

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΟΛΟΓΙΑΣ

(Διευθυντής: Καθηγητής Δ. Α. Σπαντίδος)

ΟΦΘΑΛΜΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

(Διευθυντής: Καθηγητής Ι.Γ. Παλλήκαρης)

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ, ΗΡΑΚΛΕΙΟ

ΕΥΣΤΑΘΙΟΣ Θ. ΔΕΤΟΡΑΚΗΣ

**ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ**

**ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ ΜΙΚΡΟΔΟΥΡΥΦΟΡΙΚΟΥ DNA**

**ΣΕ ΙΣΤΟΥΣ ΟΦΘΑΛΜΙΚΟΥ ΠΤΕΡΥΓΙΟΥ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

1999

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης, με δείγματα που συλλέχθηκαν από ασθενείς της Οφθαλμολογικής Κλινικής του Παν/μίου Κρήτης. Η αρχική ιδέα ανήκει στον αείμνηστο Καθηγητή Οφθαλμολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης Ιωάννη Τσαμπαρλάκη, ο οποίος μου ανέθεσε την πραγμάτευση του θέματος. Θερμές ευχαριστίες οφείλω επίσης στον Καθηγητή Ιολογίας του Παν/μίου Κρήτης κ. Δημήτριο Σπαντίδο, ο οποίος επέβλεψε και καθοδήγησε την πορεία του ερευνητικού έργου. Πολύτιμη συμπαράσταση μου προσέφεραν επίσης ο Καθηγητής Οφθαλμολογίας του Παν/μίου Κρήτης κ. Ιωάννης Παλλήκαρης αλλά και ο Λέκτορας Οφθαλμολογίας κ. Μιλτιάδης Τσιλιμπάρης, τους οποίους ευχαριστώ θερμά.

Η όλη ερευνητική προσπάθεια δεν θα ήταν δυνατό να ολοκληρωθεί χωρίς τη βοήθεια του εκλεκτού Βιολόγου και Διδάκτορα Ιατρικής του Παν/μίου Κρήτης κ. Γ. Σουρβίνου, στον οποίο οφείλω πολλά. Σημαντική βοήθεια προσέφεραν επίσης ο επιστημονικός συνεργάτης του Εργαστηρίου Βιοστατιστικής του Ιατρικού Τμήματος του Παν/μίου Κρήτης κ. Ε. Μαυρομανωλάκης, ο παθολογοανατόμος και επιστημονικός συνεργάτης του Εργαστηρίου Βιολογίας Ιατρικού τμήματος Παν/μίου Αθηνών κ. Γ. Ρασιδάκης καθώς και η ιστολόγος και επιστημονική συνεργάτης του ΒΕΜΜΟ κ<sup>α</sup> Ειρήνη Ναουμίδα. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους συναδέλφους μεταπτυχιακούς φοιτητές στο Εργαστήριο Ιολογίας για την άριστη συνεργασία κατά το διάστημα εκπόνησης της εργασίας αυτής αλλά και τους συναδέλφους της Οφθαλμολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου και του ΒΕΜΜΟ που με βοήθησαν αποτελεσματικά στη συλλογή των δειγμάτων.

## **ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ ΕΥΣΤΑΘΙΟΥ Θ. ΔΕΤΟΡΑΚΗ**

ΟΝΟΜΑ: Ευστάθιος  
ΕΠΩΝΥΜΟ: Δετοράκης  
ΧΡΟΝΟΛΟΓΙΑ ΓΕΝΝΗΣΕΩΣ: 26/07/1967  
ΤΟΠΟΣ ΓΕΝΝΗΣΕΩΣ: Ηράκλειο Κρήτης  
ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ ΚΑΤΟΙΚΙΑΣ: Γερωνυμάκη 70, 713 07  
Ηράκλειο Κρήτης  
ΤΗΛΕΦΩΝΟ: 081-229067  
ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ: Άγαμος

### **ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΗ ΜΟΡΦΩΣΗ:**

- Πτυχίο Ιατρικής Πανεπιστημίου Αθηνών (1985-1991), με Γενικό Βαθμό «Άριστα» (9,03).

### **ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ:**

- Επιστημονικός συνεργάτης του Βαρδινογιάννειου Εργαστηρίου Μεταμοσχεύσεων και Μικροχειρουργικής Οφθαλμού (ΒΕΜΜΟ) του Πανεπιστημίου Κρήτης (1995).
- Εκπόνηση Διδακτορικής Διατριβής από το Εργαστήριο Ιολογίας και την Οφθαλμολογική Κλινική Πανεπιστημίου Κρήτης με τίτλο «Μοριακή Γενετική Ανάλυση Αλληλουχιών Μικροδορυφορικού DNA σε ιστούς οφθαλμικού πτερυγίου» (1996-1999).

### **ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ:**

- Υπηρεσία υπαίθρου στον Υγειονομικό Σταθμό Επισκοπής Ηρακλείου Κρήτης (1991-1993).
- Ειδίκευση στην Οφθαλμολογία στο Οφθαλμολογικό Τμήμα του 401ΓΣΝΑ (1994).
- Ειδίκευση στην Οφθαλμολογία στην Οφθαλμολογική Κλινική ΠΕ.ΠΑ.Γ.Ν.Η. (1996-1999).

#### ΕΠΙΠΡΟΣΘΕΤΕΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΕΣ:

- Αντιπρόεδρος του Συλλόγου Πρωτοβάθμιας Περίθαλψης Νομού Ηρακλείου (1992).
- Μέλος της Οφθαλμολογικής Εταιρείας Κρήτης.
- Μέλος του Βρετανικού Ιατρικού Συλλόγου (GMC).

#### ΔΙΑΚΡΙΣΕΙΣ

- Αριστείο Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Αθηνών για την υψηλότερη επίδοση σπουδών μεταξύ των φοιτητών του έτους (Οκτώβριος 1991).

#### ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ:

- Αγγλικά (Proficiency)
- Γαλλικά (Certificat d'études Primaires)
- Ισπανικά (Basico)

#### ΣΤΡΑΤΙΩΤΙΚΕΣ ΥΠΟΧΡΕΩΣΕΙΣ:

- Δόκιμος έφεδρος ανθυπίατρος στο Στρατιωτικό Νοσοκομείο Μύρινας Λήμνου (1993).
- Δόκιμος έφεδρος ανθυπίατρος στο 401 ΓΣΝΑ (1993-1994).

## ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΕΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1. Pallikaris I, McDonald MB, Siganos D, Klonos G, **Detorakis S**, Frey R, Downes R, Gauthier CA Tracker-assisted photorefractive keratectomy for myopia of -1 to -6 diopters. *J Refract Surg* 1996;12:240-247.
2. Kanellopoulos AJ, Pallikaris IG, Donnenfeld ED, **Detorakis S**, Koufala K, Perry HD Comparison of corneal sensation following photorefractive keratectomy and laser in situ keratomileusis. *J Cataract Refract Surg* 1997;23:34-38.
3. Kozobolis VP, **Detorakis ET**, Vlachonikolis IG, Pallikaris IG Endothelial corneal damage after neodymium:YAG laser treatment: pupillary membranectomies, iridotomies, capsulotomies. *Ophthalmic Surg Lasers* 1998;29:793-802.
4. **Detorakis ET**, Sourvinos G, Tsampralakis J, Spandidos DA Evaluation of loss of heterozygosity and microsatellite instability in human pterygium: clinical correlations. *Br J Ophthalmol* 1998;82:1324-1328.
5. **Detorakis ET**, Siganos DS, Houlakis VM, Kozobolis VP, Pallikaris IG Microbiological examination of bandage soft contact lenses used in laser refractive surgery. *J Refract Surg* 1998;14:631-635.
6. **Efstathios T. Detorakis**, Demetrios A. Spandidos. P16 alterations in metastatic melanoma (editorial). *Journal of BUON* 1998;4:269-270.
7. **Efstathios T. Detorakis**, Spiros Myiakakis, Demetrios A. Spandidos. Molecular Genetics of Malignant Melanoma. *European School of Oncology, postgraduate course*.1998:19-27.
8. **Detorakis ET**, Siganos DS, Kozobolis VP, Pallikaris IG Corneal epithelial wound healing after excimer laser photorefractive and photoastigmatic keratectomy (PRK and PARK). *Cornea* 1999;18:25-28.
9. VP Kozobolis, **ET Detorakis**, G Sourvinos, IG Pallikaris, DA Spandidos Loss of Heterozygosity in pseudoexfoliation syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:1255-60.
10. Vassilios P. Kozobolis, **Efstathios T. Detorakis**, Miltiadis K. Tsilimbaris, Ioannis G. Vlachonikolis, Ioannis C. Tsambarlakis, Ioannis G. Pallikaris. Correlation between Age Related Macular Degeneration and Pseudoexfoliation Syndrome in the Population of Crete (Greece). *Arch Ophthalmol* 1999;117:664-669.
11. Vassilios P. Kozobolis, **Efstathios T. Detorakis**, Gregory M. Tsopakis, Ioannis G. Pallikaris. Evaluation of tear secretion and tear film stability in pseudoexfoliation syndrome. *Acta Ophthalmol* 1999;77:406-409.

12. Dimitrios S. Siganos, **Efstathios T. Detorakis**, Ioannis M. Halkiadakis, Ioannis G. Pallikaris  
Peripheral Fundus Findings In Myopic Patients Seeking Excimer Laser Refractive Surgery.  
(Submitted,*Ophthalmology*).

#### ΕΛΛΗΝΟΓΛΩΣΣΕΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1. Γερμανάκης Ι, **Δετοράκης ΕΘ**, La Grange R. Κατανάλωση βενζοδιαζεπινών από μη ψυχωσικούς ασθενείς σε ορεινή περιοχή της Κρήτης. *Πρωτοβάθμια Φροντίδα Υγείας*, τόμος 9, τεύχος 4, Οκτώβριος-Δεκέμβριος 1997.
2. Κοζομπόλης ΒΠ, **Δετοράκης Ε**, Τσοπάκης ΓΜ, Παλλήκαρης ΙΓ. Ψευδοαποφολίδωση και σχετιζόμενη με την ηλικία εκφύλιση της ωχράς. *Οφθαλμολογία*,9,3:266-271,1997.

#### ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. Kanellopoulos A, Pallikaris I, Donnefeld K, Koufala K, **Detorakis S**, Lambros J, Perry H. Evaluation of corneal sensitivity following LASIK and PRK. *ISRS*, 1995.
2. Pallikaris I, Mc Donald M, Koufala D, Siganos D, Klonos G, **Detorakis E**, Frey R, Downes D, USA .T-PRK for low myopia with the Autonomous Technologies Excimer Laser with a small scanning beam and tracker. *ISRS*, 1995.
3. Pallikaris I, Mc Donald M, Koufala D, Siganos D, Klonos G, **Detorakis E**, Frey R, Downes D .T-PRK for low myopia with the Autonomous Technologies Excimer Laser: Specific tests outcome. *ISRS*, 1995.
4. **Detorakis E**, Pallikaris I, Astirakakis N. PRK in the treatment of residual myopia following previous PRK or LASIK. *29<sup>th</sup> Panhellenic Ophthalmological Congress*, 1996.
5. Pallikaris IG, Siganos G, Klonos G, **Detorakis E**, Papadaki T, Astyrakakis N, Mc Donald M. T-PRK for low myopia with the Autonomous Technologies Excimer Laser with a small scanning beam and tracker: phase IIA. *29<sup>th</sup> Panhellenic Ophthalmological Congress*, 1996.
6. Koufala K, Pallikaris IG, Siganos DS, Klonos G, **Detorakis E**, Papadaki T, Astyrakakis N, Lambropoulou A, Margaritis V, Mc Donald M. T-PRK for low myopia with the Autonomous

- Technologies Excimer Laser with a small scanning beam and tracker: phase IIB. 29<sup>th</sup> *Panhellenic Ophthalmological Congress*, 1996.
7. Pallikaris I, Koufala K, **Detorakis E**. Comparative study of the results of the LASIK technique for the correction of myopia , using two different excimer laser systems. 29<sup>th</sup> *Panhellenic Ophthalmological Congress*, 1996.
  8. Kozobolis V, **Detorakis E**, Astyrakakis N, Pallikaris IG, Tsambarlakis I. Nd YAG laser membranectomy from the anterior surface of the IOL-PC. 29<sup>th</sup> *Panhellenic Ophthalmological Congress*, 1996.
  9. Koufala K, Pallikaris IG, Siganos DS, Klonos G, **Detorakis E**, Papadaki T, Astyrakakis N, Lambropoulou A, Margaritis V, Tourtsan V, Mc Donald M. T-PRK™ for low myopia with the Autonomous Technologies Excimer Laser with a small scanning beam and tracker: phase IIB. *Aegean Cornea III*, 1996.
  10. **Detorakis ET**, Houlakis VM, Siganos DS, Papadaki TG, Pallikaris IG. Microbiological examination of therapeutic contact lenses used until reepithelialization after laser refractive surgery. *Aegean Cornea III* September 6-8 1996, Samos, Greece.
  11. Siganos DS, **Detorakis ET**, Halkiadakis I, Pallikaris IG. Peripheral fundus findings in patients seeking laser refractive surgery. *Aegean Cornea III*, 1996.
  12. Siganos DS, Pallikaris IG, **Detorakis ET**, Papadaki TG, Astirakakis NI. Topographic changes in LASIK. *Aegean Cornea III*, 1996.
  13. Pallikaris IG, Siganos DS, **Detorakis ET**, Papadaki TG, Astirakakis I. Enhancement of the PRK or LASIK ablated zone using arcuate corneal cuts. *Midsummer symposium and exhibition*, 1996.
  14. Siganos DS , Pallikaris IG, **Detorakis ET**, Papadaki TG. Rotating brush vs blade removal of corneal epithelium in PRK. *Midsummer symposium and exhibition*, 1996.
  15. Siganos DS , Pallikaris IG **Detorakis ET**, Papadaki TG, Astirakakis I. Corneal Topography changes in LASIK. *Midsummer symposium and exhibition*, 1996.
  16. Siganos DS Pallikaris IG, **Detorakis ET**, Klonos GG, Papadaki TG, Astirakakis I. Topographic changes in LASIK. 1996, *ARVO*.
  17. Mc Donald M, Pallikaris I, Koufala K, Siganos D, **Detorakis S**, Klonos G, Papadaki T, Katsanevaki V, Wyse T, Borodkin M. Clinical results of the Autonomous technologies Phase II Trials for Correction of Low Myopia. *AAO*, 1996.
  18. Κοζομπόλης Β, **Δετοράκης Ε**, Χαλκιαδάκης Ι, Μαρκέτος Γ, Παλλήκαρης Ι. Εξοπλισμός με υψηλής τεχνολογίας μηχανήματα σε κινητή οφθαλμολογική μονάδα (ΚΟΜ) για την πρόληψη και αντιμετώπιση του γλαυκώματος. 30<sup>ο</sup> *Πανελλήνιο Οφθαλμολογικό Συνέδριο*, 1997.

