμός θεραπευτικών στρατηγικών που στοχεύουν σε συνδυασμό συγκεκριμένων μοριακών στόχων αναμένεται να συμβάλλει σημαντικά στην αποτελεσματική θεραπευτική αντιμετώπιση των ασθενών με καρκίνο καθιστώντας τη γονιδιακή θεραπεία αναπόσπαστο εργαλείο της θεραπευτικής του μέλλοντος.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5



### ΤΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ *ras*

- 5.1. Γενικά
- 5.2. Δομή των ογκογονιδίων *ras*
- 5.3. Ρύθμιση των ογκογονιδίων *ras*
- 5.4. Η πρωτεΐνη p21
- 5.5. Η ενεργοποίηση των ογκογονιδίων *ras* στον καρκίνο
  - 5.5.1. Μεταλλάξεις των ογκογονιδίων *ras*
  - 5.5.2. Υπερέκφραση των ογκογονιδίων *ras*
- 5.6. Ο πιθανός ογκοκατασταλτικός ρολος των ογκογονιδίων *ras*
- 5.7. Τα ογκογονίδια *raf*

#### 5.1. Γενικά

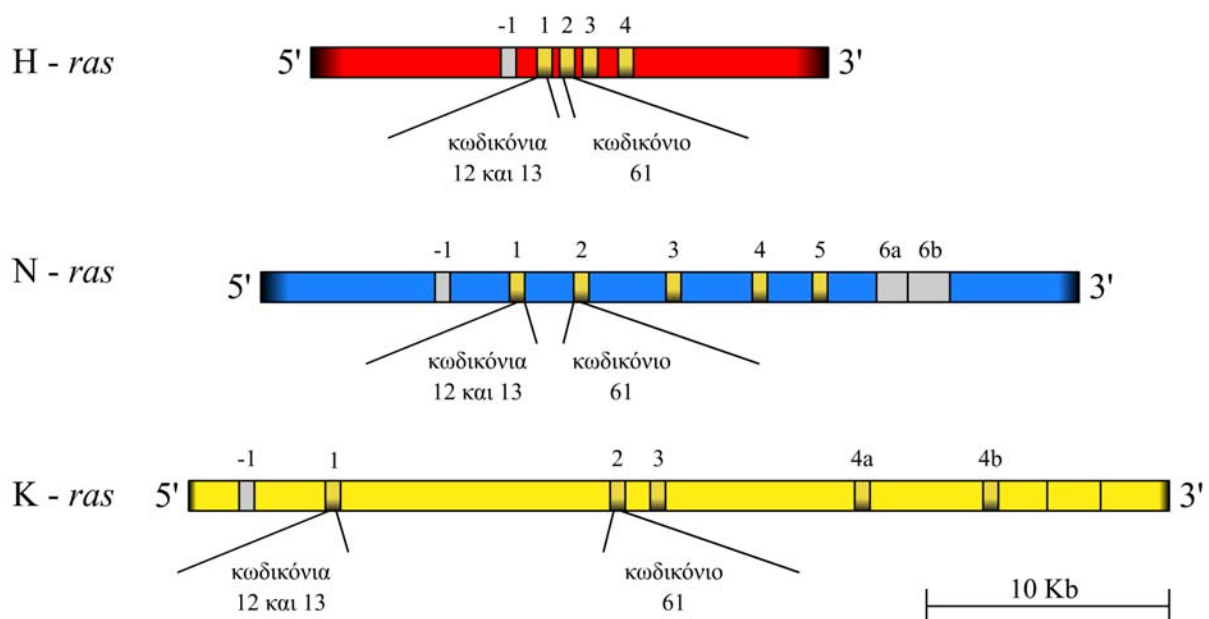
Τα ογκογονίδια της οικογένειας *ras* κατέχουν σημαντική θέση στη ρύθμιση βασικών κυτταρικών λειτουργιών, όπως ο πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίηση του κυττάρου και συγκαταλέγονται μεταξύ των κυριότερων γονιδίων με καθοριστικό ρόλο στην καρκινογένεση (Bar-Sagi, 2001, Rebollo και Martinez, 1999). Στον άνθρωπο έχουν ταυτοποιηθεί τρία γονίδια *ras*: το *K-ras* στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 12 (12p12.1-p13), το *H-ras* στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 11 (11p15.1-p15.5) και το *N-ras* στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 1 (1p22-p32). Έχουν επίσης ταυτοποιηθεί και δύο ψευδογονίδια, τα *H-ras 2* και *K-ras 1*, τα οποία όμως δεν είναι λειτουργικά.

#### 5.2. Δομή των ογκογονιδίων *ras*

Η δομή και των τριών γονιδίων (Σχήμα 5.1) είναι παρόμοια, έχοντας ένα 5' μη κωδικοποιό εξώνιο (εξώνιο-1), τέσσερα κωδικοποιά εξώνια και μια περιοχή πολλαπλών

διαδοχικών επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών (VTR) στο μη μεταγραφόμενο 3' άκρο του γονιδίου (Ishii και συν, 1985). Τα μήκη των αντίστοιχων εξωνίων είναι παρόμοια, ενώ τα μήκη των εσωνίων διαφέρουν αρκετά, με αποτέλεσμα τα συνολικά μήκη των τριών γονιδίων να είναι διαφορετικά: το *K-ras* έχει μήκος περίπου 50 Kb, το *H-ras* 4,5 Kb και το *N-ras* περίπου 10 Kb. Το *K-ras* φέρει δύο εναλλακτικά τέταρτα εξώνια, τα 4A και 4B. Οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα *K-ras*, *H-ras* και *N-ras* αποτελούνται από 189 αμινοξέα, ενώ του *K-ras* αποτελείται από 188 αμινοξέα, διότι το 4B εξώνιο έχει ένα κωδικόνιο λιγότερο.

**Σχήμα 5.1.** Τα γονίδια *H-ras*, *N-ras* και *K-ras*. Τα κωδικόνια 12, 13 και 61 που φαίνονται στο σχήμα αποτελούν τα σημεία, όπου απαντώνται συχνότερα σημειακές μεταλλάξεις.

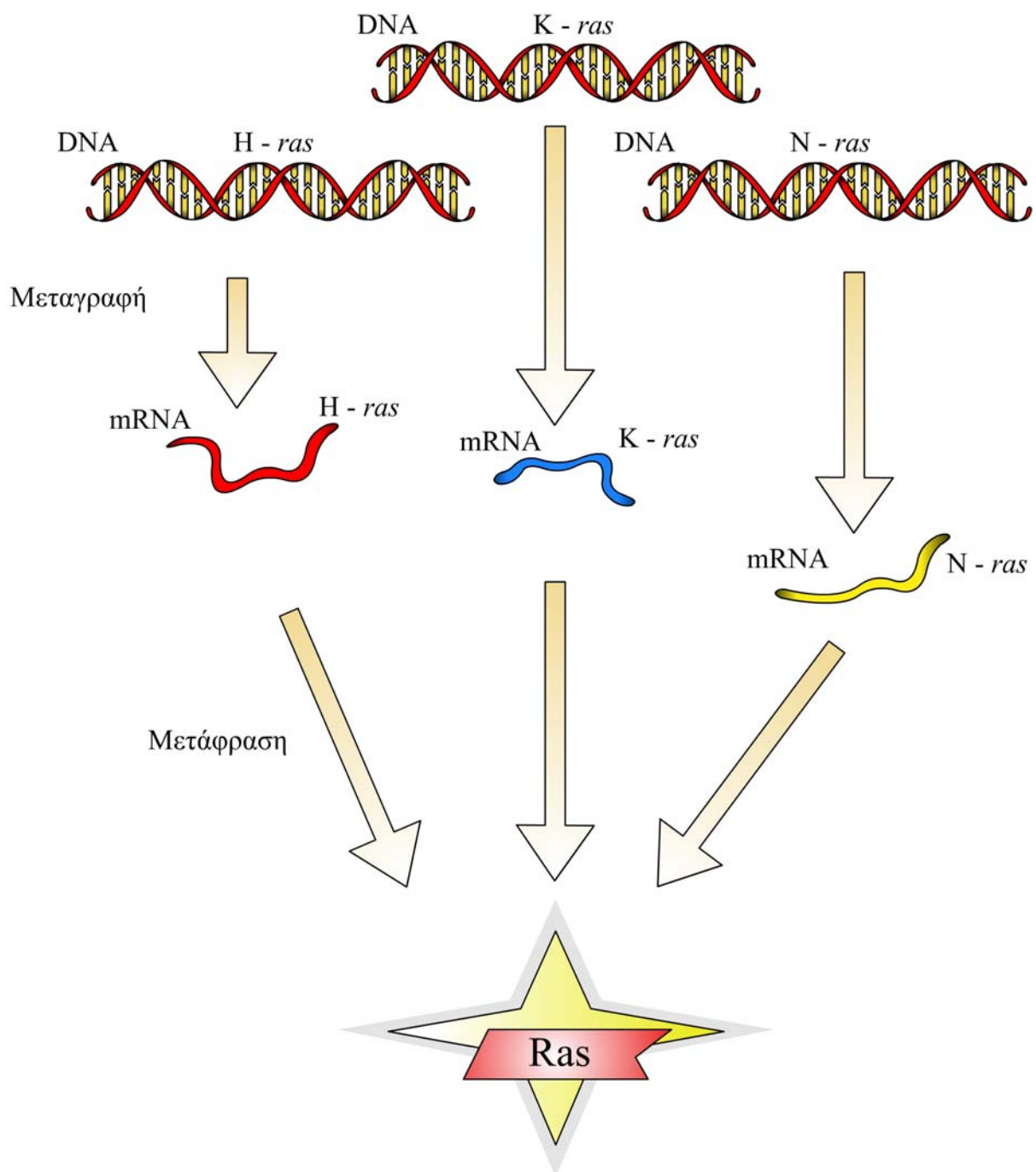


Οι υποκινητές των τριών *ras* γονιδίων έχουν κοινά δομικά χαρακτηριστικά, που απορρέουν από τη συντηρητική συμπεριφορά τους κατά την εξελικτική διαδικασία. Έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε γουανίνη και κυτοσίνη (GC), ενώ δε διαθέτουν αλληλουχίες TATA ή CAT, χαρακτηριστικά που απαντώνται σε πολλά ακόμη ογκογονίδια.

### 5.3. Ρύθμιση των ογκογονιδίων *ras*

Στο Σχήμα 5.2 παρουσιάζεται η μεταγραφή και η μετάφραση της πρωτεΐνης Ras, η οποία ελέγχεται από μια σειρά από ρυθμιστικούς μηχανισμούς, με κυριότερο τον έλεγχο σε μεταγραφικό επίπεδο.

Σχήμα 5.2. Μεταγραφή και μετάφραση πρωτεΐνης Ras.

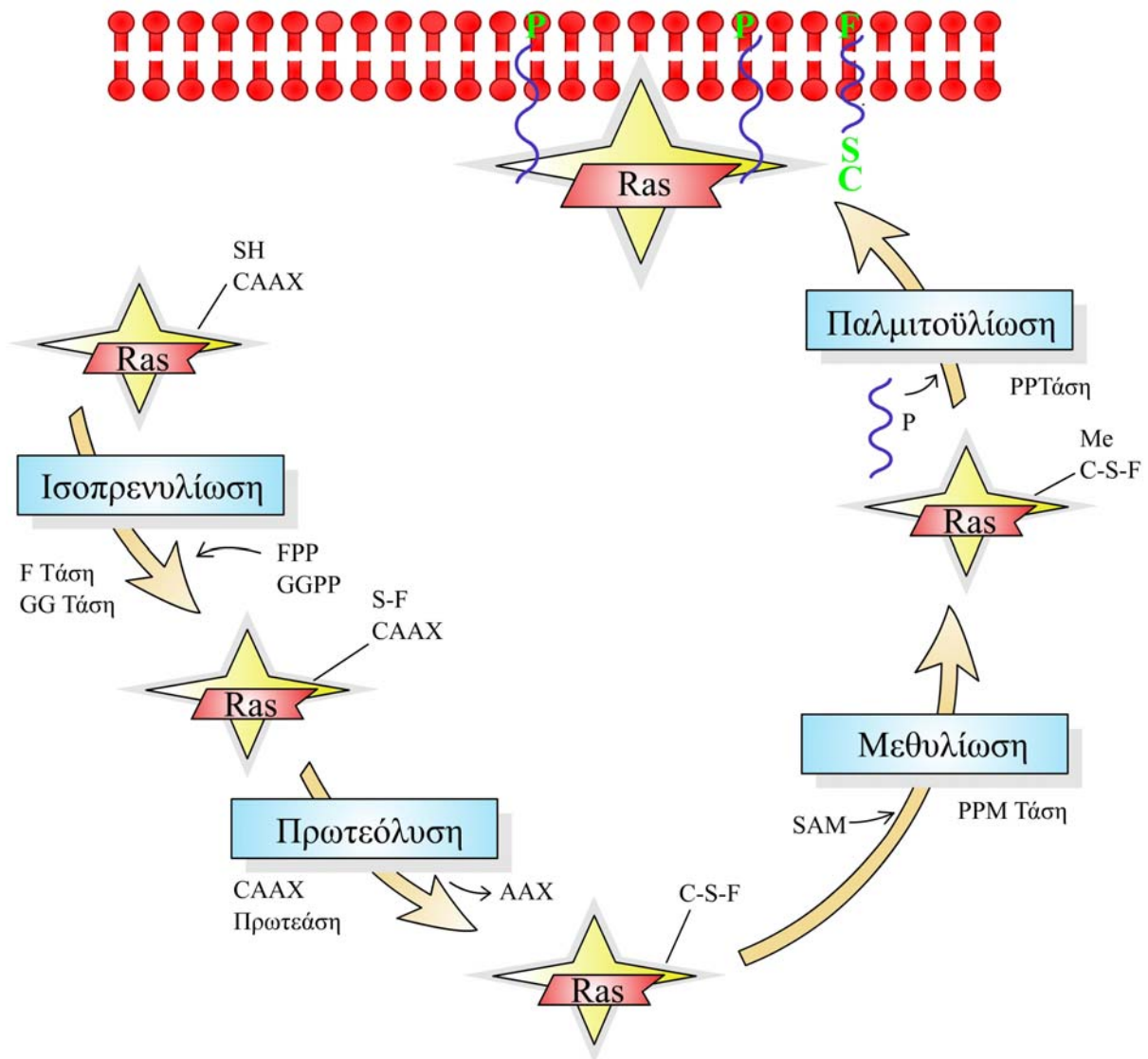


Τα ρυθμιστικά μεταγραφικά στοιχεία των γονιδίων *ras* έχουν μελετηθεί εκτενώς. Φαίνεται πως υπάρχουν αρκετές θέσεις έναρξης της μεταγραφής εντοπισμένες σε μια περιοχή 40bp μέσα στο εσώνιο-1. Στη ρύθμιση της έκφρασης των *ras* εμπλέκονται ρυθμιστικές περιοχές που έχουν τη δυνατότητα πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων (Lowndes και συν, 1989). Τέτοια ρυθμιστικά στοιχεία έχουν αναγνωριστεί στην περιοχή του υποκινητή και στο πρώτο εσώνιο του *H-ras*. Τα στοιχεία του πρώτου εσωνίου τροποποιούν την έκφραση του γονιδίου σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο, με θετικό και αρνητικό τρόπο. Στο ίδιο εσώνιο έχουν αναγνωριστεί δύο ακόμη θέσεις με λειτουργική σημασία για τη μεταγραφή, μια με ειδικότητα σύνδεσης της πρωτεΐνης p53 και η δεύτερη με ενεργότητα πρόσδεσης υποδοχέων γλυκοκορτικοειδών (glucocorticoid response element-GRE). Παρόμοια περιοχή υπάρχει για οιστρογονικούς υποδοχείς (ERE) στο τέταρτο εσώνιο του *H-ras* (Zachos και Spandidos, 1997).

Στο μηχανισμό έκφρασης των γονιδίων *ras* εμπλέκονται επίσης ρυθμιστικές θέσεις της 3' περιοχής τους. Πρόκειται για επαναλαμβανόμενες μινιδουροφορικές DNA αλληλουχίες (VTR) ευρισκόμενες 3' του πολυαδενυλικού σήματος, οι οποίες κατέχουν ενεργότητα πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων. Οι ρυθμιστικές πρωτεΐνες της μεταγραφής *rel/NF-kB* προσδέονται στη VTR περιοχή του *H-ras* (Trepicchio και Krontiris, 1992) και προκαλούν την ικανότητα μετασχηματισμού κυττάρων μέσω υπερέκφρασης του γονιδίου (Krontiris και συν, 1993). Στη ρύθμιση, τέλος, της έκφρασης των *ras* υπεισέρχονται ακόμη η μεθυλίωση των υποκινητών τους και ο μηχανισμός του εναλλακτικού ματίσματος στις ρυθμιστικές αλληλουχίες του τέταρτου εσωνίου και της 3' VTR περιοχής του *H-ras* (Hwang και Cohen, 1997).

Στη ρύθμιση πρωτεΐνης Ras εμπλέκονται τέλος μια σειρά από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις του μορίου της, πριν αυτό μεταφερθεί και ενσωματωθεί στην κυτταρική μεμβράνη (Σχήμα 5.3).

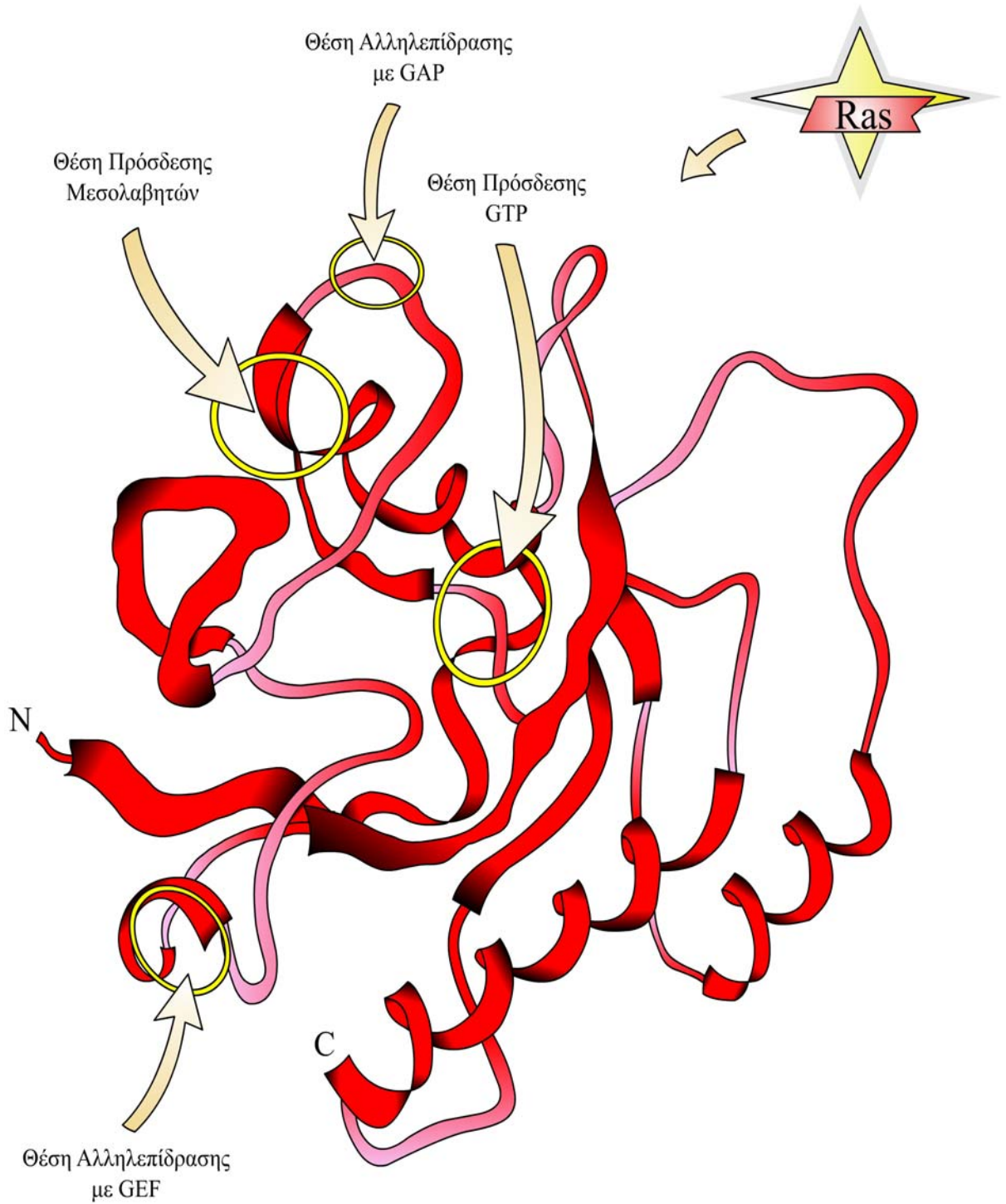
Σχήμα 5.3. Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις πρωτεΐνης Ras.



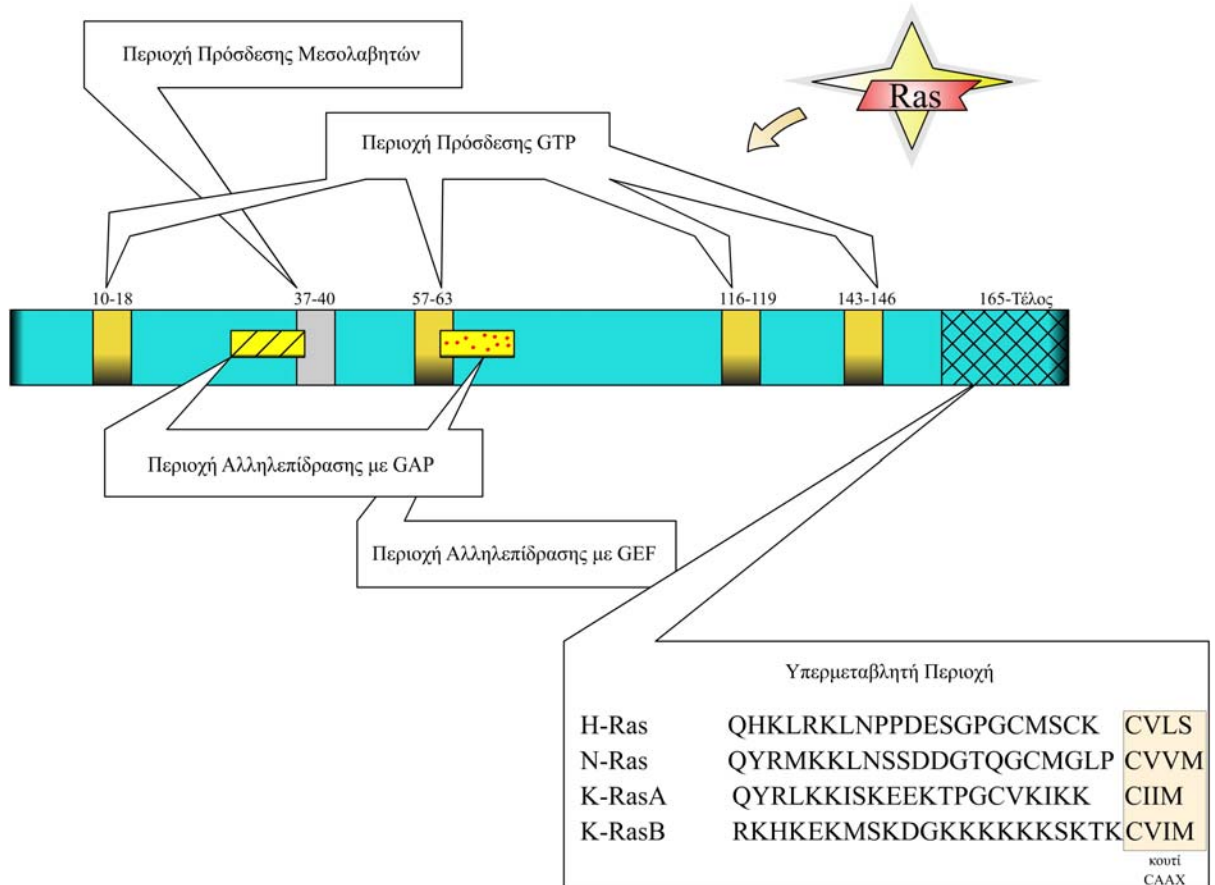
#### 5.4. Η πρωτεΐνη p21

Η πρωτεΐνη p21 ή Ras (Σχήματα 5.4 και 5.5) που κωδικοποιείται από τα ογκογονίδια *ras* είναι μια GTPάση, μοριακού βάρους 21kDa, που προσδένεται στη μεμβράνη του κυττάρου. Η φυσιολογική p21ras (Ras) υδρολύει GTP σε συγκρίσιμα επίπεδα με αυτά των καθαρών G πρωτεϊνών και εμφανίζεται σε ισορροπία, όπως φαίνεται στο Σχήμα 5.6, μεταξύ μια ενεργής μορφής (GTP-Ras) και μιας ανενεργής (GDP-Ras) (Wittinghofer, 1998). Τα επίπεδα της απελευθέρωσης GDP και της υδρόλυσης GTP αυξάνονται από την επιρροή

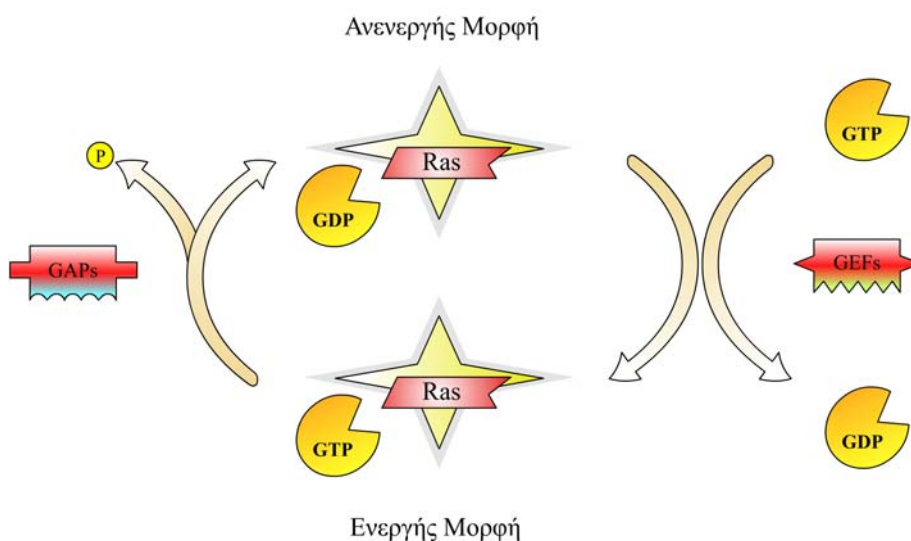
**Σχήμα 5.4.** Τρισδιάστατη δομή πρωτεΐνης Ras. Στο σχήμα παρουσιάζονται οι θέσεις πρόσδεσης των μεσολαβητών μορίων, οι θέσεις πρόσδεσης GTP, καθώς και οι θέσεις αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης Ras με τα GEFs και GAPs.



**Σχήμα 5.5.** Δομή πολυπεπτιδικής αλληλουχίας πρωτεΐνης Ras. Στο σχήμα παρουσιάζονται οι περιοχές της πολυπεπτιδικής αλυσίδας που ευθύνονται για την πρόσδεση των μεσολαβητών μορίων, την πρόσδεση GTP, καθώς και οι περιοχές αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης Ras με τα GEFs και GAPs.



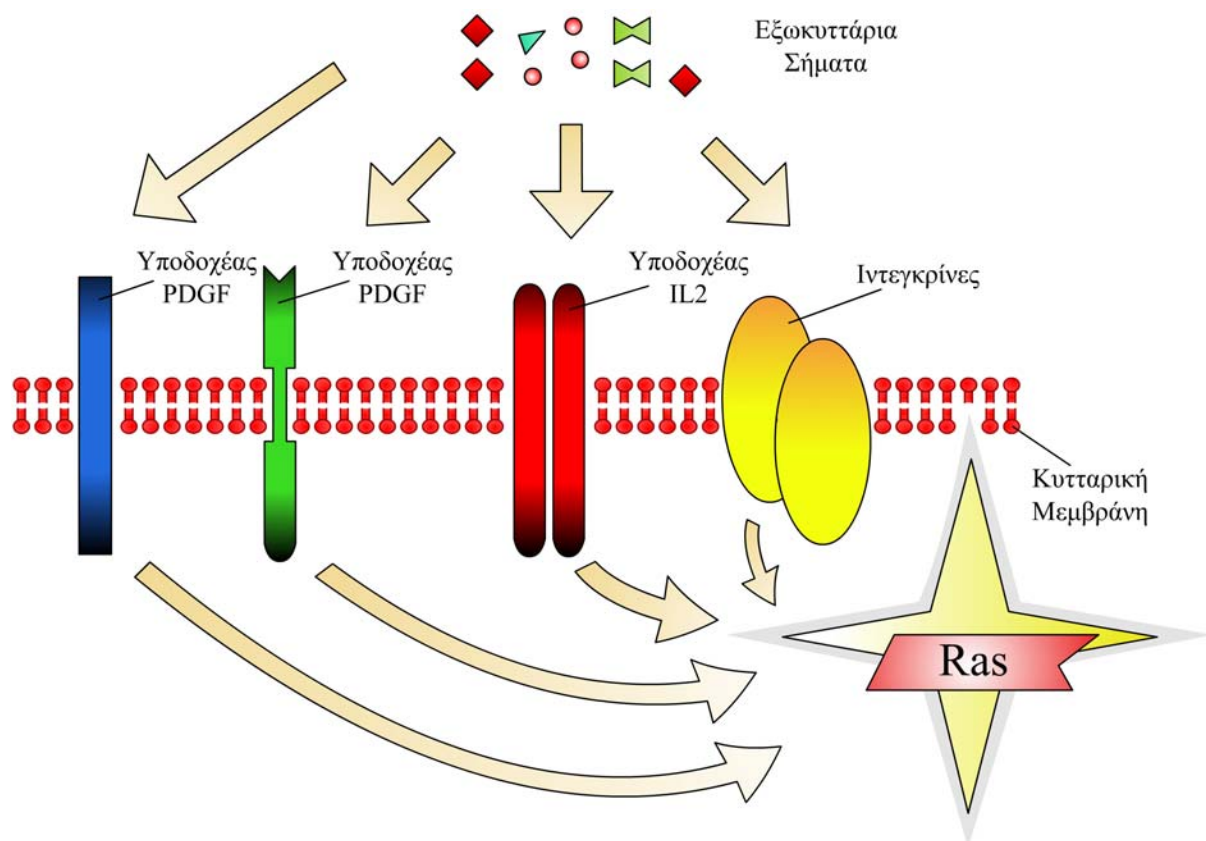
**Σχήμα 5.6.** Οι μορφές της πρωτεΐνης Ras. GAPs: πρωτεΐνες ενεργοποιητές GTPάσης (GTPase-activating proteins) GEFs: παράγοντες ανταλλαγής νουκλεοτιδίων της γουανίνης (guanine nucleotide exchange factors).



τριών κατηγοριών ρυθμιστικών πρωτεϊνών: τις GAP (GTP-ase activating proteins) που αυξάνουν τα επίπεδα υδρόλυσης του GTP, τις GNRP (guanine nucleotide exchange factors) που καταλύουν την απελευθέρωση του δεσμευμένου GDP και τις GDI ( guanine nucleotide dissociation inhibitors) που αναστέλλουν την αντικατάσταση του GDP από το GTP και μπορούν επίσης να αναστέλλουν τη δράση των GAP πρωτεϊνών (Boguski και McCormick, 2001). Οι φυσιολογικές πρωτεΐνες εμπλέκονται στον έλεγχο της κυτταρικής αύξησης και διαφοροποίησης μέσω της μεταβίβασης μιας σειράς μηνυμάτων στο εσωτερικό του κυττάρου (White και Anderson, 2001).

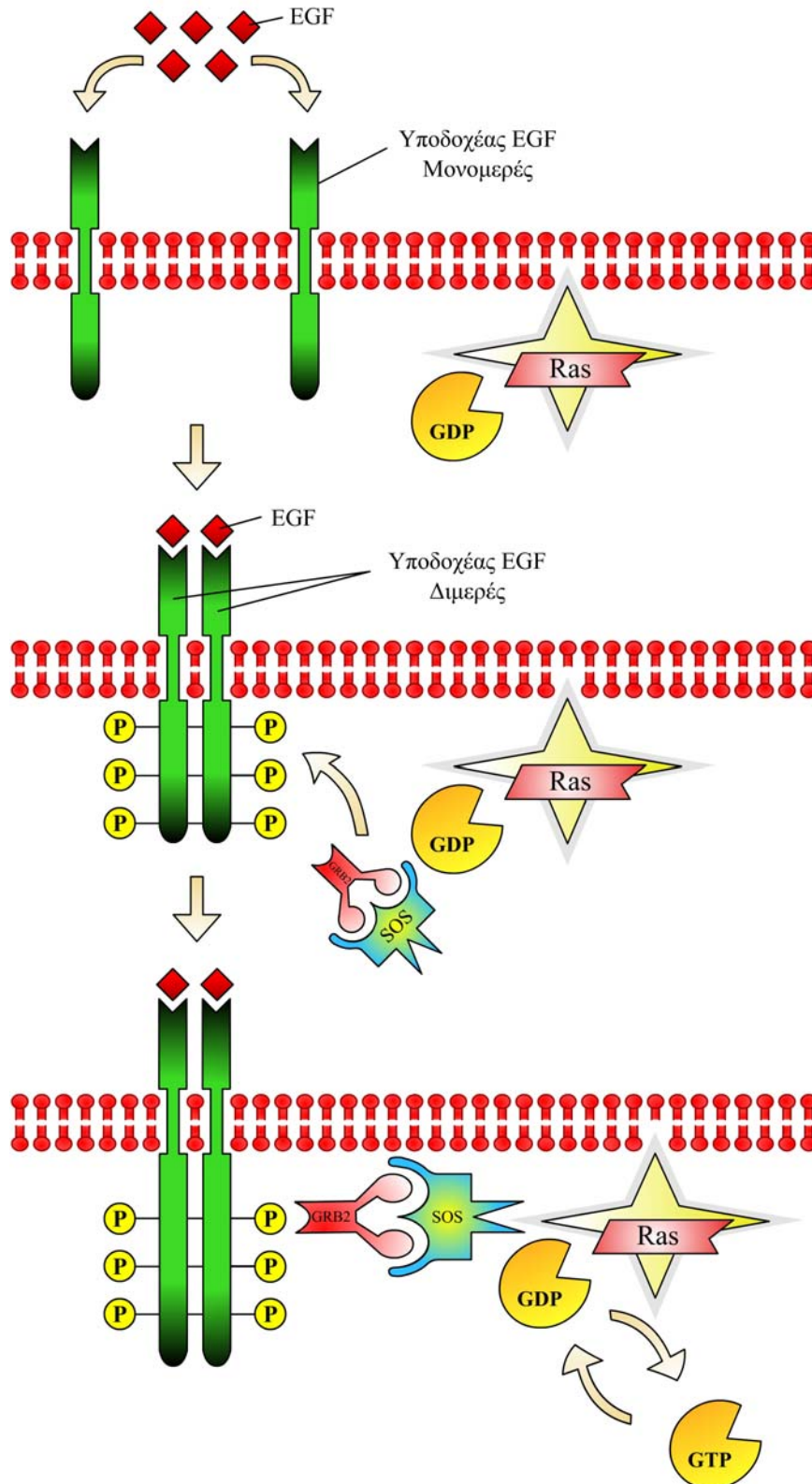
Στα κύτταρα των θηλαστικών μια σειρά από εξωκυττάρια σήματα μέσω κυτταρικών υποδοχέων, όπως οι υποδοχείς των PDGF, EGF και IL-2 (Σχήμα 5.7), οδηγούν στην ενεργοποίηση της πρωτεΐνης Ras. Στο Σχήμα 5.8 παρουσιάζεται ο τρόπος ενεργοποίησης της πρωτεΐνης Ras μέσω του μορίου EGF.

Σχήμα 5.7. Ενεργοποιητές πρωτεΐνης Ras.





**Σχήμα 5.8.** Ενεργοποίηση πρωτεΐνης Ras από τον EGF. Η πρόσδεση του EGF στον υποδοχέα του EGF έχει ως αποτέλεσμα το διμερισμό του υποδοχέα, τη σύνδεση του με το πρωτεϊνικό σύμπλεγμα GRB2-Sos και την επαγωγή από την πρωτεΐνη Sos της αποδέσμευσης του GDP από την πρωτεΐνη Ras.

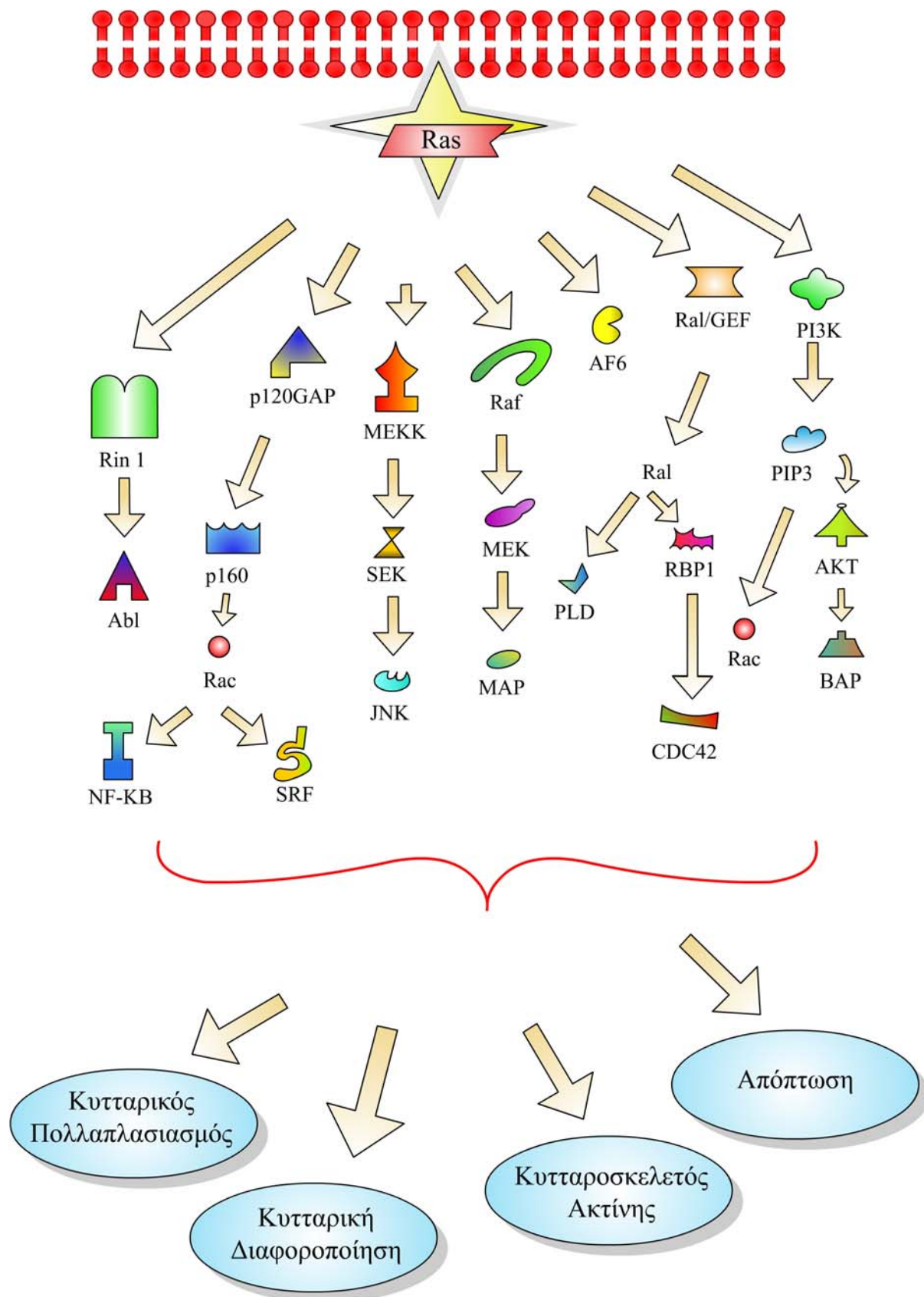


Η ενεργοποίηση της πρωτεΐνης Ras ενεργοποιεί μια σειρά από πρωτεϊνικά μόρια (Σχήμα 5.9), μεταξύ των οποίων οι κινάσες Raf, η πρωτεΐνη Ral/GEF και η PI3K, που με τη σειρά τους ενεργοποιούν άλλα μόρια. με τελικό αποτέλεσμα τη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, των μηχανισμών απόπτωσης, του κυτταροσκελετού ακτίνης και της κυτταρικής διαφοροποίησης (Mammas και συν, 2005, Rusanescu και συν, 2001, Xing και συν, 1996). Επιπλέον η πρωτεΐνη Ras ενεργοποιεί τη λειτουργία της πρωτεϊνικής κινάσης C και της αντλίας Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>, το μεταβολισμό των φωσφολιπιδίων και σε διάφορους τύπους κυττάρων τη μεταγραφή πολλών γονιδίων όπως τα ODC1, FOS, JUN, JUNB, MDR1, MYC, p9Kα/42A, TGFα και TGFβ. Η πρωτεΐνη Ras καταστέλλει τη μεταγραφή των γονιδίων MYOD1, MYOH, Myf5, MRF4, μυογενίνης, PDGF υποδοχέα και της φιμπρονεκτίνης (Sistonen και συν, 1989). Δύο οικογένειες μεταγραφικών παραγόντων, οι AP1/ATF και ETS, έχουν αναγνωριστεί ως βασικοί πυρηνικοί διαμεσολαβητές της λειτουργίας της πρωτεΐνης Ras. Η έκφραση του *H-ras* ενισχύει την ικανότητα ενεργοποίησης του NET, ενός παράγοντα που σχετίζεται με τον ETS και διαθέτει ομοιότητα αλληλουχίας με τρεις περιοχές του ELK1 και SAP1 (Giovane και συν, 1994).

### **5.5. Ενεργοποίηση των ογκογονιδίων *ras* στον καρκίνο**

Η ενεργοποίηση των γονιδίων *ras* αποτελεί σημαντικό παράγοντα στη πολυσταδιακή διαδικασία της νεοπλασματικής εξαλλαγής σε όλους σχεδόν τους καρκίνους στον άνθρωπο. Ενεργοποίηση των γονιδίων *ras* μπορεί να επιτευχθεί είτε με σημειακές μεταλλάξεις είτε με υπερέκφραση του προϊόντος του γονιδίου με αποτέλεσμα την παραγωγή δομικά αλλοιωμένης πρωτεΐνης Ras ή φυσιολογικής σε υπερβολικές ποσότητες αντίστοιχα, και τη γενετική αποδιοργάνωση των κυττάρων και την ανάπτυξη του καρκινικού φαινότυπου. Έχει επίσης αναφερθεί διαφορετικό πρότυπο μεθυλίωσης των ογκογονιδίων *ras* σε όγκους του ανθρώπου καθώς και πολυμορφισμός των αλληλόμορφων του *ras* (Krontiris και συν, 1993).

Σχήμα 5.9. Μεσολαβητές πρωτεΐνης Ras



### 5.5.1. Μεταλλάξεις των ογκογονιδίων *ras*

Οι μεταλλάξεις των γονιδίων *ras* απαντώνται σε ορισμένα κωδικόνια, τα 12, 13 και 61 (Kiaris και Spandidos, 1995). Οι μεταλλαγμένες Ras είτε στερούνται δράσης GTPάσης, είτε σε αυτές η αποδέσμευση του GTP από την Ras καθίσταται δυσχερής. Η αντικατάσταση π.χ. Γλυκίνης από Βαλίνη στο κωδικόνιο 12 του *K-ras*, που αποτελεί τη συχνότερη μετάλλαξη στα *ras*, προκαλεί δεκαπλάσια ελάττωση του ρυθμού υδρόλυσης GTP με αποτέλεσμα τη συσσώρευση των συμπλεγμάτων Ras-GTP. Οι μεταλλάξεις των γονιδίων *ras* ανιχνεύονται είτε με τη βοήθεια πολυμορφισμού μεγέθους περιοριστικών θραυσμάτων (RFLP), είτε με συνδυασμό ανάλυσης πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονής έλικας (SSCP) και ανάλυσης ετεροδίκλωνου DNA (heteroduplex) ακολουθούμενων από ανάλυση αλληλουχίας DNA (sequencing). Με τις τεχνικές αυτές, μεταλλάξεις των τριών γονιδίων έχουν περιγραφεί στους περισσότερους τύπους ανθρώπινου καρκίνου. Η ανεύρεση σημειακών μεταλλάξεων στο κωδικόνιο 12 του *K-ras* στο 90% των αδενοκαρκινωμάτων του παγκρέατος αποτελεί μια από τις ισχυρότερες συσχετίσεις γονιδιακής συμμετοχής στον ανθρώπινο καρκίνο.

**Πίνακας 5.1.** Επίπτωση μεταλλάξεων ογκογονιδίων *ras* σε διάφορους τύπους ανθρώπινου καρκίνου.

Τύπος Καρκίνου	Συχνότητα %	Ισομορφή <i>ras</i>
Πνεύμονες	33	K-
Παχύ Έντερο	44	K-
Πάγκρεας	90	K-
Θυρεοειδής	53	H-, K-, N-
	60	H-, K-, N-
Σεμίνωμα	43	K-, N-
Μελάνωμα	13	N-
Ουροδόχος Κύστη	10	H-
Ήπαρ	30	N-
Νεφροί	10	H-
Λευχαιμία	30	N-

Οι μεταλλάξεις των *K-ras* και *H-ras* αφορούν περισσότερο συμπαγείς όγκους, κυρίως αδενοκαρκινώματα και επιθηλιακά νεοπλάσματα αντίστοιχα, ενώ αυτές του *N-ras* απαντώνται κυρίως σε αιματολογικές νεοπλασίες. Συχνά ανευρίσκονται στον ίδιο τύπο καρκίνου μεταλλάξεις σε περισσότερα από ένα γονίδια της οικογένειας (π.χ. μεταλλάξεις των *H-ras* και *K-ras* σε καρκινώματα ήπατος και νεφρού, καθώς και των *H-ras* και *N-ras* σε καρκινώματα θυρεοειδούς αδένου). Μεταλλάξεις παρατηρούνται συχνότερα στο *K-ras* από ό,τι στα υπόλοιπα γονίδια της οικογένειας εξαιτίας του μεγαλύτερου μήκους του γονιδίου αυτού. Έχει βρεθεί σε καρκίνους, όπως το αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα και του παχέος εντέρου, πως οι μεταλλάξεις συμβαίνουν αρκετά νωρίς κατά τη διαδικασία εξέλιξης του όγκου και σχετίζονται με πτωχή πρόγνωση.

### 5.5.2. Υπερέκφραση των ογκογονιδίων *ras*

Ενεργοποίηση των ογκογονιδίων *ras* μέσω υπερέκφρασης έχει τεκμηριωθεί στις περισσότερες μορφές καρκίνου στον άνθρωπο (**Πίνακας 5.2**).

Η αυξημένη έκφραση προκύπτει έπειτα από γονιδιακή επέκταση και παραγωγή πολλών αντιγράφων του γονιδίου ή από αλλοιώσεις ρυθμιστικών αλληλουχιών που καταλήγουν σε απώλεια της μεταγραφικής ρύθμισης. Στη δεύτερη περίπτωση συγκαταλέγονται μετατοπίσεις περιοχών λόγω εναλλακτικού ματίσματος, ενσωμάτωση ικών αλληλουχιών στις ρυθμιστικές περιοχές του γονιδίου ή αυξημένη πρόσδεση στις τελευταίες μεταλλαγμένου ή υπερπαραγόμενου μεταγραφικού παράγοντα. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η απρόσφορη παραγωγή φυσιολογικής δομικά πρωτεΐνης Ras. Το φαινόμενο ανιχνεύεται είτε σε επίπεδο mRNA με συνδυασμό αντίστροφης μεταγραφής και αλυσιδωτής αντίδρασης με πολυμεράση (RT-PCR) ή με υβριδισμό κατά Northern, είτε σε επίπεδο πρωτεΐνης με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους ή υβριδισμό κατά Western.

**Πίνακας 5.2.** Επίπτωση υπερέκφρασης ογκογονιδίων *ras* σε διάφορους τύπους ανθρώπινου καρκίνου.

Τύπος Καρκίνου	Συχνότητα %	Μέθοδος	Ισομορφή <i>ras</i>
Νευροβλάστωμα	50-80	IHC	H-, <i>ras</i>
Κεφαλή-Τράχηλος	54	RT-PCR, RHA	H-, K-
Οισοφάγος	40	NBA	H-
Λάρυγγας	70	IHC	<i>ras</i>
	86	RT-PCR	H-
	78	RT-PCR	K-
	57	RT-PCR	N-
Θυρεοειδής	85	IHC	<i>ras</i>
Πνεύμονες	64-85	IHC	<i>ras</i>
Ήπαρ	60	IHC	<i>ras</i>
Λεπτό έντερο	70	IHC	<i>ras</i>
Στόμαχος	35	IHC, WBA	K-, <i>ras</i>
Παχύ έντερο	31	IHC, RHA	H-, K-, <i>ras</i>
Μαστός	65-70	WBA	<i>ras</i>
Ουροδόχος Κύστη	39	RT-PCR	H-
	58	RT-PCR	K-, N-
Ενδομήτριο	18-95	IHC	<i>ras</i>
Ωοθήκες	45	IHC, WBA	<i>ras</i>
Λευχαιμία	39	RT-PCR	H-
	61	RT-PCR	K-
	67	RT-PCR	N-

*IHC: Ανοσο-ιστοχημεία, RT-PCR: Αντίστροφη μεταγραφή- Αλυσιδωτή αντίδραση της Πολυμεράσης, RHA: Ανάλυση*

*RNA υβριδισμού, NBA: Ανάλυση Northern blot, WBA: Ανάλυση Western blot.*

Εξαιρετικό ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι στον καρκίνο του πνεύμονα τα ογκογονίδια *ras* ενεργοποιούνται μέσω υπερέκφρασης σε διαφορετικό ιστολογικό τύπο απ' ό,τι με μεταλλάξεις (Zachos και Spandidos, 1997). Η υπερέκφραση των *ras* στον πνεύμονα αποτελεί όψιμο γεγονός, σε αντίθεση με άλλους τύπους καρκίνου, όπως της κεφαλής-τραχήλου και της ουροδόχου κύστης, όπου συμβαίνει πρώιμα. Η αυξημένη έκφραση του γονιδίου H-*ras* συσχετίζεται με τα επίπεδα πρόσδεσης στους αντίστοιχους υποδοχείς. Αυτό συμβαίνει με τα ρυθμιστικά στοιχεία της Ras και τους υποδοχείς γλυκοκορτικοειδών και οιστρογόνων σε γυναικολογικούς καρκίνους. Η σύνδεση της p53 με το ρυθμιστικό της στοιχείο συνεπάγεται αυξημένη έκφραση τόσο της Ras, όσο και της ίδιας της φυσιολογικής

p53. Στον καρκίνο του μαστού η υπερέκφραση των γονιδίων *ras* αποτελεί πρώιμο ογκογενετικό γεγονός (Miyakis και συν, 1998) και η ανοσοϊστοχημική έκφραση της Ras σχετίζεται με δυσμενή πορεία νόσου, σε αντίθεση με τη συσχέτιση του φαινομένου με ευνοϊκή πρόγνωση σε περιπτώσεις νευροβλαστώματος (Brooksbank, 2002).

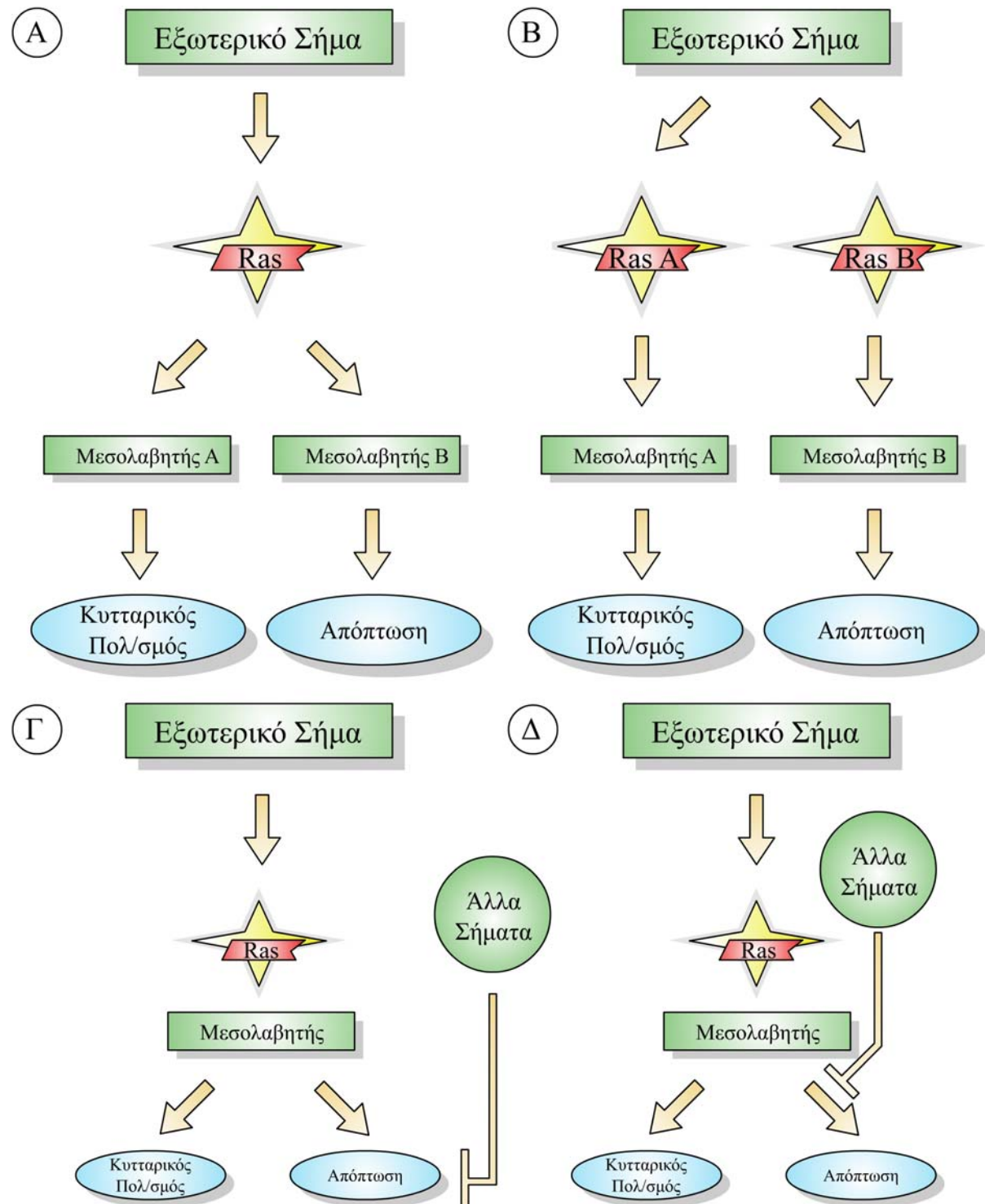
### **5.6. Ο πιθανός ογκοκατασταλτικός ρολος των ογκογονιδίων *ras***

Παρά το γεγονός πως η φυσιολογική πρωτεΐνη Ras έχει την ικανότητα να μετασχηματίζει κύτταρα όταν παράγεται σε υπερβολικές ποσότητες, η έκφραση των φυσιολογικών *ras* γονιδίων σε καρκινικά κύτταρα παρουσιάζει ογκοκατασταλτικές ιδιότητες (Spandidos και συν, 2002).

Ο ογκοκατασταλτικός ρόλος των *ras* αναφέρθηκε για πρώτη φορά από τους Spandidos και συν, οι οποίοι έδειξαν σε καρκινικές κυτταρικές σειρές πως η έκφραση του φυσιολογικού H-*ras* 1 γονιδίου καταστέλλει τον καρκινικό φαινότυπο λόγω της έκφρασης μεταλλαγμένου H-*ras* ή μεταλλαγμένου N-*ras*. Πρόσφατα, με τη δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών επιβεβαιώθηκε ο ογκοκατασταλτικός ρόλος των φυσιολογικών *ras* γονιδίων (wild-type *ras*) σε όγκους του πνεύμονα και του μαστού (Thompson και συν, 2002, Zhang και συν, 2001, Asamoto και συν, 2000). Τα πειραματικά αυτά αποτελέσματα συμφωνούν με κλινικές παρατηρήσεις, όπου η έκφραση φυσιολογικού H-*ras* 1 σε καρκίνους της κεφαλής και του τραχήλου έχει συσχετιστεί με καλή πρόγνωση.

Έχει προταθεί πως για την καρκινογένεση η ενεργοποίηση των *ras* γονιδίων απαιτεί επιπρόσθετα γεγονότα, όπως η υπερέκφραση των μεταλλαγμένων αλληλίων ή η απώλεια των φυσιολογικών. Ο ογκοπροστατευτικός ρόλος των φυσιολογικών *ras* αλληλίων έναντι των μεταλλαγμένων μπορεί να αποδοθεί στην αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού λόγω προαγωγής της διαδικασίας διαφοροποίησης του κυττάρου.

Σχήμα 5.10. Ο διπλός ρόλος της ογκοπρωτεΐνης Ras.





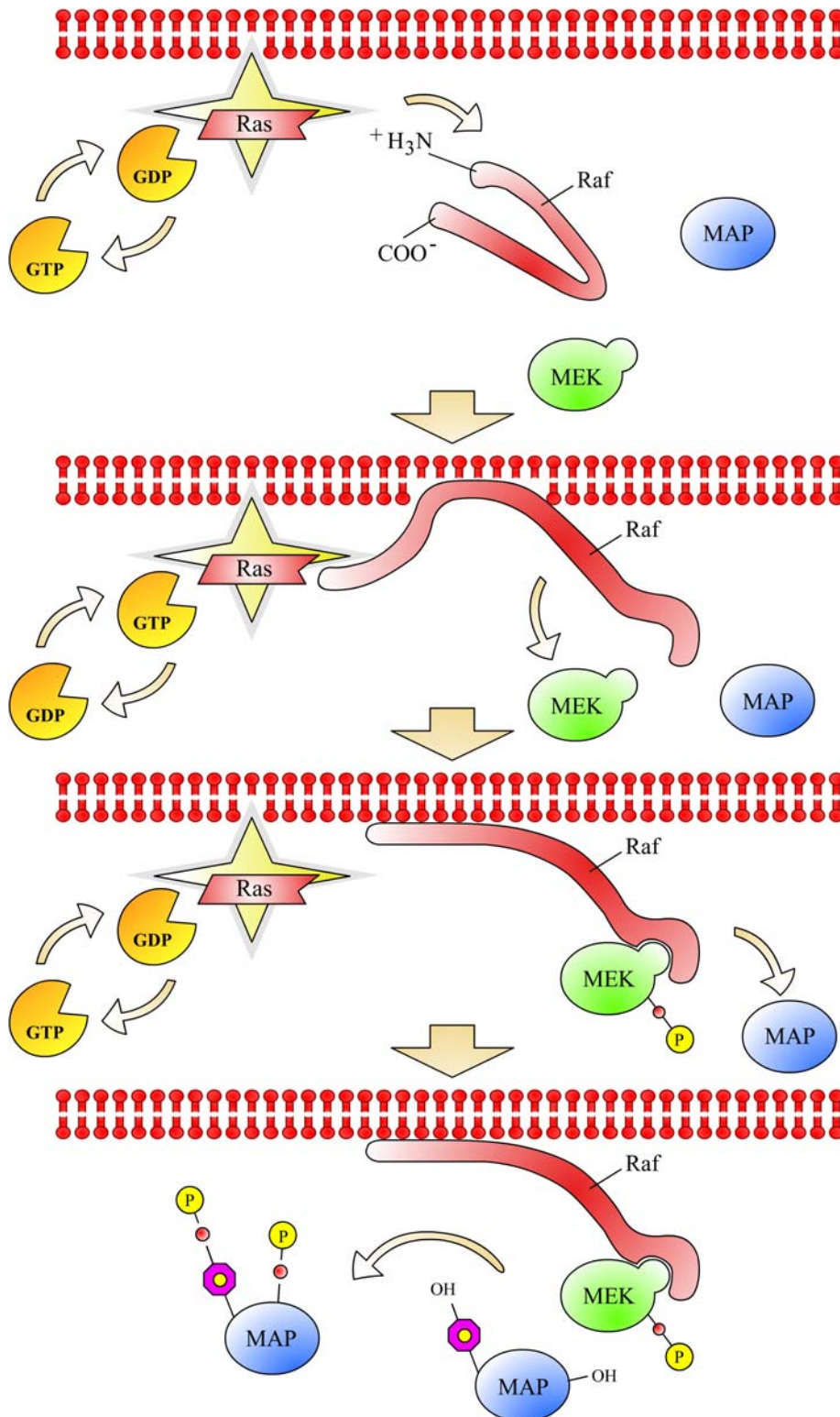
Στο μέλλον αναμένεται να διευκρινιστεί κατά πόσο ο διττός ρόλος της πρωτεΐνης Ras μπορεί να αποδοθεί απευθείας στο διαφορετικό ρόλο των διαφορετικών μορφών της ή το κατά πόσο οφείλεται στην επίδραση της πρωτεΐνη Ras σε διαφορετικούς μεσολαβητές κάθε φορά ή στον ίδιο, ο οποίος όμως έχει διττό ρόλο ή ρυθμίζεται από την παρουσία άλλων κάθε φορά παραγόντων (**Σχήμα 5.10**).

### **5.7. Τα ογκογονίδια *raf***

Τα ογκογονίδια *raf* συνιστούν μια οικογένεια γονιδίων, τα οποία κωδικοποιούν τις κινάσες σερίνης/θρεονίνης Raf-1, A-Raf και B-Raf (Chong και συν, 2003). Η φωσφορυλίωση των Raf κινασών ενεργοποιεί έναν καταρράκτη αντιδράσεων με κύριους μεσολαβητές τις κινάσες MEK και MAP. Η ενεργοποίηση των Raf κινασών συμβαίνει μετά την ενεργοποίηση των Ras, όπως παρουσιάζεται στο σχήμα **Σχήμα 5.11** και η αλληλεπίδραση αυτή μεταξύ Ras-Raf φαίνεται πως είναι κυρίαρχη στην ενεργοποίηση του μονοπατιού της πρωτεΐνης Ras.

Τα ογκογονίδια *raf* έχουν αποκτήσει το τελευταίο διάστημα ιδιαίτερο ερευνητικό λόγω της ενεργοποίησης του *B-raf* μέσω σημειακών μεταλλάξεων σε μια σειρά από καρκίνους συμπεριλαμβανομένων του μελανώματος και του καρκίνου του θυρεοειδούς (Cohen και συν, 2003, Davies και συν, 2002). Στο μέλλον αναμένεται να διευκρινιστεί η σημασία των Raf κινασών στη ρύθμιση του μονοπατιού της πρωτεΐνης Ras καθώς και ο ρόλος κάθε κινάσης ξεχωριστά στην καρκινογένεση στον άνθρωπο.

**Σχήμα 5.11.** Ενεργοποίηση πρωτεΐνης Raf. Στο πρώτο επίπεδο (Επίπεδο 1) παρουσιάζεται η ενεργοποίηση της πρωτεΐνης Ras και η στρατολόγηση της πρωτεΐνης Raf στη μεμβράνη του κυττάρου, στο δεύτερο επίπεδο (Επίπεδο 2) φαίνεται η υδρόλυση του GTP και η ενεργοποίηση της Raf, η οποία αποδεσμεύεται από την πρωτεΐνη Ras-GDP και προκαλεί την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης MEK φωσφορυλιώνοντάς την (Επίπεδο 3), η οποία τέλος με τη σειρά της προκαλεί την φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση της πρωτεΐνης MAP (Επίπεδο 4).



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6



### Ο ΙΟΣ ΤΟΥ ΘΗΛΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ HPV ΣΤΗΝ ΠΑΙΔΙΚΗ ΗΛΙΚΙΑ

- 6.1. Γενικά
- 6.2. Τα θηλώματα στην παιδική ηλικία
  - 6.2.1. Τα θηλώματα του δέρματος
  - 6.2.2. Τα θηλώματα της γεννητικής περιοχής
  - 6.2.3. Η θηλωμάτωση του λάρυγγα
  - 6.2.4. Τα θηλώματα στη στοματική κοιλότητα
- 6.3. Μετάδοση του ιού HPV στα παιδιά
  - 6.3.1. Οριζόντια μετάδοση
  - 6.3.2. Κάθετη μετάδοση
- 6.4. Αντιμετώπιση παιδιών με θηλώματα της γεννητικής περιοχής
  - 6.4.1. Η υποψία της σεξουαλικής κακοποίησης
  - 6.4.2. Το δίλημμα: Σεξουαλική κακοποίηση ή όχι;
  - 6.4.3. Η σημασία της ανίχνευση του ιού HPV
  - 6.4.4. Οδηγίες διαχείρισης και αντιμετώπισης
- 6.5. Θεραπευτική αντιμετώπιση των θηλωμάτων στα παιδιά
- 6.6. Η σημασία του εμβολίου για τον ιο HPV στην παιδική ηλικία

#### 6.1.Γενικά

Ο ιός του θηλώματος του ανθρώπου HPV στην παιδική ηλικία έχει ενοχοποιηθεί για μια σειρά από καλοήθειες αλλοιώσεις σε διάφορες ανατομικές θέσεις, με συχνότερη εκδήλωση τα θηλώματα του δέρματος. Τα θηλώματα της γεννητικής περιοχής αποτελούν βασικό στοιχείο υποψίας σεξουαλικής κακοποίησης στα παιδιά γεγονός με ιδιαίτερες νομικές και κοινωνικές συνέπειες.

Η θηλωμάτωση του λάρυγγα (τύποι HPV 6 και 11) αποτελεί βασικό παράγοντα απόφραξης του ανώτερου αεραγωγού και αντιμετωπίζεται χειρουργικά. Η μετάδοση του ιού στην παιδική ηλικία μπορεί να γίνει με ετερο-ενοφθαλμισμό, αυτο-ενοφθαλμισμό, μεσωφομιτών και με κάθετο τρόπο από την HPV-θετική μητέρα στο νεογνό. Η πιθανότητα της σεξουαλικής κακοποίησης πρέπει να αποκλείεται σε κάθε περιστατικό παιδιού με θηλώματα της γεννητικής περιοχής. Στο Κεφάλαιο αυτό παρουσιάζεται ο ρόλος και η σημασία του ιού στην παιδική ηλικία.

## **6.2. Τα θηλώματα στην παιδική ηλικία**

### **6.2.1. Τα θηλώματα του δέρματος**

Στην παιδική ηλικία τα θηλώματα του δέρματος αποτελούν τη συχνότερη εκδήλωση της λοίμωξης με τον ιό HPV και απαντούν σε διάφορες ανατομικές θέσεις. Η επίπτωση τους είναι μεγαλύτερη στις ηλικίες 12 έως 16 έτη και στα κορίτσια σε σχέση με τα αγόρια (Bacelieri και Jonson, 2005, Plasencia, 2000). Στο 40% των παιδιών τα δερματικά θηλώματα υποχωρούν χωρίς θεραπεία. Σε ορισμένες περιπτώσεις λόγω της ανατομικής τους θέσης μπορούν προκαλέσουν πόνο στο παιδί, γεγονός που απαιτεί τη θεραπευτική τους αντιμετώπιση. Για την εκδήλωση των δερματικών θηλωμάτων στα παιδιά έχουν ενοχοποιηθεί οι δερματικοί τύποι HPV 1, 2, 3 και 4, με συχνότερο τον ιό HPV 2.

### **6.2.2. Τα θηλώματα της γεννητικής περιοχής**

Τα θηλώματα της γεννητικής περιοχής στα κορίτσια παρουσιάζονται τόσο στη γεννητική περιοχή (αιδοίο, κόλπος, ουρηθρική περιοχή) όσο και στην περιπρωκτική περιοχή. Στα αγόρια είναι περισσότερο συχνά στην περιπρωκτική περιοχή, ενώ σπάνια παρουσιάζονται στην περιοχή του πέους. Στο 90% των περιπτώσεων ανιχνεύεται ο ιός HPV με πιο συχνούς τους τύπους HPV 6 και 11 στο 75%, τον τύπο 2 στο 11%, τους τύπους HPV

16 και 18 στο 5% και τους τύπους HPV 27 και 57 στο 3% των HPV θετικών περιπτώσεων (Syrjanen και Puranen, 2000). Στα θηλώματα της γεννητικής περιοχής στα παιδιά απαντούν ακόμα οι τύποι HPV 1, 31, 33, 34, 35, 45 και 56 (Siegfried και συν, 1998).

Πριν το 1990, μόνο 136 περιπτώσεις παιδιών με θηλώματα της γεννητικής περιοχής είχαν αναφερθεί στη βιβλιογραφία, ενώ τα τελευταία χρόνια η επίπτωση αντίστοιχων περιπτώσεων έχει αυξηθεί (Syrjanen και Puranen, 2002, Siegfried και συν, 1998, Armstrong και συν, 1997). Η αύξηση αυτή μπορεί να αποδοθεί τόσο στην αντίστοιχη αύξηση ανίχνευσης θηλωμάτων της γεννητικής περιοχής στους ενήλικες, όσο και στο αυξανόμενο ενδιαφέρον για μελέτη των θηλωμάτων στα παιδιά τα τελευταία χρόνια. Στην Ελλάδα, δεν υπάρχουν επαρκή επιδημιολογικά στοιχεία που να παρουσιάζουν την έκταση του προβλήματος στην παιδική ηλικία.

### **6.2.3. Η θηλωμάτωση του λάρυγγα**

Η θηλωμάτωση του λάρυγγα στην παιδική ηλικία αποτελεί τον πιο συχνό καλοήγη όγκο του λάρυγγα στα βρέφη και τα παιδιά και η επίπτωση της κυμαίνεται μεταξύ 0,6-4,3/100.000. Εντοπίζεται συνήθως στις φωνητικές χορδές, στην επιγλωτίδα ή υπογλωτιδικά, ωστόσο μπορεί να προσβάλει ολόκληρο τον λάρυγγα, το τραχειοβρογχικό δέντρο καθώς επίσης και τους πνεύμονες σε πολύ σπάνιες περιπτώσεις. Η αλλοίωση μπορεί να είναι μονήρης ή πολλαπλή. Κλινικά μπορεί να εκδηλωθεί με αφωνία και με συμπτώματα αναπνευστικής δυσχέρειας λόγω μερικής απόφραξης του ανώτερου αεραγωγού. Η απόφραξη μπορεί να εξελιχθεί απειλώντας ακόμα και τη ζωή του παιδιού γεγονός που απαιτεί έγκαιρη χειρουργική αντιμετώπιση και νοσηλεία του σε Μονάδα Εντατικής Θεραπείας.

Η εμφάνιση της θηλωμάτωσης του λάρυγγα στην παιδική ηλικία συμβαίνει στα 5 πρώτα χρόνια της ζωής του παιδιού και η σοβαρότητα της σχετίζεται αντίστροφα με την ηλικία έναρξης (Somers και συν, 1997). Παρουσιάζεται πιο συχνά σε πρωτότοκα παιδιά, τα

οποία έχουν γεννηθεί με φυσιολογικό τοκετό από μητέρες μικρής ηλικίας (Sytjanen και Puranen, 2000). Για την εμφάνιση της θηλωμάτωσης του λάρυγγα στην παιδική ηλικία έχουν ενοχοποιηθεί οι τύποι HPV 6 και 11 (Wiatrak και συν, 2004). Η κάθετη μετάδοση του ιού και η πολύ σπάνια εμφάνιση της θηλωμάτωσης του λάρυγγα σε παιδιά που έχουν γεννηθεί με καισαρική τομή έχουν οδηγήσει σε αρκετή συζήτηση τα τελευταία χρόνια σχετικά με το ρόλο της καισαρικής τομής σε γυναίκες με HPV-συσχετιζόμενες αλλοιώσεις κατά την εγκυμοσύνη (Shah και συν, 1998).

#### **6.2.4. Τα θηλώματα της στοματικής κοιλότητας**

Στο στοματικό βλεννογόνο μπορούν επίσης να εμφανιστούν HPV-συσχετιζόμενα θηλώματα χωρίς ιδιαίτερο κλινικό ενδιαφέρον. Πρόσφατα η υποκλινική ανίχνευση του ιού στη στοματική κοιλότητα σε ασυμπτωματικά παιδιά έχει δημιουργήσει νέα ερωτήματα σχετικά με τους τρόπους μετάδοσης του ιού στην παιδική ηλικία και το ρόλο της παρουσίας του στο στοματικό βλεννογόνο στα παιδιά (Sytjanen και Puranen, 2000, Cason και Mant, 2005). Στην παρούσα διατριβή εξετάζεται ο ρόλος του ιού στην καλοήγη υπερπλασία των αδενοειδών και αμυγδαλοειδών εκβλαστήσεων, όπως περιγράφεται στα Κεφάλαιο 7, 9 και 10.

### **6.3. Μετάδοση του ιού HPV στα παιδιά**

#### **6.3.1. Οριζόντια μετάδοση**

Ο ιός του θηλώματος του ανθρώπου HPV στα παιδιά μεταδίδεται με τη σεξουαλική επαφή, με ετερο-ενοφθαλμισμό, αυτο-ενοφθαλμισμό, ή από μολυσμένες επιφάνειες ή αντικείμενα μέσω φομιτών. Σε αντίθεση με τους ενήλικες, στους οποίους η σεξουαλική οδός αποτελεί την κύρια οδό μετάδοσης του ιού, στα παιδιά οι μη-σεξουαλικάσυσχετιζόμενοι τρόποι φαίνεται πως είναι πολύ πιο συχνοί. Ωστόσο η πιθανότητα της σεξουαλικής

κακοποίησης πρέπει σε κάθε περίπτωση να διερευνάται διεξοδικά. Ο αυτο-ενοφθαλμισμός του ιού συμβαίνει λιγότερο συχνά και συνίσταται στη μετάδοση του ιού από ένα σημείο του σώματος του παιδιού σε άλλο από το ίδιο το παιδί. Ο ιός μπορεί να μεταδοθεί με ετερο-ενοφθαλμισμό στο παιδί τόσο από τη μητέρα του, όσο και από τα άτομα που το φροντίζουν άμεσα και έρχονται σε καθημερινή επαφή με αυτό. Οι φομίτες, οι οποίοι απαντούν σε μολυσμένα αντικείμενα ή επιφάνειες, είναι σταγονίδια, στα οποία ανιχνεύεται ο ιός και μέσω των οποίων μπορεί δυνητικά να μεταδοθεί. (Hornor, 2004, Syrjanen και Puranen, 2000).

### 6.3.2. Κάθετη μετάδοση

Η κάθετη μετάδοση του ιού HPV συνίσταται στη μετάδοση του ιού από τη μητέρα στο βρέφος (Adams, 2001). Στον **Πινάκα 6.1** παρουσιάζονται οι πιθανοί τρόποι κάθετης μετάδοσης του ιού κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, κατά τον τοκετό αλλά και μετά από αυτόν.

**Πίνακας 6.1.** Πιθανοί τρόποι μετάδοσης του ιού HPV στην παιδική ηλικία.

Οριζόντια μετάδοση	
	Σεξουαλική κακοποίηση
	Ετερο-ενοφθαλμισμός
	Αυτο-ενοφθαλμισμός
	Μολυσμένες επιφάνειες/Μολυσμένα αντικείμενα (μέσω φομιτών)
Κάθετη μετάδοση από τη μητέρα στο βρέφος	
	Κατά τη φάση του εγκυμοσύνης
	Μέσω του πλακούντα
	Ως ανιούσα γενετική λοίμωξη
	Κατά τη φάση του τοκετού
	Δίοδος βρέφους στον κόλπο της μητέρας
	Ρήξη μεμβρανών
	Μολυσμένες επιφάνειες/Μολυσμένα αντικείμενα (μέσω φομιτών)
	Κατά τη φάση μετά τον τοκετό
	Μέσω του θηλασμού
	Με ετερο-ενοφθαλμισμό

*Τροποποιημένο από Syrjanen και Puranen, 2000.*

Παρά το γεγονός πως η διάδος του βρέφους κατά τον τοκετό από τον κόλπο της μητέρας αποτελεί τον πιθανότερο τρόπο μετάδοσης του ιού, η ανίχνευση του ιού καθώς και

HPV-συσχετιζόμενων αλλοιώσεων σε νεογνά ύστερα από καισαρική τομή χωρίς πρόωμη ρήξη μεμβρανών καθιστά αναγκαία περαιτέρω τη διερεύνηση των τρόπων κάθετης μετάδοσης του (Syrtjanen και Puranen, 2000). Ως εναλλακτικοί τρόποι μετάδοσης του ιού έχουν προταθεί η οδός μέσω του πλακούντα, παρά την απουσία ενδείξεων που να υποστηρίζουν την HPV ιαιμία καθώς και η ανιούσα λοίμωξη του γεννητικού συστήματος στη μητέρα.

Η απουσία θηλωμάτων ή ορατών HPV-συσχετιζόμενων αλλοιώσεων στη μητέρα πριν τον τοκετό δεν αποκλείει την μετάδοση του ιού στο βρέφος. Στο βρέφος ο ιός μπορεί να παραμείνει σε λανθάνουσα κατάσταση μήνες ή ακόμα και 5 χρόνια μετά τη γέννηση και μπορεί να εκδηλωθεί κλινικά σε οποιαδήποτε ανατομική θέση (Frazier, 1998). Η ποικίλη σε διάρκεια λανθάνουσα φάση του ιού αποτελεί τον λόγο για τον οποίο δεν μπορεί να καθοριστεί ακριβώς η ηλικία, πάνω από την οποία η παρουσία HPV-συσχετιζόμενων αλλοιώσεων δεν πρέπει να αποδίδεται στην κάθετη μετάδοση του ιού. Με βάση τα νεότερα δεδομένα το όριο αυτό μπορεί να τοποθετηθεί στα 2 έτη χωρίς ωστόσο να είναι επαρκή τα επιστημονικά δεδομένα που να το υποστηρίζουν.

#### **6.4. Αντιμετώπιση παιδιών με θηλώματα της γεννητικής περιοχής**

##### **6.4.1. Η υποψία της σεξουαλικής κακοποίησης**

Η υποψία οποιασδήποτε μορφής κακοποίησης στα παιδιά (σεξουαλικής, φυσικής, συναισθηματικής ή παραμέλησης) απαιτεί τη λεπτομερή διερεύνηση του περιστατικού με μοναδικό σκοπό την προστασία του παιδιού. Στα πλαίσια αυτά και με βάση τη διακήρυξη της προστασίας των δικαιωμάτων του παιδιού, η αντιμετώπιση τέτοιων περιστατικών απαιτεί τόσο τη διαχείριση τους από ειδική επιστημονική ομάδα, όσο και την προστασία των παιδιών αυτών από το νόμο.



Η υποψία παιδικής σεξουαλικής κακοποίησης απαιτεί την παραπομπή του περιστατικού σε ειδικό ειδικευμένο ιατρό, παιδίατρο ή ιατροδικαστή, ο οποίος καλείται στη συνέχεια να ζητήσει νομικά την προστασία του παιδιού. Η υποψία οφείλει να διερευνηθεί με στόχο την τεκμηρίωση της επιβεβαίωσης ή όχι της σεξουαλικής κακοποίησης, γεγονός με ιδιαίτερες τόσο νομικές και οικογενειακές επιπτώσεις (Siegfried και συν, 1998, Allen και Siegfried, 1998).

#### **6.4.2. Το δίλημμα: Σεξουαλική κακοποίηση ή όχι;**

Παλαιότερα η παρουσία θηλωμάτων στη γεννητική περιοχή στα παιδιά αποδιδόταν αποκλειστικά σε σεξουαλική κακοποίηση. Το γεγονός αυτό ενισχυόταν από το ότι οι τύποι 6 και 11 που αποτελούν τους πιο συχνούς τύπους που ανιχνεύονται στις αλλοιώσεις αυτές μεταδίδονται με τη σεξουαλική επαφή. Ωστόσο, οι νεότερες μελέτες έχουν αναδείξει τους μη-σεξουαλικά συσχετιζόμενους τρόπους μετάδοσης του ιού πολύ πιο συχνούς από ό,τι ήταν γνωστό στο παρελθόν (Armstrong και συν, 1997, Myhre και συν, 2003).

Η κάθετη μετάδοση των τύπων που απαντούν στον τράχηλο της μήτρας της μητέρας (HPV 16, 18, 11, 6) στο νεογνό αποτελεί βασικό παράγοντα αμφιβολίας κατά την αξιολόγηση μιας HPV-σχετιζόμενης αλλοίωσης σε ένα βρέφος. Η ανίχνευση σε θηλώματα της γεννητικής περιοχής τύπων όπως ο HPV 2, ο οποίος απαντά κυρίως σε δερματικές αλλοιώσεις καθιστά πιο πιθανή τη μετάδοση των θηλωμάτων αυτών με αυτο-ενοφθαλμισμό ή ετερο-ενοφθαλμισμό. Ωστόσο στην περίπτωση του ετερο-ενοφθαλμισμού και πάλι δεν μπορεί αντίστροφα να αποκλειστεί η πιθανότητα σεξουαλικής κακοποίησης.

Η διάγνωση της σεξουαλικής κακοποίησης γίνεται με βάση το ιστορικό του παιδιού (Siegfried και συν, 1998). Στον **Πίνακα 6.2** παρουσιάζονται στοιχεία και πληροφορίες που πρέπει να διευκρινίζονται κατά τη λήψη του ιστορικού και μπορούν να βοηθήσουν στην επιβεβαίωση της υποψίας της σεξουαλικής κακοποίησης.