19. Κοζομπόλης Β, **Δετοράκης Ε**, Παλλήκαρης Ι. Προκαλούμενες βλάβες του ενδοθηλίου του κερατοειδούς μετά από εφαρμογή Nd-Yag Laser. *30<sup>o</sup> Πανελλήνιο Οφθαλμολογικό Συνέδριο*, 1997.
20. Siganos DS, Tsilimbaris MK, **Detorakis ET**, Halkiadakis I, Pallikaris IG. Peripheral fundus findings in patients seeking laser refractive surgery. *Aegean Retina V*, 1997.
21. **Detorakis E**, Sourvinos G, Tsambarlakis J, Spandidos DA. Evaluation of loss of heterozygosity and microsatellite instability in ocular pterygium on chromosomal regions 13q,17p and 17q. *2<sup>nd</sup> World Congress on Advances in Oncology*, 1997.
22. **ET Detorakis**, G Sourvinos, J Tsampralakis, DA Spandidos. Evaluation of Loss of Heterozygosity and Microsatellite Instability in human pterygium-Clinical correlations. *31<sup>st</sup> Panhellenic Ophthalmological Congress*, 1998.
23. VP Kozobolis, **ET Detorakis**, IG Pallikaris. Deep sclerectomy (DS) and DS with phacoemulcification. *31<sup>st</sup> Panhellenic Ophthalmological Congress*, 1998.
24. D Spandidos, B Kozobolis, **E Detorakis**, G Sourvinos, I Pallikaris. Loss of Heterozygotic indices of Microsatellite DNA of iris and anterior capsule in pseudoexfoliated patients. *31<sup>st</sup> Panhellenic Ophthalmological Congress*, 1998.
25. **ET Detorakis**. Microsatellites in human cancer. *Seminar on cancer research*, 1998.



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το οφθαλμικό περυσγίο είναι ινοαγγειακή βλάβη του σκληροκερατείου ορίου, που μπορεί να παρουσιάσει προοδευτική αύξηση σε μέγεθος και να απειλήσει την όραση με κατάληψη του κεντρικού κερατοειδή. Η αιτιοπαθογένεια παραμένει σε μεγάλο βαθμό αδιευκρίνιστη, αν και έχει διαπιστωθεί στενή συσχέτιση με περιβαλλοντικούς ερεθισμούς, όπως το ηλιακό φως. Η αντιμετώπιση είναι κυρίως χειρουργική. Η τάση για προοδευτική αύξηση του μεγέθους, η συχνή μετεγχειρητική υποτροπή αλλά και ορισμένα εργαστηριακά δεδομένα, οδήγησαν στην υπόθεση ότι ενδεχομένως αντιπροσωπεύει νεοπλασματική επεξεργασία. Εξάλλου, έχει αναφερθεί η ανίχνευση διαφόρων δυνητικά ογκογόνων ιών σε οφθαλμικά περυσγία, όπως ο ιός των θηλωμάτων (HPV) και ο ιός του απλού έρπητα (HSV).

Η απώλεια ετεροζυγωτίας (LOH) υποδηλώνει εμπλοκή ογκο-κατασταλτικών γονιδίων σε μια παθολογική κατάσταση. Για την ανίχνευσή της χρησιμοποιούνται γενετικοί δείκτες μικροδορυφορικού DNA, που ενισχύονται με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης με πολυμεράση (PCR), τόσο σε δείγματα από παθολογικές καταστάσεις, όσο και σε αντίστοιχα δείγματα περιφερικού αίματος. Με την παρούσα εργασία επιχειρείται η διερεύνηση της παρουσίας LOH στο περυσγίο, η ανίχνευση των ιών HPV και HSV αλλά και η συσχέτιση των ευρημάτων με κλινικοεπιδημιολογικά δεδομένα των ασθενών.

Εξετάστηκαν 50 δείγματα περυσγίων ασθενών της Οφθαλμολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου και αντίστοιχα δείγματα περιφερικού αίματος και φαινοτυπικά υγιούς επιπεφυκότα. Προηγήθηκε οφθαλμολογική εξέταση και καταγραφή στοιχείων από το ιατρικό και οφθαλμολογικό ιστορικό των ασθενών. Ενισχύθηκαν συνολικά 20 μικροδορυφορικοί δείκτες στις χρωμοσωμικές περιοχές 17p, 17q, 13q, 9p, 9q και 3p. Επίσης διερευνήθηκε με PCR η παρουσία των ιών HPV και HSV και στις περιπτώσεις θετικών δειγμάτων έγινε τυποποίηση στελεχών των ιών.

Η υψηλότερη συχνότητα LOH παρατηρήθηκε στις περιοχές 9p (48% των δειγμάτων) και 17q (42%). Σε καμία περίπτωση δεν παρατηρήθηκε LOH σε δείγμα φυσιολογικού επιπεφυκότα. Σε 22% των δειγμάτων περυσγίου ανιχνεύτηκε HSV και σε 24% HPV. Ο HSV δεν ανιχνεύτηκε σε δείγματα φυσιολογικού επιπεφυκότα ενώ ο HPV ανιχνεύτηκε σε 8% των δειγμάτων αυτών. Σε 3 περιπτώσεις ανιχνεύτηκαν στα ίδια δείγματα οι ιοί HPV και HSV. Σε όλα τα δείγματα που βρέθηκαν θετικά για τον ιό HSV ανιχνεύτηκε ο τύπος HSV-1, ενώ σε όλα τα θετικά δείγματα για HPV βρέθηκε ο HPV-18. Η συχνότητα LOH στις περιοχές 9q31-33 και 3p22-21.3 ήταν υψηλότερη

σε άτομα με μεγαλύτερο υψόμετρο διαβίωσης και ιστορικό χρόνιας επιπεφυκίτιδας αντίστοιχα. Η συχνότητα LOH στην περιοχή 9q31-33 ήταν επίσης υψηλότερη σε νεότερα άτομα. Η μετεγχειρητική υποτροπή συσχετίστηκε με την ταυτόχρονη παρουσία των ιών HPV και HSV καθώς και με την παρουσία LOH στην περιοχή 9q.

Η ανίχνευση LOH στους εξετασθέντες δείκτες, ενισχύει την υπόθεση ότι το οφθαλμικό περύγιο είναι νεοπλασματική κατάσταση και υποδηλώνει ότι πιθανώς ελέγχεται γονιδιακά. Το γεγονός ότι η συχνότητα LOH στην περιοχή 9q ήταν υψηλότερη σε υποτροπιάζοντα περύγια και συσχετίστηκε, ιδίως στην περιοχή 9q31-33, με γνωστούς παράγοντες κινδύνου όπως η νεαρή ηλικία και το υψόμετρο του τόπου διαβίωσης (που συνδέεται με την έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία), υποδηλώνει πιθανή προγνωστική αξία της LOH στην παραπάνω περιοχή για μετεγχειρητική υποτροπή. Εξάλλου, η συσχέτιση της ταυτόχρονης παρουσίας HPV και HSV με τη μετεγχειρητική υποτροπή υποδηλώνει ότι επιλεκτική αντική θεραπεία μπορεί ενδεχομένως να έχει κάποια θέση στη θεραπευτική του περυγίου.

## ABSTRACT

Ophthalmic pterygium is a fibrovascular lesion of the corneoscleral junction, usually displaying progressive growth. It can threaten vision by extending to the central cornea. Pathogenesis remains unknown, although a relationship with environmental factors, such as solar light, has been established. Treatment is mainly surgical. The tendency to grow, the frequent postoperative recurrence as well as laboratory findings have led to the assumption that pterygium is a neoplastic condition. Furthermore, potentially oncogenic viruses, such as HPV and HSV have been detected in pterygia.

Loss of Heterozygosity (LOH) implies the involvement of tumor-suppressor genes in pathological conditions. LOH can be detected with microsatellite DNA markers, amplified with polymerase chain reaction (PCR) in paired pathological and peripheral blood specimens. The present study investigated the incidence of LOH, in selected loci, as well as the presence of HPV and HSV in pterygia. Moreover, evaluation of the possible correlation of the findings with clinical and epidemiological information was carried out.

Fifty pterygia and respective phenotypically normal conjunctival samples, together with peripheral blood samples were included. Samples were obtained from patients treated at the Ophthalmological Clinic of the University Hospital of Crete. A slit lamp examination was performed and an ophthalmological and medical history was recorded for each patient. PCR was employed to amplify 20 microsatellite markers located at regions 17p, 17q, 13q, 9p, 9q and 3p. HSV and HPV detection and typing were also performed with PCR.

The highest incidence of LOH was observed at regions 9p (48% of specimens) and 17q (42% of specimens). No conjunctival specimen displayed LOH. HSV and HPV were detected in 22% and 24% of pterygium specimens respectively, while both HSV and HPV in 6% of specimens. No conjunctival specimen displayed HSV, while HPV was detected in 8%. All HSV-positive specimens displayed HSV-1, while all HPV-positive specimens displayed HPV-18. LOH at regions 9q31-33 and 3p22-21.3 was higher among patients living at higher altitudes and among those with a history of chronic conjunctivitis respectively. LOH incidence at region 9q31-33 was also higher among younger patients. Postoperative recurrence correlated with LOH at 9q and with the simultaneous presence of HPV and HSV.

The detection of LOH at the examined loci, supports the concept that pterygium is a neoplastic condition and implies that it is genetically determined. The fact that the incidence of LOH at region 9q was higher among recurrent pterygia and correlated, especially at 9q31-33, with recognized risk factors such as young age and altitude of residence (which is related to exposure to

ultraviolet irradiation), implies a possible prognostic value of LOH at this region for postoperative recurrence. Moreover, the correlation of the simultaneous presence of HPV and HSV with postoperative recurrence suggests that antiviral therapy in selected cases could play a role in the management of recurrent pterygia.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	1
ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	2
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	9
ABSTRACT	11
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	13

### A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

#### *1. Γενικά για το πτερύγιο*

➤ Περιγραφή, Ιστορία και Επιδημιολογία	15
➤ Συμπτωματολογία	16
➤ Φυσική Ιστορία	16
➤ Διαφορική διαγνωστική	17
➤ Ιστολογικά και Ιστοχημικά χαρακτηριστικά	18
➤ Παθογένεια	19
➤ Θεραπεία	25

#### *2. Μικροδορυφορικό DNA, γενετικοί δείκτες & ογκογονίδια*

➤ Εξωγονιδιακές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA	27
➤ Χαρτογράφηση γονιδιώματος, γενετικοί δείκτες και περιεχόμενη πληροφορία (information content)	32
➤ Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	37
➤ PCR και μικροδορυφορικό DNA	39
➤ Αξιοποίηση μικροδορυφορικού DNA στην ανάλυση νεοπλασματικών και μη καταστάσεων	40
➤ Ογκοκατασταλτικά γονίδια και απώλεια της ετεροζυγωτίας (LOH)	41
➤ Αξιολόγηση της παρουσίας LOH	43
➤ Καρκίνος μικροδορυφορικές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες και πιστότητα αντιγραφής DNA	46

- Ιική ογκογόνος δράση και LOH 47

### **3. Οφθαλμικό πτερύγιο και LOH**

- Αρχική αναφορά ανίχνευσης LOH σε οφθαλμικά πτερύγια και ερωτήματα που προέκυψαν από αυτή 50
- Ανίχνευση LOH σε καταστάσεις σχετιζόμενες με το ηλιακό φως-το «παράδειγμα» της ακτινικής κεράτωσης 51
- Ερευνητική πρόταση για την περαιτέρω διερεύνηση αλλοιώσεων μικροδορυφορικού DNA στο οφθαλμικό πτερύγιο 53

## **B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

### **1. Ασθενείς, υλικά και μεθοδολογία**

- Επιλογή ασθενών και προεγχειρητικός έλεγχος 55
- Κλινικά και επιδημιολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών 56
- Εγχειρητική τεχνική 58
- Παθολογοανατομική εξέταση δειγμάτων 59
- Συλλογή και αποθήκευση δειγμάτων 59
- Απομόνωση DNA 59
- Επιλογή δεικτών μικροδορυφορικού DNA 60
- Εκκινητές για μικροδορυφορικούς δείκτες και ικές αλληλουχίες 61
- PCR για μικροδορυφορικό DNA 62
- PCR για ικές αλληλουχίες 63
- Ηλεκτροφόρηση και χρώση πηκτής πολυακρυλαμιδίου για μικροδορυφορικούς δείκτες 63
- Ηλεκτροφόρηση και χρώση γέλης αγαρόζης για ικές αλληλουχίες 63

➤ Διαγνωστική τεχνική περιπτώσεων LOH/MI	64
➤ Διαγνωστική τεχνική για ιικές αλληλουχίες/θετικοί μάρτυρες	65
➤ Μετεγχειρητική εξέταση ασθενών	65
➤ Στατιστική ανάλυση	66

## **2. Αποτελέσματα**

➤ Συχνότητα LOH και MI στα συλλεχθέντα δείγματα	67
➤ Συχνότητα ανεύρεσης ιών	67
➤ Στατιστική ανάλυση κλινικοεπιδημιολογικών δεδομένων των ασθενών	68
➤ Συσχέτιση μεταξύ κλινικοεπιδημιολογικών δεδομένων και LOH/MI	69
➤ Συσχέτιση μεταξύ κλινικοεπιδημιολογικών δεδομένων ικής παρουσίας και LOH/MI	71
➤ Αποτελέσματα μετεγχειρητικής παρακολούθησης ασθενών	72

## **3. Συζήτηση**

➤ Σημασία της ανεύρεσης LOH/MI στο πτερύγιο	73
➤ Σημασία της ικής παρουσίας στο πτερύγιο	76
HSV	76
HPV	78
➤ Αξιολόγηση των στατιστικών συσχετίσεων που προέκυψαν	80

## **4. Συμπεράσματα**

## **Γ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

## A.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1. Γενικά για το πτερύγιο

#### Περιγραφή, Ιστορία και Επιδημιολογία

Το οφθαλμικό πτερύγιο είναι ανάπτυξη ινοαγγειακού συνδετικού ιστού, τριγωνικού σχήματος, από τον επιπεφυκότα προς τον κερατοειδή, παρατηρούμενη στη μεσοβλεφάρια σχισμή και συνήθως από τη ρινική πλευρά (στο 90% των περιπτώσεων)<sup>1</sup>. Πρόκειται για βλάβη που περιγράφηκε ήδη από τα αρχαία χρόνια, από τον Ιπποκράτη, το Γαληνό και άλλους<sup>1</sup>. Το όνομά του αναφέρεται ότι προήλθε από την ομοιότητα του σχήματός του με αυτό της πτέρυγας πτηνού. Περιγραφικά η βλάβη διακρίνεται σε σώμα (body), που είναι τμήμα με πλούσια αγγείωση, κεφαλή (apex), που είναι σχετικά λεπτυσμένο και ανάγγειο τμήμα και άκρο κεφαλής (cap), που αντιπροσωπεύει το μέτωπο ανάπτυξης του πτερυγίου και ευρίσκεται αμέσως κεντρικότερα της κεφαλής<sup>2</sup>.

Πρόκειται για πολύ συχνή κατάσταση ιδίως στις περιοχές που βρίσκονται στη ζώνη 40ο νοτίως και βορείως του ισημερινού, η οποία ονομάστηκε "ζώνη πτερυγίου"<sup>3</sup>. Σε πληθυσμούς που διαβιούν σε αυτές τις περιοχές, αναφέρεται επιπολασμός ως και 22%, ενώ σε βορειότερα και νοτιότερα γεωγραφικά πλάτη ο επιπολασμός μειώνεται στα επίπεδα του 2% και η νόσος αφορά κυρίως ναυτικούς και εργαζόμενους στο ύπαιθρο<sup>4,5,6</sup>. Στην Ελλάδα, ο επιπολασμός του πτερυγίου είναι σχετικά υψηλός και ιδίως για την περιοχή της Κρήτης αναφέρεται επιπολασμός μέχρι και 27.3% κατά περιοχές<sup>7</sup>.