## Πίνακας 6.2. Διερεύνηση και αντιμετώπιση παιδιού με θηλώματα στη γεννητική περιοχή.

### Ιατρικό Ιστορικό

- Λεπτομερής διερεύνηση της παρούσας νόσου και της πιθανότητας σεξουαλικής ή φυσικής ή συναισθηματικής κακοποίησης ή παραμέλησης με βάση την αιτία προσέλευσης στον παιδίατρο
- Λήψη αναμνηστικού ιστορικού σχετικά με την παρουσία θηλωμάτων στη γεννητική περιοχή καθώς και σε άλλες ανατομικές περιοχές στο παρελθόν
- Λήψη αναμνηστικού ιστορικού σχετικά με το είδος του τοκετού (φυσιολογικός τοκετός ή Καισαρική τομή)
- Λήψη οικογενειακού ιστορικού παρουσίας θηλωμάτων στη γεννητική περιοχή καθώς και σε άλλες ανατομικές περιοχές στους γονείς ή θετικής εξέτασης Παπανικολάου στη μητέρα
- Λήψη ψυχοκοινωνικού ιστορικού
  - Ηλικία μητέρας και πατέρα κατά τη γέννηση του πρώτου παιδιού
  - Οικογενειακή κατάσταση / Επάγγελμα και μορφωτικό επίπεδο μητέρας και πατέρα
  - Προβλήματα στο παρόν ή στο παρελθόν σχετικά με τη χρήση ναρκωτικών ουσιών ή αλκοόλ από τη μητέρα ή τον πατέρα
  - Προβλήματα στο παρόν ή στο παρελθόν σχετικά με τη χρήση σωματικής ή σεξουαλικής βίας από τη μητέρα ή τον πατέρα
  - Ψυχολογικά προβλήματα στο παρόν ή στο παρελθόν στη μητέρα ή τον πατέρα, συμπεριλαμβανομένου της σχιζοφρένειας, των διπολικών διαταραχών, της κατάθλιψης και των αγχώδων διαταραχών που απαιτούν φαρμακευτική αγωγή
  - Οικογενειακό ιστορικό σεξουαλικής, φυσικής, συναισθηματικής κακοποίησης ή παραμέλησης της μητέρας ή του πατέρα κατά την παιδική τους ηλικία
  - Ανάμειξη στο παρόν ή στο παρελθόν με κοινωνικές υπηρεσίες ή ιδρύματα
  - Παραμονή στο παρόν ή στο παρελθόν του παιδιού σε συγγενικά άτομα ή σε παιδικό σταθμό ή σε ίδρυμα
  - Νοητικά προβλήματα μητέρας ή προβλήματα

### Φυσική Εξέταση

- Προσεκτική επισκόπηση γενετικών οργάνων και περιπρωκτικής περιοχής (Επιβεβαίωση της διάγνωσης των θηλωμάτων στη γεννητική περιοχή)
- Προσεκτική επισκόπηση δέρματος και βλεννογόνων για την ανεύρεση θηλωμάτων
- Φυσική εξέταση για τη ανεύρεση κλινικών σημείων ενδεικτικών φυσικής κακοποίησης (εκδορές, μώλωπες, πετέχειες, σημεία κατάγματος)

### Εργαστηριακός έλεγχος

- Ανίχνευση και τυποποίηση του ιού HPV (αποφολιδούμενα κύτταρα)
  - Δεν υπάρχουν ενδείξεις πως η ανίχνευση και η τυποποίηση του ιού HPV βοηθά στην επιβεβαίωση ή των αποκλεισμό σεξουαλικής κακοποίησης, όμως η ανίχνευση ιών υψηλού κινδύνου HPV 16 και 18 υποδεικνύει την πιθανότητα κακοήθους εξαλλαγής των αλλοιώσεων αυτών
- Ανεύρεση και άλλων σεξουαλικά μεταδιδόμενων νόσων
  - Καλλιέργεια γονοκόκκου (στοματική κολόνη, γεννητική περιοχή, περιπρωκτικά)
  - Καλλιέργεια χλαμυδίων (γεννητική περιοχή και περιπρωκτικά)
  - HIV (ορός)
  - Αντιγόνο επιφανείας Ηπατίτιδας Β (ορός)

### Συζήτηση με γονείς και άτομα που φροντίζουν άμεσα το παιδί

- Συζήτηση με τους γονείς καθώς και με άτομα που φροντίζουν άμεσα το παιδί για τους πιθανούς τρόπους μετάδοσης των θηλωμάτων συμπεριλαμβανομένης και της σεξουαλικής κακοποίησης
- Διερεύνηση ανησυχίας των γονιών ή ατόμων που φροντίζουν άμεσα το παιδί για σεξουαλική κακοποίηση του

### Αντιμετώπιση παιδιού με θηλώματα στη γεννητική περιοχή

- Κάθε παιδί με θηλώματα στη γεννητική περιοχή ηλικίας μεγαλύτερης των 2-4 ετών, πρέπει να παραπέμπεται για διερεύνηση από ειδικό ειδικευμένο ιατρό, παιδίατρο ή ιατροδικαστή
- Κάθε παιδί με θηλώματα στη γεννητική περιοχή ηλικίας μικρότερης των 2-4 ετών, πρέπει να παραπέμπεται για διερεύνηση από ειδικό ειδικευμένο ιατρό, παιδίατρο ή ιατροδικαστή όταν:
  - Ανευρίσκονται παθολογικά ευρήματα κατά την εξέταση της γεννητικής και περιπρωκτικής περιοχής
  - Ανευρίσκεται κλινικά ή εργαστηριακά και άλλο σεξουαλικό μεταδιδόμενο νόσημα
  - Κατά τη λήψη του ψυχοκοινωνικού ιστορικού ανευρίσκονται στοιχεία που υποδεικνύουν την ανάγκη περαιτέρω διερεύνησης
  - Υπάρχει ανησυχία από τους γονείς ή τα άτομα που φροντίζουν άμεσα το παιδί για σεξουαλική κακοποίηση

### Θεραπευτική αντιμετώπιση θηλωμάτων στη γεννητική περιοχή

Δεν υπάρχουν ενδείξεις σχετικά με το ποιά θεραπευτική στρατηγική προσφέρει τα καλύτερα αποτελέσματα στα παιδιά

- Κρυοθεραπεία με υγρό άζωτο
- Ηλεκτροκαυτηρίαση
- Laser
- Χειρουργική εξαίρεση
- Φαρμακευτική αντιμετώπιση

### Πρόληψη

Σε περίπτωση που η κάθετη μετάδοση του ιού αποτελεί τον πιθανότερο τρόπο μετάδοσής του στο βρέφος απαιτείται έλεγχος της μητέρας μέσω ανίχνευσης και τυποποίησης του ιού HPV (αποφολιδούμενα κύτταρα) και παρακολούθησή της με κολποσκόπηση και εξέταση Παπανικολάου.

Αντικειμενικά ευρήματα κατά την κλινική εξέταση ενδεικτικά άλλου σεξουαλικού μεταδιδόμενου νοσήματος ή φυσικής κακοποίησης είναι ιδιαίτερα σπάνια, χωρίς όμως να αποκλείονται. Η εργαστηριακή διερεύνηση της παρουσίας και άλλου σεξουαλικά μεταδιδόμενου νοσήματος μπορεί να επιβεβαιώσει την υποψία, όμως απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή στον τρόπο λήψης των δειγμάτων. Η ανεύρεση θετικής καλλιέργειας στο γονόκκο σε παιδί χωρίς συγγενή σύφιλη αποτελεί αποδεικτικό στοιχείο σεξουαλικής κακοποίησης, ενώ η θετική καλλιέργεια για τα χλαμύδια είναι ενδεικτική πιθανής σεξουαλικής κακοποίησης (Adams, 2001).

Η έγκαιρη εντόπιση της παιδικής σεξουαλικής κακοποίησης αποτελεί βασικό στοιχείο της καλύτερης αντιμετώπισης των παιδιών αυτών. Έχει βρεθεί πως η αδυναμία εντοπισμού της, έχει ως αποτέλεσμα τη συνέχισή της με σοβαρές τόσο ψυχολογικές όσο και φυσικές επιπτώσεις για το παιδί, το οποίο την υφίσταται (Dubowitz και συν, 1992). Ωστόσο, η επιβεβαίωση της πρέπει να πραγματοποιείται προσεκτικά με τρόπο τεκμηριωμένο, δεδομένου πως σε περίπτωση λανθασμένης επιβεβαίωσής της οι συνέπειες είναι σοβαρές τόσο για το παιδί όσο και για την οικογένεια.

#### **6.4.3. Η σημασία της ανίχνευσης του ιού HPV**

Η ανίχνευση του ιού HPV δε βοηθά στην επιβεβαίωση της διάγνωση των θηλωμάτων δεδομένου πως η διάγνωση των θηλωμάτων είναι κλινική αφενός και αφετέρου η λήψη βιοψιακού δείγματος είναι τις περισσότερες φορές απαγορευτική δεδομένου ότι η θεραπευτική αντιμετώπιση των αλλοιώσεων αυτών τις περισσότερες φορές συνίσταται στην καταστροφή τους. Επιπλέον δεν υπάρχουν ενδείξεις πως η τυποποίηση του ιού μπορεί να βοηθήσει στον καθορισμό του τρόπου μετάδοσης του ιού και να συμβάλει με αυτό τον τρόπο στην επιβεβαίωση ή όχι της σεξουαλικής κακοποίησης. Για παράδειγμα, η ανίχνευση σε θηλώματα της γενετικής περιοχής των τύπων HPV 2 και 1, οι οποίοι απαντούν

κυρίως σε θηλώματα του δέρματος, δεν μπορεί να αποκλείσει αλλά ούτε να επιβεβαιώσει τη σεξουαλική κακοποίηση.

Ωστόσο η ανίχνευση ιών υψηλού κινδύνου HPV 16 και 18 υποδεικνύει την πιθανότητα κακοήθους εξαλλαγής των αλλοιώσεων αυτών γεγονός που βοηθά στην επιλογή άμεσα πιο ριζικών τρόπων θεραπευτικής τους αντιμετώπισης και καθιστά αναγκαία τη συστηματική παρακολούθηση των παιδιών αυτών. Περαιτέρω μελέτη απαιτείται στο κατά πόσο η εξέταση αποφολιδούμενων κυττάρων με PCR για την τυποποίηση των ιών HPV πριν από τη θεραπεία μπορεί να βοηθήσει προς την κατεύθυνση αυτή.

Σε περίπτωση που η κάθετη μετάδοση του ιού αποτελεί τον πιθανότερο τρόπο μετάδοσής του στο βρέφος, απαιτείται έλεγχος της μητέρας μέσω ανίχνευσης και τυποποίησης του ιού HPV (αποφολιδούμενα κύτταρα) και παρακολούθησή της με κολποσκόπηση και εξέταση Παπανικολαού.

#### **6.4.4. Οδηγίες διαχείρισης και αντιμετώπισης**

Η παρουσία θηλωμάτων στη γεννητική περιοχή σε παιδιά ηλικίας μεγαλύτερης των 2-4 χρόνων απαιτεί την παραπομπή των παιδιών αυτών για διερεύνηση από ειδικό ειδικευμένο ιατρό, παιδίατρο ή ιατροδικαστή. Κάθε παιδί με θηλώματα στη γεννητική περιοχή ηλικίας μικρότερης των 2-4 ετών, πρέπει να παραπέμπεται για διερεύνηση από ειδικό ειδικευμένο ιατρό, παιδίατρο ή ιατροδικαστή όταν: α) ανευρίσκονται παθολογικά ευρήματα κατά την εξέταση της γεννητικής και περιπρωκτικής περιοχής, β) ανευρίσκεται κλινικά ή εργαστηριακά και άλλο σεξουαλικό μεταδιδόμενο νόσημα, γ) κατά τη λήψη του ψυχοκοινωνικού ιστορικού ανευρίσκονται στοιχεία που υποδεικνύουν την ανάγκη περαιτέρω διερεύνησης και δ) υπάρχει ανησυχία από τους γονείς ή τα άτομα που φροντίζουν άμεσα το παιδί για σεξουαλική κακοποίηση.

### **6.5. Θεραπευτική αντιμετώπιση των θηλωμάτων στα παιδιά**

Η θεραπευτική αντιμετώπιση των θηλωμάτων στα παιδιά αποτελεί ακόμα πεδίο συζητήσεων και έρευνας. Η υποτροπή τους μετά από τις εφαρμοζόμενες σήμερα θεραπευτικές στρατηγικές κυμαίνεται μεταξύ 25-50%, ενώ χωρίς θεραπεία η αυτόματη υποχώρησή τους ανέρχεται στο 67% (Frazier, 1998). Στις θεραπευτικές στρατηγικές που εφαρμόζονται σήμερα στα παιδιά τόσο για τα θηλώματα της γεννητικής περιοχής όσο και του δέρματος περιλαμβάνεται η κρυοπηξία με υγρό άζωτο, η ηλεκτροκαυτηρίαση, η χειρουργική θεραπεία και η φαρμακευτική θεραπεία. Σε αρκετές περιπτώσεις η αντιμετώπισή τους απαιτεί στη συνέχεια κατάλληλη παρακολούθηση, ενώ οι υποτροπές τους μπορούν να καταστήσουν αναγκαία την επανάληψη της θεραπείας.

Η θηλωμάτωση του λάρυγγα στα παιδιά αντιμετωπίζεται χειρουργικά. Σε αρκετές περιπτώσεις υποτροπιάζει μετά τη χειρουργική αντιμετώπιση γεγονός που απαιτεί και νέες επεμβάσεις με μέσο όρο, όπως έχει δειχθεί σε διάφορες σειρές ασθενών, τις 10 και μέγιστο περίπου τις 100.

### **6.6. Η σημασία του εμβολίου για τον ιό HPV στην παιδική ηλικία**

Σημαντική ερευνητική πρόκληση για το μέλλον αποτελεί η κατανόηση της σημασίας του εμβολίου για τον ιό HPV στην πρόληψη των HPV-συσχετιζόμενων αλλοιώσεων που απαντούν στην παιδική ηλικία συμπεριλαμβανομένης και της θηλωμάτωσης του λάρυγγα. Το εμβόλιο έχει προταθεί να χορηγείται σε κορίτσια κατά την εφηβεία πριν την έναρξη της σεξουαλικής επαφής. Ωστόσο τα συνεχώς αυξανόμενα δεδομένα σχετικά με την κάθετη μετάδοση του ιού καθιστούν αναγκαία τη διερεύνηση του κατά πόσο το εμβόλιο για τον ιό HPV θα πρέπει να χορηγείται αμέσως μετά τη γέννηση και θα πρέπει να γίνεται τόσο σε αγόρια όσο και στα κορίτσια (Cason και Mant, 2005, Steller, 2002).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7



### ΤΟ ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

7.1. Γενικά

7.2. Μελετη της αλληλεπίδρασης του ιού του θηλώματος του ανθρώπου HPV με τα ογκογονίδια *ras* στον τράχηλο της μήτρας.

7.3. Ανίχνευση του ιού HPV σε αδενοειδείς και αμυγδαλοειδείς εκβλαστήσεις σε παιδιά

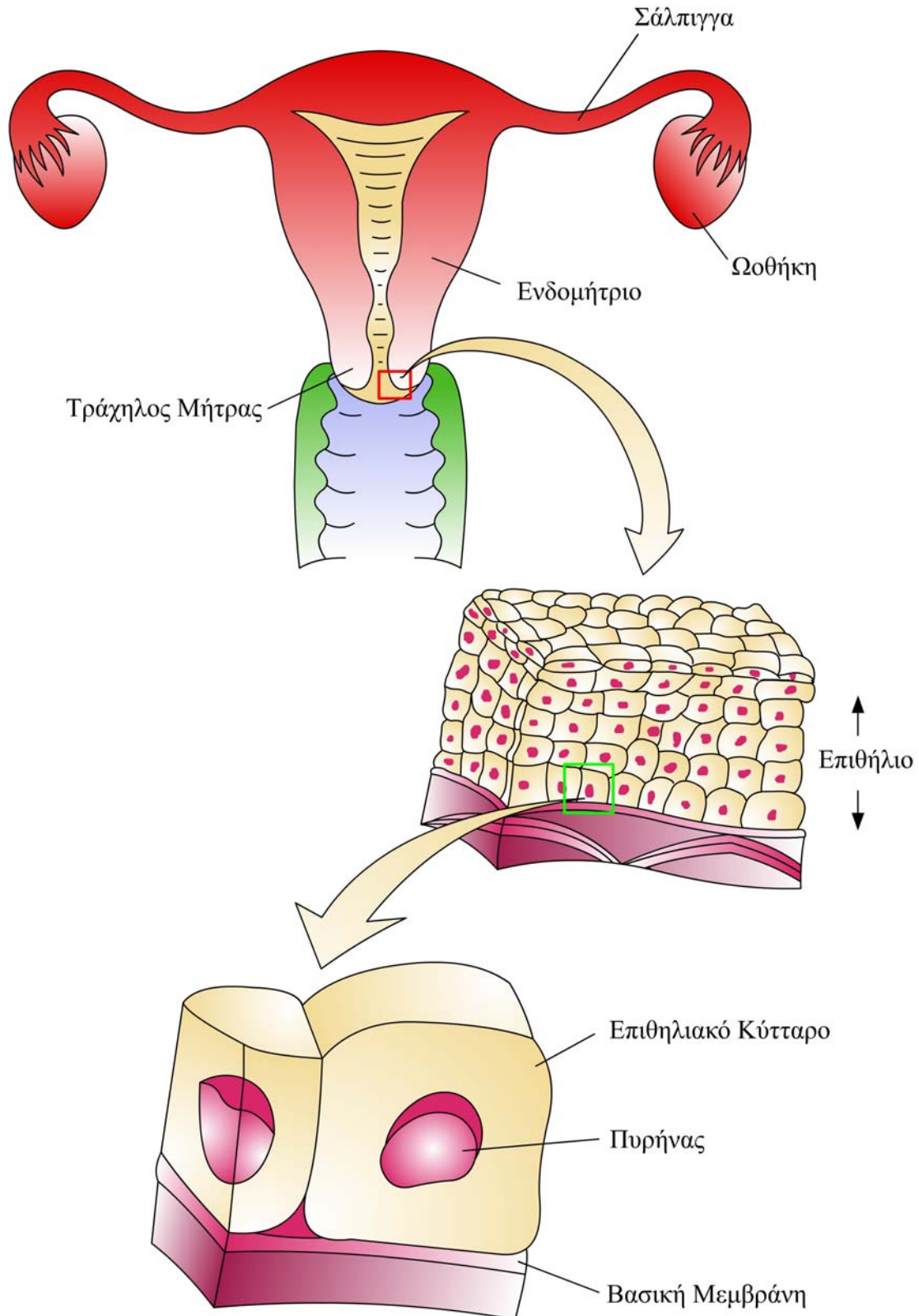
#### 7.1. Γενικά

Στο Κεφάλαιο αυτό περιγράφονται συνοπτικά οι δύο κύριοι στόχοι της παρούσας διατριβής. Ο πρώτος στόχος ήταν η μελέτη της αλληλεπίδρασης του ιού HPV με την έκφραση των ογκογονιδίων της οικογένειας *ras* σε ασθενείς με φυσιολογικό τράχηλο, με ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία του τραχήλου και με καρκίνο του τραχήλου της μήτρας (**Σχήμα 7.1**). Ο δεύτερος στόχος της διατριβής ήταν η μελέτη του ιού στις αδενοειδείς και αμυγδαλοειδείς εκβλαστήσεις στην παιδική ηλικία (**Σχήμα 7.2**).

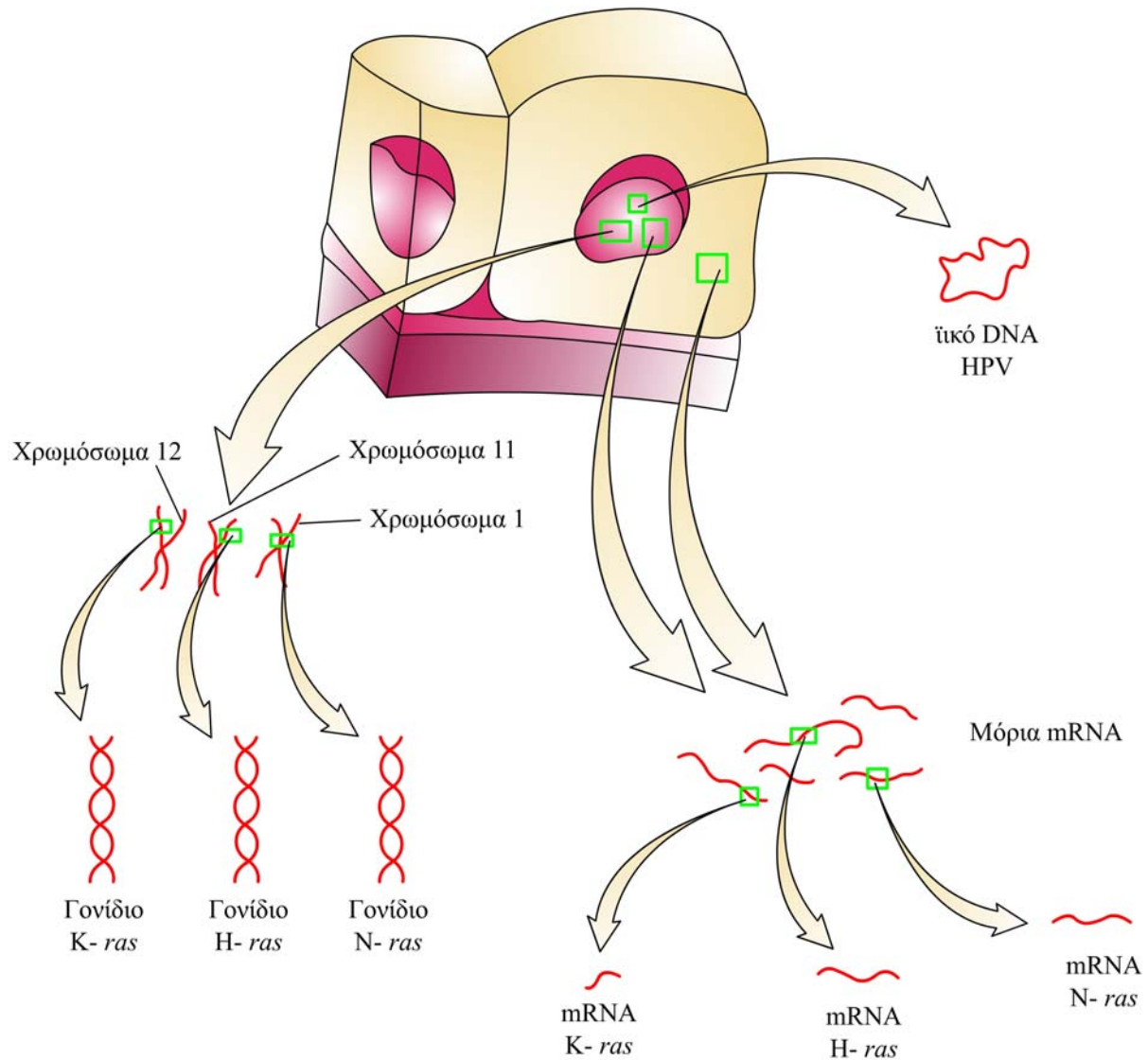
#### 7.2. Μελετη της αλληλεπίδρασης του ιού του θηλώματος του ανθρώπου HPV με τα ογκογονίδια *ras* στον τράχηλο της μήτρας

Η νεοπλασία του τραχήλου της μήτρας, η οποία αποτελεί μια από τις συχνότερες νεοπλασίες στη γυναίκα, σχετίζεται με την παρουσία του ιού HPV γεγονός που καθιστά τον τράχηλο της μήτρας ιδανικό σύστημα *in vivo* μελέτης του ιού HPV και του ρόλου του στην καρκινογένεση.

**Σχήμα 7.1.** Το αντικείμενο της διατριβής. Πειραματική προσέγγιση για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης του ιού του θηλώματος του ανθρώπου HPV με τα ογκογονίδια *ras* στον τράχηλο της μήτρας.



**Σχήμα 7.1.** Το αντικείμενο της διατριβής. Πειραματική προσέγγιση για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης του ιού του θηλώματος του ανθρώπου HPV με τα ογκογονίδια *ras* στον τράχηλο της μήτρας (συνέχεια από την προηγούμενη σελίδα).

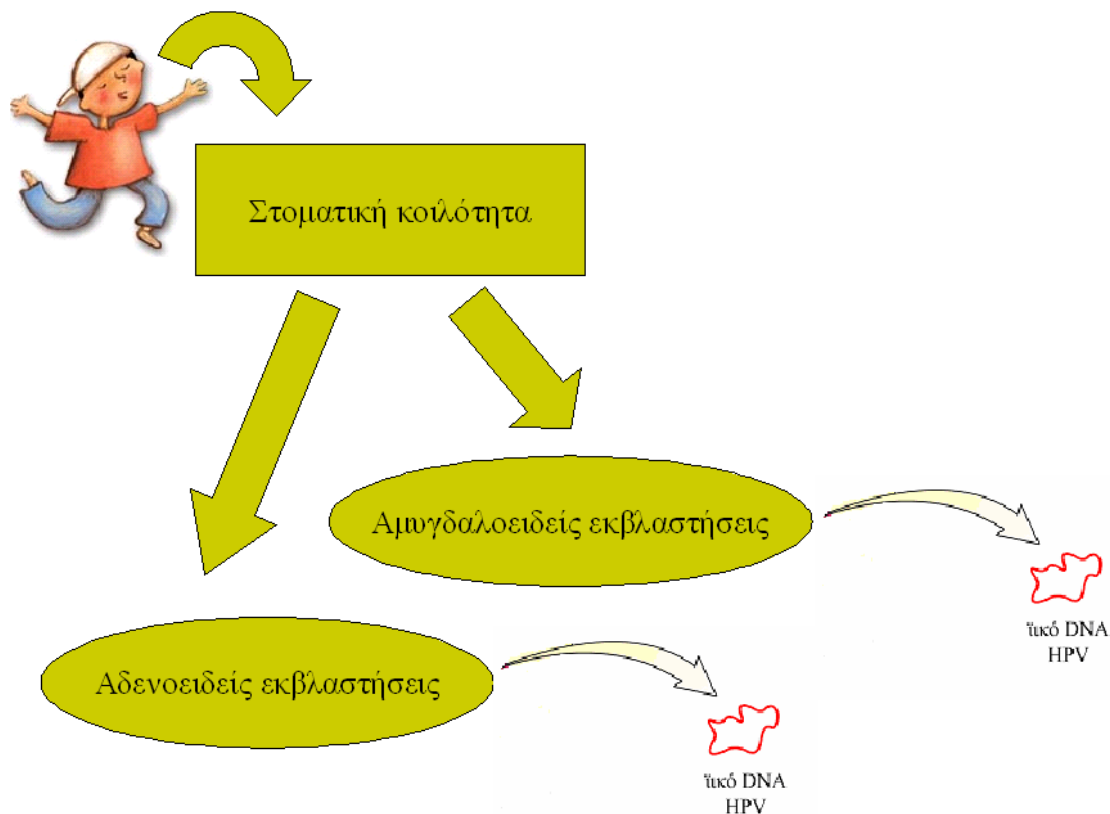


Επιπλέον ο τράχηλος της μήτρας προσφέρει τη δυνατότητα λήψης κυτταρολογικού και βιοψιακού υλικού στα πλαίσια των σύγχρονων διαγνωστικών αλγορίθμων. Αντίθετα η μελέτη της παρουσίας του ιού σε άλλα συστήματα όπου παρουσιάζει τροπισμό ο ιός HPV, όπως το αναπνευστικό σύστημα απαιτεί τη χρήση ειδικών προσπελάσεων για τη λήψη δείγματος ιστού, ενώ στην περίπτωση των θηλωμάτων του δέρματος, τόσο στους ενήλικες,



όσο και στα παιδιά, η συνήθης θεραπευτική αντιμετώπιση της καταστροφής της βλάβης με μεθόδους, όπως η κρυοπηξία, καθιστά ανέφικτη τη λήψη ιστού από τη βλάβη.

**Σχήμα 7.2.** Το αντικείμενο της διατριβής. Ανίχνευση του ιού HPV σε αδενοειδείς και αμυγδαλοειδείς εκβλαστήσεις σε παιδιά.



Στα πλαίσια της συνεργασίας του Εργαστηρίου Ιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης με τη Γυναικολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου (ΠΑ.Γ.Ν.Η) συλλέχτηκαν φρέσκα δείγματα ιστού τραχήλου της μήτρας από γυναίκες, οι οποίες υποβλήθηκαν την περίοδο 2002-2004 σε εγχείρηση ολικής ή ριζικής υστερεκτομής. Στη μελέτη συμπεριλήφθησαν γυναίκες με φυσιολογικό τράχηλο, με ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία του τραχήλου της μήτρας και με διηθητικό καρκίνο τραχήλου της μήτρας. Στόχος της μελέτης ήταν να προσδιοριστούν τα επίπεδα έκφρασης σε επίπεδο mRNA των γονιδίων K-, H- και N-*ras* στις διάφορες ομάδες ασθενών και να συγκριθούν

ανάλογα με την ιστολογία, την ανίχνευση και την τυποποίηση του ιού HPV. Μέχρι σήμερα με βάση τη διεθνή βιβλιογραφία δεν υπάρχουν μελέτες της διαφορικής έκφρασης των γονιδίων *ras* σε μεταγραφικό επίπεδο στον τράχηλο της μήτρας (Mammas και συν, 2005, Koffa και Spandidos, 1997).

### **7.3. Ανίχνευση του ιού HPV σε αδενοειδείς και αμυγδαλοειδείς εκβλαστήσεις σε παιδιά.**

Ο δεύτερος στόχος της διατριβής ήταν η μελέτη της παρουσίας του ιού HPV στην καλοήγη υπερπλασία των αδενοειδών και αμυγδαλοειδών εκβλαστήσεων στην παιδική ηλικία. Για το λόγο αυτό, στα πλαίσια της συνεργασίας του Εργαστηρίου Ιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης με το Παθολογοανατομικό Εργαστήριο του Νοσοκομείου Παιδών 'Π.&Α. Κυριακού' στην Αθήνα, συλλέχτηκαν δείγματα σε παραφίνη ιστού αδενοειδών και αμυγδαλοειδών εκβλαστήσεων από παιδιά, τα οποία υποβλήθηκαν την περίοδο 1995-2000 σε αδενεκτομή ή και αμυγδαλεκτομή.

Στη βιβλιογραφία μέχρι στιγμής υπάρχουν αρκετές μελέτες, οι οποίες έχουν ανιχνεύσει τον ιό HPV στη στοματική κοιλότητα με τη μελέτη στοματικών ξεσμάτων και εκπλυμάτων (Koch και συν, 1997, Rice και συν, 2000, Kojima και συν, 2003, Rintala και συν, 2005, Cason και Mant, 2005). Ωστόσο, τα δεδομένα από βιοψιακό υλικό στοματικού βλεννογόνου από παιδιά με φυσιολογικό βλεννογόνο ή καλοήθειες αλλοιώσεις είναι ιδιαίτερα περιορισμένα (Syrjanen, 2005).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8



### ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

- 8.1. Προέλευση δειγμάτων
- 8.2. Εκχύλιση DNA και RNA
  - 8.2.1. Πρωτόκολλο εκχύλισης DNA από συμπαγή φρέσκο ιστό
  - 8.2.2. Πρωτόκολλο εκχύλισης DNA από συμπαγή ιστό σε παραφίνη
  - 8.2.2. Πρωτόκολλο εκχύλισης RNA από συμπαγή φρέσκο ιστό
- 8.3. Αλυσιδωτή αντίδραση με πολυμεράση (PCR)
  - 8.3.1. Αρχές της μεθόδου
  - 8.3.2. Ρυθμιστικοί παράγοντες της PCR
  - 8.3.3. Συνθήκες PCR και επιλογή εκκινήτων
- 8.4. Ανάλυση πολυμορφισμού μεγέθους περιοριστικών θραυσμάτων (RFLP)
  - 8.4.1. Αρχές της μεθόδου
  - 8.4.2. Ανίχνευση μεταλλάξεων ογκογονιδίων *ras* και τυποποίηση ιών HPV
- 8.5. Αντίστροφη αλυσιδωτή αντίδραση με πολυμεράση (RT-PCR)
  - 8.5.1. Αρχές της μεθόδου
  - 8.5.2. Ποσοτικοποίηση επιπέδων mRNA ογκογονιδίων *ras*
- 8.6. Ηλεκτροφόρηση
  - 8.6.1. Αρχές της μεθόδου
  - 8.6.2. Πήκτωμα αγαρόζης
  - 8.6.3. Πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου
- 8.7. Χρώσεις νουκλεϊκών οξέων
  - 8.7.1. Χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο
  - 8.7.2. Χρώση με νιτρικό άργυρο
- 8.5. Στατιστική ανάλυση
- 8.6. Υλικά και εταιρίες προέλευσης

#### 8.1. Προέλευση δειγμάτων

Για την παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν 56 δείγματα βιοψιακού υλικού τραχήλου της μήτρας, τα οποία προήλθαν από γυναίκες, στις οποίες διενεργήθηκε ολική υστερεκτομή κατά τη νοσηλεία τους στη Γυναικολογική και Μαιευτική Κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου την χρονική περίοδο Ιούλιος 2002 έως

Δεκέμβριος 2004. Κάθε δείγμα εξετάστηκε παθολογοανατομικά για την επιβεβαίωση της ιστολογίας του και τον καθορισμό παραμέτρων όπως το στάδιο της νόσου, ο βαθμός διαφοροποίησης και η διήθηση των λεμφαδένων. Επίσης καταγράφηκαν από τον ιατρικό φάκελο των ασθενών κλινικές παράμετροι όπως η ηλικία, το κάπνισμα και το οικογενειακό ιστορικό. Από την παρούσα μελέτη εξαιρέθηκαν οι γυναίκες εκείνες, στις οποίες διενεργήθηκε ολική υστερεκτομή με ιστορικό ή ιστολογική διάγνωση καρκίνου του ενδομητρίου, των σαλπίγγων ή των ωοθηκών. Η λήψη των δειγμάτων γινόταν αμέσως μετά τη χειρουργική εξαίρεση του τραχήλου της μήτρας. Οι ιστοί τοποθετούνταν σε σωλήνες eppendorf του 1,5ml μέσα σε δοχείο με υγρό άζωτο και ακολούθως αποθηκεύονταν σε θερμοκρασία  $-80^{\circ}\text{C}$  στο εργαστήριο Κλινικής Ιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης. Στη συνέχεια ο ιστός κοβόταν σε τρία μέρη, από τα οποία τα δύο πρώτα χρησιμοποιούνταν για την εκχύλιση DNA και RNA αντίστοιχα, ενώ το τρίτο μέρος για την επιβεβαίωση της ιστολογικής διάγνωσης.

Επίσης αναλύθηκαν 106 δείγματα ιστού αδενοειδών και αμυγδαλοειδών εκβλαστήσεων σε παραφίνη, τα οποία προήλθαν από παιδιά με καλοήγη υπερπλασία των αδενοειδών ή/και των αμυγδαλοειδών τους εκβλαστήσεων, τα οποία νοσηλεύτηκαν στο Νοσοκομείο Παιδών 'Π.&Α. Κυριακού' στην Αθήνα το διάστημα 1995-2000, και στα οποία διενεργήθηκε αδενεκτομή ή/και αμυγδαλεκτομή. Από τέσσερα παιδιά, δύο αγόρια και δύο κορίτσια, συμπεριλήφθηκαν τόσο ιστός από τις αδενοειδείς όσο και τις αμυγδαλοειδείς εκβλαστήσεις. Κάθε δείγμα εξετάστηκε παθολογοανατομικά για την επιβεβαίωση της ιστολογίας του. Επίσης καταγράφηκαν κλινικές παράμετροι όπως η ηλικία, το φύλο, η καταγωγή, ο τόπος διαμονής και ο μήνας προσέλευσης στο νοσοκομείο. Μετά από τομή των επιφανειακών στιβάδων των ιστών στη παραφίνη, τα λαμβανόμενα τμήματα του ιστού τοποθετούνταν σε σωλήνες eppendorf του 1,5ml. Ακολουθούσε η διαδικασία αποπαραφίνωσης και στη συνέχεια η εκχύλιση του DNA, όπως περιγράφεται παρακάτω.

## **8.2. Εκχύλιση DNA και RNA**

### **8.2.1. Πρωτόκολλο εκχύλισης DNA από συμπαγή φρέσκο ιστό**

Ο ιστός κόβεται σε πολύ μικρά κομμάτια, τα οποία μεταφέρονται σε σωλήνα eppendorf του 1,5ml. Ακολουθεί προσθήκη 400μl λυτικού διαλύματος που περιέχει 10mM Tris pH 8,0, 10mM EDTA, 150mM NaCl και 0,5% SDS. Προστίθεται πρωτεΐνάση K σε τελική συγκέντρωση 100μg/ml και το διάλυμα επωάζεται στους 60°C για 1h με συνεχή ανακίνηση. Ακολουθεί εκχύλιση των νουκλεϊκών οξέων (DNA και RNA) με φαινόλη/χλωροφόρμιο. Αρχικά προστίθενται 200μl φαινόλη και 200μl χλωροφόρμιο και το διάλυμα φυγοκεντρείται με 13.000 rpm σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 5min.

Στη συνέχεια λαμβάνεται η υπερκείμενη φάση, προστίθεται ίσος όγκος χλωροφορμίου (περίπου 500μl) και ακολουθεί νέα φυγοκέντρωση με 13.000 rpm σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 5min. Ακολούθως λαμβάνεται η υπερκείμενη φάση και προστίθενται 20μl NaCl (1/20 όγκου) και 2,5 όγκοι απόλυτη αιθανόλη με αποτέλεσμα την κατακρήμνιση του DNA.

Μετά από επώαση στους -20°C για 24 ώρες, ακολουθεί φυγοκέντρωση με 13.000 rpm σε θερμοκρασία 4°C για 15min και έκπλυση του κατακρημνισμένου DNA σε 70% αιθανόλη. Αφού απομακρυνθεί η αιθανόλη, το DNA επαναραιώνεται σε 30-50μl ddH<sub>2</sub>O και διατηρείται σε θερμοκρασία -20°C. Η ποσότητα και η καθαρότητα του DNA υπολογίζεται με φωτομέτρηση με UV/VIS φωτόμετρο στα 260nm και στα 280nm και στη συνέχεια με κατάλληλη αραίωση καθορίζεται η τελική συγκέντρωση του δείγματος στα 200μg/ml (Dokianakis και συν 1998, Maniatis και συν, 1989).

### **8.2.2. Πρωτόκολλο εκχύλισης DNA από συμπαγή ιστό σε παραφίνη**

Τμήμα του ιστού στην παραφίνη κόβεται σε πολύ μικρά κομμάτια, τα οποία μεταφέρονται σε σωλήνα eppendorf του 1.5ml. Προτίθεται 1 ml ξυλόλης και μετά την επώαση

του δείγματος για 12-24 ώρες προστίθεται αιθανόλη για την απομάκρυνση της ξυλόλης (Noutsou και συν, 1996). Στη συνέχεια ακολουθεί η διαδικασία εκχύλισης του DNA ακολουθώντας το πρωτόκολλο που περιγράφηκε στην Παράγραφο 8.2.1.

### **8.2.3. Πρωτόκολλο εκχύλισης RNA από συμπαγή φρέσκο ιστό**

Ο ιστός ομογενοποιείται αρχικά μηχανικά με τη χρήση μηχανικού ομογενοποιητή και στη συνέχεια αφού τοποθετηθεί σε σωλήνα eppendorf του 1,5ml με την προσθήκη 1ml διαλύματος Trizol.

Το διάλυμα Trizol περιέχει θειοκυανιούχο γουανίδιο, που επιτυγχάνει τη λύση των κυττάρων και όξινη φαινόλη, που απομακρύνει τα λιπίδια, τις πρωτεΐνες και το DNA, ώστε επιτυγχάνεται ταυτόχρονη λύση της κυτταρικής μεμβράνης και άλλων συστατικών και ομογενοποίηση του ιστού. Αφού ομογενοποιηθούν τα δείγματα προστίθενται 100-200μl χλωροφορμίου και ακολουθεί φυγοκέντρηση με 12.000rpm στους 4°C για 15 λεπτά.

Στην υδατική φάση, όπου βρίσκεται το RNA προστίθεται ίσος όγκος ισοπροπανόλης, ακολουθεί επώαση στους 4°C για 24 ώρες και στη συνέχεια φυγοκέντρηση με 12.000rpm στους 4°C για 10 λεπτά. Το ίζημα πλένεται με διάλυμα 75% αιθανόλης, επωάζεται στους -20°C για 24 ώρες και φυγοκεντρείται με 7.500rpm στους 4°C για 5 λεπτά. Ακολούθως το λαμβανόμενο ίζημα στεγνώνεται για 15-30 λεπτά, διαλύεται σε 20-30μl ddH<sub>2</sub>O και αποθηκεύεται στους -20°C.

Η ποσότητα και η ποιότητα του RNA που απομονώθηκε υπολογίζεται με φωτομέτρηση με UV/VIS φωτόμετρο στα 260nm και στα 280nm και στη συνέχεια με κατάλληλη αραίωση καθορίζεται η τελική συγκέντρωση του δείγματος στα 200μg/ml (Maniatis και συν, 1989).

### **8.3. Αλυσιδωτή αντίδραση με πολυμεράση (PCR)**

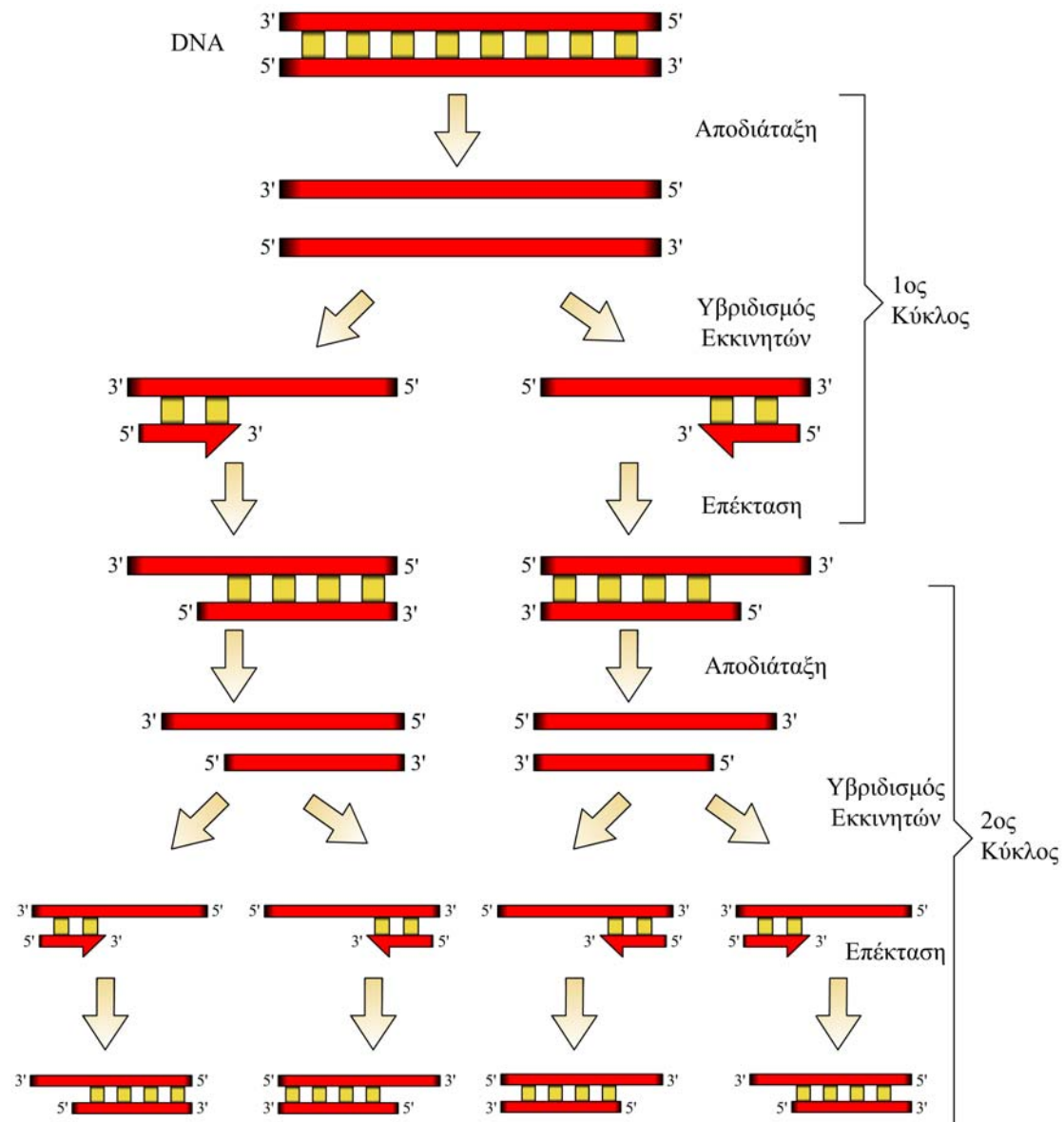
#### **8.3.1. Αρχές της μεθόδου PCR**

Η Αλυσιδωτή Αντίδραση με Πολυμεράση (Polymerase Chain Reaction, PCR) αποτελεί μια από τις πλέον σημαντικές τεχνικές της Μοριακής Βιολογίας με πολλές εφαρμογές τόσο στη βασική έρευνα όσο και στην κλινική διαγνωστική. Ανακαλύφθηκε το 1985 (Saiki και συν, 1985, Mullis και Faloona, 1987) από την ερευνητική ομάδα του K.B. Mullis, στον οποίο και αποδόθηκε για την ανακάλυψή του αυτή το βραβείο Νόμπελ το 1993. Η μέθοδος της PCR επιτρέπει την εκλεκτική ενίσχυση συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA με εκθετικό τρόπο, ώστε να είναι δυνατή η περαιτέρω μελέτη τους. Εκμεταλλεύεται τον ημισυντηρητικό τρόπο διπλασιασμού του DNA σε συνδυασμό με τη χρήση θερμοανθεκτικών DNA πολυμερασών. Πρόκειται για μια μέθοδο με μεγάλη ευαισθησία, ειδικότητα και ταχύτητα. Η τεράστια απόδοση της αντίδρασης καθιστά δυνατή την ενίσχυση αλληλουχιών ακόμα και όταν αυτές βρίσκονται σε ελάχιστο αριθμό αντιγράφων ή όταν το DNA έχει υποστεί σχετική αποδιάταξη.

Η ανακάλυψη της PCR αποτέλεσε αναμφίβολα επανάσταση στη βιοϊατρική έρευνα με ένα ευρύτατο φάσμα συνεχώς εξελισσόμενων εφαρμογών τόσο στον τομέα της βασικής έρευνας, όσο και της κλινικής διαγνωστικής. Οι εφαρμογές της PCR στην ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών (ιών, βακτηρίων, παρασίτων, μυκήτων) έχουν καταστήσει τη μέθοδο αυτή βασικό εργαλείο της σύγχρονης μικροβιολογίας και ιολογίας. Η μέθοδος της PCR χρησιμοποιείται, επίσης, για τον προσδιορισμό μεταλλάξεων με στόχο τη διάγνωση γενετικών νοσημάτων, όπως η κυστική ίνωση, η μυική δυστροφία Duchenne και το σύνδρομο Ehlers-Danlos, την ανίχνευση γενετικών πολυμορφισμών των αντιγόνων ιστοσυμβατότητας, γεγονός αναγκαίο σε περιπτώσεις μεταμόσχευσης καθώς και την ανάλυση αποτυπώματος του DNA που χρησιμεύει στον προγενετικό και ιατροδικαστικό έλεγχο. Επιπλέον, η PCR χρησιμεύει στην ανίχνευση γενετικών αλλοιώσεων (σημειακές

μεταλλάξεις, γονιδιακή επέκταση, ανακατατάξεις) σε μια σειρά καθορισμένων για κάθε τύπο καρκίνου ογκογονιδίων και ογκοκατασταλτικών γονιδίων.

**Σχήμα 8.1.** Αρχές λειτουργίας της μεθόδου της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης PCR.



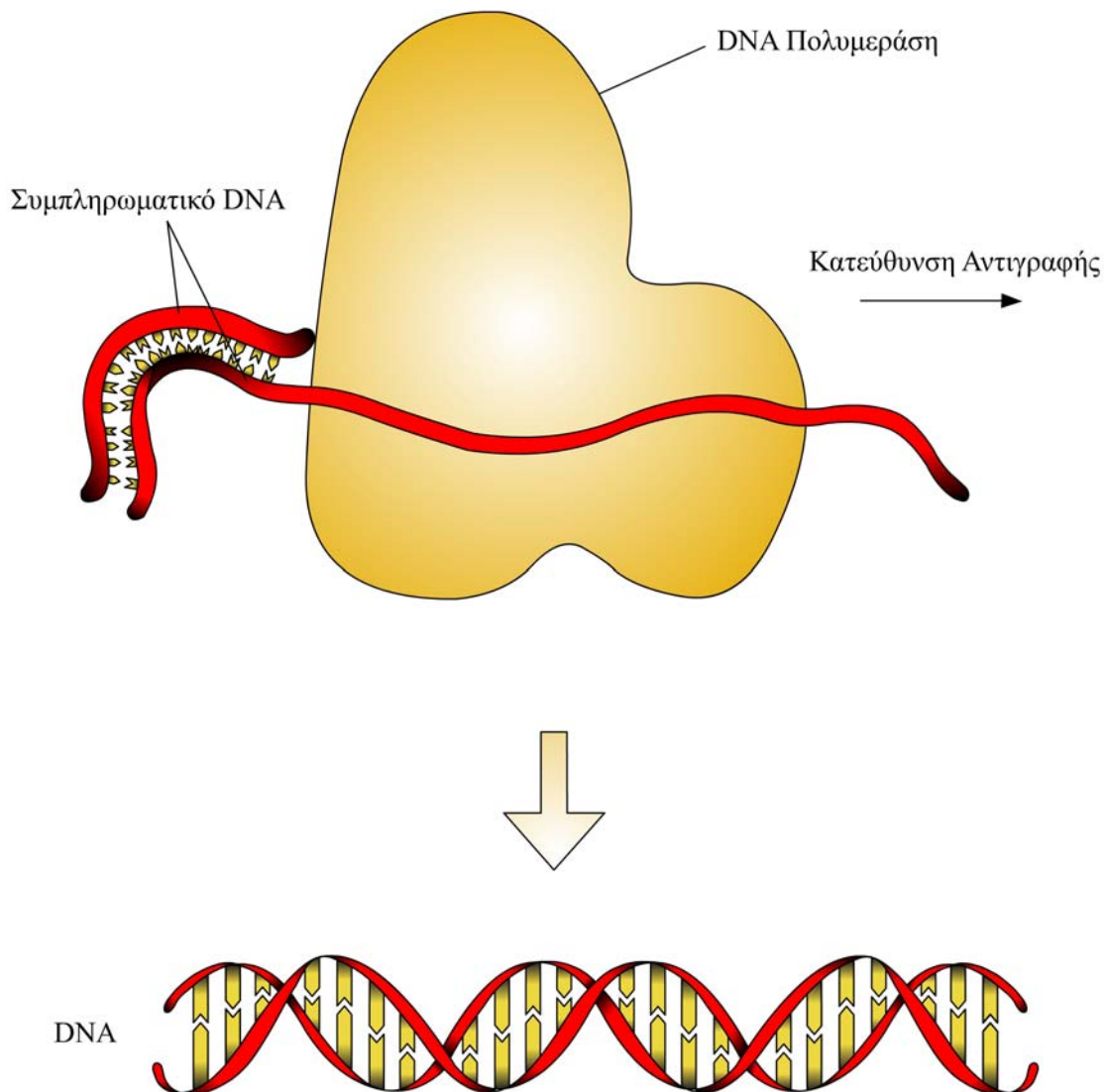


Η ταχύτητα, η ευαισθησία και η εξειδίκευση της μεθόδου σε συνδυασμό με την ευκολία στην εφαρμογή της, την καθιστούν ως εργαστηριακή μέθοδο ιδιαίτερα σημαντική σε όλο το εύρος των ιατρικών ειδικοτήτων. Με την πάροδο του χρόνου η τεχνική διαρκώς επεκτείνεται σε ακόμα μεγαλύτερο φάσμα διαγνωστικών εφαρμογών, ενώ τα τελευταία χρόνια η ανάπτυξη της μεθόδου Real-time PCR, η οποία στο μέλλον αναμένεται να αντικαταστήσει την παραδοσιακή PCR, παρέχει τη δυνατότητα αξιόπιστων τόσο ποιοτικών όσο και ποσοτικών αναλύσεων. Τόσο η παραδοσιακή PCR όσο και η Real-time PCR μπορούν, εκτός από τη μελέτη του DNA, να χρησιμοποιηθούν και για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό του RNA. Η εφαρμογή αυτή της PCR (Αντίστροφη αλυσιδωτή αντίδραση με πολυμεράση, RT-PCR) περιγράφεται στην Παράγραφο 8.5.

Το υπόστρωμα του DNA επώάζεται σε ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει μια θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση, μίγμα δεσοξυριβονουκλεοτιδίων, ιόντα Μαγνησίου και το ζεύγος των εκκινητών (primers). Οι τελευταίοι είναι ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες που παρουσιάζουν ομολογία ως προς δύο θέσεις εκατέρωθεν της DNA αλληλουχίας που πρέπει να ενισχυθεί, οπότε και προσδένονται σε αυτές. Στο **Σχήμα 8.1** παρουσιάζονται τα στάδια της Αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης PCR. Αρχικά γίνεται θερμική αποδιάταξη του δίκλωνου DNA, ώστε να διαχωριστούν οι αλυσίδες και να μπορέσει να γίνει ο υβριδισμός των εκκινητών, ο οποίος σηματοδοτεί την έναρξη της προσθήκης από την DNA πολυμεράση δεσοξυριβονουκλεοτιδίων συμπληρωματικών προς τις αντίστοιχες θέσεις της μητρικής αλυσίδας (**Σχήμα 8.2**). Με τον τρόπο αυτό σχηματίζονται δύο καινούργιες άλυσιοι DNA με αποτέλεσμα το διπλασιασμό του DNA στόχου. Η σειρά των τριών σταδίων (αποδιάταξη, υβριδισμός και πολυμερισμός) αποτελούν τον πρώτο κύκλο της αντίδρασης PCR. Ακολουθούν 30-40 κύκλοι, κάθε ένας από του οποίους περιλαμβάνει τρία στάδια (αποδιάταξη, υβριδισμός και πολυμερισμός), με αποτέλεσμα την εκθετική αύξηση του αριθμού των αντιγράφων του DNA σύμφωνα με την εξίσωση  $N=n(1+e)^a$ , όπου  $N$ =η τελική

ποσότητα του προϊόντος,  $n = n_0 \cdot 2^a$  αρχική ποσότητα του υποστρώματος και  $a = 0$  αριθμός των κύκλων της PCR. Αν υποθέσουμε ότι η απόδοση του συστήματος είναι 100% για κάθε κύκλο, τότε από ένα μόριο DNA μετά από 25 κύκλους έχουμε την παραγωγή 33.554.432 αντιγράφων της αλληλουχίας στόχου, ενώ μετά από 40 κύκλους έχουμε την παραγωγή 1.099.511.627.716 αντιγράφων. Κάθε κύκλος PCR περιλαμβάνει τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες, οι οποίες αντιστοιχούν σε κάθε ένα στάδιο του κύκλου.

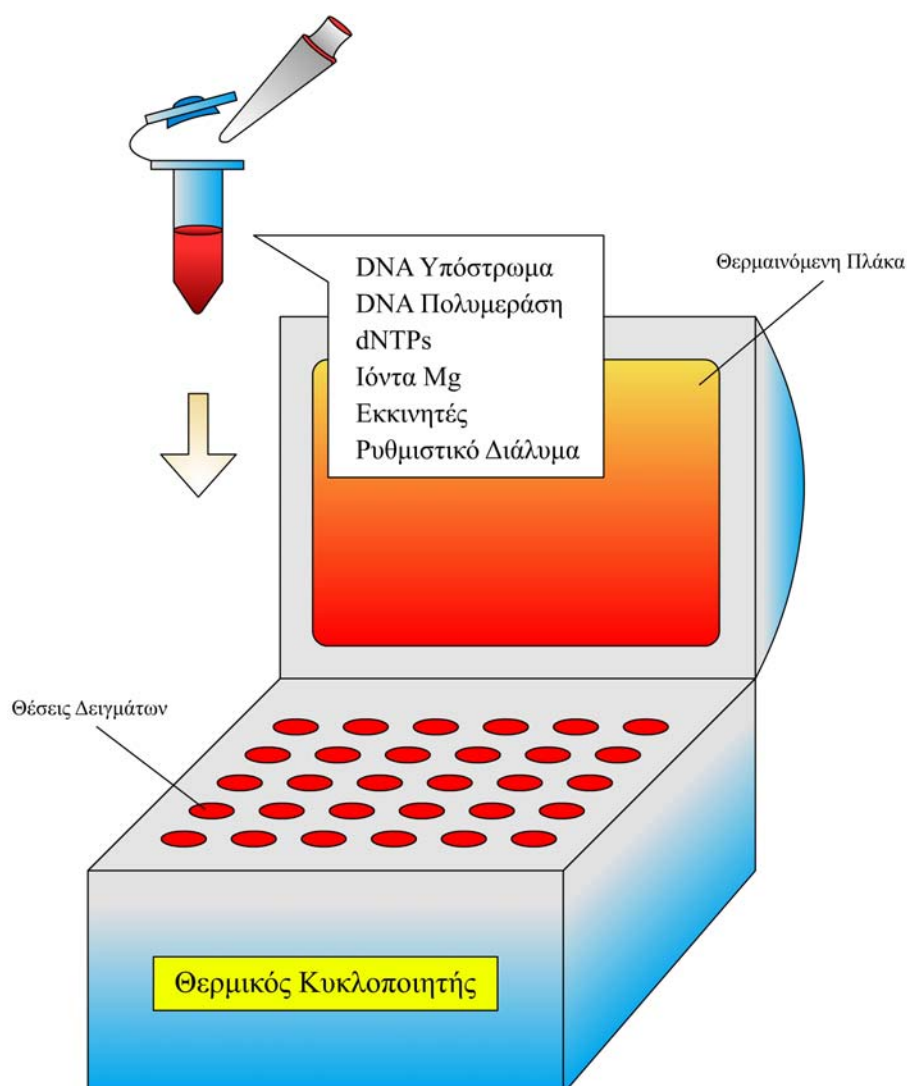
**Σχήμα 8.2.** Ο ρόλος του ενζύμου της DNA πολυμεράσης στην αντίδραση της PCR.



Η αποδιάταξη συμβαίνει συνήθως σε θερμοκρασία 92-95°C, ο υβριδισμός ανάλογα με τη σύνθεση των βάσεων A/T, G/C σε θερμοκρασία 50-65°C και τέλος ο πολυμερισμός σε θερμοκρασία 70-78°C. Οι εναλλαγές της θερμοκρασίας ανάμεσα σε κάθε κύκλο επιτυγχάνονται με αυτοματοποιημένες συσκευές, τους θερμοκούς κυκλοποιητές, οι οποίοι έχουν την ικανότητα να τροποποιούν με κατάλληλη θερμαινόμενη πλάκα τη θερμοκρασία μεταξύ των τριών προαναφερόμενων θερμοκρασιών σε λιγότερο από 1min για αυξομείωση θερμοκρασίας 40°C. Ένας τέτοιος θερμικός κυκλοποιητής παρουσιάζεται σχηματικά στο

### Σχήμα 8.3.

Σχήμα 8.3. Ο θερμικός κυκλοποιητής για την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης PCR.



### 8.3.2. Ρυθμιστικοί παράγοντες της PCR

Η απόδοση και η ειδικότητα της αντίδρασης PCR εξαρτάται από μια σειρά από παράγοντες, οι οποίοι παρουσιάζονται στον **Πίνακα 8.1**.

**Πίνακας 8.1.** Ρυθμιστικοί παράγοντες της PCR.

Επιλογή κατάλληλων εκκινητών (αλληλουχία)
Επιλογή κατάλληλων εκκινητών (θερμοκρασία αποδιάταξης $T_m$ )
Προσδιορισμός θερμοκρασίας υβριδισμού $T_a$
Συγκέντρωση ιόντων Μαγνησίου
Συγκέντρωση δεσοξυριβονουκλεοτιδίων dNTPs
Συγκέντρωση εκκινητών
Ποσότητα DNA υποστρώματος
Επιλογή DNA πολυμεράσης

Ο σχεδιασμός κατάλληλων εκκινητών αποτελεί βασικό παράγοντα επίτευξης ικανοποιητικής απόδοσης και ειδικότητας στην αντίδραση πολυμερισμού της PCR. Η γνώση της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων της περιοχής-στόχο αποτελεί τη βάση της σύνθεσης των εκκινητών. Περιοχές με ασυνήθεις αλληλουχίες βάσεων, όπως επαναλαμβανόμενα μοτίβα ή πολυπυριρινικές/πολυπυριμιδινικές περιοχές καθώς και αλληλουχίες, οι οποίες ενέχονται στο σχηματισμό δευτεροταγών δομών αποφεύγονται να επιλεγούν ως αλληλουχία στόχος.

Το μήκος των εκκινητών (συνήθως μεγαλύτερο των 20bp) εξασφαλίζει στατιστικά ότι οι εκκινητές έχουν ελάχιστη πιθανότητα υβριδισμού σε άλλες περιοχές του γονιδιώματος. Ωστόσο έχει βρεθεί πως εκκινητές με μήκος μεγαλύτερο των 30bp δε συμβάλουν σε περαιτέρω αύξηση της ειδικότητας της αντίδρασης της PCR. Το ζεύγος των εκκινητών πρέπει να έχουν παραπλήσιο αριθμό βάσεων G/C, να μην παρουσιάζουν συμπληρωματικότητα στο 3' ή στο 5' άκρο τους ώστε να αποφεύγεται ο σχηματισμός διμερών και να έχουν παραπλήσια θερμοκρασία αποδιάταξης ή τήξεως ( $T_m$ , melting temperature).

Με τον όρο θερμοκρασία αποδιάταξης ορίζεται η θερμοκρασία κατά την οποία η μετατροπή του δίκλωνου DNA σε μονόκλωνο ολοκληρώνεται στο 50%. Η θερμοκρασία αποδιάταξης για εκκινητές με μήκος μεγαλύτερο των 20bp υπολογίζεται σύμφωνα με τον τύπο  $T_m = (\text{αριθμός βάσεων A+T}) \times 2^\circ\text{C} + (\text{αριθμός βάσεων G+C}) \times 4^\circ\text{C}$ . Για αλληλουχίες εκκινητών 14-70 βάσεων μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί ο τύπος  $T_m = 81,5^\circ\text{C} + 16,6 \times (\log_{10}[\text{Συγκέντρωση μονοσθενών κατιόντων}])^\circ\text{C} + 0,41 \times (\%G+C)^\circ\text{C} - (600/\text{Μήκος ολιγονουκλεοτιδικής αλληλουχίας})^\circ\text{C}$ . Σήμερα για τον ακριβή σχεδιασμό των εκκινητών χρησιμοποιούνται ειδικά υπολογιστικά προγράμματα (π.χ. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), τα οποία επεξεργάζονται τις παραμέτρους αυτές και παρέχουν τη δυνατότητα επιλογής κατάλληλων εκκινητών που εξασφαλίζουν υψηλή ειδικότητα και απόδοση στην αντίδραση της PCR.

Ο προσδιορισμός της ακριβούς θερμοκρασίας υβριδισμού ( $T_a$ , annealing temperature) των εκκινητών παρουσιάζει ιδιαίτερη σημασία στην ειδικότητα της αντίδρασης της PCR. Η θερμοκρασία υβριδισμού  $T_a$  ποικίλει ανάλογα με το είδος των εκκινητών και του DNA υποστρώματος και κυμαίνεται μεταξύ  $37^\circ\text{C}$  και  $60^\circ\text{C}$ . Η επιλογή υψηλών θερμοκρασιών επιτυγχάνει περισσότερο εξειδικευμένο υβριδισμό, χαμηλής όμως απόδοσης. Σε χαμηλότερες θερμοκρασίες αυξάνει η απόδοση της αντίδρασης PCR σε βάρος όμως της ειδικότητας, με αποτέλεσμα τον αυξημένο κίνδυνο δημιουργίας παραπροϊόντων. Η θεωρητική ιδανική θερμοκρασία υβριδισμού  $T_a$  μπορεί να είναι έως και  $5^\circ\text{C}$  χαμηλότερη, μέχρι και  $12^\circ\text{C}$  υψηλότερη από τη θερμοκρασία αποδιατάξεως  $T_m$  των εκκινητών. Όσο πιο κοντά βρίσκεται η θερμοκρασία υβριδισμού  $T_a$  προς τη θερμοκρασία αποδιατάξεως  $T_m$  των εκκινητών, τόσο πιο πολύ η ειδικότητα αυξάνει. Ωστόσο για τον προσδιορισμό της πραγματικής θερμοκρασίας υβριδισμού απαιτείται η πραγματοποίηση πειραμάτων βελτιστοποίησης με διαβάθμιση θερμοκρασίας υβριδισμού  $T_a$ , τα οποία υποδεικνύουν στην

πράξη την τιμή της θερμοκρασίας η οποία εξασφαλίζει την καλύτερη απόδοση και ειδικότητα της αντίδρασης PCR.

Τα ιόντα Μαγνησίου είναι απαραίτητος συμπαράγοντας για τη δράση της πολυμεράσης και απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή στην ποσότητά τους. Τα ιόντα Μαγνησίου δημιουργούν ένα διαλυτό σύμπλεγμα με τα dNTPs, το οποίο είναι απαραίτητο για την ενσωμάτωση των dNTPs στη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα του DNA, ενώ ταυτόχρονα είναι απαραίτητο για την ενεργότητα της πολυμεράσης. Μεγάλες συγκεντρώσεις  $MgCl_2$  αυξάνουν την ενεργότητα της πολυμεράσης μειώνοντας όμως την πιστότητά της προκαλώντας την παραγωγή παραπροϊόντων, ενώ το αντίθετο ισχύει για μικρότερες συγκεντρώσεις. Οι συνήθεις ιδανικές συγκεντρώσεις ιόντων Μαγνησίου κυμαίνονται περίπου στα 0,5-5mM/αντίδραση.

Κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού απαιτούνται υψηλής καθαρότητας δεσοξυριβονουκλεοτίδια dNTPs σε συγκέντρωση που κυμαίνεται από 100-200 $\mu$ M. Η βέλτιστη συγκέντρωση των dNTPs εξαρτάται από τη συγκέντρωση των ιόντων Μαγνησίου, τη συγκέντρωση των εκκινητών, το μήκος της αλληλουχίας στόχου, τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης PCR καθώς και από τις συνθήκες της αντίδρασης.

Η συνήθης συγκέντρωση των εκκινητών σε μια αντίδραση PCR κυμαίνεται από 0,1-0,5mM. Χαμηλές συγκεντρώσεις εκκινητών έχουν ως αποτέλεσμα τη γρήγορη εξάντλησή τους, οπότε και λαμβάνεται μικρή ποσότητα προϊόντος, ενώ μεγάλες συγκεντρώσεις οδηγούν συχνά στο σχηματισμό παραπροϊόντων. Κατά τη βελτιστοποίηση της αντίδρασης PCR η συγκέντρωση των εκκινητών τροποποιείται σε συνδυασμό με τις συγκεντρώσεις του Μαγνησίου και των dNTPs με στόχο τον καθορισμό των κατάλληλων συγκεντρώσεων για μια δεδομένη θερμοκρασία υβριδισμού Ta.

Η ποσότητα του αρχικού υποστρώματος DNA μπορεί επίσης να επηρεάσει την αντίδραση PCR. Μεγάλη ποσότητα DNA οδηγεί σε μη ειδικό πολυμερισμό με την παραγωγή

παραπροϊόντων, ενώ μικρή ποσότητα συχνά απαιτεί την εφαρμογή της “nested” PCR. Με την τεχνική αυτή το προϊόν της PCR αντίδρασης υποβάλλεται σε μια νέα αντίδραση PCR χρησιμοποιώντας ζεύγος εκκινητών, που είναι εσωτερικά (inner primers) του αρχικού ζεύγους (outer primers).

Οι DNA πολυμεράσες είναι ένζυμα που καταλύουν την αντίδραση σύνθεσης πολυνουκλεοτιδικών αλυσίδων από μονομερή τριφωσφορικά δεσοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs) χρησιμοποιώντας ως μήτρα τη μια από τις δύο αρχικές αλυσίδες DNA. Η σύνθεση του DNA γίνεται με κατεύθυνση 5' προς 3', από τον 5' α-φώσφορο του τριφωσφορικού δεσοξυριβονουκλεοτιδίου προς την 3' τελική υδροξυλική ομάδα της νεοσυντιθέμενης αλυσίδας. Πριν την ανακάλυψη των θερμοανθεκτικών DNA πολυμερασών ήταν αναγκαία η συνεχής προσθήκη ενζύμου σε κάθε κύκλο της PCR λόγω της υψηλής θερμοκρασίας αποδιάταξης του DNA. Στον **Πίνακα 8.2** αναφέρονται ορισμένες από τις θερμοανθεκτικές DNA πολυμεράσες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σήμερα σε μια αντίδραση PCR.

**Πίνακας 8.2.** Θερμοανθεκτικές DNA πολυμεράσες.

<i>Taq</i>	Φυσική ( <i>Thermus aquaticus</i> )
<i>Amplitaq</i>	Ανασυνδυασμένη ( <i>Thermus aquaticus</i> )
<i>Hot Tub</i>	Φυσική ( <i>Thermus flavis</i> )
<i>Pyrostate</i>	Φυσική ( <i>Thermus flavis</i> )
<i>Tth</i>	Ανασυνδυασμένη ( <i>Thermus thermophilus</i> )
<i>Vent</i>	Ανασυνδυασμένη ( <i>Thermococcus litoralis</i> )
<i>DeepVent</i>	Ανασυνδυασμένη ( <i>Pyrococcus GB-D</i> )
<i>Pfu</i>	Φυσική ( <i>Pyrococcus furiosus</i> )

Η φυσική πολυμεράση *Taq* καθώς και η ανασυνδυασμένη μορφή της *Amplitaq* αποτελούν τις συχνότερα χρησιμοποιούμενες πολυμεράσες στην αντίδραση PCR. Έχουν την ικανότητα ενσωμάτωσης 35-100 νουκλεοτίδια/λεπτό και η θερμοκρασία βέλτιστης απόδοσης κυμαίνεται μεταξύ 70°C και 80°C. Έχουν επίσης 5'-3' εξωνουκλεολυτική δράση απομακρύνοντας νουκλεοτίδια μπροστά από τη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα, ενώ δεν έχουν 3'-

5' εξωνουκλεολυτική δράση. Η πολυμεράση *Pfu* έχει τόσο 5'-3', όσο και 3'-5' εξωνουκλεολυτική δράση με αποτέλεσμα την υψηλής ακρίβειας σύνθεση DNA, γεγονός που την καθιστά απαραίτητη σε περιπτώσεις που απαιτείται ακριβής πολυμερισμός καθώς και όταν η αρχική ποσότητα DNA είναι ελάχιστη. Ωστόσο η πολυμεράση αυτή δεν ενδείκνυται σε περιπτώσεις μεγάλου μήκους αλληλουχίας στόχου λόγω της χαμηλής ταχύτητάς της. Η χρήση μιγμάτων πολυμερασών αξιοποιώντας ταυτόχρονα τα επιμέρους πλεονεκτήματά της κάθε μιας πολυμεράσης αποτελεί μια εναλλακτική πρόταση βελτίωσης της ειδικότητας και της απόδοσης της αντίδρασης PCR.

### 8.3.3. Συνθήκες PCR και επιλογή εκκινητών

Ποσότητα 1μl από το εκχυλισμένο DNA κάθε δείγματος ενίσχυόταν με PCR σε τελικό όγκο 20μl με τη βοήθεια ειδικά τροποποιημένου θερμικού κυκλοποιητή (LightCycler, Roche). Για την αντίδραση, κάθε δείγμα χρειαζόταν 5μl ρυθμιστικού διαλύματος, 200μM από κάθε dNTP, 0,5μM από κάθε εκκινητή και 0,74 U Taq πολυμεράση. Σε κάθε αντίδραση PCR εξετάζονταν επίσης δύο δείγματα με όλα τα υλικά της PCR εκτός από το εκχυλισμένο DNA ως στοιχεία ελέγχου πιθανής επιμόλυνσης στην αντίδραση. Το μίγμα από κάθε δείγμα επωαζόταν για 1 λεπτό στους 95°C και ακολουθούσαν 35 κύκλοι ενίσχυσης με τις ακόλουθες συνθήκες:

**β2-μικροσφαιρίνη:** Για τον έλεγχο της ποσότητας του DNA που εκχυλιζόταν από τους λαμβανόμενους βιοψιακούς φρέσκους ή σε παραφίνη ιστούς, τα δείγματα ελέγχονταν με ενίσχυση μιας περιοχής 110bp του γονιδίου της β2-μικροσφαιρίνης, το οποίο χρησιμοποιείται ως γονίδιο μάρτυρας. Οι συνθήκες οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε κύκλο της αντίδρασης ήταν 94°C για 35sec (αποδιάταξη), 60°C για 40sec (υβριδισμός) και 72°C για 40sec (πολυμερισμός). Μέρος του των προϊόντων της PCR αναλύονταν σε πήκτωμα



αγαρόζης 2% και έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία, ώστε να πιστοποιηθεί η επιθυμητή ενίσχυση των 110bp.

**Πίνακας 8.3.** Εκκινητές και συνθήκες PCR που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων στο κωδικόνιο 12 των ογκογονιδίων *H-ras*, *K-ras* και *N-ras*.

Γονίδιο	Εκκινητές	Συνθήκες PCR
<i>H-ras</i> (DNA)	5-GAGACCCTGTAGGAGGACCC-3 (S)	94° για 35s (αποδιάταξη)
	5-GGGTGCTGAGACGAGGGACT-3 (A)	60° για 40s (υβριδισμός) 72° για 40s (πολυμερισμός)
<i>K-ras</i> (DNA)	5-ACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGACCT-3 (S)	94° για 35s (αποδιάταξη)
	5-TCAAAGAATGGTCTCGGACC-3 (A)	60° για 40s (υβριδισμός) 72° για 40s (πολυμερισμός)
<i>N-ras</i> (DNA)	5-AACTGGTGGTGGTTGGACCA-3 (S)	94° για 35s (αποδιάταξη)
	5-ATATTCATCTTACAAAGTGGTCCTGGA-3 (A)	60° για 40s (υβριδισμός) 72° για 40s (πολυμερισμός)
$\beta$ 2-m (DNA)	5-TCCAACATCAACATCCCGGT-3 (S)	94° για 35s (αποδιάταξη)
	5-TCCCCCAAATTCTAAGCAGA-3 (A)	58° για 40s (υβριδισμός) 72° για 40s (πολυμερισμός)

Σημείωση: S = Sense primer; A = Antisense primer.

***K-ras*:** Για την εύρεση μεταλλάξεων στο κωδικόνιο 12 του γονιδίου *K-ras* ενισχυτόταν πρώτα η αντίστοιχη περιοχή που περιέχει το κωδικόνιο 12 με την τεχνική της PCR χρησιμοποιώντας τους εκκινητές K5' και K3' (Jiang και συν, 1989). Οι συνθήκες οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε κύκλο της αντίδρασης ήταν 94°C για 35sec (αποδιάταξη), 60°C για 40sec (υβριδισμός) και 72°C για 40sec (πολυμερισμός). Μέρος του των προϊόντων της PCR αναλυόταν σε πήκτωμα αγαρόζης 2% και έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία, ώστε να πιστοποιηθεί η επιθυμητή ενίσχυση των 157bp.

**H-ras:** Για την εύρεση μεταλλάξεων στο κωδικόνιο 12 του γονιδίου H-ras ενισχυόταν πρώτα η αντίστοιχη περιοχή που περιέχει το κωδικόνιο 12 με την τεχνική της PCR χρησιμοποιώντας τους αντίστοιχους εκκινητές (Jiang και συν, 1989). Οι συνθήκες οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε κύκλο της αντίδρασης ήταν 94°C για 35sec (αποδιάταξη), 60°C για 40sec (υβριδισμός) και 72°C για 40sec (πολυμερισμός). Μέρος του των προϊόντων της PCR αναλυόταν σε πήκτωμα αγαρόζης 2% και έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία, ώστε να πιστοποιηθεί η επιθυμητή ενίσχυση των 312bp.

**N-ras:** Για την εύρεση μεταλλάξεων στο κωδικόνιο 12 του γονιδίου N-ras ενισχυόταν πρώτα η αντίστοιχη περιοχή που περιέχει το κωδικόνιο 12 με την τεχνική της PCR χρησιμοποιώντας τους αντίστοιχους εκκινητές N12a και N12s (Koffa και συν, 1994). Οι συνθήκες οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε κύκλο της αντίδρασης ήταν 94°C για 35sec (αποδιάταξη), 60°C για 40sec (υβριδισμός) και 72°C για 40sec (πολυμερισμός). Μέρος του των προϊόντων της PCR αναλυόταν σε πήκτωμα αγαρόζης 2% και έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία, ώστε να πιστοποιηθεί η επιθυμητή ενίσχυση των 83bp.

**HPV:** Για την ανίχνευση του ιού χρησιμοποιήθηκαν οι «γενικοί» εκκινητές GP5 και GP6 (Snijders και συν, 1990). Οι εκκινητές αυτοί παρουσιάζουν ομολογία με μια συντηρητική περιοχή του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης L1 των ιών HPV τύπου 6, 11, 16, 18, 31 και 33, ενώ με αρκετές διαφορές στη συμπληρωματικότητα των εκκινητών μπορούν να ενισχυθούν επίσης και οι τύποι 1, 5 και 8, οι οποίοι όμως δεν απαντώνται συχνά στο γυναικολογικό σύστημα. Οι συνθήκες, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε κύκλο της αντίδρασης ήταν 94°C για 50sec (αποδιάταξη), 52°C για 45sec (υβριδισμός) και 72°C για 45sec (πολυμερισμός). Μέρος των προϊόντων της PCR αναλύονταν σε πήκτωμα αγαρόζης 2% και έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία, ώστε να πιστοποιηθεί η επιθυμητή ενίσχυση των 150bp.

**Πίνακας 6.4.** Εκκινητές και συνθήκες PCR που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση και την τυποποίηση του ιού HPV.

Γονίδιο	Εκκινητές	Συνθήκες PCR
HPV GP5/GP6 (DNA)	5-TTTGTTACTGTGGTAGATAC-3 (GP5) 5-GAAAAATAAACTGTAAATCA-3 (GP6)	94° για 50s (αποδιάταξη) 52° για 45s (υβριδισμός) 72° για 45s (πολυμερισμός)
HPV 16 (DNA)	5-3 CTGCAAGCAACAGTACTGCGACG(S) 5-3 CATACATCGACCGGTCCACC(A)	94° για 45s (αποδιάταξη) 56° για 45s (υβριδισμός) 72° για 50s (πολυμερισμός)
HPV 18 (DNA)	5-AAACTAACTAACACTGGGTATACA-3 (S) 5-ATGGCACTGGCCTCTATAGT-3 (A)	94° για 45s (αποδιάταξη) 56° για 45s (υβριδισμός) 72° για 50s (πολυμερισμός)
HPV 33 (DNA)	5-AACAGTTAAAAACCTTAAA-3 (S) 5-AGTTTCTCTACGTCGGGACCTC-3 (A)	94° για 45s (αποδιάταξη) 56° για 45s (υβριδισμός) 72° για 50s (πολυμερισμός)
HPV 11 (DNA)	5-TGTGTGGCGAGACAACCTTCCCTT-3 (S) 5-TGGTTATTTAGTTTTATGAAGCGTGCCTTTCCC-3 (A)	94° for 45s (αποδιάταξη) 56° for 45s (υβριδισμός) 72° για 50s (πολυμερισμός)
β2-m (DNA)	5-TCCAACATCAACATCCCGGT-3 (S) 5-TCCCCCAAATTCTAAGCAGA-3 (A)	94° for 50s (αποδιάταξη) 52° for 45s (υβριδισμός) 72° για 45s (πολυμερισμός)

*Σημείωση: S = Sense primer; A = Antisense primer.*

Επίσης για την τυποποίηση των ιών HPV χρησιμοποιήθηκαν σε ξεχωριστές αντιδράσεις «ειδικοί» εκκινητές για τους ιούς HPV τύπου 16, 18, 11 και 33 (Arends και συν, 1991). Οι εκκινητές αυτοί παρουσιάζουν πλήρη ομολογία με την αντίστοιχη νουκλεοτιδική αλληλουχία του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης E6 του κάθε τύπου ιού. Οι συνθήκες, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε κύκλο της αντίδρασης ήταν 94°C για 50sec (αποδιάταξη), 52°C για 45sec (υβριδισμός) και 72°C για 45sec (πολυμερισμός). Μέρος του των προϊόντων της PCR αναλύταν σε πήκτωμα αγαρόζης 2% και έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία, ώστε

να πιστοποιηθεί η επιθυμητή ενίσχυση των 143bp για τον ιό HPV 18, 171bp για τον ιό HPV 33, 211bp για τον ιό HPV 11 και 315bp για τον HPV 16. Για την ταυτοποίηση της ειδικότητας των επιμέρους αντιδράσεων χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες πλασμιδιακά DNA των ιών HPV 18, 33, 11 και 16 αντίστοιχα.

Στους Πίνακες 8.3 και 8.4 παρουσιάζονται οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και οι συνθήκες, στις οποίες πραγματοποιήθηκαν οι αντιδράσεις PCR.

#### **8.4. Ανάλυση πολυμορφισμού μεγέθους περιοριστικών θραυσμάτων (RFLP)**

##### **8.4.1. Αρχές της μεθόδου**

Για την ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων στα ογκογονιδια *K-ras*, *H-ras* και *N-ras* καθώς και για την επιβεβαίωση της τυποποίησης των HPV χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ανάλυσης πολυμορφισμού μεγέθους περιοριστικών θραυσμάτων RFLP (Dokianakis και συν, 1999, Koffa και συν, 1994). Η αρχή της μεθόδου συνίσταται στην πέψη των PCR προϊόντων με περιοριστικές ενδονουκλεάσες, οι οποίες έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν συγκεκριμένες θέσεις (ειδικές θέσεις) στο DNA στόχο και να προκαλούν τη διάσπασή του σε δύο ή περισσότερα θραύσματα (πέψη). Αν υπάρχει μετάλλαξη στις ειδικές θέσεις αναγνώρισης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης, τότε δεν μπορεί να δράσει η ενδονουκλεάση και προκύπτει αλλοιωμένο πρότυπο περιοριστικών θραυσμάτων. Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων της PCR-RFLP ανάλυσης γίνεται με βάση την παρατήρηση των θραυσμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης ή πολυακρυλαμιδίου.