#### Συμπτωματολογία



Αίσθημα ξένου σώματος, δακρύρροια και ερεθισμός του βολβού είναι τα συνηθέστερα συμπτώματα, ιδίως όταν το πτερύγιο επεκτείνεται επί του κερατοειδούς<sup>8</sup>. Ο προκαλούμενος υψηλός και συχνά ανώμαλος αστιγματισμός προκαλεί θάμβος όρασης που επιτείνεται καθώς η βλάβη προσεγγίζει τον οπτικό άξονα. Στην περίπτωση αυτή παρατηρείται επίσης μείωση της ευαισθησίας στις αντιθέσεις (contrast sensitivity)<sup>9</sup>. Σε σοβαρές περιπτώσεις αναπτύσσεται συμβλέφαρο και είναι δυνατό να προκληθεί περιορισμός της κινητικότητας του βολβού και διπλωπία<sup>2</sup>. Εξάλλου, το πτερύγιο μπορεί να δυσχεράνει την εφαρμογή φακών επαφής, ενώ σε πολλές περιπτώσεις αποτελεί και κοσμητικό πρόβλημα<sup>10</sup>.

### Φυσική Ιστορία

Η αρχική εντόπιση στον επιπεφυκότα, χαρακτηρίζεται πολλές φορές από την παρουσία διευρυσμένων αγγείων με ακτινωτή διάταξη. Το εύρημα αυτό υποδηλώνει ταχύ ρυθμό ανάπτυξης της βλάβης<sup>2</sup>. Στη φάση αυτή όμως, η συμπτωματολογία είναι συνήθως αμβληχρή. Απεναντίας, με την ανάπτυξη της βλάβης επί του κερατοειδή αναφέρονται εντονότερα συμπτώματα<sup>8</sup>. Για αδιευκρίνιστους λόγους, η ανάπτυξη του πτερυγίου μπορεί να επιβραδυνθεί ή να σταματήσει σε οποιαδήποτε φάση κατά την εξέλιξή του, κάτι που συνοδεύεται από μείωση της αγγειοβρίθειας<sup>2</sup>. Η βλάβη μπορεί να παραμείνει στάσιμη για όλη την υπόλοιπη ζωή. Μπορεί όμως η ανάπτυξή της να αναζωπυρωθεί αιφνιδίως<sup>2</sup>. Επί πτερυγίων που παραμένουν σε στατική φάση από μακρού, παρατηρείται συχνά γραμμοειδής εναπόθεση σιδήρου κεντρικότερα της κεφαλής (γραμμή Stocker)<sup>8</sup>.

### Διαφορική διαγνωστική

Η κλινική εικόνα του πτερυγίου είναι αρκετά τυπική. Ωστόσο, υπάρχουν πολλές καταστάσεις από τις οποίες πρέπει να διακριθεί, οι κυριότερες από τις οποίες είναι το στεάτιο και το ψευδοπτερύγιο.

Το στεάτιο είναι υποκίτρινη βλάβη του σκληροκεράτειου ορίου στο ύψος της μεσοβλεφαρίου σχισμής. Παθολογοανατομικά πρόκειται για υαλοειδή εκφύλιση του αντίστοιχου επιπεφυκότα.

Ενίοτε φλεγμαίνει, αλλά σπανίως τίθεται η ένδειξη αφαίρεσής του επί επανειλημμένων φλεγμονωδών αντιδράσεων ή για κοσμητικούς λόγους<sup>11</sup>. Δεν υποτροπιάζει μετεγχειρητικά<sup>10</sup>.

Η κατεύθυνση ανάπτυξης σε άλλους μεσημβρινούς πλην του οριζώντιου, εμβάλλει την υποψία ότι το μόρφωμα μπορεί να μην είναι πτερύγιο αλλά ψευδοπτερύγιο. Πρόκειται για το αποτέλεσμα χρόνιας φλεγμονής ή τραυματισμού. Δεν υπάρχει η τυπική οργάνωση σε σώμα, κεφαλή και άκρο κεφαλής, ενώ η πρόσφυση γίνεται απευθείας στον κερατοειδή και όχι στο σκληροκεράτριο όριο<sup>8</sup>. Σπανιότερα μπορεί να προκληθεί σύγχυση με άλλες παθολογικές καταστάσεις του κερατοειδή και του επιπεφυκότα όπως η περιφερική εκφύλιση Terrien, το θήλωμα, το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα, το σημηματοροϊκό καρκίνωμα με παζετοειδή επέκταση, το μελάνωμα, το ίνωμα, το ινοχόνδρωμα, το αδένωμα, το ινώδες ιστοκύττωμα, το νευριλήμωμα, το σάρκωμα Karosi, το αιμαγγείωμα, το λίπωμα, η έκτοπη εντόπιση δακρυϊκού αδένου, ο σπίλος, το κυψελιδικό ενδοθηλίωμα, το επισκληρικό χωρίστωμα ή το νεανικό ξανθοκοκκίωμα<sup>12</sup>.

#### Ιστολογικά και Ιστοχημικά χαρακτηριστικά

Υαλινοειδής εκφύλιση της ίδιας ουσίας του επιπεφυκότα, διάχυτη ή κατά τόπους συγκέντρωση ηωσινοφιλικού κοκκιώδους υλικού και έντονη παρουσία ινοβλαστών χαρακτηρίζουν τόσο το πτερύγιο, όσο και το στεάτιο<sup>13</sup>. Ηωσινοφιλικές ή βασεόφιλες εναποθέσεις παρατηρούνται μεταξύ των κοκκιωδών ή υαλινοειδών περιοχών<sup>13</sup>. Στην ιστολογική εικόνα περιλαμβάνονται ακόμη παχυσμένα και με ελικοειδή πορεία ινώδη στοιχεία που προσλαμβάνουν χρωστικές του ελαστικού ιστού όπως οι "Weigert" και η "Verhoff" (ελαστωτική εκφύλιση)<sup>14</sup>. Τα ινώδη αυτά στοιχεία είχαν αρχικά θεωρηθεί προϊόντα αποδόμησης του ελαστικού ιστού, αργότερα όμως διαπιστώθηκε ότι επώαση με ελαστάση δεν προκαλούσε ελαστόλυση<sup>15</sup>. Έτσι προτάθηκε ότι πρόκειται κατά βάση για εκφυλισμένο κολλαγόνο, τύπου I και IV<sup>16,17</sup>. Ωστόσο, υπάρχει το ενδεχόμενο να πρόκειται

για ανώριμες μορφές ελαστίνης (ελαστοδυσπλασία) είτε δευτερογενώς εκφυλισμένες ελαστικές ίνες (ελαστοδυστροφία)<sup>13</sup>, δεδομένου ότι η ελαστάση δρα μόνο στην ώριμη μορφή ελαστίνης<sup>4</sup> [Εικ. 2].

Η ιστολογική ομοιότητα του πτερυγίου και του στεατίου με την ακτινική εκφύλιση που παρατηρείται στο δέρμα, οδηγεί στην υπόθεση ότι στις βλάβες αυτές, η επίδραση της υπερϊώδους ακτινοβολίας στους ινοβλάστες, οδηγεί στην παραγωγή πρόδρομων συστατικών του ελαστικού ιστού<sup>13</sup>. Ινοβλάστες ενεργοποιημένοι από την υπερϊώδη ακτινοβολία, που βρίσκονται κάτω από την μεμβράνη Bowman, προκαλούν κατακερματισμό της ίδιας της μεμβράνης αλλά και τοπική καταστροφή του προσθίου στρώματος του κερατοειδή<sup>4</sup>. Η διήθηση από τέτοιου είδους κύτταρα ευθύνεται για τη στερεή πρόσφυση της κεφαλής του πτερυγίου στον κερατοειδή<sup>18</sup>. Απεναντίας, η παρεμβολή της τενονείου κάψας μεταξύ επιπεφυκότα και σκληρού αποτρέπει την προσκόλληση του πτερυγίου στο σκληρό χιτώνα<sup>2</sup>. Εξάλλου, επιθηλιακές μεταβολές όπως ακάνθωση, υπερκεράτωση, παρακεράτωση και σπάνια ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα, μπορεί να αναπτυχθούν στην επιφάνεια πτερυγίου<sup>14</sup>.

Ενδιαφέρον είναι ότι το υποτροπιάζον πτερύγιο παρουσιάζει σημαντικές ιστολογικές διαφορές από την πρωτοπαθή βλάβη<sup>14</sup> και προσομοιάζει περισσότερο από ιστολογική άποψη με τα χηλοειδή του δέρματος<sup>19</sup>. Εξάλλου, παρότι κλινικά η υποτροπιάζουσα βλάβη ομοιάζει με την πρωτοπαθή, η υποτροπή έχει αναφερθεί ότι δεν παρουσιάζει επιδημιολογική συσχέτιση με την έκθεση στην υπερϊώδη ακτινοβολία<sup>20,21</sup>.

Διαφορές στη βιοχημική σύνθεση του πτερυγίου από το φυσιολογικό επιπεφυκότα έχουν επίσης αναφερθεί, όπως ανώμαλες βλενωδείς γλυκοπρωτείνες και γλυκοζαμινογλυκάνες. Οι τελευταίες περιέχουν σε αυξημένη ποσότητα ουδέτερα σάκχαρα και σιαλικό οξύ<sup>22,23</sup>. Στα πτερύγια ανιχνεύεται επίσης σε αυξημένη ποσότητα το αμινοξύ προλίνη σε σχέση με το φυσιολογικό επιπεφυκότα<sup>23,24</sup>.

## Παθογένεια

Παρά τη διατύπωση πολλών θεωριών για την ανάπτυξη του πτερυγίου, δεν υπάρχει ακόμη σαφής αντίληψη αιτιοπαθογένειας. Αρχικά είχε υποτεθεί ότι αλλοιωμένο πρωτεϊνικό υλικό που δημιουργείται από την επίδραση του ηλιακού φωτός στον κερατοειδή και τον επιπεφυκότα λειτουργεί ως "πτερυγιογεννητικός" ή "αγγειογεννητικός" παράγοντας<sup>3</sup>. Έτσι από πολύ νωρίς το πτερύγιο συνδέθηκε με την έκθεση στο ηλιακό φως και θεωρήθηκε "οφθαλμοηλίωση"<sup>3</sup>.

Συγκεκριμένα, προδιαθεσικός παράγοντας θεωρήθηκε η έκθεση στο υπεριώδες τμήμα του φάσματος του ηλιακού φωτός (ακτινοβολίες UVA και UVB, με μήκη κύματος 290-400nm)<sup>25</sup>.

Ιδιαίτερα επικίνδυνη θεωρείται η σκεδαζόμενη ηλιακή ακτινοβολία (albedo)<sup>3</sup>. Έχει υπολογιστεί ότι αύξηση της έκθεσης στην ηλιακή ακτινοβολία κατά 1% θα προκαλούσε αύξηση της επίπτωσης πτερυγίου στον πληθυσμό της Αυστραλίας κατά 2,5-14%<sup>3</sup>. Υπάρχει εξάλλου συσχέτιση του πτερυγίου με νόσους κυρίως του δέρματος που είναι γνωστό ότι συνδέονται αιτιοπαθογενετικά ή επιδεινώνονται με το ηλιακό φως (δερματοηλίωσεις) όπως το βασικοκυτταρικό καρκίνωμα του δέρματος<sup>26</sup>, η δερματική πορφυρία (Porphyria Cutaneous Tarda)<sup>27</sup>, το πολύμορφο ακτινικό ερύθημα (actinic prurigo)<sup>28</sup>, και η χρωστική ξηροδερμία (xeroderma pigmentosum)<sup>29</sup>. Μάλιστα αναφέρεται ότι η εκδήλωση του πτερυγίου μπορεί να προηγείται ακόμη και μια 10ετία από την εμφάνιση των νόσων αυτών<sup>3</sup>.

Σε μοριακό επίπεδο, η δράση της υπεριώδους ακτινοβολίας φαίνεται να συνδέεται με το σχηματισμό ελεύθερων ριζών και την τροποποίηση της ανοσολογικής κατάστασης στο σκληροκεράτριο όριο. Ιδιαίτερα έχει αναφερθεί μείωση του αριθμού των κυττάρων Langerhans, κάτι που συνδέεται με αυξημένη ανοσολογική ανοχή<sup>3</sup>. Ένα μέσο προστασίας απέναντι στη δράση των ελευθέρων ριζών είναι και η λακτοφερρίνη, που αποτελεί σημαντικό πρωτεϊνικό συστατικό των δακρύων. Είναι πιθανό ότι η ανασταλτική δράση της λακτοφερρίνης επί των ελευθέρων ριζών

συνδέεται με την εναπόθεση σιδήρου σε πτερύγια που βρίσκονται σε στατική φάση από μακρού (γραμμή Stocker)<sup>3,8</sup>.

Στην εκδήλωση πτερυγίου προδιαθέτει και το ανδρικό φύλο, αν και διαπιστώθηκε ότι αυτό οφείλεται μάλλον στην αυξημένη έκθεση των ανδρών στην ηλιακή ακτινοβολία για επαγγελματικούς λόγους<sup>30</sup>. Επίσης, εκτός από το ηλιακό φως, η έκθεση σε εξωτερικούς ερεθιστικούς παράγοντες, όπως σκόνη, έχει αναφερθεί ότι προδιαθέτει στην ανάπτυξη της βλάβης. Το συμπέρασμα αυτό προέκυψε από παρατηρήσεις σε βιομηχανικούς εργάτες που εργάζονταν σε περιβάλλον με σκόνη και παρουσίαζαν σημαντικά υψηλότερη συχνότητα πτερυγίου από μάρτυρες που ζούσαν στην ίδια περιοχή<sup>31</sup>. Έτσι θεωρήθηκε ότι το μικροτραύμα από σωματίδια σκόνης, που μάλιστα είναι εντονότερο στο ρινικό επιπεφυκότα λόγω της ροής των δακρύων, μπορεί να ευθύνεται για την ανάπτυξη πτερυγίου<sup>3</sup>. Ωστόσο, η υψηλή συχνότητα πτερυγίου και σε πληθυσμούς που δεν εκτίθενται σε σκόνη, όπως σε ναυτικούς, δημιουργεί προβληματισμούς για την άποψη αυτή<sup>3,32</sup>. Η κληρονομικότητα είναι ένας άλλος παράγον που συνδέεται επιδημιολογικά με το πτερύγιο<sup>3,30</sup>. Μάλιστα, έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι πιθανώς η κατάσταση κληρονομείται κατά τον αυτοσωματικό επικρατούντα χαρακτήρα, αν και δεν έχει διευκρινιστεί αν κληρονομείται η ίδια η νόσος ή η προδιάθεση για την ανάπτυξή της μέσω αυξημένης ευαισθησίας στην ηλιακή ακτινοβολία<sup>3</sup>.

Η συσχέτιση του πτερυγίου με την έκθεση στο ηλιακό φως προτάθηκε ότι οφείλεται στην προκαλούμενη ξήρανση του επιπεφυκότα και αλλοίωση στη δακρυϊκή στιβάδα<sup>3,33</sup>. Υπάρχουν αντικρουόμενες αναφορές σχετικά με την επάρκεια της δακρυϊκής λειτουργίας σε ασθενείς με πτερύγιο, όπως αυτή εκτιμάται από το Schirmer test, χρόνο διάσπασης της δακρυϊκής στιβάδας (BUT) και χρώση κερατοειδή με Rose Bengal<sup>33,34,35</sup>. Αναφέρεται υψηλή επίπτωση πτερυγίου σε περιοχές με υγρό κλίμα, όπου η ξήρανση στο κόλπωμα του επιπεφυκότα είναι λιγότερο πιθανή, αν και πιθανώς η έκθεση στον άνεμο μπορεί αφ'εαυτής να προκαλέσει ξήρανση<sup>36</sup>. Ωστόσο, είναι

δύσκολο να καθοριστεί αν τυχόν διαταραχές στη δακρυϊκή στιβάδα είναι το αίτιο ή το αποτέλεσμα της ύπαρξης του πτερυγίου<sup>3,33</sup>.

Εκτός από το υπεριώδες φάσμα της ηλιακής ακτινοβολίας, έχει διερευνηθεί και η σχέση της ανάπτυξης πτερυγίου με την υπέρυθη ακτινοβολία<sup>34,37</sup> και με την υψηλή θερμοκρασία. Σε πειραματικό μοντέλο κουνελιού, έχει αποδειχτεί ότι η έκθεση σε θερμοκρασία 390C για χρονικό διάστημα μιας ώρας, μπορεί να προκαλέσει αλλοιώσεις όπως σκληρική υπερπλασία και κινητοποίηση ινοβλαστών<sup>38</sup>.

Ανοσολογικοί μηχανισμοί επίσης έχει προταθεί ότι συμμετέχουν στην παθογένεια του πτερυγίου<sup>39,40</sup>. Έχει περιγραφεί η εναπόθεση ανοσοσφαιρινών IgE και IgG στο συνδετικό ιστό πτερυγίου, όπως επίσης και η διήθηση από λεμφοκύτταρα και πλασματοκύτταρα<sup>40</sup>. Έτσι, έχει πιθανολογηθεί ότι στην ανάπτυξη του πτερυγίου εμπλέκεται ανοσολογικός μηχανισμός τύπου I, σύμφωνα με τον οποίο, η πρόσδεση IgE σε μαστοκύτταρα οδηγεί στην απελευθέρωση φαρμακολογικά δραστικών ουσιών, όπως ο παράγων ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF) ή ο αναπτυξιακός παράγων των αιμοπεταλίων (PDGF)<sup>40</sup>. Ο τελευταίος παράγων είναι ρυθμιστικός του επιθηλιακού αναπτυξιακού παράγοντα (EGF)<sup>3</sup>.

Άλλοι μηχανισμοί έχουν επίσης ενοχοποιηθεί, όπως η δράση του γαλακτικού οξέως (συστατικό του ιδρώτα), που ακολουθώντας διαδρομή κατά μήκος της οφρύος και της πλάγιας επιφάνειας της ρινός, εναποτίθεται στο ρινικό βολβικό επιπεφυκότα<sup>3,41</sup>. Αυτό έχει αποδειχτεί με πειράματα όπου ερυθρό της Βεγγάλης τοποθετήθηκε στο μέτωπο<sup>41</sup>. Ωστόσο, η θεωρία αυτή δεν μπορεί να εξηγήσει την υψηλή συχνότητα πτερυγίου σε περιπτώσεις με ταχεία εξάτμιση του ιδρώτα (π.χ. σε ναυτικούς), ή σε ψυχρά κλίματα, όπου η έντονη εφίδρωση είναι ασυνήθιστη. Άλλες θεωρίες που έχουν κατά καιρούς αναπτυχθεί για την ερμηνεία της ανάπτυξης του πτερυγίου, είναι μια αδιευκρίνιστη χρόνια λοίμωξη του επιπεφυκότα, θρόμβωση φλεβών του επιπεφυκότα, συστολή των οριζόντιων ορθών που οδηγεί σε στάση του αίματος στα αιμοφόρα αγγεία του επιπεφυκότα και επίσης χαλάρωση και πτύχωση του επιπεφυκότα επί του κερατοειδούς ή αντανάκλαση του φωτός

από την πλάγια επιφάνεια της ρινός στο ρινικό τμήμα του σκληροκεράτειου ορίου<sup>3</sup>. Η κατά κύριο λόγο ρινική εντόπιση του πτερυγίου έχει προταθεί ότι οφείλεται στο φιλτράρισμα του φωτός από την κλίση των έξω 2/3 της οφρύος καθώς και από το μεγαλύτερο μήκος των βλεφαρίδων στην κροταφική πλευρά<sup>19,42</sup>. Δεν εξηγείται όμως η εντόπιση του πτερυγίου στο μάτι που προσηλώνει, επί ασθενών με εξωτροπία, όπου εκτίθεται περισσότερο ο ρινικός βολβικός επιπεφυκότας του ματιού που στραβίζει, αν και έχει παρατηρηθεί ότι το πτερύγιο τείνει να εμφανίζεται επί του κυρίαρχου (dominant) οφθαλμού, γεγονός που έχει αποδοθεί στη μεγαλύτερη έκθεσή του στο ηλιακό φως, όπου ο μη κυρίαρχος οφθαλμός κλείνει<sup>42</sup>. Μια άλλη θεωρία στηρίζει την ανάπτυξη του πτερυγίου στην εστίαση του ορατού και υπεριώδους φωτός με παράπλευρες (transcameral) οδούς στην περιοχή του σκληροκεράτειου ορίου, όπου πιθανώς τα βλαστικά επιθηλιακά κύτταρα ακτινοβολούνται από θέσεις απροστάτευτες από τις πιο επιπολής κυτταρικές στιβάδες<sup>3,43</sup>. Έχει αναφερθεί ότι επί πτερυγίου οι κάθετοι άξονες των βλαστικών κυττάρων του επιθηλίου αποκτούν λοξή φορά<sup>44</sup>, ενώ παρατηρούνται επίσης αλλοιώσεις του σχήματος αλλά και του πυρήνα των κυττάρων που εμφανίζονται πυκνωτικοί<sup>45</sup>. Πυρήνες με πυκνωτική μορφολογία έχουν επίσης παρατηρηθεί και σε επιθηλιακά κύτταρα φακού που έχουν ακτινοβοληθεί με υπεριώδη ακτινοβολία, σε πειραματικό μοντέλο ποντικού<sup>47</sup>. Η εστίαση του φωτός που προσπίπτει από την κροταφική στη ρινική πλευρά του σκληροκεράτειου ορίου και του φακού μπορεί να ερμηνεύσει και τη συχνή έναρξη των φλοιωδών καταρρακτών από τη ρινική πλευρά<sup>3</sup>. Η χρόνια ακτινοβόληση του ρινικού σκληροκεράτειου ορίου έχει αναφερθεί ότι μπορεί να μειώσει την ικανότητα των βλαστικών κυττάρων να ανανεώνουν το επιθήλιο του κερατοειδή<sup>48</sup>. Η ακτινοβόληση με υπεριώδη ακτινοβολία θα μπορούσε επίσης να προκαλέσει υπερπλασία των κυττάρων στο σκληροκεράτειο όριο, όπως έχει αναφερθεί για τα κύτταρα στην επιδερμίδα και τα τριχοθυλάκια<sup>3,48,49</sup>. Με βάση αυτές τις μεταβολές στην κινητική των κυττάρων του σκληροκεράτειου ορίου και εφαρμόζοντας ένα μοντέλο σχετικής πληθυσμιακής ανάπτυξης του επιθηλίου επιπεφυκότα και κερατοειδή, έχει γίνει προσπάθεια ερμηνείας του τριγωνικού σχήματος του πτερυγίου<sup>50</sup>.

Ο ρόλος των ιών στην ανάπτυξη του πτερυγίου είναι επίσης υπό διερεύνηση. Με μέθοδο ενίσχυσης του DNA με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR-polymerase chain reaction), έχει διαπιστωθεί αυξημένη παρουσία DNA των ιών απλού έρπητα (HSV) και κυτταρομεγαλοϊού του ανθρώπου (HCMV) σε ιστό πτερυγίου σε σχέση με φυσιολογικό ιστό επιπεφυκότα που ελήφθη από το ίδιο άτομο<sup>51</sup>. Ακόμη βρέθηκε συσχέτιση του πτερυγίου με τον ιό των θηλωμάτων (HPV) με τεχνικές ανοσοϊστοχημείας<sup>52</sup>.

Εξάλλου με κυτταροκαλλιέργεια ινοβλαστών από πτερύγια διαπιστώθηκε ότι τα κύτταρα αυτά παρουσιάζουν φαινοτυπικές ομοιότητες με νεοπλασματικά κύτταρα, όπως μειωμένη εξάρτηση από εξωγενείς αναπτυξιακούς παράγοντες για την ανάπτυξή τους και πολύ μεγαλύτερη πληθυσμιακή συγκέντρωση κορεσμού σε σχέση με ινοβλάστες του φυσιολογικού επιπεφυκότα<sup>53</sup>, ενώ αναφέρεται περίπτωση όπου, με την παθολογοανατομική εξέταση ενός αθώου φαινομενικά πτερυγίου, διαπιστώθηκε η παρουσία ενδοεπιθηλιακού νεοπλάσματος του επιπεφυκότα<sup>54</sup>. Τα δεδομένα αυτά, σε συνδυασμό με την αύξηση σε μέγεθος της βλάβης καθώς και τη συχνά παρατηρούμενη μετεγχειρητική υποτροπή, αλλά και την προαναφερθείσα σύνδεση των πτερυγίων με δυνητικά ογκογόνους ιούς, όπως ο HPV που είναι γνωστό ότι εμπλέκεται σε νεοπλασίες του επιπεφυκότα<sup>56</sup>, οδήγησε στην υπόθεση ότι ενδεχομένως η βλάβη αντιπροσωπεύει μια νεοπλασματική εξεργασία<sup>57</sup>.

## Θεραπεία

Η συντηρητική θεραπεία περιορίζεται στη συμπτωματική ανακούφιση με τη χορήγηση τοπικά στεροειδών και μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών και τεχνητών δακρύων<sup>8</sup>. Έχει επίσης αναφερθεί η ότι η προστασία με γυαλιά ηλίου πιθανώς αναστέλλει την ανάπτυξη της βλάβης<sup>25</sup>.

Οι κύριες ενδείξεις χειρουργικής θεραπείας είναι η απειλή κατάληψης του οπτικού άξονα, ο ανώμαλος αστιγματισμός και ο περιορισμός της οφθαλμοκινητικότητας, ενώ δευτερεύουσες ενδείξεις θεωρούνται η δυσανεξία στη χρήση φακών επαφής, η χρόνια φλεγμονή και τα κοσμητικά



προβλήματα<sup>10</sup>. Η χειρουργική θεραπεία μπορεί να εφαρμοστεί με πολλούς διαφορετικούς τρόπους. Η παλαιότερη τεχνική, γνωστή ήδη από τα αρχαία χρόνια, είναι η απόσπαση της κεφαλής του πτερυγίου<sup>2</sup>. Η μετεγχειρητική υποτροπή μετά από απόσπαση έχει αναφερθεί 23-75%, παρόμοια με άλλες τεχνικές<sup>57</sup>. Μια δημοφιλής τεχνική είναι αυτή του "ακάλυπτου σκληρού" ("bare sclera")<sup>58</sup>. Με την τεχνική αυτή, ιδίως όταν γίνεται συρραφή του υπολειπόμενου επιπεφυκότα επί του σκληρού, έχει υποτεθεί ότι αναστέλλεται η μετεγχειρητική ανάπτυξη του πτερυγίου επί του κερατοειδή<sup>59</sup> [Εικ. 3]. Ωστόσο, η πρωτογενής σύγκλειση του τραύματος ("primary closure") ή τεχνική του ελάχιστου σκληρού ("merest sclera"), ενδεχόμενα με συρραφή επιπεφυκοτικού κρημνού, αναφέρεται ότι μπορεί να μειώσει την υποτροπή στο πρώτο έτος μετεγχειρητικά, σε ποσοστό μόλις 5%<sup>60</sup>. Άλλες τεχνικές είναι η μεταμόσχευση της κεφαλής σε συνδυασμό με Z-πλαστική του επιπεφυκότα<sup>61</sup>, η αυτομεταμόσχευση επιπεφυκότα<sup>62</sup> και η μεταμόσχευση σκληροκεράτειου ορίου<sup>63</sup>, ενώ λόγω του ότι μετεγχειρητικά μπορεί να παρατηρηθεί σημαντική λέπτυνση και ουλοποίηση του κερατοειδή, μερικές φορές απαιτείται επιπολής κερατοπλαστική<sup>64</sup>.

Σε κάθε περίπτωση κατά ή μετά τη χειρουργική αφαίρεση μπορεί να εφαρμοστεί συμπληρωματική θεραπεία<sup>8</sup>. Αυτή μπορεί να είναι προσεκτική διαθερμία επί των αγγείων στην κοίτη του πτερυγίου<sup>65</sup>, εφαρμογή Argon<sup>66</sup> ή Excimer Laser<sup>67</sup> επί των αγγειακών σχηματισμών στην κοίτη του πτερυγίου, η μετεγχειρητική χρήση κορτικοειδών μετά την επιθηλιοποίηση του κερατοειδή<sup>68</sup>, η χρήση κυτταροστατικών παραγόντων διεγχειρητικά ή μετεγχειρητικά, όπως η Thiotepa<sup>69</sup> ή η μιτομυκίνη C70, και η χρήση β ακτινοβολίας<sup>71</sup>.

## 2. Μικροδορυφορικό DNA, γενετικοί δείκτες & ογκογονίδια

Επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA

Το ανθρώπινο γονιδίωμα, όπως και αυτό άλλων ευκαρυωτικών οργανισμών, περιλαμβάνει σε σημαντικό βαθμό, επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA. Οι αλληλουχίες αυτές είναι στο μεγαλύτερο μέρος τους μεταγραφικά ανενεργείς και οργανώνονται σε 2 κύριες κατηγορίες<sup>72</sup>: Παρεμβαλλόμενες αλληλουχίες επανάληψης. Δεν συρρέουν, αλλά είναι διεσπαρμένες σε πολλές θέσεις στο γονιδίωμα.

Πολλαπλά επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες. Ανάλογα με το μέγεθός τους μπορεί να χωρίζονται σε δορυφορικό, μινιδορυφορικό και μικροδορυφορικό DNA. Το χαρακτηριστικό τους είναι ότι συρρέουν σε ομάδες άλλοτε άλλου μεγέθους.

Έχουν περιγραφεί δύο κυρίως οικογένειες παρεμβαλλόμενων αλληλουχιών επανάληψης<sup>72</sup>: Τα SINEs (Short Interspersed Nuclear Elements), με κύριο εκπρόσωπο την αλληλουχία Alu, χαρακτηριστική στα πρωτεύοντα, και Τα LINEs (Long Interspersed Nuclear Elements), με κύριο εκπρόσωπο την αλληλουχία LINE-1 ή L1.

Ως προς τις πολλαπλά επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες:

Το δορυφορικό (satellite) DNA αποτελείται από αλληλουχίες 5-100 ζευγών βάσεων, οργανωμένων σε ομάδες των 100Mb. Δεν μεταγράφεται και απαρτίζει το μεγαλύτερο όγκο των περιοχών ετεροχρωματίνης του γονιδιώματος. Υπάρχουν πολλές οικογένειες δορυφορικού DNA που διαχωρίζονται με στρωματική κατακρήμνιση με θειικό καΐσιο ή εντοπίζονται με την επίδραση περιοριστικών ενζύμων. Δεν είναι μέχρι στιγμής γνωστός με σαφήνεια ο ρόλος του δορυφορικού DNA<sup>72</sup>.

Το μινιδορυφορικό (minisatellite) DNA, περιλαμβάνει αλληλουχίες μετρίου μήκους (0.1-20kb), διεσπαρμένες στο γονιδίωμα, γνωστές και ως VNTR (Variable Number of Tandem Repeats). Όπως και στην περίπτωση του δορυφορικού DNA, δεν μεταγράφονται. Η λειτουργικότητα του υπερμεταβλητού μινιδορυφορικού DNA επίσης δεν είναι γνωστή, αν και έχει υποτεθεί ότι αποτελεί πιθανή θέση για ομόλογο ανασυνδυασμό σε ανθρώπινα κύτταρα. Επίσης, μια

ειδική κατηγορία μινιδορυφορικού DNA, το τελομερικό DNA προστατεύει τα άκρα των χρωμοσωμάτων από βλαπτικά ερεθίσματα και συμμετέχει στην αντιγραφή του DNA<sup>72</sup>.