##### **8.4.2. Ανίχνευση μεταλλάξεων ογκογονιδίων *ras* και τυποποίηση ιών HPV**

Στα Σχήματα 8.4, 8.5 και 8.6 παρουσιάζεται η μέθοδος της PCR-RFLP, όπως αυτή εφαρμόστηκε για την ανίχνευση μεταλλάξεων στο κωδικόνιο 12 των γονιδίων *K-ras*, *H-ras*

και *N-ras* Τα προϊόντα της πέψης που αναφέρονται στα σχήματα αυτά αφορούν την περίπτωση των φυσιολογικών γονιδίων. Παρακάτω περιγράφονται τα προϊόντα της πέψης τόσο στην περίπτωση των φυσιολογικών όσο και στην περίπτωση σημειακών μεταλλάξεων στο κωδικόνιο 12 των γονιδίων αυτών. Στο **Σχήμα 8.7** παρουσιάζεται η αρχή της μεθόδου RFLP για την τυποποίηση του ιού HPV.

***K-ras*:** Η ανάδειξη σημειακών μεταλλάξεων στο κωδικόνιο 12 του γονιδίου *K-ras* καθίσταται δυνατή με την εισαγωγή μιας μη ομόλογης βάσης στον κάθε εκκινητή, με αποτέλεσμα τη δημιουργία δυο θέσεων αναγνώρισης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης BstN I, από τις οποίες η μια περιλαμβάνει το κωδικόνιο 12, ενώ η άλλη χρησιμεύει ως μάρτυρας πιστότητας της πέψης.

Για το λόγο αυτό, ο εκκινητής του 5' άκρου έχει ενσωματωμένο ένα κατάλοιπο κυτοσίνης αντί γουανίνη στην πρώτη θέση του κωδικονίου 11, οπότε δημιουργείται μια θέση αναγνώρισης για την περιοριστική ενδονουκλεάση BstN I (CCTGG), η οποία περιλαμβάνει τα δύο πρώτα νουκλεοτίδια του κωδικονίου 12 (GGT). Σημειακή μετάλλαξη ενός από τα δύο νουκλεοτίδια αυτά προκαλεί καταστροφή της θέσης αναγνώρισης, οπότε το ένζυμο δεν τεμαχίζει σε θραύσματα 113bp και 29bp, όπως συμβαίνει στην περίπτωση της φυσιολογικής μορφής του γονιδίου, αλλά παράγεται ένα θραύσμα μεγέθους 143bp.

Σημειακή μετάλλαξη στο τρίτο νουκλεοτίδιο (θυμίνη) του κωδικονίου 12 δεν ελέγχεται με τον τρόπο αυτό, ωστόσο δεν παρουσιάζει ενδιαφέρον καθώς όλα τα κωδικόνια που ενδέχεται να προκύψουν κωδικοποιούν το ίδιο αμινοξύ με εκείνο του αμετάλλακτου κωδικονίου (γλυκίνη).

**Σχήμα 8.4.** Αρχή λειτουργίας της PCR-RFLP μεθόδου για την ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων στο κωδικόνιο 12 του γονιδίου *K-ras*.

5'...ATGACTG AATATAAACTTCTGCTAGTTGGAGCTGGTGGC.....ATATTACTGGTCCAGGACCATTCTTTGATACAGA...3'

Άλληλουχία του γονιδίου *K-ras* με φυσιολογικό κωδικόνιο 12

5' ACTGAAATATAAACTTCTGCTAGTTGGACCT3'

5' εκαονητής (6410-6439)

3' CCAGGTCTCTGGTAAGAAACT5'

3' εκαονητής (6547-6566)

PCR πολυμερισμός



5' ACTGAAATATAAACTTCTGCTAGTTGGACCTGGTGGC.....ATATTACTGGTCCAGGACCATTCTTTGCA3'

Προϊόν PCR (157bp)

RFLP Ανάλυση- Πέψη με BstN I



5' TGGTGGC.....ATATTACTGGTCC 3'

Προϊόν Πέψης (113bp)

5' ACTGAAATATAAACTTCTGCTAGTTGGACCT3'

Προϊόν Πέψης (29bp)

5' AGGACCATTCTTTGCA3'

Προϊόν Πέψης (15bp)

*Σημείωση.* Με μεγαλύτερα γράμματα σημειώνονται οι βάσεις του κωδικόνιου 12 (GGT) και με υπογράμμιση οι θέσεις αναγνώρισης της ενδονουκλεάσης *BstN I* (CC(A/T)GG).







Σε μέρος των προϊόντων της PCR αντίδρασης (15μl) γινόταν πέψη με 20U της περιοριστικής ενδονουκλεάσης BstN I στους 60°C για 4h. Τα προϊόντα της πέψης αναλύονταν στη συνέχεια σε πήκτωμα αγαρόζης 2% ή πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 8%, όπου παρατηρούνταν τα θραύσματα DNA διαφορετικού μήκους για το φυσιολογικό (113bp και 29bp) και μεταλλαγμένο (143bp) αλληλόμορφο.

**H-ras:** Για την εύρεση σημειακών μεταλλάξεων στο κωδικόνιο 12 του γονιδίου H-ras, δεν χρειάζεται η εισαγωγή μη ομόλογων βάσεων στους εκκινητές δεδομένου ότι υπάρχουν ενδογενώς δύο θέσεις αναγνώρισης για την περιοριστική ενδονουκλεάση Msp I στο προϊόν της PCR για το H-ras. Η πρώτη εντοπίζεται στο τέλος του εκκινητή στο 5' άκρο και χρησιμεύει ως θέση ελέγχου της πέψης με Msp I, ενώ η δεύτερη είναι πολυμορφική για τις μεταλλάξεις του H-ras σε μια από τις δύο πρώτες θέσεις του κωδικόνιου 12.

Σε μέρος των προϊόντων της PCR αντίδρασης (15μl) γινόταν πέψη με 30U της περιοριστικής ενδονουκλεάσης Msp I στους 37°C για 12h. Τα προϊόντα της πέψης αναλύονταν στη συνέχεια σε πήκτωμα αγαρόζης 2% ή πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 8%, όπου παρατηρούνταν τα θραύσματα DNA διαφορετικού μήκους για το φυσιολογικό (236bp και 55bp) και μεταλλαγμένο (291bp) αλληλόμορφο.

**N-ras:** Για την εύρεση σημειακών μεταλλάξεων στο κωδικόνιο 12 του γονιδίου N-ras, σε μέρος των προϊόντων της PCR αντίδρασης (15μl) γινόταν πέψη με 30U της περιοριστικής ενδονουκλεάσης BstN I στους 60°C για 6h. Τα προϊόντα της πέψης αναλύονταν στη συνέχεια σε πήκτωμα αγαρόζης 2% ή πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 8%, όπου παρατηρούνταν τα θραύσματα DNA διαφορετικού μήκους για το φυσιολογικό (19bp, 23bp και 41bp) και μεταλλαγμένο αλληλόμορφο (23bp και 60bp).

**HPV:** Για την εύρεση του τύπου του HPV χρησιμοποιώντας τους «γενικούς» εκκινητές, σε μέρος των προϊόντων της PCR αντίδρασης (15μl) γινόταν πέψη με 40U της περιοριστικής ενδονουκλεάσης Rsa I στους 60°C για 6h, οπότε προέκυπταν τμήματα DNA

διαφορετικού μήκους για κάθε τύπο HPV ιό. Τα προϊόντα της πέψης αναλύονται στη συνέχεια σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 8%. Μετά την περιοριστική πέψη προέκυπταν θραύσματα 39bp και 109bp για τον ιό HPV 11, 30bp, 42bp και 70bp για τον ιό HPV 16, 30bp, 38bp και 77bp για τον ιό HPV 18 και 30bp, 39bp και 70bp για τον ιό HPV 33. Οι τύποι των ιών HPV που ανιχνεύονται κάθε φορά επιβεβαιώνονται με τη χρησιμοποίηση στην αντίδραση PCR ειδικών εκκινητών για κάθε ένα τύπο ιό HPV (16, 18, 11, 33).

**Σχήμα 8.7.** Αρχή λειτουργίας της PCR-RFLP μεθόδου για την τυποποίηση των ιών HPV.

5' ...TTTGTACTGTGGTAGATAC.....TGATTACAGTTTATTTTTTC... 3'  
*Αλληλουχία ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης L1 ORF του ιού HPV 11*

5' TTTGTACTGTGGTAGATAC 3'

5' εκκινητής

3' ACTAAATGTCAAATAAAAAG 5'

3' εκκινητής

PCR Πολυμερισμός



PCR Προϊόν

RFLP Ανάλυση-Πέψη με Msp I

Προϊόντα Πέψης  
30bp, 38bp και 77bp  
**HPV 18**

Προϊόντα Πέψης  
30bp, 42bp και 70bp  
**HPV 16**

Προϊόντα Πέψης  
39bp και 109bp  
**HPV 11**

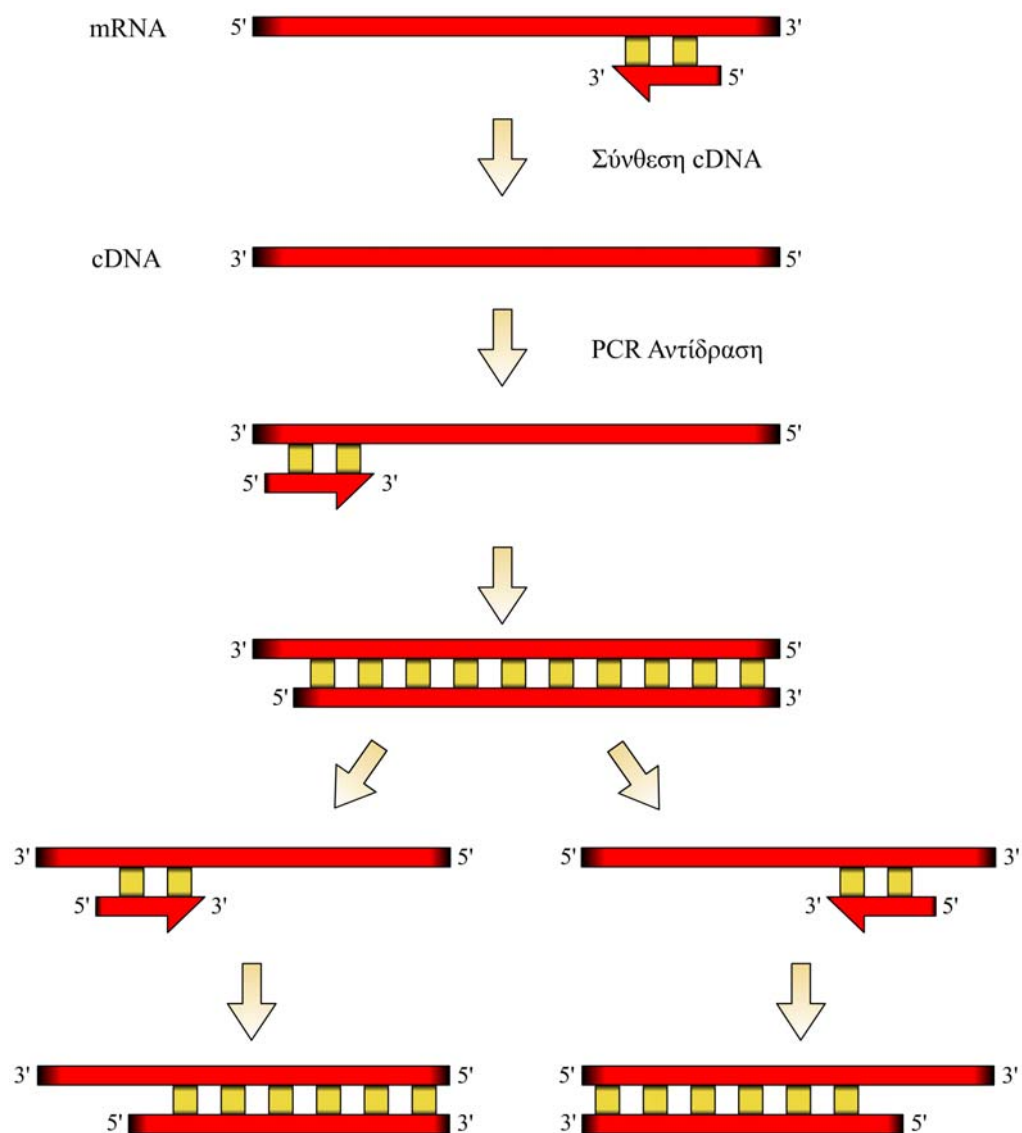
Προϊόντα Πέψης  
30bp, 39bp και 70bp  
**HPV 33**

## 6.5. Αντίστροφη αλυσιδωτή αντίδραση με πολυμεράση (RT-PCR)

### 6.5.1. Αρχές της μεθόδου

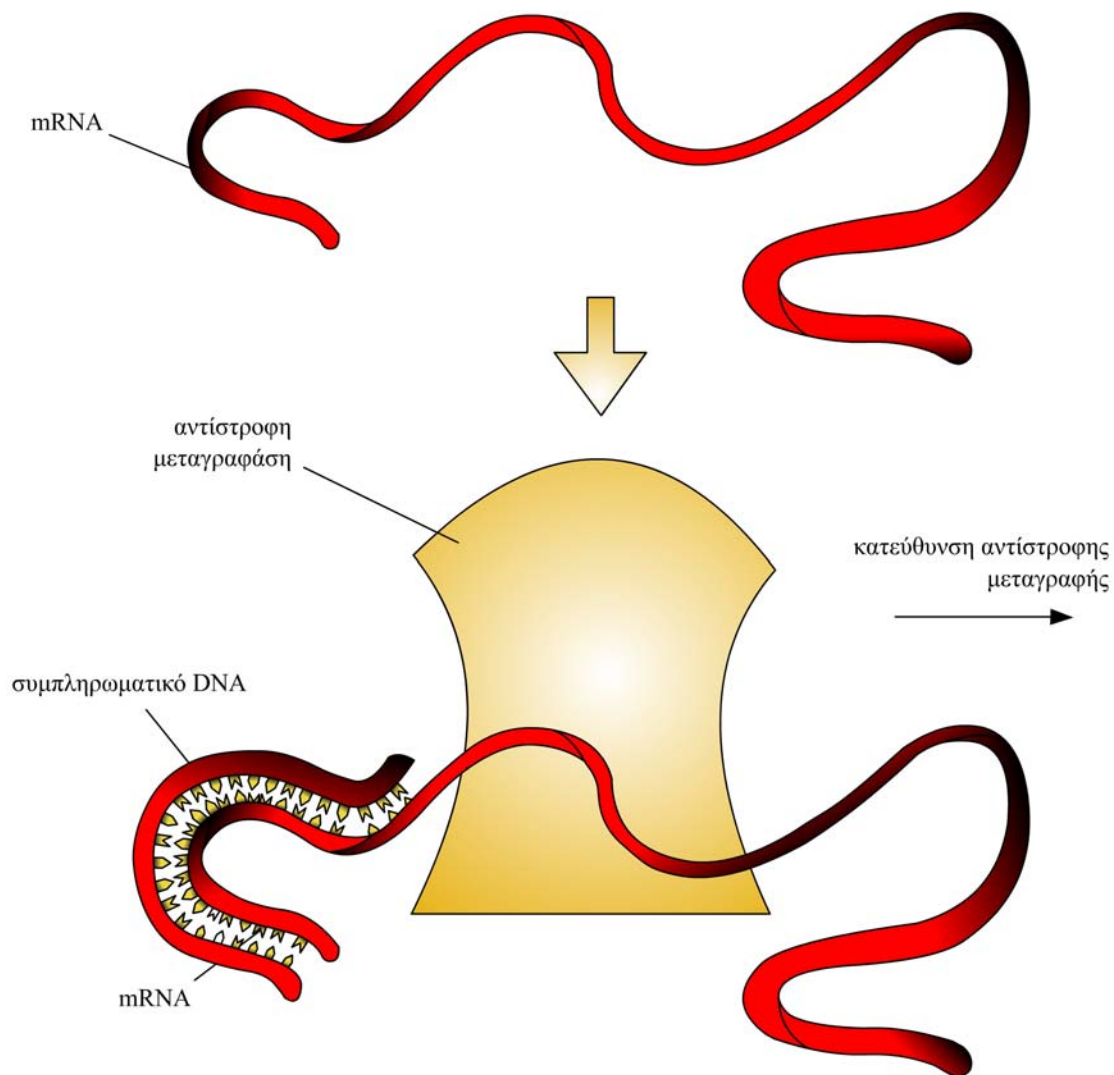
Η αντίστροφη αλυσιδωτή αντίδραση με πολυμεράση (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction RT-PCR) αποτελεί μια από τις βασικότερες εφαρμογές της αντίδρασης PCR με στόχο τη μελέτη του RNA αντί του DNA. Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου παρουσιάζεται στο **Σχήμα 6.8**.

**Σχήμα 6.8.** Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου της αντίστροφης μεταγραφάσης-αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (RT-PCR).



Η μέθοδος αποτελείται από δύο στάδια: α) το στάδιο της αντίστροφης μεταγραφής RT και β) το στάδιο του PCR πολυμερισμού. Στο πρώτο στάδιο έχουμε τη μετατροπή του ολικού RNA, το οποίο έχει εκχυλιστεί από το προς μελέτη δείγμα σε cDNA με τη χρήση του ενζύμου της αντίστροφης μεταγραφάσης (**Σχήμα 8.9**). Στο δεύτερο στάδιο το μόριο cDNA αποτελεί το υπόστρωμα για την αντίδραση PCR που ακολουθεί, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την ενίσχυση της αλληλουχίας στόχου που θέλουμε να μελετήσουμε.

**Σχήμα 8.9.** Ο ρόλος της αντίστροφης μεταγραφάσης στη μέθοδο της RT-PCR.



### 8.5.2. Ποσοτικοποίηση επιπέδων mRNA ογκογονιδίων *ras*

Πριν την εποχή της PCR, η προσέγγιση του ποσοτικού προσδιορισμού των νουκλεϊκών οξέων γινόταν με τεχνικές υβριδισμού, Southern blotting και Northern blotting, με ελάχιστο όριο ανίχνευσης ποσοτικού προσδιορισμού των μορίων στόχου από 10.000 έως 10.000.000 μόρια. Η εφαρμογή της αντίδρασης PCR στον ποσοτικοποίηση των νουκλεϊκών οξέων μπορεί να στοχεύει είτε στο σχετικό ποσοτικό προσδιορισμό με τη σύγκριση των σχετικών συγκεντρώσεων μεταξύ διαφόρων δειγμάτων από τους ίδιους (π.χ. ζεύγος καρκινικού και γειτονικού φυσιολογικού ιστού) ή άλλους ασθενείς (π.χ. σύγκριση καρκινικών ιστών με ομάδα ελέγχου φυσιολογικών ιστών), είτε στον ακριβή προσδιορισμό των μορίων στόχου σε ένα δεδομένο δείγμα.

Η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων της RT-PCR παρέχει τη δυνατότητα μελέτης μέσω του υπολογισμού των επιπέδων mRNA της μεταγραφικής ενεργοποίησης των διάφορων γονιδίων. Σε περιπτώσεις καρκινικών δειγμάτων μπορεί να γίνει σύγκριση των επιπέδων mRNA ενός γονιδίου με τα αντίστοιχα σε γειτονικά φυσιολογικά δείγματα από τον ίδιο ασθενή ή σε ομάδα ελέγχου από διαφορετικούς ασθενείς με φυσιολογικά δείγματα. Για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων της RT-PCR πρέπει να έχει τερματιστεί η αντίδραση της PCR ενώ βρίσκεται στην εκθετική της φάση, ώστε να υπάρχει γραμμική αντιστοιχία της τελικής ποσότητας προϊόντος και του αρχικού υποστρώματος. Με τη δημιουργία πρότυπης καμπύλης καθορίζονται οι κύκλοι καθώς και οι συνθήκες, ώστε να διατηρείται η γραμμική αυτή σχέση (Kotsinas και συν, 1994).

Για να επιτευχθούν ποσοτικές μετρήσεις μπορεί να εφαρμοστεί duplex PCR κατά την οποία στην ίδια αντίδραση ενισχύονται ταυτόχρονα η αλληλουχία στόχος του προς μελέτη γονιδίου μαζί με μια αλληλουχία ενός γονιδίου ελέγχου με σταθερή έκφραση στους φυσιολογικούς και τους καρκινικούς ιστούς. Η duplex PCR αποτελεί εφαρμογή της multiplex PCR, η οποία επιτρέπει την ταυτόχρονη μελέτη πολλών γονιδίων στο ίδιο σωλήνα

του δείγματος κατά τη διάρκεια της ίδιας αντίδρασης PCR. Για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων της duplex RT-PCR πρέπει α) και οι δύο καμπύλες να παρουσιάζουν την γραμμική τους φάση ταυτόχρονα, β) η μέγιστη ποσότητα (πλατώ) των τελικών προϊόντων να είναι συγκρίσιμη, ενώ γ) η αντίδραση PCR πρέπει να τερματίζεται στον κύκλο, ο οποίος αντιστοιχεί στο μέσο της γραμμικής φάσης. Για το λόγο αυτό γίνεται βελτιστοποίηση των συνθηκών της duplex PCR, με την τροποποίηση των συγκεντρώσεων Μαγνησίου, των dNTPs και της αναλογίας των εκκινητών για κάθε γονίδιο καθώς και της θερμοκρασίας υβριδισμού Ta.

Για τον καθορισμό των πρότυπων καμπυλών παρασκευάζεται μίγμα με cDNA ίσου όγκου από κάθε δείγμα και πραγματοποιείται η αντίδραση PCR, από την οποία λαμβάνεται διαδοχικά μετά το πέρας κάθε κύκλου το PCR προϊόν για να ηλεκτροφορηθούν στη συνέχεια όλα μαζί. Με τον τρόπο αυτό κάθε PCR προϊόν αντιστοιχεί στο προϊόν που λαμβάνεται διαδοχικά σε κάθε κύκλο με αποτέλεσμα τη δημιουργία της πρότυπης καμπύλης της αντίδρασης. Τα προϊόντα της RT-PCR διαχωρίζονται ηλεκτροφορητικά σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου και πραγματοποιείται πυκνομετρική ανάλυση των ηλεκτροφορητικών ζωνών. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης αναλύονται με τη βοήθεια ψηφιακού συστήματος ανάλυσης εικόνας. Με τη χρήση σήμερα της Real-time PCR ο προσδιορισμός της ποσότητας του προϊόντος σε κάθε κύκλο γίνεται αυτόματα, με αποτέλεσμα στο μέλλον, παρά το γεγονός πως η εφαρμογή της υποκρύβει διάφορα προβλήματα, αναμένεται να αντικαταστήσει την ημιποσοτική RT-PCR.

Στην παρούσα μελέτη, σε 500ng ολικού RNA από κάθε δείγμα με τη βοήθεια ειδικού θερμικού κυκλοποιητή (LightCycler, Roche) γινόταν αρχικά η αντίστροφη μεταγραφή σε όγκο 20μl με 15U του ενζύμου της αντίστροφης μεταγραφάσης, 40 U RNaseOut, 50ng random hexamers και 1,0 mM από κάθε dNTP και 1x First Strand cDNA ρυθμιστικό διάλυμα, το οποίο περιέχει 5 mM διθειοθρεϊτόλη DTT για 1 ώρα στους 52°C με βάση τις

οδηγίες του κατασκευαστή του ενζύμου (Life Technologies Ltd., UK). Στη συνέχεια γινόταν επώαση για 20 λεπτά στους 37°C με 2 U E.coli RNaseH με στόχο την απαλλαγή του τελικού προϊόντος από RNA και το λαμβανόμενο cDNA αποθηκευόταν στους -20°C. Ο πολυμερισμός του cDNA με την αντίδραση της PCR γινόταν, όπως περιγράφηκε στην Παράγραφο 3.3 με τη διαφορά της χρήσης ταυτόχρονα δύο ζευγών εκκινητών (duplex PCR). Ποσότητα 1μl από το cDNA κάθε δείγματος ενίσχυόταν σε τελικό όγκο 20μl με τη βοήθεια ειδικά τροποποιημένου θερμικού κυκλοποιητή (LightCycler, Roche) και την ταυτόχρονη χρήση ζεύγους εκκινητών για το προς μελέτη κάθε φορά mRNA και για την b-actin (γονίδιο αναφοράς).

**Πίνακας 8.5.** Εκκινητές και συνθήκες PCR αντιδράσεων που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της έκφρασης του mRNA των ογκογονιδίων *H-ras*, *K-ras* και *N-ras*.

Γονίδιο	Εκκινητές	Συνθήκες PCR
H-ras (RNA)	5-GACGGAATATAAGCTGGTGG-3 (S) 5-TAACTACCCCTCTGCACGGA-3 (A)	94° για 35s (αποδιάταξη) 60° για 40s (υβριδισμός) 72° για 40s (πολυμερισμός)
K-ras (RNA)	5-ACTGAATATAAACTTGTGGTAG TT GGACCT-3 (S) 5-CAAATCACATTTATTTCTACCA GGACCT-3 (A)	94° για 30s (αποδιάταξη) 58° για 30s (υβριδισμός) 72° για 40s (πολυμερισμός)
N-ras (RNA)	5-AATCCAGCTAATCCAGAACC-3 (S) 5-TGGTCTCTCATGGCACTGTA-3 (A)	94° για 30s (αποδιάταξη) 58° για 30s (υβριδισμός) 72° για 40s (πολυμερισμός)
β-actin (RNA)	5-AGCCTCGCCTTTGCCGA-3 (S) 5-CTGGTGCCTGGGGCG-3 (A)	94° για 35s (αποδιάταξη) 60° για 40s (υβριδισμός) 72° για 40s (πολυμερισμός)
		94° για 30s (αποδιάταξη) 58° για 30s (υβριδισμός) 72° για 40s (πολυμερισμός)

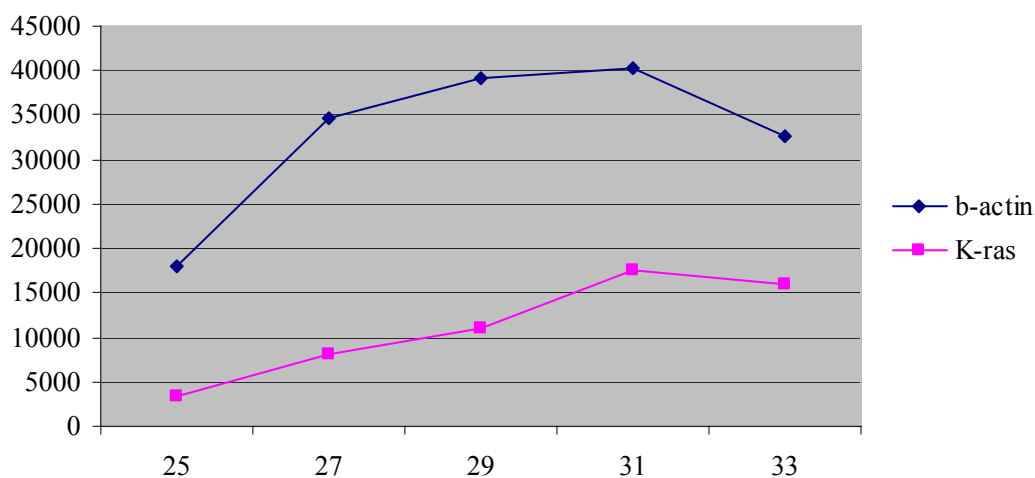
Σημείωση: S = Sense primer; A = Antisense primer.

Για την αντίδραση, κάθε δείγμα χρειαζόταν 5μl 1xPCR ρυθμιστικού διαλύματος, 200μM από κάθε dNTP, 2,5 μM MgCl<sub>2</sub>, 0,5μM από κάθε εκκινητή και 0,6 U Taq πολυμεράση. Οι κατάλληλα σχεδιασμένα ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές των mRNA των K-, H- και N-ras γονιδίων (Miyakis και συν 1998, Vageli και συν, 1996) και της b-actin που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη καθώς και οι συνθήκες των PCR αντιδράσεων παρουσιάζονται στον **Πίνακα 8.5**.

Στο **Σχήμα 8.10** παρουσιάζονται οι καμπύλες μέσω των οποίων καθορίστηκε ο κύκλος, στον οποίο θα πραγματοποιούνταν οι ποσοτικές μετρήσεις για κάθε γονίδιο.

**Σχήμα 8.10.** Βελτιστοποίηση της μεθόδου RT-PCR για τη μελέτη της έκφρασης των ογκογονιδίων *ras*. Καθορισμός του κύκλου πραγματοποίησης των ποσοτικών προσδιορισμών. Για την αντίδραση β-actin /K-*ras* (A) ο κύκλος που επιλέχθηκε ήταν ο 27<sup>ος</sup>, για την αντίδραση β-actin/H-*ras* (B) ο 29<sup>ος</sup> και για την αντίδραση β-actin/N-*ras* (Γ) ο 31<sup>ος</sup> κύκλος. Στον άξονα ψ΄ παρουσιάζεται η έκφραση, με βάση τη μέτρηση της απορρόφησης σε πήκτωμα αγαρόζης, κάθε γονιδίου ξεχωριστά στο τέλος κάθε κύκλου της PCR αντίδρασης, ενώ στον άξονα χχ΄ παρουσιάζεται ο κύκλος στον οποίο πραγματοποιήθηκε ο ποσοτικός προσδιορισμός.

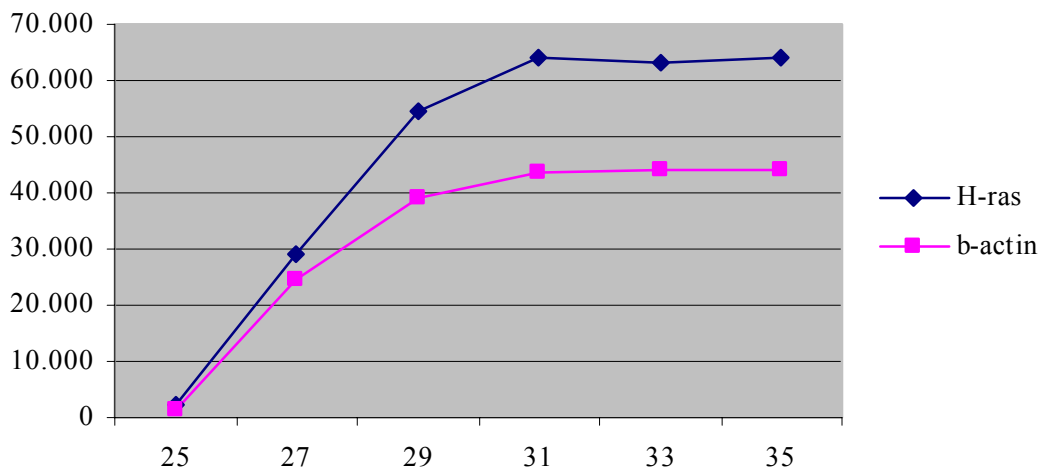
A.



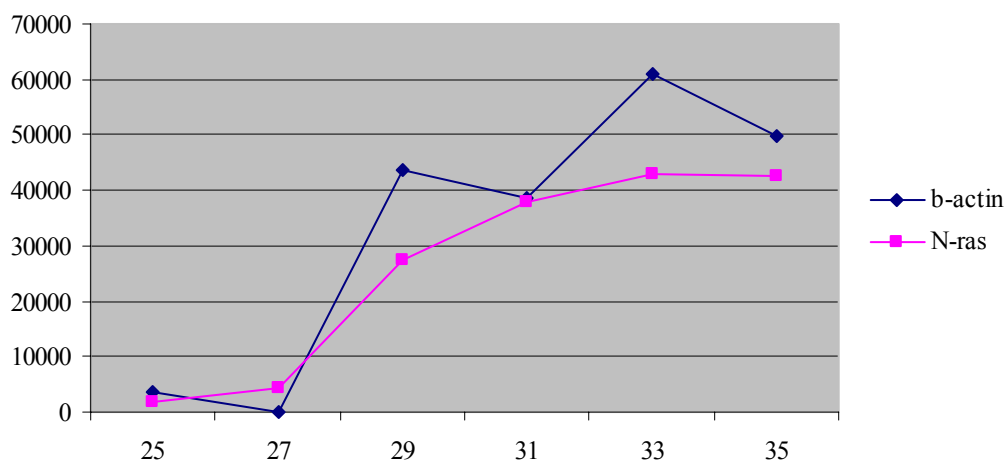


**Σχήμα 8.10.** Βελτιστοποίηση μεθόδου RT-PCR για τη μελέτη της έκφρασης των ογκογονιδίων *ras* (συνέχεια από την προηγούμενη σελίδα)

B.



Γ.



Τα PCR προϊόντα αναλύονταν σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου και γίνονται ορατά με χρώση με νιτρικό άργυρο. Τα μεγέθη των PCR προϊόντων ήταν τα ακόλουθα: για τη *β-actin* 175bp, για το *H-ras* 151bp, για το *K-ras* 357bp και για το *N-ras* 150bp. Τα επίπεδα έκφρασης για κάθε γονίδιο *H-ras*, *K-ras* και *N-ras* εκφράστηκαν ως ο λόγος των επιπέδων mRNA *ras* προς τα επίπεδα έκφρασης της *b-actin* (γονίδιο αναφοράς).

## **8.6. Ηλεκτροφόρηση**

### **8.6.1. Αρχές της μεθόδου**

Η ηλεκτροφόρηση συνίσταται στο διαχωρισμό μορίων με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου με βάση το μέγεθός και το φορτίο τους. Στην περίπτωση του DNA η ηλεκτροφόρηση των μορίων μπορεί να γίνει είτε σε πήκτωμα αγαρόζης είτε σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. Η επιλογή του πηκτώματος καθώς και της συγκέντρωσής του γίνεται με βάση το μέγεθος του DNA που πρόκειται να ηλεκτροφορηθεί καθώς και την απαιτούμενη διακριτική ικανότητα της πειραματικής διαδικασίας. Το πήκτωμα αγαρόζης (συνήθης συγκέντρωση 1-2%) χρησιμοποιείται για την ηλεκτροφόρηση μεγάλων DNA τμημάτων καθώς και για μεγάλες διαφορές μεγέθους των τμημάτων που πρόκειται να διαχωριστούν. Αντίθετα, το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (19:1 μίγμα ακρυλαμιδίου/bis-ακρυλαμιδίου) επιλέγεται για μικρότερα τμήματα DNA και για μικρές διαφορές μεγέθους ανάμεσά τους.

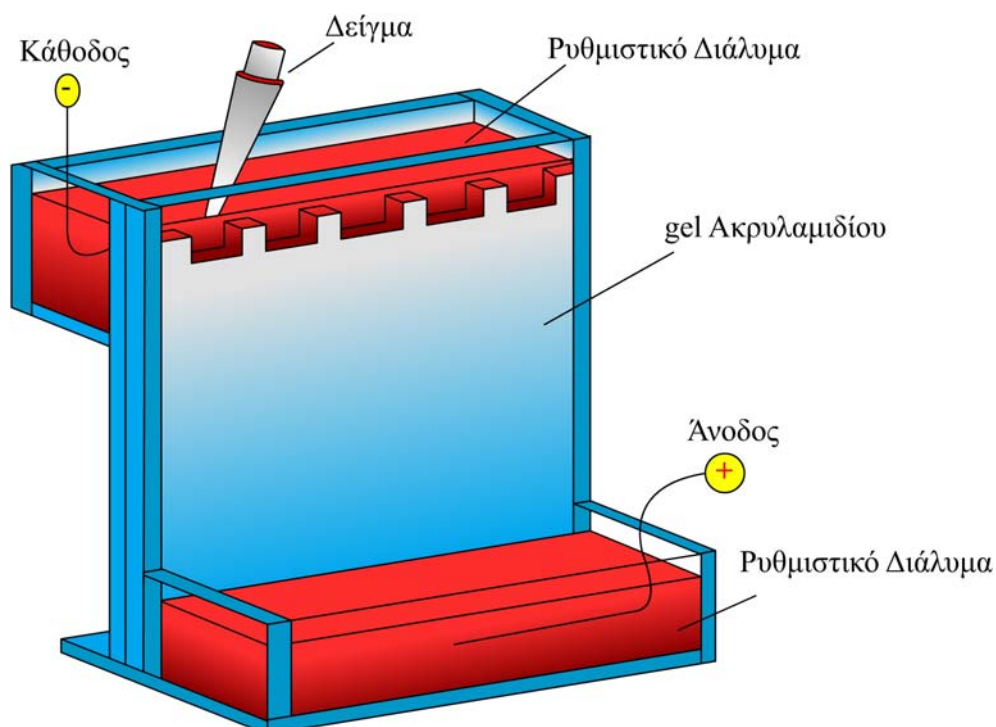
### **6.6.2. Πήκτωμα αγαρόζης**

Η επιθυμητή ποσότητα αγαρόζης διαλύεται σε διάλυμα 0,5xTBE και θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων για 3-5min περίπου. Αφήνεται να κρυώσει έως τους 60°C για λίγα λεπτά και ακολούθως προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) σε τελική συγκέντρωση 0,5μg/ml. Το στερεοποιημένο πήκτωμα μετά την αφαίρεσή της κτένας, η οποία δημιουργεί τις θέσεις για τη φόρτωση των δειγμάτων, εμβαπτίζεται σε συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιέχει 0,5xTBE. Τα δείγματα φορτώνονται αφού αναμιχθούν με 1/10 του όγκου διαλύματος φόρτωσης και εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση. Το διάλυμα TBE αποτελείται από 10,8g/l Tris με pH=8, 5,5g/l βορικό οξύ και 0,002M (EDTA). Το διάλυμα φόρτωσης αποτελείται από 0,25% κυανό της βρωμοφαινόλης, 0,25% κυανό του ξυλενίου και 25% φικόλη.

### 8.6.3. Πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου

Το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου προκύπτει από τον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου και του bis-ακρυλαμιδίου, παρουσία ελεύθερων ριζών, με τη βοήθεια καταλύτη. Ως δότης ελεύθερων ριζών χρησιμοποιείται το υπερθεικό αμμώνιο και ως καταλύτης η τετραμεθυλαιθυλενο-διαμίνη (TEMED). Για την παρασκευή ενός πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου συγκέντρωσης 8% όγκου 25ml προστίθενται τα εξής: 10ml από διάλυμα 20% μίγματος 19:1 ακρυλαμιδίου/bis-ακρυλαμιδίου, 2,5ml 5xTBE, 1,5ml γλυκερόλη, 11ml ddH<sub>2</sub>O και 250μl υπερθεικό αμμώνιο 10%. Το διάλυμα αναδεύεται και στη συνέχεια προστίθενται 25μl TEMED. Το διάλυμα αφήνεται να πολυμεριστεί για 20-30min και στη συνέχεια τα δείγματα φορτώνονται στο πήκτωμα (**Σχήμα 8.11**), αφού αναμιχθούν με 1/10 του όγκου διαλύματος φόρτωσης, εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση και στο τέλος της ηλεκτροφόρησης ακολουθεί η χρώση του πηκτώματος.

**Σχήμα 8.11.** Φόρτωση δείματος σε gel ακρυλαμιδίου για ηλεκτροφόρηση.



## 8.7. Χρώσεις νουκλεϊκών οξέων

### 8.7.1. Χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο

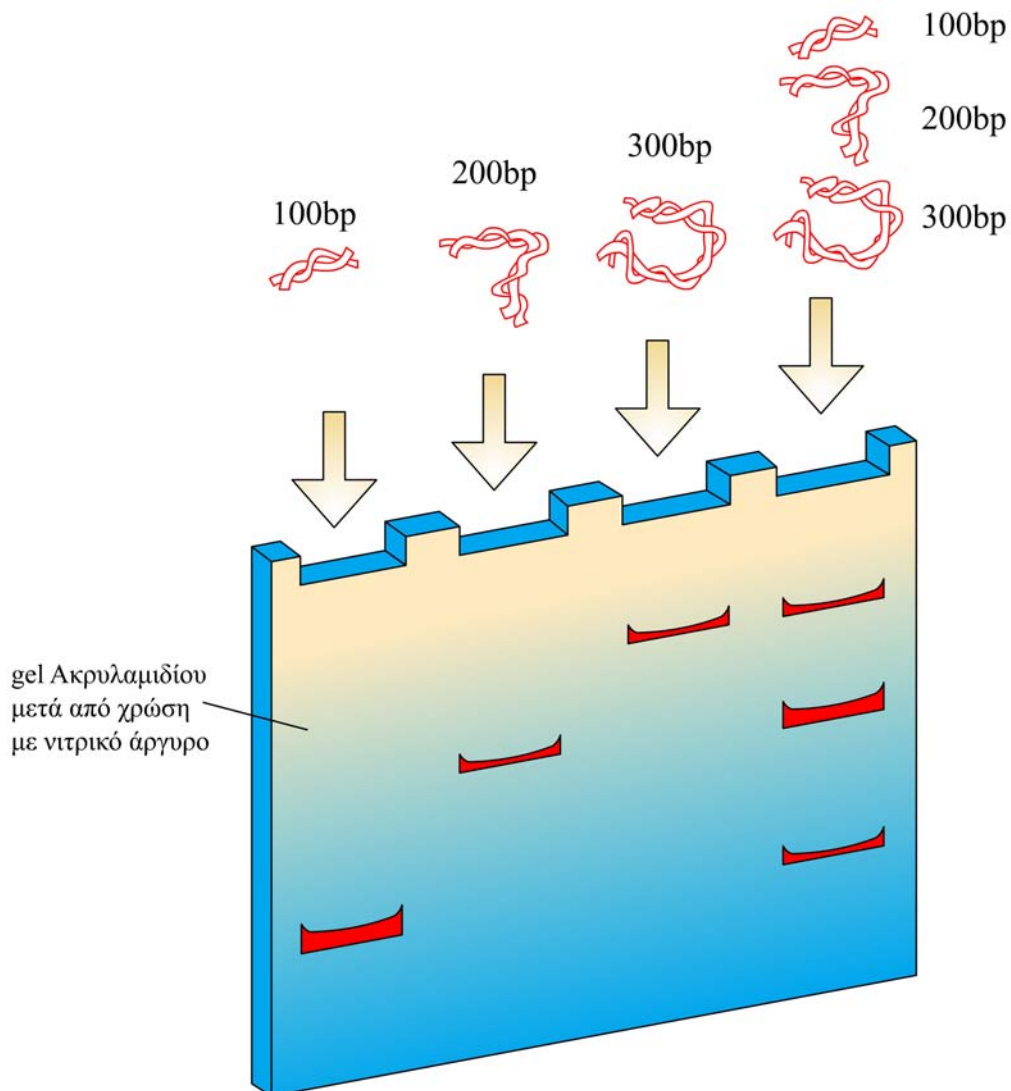
Κατά την παρασκευή του πηκτώματος αгарόζης προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο σε τελική συγκέντρωση 0,5μg/ml, το οποίο έχει την ικανότητα να προσδένεται στο δίκλωνο DNA. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης οι ζώνες του DNA γίνονται άμεσα ορατές κατόπιν έκθεσης του πηκτώματος σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV). Η χρώση αυτή μπορεί να εφαρμοστεί και για τα πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου, τα οποία μετά την ηλεκτροφόρηση εμβαπτίζονται σε υδατικό διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου συγκέντρωσης 0,5μg/ml, αφήνονται για 20-30min, ξεπλένονται με ίσο όγκο ddH<sub>2</sub>O για άλλα 20-30min και ακολούθως εκτίθενται σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV) ώστε να γίνουν ορατές οι ηλεκτροφορητικές ζώνες του DNA.

### 8.7.2. Χρώση με νιτρικό άργυρο

Η μέθοδος χρώσης του DNA με νιτρικό άργυρο χαρακτηρίζεται από μεγάλη ευαισθησία και αποφυγή της ραδιενέργειας, στοιχεία που την καθιστούν μέθοδο εκλογής στην περίπτωση των πηκτωμάτων πολυακρυλαμιδίου. Στα μειονεκτήματά της συγκαταλέγεται η μη ειδική χρώση του δίκλωνου DNA, δεδομένου ότι χρωματίζονται επίσης το μονόκλωνο DNA, το RNA καθώς και οι πρωτεΐνες. Το γεγονός αυτό καθιστά αναγκαία προϋπόθεση για την εφαρμογή της μεθόδου την ύπαρξη ιδιαίτερα καθαρού και ειδικού DNA.

Το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου τοποθετείται αρχικά σε ανάδευση για 10min, σε μονιμοποιητικό διάλυμα που περιέχει 10% αιθανόλη και 0,5% οξικό οξύ. Ακολουθεί η προσθήκη διαλύματος νιτρικού αργύρου 0,1% για 20min σε ημίφως, πλύσιμο με H<sub>2</sub>O και προσθήκη του διαλύματος εμφάνισης, το οποίο περιέχει 0,4N NaOH και 0,15% φορμαλδεΰδη. Η αντίδραση τερματίζεται με την προσθήκη διαλύματος ανθρακικού νατρίου (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) 0,75%, οπότε και γίνονται ορατές οι μπάντες, οι οποίες αντιστοιχούν στα μόρια του DNA, τα οποία φορτώθηκαν στο πήκτωμα (**Σχήμα 8.12**).

**Σχήμα 8.12.** Διαχωρισμός σε gel ακρυλαμιδίου, όπως αυτό φαίνεται μετά από χρώση με νιτρικό άργυρο, μορίων DNA με ηλεκτροφόρηση με βάση το μέγεθός τους.



### 8.8. Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική επεξεργασία των εργαστηριακών ευρημάτων και των κλινικοπαθολογικών δεδομένων έγινε με τη χρήση της δοκιμασίας SPSS version 9.0 for Windows. Ως στατιστικά σημαντικές θεωρήθηκαν οι συσχετίσεις με μονοδύναμο επίπεδο σημαντικότητας ( $p$ -value)  $p < 0,05$ .

Για τα γυναικολογικά δείγματα της μελέτης αρχικά εξετάστηκε η παρουσία στατιστικά σημαντικών διαφορών στην έκφραση των ογκογονιδίων *H-ras*, *K-* και *N-ras* και

την ηλικία ανάμεσα στις 3 ομάδες ασθενών με τη χρήση του Kruskal-Wallis Test. Στη συνέχεια, για τη σύγκριση της έκφραση mRNA των ογκογονιδίων H-, K- και N-*ras* ανά ζεύγη ανάμεσα στις ομάδες ασθενών της μελέτης, καθώς και μεταξύ ασθενών με CIN 1 και ασθενών με CIN 2 ή 3 χρησιμοποιήθηκε το Mann-Witney Test.

Το Mann-Witney Test χρησιμοποιήθηκε επίσης για τη μελέτη της έκφρασης mRNA των ογκογονιδίων H-, K- και N-*ras* σε σχέση την παρουσία HPV16/18 ή όχι, πολλαπλής ή μονήρους λοίμωξης και HPV 16 ή 18 στα HPV θετικά δείγματα της μελέτης., καθώς την ανίχνευση ή όχι μεταλλάξεων στο κωδικόνιο 12 του γονιδίου K-*ras* στα δείγματα με ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία CIN ή καρκίνο του τραχήλου.

Για τη μελέτη της συν-έκφρασης των γονιδίων H-, K- και N-*ras* στο σύνολο των δειγμάτων της μελέτης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Kendall's tau (Kendall's coefficient of rank correlation).

Για τη σύγκριση της μέσης ηλικία των παιδιών με αδenoειδή υπερπλασία και των παιδιών με καλοήγη υπερπλασία των αμυγδαλοειδών εκβλαστήσεων χρησιμοποιήθηκε το T-test. Επίσης το T-Test χρησιμοποιήθηκε για τη σύγκριση της μέσης ηλικία των παιδιών με HPV θετικά και αρνητικά δείγματα. Για τη σύγκριση των συχνοτήτων ανίχνευσης του ιού HPV στους παιδιατρικούς ασθενείς της μελέτης ανάλογα με το φύλο, την ηλικιακή ομάδα, την καταγωγή/εθνότητά, τον τόπο της διαμονής τους και την ιστολογία χρησιμοποιήθηκε το Pearson  $\chi^2$  Test.

## 8.9. Υλικά και εταιρίες προέλευσης

ρυθμιστικά διαλύματα PCR - Gibco BRL/Life Technologies Ltd.

ρυθμιστικό διάλυμα 1x First Strand cDNA - Life Technologies Ltd.

1,2-δωδροξυ-αιθυλενο-δις-ακρυλαμίδιο (bis-ακρυλαμίδιο) - BDH

Αγαρόζη - Gibco BRL

Αιθανόλη - Merck

Αιθυλο-διαμινο-τετραοξικό οξύ (EDTA) - BDH

Ακρυλαμίδιο - Gibco BRL

Ανθρακικό νάτριο - Sigma

Αντίστροφη μεταγραφάση - Life Technologies Ltd.

Βορικό οξύ - BDH

Βρωμιούχο αιθίδιο - Sigma

Γλυκερόλη - Gibco BRL

Δεσοξυριβονουκλεοτίδια - Gibco BRL/Life Technologies Ltd.

DNase I - Life Technologies Ltd.

Ένζυμα περιορισμού - New England Biolabs/ Gibco BRL

Κυανό της βρωμοφαινόλης - Sigma

Κυανό του ξυλενίου - Sigma

Νιτρικός άργυρος - Sigma

Οξικό οξύ - BDH

Πρωτεϊνάση K - Gibco BRL

random hexamers - Life Technologies Ltd.

RNaseH *E.coli* - Life Technologies Ltd.

RNaseOut - Life Technologies Ltd.

Ταq πολυμεράση - Gibco BRL/Life Technologies Ltd.

Τετραμεθυλ-αιθυλενο-διαμίνη (TEMED) - Sigma

Tris βάση - BDH

Trizol - Gibco BRL/Life Technologies Ltd.

Υδροξείδιο του νατρίου - Sigma

Υδροχλωρικό οξύ - BDH

Υπερθεικό αμμώνιο - Gibco BRL

Φαινόλη - Gibco BRL

Φορμαλδεΰδη - BDH

Χλωριούχο νάτριο - Sigma

Χλωριούχο κάλιο

Χλωριούχο μαγνήσιο

Χλωροφόρμιο - Fluka

Φικόλη - Sigma



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9



### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

- 9.1. Ιστολογική διάγνωση-Ομαδοποίηση γυναικολογικών ασθενών
- 9.2. Μελέτη της μεταγραφικής ενεργοποίησης ογκογονιδίων *ras* σε ασθενείς με φυσιολογικό τράχηλο, με ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία και με καρκίνο τραχήλου της μήτρας
- 9.3. Ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων στο κωδικόνιο 12 των γονιδίων *ras* σε ασθενείς με φυσιολογικό τράχηλο, με ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία και με καρκίνο τραχήλου της μήτρας
- 9.4. Ανίχνευση και τυποποίηση του ιού HPV σε ασθενείς με φυσιολογικό τράχηλο, με ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία και με καρκίνο τραχήλου της μήτρας
- 9.5. Μελέτη της σχέσης της παρουσίας υψηλού κινδύνου HPV 16/18 και της μεταγραφικής ενεργοποίησης των ογκογονιδίων *ras*
- 9.6. Μελέτη της σχέσης της παρουσίας πολλαπλής HPV λοίμωξης και της μεταγραφικής ενεργοποίησης των ογκογονιδίων *ras*
- 9.7. Μελέτη της σχέσης της παρουσίας HPV 16 ή 18 και της μεταγραφικής ενεργοποίησης των ογκογονιδίων *ras*
- 9.8. Ιστολογική διάγνωση-Ομαδοποίηση παιδιατρικών ασθενών
- 9.9. Ανίχνευση του ιού HPV σε αμυγδαλοειδείς και αδενοειδείς εκβλαστήσεις σε παιδιά με καλοήγη υπερπλασία των αδενοειδών ή/και των αμυγδαλοειδών εκβλαστήσεων
- 9.10. Τυποποίηση του ιού HPV σε αμυγδαλοειδείς και αδενοειδείς εκβλαστήσεις σε παιδιά
- 9.11. Συσχέτιση της παρουσίας του ιού HPV σε αμυγδαλοειδείς και αδενοειδείς εκβλαστήσεις σε παιδιά με την ηλικία τους

#### 9.1. Ιστολογική διάγνωση-Ομαδοποίηση γυναικολογικών ασθενών

Στα πλαίσια της συνεργασίας του Εργαστηρίου Ιολογίας με τη Γυναικολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου (ΠΑ.Γ.Ν.Η) συλλέχτηκε βιοψιακό υλικό από τον τράχηλο της μήτρας, το ενδομήτριο και τις ωθήκες από 112 γυναίκες, στις οποίες διενεργήθηκε ολική υστερεκτομή την περίοδο Ιούλιος 2002 έως Δεκέμβριος 2004. Στη μελέτη μας συμπεριλήφθησαν οι γυναίκες εκείνες από τις οποίες λήφθηκε τραχηλικός ιστός, ενώ εξαιρέθηκαν οι γυναίκες με καρκίνο του ενδομητρίου.

Μελετήθηκαν συνολικά 56 γυναίκες, οι οποίες με βάση την ιστολογική διάγνωση τα-

**Πίνακας 9.1.** Ταξινόμηση γυναικολογικών ασθενών με βάση την ιστολογική τους διάγνωση.

Ομάδα ασθενών	Αριθμός ασθενών	
με φυσιολογικό τράχηλο	24	
με ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία	18	
CIN 1		6
CIN 2		5
CIN 3		7
με καρκίνο τραχήλου της μήτρας	14	
αδενοκαρκίνωμα		1
ακανθοκυτταρικό		13

ξινόμηθηκαν σε 3 ομάδες ασθενών: α. στην ομάδα των γυναικών με φυσιολογικό τράχηλο (N=24), β. στην ομάδα των γυναικών με ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία CIN (N=18) και γ. στην ομάδα των γυναικών με καρκίνο του τραχήλου της μήτρας (N=14) (**Πίνακας 9.1**). Στον

**Πίνακα 9.2** παρουσιάζεται η ηλικιακή κατανομή των ασθενών σε κάθε ομάδα. Η μέση ηλικία των ασθενών με καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία CIN και φυσιολογικό τράχηλο ήταν 58 (Τυπική απόκλιση 16 έτη), 49 (Τυπική απόκλιση 14,2 έτη) και 54 έτη (Τυπική απόκλιση 12,4 έτη) αντίστοιχα. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην ηλικία των ασθενών ανάμεσα στις 3 ομάδες (Mann-Whitney Test).

**Πίνακας 9.2.** Ηλικιακή κατανομή των τριών ομάδων ασθενών (με φυσιολογικό τράχηλο, με ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία και με καρκίνο τραχήλου της μήτρας) που συμμετείχαν στη μελέτη.

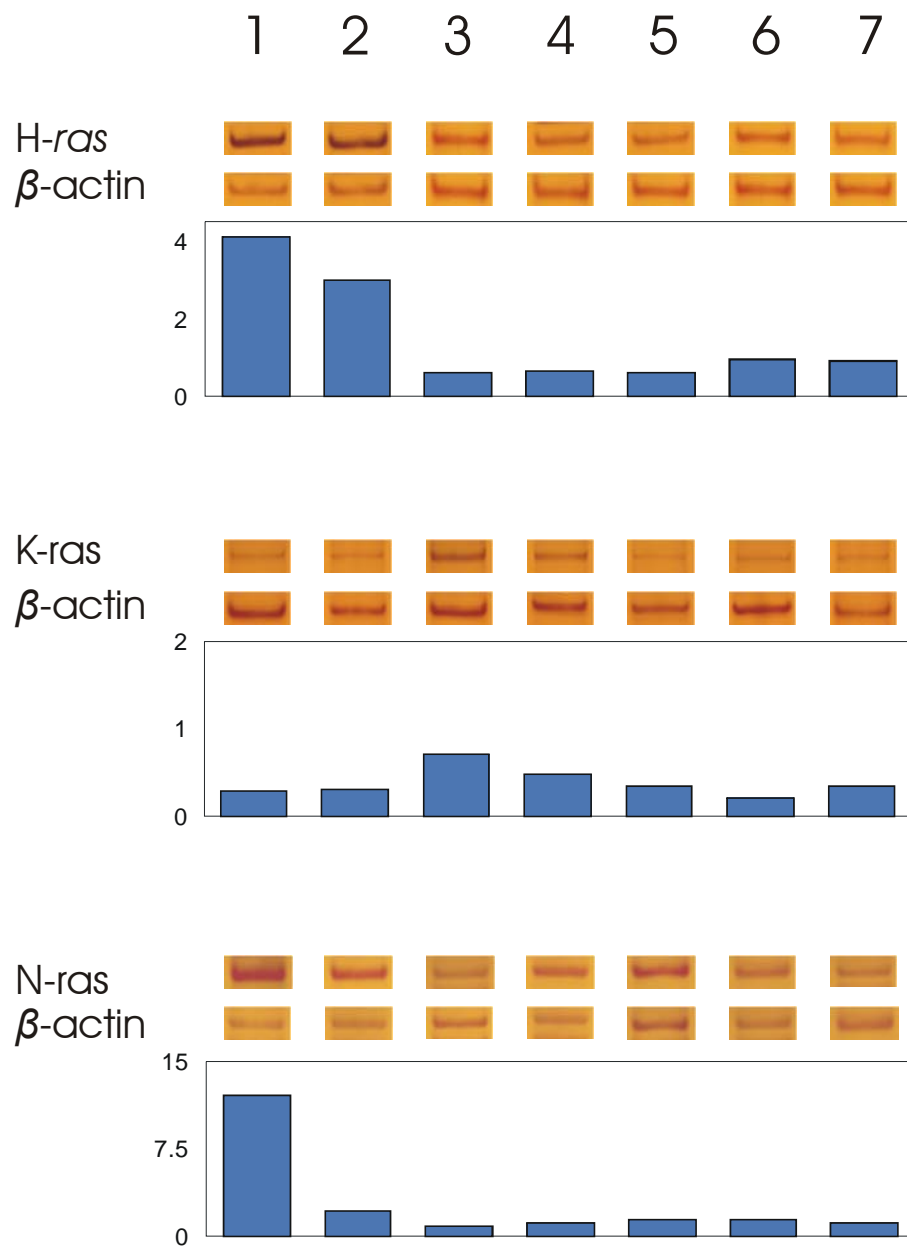
Ομάδα ασθενών	Ηλικιακή ομάδα			
	20-40 έτη	41-60 έτη	61-80 έτη	>81 έτη
	Αριθμός ασθενών	Αριθμός ασθενών	Αριθμός ασθενών	Αριθμός ασθενών
με φυσιολογικό τράχηλο (N=24)	4	16	4	-
με ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία (N=18)	7	7	4	-
με καρκίνο τραχήλου της μήτρας (N=14)	3	6	4	1

## 9.2. Μελέτη της μεταγραφικής ενεργοποίησης ογκογονιδίων *ras* σε ασθενείς με φυσιολογικό τράχηλο, με ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία και με καρκίνο τραχήλου της μήτρας.

Τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *K-*, *H-* και *N-ras* προσδιορίστηκαν με την τεχνική της Αντίστροφης Αλυσιδωτής Αντίδρασης με Πολυμεράση (RT-PCR) και εκφράστηκαν ως ο λόγος των επιπέδων mRNA *ras* προς τα επίπεδα έκφρασης της  $\beta$ -actin (γονίδιο αναφοράς).

Στην **Εικόνα 9.1** παρουσιάζεται η έκφραση των ογκογονιδίων *H-*, *K-* και *N-ras* σε αντιπροσωπευτικά δείγματα ασθενών με φυσιολογικό τράχηλο, με ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία και με καρκίνο τραχήλου της μήτρας. Στο σύνολο των δειγμάτων τα επίπεδα έκφρασης του *H-ras* κυμάνθηκαν από  $<0,0001$  έως 9,98 (Μέση Τιμή: 1,26, Τυπική Απόκλιση: 6,67), του *K-ras* από  $<0,0001$  έως 1,25 (Μέση Τιμή: 0,32, Τυπική Απόκλιση: 10,8) και του *N-ras* από  $<0,0001$  έως 12,08 (Μέση Τιμή: 1,54, Τυπική Απόκλιση: 5,92).

Στον **Πίνακα 9.3** παρουσιάζονται οι μέσες τιμές των επιπέδων έκφρασης mRNA των ογκογονιδίων *H-*, *K-* και *N-ras* ξεχωριστά σε κάθε ομάδα ασθενών. Η στατιστική ανάλυση ανέδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές στην έκφραση των ογκογονιδίων *H-ras* και *N-ras* ανάμεσα στις 3 ομάδες ασθενών της μελέτης (Kruskall-Wallis Test,  $p=0,00015$  και  $p=0,008$  αντίστοιχα), ενώ τα επίπεδα έκφρασης του ογκογονιδίου *K-ras* δεν παρουσίασαν διαφορές (Kruskall-Wallis Test,  $p=0,103$ ). Η ανάλυση ανά ζεύγη με τη βοήθεια του Mann-Whitney Test ανέδειξε πως η έκφραση των ογκογονιδίων *H-ras* και *N-ras* είναι στατιστικά σημαντικά αυξημένη στην ομάδα ασθενών με καρκίνο τραχήλου μήτρας σε σχέση την ομάδα ασθενών με CIN (Mann-Whitney Test  $p=0,004$  και  $p=0,007$  αντίστοιχα) και με την ομάδα ασθενών με φυσιολογικό τράχηλο της μήτρας (Mann-Whitney Test  $p=0,001$  και  $p=0,003$  αντίστοιχα).



**Εικόνα 9.1.** Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα έκφρασης των ογκογονιδίων H-, K- και N-*ras* σε δείγματα ασθενών με φυσιολογικό τράχηλο, με ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία και με καρκίνο τραχήλου της μήτρας. Δείγματα 1,2 καρκίνος τραχήλου της μήτρας, Δείγματα 3,4,5 ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία, Δείγματα 6,7 φυσιολογικός τράχηλος. Τα ραβδογράμματα αντιστοιχούν στον λόγο των επιπέδων mRNA κάθε *ras* προς τα επίπεδα έκφρασης mRNA της  $\beta$ -actin σε κάθε δείγμα τραχήλου της μήτρας.

**Πίνακας 9.3.** Έκφραση mRNA των ογκογονιδίων *H-ras*, *K-ras* και *N-ras* εκφραζόμενη ως ο λόγος των επιπέδων mRNA *ras* προς τα επίπεδα έκφρασης  $\beta$ -actin σε κάθε ομάδα ασθενών.

Έκφραση mRNA	Ομάδα ασθενών			p value
	με φυσιολογικό τράχηλο (N=24)	με ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία (N=18)	με καρκίνο τραχήλου της μήτρας (N=14)	
	Μέση τιμή (T.A.)	Μέση Τιμή (T.A.)	Μέση Τιμή (T.A.)	
<i>H-ras</i>	0,63(2,44)	0,71(11,0)	5,89(2,57)	0,00015
<i>K-ras</i>	0,24(4,91)	0,16(18,5)	0,22(16,9)	M.Σ.
<i>N-ras</i>	1,04(1,01)	0,89(9,9)	4,98(2,02)	0,008

*Kruskall-Wallis Test*, M.Σ. =στατιστικά μη σημαντικό ( $p>0,05$ ), T.A. = Τυπική Απόκλιση.

Δεν παρατηρήθηκαν αντίστοιχες διαφορές στην έκφραση του ογκογονιδίου *K-ras* στην ομάδα ασθενών με καρκίνο τραχήλου μήτρας σε σχέση την ομάδα ασθενών με CIN (Mann-Witney Test  $p=0,201$ ) και με την ομάδα ασθενών με φυσιολογικό τράχηλο της μήτρας (Mann-Witney Test  $p=0,341$ ).

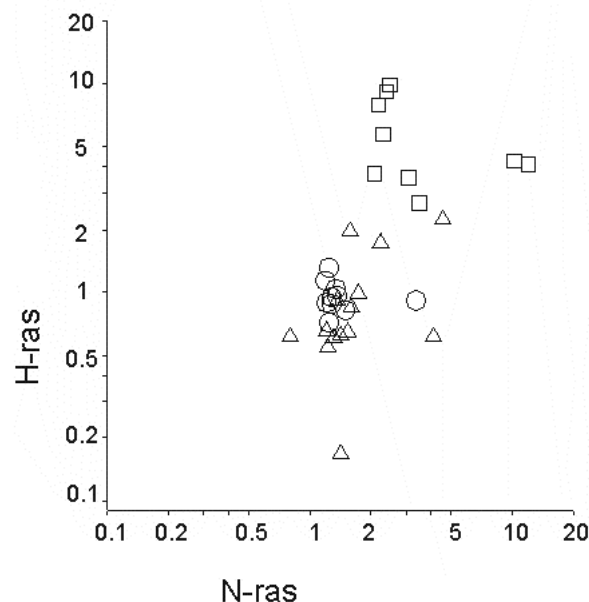
Στην ομάδα ασθενών με ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία τα επίπεδα έκφρασης των ογκογονιδίων *H-* και *N-ras* ήταν υψηλότερα (1,01, Τυπική Απόκλιση 8,6) στους ασθενείς με CIN 2 ή CIN 3 σε σχέση με εκείνους με CIN 1 (0,61, Τυπική Απόκλιση 9,4), ωστόσο δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση (Mann-Whitney Test,  $p=0,239$ ). Στην ομάδα ασθενών με καρκίνο του τραχήλου της μήτρας τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης των ογκογονιδίων *H-* και *N-ras* παρατηρήθηκαν σε ασθενείς Σταδίου IA and IB κατά FIGO. Δεν προέκυψαν στατιστικά σημαντικές σχέσεις μεταξύ των επιπέδων mRNA των ογκογονιδίων *H-*, *K-* και *N-ras* και της ηλικίας των ασθενών (Kruskall-Wallis Test,  $p=0,456$ ,  $p=0,721$  και  $p=0,189$  αντίστοιχα).

Ο μικρός αριθμός των δειγμάτων σε κάθε ομάδα ασθενών δεν επέτρεψε στατιστικά τη μελέτη της έκφρασης των ογκογονιδίων *ras* με τις υπόλοιπες γνωστές

παθολογοανατομικές και κλινικές παραμέτρους (ιστολογικός τύπος, συνήθεια καπνίσματος, οικογενειακό ιστορικό, αριθμός τοκετών, καταγωγή, διαμονή και οικογενειακή κατάσταση).

Η συν-έκφραση των γονιδίων H-, K- και N-*ras* στο σύνολο των δειγμάτων μελετήθηκε στατιστικά με τη χρήση της μεθόδου Kendall's tau (Kendall's coefficient of rank correlation). Η έκφραση του H-*ras* συσχετίστηκε θετικά (Kendall's tau,  $p=0,001$ ) με την έκφραση του N-*ras*, ενώ δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση στην έκφραση μεταξύ των γονιδίων N-*ras* και K-*ras* (Kendall's tau,  $p=0,671$ ) καθώς και μεταξύ των H-*ras* και K-*ras* (Kendall's tau,  $p=0,815$ ).

Στη **Εικόνα 9.2** παρουσιάζεται διαγραμματικά η συν-έκφραση των H- και N-*ras* στους ασθενείς της μελέτης, όπου φαίνεται πώς η συσχέτιση αυτή αφορά τόσο τα καρκινικά δείγματα, όσο και τα δείγματα με ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία CIN.

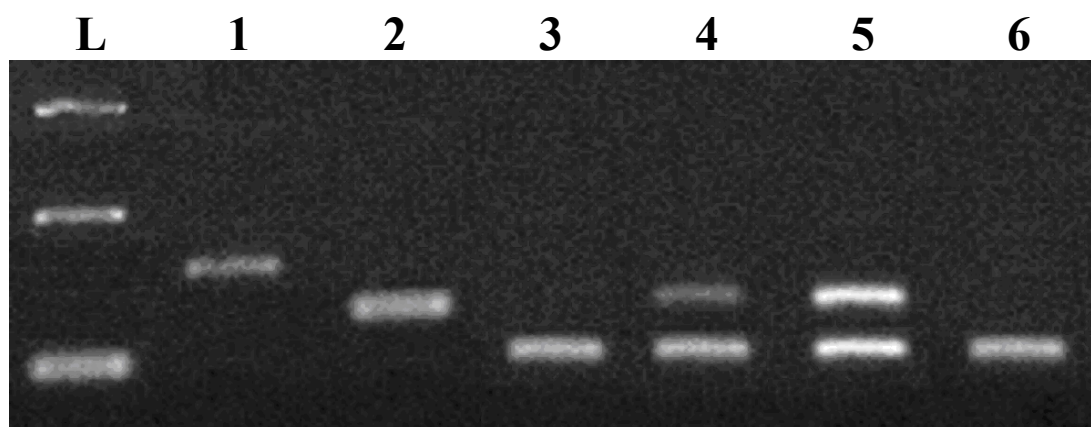


**Εικόνα 9.2.** Συσχέτιση επιπέδων έκφρασης ογκογονιδίων H- και N-*ras* στον τράχηλο της μήτρας. Οι άξονες του διαγράμματος εκφράζουν τις μεταβλητές τιμές της έκφρασης κάθε γονιδίου σε λογαριθμική μορφή. Ο: φυσιολογικός τράχηλος, Δ: ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία CIN, ◻: καρκίνος τραχήλου της μήτρας

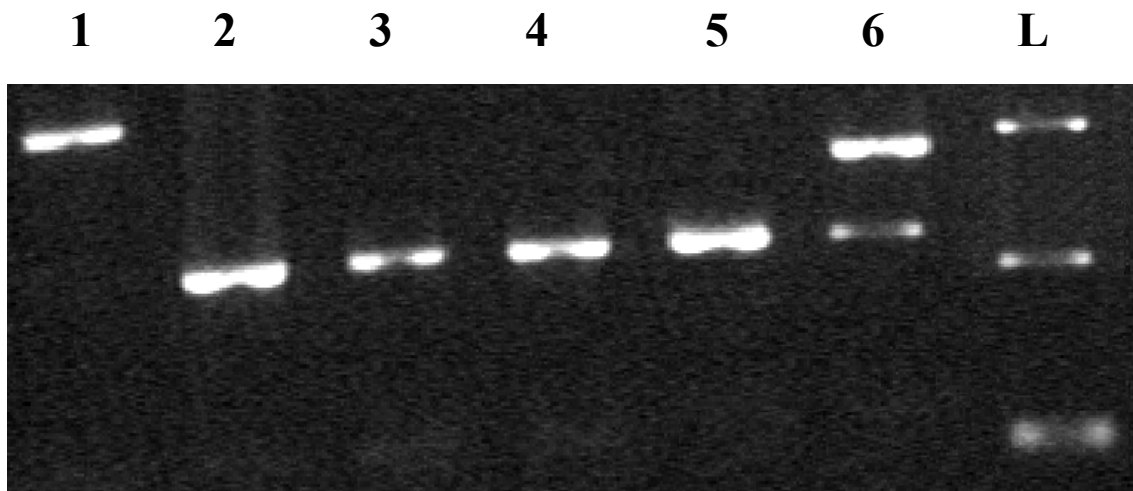
**9.3. Ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων στο κωδικόνιο 12 των ογκογονιδίων *ras* σε ασθενείς με φυσιολογικό τράχηλο, με ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία και με καρκίνο τραχήλου της μήτρας.**

Στην παρούσα μελέτη εκτιμήθηκε η παρουσία μεταλλαγών στο κωδικόνιο 12 των ογκογονιδίων *ras* σε όλα τα δείγματα από κάθε ομάδα ασθενών με τη βοήθεια της τεχνικής της PCR και της ανάλυσης πολυμορφισμού μεγέθους περιοριστικών θραυσμάτων (RFLP) με τη χρήση των περιοριστικών ενδονουκλεασών BstN I και Msp I (Εικόνα 9.3, 9.4 και 9.5).

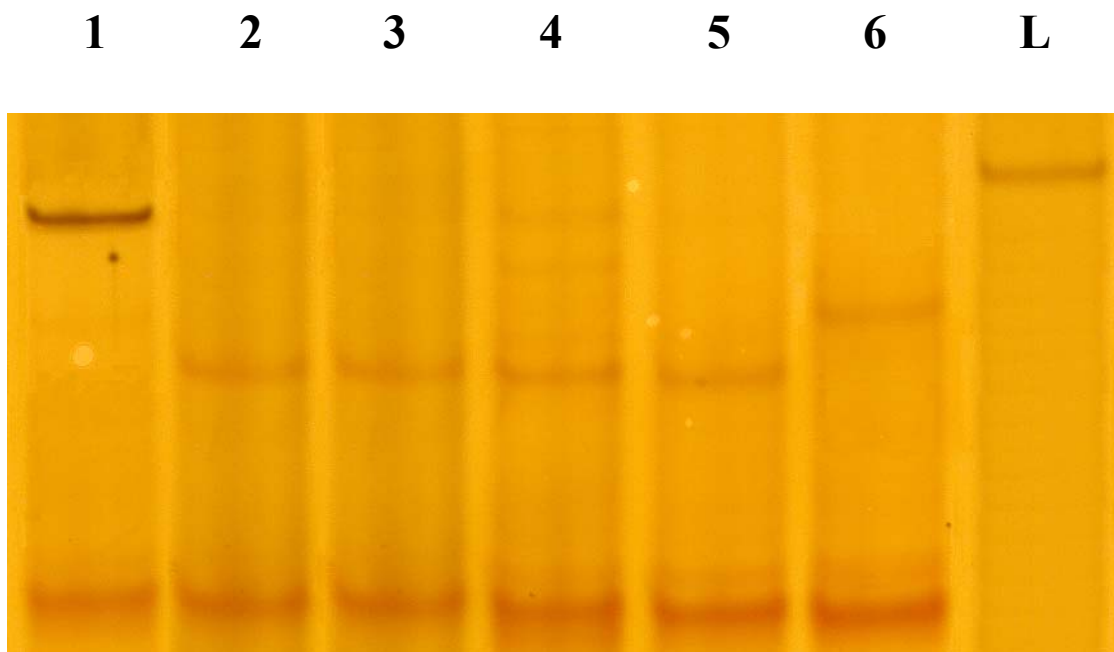
Μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 12 του ογκογονιδίου *K-ras* ανευρέθησαν σε ποσοστό 21,4% (3/14) στην ομάδα ασθενών με καρκίνο του τραχήλου τις μήτρας και σε ποσοστό 11,1% (2/18) στην ομάδα ασθενών με ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία CIN. Σε μια ασθενή με καρκίνο του τραχήλου της μήτρας ανιχνεύτηκε μετάλλαξη στο κωδικόνιο του ογκογονιδίου *H-ras* (ποσοστό 7,1%), ενώ δεν ανιχνεύτηκαν μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 12 του ογκογονιδίου *N-ras*. Στην ομάδα ασθενών με φυσιολογικό τράχηλο δεν ανιχνεύτηκαν μεταλλάξεις σε κανένα ογκογονίδιο *ras*.



**Εικόνα 9.3.** Ανίχνευση μεταλλάξεων του ογκογονιδίου *K-ras* με τη μέθοδο PCR-RFLP σε πύκτωμα αгарόζης. Οι ηλεκτροφορητικές στήλες 2, 4 και 5 αντιστοιχούν σε μεταλλαγμένα δείγματα, ενώ οι στήλες 3 και 6 σε φυσιολογικό γονίδιο. Η στήλη 1 περιέχει άπεπτο PCR προϊόν και η στήλη L δείκτη (ladder) μοριακών βαρών 100, 200 και 300bp.



**Εικόνα 9.4.** Ανίχνευση μεταλλάξεων του ογκογονιδίου *H-ras* με τη μέθοδο PCR-RFLP σε πήκτωμα αγαρόζης. Οι ηλεκτροφορητικές στήλες 2, 3 και 4 αντιστοιχούν σε δείγματα με φυσιολογικό γονίδιο, ενώ η στήλη 6 αντιστοιχεί σε μεταλλαγμένο δείγμα. Η στήλη 1 περιέχει άπεπτο PCR προϊόν και η στήλη L δείκτη (ladder) μοριακών βαρών 100, 200 και 300bp.



**Εικόνα 9.5.** Ανίχνευση μεταλλάξεων του ογκογονιδίου *N-ras* με τη μέθοδο PCR-RFLP σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου. Οι ηλεκτροφορητικές στήλες 2, 3, 4 και 5 αντιστοιχούν σε δείγματα με φυσιολογικό γονίδιο. Στη στήλη 6 έχει ηλεκτροφορηθεί θετικός μάρτυρας για μετάλλαξη (δείγμα από ασθενή με καρκίνο του προστάτη). Η στήλη 1 περιέχει άπεπτο PCR προϊόν και η στήλη L δείκτη (ladder) μοριακού βάρους 100bp.



**Πίνακας 9.4.** Μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 12 των γονιδίων H-, K- και N-*ras* σε κάθε ομάδα ασθενών.

Ομάδα ασθενών	Μετάλλαξη στο κωδικόνιο 12		
	H- <i>ras</i>	K- <i>ras</i>	N- <i>ras</i>
	Αριθμός ασθενών (Ποσοστό %)	Αριθμός ασθενών (Ποσοστό %)	Αριθμός ασθενών (Ποσοστό %)
με φυσιολογικό τράχηλο (N=24)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
με ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία (N=18)	0(0%)	2 (11,1%)	0(0%)
με καρκίνο τραχήλου της μήτρας (N=14)	1(7,1%)	3(21,4%)	0(0%)

Στον **Πίνακα 9.4** παρουσιάζονται οι συχνότητες ανεύρεσης μεταλλάξεων για κάθε ογκογονίδιο σε κάθε ομάδα ασθενών. Όπως φαίνεται στον **Πίνακα 9.5**, στα δείγματα του τραχήλου της μήτρας όπου ανιχνεύτηκαν σημειακές μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 12 του γονι-

**Πίνακας 9.5.** Έκφραση mRNA ογκογονιδίων *ras* σε δείγματα θετικά (+) και αρνητικά (-) για τη μετάλλαξη στο κωδικόνιο 12 του K-*ras* ασθενών με νεοπλασία του τραχήλου της μήτρας.

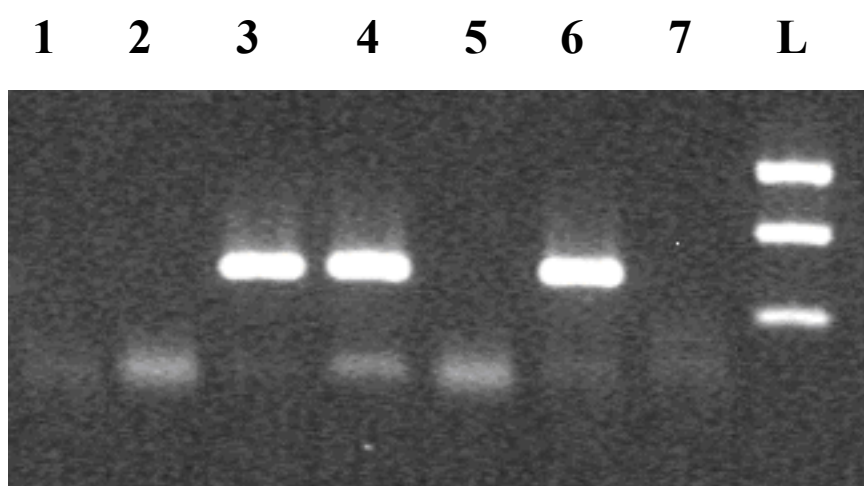
Α. Ομάδα ασθενών με ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία (N=18)			
Έκφραση mRNA	K- <i>ras</i> κωδικόνιο 12 (+) N=2	K- <i>ras</i> κωδικόνιο 12 (+) N=16	p-value
	Μέση Τιμή (T.A.)	Μέση Τιμή (T.A.)	
H- <i>ras</i>	0.698(0,599)	0.789(0,804)	M.Σ.
K- <i>ras</i>	0.704(0,109)	0.876(1,478)	M.Σ.
N- <i>ras</i>	3.624(3,567)	3.098(1,349)	M.Σ.
B. Ομάδα ασθενών με καρκίνο τραχήλου της μήτρας (N=14)			
Έκφραση mRNA	K- <i>ras</i> κωδικόνιο 12 (+) N=3	K- <i>ras</i> κωδικόνιο 12 (+) N=11	p-value
	Μέση Τιμή (T.A.)	Μέση Τιμή (T.A.)	
H- <i>ras</i>	8.987(3,986)	10.456(7,009)	M.Σ.
K- <i>ras</i>	1.345(1,897)	0.987(0,674)	M.Σ.
N- <i>ras</i>	7.009(3,678)	7.899(3,007)	M.Σ.

*Mann-Whitney Test*, M.Σ. = στατιστικά μη σημαντικό ( $p > 0,05$ ), T.A. = Τυπική Απόκλιση.

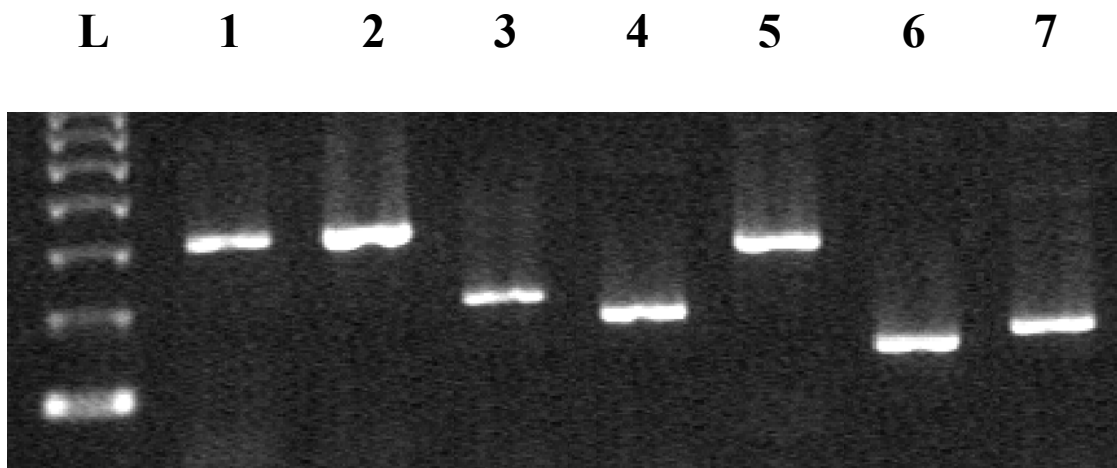
δίου *K-ras* η έκφραση των ογκογονιδίων *ras* δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με τα δείγματα με ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία CIN ή καρκίνο του τραχήλου που ήταν αρνητικά για μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 12 του γονιδίου *K-ras* (Mann-Whitney Test,  $p>0,05$ ). Αντίστοιχη σύγκριση δεν πραγματοποιήθηκε όσον αφορά την παρουσία μεταλλάξεων στα ογκογονίδια *H-ras* και *N-ras* λόγω του χαμηλού αριθμού στη μια περίπτωση και της απουσίας στην άλλη περίπτωση δειγμάτων θετικών για τα γονίδια αυτά.

#### 9.4. Ανίχνευση και τυποποίηση του ιού HPV σε ασθενείς με φυσιολογικό τράχηλο, με ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία και με καρκίνο τραχήλου της μήτρας

Στα πλαίσια της μελέτης εξετάστηκε η παρουσία του ιού HPV στο σύνολο των δειγμάτων με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR), όπου χρησιμοποιήθηκαν οι «γενικοί» εκκινητές GP5 και GP6 (Εικόνα 9.7). Η τυποποίηση του ιού HPV στα θετικά για τον ιό HPV δείγματα πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ειδικών εκκινητών κατά την αντίδραση της PCR ξεχωριστά για κάθε τύπο ιό (Εικόνα 9.8).



**Εικόνα 9.7.** Ανίχνευση του ιού HPV με τη μέθοδο της PCR. Οι ηλεκτροφορητικές στήλες 2, 5 και 7 αντιστοιχούν σε δείγματα αρνητικά για τον ιό HPV, ενώ οι ηλεκτροφορητικές στήλες 3 και 4 αντιστοιχούν σε δείγματα που εμφανίζουν τον ιό HPV. Η στήλη L αντιστοιχεί σε δείκτη (ladder) μοριακών βαρών 100, 200 και 300bp. Η στήλη 1 αντιστοιχεί σε αρνητικό control για τον έλεγχο της αντίδρασης PCR.



**Εικόνα 9.8.** Τυποποίηση του ιού HPV με τη χρήση ειδικών εκκινητών κατά την αντίδραση της PCR. Οι ηλεκτροφορητικές στήλες 1, 2 και 5 αντιστοιχούν σε δείγματα θετικά για τον ιό HPV 16, η στήλη 3 αντιστοιχεί σε δείγμα θετικό για τον ιό HPV 11, η στήλη 4 αντιστοιχεί σε δείγμα θετικό για τον ιό HPV 33 και η στήλη 6 για δείγμα θετικό για τον ιό HPV 18. Η στήλη 7 αντιστοιχεί σε δείγμα θετικό για τον ιό HPV (PCR προϊόν με τη χρήση των γενικών εκκινητών). Η στήλη L αντιστοιχεί σε δείκτη (ladder) μοριακών βαρών 100bp.

Από τις 56 ασθενείς που μελετήθηκαν ο ιός HPV ανιχνεύτηκε σε 5 γυναίκες με φυσιολογικό ιστολογικά τράχηλο, σε 14 γυναίκες με ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία CIN και σε 12 γυναίκες με καρκίνο του τραχήλου της μήτρας (**Πίνακας 9.6**). Με βάση την τυποποίηση του ιού χρησιμοποιώντας τους ειδικούς εκκινητές, ο ιός HPV 16 ανιχνεύτηκε σε 15 γυναίκες, 6 με καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, 7 με CIN και 2 με φυσιολογικό τράχηλο, ενώ ο ιός HPV 18 ανιχνεύτηκε σε 12 γυναίκες, 6 με καρκίνο του τραχήλου της μήτρας και 6 με CIN (**Πίνακας 9.7**)

**Πίνακας 9.6.** Ανίχνευση ιού HPV σε κάθε ομάδα ασθενών.

Ομάδα ασθενών	Ανίχνευση ιού HPV	
	HPV(+)	HPV (-)
	Αριθμός ασθενών (Ποσοστό%)	Αριθμός ασθενών (Ποσοστό%)
με φυσιολογικό τράχηλο (N=24)	5(20,8%)	19(79,2%)
με ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία (N=18)	14(77,8%)	4(22,2%)
με καρκίνο τραχήλου της μήτρας (N=14)	12(85,7%)	2(14,3%)

**Πίνακας 9.7.** Τυποποίηση ιών HPV στα HPV-θεικά δείγματα τραχήλου της μήτρας της μελέτης.

Κωδικός ασθενή	Ιστολογική Διάγνωση	HPV 16	HPV18	HPV 33	HPV 11
G2	καρκίνος		+		
G6	CIN		+		
G9	φυσιολογικός τράχηλος			+	
G10	φυσιολογικός τράχηλος				+
G14	καρκίνος	+			
G15	καρκίνος	+			
G16	CIN	+			
G19	καρκίνος	+	+		
G20	καρκίνος		+		+
G21	καρκίνος	+			
G22	καρκίνος		+		
G24	καρκίνος	+	+		
G25	CIN				
G27	CIN				+
G28	CIN	+			
G29	CIN	+			+
G30	CIN	+	+		
G33	φυσιολογικός τράχηλος	+			
G34	CIN				
G35	CIN				+
G36	φυσιολογικός τράχηλος	+			
G38	CIN		+		
G39	CIN	+			
G41	CIN		+		
G44	καρκίνος		+		
G45	καρκίνος	+			
G47	CIN	+	+		
G51	καρκίνος				
G52	CIN	+	+		
G54	καρκίνος				
G55	φυσιολογικός τράχηλος			+	

*CIN: ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία του τραχήλου της μήτρας*

Σε 2 γυναίκες ανιχνεύτηκε ο ιός HPV33 και σε 5 ο ιός HPV 11, ενώ 4 δείγματα παρέμειναν αταυτοποιήτα. Στον **Πίνακα 9.8** παρουσιάζονται οι συχνότητες ανεύρεσης των HPV τύπων που μελετήθηκαν στις HPV θετικές ασθενείς της μελέτης ανα ομάδα ασθενών. Από τις 31 HPV θετικές ασθενείς της μελέτης, σε 7 ανιχνεύτηκαν περισσότεροι του ενός τύποι HPV (πολλαπλή λοίμωξη). Συν-λοίμωξη με τους ιούς HPV 16 και 18 ανιχνεύτηκε σε 2

ασθενείς με καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, με τους ιούς HPV 18 και 11 σε μια ασθενή με καρκίνο του τραχήλου της μήτρας και με τους ιούς HPV 16 και 11 σε μια ασθενή με CIN.

#### **9.5. Συσχέτιση της παρουσίας υψηλού κινδύνου HPV 16/18 και της μεταγραφικής ενεργοποίησης των ογκογονιδίων *ras***

Η συσχέτιση της έκφρασης mRNA των ογκογονιδίων H-, K- και N-*ras* με την παρουσία των ιών υψηλού κινδύνου HPV 16/18 ή άλλων ιών HPV παρουσιάζεται στον **Πίνακα 9.9**. Στην ομάδα των ασθενών με καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, η μέση έκφραση mRNA των ογκογονιδίων H-, K- και N-*ras* ήταν υψηλότερη στις HPV 16/18 θετικές ασθενείς σε σχέση με εκείνες που ήταν θετικές σε άλλους ιούς HPV (Mann-Whitney Test,  $p=0,003$ ,  $p=0,004$  και  $p=0,0001$ , αντίστοιχα). Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές (Mann-Whitney Test,  $p>0,05$ ) σε σχέση με την παρουσία των ιών HPV 16/18 στην ομάδα HPV-θετικών ασθενών με CIN ή φυσιολογικό τράχηλο.

#### **9.6. Συσχέτιση της παρουσίας πολλαπλής HPV λοίμωξης και της μεταγραφικής ενεργοποίησης των ογκογονιδίων *ras***

Στον **Πίνακα 9.10** παρουσιάζεται η έκφραση mRNA των ογκογονιδίων H-, K- και N-*ras* σε σχέση με την παρουσία πολλαπλής ή μονήρους λοίμωξης με τον ιό HPV. Στην ομάδα των ασθενών με καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, η μέση έκφραση mRNA των ογκογονιδίων H-, K- και N-*ras* ήταν υψηλότερη σε ασθενείς με πολλαπλή HPV λοίμωξη σε σχέση με εκείνες με μονήρη HPV λοίμωξη (Mann-Whitney Test,  $p=0,004$ ,  $p=0,01$  και  $p=0,009$ , αντίστοιχα). Στην ομάδα των ασθενών με CIN ή φυσιολογικό τράχηλο δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση (Mann-Whitney Test,  $p>0,05$ ) με την παρουσία πολλαπλής ή μονήρους HPV λοίμωξης. Τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης παρατηρήθηκαν σε ασθενείς με πολλαπλή HPV λοίμωξη 16 και 18.

**Πίνακας 9.8.** Τυποποίηση ιού HPV σε κάθε ομάδα HPV (+) ασθενών.

Ομάδα ασθενών	Τυποποίηση ιού HPV		
	HPV16(+)	HPV 18(+)	HPV16/18(-)
	Αριθμός ασθενών (Ποσοστό%)	Αριθμός ασθενών (Ποσοστό%)	Αριθμός ασθενών (Ποσοστό%)
με φυσιολογικό τραχήλο (N=5)	2(40%)	0(0%)	3(60%)
με ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία (N=14)	7(50%)	6(42,9%)	1(7,1%)
με καρκίνο τραχήλου της μήτρας (N=12)	6(50%)	6(50%)	2(16,7%)

**Πίνακας 9.9.** Έκφραση mRNA ογκογονιδίων *ras* σε HPV 16/18 θετικά και HPV 16/18 αρνητικά δείγματα HPV-θετικών ασθενών με νεοπλασία του τραχήλου της μήτρας.

Α. Ομάδα ασθενών με ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία του ή φυσιολογικό τραχήλο			
Έκφραση mRNA	HPV(+)/HPV 16/18 (+) N=11	HPV (+)/HPV 16/18 (-) N=7	p-value
	Μέση τιμή (T.A.)	Μέση τιμή (T.A.)	
H- <i>ras</i>	0,645(0,297)	0,596(0,195)	M.Σ.
K- <i>ras</i>	0,683(0,359)	0,519(0,352)	M.Σ.
N- <i>ras</i>	1,294(1,579)	0,973(1,478)	M.Σ.
B. Ομάδα ασθενών με καρκίνο τραχήλου της μήτρας			
Έκφραση mRNA	HPV(+)/HPV 16/18 (+) N=10	HPV (+)/HPV 16/18 (-) N=2	p-value
	Μέση τιμή (T.A.)	Μέση τιμή (T.A.)	
H- <i>ras</i>	9,290(4,383)	0,655(0,926)	0,003
K- <i>ras</i>	1,066(1,161)	0,357(0,208)	0,004
N- <i>ras</i>	7,780(3,749)	1,695(1,945)	0,0001

*Mann-Whitney Test*, M.Σ. = στατιστικά μη σημαντικό ( $p > 0,05$ ), T.A. = Τυπική Απόκλιση.

**Πίνακας 9.10.** Έκφραση mRNA ογκογονιδίων *ras* σε δείγματα ασθενών με νεοπλασία του τραχήλου της μήτρας με πολλαπλή και μονήρη λοίμωξη με τον ιό HPV.

Α. Ομάδα ασθενών με ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία ή φυσιολογικό τράχηλο			
Έκφραση mRNA	Πολλαπλή λοίμωξη HPV (+) N=4	Μονήρης λοίμωξη HPV (+) N=15	p-value
	Μέση τιμή (T.A.)	Μέση τιμή (T.A.)	
H- <i>ras</i>	4,532(4,282)	3,106(2,189)	M.Σ.
K- <i>ras</i>	1,602(1,099)	0,723(0,650)	M.Σ.
N- <i>ras</i>	4,002(2,519)	3,133(4,008)	M.Σ.
B. Ομάδα ασθενών με καρκίνο τραχήλου της μήτρας			
Έκφραση mRNA	Πολλαπλή λοίμωξη HPV (+) N=3	Μονήρης λοίμωξη HPV(+) N=9	p-value
	Μέση τιμή (T.A.)	Μέση τιμή (T.A.)	
H- <i>ras</i>	12,965(3,138)	7,001(4,171)	0,004
K- <i>ras</i>	0,687(0,491)	1,080(1,217)	0,01
N- <i>ras</i>	9,390(2,199)	5,994(3,781)	0,009

*Mann-Whitney Test, M.Σ. = στατιστικά μη σημαντικό ( $p>0,05$ ), T.A. = Τυπική Απόκλιση.*

### 9.7. Μελέτη της σχέσης της παρουσίας HPV 16 ή 18 και της μεταγραφικής ενεργοποίησης των ογκογονιδίων *ras*.

Στον **Πίνακα 9.11** παρουσιάζεται η έκφραση mRNA των ογκογονιδίων H-, K- και N-*ras* σε σχέση την παρουσία του ιού HPV 16 ή 18. Τόσο στην ομάδα ασθενών με καρκίνο του τραχήλου της μήτρας όσο και με CIN ή φυσιολογικό τράχηλο, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές (Mann-Whitney Test,  $p>0.05$ ) σε σχέση με την παρουσία HPV 16 ή HPV 18.

### 9.8. Ιστολογική διάγνωση-Ομαδοποίηση παιδιατρικών ασθενών

Στα πλαίσια της συνεργασίας του Εργαστηρίου Ιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης με το Παθολογοανατομικό Εργαστήριο του Νοσοκομείου Παίδων

**Πίνακας 9.11.** Έκφραση mRNA ογκογονιδίων *ras* σε HPV-16 και HPV-18 θετικά δείγματα ασθενών με νεοπλασία του τραχήλου της μήτρας.

Α. Ομάδα ασθενών με ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία του ή φυσιολογικό τράχηλο			
Έκφραση mRNA	HPV 16 (+) N=6	HPV 18 (+) N=3	p-value
	Μέση τιμή (T.A.)	Μέση τιμή (T.A.)	
H- <i>ras</i>	0,604(0,581)	0,891(0,782)	M.Σ.
K- <i>ras</i>	0,504(0,135)	1,023(1,598)	M.Σ.
N- <i>ras</i>	4,624(2,523)	5,192(0,242)	M.Σ.
B. Ομάδα ασθενών με καρκίνο τραχήλου της μήτρας			
Έκφραση mRNA	HPV 16 (+) N=4	HPV18 (+) N=4	p-value
	Μέση τιμή (T.A.)	Μέση τιμή (T.A.)	
H- <i>ras</i>	7,395(3,406)	10,202(8,455)	M.Σ.
K- <i>ras</i>	1,414(1,589)	0,764(0,451)	M.Σ.
N- <i>ras</i>	6,948(3,969)	7,466(3,936)	M.Σ.

*Mann-Whitney Test, M.Σ. = στατιστικά μη σημαντικό ( $p > 0,05$ ), T.A. = Τυπική Απόκλιση.*

‘Π.&Α. Κυριακού’ στην Αθήνα, μελετήθηκαν 64 δείγματα αμυγδαλοειδών εκβλαστήσεων και 42 δείγματα αδενοειδών εκβλαστήσεων από 102 συνολικά παιδιά, 57 κορίτσια και 45 αγόρια (Πίνακας 9.12 και Πίνακας 9.13).

Σε 4 παιδιά, 2 αγόρια και 2 κορίτσια έγινε συλλογή δειγμάτων και αδενοειδών και αμυγδαλοειδών εκβλαστήσεων. Τα παιδιά αυτά νοσηλεύτηκαν στο Γενικό Νοσοκομείο Παιδών ‘Αγλαία Κυριακού’ την περίοδο 1995 έως 2000 λόγω καλοήθους υπερπλασίας των αμυγδαλοειδών ή/και των αδενοειδών τους εκβλαστήσεων και διενεργήθηκε χειρουργική εξαίρεσή τους. Η μέση ηλικία των ασθενών της μελέτης ήταν 7,5 (Τυπική Απόκλιση 3,6) έτη με ηλικιακό ευρος από 2 έως 14 έτη. Σε όλα τα δείγματα τέθηκε η διάγνωση της καλοήθους υπερπλασίας των αμυγδαλοειδών ή/και των αδενοειδών εκβλαστήσεων στο Παθολογοανατομικό Εργαστήριο του Γενικού Νοσοκομείου Παιδών ‘Αγλαία Κυριακού’.



**Πίνακας 9.12.** Χαρακτηριστικά παιδιών με καλοήγη υπερπλασία των αμυγδαλοειδών τους εκβλαστήσεων, τα οποία συμπεριλήφθησαν στη μελέτη.

Παιδιά με καλοήγη υπερπλασία των αμυγδαλοειδών		N=64
Ομαδοποίηση ασθενών		Αριθμός ασθενών( Ποσοστό %)
Φύλο		
	αγόρια	28(43,8)
	κορίτσια	36(56,2)
Ηλικιακή ομάδα		
	προσχολικής ηλικίας	35(54,7)
	σχολικής ηλικίας	29(45,3)
Καταγωγή/Εθνικότητα		
	ελληνική	51(79,7)
	άλλη	13(20,3)
Τόπος κατοικίας		
	αστικός	49(76,6)
	αγροτικός	15(23,4)
Ηλικία σε έτη		
	Μέση Τιμή (Τ.Α.)	7,1(3,2)
	Ηλικιακό Εύρος	2-14

*T.A.: Τυπική Αποκλίση.*

**Πίνακας 9.13.** Χαρακτηριστικά παιδιών με καλοήγη υπερπλασία των αδενοειδών τους εκβλαστήσεων, τα οποία συμπεριλήφθησαν στη μελέτη.

Παιδιά με καλοήγη υπερπλασία των αδενοειδών		N=42
Ομαδοποίηση ασθενών		Αριθμός ασθενών (Ποσοστό %)
Φύλο		
	αγόρια	19(45,2)
	κορίτσια	23(54,8)
Ηλικιακή ομάδα		
	προσχολικής ηλικίας	18(42,9)
	σχολικής ηλικίας	24(57,1)
Καταγωγή/Εθνικότητα		
	ελληνική	32(76,2)
	άλλη	10(23,8)
Τόπος κατοικίας		
	αστικός	26(61,9)
	αγροτικός	16(38,1)
Ηλικία σε έτη		
	Μέση Τιμή (Τ.Α.)	8,1(4,0)
	Ηλικιακό Εύρος	2-14

*T.A.: Τυπική Απόκλιση*

Σε κανένα δείγμα δεν υπήρχαν στοιχεία κακοήθειας, ούτε στοιχεία ενδεικτικά λοίμωξης με τον ιό HPV (παρουσία κοιλιοκυττάρων, δυσκερατωτικών κυττάρων ή παρακεράτωσης). Η μέση ηλικία των παιδιών με αδενοειδή υπερπλασία ήταν μεγαλύτερη σε σχέση με την ηλικία των παιδιών με καλοήγη υπερπλασία των αμυγδαλοειδών εκβλαστήσεων, ωστόσο η σχέση αυτή δεν ήταν στατιστικώς σημαντική (T-test,  $p=0,101$ ). Κανένα παιδί δεν είχε θηλώματα στην στοματική του κοιλότητα, ενώ σε κανένα δεν τέθηκε κλινική υποψία σεξουαλικής κακοποίησης.

### **9.9. Ανίχνευση του ιού HPV σε αμυγδαλοειδείς και αδενοειδείς εκβλαστήσεις σε παιδιά με καλοήγη υπερπλασία των αδενοειδών ή/και των αμυγδαλοειδών εκβλαστήσεων.**

Στον Πίνακα 9.14 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ανίχνευσης του ιού HPV στα παιδιατρικά δείγματα της μελέτης. Ο ιός HPV ανιχνεύτηκε σε 6 (9,4%) από τα 64 δείγματα αμυγδαλοειδών και σε 3 (7,1%) από τα 42 δείγματα αδενοειδών εκβλαστήσεων που μελετήθηκαν. Από τα τέσσερα παιδιά, όπου μελετήθηκαν και οι αδενοειδείς και οι αμυγδαλοειδείς εκβλαστήσεις, θετικό στον ιό HPV ήταν ένα παιδί, στο οποίο θετικό ήταν μόνο δείγμα της αμυγδαλοειδούς εκβλάστησης.

**Πίνακας 9.14.** Ανίχνευση του ιού HPV σε αμυγδαλοειδείς και αδενοειδείς εκβλαστήσεις σε παιδιά με καλοήγη υπερπλασία των αδενοειδών ή/και των αμυγδαλοειδών τους εκβλαστήσεων.

Ομάδα ασθενών	Ανίχνευση του ιού HPV	
	HPV(+)	HPV(-)
	Αριθμός δειγμάτων (Ποσοστό%)	Αριθμός δειγμάτων (Ποσοστό%)
Παιδιά με καλοήγη υπερπλασία των αμυγδαλοειδών (N=64)	6(9,4)	58 (90,6)
Παιδιά με καλοήγη υπερπλασία των αδενοειδών (N=42)	3(7,1)	39(92,9)
Σύνολο (N=106)	9(8,5)	97(91,5)

### 9.10. Τυποποίηση του ιού HPV σε αμυγδαλοειδείς και αδενοειδείς εκβλαστήσεις σε παιδιά.

Στους Πίνακες 9.15 και 9.16 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της τυποποίησης των ιών HPV στις αμυγδαλοειδείς και αδενοειδείς εκβλαστήσεις των παιδιών της μελέτης.

**Πίνακας 9.15.** Τυποποίηση ιών HPV στα HPV-θεικά δείγματα των αδενοειδών και αμυγδαλοειδών εκβλαστήσεων της μελέτης.

Κωδικός Ασθενή	Ιστολογική Διάγνωση	HPV 16	HPV18	HPV 33	HPV 11
P4	Υπερπλασία αδενοειδών	+			
P8	Υπερπλασία αμυγδαλών				+
P25	Υπερπλασία αμυγδαλών	+			
P29	Υπερπλασία αμυγδαλών	+			
P43	Υπερπλασία αδενοειδών				
P48	Υπερπλασία αδενοειδών	+			
P76	Υπερπλασία αμυγδαλών	+			
P92	Υπερπλασία αμυγδαλών				+
P95	Υπερπλασία αμυγδαλών	+			

**Πίνακας 9.16.** Τυποποίηση του ιού HPV σε αμυγδαλοειδείς και αδενοειδείς εκβλαστήσεις σε παιδιά ανα ομάδα δειγμάτων.

Ομάδα ασθενών	Ανίχνευση και τυποποίηση ιού HPV					
	HPV (+)	HPV 16	HPV 18	HPV 11	HPV 33	άλλοι HPV
	Αριθμός δειγμάτων (%)	Αριθμός δειγμάτων (%)	Αριθμός δειγμάτων (%)	Αριθμός δειγμάτων (%)	Αριθμός δειγμάτων (%)	Αριθμός δειγμάτων (%)
Παιδιά με καλοήγη υπερπλασία των αμυγδαλοειδών (N=64)	6(9,4%)	4(6,3%)	0(0%)	2(3,1%)	0(0%)	0(0%)
Παιδιά με καλοήγη υπερπλασία των αδενοειδών (N=42)	3(7,1%)	2(4,8%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	1(2,4%)
Σύνολο (N=106)	9(8,5%)	6(5,7%)	0(0%)	2(1,9%)	0(0%)	1(0,9%)

Σε 4 παιδιά συλλέχτηκαν δείγματα και αμυγδαλοειδών και αδενοειδών εκβλαστήσεων.

Η τυποποίηση του ιού HPV στα θετικά για τον ιό HPV δείγματα πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ειδικών εκκινητών κατά την αντίδραση της PCR ξεχωριστά για κάθε τύπο ιό. Ο ιός HPV 16 ανιχνεύτηκε σε 3 κορίτσια και σε 3 αγόρια σε ποσοστό 5,7% των δειγμάτων που μελετήθηκαν. Ο ιός HPV 11 ανιχνεύτηκε σε 1 αγόρι και 1 κορίτσι, ενώ δεν ανιχνεύτηκαν σε κανένα παιδί οι ιοί HPV 33, 18 και 6. Ένα δείγμα αμυγδαλοειδούς εκβλάστησης από ένα HPV-θετικό κορίτσι παρέμεινε ατυποποίητο. Σε κανένα από τα HPV-θετικά δείγματα της μελέτης δεν ανιχνεύτηκαν περισσότεροι του ενός ιοί HPV, υποδεικνύονταν απουσία HPV πολλαπλής μόλυνσης στα παιδιά αυτά.

#### **9.11. Συσχέτιση της παρουσίας του ιού HPV σε αμυγδαλοειδείς και αδενοειδείς εκβλαστήσεις σε παιδιά με την ηλικία τους.**

Στον **Πίνακα 9.17** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της στατιστικής συσχέτισης της παρουσίας του ιού HPV με τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά των παιδιών της μελέτης. Για τη σύγκριση των συχνοτήτων ανίχνευσης του ιού HPV ανάλογα με το φύλο, την ηλικιακή ομάδα, την καταγωγή/εθνότητα, τον τόπο της διαμονής τους και την ιστολογία χρησιμοποιήθηκε το Pearson  $\chi^2$  Test. Για τη μελέτη της σχέσης της παρουσίας του ιού με βάση την ηλικία των παιδιών χρησιμοποιήθηκε το T-test.

Η μέση ηλικία των παιδιών με HPV θετική καλοήγη υπερπλασία των αμυγδαλοειδών ή/και των αδενοειδών τους εκβλαστήσεων ήταν 4,1 (Τυπική Απόκλιση 1,8) έτη, ενώ η μέση ηλικία των παιδιών με HPV-αρνητικά δείγματα ήταν 7,8 (Τυπική Απόκλιση 3,5) έτη (T-test,  $p=0,006$ ). Η συσχέτιση της παρουσίας του ιού HPV και της ηλικίας των παιδιών επιβεβαιώθηκε και μέσω της σύγκρισης των αντίστοιχων ποσοστών στα παιδιά της προσχολικής και της σχολικής ηλικίας, όπου στα παιδιά της προσχολικής ηλικίας η συχνότητα της παρουσίας του ιού HPV ήταν μεγαλύτερη σε σχέση με αυτή στα παιδιά σχολικής ηλικίας (Pearson  $\chi^2$  Test,  $p=0,01$ ).

**Πίνακας 9.17.** Ανίχνευση του ιού HPV σύμφωνα το φύλο των παιδιών (αγόρια ή κορίτσια), την ηλικιακή ομάδα (προσχολικής ή σχολικής ηλικίας) την καταγωγή/εθνότητά τους (ελληνική ή άλλη), τον τόπο της διαμονής τους (αστικό ή αγροτικό), την ιστολογία του δείγματος (αμυγδαλοειδής ή αδενοειδής εκβλάστηση) καθώς και την ηλικία τους.

Ομαδοποίηση ασθενών		Ανίχνευση του ιού HPV			
		N	HPV (+) Αριθμός δειγμάτων (ποσοστό %)	HPV (-) Αριθμός δειγμάτων (ποσοστό %)	p-value
Φύλο	αγόρια	59	4(6,8)	55(93,2)	M.Σ.
	κορίτσια	47	5(10,6)	42(89,4)	
Ηλικιακή ομάδα	προσχολικής ηλικίας	53	8(15,1)	45(84,9)	0,015
	σχολικής ηλικίας	53	1(1,9)	52(98,1)	
Καταγωγή/Εθνικότητα	ελληνική	83	5(6)	78(94)	M.Σ.
	άλλη	23	4(17,4)	19(82,6)	
Τόπος κατοικίας	αστικός	75	8(10,7)	67(89,3)	M.Σ.
	αγροτικός	31	1(3,2)	30(96,8)	
Ιστολογία	αμυγδαλοειδείς εκβλαστήσεις	64	6(9,4)	58(90,6)	M.Σ.
	αδενοειδείς εκβλαστήσεις	42	3(7,1)	39(92,9)	
Ηλικία σε έτη	Μέση Τιμή (T.A.)		4,1(1,8)	7,8(3,5)	0,006
	Ηλικιακό Εύρος		2-8	2-14	

*Pearson  $\chi^2$  Test για τη σύγκριση των συχνοτήτων ανίχνευσης του ιού HPV ανάλογα με το φύλο, την ηλικιακή ομάδα, την καταγωγή/εθνότητά, τον τόπο της διαμονής τους και την ιστολογία, T-test για τη σύγκριση της μέσης ηλικίας των παιδιών με βάση την παρουσία ή όχι του ιού HPV, M.Σ. = στατιστικά μη σημαντικό ( $p > 0,05$ ), T.A. = Τυπική Απόκλιση.*

Παρά το γεγονός πως ο ιός HPV ανιχνεύτηκε σε μεγαλύτερη συχνότητα στις αμυγδαλοειδείς σε σχέση με τις αδενοειδείς εκβλαστήσεις, η συσχέτιση αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική (Pearson  $\chi^2$  Test,  $p=0,687$ ). Καμιά διαφορά δεν παρατηρήθηκε ανάμεσα στα HPV-θετικά και στα HPV-αρνητικά δείγματα σύμφωνα το φύλο των παιδιών

(αγόρια ή κορίτσια), την καταγωγή/εθνότητά τους (ελληνική ή άλλη) και τον τόπο της διαμονής τους (αστικό ή αγροτικό) (Pearson  $\chi^2$  Test,  $p=0,479$ ,  $p=0,084$ ,  $p=0,211$ , αντίστοιχα).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10



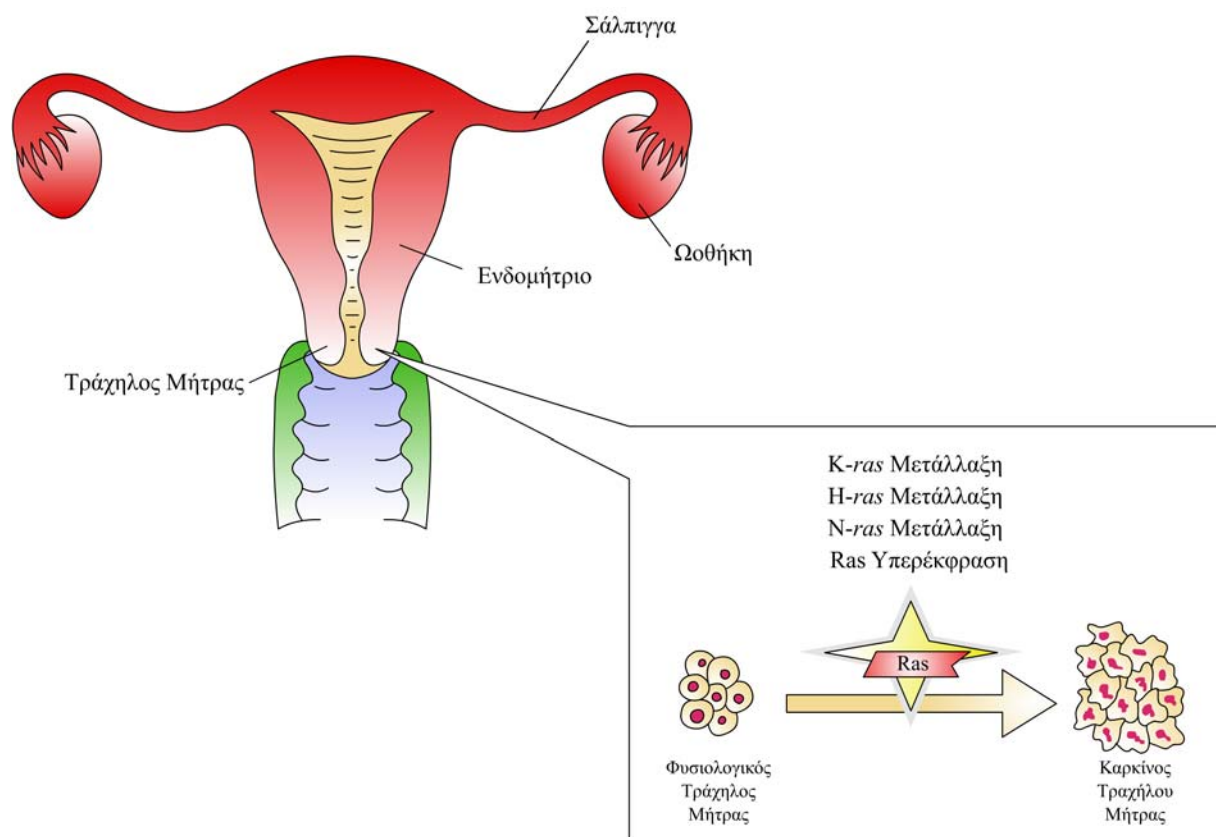
### ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- 10.1. Γενικά. Ο τράχηλος της μήτρας ως μοντέλο μελέτης του ιού HPV
- 10.2. Μεταγραφική ενεργοποίηση των ογκογονιδίων *H-* και *N-ras* στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας
- 10.3. Ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων ογκογονιδίων *ras* στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας και σε ενδοεπιθηλιακές νεοπλασματικές αλλοιώσεις
- 10.4. Ανίχνευση και τυποποίηση ιών HPV στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας και σε ενδοεπιθηλιακές νεοπλασματικές αλλοιώσεις
- 10.5. Συσχέτιση της παρουσίας του ιού HPV και της ενεργοποίησης των ογκογονιδίων *ras*
- 10.6. Ανίχνευση του ιού HPV σε αδενοειδείς και αμυγδαλοειδείς εκβλαστήσεις σε παιδιά με καλοήγη υπερπλασία των αδενοειδών ή/και των αμυγδαλοειδών εκβλαστήσεων
- 10.7. Συσχέτιση της παρουσίας του ιού HPV σε αδενοειδείς και αμυγδαλοειδείς εκβλαστήσεις σε παιδιά με την ηλικία τους
- 10.8. Τυποποίηση του ιού HPV σε αδενοειδείς και αμυγδαλοειδείς εκβλαστήσεις σε παιδιά
- 10.9. Συζήτηση των πιθανών τρόπων μετάδοσης του ιού HPV στη στοματική κοιλότητα στα παιδιά
- 10.10. Συμπεράσματα

#### 10.1. Γενικά. Ο τράχηλος της μήτρας ως μοντέλο μελέτης του ιού HPV

Η μελέτη της αλληλεπίδρασης του ιού HPV με το κύτταρο ξενιστή παρουσιάζει ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον λόγω της συσχέτισης του ιού με την εμφάνιση καρκίνου στον άνθρωπο. Κλινικές και επιδημιολογικές μελέτες έχουν αναδείξει τον ιό HPV ως τον κύριο αιτιολογικό παράγοντα του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας (Munoz και συν, 1992, Bosch και συν, 1995), ενώ μια σειρά από πρόσφατες μελέτες έχουν συσχετίσει την παρουσία του ιού HPV με την εμφάνιση του καρκίνου του λάρυγγα, του οισοφάγου και του πνεύμονα (zur Hausen, 2000). Τα ογκογόνα στελέχη του ιού HPV κωδικοποιούν τις ογκοπρωτεΐνες E6

**Σχήμα 10.1.** Ενεργοποίηση ογκογονιδίων της οικογένειας *ras* κατά τη διαδικασία καρκινογένεσης του τραχήλου της μήτρας.



και E7, οι οποίες αλληλεπιδρούν με γονίδια και πρωτεΐνες του κυττάρου-ξενιστή με αποτέλεσμα την κακοήθη εξαλλαγή του. Η παρουσία του ιού HPV, παρά το γεγονός πως θεωρείται αναγκαία συνθήκη, φαίνεται πως δεν είναι ικανή από μόνη της να για να προκαλέσει κακοήθη εξαλλαγή. Επιπρόσθετοι παράγοντες, όπως η ενεργοποίηση ογκογονιδίων ή η απερεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων του κυττάρου-ξενιστή, έχει προταθεί πως προάγουν την εξέλιξη της HPV λοίμωξης στην εκδήλωση του κακοήθους φαινοτύπου δρώντας συνεργιστικά με τον ιό HPV (Spandidos και συν, 2000).

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε τόσο σε μεταγραφικό επίπεδο, όσο και σε επίπεδο σημειακών μεταλλάξεων η ενεργοποίηση των ογκογονιδίων *ras* (Σχήμα 10.1) και διερευνήθηκε η αλληλεπίδραση των ογκογονιδίων *ras* με τον ιό HPV στη νεοπλασία του τραχήλου της μήτρας. Ο τράχηλος της μήτρας αποτελεί ιδανικό μοντέλο ιστού για την in



νίνο μελέτη του ιού HPV και την κατανόηση των μηχανισμών της HPV-επαγώμενης καρκινογένεσης τόσο λόγω της συσχέτισης του ιού με τη νεοπλασία του τραχήλου της μήτρας, όσο και λόγω της δυνατότητας λήψης βιοψιακού υλικού κατά τη χειρουργική αντιμετώπιση της κακοήθους ή μη παθολογίας του τραχήλου. Για το λόγο αυτό, συμπεριλήφθησαν στη μελέτη μας 56 δείγματα βιοψιακού υλικού τραχήλου της μήτρας, τα οποία προήλθαν από γυναίκες που νοσηλεύτηκαν στη Γυναικολογική και Μαιευτική Κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου Κρήτης την περίοδο Ιούλιος 2002 έως Δεκέμβριος 2004 και στην οποίες διενεργήθηκε ολική υστερεκτομή. Οι ασθενείς της μελέτης, από τις οποίες έγινε λήψη ιστού τραχήλου μήτρας με βάση την ιστολογική διάγνωση ταξινομήθηκαν σε τρεις ομάδες: α. με φυσιολογικό τράχηλο, β. με ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία και γ. με καρκίνο τραχήλου της μήτρας.

#### **10.2. Μεταγραφική ενεργοποίηση των ογκογονιδίων H- και N-ras στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας**

Η μεταγραφική ενεργοποίηση των ογκογονιδίων της οικογένειας *ras* στον τράχηλο της μήτρας εκτιμήθηκε με τη χρήση της μεθόδου της ημιποσοτικής αντίστροφης αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (RT-PCR). Η μέθοδος αυτή, η οποία αποτελεί μια από τις σημαντικότερες εφαρμογές της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR), παρέχει τη δυνατότητα ποσοτικοποίησης των επιπέδων mRNA κάθε γονιδίου ξεχωριστά με αυξημένη ευαισθησία, ειδικότητα, επαναληπτικότητα και με σχετικά χαμηλό κόστος. Η μέθοδος προσφέρει τη δυνατότητα διαφορικής μελέτης της έκφρασης των ογκογονιδίων *ras*, η οποία δεν μπορεί να μελετηθεί σε πρωτεϊνικό επίπεδο, καθώς η πρωτεΐνη Ras αποτελεί κοινό προϊόν για τα τρία ογκογονίδια *ras*. Το γεγονός πως το αρχικό υπόστρωμα της αντίδρασης RT είναι το RNA, το οποίο είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο στην αποδόμησή του από RNAάσες, καθιστούσε αναγκαία τόσο κατά τη φάση της διαδικασίας εκχύλισης του RNA, όσο και κατά

την έναρξη της RT-PCR την εφαρμογή απόλυτων συνθηκών αποστείρωσης. Ιδιαίτερη προσοχή απαιτήθηκε στη πειραματική φάση βελτιστοποίησης της μεθόδου, γεγονός που εξασφάλισε, τόσο την πιστότητα της μεθόδου, όσο και τη δυνατότητα ερμηνείας των αποτελεσμάτων της.

Με βάση τον ποσοτικό προσδιορισμό των αποτελεσμάτων της μεθόδου RT-PCR στην ομάδα ασθενών με καρκίνο του τραχήλου μήτρας παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση των ογκογονιδίων *H-ras* και *N-ras* σε σχέση με την ομάδα ασθενών με ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία και με την ομάδα ασθενών με φυσιολογικό τράχηλο της μήτρας, ενώ τα επίπεδα έκφρασης του ογκογονιδίου *K-ras* δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις τρεις ομάδες ασθενών της μελέτης. Η παρούσα μελέτη αποτελεί την πρώτη προσπάθεια στην παγκόσμια βιβλιογραφία διερεύνησης του ρόλου της μεταγραφικής ενεργοποίησης των ογκογονιδίων *ras* στον τράχηλο της μήτρας. Μέχρι σήμερα, μια σειρά από ανοσοϊστοχημικές μελέτες έχουν ανιχνεύσει σε δείγματα τραχήλου της μήτρας την πρωτεΐνη Ras σε ποσοστό 12-80% και έχουν δείξει πως η έκφρασή της είναι αυξημένη στο καρκίνο του τραχήλου της μήτρας σε σχέση με τον φυσιολογικό τράχηλο (Leung και συν, 2001, Skomedal και συν, 1999, Slagle και συν, 1998, Huang και συν, 1992, Pinion και συν, 1991, Agnantis και συν, 1988, Shirasawa και συν, 1987). Ωστόσο οι εργασίες αυτές δεν είχαν τη δυνατότητα να καθορίσουν ποιό ή ποιά από τα ογκογονίδια *ras* ευθύνεται για την υπερέκφραση της πρωτεΐνης Ras σε μεταγραφικό επίπεδο ή κατά πόσο η υπερέκφραση είναι το αποτέλεσμα μετα-μεταγραφικών τροποποιήσεων.

Με βάση τα ευρήματα της μελέτης μας τα αυξημένα επίπεδα της πρωτεΐνης Ras μπορούν να αποδοθούν στη μεταγραφική ενεργοποίηση των ογκογονιδίων *H-ras* και *N-ras*. Το γεγονός αυτό έχει ιδιαίτερη σημασία δεδομένου ότι αποδεικνύει πως η αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης Ras δεν οφείλεται σε ειδική μεταγραφική δραστηριότητα ενός μόνου από τα ογκογονίδια *ras*, αλλά στην αθροιστική τους δράση, όπως έχει βρεθεί και σε άλλους

τύπους καρκίνου (Miyakis και συν, 1998). Η συνέκφραση των ογκογονιδίων *H-ras* και *N-ras* υποδεικνύει την παρουσία κοινών μηχανισμών μεταγραφικής ρύθμισης των γονιδίων αυτών στα κύτταρα του τραχήλου της μήτρας, γεγονός που απαιτεί στο μέλλον περαιτέρω διερεύνηση.

Η υπερέκφραση της πρωτεΐνης Ras στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας έχει συσχετιστεί με την εμφάνιση προχωρημένων σταδίων κατά FIGO (Riou και συν, 1988) και με την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων (Hayasashi και συν, 1991). Οι Sagae και συν έχουν επίσης συσχετίσει την υπερέκφραση της πρωτεΐνης Ras με φτωχή πρόγνωση των ασθενών (Sagae και συν, 1989), γεγονός, όμως, που δεν έχει επιβεβαιωθεί σε μεταγενέστερες εργασίες (Garzetti και συν, 1998, Lee και συν, 1996, Symonds και συν, 1992). Στη μελέτη μας τα υψηλότερα επίπεδα mRNA των ογκογονιδίων *H-* and *N-ras* βρέθηκαν σε πρώιμα στάδια κατά FIGO (Στάδιο IA and IB) παρά σε προχωρημένα (IIB and III). Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με παρατηρήσεις που προτείνουν τον ογκοπροστατευτικό ρόλο της φυσιολογικής *H-Ras* πρωτεΐνης (Spandidos και συν, 2002) δημιουργούν νέα ερωτήματα σχετικά με το ρόλο της έκφρασης της πρωτεΐνης Ras στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Η πενταετής παρακολούθηση των ασθενών που συμμετείχαν στην παρούσα μελέτη θα βοηθήσει στη διερεύνηση του ρόλου των επιπέδων mRNA των ογκογονιδίων *H-* and *N-ras* ως προγνωστικοί δείκτες στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας.

Η μελέτη της έκφρασης τόσο σε πρωτεϊνικό όσο και σε μεταγραφικό επίπεδο κυτταρικών γονιδίων που σχετίζονται με επαγωγή της καρκινογένεσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί δυναμικά στη διάγνωση και την πρόγνωση του καρκίνου στον άνθρωπο. Παράδειγμα ενός τέτοιου δείκτη στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, καλά μελετημένου, αποτελεί η πρωτεΐνη *INK4A*, η οποία κωδικοποιείται από το γονίδιο *CDKN2A*. Η πρωτεΐνη *INK4A* απενεργοποιεί τα συμπλέγματα της κυκλίνης *D1-CDK4* και της κυκλίνης *D1-CDK6* αναστέλλοντας την έκφραση της κυκλίνης *E* και εμποδίζει την ικανότητα της πρωτεΐνης *E6*

να προκαλέσει μετασχηματισμό των κυττάρων. Η δράση της INK4A αναστέλλεται από την πρωτεΐνη E7 των ιών υψηλού κινδύνου, η οποία παρά το γεγονός πως προκαλεί υπερέκφραση της INK4A, ενεργοποιεί τις κυκλίνες A και E μέσω της της αλληλεπίδρασής της με την πρωτεΐνη Rb (Zerfass και συν, 1995). Η αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης INK4A η οποία προσδιορίζεται ανοσοϊστοχημικά έχει συσχετιστεί με υψηλού βαθμού νεοπλασματικές αλλοιώσεις του τραχήλου της μήτρας (Klaes και συν, 2001).

Ωστόσο η θετική προγνωστική της αξία που έχει αναφερθεί αναμένεται να καθοριστεί σε μελλοντικές προοπτικές μελέτες. Η ειδικότητα, η ευαισθησία και η θετική ή αρνητική προγνωστική αξία της υπερέκφρασης ή υποέκφρασης και άλλων πρωτεϊνών επιβάλλεται να διερευνηθούν στο μέλλον και να αξιολογηθούν κλινικά. Στην περίπτωση του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, ο οποίος είναι ιδιαίτερα συχνός στις αναπτυσσόμενες χώρες, εκτός από την αξιοπιστία των δεικτών ιδιαίτερη σημασία πρέπει να αποδοθεί και στο χαμηλό κόστος εφαρμογής των μεθόδων προσδιορισμού τους. Η παραδοσιακή μεθοδολογία της RT-PCR αποτελεί μια αξιόπιστη μέθοδο, η οποία πλεονεκτεί όσον αφορά το κόστος σε σχέση με τη Real-time RT-PCR. Ωστόσο η καθιέρωσή της στην καθημερινή κλινική πράξη υποκρύβει μια σειρά από τεχνικές δυσκολίες λόγω της ευαισθησίας του μορίου του RNA, το οποίο αποτελεί το υπόστρωμα της αντίδρασης της RT-PCR. Η τεχνολογία των microarrays, αποτελεί μια ελπιδοφόρα προοπτική προς την κατεύθυνση αυτή. Παρέχει τη δυνατότητα προσδιορισμού της έκφρασης ταυτόχρονα ενός μεγάλου αριθμού γονιδίων και στο μέλλον αναμένεται η επέκταση της χρήσης των microarrays στην κλινική πρακτική (Liotta και Petricoin, 2000).

Η υπερέκφραση των ογκογονιδίων *ras* έχει συσχετιστεί με την ανάπτυξη πολλών τύπων καρκίνου στον άνθρωπο (Gulbis και Galand, 1993). *In vitro* μελέτες έχουν επιβεβαιώσει το ρόλο της έκφρασης των Ras στην επαγωγή της κακοήθους εξαλλαγής διάφορων κυττάρικών σειρών και από διαφορετικούς ιστούς (Stacey και συν, 1984).

Επιπλέον, η έκφραση της πρωτεΐνης Ras έχει ενοχοποιηθεί για αυξημένη αντίσταση των καρκινικών κυττάρων στην ακτινοθεραπεία (Sklar, 1988, Miller και συν, 1993). Οι Karlson και συν έχουν δείξει πως η αναστολή της έκφρασης του ογκογονιδίου *H-ras* σε κυτταρικές σειρές ινοβλαστών με τη βοήθεια ειδικού αναστολέα οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα απόπτωσης των κυττάρων μετά από ακτινοβόλησή τους (Karlson και συν, 1996). Οι παρατηρήσεις αυτές υποδεικνύουν την πρωτεΐνη Ras καθώς και τα ογκογονίδια *ras* ως πιθανά μόρια στόχους για τη γονιδιακή θεραπεία είτε ως μονοθεραπεία, είτε σε συνδυασμό με τις παραδοσιακές μεθόδους (ακτινοθεραπεία, χημειοθεραπεία και χειρουργική θεραπεία). Η αναστολή των ενεργοποιημένων ογκογονιδίων *ras* μπορεί να γίνει σε επίπεδο DNA με τη χρήση ειδικών antisense ολιγονουκλεοτιδίων, σε μεταγραφικό επίπεδο, σε πρωτεϊνικό επίπεδο με την αδρανοποίηση της πρωτεΐνης Ras καθώς και σε μετα-πρωτεϊνικό επίπεδο είτε με την αναστολή των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων της πρωτεΐνης που είναι απαραίτητες για τη δράση της, είτε με την καταστροφή της από το ανοσοποιητικό σύστημα λόγω εμβολιασμού με Ras πεπτίδια (Zachos και Spandidos, 1997). Η γονιδιακή θεραπεία στον γυναικολογικό καρκίνο αποτελεί πραγματική πρόκληση για το μέλλον, ενώ οι πρώτες προσπάθειες χρησιμοποιώντας ως συστήματα μεταφοράς αδενοϊούς με μόρια στόχους το γονίδιο της p53 καθώς και τα ογκογονίδια E6 και E7 του ιού HPV είχαν ενθαρρυντικά αποτελέσματα (Hamada και συν, 1996, Hamada και συν, 1996). Στο μέλλον ο καθορισμός και άλλων μορίων στόχων θα επιτρέψει την επιλογή της μοριακής θεραπείας ως θεραπεία εκλογής του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας.

Η πλειοψηφία των περιπτώσεων χαμηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας του τραχήλου της μήτρας (CIN) υποχωρούν αυτόματα, ενώ έχει υπολογιστεί πως μόλις το 1% των αλλοιώσεων CIN1 και περίπου το 10% των αλλοιώσεων CIN3 τελικά εξελίσσονται σε διηθητικό καρκίνο του τραχήλου της μήτρας (Duggan και συν, 1998, Ostor, 1993). Εξαιτίας της έλλειψης αξιόπιστων γενετικών δεικτών ελέγχου της εξέλιξης της ενδοεπιθηλιακής

νεοπλασίας του τραχήλου της μήτρας, η θεραπεία εκλογής για τις υψηλού βαθμού αλλοιώσεις CIN αποτελεί η χειρουργική εκτομή της βλάβης. Η καθιέρωση αξιόπιστων, ευαίσθητων και ειδικών δεικτών θα έχει ως αποτέλεσμα τον προσδιορισμό της κατάλληλης θεραπευτικής τους αντιμετώπισης με βάση την επιθετικότητά της ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας του τραχήλου της μήτρας, ενώ θα βοηθήσει στην πρόληψη του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας (Cheng και συν, 2002). Μια σειρά από εργασίες έχουν μελετήσει την έκφραση της πρωτεΐνης Ras σε ασθενείς με ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία (Pedroza-Saavedra και συν, 2000, Ngan και συν, 1999, Nair και συν, 1998, Slagle και συν, 1998, Sagae και συν, 1990). Αρκετοί ερευνητές έχουν βρει αυξημένα επίπεδα και έχουν συσχετίσει την έκφραση της με την εξέλιξη της ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας (Nair και συν, 1998, Sagae και συν, 1990). Στη μελέτη των Sagae και συν η συχνότητα έκφρασης της πρωτεΐνης Ras με τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων ήταν 17,9% σε αλλοιώσεις CIN1, 28,9% σε CIN2, και 53,9% CIN3, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό στον μικροδιηθητικό καρκίνο ήταν 50% (Sagae και συν, 1990). Στην ανοσοϊστοχημική ανάλυση 204 προκαρκινικών και καρκινικών αλλοιώσεων του τραχήλου της μήτρας από τους Nair και συν, τα επίπεδα της πρωτεΐνης N-Ras αυξάνονταν με βάση το βαθμό της δυσπλασίας (Nair και συν, 1998). Ωστόσο άλλοι ερευνητές δεν έχουν βρει σημαντικές διαφορές στην έκφραση της πρωτεΐνης Ras μεταξύ ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας του τραχήλου της μήτρας και φυσιολογικού τραχήλου και δεν έχουν επιβεβαιώσει τα ευρήματα των προηγούμενων (Slagle και συν, 1998).

Στη μελέτη μας παρά το γεγονός πως δεν παρουσιάστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων με ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία του τραχήλου της μήτρας και της ομάδας ελέγχου γυναικών με φυσιολογικό τράχηλο, τα επίπεδα mRNA σε ασθενείς με CIN2 και CIN3 ήταν υψηλότερα, αν και στατιστικώς μη σημαντικά, σε σχέση με εκείνα των ασθενών με CIN1. Μελέτη με μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων ασθενών με ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία του τραχήλου της μήτρας απαιτείται για τη διερεύνηση του ρόλου της

μεταγραφικής ενεργοποίησης των ογκονιδίων *ras* στην εμφάνιση και την εξέλιξη της ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας του τραχήλου της μήτρας.

### **10.3. Ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων ογκογονιδίων *ras* στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας και σε ενδοεπιθηλιακές νεοπλασματικές αλλοιώσεις.**

Η συχνότητα ανίχνευσης σημειακών μεταλλάξεων στο κωδικόνιο 12 του ογκογονιδίου *K-ras* στα δείγματα με νεοπλασία του τραχήλου της μήτρας ήταν 12,5%, ενώ σε ασθενείς με φυσιολογικό τράχηλο δε βρέθηκαν *K-ras* μεταλλάξεις. Στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας η συχνότητα ανίχνευσης σημειακών μεταλλάξεων στο κωδικόνιο 12 του ογκογονιδίου *K-ras* ήταν υψηλότερη σε σχέση με την ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με άλλες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί στον ελληνικό πληθυσμό, οι οποίες έχουν δείξει πως η συχνότητα *K-ras* μεταλλάξεων σε προκαρκινικές και καρκινικές αλλοιώσεις του τραχήλου της μήτρας κυμαίνεται μεταξύ 17 και 24,4% (Dokianakis και συν, 1999, Koffa και συν, 1994). Με βάση τη διεθνή βιβλιογραφία, οι μεταλλάξεις στο ογκογονίδιο *K-ras* στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας συμβαίνουν σε ποσοστό 0-61%, όπως φαίνεται στον **Πίνακα 10.1**.

Οι πιο συχνές σημειακές μεταλλάξεις αφορούν το κωδικόνιο 12 με συχνότερες τις μεταθέσεις GGT σε GAT (Stenzel και συν, 2001, Ferguson και συν, 1998, Parker και συν, 1997, Wong και συν, 1995, Sato και συν, 1991). Σε ασθενείς με ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία η συχνότητα μεταλλάξεων στο ογκογονίδιο *K-ras* είναι μικρότερη, ωστόσο η παρουσία τους συνηγορεί στην ενεργοποίηση του ογκογονιδίου *K-ras* μέσω σημειακών μεταλλάξεων στα αρχικά στάδια της καρκινογένεσης του τραχήλου της μήτρας (Alonio και συν, 2003, Prokorakis και συν, 2002, Golijow και συν, 1999, Dokianakis και συν, 1998).

Στη μελέτη μας η συχνότητα ανεύρεσης σημειακών μεταλλάξεων στις ασθενείς με καρκίνο του τραχήλου της μήτρας στο κωδικόνιο 12 του ογκογονιδίου *H-ras* ήταν 7,1%, ενώ

**Πίνακας 10.1.** Ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων στα ογκογονίδια *ras* σε ασθενείς με καρκίνο του τραχήλου της μήτρας.

Ερευνητική Ομάδα	Αριθμός περιστατικών	Ογκογονίδιο <i>ras</i>	Συχνότητα (Ποσοστό%)
Sato και συν, 1991	7	<i>K-ras</i>	2/7 (28,6%)
Falcinelli και συν, 1993	42	<i>K-ras</i>	0/42 (0%)
Willis και συν, 1996	15	<i>K-ras</i>	1/15 (6,7%)
Jiko και συν, 1995	25	<i>K-ras</i>	1/25 (4%)
Koffa και συν, 1994	37	<i>K-ras</i>	10/37 (27%)
		<i>H-ras</i>	3/37 (8,1%)
		<i>N-ras</i>	2/37 (5,4%)
Wong και συν, 1995	80	<i>K-ras</i>	49/80 (61%)
		<i>H-ras</i>	28/80 (35%)
Huang και συν, 1996	44	<i>H-ras</i>	8/44 (18,2%)
Lee και συν, 1996	27	<i>H-ras</i>	6/27 (22%)
Parker και συν, 1997	32	<i>K-ras</i>	3/32 (9,4%)
Grendys και συν, 1997	33	<i>K-ras</i>	4/33 (12,1%)
		<i>H-ras</i>	2/33 (6,1%)
		<i>N-ras</i>	2/33 (6,1%)
Ferguson και συν, 1998	27	<i>K-ras</i>	1/27 (3,7%)
O'Leary και συν, 1998	20	<i>K-ras</i>	0/20 (0%)
		<i>H-ras</i>	1/20 (5%)
		<i>N-ras</i>	0/20 (0%)
Aoyama και συν, 1998	20	<i>H-ras</i>	0/20 (0%)
Dokianakis και συν, 1999	75	<i>K-ras</i>	24/75 (32%)
		<i>H-ras</i>	7/75 (9,3%)
		<i>N-ras</i>	0/75 (0%)
Pochylski και συν, 2003	29	<i>K-ras</i>	0/29 (0%)
Stenzel και συν, 2001	24	<i>K-ras</i>	2/24 (8,3%)
Alonio και συν, 2003	39	<i>H-ras</i>	16/39 (41%)

*Τροποποιημένο από Mammas και συν, 2005.*

δε βρέθηκαν σημειακές μεταλλάξεις στο ογκογονίδιο *N-ras*. Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με άλλους ερευνητές, οι οποίοι έχουν δείξει πως η ενεργοποίηση των ογκογονιδίων *H-ras* και *N-ras* μέσω σημειακών μεταλλάξεων συμβαίνει λιγότερο συχνά στη νεοπλασία του τραχήλου της μήτρας (Dokianakis και συν, 1999, O'Leary και συν, 1998, Huang και συν, 1996, Lee και συν, 1996, Wong και συν, 1995). Για παράδειγμα, στη μελέτη των Dokianakis και συν, σε 75 ασθενείς με διηθητικό καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, σημειακές



μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 12 του ογκογονιδίου *K-ras* ανιχνεύτηκαν στο 32% των ασθενών, ενώ τα αντίστοιχα ποσοστά για τα ογκογονίδια *H-ras* και *N-ras* ήταν 22% και 0% αντίστοιχα (Dokianakis και συν, 1999). Στη μελέτη των Koffa και συν, σε 37 ασθενείς με καρκίνο του τραχήλου της μήτρας τα αντίστοιχα ποσοστά ήταν 27% για το ογκογονίδιο *K-ras*, 8,1% για το ογκογονίδιο *H-ras* και 5,4% για το ογκογονίδιο *N-ras* (Koffa και συν, 1994), ενώ στη μελέτη των Grendys και συν σε 33 ασθενείς με καρκίνο του τραχήλου της μήτρας τα αντίστοιχα ποσοστά ήταν 12,1%, 6,1% και 6,1% (Grendys και συν, 1997).

Είναι σημαντικό, ωστόσο, να σημειωθεί πως στη διεθνή βιβλιογραφία οι μελέτες ανίχνευσης σημειακών μεταλλάξεων σε άλλα κωδικόνια σε δείγματα τραχήλου της μήτρας είναι ιδιαίτερα περιορισμένες (Pochylski και Kwasniewska, 2003, Stenzel και συν, 2001, O'Leary και συν, 1998, Parker και συν, 1997, Grendys και συν, 1997, Lee και συν, 1996, Wong και συν, 1995, Falcinelli και συν, 1993, Willis και συν, 1993). Οι Grendys και συν μελέτησαν 33 ασθενείς με πρώιμο στάδιο καρκίνο του τραχήλου της μήτρας και ανίχνευσαν μεταλλάξεις στα ογκογονίδια *ras* στο 24,2% των ασθενών (Grendys και συν, 1997). Στη μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε ανάλυση για τα κωδικόνια 12, 13 και 61, και οι σημειακές μεταλλάξεις στο σύνολό τους ανιχνεύτηκαν στο κωδικόνιο 61 των ογκογονιδίων *H-*, *N-* και *K-ras*. Στη μελέτη των Parker και συν, σε 32 ασθενείς η συχνότητα ανίχνευσης σημειακών μεταλλάξεων στο κωδικόνιο 61 του ογκογονιδίου *K-ras* ήταν 3,1% (Parker και συν, 1997). Οι Wong και συν ανίχνευσαν σημειακές μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 13 του ογκογονιδίου *K-ras* σε 5 από του 80 ασθενείς (6%) με καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, ενώ οι Willis και συν σε 15 ασθενείς με καρκίνο του τραχήλου της μήτρας βρήκαν μόνο σε μια γυναίκα μετάλλαξη στο κωδικόνιο 13 του ογκογονιδίου *K-ras* (Wong και συν, 1995). Πρόσφατα ανιχνεύτηκαν πολυμορφισμοί στο κωδικόνιο 31 σε δείγματα αδενοκαρκινωμάτων με υψηλού κινδύνου HPV ιούς (Roh και συν, 2001). Περαιτέρω έρευνα απαιτείται για τη διερεύνηση και

νέων κωδικονίων ως πιθανές θέσεις σημειακών μεταλλάξεων στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας.

Η παρουσία σημειακών μεταλλάξεων στο ογκογονίδιο *K-ras* έχει συσχετιστεί με προχωρημένα στάδια καρκίνου του τραχήλου της μήτρας κατά FIGO και με πτωχή πρόγνωση (Dokianakis και συν, 1999). Ωστόσο, άλλοι ερευνητές δεν έχουν επιβεβαιώσει τις συσχετίσεις αυτές (Wong και συν, 1995, Sato και συν, 1991). Σε ασθενείς με ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία και με σημειακές μεταλλάξεις στο ογκογονίδιο *H-ras* η εξέλιξη της νεοπλασίας σε διηθητικό καρκίνο του τραχήλου της μήτρας έχει βρεθεί πως συμβαίνει σε χρονικό διάστημα μικρότερο των δύο χρόνων (Alonio και συν, 2003). Ο ρόλος της ανίχνευσης των σημειακών μεταλλάξεων στα ογκογονίδια *ras* ως προγνωστικοί δείκτες της εξέλιξης της νεοπλασίας του τραχήλου της μήτρας απομένει να διερευνηθεί στο μέλλον με τη βοήθεια προοπτικών μελετών. Αξίζει να σημειωθεί η απουσία μεταλλάξεων στα ογκογονίδια *ras* στο φυσιολογικό τράχηλο γεγονός που είναι σύμφωνο με τα ευρήματα και άλλων ερευνητών (O'Leary και συν, 1998, Aoyama και συν, 1998, Van Le και συν, 1993).

Στη μελέτη μας δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας σημειακών μεταλλάξεων στα ογκογονίδια *K-ras* και των επιπέδων έκφρασης των ογκογονιδίων *H-*, *K-* και *N-ras*. Παρόμοια αποτελέσματα τα έχουν βρεθεί και από τους Lee και συν, οι οποίοι σε δείγματα καρκίνου του τραχήλου της μήτρας έχουν δείξει πως η έκφραση της πρωτεΐνης *H-Ras* δε σχετίζεται με την παρουσία σημειακών μεταλλάξεων στο κωδικόνιο 12 του ογκογονιδίου *H-ras* (Lee και συν, 1996). Φαίνεται πως άλλοι μηχανισμοί, όπως η γονιδιακή επέκταση των ογκογονιδίων *ras*, οι σημειακές μεταλλάξεις σε άλλα κωδικόνια των ρυθμιστικών περιοχών τους καθώς και η δράση μεταγραφικών παραγόντων που προάγουν τη μεταγραφή των ογκογονιδίων, ενδεχομένως να είναι υπεύθυνοι για την υπερέκφραση των ογκογονιδίων *H-ras* και *N-ras* στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας.

#### **10.4. Ανίχνευση και τυποποίηση ιών HPV στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας και σε ενδοεπιθηλιακές νεοπλασματικές αλλοιώσεις.**

Η εξέλιξη των τεχνικών και των μεθόδων της μοριακής βιολογίας είχε ως αποτέλεσμα την ανίχνευση του ιού HPV σε όλο και μεγαλύτερο ποσοστό ασθενών με καρκίνο του τραχήλου της μήτρας (Bosch και Munoz, 2002, Walboomers και συν, 1999). Αξίζει να σημειωθεί πως στις αρχές τις δεκαετίας του 1980 το ποσοστό ανίχνευσης του ιού HPV σε ασθενείς με καρκίνο του τραχήλου της μήτρας δεν ξεπερνούσε το 40-50%, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό σήμερα ανέρχεται σχεδόν στο 100%. Η ανίχνευση του ιού μπορεί να πραγματοποιηθεί με διάφορες μοριακές μεθόδους, όπως ο *in situ* υβριδισμός (μέθοδος FISH), η ανάλυση southern (μέθοδος SH), η μέθοδος Hybrid Capture (HC) και η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR).

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR), η οποία χρησιμοποιείται σήμερα περισσότερο συχνά, είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη και παρέχει τη δυνατότητα ανίχνευσης ενός μεγάλου αριθμού τύπων ιού HPV (τυποποίηση). Με τη χρήση γενικών εκκινητών και ακολούθως την πέψη των PCR προϊόντων με περιοριστικά ένζυμα (τεχνική RFLP), καθώς και με τη χρήση ειδικών εκκινητών για κάθε τύπο ιού HPV ταυτόχρονα (multiplex PCR) μπορεί να πραγματοποιηθεί η τυποποίηση των ιών HPV με τη βοήθεια μιας μόνο αντίδρασης πολυμερισμού (Koffa και συν, 1994). Ωστόσο, με τη χρήση ειδικών εκκινητών για κάθε τύπο ιού HPV ξεχωριστά περιορίζεται η πιθανότητα ψευδώς θετικών ή αρνητικών αποτελεσμάτων, ενώ ταυτόχρονα είναι δυνατόν να προσδιοριστούν με μεγαλύτερη ακρίβεια περιπτώσεις πολλαπλών HPV λοιμώξεων (Husnjak και συν, 2000, Astori και συν, 1997). Στην παρούσα μελέτη η ανίχνευση των ιών HPV πραγματοποιήθηκε με PCR χρησιμοποιώντας τους γενικούς εκκινητές, ενώ η τυποποίηση των HPV θετικών δειγμάτων έγινε με PCR χρησιμοποιώντας ειδικούς εκκινητές ξεχωριστά για κάθε τύπο ιού HPV.

Η παρουσία HPV αρνητικών δειγμάτων σε νεοπλασματικά δείγματα μπορεί να αποδοθεί είτε στην παρουσία και άλλων HPV ιών που δεν προσδιορίστηκαν στην παρούσα μελέτη, είτε να ερμηνευτεί ως ψευδώς αρνητικό αποτέλεσμα. Σε μελέτη επανεξέτασης HPV αρνητικών δειγμάτων έχει βρεθεί πως στην πλειοψηφία των περιπτώσεων τελικά ανιχνεύεται ο ιός HPV με τη χρήση μικρότερου μεγέθους εκκινητών που παρουσίαζαν μεγαλύτερη ευαισθησία σε σχέση με τους αρχικούς (Bosch και συν, 1995, Walboomers και συν, 1999). Ωστόσο, η ανάπτυξη καρκίνου του τραχήλου της μήτρας σε δείγματα όπου δεν ανιχνεύεται ο ιός HPV δεν μπορεί να αποκλείσει την υπόθεση της μη HPV-εξαρτώμενης καρκινογένεσης σε ένα μικρό ποσοστό περιπτώσεων.

Η παγκόσμια κατανομή των διάφορων τύπων ιού HPV ποικίλει στις διάφορες γεωγραφικές περιοχές, γεγονός που έχει αποδοθεί τόσο σε επιδημιολογικά χαρακτηριστικά των περιοχών αυτών, όσο και στη διαφορετική ευαισθησία των μεθόδων που έχουν χρησιμοποιηθεί για την τυποποίηση των ιών HPV (Walboomers και συν, 1999, Sasagawa και συν, 2001). Οι ιοί HPV 16 και 18 αποτελούν τους πιο συχνούς τύπους ιούς HPV που ανιχνεύονται σε ασθενείς με καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, με τον ιό HPV 16 να παρουσιάζεται παγκόσμια σε μεγαλύτερη συχνότητα. Στη μελέτη μας, παρά το γεγονός πως ο ιός HPV 16 ήταν ο πιο συχνός τύπος ιού HPV, ο ιός HPV 18 ανιχνεύτηκε σε ποσοστό σχεδόν διπλάσιο από εκείνο που έχει αναφερθεί από άλλους ερευνητές σε Ευρωπαϊκές γυναίκες (Walboomers και συν, 1999). Η παρατήρηση αυτή είναι σύμφωνη με τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών που έχουν πραγματοποιηθεί στον ελληνικό πληθυσμό, όπου έχει βρεθεί σε υψηλή συχνότητα ο ιός HPV 18 (Prokopoulos και συν, 2002, Dokianakis και συν, 1998, Koffa και συν, 1994).

Στον **Πίνακα 10.2.** παρουσιάζονται οι μελέτες που αφορούν την ανίχνευση των ιών HPV 16 και 18 στον ελληνικό πληθυσμό. Το κατα πόσο η κυριαρχία αυτή του ιού HPV 18

οφείλεται στην αυξημένη συχνότητα του στο νησί της Κρήτης αποτελεί μια πραγματικά ενδιαφέρουσα ερευνητική πρόκληση.

**Πίνακας 10.2.** Η λοίμωξη με τον ιό HPV στον ελληνικό πληθυσμό. Ανασκόπηση της βιβλιογραφίας.

Ερευνητική Ομάδα	Περιοχή	Δείγματα/Ιστολογική Διάγνωση	Μεθοδολογία	N ασθενών	Συχνότητα HPV 16	Συχνότητα HPV 18
Koffa και συν, 1995	Αθήνα/Κρήτη;	Τράχηλος της μήτρας/ CIN	PCR	31	11/31(35,5%)	3/31(9,7%)
Agorastos και συν, 1995	Β. Ελλάδα	Τράχηλος της μήτρας/ Φυσιολογικός, CIN	dot blot	226	15/226(6,6%)	3/226(1,3%)
Noutsou και συν, 1996	Αθήνα/Κρήτη;	Πνεύμονας/ καρκίνος	PCR- PCR/RFLP	99	4/99(4%)	8/99(8%)
Labropoulou και συν, 1997	Αθήνα/Κρήτη;	Τράχηλος της μήτρας/ CIN, καρκίνος	PCR/RFLP- Southern blot	136	43/136(31,6%)	14/136(10,3%)
Lambropoulos και συν, 1997	Β. Ελλάδα	Στοματική κοιλότητα/ φυσιολογικός βλεννογόνο	Southern blot	169	4/169(2,4%)	0/169(0%)
Dokianakis και συν, 1998	Αθήνα/Κρήτη;	Τράχηλος της μήτρας/ CIN, καρκίνος	PCR- PCR/RFLP	35	3/35(8,6%)	14/35(40%)
Dokianakis και συν, 1999	Αθήνα/Κρήτη;	Τράχηλος της μήτρας/ CIN, καρκίνος	PCR	88	4/88(4,5%)	36/88(40,9%)
Aggelopoulou και συν, 1999	Αθήνα/Κρήτη;	Στοματική κοιλότητα/ Υπερπλασία, καρκίνος	PCR	102	11/102(10,8%)	22/102(21,6%)
Prokopakis και συν, 2002	Κρήτη	Τράχηλος της μήτρας/ τραχηλίτιδα, CIN	PCR	47	5/47(10,6%)	12/47(25,5%)
Mammas και συν, 2005	Κρήτη	Τράχηλος της μήτρας/ Φυσιολογικός, CIN, καρκίνος	PCR- PCR/RFLP	31	15/31(48,4%)	12/31(38,7%)
Lyronis και συν, 2005	Κρήτη	Οισοφάγος/ φυσιολογικός, καρκίνος	PCR	57	2/57(3,5%)	20/57(35,1%)
Roussaki-Schulze και συν, 2005	Λάρισα	Δέρμα/Μελάνωμα	PCR/RFLP	28	2/28(7,1%)	0/28(0%)
Mammas και συν, 2006	Αθήνα	Αδενοειδείς και Αμυγδαλοειδείς εκβλαστήσεις/ φυσιολογικός βλεννογόνο	PCR	102	6/102(5,9%)	0/102(0%)

*PCR: Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, RFLP: Ανάλυση πολυμορφισμού μεγέθους περιοριστικών θραυσμάτων.*

Η Κρήτη, ένα νησί στο νοτιοανατολικό άκρο της Εύρωπης, πολύ κοντά στα βόρεια παράλια της Αφρικανικής ηπείρου, παρουσιάζει ιδιαίτερα επιδημιολογικά χαρακτηριστικά. Ο σχεδιασμός επιδημιολογικής μελέτης των ιών HPV στο νησί θα μπορούσε να διερευνήσει τις

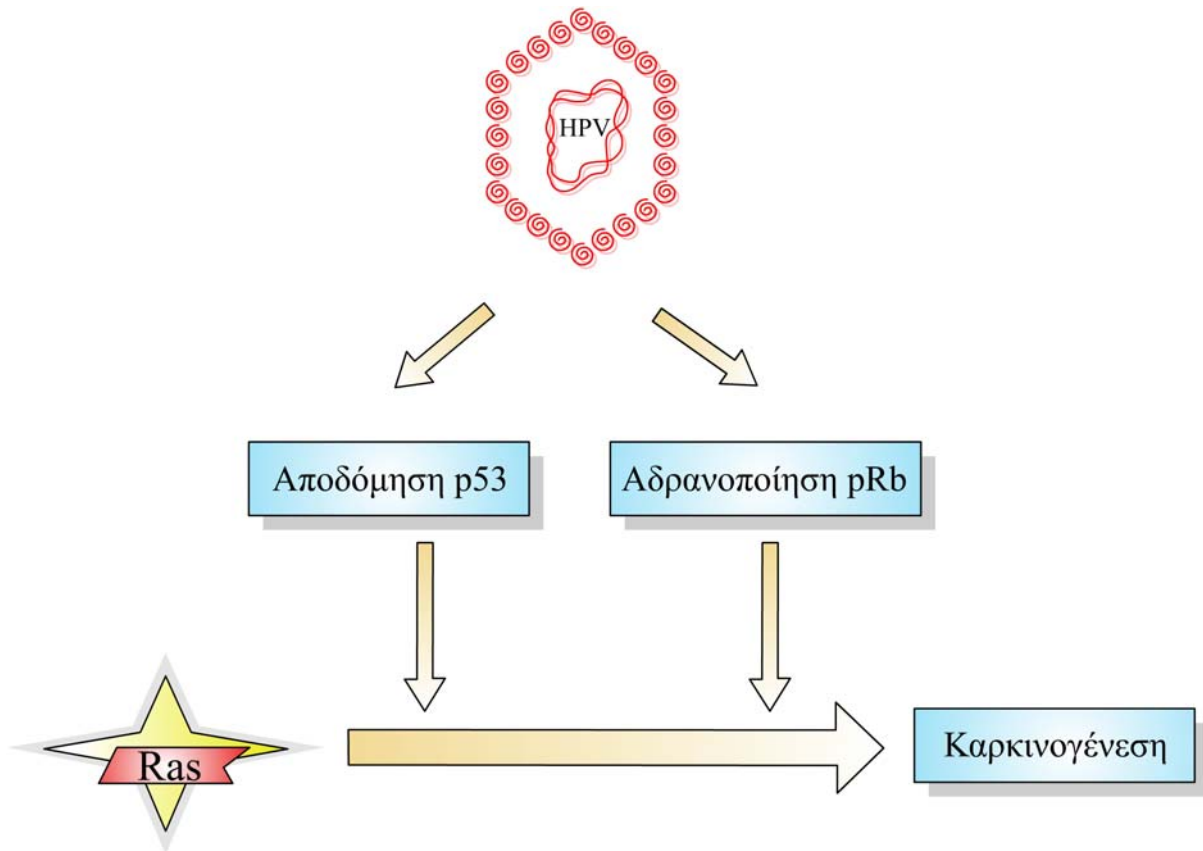
παρατηρήσεις αυτές σε μεγαλύτερο και αντιπροσωπευτικότερο δείγμα γυναικών της Κρήτης. Η γνώση της κατανομής των τύπων του ιού HPV είναι σημαντική τόσο για το σχεδιασμό στο μέλλον κατάλληλου προγράμματος HPV εμβολιασμού ειδικού για κάθε περιοχή, όσο και για τη μελέτη των ενδοτυπικών χαρακτηριστικών που καθιστούν έναν τύπο ιού HPV συχνό σε μια περιοχή. Για τον ιό HPV 18 έχουν περιγραφεί διάφοροι ενδότυποι, όπως ο Αφρικανικός και ο Ευρωπαϊκός, με τον Αφρικανικό να παρουσιάζει πιο επιθετική συμπεριφορά προκαλώντας επιμένουσες HPV λοιμώξεις και να σχετίζεται σε υψηλότερο ποσοστό με καρκίνο του τραχήλου της μήτρας σε σχέση με τον Ευρωπαϊκό ενδότυπο (Villa και συν, 2000, Hecht και συν, 1995).

#### **10.5. Συσχέτιση της παρουσίας του ιού HPV και της ενεργοποίησης των ογκογονιδίων *ras***

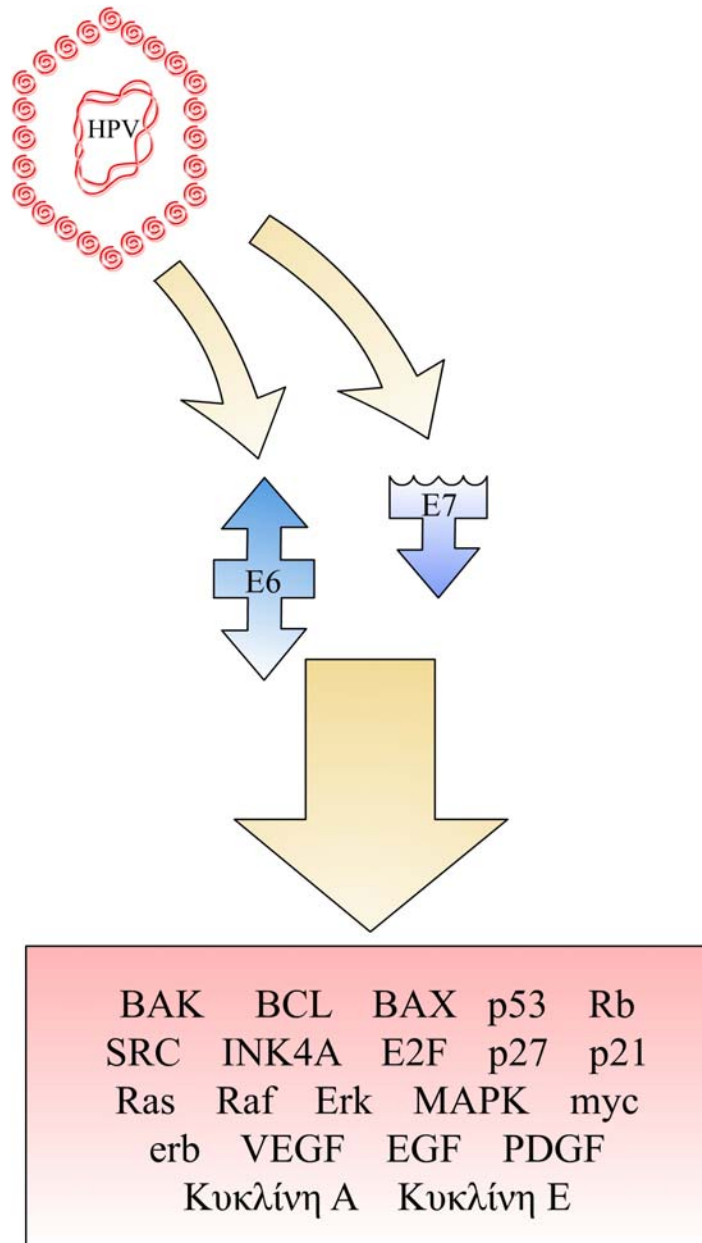
Η αλληλεπίδραση του ιού HPV με τα ογκογονίδια της οικογένειας *ras* του κυττάρου ξενιστή κατά το μετασχηματισμό των επιθηλιακών κυττάρων του τραχήλου της μήτρας έχει δείξει σε *in vitro* πειράματα από αρκετούς ερευνητές (Di Paolo και συν, 1989, Durst και συν, 1989). Μια σειρά από πειράματα σε κύτταρα ποντικού καθώς και σε ανθρώπινους ινοβλάστες επιβεβαιώνουν τη συνεργασία HPV και *ras* κατά τον κυτταρικό μετασχηματισμό (Matlashewski και συν, 1987, Matlashewski και συν, 1988). Η ενεργοποίηση των ογκογονιδίων *ras* επάγει την έκφραση των ιικών πρωτεϊνών E6 και E7 τόσο του ιού HPV 16 όσο και του HPV 18 (Gaiotti και συν, 2000, Medina-Martinez και συν, 1997). Οι Chen και συν έχουν δείξει πως η συνεργασία της πρωτεΐνης E6 του ιού HPV και του ογκογονιδίου H-*ras* είναι απαραίτητη για την εξουδετέρωση της πρωτεΐνης p53, η οποία αποτελεί τον κύριο στόχο του ιού HPV (Chen και Defendi, 1992). Στη μελέτη μας τα επίπεδα έκφρασης των ογκογονιδίων H-, K- και N-*ras* ήταν ιδιαίτερα αυξημένα σε γυναίκες με καρκίνο του τραχήλου της μήτρας θετικές για ιούς HPV υψηλού κινδύνου 16 και 18. Η μεταγραφική

ενεργοποίηση των ογκογονιδίων *ras* σε γυναίκες με ιούς υψηλού κινδύνου HPV ενδεχομένως συμβάλλει στην κακοήθη συμπεριφορά των ιών αυτών. Οι παρατηρήσεις μας απομένουν να διερευνηθούν περισσότερο και να διευκρινισθεί ο ρόλος της πρωτεΐνης Ras στην HPV-επαγόμενη καρκινογένεση (**Σχήμα 10.2**) και το κατά πόσο οι ιοί HPV υψηλού κινδύνου έχουν διαφορετική επίδραση στην έκφραση των κυτταρικών πρωτεϊνών σε σχέση με τους ιούς χαμηλού κινδύνου. Προηγούμενα ευρήματα των Giannoudis και συν έχουν δείξει πως η παρουσία ιών HPV χαμηλού, μέσου και υψηλού κινδύνου σχετίζεται με διαφορετικά επίπεδα έκφρασης πρωτεϊνών του κυττάρου του ξενιστή, όπως η CDKI p21 και η p53 (Giannoudis και Herrington, 2000).