Οι αλληλουχίες μικροδορυφορικού (microsatellite) DNA, γνωστές και ως SSLP (Simple Sequence Length Polymorphism) ή STRs (Short Tandem Repeats), αποτελούν σημαντικό τμήμα της οικογένειας αλληλουχιών επαναλαμβανόμενου DNA, που είναι διάσπαρτες στο γονιδίωμα<sup>72,73</sup>. Πρόκειται για επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες 1-6 ζευγών βάσεων, που ποικίλουν σε συνολικό μήκος αλλά συνήθως φτάνουν τα 100 ζεύγη βάσεων (συνήθης αριθμός επαναλήψεων είναι 15-30 φορές)<sup>74</sup>. Βρίσκονται κυρίως σε περιοχές που παρεμβάλλονται μεταξύ των γονιδίων ή σε εσωνικά ενδογονιδιακά τμήματα, όμως έχει αναφερθεί η παρουσία τους και σε μεταγραφόμενα εξωνικά τμήματα<sup>72</sup>. Γενικά παρουσιάζουν μια ομοιογενή κατανομή στο γονιδίωμα, αν και τείνουν να υποεκπροσωπούνται σε τελομερικές περιοχές<sup>73</sup>.

Από τις μονονουκλεοτιδικές αλληλουχίες, είναι πολύ συχνές οι ακολουθίες νουκλεοτιδίων αδενίνης (A) και θυμίνης (T), και μαζί απαρτίζουν 10Mb ή το 0.3% του πυρηνικού γονιδιώματος. Αντίθετα, αλληλουχίες από επαναλαμβανόμενα νουκλεοτίδια γουανίνης (G) και κυτοσίνης (C) είναι πολύ σπανιότερες. Στην περίπτωση επαναλαμβανόμενων δι-νουκλεοτιδίων, είναι πολύ συχνές οι ακολουθίες CA/GT, οι οποίες αποτελούν το 0,5% του γονιδιώματος (υπολογίζονται σε 35000-100000 αντίγραφα)<sup>73</sup> και είναι συχνά ποικίλου μήκους, παρουσιάζουν δηλαδή υψηλό βαθμό πολυμορφικότητας. Η υψηλή συχνότητα (CA)<sub>n</sub>, μπορεί να ερμηνευτεί από τη μεθυλίωση και επακόλουθη απαμίνωση των νουκλεοτιδίων κυτοσίνης αλληλουχιών (GC)<sub>n</sub>, που οδηγεί σε νουκλεοτίδια θυμίνης, δηλαδή σε αλληλουχίες (GT)<sub>n</sub> και στις συμπληρωματικές τους (CA)<sub>n</sub><sup>73,75</sup>. Σχετικά συχνές είναι επίσης οι αλληλουχίες CT/GA, οι οποίες απαντώνται ανά 50kb και αποτελούν το 0.2% του γονιδιώματος. Απεναντίας, οι αλληλουχίες από επαναλήψεις CG/GC είναι πολύ σπάνιες, επειδή το νουκλεοτίδιο κυτοσίνης συνδεδεμένο στο 3' άκρο με νουκλεοτίδιο γουανίνης υπόκειται σε μεθυλίωση και επακόλουθη απαμίνωση οδηγώντας σε νουκλεοτίδιο θυμίνης. Οι

επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες τρι- και τετρα- νουκλεοτιδίων είναι σχετικά σπάνιες αλλά υψηλού βαθμού πολυμορφικότητας<sup>72</sup>.

Ο λειτουργικός ρόλος του μικροδορυφορικού DNA δεν είναι απόλυτα γνωστός<sup>72,73</sup>. Οι μικροδορυφορικές αλληλουχίες έχουν θεωρηθεί μια μορφή "περιττού" (junk) DNA, δηλαδή χωρίς συγκεκριμένο προορισμό, πιθανώς μια λανθασμένη κατεύθυνση στον εξελικτικό βίο των γονιδίων, η διατήρηση της οποίας επιβαρύνει τους οργανισμούς<sup>73</sup>. Λόγω της επιβάρυνσης αυτής και της απώλειας λειτουργικότητας που προκαλείται στους οργανισμούς, ο ρόλος του μικροδορυφορικού DNA στο γονιδίωμα χαρακτηρίστηκε "εγωιστικός" (selfish)<sup>73,76</sup>. Ωστόσο, είναι πολύ πιθανό ότι για το μικροδορυφορικό DNA υπάρχει συγκεκριμένος ρόλος. Οι αλληλουχίες αυτές αποτελούν θέσεις υψηλής πιθανότητας μετάλλαξης και αυτό μπορεί να συμβάλει στο εξελικτικό δυναμικό των ειδών<sup>73</sup>. Οι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες CA/TG επιτρέπουν τη στερεοδιαμόρφωση του μορίου του DNA σε μορφή Z-DNA in vitro<sup>72</sup>. Ακόμη, σε ορισμένα είδη (όπως στο ποντίκι) βασικές αναπτυξιακές διαδικασίες, όπως ο καθορισμός του φύλου, μπορεί να επηρεάζονται από τις πολυμορφικές αλληλουχίες μικροδορυφορικού DNA<sup>77</sup>. Σε ειδικές περιπτώσεις, τρινουκλεοτιδικές αλληλουχίες (GAG) μπορεί να δώσουν μεταγραφικό προϊόν, ενώ άλλες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες μπορεί να χρησιμεύσουν ως θέσεις δέσμευσης πρωτεϊνών. Ο πιο σημαντικός όμως ρόλος του μικροδορυφορικού DNA πιθανώς αφορά τη μείωση του χρωμοσωμικού ομόλογου ανασυνδυασμού, λόγω του ότι οι μικροδορυφορικές αλληλουχίες δεν είναι τέλειες επαναλήψεις. Απεναντίας περιέχουν ατέλειες που δρουν ως φραγμός στο χρωμοσωμικό ανασυνδυασμό. Ενδεχομένως, σε περιπτώσεις νεοπλασιών του λεγόμενου μεταλλακτικού φαινοτύπου (mutator phenotype), όπου παρατηρείται αστάθεια του μικροδορυφορικού DNA (Microsatellite Instability, MI), να καταργούνται οι μηχανισμοί φραγμού και να επιτρέπεται εκτεταμένος ανασυνδυασμός του χρωμοσωμικού υλικού, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε ογκογονιδιακή ενεργοποίηση<sup>78</sup>. Ωστόσο, η γενετική αστάθεια που χαρακτηρίζει τις επαναλαμβανόμενες αυτές αλληλουχίες μπορεί να παίζει ρόλο και στην παθογένεια μη νεοπλασματικών νοσημάτων, ιδίως σε καταστάσεις που

ακολουθούν επικρατούσα κληρονομικότητα<sup>73</sup>. Έτσι, μεταλλάξεις (ανωμαλίες στο μήκος) μικροδορυφορικών αλληλουχιών έχουν περιγραφεί σε πάσχοντες από μυοτονική δυστροφία, σύνδρομο "εύθραυστου X" χρωμοσώματος, ή νευροεκφυλιστικά νοσήματα<sup>73</sup>. Πιστεύεται ότι η ίδια η επαναλαμβανόμενη αλληλουχία μπορεί να προδιαθέτει στη μετάλλαξη και μάλιστα σε βαθμό ανάλογο με το μήκος της, μια διαδικασία που έχει ονομαστεί "δυναμική μετάλλαξη" (dynamic mutation)<sup>73,79</sup>, ενώ ο παρατηρούμενος στο μικροδορυφορικό DNA ρυθμός μεταλλάξεων είναι κατά πολύ υψηλότερος του φυσιολογικού ( $10^{-6}$ /γονίδιο/γενεά<sup>72</sup>) και κυμαίνεται περίπου σε  $10^{-2}$ - $10^{-5}$ /γενεά<sup>73</sup>. Στην περίπτωση του συνδρόμου "εύθραυστου X" μετάλλαξη μπορεί να προκληθεί από μεθυλίωση τόσο της επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας, όσο και των παραπλήσιων περιοχών εκκίνησης μεταγραφής (promoters)<sup>80,81,82</sup>. Στην περίπτωση της μυοτονικής δυστροφίας πιθανώς παίζουν ρόλο διαταραχές της συγκρότησης νουκλεοσωμάτων στις περιοχές των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών<sup>83</sup>. Σε νευροεκφυλιστικές καταστάσεις, είναι πιθανή η αύξηση της έκφρασης πρωτεϊνών με υψηλή περιεκτικότητα γλουταμικού οξέος, ως συνέπεια της παρουσίας μακρών επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών<sup>84,85</sup>.

Διαταραχές της αντιγραφής μπορούν πιθανότατα να ερμηνεύσουν την προέλευση και ποικιλότητα των μικροδορυφορικών αλληλουχιών. Πιθανώς το μικροδορυφορικό DNA προέρχεται αρχικά από μεταλλάξεις πολυαδενινονουκλεοτιδίων στο 3' άκρο αλληλουχιών Alu<sup>75,86</sup>. Ακολούθως το μήκος μια μικροδορυφορικής αλληλουχίας μπορεί να διαφοροποιηθεί λόγω του φαινομένου της "ολίσθησης αλυσίδας" (strand slippage)<sup>72</sup>. Κατά το φαινόμενο αυτό, διαταράσσεται η σύζευξη των συμπληρωματικών αλυσίδων στις περιοχές επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών. Έτσι δημιουργείται μια περιοχή, γνωστή ως "φουσαλίδα" (bubble), που στερείται συμπληρωματικής αλληλουχίας. Αν αυτή βρίσκεται στη μητρική αλυσίδα (forward slippage) το αποτέλεσμα είναι απάλειψη βάσεων, ενώ αν βρίσκεται στη θυγατρική αλυσίδα (backward slippage) το αποτέλεσμα είναι προσθήκη βάσεων. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να παρατηρηθεί και σε μη αντιγραφόμενο DNA. Ωστόσο το αντιγραφόμενο DNA αποτελεί καλύτερο έδαφος για φαινόμενα ολίσθησης, που χαρακτηρίζονται

και "ολίσθηση πολυμεράσης". Έτσι παράγονται πολυμορφισμοί μήκους, που διαφέρουν κατά μικρό αριθμό επαναλήψεων κάθε φορά. Το φαινόμενο αυτό θεωρείται ως ένας από τους κύριους μηχανισμούς εξέλιξης του γονιδιώματος<sup>72,75</sup>.

Η "δυναμική μετάλλαξη" είναι πιθανότατα διαφορετική για αλληλουχίες μικρού και μεγάλου μήκους<sup>73</sup>. Συγκεκριμένα, μικρότερες σε μήκος επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες είναι λιγότερο επιρρεπείς σε ολίσθηση μεταγραφής. Αυτό αποδίδεται στο μήκος των τμημάτων Okazaki. Οι μικρές σε μήκος επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες το πιθανότερο είναι να έχουν μια μόνο διακοπή κατά αλληλόμορφο στη φάση πολυμερισμού, ενώ αντίθετα, στις μεγαλύτερες αλληλουχίες (>80 επαναλήψεις), μπορεί να υπάρχουν δύο διακοπές. Στην περίπτωση αυτή, δημιουργούνται τμήματα ελεύθερα και στα δύο άκρα, τα οποία μπορεί να ολισθήσουν ελεύθερα, οδηγώντας σε μαζική επέκταση<sup>87</sup>.

Χαρτογράφηση γονιδιώματος, γενετικοί δείκτες και περιεχόμενη πληροφορία (information content)

Ο στόχος της χαρτογράφησης του γονιδιώματος, είναι ο προσδιορισμός της συχνότητας διαχωρισμού με μειωτικό ανασυνδυασμό, δύο γενετικών τόπων (loci). Το "κλάσμα ανασυνδυασμού" (recombination fraction), για ένα ετερόζυγο ως προς δύο γονίδια άτομο (που για δύο γονίδια έχει κληρονομήσει διαφορετικό αλληλόμορφο από κάθε γονέα), ορίζεται ως το ποσοστό των απογόνων του που παρουσιάζουν συνδυασμό δύο διαφορετικών γονεϊκών αλληλομόρφων<sup>72</sup>. Αν οι δύο γενετικοί τόποι είναι εντοπισμένοι σε διαφορετικά χρωμοσώματα, αναμένεται κλάσμα ανασυνδυασμού 50%. Ωστόσο, αν εντοπίζονται στο ίδιο χρωμόσωμα (συνταϊνικοί τόποι), αναμένεται ανασυνδυασμός που προέρχεται από την ανταλλαγή γενετικού υλικού μεταξύ δύο εκ των τεσσάρων αδελφών χρωματίδων κατά τη σύναψη που παρατηρείται στην πρόφαση της μείωσης I. Οι θέσεις ανταλλαγής γενετικού υλικού είναι γνωστές ως χιάσματα (crossovers). Η πιθανότητα να διαχωριστούν δύο γενετικοί τόποι σε ένα χιάσμα, είναι αντίστροφα

ανάλογη με την απόσταση που τους χωρίζει επί του χρωμοσώματος. Έτσι, το κλάσμα ανασυνδυασμού δύο αλληλίων είναι μέτρο της απόστασης που χωρίζει τους αντίστοιχους γενετικούς τόπους<sup>72,88</sup>.

Μια ομάδα γενετικών τόπων που τοπογραφικά εντοπίζονται σε μικρή απόσταση μεταξύ τους, τείνουν να συνκληρονομούνται, αποτελώντας έναν απλότυπο (haplotype). Οι απλότυποι ορίζουν καθορισμένα χρωμοσωμικά τμήματα, των οποίων το γονιδιακό φορτίο μπορεί να αναγνωριστεί στον πληθυσμό. Ωστόσο, η "γενετική" απόσταση, που καθορίζεται από τα κλάσματα ανασυνδυασμού, δεν αντιστοιχεί απόλυτα στη φυσική απόσταση (επί των χρωμοσωμάτων). Δύο γενετικοί τόποι που ανασυνδυάζονται κατά 1%, ορίζεται ότι απέχουν επί του χρωμοσώματος 1centiMorgan (cM). Όμως, για αποστάσεις άνω των 5cM, παρατηρείται αυξανόμενη απόκλιση μεταξύ της γενετικής απόστασης και της απόστασης επί του χρωμοσώματος. Αυτό οφείλεται στο ότι το κλάσμα ανασυνδυασμού (που αντιστοιχεί στη γενετική απόσταση) δεν μπορεί να υπερβεί το 50%, ενώ η απόσταση επί του χρωμοσώματος μπορεί να υπερβεί τα 50cM.

Η μαθηματική σχέση μεταξύ κλάσματος ανασυνδυασμού και γενετικής απόστασης περιγράφεται από τη συνάρτηση χαρτογράφησης (mapping function). Η απλούστερη τέτοια συνάρτηση (Haldane), στηρίζεται στην παραδοχή ότι τα χιάσματα επισυμβαίνουν τυχαία κατά μήκος των χρωματίδων:

$$\omega = -1/2 \ln(1-2\theta),$$

όπου  $\omega$  είναι η απόσταση και  $\theta$  το κλάσμα ανασυνδυασμού. Ωστόσο, αυτό αποτελεί απλούστευση, δεδομένου ότι η παρουσία ενός χιάσματος εμποδίζει τη δημιουργία άλλου σε παραπλήσια θέση, κάτι που είναι γνωστό ως "φαινόμενο παρεμβολής" (interference). Επίσης, τα χιάσματα είναι πιο συχνά κατά τη μείωση στο ομογαμετικό φύλο (γυναίκες). Με βάση το συνολικό αριθμό χιασμάτων κατά κύτταρο (περίπου 49 για κύτταρα του ανδρικού φύλου), και με δεδομένο ότι κάθε χιάσμα οδηγεί σε ανασυνδυασμό με πιθανότητα 50% ενώ το μέγεθος του γονιδιώματος είναι 3000Mb, έχει υπολογιστεί ότι στους άνδρες 1cM αντιστοιχεί σε 1.13Mb, ενώ στις γυναίκες σε 0.67Mb. Ο μέσος

όρος και των δύο φύλων είναι 0.9Mb. Ωστόσο, η έκταση του ανασυνδυασμού ποικίλει κατά περιοχές των χρωμοσωμάτων. Γενικά, ο ανασυνδυασμός είναι συχνότερος στη τελομερικές σε σχέση με τις κεντρομερικές περιοχές, ιδίως στους άνδρες.