**Σχήμα 10.2.** Μοντέλο αλληλεπίδρασης ιού HPV και πρωτεΐνης Ras κατά τη διαδικασία καρκινογένεσης.



**Σχήμα 10.3.** Ο ιός HPV και η σχέση του με τις πρωτεΐνες του κυττάρου ξενιστή.



Στο μέλλον απομένει να μελετηθεί η αλληλεπίδραση των ικών πρωτεϊνών E6 και E7 και με άλλες πρωτεΐνες του κυττάρου ξενιστή (**Σχήμα 10.3**) και να διευκρινισθεί ο ρόλος των αλληλεπιδράσεων αυτών στην HPV-επαγόμενη καρκινογένεση.

Ο ιός HPV 18 θεωρείται πιο ογκογόνος σε σχέση με τον ιό HPV 16 και έχει συσχετιστεί με ταχύτερη εξέλιξη της ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας σε καρκίνο (Riethdorf και συν, 2000). Η παρουσία του ιού HPV 18 σε ασθενείς με καρκίνο του τραχήλου της μήτρας



έχει συσχετιστεί με βαθύτερη διήθηση του στρώματος, με συχνότερη εμφάνιση λεμφαδενικών μεταστάσεων και με πτωχότερη κλινική πρόγνωση (Spandidos και συν, 1997). Σε ασθενείς με πρώιμο στάδιο καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, οι οποίες υποβλήθηκαν σε ριζική υστερεκτομή, υποτροπές παρουσιάστηκαν συχνότερα σε γυναίκες θετικές στον ιό HPV 18 (Im και συν, 2003). Επιπλέον ο ιός HPV 18 ανιχνεύεται συχνότερα σε επιθετικότερους ιστολογικούς τύπους, όπως το αδenoκαρκίνωμα, σε αντίθεση με τον ιό HPV 16 ο οποίος κυριαρχεί στο ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα (Huang και συν, 2004). Στη μελέτη μας διερευνήθηκε στατιστικά το κατα πόσο οι διαφορές αυτές μεταξύ των HPV 16 και 18 θα μπορούσαν να αποδοθούν στην έκφραση της Ras, ωστόσο ανάμεσα σε ασθενείς θετικές για τον ιό HPV 16 και σε ασθενείς θετικές για τον ιό HPV 18 δε βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην έκφραση των ογκογονιδίων *ras*.

Η παρουσία ταυτόχρονα πολλών τύπων ιού HPV σε καρκινικά δείγματα τραχήλου της μήτρας έχει δειχθεί από πολλούς ερευνητές σε ποικίλη συχνότητα (Huang και συν, 2004, Schellekens και συν, 2004, Cuschieri και συν, 2004). Η πολλαπλή HPV λοίμωξη έχει βρεθεί πιο συχνά σε γυναίκες με αδenoμαλπιγιακό καρκίνωμα από ό,τι σε γυναίκες με ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα (Schellekens και συν, 2004). Γυναίκες με πολλαπλή HPV λοίμωξη έχουν αυξημένο κίνδυνο για ανάπτυξη καρκίνου του τραχήλου της μήτρας σε σχέση με γυναίκες με μονήρη HPV λοίμωξη (Lee και συν, 2003), αν και άλλοι ερευνητές δεν έχουν επιβεβαιώσει τη σχέση αυτή (Cuschieri και συν, 2004, Bosch και Munoz, 2002). Επιπλέον, σε ασθενείς με καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, στις οποίες χορηγήθηκε ακτινοθεραπεία, η παρουσία πολλαπλής HPV λοίμωξης έχει συσχετιστεί με πτωχή πρόγνωση (Bachtiary και συν, 2002). Στη μελέτη μας, η πολλαπλή HPV λοίμωξη με τους ιούς HPV 16 και 18 ήταν η πιο συχνή πολλαπλή HPV λοίμωξη, γεγονός που είναι σύμφωνο με τα ευρήματα και άλλων ερευνητών (Huang και συν, 2004). Στην ομάδα των ασθενών με καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, η πολλαπλή HPV λοίμωξη συσχετίστηκε με αυξημένη έκφραση των ογκογονιδίων

H-, K- και N-*ras* γεγονός που υποδεικνύει τη πιθανή συμμετοχή των μονοπατιών των ογκογονιδίων *ras* στην συνεργιστική δράση των διαφορετικών ιών HPV και την εκδήλωση της επιθετικής τους συμπεριφοράς.

Στην ομάδα των ασθενών με ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία SIL, δε βρέθηκαν αλλαγές στην έκφραση των ογκογονιδίων *ras* ανάλογα με την παρουσία ή όχι ιών HPV υψηλού κινδύνου, ανάλογα με την παρουσία του ιού HPV 16 ή 18 καθώς και ανάλογα με την παρουσία πολλαπλής ή μονήρους HPV λοίμωξης. Η λοίμωξη αυτή καθ' εαυτή φαίνεται πως δεν είναι αρκετή για την αλληλεπίδραση του ιού HPV με τα ογκογονίδια *ras* του κυττάρου ξενιστή. Επιπρόσθετα γεγονότα, όπως η ενσωμάτωση του ιικού γονιδιώματος στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή θα μπορούσαν να προσφέρουν τις κατάλληλες προϋποθέσεις για την αλληλεπίδραση HPV και *ras*. Σε μη κακοήθεις αλλοιώσεις του τραχήλου της μήτρας, ο ιός HPV βρίσκεται στον πυρήνα του μολυσμένου κυττάρου σε επισωματική μορφή χωρίς να είναι ενσωματωμένος στο γονιδίωμα του κυττάρου (Wentzensen και συν, 2002).

Η ενσωμάτωση του ιικού γονιδιώματος αυξάνει τη σταθερότητα των mRNAs για τις ιικές πρωτεΐνες E6 και E7 γεγονός που οδηγεί σε αυξημένη έκφραση των πρωτεϊνών αυτών (Jeon και Lambert, 1995). Η αυξημένη έκφραση των πρωτεϊνών E6 και E7 επηρεάζει τα κυτταρικά μονοπάτια μετάδοσης μηνυμάτων και ιδιαίτερα τους κυτταρικούς μεταγραφικούς παράγοντες, γεγονός που επιδρά τόσο σε μεταγραφικό όσο και σε μεταφραστικό επίπεδο (Zur Hausen, 2000). Η ενσωμάτωση του ιικού γονιδιώματος μπορεί ακόμα να οδηγήσει απευθείας σε αλλαγές στα κυτταρικά γονίδια λόγω της ενσωμάτωσης του ιικού DNA σε χρωμοσωμιακές περιοχές που βρίσκονται τα γονίδια αυτά. Τέτοιες αλλαγές έχουν περιγραφεί για το ογκογονίδιο *myc* και και το γονίδιο APM-1 (Couturier και συν, 1991, Reuter και συν, 1998). Ωστόσο η απευθείας τροποποίηση των *ras* λόγω ενσωμάτωσης του ιικού DNA στις χρωμοσωμιακές περιοχές που βρίσκονται τα γονίδια αυτά δεν φαίνεται πιθανή και τούτο γιατί οι ιοί HPV ενσωματώνονται τυχαία, όπως φαίνεται στον **Πίνακα 10.3**, χωρίς να

παρουσιάζουν εκλεκτικότητα σε χρωμοσωμικούς τύπους που εδράζονται συγκεκριμένα ογκογονίδια (Wentzensen και συν, 2004).

**Πίνακας 10.3.** Περιοχές ενσωμάτωσης του ιού HPV στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή.

Όνομα περιοχής ενσωμάτωσης	Τύπος ιού HPV	Παθολογία δειγμάτων-κυτταρικών σειρών	Εντόπιση περιοχής ενσωμάτωσης	Γονίδιο-γονιδιακός τόπος συσχετιζόμενα με την περιοχή ενσωμάτωσης	Μέθοδος μελέτης περιοχής ενσωμάτωσης
int9	HPV 16	καρκίνος	1p36	WASF2	APOT
V18	HPV 16	καρκίνος	1p34	BMP8	PCR
CC192	HPV 16	καρκίνος	1q21	HS8015	PCR
int69	HPV 16	CIN3	1q32	HS205126	APOT
LU7	HPV 18	καρκίνος	1q32.2	CD34	PCR
T32	HPV 18	καρκίνος	1q42	HS285861	APOT/DIPS
int66	HPV 18	καρκίνος	1q43	CHS1	APOT
T19	HPV 16	καρκίνος	2q21	LRP1B	APOT/DIPS
int29	HPV 16	καρκίνος	2q24	NR4A2	APOT
int71	HPV 16	καρκίνος	2q32	GLS	APOT
T04	HPV 16	CIN3	2q34	HS25235	DIPS
M15	HPV 16	καρκίνος	2q34-35	MAP2	PCR
T14	HPV 16	καρκίνος	3p21	MAP4	APOT/DIPS
MC123	HPV 18	καρκίνος	3p14	FHIT	PCR
int68	HPV 16	CIN3	4q21	PTPN13	APOT
MC11	HPV 18	καρκίνος	5p15	HTERT	PCR
MC315	HPV 18	καρκίνος	5p13.2	SLC1A3	PCR
int46	HPV 16	καρκίνος	5q31	KLHL3	APOT
T18	HPV 16	καρκίνος	6p24	HS171942	APOT/DIPS
T21	HPV 16	καρκίνος	6p23	HS633327	APOT/DIPS
MC123	HPV 18	καρκίνος	6q26	KIAA1838	PCR
T25	HPV 16	καρκίνος	7p22	DGKB	DIPS
T6	HPV 18	καρκίνος	7q31	FOXP2	DIPS
int42	HPV 16	καρκίνος	8p23	HS162183	APOT
int16	HPV 18	καρκίνος	8p11.2	HS127775	DIPS, APOT
61	HPV 16	καρκίνος	8q21.3	RIPK2	PCR
T29	HPV 18	καρκίνος	8q24	FLJ10359	APOT/DIPS
MC31	HPV 18	καρκίνος	8q24	MYC	PCR
LU8	HPV 18	καρκίνος	8q24	MYC	PCR
HK10	HPV 18	καρκίνος	8q24	MYC	PCR
int25	HPV 18	καρκίνος	8q24	MYC	APOT
MC415	HPV 18	καρκίνος	8q24.2	MYC	PCR
T23	HPV 18	καρκίνος	9p22	NFIB	APOT/DIPS
HK13	HPV 18	καρκίνος	9q22	FANK	PCR
int78	HPV 16	καρκίνος	10q23	FER1L3	APOT
73	HPV 16	καρκίνος	11p15.5	MUC5B	PCR
int27	HPV 18	καρκίνος	12q21	ALU	APOT
61	HPV 16	καρκίνος	12q21.31	MYF5	PCR
327	HPV 16	καρκίνος	12q23.1	ELK3	PCR
int50	HPV 16	CIN3	13q14	KPNA3	APOT
int1	HPV 16	καρκίνος	14q24.1	HS57811	APOT
MC34	HPV 18	καρκίνος	14q24	RNGTT	PCR
int62	HPV 16	καρκίνος	15q15	HS195730	APOT
int61	HPV 16	καρκίνος	16q22	AFP	APOT
T15	HPV 16	καρκίνος	16q24	CDH13	APOT/DIPS
int33	HPV 16	καρκίνος	17q12	HS23106	APOT
AC8	HPV 18	καρκίνος	17q21	ERBB2	PCR
T26	HPV 18	καρκίνος	17q23	HS355936	APOT/DIPS
int13	HPV 18	καρκίνος	17q23	HS12677	APOT
HK11	HPV 18	καρκίνος	19p13	PRKACA	PCR
LU2	HPV 18	καρκίνος	19q13	CEACAM5	PCR
Int6	HPV 16	καρκίνος	20p11	HS97790	APOT
T27	HPV 16	καρκίνος	Xp22	HSX11910	APOT/DIPS

PCR: Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, APOT: Πολλαπλασιασμός μεταγράφων ογκογονιδίων του ιού του θηλώματος, DIPS: ανίχνευση ενσωματωμένων αλληλουχιών του ιού του θηλώματος, Τροποποιημένο από Wentzensen και συν, 2004.

Μελλοντικές μελέτες απαιτούνται για τη διερεύνηση του ρόλου της ενσωμάτωσης του ιικού DNA στη μεταγραφική ενεργοποίηση των ογκογονιδίων *ras*.

#### **10.6. Ανίχνευση του ιού HPV σε αδενοειδείς και αμυγδαλοειδείς εκβλαστήσεις σε παιδιά με καλοήγη υπερπλασία των αδενοειδών ή/και των αμυγδαλοειδών εκβλαστήσεων**

Η μελέτη του ιού HPV στην παιδική ηλικία τα τελευταία χρόνια έχει αποκτήσει μεγάλο ενδιαφέρον, τόσο λόγω της αναφερόμενης αύξησης της επίπτωσης των θηλωμάτων στα παιδιά την τελευταία δεκαετία, όσο και των νεότερων επιστημονικών δεδομένων, τα οποία υποστηρίζουν την κάθετη μετάδοση του ιού από τη μητέρα στο βρέφος. Ο ιός HPV ενοχοποιείται στα παιδιά για την εμφάνιση δερματικών και γεννητικών θηλωμάτων καθώς και την πρόκληση της θηλωμάτωσης του λάρυγγα, μιας κατάστασης δυνητικά απειλητικής ακόμα και για τη ζωή του παιδιού. Πρόσφατες μελέτες έχουν ανιχνεύσει τον ιό στη στοματική κοιλότητα ασυμπτωματικών παιδιών, γεγονός που αναδεικνύει νέα ερωτήματα σχετικά με τους πιθανούς τρόπους μετάδοσής του ιού στη στοματική κοιλότητα και τη σημασία του γεγονότος αυτού στη διατήρηση της λοίμωξης στην παιδική και ενήλικη ζωή (Koch και συν, 1997, Rice και συν, 2000, Kojima και συν, 2003, Rintala και συν, 2005, Cason και Mant, 2005, Herrero και συν, 2003, Chen και συν, 2005, Syrjanen, 2005). Οι μελέτες αυτές έχουν ανιχνεύσει τον ιό σε στοματικά ξέσματα ή εκπλύματα, ενώ δεν υπάρχουν επαρκή στοιχεία σχετικά με την παρουσία του ιού στην καλοήγη υπερπλασία των αδενοειδών και αμυγδαλοειδών εκβλαστήσεων στα παιδιά. Πρόσφατα, δείχθηκε σε ενήλικες ότι ο ιός HPV ανιχνεύεται λιγότερο συχνά στα αποφολιδούμενα κύτταρα σε σχέση με το βιοψιακό υλικό του στοματικού βλεννογόνου (Herrero και συν, 2003, Chen και συν, 2005).

Στην παρούσα μελέτη, στα πλαίσια της συνεργασίας του Εργαστηρίου Ιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης με το Παθολογοανατομικό Εργαστήριο του

Νοσοκομείου Παίδων 'Π.&Α. Κυριακού' στην Αθήνα, συλλέχθηκαν δείγματα σε παραφίνη ιστού αδενοειδών και αμυγδαλοειδών εκβλαστήσεων από παιδιά με καλοήγη υπερπλασία των αδενοειδών ή/και των αμυγδαλοειδών εκβλαστήσεων τους, τα οποία υποβλήθηκαν σε αδενεκτομή ή/και αμυγδαλεκτομή την περίοδο 1995-2000. Το DNA του ιού HPV ανιχνεύτηκε με τη χρήση της αντίδρασης PCR με γενικούς εκκινητές και η τυποποίηση του ιού πραγματοποιήθηκε με PCR με τη χρήση ειδικών εκκινητών. Οι αδενοειδείς και αμυγδαλοειδείς εκβλαστήσεις αποτελούν τμήμα του λεμφώδη δακτυλίου του φάρυγγα ή δακτυλίου Waldayer, ο οποίος βρίσκεται στην αρχή της αναπνευστικής και πεπτικής οδού συμβάλλοντας στην ανοσοποιητική άμυνα του ανθρώπινου οργανισμού. Οι αδενοειδείς εκβλαστήσεις καλύπτονται από μονόστιβο πλακώδες επιθήλιο, ενώ οι αμυγδαλοειδείς εκβλαστήσεις από πολύστιβο πλακώδες χωρίς κερατινοποίηση, το οποίο παρουσιάζει σχισμοειδείς εμβαθύνσεις με το σχηματισμό μικρών κοιλοτήτων, των αμυγδαλικών κρυπτών. Τόσο οι αδενοειδείς όσο και οι αμυγδαλοειδείς εκβλαστήσεις εκθέτονται σε μια σειρά από μικροβιακούς παράγοντες συμπεριλαμβανομένου του ιού Epstein-Barr, των αδενοϊών, των ιών του έρπητα, του αναπνευστικού συγκυτιακού ιού RSV, των ιών της Influenza A και B, του ιού της Parainfluenza καθώς και του ιού HPV (Syrjanen, 2005).

Με βάση πρόσφατη ανασκόπηση της βιβλιογραφίας, έως το έτος 2002, μόνο 200 μη καρκινικά δείγματα αδενοειδών ή αμυγδαλοειδών εκβλαστήσεων από ασθενείς με φυσιολογικό βλεννογόνο, με καλοήγη υπερπλασία των αδενοειδών ή των αμυγδαλοειδών εκβλαστήσεων, με χρόνια αμυγδαλίτιδα ή με θηλώματα έχουν αναλυθεί για την παρουσία του ιού HPV (Syrjanen, 2005). Ανάμεσα στους ασθενείς με χρόνια αμυγδαλίτιδα ή καλοήγη υπερπλασία, το ποσοστό ανίχνευσης του ιού HPV ανέρχεται στο 14% (Watanabe και συν, 1993, Fukushima και συν 1994, Srome και συν, 2002). Ωστόσο, άλλοι ερευνητές σε δείγματα με αμυγδαλίτιδα ή καλοήγη υπερπλασία των αδενοειδών δεν έχουν μπορέσει να ανιχνεύσουν τον ιό (Brandsma and Abramson, 1989, Snijders et al, 1992, Fukushima et al 1994,

Klussmann et al, 2001). Πρόσφατα, οι Chen και συν μελέτησαν δείγματα αμυγδαλοειδών εκβλαστήσεων από 212 ασθενείς με αμυγδαλίτιδα ή καλοήγη υπερπλασία των αμυγδαλοειδών εκβλαστήσεων και το ποσοστό ανίχνευσης του ιού HPV στο σύνολο των ασθενών της μελέτης ήταν 6,3%, ενώ στα παιδιά της μελέτης ήταν 8,2% (Chen και συν, 2005).

Στη μελέτη μας, ο ιός HPV ανιχνεύτηκε στο 9,4% των ασθενών με καλοήγη υπερπλασία των αμυγδαλοειδών εκβλαστήσεων και στο 7,1% των ασθενών με καλοήγη υπερπλασία των αδενοειδών εκβλαστήσεων. Ο ιός HPV ανιχνεύτηκε τόσο στα αγόρια όσο και στα κορίτσια και τα ποσοστά του στα δύο φύλα δε διέφεραν στατιστικά σημαντικά. Το γεγονός αυτό είναι σύμφωνο με προηγούμενες μελέτες στοματικών ξεσμάτων ή εκπλυμάτων στα παιδιά, οι οποίες έχουν δείξει πως ο ιός ανιχνεύεται με παρόμοια συχνότητα και στα δύο φύλα (Mund και συν, 1997, Rice και συν, 2000, Kojima και συν, 2003).

#### **10.7. Συσχέτιση της παρουσίας του ιού HPV σε αδενοειδείς και αμυγδαλοειδείς εκβλαστήσεις σε παιδιά με την ηλικία τους**

Η μέση ηλικία των παιδιών, στα οποία ανιχνεύτηκε ο ιός HPV στις αδενοειδείς ή στις αμυγδαλοειδείς τους εκβλαστήσεις ήταν στατιστικά σημαντικά μικρότερη (4,1 έτη) σε σχέση με τη μέση ηλικία των HPV-αρνητικών παιδιών (7,8 έτη). Το ποσοστό των HPV-θετικών παιδιών της προσχολικής ηλικίας ήταν 15,1% (8/53), ενώ το αντίστοιχο ποσοστό HPV-θετικών παιδιών σχολικής ηλικίας ήταν μόλις 1,9% (1/53). Το εύρημα αυτό συμφωνεί με τα αποτελέσματα άλλων ερευνητών, συμπεριλαμβανομένου και των αποτελεσμάτων που έχουν προκύψει με βάση ορολογικές μελέτες, τα οποία αναδεικνύουν την παρουσία του ιού HPV περισσότερο συχνά σε παιδιά μικρότερης ηλικίας (Mund και συν, 1997, Summergill και συν, 2001, Chen και συν, 2005). Πρόσφατα στη μελέτη των Chen και συν, ο ιός HPV ανιχνεύτηκε στο 11,5% των παιδιών προσχολικής ηλικίας με μέση ηλικία τα 4,6 έτη, ενώ το αντίστοιχο

ποσοστό στα παιδιά της σχολικής ηλικίας με μέση ηλικία τα 10,4 έτη ήταν 6,5% (Chen και συν, 2005). Ωστόσο, τα αποτελέσματα από άλλους ερευνητές δεν έχουν επιβεβαιώσει τη συσχέτιση της παρουσίας του ιού στη στοματική κοιλότητα με την ηλικία, γεγονός που απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση (Rice και συν, 2000, Kojima και συν, 2003). Επιπλέον, αντικείμενο μελλοντικής προοπτικής μελέτης θα μπορούσε να αποτελέσει η αξιολόγηση του πιθανού ρόλου της παρουσίας του ιού HPV στην εκδήλωση σε μικρότερη ηλικία καλοήθους υπερπλασίας των αδενοειδών ή των αμυγδαλοειδών εκβλαστήσεων στα παιδιά.

#### **10.8. Τυποποίηση του ιού HPV σε αδενοειδείς και αμυγδαλοειδείς εκβλαστήσεις σε παιδιά**

Η τυποποίηση του ιού στα δείγματα της μελέτης ανέδειξε την κυριαρχία του ιού HPV 16 στις αδενοειδείς και αμυγδαλοειδείς εκβλαστήσεις σε ποσοστό 66,7% των HPV-θετικών δειγμάτων. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με τα ευρήματα και άλλων ερευνητών (Watanabe και συν, 1993, Fuushira και συν, 1994, Strome και συν, 2002, Chen και συν, 2005). Η κυριαρχία του ιού HPV 16 στη στοματική κοιλότητα στην παιδική ηλικία έχει επιβεβαιωθεί και στις μελέτες, στις οποίες αναλύθηκαν στοματικά ξέσματα ή εκπλύματα (Rice και συν, 2000, Kojima και συν, 2003). Η λοίμωξη με τον ιό HPV 16 στη στοματική κοιλότητα σε ενήλικες έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο τόσο ανάπτυξης καρκίνου του τραχήλου της μήτρας στις γυναίκες όσο και ανάπτυξης καρκίνου στις αμυγδαλοειδείς εκβλαστήσεις (Schwartz και συν, 1998, Syrjanen, 2005).

Ο ιός HPV 11 ανιχνεύτηκε λιγότερο συχνά, ενώ κανένα δείγμα δεν ήταν θετικό για τους τύπους HPV 18 και 33, οι οποίοι εξετάστηκαν. Ο ιός HPV 11 αποτελεί έναν από τους πιο συχνά ανιχνευόμενους τύπους HPV ιού στα θηλώματα της γεννητικής περιοχής στα παιδιά (Armstrong και συν, 1997). Επιπλέον, θεωρείται ένας από τους κύριους τύπους ιού που προκαλούν θηλωμάτωση του λάρυγγα στην παιδική ηλικία (Hartley και συν, 1994,

Rimell και συν, 1997). Έχει δειχθεί πως ασθενείς με θηλωμάτωση του λάρυγγα θετικοί στον ιό HPV 11 αναπτύσσουν πιο επιθετική νοσο και απαιτούν πιο συχνή χειρουργική αντιμετώπιση (Hartley και συν, 1994, Rimell και συν, 1997, Rabah και συν, 2001, Wiatrak και συν, 2004).

Στη μελέτη μας, δεν βρέθηκαν δείγματα θετικά ταυτόχρονα σε περισσότερους του ενός τύπους ιού HPV, γεγονός που υποδεικνύει την απουσία πολλαπλής HPV λοίμωξης στη στοματική κοιλότητα στα παιδιά. Η πολλαπλή τραχηλική HPV λοίμωξη, η οποία στον τράχηλο των HPV θετικών γυναικών αποτελεί συχνό εύρημα, έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, όπως αναλύθηκε προηγουμένως στην Παράγραφο 10.5. Επίσης έχει δειχθεί σε ενήλικες πως η ανίχνευση πολλαπλής HPV λοίμωξης στη στοματική κοιλότητα συσχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου στις αμυγδαλοειδείς εκβλαστήσεις (Syrtjanen, 2005). Περαιτέρω έρευνα απαιτείται για την κατανόηση και τη σημασία της μονήρους HPV λοίμωξης στη στοματική κοιλότητα ασυμπτωματικών παιδιών.

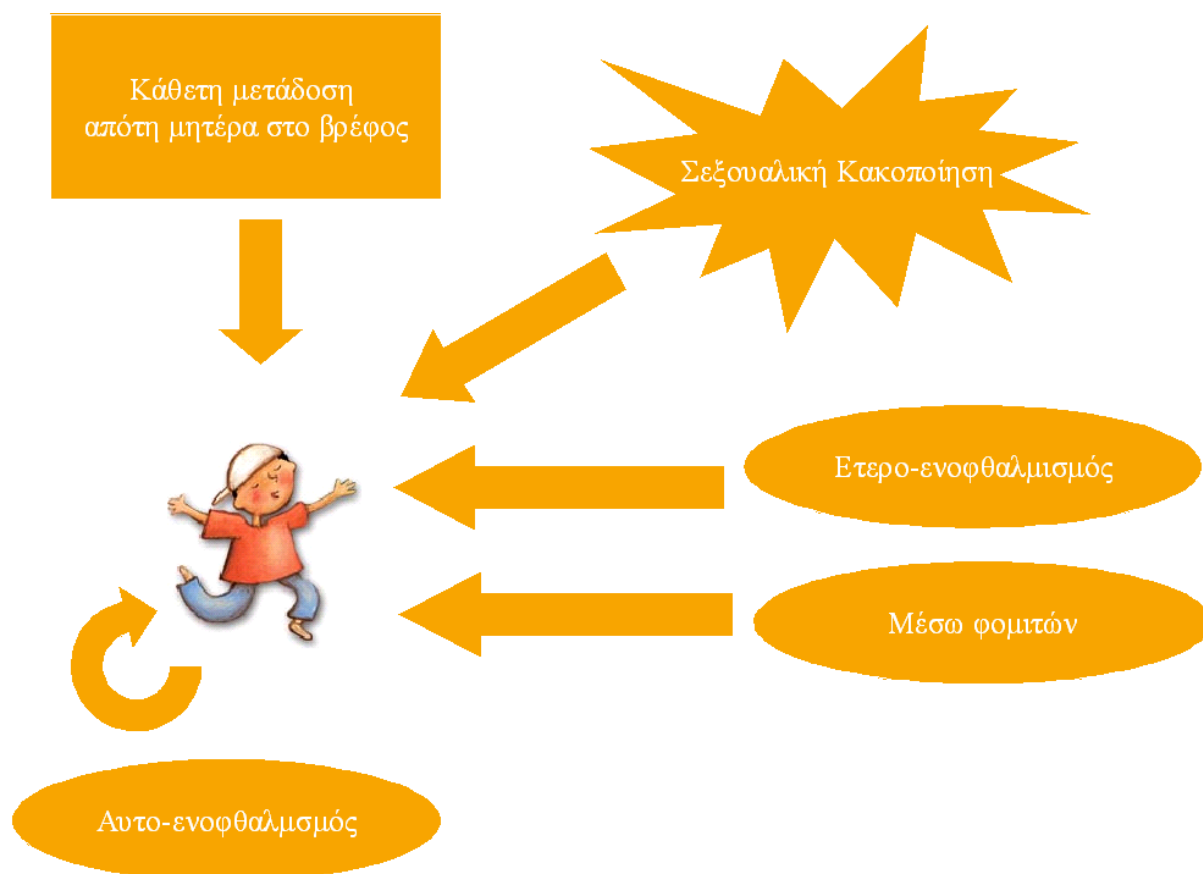
#### **10.9. Συζήτηση των πιθανών τρόπων μετάδοσης του ιού HPV στη στοματική κοιλότητα στα παιδιά**

Στους τρόπους μετάδοσης του ιού HPV περιλαμβάνονται η σεξουαλική κακοποίηση, ο ετερο-ενοφθαλμισμός, ο αυτο-ενοφθαλμισμός και η μετάδοση του ιού μεσω φοιτών από μολυσμένες επιφάνειες ή αντικείμενα (**Σχήμα 10.4**). Επίσης τα τελευταία χρόνια, νεότερα δεδομένα υποστηρίζουν την κάθετη μετάδοση του ιού από τη μητέρα στο βρέφος, γεγονός το οποίο πρέπει να λαμβάνεται σοβαρά υπόψη κατά τη διαχείριση ενός παιδιού με HPV-συσχετιζόμενη αλλοίωση. Παρά το γεγονός πως η σεξουαλική κακοποίηση αποτελεί μια πιθανότητα, η οποία απαιτεί λεπτομερή διερεύνηση και σε αρκετές περιπτώσεις παραπομπή του περιστατικού σε ειδικό ειδικευμένο παιδίατρο ή ιατροδικαστή, οι μη



σεξουαλικά σχετιζόμενοι τρόποι μετάδοσης του ιού στη στοματική κοιλότητα των παιδιών φαίνεται πως είναι πολύ πιο πιθανοί (Syrjanen και Puranen, 2000). Στη μελέτη μας, τόσο στα HPV-θετικά παιδιά όσο και σε εκείνα στα οποία δεν ανιχνεύτηκε ο ιός στις αδενοειδείς ή στις αμυγδαλοειδείς τους εκβλαστήσεις δεν υπήρχε καμία ένδειξη σεξουαλικής κακοποίησης. Το γεγονός αυτό έχει ιδιαίτερη σημασία δεδομένου πως με βάση τα αποτελέσματά μας η παρουσία του ιού στις αδενοειδείς και στις αμυγδαλοειδείς εκβλαστήσεις των παιδιών δε σχετίζεται με σεξουαλική κακοποίηση.

**Σχήμα 10.4.** Τρόποι μετάδοσης του ιού HPV στην παιδική ηλικία.



Η μετάδοση του ιού από τη μητέρα στη στοματική κοιλότητα του βρέφους έχει προταθεί από αρκετούς ερευνητές (Fredericks και συν, 1993, Cason και συν, 1995, Armstrong και συν, 1997, Catterjee και συν, 1998, Myhre και συν, 2003). Πρόσφατα οι

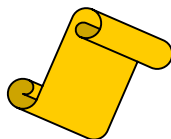
Rintala και συν, οι οποίοι εξέτασαν στοματικά ξέσματα από 324 παιδιά στα πρώτα 3 χρόνια της ζωής τους, έδειξαν πως η HPV λοίμωξη ανιχνεύεται λιγότερο συχνά καθώς η ηλικία αυξάνει (Rintala και συν, 2005). Οι Mant και συν, εξέτασαν κατα πόσο η λοίμωξη της στοματικής κοιλότητας με τον ιό HPV 16 σε παιδιά 4-8 ετών είναι παροδική ή επιμένουσα εξετάζοντας ξέσματα από τη στοματική κοιλότητα των παιδιών 30 μήνες μετά την αρχική εκτίμησή τους (Mant και συν, 2003). Κατά την επανεξέτασή τους, σε 40% HPV 16 θετικών παιδιών δεν ανιχνεύτηκε ο ιός, ενώ το 63% των παιδιών που κατά την αρχική εκτίμηση ήταν αρνητικό στον ιό είχε θετικοποιηθεί, με πιο πιθανό τρόπο μετάδοσης του ιού με ετερο-ενοφθαλμισμό. Η εξέλιξη της λοίμωξης στη στοματική κοιλότητα στα παιδιά και η σημασία της στη μετάδοση του ιού σε άλλες ανατομικές θέσεις απομένει να διευκρινισθεί στο μέλλον.

#### **10.10. Συμπεράσματα**

Η παρούσα μελέτη αναδεικνύει το ρόλο της μεταγραφικής ενεργοποίησης των ογκογονιδίων *H-ras* and *N-ras* στην καρκινογένεση του τραχήλου της μήτρας. Οι συσχετίσεις που βρέθηκαν μεταξύ της ενεργοποίησης των ογκογονιδίων *ras* και της παρουσίας του ιού HPV προτείνουν την πιθανή αλληλεπίδραση HPV και *ras* για την κακοήθη εξαλλαγή των κυττάρων του ξενιστή. Η κατανόηση του ρόλου των ογκογονιδίων *ras* στην εξέλιξη της HPV λοίμωξης αναμένεται να συμπληρώσει τις γνώσεις μας σχετικά με την ογκογόνο δράση του ιού στον τράχηλο της μήτρας αλλά και σε άλλες ανατομικές θέσεις τόσο στους ενήλικες, όσο και στα παιδιά και να συμβάλει στην ανεύρεση νέων διαγνωστικών και θεραπευτικών προσεγγίσεων. Η ανίχνευση του ιού HPV στις αμυγδαλοειδείς και στις αδenoειδείς εκβλαστήσεις αναδεικνύει το ρόλο του ιού στην παιδική ηλικία και δημιουργεί νέα ερωτήματα σχετικά με τους τρόπους μετάδοσής του. Η μέση ηλικία των HPV-θετικών παιδιών ήταν μικρότερη σε σχέση με τη μέση ηλικία των παιδιών, στα οποία δεν ανιχνεύτηκε ο ιός. Ο ιός HPV 16 ανιχνεύτηκε πιο συχνά , ενώ σε μικρότερη συχνότητα βρέθηκε ο ιός

HPV 11. Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές με βάση το φύλο, την καταγωγή, τον τόπο διαμονής των παιδιών και την ιστολογία των δειγμάτων που μελετήθηκαν. Οι επιπτώσεις της παρουσίας του ιού HPV, παρά το γεγονός της χαμηλής της συχνότητας, στις αμυγδαλοειδείς και αδενοειδείς εκβλαστήσεις απομένουν να διευκρινισθούν. Περαιτέρω έρευνα όσον αφορά τη HPV λοίμωξη στα παιδιά θα μας βοηθήσει στο να κατανοήσουμε τη φυσική ιστορία του ιού και τους τρόπους μετάδοσής του στην παιδική ηλικία και την ενήλικη ζωή.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ-ΑΝΑΦΟΡΕΣ



1. Adams JA. Evolution of classification scale: Medical evaluation of suspected child sexual abuse. *Child Maltreatment*. 2001;6:31-5.
2. Adams M, Borysiewicz L, Fiander A, Man S, Jasani B, Navabi H, Lipetz C, Evans AS, Mason M. Clinical studies of human papilloma vaccines in pre-invasive and invasive cancer. *Vaccine*. 2001;19:2549-56. Review.
3. Aggelopoulou EP, Sklarlos Papadimitriou C, Kittas C, Troungos C. Human papilloma virus DNA detection in oral lesions in the Greek population. *Anticancer Res*. 1999;19:1391-5.
4. Agnantis NJ, Spandidos DA, Mahera H, Parissi P, Kakkanas A, Pintzas A, Papacharalampous NX. Immunohistochemical study of ras oncogene expression in endometrial and cervical human lesions. *Eur J Gynaecol Oncol*. 1988;9:360-5.
5. Agorastos T, Bontis J, Lambropoulos A, Constantinidis T, Nasioutziki M, Tagou C, Katsouyiannopoulos V. *Eur J Cancer Prev*. 1995;4:159-67.
6. Allen AL, Siegfried EC. The natural history of condyloma in children. *J Am Acad Dermatol*. 1998; 39:951-5.
7. Alonio LV, Picconi MA, Dalbert D, Mural J, Bartt O, Bazan G, Dominguez M, Teyssie AR. Ha-ras oncogene mutation associated to progression of papillomavirus induced lesions of uterine cervix. *J Clin Virol*. 2003;27:263-9.
8. Andersen B, Hariri A, Pittelkow MR, Rosenfeld MG. Characterization of Skn-1a/i POU domain factors and linkage to papillomavirus gene expression. *J Biol Chem*. 1997;272:15905-13.
9. Aoyama C, Peters J, Senadheera S, Liu P, Shimada H. Uterine cervical dysplasia and cancer: identification of c-myc status by quantitative polymerase chain reaction. *Diagn Mol Pathol*. 1998;7:324-30.
10. Apple RJ, Erlich HA, Klitz W, Manos MM, Becker TM, Wheeler CM. HLA DR-DQ associations with cervical carcinoma show papillomavirus-type specificity. *Nat Genet*. 1994;6:157-62.
11. Arends MJ, Donaldson YK, Duvall E, Wyllie AH, Bird CC. HPV in full thickness cervical biopsies: high prevalence in CIN 2 and CIN 3 detected by a sensitive PCR method. *J Pathol*. 1991;165:301-9.

12. Arends MJ, Wyllie AH, Bird CC. Papillomaviruses and human cancer. *Hum Pathol.* 1990;21:686-98.
13. Asamoto M, Ochiya T, Toriyama-Baba H, Ota T, Sekiya T, Terada M, Tsuda H. Transgenic rats carrying human *c-Ha-ras* proto-oncogenes are highly susceptible to *N-methyl-N-nitrosourea* mammary carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 2000;21(2):243-9.
14. Armstrong DK, Handley JM. Anogenital warts in prepubertal children: pathogenesis, HPV typing and management. *Int J STD AIDS.* 1997;8:78-81.
15. Astori G, Arzese A, Pipan C, de Villiers EM, Botta GA. Characterization of a putative new HPV genomic sequence from a cervical lesion using *L1* consensus primers and restriction fragment length polymorphism. *Virus Res.* 1997;50:57-63.
16. Bacelieri R, Jonson SM. Cutaneous warts: an evidence-based approach to therapy. *Am Fam Phys.* 2005;72:647-52.
17. Bachtiry B, Obermair A, Dreier B, Birner P, Breitenecker G, Knocke TH, Selzer E, Potter R. Impact of multiple HPV infection on response to treatment and survival in patients receiving radical radiotherapy for cervical cancer. *Int J Cancer.* 2002;102:237-43.
18. Baker GE, Tyring SK. Therapeutic approaches to papillomavirus infections. *Dermatol Clin.* 1997;15(2):331-40. Review.
19. Bar-Sagi D. A Ras by any other name. *Mol Cell Biol.* 2001;21:1441-3. Review.
20. Bauknecht T, Jundt F, Herr I, Oehler T, Delius H, Shi Y, Angel P, 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.* 1995;69:1-12.
21. Bauknecht T, Angel P, Royer HD, zur Hausen H. Identification of a negative regulatory domain in the human papillomavirus type 18 promoter: interaction with the transcriptional repressor YY1. *EMBO J.* 1992;11:4607-17.
22. Benedet JL, Odicino F, Maisonneuve P, Beller U, Creasman WT, Heintz AP, Ngan HY, Pecorelli S. Carcinoma of the cervix uteri. *Int J Gynaecol Obstet.* 2003;83:41-78
23. Benton C, Shahidullah H, Hunter JAA. Human papillomavirus in the immunosuppressed. *Papillomavirus Report.* 1992;3:23-6.
24. Berumen J, Ordonez RM, Lazcano E, Salmeron J, Galvan SC, Estrada RA, Yunes E, Garcia-Carranca A,

- Gonzalez-Lira G, Madrigal-de la Campa A. Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study. *J Natl Cancer Inst.* 2001;93:1325-30.
25. Beskow AH, Josefsson AM, Gyllensten UB. HLA class II alleles associated with infection by HPV16 in cervical cancer in situ. *Int J Cancer.* 2001;93:817-22.
26. Biron CA. Initial and innate responses to viral infectious-pattern setting in immunity or disease. *Curr Opin Microbiol.* 1999;2:719-27.
27. Black RJ, Bray F, Ferlay J, Parkin DM. Cancer incidence and mortality in the European Union: cancer registry data and estimates of national incidence for 1990. *Eur J Cancer.* 1997;33:1075-107.
28. Boguski, MS, McCormick F. Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature.* 1993;366:643-54.
29. Bolck DR, HellmanDJ. Laboratory implementation and efficacy assessment of the ThinPrep cervical cancer screening system. *Acta Cytol.* 1998;42:209-13.
30. Bontkes HJ, Walboomers JM, Meijer CJ, Helmerhorst TJ, Stern PL. Specific HLA class I down-regulation is an early event in cervical dysplasia associated with clinical progression. *Lancet.* 1998;351:187-8.
31. Bosch FX, Munoz N. The viral etiology of cervical cancer. *Virus Research.* 2002;89:183-90.
32. Bosch FX, Manos M, Munoz N, Sherman M, Jansen A, Pet J, Schiffman N, Moreno V, Shah KV and the IBSCC Study Group. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *J Natl Cancer Inst.* 1996;87:796-802.
33. Boshart M, Gissmann L, Ikenberg H, Kleinheinz A, Scheurlen W, zur Hausen H. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J.* 1984;3:1151-57.
34. Brader KR, Morris M, Levenback C, Levy L, Lucas KR, Gershenson DM. Chemotherapy for cervical carcinoma: factors determining response and implications for clinical trial design. *J Clin Oncol.* 1998;16:1879-84.
35. Brady CS, Duggan-Keen MF, Davidson JA, Varley JM, Stern PL. Human papillomavirus type 16 E6 variants in cervical carcinoma: relationship to host genetic factors and clinical parameters. *J Gen Virol.* 1999;80:3233-40.
36. Brandsma JL, Abramson AL. Association of papillomavirus with cancers of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1989;115:621-25.
37. Breitburd F, Kirnbauer R, Hubbert NL, Nonnenmacher B, Trin-Dinh-Desmarquet C, Orth G, Schiller JT, Lowy DR. Immunization with viruslike particles from cottontail rabbit papillomavirus (CRPV) can protect against

- experimental CRPV infection. J Virol. 1995;69:3959-63.*
38. Brescia RJ, Jenson AB, Lancaster WD, Kurman RJ. The role of human papillomaviruses in the pathogenesis and histologic classification of precancerous lesions of the cervix. *Human Pathol* 1986;17:552-59.
39. Brooksbank C. RAS, the magician. *Nature Rev Cancer. 2002;2:249.*
40. Buntinx F, Brouwers M. Relation between sampling device and detection of abnormality in cervical smears: a meta-analysis of randomised and quasi-randomised studies. *BMJ. 1996;313:1285-90.*
41. Cason J, Kaye JN, Jewers RJ, Kambo PK, Bible JM, Kell B, Shergill B, Pakarian F, Raju KS, Best JM. Perinatal infection and persistence of human papillomavirus types 16 and 18 in infants. *J Med Virol. 1995;47:209-18.*
42. Cason J, Mant C. High-risk mucosal human papillomavirus infections during infancy & childhood. *J Clin Virology. 2005;32S:S52-S58. Review.*
43. Chabot I, Goetghebeur MM, Gregoire JP. The societal value of universal childhood vaccination. *Vaccine. 2004;22:1992-2005.*
44. Chan PK, Lam CW, Cheung TH, Li WW, Lo KW, Chan MY, Cheung JL, Cheng AF. Association of human papillomavirus type 58 variant with the risk of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst. 2002;94:1249-53.*
45. Chatterjee R, Mukhopadhyay D, Murmu N, Mitra PK. Correlation between human papillomavirus DNA detection in maternal cervical smears and buccal swabs of infants. *Indian J Exp Biol. 1998;36:199-202.*
46. Chen R, Sehr P, Waterboer T, Leivo I, Pawlita M, Vaheri A, Aaltonen LM. Presence of DNA of human papillomavirus 16 but no other types in tumor-free tonsillar tissue. *J Clin Microbiol* 2005;43:1408-10.
47. Chen TM, Defendi V. Functional interaction of p53 with HPV18 E6, c-myc and H-ras in 3T3 cells. *Oncogene. 1992;7(8):1541-7.*
48. Cheng Q, Lau WM, Chew SH, Ho TH, Tay SK, Hui KM. Identification of molecular markers for the early detection of human squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Br J Cancer. 2002;86:274-81.*
49. Chow LT, Broker TR. Papillomavirus DNA replication. *Intervirology. 1994;37:150-54.*
50. Chong H, Vikis HG, Guan KL. Mechanisms of regulating the Raf kinase family. *Cell Signal* 2003;15:463-69.
51. Chung TK, Ip TY, Hampton GM, Wang VW, Cheung TH, Wong YF. Microsatellite instability in cervical carcinoma. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2001;94:121-4.*
52. Ciuffo G. Innesto positive con filtrado di verrucae volgare. *G Ital Mal Venereol. 1907;48:12.*
53. Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Munoz N, Franceschi S. Human papillomavirus types in invasive cervical

- cancer worldwide: a meta-analysis. Br J Cancer. 2003;88:63-73.*
54. Cohen Y, Xing M, Mambo E, Guo Z, Wu G, Trink B, Beller U, Westra W, Ladenson P, Sidransky D. *BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma. J Nat Cancer Inst. 2003;95:625-27.*
55. Couturier J, Sastre-Garau X, Schneider-Maunoury S, Labib A, Orth G. *Integration of papillomavirus DNA near myc genes in genital carcinomas and its consequences for proto-oncogene expression. J Virol. 1991;65:4534-8.*
56. Cox JT. *HPV testing: Is it useful in triage of minor Pap abnormalities. J Fam Pract. 1998;46:121-24.*
57. Cox JT. *Clinical Role of HPV testing. Obstet Gynecol Clin N Amer. 1996;23:811-51.*
58. Crawford LV, Crawford EM. *Virology. 1963;21:258-63.*
59. Critchlow CW, Surawicz CM, Holmes KK, Kuypers J, Daling JR, Hawes SE, Goldbaum GM, Sayer J, Hurt C, Dunphy C, et al. *Prospective study of high grade anal squamous intraepithelial neoplasia in a cohort of homosexual men: influence of HIV infection, immunosuppression and human papillomavirus infection. AIDS. 1995;9:1255-62.*
60. Cuschieri KS, Cubie HA, Whitley MW, Seagar AL, Arends MJ, Moore C, Gilkisson G, McGoogan E. *Multiple high risk HPV infections are common in cervical neoplasia and young women in a cervical screening population. J Clin Pathol. 2004;57:68-72.*
61. Cuzick J, Terry G, Ho L, Monaghan J, Lopes A, Clarkson P, Duncan I. *Association between high-risk HPV types, HLA DRB1\* and DQB1\* alleles and cervical cancer in British women. Br J Cancer. 2000;82:1348-52.*
62. Daly SF, Doyle M, English J, Turner M, Clinch J, Prendiville W. *Can the number of cigarettes smoked predict high-grade cervical intraepithelial neoplasia among women with mildly abnormal cervical smears? Am J Obstet Gynecol. 1998;179:399-402.*
63. Dargent D, Martin X, Sacchetoni A, Mathevet P. *Laparoscopic vaginal radical trachelectomy: a treatment to preserve the fertility of cervical carcinoma patients. Cancer. 2000;88:1877-82.*
64. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA. *Mutations of the BRAF gene in human cancer. Nature. 2002;417:949-*



- 54.
65. Deacon JM, Evans CD, Yule R, Desai M, Binns W, Taylor C, Peto J. Sexual behaviour and smoking as determinants of cervical HPV infection and of CIN3 among those infected: a case-control study nested within the Manchester cohort. *Br J Cancer*. 2000;83:1565-72.
66. DiPaolo JA, Woodworth CD, Popescu NC, Notario V, Doniger J. Induction of human cervical squamous cell carcinoma by sequential transfection with human papillomavirus 16 DNA and viral Harvey ras. *Oncogene*. 1989;4:395-9.
67. Dokianakis DN, Papaefthimiou M, Tsiveleka A, Spandidos DA. High prevalence of HPV18 in correlation with ras gene mutations and clinicopathological parameters in cervical cancer studied from stained cytological smears. *Oncol Rep*. 1999;6:1327-31.
68. Dokianakis DN, Sourvinos G, Sakkas S, Athanasiadou E, Spandidos DA. Detection of HPV and ras gene mutations in cervical smears from female genital lesions. *Oncol Rep*. 1998;5:1195-8.
69. Dokianakis DN, Papaefthimiou M, Tsiveleka A, Spandidos DA. High prevalence of HPV18 in correlation with ras gene mutations and clinicopathological parameters in cervical cancer studied from stained cytological smears. *Oncol Rep*. 1999 Nov-Dec;6:1327-31.
70. Dubowitz H, Black M, Harrington D. The diagnosis of child sexual abuse. *Am J Dis Child*. 1992;146:688-93.
71. Duggan MA, McGregor SE, Stuart GC, Morris S, Chang-Poon V, Schepansky A, Honore L. The natural history of CIN I lesions. *Eur J Gynaecol Oncol*. 1998;19:338-44.
72. Durst M, Gissmann L, Ikenberg H, 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*. 1983;80:3812-5.
73. Durst M, Kleinheinz A, Hotz M, Gissmann L. The physical state of human papillomavirus type 16 DNA in benign and malignant genital tumors. *J Gen Virol*. 1985;66:1515-22.
74. Durst M, Gallahan D, Jay G, Rhim JS. Glucocorticoid-enhanced neoplastic transformation of human keratinocytes by human papillomavirus type 16 and an activated ras oncogene. *Virology*. 1989;173:767-71.
75. Dyson N, Howley PM, Munger K, Harlow E. The human papillomavirus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science*. 1989;243:934-37.
76. Elnifro E, Ashshi A, Cooper R, Klapper P. Multiplex PCR: Optimazation and application in diagnostic virology.

- Clin Microbiol Rev.* 2000;13:559-70.
77. Evander M, Frazer IH, Payne E, Qi YM, Hengst K, McMillan NA. Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J Virol.* 1997;71:2449-56.
  78. Falcinelli C, Luzi P, Alberti P, Cosmi EV, Anceschi MM. Human papilloma virus infection and Ki-ras oncogene in paraffin-embedded squamous carcinomas of the cervix. *Gynecol Obstet Invest.* 1993;36:185-8.
  79. Fenton J. Prognostic significance of age in cervix uteri carcinoma. 11<sup>th</sup> Annual Meeting of ESTRO, Malmo Sweden, 1992.
  80. Ferenczy A, Jenson B. Tissue effects and host response. The key to the rational triage of cervical neoplasia. *Obstet Gynecol Clin N Amer.* 1996;23:759-82.
  81. Ferenczy A, Franco E. Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *Lancet Oncol.* 2002;3:11-6. Review.
  82. Ferguson AW, Svoboda-Newman SM, Frank TS. Analysis of human papillomavirus infection and molecular alterations in adenocarcinoma of the cervix. *Mod Pathol.* 1998;11:11-8.
  83. Finzer P, Aguilar-Lemarroy A, Rosl F. The role of human papillomavirus oncoproteins E6 and E7 in apoptosis. *Cancer Letters.* 2002;188:15-24. Review.
  84. Francois G, Duclos P, Margolis H, Lavanchy D, Siegrist C-A, Meheus A, Lambert P-H, Emiroglu N, Barud S, Damme P. *Pediatr Infect Dis J.* 2005;24:953-61.
  85. Frazer IH. Immunology of papillomavirus infection. *Curr Opin Immunol.* 1996;8:484-91. Review.
  86. Frazer IH, Thomas R, Zhou J, Leggatt GR, Dunn L, McMillan N, Tindle RW, Filgueira L, Manders P, Barnard P, Sharkey M. Potential strategies utilised by papillomavirus to evade host immunity. *Immunol Rev.* 1999;168:131-42. Review.
  87. Frazier L. Genital warts in children. *Am Profess Soc Abus Child Adv.* 1998;11:9-12.
  88. Fredericks BD, Balkin A, Daniel HW, Schonrock J, Ward B, Frazer IH. Transmission of human papillomaviruses from mother to child. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 1993;33:30-2.
  89. Friis S, Kjaer SK, Frisch M, Mellemkjaer L, Olsen JH. Cervical intraepithelial neoplasia, anogenital cancer, and other cancer types in women after hospitalization for condylomata acuminata. *J Infect Dis.* 1997;175:743-8.
  90. Fukushima K, Ogura H, Watanabe S, Yabe Y, Masuda Y. Human papillomavirus type 16 DNA detected by the polymerase chain reaction in non-cancer tissues of the head and neck. *Eur Arch Otorhinolaryngol.*

- 1994;251:109-12.
91. Funk JO, Waga S, Harry JB, Espling E, Stillman B, Galloway DA. Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes Dev.* 1997;11:2090-100.
92. Gaiotti D, Chung J, Iglesias M, Nees M, Baker PD, Evans CH, Woodworth CD. Tumor necrosis factor- $\alpha$  promotes human papillomavirus (HPV) E6/E7 RNA expression and cyclin-dependent kinase activity in HPV-immortalized keratinocytes by a ras-dependent pathway. *Mol Carcinog.* 2000;27:97-109.
93. Gardeil F, Barry-Walsh C, Prendiville W, Clinch J, Turner MJ. Persistent intraepithelial neoplasia after excision for cervical intraepithelial neoplasia grade III. *Obstet Gynecol.* 1997;89:419-22.
94. Garzetti GG, Ciavattini A, Goteri G, De Nictolis M, Menso S, Muzzioli M, Fabris N. HPV DNA positivity and natural killer cell activity in the clinical outcome of mild cervical dysplasia: integration between virus and immune system. *Gynecol Obstet Invest.* 1995;39:130-5.
95. Garzetti GG, Ciavattini A, Lucarini G, Goteri G, Nictolis MD, Romanini C, Biagini G. Ras p21 immunostaining in early stage squamous cervical carcinoma: relationship with lymph nodal involvement and 72 kDa-metalloproteinase index. *Anticancer Res.* 1998;18:609-13.
96. Giannoudis A, Herrington CS. Differential expression of p53 and p21 in low grade cervical squamous intraepithelial lesions infected with low, intermediate, and high risk human papillomaviruses. *Cancer.* 2000;89(6):1300-7.
97. Giovane A, Pintzas A, Maira SM, Sobieszczuk P, Wasyluk B. Net, a new ets transcription factor that is activated by Ras. *Genes Dev.* 1994;8:1502-13.
98. Giroglou T, Florin L, Schafer F, Streeck RE, Sapp M. Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J Virol.* 2001;75:1565-70.
99. Gissmann L, zur Hausen H. Partial characterization of viral DNA from human genital warts (condylomata acuminata). *Int J Cancer* 1980;25:605.
100. Golijow CD, Mouron SA, Gomez MA, Dulout FN. Analysis of prevalence of point mutations in codon 12 of oncogene K-ras from non-cancerous samples of cervical cytology positive for type 16 or 18 PVH *Invest Clin.* 1999;40:257-66.
101. Goodman MT, McDuffie K, Hernandez B, Wilkens LR, Bertram CC, Killeen J, Le Marchand L, Selhub J,

- Murphy S, Donlon TA. Association of methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism C677T and dietary folate with the risk of cervical dysplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001;10:1275-80.
102. Ghaderi M, Nikitina L, Peacock CS, Hjelmstrom P, Hallmans G, Wiklund F, Lenner P, Blackwell JM, Dillner J, Sanjeevi CB. Tumor necrosis factor  $\alpha$ -11 and DR15-DQ6 (B\*0602) haplotype increase the risk for cervical intraepithelial neoplasia in human papillomavirus 16 seropositive women in Northern Sweden. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2000;9:1067-70.
103. Grendys EC Jr, Barnes WA, Weitzel J, Sparkowski J, Schlegel R. Identification of H, K, and N-ras point mutations in stage IB cervical carcinoma. *Gynecol Oncol.* 1997;65:343-7.
104. Green JA, Kirwan JM, Tierney JF, Symonds P, Fresco L, Collingwood M, Williams CJ. Survival and recurrence after concomitant chemotherapy and radiotherapy for cancer of the uterine cervix: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 2001;358:781-86.
105. Grigsby PW, Siegel BA, Dehdashti F. Lymph node staging by positron emission tomography in patients with carcinoma of the cervix. *J Clin Oncol* 2001;19:3745-49.
106. Grisaru D, Covens A, Chapman B, Shaw P, Colgan T, Murphy J, DePetrillo D, Lickrish G, Laframboise S, Rosen B. Does histology influence prognosis in patients with early-stage cervical carcinoma? *Cancer.* 2001;92:2999-3004.
107. Gulbis B, Galand P. Immunodetection of the p21-ras products in human normal and preneoplastic tissues and solid tumors: a review. *Hum Pathol* 1993;24:1271-85.
108. Hadlich SF, Kohl PK. Sexually transmitted diseases in children: A practical approach. *Dermatologic Clinics* 1998;16:859-61.
109. Halbert CL, Demers GW, Galloway DA. The E7 gene of human papillomavirus type 16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells. *J Virol.* 1991;65:473-8.
110. Hamada K, Alemany R, Zhang WW, Hittelman WN, Lotan R, Roth JA, Mitchell MF. Adenovirus-mediated transfer of a wild-type p53 gene and induction of apoptosis in cervical cancer. *Cancer Res.* 1996;56:3047-54.
111. Hamada K, Sakaue M, Alemany R, Zhang WW, Horio Y, Roth JA, et al. Adenovirus-mediated transfer of HPV 16 E6/E7 antisense RNA to human cervical cancer cells. *Gynecol Oncol* 1996;63:219-27.
112. Harima Y, Sawada S, Nagata K, Sougawa M, Ostapenko V, Ohnishi T. Polymorphism of the WAF1 gene is related to susceptibility to cervical cancer in Japanese women. *Int J Mol Med.* 2001;7:261-4.

113. Hartley C, Hamilton J, Birzgalis AR, Farrington WT. Recurrent respiratory papillomatosis--the Manchester experience, 1974-1992. *J Laryngol Otol.* 1994;108:226-9.
114. Harro CD, Pang YY, Roden RB, Hildesheim A, Wang Z, Reynolds MJ, Mast TC, Robinson R, Murphy BR, Karron RA, Dillner J, Schiller JT, Lowy DR. Safety and immunogenicity trial in adult volunteers of a human papillomavirus 16 L1 virus-like particle vaccine. *J Natl Cancer Inst.* 2001;93:284-92.
115. Hayashi Y, Hachisuga T, Iwasaka T, Fukuda K, Okuma Y, Yokoyama M, Sugimori H. Expression of ras oncogene product and EGF receptor in cervical squamous cell carcinomas and its relationship to lymph node involvement. *Gynecol Oncol.* 1991;40:147-51.
116. Hecht JL, Kadish AS, Jiang G, Burk RD. Genetic characterization of the human papillomavirus (HPV) 18 E2 gene in clinical specimens suggests the presence of a subtype with decreased oncogenic potential. *Int J Cancer.* 1995;60:369-76.
117. Herrero R, Castellsague X, Pawlita M, Lissowska J, Kee F, Balaram P, Rajkumar T, Sridhar H, Rose B, Pintos J, Fernandez L, Idris A, Sanchez MJ, Nieto A, Talamini R, Tavani A, Bosch FX, Reidel U, Snijders PJ, Meijer CJ, Viscidi R, Munoz N, Franceschi S; IARC Multicenter Oral Cancer Study Group. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on cancer multicenter study. *J Natl Cancer Inst.* 2003;95:1772-83.
118. Hildesheim A, Schiffman MH, Gravitt PE, Glass AG, Greer CE, Zhang T, Scott DR, Rush BB, Lawler P, Sherman ME, et al. Persistence of type-specific human papillomavirus infection among cytologically normal women. *J Infect Dis.* 1994;169:235-40.
119. Hildesheim A, Schiffman M, Scott DR, Marti M, Kissler T, Sherman ME, Glass AG, Manos MM, Lorincz AT, Kurman RJ, Buckland J, Rush BB, Carrington M. HLA class I/II alleles and development of HPV-related cervical neoplasia: results from a case-control study conducted in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarker Prev.* 1998;7:1035-41.
120. Hildesheim A, Herrero R, Castle PE, Wacholder S, Bratti MC, Sherman ME, Lorincz AT, Burk RD, Morales J, Rodriguez AC, Helgesen K, Alfaro M, Hutchinson M, Balmaceda I, Greenberg M, Schiffman M. HPV co-factors related to the development of cervical cancer: results from a population-based study in Costa Rica. *Br J Cancer.* 2001;84:1219-26.
121. Hornor G. Ano-genital warts in children: sexual abuse or not? *J P Health Care.* 2004;18:165-70.

- 122.Hopfl R, Heim K, Christensen N, Zumbach K, Wieland U, Volgger B, Widschwendter A, Haimbuchner S, Muller-Holzner E, Pawlita M, Pfister H, Fritsch P. Spontaneous regression of CIN and delayed-type hypersensitivity to HPV-16 oncoprotein E7. *Lancet*. 2000;356:1985-6.
- 123.Huang G, Lu S, Mao T, Song Y. Clinical significance on expression of the ras gene product P21 in human cervical carcinoma tissues. *Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 1992;23:61-4.
- 124.Huang G, Xiao X, Huang Y, Huang R. Carcinogenic mechanisms of multiple genes in cervical carcinoma. *Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 1996;27:5-9.
- 125.Huang LW, Chao SL, Chen PH, Chou HP. Multiple HPV genotypes in cervical carcinomas: improved DNA detection and typing in archival tissues. *J Clin Virol*. 2004;29:271-6.
- 126.Huibregste JM, Scheffner M. *Seminars Virol*. 1994;5:357-67.
- 127.Hurlin PJ, Kaur P, Smith PP, Perez-Reyes N, Blanton RA, McDougall JK. Progression of human papillomavirus type 18-immortalized human keratinocytes to a malignant phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88:570-4.
- 128.Husnjak K, Grce M, Magdic L, Pavelic K. Comparison of five different polymerase chain reaction methods for detection of human papillomavirus in cervical cell specimens. *J Virol Methods*. 2000;88:125-34.
- 129.Hwang DY, Cohen JB. A splicing enhancer in the 3'-terminal c-H-ras exon influences mRNA abundance and transforming activity. *J Virol*. 1997;71:6416-26.
- 130.Im SS, Wilczynski SP, Burger RA, Monk BJ. Early stage cervical cancers containing human papillomavirus type 18 DNA have more nodal metastasis and deeper stromal invasion. *Clin Cancer Res*. 2003;9:4145-50.
- 131.Ishii, S, Merlino GT, Pastan I. Promoter region of the human Harvey ras proto-oncogene: similarity to the EGF receptor proto-oncogene promoter. *Science*. 1985;230:1378-81.
- 132.Jackson S, Harwood C, Thomas M, Banks L, Storey A. Role of Bak in UV-induced apoptosis in skin cancer and abrogation by HPV E6 proteins. *Genes Dev*. 2000;14:3065-73.
- 133.Jemal A, Thomas A, Murray T, Thun M. Cancer statistics. 2002. *CA Cancer J Clin*. 2002;52:23-4.
- 134.Jeon S, Lambert PF. Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: Implications for cervical carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:1654-58.
- 135.Jiang W, Kahn SM, Guillem JG, Lu S-H, Weinstein IB. Rapid detection of ras oncogenes in human tumors:

- applications to colon, esophageal and gastric cancer. Oncogene. 1989;4:923-28.*
136. Jones WB, Mercer GO, Lewis JL, Rubin SC, Hoskins WJ. Early invasive carcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol. 1993;51:26-32.*
137. Kabsch K, Alonso A. The human papillomavirus type 16 (HPV-16) E5 protein sensitizes human keratinocytes to apoptosis induced by osmotic stress. *Oncogene. 2002;21:947-53.*
138. Kamura T. Multivariate analysis of the histopathologic prognostic factors of cervical cancer in patients undergoing hysterectomy. *Cancer. 1992;69:181.*
139. Kanda T, Watanabe S, Zanma S, Sato H, Furuno A, Yoshiike K. Human papillomavirus type 16 E6 proteins with glycine substitution for cysteine in the metal-binding motif. *Virology. 1991;185:536-43.*
140. Karlson J, Borg-Karlson AK, Unelius R, Shoshan MC, Wilking N, Ringborg U, Linder S. Inhibition of tumor cell growth by monoterpenes in vitro: evidence of a Ras-independent mechanism of action. *Anticancer Drugs. 1996;7:422-9.*
141. Kiaris H, Spandidos DA. Mutations of ras genes in human tumours. *Int J Oncol. 1995;7:413-21.*
142. Kiyono T, Foster SA, Koop JI, McDougall JK, Galloway DA, Klingelhutz AJ. Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature. 1998;396:84-8.*
143. Klaes R, Woerner SM, Ridder R, Wentzensen N, Duerst M, Schneider A, Lotz B, Melsheimer P, von Knebel Doeberitz M. Detection of high-risk cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer by amplification of transcripts derived from integrated papillomavirus oncogenes. *Cancer Res. 1999;59:6132-6.*
144. Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U, Dallenbach-Hellweg G, Schmidt D, von Knebel Doeberitz M. Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer. 2001;92:276-84.*
145. Klussmann JP, Weissenborn SJ, Wieland U, Dries V, Kolligs J, Jungehuelssing M, Eckel HE, Dienes HP, Pfister HJ, Fuchs PG. Prevalence, distribution and viral load of human papillomavirus 16 DNA in tonsillar carcinomas. *Cancer. 2001;92:2875-84.*
146. Koch A, Hansen SV, Nielsen NM, Palefsky J, Melbye M. HPV detection in children prior to sexual debut. *Int J Cancer. 1997;73:621-4.*
147. Koffa M, Koumantakis E, Ergazaki M, Malamou-Mitsi V and Spandidos DA. Detection of ras mutations and HPV in lesions of the human female reproductive tract. *Int J Oncol. 1994;5:189-95.*

148. Koffa M, Spandidos DA. *Oncogenes and onco-suppressor genes in female genital cancer. Ann N Y Acad Sci.* 1997;816:347-55. Review.
149. Kojima A, Maeda H, Kurahashi N, Sakagami G, Kubo K, Yoshimoto H, Kameyama Y. *Human papillomaviruses in the normal oral cavity of children in Japan. Oral Oncol.* 2003;39:821-8.
150. Kotsinas A, Kiaris H, Spandidos DA. *A method to detect and quantitate the expression of normal versus mutant H-ras transcripts at codon 12. Int J Oncol.* 1994;5:479-83.
151. Koutsky LA, Ault KA, Wheeler CM, Brown DR, Barr E, Alvarez FB, Chiacchierini LM, Jansen KU; *Proof of Principle Study Investigators. A controlled trial of human Papillomavirus type 16 vaccine. N Engl J Med.* 2002;347:1645-51.
152. Krontiris TG, Devlin B, Karp DD, Robert NJ, Risch N. *An association between the risk of cancer and mutations in the HRAS1 minisatellite locus. N Engl J Med.* 1993;329:517-23.
153. Kruger-Kjaer S, van den Brule AJ, Svare EI, Engholm G, Sherman ME, Poll PA, Walboomers JM, Bock JE, Meijer CJ. *Different risk factor patterns for high-grade and low-grade intraepithelial lesions on the cervix among HPV-positive and HPV-negative young women. Int J Cancer.* 1998;76:613-9.
154. Labropoulou V, Diakomanolis E, Dailianas S, Kalpaktoglou K, Balamotis A, Mavromara P. *Type-specific prevalence of genital human papillomaviruses in benign, premalignant and malignant biopsies in patients from Greece. Sex Transm Dis.* 1997;24:467-74.
155. Lambropoulos A, Dimitrakopoulos J, Frangoulides E, Katopodi R, Kotsis A, Karakasis D. *Eur J Oral Sci.* 1997;105:294-7.
156. Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA. *Cancer statistics, 1999. CA Cancer J Clin.* 1999;49:8-31.
157. Landoni F, Maneo A, Cormio G, Perego P, Milani R, Caruso O, Mangioni C. *Class II versus class III radical hysterectomy in stage IB-IIA cervical cancer: a prospective randomized study. Gynecol Oncol.* 2001;80:3-12.
158. Lazo PA. *The molecular genetics of cervical carcinoma. Br J Cancer.* 1999;80:2008-18.
159. Lee JH, Lee SK, Yang MH, Ahmed MM, Mohiuddin M, Lee EY. *Expression and mutation of H-ras in uterine cervical cancer. Gynecol Oncol.* 1996;62:49-54.
160. Lee SA, Kang D, Seo SS, Jeong JK, Yoo KY, Jeon YT, Kim JW, Park NH, Kang SB, Lee HP, Song YS. *Multiple HPV infection in cervical cancer screened by HPV DNAChip. Cancer Lett.* 2003;198:187-92.
161. Leung TW, Cheung AN, Cheng DK, Wong LC, Ngan HY. *Expressions of c-erbB-2, epidermal growth factor*



- receptor and pan-ras proto-oncogenes in adenocarcinoma of the cervix: correlation with clinical prognosis. Oncol Rep. 2001;8:1159-64.*
162. Lin P, Koutsky LA, Critchlow CW, Apple RJ, Hawes SE, Hughes JP, Toure P, Dembele A, Kiviat NB. HLA class II DR-DQ and increased risk of cervical cancer among Senegalese women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2001;10:1037-45.*
163. Liotta L, Petricoin E. Molecular profiling of human cancer. *Nat Rev Genet. 2000;1:48-56.*
164. Lorincz AT, Reid R, Jenson AB, Greenberg MD, Lancaster W, Kurman RJ. Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. *Obstet Gynecol. 1992;79:328-37.*
165. Lowndes NF, Paul J, Wu J, Allan M. c-Ha-ras gene bidirectional promoter expressed in vitro: location and regulation. *Mol Cell Biol. 1989;9:3758-70.*
166. Luft F, Klaes R, Nees M, Durst M, Heilmann V, Melsheimer P, von Knebel Doeberitz M. Detection of integrated papillomavirus sequences by ligation-mediated PCR (DIPS-PCR) and molecular characterization in cervical cancer cells. *Int J Cancer. 2001;92:9-17.*
167. Mackay I, Arden K, Nitsche A. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Research. 2002;30:1292-305.*
168. Mammas I, Zafiroopoulos A, Koumantakis E, Sifakis S, Spandidos DA. Transcriptional activation of H- and N-ras oncogenes in human cervical cancer. *Gyn Oncol. 2004;92:941-8.*
169. Mammas I, Zafiroopoulos A, Sifakis S, Sourvinos G, Spandidos DA. Human Papilloma Virus (HPV) typing in relation to ras oncogene mRNA expression in HPV-associated human squamous cervical neoplasia. *Int J Biol Mark. 2006;20:257-63.*
170. Mammas I, Zafiroopoulos A, Spandidos DA. Involvement of ras genes in female genital tract cancer. *Int J Oncol. 2005;26:1241-55. Review.*
171. Mandic A, Vujkov T. Human papillomavirus vaccine as a new way of preventing cervical cancer: a dream or the future? *Ann Oncol. 2004;15:197-200. Review.*
172. Maniatis T, Fritsch EF and Sambrook J. *Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989.*
173. Margina JF, Goodrich MA, Weaver AL, Podratz KC. Modified radical hysterectomy: morbidity and mortality. *Gynecol Oncol. 1995;59:277-82.*
174. Mant C, Kell B, Rice P, Best JM, Bible JM, Cason J. Buccal exposure to human papillomavirus type 16 is a

- common yet transitory event of childhood. *J Med Virol.* 2003;71:593-8.
175. Matlashewski G, Schneider J, Banks L, Jones N, Murray A, Crawford L. Human papillomavirus type 16 DNA cooperates with activated ras in transforming primary cells. *EMBO J.* 1987;6:1741-6.
176. Matlashewski G, Osborn K, Banks L, Stanley M, Crawford L. Transformation of primary human fibroblast cells with human papillomavirus type 16 DNA and EJ-ras. *Int J Cancer.* 1988;42:232-8.
177. Matsumoto K, Yoshikawa H, Nakagawa S, Tang X, Yasugi T, Kawana K, Sekiya S, Hirai Y, Kukimoto I, Kanda T, Taketani Y. Enhanced oncogenicity of human papillomavirus type 16 (HPV16) variants in Japanese population. *Cancer Lett.* 2000;156:159-65.
178. Medina-Martinez O, Vallejo V, Guido MC, Garcia-Carranca A. Ha-ras oncogene-induced transcription of human papillomavirus type 18 E6 and E7 oncogenes. *Mol Carcinog.* 1997;19:83-90.
179. Meisels A, Fortin R. Condylomatous lesions of the cervix and vagina I. Cytological patterns. *Acta Cytol.* 1976;20:505-509.
180. Melnikow J, Nuovo J, Willan AR, Chan BK, Howell LP. Natural history of cervical squamous intraepithelial lesions: a meta-analysis. *Obstet Gynecol.* 1998;92:727-35.
181. Miller AC, Kariko K, Myers CE, Clark EP, Samid D. Increased radioresistance of EJras-transformed human osteosarcoma cells and its modulation by lovastatin, an inhibitor of p21ras isoprenylation. *Int J Cancer.* 1993;53:302-7.
182. Minaguchi T, Kanamori Y, Matsushima M, Yoshikawa H, Taketani Y, Nakamura Y. No evidence of correlation between polymorphism at codon 72 of p53 and risk of cervical cancer in Japanese patients with human papillomavirus 16/18 infection. *Cancer Res.* 1998;58:4585-6.
183. Mitchell MF, Tortolero-Luna G, Cook E, Whittaker L, Rhodes-Morris H, Silva E. A randomized clinical trial of cryotherapy, laser vaporization and loop electrosurgical excision for treatment of squamous intraepithelial lesions of the cervix. *Obstet Gynecol.* 1998;92:737-44.
184. Mitchell MF, Tortolero-Luna G, Wright T, Sarkar A, Richards-Kortum R, Hong WK, et al. Cervical human papillomavirus infection and intraepithelial neoplasia: a review. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 1996;21:17-25.
185. Miyakis S, G. Sourvinos, and D.A. Spandidos, Differential expression and mutation of the ras family genes in human breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;251:609-12.
186. Moreno V, Bosch FX, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV, Walboomers JM, Herrero R, Franceschi S; International

- Agency for Research on Cancer. Multicentric Cervical Cancer Study Group. Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. Lancet. 2002;359:1085-92.*
187. Motoyama S, Ladines-Llave CA, Luis Villanueva S, Maruo T. The role of human papilloma virus in the molecular biology of cervical carcinogenesis. *Kobe J Med Sci. 2004;50:9-19. Review.*
188. Mulligan RC. The basic science of gene therapy. *Science 1993;260:926-932.*
189. Mullis KB, Faloona F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol 1987;155:335-50.*
190. Mund K, Han C, Daum R, Helfrich S, Muller M, Fisher SG, Schiller JT, Gissmann L. Detection of human papillomavirus type 16 DNA and of antibodies to human papillomavirus type 16 proteins in children. *Intervirology 1997;40:232-7.*
191. Munger K, Phelps WC, Bubbs V, Howley PM, Schlegel R. The E6 and E7 genes of human papillomavirus type 16 are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J Virol 1989;63:4417-23.*
192. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Tafur L, Izarzugaza I, Gili M, Viladiu P, Navarro C, Martos C, Ascunce N, et al. The causal link between human papillomavirus and invasive cervical cancer: a population-based case-control study in Colombia and Spain. *Int J Cancer. 1992;52:743-9.*
193. Munoz N, Franceschi S, Bosetti C, Moreno V, Herrero R, Smith JS, Shah KV, Meijer CJLM, Bosch FX for the International Agency for Research on Cancer (IARC) Multicentric Cervical Cancer Study Group 2002. Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. *Lancet 2002;359:1093-101.*
194. Myhre AK, Dalen A, Berntzen K, Bratlid D. Anogenital human papillomavirus in non-abused preschool children. *Acta Paediatr. 2003;92:1445-52.*
195. Nanda K, McCrory DC, Myers ER, Bastian LA, Hasselblad V, Hickey JD, Matchar DB. Accuracy of the Papanikolaou test in screening for and follow-up of cervical cytologic abnormalities: a systematic review. *Ann Intern Med. 2000;132:810-9.*
196. Nawa A, Nishiyama Y, Kobayashi T, Wakahara Y, Okamoto T, Kikkawa F, Suganuma N, Goto S, Kuzuya K, Tomoda Y. Association of human leukocyte antigen-B1\*03 with cervical cancer in Japanese women aged 35 years and younger. *Cancer. 1995;75:518-21.*

197. Neuman RJ, Huettner PC, Li L, Mardis ER, Duffy BF, Wilson RK, Rader JS. Association between DQB1 and cervical cancer in patients with human papillomavirus and family controls. *Obstet Gynecol.* 2000;95:134-40.
198. Niesters M. Molecular and diagnostics clinical virology in real time. *Clin Microbiol Infect.* 2004;10:5-11.
199. Ngan HY, Liu VW, Liu SS. Risk of cervical cancer is not increased in Chinese carrying homozygous arginine at codon 72 of p53. *Br J Cancer.* 1999;80:1828-9.
200. Noutsou A, Koffa M, Ergazaki M, Siafakas N, Spandidos DA. Detection of human papilloma virus (HPV) and K-ras mutations in human lung carcinomas. *Int J Oncol.* 1996;8:1089-93.
201. O'Leary JJ, Landers RJ, Silva I, Uhlmann V, Crowley M, Healy I, Luttich K. Molecular analysis of ras oncogenes in CIN III and in stage I and II invasive squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *J Clin Pathol.* 1998;51:576-82.
202. Oda H, Kumar S, Howley PM. Regulation of the Src family tyrosine kinase Blk through E6AP-mediated ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:9557-62.
203. Odunsi K, Terry G, Ho L, Bell J, Cuzick J, Ganesan TS. Susceptibility to human papillomavirus-associated cervical intra-epithelial neoplasia is determined by specific HLA DR-DQ alleles. *Int J Cancer.* 1996;67:595-602.
204. Orth G, Jablonska S, Favre M, Croissant O, Jarzabek-Chorzelska M, Rzeska G. Characterization of two types of human papillomaviruses in lesions of epidermodysplasia verruciformis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1978;75:1537
205. Ostor AG. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *Int J Gynecol Pathol.* 1993;12:186-92.
206. Papanikolaou GN, Traut HF. The diagnostic value of vaginal smears in carcinoma of the uterus. *Am J Obstetr Gynecol.* 1941;42:193-206.
207. Park RC, Thigpen JT. Chemotherapy in advanced and recurrent cervical cancer. *Cancer.* 1993;71:1446-50.
208. Park TW, Fujiwara H, Wright TC. Molecular biology of cervical cancer and its precursors. *Cancer.* 1995;76:1902-13.
209. Parker MF, Arroyo GF, Geradts J, Sabichi AL, Park RC, Taylor RR, Birrer MJ. Molecular characterization of adenocarcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol.* 1997;64:242-51.
210. Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J. Cancer incidence in five continents, vol VII. International Agency for Research on Cancer, Scientific Publications number 143. Lyon: IARC, 1997.

211. Perez CA, Grigsby PW, Castro-Vita H, Lockett MA. Carcinoma of the uterine cervix. I. Impact of prolongation of treatment time and timing of brachytherapy on outcome of radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1995;32:1275-88.
212. Petereit DG, Sarkaria JN, Potter DM, Schink JM. High-dose-rate versus low-dose-rate brachytherapy in the treatment of cervical cancer: analysis of tumor recurrence-the University of Wisconsin experience. *Int J Oncol Biol Phys.* 1999;45:1267-74.
213. Petry KU, Scheffel D, Bode U, Gabrysiak T, Kochel H, Kupsch E, Glaubitz M, Niesert S, Kuhnle H, Schedel I. Cellular immunodeficiency enhances the progression of human papillomavirus-associated cervical lesions. *Int J Cancer.* 1994;57:836-40.
214. Pinion SB, Kennedy JH, Miller RW, MacLean AB. Oncogene expression in cervical intraepithelial neoplasia and invasive cancer of cervix. *Lancet.* 1991;337:819-20.
215. Plasencia JM. Cutaneous warts: diagnosis and treatment, *Prim Care.* 2000;27:423-34.
216. Pochylski T, Kwasniewska A. Absence of point mutation in codons 12 and 13 of K-RAS oncogene in HPV-associated high grade dysplasia and squamous cell cervical carcinoma. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2003;111:68-73.
217. Prokopakis P, Sourvinos G, Koumantaki Y, Koumantakis E, Spandidos D. K-ras mutations and HPV infection in cervicitis and intraepithelial neoplasias of the cervix. *Oncol Rep.* 2002;9:129-33.
218. Prokopczyk B, Cox J, Hu P, Hoffman D, El-Bayoumy K, Waggoner S. Identification of tobacco-specific carcinogens in the cervical mucus of smokers and nonsmokers. *J Natl Cancer Inst.* 1997;89:868-73.
219. Rabah R, Lancaster WD, Thomas R, Gregoire L. Human papillomavirus-11 associated recurrent respiratory papillomatosis is more aggressive than human papillomavirus-6-associated disease. *Pediatr Dev Pathol.* 2001;4:68-72.
220. Read SJ, Burnett D, Fink CG. Molecular techniques for clinical diagnostic virology. *J Clin Pathol.* 2000;53:502-6.
221. Rebollo A, Martinez AC. Ras proteins: recent advances and new functions. *Blood.* 1999;94:2971-80.
222. Reuter S, Bartelmann M, Vogt M, Geisen C, Napierski I, Kahn T, Delius H, Lichter P, Weitz S, Korn B, Schwarz E. APM-1, a novel human gene, identified by aberrant co-transcription with papillomavirus oncogenes in a cervical carcinoma cell line, encodes a BTB/POZ-zinc finger protein with growth inhibitory activity. *EMBO J.*

- 1998;17:215-22.
223. Rice PS, Mant C, Cason J, Bible JM, Muir P, Kell B, Best JM. High prevalence of human papillomavirus type 16 infection in children. *J Med Virol.* 2000;61:70-75.
224. Riethdorf S, Riethdorf L, Milde-Langosch K, Park TW, Loning T. Differences in HPV 16- and HPV 18 E6/E7 oncogene expression between in situ and invasive adenocarcinomas of the cervix uteri. *Virchows Arch.* 2000;437:491-500.
225. Rimell FL, Shoemaker DL, Pou AM, Jordan JA, Post JC, Ehrlich GD. Pediatric respiratory papillomatosis: prognostic role of viral typing and cofactors. *Laryngoscope.* 1997;107:915-8.
226. Rintala MA, Grenman SE, Jarvenkyla ME, Syrjanen KJ, Syrjanen SM. High-risk types of human papillomavirus (HPV) DNA in oral and genital mucosa of infants during their first 3 years of life: experience from the Finnish HPV family study. *Clin Inf Diseases* 2005;41:1728-33.
227. Riou G, Barrois M, Sheng ZM, Duvillard P, Lhomme C. Somatic deletions and mutations of c-Ha-ras gene in human cervical cancers. *Oncogene.* 1988;3:329-33.
228. Roh J, Kim M, Kim J, Park N, Song Y, Kang S, Lee H. Polymorphisms in codon 31 of p21 and cervical cancer susceptibility in Korean women. *Cancer Lett.* 2001;165:59-62.
229. Roussaki-Schulze AV, Kouskoukis C, Rammos C, Rallis E, Kontos F, Zafiriou E, Gross G. Identification of human papillomavirus DNA in melanoma biopsy specimens of Greek population. *Int J Clin Pharmacol Res.* 2005;25:145-50.
230. Rose PG, Blessing JA, Gershenson DM, McGehee R. Paclitaxel and cisplatin as first-line therapy in recurrent or advanced squamous cell carcinoma of the cervix: a Gynecologic Oncology Group study. *J Clin Oncol.* 1999;17:2676-80.
231. Rous P, Beard JW. The progression to carcinoma of virus-induced rabbit papillomas (Shope). *J Exp Med.* 1934;62:523.
232. Rous P, Friedewald WF. The effect of chemical carcinogens on virus-induced rabbit papillomas. *J Exp Med* 1944;79:511.
233. Rous P, Kidd JG. The carcinogenic effect of a papilloma virus on the tarred skin of rabbits. I. Description of the phenomenon. *J Exp Med.* 1938;67:399.
234. Rous P. Sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. *J Exp Med.*

- 1911;13:392-397.
235. Rusanescu G, Gotoh T, Tian X, Feig LA. Regulation of Ras signaling specificity by protein kinase C. *Mol Cell Biol.* 2001;21:2650-8.
236. Sagae S, Kuzumaki N, Hisada T, Mugikura Y, Kudo R, Hashimoto M. ras oncogene expression and prognosis of invasive squamous cell carcinomas of the uterine cervix. *Cancer.* 1989;63:1577-82.
237. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis K, Horn GT, Erlich HA and Arnheim N. Enzymatic amplification of  $\beta$ -glibin genomic sequences and restriction site analysis. *Science.* 1985;230:1350-4.
238. Sanclemente G, Gill DK. Human papillomavirus molecular biology and pathogenesis. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2002;16:231-40.
239. Sanjeevi CB, Hjelmstrom P, Hallmans G, Wiklund F, Lenner P, Angstrom T, Dillner J, Lernmark A. Different HLA-DR-DQ haplotypes are associated with cervical intraepithelial neoplasia among human papillomavirus type-16 seropositive and seronegative Swedish women. *Int J Cancer.* 1996;68:409-14.
240. Sasagawa T, Basha W, Yamazaki H, Inoue M. High-risk and multiple human papillomavirus infections associated with cervical abnormalities in Japanese women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001;10:45-52.
241. Sastre-Garau X, Loste MN, Vincent-Salomon A, Favre M, Mouret E, de la Rochefordiere A, Durand JC, Tartour E, Lepage V, Charron D. Decreased frequency of HLA-DRB1 13 alleles in French women with HPV-positive carcinoma of the cervix. *Int J Cancer.* 1996;69:159-64.
242. Sato S, Ito K, Ozawa N, Yajima A, Sasano H. Analysis of point mutations at codon 12 of K-ras in human endometrial carcinoma and cervical adenocarcinoma by dot blot hybridization and polymerase chain reaction. *Tohoku J Exp Med.* 1991;165:131-6.
243. Saunders NA, Frazer IH. Simplifying the molecular mechanisms of human papillomavirus. *Dermatol Clin.* 1998;16:823-7.
244. Schellekens MC, Dijkman A, Aziz MF, Siregar B, Cornain S, Kolkman-Uljee S, Peters LA, Fleuren GJ. Prevalence of single and multiple HPV types in cervical carcinomas in Jakarta, Indonesia. *Gynecol Oncol.* 2004;93:49-53.
245. Schiffman MH, Bauer HM, Hoover RN, Glass AG, Cadell DM, Rush BB, Scott DR, Sherman ME, Kurman RJ, Wacholder S, et al. Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst.* 1993;85:958-64.

246. Schiller JT, Hidesheim A. Developing HPV virus-like particle vaccines to prevent cervical cancer: a progress report. *J Clin Virol.* 2000;19:67-74. Review.
247. Scholtz M, Dulcos P. Immunization safety: a global priority. *Bull World Health Organ.* 2000;78:153-4.
248. Schwartz SM, Daling JR, Doody DR, Wipf GC, Carter JJ, Madeleine MM, Mao EJ, Fitzgibbons ED, Huang S, Beckmann AM, McDougall JK, Galloway DA. Oral cancer risk in relation to sexual history and evidence of human papillomavirus infection. *J Natl Cancer Inst.* 1998;90:1626-36.
249. Schwarz E, Freese UK, Gissmann L, Mayer W, Roggenbuck B, Stremlau A, zur Hausen H. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature.* 1985;314:111-4.
250. Shah KV, Stern WF, Shah FK, Bishai D, Kashima HK. Risk factors for juvenile onset recurrent respiratory papillomatosis. *P Infect Dis J.* 1998;17:372-6.
251. Shafi MI, Luesley DM, Jordan JA, Dunn JA, Rollson TP, Yates M. Randomised trial of immediate versus deferred treatment strategies for the management of minor cervical cytological abnormalities. *Br J Obstet Gynaecol.* 1997;104:590-4.
252. Shingleton HM, Soong SJ, Gelder MS, Hatch KD, Baker VV, Austin JM. Clinical and histopathological factors predicting recurrence and survival after pelvic exenteration for cancer of the cervix. *Obstet Gynecol.* 1989;73:1027-34.
253. Shirasawa H, Tomita Y, Sekiya S, Takamizawa H, Simizu B. Integration and transcription of human papillomavirus type 16 and 18 sequences in cell lines derived from cervical carcinomas. *J Gen Virol.* 1987;68:583-91.
254. Siegfried E, Rasnick-Conley J, Cook S, Leonardi C, Monteleone J. Human papillomavirus screening in pediatric victims of sexual abuse. *Pediatrics.* 1998;101:43-7.
255. Sistonen L, Holtta E, Makela TP, Keski-Oja J, Alitalo K. The cellular response to induction of the p21 c-Ha-ras oncoprotein includes stimulation of jun gene expression. *EMBO J.* 1989;8:815-22.
256. Sklar MD. The ras oncogenes increase the intrinsic resistance of NIH 3T3 cells to ionizing radiation. *Science.* 1988;239:645-7.
257. Skomedal H, Kristensen GB, Lie AK, Holm R. Aberrant expression of the cell cycle associated proteins TP53, MDM2, p21, p27, cdk4, cyclin D1, RB, and EGFR in cervical carcinomas. *Gynecol Oncol.* 1999;73:223-8.
258. Slagle B, Kaufman R, Reeves W, Icenogle J. Expression of ras, c-myc, and p53 proteins in cervical



- intraepithelial neoplasia. Cancer. 1998;83:1401-8.*
- 259.Snijders PJF, van den Brule AJC, Schrijnemakers HFJ, Snow G, Meijer CJLM and Walboomers JMM. *The use of general primers in the polymerase chain reaction permits the detection of a broad spectrum of human papillomavirus genotypes. J Gen Virology. 1990;71:173-81.*
- 260.Snijders PJ, Cromme FV, van den Brule AJ, Schrijnemakers HF, Snow GB, Meijer CJ, Walboomers JM. *Prevalence and expression of human papillomavirus in tonsillar carcinomas, indicating a possible viral etiology. Int J Cancer. 1992;52:845-50.*
- 261.Soler MH, Schiffman M. *Interobserver reproducibility of cervical cytologic and histologic interpretations: realistic estimates from the ASCUS-LSIL Triage Study. JAMA. 2001;285:1500-5.*
- 262.Somers GR, Tabrizi SN, Borg AJ, Garland SM, Chow CW. *Juvenile laryngeal papillomatosis in a pediatric population: a clinicopathologic study. Pediatr Pathol Lab Med. 1997;17:53-64.*
- 263.Spandidos DA. *The cancer story. Cancer Biol Ther. 2004 Nov;3:1184-6.*
- 264.Spandidos DA. *A unified theory for the development of cancer. Biosci Rep. 1986 Aug;6:691-708. Review.*
- 265.Spandidos DA, Anderson ML. *A role of ras oncogenes in carcinogenesis and differentiation. Adv Exp Med Biol. 1990;265:127-31.*
- 266.Spandidos DA, Dokianakis DN, Kallergi G, Aggelakis E. *Molecular basis of gynecological cancer. Ann N Y Acad Sci. 2000;900:56-64. Review.*
- 267.Spandidos DA, Liloglou T, Field JK. *Prognostic significance of oncogenes and tumor suppressor genes in human malignancy. Stem Cells. 1993;11:194-8. Review.*
- 268.Spandidos DA, Sourvinos G, Tsatsanis C, Zafiroopoulos A. *Normal ras genes: their onco-suppressor and pro-apoptotic functions. Int J Oncol. 2002;21:237-41. Review.*
- 269.Spandidos DA, Wilkie NM. *The normal human H-ras1 gene can act as an onco-suppressor. Br J Cancer Suppl. 1988;9:67-71.*
- 270.Spandidos DA, Wilkie NM. *Malignant transformation of early passage rodent cells by a single mutated human oncogene. Nature. 1984;310:469-75.*
- 271.Spataro V, Norbury C, Harris AL. *The ubiquitin-proteasome pathway in cancer. Br J Cancer. 1998;77:448-55. Review.*
- 272.Spitzer M, Chernys AE, Shifrin A, Ryskin M. *Indications for cone biopsy: pathologic correlation. Am J Obstet*

- Gynecol.* 1998;178:74-9.
273. Stacey DW, Kung HF. Transformation of NIH 3T3 cells by microinjection of Ha-ras p21 protein. *Nature.* 1984;310:508-11.
274. Stanczuk GA, Sibanda EN, Perrey C, Chirara M, Pravica V, Hutchinson IV, Tswana SA. Cancer of the uterine cervix may be significantly associated with a gene polymorphism coding for increased IL-10 production. *Int J Cancer.* 2001;94:792-4.
275. Stanley LA. Molecular aspects of chemical carcinogenesis: the roles of oncogenes and tumour suppressor genes. *Toxicology.* 1995;96:173-94.
276. Steller M. Cervical cancer vaccines; progress and prospectives. *J Soc Gyn Invest.* 2002;9:254-64.
277. Stenzel A, Semczuk A, Rozynskal K, Jakowicki J, Wojcierowski J. "Low-risk" and "high-risk" HPV-infection and K-ras gene point mutations in human cervical cancer: a study of 31 cases. *Pathol Res Pract.* 2001;197:597-603.
278. Stewart AC, Eriksson AM, Manos MM, Munoz N, Bosch FX, Peto J, Wheeler CM. Intratype variation in 12 human papillomavirus types: a worldwide perspective. *J Virol.* 1996;70:3127-36.
279. Storch G. Diagnostic Virology. *Clinic Infect Dis.* 2000;31:739-51.
280. Storey A, Thomas M, Kalita A, Harwood C, Gardiol D, Mantovani F, Breuer J, Leigh IM, Matlashewski G, Banks L. Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature.* 1998;393:229-34.
281. Strauss MJ, Shaw EW, Bunting H, Melnick JL. "Crystalline" virus-like particles from skin papillomas characterized by intranuclear inclusion bodies. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1949;72:46.
282. Strome SE, et al. Squamous cell carcinoma of the tonsils: a molecular analysis of HPV associations. *Clin Cancer Res.* 2002;8:1093-100.
283. Summersgill KF, Smith EM, Levy BT, Allen JM, Haugen TH, Turek LP. Human papillomavirus in the oral cavities of children and adolescents. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001;91:62-9.
284. Sun Y, Eluf-Neto J, Bosch FX, Munoz N, Walboomers JM, Meijer CJ, Shah KV, Clayman B, Viscidi RP. Serum antibodies to human papillomavirus 16 proteins in women from Brazil with invasive cervical carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1999;8:935-40.
285. Sung H, Kearney KA, Miller M, Kinney W, Sawaya GF, Hiatt RA. Papanikolaou smear history and diagnosis of invasive cervical carcinoma among members of a large prepaid health plan. *Cancer.* 2000;88:2283-9.

286. Suzich JA, Ghim SJ, Palmer-Hill FJ, White WI, Tamura JK, Bell JA, Newsome JA, Jenson AB, Schlegel R. Systemic immunization with papillomavirus L1 protein completely prevents the development of viral mucosal papillomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:11553-7.
287. Swygart C. Human papillomavirus: disease and laboratory diagnosis. *Br J Biomed Sci.* 1997;54:299-303.
288. Symonds RP, Habeshaw T, Paul J, Kerr DJ, Darling A, Burnett RA, Sotsiou F, Linardopoulos S, Spandidos DA. No correlation between ras, c-myc and c-jun proto-oncogene expression and prognosis in advanced carcinoma of cervix. *Eur J Cancer* 1992;28A:1615-7.
289. Syrjanen S. HPV infections and tonsillar carcinoma. *J Clin Pathol.* 2004;57:449-55. Review.
290. Syrjanen S, Puranen M. Human papillomavirus infections in children: the potential role of maternal transmission. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002;11:259-74.
291. Szarewski A, Cuzick J. Smoking and cervical neoplasia: a review of the evidence. *J Epidemiol Biostat.* 1998;3:229-56.
292. Tan SH, Leong LE, Walker PA, 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.* 1994;68:6411-20.
293. Thomas M, Banks L. Inhibition of Bak-induced apoptosis by HPV-18 E6. *Oncogene.* 1998;17:2943-54.
294. Thomas DB, Ray RM, Koetsawang A, Kiviat N, Kuypers J, Qin Q, Ashley RL, Koetsawang S. Human papillomaviruses and cervical cancer in Bangkok. I. Risk factors for invasive cervical carcinomas with human papillomavirus types 16 and 18 DNA. *Am J Epidemiol.* 2001;153:723-31.
295. Thompson TA, Haag JD, Lindstrom MJ, Griep AE, Lohse JK, Gould MN. Decreased susceptibility to NMU-induced mammary carcinogenesis in transgenic rats carrying multiple copies of a rat ras gene driven by the rat Harvey ras promoter. *Oncogene.* 2002;21:2797-804.
296. Tindle RW, Frazer IH. Immune response to human papillomaviruses and the prospects of human papillomavirus-specific immunization. *Curr Top Microbiol.* 1994;86:218-5.
297. Trepicchio WL, Krontiris TG. Members of the rel/NF-kappa B family of transcriptional regulatory proteins bind the HRAS1 minisatellite DNA sequence. *Nucleic Acids Res.* 1992;20:2427-34.
298. Tseng CJ, Hong SG, Soong YK, Hsueh S, Hsieh CH, Lin HW. Conservative conization for microinvasive carcinoma of the cervix. *Am J Obstet Gynecol.* 1997;176:1009-10.

299. Turek LP, Smith EM. The genetic program of genital human papillomaviruses in infection and cancer. *Obstet Gynecol Clin N Amer.* 1996;23:735-58.
300. Vageli D, Kiaris H, Delakas D, Anezinis P, Cranidis A, Spandidos DA. Transcriptional activation of H-ras, K-ras and N-ras proto-oncogenes in human bladder tumors. *Cancer Lett.* 1996;107:241-7.
301. Van Le L, Stoerker J, Rinehart CA, Fowler WC. H-ras codon 12 mutation in cervical dysplasia. *Gynecol Oncol.* 1993;49(2):181-4.
302. Veldman T, Horikawa I, Barrett JC, Schlegel R. Transcriptional activation of the telomerase hTERT gene by human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein. *J Virol.* 2001;75:4467-72.
303. Villa LL, Sichero L, Rahal P, Caballero O, Ferenczy A, Rohan T, Franco EL. Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. *J Gen Virol.* 2000;81:2959-68.
304. Virmani AK, Muller C, Rathi A, Zoechbauer-Mueller S, Mathis M, Gazdar AF. Aberrant methylation during cervical carcinogenesis. *Clin Cancer Res.* 2001;7:584-9.
305. Vizcaino AP, Moreno V, Bosch FX, Munoz N, Barros-Dios XM, Borras J, Parkin DM. International trends in incidence of cervical cancer: II. Squamous cell carcinoma. *Int J Cancer.* 2000;86:429-35.
306. Vlachonikolis IG, Georgoulis V, eds. *Epidemiology of cancer in the Mediterranean.* Heraklion: University of Crete, 1997.
307. Vlachonikolis IG, Philalithis AE, Brittan Y, Georgoulis V. Mortality from malignant neoplasms in Crete, 1992-1993. *J Epidemiol Community Health.* 1998;52:126-7.
308. Von Knebel Doeberitz, Rittmuller C, zur Hausen H, Durst M. Inhibition of tumorigenicity of cervical cancer cells in nude mice by HPV E6-E7 antisense RNA. *Int J Cancer.* 1992;51:831-4.
309. Wagenaar HC, Trimbos JB, Postema S, Anastasopoulou A, van der Geest RJ, Reiber JH, Kenter GG, Peters AA, Pattynama PM. Tumor diameter and volume assessed by magnetic resonance imaging in the prediction of outcome for invasive cervical cancer. *Gynecol Oncol.* 2001;82:474-82.
310. Waggoner SE. Cervical cancer. *Lancet* 2003;361:2217-25.
311. Walboomers JMM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJF, Peto J, Meijer CJLM, Munoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 1999;189:12-9.
312. Wang SS, Wheeler CM, Hildesheim A, Schiffman M, Herrero R, Bratti MC, Sherman ME, Alfaro M, Hutchinson

- ML, Morales J, Lorincz A, Burk RD, Carrington M, Erlich HA, Apple RJ. Human leukocyte antigen class I and II alleles and risk of cervical neoplasia: results from a population-based study in Costa Rica. *J Infect Dis.* 2001;184:1310-4.
313. Watanabe S, Ogura H, Fukushima K, Yabe Y. Comparison of Virapap filter hybridisation with polymerase chain reaction and Southern blot hybridisation methods for detection of human papillomavirus in tonsillar and pharyngeal cancers. *Eur Arch Otorinolaryngol.* 1993;250:115-9.
314. Wentzensen N, Ridder R, Klaes R, Vinokurova S, Schaefer U, Doeberitz MK. Characterization of viral-cellular fusion transcripts in a large series of HPV16 and 18 positive anogenital lesions. *Oncogene.* 2002;21:419-26.
315. Wentzensen N, Vinokurova S, von Knebel Doeberitz M. Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract. *Cancer Res.* 2004;64:3878-84. Review.
316. Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science.* 1990;248:76-9.
317. White MA, Anderson RG. Which Ras rides the raft? *Nat Cell Biol.* 2001;3:E172.
318. Wiatrak BJ, Wiatrak DW, Broker TR, Lewis L. Recurrent respiratory papillomatosis: a longitudinal study comparing severity associated with human papilloma viral types 6 and 11 and other risk factors in a large pediatric population. *Laryngoscope* 2004;114:1-23.
319. Willis G, Jennings B, Ball RY, New NE, Gibson I. Analysis of ras point mutations and human papillomavirus 16 and 18 in cervical carcinomata and their metastases. *Gynecol Oncol.* 1993 Jun;49:359-64.
320. Wittinghofer F. Ras signalling. Caught in the act of the switch-on. *Nature.* 1998;394:317, 319-20.
321. Wong YF, Chung TK, Cheung TH, Lam SK, Xu YG, Chang AM. Frequent ras gene mutations in squamous cell cervical cancer. *Cancer Lett.* 1995;95:29-32.
322. Wright TC, Ferenczy AF, Kurman RJ. Precancerous lesions of the cervix. In: Kurman RJ, Editor. *Blaustein's pathology of the female genital tract.* New York: Springer-Verlag, 2002.
323. Xi LF, Koutsky LA, Galloway DA, Kuypers J, Hughes JP, Wheeler CM, Holmes KK, Kiviat NB. Genomic variation of human papillomavirus type 16 and risk for high grade cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst.* 1997;89:796-802.
324. Xing J, Ginty DD, Greenberg ME. Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth

- factor-regulated CREB kinase. Science. 1996. 273:959-63.*
325. Yamada T, Manos MM, Peto J, Greer CE, Munoz N, Bosch FX, Wheeler CM. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *J Virol. 1997;71:2463-72.*
326. Zachos G, Spandidos D. Expression of ras proto-oncogenes: regulation and implications in the development of human tumors. *Crit Rev Oncol Hematol. 1997;26:65-75.*
327. Zaitoun AM, McKee G, Coppen MJ, Thomas SM, Wilson PO. Completeness of excision and follow up cytology in patients treated with loop excision biopsy. *J Clin Pathol. 2000;53:191-6.*
328. Zerfass K, Schulze A, Spitkovsky D, Friedman V, Henglein B, 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. 1995;69:6389-99.*
329. Zerfass-Thome K, Zwerschke W, Mannhardt B, Tindle R, Botz JW, Jansen-Durr P. Inactivation of the cdk inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Oncogene. 1996;13:2323-30.*
330. Zhang Z, Wang Y, Vikis HG, Johnson L, Liu G, Li J, Anderson MW, Sills RC, Hong HL, Devereux TR, Jacks T, Guan KL, You M. Wildtype Kras2 can inhibit lung carcinogenesis in mice. *Nat Genet. 2001;29:25-33.*
331. zur Hausen H, Meinhof W, Scheiber W, Bornkamm GW. Attempts to detect virus-specific DNA sequences in human tumors: I. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human wart virus. *Int J Cancer. 1974;13:650-6.*
332. zur Hausen H. Condylomata acuminata and human genital cancer. *Cancer Res. 1976;36:530.*
333. zur Hausen H. Viruses in human cancer. *Eur J Cancer. 1999;35:1174-81.*
334. zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst. 2000;92:690-8. Review.*
335. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer. 2002;2:342-50.*

## ΛΕΞΙΛΟΓΙΟ-ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ



**Αγγελιοφόρο RNA (mRNA):** Μόριο RNA το οποίο χρησιμοποιείται ως μήτρα για την σύνθεση των πολυπεπτιδικών αλυσίδων με τη διαδικασία της μεταγραφής.

**Αδενοειδής εκβλάστηση (Adenoid):** Πυραμοειδές τμήμα του λεμφώδη δακτυλίου του φάρυγγα (δακτύλιος του Waldayer) στον άνω οπίσθοφάρυγγα επικαλυπτόμενο από μονόστιβο επιθήλιο. Ονομάζεται και φαρυγγική αμυγδαλή.

**Αδενοειδής υπερπλασία (Adenoid hyperplasia):** Καλοήθης υπερπλασία της αδενοειδούς εκβλάστηση, η οποία αποτελεί συχνό αίτιο απόφραξης του ανώτερου αεραγωγού στην παιδική ηλικία.

**Αλληλόμορφα Γονίδια (Alleles Genes):** Εναλλακτικές μορφές ενός γονιδίου σε μια συγκεκριμένη θέση ή περιοχή ενός χρωμοσώματος.

**Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης (PCR):** Μοριακή τεχνική πολλαπλασιασμού μιας

συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA με τη βοήθεια του ενζύμου της DNA πολυμεράσης και τη χρήση κατάλληλων ολιγονουκλεοτιδικών εκκινήτων κατά τη διάρκεια διαδοχικών κύκλων επιμήκυνσης.

**Αμυγδαλοειδής εκβλάστηση (Tonsil):** Τμήμα του λεμφώδη δακτυλίου του φάρυγγα (δακτύλιος του Waldayer), το οποίο βρίσκεται σε κάθε πλευρά στον τρίγωνο χώρο μεταξύ των παρίσθμιών καμάρων. Επικαλύπτεται από πολύστιβο μη κερατινοποιημένο πλακώδες επιθήλιο, το οποίο εμφανίζει σχισμοειδείς εμβανθύνσεις με αποτέλεσμα των σχηματισμό μικρών κοιλοτήτων, των αμυγδαλικών κρυπτών. Ονομάζεται και παρίσθμια αμυγδαλή ή απλά αμυγδαλή.

**Ανιχνευτής (Probe):** Σημασμένη αλληλουχία DNA ή RNA, που χρησιμοποιείται για να ανιχνεύσει την παρουσία συμπληρωματικής αλληλουχίας με τη χρήση μοριακής υβριδοποίησης.

**Αντίστροφη Μεταγραφάση-Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης (RT-PCR):** Μοριακή τεχνική μετατροπής του DNA σε RNA με τη χρήση του ενζύμου της αντίστροφης μεταγραφάσης, το οποίο καταλύει τον πολλαπλασιασμό DNA χρωσιμοποιώντας ως μήτρα RNA, και στη συνέχεια πολλαπλασιασμό μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA με τη βοήθεια του ενζύμου της DNA πολυμεράσης και τη χρήση κατάλληλων ολιγονουκλεοτιδικών εκκινήτων κατά τη διάρκεια διαδοχικών κύκλων επιμήκυνσης.

**Βίριο (Virion):** Το πλήρες σωματίδιο ενός ιού.

**Γονιδιακή Θεραπεία (Gene Therapy):** Θεραπευτική προσέγγιση για την αντιμετώπιση νοσημάτων με τη βοήθεια της γονιδιακής μεταφοράς στο κυτταρικό γονιδίωμα χρησιμοποιώντας



κατάλληλα συστήματα μεταφοράς.

**Γονιδίωμα (Genome):** Η πλήρης αλληλουχία DNA ενός οργανισμού που περιλαμβάνει το σύνολο της γενετικής πληροφορίας.

**Αμυγδαλοειδής υπερπλασία (Tonsillar hyperplasia):** Καλοήθης υπερπλασία των παρίσθμιων αμυγδαλών, η οποία αποτελεί συχνό αίτιο απόφραξης του ανώτερου αεραγωγού στην παιδική ηλικία.

**Γονότυπος (Genotype):** Η γενετική σύσταση ενός ατόμου, η οποία καθορίζεται από το είδος των αλληλόμορφων γονιδίων σε έναν συγκεκριμένο γονιδιακό τόπο.

**Δακτύλιος του Waldayer (Waldayer's ring):** Με τον όρο αυτό αναφέρεται ο λεμφώδης δακτύλιος του φάρυγγα, ο οποίος περιλαμβάνει τις δύο παρίσθμιες αμυγδαλές, τη φαρυγγική αμυγδαλή και η γλωσσική αμυγδαλή.

**Δεοξυριβονουκλικό οξύ (DNA):** Πολυμερές δεοξυριβονουκλεοτιδίων που περιέχουν δεοξυριβόζη και το οποίο μεταγράφεται σε RNA.

**DNA πολυμεράση (DNA polymerase):** Ένζυμο υπεύθυνο για τη αντιγραφή του DNA, που επιτυγχάνεται με τη χρησιμοποίηση κάθε συμπληρωματικής αλυσίδας της διπλής έλικας του DNA ως μήτρα για τη σύνθεση μιας νέας αλυσίδας.

**Ειδικότητα (Specificity):** *Η συχνότητα με την οποία μια διαγνωστική δοκιμασία δίνει αρνητικό αποτέλεσμα στις περιπτώσεις πραγματικού αρνητικού αποτελέσματος.*

**Εκκινητές (Primers):** *Ολιγονουκλεοτιδικές αλυσίδες DNA, οι οποίες χρησιμοποιούνται στην Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης για τον πολλαπλασιασμό συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA με επαναλαμβανόμενους κύκλους επιμήκυνσης τους.*

**Ενδοεπιθηλιακή Νεοπλασία τραχήλου της μήτρας (CIN):** *Καλοήθεις προκαρκινικές νεοπλασματικές αλλοιώσεις του τραχήλου της μήτρας για τις οποίες ενοχοποιείται ο ιός του θηλώματος του ανθρώπου HPV.*

**Ενισχυτής (Enhancer):** *Αλληλουχία DNA που δρα αυξάνοντας τη μεταγραφή ενός παρακείμενου γονιδίου στην ίδια αλυσίδα.*

**Ενσωμάτωση (Integration):** *Η προσθήκη πλασμιδιακού ή μη γενετικού υλικού σε συγκεκριμένη θέση του κυτταρικού γονιδιώματος.*

**Εξόνιο (Exon):** *Μεταγραφόμενες περιοχές ενός γονιδίου που υπάρχουν στο ώριμο mRNA και περιέχουν κωδικοποιούσα πληροφορία.*

**Ευαισθησία (Sensitivity):** *Η συχνότητα με την οποία μια διαγνωστική δοκιμασία δίνει θετικό αποτέλεσμα στις περιπτώσεις πραγματικού θετικού αποτελέσματος.*

**Ζεύγος βάσεων (bp):** Κάθε ζευγάρι που προκύπτει από τη συμπληρωματική σύνδεση πουρίνης – πυριμιδίνης με δεσμούς υδρογόνου στο δίκλωνο μόριο DNA.

**Ηλεκτροφόρηση (Electrophoresis):** Μοριακή τεχνική διαχωρισμού νουκλεϊκών ή πρωτεϊνικών μορίων με βάση το ηλεκτρικό τους φορτίο και το μέγεθός τους.

**Θηλώμα (Papilloma):** Καλοήθης αλλοίωση του επιθηλίου, η οποία οφείλεται κυρίως στον ιό του θηλώματος του ανθρώπου HPV. Συχνές εντοπίσεις θηλωμάτων στον άνθρωπο αποτελεί το δέρμα, η γενετική περιοχή, ο στοματικός βλεννογόνας, ο ρινικός βλεννογόνας, η ουροδόχος κύστη καθώς και ο λάρυγγας. Η ανίχνευση στη γενετική περιοχή θηλωμάτων στην παιδική ηλικία έχει σημαντικές νομικές συνέπειες λόγω της πιθανότητας σεξουαλικής κακοποίησης του παιδιού. Η θηλώματωση του λάρυγγα αποτελεί βασική αιτία πλήρους απόφραξης του αεραγωγού στην παιδική ηλικία.

**ΙΚό σωματίδιο (Virion):** Το πλήρες σωματίδιο ενός ιού στη μορφή που βρίσκεται εξωκυττάρια.

**ΙΚό ογκογονίδιο (Viral Oncogene):** Γονίδιο του ιικού γονιδιώματος η έκφραση του οποίου μπορεί να προκαλέσει καρκινική εξαλλαγή του κυττάρου ξενιστή.

**Ιντρόνιο (Intron):** Τμήμα ενός γονιδίου που αρχικά μεταγράφεται σε RNA, αλλά στη συνέχεια αφαιρείται με μάτισμα και δε συναντάται στ ώριμο mRNA.

**Ιοί (Viruses):** Οι μικρότεροι γνωστοί λοιμογόνιοι οργανισμοί, οι οποίο προσβάλλουν τον

άνθρωπο προκαλώντας μια σειρά από ποικίλης βαρύτητας ασθένειες.

**Ιολογία (Virology):** Ο κλάδος της επιστήμης, ο οποίος ασχολείται με τη μελέτη των ιών. Ο όρος *Κλινική Ιολογία (Clinical Virology)* αναφέρεται στη μελέτη των ιών που προσβάλλουν τον ανθρώπινο οργανισμό και έχει ως αντικείμενο τη διάγνωση, τη θεραπευτική αντιμετώπιση και τη πρόληψη των λοιμώξεων που προκαλούν οι ιοί στον άνθρωπο.

**Ιός του θηλώματος του ανθρώπου (HPV):** Μικροί DNA ιοί με διάμετρο περίπου 55-60nm, οι οποίοι ανήκουν στην οικογένεια των *Papovaviridae* ιών. Η ονομασία τους οφείλεται στην ιδιότητα τους να προκαλούν θηλώματα στον άνθρωπο. Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί περισσότεροι από 130 διαφορετικοί γονότυποι ιών HPV, οι οποίοι προκαλούν πλήθος αλλοιώσεων, καλοήθων και κακοήθων, στο δέρμα και τους βλεννογόνους τόσο στους ενήλικες όσο και στα παιδιά.

**Κάθετη μετάδοση (Vertical transmission):** Ο όρος αυτός αναφέρεται στην μετάδοση ενός λοιμογόνου παράγοντα, π.χ. ιού, από τη μητέρα στο βρέφος. Η μετάδοση του λοιμογόνου παράγοντα μπορεί να συμβεί πριν τον τοκετό μέσω του πλακούντα, τα τη διάρκεια του τοκετού ή από το γάλα της μητέρας κατά το θηλασμό.

**Καρκίνος τραχήλου της μήτρας (Cervical Cancer):** Κακόηθες νεόπλασμα του τραχήλου της μήτρας για την πρόκληση του οποίου ενοχοποιείται ο ιός του θηλώματος του ανθρώπου HPV. Αποτελεί τη δεύτερη σε συχνότητα κακοήθη νεοπλασία, μετά τον καρκίνο του μαστού, στις γυναίκες παγκόσμια.

**Κάθετη μετάδοση (Vertical transmission):** Με τον όρο αυτό αναφέρεται η μετάδοση ενός

παθολόγου παράγοντα, ιογενούς ή μικροβιακού, από τη μητέρα στο βρέφος πριν, κατά τη διάρκεια ή λίγο μετά από τον τοκετό.

**Καψίδιο (Capsid):** Το πρωτεϊνικό περίβλημα ενός ιού.

**Καψομερίδιο (Capsomeres):** Οι πρωτεϊνικές δομικές μονάδες, από τις οποίες αποτελείται το καψίδιο ενός ιού.

**Κλώνος (Clone):** Το σύνολο γενετικά όμοιων κυττάρων, που έχουν προέλθει με μίτωση από ένα μοναδικό προγονικό κύτταρο.

**Κυκλικό DNA (cDNA):** Το DNA που συντίθεται με μήτρα το RNA με τη χρήση της αντίστροφης μεταγραφάσης.

**Κυτταρικό ογκογονίδιο (Cellular Oncogene):** Ενεργοποιημένο πρωτο-ογκογονίδιο που μπορεί να προκαλέσει καρκινική εξαλλαγή στο κύτταρο που εκφράζεται.

**Κωδικόνιο (Codon):** Τριάδα βάσεων στο μόριο του DNA ή του RNA που κωδικοποιεί ένα αμινοξύ.

**Μάτισμα (Splicing):** Η απομάκρυνση των ιντρονίων και η επανασύνδεση των εξονίων σε επίπεδο RNA για τη δημιουργία του ώριμου mRNA.

**Μεθυλίωση DNA (DNA Methylation):** Ομοιοπολική προσθήκη μεθυλομάδων στο DNA, γεγονός που σχετίζεται με ελαττωμένα επίπεδα μεταγραφής ενός γονιδίου.

**Μεταγραφή (Transcription):** Η σύνθεση ενός μονόκλωνου RNA μορίου από ένα δίκλωνο DNA που χρησιμεύει ως μήτρα με τη βοήθεια του ενζύμου της RNA πολυμεράσης.

**Μεταλλαγή (Mutation):** Κάθε αλλαγή στην αλληλουχία του γενωμικού DNA που συμβαίνει τυχαία ή λόγω της επίδρασης χημικών ή φυσικών παραγόντων που ονομάζονται μεταλλαξιογόνα.

**Μετάφραση (Expression):** Η διαδικασία σύνθεσης ενός πεπτιδίου που κατευθύνεται από την αλληλουχία ενός συγκεκριμένου mRNA.

**Μοριακή Ιατρική (Molecular Medicine):** Νέος ταχύτατα εξελισσόμενος κλάδος της σύγχρονης ιατρικής επιστήμης, ο οποίος έχει ως στόχο τη μελέτη της μοριακής βάσης κληρονομικών και μη νοσημάτων, την εφαρμογή στην κλινική πράξη νέων μοριακών τεχνικών και μεθόδων καθώς και την ανάπτυξη θεραπευτικών προσεγγίσεων, όπως η γονιδιακή θεραπεία.

**Ογκογονίδιο (Oncogene):** Γονίδιο, ιικό ή κυτταρικό, που το πρωτεϊνικό του προϊόν μπορεί να προκαλέσει στο κύτταρο καρκινική εξαλλαγή.

**Ογκοκατασταλτικό γονίδιο (Oncosuppressive Gene) :** Κυτταρικό γονίδιο η απενεργοποίηση του οποίου οδηγεί στην καρκινική εξαλλαγή του κυττάρου.

**Περιοριστικό ένζυμο (Restriction Enzyme):** Ενδονουκλεάση που τένει το δίκλωνο DNA σε

ειδικές νουκλεοτιδικές αλληλουχίες.

**Περιοχή (Domain):** Περιοχή της αμινοξικής αλληλουχίας μιας πρωτεΐνης που συνδέεται με μια ειδική λειτουργία ή το αντίστοιχο τμήμα σε ένα γονίδιο.

**Πλασμίδιο (Plasmid):** Ανεξάρτητο πολλαπλασιαζόμενο, εξωχρωμοσωμικό κυκλικό μόριο DNA.

**Πολλαπλασιασμός ή Ενίσχυση (Amplification):** Η παραγωγή πολλαπλών αντιγράφων μιας αλληλουχίας DNA.

**Πολυμορφισμοί μεγέθους περιοριστικών τμημάτων (RFLP):** Η ποικιλομορφία στην αλληλουχία του DNA που αλλάζει το μέγεθος ενός τμήματος που προκύπτει μετά από πέψη με ένα περιοριστικό ένζυμο.

**Πρωτεΐνη Ras (Ras Protein):** Ενδοκυττάρια πρωτεΐνη της μεμβράνης του κυττάρου με δράση GTPάσης μεγέθους 21kD που κωδικοποιείται από τα ογκογονίδια H-, K- και N-ras.

**Πρωτο-ογκογονίδιο (Proto-oncogene):** Κυτταρικό ογκογονίδιο που ενέχεται στον έλεγχο της φυσιολογικής κυτταρικής λειτουργίας, η ενεργοποίηση των οποίων οδηγεί στη μετατροπή τους σε ογκογονίδια που μπορούν να προκαλέσουν καρκινική εξαλλαγή.

**ras ογκογονίδια (ras oncogenes) :** Οικογένεια ογκογονιδίων με σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση βασικών κυτταρικών λειτουργιών, όπως ο πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίηση του κυττάρου.

Στον άνθρωπο έχουν ταυτοποιηθεί τρία γονίδια *ras*: το *K-ras* στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 12 (12p12.1-*ptr*), το *H-ras* στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 11 (11p15.1-*p15.5*) και το *N-ras* στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 1 (1p22-*p32*). Έχουν επίσης ταυτοποιηθεί και δύο ψευδογονίδια, τα *H-ras 2* και *K-ras 1*, τα οποία όμως δεν είναι λειτουργικά. Τα ογκογονίδια *ras* συγκαταλέγονται μεταξύ των κυριότερων γονιδίων με καθοριστικό ρόλο στην καρκινογένεση.

**Ριβονουκλεϊκό οξύ (RNA):** Πολυμερές ριβονουκλεοτιδίων που περιέχουν ριβόζη αντί για δεοξυριβόζη και στο οποίο μεταγράφεται το DNA.

**RNA πολυμεράσες (RNA polymerases):** DNA εξαρτώμενα ένζυμα μεταγραφής που συνθέτουν RNA από πρόδρομα τριφωσφορικά ριβονουκλεοτίδια.

**Σημειακή μετάλλαξη (Point Mutation):** Η μετάλλαξη που οφείλεται στην αντικατάσταση ενός νουκλεοτιδίου από ένα άλλο.

**Τράχηλος της μήτρας (Uterine Cervix):** Το χαμηλότερο τμήμα της μήτρας, μήκους περίπου 3cm και διάμετρου 2-2,5cm, το οποίο επικοινωνεί με την κοιλότητα του σώματος της μήτρας με το έσω στόμιο της μήτρας και με την κοιλότητα του κόλπου με το έξω στόμιο της μήτρας. Ο τράχηλος της μήτρας διακρίνεται στον εξωτράχηλο και στον ενδοτράχηλο.

**Υβριδοποίηση (Hybridization):** Η μοριακή τεχνική ζευγαρώματος με βάση τη συμπληρωματικότητα μιας RNA και μιας DNA αλυσίδας ή δύο διαφορετικών DNA.



**Υπερέκφραση (Overexpression):** *Αυξημένη έκφραση ενός πρωτεϊνικού μορίου λόγω τροποποιήσεων σε επίπεδο DNA, μεταγραφής, μετάφρασης ή μετα-μεταφραστικών μηχανισμών.*

**Υποκινητής (Promoter):** *Αλληλουχία που καθορίζει τη θέση έναρξης της μεταγραφής και ελέγχουν την ποσότητα του παραγόμενου mRNA.*

**Φαινότυπος (Phenotype):** *Το αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης του γονότυπου με περιβαλλοντικούς παράγοντες που προκύπτει από την έκφραση ενός συγκεκριμένου γονιδίου ή γονιδίων.*

**Φάκελος ή Έλυτρο (Envelope):** *Το περίβλημα με το οποίο περιβάλλεται το νουκλεοκαψίδιο ορισμένων ιών.*

**Χιλιοβάση (kb):** *Χίλια ζεύγη βάσεων μιας αλληλουχίας DNA.*

**Ψευδογονίδιο (Pseudogene):** *Αλληλουχία DNA που διαθέτει τη δομή εκφραζόμενου γονιδίου αλλά δεν είναι λειτουργική και δεν παράγει πρωτεϊνικό προϊόν.*

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

### *ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ*

1. **Transcriptional activation of H- and N-*ras* oncogenes in human cervical cancer.** Mammas I., Zafiropoulos A., Koumantakis E., Sifakis S., Spandidos D.A. **Gynecologic Oncology** 2004;92(3):941-8.
2. **Involvement of *ras* genes in female genital tract cancer (Review).** Mammas I., Zafiropoulos A., Spandidos D.A. **International Journal of Oncology** 2005;26:1241-1255.
3. **Human Papilloma Virus (HPV) typing in relation to *ras* oncogene mRNA expression in HPV-associated human squamous cervical neoplasia.** Mammas I., Zafiropoulos A., Sifakis S., Sourvinos G., Spandidos D.A. **International Journal of Biological Markers** 2005;20(4)257-263.
4. **Human papilloma virus in hyperplastic tonsillar and adenoid tissues in children.** Mammas I., Sourvinos G., Michael C., Spandidos D.A. **Journal of Pediatric Infectious Diseases** 2006 (in press).

### *ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΛΠΙΑ*

1. **Transcriptional activation and mutations of *ras* family genes in human cervical neoplasia.** Mammas I., Zafiropoulos A., Sifakis S., Koumantakis E., Spandidos D.A. *7<sup>th</sup> World Congress on Advances in Oncology and 5<sup>th</sup> International Symposium on Molecular Medicine, Hersonissos, Crete, 10-12 October, 2002.*
2. **Evaluation of *ras* family oncogenes mRNA expression as a marker of malignant transformation in cervical neoplasia.** Mammas I., Zafiropoulos A., Sifakis S., Koumantakis E., Spandidos D.A. *28<sup>th</sup> European Congress of Obstetrics and Gynaecology, Athens, 12-15 May, 2004.*
3. ***ras* and angiogenesis: association between mRNA expression levels of *ras* family oncogenes and vascular endothelial growth factor (VEGF) in human cervical neoplasia.** Soufla G., Mammas I., Zafiropoulos A., Sifakis S., Koumantakis E., Spandidos D.A. *18th Meeting of the European Association for Cancer Research, Innsbruck, Austria 3-6 July 2004.*

- 4. Human Papilloma Virus (HPV) infection and host cellular genes: relationship between “high-risk” HPVs and *ras* oncogenes mRNA expression in human squamous cervical cancer.** Mammas I., Zafiropoulos A., Sifakis S., Sourvinos G., Spandidos D.A. *10<sup>th</sup> World Congress on Advances in Oncology and 8<sup>th</sup> International Symposium on Molecular Medicine, Hersonissos, Crete, 13-15 October, 2005.*
- 5. Human Papilloma virus (HPV) in childhood: Detection of HPV DNA in children’s oral cavity is not correlated with sexual abuse.** Mammas I., Sourvinos G., Michael C., Spandidos D.A. *11<sup>th</sup> World Congress on Advances in Oncology and 9<sup>th</sup> International Symposium on Molecular Medicine, Hersonissos, Crete, 12-14 October, 2006.*

#### *ΑΛΛΕΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ*

- 1. Consumption of ready-to eat cereals in relation to health and diet indicators among school adolescents in Crete, Greece.** Kafatos A., Linardakis M, Bertsias G., Mammas I., Fletcher R., Bervanaki F. *Ann Nutr Metab* 2005 Jul;49(3):165-172.
- 2. Nutrient intake and food consumption among medical students in Greece assessed during a Clinical Nutrition course.** Mammas I., Bertsias G., Linardakis M., Moschandreas J., Kafatos A. *International Journal of Food and Nutrition Sciences* 2004 Jan;55(1):17-26.
- 3. Cigarette smoking, alcohol consumption and serum lipid profile among medical students in Greece.** Mammas I., Bertsias G., Linardakis M., Tzanakis N., Labadarios D., Kafatos A. *European Journal of Public Health* 2003 Sep;13(3):278-282.
- 4. Overweight and obesity in relation to cardiovascular disease risk factors among medical students in Crete, Greece.** Bertsias G., Mammas I., Linardakis M., Kafatos A. *BMC Public Health* 2003; 3:3.
- 5. Severe fenthion intoxications due to ingestion and inhalation with survival outcome.** Tsatsakis A., Bertsias G., Liakou V, Mammas I., Stiakakis I., Tzanakakis G. *Human & Experimental Toxicology* 2002; 21(1): 49-54.
- 6. Acute fatal poisoning by Methomyl caused by inhalation and transdermal absorption.** Tsatsakis A., Bertsias G., Mammas I., Stiakakis I., Georgopoulos D. *Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology* 2001; 66: 415-420.

Ακολουθούν τα πλήρη ανάτυπα των δημοσιεύσεων που προέκυψαν από την παρούσα διατριβή.

## Transcriptional activation of H- and N-*ras* oncogenes in human cervical cancer

Ioannis N. Mamas,<sup>a</sup> Alexandros Zafiropoulos,<sup>a</sup> Eugenios Koumantakis,<sup>b</sup>  
Stavros Sifakis,<sup>b</sup> and Demetrios A. Spandidos<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Virology, Medical School, University of Crete, Heraklion 71100, Crete, Greece

<sup>b</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, University Hospital of Heraklion, Heraklion, Crete, Greece

Received 7 September 2003

### Abstract

**Objective.** Overexpression of p21 protein has been detected in human cervical cancer. However, to date, there are no data on the differential activation of the three *ras* genes at the transcriptional level in cervical lesions. The purpose of this study was to evaluate the quantitative and qualitative changes of expression of the *ras* family genes in the development of human cervical cancer.

**Methods.** The expression of *ras* mRNA levels in 35 human cervical specimens [11 normal cervix, 15 cervical intraepithelial neoplasia (CIN), 9 cervical cancer] was examined using the RT-PCR technique. In addition, we studied the incidence of point mutations in codon 12 of each *ras* gene using RFLP analysis and human papilloma virus (HPV) status.

**Results.** The transcript levels for H-*ras* and N-*ras* were significantly higher in cancer cases compared to normal cervical tissues ( $P = 0.0002$  and  $P = 0.001$ , respectively) and CIN lesions ( $P < 0.0001$  and  $P = 0.002$ , respectively). The transcript levels for K-*ras* were similar in normal cervical tissue, CIN and cervical cancer. A strong positive correlation was found between H- and N-*ras* expression ( $P = 0.001$ ) and no correlation between H- and K- or N- and K-*ras* expression. Point mutations were detected only in three samples, located in codon 12 of K-*ras* gene. No relationship was found between expression levels of each *ras* gene and the presence of HPV.

**Conclusion.** Our findings indicate the expression pattern of the three *ras* genes in cervical tissue and the involvement of H- and N-*ras* up-regulation in the pathogenesis of cervical cancer independent of HPV infection.

© 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** *ras*; RT-PCR; Expression; Cervical cancer; CIN; HPV

### Introduction

Cervical cancer is one of the most common malignancies affecting women world-wide. More than 471,000 new cases are diagnosed annually predominantly in less developed countries, where 80% of the world's cervical cancer occurs [1]. In United States, 12,900 new cases are diagnosed each year and approximately one-third of these women die of the disease [2]. In the last decades, the Papanicolaou (Pap) smear screening has led to a steep decline in incidence and mortality from cervical cancer world-wide [3].

Human papilloma virus (HPV) has been identified as the principal etiologic agent for cervical cancer and its precursors. The presence of specific types of HPV—mainly types

16 and 18 ('high risk')—is associated with high-grade intraepithelial lesions and at least 90% of cervical carcinomas [4–7]. The oncogenic potential of HPV is genetically confined to two small open reading frames (ORFs) encoding the proteins E6 and E7 [6,7]. High risk E6 and E7 interact with the host cell DNA and functionally inactivate the p53 and the retinoblastoma (Rb) protein [8,9]. Both p53 and Rb are important tumor suppressor genes, whose products maintain cell cycle regulation, protect the cellular repair process and are involved in apoptosis. To act as oncogenes, however, E6 and E7 have to be uncoupled from their normal function during the regular permissive life cycle [10,11]. In vitro experiments have shown that HPV 16 and 18 are able to immortalize primary keratinocytes, but they are not sufficient to engender a full tumorigenic conversion [12]. Because only a small fraction of HPV-infected women ever develop cervical cancer, additional environmental, lifestyle and genetic factors, such as the activation of cellular

\* Corresponding author. Laboratory of Virology, Medical School, University of Crete, Heraklion 71100, Crete, Greece. Fax: +30-810-394633.

E-mail address: [spandidos@spandidos.gr](mailto:spandidos@spandidos.gr) (D.A. Spandidos).

oncogenes, are likely to be involved in the persistence and progression of HPV infection to cervical cancer.

Harvey (H)-*ras*, Kirsten (K)-*ras* and Neuroblastoma (N)-*ras* genes have been localized to chromosomes 11, 12 and 1, respectively, in humans. All three *ras* genes have a common structure with a 5' non-coding exon (exon I) and four coding exons (exons I–IV) while the introns of the genes differ widely in size and sequence [13]. The K-*ras* gene has two alternative IV coding exons, thus encoding two proteins, K-*rasA* and K-*rasB*, with K-*rasB* being more abundant. Various reports have been published concerning transcriptional regulation of the H-, K- and N-*ras* genes [13]. All the *ras* oncogenes (H-, K- and N-*ras*) encode for a 21-kDa (p21) protein, 189 amino acids long (except for K-*rasB* which is 188), with GTPase activity which participates in cellular signal transduction [14,15]. Comparison of the amino acid sequence from the three p21 proteins demonstrates complete homology in the N-terminal 86 amino acids, 85% homology in the next 80 amino acids and no homology in the rest.

Activation of *ras* oncogenes by point mutations has been suggested to play an important role in the multistep process of carcinogenesis [16]. The most frequent *ras* alterations in human cancer are mutations in codons 12, 13 and 61 which abolish p21 GTPase activity rendering p21 constitutively activated [16,17]. Overexpression of the *ras* genes has also been shown to confer to carcinogenesis [18]. In vitro experiments have shown that the overproduction of even the normal *ras* p21 protein is sufficient to confer a transforming potential

on cultured cells [13,18]. Elevated expression of *ras* genes has been reported for several human cancers including breast, colon, head and neck, bladder and lung and has been associated with the development of the disease [19].

Several studies implicate the activated *ras* genes by point mutations, especially in codon 12, in cervical cancer, although at low frequency [16,20–24]. The *ras* gene mutations have also been detected in non-malignant lesions, indicating that the *ras* genes play an important role in the initial stages of carcinogenesis of the cervix [21]. Elevated expression of *ras* p21 protein has been found in cervical tumors as opposed to benign or premalignant lesions [25–28]. However, expression of *ras* genes in cervix has been studied only at the translational level using immunohistochemical methods. There is no previous data on the transcriptional level of each *ras* oncogene in cervical intraepithelial neoplasia and cancer.

The aim of this study was to examine the expression of N-*ras*, K-*ras* and H-*ras* genes individually at the mRNA level in cervical neoplasia and normal cervix and to investigate their relationship with HPV infection.

## Materials and methods

### Tissue specimens

Among 77 female patients treated at the Department of Obstetrics and Gynecology, University Hospital of Hera-

Table 1  
Primers and PCR amplification conditions used for *ras* expression analysis, detection of codon 12 *ras* mutations and HPV

Gene	Primers	PCR profile
H- <i>ras</i> (RNA)	5-GACGGAATATAAGCTGGTGG-3 (S) 5-TAACTACCCCTCTGCACGGA-3 (A)	94°C for 35 s (denaturation) 60°C for 40 s (annealing) 72°C for 40 s (extension)
K- <i>ras</i> (RNA)	5-ACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGACCT-3 (S) 5-CAAATCACATTATTTCTACCAGGACCT-3 (A)	94°C for 30 s (denaturation) 58°C for 30 s (annealing) 72°C for 40 s (extension)
N- <i>ras</i> (RNA)	5-AATCCAGCTAATCCAGAACC-3 (S) 5-TGGTCTCTCATGGCACTGTA-3 (A)	94°C for 30 s (denaturation) 58°C for 30 s (annealing) 72°C for 40 s (extension)
β-Actin (RNA)	5-AGCCTCGCCTTTGCCGA-3 (S) 5-CTGGTGCCTGGGGCG-3 (A)	
β2-m (DNA)	5-TCCAACATCAACATCCCGGT-3 (S) 5-TCCCCAAATTCTAAGCAGA-3 (A)	
H- <i>ras</i> (DNA)	5-GAGACCCTGTAGGAGGACCC-3 (S) 5-GGGTGCTGAGACGAGGGACT-3 (A)	94°C for 35 s (denaturation) 60°C for 40 s (annealing) 72°C for 40 s (extension)
K- <i>ras</i> (DNA)	5-ACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGACCT-3 (S) 5-TCAAAGAATGGTCTGGACC-3 (A)	94°C for 35 s (denaturation) 60°C for 40 s (annealing) 72°C for 40 s (extension)
N- <i>ras</i> (DNA)	5-AACTGGTGGTGGTTGGACCA-3 (S) 5-ATATTCATCTTACAAAGTGGTCTGGA-3 (A)	94°C for 35 s (denaturation) 60°C for 40 s (annealing) 72°C for 40 s (extension)
HPV (DNA)	5-TTTGTTACTGTGGTAGATAC-3 (GP5) 5-GAAAAATAAACTGTAATCA-3 (GP6)	94°C for 50 s (denaturation) 52°C for 45 s (annealing) 72°C for 45 s (extension)

Note: S = sense primer; A = antisense primer.

klion, Crete, Greece from July 2002 to December 2002 who undertook surgical resection or biopsy, we selected for our study all patients with cervical cancer, cervical intraepithelial neoplasia and normal cervix. Finally, our sample group consisted of 11 normal cervical tissues, 15 tissues with cervical intraepithelial neoplasia (6 with CIN I, 2 with CIN II and 7 with CIN III) and 9 cervical cancers (1 adenocarcinoma and 8 squamous cell carcinoma). Clinical staging was determined using the International Federation of Gynaecology and Obstetrics (FIGO) classification: 2 were IA, 1 was IB, 4 were IIB and 2 were III. Normal cervical tissues used as controls were obtained from patients who had hysterectomies done for non-malignant condition. At the time of surgical resection, the tissue was put in cryotubes and snap frozen in liquid nitrogen. The specimens were subsequently stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Clinicopathological data (histological subtype, stage, grade, age, tobacco use, lifestyle, outcome and survival data) were available for all specimens examined. The present study was approved by the ethics committee of the University of Crete and all the patients participating in the study gave written informed consent.

#### Extraction and quantification of mRNA

Total RNA was isolated from fresh tissues using the Trizol reagent (Life Technologies Ltd., UK) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 1 ml of reagent was added to each tube. The samples were homogenized using a mechanical mixer and transferred to a 1.5-ml Eppendorf tube. Chloroform (200  $\mu\text{l}$ ) was added, and the tube was vortexed and centrifuged at 14,000 rpm for 15 min. The RNA was precipitated with an equal volume of isopropanol and washed with 75% ethanol. The RNA was air-dried and resuspended in water treated with diethyl pyrocarbonate. The RNA preparation was treated with DNase I to remove residual traces of DNA, purified with the phenol–chloroform method and precipitated with ethanol. RNA concentration and purity was determined on a UV spectrophotometer (Hitachi Instruments Inc., USA) by the 260-nm absorbance and 260- to 280-nm absorbance ratio, respectively. One percent agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining were used to examine RNA integrity.

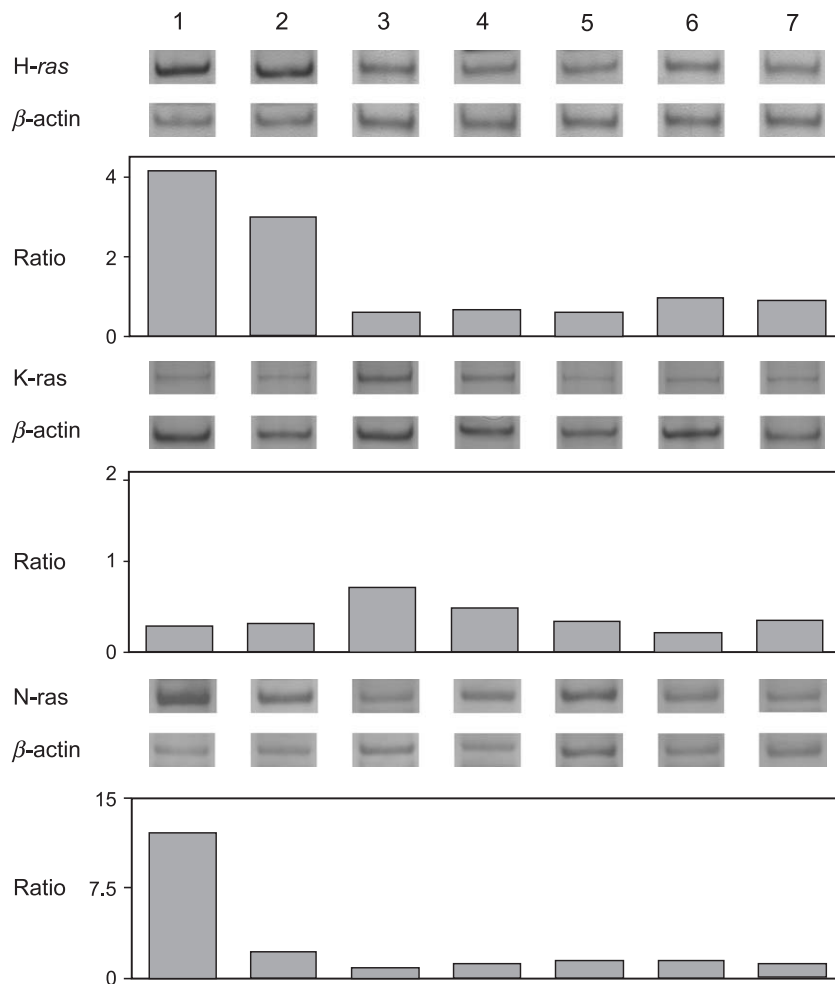


Fig. 1. Representative examples of H-, K- and N-ras genes expression in cervical tissue. Samples 1, 2: cancer; 3–5: CIN; 6, 7: normal. Ratio: integrated density of the band of each *ras* gene divided by the integrated density of the band of  $\beta$ -actin.

### RT-PCR

Reverse transcription reactions for the preparation of first-strand cDNA from 1 µg of total RNA were performed for 1 h at 52°C, using 15 units Thermoscript reverse transcriptase, 40 units RNaseOut, 50 ng of random hexamers and 1.0 mM of each dNTP in a total volume of 20 µl of 1× First Strand cDNA Synthesis Buffer containing 5 mM dithiothreitol (DTT), ensued by incubation for 20 min at 37°C with 2 units of *Escherichia coli* RNaseH to avoid RNA contamination of cDNA, according to the manufacturer's protocol (Life Technologies Ltd.).

PCR assays were carried out in a PTC-200 programmable thermal controller (MJ Research Inc., USA); 1 µl of cDNA was amplified in a total volume of 10 µl containing 1× PCR reaction buffer, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4 mM dNTPs and 0.6 units Platinum *Taq* DNA polymerase (Life Technologies Ltd.), with 30 pmol of each primer set. The oligonucleotide primers and the amplification conditions used are listed in Table 1. *β-Actin* was used as an internal control in all PCR reactions. The PCR product size of *H-ras* was 151 bp, *K-ras* 357 bp, *N-ras* 150 bp and *β-actin* 175 bp.

To evaluate the above conditions for specific and optimum amplification of each primer set, and to achieve integrated density measurements at the exponential amplification phase of the PCR reaction, we performed kinetic analysis increasing the number of PCR cycles from 24 to 38, for different annealing temperatures 53°C, 55°C and 57°C (data not shown). For this purpose, a mixture of all cDNA preparations was used as reference sample.

PCR products were analysed by 10% polyacrylamide gel electrophoresis (29:1 ratio acrylamide/bis-acrylamide) and silver stained. Gels were scanned on an Agfa SnapScan 1212u (Agfa-Gevaert N.V., Belgium). Integrated density of the bands was used as quantitative parameter and was calculated by digital image analysis (Scion image). The mRNA levels for each gene were expressed as the ratio of the integrated density of the band of each *ras* gene versus the corresponding levels of *β-actin*.

### DNA extraction and PCR

DNA extraction was performed according to standard procedures [21] and stored at −20°C until PCR amplification. The presence of amplifiable DNA was verified for each sample by performing PCR with primers specific for *β2*-microglobulin. The oligonucleotide primers and the amplification conditions used are listed in Table 1. PCR products for HPV were analysed on 2% agarose gel and photographed on a UV light transilluminator. All PCR reactions included appropriate negative controls. DNA extracted from HeLa cells was used as positive control for the HPV PCR detection method.

### RFLP analysis of *ras* mutations

Twenty microliters of the amplification product was digested for 16 h with 20 units of the restriction endonucleases *MspI* (*H-ras*) and *BstNI* (*K-ras* and *N-ras*) in conditions recommended by the suppliers. Ten microliters of the digestion product was electrophoresed through an 8% polyacrylamide gel and silver stained. Genomic DNA from the EJ and SW480 cell lines were used as positive controls for the *H-ras* and *K-ras* codon 12 mutations, respectively [21]. With regard to *N-ras*, genomic DNA from a previously described donor heterozygous for the *N-ras* codon 12 mutation [21] was used as a positive control. Genomic DNA from previously genotyped donors [21] was used as negative controls for all *ras* mutations.

### Statistical analyses

The Kruskal–Wallis test was applied to assess possible differences in expression levels of *H-*, *K-* and *N-ras* genes between the three patient groups (normal, CIN and cervical cancer) [29]. Pairwise correlations between the expression levels of *H-* and *K-*, *K-* and *N-*, *H-* and *N-ras* genes were performed in the total patient group using Kendall's tau method (Kendall's coefficient of rank correlation). Mann–Whitney tests were used to assess differences in gene expression levels according to HPV status. Statistical analyses were performed using SPSS version 11.5. The limit of statistical significance was set at  $P < 0.05$ .

## Results

Overall, *H-ras* gene expression ranged from a ratio of <0.0001 to 9.94 (median 0.95, mean 0.96 and SD 6.87). The ranges for *K-ras* and *N-ras* gene expression were

Table 2  
Expression (mRNA levels/mRNA levels *β-actin*) of *H-*, *K-* and *N-ras* family genes in 35 hysterectomy patients<sup>a</sup>

Variable	Group CA (n = 9)		Group CIN (n = 15)		Controls (n = 11)		P-value <sup>b</sup>
	Mean (SD) <sup>c</sup>	Median	Mean (SD) <sup>c</sup>	Median	Mean (SD) <sup>c</sup>	Median	
Age (years)	58 (17.0)	53	48 (14.1)	46	51 (12.0)	49	NS
<i>H-ras</i> (ratio)	5.17 (1.59)	4.30	0.43 (11.0)	0.64	0.73 (2.44)	0.91	<0.0001
<i>K-ras</i> (ratio)	0.22 (18.2)	0.58	0.14 (20.9)	0.45	0.38 (1.59)	0.36	NS
<i>N-ras</i> (ratio)	3.53 (1.96)	2.50	0.87 (12.8)	1.43	1.44 (1.34)	1.29	0.0011

<sup>a</sup> Nine patients with cancer of the uterus (CA), 15 with cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and 11 controls.

<sup>b</sup> Kruskal–Wallis tests, NS = not significant ( $P > 0.05$ ).

<sup>c</sup> The mean and SD are presented for *H-*, *K-* and *N-ras* ratios, where SD is defined as the antilog transformed SD of the logarithmic values.



Table 3  
Detection of H-, K- and N-*ras* mutations in codon 12 and HPV by patient group

Variable	Group CA (n = 9)	Group CIN (n = 15)	Controls (n = 11)
N (%)			
H- <i>ras</i> mutation	None	None	None
K- <i>ras</i> mutation	2 (22%)	1 (7%)	None
N- <i>ras</i> mutation	None	None	None
HPV positive	8 (89%)	11 (73%)	4 (36%)

<0.0001–1.25 (median 0.45, mean 0.21 and SD 11.7) and 0.0001–12.08 (median 1.55, mean 1.46 and SD 5.87), respectively (Fig. 1). Patient age ranged from 29 to 82 years (median 49 years, mean 51 and SD 14.5 years). There was no evidence of a difference in age between patients with normal cervical tissue, CIN and cervical cancer (Table 2). No significant differences were found in marital status, region of residence, educational level and tobacco use between the three groups.

In Table 3, the *ras* family gene expression ratios are displayed according to patient group. There was strong evidence of a difference in H- ( $P < 0.0001$ ) and N-*ras* ( $P = 0.0011$ ) but not K-*ras* expression between the three patient groups (Table 3). Pairwise analysis indicated that the transcript levels (mean values) for H- and N-*ras* were significantly higher in the cancer cases compared to normal cervical tissues ( $P = 0.0002$  and  $P = 0.001$ , respectively) and CIN lesions ( $P < 0.0001$  and  $P = 0.002$  respectively) while no significant difference was found between cancer and CIN groups. The highest levels of H- and N-*ras* mRNAs were found in early stage

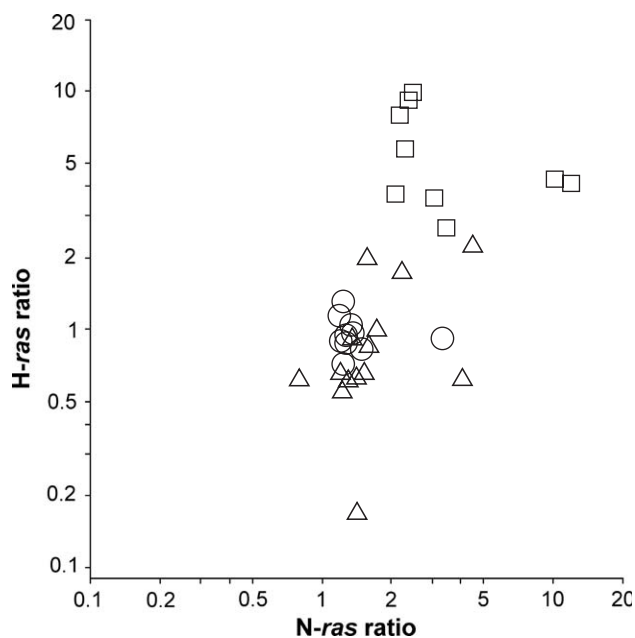


Fig. 2. Relationship between H-*ras* and N-*ras* expression in cervical tissue. □ cancer, △ cervical intraepithelial neoplasia, ○ controls.

Table 4  
Expression levels of H-, K- and N-*ras* genes by HPV status

Variable	HPV-negative (n = 12)		HPV-positive (n = 23)		P-value <sup>a</sup>
	Mean (SD) <sup>b</sup>	Median	Mean (SD) <sup>b</sup>	Median	
Age (years)	49 (15.4)	48	53 (14.0)	50	NS
H- <i>ras</i> (ratio)	0.91 (2.88)	0.93	0.99 (9.72)	0.96	NS
K- <i>ras</i> (ratio)	0.24 (11.9)	0.41	0.20 (12.2)	0.45	NS
N- <i>ras</i> (ratio)	2.16 (1.98)	1.61	1.19 (8.30)	1.43	NS

<sup>a</sup> Mann–Whitney test, NS = not significant ( $P > 0.05$ ).

<sup>b</sup> The mean and SD are presented for H, K and N ratios, where SD is defined as the antilog transformed SD of the logarithmic values.

cervical cancer (Stage IA and IB). The transcript levels for K-*ras* were similar in normal cervical tissue, CIN and cervical cancer. We observed a significant positive correlation ( $P = 0.001$ ) between H- and N-*ras* expression (Fig. 2) and no correlation at all between H- and K- or N- and K-*ras* expression in the total sample. H-*ras* appeared to be strongly co-expressed with N-*ras* in both CIN and cancer groups while no correlation was found between H- and N-*ras* expression in normal cervical tissues.

Among the 35 samples analysed, only 3 (2 with cancer and 1 with CIN) were found to contain a K-*ras* mutation in codon 12 (Table 3). No point mutations were found in codon 12 of H- and N-*ras*. No statistical association was found between expression levels of each *ras* gene and the presence of mutation in K-*ras*. As there were only three positive samples with mutations, no correlation with the clinicopathological parameters was undertaken.

HPV DNA was detected in 4 (36%) normal, 11 (73%) CIN and 8 (89%) cervical cancer specimens (Table 3). The highest expression levels of H- and N-*ras* were observed among HPV-positive samples with cancer. However, there was no evidence that expression levels of *ras* family genes differed according to HPV status (Table 4).

## Discussion

In the present study, we assessed the transcription levels of H-*ras*, K-*ras* and N-*ras* oncogenes in 35 cervical biopsies using RT-PCR technique. To our knowledge, this is the first report on the differential mRNA expression of the *ras* family genes in human cervical neoplasia. To date, various immunohistochemical studies for cervical cancer and dysplasia have demonstrated p21 immunoreactivity in 12–80% of cases [22,26–28,30]. Elevated p21 protein has been associated with the development of cervical cancer [22] while no differences have been observed between normal cervix and cervical tissue with CIN [25]. Our data demonstrate overexpression of *ras* genes in cervical cancer and suggest that the previously reported high levels of p21 can be attributed specifically to the elevated expression levels of H- and N-*ras* gene.

The frequency of K-*ras* gene mutations at codon 12 in specimens with cervical neoplasia was 3/24 (12.5%) while

no mutations of H- and N-*ras* were detected. This is consistent with the results of previous studies that have shown that the incidence of *ras* mutations in cervical carcinomas is low and preferentially occur at codon 12 of the K-*ras* gene [16,22–24]. In studies focused on the Greek population, the frequency of point mutations at codon 12 of the K-*ras* gene in premalignant and malignant cervical lesions ranges from 17% to 24.4% [20,21]. It has been suggested that the mutational activation of the K-*ras* gene may be involved in the initial stages of cervical carcinogenesis [21].

In our study, we did not find any correlation between expression levels of H- and N-*ras* genes and the presence of mutations in codon 12. Similar results have been reported by Lee et al. [22] who showed no correlation between H-*ras* protein and codon 12 point mutation in cervical cancer. It appears that other mechanisms, such as amplification and mutation of different codons within the regulatory regions of *ras* genes, may be responsible for protein expression. The relationship between H- and N-*ras* expression suggests the presence of similar regulator elements in the promoter sites of these two genes activated in cervical tissue.

Although the presence of HPV is detected in over 90% of cervical carcinomas [31], it is insufficient to cause carcinogenesis. In vitro studies have demonstrated that activated H-*ras* gene can induce tumorigenic conversion of HPV-immortalized cervical keratinocytes, indicating a cooperative effect between the *ras* and *E6/E7* genes in cellular transformation [32,33]. It has also been found that overexpression of HPV 18 E6, *c-myc* or activated H-*ras* can partially overcome the growth inhibitory effect of wild-type p53 in NIH3T3 cells [34]. Additionally, expression of oncogenic *ras* induces transformation only in cooperation with another oncogene such as *myc*, E1A, SV40 large T antigen, or when an onco-suppressor gene like *p53* or *p16* is inactivated [35]. In our study, no correlation was found between HPV detection and *ras* expression, indicating that *ras* overexpression may be an important event in cervical tumorigenesis independent of HPV infection. The exact mechanism through which overexpression of *ras* genes is implicated in cervical cancer remains to be elucidated.

The vast majority of low-grade CIN lesions regress spontaneously, and it has been suggested that approximately only 1% of CIN1 lesions and about 10% of CIN3 lesions actually progress to cancer [36,37]. In the absence of genetic markers to monitor disease progression, the current treatment of choice for all high-grade CIN cervical lesions is still complete excision of the lesion inclusive of the transformation zone. Sensitive and objective diagnostic markers that could assess the potential of the invasiveness of cervical neoplastic cells detected in cervical cancer patients would be of tremendous clinical value. The expression of cellular genes such as the ribosomal protein S12 gene has been suggested as early molecular diagnostic identifier for the screening of cervical cancer [38]. In our study, the expression of all *ras* genes was detected in cervical tissues despite

the histopathological status. No difference was found in *ras* expression between normal tissues and those demonstrating all grades of CIN. This result is complementary to previous reports [25] using immunohistochemical methods indicating that *ras* p21 is not likely to be predictive of CIN progression. However, the observed quantitative differences in H- and N-*ras* expression between malignant and non-malignant lesions allow the distinct possibility of employing the *ras* gene family expression as an early molecular diagnostic identifier for the screening of human cervical cancer.

Expression of *ras* p21 has been related to the pathological parameters and the clinical outcome of the patients in a variety of human cancers [17]. In cervical cancer, expression of *ras* p21 has been associated with poor prognosis [28], lymph node metastasis [39] and occurs in the late stage of the disease [40]. However, observations made by other groups have not supported the significance of *ras* expression in the disease progression and survival [22,30]. In our study, higher levels of H- and N-*ras* mRNAs were found in early stage cervical cancer (Stage IA and IB) than in advanced stage cervical cancer (IIB and III) which is in agreement with observations from related studies on other types of cancer [16]. This finding may indicate a possible role of *ras* expression in the prognosis of cervical cancer because it has been found that the normal H-*ras* can act as an onco-suppressor [41]. The clinical follow-up of our samples will help to examine the significance of *ras* overexpression as a prognostic factor in cervical neoplasia.

Overexpression of *ras* genes can induce neoplastic transformation of cells in vitro [42] and has been associated with the development of several human tumors [43]. Moreover, expression of the oncogenic Ras-family proteins is implicated in enhanced resistance of cancer cells to radiation therapy [44,45]. Karlson et al. [46] have shown that the inhibition of H-*ras* by treatment of a transformed embryonic rat fibroblast cell line with a peptidomimetic FTase-selective inhibitor results in higher levels of apoptosis after radiation therapy. The inhibition of the activated *ras* genes can be achieved with antisense oligonucleotides, ribozymes against *ras* gene products, inhibitors of Ras protein posttranslational modifications and Ras peptide vaccination [13]. On this basis, our data indicate H-*ras* and N-*ras* genes as candidate targets for gene therapy strategies in cervical cancer. To date, adenoviral-mediated transfer of wild-type *p53* or HPV 16 *E6* and *E7* antisense RNA has been associated with cell growth suppression in cervical cancer [47,48]. However, further investigations are warranted to find the complete gene pattern that can be exploited for the molecular treatment of cervical cancer.

The present study provides evidence that H-*ras* and N-*ras* genes are probably involved in cervical carcinogenesis through elevated expression of the normal *ras* p21 protein. Elevated *ras* gene expression is implicated in the development of cervical cancer independent of HPV status. The precise role of each *ras* gene overexpression to the development of the HPV infection has to be clarified.

## Acknowledgments

The authors thank G. Soufla for her assistance with data collection and J. Moshandreas for her assistance with the statistical analysis of the data.

## References

- [1] Cannistra SA, Niloff JM. Cancer of the uterine cervix. *N Engl J Med* 1996;334:1030–8.
- [2] Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, Thun M. Cancer statistics, 2001. *CA Cancer J Clin* 2001;51:15–36.
- [3] Nanda K, McCrory DC, Myers ER, Bastian LA, Hasselblad V, Hickey JD, et al. Accuracy of the Papanicolaou test in screening for and follow-up of cervical cytologic abnormalities: a systematic review. *Ann Intern Med* 2000;132:810–9.
- [4] Spandidos DA, Dokianakis DN, Kallergi G, Aggelakis E. Molecular basis of gynecological cancer. *Ann N Y Acad Sci* 2000;900:56–64.
- [5] Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Munoz N, Franceschi S. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br J Cancer* 2003;88:63–73.
- [6] Sanclemente G, Gill DK. Human papillomavirus molecular biology and pathogenesis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2002;16:231–40.
- [7] zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002;2:342–50.
- [8] Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 1990;63:1129–36.
- [9] Dyson N, Howley PM, Munger K, Harlow E. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 1989;243:934–7.
- [10] Thomas JT, Hubert WG, Ruesch MN, Laimins LA. Human papillomavirus type 31 oncoproteins E6 and E7 are required for the maintenance of episomes during the viral life cycle in normal human keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:8449–54.
- [11] Flores ER, Allen-Hoffmann BL, Lee D, Lambert PF. The human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein is required for the productive stage of the viral life cycle. *J Virol* 2000;74:6622–31.
- [12] Hurlin PJ, Kaur P, Smith PP, Perez-Reyes N, Blanton RA, McDougall JK. Progression of human papillomavirus type 18-immortalized human keratinocytes to a malignant phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:570–4.
- [13] Zachos G, Spandidos DA. Expression of *ras* proto-oncogenes: regulation and implications in the development of human tumors. *Crit Rev Oncol Hematol* 1997;26:65–75.
- [14] Bar-Sagi D. A *ras* by any other name. *Mol Cell Biol* 2001;21:1441–3.
- [15] Barbacid M. *ras* genes. *Annu Rev Biochem* 1987;56:779–827.
- [16] Kiaris H, Spandidos D. Mutations of *ras* genes in human tumors. *Int J Oncol* 1995;7:413–21.
- [17] Field JK, Spandidos DA. The role of *ras* and *myc* oncogenes in human solid tumours and their relevance in diagnosis and prognosis (review). *Anticancer Res* 1990;10:1–22.
- [18] Spandidos DA, Wilkie NM. Malignant transformation of early passage rodent cells by a single mutated human oncogene. *Nature* 1984;310:469–75.
- [19] Spandidos D, Sourvinos G, Koffa M. *Ras* genes, p53 and HPV as prognostic indicators in human cancer. *Oncol Rep* 1997;4:211–8.
- [20] Koffa M, Koumantakis E, Ergazaki M, Malamou-Mitsi V, Spandidos D. Detection of *ras* gene mutations and HPV in lesions of the human female reproductive tract. *Int J Oncol* 1994;5:189–95.
- [21] Dokianakis DN, Sourvinos G, Sakkas S, Athanasiadou E, Spandidos DA. Detection of HPV and *ras* gene mutations in cervical smears from female genital lesions. *Oncol Rep* 1998;5:1195–8.
- [22] Lee JH, Lee SK, Yang MH, Ahmed MM, Mohiuddin M, Lee EY. Expression and mutation of H-*ras* in uterine cervical cancer. *Gynecol Oncol* 1996;62:49–54.
- [23] Wong YF, Chung TK, Cheung TH, Lam SK, Xu YG, Chang AM. Frequent *ras* gene mutations in squamous cell cervical cancer. *Cancer Lett* 1995;95:29–32.
- [24] Grendys Jr EC, Barnes WA, Weitzel J, Sparkowski J, Schlegel R. Identification of H, K, and N-*ras* point mutations in stage IB cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 1997;65:343–7.
- [25] Slagle BL, Kaufman RH, Reeves WC, Icenogle JP. Expression of *ras*, *c-myc*, and p53 proteins in cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer* 1998;83:1401–8.
- [26] Pinion SB, Kennedy JH, Miller RW, MacLean AB. Oncogene expression in cervical intraepithelial neoplasia and invasive cancer of cervix. *Lancet* 1991;337:819–20.
- [27] Sagae S, Kudo R, Kuzumaki N, Hisada T, Mugikura Y, Nihei T, et al. *Ras* oncogene expression and progression in intraepithelial neoplasia of the uterine cervix. *Cancer* 1990;66:295–301.
- [28] Sagae S, Kuzumaki N, Hisada T, Mugikura Y, Kudo R, Hashimoto M. *ras* oncogene expression and prognosis of invasive squamous cell carcinomas of the uterine cervix. *Cancer* 1989;63:1577–82.
- [29] Sokal RR, Rohlf FJ. *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*. New York: W H Freeman and Co.; 1995.
- [30] Symonds RP, Habeshaw T, Paul J, Kerr DJ, Darling A, Burnett RA, et al. No correlation between *ras*, *c-myc* and *c-jun* proto-oncogene expression and prognosis in advanced carcinoma of cervix. *Eur J Cancer* 1992;28A:1615–7.
- [31] Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:796–802.
- [32] DiPaolo JA, Woodworth CD, Popescu NC, Notario V, Doniger J. Induction of human cervical squamous cell carcinoma by sequential transfection with human papillomavirus 16 DNA and viral Harvey *ras*. *Oncogene* 1989;4:395–9.
- [33] Durst M, Gallahan D, Jay G, Rhim JS. Glucocorticoid-enhanced neoplastic transformation of human keratinocytes by human papillomavirus type 16 and an activated *ras* oncogene. *Virology* 1989;173:767–71.
- [34] Chen TM, Defendi V. Functional interaction of p53 with HPV18 E6, *c-myc* and H-*ras* in 3T3 cells. *Oncogene* 1992;7:1541–7.
- [35] Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic *ras* provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 1997;88:593–602.
- [36] Duggan MA, McGregor SE, Stuart GC, Morris S, Chang-Poon V, Schepansky A, et al. The natural history of CIN I lesions. *Eur J Gynaecol Oncol* 1998;19:338–44.
- [37] Ostor AG. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *Int J Gynecol Pathol* 1993;12:186–92.
- [38] Cheng Q, Lau WM, Chew SH, Ho TH, Tay SK, Hui KM. Identification of molecular markers for the early detection of human squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Br J Cancer* 2002;86:274–81.
- [39] Hayashi Y, Hachisuga T, Iwasaka T, Fukuda K, Okuma Y, Yokoyama M, et al. Expression of *ras* oncogene product and EGF receptor in cervical squamous cell carcinomas and its relationship to lymph node involvement. *Gynecol Oncol* 1991;40:147–51.
- [40] Riou G, Barrois M, Sheng ZM, Duvillard P, Lhomme C. Somatic deletions and mutations of c-Ha-*ras* gene in human cervical cancers. *Oncogene* 1988;3:329–33.
- [41] Spandidos DA, Sourvinos G, Tsatsanis C, Zafiropoulos A. Normal *ras* genes: their onco-suppressor and pro-apoptotic functions (review). *Int J Oncol* 2002;21:237–41.
- [42] Stacey DW, Kung HF. Transformation of NIH 3T3 cells by microinjection of Ha-*ras* p21 protein. *Nature* 1984;310:508–11.
- [43] Gulbis B, Galand P. Immunodetection of the p21-*ras* products in human normal and preneoplastic tissues and solid tumors: a review. *Hum Pathol* 1993;24:1271–85.
- [44] Sklar MD. The *ras* oncogenes increase the intrinsic resistance of NIH 3T3 cells to ionizing radiation. *Science* 1988;239:645–7.