Η δημιουργία γονιδιακών χαρτών, όπου υπάρχει απευθείας αναφορά στη θέση και την απόσταση μεταξύ γονιδίων, παρότι έχει επιτευχθεί για τη *Drosophila* ή για μύκητες, είναι πολύ δύσκολο να επιτευχθεί για το ανθρώπινο γονιδίωμα. Αυτό οφείλεται στο ότι η δημιουργία τέτοιων χαρτών στηρίζεται στη ταυτόχρονη μελέτη δύο γονιδίων και είναι σπάνιες οι περιπτώσεις οικογενειών με κληρονομικότητα σε δύο γενετικές ασθένειες. Έτσι, για τη χαρτογράφηση του ανθρώπινου γονιδιώματος χρησιμοποιούνται γενετικοί δείκτες (genetic markers). Πρόκειται για γενετικούς χαρακτήρες που ακολουθούν τη μεντέλεια κληρονομικότητα και επιπλέον έχουν αρκετά υψηλό βαθμό πολυμορφισμού ώστε η πιθανότητα ένα τυχαία επιλεγμένο άτομο να είναι ετερόζυγο ως προς το συγκεκριμένο χαρακτήρα, να είναι αντίστοιχα υψηλή. Αυτή είναι και η σπουδαιότερη ιδιότητα ενός γενετικού δείκτη, ενώ σημαντικό είναι επίσης να μπορεί ο δείκτης να μελετηθεί με σχετικά εύκολες μεθόδους και από προσιτά βιολογικά υλικά, καθώς και να είναι δυνατή η ακριβής και εύκολη αξιολόγησή του. Το "περιεχόμενο πληροφορίας" (Polymorphic Information Content- PIC), ενός πολυμορφικού δείκτη εντοπιζόμενου σε αυτοσωματικό χρωμόσωμα, δίνεται από τον τύπο:

όπου, αν ένας γενετικός δείκτης έχει  
πολλαπλά αλληλομόρφοι (1,2,3,...) στον  
πληθυσμό, με συχνότητες  $p_1, p_2, p_3, \dots$ , τότε  $p_i$   
είναι η συχνότητα του  $i$ ου αλληλομόρφου. Για δείκτες εντοπιζόμενους στο χρωμόσωμα X, το PIC  
ισούται με το ποσοστό ετεροζυγωτίας. Ένας δείκτης με  $PIC=0$ , δεν είναι ποτέ αξιοποιήσιμος  
πληροφοριακά (informative), ενώ αν  $PIC=1$ , είναι πάντα αξιοποιήσιμος<sup>72</sup>.

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 - \sum_{i=1}^n \sum_{j=i+1}^n 2p_i p_j$$



Αρχικά, χρησιμοποιήθηκαν ως δείκτες φαινοτυπικά χαρακτηριστικά, όπως ομάδες αίματος, διαφορές ηλεκτροφορητικής κινητικότητας πρωτεϊνών του ορού ή αντιγόνα του συστήματος HLA. Σύντομα όμως, επικράτησε η χρήση γονοτυπικών χαρακτηριστικών, όπως πολυμορφικών αλληλουχιών DNA, ως γενετικών δεικτών, η οποία πλεονεκτεί κατά το ότι είναι δυνατή η απευθείας χρωμοσωμική εντόπιση του γενετικού χαρακτηριστικού με τη χρήση τεχνικών όπως η FISH (Fluorescent In Situ Hybridization). Η πρώτη γενεά γενετικών δεικτών DNA ήταν τα RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms), που μπορούσαν να ταυτοποιηθούν με υβριδισμό με τεχνική Southern Blotting. Η εφαρμογή τέτοιων τεχνικών ήταν δαπανηρή και απαιτούσε πολύ χρόνο και μεγάλη ποσότητα DNA. Ωστόσο, το κύριο μειονέκτημα αυτής της γενεάς δεικτών ήταν το περιορισμένο ποσό πληροφορίας (PIC). Τα RFLPs έχουν μόνο δύο αλληλόμορφα: η θέση επίδρασης ενός περιοριστικού ενζύμου μπορεί να υπάρχει ή να μην υπάρχει. Στην καλύτερη περίπτωση, όταν τα δύο αλληλόμορφα μιας θέσης RFLP έχουν την ίδια συχνότητα ( $p=0.5$ ), το PIC είναι 0.375, αλλά δεν μπορεί να ξεπεράσει την τιμή αυτή, για δείκτες που βρίσκονται σε αυτοσωματικά χρωμοσώματα. Έτσι, άρχισαν να χρησιμοποιούνται οι δείκτες μιτιδορυφορικού DNA (VNTRs), που έχουν το πλεονέκτημα ότι διαθέτουν μεγάλο αριθμό αλληλομόρφων και αντίστοιχα υψηλή τιμή PIC. Αυτό διευκόλυνε πολύ τη διενέργεια ερευνών γενετικής σύνδεσης (genetic linkage), παρέμεναν όμως τα προβλήματα της δυσχέρειας στην εκτέλεση Southern Blotting. Η έλευση της PCR έδωσε τη δυνατότητα για γρήγορη και εύκολη ανάλυση της γενετικής σύνδεσης με τη χρήση δεικτών. Η PCR έχει εύκολη εφαρμογή στην ενίσχυση αλληλουχιών που περιλαμβάνουν και τη θέση επίδρασης του περιοριστικού ενζύμου (restriction site), είναι όμως δύσκολο να ενισχυθούν μακρές αλληλουχίες βάσεων, όπως αυτές του μιτιδορυφορικού DNA. Οι τελευταίες έχουν το πρόσθετο μειονέκτημα της ανισομερούς κατανομής στο γονιδίωμα, δεδομένου ότι παρουσιάζουν συρροή σε υποτελομερικές (subtelomeric) περιοχές των χρωμοσωμάτων. Έτσι, έδωσαν τη θέση τους στους γενετικούς δείκτες μικροδορυφορικού DNA89. Το ανθρώπινο γονιδίωμα υπολογίζεται ότι περιλαμβάνει 12000

περίπου επαναλαμβανόμενες δινουκλεοτιδικές αλληλουχίες μικροδορυφορικού DNA (dC-dA)<sub>n</sub>, με PIC>0.573. Επειδή ωστόσο οι δείκτες μικροδορυφορικού DNA τείνουν να υποεκπροσωπούνται σε τελομερικές περιοχές, η χρήση μινιδορυφορικών δεικτών χρησιμοποιείται μερικές φορές συμπληρωματικά<sup>72</sup>.

### Αλυσιδωτή αντίδραση με πολυμεράση (PCR)

Η PCR έχει καθιερωθεί ως η μια από τις ευρύτερα χρησιμοποιούμενες τεχνικές στη Μοριακή Βιολογία, αφού είναι ταχεία, φτηνή και σχετικά απλή και μπορεί από ελάχιστη ποσότητα μητρικού DNA να αποδώσει in vitro προϊόν DNA της τάξης των μικρογραμμαρίων (από 50ng μητρικού DNA μπορεί να προκύψουν ως 1μg DNA προϊόντος σε 25-35 κύκλους). Η τεχνική περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Khorana και συνεργάτες (1971) αλλά ολοκληρώθηκε σε τεχνικό επίπεδο από τον Mullis και συνεργάτες (1987)<sup>90</sup>. Αυτό που κατέστησε δυνατή την αντίδραση είναι η ευρεία παραγωγή θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης<sup>72</sup>.

Ως υπόστρωμα της αντίδρασης μπορεί να χρησιμοποιηθεί γενωμικό DNA (σε ακραίες περιπτώσεις από ένα μόνο κύτταρο ή ακόμη και τμήματα χρωμοσωμάτων), RNA (από λίγα μόνο κύτταρα), DNA από αρχειακά δείγματα, κλωνοποιημένο DNA ή ακόμη και προϊόντα της ίδιας της αντίδρασης. Η ποιότητα του μητρικού DNA δεν απαιτείται να είναι πολύ υψηλή. Για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση, απαιτούνται, εκτός από το υπόστρωμα, θερμοανθεκτική πολυμεράση, εκκινητές (primers), δηλαδή αλληλουχίες DNA μέσω των οποίων το ένζυμο κατευθύνεται σε συγκεκριμένη θέση στο μητρικό DNA, δεοξυριβονουκλεοτίδια, και διάλυμα αντίδρασης που περιέχει μαγνήσιο. Τα δεοξυριβονουκλεοτίδια και οι εκκινητές πρέπει να βρίσκονται σε μεγάλη περίσσεια, ώστε να είναι δυνατή η επανάληψη των τριών σταδίων της αντίδρασης (αποδιάταξης, πρόσδεσης και πολυμερισμού) για αρκετούς κύκλους.

Από την αντίδραση παράγονται αρχικά μεγάλες σχετικά αλληλουχίες με αφετηρία κάθε εκκινητή. Όταν όμως τα προϊόντα του πρώτου κύκλου χρησιμεύσουν ως υπόστρωμα για τους επόμενους, το

μήκος του νέου προϊόντος περιορίζεται στην απόσταση μεταξύ των δύο εκκινητών. Το ποσό της συγκεκριμένης αυτής αλληλουχίας αυξάνει σχεδόν εκθετικά καθώς η αντίδραση επαναλαμβάνεται, ενώ το ποσό των μεγαλύτερου μήκους αλληλουχιών αυξάνει μόνο γραμμικά. Έτσι, μετά από αρκετούς κύκλους, το κύριο προϊόν της αντίδρασης θα είναι η αλληλουχία που οριοθετείται από τους δύο εκκινητές και περιλαμβάνει τους ίδιους. Το ποσό του παραγόμενου προϊόντος αυξάνει εκθετικά μέχρι ενός ορίου, οπότε φτάνει σε επίπεδο ισορροπίας (plateau), αφού εξαντλούνται οι δομικές μονάδες (dNTPs) είτε αδρανοποιείται το ένζυμο λόγω των επανειλημμένων εκθέσεων σε υψηλές θερμοκρασίες<sup>90</sup>.

Έχουν περιγραφτεί πολλές παραλλαγές της βασικής μεθόδου, όπως η "DOP-PCR" (με χρήση "εκφυλισμένων" εκκινητών, για τη λήψη πολλαπλών προϊόντων), "linker-primed PCR" (για την ενίσχυση όλων των αλληλουχιών σε ένα ετερογενές μείγμα DNA), "inverse" και "bubble linker" PCR (για την ενίσχυση αλληλουχίας που βρίσκεται δίπλα σε γνωστή αλληλουχία DNA) και "asymmetric" PCR (για την παραγωγή προϊόντος μονής αλυσού)<sup>72,90</sup>.

Ανάμεσα στις εφαρμογές της PCR περιλαμβάνονται η διαγνωστική προσπέλαση σε γενετικά νοσήματα και καρκίνο, ο έλεγχος της αποτελεσματικότητας της θεραπείας νεοπλασματικών νοσημάτων, η ταχεία ανίχνευση μικροβίων και ιών και η τυποποίηση αντιγόνων ιστοσυμβατότητας. Παράλληλα γίνεται ευρεία χρήση της τεχνικής στην Ιατροδικαστική για την ταυτοποίηση DNA σε διάφορα βιολογικά δείγματα<sup>91</sup>. Ίσως όμως ο σπουδαιότερος ρόλος της PCR είναι η χρήση της για ερευνητικούς σκοπούς στη Μοριακή Βιολογία.

## PCR και μικροδορυφορικό DNA

Η εφαρμογή της PCR σε γενετικούς δείκτες μικροδορυφορικού DNA, δεν έχει ουσιαστικές διαφορές από τις άλλες τυποποιημένες εφαρμογές PCR. Υπάρχουν ωστόσο ορισμένες ιδιαιτερότητες που πρέπει να ληφθούν υπόψη<sup>73</sup>:

A. Στην περίπτωση που το DNA που ενισχύεται είναι εν μέρει αποδομημένο, όπως π.χ. το DNA από ιστούς που έχουν διατηρηθεί σε block παραφίνης, υπάρχει περιορισμός στο μέγεθος των αλληλουχιών που μπορούν να ενισχυθούν (400 ζεύγη βάσεων για block παραφίνης)<sup>92</sup>. Στις περιπτώσεις αυτές πολύ συχνά απαιτείται εμπειρικός καθορισμός των συνθηκών της αντίδρασης που πολλές φορές διαφέρουν από αυτές που αναφέρονται στη βιβλιογραφία.

B. Απαιτείται προσοχή στη σχεδίαση των εκκινητών (primers) για να μην υπάρξει συμπληρωματικότητα ή ομοιότητα δευτεροταγούς δομής προς αλληλουχίες Alu που συχνά εντοπίζονται δίπλα στις αλληλουχίες μικροδορυφορικού DNA που ενισχύονται. Βιβλιογραφικά προτείνεται η χρήση αλληλουχιών 20 περίπου βάσεων με περιεκτικότητα σε GC 35-55%<sup>90</sup>.

Γ. Η συγκέντρωση δεοξυνουκλεοτιδίων πρέπει να είναι χαμηλότερη από τη συνηθισμένη (200mM), λόγω της μεγαλύτερης ευαισθησίας και πιστότητας που απαιτείται.

Δ. Η πρόσδεση των εκκινητών σε άλλες πλην των επιθυμητών αλληλουχίες μπορεί να οδηγήσει σε ενίσχυση στις αντίστοιχες θέσεις. Αυτό απεικονίζεται με πολλαπλές ηλεκτροφορητικές ζώνες, που δυσχεραίνουν τη διαγνωστική των αλληλομόρφων που αποτελούν τον καθαυτό στόχο της PCR.

Έτσι, είναι σημαντικό οι θερμοκρασίες πρόσδεσης (annealing), να είναι όσο το δυνατό υψηλότερες και αντίστοιχα το χρονικό διάστημα πολυμερισμού (extension) να είναι όσο το δυνατό μικρότερο, λαμβάνοντας υπόψη το ρυθμό πολυμερισμού της Taq DNA polymerase (35-100 νουκλεοτίδια/sec)<sup>93</sup> και το μέγεθος της αλληλουχίας που θα ενισχυθεί. Για την αύξηση της ειδικότητας της αντίδρασης μπορεί να χρησιμοποιηθούν ειδικές τεχνικές, όπως η "hot-start" PCR, η "heat-soaked" PCR και η "touchdown" PCR.

Ε. Ένα άλλο συχνό διαγνωστικό πρόβλημα στην ανάγνωση γέλης ηλεκτροφόρησης, είναι η παρουσία πρόσθετων ζωνών (stutter bands), εκτός από την καθαυτό ζώνη που αντιστοιχεί στη μικροδορυφορική αλληλουχία που ενισχύεται, οι οποίες διαφέρουν από την αλληλουχία αυτή κατά 1 ή 2 ζεύγη βάσεων. Ο κύριος μηχανισμός παραγωγής τέτοιων ζωνών είναι η "ολίσθηση αλυσίδας" (slipped strand mispairing). Άλλοι μηχανισμοί είναι η αποτυχία ανάγνωσης όλης της

επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας από την πολυμεράση και η προσθήκη νουκλεοτιδίων στο 3' άκρο της δημιουργούμενης αλληλουχίας από την πολυμεράση. Πιο επιρρεπείς στην "ολίσθηση αλυσίδας" είναι οι δινουκλεοτιδικές από τις τρι- και τετρανουκλεοτιδικές αλληλουχίες. Στ.Με τη χρήση μικρού όγκου αντίδρασης (10μl) διευκολύνεται η διάχυση θερμότητας και μειώνεται η θερμοκρασιακή υστέρηση (thermal lag) μεταξύ των διαφόρων φάσεων της αντίδρασης.