- [45] Miller AC, Kariko K, Myers CE, Clark EP, Samid D. Increased radio-resistance of EJras-transformed human osteosarcoma cells and its modulation by lovastatin, an inhibitor of p21ras isoprenylation. *Int J Cancer* 1993;53:302–7.
- [46] Karlson J, Borg-Karlson AK, Unelius R, Shoshan MC, Wilking N, Ringborg U, et al. Inhibition of tumor cell growth by monoterpenes in vitro: evidence of a Ras-independent mechanism of action. *Anticancer Drugs* 1996;7:422–9.
- [47] Hamada K, Alemany R, Zhang WW, Hittelman WN, Lotan R, Roth JA, et al. Adenovirus-mediated transfer of a wild-type p53 gene and induction of apoptosis in cervical cancer. *Cancer Res* 1996;56:3047–54.
- [48] Hamada K, Sakaue M, Alemany R, Zhang WW, Horio Y, Roth JA, et al. Adenovirus-mediated transfer of HPV 16 E6/E7 antisense RNA to human cervical cancer cells. *Gynecol Oncol* 1996;63:219–27.

# Involvement of the *ras* genes in female genital tract cancer (Review)

IOANNIS N. MAMMAS<sup>1</sup>, ALEXANDROS ZAFIROPOULOS<sup>2</sup> and DEMETRIOS A. SPANDIDOS<sup>1</sup>

Laboratories of <sup>1</sup>Virology and <sup>2</sup>Histology, Medical School, University of Crete, Heraklion, Crete, Greece

**Abstract.** Human carcinogenesis is a multistep process involving complicated genetic events in which several oncogenes and oncosuppressor genes are implicated. The role of *ras* oncogenes in cellular transformation and apoptosis has been extensively examined and the dual role of *ras* as oncogene and oncosuppressor gene has been supported. Activation of *ras* occurs either by genomic alterations such as point mutations or by modulation of Ras protein expression. Many molecular and immunohistochemical studies have focused on *ras* activation in a wide range of human tumours. In this review, we summarize available information regarding the genomic and expression alterations of *ras* oncogenes in cervical, endometrial and ovarian cancer. Gynecological malignancies represent some of the most well-studied types of human cancer concerning *ras* activation and its possible use in clinical practice.

## Contents

1. Introduction
2. *ras* and cervical cancer
3. *ras* and endometrial cancer
4. *ras* and ovarian cancer
5. Future perspectives

## 1. Introduction

*ras* oncogenes and Ras protein. The family of *ras* oncogenes consists of three functional genes: H (Harvey)-*ras*, K (Kirsten)-*ras* and N (neuroblastoma)-*ras* which are located in chromosomes 11p15.5, 12p12.1 and 1p13, respectively (1). They

have similar structure with a 5' non-coding exon and four coding exons (exons I-IV). The introns of the genes differ widely in size and sequence with the DNA sequence of K-*ras* spanning more than 35 kb, while those of N-*ras* and H-*ras* span approximately 7 and 3 kb, respectively. The K-*ras* gene has two alternative IV coding exons and is spliced into two isoforms: K-*rasA* and K-*rasB* (2).

The *ras* family oncogenes encode four highly related GTPases of 188 (K-RasB) or 189 (H-Ras, K-RasA, and N-Ras) amino acids in length. Different Ras proteins share high homology in the first 165 amino acids but show difference in 25 amino acids of the C-terminal region that constitutes the heterogeneous region. Their critical domains for GTPase function are present within the N-terminal 165 amino acids. All four proteins have a molecular weight of 21 kDa and are all termed ras p21 or Ras protein. Ras proteins are synthesized in the cytoplasm on free ribosomes as cytoplasmic precursor proteins, undergo a series of post-translational modifications at the C-terminus including prenylation, proteolysis, carboxymethylation and palmitoylation and associate with the inner face of the plasma membrane (3,4). The membrane localization of Ras proteins is essential for their function.

*ras* signalling pathways. The Ras proteins cycle between an inactive GDP-bound state and active GTP-bound state at the plasma membrane (5). The ratio of GTP to GDP bound to Ras proteins is controlled by guanine nucleotide exchange factors (GEFs) and GTPase-activating proteins (GAPs), the enzymatic activity of which responds to extracellular stimuli such as growth factors (6). Binding of growth factors (EGF, PDGF, etc.) to their receptors at the cell surface leads to autophosphorylation of their tyrosine receptor kinases (7). Adaptor proteins such as growth factor receptor-bound protein 2 (GRB2) interact with receptor phosphorylated tyrosines. This allows recruitment of GEFs in the membrane where they promote the Ras transition into the Ras-GTP active complex. Ras is quickly inactivated by GAPs that stimulate GTP hydrolysis. Once active, Ras protein regulates different downstream signalling pathways by interacting with a plethora of target protein effectors (8).

The three main Ras effectors are Raf kinases, Ral-GEFs and PI3-K (Fig. 1). Raf family of protein serine/threonine kinases (A-Raf, B-Raf and Raf-1) initiate a kinase cascade that leads to ERK activation, which modulate both cytoplasmic and nuclear transcriptional factors (9). Biological responses mediated by Raf/Ras activation include cellular proliferation,

---

*Correspondence to:* Professor Demetrios A. Spandidos, Laboratory of Virology, Medical School, University of Crete, Heraklion 71100, Crete, Greece  
E-mail: spandidos@spandidos.gr

*Key words:* *ras*, cervical cancer, endometrial cancer, ovarian cancer

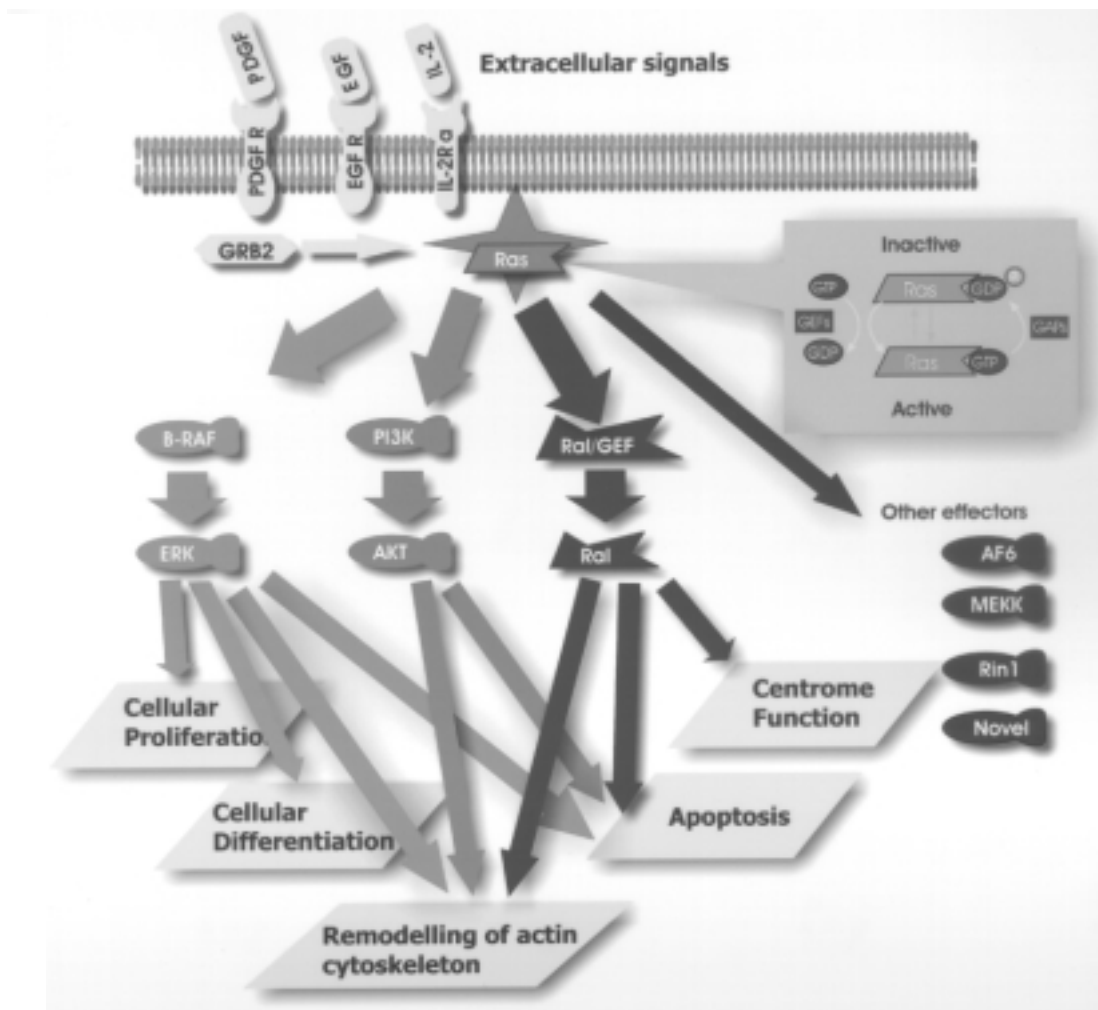


Figure 1. *ras* signalling pathways.

differentiation, apoptosis (10,11), and cytoskeleton remodelling (12). Ral-GEFs activate the Ral GTPases RalA and RalB that contribute to the regulation of phospholipase D (PLD). Ras/Ral signalling affects specific gene transcription pathways and influence apoptosis, acting cytoskeleton and centrosome function (13-15). PI3-kinase initiates a kinase cascade leading to PKB/AKT activation that has been strongly connected with protection from apoptosis (16).

*ras* and human cancer. The family of *ras* oncogenes has been extensively studied for its involvement in the multistep process of carcinogenesis (17-19). Activation of *ras* oncogenes involves genomic alterations of *ras* oncogenes at the level of DNA as well as quantitative changes of the expression of Ras protein. *ras* activation is implicated in human carcinogenesis mainly by inhibiting apoptosis and promoting cellular proliferation. However, there is considerable evidence that activated *ras* oncogenes can also have opposite action by promoting apoptosis and inhibiting cellular proliferation and may have, under many circumstances, an oncosuppressive role. Early observations provided evidence indicating that expression of wild-type *ras* genes possesses anti-oncogenic properties. Proof that *ras* has oncosuppressive activity came very early when Spandidos and Wilkie demonstrated that

expression of the normal H-*ras1* gene suppresses the transformed phenotype induced by the T24 mutant H-*ras* (20) or the mutant N-*ras* (21) present in tumour cell lines. Recent development of the K-*ras2* deficient animals provided the tool to study the role of wild-type K-*ras2* gene in tumourigenesis (22). The dual role of *ras* as oncogenes and oncosuppressor genes has been recently reviewed (23).

The most common genomic alterations of the *ras* oncogenes are point mutations in codons 12, 13 and 61 which abolish p21 GTPase activity rendering p21 constitutively activated (24). Mutations of *ras* oncogenes are involved in a wide range of human tumours in various frequencies with tissue specificity depending on the member of the family which is activated. Mutations of K-*ras* occur more frequently in tumours of pancreas, lung and colon, H-*ras* in tumours of bladder and kidney while N-*ras* is mutated more often in melanoma and acute myelogenous leukaemia (25). Moreover, the presence of *ras* mutations has been associated with the clinical outcome of the patients and has been proposed as a negative prognostic factor in many types of cancer (26). Overexpression of *ras* oncogenes has also been detected in several human cancers including breast, colon, head and neck, bladder and lung and has been associated with the development of the disease (27). *In vitro* experiments have

shown that overproduction of even the normal Ras protein is sufficient to confer a transforming potential on cultured cells (28).

The gynaecological oncology field includes some of the most well studied types of human cancer as far as *ras* activation is concerned. It can be used as a positive and representative paradigm for the implication of *ras* oncogenes in human carcinogenesis. The purpose of this review is to summarize our knowledge concerning *ras* activation mediated either by genomic alteration events or by modulation of Ras protein expression in cervical, endometrial and ovarian tumours. We will also provide an overview of its relationship with clinicopathological parameters evaluating its possible usefulness in clinical practice.

## 2. *ras* and cervical cancer

**Background.** Cervical cancer is one of the most frequent malignancies in women worldwide (29). Clinical and epidemiological data have linked cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia (CIN) to the human papilloma virus (HPV) infection. Cervical carcinoma-associated HPV types 16 and 18 encode E6 and E7 oncoproteins which inactivate p53 and Rb altering cell cycle control and leading to chromosomal instability (30). However, the presence of HPV infection alone is not enough to cause tumorigenesis, suggesting a role for additional host-cell genetic factors such as activation of *ras* oncogenes.

Several transformation studies indicate that activation of *ras* oncogenes can transform cervical cells in cooperation with HPV (31,32). Di Paolo *et al* have demonstrated in nude mice that the addition of activated H-*ras* to HPV16-immortalized human cervical cells can result in malignancy (31). It has been also suggested that activated H-*ras* can overcome both the anti-proliferative and anti-transforming effects of p53, the most important HPV target (32). Recently, Gaiotti *et al* found that activation of *ras* promotes expression of HPV-16 E6/E7, induces cyclins A and B, and mediates growth stimulation of immortal keratinocytes by TNF- $\alpha$  (33). Furthermore, *ras* oncogenes appear to be involved in cellular response to radiotherapy indicating *ras* mutations as modulators of the effectiveness of radiotherapy in cervical cancer (34).

### Genomic alterations of *ras* oncogenes

***ras* mutations.** Point mutations of K-*ras* have commonly been implicated in cervical cancer with a frequency ranging from 0 to 61% (Table I). The vast majority of K-*ras* mutations occur in codon 12 including mostly transitions from GGT to GAT (35-41). It has been suggested that codon 12 K-*ras* mutations may serve as a molecular marker for the detection of the disease (37,38). However, other investigators have reported less frequent codon 12 K-*ras* mutations in cervical cancer indicating the need for larger epidemiological surveys (39-44). Mutations of H-*ras* at codon 12 have also been reported in cervical cancer, however, they occur less frequently than K-*ras* mutations in the same codon (37,38,45-47). For example, in the study of Dokianakis *et al*, which included 75 patients with squamous cervical carcinoma, codon 12 point mutations of the K-*ras* were detected in 24 (32%) patients while codon 12 H-*ras* mutations were detected in 6 (22%)

Table I. Mutational activation of *ras* family oncogenes in cervical cancer.

Author/refs.	Number of cases	<i>ras</i> gene	Frequency (%)
Sato <i>et al</i> (35)	7	K- <i>ras</i>	2/7 (28.6)
Falcinelli <i>et al</i> (42)	42	K- <i>ras</i>	0/42 (0)
Willis <i>et al</i> (49)	15	K- <i>ras</i>	1/15 (6.7)
Jiko <i>et al</i> (43)	25	K- <i>ras</i>	1/25 (4)
Koffa <i>et al</i> (36)	37	K- <i>ras</i>	10/37 (27)
		H- <i>ras</i>	3/37 (8.1)
		N- <i>ras</i>	2/37 (5.4)
Wong <i>et al</i> (38)	80	K- <i>ras</i>	49/80 (61)
		H- <i>ras</i>	28/80 (35)
Huang <i>et al</i> (45)	44	H- <i>ras</i>	8/44 (18.2)
Lee <i>et al</i> (46)	27	H- <i>ras</i>	6/27 (22)
Parker <i>et al</i> (39)	32	K- <i>ras</i>	3/32 (9.4)
Grendys <i>et al</i> (48)	33	K- <i>ras</i>	4/33 (12.1)
		H- <i>ras</i>	2/33 (6.1)
		N- <i>ras</i>	2/33 (6.1)
Ferguson <i>et al</i> (40)	27	K- <i>ras</i>	1/27 (3.7)
O'Leary <i>et al</i> (47)	20	K- <i>ras</i>	0/20 (0)
		H- <i>ras</i>	1/20 (5)
		N- <i>ras</i>	0/20 (0)
Aoyama <i>et al</i> (56)	20	H- <i>ras</i>	0/20 (0)
Dokianakis <i>et al</i> (37)	75	K- <i>ras</i>	24/75 (32)
		H- <i>ras</i>	7/75 (9.3)
		N- <i>ras</i>	0/75 (0)
Pochylski <i>et al</i> (44)	29	K- <i>ras</i>	0/29 (0)
Stenzel <i>et al</i> (41)	24	K- <i>ras</i>	2/24 (8.3)
Alonio <i>et al</i> (53)	39	H- <i>ras</i>	16/39 (41)

patients (37). In the Wong *et al* study of 80 patients with squamous cervical carcinoma, codon 12 mutations of K-*ras* and H-*ras* were found in 49 (61%) and in 28 (35%) patients, respectively (38).

It is important to note that only a small number of studies have examined the frequency of *ras* mutations in other codons (38,39,41,42,44,46-49). Grendys *et al* identified *ras* mutations in 24.2% of specimens from 33 patients with early-stage cervical carcinoma. In this study, analysis at codons 12, 13, and 61 was performed, however, the detected mutations in H-, K-, and N-*ras* all occurred only at codon 61; 2 in H-*ras*, 2 in N-*ras* and 4 in K-*ras* (48). In the study of Parker *et al*, codon 61 K-*ras* mutations were detected in one out of 32 specimens with cervical cancer (39,42). Wong *et al* found K-*ras* codon 13 mutations in 5 out of 80 samples (6%) with invasive squamous cell carcinoma, while Willis *et al* found only one patient of 15 with cervical carcinoma to have a K-*ras* mutation and this was present in codon 13 (38,49). Polymorphisms in codon 31 have been detected in adeno-

carcinomas with high-risk HPV (16 or 18) from Korean women (50). Additional studies are needed to evaluate whether other codons such as codon 61, 13 and 31 represent characteristic 'hot-spots' of *ras* mutations in cervical cancer.

*ras* mutations and prognosis. Several studies have suggested association between *ras* mutations and the clinical parameters of the patients although conflicting results have been described (35,37-39,46). In the study of Dokianakis *et al.*, K-*ras* point mutations were correlated with FIGO stage indicating that the presence of K-*ras* mutations coexists with the increase of the FIGO stage (37). Moreover, a negative correlation was found between the presence of K-*ras* mutations and the survival of the patients.

However, in other studies no correlation has been found between the presence of *ras* mutations and clinical stage or survival (35,37,38). Sato *et al* found no correlation between the presence of point mutation at codon 12 of K-*ras* and age, clinical stage, or depth of muscular invasion (35). In support, there were no significant differences in incidence of the H- and K-*ras* mutations among different histologic grades or clinical stages of cervical cancers studied by Wong *et al* (38). Cases with codon 12 H-*ras* mutations studied by Lee *et al* included 3 of 21 squamous, 2 of 3 adeno, and 1 of 2 adenosquamous carcinomas while no correlation was found between H-*ras* codon 12 mutations and patient survival time (46).

*ras* mutations and CIN. The presence of *ras* mutations in non-cancerous cytological samples indicates the possible role of *ras* mutations in premalignant cervical lesions. In patients with CIN, codon 12 mutations of K-*ras* were found in 4 out of 23 (17%), codon 12 H-*ras* mutations were found in 8.5%, while no sample carried a codon 12 point mutation of N-*ras* (51). Among 91 non-cancerous samples, 17.58% showed mutations in codon 12 of K-*ras* (52). In the study of Alonio *et al.*, 20% of CIN III patients had patterns compatible with H-*ras* mutations (53). It has been suggested that mutational activation of K- and H-*ras* oncogenes is implicated in the development of CIN (51-54). Moreover, in H-*ras* mutated cases with CIN lesions, the progression took place in under two years, indicating that this detection may be an early predictive marker of rapid progression (53). It is important to note that *ras* mutations occur less frequently in CIN than in cervical cancer cases and that *ras* mutations have not been detected in cervical tissues with normal histology (47,55,56).

*ras* mutations and HPV. The simultaneous presence of *ras* activation by point mutations and HPV suggest a possible co-operation between *ras* activation and HPV infection in cervical cancer (40,41,52,57). The presence of HPV DNA in samples with cervical cancer has been correlated with the detection of codon 12 of K-*ras* mutations (40,52). Moreover, 'high-risk' HPV DNA coexists with K-*ras* oncogene alterations in a subset of moderately differentiated cervical carcinomas (41). Mouron *et al* demonstrated in cervical tissue samples with different grades of dysplasia a highly significant difference in K-*ras* codon 12 mutation frequency between 'high-risk' (HPV-16 and HPV-18) and 'low-risk' (HPV-6) HPV-infected samples (57).

*Amplification or deletions of ras.* Many studies have examined the presence of *ras* amplification in cervical cancer (45,58,59). In the analysis of Pinion *et al.*, amplification of H-*ras* in CIN III and invasive cancer compared with normal cervix and CIN I was demonstrated, while in 20 cervical carcinomas studied by Huang *et al.*, amplification rate of H-*ras* oncogene was 45% (45,58). However, no H-*ras* amplification was demonstrated in 38 patients with invasive cervical carcinoma studied by Iwasaka *et al* (59). Deletions of *ras* oncogenes have also been documented in cervical cancer. The c-H-*ras*-1 locus was analysed by Riou *et al* and shown to exhibit the loss of one allele in 36% of heterozygous cervical tumours (60). The H-*ras* allele deletions were present in 40% of codon 12 mutated cervical tumours.

#### *Expression of ras oncogenes*

*Ras expression.* It has been shown that the expression of Ras protein in cervical cancer is considerably enhanced compared with benign lesions or normal cervical tissues (58,61-66). The Ras protein levels detected immunohistochemically using the Y13 259 monoclonal antibody were elevated in malignant compared to benign human cervical lesions (63). Expression of Ras protein was noted in 51 of the 70 (72.8%) cervical carcinomas immunohistochemically using MAB-P21 as a probe, while there was no detectable Ras protein in the normal cervical tissues (64). Overexpression of Ras was found in 96% of 74 cervical carcinomas studied in relation to normal cervical epithelium from 10 patients with benign uterine leiomyomas (65). Expression of Ras protein in 32 cervical dysplasia/adenocarcinomas *in situ* lesions and invasive cervical adenocarcinomas was significantly higher than in 45 normal tissues (66).

In cell lines derived from Japanese patients with cervical carcinoma, Shirasawa *et al* detected H-*ras* mRNA expression at about nine times the level of that in normal cells (61). In the study of Shiratori *et al.*, H-*ras* oncogene expression was often characterized by staining with a monoclonal antibody in cases with severe dysplasia, carcinoma *in situ* or invasive carcinoma while normal squamous epithelium was largely negative (62). In the analysis of 56 cervical tissues by Pinion *et al.*, the expression of H-*ras* oncogene was elevated in invasive cancer compared with normal cervix, CIN I and CIN III (58). Recently, our group found that the transcript levels for H-*ras* and N-*ras* were significantly higher in cervical cancer cases compared to normal cervical tissues and CIN lesions indicating H- and N-*ras* up-regulation as a marker of malignant transformation in human cervical neoplasia (67). The exact role of differential mechanisms of H-, K- and N-*ras* oncogene transcriptional and translational activation in cervical tissue and their implication in Ras overexpression remain to be elucidated.

It has been reported that overexpression of Ras protein in squamous cervical carcinomas of different histologic types is detected more frequently in keratinizing and large cell non-keratinizing type than in small cell type (68). In the study of Huang *et al.*, the expression of Ras protein in cervical carcinoma varied with grades of cell differentiation (64). The level of Ras expression in high-differentiation types was higher than that of the middle- and low-differentiation types.



**Ras expression and prognosis.** Overexpression of Ras protein has been related with various clinical parameters (46,65,66,69,70). Hayashi *et al* demonstrated that the patients with positive staining for Ras protein in cervical carcinomas have a higher incidence of lymph node metastasis than the patients with negative staining for Ras (69). In this study, although the levels of Ras protein expression in the metastatic sites were reduced compared to those in the primary sites, tumour cells in metastatic lymph nodes also expressed Ras. A significant relationship between Ras expression and risk of lymphatic spread was detected in early-stage cervical carcinoma proposing Ras positivity as an indicator of lymphatic spread (70).

However, Ras expression does not seem to be a significant predictor of prognosis. In the study of Lee *et al*, no correlation was found between H-*ras* oncogene expression and patient survival time (46). In FIGO stage I squamous cervical cancers studied by Garzetti *et al*, no connection was found between Ras expression and tumour size or histologic grade (70). Skomedal *et al* found no difference in aberrant expression of Ras protein related to histological type, grade of differentiation, FIGO stage, or relapse-free survival (65). No correlation was found by Leung *et al* between moderate/strong expression of Ras and stage at presentation or with survival (66). In the study of Sagae *et al*, although expression of Ras was related with prognosis of cervical cancers, the mode of the correlation was dependent on their histologic types (68).

**Ras expression and CIN.** Many studies have detected Ras protein in CIN lesions indicating its important role in early phase of carcinogenesis (71-75). Ras expression levels increase proportionally from CIN I to microinvasive cervical carcinoma and they have been suggested to be predictive of CIN progression (71,72). The frequency of positive Ras staining using anti-*ras* p21 mouse monoclonal antibody rp35 was 17.9% in CIN I, 28.9% in CIN II and 53.9% in CIN III, whereas in microinvasive carcinoma it was 50.0% (71). In the analysis of 204 cervical tissue samples including pre-malignant and malignant lesions as well as apparently normal cervical tissues, the immunoreactivity for N-Ras also increased with increasing histological abnormality from low grade squamous cervical lesions (SIL) to invasive carcinoma while none of the samples analysed displayed immunoreactivity for H-Ras and K-Ras (72). However, in the immunohistochemical analysis of 395 biopsy specimens representing normal through CIN III histology, neither the proportion of tissues staining positive for Ras protein nor the staining pattern within the epithelial layers differed significantly among normal or CIN biopsy samples (75). Recently, our group found no statistically significant differences in mRNA transcript levels of H-, K-, and N-*ras* genes between 11 normal cervical tissues and 15 CIN lesions (67). Further research is required to evaluate Ras protein detection as a marker of CIN progression.

**Ras expression and HPV.** In the study of Pedroza-Saavedra *et al*, in serum samples from 38 healthy women and 55 women with different types of cervical lesions, patients positive for Ras antibodies were also positive for HPV E4 antibodies,

suggesting an association between Ras expression and HPV (74). Giannoudis *et al* suggested that p53 status is correlated with Ras expression in low grade SILs infected with 'low, intermediate, and high-risk' HPVs (76). Moreover, it has been suggested that 'low, intermediate, and high risk' HPVs have different effects on both p53 and Ras protein expression. Understanding of molecular interaction mechanisms between Ras protein and HPV will enable us to evaluate the clinical usefulness of Ras protein detection in HPV-infected samples.

### 3. *ras* and endometrial cancer

**Background.** Endometrial cancer is the most common type of female cancer in the Western world (77). Endometrial carcinoma can be divided into two biologically and clinically distinctive subtypes of which one is estrogen-related (type I) and the other estrogen-unrelated (type II). Type I carcinomas occur at younger age, express estrogen (ER) and progesterone receptors (PR), are frequently associated with endometrial hyperplasia, show a good prognosis and histologically correspond to endometrioid carcinomas. Type II carcinomas occur at older age, are negative for ER and PR, arise in the background of atrophic endometrium, show poor prognosis and histologically correspond to serous carcinomas. A number of oncogenes and tumour suppressor genes are involved in the process of endometrial carcinogenesis (78).

The role of *ras* oncogenes in endometrial cell proliferation and differentiation has been examined by several *in vitro* studies (79-82). Expression of H-Ras has been associated with proliferation in transformed endometrial carcinoma cells and is increased by epidermal growth factor (EGF) and estradiol (79,80). Kato *et al* compared the growth response of endometrial carcinoma cells harbouring wild-type (Ishikawa cells) or mutated K-*ras* (HHUA cells) and demonstrated that the presence of mutated K-*ras* alone modulates the growth response of endometrial carcinoma cells to EGF (81). Moreover, *in vitro* experiments using a highly differentiated endometrial cancer cell line (SNG-II) have showed that tumour cell adhesion and infiltration decreased after exposure to conophylline, a new vinca alkaloid that inhibits *ras* oncogene expression (82).

#### *Genomic alterations of ras oncogenes*

***ras* mutations.** Point mutations of K-*ras* in codon 12 have been reported to occur in 0-46% of endometrial cancers being more frequent than H-*ras* or N-*ras* mutations in the same codon (Table II). The most frequent codon 12 K-*ras* mutations are transitions from GGT to GAT, to GTT, to GCT, to AGT and TGT (35,83-85). K-*ras* point mutations in codons 13 and 61 occur less frequently (70,83,84,86-91). In Japan, Fujimoto *et al* found K-*ras* mutations in 10 (22.2%) out of 45 patients with endometrial carcinoma (92). Enomoto *et al* found in 19 endometrial adenocarcinomas, point mutations in codon 12 of K-*ras* were found in six tumours (32%), while only one mutation in codon 12 of N-*ras* and no mutation in H-*ras* (92). Caduff *et al* studied 112 patients from USA with carcinoma of the endometrium and K-*ras* codon 12 mutations were observed in 13 tumours (11.6%), including 11 endometrioid carcinomas, one

Table II. Mutational activation of *ras* family oncogenes in endometrial cancer.

Author/refs.	Number of cases	<i>ras</i> gene	Frequency (%)
Enomoto <i>et al</i> (83)	13	K- <i>ras</i>	6/13 (64)
Boyd <i>et al</i> (84)	11	K- <i>ras</i>	4/11 (36.4)
		H- <i>ras</i>	3/11 (27.3)
Sato <i>et al</i> (35)	21	K- <i>ras</i>	3/21 (14.3)
Enomoto <i>et al</i> (92)	19	K- <i>ras</i>	6/19 (32)
		H- <i>ras</i>	0/19 (0)
		N- <i>ras</i>	1/19 (5.3)
Mizuuchi <i>et al</i> (86)	49	K- <i>ras</i>	6/49 (12.2)
Ignar-Trowbridge <i>et al</i> (87)	30	K- <i>ras</i>	3/30 (10)
		H- <i>ras</i>	0/30 (0)
		N- <i>ras</i>	0/30 (0)
Fugimoto <i>et al</i> (85)	45	K- <i>ras</i>	12/45 (22.2)
Duggan <i>et al</i> (88)	60	K- <i>ras</i>	9/60 (15)
Caduff <i>et al</i> (93)	112	K- <i>ras</i>	13/112(11.6)
Enomoto <i>et al</i> (89)	38	K- <i>ras</i>	4/38 (11)
Jones <i>et al</i> (111)	32	K- <i>ras</i>	6/32 (18.8)
Schmitz <i>et al</i> (180)	21	K- <i>ras</i>	2/21 (10)
Varras <i>et al</i> (94)	55	K- <i>ras</i>	8/55 (15)
		H- <i>ras</i>	4/55 (7.3)
		N- <i>ras</i>	0/55 (0)
Semczuk <i>et al</i> (91)	13	K- <i>ras</i>	2/13 (15)
Esteller <i>et al</i> (96)	55	K- <i>ras</i>	8/55 (14.5)
Semczuk <i>et al</i> (97)	57	K- <i>ras</i>	8/57 (14)
Niederacher <i>et al</i> (98)	112	K- <i>ras</i>	13/112(11.6)
Semczuk <i>et al</i> (90)	82	K- <i>ras</i>	2/82 (2.4)
Lagerda <i>et al</i> (95)	58	K- <i>ras</i>	11/58 (18.9)
Mavani <i>et al</i> (99)	72	K- <i>ras</i>	3/72 (4.2)

undifferentiated carcinoma, and one carcinosarcoma (93). Additionally, in 38 endometrial adenocarcinomas from Colorado analysed by Enomoto *et al*, K-*ras* activation was detected in 4 cases (11%), three in codon 12 and one in codon 13 (89). Differences in the frequency of *ras* activation between populations from Japan and USA can be attributed to different epidemiological and geographical characteristics of these populations.

In Europe, studies conducted in Greek, Spanish, Polish and German populations have not shown significant differences concerning the frequency of *ras* mutations (94). In the study of Varras *et al* in the Greek population, K-*ras* mutations were detected in 8 out of 55 cases (15%) of primary endometrial carcinoma, H-*ras* in 4 (7.3%), while no mutations were found for the N-*ras* oncogene (94). In Spain, point mutations at codon 12 of K-*ras* were identified in 8 of 55 (14.5%) specimens with endometrial carcinoma while in another study K-*ras* mutations were detected in 11 (18.9%) of 58

endometrial carcinomas (95,96). In Polish women studied by Semczuk *et al*, mutations at exon 1 of the K-*ras* oncogene were detected in two of 13 human endometrial carcinomas (15%), while in another study, mutational activation in codon 12 of the K-*ras* gene was detected in 8 out of 57 (14%) endometrial carcinomas, whereas in codon 13 of the K-*ras* oncogene no point mutation was noted (91,97). In Germany, Niederacher *et al* studied 112 human endometrial carcinomas and K-*ras* mutations were detected in 11.6% (98). However, in 72 malignant samples of the human endometrium from Austria examined for point mutation in codons 12, 13 and 61 of the K-*ras* oncogene, a double mutation of codons 12 and 13 as a single-point mutation in one case of endometrioid carcinoma (2.8%) and two single-point mutations of codon 13 (5.6%) in two other cases of endometrioid carcinoma (2/72) were observed (99).

The frequency of K-*ras* mutations in endometrioid and serous endometrial carcinoma differ suggesting that different molecular genetic pathways are involved in the pathogenesis of these two common types of endometrial carcinoma (100-102). K-*ras* mutations at codon 12 were found in 15 of 58 (26%) endometrioid endometrial carcinomas and in only 1 of 45 (2%) serous endometrial carcinomas (100). Hori *et al* showed a tendency for cases with K-*ras* point mutations to be endometrioid rather than serous endometrial carcinoma (101). Among 58 endometrial carcinomas studied by Lagarda *et al*, all tumours with K-*ras* mutations were endometrioid carcinomas (95).

Mutations of K-*ras* have been associated with positive expression of progesterone receptor (PR) indicating that activation of K-*ras* may be involved in the development of hormonal independence in endometrial cancer (98). Zachos *et al* examined the activity of estrogen receptors (ER) and glucocorticoid receptors (GR) in human endometrial cancer and found increased binding of these receptors to H-*ras* element indicating the direct activation of H-*ras* by steroid hormone receptor binding (103). Transcriptional regulation of the H-*ras* oncogene by p53 protein in human endometrial tumours has also been demonstrated by Zachos and Spandidos (104). In this study overexpression of Ras protein was related to increased nuclear levels of wild-type p53 protein and elevated binding of the p53 protein to the H-*ras* element.

Esteller *et al* revealed a positive association of K-*ras* oncogene mutation and germline variants of the cytochrome P-450 1A1 (CYP1A1) gene, an estrogen-metabolizing gene associated with enhanced endometrial cancer risk (105). K-*ras* codon 12 point mutations as well as K-*ras* exon 2 point mutations have also been associated with expression of the retinoblastoma protein (pRB) (90,106).

K-*ras* mutations were more frequent in microsatellite instability (MI) positive than in MI-negative tumours supporting a close relationship between K-*ras* mutations and the phenomenon of MI in endometrial carcinomas (95). However, others have failed to find any relationship between MI and *ras* activation (107,108). Sakamoto *et al* found no relationship in endometrial carcinoma between MI and point mutations in K-*ras*, while in the study of Mutter *et al* K-*ras* mutations occurred in both microsatellite stable and unstable premalignant endometrial neoplasia (107,108).

*ras mutations and prognosis.* Many studies have examined the relationship between the presence of K-*ras* mutations and various clinicopathological parameters suggesting an important role of activated K-*ras* in determining the aggressiveness of endometrial carcinoma (85,86,102). Mizuuchi *et al* found, K-*ras* activation to be an independent risk factor when compared with clinical stage, depth of myometrial invasion, and patient age (86). In endometrioid carcinoma cases, K-*ras* activation has been found to be responsible for more aggressive clinical behaviour in postmenopausal than in premenopausal patients (102).

In the study of Fujimoto *et al*, although no relationship appeared to be present between K-*ras* mutations and clinical stage, histological type, histological grade of differentiation, depth of myometrial invasion, and ascitic cytology, the positive rates of lymph node metastasis tended to be higher in the group with positive K-*ras* mutations than in the group without mutations (86). This is consistent with the results of Ito *et al*, who found that K-*ras* mutations were significantly associated with the presence of lymph node metastases (102). Alexander-Sefre *et al* have proposed molecular assessment of depth of myometrial invasion using K-*ras* mutation (109).

Other studies on human endometrial carcinoma have not found significant correlation of K-*ras* mutations with age, grade of differentiation, clinical stage, lymph node status and myometrial invasion (35,93,94,96-98,110). It has been proposed that the presence of K-*ras* mutations in endometrial carcinoma is not associated with patient prognosis and survival (93,94,111).

*ras mutations and endometrial hyperplasia.* K-*ras* mutations have also been observed in patients with endometrial hyperplasia, indicating that they may represent an early event in the development of endometrial cancer (88,92,112). K-*ras* mutations have been found in endometrial hyperplasias histologically classified as atypical and clinically considered premalignant. No detectable *ras* mutations in adenomatous hyperplasias and cystic hyperplasias have been found. Hachisuga *et al* reported the presence of K-*ras* mutations in codon 12 in tamoxifen (TAM)-related endometrial polyps (113). The incidence of mutations in codon 12 of K-*ras* in TAM-related endometrial polyps (64%) was greater than the incidence of the same mutations in sporadic endometrial hyperplasias, suggesting the important role of *ras* in chemically-induced transformation of endometrium in TAM-treated postmenopausal women with breast cancer.

#### *Expression of ras oncogenes*

*Expression of Ras protein.* Expression of Ras protein has been detected in endometrial carcinoma indicating that it may play an important role in the development of human endometrial carcinoma (63,114-117). It has been demonstrated that Ras protein is expressed in 68-75% of the specimens with endometrial carcinomas analyzed by immunohistochemical staining with monoclonal antibodies, while 47.5% has been found positive for H-Ras (115,116,118). The levels of Ras protein in human uterine lesions was studied as compared to normal tissue using an immunohistochemical assay (Y13 259 monoclonal antibody) and elevated expression of Ras in endometrial carcinoma was found (63).

In this study, normal or atrophic endometrial mucosae were mostly negative while 6 out of the 12 hyperplastic endometrial lesions were found to be moderately or highly positive. Scambia *et al* studied 18 normal endometrial tissues and 37 human primary endometrial carcinomas by Western blot analysis and found that Ras levels were significantly higher in primary endometrial carcinomas than in normal proliferative tissues (114).

In contrast to other types of cancer (bladder, prostate, colon and breast) where Ras is detected only within neoplastic cells, in high-grade endometrial carcinomas Ras protein has also been detected within stromal cells (117). However, in the immunohistochemical analysis although most of the tumour cells expressed Ras protein, the stromal component was unreactive (114).

It has been found that the Ras protein levels are significantly higher in secretory than in proliferative endometrium (114). Estrogen receptor (ER)-positive tumours express higher Ras protein levels than ER-negative tumours, while a similar trend, although not statistically significant, has been found between Ras values and progesterone receptor (PR) expression (114). In immunohistochemical analysis of Ras protein using monoclonal antibody rp-28 by Yaginuma *et al*, Ras expression was related to the histological type of endometrial cancer. In this study, 63% of well differentiated adenocarcinomas, 53% of moderately differentiated and 40% of poorly differentiated were positive, while the staining intensity of Ras seemed to be stronger in the more differentiated types of endometrial carcinoma (119). Among patients with endometrial cancer, expression of Ras protein has been detected more frequently in post-menopausal than in premenopausal women indicating the existence of different carcinogenetic mechanisms in these two groups of patients (119).

*Ras expression and prognosis.* Expression of *ras* oncogenes has been examined in relation to patients prognostic parameters with conflicting results (115,116,118,120). In the study of Miturski *et al*, the simultaneous detection of both Ras and p53 proteins was correlated with advanced clinical stage of human endometrial carcinoma (118). Semczuk *et al* showed that Ras immunostaining was related to myometrial invasion (116). However, no significant relationship between Ras expression and patients survival has been proposed in other studies (115,120).

#### **4. *ras* and ovarian cancer**

*Background.* Ovarian cancer is the leading cause of death from gynaecological malignancies and the fifth most common cause of cancer death among women (121). There is evidence that ovarian cancer may be derived from the progressive transformation of benign and/or borderline tumours (122). Benign ovarian tumours lack the cytological and nuclear atypia and follow a benign clinical course. Borderline ovarian tumours retain a cellular and nuclear architecture similar to invasive carcinomas, without histological evidence of stromal invasion, but with the ability to metastasize. Mutations involving different oncogenes and tumour suppressor genes accumulate during the process of malignant transformation of ovarian cells.

The role of *ras* oncogene activation in ovarian carcinogenesis has been extensively studied (123-128). *In vitro* experiments have demonstrated that transfection of mutant H-*ras* into immortalized ovarian cells can induce malignant transformation (123). Yang *et al* found that silencing of H-*ras* oncogene expression using small inhibitory RNA (siRNA) in ovarian cancer cell lines decreases transformation efficiency and tumour growth (124). Moreover, it has been shown that activation of AKT2, a member of protein kinase B family activated via *ras* signalling pathways, is a common occurrence in human ovarian cancer (125,126). Thangaraju *et al* found that BRCA1 overexpression in ovarian cancer cell lines enhanced signalling through a pathway that involved H-*ras* activation (127). It has been demonstrated that hepatocyte growth factor (HGF), a multifunctional growth factor which has several biological effects on epithelial cells, such as proliferation, invasiveness and morphogenesis modulates motility and invasiveness of ovarian carcinomas via *ras*-mediated pathways (128).

#### Genomic alterations of *ras* oncogenes

*ras* mutations. Mutations of the K-*ras* oncogene in ovarian cancer range from 4 to 47% while H-*ras* and N-*ras* oncogenes occur less frequently (Table III). The most frequent codon 12 K-*ras* mutations are GGT to GAT transversions (129). For example, in the study of Park *et al* in 37 ovarian cancers, the incidence of codon 12 mutations of K-*ras* gene was 35.1% (13/37) and the distributions of transversions from GGT to GAT, to AGT, to TGT, and to GTT were 32.4% (12/37), 2.7% (1/37), 0% and 0%, respectively (130).

Mutations of *ras* oncogenes in other codons such as 13 and 61 have also been implicated less frequently in ovarian cancer (131-133). In 28 tissue specimens of human ovarian cancer examined by Chien and Chow, one specimen was found with a H-*ras* point mutation at codon 12, two had a K-*ras* mutation at codon 12, one had a K-*ras* mutation at codon 13 and none at codon 61 (132). Hogdall *et al* analyzed the presence of mutations at codons 12 and 13 of the K-*ras* oncogene in 138 women with invasive ovarian cancer and K-*ras* codon 12 mutations were found in 8.7% of the patients while a K-*ras* codon 13 mutation was found in 1.5% (133).

Peritoneal fluid evaluation forms part of the staging process of ovarian cancer. However, since cytological examination may be negative in the presence of micrometastatic ovarian cancer, molecular analysis of peritoneal fluid can be used to complement current conventional diagnostic procedures for detection of primary ovarian cancer (134). Genetic abnormalities, such as genomic alterations of K-*ras* oncogene present in cancer cells can be detected using molecular biology techniques and can increase the diagnostic accuracy of peritoneal fluid evaluation (135). In 1999 it was suggested that K-*ras* detection in peritoneal fluid may have value for the early diagnosis and monitoring of ovarian cancer (136). This study demonstrated a high incidence of K-*ras* gene mutations in the peritoneal washings or ascites of women with ovarian adenocarcinomas related to FIGO staging whereas K-*ras* mutations in cystadenomas peritoneal fluid were less frequent. However, Parrella *et al* studied 14 ovarian cancers and matched peritoneal fluid but no K-*ras* mutation was detected either in tissues or in peritoneal fluid

Table III. Mutational activation of *ras* family oncogenes in ovarian cancer.

Author/refs.	Number of cases	<i>ras</i> gene	Frequency (%)
Enomoto <i>et al</i> (83)	13	K- <i>ras</i>	2/13 (15.4)
Enomoto <i>et al</i> (131)	37	K- <i>ras</i>	10/37 (27)
		H- <i>ras</i>	0/37 (0)
		N- <i>ras</i>	0/37 (0)
Chien <i>et al</i> (132)	28	K- <i>ras</i>	3/28 (10.7)
		H- <i>ras</i>	1/28 (3.6)
Teneriello <i>et al</i> (129)	25	K- <i>ras</i>	1/25 (4)
Ichikawa <i>et al</i> (138)	32	K- <i>ras</i>	8/32 (25)
Park <i>et al</i> (130)	37	K- <i>ras</i>	13/37 (35.1)
Tanimoto <i>et al</i> (148)	17	K- <i>ras</i>	4/17 (23.5)
Cuatrecasas <i>et al</i> (144)	97	K- <i>ras</i>	34/97 (35.1)
Mandai <i>et al</i> (149)	10	K- <i>ras</i>	4/10 (40)
Haas <i>et al</i> (150)	17	K- <i>ras</i>	2/17 (11.8)
Caduff <i>et al</i> (151)	81	K- <i>ras</i>	9/81 (11.1)
Varras <i>et al</i> (142)	48	K- <i>ras</i>	11/48 (22.9)
		H- <i>ras</i>	3/48 (6.3)
		N- <i>ras</i>	0/48 (0)
Dokianakis <i>et al</i> (37)	47	K- <i>ras</i>	22/47 (46.7)
		H- <i>ras</i>	3/47 (6.4)
		N- <i>ras</i>	1/47 (2.1)
Suzuki <i>et al</i> (139)	64	K- <i>ras</i>	15/64 (23.4)
Schmitz <i>et al</i> (180)	21	K- <i>ras</i>	2/21 (9.5)
Hongdall <i>et al</i> (133)	138	K- <i>ras</i>	14/138 (10.1)
Okuda <i>et al</i> (141)	64	K- <i>ras</i>	7/64 (10.9)
Singer <i>et al</i> (140)	31	K- <i>ras</i>	0/31 (0)

(137). Further studies are required to determine the sensitivity of the detection of K-*ras* mutations in peritoneal fluid and their importance for the early diagnosis of ovarian cancer.

The incidence of K-*ras* mutations is significantly higher in cases of mucinous than serous ovarian carcinoma (83,131,133,138-140). K-*ras* mutations have also been detected more frequently in patients with ovarian clear cell adenocarcinoma than in patients with ovarian endometrioid adenocarcinoma (141). The incidence of codon 12 K-*ras* point mutations was higher in patients with serous cystadenocarcinomas than in patients with mucinous cystadenocarcinomas (130). However, in another study K-*ras* mutations were not associated with the differentiation of the epithelial cells (142). The exact involvement of K-*ras* mutations in ovarian differentiation remains to be elucidated.

*ras* mutations and prognosis. Many studies have examined the presence of K-*ras* mutations in relation to clinicopathological parameters in order to evaluate the prognostic role of detection

of *ras* mutations in ovarian cancer. Point mutations of K-*ras* were found most frequently in patients with advanced stage disease and in those with pelvic lymph node metastases indicating K-*ras* mutations as a marker that can predict a high risk of pelvic lymph node metastases in ovarian cancer (130). The presence of K-*ras* gene mutations was statistically correlated with FIGO and surgical stage of the malignant specimens (136). It has been proposed that ovarian cancers of mucinous and non-mucinous histology are significantly different with respect to clinical characteristics, survival and molecular alterations (143). However, most of the researchers have demonstrated no correlation between *ras* mutations and patients survival (133,141,142,144). No significant correlation was found between *ras* mutations and clinicopathological parameters or clinical outcome of primary invasive ovarian carcinomas in Greek population (142). The presence of K-*ras* point mutations did not correlate with survival in non-mucinous ovarian epithelial tumours (144). K-*ras* mutations did not affect survival of patients with ovarian clear cell or ovarian endometrioid adenocarcinoma (141), and the frequency of K-*ras* mutations was correlated with the histological type of tumour, but not with age, stage, radicality of operation and patients survival (133).

*ras* mutations and benign/borderline ovarian tumours. Ovarian cancers are likely to arise through malignant transformation of benign ovarian tumours (122). The results of many studies confirm that K-*ras* mutations occur in benign and borderline ovarian tumours supporting that K-*ras* mutational activation is an early event in ovarian carcinogenesis (129,133,138,144-155).

It has been suggested that the frequency of K-*ras* mutations increases from benign to borderline tumours and from borderline tumours to ovarian cancer (122,138,144,147). In the study of Ichikawa *et al.*, mutations of K-*ras* in codon 12 were detected in 4 of 30 mucinous adenomas (13%), in 4 of 12 mucinous borderline tumours (33%), while the incidence of K-*ras* mutations in mucinous carcinomas was 46% (138). Cuatrecasas *et al.* found codon 12 point mutations of K-*ras* in 55.7% of mucinous cystadenomas, 73% of borderline tumours and 85% of ovarian carcinomas, while codon 13 mutations were detected in five cystadenomas, three borderline tumours and three carcinomas (147). In a series of 144 non-mucinous ovarian tumours, the frequency of K-*ras* mutations at codons 12 or 13 was 20% (7/35) in benign tumours, 25% (3/12) in borderline tumours, and 35% (34/97) and in carcinomas (144).

Higher incidence of K-*ras* mutations in borderline tumours than ovarian cancer have been reported suggesting the essential role of K-*ras* mutations in borderline tumours (133,145,148,150,151).

Mutations of K-*ras* have been detected at a higher frequency in mucinous borderline tumours compared to serous borderline tumours (145,146,149,151,153). It is suggested that K-*ras* mutations occur during the transformation from benign cystadenomas to mucinous borderline tumours or mucinous carcinomas, providing molecular genetic support for the hypothesis of the 'adenoma-carcinoma sequence' in mucinous ovarian tumours. Mucinous borderline tumours represent precursors of mucinous carcinoma of the ovary, while serous borderline tumours, although they have some

molecular features associated with malignancy, are unlikely to represent a precursor of invasive serous carcinoma (122).

*Amplification and deletions of ras oncogenes.* Amplification of the *ras* oncogenes has been widely studied in ovarian cancer (156-162). Amplification of H-*ras* and K-*ras* has been detected in ovarian carcinomas in a small number of cases but compared to tumours in other anatomical sites it has been proposed to be specific to ovarian tumours (157). Amplification of K-*ras* was found in 3 of 7 cases and amplification of H-*ras* in 1 of 12 cases with ovarian adenocarcinoma (158). The amplification rate of N-*ras* and K-*ras* in ovarian carcinomas was 44 and 31%, respectively (159), and took place chiefly in cases of early stage and those of good differentiation. Corresponding elevated levels of c-K-*ras2* mRNA and Ras protein were found in tumours with K-*ras2* amplification (156). The levels of K-*ras* specific RNA transcripts and Ras protein were also related to elevated amplification of K-*ras* (163). However, it has been suggested that amplification of the K-*ras* oncogene is not associated with tumour progression and metastasis (160).

Allelic loss of *ras* oncogenes or chromosomes where *ras* oncogenes are located have also been reported in ovarian cancer and may be involved in ovarian carcinogenesis. Allelic deletions of the H-*ras* oncogene have been found to be a very common abnormality in human ovarian adenocarcinomas and have been used as markers of larger chromosomal deletions on chromosome 11 (164). Chromosome 11 is one of the most commonly involved chromosome in ovarian cancer, reported abnormal in 83% of 29 tumours (165). Allele loss on chromosome 11 is present in late stage human ovarian carcinomas and has been associated with poor patient survival (166,167).

#### *Expression of ras oncogenes*

*Ras protein expression.* Overexpression of *ras* oncogenes only occurs in a small proportion of ovarian carcinomas but may have an important role in the progression of the disease pattern (146,148,168-174). In 57 tumour specimens from patients with advanced ovarian cancer, although the pattern of the staining was similar to the germinal epithelium of normal ovaries, the intensity of staining was more enhanced in carcinomas than in normal ovaries (168). Overexpression of *ras* oncogenes was found in 16 of 80 (20%) patients with epithelial ovarian cancer (170). Levels of Ras protein detected were similar in normal and cystic ovaries and in benign tumours, whereas they were significantly higher in malignant tumours than in control tissues (172). Compared to normal ovaries and benign ovarian tumours, higher levels of Ras protein were also found in 45% of the 100 ovarian carcinomas (173).

The presence of Ras overexpression in borderline ovarian tumours suggests that it may be an early genetic alteration in ovarian tumourigenesis (148,169,174-176). Ras expression was relatively higher in serous borderline tumours and papillary serous cystadenocarcinomas in contrast to normal ovary and serous cystadenomas (176). It has been suggested that Ras expression could be an indicator of malignant potential, enabling us to distinguish benign lesions from borderline ovarian tumours and carcinomas.

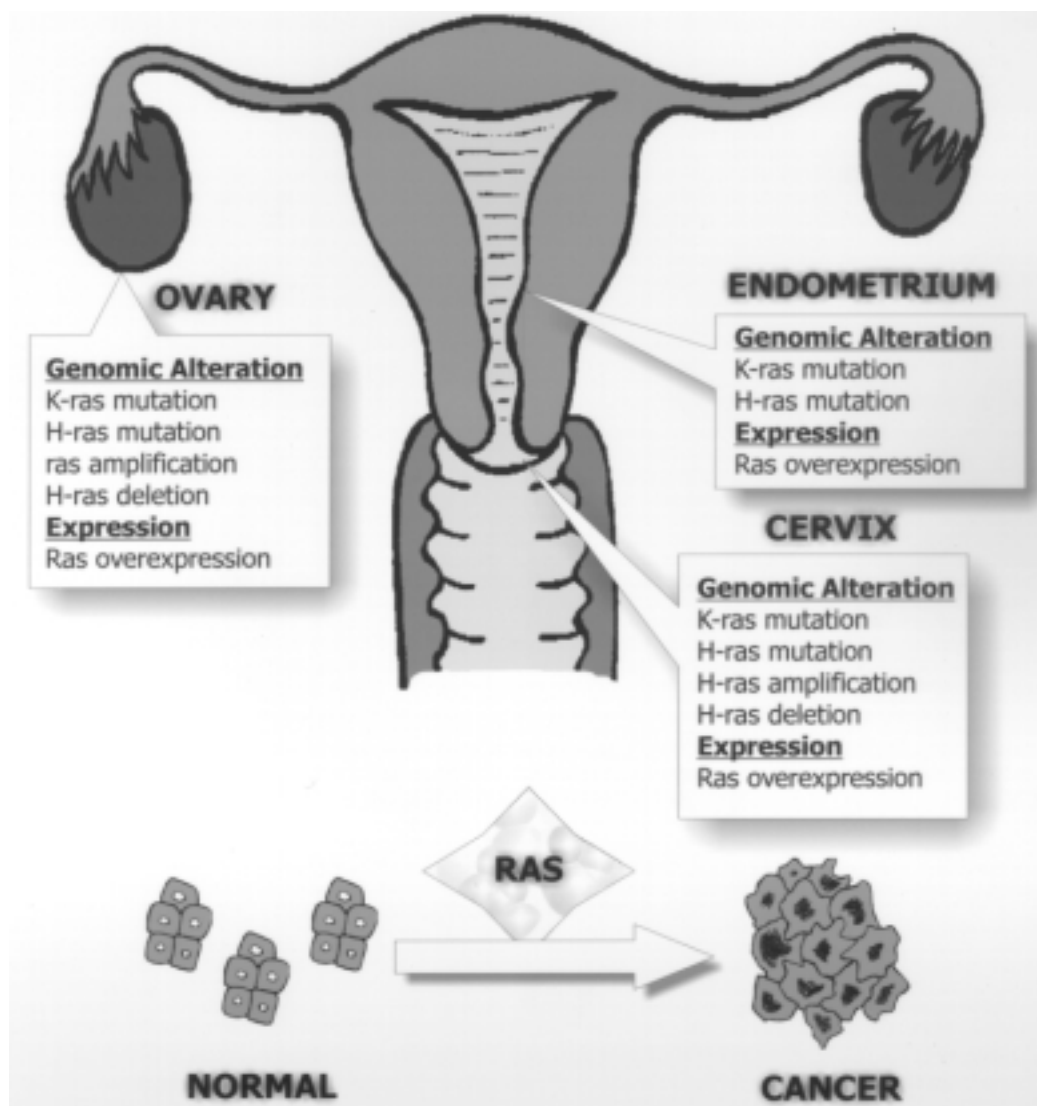


Figure 2. Involvement of the *ras* family oncogenes in female genital tract carcinogenesis.

Overexpression of Ras protein has been observed in serous and mucinous cystadenocarcinomas, undifferentiated adenocarcinomas, and clear cell carcinomas but not in germ cell and sex-cord stromal tumours (171). This differential expression of *ras* p21 has been suggested to be due to the different histogenesis of ovarian tumours reflecting a different carcinogenic mechanism for different types of malignancy.

Statistical analyses have shown a strong positive correlation between cyclin D1 and K-Ras immunoreexpression in ovarian cancer cell lines and tumour tissues (177). It has also been found that estrogen receptor (ER)-positive and progesterone receptor (PR)-positive tumours express higher Ras protein levels than ER-negative and PR-negative tumours (172). Suto *et al* showed that tumourigenic transformation induced by the *ras* oncogenes is associated with alterations in estradiol biotransformation (178). Zachos *et al* found increased binding of glucocorticoid receptor (GR) to H-*ras* GR element and of estrogen receptor (ER) to H-*ras* ER element in all ovarian tumours tested (179). It has been suggested that steroid hormone receptor binding could directly activate the H-*ras* oncogenic potency in ovarian lesions.

Overexpression of the Ras protein in ovarian tumours has also been correlated with elevated binding and increased nuclear levels of wild-type p53 (104).

*Ras expression and prognosis.* The levels of Ras expression have been found significantly higher in tumours of patients with recurrent or persistent disease after chemotherapy compared to tumours of patients at initial presentation (170). Moreover, Ras protein levels are higher in metastases than in primary ovarian carcinomas (146). A significant relationship has been shown between Ras positivity and a shorter overall survival and progression-free survival (146,172). Simultaneous overexpression of p185 and Ras protein has also been associated with shorter disease-free and overall survival (173).

No association between Ras protein and the histologic characteristics, the clinical stage and the patients prognosis have also been shown (168,169,174). There was no correlation between staining intensity of Ras protein and the histologic type, the histologic grade, the ploidy class, and the clinical outcome (168). Ras expression was comparable in

I/II and III/IV FIGO stages (169) and no difference in Ras expression was observed between the cases examined in spite of the differences in the degree of differentiation of the epithelial ovarian carcinomas (174).

## 5. Future perspectives

A major concern regarding gynaecological cancer is the lack of specific tumour markers for early detection, for accurate prediction of biological behaviour and for accurate assessment of prognosis. From this point of view *ras* oncogenes allow us to improve our understanding of disease aetiology (Fig. 2), and provide more precise diagnostic and prognostic characterization of individual tumours. The evaluation of *ras* activation in patients with cervical intraepithelial neoplasia, endometrial hyperplasia and benign or borderline ovarian tumours may be used to identify those at high risk for developing carcinomas. Differences in the incidence of *K-ras* gene mutations in various ethnic groups or geographic regions may indicate the presence of genetic or environmental factors influencing the pathway of female genital carcinogenesis. The involvement of *ras* oncogenes in radioresistance or multidrug resistance will result in the improvement of potential therapies that can be targeted at *ras* oncogenes, through approaches such as selective inhibition by anti-sense oligonucleotides. The potential *ras* oncogenes to be used as therapeutic targets in gynaecological cancer will require further research.

## References

- Lowy DR and Willumsen BM: Function and regulation of ras. *Annu Rev Biochem* 62: 851-891, 1993.
- Pells S, Divjak M, Romanowski P, Impey H, Hawkins NJ, Clarke AR, Hooper ML and Williamson DJ: Developmentally-regulated expression of murine K-ras isoforms. *Oncogene* 15: 1781-1786, 1997.
- Clarke S: Protein isoprenylation and methylation at carboxyl-terminal cysteine residues. *Annu Rev Biochem* 61: 355-386, 1992.
- Glomset JA and Farnsworth CC: Role of protein modification reactions in programming interactions between ras-related GTPases and cell membranes. *Annu Rev Cell Biol* 10: 181-205, 1994.
- Boguski MS and McCormick F: Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* 366: 643-654, 1993.
- McCormick F: Signal transduction. How receptors turn Ras on. *Nature* 363: 15-16, 1993.
- Downward J: Ras signalling and apoptosis. *Curr Opin Genet Dev* 8: 49-54, 1998.
- Shields JM, Pruitt K, McFall A, Shaub A and Der CJ: Understanding Ras: 'it ain't over 'til it's over'. *Trends Cell Biol* 10: 147-154, 2000.
- Hagemann C and Rapp UR: Isozyme-specific functions of Raf kinases. *Exp Cell Res* 253: 34-46, 1999.
- Schwieger A, Bauer L, Hanusch J, Sers C, Schafer R and Bauer G: ras oncogene expression determines sensitivity for intercellular induction of apoptosis. *Carcinogenesis* 22: 1385-1392, 2001.
- Kauffmann-Zeh A, Rodriguez-Viciana P, Ulrich E, Gilbert C, Coffey P, Downward J and Evan G: Suppression of c-Myc-induced apoptosis by Ras signalling through PI(3)K and PKB. *Nature* 385: 544-548, 1997.
- Lloyd AC: Ras versus cyclin-dependent kinase inhibitors. *Curr Opin Genet Dev* 8: 43-48, 1998.
- Jiang H, Luo JQ, Urano T, Frankel P, Lu Z, Foster DA and Feig LA: Involvement of Ral GTPase in v-Src-induced phospholipase D activation. *Nature* 378: 409-412, 1995.
- Wolthuis RM and Bos JL: Ras caught in another affair: the exchange factors for Ral. *Curr Opin Genet Dev* 9: 112-117, 1999.
- Feig LA, Urano T and Cantor S: Evidence for a Ras/Ral signaling cascade. *Trends Biochem Sci* 21: 438-441, 1996.
- Rameh LE and Cantley LC: The role of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function. *J Biol Chem* 274: 8347-8350, 1999.
- Barbacid M: ras genes. *Annu Rev Biochem* 56: 779-827, 1987.
- Field JK and Spandidos DA: The role of ras and myc oncogenes in human solid tumours and their relevance in diagnosis and prognosis (review). *Anticancer Res* 10: 1-22, 1990.
- Spandidos DA: The cancer story. *Cancer Biol Ther* 3: 1184-1186, 2004.
- Spandidos A and Wilkie NM: The normal human H-ras1 gene can act as an onco-suppressor. *Br J Cancer Suppl* 9: 67-71, 1988.
- Spandidos DA, Frame M and Wilkie NM: Expression of the normal H-ras1 gene can suppress the transformed and tumorigenic phenotypes induced by mutant ras genes. *Anticancer Res* 10: 1543-1554, 1990.
- Zhang Z, Wang Y, Vikis HG, Johnson L, Liu G, Li J, Anderson MW, Sills RC, Hong HL, Devereux TR, Jacks T, Guan KL and You M: Wild-type Kras2 can inhibit lung carcinogenesis in mice. *Nat Genet* 29: 25-33, 2001.
- Spandidos DA, Sourvinos G, Tsatsanis C and Zafiroopoulos A: Normal ras genes: Their onco-suppressor and pro-apoptotic functions (Review). *Int J Oncol* 21: 237-241, 2002.
- Pronk GJ and Bos JL: The role of p21ras in receptor tyrosine kinase signalling. *Biochim Biophys Acta* 1198: 131-147, 1994.
- Kiaris H and Spandidos DA: Mutations of ras genes in human tumours. *Int J Oncol* 7: 413-421, 1995.
- Spandidos DA, Sourvinos G and Koffa M: ras genes, p53 and HPV as prognostic indicators in human cancer. *Oncol Rep* 4: 211-218, 1997.
- Zachos G and Spandidos DA: Expression of ras proto-oncogenes: regulation and implications in the development of human tumors. *Crit Rev Oncol Hematol* 26: 65-75, 1997.
- Spandidos DA and Wilkie NM: Malignant transformation of early passage rodent cells by a single mutated human oncogene. *Nature* 310: 469-475, 1984.
- Waggoner SE: Cervical cancer. *Lancet* 361: 2217-2225, 2003.
- Bosch FX and Munoz N: The viral etiology of cervical cancer. *Virus Res* 89: 183-190, 2002.
- Di Paolo JA, Woodworth CD, Popescu NC, Notario V and Doniger J: Induction of human cervical squamous cell carcinoma by sequential transfection with human papillomavirus 16 DNA and viral Harvey ras. *Oncogene* 4: 395-399, 1989.
- Chen TM and Defendi V: Functional interaction of p53 with HPV18 E6, c-myc and H-ras in 3T3 cells. *Oncogene* 7: 1541-1547, 1992.
- Gaiotti D, Chung J, Iglesias M, Nees M, Baker PD, Evans CH and Woodworth CD: Tumor necrosis factor-alpha promotes human papillomavirus (HPV) E6/E7 RNA expression and cyclin-dependent kinase activity in HPV-immortalized keratinocytes by a ras-dependent pathway. *Mol Carcinog* 27: 97-109, 2000.
- Sreelekha TT, Nair MK, Jayaprakash PG and Pillai MR: Immunophenotype of mutant ras p21 and early response to radiotherapy in cancer of the uterine cervix. *J Exp Clin Cancer Res* 18: 337-341, 1999.
- Sato S, Ito K, Ozawa N, Yajima A and Sasano H: Analysis of point mutations at codon 12 of K-ras in human endometrial carcinoma and cervical adenocarcinoma by dot blot hybridization and polymerase chain reaction. *Tohoku J Exp Med* 165: 131-136, 1991.
- Koffa M, Koumantakis E, Ergazaki M, Malamou-Mitsi V and Spandidos DA: Detection of ras gene mutations and HPV in lesions of the human female reproductive tract. *Int J Oncol* 5: 189-195, 1994.
- Dokianakis DN, Papaefthimiou M, Tsiveleka A and Spandidos DA: High prevalence of HPV18 in correlation with ras gene mutations and clinicopathological parameters in cervical cancer studied from stained cytological smears. *Oncol Rep* 6: 1327-1331, 1999.
- Wong YF, Chung TK, Cheung TH, Lam SK, Xu YG and Chang AM: Frequent ras gene mutations in squamous cell cervical cancer. *Cancer Lett* 95: 29-32, 1995.
- Parker MF, Arroyo GF, Geradts J, Sabichi AL, Park RC, Taylor RR and Birrer MJ: Molecular characterization of adenocarcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol* 64: 242-251, 1997.
- Ferguson AW, Svoboda-Newman SM and Frank TS: Analysis of human papillomavirus infection and molecular alterations in adenocarcinoma of the cervix. *Mod Pathol* 11: 11-18, 1998.

41. Stenzel A, Semczuk A, Rozynskal K, Jakowicki J and Wojciorowski J: 'Low-risk' and 'high-risk' HPV-infection and K-ras gene point mutations in human cervical cancer: a study of 31 cases. *Pathol Res Pract* 197: 597-603, 2001.
42. Falcinelli C, Luzi P, Alberti P, Cosmi EV and Anceschi MM: Human papilloma virus infection and Ki-ras oncogene in paraffin-embedded squamous carcinomas of the cervix. *Gynecol Obstet Invest* 36: 185-188, 1993.
43. Jiko K, Tsuda H, Sato S and Hirohashi S: Pathogenetic significance of p53 and c-Ki-ras gene mutations and human papillomavirus DNA integration in adenocarcinoma of the uterine cervix and uterine isthmus. *Int J Cancer* 59: 601-606, 1994.
44. Pochylski T and Kwasniewska A: Absence of point mutation in codons 12 and 13 of K-RAS oncogene in HPV-associated high grade dysplasia and squamous cell cervical carcinoma. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 111: 68-73, 2003.
45. Huang G, Xiao X, Huang Y and Huang R: Carcinogenic mechanisms of multiple genes in cervical carcinoma. *Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao* 27: 5-9, 1996.
46. Lee JH, Lee SK, Yang MH, Ahmed MM, Mohiuddin M and Lee EY: Expression and mutation of H-ras in uterine cervical cancer. *Gynecol Oncol* 62: 49-54, 1996.
47. O'Leary JJ, Landers RJ, Silva I, Uhlmann V, Crowley M, Healy I and Luttich K: Molecular analysis of ras oncogenes in CIN III and in stage I and II invasive squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *J Clin Pathol* 51: 576-582, 1998.
48. Grendys EC Jr, Barnes WA, Weitzel J, Sparkowski J and Schlegel R: Identification of H, K, and N-ras point mutations in stage IB cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 65: 343-347, 1997.
49. Willis G, Jennings B, Ball RY, New NE and Gibson I: Analysis of ras point mutations and human papillomavirus 16 and 18 in cervical carcinomata and their metastases. *Gynecol Oncol* 49: 359-364, 1993.
50. Roh J, Kim M, Kim J, Park N, Song Y, Kang S and Lee H: Polymorphisms in codon 31 of p21 and cervical cancer susceptibility in Korean women. *Cancer Lett* 165: 59-62, 2001.
51. 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.
52. Golijow CD, Mouron SA, Gomez MA and Dulout FN: Analysis of prevalence of point mutations in codon 12 of oncogene K-ras from non-cancerous samples of cervical cytology positive for type 16 or 18 PVH. *Invest Clin* 40: 257-266, 1999.
53. Alonio LV, Picconi MA, Dalbert D, Mural J, Bartt O, Bazan G, Dominguez M and Teyssie AR: Ha-ras oncogene mutation associated to progression of papillomavirus induced lesions of uterine cervix. *J Clin Virol* 27: 263-269, 2003.
54. Prokopakis P, Sourvinos G, Koumantaki Y, Koumantakis E and Spandidos DA: K-ras mutations and HPV infection in cervicitis and intraepithelial neoplasias of the cervix. *Oncol Rep* 9: 129-133, 2002.
55. Van Le L, Stoerker J, Rinehart CA and Fowler WC: H-ras codon 12 mutation in cervical dysplasia. *Gynecol Oncol* 49: 181-184, 1993.
56. Aoyama C, Peters J, Senadheera S, Liu P and Shimada H: Uterine cervical dysplasia and cancer: identification of c-myc status by quantitative polymerase chain reaction. *Diagn Mol Pathol* 7: 324-330, 1998.
57. Mouron SA, Abba MC, Guerci A, Gomez MA, Dulout FN and Golijow CD: Association between activated K-ras and c-erbB-2 oncogenes with 'high-risk' and 'low-risk' human papilloma virus types in preinvasive cervical lesions. *Mutat Res* 469: 127-134, 2000.
58. Pinion SB, Kennedy JH, Miller RW and MacLean AB: Oncogene expression in cervical intraepithelial neoplasia and invasive cancer of cervix. *Lancet* 337: 819-820, 1991.
59. Iwasaka T, Yokoyama M, Oh-uchida M, Matsuo N, Hara K, Fukuyama K, Hachisuga T, Fukuda K and Sugimori H: Detection of human papillomavirus genome and analysis of expression of c-myc and Ha-ras oncogenes in invasive cervical carcinomas. *Gynecol Oncol* 46: 298-303, 1992.
60. Riou G, Barrois M, Sheng ZM, Duvillard P and Lhomme C: Somatic deletions and mutations of c-Ha-ras gene in human cervical cancers. *Oncogene* 3: 329-333, 1988.
61. Shirasawa H, Tomita Y, Sekiya S, Takamizawa H and Simizu B: Integration and transcription of human papillomavirus type 16 and 18 sequences in cell lines derived from cervical carcinomas. *J Gen Virol* 68: 583-591, 1987.
62. Shiratori Y, Soma Y, Maruyama H, Sato S, Takano A and Sato K: Immunohistochemical detection of the placental form of glutathione S-transferase in dysplastic and neoplastic human uterine cervix lesions. *Cancer Res* 47: 6806-6809, 1987.
63. Agnantis NJ, Spandidos DA, Mahera H, Parissi P, Kakkanas A, Pintzas A and Papacharalampous NX: Immunohistochemical study of ras oncogene expression in endometrial and cervical human lesions. *Eur J Gynaecol Oncol* 9: 360-365, 1988.
64. Huang G, Lu S, Mao T and Song Y: Clinical significance on expression of the ras gene product P21 in human cervical carcinoma tissues. *Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao* 23: 61-64, 1992.
65. Skomedal H, Kristensen GB, Lie AK and Holm R: Aberrant expression of the cell cycle associated proteins TP53, MDM2, p21, p27, cdk4, cyclin D1, RB, and EGFR in cervical carcinomas. *Gynecol Oncol* 73: 223-228, 1999.
66. Leung TW, Cheung AN, Cheng DK, Wong LC and Ngan HY: Expressions of c-erbB-2, epidermal growth factor receptor and pan-ras proto-oncogenes in adenocarcinoma of the cervix: correlation with clinical prognosis. *Oncol Rep* 8: 1159-1164, 2001.
67. Mammias IN, Zafiroopoulos A, Koumantakis E, Sifakis S and Spandidos DA: Transcriptional activation of H- and N-ras oncogenes in human cervical cancer. *Gynecol Oncol* 92: 941-948, 2004.
68. Sagae S, Kuzumaki N, Hisada T, Mugikura Y, Kudo R and Hashimoto M: ras oncogene expression and prognosis of invasive squamous cell carcinomas of the uterine cervix. *Cancer* 63: 1577-1582, 1989.
69. Hayashi Y, Hachisuga T, Iwasaka T, Fukuda K, Okuma Y, Yokoyama M and Sugimori H: Expression of ras oncogene product and EGF receptor in cervical squamous cell carcinomas and its relationship to lymph node involvement. *Gynecol Oncol* 40: 147-151, 1991.
70. Garzetti GG, Ciavattini A, Lucarini G, Goteri G, Nictolis MD, Romanini C and Biagini G: Ras p21 immunostaining in early stage squamous cervical carcinoma: relationship with lymph nodal involvement and 72 kDa-metalloproteinase index. *Anticancer Res* 18: 609-613, 1998.
71. Sagae S, Kudo R, Kuzumaki N, Hisada T, Mugikura Y, Nihei T, Takeda T and Hashimoto M: Ras oncogene expression and progression in intraepithelial neoplasia of the uterine cervix. *Cancer* 66: 295-301, 1990.
72. Nair SA, Nair MB, Jayaprakash PG, Rajalekshmy TN, Nair MK and Pillai MR: ras and c-myc oncoproteins during tumor progression in the uterine cervix. *Tumori* 84: 583-588, 1998.
73. Ngan HY, Liu SS, Yu H, Liu KL and Cheung AN: Proto-oncogenes and p53 protein expression in normal cervical stratified squamous epithelium and cervical intra-epithelial neoplasia. *Eur J Cancer* 35: 1546-1550, 1999.
74. Pedroza-Saavedra A, Cruz A, Esquivel F, De La Torre F, Berumen J, Gariglio P and Gutierrez L: High prevalence of serum antibodies to Ras and type 16 E4 proteins of human papillomavirus in patients with precancerous lesions of the uterine cervix. *Arch Virol* 145: 603-623, 2000.
75. Slagle BL, Kaufman RH, Reeves WC and Icenogle JP: Expression of ras, c-myc, and p53 proteins in cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer* 83: 1401-1408, 1998.
76. Giannoudis A and Herrington CS: Differential expression of p53 and p21 in low grade cervical squamous intraepithelial lesions infected with low, intermediate, and high risk human papillomaviruses. *Cancer* 89: 1300-1307, 2000.
77. Berchuck A and Boyd J: Molecular basis of endometrial cancer. *Cancer* 76: 2034-2040, 1995.
78. Sherman ME: Theories of endometrial carcinogenesis: a multidisciplinary approach. *Mod Pathol* 13: 295-308, 2000.
79. Albright CD, Tsongalis GJ, Resau JH and Kaufman DG: Human endometrial carcinoma cells release factors which inhibit the growth of normal epithelial cells in culture. *Cell Biol Toxicol* 11: 251-261, 1995.
80. Fujimoto J, Ichigo S, Hori M, Morishita S and Tamaya T: Estrogen induces c-Ha-ras expression via activation of tyrosine kinase in uterine endometrial fibroblasts and cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 55: 25-33, 1995.



81. Kato K, Ueoka Y, Tamura T, Nishida J and Wake N: Oncogenic Ras modulates epidermal growth factor responsiveness in endometrial carcinomas. *Eur J Cancer* 34: 737-744, 1998.
82. Irie T, Kubushiro K, Suzuki K, Tsukazaki K, Umezawa K and Nozawa S: Inhibition of attachment and chemotactic invasion of uterine endometrial cancer cells by a new vinca alkaloid, conophylline. *Anticancer Res* 19: 3061-3066, 1999.
83. Enomoto T, Inoue M, Perantoni AO, Terakawa N, Tanizawa O and Rice JM: K-ras activation in neoplasms of the human female reproductive tract. *Cancer Res* 50: 6139-6145, 1990.
84. Boyd J and Risinger JI: Analysis of oncogene alterations in human endometrial carcinoma: prevalence of ras mutations. *Mol Carcinog* 4: 189-195, 1991.
85. Fujimoto I, Shimizu Y, Hirai Y, Chen JT, Teshima H, Hasumi K, Masubuchi K and Takahashi M: Studies on ras oncogene activation in endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 48: 196-202, 1993.
86. Mizuuchi H, Nasim S, Kudo R, Silverberg SG, Greenhouse S and Garrett CT: Clinical implications of K-ras mutations in malignant epithelial tumors of the endometrium. *Cancer Res* 52: 2777-2781, 1992.
87. Ignar-Trowbridge D, Risinger JI, Dent GA, Kohler M, Berchuck A, McLachlan JA and Boyd J: Mutations of the Ki-ras oncogene in endometrial carcinoma. *Am J Obstet Gynecol* 167: 227-232, 1992.
88. Duggan BD, Felix JC, Muderspach LI, Tsao JL and Shibata DK: Early mutational activation of the c-Ki-ras oncogene in endometrial carcinoma. *Cancer Res* 54: 1604-1607, 1994.
89. Enomoto T, Fujita M, Inoue M, Nomura T and Shroyer KR: Alteration of the p53 tumor suppressor gene and activation of c-K-ras-2 protooncogene in endometrial adenocarcinoma from Colorado. *Am J Clin Pathol* 103: 224-230, 1995.
90. Semczuk A, Schneider-Stock R, Berbec H, Marzec B, Jakowicki JA and Roessner A: K-ras exon 2 point mutations in human endometrial cancer. *Cancer Lett* 164: 207-212, 2001.
91. Semczuk A, Berbec H, Kostuch M, Kotarski J and Wojcierowski J: Detection of K-ras mutations in cancerous lesions of human endometrium. *Eur J Gynaecol Oncol* 18: 80-83, 1997.
92. Enomoto T, Inoue M, Perantoni AO, Buzard GS, Miki H, Tanizawa O and Rice JM: K-ras activation in premalignant and malignant epithelial lesions of the human uterus. *Cancer Res* 51: 5308-5314, 1991.
93. Caduff RF, Johnston CM and Frank TS: Mutations of the Ki-ras oncogene in carcinoma of the endometrium. *Am J Pathol* 146: 182-188, 1995.
94. Varras MN, Koffa M, Koumantakis E, Ergazaki M, Protopapa E, Michalakis S and Spandidos DA: ras gene mutations in human endometrial carcinoma. *Oncology* 53: 505-510, 1996.
95. Lagarda H, Catusas L, Arguelles R, Matias-Guiu X and Prat J: K-ras mutations in endometrial carcinomas with microsatellite instability. *J Pathol* 193: 193-199, 2001.
96. Esteller M, Garcia A, Martinez-Palones JM, Xercavins J and Reventos J: The clinicopathological significance of K-RAS point mutation and gene amplification in endometrial cancer. *Eur J Cancer* 33: 1572-1577, 1997.
97. Semczuk A, Berbec H, Kostuch M, Cybulski M, Wojcierowski J and Baranowski W: K-ras gene point mutations in human endometrial carcinomas: correlation with clinicopathological features and patients' outcome. *J Cancer Res Clin Oncol* 124: 695-700, 1998.
98. Niederacher D, An HX, Cho YJ, Hantschmann P, Bender HG and Beckmann MW: Mutations and amplification of oncogenes in endometrial cancer. *Oncology* 56: 59-65, 1999.
99. Manavi M, Bauer M, Baghestanian M, Berger A, Kucera E, Pischinger K, Battistutti W and Czerwenka K: Oncogenic potential of c-erbB-2 and its association with c-K-ras in premalignant and malignant lesions of the human uterine endometrium. *Tumour Biol* 22: 299-309, 2001.
100. Lax SF, Kendall B, Tashiro H, Slebos RJ and Hedrick L: The frequency of p53, K-ras mutations, and microsatellite instability differs in uterine endometrioid and serous carcinoma: evidence of distinct molecular genetic pathways. *Cancer* 88: 814-824, 2000.
101. Hori M, Takechi K, Arai Y, Yomo H, Itabashi M, Shimazaki J and Inagawa S: Comparison of macroscopic appearance and estrogen receptor-alpha regulators after gene alteration in human endometrial cancer. *Int J Gynecol Cancer* 10: 469-476, 2000.
102. Ito K, Watanabe K, Nasim S, Sasano H, Sato S, Yajima A, Silverberg SG and Garrett CT: K-ras point mutations in endometrial carcinoma: effect on outcome is dependent on age of patient. *Gynecol Oncol* 63: 238-246, 1996.
103. Zachos G, Varras M, Koffa M, Ergazaki M and Spandidos DA: The association of the H-ras oncogene and steroid hormone receptors in gynecological cancer. *J Exp Ther Oncol* 1: 335-341, 1996.
104. Zachos G and Spandidos DA: Transcriptional regulation of the c-H-ras1 gene by the P53 protein is implicated in the development of human endometrial and ovarian tumours. *Oncogene* 16: 3013-3017, 1998.
105. Esteller M, Garcia A, Martinez-Palones JM, Xercavins J and Reventos J: Clinicopathologic features and genetic alterations in endometrioid carcinoma of the uterus with villoglandular differentiation. *Am J Clin Pathol* 111: 336-342, 1999.
106. Semczuk A, Schneider-Stock R, Miturski R, Skomra D, Tomaszewski J, Roessner A and Jakowicki JA: RB protein expression in human endometrial carcinomas-an immunohistochemical study. *Pathol Res Pract* 196: 41-46, 2000.
107. Sakamoto T, Murase T, Urushibata H, Kato K, Takada H, Imamura T, Mori H and Wake N: Microsatellite instability and somatic mutations in endometrial carcinomas. *Gynecol Oncol* 71: 53-58, 1998.
108. Mutter GL, Wada H, Faquin WC and Enomoto T: K-ras mutations appear in the premalignant phase of both microsatellite stable and unstable endometrial carcinogenesis. *Mol Pathol* 52: 257-262, 1999.
109. Alexander-Sefre F, Salvesen HB, Ryan A, Singh N, Akslen LA, MacDonald N, Wilbanks G and Jacobs IJ: Molecular assessment of depth of myometrial invasion in stage I endometrial cancer: a model based on K-ras mutation analysis. *Gynecol Oncol* 91: 218-225, 2003.
110. Mori Y, Mizuuchi H, Sato K, Okamura N and Kudo R: The factors involved in invasive ability of endometrial carcinoma cells. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi* 46: 509-516, 1994.
111. Jones MW, Kounelis S, Hsu C, Papadaki H, Bakker A, Swalsky PA and Finkelstein SD: Prognostic value of p53 and K-ras-2 topographic genotyping in endometrial carcinoma: a clinicopathologic and molecular comparison. *Int J Gynecol Pathol* 16: 354-360, 1997.
112. Sun H, Enomoto T, Shroyer KR, Ozaki K, Fujita M, Ueda Y, Nakashima R, Kuragaki C, Ueda G and Murata Y: Clonal analysis and mutations in the PTEN and the K-ras genes in endometrial hyperplasia. *Diagn Mol Pathol* 11: 204-211, 2002.
113. Hachisuga T, Miyakawa T, Tsujioka H, Horiuchi S, Emoto M and Kawarabayashi T: K-ras mutation in tamoxifen-related endometrial polyps. *Cancer* 98: 1890-1897, 2003.
114. Scambia G, Catozzi L, Benedetti-Panici P, Ferrandina G, Battaglia F, Giovannini G, Distefano M, Pellizzola D, Piffanelli A and Mancuso S: Expression of ras p21 oncoprotein in normal and neoplastic human endometrium. *Gynecol Oncol* 50: 339-346, 1993.
115. Yokoyama Y, Sagara M, Sato S and Saito Y: Value of glutathione S-transferase pi and the oncogene products c-Jun, c-Fos, c-H-Ras, and c-Myc as a prognostic indicator in endometrial carcinomas. *Gynecol Oncol* 68: 280-287, 1998.
116. Semczuk A, Miturski R, Baranowski W and Jakowicki JA: ras p21 immunohistochemical detection in human endometrial carcinomas. *Gynecol Obstet Invest* 44: 132-135, 1997.
117. Long CA, O'Brien TJ, Sanders MM, Bard DS and Quirk JG Jr: ras oncogene is expressed in adenocarcinoma of the endometrium. *Am J Obstet Gynecol* 159: 1512-1516, 1988.
118. Miturski R, Semczuk A and Jakowicki J: Simultaneous expression of the ras p21 and p53 proteins in human endometrial carcinomas. *Acta Histochem* 98: 411-418, 1996.
119. Yaginuma Y, Fujita M, Saitoh S, Hayakawa K, Kuzumaki N and Ishikawa M: Immunohistochemical analysis of ras oncogene product p21 in human endometrial carcinoma. *Acta Histochem* 95: 23-29, 1993.
120. Tornos C, Silva EG, El-Naggar A and Burke TW: Aggressive stage I grade 1 endometrial carcinoma. *Cancer* 70: 790-798, 1992.
121. Gajewski W and Legare RD: Ovarian cancer. *Surg Oncol Clin North Am* 7: 317-333, 1998.
122. Matias-Guiu X and Prat J: Molecular pathology of ovarian carcinomas. *Virchows Arch* 433: 103-111, 1998.

123. Kusakari T, Kariya M, Mandai M, Tsuruta Y, Hamid AA, Fukuhara K, Nanbu K, Takakura K and Fujii S: C-erbB-2 or mutant Ha-ras induced malignant transformation of immortalized human ovarian surface epithelial cells *in vitro*. *Br J Cancer* 89: 2293-2298, 2003.
124. Yang G, Thompson JA, Fang B and Liu J: Silencing of H-ras gene expression by retrovirus-mediated siRNA decreases transformation efficiency and tumor growth in a model of human ovarian cancer. *Oncogene* 22: 5694-5701, 2003.
125. Yuan ZQ, Sun M, Feldman RI, Wang G, Ma X, Jiang C, Coppola D, Nicosia SV and Cheng JQ: Frequent activation of AKT2 and induction of apoptosis by inhibition of phosphoinositide-3-OH kinase/Akt pathway in human ovarian cancer. *Oncogene* 19: 2324-2330, 2000.
126. Liu AX, Testa JR, Hamilton TC, Jove R, Nicosia SV and Cheng JQ: AKT2, a member of the protein kinase B family, is activated by growth factors, v-Ha-ras, and v-src through phosphatidylinositol 3-kinase in human ovarian epithelial cancer cells. *Cancer Res* 58: 2973-2977, 1998.
127. Thangaraju M, Kaufmann SH and Couch FJ: BRCA1 facilitates stress-induced apoptosis in breast and ovarian cancer cell lines. *J Biol Chem* 275: 33487-33496, 2000.
128. Ueoka Y, Kato K, Kuriaki Y, Horiuchi S, Terao Y, Nishida J, Ueno H and Wake N: Hepatocyte growth factor modulates motility and invasiveness of ovarian carcinomas via Ras-mediated pathway. *Br J Cancer* 82: 891-899, 2000.
129. Teneriello MG, Ebina M, Linnoila RI, Henry M, Nash JD, Park RC and Birrer MJ: p53 and Ki-ras gene mutations in epithelial ovarian neoplasms. *Cancer Res* 53: 3103-3108, 1993.
130. Park JS, Kim HK, Han SK, Lee JM, Namkoong SE and Kim SJ: Detection of c-K-ras point mutation in ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 5: 107-111, 1995.
131. Enomoto T, Weghorst CM, Inoue M, Tanizawa O and Rice JM: K-ras activation occurs frequently in mucinous adenocarcinomas and rarely in other common epithelial tumors of the human ovary. *Am J Pathol* 139: 777-785, 1991.
132. Chien CH and Chow SN: Point mutation of the ras oncogene in human ovarian cancer. *DNA Cell Biol* 12: 623-627, 1993.
133. Hogdall EV, Hogdall CK, Blaakaer J, Christensen L, Bock JE, Vuust J, Glud E and Kjaer SK: K-ras alterations in Danish ovarian tumour patients. From the Danish 'Malova' Ovarian Cancer study. *Gynecol Oncol* 89: 31-36, 2003.
134. Zuna RE, Mitchell ML, Mulick KA and Weijchert WM: Cytohistologic correlation of peritoneal washing cytology in gynecologic disease. *Acta Cytol* 33: 327-336, 1989.
135. Feig LA, Bast RC Jr, Knapp RC and Cooper GM: Somatic activation of rasK gene in a human ovarian carcinoma. *Science* 223: 698-701, 1984.
136. Dokianakis DN, Varras MN, Papaefthimiou M, Apostolopoulou J, Simiakaki H, Diakomanolis E and Spandidos DA: Ras gene activation in malignant cells of human ovarian carcinoma peritoneal fluids. *Clin Exp Metastasis* 17: 293-297, 1999.
137. Parrella P, Zangen R, Sidransky D and Nicol T: Molecular analysis of peritoneal fluid in ovarian cancer patients. *Mod Pathol* 16: 636-640, 2003.
138. Ichikawa Y, Nishida M, Suzuki H, Yoshida S, Tsunoda H, Kubo T, Uchida K and Miwa M: Mutation of K-ras proto-oncogene is associated with histological subtypes in human mucinous ovarian tumors. *Cancer Res* 54: 33-35, 1994.
139. Suzuki M, Saito S, Saga Y, Ohwada M and Sato I: Mutation of K-RAS protooncogene and loss of heterozygosity on 6q27 in serous and mucinous ovarian carcinomas. *Cancer Genet Cytogenet* 118: 132-135, 2000.
140. Singer G, Shih Le M, Truskinovsky A, Umudum H and Kurman RJ: Mutational analysis of K-ras segregates ovarian serous carcinomas into two types: invasive MPSC (low-grade tumor) and conventional serous carcinoma (high-grade tumor). *Int J Gynecol Pathol* 22: 37-41, 2003.
141. Okuda T, Otsuka J, Sekizawa A, Saito H, Makino R, Kushima M, Farina A, Kuwano Y and Okai T: p53 mutations and over-expression affect prognosis of ovarian endometrioid cancer but not clear cell cancer. *Gynecol Oncol* 88: 318-325, 2003.
142. Varras MN, Sourvinos G, Diakomanolis E, Koumantakis E, Flouris GA, Lekka-Katsouli J, Michalas S and Spandidos DA: Detection and clinical correlations of ras gene mutations in human ovarian tumors. *Oncology* 56: 89-96, 1999.
143. Pieretti M, Hopenhayn-Rich C, Khattar NH, Cao Y, Huang B and Tucker TC: Heterogeneity of ovarian cancer: relationships among histological group, stage of disease, tumor markers, patient characteristics, and survival. *Cancer Invest* 20: 11-23, 2002.
144. Cuatrecasas M, Erill N, Musulen E, Costa I, Matias-Guiu X and Prat J: K-ras mutations in non-mucinous ovarian epithelial tumors: a molecular analysis and clinicopathologic study of 144 patients. *Cancer* 82: 1088-1095, 1998.
145. Mok SC, Bell DA, Knapp RC, Fishbaugh PM, Welch WR, Muto MG, Berkowitz RS and Tsao SW: Mutation of K-ras protooncogene in human ovarian epithelial tumors of borderline malignancy. *Cancer Res* 53: 1489-1492, 1993.
146. Scambia G, Masciullo V, Benedetti Panici P, Marone M, Ferrandina G, Todaro N, Bellacosa A, Jain SK, Neri G, Piffanelli A and Mancuso S: Prognostic significance of ras/p21 alterations in human ovarian cancer. *Br J Cancer* 75: 1547-1553, 1997.
147. Cuatrecasas M, Villanueva A, Matias-Guiu X and Prat J: K-ras mutations in mucinous ovarian tumors: a clinicopathologic and molecular study of 95 cases. *Cancer* 79: 1581-1586, 1997.
148. Tanimoto H, Mehta KD, Parmley TH, Shigemasa K, Parham GP, Clarke J and O'Brien TJ: Expression of the farnesyltransferase beta-subunit gene in human ovarian carcinoma: correlation to K-ras mutation. *Gynecol Oncol* 66: 308-312, 1997.
149. Mandai M, Konishi I, Kuroda H, Komatsu T, Yamamoto S, Nanbu K, Matsushita K, Fukumoto M, Yamabe H and Mori T: Heterogeneous distribution of K-ras-mutated epithelia in mucinous ovarian tumors with special reference to histopathology. *Hum Pathol* 29: 34-40, 1998.
150. Haas CJ, Diebold J, Hirschmann A, Rohrbach H and Lohrs U: In serous ovarian neoplasms the frequency of Ki-ras mutations correlates with their malignant potential. *Virchows Arch* 434: 117-120, 1999.
151. Caduff RF, Svoboda-Newman SM, Ferguson AW, Johnston CM and Frank TS: Comparison of mutations of Ki-RAS and p53 immunoreactivity in borderline and malignant epithelial ovarian tumors. *Am J Surg Pathol* 23: 323-328, 1999.
152. Garrett AP, Lee KR, Colitti CR, Muto MG, Berkowitz RS and Mok SC: K-ras mutation may be an early event in mucinous ovarian tumorigenesis. *Int J Gynecol Pathol* 20: 244-251, 2001.
153. Fujita M, Enomoto T and Murata Y: Genetic alterations in ovarian carcinoma: with specific reference to histological subtypes. *Mol Cell Endocrinol* 202: 97-99, 2003.
154. Thomas NA, Neville PJ, Baxter SW and Campbell IG: Genetic analysis of benign ovarian tumors. *Int J Cancer* 105: 499-505, 2003.
155. Diebold J, Seemuller F and Lohrs U: K-RAS mutations in ovarian and extraovarian lesions of serous tumors of borderline malignancy. *Lab Invest* 83: 251-258, 2003.
156. van't Veer LJ, Hermens R, van den Berg-Bakker LA, Cheng NC, Fleuren GJ, Bos JL, Cleton FJ and Schrier PI: ras oncogene activation in human ovarian carcinoma. *Oncogene* 2: 157-165, 1988.
157. Masuda H, Battifora H, Yokota J, Meltzer S and Cline MJ: Specificity of proto-oncogene amplification in human malignant diseases. *Mol Biol Med* 4: 213-227, 1987.
158. Zhou DJ, Gonzalez-Cadavid N, Ahuja H, Battifora H, Moore GE and Cline MJ: A unique pattern of proto-oncogene abnormalities in ovarian adenocarcinomas. *Cancer* 62: 1573-1576, 1988.
159. Bian M, Fan Q, Huang S, Ma J and Lang J: Amplifications of proto-oncogenes in ovarian carcinoma. *Chin Med J (Engl)* 108: 844-848, 1995.
160. Boltz EM, Kefford RF, Leary JA, Houghton CR and Friedlander ML: Amplification of c-ras-Ki oncogene in human ovarian tumours. *Int J Cancer* 43: 428-430, 1989.
161. Csokay B, Papp J, Besznyak I, Bosze P, Sarosi Z, Toth J, Zalay Z and Olah E: Oncogene patterns in breast and ovarian carcinomas. *Eur J Surg Oncol* 19: 593-599, 1993.
162. Smith DM, Groff DE, Pokul RK, Bear JL and Delgado G: Determination of cellular oncogene rearrangement or amplification in ovarian adenocarcinomas. *Am J Obstet Gynecol* 161: 911-915, 1989.
163. Chien CH, Chang KT and Chow SN: Amplification and expression of c-Ki-ras oncogene in human ovarian cancer. *Proc Natl Sci Counc Repub China B* 14: 27-32, 1990.

164. Viel A, De Pascale L, Toffoli G, Tumioto L, Miotto E and Boiocchi M: Frequent occurrence of Ha-ras allelic deletion in human ovarian adenocarcinomas. *Tumori* 77: 16-20, 1991.
165. Gallion HH, Powell DE, Smith LW, Morrow JK, Martin AW, van Nagell JR and Donaldson ES: Chromosome abnormalities in human epithelial ovarian malignancies. *Gynecol Oncol* 38: 473-477, 1990.
166. Eccles DM, Gruber L, Stewart M, Steel CM and Leonard RC: Allele loss on chromosome 11p is associated with poor survival in ovarian cancer. *Dis Markers* 10: 95-99, 1992.
167. Zheng JP, Robinson WR, Ehlen T, Yu MC and Dubeau L: Distinction of low grade from high grade human ovarian carcinomas on the basis of losses of heterozygosity on chromosomes 3, 6, and 11 and HER-2/neu gene amplification. *Cancer Res* 51: 4045-4051, 1991.
168. Rodenburg CJ, Koelma IA, Nap M and Fleuren GJ: Immunohistochemical detection of the ras oncogene product p21 in advanced ovarian cancer. Lack of correlation with clinical outcome. *Arch Pathol Lab Med* 112: 151-154, 1988.
169. Harlozinska A, Bar JK, Sobanska E and Goluda M: p53, c-erbB-2 and p21ras expression in tumor effusion cells of patients with histopathologically different ovarian neoplasms. *Anticancer Res* 17: 3545-3552, 1997.
170. Van Dam PA, Vergote IB, Lowe DG, Watson JV, van Damme P, van der Auwera JC and Shepherd JH: Expression of c-erbB-2, c-myc, and c-ras oncoproteins, insulin-like growth factor receptor I, and epidermal growth factor receptor in ovarian carcinoma. *J Clin Pathol* 47: 914-919, 1994.
171. Yaginuma Y, Yamashita K, Kuzumaki N, Fujita M and Shimizu T: ras oncogene product p21 expression and prognosis of human ovarian tumors. *Gynecol Oncol* 46: 45-50, 1992.
172. Scambia G, Catozzi L, Panici PB, Ferrandina G, Coronetta F, Barozzi R, Baiocchi G, Uccelli L, Piffanelli A and Mancuso S: Expression of ras oncogene p21 protein in normal and neoplastic ovarian tissues: correlation with histopathologic features and receptors for estrogen, progesterone, and epidermal growth factor. *Am J Obstet Gynecol* 168: 71-78, 1993.
173. Katsaros D, Theillet C, Zola P, Louason G, Sanfilippo B, Isaia E, Arisio R, Giardina G and Sismondi P: Concurrent abnormal expression of erbB-2, myc and ras genes is associated with poor outcome of ovarian cancer patients. *Anticancer Res* 15: 1501-1510, 1995.
174. Kuwashima Y, Shisa H, Uehara T, Kurosumi M, Kobayashi Y, Tanuma J, Shiromizu K, Matsuzawa M and Kishi K: Immunohistochemical detection of ras p21 oncoprotein in undifferentiated and well-differentiated epithelial carcinomas of the human ovary. *Anticancer Res* 15: 2847-2850, 1995.
175. Kuhn W, Marx D, Meidel A, Fattahi-Meibodi A, Korabiowska M, Ruschenburg I, Droese M, Schauer A and Meden H: Borderline tumors of the ovary: a clinico-pathologic and immunohistochemical study of 54 cases. *J Obstet Gynaecol Res* 24: 437-445, 1998.
176. Kotylo PK, Robertson PB, Fineberg NS, Azzarelli B and Jakacki R: Flow cytometric DNA analysis of pediatric intracranial ependymomas. *Arch Pathol Lab Med* 121: 1255-1258, 1997.
177. Hung WC, Chai CY, Huang JS and Chuang LY: Expression of cyclin D1 and c-Ki-ras gene product in human epithelial ovarian tumors. *Hum Pathol* 27: 1324-1328, 1996.
178. Suto A, Bradlow HL, Wong GY, Osborne MP and Telang NT: Persistent estrogen responsiveness of ras oncogene-transformed mouse mammary epithelial cells. *Steroids* 57: 262-268, 1992.
179. Zachos G, Varras M, Koffa M, Ergazaki M and Spandidos DA: Glucocorticoid and estrogen receptors have elevated activity in human endometrial and ovarian tumors as compared to the adjacent normal tissues and recognize sequence elements of the H-ras proto-oncogene. *Jpn J Cancer Res* 87: 916-922, 1996.
180. Schmitz MJ, Hendricks DT, Farley J, Taylor RR, Geradts J, Rose GS and Birrer MJ: p27 and cyclin D1 abnormalities in uterine papillary serous carcinoma. *Gynecol Oncol* 77: 439-445, 2000.

**Human Papilloma Virus (HPV) typing in relation to *ras* oncogene mRNA expression in HPV-associated human squamous cervical neoplasia.**

Ioannis N. Mammias<sup>1</sup>, Alexandros Zafiropoulos<sup>2</sup>, Stavros Sifakis<sup>3</sup>, George Sourvinos<sup>1</sup> and  
Demetrios A. Spandidos<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Virology, Medical School, University of Crete, Heraklion, Crete, Greece

<sup>2</sup>Department of Histology, Medical School, University of Crete, Heraklion, Crete, Greece

<sup>3</sup>Department of Gynaecology, University Hospital of Heraklion, Heraklion, Crete, Greece

**\*Correspondence:** Professor D.A. Spandidos, Laboratory of Virology, Medical School, University of Crete, Heraklion 71100, Crete, Greece. Tel/Fax +30 2810-394633. e-mail: [spandidos@spandidos.gr](mailto:spandidos@spandidos.gr)

Keywords HPV 16; HPV 18; H-*ras*; K-*ras*; N-*ras*; squamous intraepithelial lesions; squamous cervical cancer

Short running head: HPV typing and *ras* expression

## ABSTRACT

*Objective.* Human papilloma virus (HPV) has been identified as the principal etiologic agent for cervical cancer and its precursors. Different HPV types have been associated with different oncogenic potential. The purpose of this study was to evaluate the relationship between HPV specific type infection and expression pattern of the *ras* family oncogenes in different grades of HPV-associated human cervical neoplasia. *Methods.* HPV typing was performed using polymerase chain reaction (PCR) in thirty-one HPV-positive human cervical specimens from patients with squamous intraepithelial lesions (SIL) or squamous cervical carcinoma (SCC). The mRNA expression levels of H-, K- and N-*ras* oncogenes were examined using reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) technique. Statistical analyses were performed using SPSS software. *Results.* Among patients with SCC, H-, K- and N-*ras* expression levels were higher in HPV 16/18-associated cases compared to HPV 16/18 non-associated samples ( $p=0.003$ ,  $p=0.004$  and  $p=0.0001$  respectively). Differences in *ras* mRNA expression between multiple HPV and single HPV infection were detected in patients with SCC. Among patients with SIL, no statistically significant relationship was found between *ras* expression and HPV status. *Conclusion.* Our findings indicate the possible role of *ras* signalling interaction with 'high-risk' HPV 16/18 and multiple HPV infection in cervical cancer development.

## INTRODUCTION

Human Papilloma Viruses (HPVs), small double-stranded DNA viruses, comprise a family of more than 130 genotypes (1). At present, more than 80 HPV genotypes have been identified in humans, each with a distinct tissue tropism. The circular HPV genome contains between 6800 and 8000 base pairs (bp) and is divided into eight open frames (ORF)-E6, E7, E1, E2, E4, E5 and L2 and L1- coding for 'early' or 'late' functions and some 1 kb of noncoding region (2). Specific types of HPV are implicated in the development of various types of human tumor, including cervical carcinoma, squamous cell carcinoma of the skin and of the upper respiratory tract and prostate cancer (2-4). Epidemiological studies have clearly established infection with HPV as the central cause of invasive cervical cancer (3).

HPV 16 and HPV 18, being cloned in 1983 and 1984, respectively, are the most prevalent HPV genotypes worldwide (2). Both types are considered as 'high-risk' types because their presence is predominately associated with cervical carcinoma and preneoplastic lesions. The presence of HPV 16 and 18 in patients with cervical carcinoma has been associated with vascular invasion, lymph node metastases, tumor size and FIGO stage (5). In patients with low grade intraepithelial lesions (LSIL), the persistence of 'high-risk' HPV has been proposed as a risk factor to a high-grade intraepithelial lesion (HSIL) progression (6). In contrast, 'low-risk' HPV types, most commonly types 6 and 11, are typically associated with benign proliferative lesions, such as genital warts, while HPV 33 is considered as an 'intermediate-risk' type (7).

The oncogenic potential of HPV 16 and HPV 18 has been attributed to two small open reading frames (ORF), E6 and E7, that encode proteins essential for viral replication. E6 and E7 proteins interact with host cell proteins that are implicated in cell cycle regulation, DNA cellular repair processes and apoptosis. The E6 protein binds and functionally inactivates tumor suppressor protein, p53, promoting its degradation by means of an ubiquitin-dependent pathway (8). The E7 protein, similarly, interacts with the retinoblastoma

(Rb) protein and inactivates it (9). In addition, E6 functions to activate telomerase and the SRC kinases and inhibit BAK, while E7 stimulates cyclins A and E and inactivates the cyclin-dependent kinase inhibitors, WAF1 and KIP1 (2). Although E6 and E7 can independently immortalize human cells, efficiency is increased when they are expressed together, indicating a synergizing action in host cell immortalization and malignant transformation (10).

Although the presence of HPV DNA and E6/7 expression is proposed as a virtually necessary cause of primary keratinocyte immortalization, HPV infection alone is not sufficient to engender a full tumorigenic conversion of cervical tissue (11). This is illustrated by the rare occurrence of cancer compared with the wide distribution of HPV infection worldwide and the long latency of HPV-induced cervical neoplasia. Interaction between HPV and host cell genes, including the inactivation of tumor suppressor genes and /or activation of cellular oncogenes is likely to contribute to the persistence and progression of HPV infection to cervical cancer.

Expression of cellular genes has been excessively studied in human malignancies by several researchers (12-14). The family of *ras* oncogenes, the most well-studied family of cellular genes, consists of H-*ras*, K-*ras* and N-*ras*, which have been mapped on chromosomes 12p12.1, 11p15.5 and 1p13 respectively (15). These genes encode for a 21kDa protein (p21 protein) with GTPase activity which participates in cellular signal transduction. *ras* oncogenes are frequently implicated in human tumors by four different mechanisms: mutation of *ras* proto-oncogenes (16,17), gene amplification, insertion of retroviral sequences and alterations in regulation of transcription (18). Overexpression of p21 protein has been implicated in several human cancers including breast, colon, head and neck, bladder and lung (18). *In vitro* experiments have shown that overexpression of the mutant T24 H-*ras* oncogene can cause the oncogenic transformation of early passage rodent cells (19), while overproduction of even the normal p21 protein is sufficient to confer a transforming potential on cultured cells (20).

In cervical neoplasia, overexpression of p21 protein has been detected in cervical tumors as opposed to benign or premalignant lesions and has been associated with the

development of the disease (21-25). Recently, our group demonstrated H-*ras* and N-*ras* overexpression as a marker of malignant transformation in human cervical neoplasia (26). *In vitro* experiments have demonstrated collaboration between HPV and *ras* in the malignant transformation process of cervical keratinocytes (27-29).

The purpose of this study was to examine the possible interaction of different HPV types with *ras* oncogene expression. We evaluated the *ras* expression pattern according to specific type HPV status and investigated differences between HPV 16 and HPV 18 positive, 'high risk' HPV16/18(+) and HPV16/18(-), multiple and single HPV(+) samples in different grades of human cervical neoplasia. To date, there is no data on the relationship between specific HPV types and transcriptional activation of *ras* oncogenes in human cervical tissue.

## **MATERIALS AND METHODS**

### *Patients and tissue specimens*

We collected cervical tissue from fifty six (56) patients who undertook surgical resection or biopsy at the Department of Obstetrics and Gynecology, University Hospital of Heraklion between 2002 and 2004. HPV detection was performed in the total number of samples. All the HPV-positive samples (31) were selected for further HPV typing and analysis of H-*ras*, K-*ras* and N-*ras* mRNA expression. The histological classification of the material was performed at the Department of Pathology, University of Crete, Heraklion, Greece. Clinicopathological data (histological subtype, stage, grade, age, tobacco use, lifestyle, outcome and survival data) were available for all patients included in the study. The present study was approved by the ethics committee of the University of Crete and all the patients participating in the study gave written informed consent.

### *DNA and RNA extraction*



Tissue obtained during surgery was divided into three parts. One portion was fixed in buffered formalin (pH 7.4) for routine histopathological assessment, while the two others portions were directly snap-frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until DNA and RNA extraction. DNA was extracted as previously described (30) and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Total RNA was isolated using the Trizol reagent (Life Technologies Ltd., UK) according to the manufacturer's instructions. RNA samples were treated with DNase I to remove residual traces of DNA. RNA content and purity were assessed by spectrophotometry (Hitachi Instruments Inc., USA) at 260 nm and 280 nm. One percent (1%) agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining were used to examine RNA integrity. RNA aliquots were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### *HPV detection*

For the detection of the HPV, the general primers, GP5 and GP6, were used(30). The extracted DNA (1 $\mu\text{l}$ ) of each sample was amplified in a total volume of 30  $\mu\text{l}$  containing 1x PCR reaction buffer, 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 200  $\mu\text{M}$  of each dNTP, 0.5  $\mu\text{M}$  of each primer and 0.6 U Platinum Taq DNA polymerase (Life Technologies Ltd., U.K.).The amplification conditions used for HPV detection using the general primers have been previously described (30). PCR products for HPV were analysed on 2% agarose gel and photographed on a UV light transilluminator.

#### *HPV typing*

For the distinction of HPV types we used separate specific pairs of primers (31) for virus types, HPV 16, HPV 18, HPV 33 and HPV 11, giving a different length of amplified DNA. The extracted DNA (1 $\mu\text{l}$ ) of each sample was amplified in a total volume of 20  $\mu\text{l}$  containing 1x PCR reaction buffer, 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 200  $\mu\text{M}$  of each dNTP, 0.5  $\mu\text{M}$  of each primer (sense and antisense) and 0.6 U Platinum Taq DNA polymerase (Life Technologies Ltd., U.K.). The amplification conditions used for HPV detection using the specific primers have been previously described by Koffa et al (31). Ten  $\mu\text{l}$  of the digestion product was

electrophoresed through an 8% polyacrylamide gel and silver stained. The PCR product size of HPV 16 was 315 bp; HPV 18, 143 bp; HPV 33, 171 bp; and HPV 11, 236 bp. PCR assay was carried out in a PTC-200 programmable thermal controller (MJ Research Inc., U.S.A.). All PCR reactions included appropriate negative controls. DNA extracted from HeLa cells and plasmid DNA of HPV 16, HPV 18, HPV 33 and HPV 11 were used as positive controls.

#### *Analysis of H-ras, K-ras and N-ras mRNA expression*

We have reported the analysis of H-, K- and N-*ras* mRNA expression levels on samples 1-23 in a previous study (26). In order to ensure comparable results in the total sample group, we repeated the analysis with the addition of samples 24-31. Reverse transcription reactions for the preparation of first strand cDNA from 1 µg of total RNA were performed for 1h at 52°C using 15 U Thermoscript reverse transcriptase, 40 U RNaseOut, 50 ng of random hexamers and 1.0 mM of each dNTP in a total volume of 20 µl of 1x First Strand cDNA Synthesis Buffer containing 5 mM dithiothreitol (DTT), ensued by incubation for 20 min at 37°C with 2 U of E. coli RNaseH to avoid RNA contamination of cDNA, according to the manufacturer's protocol (Life Technologies Ltd., U.K.). PCR assays were carried out in a PTC-200 programmable thermal controller (MJ Research Inc., U.S.A.); 1 µl of cDNA was amplified in a total volume of 10 µl containing 1x PCR reaction buffer, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4 mM dNTPs, and 0.6 U Platinum Taq DNA polymerase (Life Technologies Ltd., U.K.), with 30 pmol of each primer set. β-actin was used as an internal control in all PCR reactions. To evaluate the above conditions for specific and optimum amplification of each primer set, and to achieve integrated density measurements at the exponential amplification phase of the PCR reaction, we performed kinetic analysis increasing the number of PCR cycles from 24 to 38 for the different annealing temperatures of 53°C, 55°C and 57°C. The oligonucleotide primers for H-, K-, N-*ras* and β-actin, as well as the amplification conditions, have been previously described (26).

PCR products were analysed by 10% polyacrylamide gel electrophoresis (29:1 ratio acrylamide/bis-acrylamide) and silver stained. Gels were scanned on an Agfa SnapScan 1212u (Agfa-Gevaert N.V., Belgium). The integrated density of the bands was used as a quantitative parameter and was calculated by digital image analysis (Scion image). The mRNA levels for each gene were expressed as the ratio of the integrated density of the band of each *ras* gene versus the corresponding levels of  $\beta$ -actin.

### *Statistics*

Statistical analyses were performed using SPSS software (SPSS, version 11.5). The Mann-Whitney U test was used to compare the median mRNA transcript levels of each *ras* oncogene between HPV 16/18(+) and HPV 16/18(-), HPV 16 and HPV 18, and single HPV and multiple HPV groups of patients. The limit of statistical significance was set at  $p < 0.05$ .

## **RESULTS**

Our study included thirty-one (31) HPV-positive patients, nineteen (19) with squamous intraepithelial lesions (SIL) and twelve (12) with squamous cervical carcinoma (SCC). The mean age in each group of patients was 49.32 and 58.2 years respectively (Table 1). The results of HPV typing of our study samples are presented in Table 2. The frequency of 'high-risk' HPV 16 or 18 infection in patients with low grade squamous intraepithelial lesions (LSIL) was 54.55%; in patients with high-grade squamous intraepithelial lesions (HSIL), 75%; and in patients with SCC, 83.33%.

HPV 16 was detected more frequently than HPV 18 (45.16% vs 38.71%). Among patients with SCC, HPV 16 was detected in 6 (50%) women and HPV 18 was detected in 6 (50%) women. In non-malignant group of patients HPV 16 was detected in 9 (47.37%) women, 4 with LSIL and 5 HSIL, while HPV 18 was detected in 6 (31.58%) women, 2 with

LSIL and 4 with HSIL. HPV 33 was observed in 2 (6.45%) LSIL patients while HPV 11 was found in 5 (16.13%) patients, 4 with LSIL and 1 with SCC.

Out of the 31 positive samples for HPV-DNA, 7 were multiple infection cases produced by more than one viral genotype. Co-infection with HPV 16 and HPV 18 was detected in 2 patients with SCC and in 3 patients with HSIL, HPV 18 and 11 was detected in one patient with SCC, while one sample with LSIL was positive for HPV 11 and HPV 16.

In the total sample, the mean expression levels of H-, K- and N-*ras* were 4.678 (SD 4.990), 0.954 (SD 1.564) and 5.231 (SD 3.987) respectively. The mean expression levels of H- and N-*ras* were higher in patients with SCC than in patients with SIL ( $p=0.002$  and  $p.029$ ). K-*ras* expression levels were also higher in patients with SCC than in patients with SIL (1.021, SD 0.654 vs 0.811, SD 0.431); however, this relationship was not statistically significant.

The relationship between mRNA expression levels of *ras* oncogenes and HPV status is summarized in tables 3 and 4. Among patients with SCC, the mean mRNA expression levels of all *ras* oncogenes, H-, K- and N-*ras*, were higher in HPV16/18 positive patients compared to HPV16/18 negative patients, while no difference was observed in patients with SIL (Table 3). Among patients with SCC and SIL, no statistically significant difference was observed in expression levels of *ras* oncogenes between HPV 16 positive and HPV 18 positive patients.

The expression levels for H-, K- and N-*ras* were significantly higher in SCC patients with multiple HPV infection compared to patients with single HPV infection (Table 4). Among patients with SIL, the transcript levels for *ras* oncogenes were similar in multiple and single HPV infected samples. The highest expression of H-*ras* and N-*ras* oncogenes was observed in patients with multiple HPV 16 and 18 infection.

## **DISCUSSION**

Molecular technology development has led to a dramatic increase in the estimated prevalence of HPV in cervical carcinoma, from 40-50% of cases in the early 1980's to nearly 100% in recent studies (32). HPV detection and typing can be performed by using various molecular biology techniques such as *in situ* hybridization (FISH), southern hybridization (SH), Hybrid Capture™ (HC) and polymerase chain reaction (PCR) technology. PCR, which is the most frequently employed, is a highly sensitive methodology which enables the detection of a large number of HPV genotypes. The PCR-RFLP technique employing general primers, as well as the multiplex PCR using simultaneously specific HPV type primers, allows the recognition of several genotypes in a single amplification reaction (31). However, these procedures are not able to define with accuracy certain cases of infection caused by multiple genotypes, which frequently produce blurred restriction or amplification patterns (33). In such cases, PCR with specific primers used separately, nucleotide sequence analysis or Dot Blot hybridization can achieve more accurate HPV typing (34). In our study, we performed PCR with specific primers used separately, increasing the sensitivity of HPV detection by avoiding HPV false-negative or undetermined results in cases of multiple HPV infection.

The distribution of specific types of HPV is known to vary in different regions of the world. Geographical variations have been attributed to the epidemiological features of each region as well as to the variability in the sensitivity of the employed assays (35,36). HPV 16 and HPV 18 are the most prevalent HPV types with HPV 16 being predominant worldwide. The knowledge of the most prevalent HPV genotypes in a region is essential to design an effective HPV-vaccination program. In our study, although HPV 16 was the most frequent genotype, the frequency of HPV 18 was almost twice the frequency which is reported by other researchers in Europe (37). This is in agreement with the reports from Greece indicating a high frequency of HPV 18 in the island of Crete, an island of the southeast edge of Europe, close to Africa (30,31). Distribution of HPV 18 type in Crete may indicate the possible presence in this remote region of an aggressive HPV 18 variant. HPV 18 intratypic variants such as European, Asian-Amerindian and African, varying by <2%, have different population and histological distribution (38). Non-European HPV-18 variants tend to persist more

frequently and are associated with a higher risk of high-grade cervical lesions than European variants (39,40).

In our study, the levels of H-, K- and N-*ras* expression were higher in HPV 16/18 positive than in HPV 16/18 negative malignant samples. Our findings may indicate the possible role of the HPV 16/18 interaction with cellular *ras* oncogene expression in malignant transformation. HPV 16/18 are considered as ‘high-risk’ HPV with a high oncogenic potential in relation to the other HPV types. The interaction between HPV and *ras* oncogenes has been documented by several researchers, indicating that it induces the full transformation of cervical keratinocytes (28,29). Transfection experiments on baby rat kidney cells (41) and on primary human fibroblast cells (42) *in vitro* have demonstrated that HPV cooperates with activated *ras* oncogenes in host cell transformation. It has been found that activation of *ras* oncogenes promotes expression of both HPV-16 E6/E7 (43) and HPV-18 E6/E7 (27). Moreover, Chen et al have demonstrated that cooperation of activated H-*ras* and E6 is necessary to overcome both the antiproliferative and antitransforming effects of wt p53, the most important HPV E6 cellular target (44). Recently, Giannoudis et al have suggested that low, intermediate, and high-risk HPVs have different effects on p21 protein expression (45).

HPV 18 is considered more tumorigenic than HPV 16 and has been associated with a more rapid progression to malignancy (46). Compared to HPV 16, the presence of HPV 18 in patients with cervical cancer is more frequently associated with deeper stromal invasion, lymph node metastasis and poorer prognosis (47). Among patients with early-stage cervical cancer who were treated with radical hysterectomy and bilateral lymph node dissection, recurrence was found to be more common among HPV 18 positive women (48). Moreover, HPV 18 is more frequent in aggressive histological types, such as adenocarcinomas, and adenosquamous carcinomas than in squamous cell carcinomas where HPV 16 predominates (49). In our study, we didn’t find any statistically significant difference in expression of H-, K- and N-*ras* between HPV 16 and HPV 18 positive samples. Further research is required to evaluate different mechanisms implicating HPV 16 and HPV 18 interaction with host cell genes.

Co-infection of multiple HPV types has been demonstrated by several researchers in cervical neoplasia with varying frequencies (49-52). Multiple HPV infection has been found more frequently in adenosquamous carcinoma than in squamous cell carcinoma (50). Women with multiple HPV types have a higher risk of cervical cancer than women with single type infection (53), although in other studies there have been conflicting results (51,54). Moreover, in patients with cervical cancer who receive radiotherapy, the presence of multiple HPV types has been associated with poor response and with reduced survival (55). In our study, co-infection with HPV 16 and 18 was the most common multiple HPV infection, which is consistent with results from other researchers (49). In the malignant group of patients included in our study, multiple HPV infection was related with elevated H- K- and N-*ras* expression implicating *ras* signalling in multiple HPV type aggressiveness.

In the group of patients with squamous intraepithelial lesions, there was no correlation between *ras* expression and HPV status. It is suggested that additional factors to HPV infection, such as the integration of HPV DNA into the host cell genome, are required for the interaction between HPV and *ras* oncogenes. In non malignant lesions, the HPV DNA genome persists as an extrachromosomal episome in the nucleus of the infected cells (56). Integration of HPV DNA increases stability of the mRNAs encoding the viral E6 and E7 oncogenes and leads to elevated viral oncogene expression (57). Elevated E6 and E7 expression affects cellular signalling and particular cellular transcriptional factors both on a transcriptional and translational level (58). HPV DNA integration can also cause alterations in the integrity and expression of cellular genes, such as *myc* and APM-1 located in the chromosomal target regions, via insertional mutagenesis (59,60). Further studies will clarify the importance of HPV DNA integration in *ras* activation and its role in host cervical cell transformation.

In conclusion, our results support the hypothesis of a potentially interactive effect between HPV 16/18 and transcriptional activation of *ras* oncogenes in cervical carcinogenesis. *ras* activation combined with multiple HPV infection may also be an important step in a subset of cervical carcinomas. The role of DNA integration in *ras*

activation and its implication in host cervical cell transformation may be essential in the oncogenic process. Further investigation is needed to determine the influence of *ras* expression on cervical carcinogenesis and its possible interaction with HPV infection status.



## REFERENCES

1. Sanclemente G, Gill DK. Human papillomavirus molecular biology and pathogenesis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2002; 16: 231-40.
2. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 342-50.
3. Stoler MH. The virology of cervical neoplasia: an HPV-associated malignancy. *Cancer J* 2003; 9: 360-7.
4. Carozzi F, Lombardi FC, Zendron P, et al. Association of human papillomavirus with prostate cancer: analysis of a consecutive series of prostate biopsies. *Int J Biol Markers* 2004; 19: 257-61.
5. Graflund M, Sorbe B, Sigurdardottir S, Karlsson M. HPV-DNA, vascular space invasion, and their impact on the clinical outcome in early-stage cervical carcinomas. *Int J Gynecol Cancer* 2004; 14: 896-902.
6. Peto J, Gilham C, Deacon J, et al. Cervical HPV infection and neoplasia in a large population-based prospective study: the Manchester cohort. *Br J Cancer* 2004; 91: 942-53.
7. Lorincz AT, Reid R, Jenson AB, Greenberg MD, Lancaster W, Kurman RJ. Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. *Obstet Gynecol* 1992; 79: 328-37.
8. Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 1990; 63: 1129-36.

9. Munger K, Werness BA, Dyson N, Phelps WC, Harlow E, Howley PM. Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *Embo J* 1989; 8: 4099-105.
10. McDougall JK. Immortalization and transformation of human cells by human papillomavirus. *Curr Top Microbiol Immunol* 1994; 186: 101-19.
11. Hurlin PJ, Kaur P, Smith PP, Perez-Reyes N, Blanton RA, McDougall JK. Progression of human papillomavirus type 18-immortalized human keratinocytes to a malignant phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 570-4.
12. Cullen R, MaGuire T, Diggin P, et al. Detection of estrogen receptor-beta mRNA in breast cancer using RT-PCR. *Int J Biol Markers* 2000; 15: 114-5.
13. Cattaneo M, Orlandi R, Ronchini C, et al. The expression of SEL1L and TAN-1 in normal and neoplastic cells. *Int J Biol Markers* 2000; 15: 26-32.
14. Tricarico C, Salvadori B, Villari D, et al. Quantitative RT-PCR assay for VEGF mRNA in human tumors of the kidney. *Int J Biol Markers* 1999; 14: 247-50.
15. Kiaris H, Spandidos DA. Mutations of ras genes in human tumours. *Int J Oncol* 1995; 7: 413-21.
16. Guerra E, Vacca G, Palombo B, Alberti S. Prognostic value of mutations in TP53 and RAS genes in breast cancer. *Int J Biol Markers* 2003; 18: 49-53.
17. Salbe C, Trevisiol C, Ferruzzi E, et al. Molecular detection of codon 12 K-RAS mutations in circulating DNA from serum of colorectal cancer patients. *Int J Biol Markers* 2000; 15: 300-7.
18. Zachos G, Spandidos DA. Expression of ras proto-oncogenes: regulation and implications in the development of human tumors. *Crit Rev Oncol Hematol* 1997; 26: 65-75.

19. Spandidos DA. The human T24 Ha-ras1 oncogene: a study of the effects of overexpression of the mutated ras gene product in rodent cells. *Anticancer Res* 1986; 6: 259-62.
20. Spandidos DA, Wilkie NM. Malignant transformation of early passage rodent cells by a single mutated human oncogene. *Nature* 1984; 310: 469-75.
21. Slagle BL, Kaufman RH, Reeves WC, Icenogle JP. Expression of ras, c-myc, and p53 proteins in cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer* 1998; 83: 1401-8.
22. Lee JH, Lee SK, Yang MH, Ahmed MM, Mohiuddin M, Lee EY. Expression and mutation of H-ras in uterine cervical cancer. *Gynecol Oncol* 1996; 62: 49-54.
23. Pinion SB, Kennedy JH, Miller RW, MacLean AB. Oncogene expression in cervical intraepithelial neoplasia and invasive cancer of cervix. *Lancet* 1991; 337: 819-20.
24. Sagae S, Kudo R, Kuzumaki N, et al. Ras oncogene expression and progression in intraepithelial neoplasia of the uterine cervix. *Cancer* 1990; 66: 295-301.
25. Sagae S, Kuzumaki N, Hisada T, Mugikura Y, Kudo R, Hashimoto M. ras oncogene expression and prognosis of invasive squamous cell carcinomas of the uterine cervix. *Cancer* 1989; 63: 1577-82.
26. Mammas IN, Zafiroopoulos A, Koumantakis E, Sifakis S, Spandidos DA. Transcriptional activation of H- and N-ras oncogenes in human cervical cancer. *Gynecol Oncol* 2004; 92: 941-8.

27. Medina-Martinez O, Vallejo V, Guido MC, Garcia-Carranca A. Ha-ras oncogene-induced transcription of human papillomavirus type 18 E6 and E7 oncogenes. *Mol Carcinog* 1997; 19: 83-90.
28. DiPaolo JA, Woodworth CD, Popescu NC, Notario V, Doniger J. Induction of human cervical squamous cell carcinoma by sequential transfection with human papillomavirus 16 DNA and viral Harvey ras. *Oncogene* 1989; 4: 395-9.
29. Durst M, Gallahan D, Jay G, Rhim JS. Glucocorticoid-enhanced neoplastic transformation of human keratinocytes by human papillomavirus type 16 and an activated ras oncogene. *Virology* 1989; 173: 767-71.
30. Dokianakis DN, Sourvinos G, Sakkas S, Athanasiadou E, Spandidos DA. Detection of HPV and ras gene mutations in cervical smears from female genital lesions. *Oncol Rep* 1998; 5: 1195-8.
31. Koffa M, Koumantakis E, Ergazaki M, Malamou-Mitsi V, Spandidos D. Detection of *ras* gene mutations and HPV in lesions of the human female reproductive tract. *Int J Oncology* 1994; 5: 189-95.
32. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999; 189: 12-9.
33. Astori G, Arzese A, Pipan C, de Villiers EM, Botta GA. Characterization of a putative new HPV genomic sequence from a cervical lesion using L1 consensus primers and restriction fragment length polymorphism. *Virus Res* 1997; 50: 57-63.

34. Husnjak K, Grce M, Magdic L, Pavelic K. Comparison of five different polymerase chain reaction methods for detection of human papillomavirus in cervical cell specimens. *J Virol Methods* 2000; 88: 125-34.
35. Arends MJ, Donaldson YK, Duvall E, Wyllie AH, Bird CC. HPV in full thickness cervical biopsies: high prevalence in CIN 2 and CIN 3 detected by a sensitive PCR method. *J Pathol* 1991; 165: 301-9.
36. Sasagawa T, Basha W, Yamazaki H, Inoue M. High-risk and multiple human papillomavirus infections associated with cervical abnormalities in Japanese women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10: 45-52.
37. Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Munoz N, Franceschi S. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br J Cancer* 2003; 88: 63-73.
38. Burk RD, Teraï M, Gravitt PE, et al. Distribution of human papillomavirus types 16 and 18 variants in squamous cell carcinomas and adenocarcinomas of the cervix. *Cancer Res* 2003; 63: 7215-20.
39. Hecht JL, Kadish AS, Jiang G, Burk RD. Genetic characterization of the human papillomavirus (HPV) 18 E2 gene in clinical specimens suggests the presence of a subtype with decreased oncogenic potential. *Int J Cancer* 1995; 60: 369-76.
40. Villa LL, Sichero L, Rahal P, et al. Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. *J Gen Virol* 2000; 81: 2959-68.
41. Matlashewski G, Schneider J, Banks L, Jones N, Murray A, Crawford L. Human papillomavirus type 16 DNA cooperates with activated ras in transforming primary cells. *Embo J* 1987; 6: 1741-6.

42. Matlashewski G, Osborn K, Banks L, Stanley M, Crawford L. Transformation of primary human fibroblast cells with human papillomavirus type 16 DNA and EJ-ras. *Int J Cancer* 1988; 42: 232-8.
43. Gaiotti D, Chung J, Iglesias M, et al. Tumor necrosis factor-alpha promotes human papillomavirus (HPV) E6/E7 RNA expression and cyclin-dependent kinase activity in HPV-immortalized keratinocytes by a ras-dependent pathway. *Mol Carcinog* 2000; 27: 97-109.
44. Chen TM, Defendi V. Functional interaction of p53 with HPV18 E6, c-myc and H-ras in 3T3 cells. *Oncogene* 1992; 7: 1541-7.
45. Giannoudis A, Herrington CS. Differential expression of p53 and p21 in low grade cervical squamous intraepithelial lesions infected with low, intermediate, and high risk human papillomaviruses. *Cancer* 2000; 89: 1300-7.
46. Riethdorf S, Riethdorf L, Milde-Langosch K, Park TW, Loning T. Differences in HPV 16- and HPV 18 E6/E7 oncogene expression between in situ and invasive adenocarcinomas of the cervix uteri. *Virchows Arch* 2000; 437: 491-500.
47. Spandidos DA, Sourvinos G, Koffa M. ras genes, p53 and HPV as prognostic indicators in human cancer. *Oncol Rep* 1997; 4: 211-8.
48. Im SS, Wilczynski SP, Burger RA, Monk BJ. Early stage cervical cancers containing human papillomavirus type 18 DNA have more nodal metastasis and deeper stromal invasion. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 4145-50.
49. Huang LW, Chao SL, Chen PH, Chou HP. Multiple HPV genotypes in cervical carcinomas: improved DNA detection and typing in archival tissues. *J Clin Virol* 2004; 29: 271-6.

50. Schellekens MC, Dijkman A, Aziz MF, et al. Prevalence of single and multiple HPV types in cervical carcinomas in Jakarta, Indonesia. *Gynecol Oncol* 2004; 93: 49-53.
51. Cuschieri KS, Cubie HA, Whitley MW, et al. Multiple high risk HPV infections are common in cervical neoplasia and young women in a cervical screening population. *J Clin Pathol* 2004; 57: 68-72.
52. Matsukura T, Sugase M. Human papillomavirus genomes in squamous cell carcinomas of the uterine cervix. *Virology* 2004; 324: 439-49.
53. Lee SA, Kang D, Seo SS, et al. Multiple HPV infection in cervical cancer screened by HPVDNAChip. *Cancer Lett* 2003; 198: 187-92.
54. Bosch FX, Munoz N. The viral etiology of cervical cancer. *Virus Res* 2002; 89: 183-90.
55. Bachtiry B, Obermair A, Dreier B, et al. Impact of multiple HPV infection on response to treatment and survival in patients receiving radical radiotherapy for cervical cancer. *Int J Cancer* 2002; 102: 237-43.
56. Wentzensen N, Ridder R, Klaes R, Vinokurova S, Schaefer U, Doeberitz MK. Characterization of viral-cellular fusion transcripts in a large series of HPV16 and 18 positive anogenital lesions. *Oncogene* 2002; 21: 419-26.
57. Jeon S, Lambert PF. Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 1654-8.
58. zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 690-8.

59. Couturier J, Sastre-Garau X, Schneider-Maunoury S, Labib A, Orth G.  
Integration of papillomavirus DNA near myc genes in genital carcinomas and its consequences for proto-oncogene expression. *J Virol* 1991; 65: 4534-8.
60. Reuter S, Bartelmann M, Vogt M, et al. APM-1, a novel human gene, identified by aberrant co-transcription with papillomavirus oncogenes in a cervical carcinoma cell line, encodes a BTB/POZ-zinc finger protein with growth inhibitory activity. *Embo J* 1998; 17: 215-22.



**Table 1. Sample histologic classification and age of the HPV positive women included in our study.**

	N	Age (years)
Non-malignant group (SIL)	19	49.32 (SD 11.17)
LSIL	11	
HSIL	8	
Malignant group (SCC)	12	58.20 (SD 17.01)
Total	31	51.86 (SD 14.46)

*SIL: squamous intraepithelial lesions, LSIL: low grade squamous intraepithelial lesions, HSIL: high-grade squamous intraepithelial lesions, SCC: squamous cervical cancer.*

Table 2. Typing of HPV-positive cervical samples.

N patient	lesion	HPV 16	HPV18	HPV 33	HPV 11	other HPV
1	SCC		+			
2	LSIL		+			
3	LSIL			+		
4	LSIL				+	
5	SCC	+				
6	SCC	+				
7	HSIL	+				
8	SCC	+	+			
9	SCC		+		+	
10	SCC	+				
11	SCC		+			
12	SCC	+	+			
13	HSIL					+
14	LSIL				+	
15	LSIL	+				
16	LSIL	+			+	
17	HSIL	+	+			
18	LSIL	+				
19	HSIL					+
20	LSIL				+	
21	LSIL	+				
22	LSIL		+			
23	HSIL	+				
24	HSIL		+			
25	SCC		+			
26	SCC	+				
27	HSIL	+	+			
28	SCC					+
29	HSIL	+	+			
30	SCC					+
31	LSIL			+		

*LSIL: low-grade squamous intraepithelial lesions, HSIL: high-grade squamous intraepithelial lesions, SCC: squamous cervical cancer.*

**Table 3. *ras* oncogene mRNA expression in ‘high-risk’ HPV 16/18 vs non-‘high-risk’ HPV 16/18 infected cervical samples with squamous cervical neoplasia.**

A. Non-malignant group (SIL)			
	HPV 16/18 (+) N=11	HPV 16/18 (-) N=7	p-value
H- <i>ras</i>	0.645 (SD 0.297)	0.596 (SD 0.195)	NS
K- <i>ras</i>	0.683 (SD 0.359)	0.519 (SD 0.352)	NS
N- <i>ras</i>	1.294 (SD 1.579)	0.973 (SD 1.478)	NS
B. Malignant group (SCC)			
	HPV 16/18 (+) N=10	HPV16/18 (-) N=2	p-value
H- <i>ras</i>	9.290 (SD 4.383)	0.655 (SD 0.926)	0.003
K- <i>ras</i>	1.066 (SD 1.161)	0.357 (SD 0.208)	0.004
N- <i>ras</i>	7.780 (SD 3.749)	1.695 (SD 1.945)	0.0001

*Mann-Whitney Test, NS=not significant ( $p>0.05$ ),*

*SIL: squamous intraepithelial lesions, SCC: squamous cervical carcinoma.*

**Table 4. *ras* oncogene mRNA expression in multiple HPV vs single HPV infected cervical samples with squamous cervical neoplasia.**

A. Non-malignant group (SIL)			
	Multiple HPV (+) N=4	Single HPV (+) N=15	p-value
H- <i>ras</i>	4.532 (SD 4.282)	3.106 (SD 2.189)	NS
K- <i>ras</i>	1.602 (SD 1.099)	0.723 (SD 0.650)	NS
N- <i>ras</i>	4.002 (SD 2.519)	3.133 (SD 4.008)	NS
B. Malignant group (SCC)			
	Multiple HPV (+) N=3	Single HPV(+) N=9	p-value
H- <i>ras</i>	12.965 (SD 3.138)	7.001 (SD 4.171)	0.009
K- <i>ras</i>	1.080 (SD 1.217)	0.687 (SD 0.491)	0.01
N- <i>ras</i>	9.390 (SD 2.199)	5.994 (SD 3.781)	0.021

*Mann-Whitney Test, NS=not significant ( $p>0.05$ ),*

*SIL: squamous intraepithelial lesions, SCC: squamous cervical carcinoma.*

**Human papilloma virus in hyperplastic tonsillar and adenoid tissues  
in children.**

Ioannis N. Mammias<sup>1</sup>, MD, George Sourvinos<sup>1</sup>, PhD, Catherine Michael<sup>2</sup>, Demetrios  
A. Spandidos<sup>1\*</sup>, PhD.

<sup>1</sup>Laboratory of Virology, School of Medicine, University of Crete, Heraklion, Greece

<sup>2</sup>Department of Pathology, 'P.&A. Kyriakou' Children's Hospital, Athens, Greece.

\*Corresponding author: Professor D.A. Spandidos

Tel.: +30 210 7227809; Fax: +30 210 7252922.

*e-mail address:* spandidos@spandidos.gr

***Abbreviated title:*** HPV infection in tonsillar and adenoid hyperplasia.

***Running title:*** Human papilloma virus.

***Keywords:*** HPV, tonsillar hyperplasia, adenoid hyperplasia, oral cavity, childhood.

## ABSTRACT

**Background:** Human papilloma virus (HPV) in childhood causes skin and anogenital warts as well as the recurrent respiratory papillomatosis, a life-threatening cause of upper airway obstruction in children. To date the information on HPV infection in tonsillar and adenoid hyperplasia in children is limited.

**Purpose:** To investigate the presence of HPV DNA in children with benign tonsillar and/or adenoid hyperplasia.

**Methods:** One hundred and six (106) samples of paraffin-embedded adenoid and/or tonsillar tissues from 102 children, 57 girls and 45 boys (age range: 2 years to 14 years), were tested for the presence of HPV DNA using polymerase chain reaction (PCR) with general primers GP5+/GP6+. HPV typing was performed by PCR with specific primers for HPV 16, 18, 33 and 11.

**Results:** HPV DNA was detected in 9 (8.5%) of the 106 collected specimens. The frequencies of HPV typing were 6/9 (66.7%) for HPV 16, 2/9(22.2%) for HPV 11, 0/9(0%) for HPV 33 and HPV 18, while one HPV-positive sample remained untyped. No multiple HPV infection was detected. HPV was detected in 6 (9.4%) children with tonsillar hyperplasia and in 3 (7.1%) with adenoid hyperplasia. The mean age of children with HPV-positive specimens was lower than that of HPV-negative children ( $p=0.006$ ). No statistical correlation in the prevalence of HPV infection was observed according to children's sex, origin or residence (urban or rural).

**Conclusion:** Although the significance of the presence of HPV DNA in tonsillar and adenoid hyperplasias remains obscure, the PCR detection of high-risk HPV DNA should be evaluated cautiously.

## INTRODUCTION

Human papilloma viruses (HPVs) are small double-stranded DNA viruses which comprise a family of more than 130 genotypes.<sup>1</sup> In humans, HPVs are widespread and occur worldwide inducing a broad spectrum of benign and malignant epithelial lesions. HPVs are classified into cutaneous or mucosal types.<sup>2</sup> Cutaneous HPV types infect the squamous epithelium of the skin and produce common warts, plantar warts and flat warts. Mucosal HPV types infect the mucous membranes and are the principal etiologic factors for development of cervical carcinoma and its precursors. HPVs have also been implicated in oral, laryngeal and esophageal carcinogenesis, although the evidence is less convincing than that for cervical cancer.<sup>3</sup>

The incidence of HPV-associated manifestations, including anogenital warts in childhood, has increased in recent years.<sup>4,5</sup> Anogenital warts represents an issue with legal and clinical implications and evaluation of children for the possibility of sexual abuse is mandatory in all cases.<sup>6,7</sup> Recurrent respiratory papillomatosis (RRP) has also been associated with HPV infection in a variety of studies.<sup>8</sup> RRP is a potentially life-threatening neoplasm that produces considerable morbidity in children by causing severe respiratory obstruction. It is diagnosed more frequently in children less than 5 years of age and its severity is inversely related to the age of onset.<sup>9</sup>

Although HPV infection is considered a sexual transmitted infection, HPVs can be transmitted by non-sexual routes including casual physical contact and perinatal vertical transmission. In childhood, it was previously thought that sexual abuse was the most common mode of transmission of HPV, but more recent studies suggest that perinatal infection and autoinoculation or heteroinoculation is much more likely than originally thought.<sup>4,10</sup> Detection of HPV infection in the buccal cavity of healthy children has raised questions concerning the mode of HPV transmission in childhood.<sup>5,11</sup>

To date, several studies have evaluated the presence of HPV DNA in the buccal cavity in children by studying oral swabs or washings from healthy children.<sup>11-15</sup> Data on HPV infection in biopsy specimens tumor free oral mucosa from children is limited. Recent reports indicate that detection of HPV DNA is less frequent in oral exfoliated cells than in biopsy specimens.<sup>16,17</sup>

The purpose of our study was to determine the frequency of HPV infection in tonsils and adenoids of children with adenoid and/or tonsillar hyperplasia, a common cause of upper respiratory tract obstruction in the pediatric age group.

## MATERIAL AND METHODS

We studied paraffin-embedded tonsillar and adenoid specimens from 102 children with tonsillar and/or adenoid hyperplasia, on whom surgical resection was performed in 'P.&A. Kyriakou' Children's Hospital, Athens, Greece during the period of 1995-2000. From 4 children, 2 girls and 2 boys, both tonsillar and adenoid tissues were collected. The histologic analysis of the material was performed at the Department of Pathology, P&A Children's Hospital, Athens, Greece. Clinicopathological data (age, sex, origin, residence and medical history) were available for all patients included in the study. This study was approved by the ethics committees of 'P.&A. Kyriakou' Children's Hospital, Athens, Greece and University of Crete, School of Medicine, Crete, Greece.

Genomic and viral DNA was extracted from paraffin-embedded tissues as described elsewhere and stored at -20°C.<sup>18</sup> DNA purity was assessed by a UV/VIS spectrophotometer estimating the  $A_{260}/A_{280}$  ratio and titrated to 200ng/μl. The presence of amplifiable DNA was verified by performing PCR using primers specific for β2-microglobulin. For the detection of the HPV DNA, the general primers, GP5+ and GP6+, were used.<sup>19</sup> The extracted DNA (1μl) of each sample was amplified in a total volume of 30μl containing 3μl of 10x PCR reaction buffer (200mM Tris-HCl pH8.4, 500mM KCl), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200μM of each dNTP, 0.5μM of each primer and 0.6U of recombinant Taq DNA polymerase (Invitrogen Ltd., U.K.). The amplification conditions used for genomic DNA and HPV detection using the general primers have been previously described.<sup>20</sup>

For the distinction of HPV types we used separate specific pairs of primers for virus types, HPV 16, HPV 18, HPV 33 and HPV 11, giving a different length of amplified DNA, as has been previously described.<sup>21</sup> The extracted DNA (1μl) of each sample was amplified in a total volume of 20μl containing 10X PCR reaction buffer, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 200μM of each dNTP, 0.5μM of each primer (sense and antisense) and 0.8U of recombinant Taq DNA polymerase (Invitrogen Ltd., U.K.). All PCR products were analysed on 2% agarose gel and photographed on a UV light transilluminator. PCR assay was carried out in a PTC-200 programmable thermal controller (MJ Research Inc., U.S.A.). All PCR reactions included appropriate negative controls. DNA extracted from HeLa cells and plasmid DNA of HPV 16, HPV 18, HPV 33 and HPV 11 served as positive controls. Characteristic examples of HPV detection experiments are shown in Figure 1. To ensure that our in-house PCR



was sensitive enough to detect relatively low levels of viral DNA, serial 10-fold dilutions of cloned HPV PCR products with known amount ( $4 \times 10^6$  copies/ml) were amplified by PCR. The sensitivity of our PCR assay reached 200 copies/ml.

Statistical analyses were done using SPSS software (SPSS, version 11.5). Pearson  $\chi^2$  test was done to compare the rates of HPV detection in groups of samples according to children's sex, age, origin, residence and histology. The T-test was used to compare the median age between HPV positive and HPV negative children included in our study. The limit of statistical significance was set at  $p < 0.05$ .

## RESULTS

We studied 64 tonsillar and 42 adenoid specimens from 102 children, 57 girls and 45 boys (Table 1). The average age of our study population was 7.5 years (S.D. 3.6), ranging between 2 years and 14 years. All specimens were diagnosed as reactive hyperplasia of tonsillar and/or adenoid tissue with no evidence of malignancy. The histologic morphology of all samples showed no features (koilocytes, dyskeratotic cells or parakeratosis) of HPV infection. The mean age of children from whom adenoid tissue was collected was higher than the age of children on whom tonsillar tissue resection was performed, but without any statistical significance. None of the children had any wart-lesion in his or her buccal cavity. There was no clinical evidence of child sexual abuse in any subject.

HPV DNA was detected in 6 (9.4%) of 64 tonsillar and 3 (7.1%) of 42 adenoid specimens. In one HPV-positive child in whom adenoid and tonsillar tissues were collected, HPV DNA was found only in the tonsillar specimen. HPV 16 was detected in 3 girls and 3 boys (5.7%) and HPV 11 was detected in 1 boy and 1 girl. HPV 33, 18 and 6 were not detected at all, while in one girl's tonsil HPV type remained undetermined. No multiple HPV infections were detected in any specimen

The cumulative results of the statistical analysis of our data are presented in Table 3. The preschool group of children showed higher prevalence of HPV DNA than school children. The difference in the prevalence of HPV in tonsillar than in adenoid tissues was not statistically significant. No difference was also observed between HPV-positive and HPV-negative samples according to children's sex, origin and residence (urban, rural).

## DISCUSSION

To date, data on the presence of HPV infection in normal or hyperplastic tonsils and adenoids in adults and children is limited.<sup>11-15,22</sup> As summarized in a recent review, by the end of year 2002, only 200 tumor-free tonsillar or adenoid samples from patients with normal mucosa, tonsillar hyperplasia, chronic tonsillitis, adenoid hyperplasia or condyloma have been analysed for the presence of HPV DNA.<sup>22</sup> Among samples from patients with chronic tonsillitis or tonsillar hyperplasia, the reported frequencies do not exceed 14%,<sup>23-25</sup> while other researchers have failed to detect HPV DNA in tonsillitis samples as well as in adenoid hyperplasia.<sup>24,26-28</sup> Recently, Chen *et al.*<sup>17</sup> studied tonsillar tissues from 212 patients with tonsillitis or tonsillar hyperplasia, and the prevalence of HPV DNA was 6.3% in the total sample while in children the prevalence was 8.2%. In the some study, HPV was detected in 2 of 127 normal tonsils from adults, while HPV was not detected in 62 normal tonsils from children.

In our study of 106 samples from children with tonsillar and/or adenoid hyperplasia, we detected HPV DNA in 9.4% of tonsillar tissues from children with tonsillar hyperplasia and in 7.1% of adenoid tissues from children with adenoid hyperplasia. None of the children in our study had any wart lesion in their buccal cavity indicating that HPV infection in the oral cavities of the children we studied is subclinical. HPV DNA was detected in boys and girls, which is consistent with the results of other studies showing no difference in HPV prevalence in the buccal cavity according to children's sex.<sup>13,14,29</sup>

The mean age of children with HPV DNA in their tonsillar and/or adenoid tissues was lower than the age of HPV-negative children. This finding agrees with the results from other reports, including serologic studies, showing that higher HPV positivity rates are related to younger age groups.<sup>17,29,30</sup> In a study Chen *et al.*<sup>17</sup>, HPV DNA was detected in 11.5% of preschool children with a mean age of 4.6 years, while the frequency in school children aged 10.4 years was 6.5%. Other researchers have not confirmed a strong relationship between the prevalence of HPV DNA in children's buccal cavity and their age.<sup>13,14</sup> The reason for the presence of HPV at a higher frequency in younger children is unknown.

Modes of HPV transmission to children's oral cavities are controversial. Although sexual contact is a possible cause of HPV transmission, other pathways seem to be more likely including perinatal transmission, autoinoculation and

heteroinoculation and, possibly, indirect transmission via fomites.<sup>5</sup> In our study, there was no evidence of sexual abuse in both HPV-positive and HPV-negative children. This finding is of great importance since the presence of HPV in tonsils and adenoids in the studied children does not seem to be correlated with sexual abuse implicating other possible modes of transmission.

Acquisition of HPV infection in buccal mucosa by infants at birth has been proposed by several researchers.<sup>4,10,31-33</sup> Newborn babies are exposed to cervical HPV infection of their mother and HPV infection persists for at least 6 months of age.<sup>32</sup> Neonatal infections are predominantly types 16 and 18 and persist for short periods in the genital area. In the study of Cason *et al.*<sup>32</sup>, the transmission rates of HPV from HPV-positive mothers to their infants 24 hr after delivery were approximately 73% while, at 6 months of age, persistent HPV-16 DNA was detected in 83.3% of cases, but HPV-18 DNA persistence at this time was only 20%. Mant *et al.*<sup>34</sup> investigated whether childhood buccal infection with HPV-16 is persistent or transient by reassessing, after thirty months, swabs from buccal mucosa of 20 HPV-16 E5 DNA-positive and 19 HPV-16 E5-negative 4-8-year-old children. At this second visit, 40% of the HPV-16-positive group had no detectable HPV-16 DNA, while 63% of children who were originally HPV-16-negative had acquired the virus. Recently, in a study of oral scrapings from 324 infants during their first 3 years of life, HPV infection was still detectable in 10% of infants, indicating a decreasing rate of carriage of HPV DNA during the first 3 years of life.<sup>15</sup> It is still unclear how frequently perinatal infection progresses to clinical lesions, whether genital, laryngeal, or oral.<sup>5</sup>

The concordance of HPV types detected in newborn babies and their mothers is in the range of 57% to 69% and it has been proposed that the infants might also acquire the HPV infection post-natally from a variety of sources.<sup>5</sup> Mant *et al.*<sup>34</sup> have suggested that HPV infection in the oral cavity of children is a transient event and is most probably acquired from their peers, but our findings of decreased frequency of HPV infection in school-aged children compared with pre-school do not support that hypothesis.

Analysis of HPV typing among HPV DNA-positive samples revealed a clear predominance of HPV 16 infection in tonsillar and adenoid hyperplasia (66.7%), a finding which is consistent with the results from other researchers.<sup>17,23-25</sup> Similar predominance of HPV 16 has been described in studies of oral swabs or scrapings from children;<sup>13,14</sup> HPV 11 was detected less frequently, and no other genital HPV

types were detected in the tested samples, including HPV 18, 6 and 33. Infection of the oral cavity by HPV 16 has been linked to elevated risk for cervical and tonsillar carcinomas.<sup>22,35</sup> HPV 11 is one of the most frequently detected HPVs in anogenital warts in children.<sup>4</sup> Moreover, HPV 11 is a common cause of RRP children.<sup>36,37</sup> Patients with RRP infected with HPV 11 are prone to develop more aggressive disease and require more frequent surgical intervention.<sup>8,36-38</sup> In our study, no multiple HPV infection were identified indicating that multiple HPV infections, which is present sometimes in tonsillar carcinoma,<sup>22</sup> occur later in life. The consequences of the presence of HPV in the tonsils and adenoids of children, even at a low frequency, remain to be elucidated.

### ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Nota Giamarelou, MD for her help during the sample collection, Lakis Liloglou, PhD, for his assistance with the statistical analysis, and George Xinarianos, PhD, and Andreas Eliades, MD for reviewing the manuscript.

### REFERENCES

1. Sanclemente G, Gill DK. Human papillomavirus molecular biology and pathogenesis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2002; 16:231-240.
2. Swygart C. Human papillomavirus: disease and laboratory diagnosis. *Br J Biomed Sci.* 1997; 54:299-303.
3. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002; 2:342-350.
4. Armstrong DK, Handley JM. Anogenital warts in prepubertal children: pathogenesis, HPV typing and management. *Int J STD AIDS.* 1997; 8:78-81.
5. Syrjanen S, Puranen M. Human papillomavirus infections in children: the potential role of maternal transmission. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002; 11:259-274
6. Siegfried E, Rasnick-Conley J, Cook S, Leonardi C, Monteleone J. Human papillomavirus screening in pediatric victims of sexual abuse. *Pediatrics* 1998; 101:43-47.
7. Allen AL, Siegfried EC. The natural history of condyloma in children. *J Am Acad Dermatol.* 1998; 39:951-955.
8. Wiatrak BJ, Wiatrak DW, Broker TR, Lewis L. Recurrent respiratory papillomatosis: a longitudinal study comparing severity associated with human

- papilloma viral types 6 and 11 and other risk factors in a large pediatric population. *Laryngoscope* 2004; 114:1-23.
9. Somers GR, Tabrizi SN, Borg AJ, Garland SM, Chow CW. Juvenile laryngeal papillomatosis in a pediatric population: a clinicopathologic study. *Pediatr Pathol Lab Med.* 1997; 17:53-64.
  10. Myhre AK, Dalen A, Berntzen K, Bratlid D. Anogenital human papillomavirus in non-abused preschool children. *Acta Paediatr.* 2003; 92:1445-1452.
  11. Cason J, Mant C. High-risk mucosal human papillomavirus infections during infancy & childhood (Review). *J Clin Virology* 2005;32S: S52-S58
  12. Koch A, Hansen SV, Nielsen NM, Palefsky J, Melbye M. HPV detection in children prior to sexual debut. *Int J Cancer* 1997; 73:621-624.
  13. Rice et al. High prevalence of human papillomavirus type 16 infection in children. *J Med Virol* 2000; 61:70-75
  14. Kojima A, Maeda H, Kurahashi N, Sakagami G, Kubo K, Yoshimoto H, Kameyama Y. Human papillomaviruses in the normal oral cavity of children in Japan. *Oral Oncol.* 2003; 39:821-828.
  15. Rintala MA, Grénman SE, Järvenkylä ME, Syrjänen KJ, Syrjänen SM. High-risk types of human papillomavirus (HPV) DNA in oral and genital mucosa of infants during their first 3 years of life: experience from the Finnish HPV family study. *Clin Inf Diseases* 2005; 41:1728-1733
  16. Herrero R, Castellsague X, Pawlita M, Lissowska J, Kee F, Balaram P, Rajkumar T, Sridhar H, Rose B, Pintos J, Fernandez L, Idris A, Sanchez MJ, Nieto A, Talamini R, Tavani A, Bosch FX, Reidel U, Snijders PJ, Meijer CJ, Viscidi R, Munoz N, Franceschi S. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Reaserch on cancer multicenter study. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95:1772-1783
  17. Chen R, Sehr P, Waterboer T, Leivo I, Pawlita M, Vaheri A, Aaltonen LM.. Presence of DNA of human papillomavirus 16 but no other types in tumor-free tonsillat tissue. *J Clin Microbiol* 2005; 43:1408-1410
  18. Noutsou A, Koffa M, Ergazaki M, Siafakas N, Spandidos D. Detection of human papilloma virus (HPV) and K-ras mutations in human lung carcinomas. *Int J Oncol* 1996; 8:1089-1093.

19. Dokianakis DN, Sourvinos G, Sakkas S, Athanasiadou E, Spandidos D. Detection of HPV and ras gene mutations in cervical smears from female genital lesions. *Oncol Rep* 1998; 5:1195-1198.
20. Mammas I, Zafiropoulos A, Koumantakis E, Sifakis S, Spandidos D. Transcriptional activation of H- and N-*ras* oncogenes in human cervical cancer. *Gynecologic Oncology* 2004; 92:941-948.
21. Mammas I, Zafiropoulos A, Sifakis S, Sourvinos G, Spandidos D. Human Papilloma Virus (HPV) typing in relation to *ras* oncogene mRNA expression in HPV-associated human squamous cervical neoplasia. *Int J Biol Mark* 2006; 20:257-263.
22. Syrjanen S. HPV infections and tonsillar carcinoma (Review). *J Clin Pathol* 2004; 57:449-455
23. Watanabe S, Ogura H, Fukushima K, Yabe Y. Comparison of Virapap filter hybridisation with polymerase chain reaction and Southern blot hybridisation methods for detection of human papillomavirus in tonsillar and pharyngeal cancers. *Eur Arch Otorinolaryngol* 1993; 250:115-119
24. Fukushima K, Ogura H, Watanabe S, Yabe Y, Masuda Y. Human papillomavirus type 16 DNA detected by the polymerase chain reaction in non-cancer tissues of the head and neck. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1994; 251:109-112
25. Strome SE, Savva A, Brissett AE, Gostout BS, Lewis J, Clayton AC, McGovern R, Weaver AL, Persing D, Kasperbauer JL. Squamous cell carcinoma of the tonsils : a molecular analysis of HPV associations. *Clin Cancer Res* 2002; 8:1093-1100
26. Brandsma JL, Abramson AL. Association of papillomavirus with cancers of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1989; 115:621-625
27. Snijders PJ, Cromme FV, van den Brule AJ, Schrijnemakers HF, Snow GB, Meijer CJ, Walboomers JM. Prevalence and expression of human papillomavirus in tonsillar carcinomas, indicating a possible viral etiology. *Int J Cancer* 1992; 52:845-850
28. Klusmann JP, Weissenborn SJ, Wieland U, Dries V, Kolligs J, Jungehuelssing M, Eckel HE, Dienes HP, Pfister HJ, Fuchs PG. Prevalence, distribution and viral load of human papillomavirus 16 DANN in tonsillar carcinomas. *Cancer* 2001; 92:2875-2884

29. Mund K, Han C, Daum R, Helfrich S, Muller M, Fisher SG, Schiller JT, Gissmann L. Detection of human papillomavirus type 16 DNA and of antibodies to human papillomavirus type 16 proteins in children. *Intervirology*. 1997;40: 232-237.
30. Summersgill KF, Smith EM, Levy BT, Allen JM, Haugen TH, Turek LP. Human papillomavirus in the oral cavities of children and adolescents. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2001; 91:62-69.
31. Fredericks BD, Balkin A, Daniel HW, Schonrock J, Ward B, Frazer IH. Transmission of human papillomaviruses from mother to child. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*. 1993; 33:30-32.
32. Cason J, Kaye JN, Jewers RJ, Kambo PK, Bible JM, Kell B, Shergill B, Pakarian F, Raju KS, Best JM. Perinatal infection and persistence of human papillomavirus types 16 and 18 in infants. *J Med Virol*. 1995; 47:209-218.
33. Chatterjee R, Mukhopadhyay D, Murmu N, Mitra PK. Correlation between human papillomavirus DNA detection in maternal cervical smears and buccal swabs of infants. *Indian J Exp Biol*. 1998; 36:199-202.
34. Mant C, Kell B, Rice P, Best JM, Bible JM, Cason J. Buccal exposure to human papillomavirus type 16 is a common yet transitory event of childhood. *J Med Virol*. 2003; 71:593-598.
35. Schwartz SM, Daling JR, Doody DR, Wipf GC, Carter JJ, Madeleine MM, Mao EJ, Fitzgibbons ED, Huang S, Beckmann AM, McDougall JK, Galloway DA. Oral cancer risk in relation to sexual history and evidence of human papillomavirus infection. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90:1626-1636
36. Hartley C, Hamilton J, Birzgalis AR, Farrington WT. Recurrent respiratory papillomatosis--the Manchester experience, 1974-1992. *J Laryngol Otol*. 1994;108:226-229.
37. Rimell FL, Shoemaker DL, Pou AM, Jordan JA, Post JC, Ehrlich GD. Pediatric respiratory papillomatosis: prognostic role of viral typing and cofactors. *Laryngoscope*. 1997; 107:915-918.
38. Rabah R, Lancaster WD, Thomas R, Gregoire L. Human papillomavirus-11-associated recurrent respiratory papillomatosis is more aggressive than human papillomavirus-6-associated disease. *Pediatr Dev Pathol*. 2001; 4:68-72.

**Table 1.** Characteristics of the children's sample of the study.

Children with tonsillar hyperplasia		N=64
Sample Group		N (%)
Sex	Boys	28 (43.8)
	Girls	36 (56.2)
Age group	Preschool	35 (54.7)
	School	29 (45.3)
Origin/Ethnicity	Hellenic	51 (79.7)
	Other	13 (20.3)
Residence	Urban	49 (76.6)
	Rural	15 (23.4)
<hr/>		
Age	Mean age	7.1 years
	( S.D.)	(3.2)
	Age range	2-14 years
<hr/>		
Children with adenoid hyperplasia		N=42
Sample group		N (%)
Sex	Boys	19 (45.2)
	Girls	23 (54.8)
Age group	Preschool	18 (42.9)
	School	24 (57.1)
Origin/Ethnicity	Hellenic	32 (76.2)
	Other	10 (23.8)
Residence	Urban	26 (61.9)
	Rural	16 (38.1)
<hr/>		
Age	Mean age	8.1 years
	(S.D.)	(4.0)
	Age range	2-14 years

*From 4 children both adenoid and tonsillar tissues were collected.  
S.D.: Standard Deviation.*



**Table 2.** HPV detection in tonsils and adenoids from children with tonsillar and/or adenoid hyperplasia in relation to children’s sex, age, origin/ethnicity, residence (urban or rural) and histology.

Sample Group	N	HPV status		p-value
		HPV Positive N (%)	HPV Negative N (%)	
Sex				
Girls	59	4 (6.8)	55 (93.2)	p=NS
Boys	47	5 (10.6)	42 (89.4)	
Age group				
Preschool	53	8 (15.1)	45 (84.9)	p=0.015
School	53	1 (1.9)	52 (98.1)	
Origin/Ethnicity				
Hellenic	83	5 (6)	78 (94)	p=NS
other	23	4 (17.4)	19 (82.6)	
Residence				
Urban	75	8 (10.7)	67 (89.3)	p= NS
Rural	31	1 (3.2)	30 (96.8)	
Histology				
Tonsils	64	6 (9.4)	58 (90.6)	p=NS
Adenoids	42	3 (7.1)	39 (92.9)	
Age				
Mean Age (S.D.)		4.1 years (1.8)	7.8 years (3.5)	p=0.006
Age range		2-8 years	2-14 years	

*Pearson Chi-Square Test was used to compare different sample groups with HPV status, T-test was performed to compare age with HPV status, NS=not significant ( $p>0.05$ ), S.D.: Standard Deviation.*

**Figure 1.** Representative examples of HPV DNA positive and HPV negative samples tested by PCR using general and specific primers. M: positive controls for  $\beta$ 2-m (123bp), HPV GP5+/6+ (150bp), HPV 18 (143bp), HPV 11 (236bp), HPV 33 (171bp), HPV 16 (315bp) respectively, Sample 1: HPV 11 positive tonsillar tissue, Sample 2: HPV negative adenoid tissue, Sample 3: HPV 16 positive tonsillar tissue, Sample 4: HPV 16 positive adenoid tissue, Sample 5: HPV negative tonsillar tissue, L: ladder 100, 200, 300bp.  $\beta$ 2-m:  $\beta$ 2-microglobin. GP: General Primers.