Αξιοποίηση του μικροδορυφορικού DNA για την ανάλυση νεοπλασματικών και μη νεοπλασματικών καταστάσεων

Η ευκολία ενίσχυσης με PCR, η ευρεία κατανομή στο γονιδίωμα, η μεντέλεια συνεπικρατούσα κληρονομικότητα και ο υψηλός βαθμός πολυμορφισμού που χαρακτηρίζουν τους μικροδορυφορικούς δείκτες, τους καθιστούν ιδανικούς για μελέτες γενετικής σύνδεσης (linkage analysis) αλλά και για ιατροδικαστικές εφαρμογές (ταυτοποίηση ατόμων με την αξιοποίηση του DNA που προέρχεται από διάφορα βιολογικά υλικά)<sup>72,73</sup>.

Ένα άλλο ευρύ πεδίο εφαρμογής είναι η ανάλυση αλληλομόρφων στα 23 χρωμοσώματα για ανίχνευση περιοχών ενδιάμεσης απάλειψης (allelotyping). Η πρώτη τέτοιας φύσης γενοτυπική ανάλυση πραγματοποιήθηκε από τον Vogelstein, για τον καρκίνο του παχέος εντέρου<sup>94,95</sup>.

Ογκο-κατασταλτικά γονίδια και απώλεια της ετεροζυγωτίας (LOH)

Στη διαδικασία της νεοπλασματικής εξαλλαγής εμπλέκονται κυρίως τρεις τύποι γονιδίων<sup>72</sup>: τα πρωτοογκογονίδια (protooncogenes), τα ογκο-κατασταλτικά γονίδια (tumor suppressor genes) και τα μεταλλακτικά γονίδια (mutator genes). Στα πρωτο-ογκογονίδια, η ογκογόνος δράση είναι κυρίαρχο χαρακτηριστικό. Αρκεί ένα αλληλίο να μετατραπεί σε παθολογικό για να επιτραπεί η νεοπλαστική εξαλλαγή. Στα ογκο-κατασταλτικά γονίδια ή αντι-ογκογονίδια, η ογκογόνος δράση

είναι υπολειπόμενο χαρακτηριστικό, ώστε για την έκφρασή του απαιτείται και τα 2 αλληλία να έχουν μετατραπεί σε παθολογικά. Στην περίπτωση που σε όλα τα κύτταρα υπάρχει ετεροζυγωτία για ένα ογκο-κατασταλτικό γονίδιο, αν σε μια ομάδα κυττάρων το φυσιολογικό κυρίαρχο αλληλίο υποστεί βλάβη (μετάπτωση στην υπολειπόμενη μορφή οπότε προκύπτει ομοζυγωτία) ή απωλεσθεί (μετάπτωση σε ημιζυγωτία), παραμένει το παθολογικό υπολειπόμενο και ανοίγει ο δρόμος για τη νεοπλαστική εξαλλαγή. Το φαινόμενο αυτό χαρακτηρίζεται απώλεια ετεροζυγωτίας (Loss of Heterozygosity-LOH). Τα μεταλλακτικά γονίδια είναι υπεύθυνα για την ακεραιότητα του γονιδιώματος και την αξιοπιστία της μεταβίβασης της πληροφορίας. Απώλεια λειτουργικότητας των γονιδίων αυτών ευνοεί την πρόκληση σφαλμάτων κατά την αντιγραφή, που μπορεί να αφορούν τόσο πρωτοογκογονίδια όσο και ογκο-κατασταλτικά γονίδια.

Το πρώτο ογκο-κατασταλτικό γονίδιο που απομονώθηκε ήταν αυτό του ρετινοβλαστώματος (Rb, 13q14.3). Το ρετινοβλάστωμα είναι ένας δυνητικά θανατηφόρος όγκος του αμφιβληστροειδή που προσβάλλει άτομα παιδικής ηλικίας 96. Η νεοπλασία μπορεί να οφείλεται σε νέα μετάλλαξη (σποραδική μορφή, ετερόπλευρη και μη κληρονομούμενη) ή σε κληρονομούμενη μετάλλαξη (οικογενής μορφή, συνήθως αμφοτερόπλευρη και κληρονομούμενη με αυτοσωμικό επικρατούντα τύπο και διεισδυτικότητα περίπου 80%). Το γονίδιο του ρετινοβλαστώματος (RB1), εντοπίστηκε στο μακρό σκέλος του χρωμοσώματος 13 (13q), όταν διαπιστώθηκε ότι 5% περίπου των ασθενών με οικογενές ρετινοβλάστωμα είχαν απάλειψη περιοχής στο σκέλος αυτό. Λεπτομερής καρυοτυπική μελέτη οδήγησε στο συμπέρασμα ότι το γονίδιο εντοπίζεται στην περιοχή 13q14, γεγονός που επιβεβαιώθηκε με έρευνες γενετικής σύνδεσης με το γονίδιο της εστεράσης D, που ήταν γνωστό ότι εντοπίζεται στην περιοχή 13q14. Με τη χρήση περιοριστικών ενζύμων στη μελέτη πολυμορφικών ακολουθιών DNA (RFLP), διαπιστώθηκε ότι στις περισσότερες περιπτώσεις ρετινοβλαστώματος υπήρχε απώλεια ετεροζυγωτίας (LOH) για πολυμορφικές ακολουθίες στη θέση 13q14, εύρημα συμβατό με την ύπαρξη ογκο-κατασταλτικού γονιδίου στη θέση αυτή. Στη σποραδική μορφή, τα κύτταρα είναι ομόζυγα για το φυσιολογικό κυρίαρχο αλληλίο και πρέπει να

χαθεί πρώτα το ένα αλληλόμορφο ("1<sup>ο</sup> χτύπημα") και μετά και το άλλο ("2<sup>ο</sup> χτύπημα"), για να εκδηλωθεί η νεοπλασία. Αυτή είναι η "θεωρία των 2 χτυπημάτων" του Alfred Knudson. [Εικ. 4]. Στην οικογενή όμως μορφή, τα κύτταρα είναι ήδη ετερόζυγα (έχει γίνει το "1<sup>ο</sup> χτύπημα" και έχει μεταφερθεί κληρονομικά) ώστε αρκεί ένα μόνο χτύπημα για να χαθεί η ετεροζυγωτία και να εκδηλωθεί η νόσος. Να σημειωθεί ότι άτομα με οικογενή μορφή ρετινοβλαστώματος είναι επιρρεπή στην ανάπτυξη και άλλων νεοπλασιών, όπως οστεοσαρκωμάτων και νεοπλασιών μαστού και πνεύμονα. Το γονίδιο RB1 έγινε το αρχέτυπο των ογκο-κατασταλτικών γονιδίων και η μεθοδολογία που οδήγησε στην ανακάλυψή του εφαρμόζεται στην έρευνα για την ανακάλυψη και άλλων παρόμοιων γονιδίων<sup>72,95</sup>.

Βέβαια, δεν εκδηλώνεται καρκίνος σε κάθε κύτταρο που χάνει την ετεροζυγωτία για ένα ογκο-κατασταλτικό γονίδιο. Η συχνότητα μεταλλάξεων είναι περίπου 10<sup>-6</sup>/γονίδιο/γενεά. Υπάρχουν 10<sup>14</sup> κύτταρα στο σώμα και για να γίνει ένα κύτταρο καρκινικό χρειάζονται 5-6 μεταλλάξεις. Άρα η θεωρητική πιθανότητα να γίνει ένα κύτταρο καρκινικό είναι 10<sup>-22</sup>. Όμως, στην πράξη, ο καρκίνος είναι συχνή σχετικά νόσος γιατί υπάρχουν μεταλλάξεις που αυξάνουν τον κυτταρικό πληθυσμό και άλλες που μεταβάλλουν τη συχνότητα των μεταλλάξεων<sup>72</sup>.

#### Αξιολόγηση της παρουσίας απώλειας ετεροζυγωτίας

Ένα δείγμα ιστού που λαμβάνεται με χειρουργική εξαίρεση περιλαμβάνει καταρχάς κύτταρα από τον ιστό που αποτελεί ερευνητικό ή διαγνωστικό στόχο. Ωστόσο, είναι αναπόφευκτη η παρουσία στο δείγμα και ιστικών στοιχείων που δεν αποτελούν άμεσο στόχο της χειρουργικής εκτομής. Τέτοια στοιχεία είναι αίμα, φυσιολογικός συνδετικός ιστός που βρίσκεται εντός του δείγματος αλλά και γειτονικοί φυσιολογικοί ιστοί. Έτσι το DNA που θα απομονωθεί από το ιστικό δείγμα, θα προέρχεται τόσο από τα κύτταρα της βλάβης όσο και από άλλα κύτταρα, μη σχετιζόμενα άμεσα με τη βλάβη.

Η πρόοδος των επαναλήψεων PCR οδηγεί σε ενίσχυση όλων των μορφών των αλληλομόρφων ενός δείκτη μικροδορυφορικού DNA, που υπάρχουν στο εξεταζόμενο δείγμα. Στην περίπτωση που υπάρχει απώλεια ετεροζυγωτίας στον ιστό στόχο, το αλληλόμορφο που έχει απαλειφτεί μπορεί να υπάρχει σε μικρές ποσότητες στα φυσιολογικά κύτταρα που εξαιρέθηκαν μαζί με τη βλάβη. Έτσι, αν ο αριθμός των επαναλήψεων της αντίδρασης είναι υψηλός (στην πράξη άνω των 30 επαναλήψεων), θα παραχθεί ικανή ποσότητα και του αλληλομόρφου που έχει απαλειφτεί. Στην περίπτωση αυτή είναι δυσχερής ή αδύνατη η διάγνωση της απώλειας της ετεροζυγωτίας. Έτσι, προκειμένου να εντοπιστεί η απάλειψη του ενός αλληλομόρφου, πρέπει η αντίδραση να διακοπεί ενώ βρίσκεται ακόμη στη λογαριθμική φάση ανόδου<sup>90</sup>, δηλαδή όταν η διαφορά στην ποσότητα ανάμεσα στο αλληλόμορφο που έχει διατηρηθεί και σε αυτό που έχει εξαλειφτεί στον ιστό στόχο αλλά παραμένει σε γειτονικούς φυσιολογικούς ιστούς, είναι σημαντική και αναγνωρίσιμη. Συγχρόνως βέβαια, δεν θα πρέπει να γίνει πρόωμη διακοπή της αντίδρασης, ώστε να παραχθούν και ικανές ποσότητες προϊόντος. Στην πράξη, για τη διαπίστωση LOH στο εξεταζόμενο δείγμα απαιτούνται περίπου 30 κύκλοι επαναλήψεων της PCR. Ως προς τις αναπόφευκτες προσμείξεις ιστών στο δείγμα που δεν αποτελούν στόχο της ερευνητικής προσπάθειας, αναφέρεται ότι για να μπορεί να διαπιστωθεί η παρουσία LOH πρέπει αυτές να μην υπερβαίνουν το 70% της μάζας του δείγματος. Αναφέρεται ωστόσο διάγνωση LOH ακόμη και μόνο με 10% παρουσία του ιστού-στόχου στο δείγμα<sup>73</sup>.

Ένα άλλο σημείο που πρέπει να ληφθεί υπόψη στη διαγνωστική της LOH είναι τα κριτήρια βάσει των οποίων θεωρείται μια δεδομένη μορφολογία στις ταινίες ηλεκτροφόρησης του PCR προϊόντος ως περίπτωση LOH ή ως εξασθένιση του ενός αλληλομόρφου εντός φυσιολογικών ορίων. Αυτή μπορεί να αποδοθεί σε artifact της αντίδρασης της χρώσης με AgNO<sub>3</sub> αλλά και στο γεγονός ότι κάποιου βαθμού υποενίσχυση σε αλληλόμορφα μεγαλύτερου μεγέθους μπορεί να παρατηρηθεί, αποδιδόμενη στο ότι η διαδικασία πολυμερισμού (extension) ολοκληρώνεται ταχύτερα στις μικρότερες αλληλουχίες<sup>90</sup>. Πέρα από την αδρή οπτική εκτίμηση, πιο αντικειμενική μέθοδος είναι



ο έλεγχος της πηκτής πολυακρυλαμιδίου με σύστημα ανάλυσης εικόνας και η βαθμολόγηση της οπτικής πυκνότητας σε κάθε ηλεκτροφορητική ταινία<sup>73</sup>. Με τον τρόπο αυτό μπορεί να θεσπιστεί ένα ποσοτικό κριτήριο βάσει του οποίου η σχετική εξασθένιση της ηλεκτροφορητικής ταινίας ενός αλληλομόρφου θεωρείται ως περίπτωση LOH ή όχι.

Γενικά, οι διαγνωστικές μέθοδοι που εφαρμόζονται στα προϊόντα της PCR διακρίνονται σε ραδιενεργές και μη<sup>73</sup>. Οι ραδιενεργές θεωρούνται γενικά πιο αξιόπιστες αλλά και δυσκολότερες στην εφαρμογή και στηρίζονται είτε στην ενσωμάτωση ενός ραδιενεργού τριφωσφορικού δεοξυριβονουκλεοσιδίου κατά τη διάρκεια των κύκλων της αντίδρασης (internal labeling) είτε στη χρήση ενός ραδιενεργού εκκινητή στο μείγμα της αντίδρασης (end labeling). Τα προϊόντα ηλεκτροφορούνται και ακολουθεί αυτοραδιογραφία. Οι μη ραδιενεργές μέθοδοι περιλαμβάνουν το βρωμιούχο αιθίδιο (εύκολο στην εφαρμογή αλλά μειωμένης ευαισθησίας, αφού μπορεί να ανιχνεύσει ποσότητα DNA μεγαλύτερη από 10ng), το νιτρικό άργυρο (πιο ευαίσθητη μέθοδος από το αιθίδιο αλλά με προβλήματα στη διάκριση από τη χρώση του υποστρώματος και μη γραμμική πρόσδεση αργύρου στο DNA) και το φθορισμό. Με την τελευταία μέθοδο και με τη χρήση χρωματικού κώδικα είναι δυνατή η αυτοματοποιημένη ανάλυση αλληλουχιών DNA (sequencing) με μεγάλη ακρίβεια.

Καρκίνος μικροδορυφορικές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες και πιστότητα αντιγραφής DNA  
Όπως είναι γνωστό, η πιστότητα της διαδικασίας αντιγραφής του DNA, στηρίζεται σε τρεις ασφαλιστικές δικλείδες<sup>97</sup>: Η πρώτη είναι η διπλοειδική οργάνωση του γονιδιώματος. Ακόμη και αν ένα λάθος στην αντιγραφή οδηγήσει σε αδρανοποίηση ενός αλληλομόρφου, παραμένει το δεύτερο για να διατηρηθεί η λειτουργικότητα. Η δεύτερη είναι η ικανότητα του γονιδιώματος να αποσβένει μεγάλο μέρος των βλαπτικών επιδράσεων, δεδομένου ότι αυτές μπορεί να αφορούν περιοχές αδρανείς μεταγραφικά. Η τρίτη δικλείδα είναι η αντοχή στις μεταλλάξεις που παρουσιάζουν τα γονίδια, αφού για να επηρεάσει την πρωτεϊνική λειτουργικότητα μια μετάλλαξη

πρέπει να αφορά σε μια συγκεκριμένη περιοχή της αλληλουχίας αμινοξέων. Η τελευταία παρατήρηση δεν αφορά τις μεταλλάξεις τύπου "πλαισίου" (frameshift mutations), στις οποίες διαταράσσεται όλη η αλληλουχία αμινοξέων από το σημείο της μετάλλαξης και κάτω. Για την αντιμετώπιση αυτών των τελευταίων και πιο απειλητικών για τη λειτουργική ακεραιότητα του γονιδιώματος μεταλλάξεων, οι οργανισμοί ανέπτυξαν το σύστημα επιδιόρθωσης σφαλμάτων (mismatch repair, MMR) του DNA<sup>99,99</sup>. Πρόκειται για ένα σύστημα διόρθωσης σφαλμάτων μετά τον πολυμερισμό του DNA. Προηγούνται δύο άλλοι μηχανισμοί διατήρησης της πιστότητας, δηλαδή η συμπληρωματικότητα των βάσεων και η δραστηριότητα εξωνουκλεάσης (proofreading), που διαθέτουν ορισμένες πολυμεράσες. Έτσι, τα σφάλματα που διαφεύγουν από τους παραπάνω δύο μηχανισμούς, διορθώνονται από το σύστημα MMR. Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί 6 γονίδια του συστήματος MMR ενεργά στον άνθρωπο, τα hMSH2, hMSH6, hMSH3, hMLH1, hPMS1 και hPMS2), ομόλογα των βακτηριδιακών γονιδίων MutS και MutL [Εικ. 5].

Παρατηρήθηκε για πρώτη φορά το 1993 στο μη σχετιζόμενο με πολύποδες καρκίνο του παχέος εντέρου (HNPCC), μια κατάσταση κληρονομούμενη με τον επικρατούντα χαρακτήρα με προδιάθεση στην ανάπτυξη νεοπλασιών ενδομητρίου και παχέος εντέρου, ότι υπήρχε παρουσία πολλαπλών αλληλομόρφων σε αλληλουχίες μικροδορυφορικού DNA διάσπαρτες στο γονιδίωμα<sup>100</sup>. Το φαινόμενο αυτό, γνωστό ως "αστάθεια μικροδορυφορικού DNA" (Microsatellite Instability, MI), που έχει από τότε παρατηρηθεί σε πολλές οικογενείς και σποραδικές νεοπλασίες του ανθρώπου<sup>101</sup>, αποτέλεσε την πρώτη πειραματική τεκμηρίωση της παρουσίας μεταλλακτικού φαινοτύπου του καρκίνου<sup>97</sup>.

### Γική ογκογόνος δράση και LOH

Η δυνατότητα πρόκλησης γενετικών βλαβών στο ανθρώπινο γονιδίωμα έχει αποδειχτεί για πολλούς ιούς. Μεταξύ αυτών περιλαμβάνονται ο ανθρώπινος ιός των θηλωμάτων (HPV)<sup>102</sup>, ο

ιός του απλού έρπητα (HSV)103, ο ανθρώπινος κυτταρομεγαλοϊός (CMV)104 και ο ιός Epstein-Barr (EBV)105. Οι τελευταίοι 3 ιοί ανήκουν στην ευρύτερη οικογένεια των ερπητοϊών. Για όλους τους παραπάνω ιούς έχει επιχειρηθεί η διερεύνηση της σχέσης τους με την ανάπτυξη πτερυγίου. Αναφέρεται ωστόσο κάποιου βαθμού συσχέτιση, όπως έχει προαναφερθεί, μόνο για τους 3 πρώτους (HSV, CMV και HPV)51,52.

Υπάρχουν σοβαρές ενδείξεις ότι ο HSV εμπλέκεται στη διαδικασία της πολυσταδιακής καρκινογένεσης103. Έχει επίσης αποδειχτεί ότι σε κύτταρα τρωκτικών ο ιός μπορεί να προκαλέσει τόσο σημειακές μεταλλάξεις όσο και ευρύτερες γονιδιακές ανακατατάξεις103. Έχει αποδειχτεί ότι μπορεί να επαυξήσει τη δράση χημικών καρκινογόνων μέσω ενίσχυσης της έκφρασης ορισμένων κυτταρικών πρωτοογκογονιδίων και αδρονποίησης του γονιδίου P53106. Η αλλαγή στο φαινότυπο των κυττάρων από τον HSV μπορεί να επιτευχθεί ακόμη και μόνο με θραύσματα DNA του ιού, που δεν κωδικοποιούν ικές πρωτείνες103 και αντίθετα με ότι συμβαίνει με άλλους ογκογόνους ιούς, τα προσβεβλημένα κύτταρα δεν εκφράζουν σταθερά ικά γονίδια. Σε μια σειρά από όγκους του γυναικείου γεννητικού συστήματος, μόνο το 10% διατηρούσε θραύσματα DNA από τους ιούς HSV και CMV107. Έτσι διαμορφώθηκε η υπόθεση "κτυπήματος-διαφυγής" ("hit-and-run" hypothesis), για την ογκογόνο δράση του HSV103.

Έχει επίσης διατυπωθεί η υπόθεση ότι ο HSV και ο HPV συνυπάρχουν και πιθανώς συνεργάζονται κατά τη διάρκεια της πολυσταδιακής καρκινογένεσης108. Πολλά στελέχη του HPV εμπλέκονται άμεσα στην ανάπτυξη κακοήθων όγκων, περιλαμβανομένων και όγκων του επιπεφυκότα και των βλεφάρων 102,109,110. Η πρωτεΐνη E7 των στελεχών 16 και 18 του HPV όπως και η EBNA-5 του EBV έχουν την ικανότητα πρόσδεσης στην πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος και συγκεκριμένα στο τμήμα του θυλάκου της πρωτεΐνης (pocket domain). Η ικανότητα της πρωτεΐνης Rb να καταστέλλει τη μεταγραφή στηρίζεται στην αλληλεπίδραση με το μεταγραφικό παράγοντα E2F. Η αλληλεπίδραση αυτή καταργείται από ορισμένες ικές ογκοπρωτείνες, όπως η E7 του HPV, ώστε μπορεί να ευνοηθεί η ογκογένεση95.

Σε πολλές περιπτώσεις έχει χρησιμοποιηθεί η μεθοδολογία της ανίχνευσης LOH σε δείκτες μικροδορυφορικού DNA για τη διαπίστωση πρόκλησης γενετικής βλάβης από διάφορους ιούς, όπως ο HPV (σε περιπτώσεις καρκίνου τραχήλου της μήτρας συσχετίστηκε με LOH στις περιοχές 3p, 13q, 9p και 11p)<sup>111,112</sup> ή ο EBV (σε περιπτώσεις καρκίνου ρινοφάρυγγα συσχετίστηκε με LOH στις περιοχές 3p, 9p, 9q, 11q, 13q και 14q)<sup>113</sup>. Στις περιπτώσεις αυτές, η παρουσία LOH στους γενετικούς τόπους που ελέγχθηκαν θεωρήθηκε ενδεικτική βλάβης σχετιζόμενης με την ιική δράση που αφορά σε παρακείμενα γονίδια, όπως στην περίπτωση του HPV τα P16 (9p21), Rb (13q14), P53 (17p13.1) και FHIT(3p14.2)<sup>111</sup>.

### 3. Οφθαλμικό πτερύγιο και αλλοιώσεις σε μικροδορυφορικό DNA

Αρχική αναφορά ανίχνευσης LOH και MI σε οφθαλμικά πτερύγια και ερωτήματα που προέκυψαν από αυτή

Σε προηγούμενη εργασία που στηρίχτηκε στην ενίσχυση με PCR αλληλουχιών μικροδορυφορικού DNA από οφθαλμικά πτερύγια αλλά και από αίμα και φυσιολογικό επιπεφυκότα των ιδίων ασθενών και τη συγκριτική αξιολόγησή των προϊόντων, διαπιστώθηκε γενετική αστάθεια, κυρίως με τη μορφή LOH<sup>56</sup>. Οι δείκτες που ελέγχθηκαν αρχικά εντοπίζονταν στα χρωμοσώματα 8, 10, 11 και 17 και τα αποτελέσματα που προέκυψαν ήταν ότι τα εξετασθέντα πτερύγια παρουσίαζαν σε σχετικά υψηλό ποσοστό (συνολικά 53%) LOH ενώ χαμηλότερο ποσοστό (13%), παρουσίαζε MI. Η υψηλότερη συχνότητα LOH (47%) παρατηρήθηκε στην περιοχή 17q. Το συμπέρασμα που προέκυψε από την εργασία αυτή ήταν ότι ενδεχομένως στην παθογένεια του πτερυγίου εμπλέκονται ογκο-κατασταλτικά γονίδια και ότι η LOH μπορεί να αντικατοπτρίζει αλλοιώσεις του γενετικού υλικού με σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της νόσου. Έτσι προτάθηκε η περαιτέρω

μελέτη αλλοιώσεων μικροδορυφορικού DNA, και κυρίως της παρουσίας LOH, στο οφθαλμικό περύγιο, όπως και η διερεύνηση των κλινικών και επιδημιολογικών παραγόντων με τους οποίους συσχετίζεται το φαινόμενο αυτό.

Ανίχνευση LOH σε καταστάσεις σχετιζόμενες με το ηλιακό φως-το "παράδειγμα" της ακτινικής κεράτωσης.

Η συσχέτιση αρκετών νοσημάτων των οφθαλμών και του δέρματος (οι γνωστές ως "οφθαλμοηλιώσεις" και "δερματοηλιώσεις" αντίστοιχα) με την ηλιακή ακτινοβολία ενδεχομένως υποδηλώνει την ύπαρξη κοινών παθογενετικών μηχανισμών<sup>3,56</sup>. Μια τέτοια κατάσταση είναι η ακτινική κεράτωση (AK) που χαρακτηρίζεται από την ανάπτυξη υπερκερατωτικών πλακών και βλατίδων (συνήθως διαστάσεων 3mm-1cm) σε εκτεθειμένες στο ηλιακό φως περιοχές του σώματος, πιο συχνά σε άτομα με ανοιχτόχρωμο δέρμα<sup>14</sup>. Ιστολογικά, υπάρχει εστιακή ή συρρέουσα παρακεράτωση, με ατυπία και μιτωτικές μορφές στα κατώτερα στρώματα της επιδερμίδας. Χαρακτηριστικά σχηματίζονται εκβλαστήσεις προς τα επιπολής στρώματα της δερμίδας, η οποία παρουσιάζει εικόνα ηλιακής ελάστωσης και κατά τόπους φλεγμονώδεις διηθήσεις<sup>15</sup>.

Η κλινική πορεία ποικίλει. Μπορεί να παρουσιαστεί αυτόματη υποστροφή (σε 25% των περιπτώσεων και κυρίως σε άτομα που μειώνουν την έκθεσή τους στο φως), σταθερότητα ή ακόμη εξαλλαγή σε ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα του δέρματος. Πιστεύεται ότι μικρό μόνο ποσοστό των περιπτώσεων AK έχουν αυτή τη δυνατότητα (αναφέρεται κάτω του 1/1000 περιπτώσεις/έτος) και μάλιστα η πιθανότητα εξαλλαγής αυξάνει με την αύξηση του αριθμού των βλαβών σε ένα συγκεκριμένο άτομο. Ένα άτομο με 10 βλάβες και με προσδόκιμο επιβίωσης 10 έτη έχει συνολικό κίνδυνο 10% να αναπτύξει ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα<sup>14</sup>.

Ακτινική κεράτωση του επιπεφυκότα έχει επίσης αναφερθεί σε σχέση με την έκθεση στο ηλιακό φως<sup>16</sup>. Η βλάβη αυτή χαρακτηριστικά ανευρίσκεται στη μεσοβλεφάρια σχισμή και πολύ συχνά

συνυπάρχει με άλλες αλλοιώσεις, κυρίως με πτερύγια και στεάτια. Η ακτινική κεράτωση του επιπεφυκότα θεωρείται ανάλογη με την ακτινική κεράτωση του δέρματος αν και αναφέρεται ότι στην περίπτωση του επιπεφυκότα οι αλλοιώσεις αυτές σπανίως υφίστανται κακοήθη εξαλλαγή. Η αποφολίδωση ωστόσο της κερατίνης μπορεί να προκαλέσει χρόνια ερεθισμό του επιπεφυκότα<sup>117</sup>. Παρά τη σε γενικές γραμμές καλοήθη πορεία της ΑΚ έχουν ανιχνευτεί σε αυτή τόσο μεταλλάξεις στο γονίδιο P53 όσο και σχετικά υψηλή συχνότητα LOH, ιδίως στις χρωμοσωμικές περιοχές 3p, 9p, 9q, 13q, 17p και 17q<sup>118,119</sup>. Μάλιστα, η συχνότητα LOH στην ΑΚ αναφέρεται ότι μπορεί να υπερβαίνει την αντίστοιχη συχνότητα στο διηθητικό ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα<sup>119</sup>. Η LOH σε ΑΚ βρέθηκε ότι συσχετίζεται με το βαθμό δυσπλασίας στις βλάβες αλλά και πιθανώς με το ποσοστό των κυττάρων που βρίσκονται σε φάση ενεργού κυτταρικού πολ/σμού, θεωρείται δε πρώιμο σύμβαμα στην παθογένεια της ΑΚ<sup>119</sup>.

Η παρουσία ιών στην ακτινική κεράτωση έχει επίσης διερευνηθεί. Σχετικά με τον HPV υπάρχουν αντικρουόμενες αναφορές. Αναφέρεται η ανίχνευση του HPV, με τη μεθοδολογία της PCR, σε σημαντικό ποσοστό περιπτώσεων ακτινικής κεράτωσης αλλά και άλλες προκαρκινικές και καρκινικές αλλοιώσεις (όπως νόσο Bowen, κερατοακάνθωμα, βασικοκυτταρικό και ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα) σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς, λήπτες νεφρικών μοσχευμάτων<sup>120</sup>. Ωστόσο, σε άλλη εργασία που έγινε με *in situ* υβριδισμό DNA σε ιστικά δείγματα διατηρημένα σε block παραφίνης, ειδικά από ΑΚ δέρματος και βλεννογόνων, αναφέρεται ότι δεν ανιχνεύτηκε κανένα από τα στελέχη HPV για τα οποία επιχειρήθηκε DNA υβριδισμός<sup>121</sup>. Σύμφωνα με μια άλλη εργασία που έγινε με τη μεθοδολογία της PCR σε διάφορες καλοήθεις και κακοήθεις δερματικές αλλοιώσεις (ΑΚ, σμηγματορροϊκή κεράτωση, μυρμηκία, βασικοκυτταρικό και ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα) επί ανοσοκατεσταλμένων ασθενών, ανιχνεύτηκε DNA παραπλήσιο με αυτό του HSV, που έχει ανιχνευτεί και σε περιπτώσεις με σάρκωμα Kaposi (KSHV)<sup>122</sup>.

Ερευνητική πρόταση για την περαιτέρω διερεύνηση αλλοιώσεων μικροδορυφορικού DNA στο οφθαλμικό πτερύγιο.

Η σύνδεση της ΑΚ με την υπεριώδη ακτινοβολία, η συχνή συνύπαρξή της με το πτερύγιο σε περίπτωση προσβολής του επιπεφυκότα, η σε γενικές γραμμές καλοήθης φύση αλλά και η δυνατότητα εξαλλαγής που έχει παρατηρηθεί και στις δύο καταστάσεις, ενδεχομένως υποδηλώνουν την ύπαρξη κοινών με το πτερύγιο παθογενετικών μηχανισμών. Έτσι, για τη διερεύνηση της LOH σε δείγματα DNA από πτερύγια, προτάθηκε ο έλεγχος καταρχάς σε χρωμοσωμικές περιοχές όπου έχει ήδη διαπιστωθεί υψηλή συχνότητα LOH σε έδαφος ΑΚ. Τέτοιες περιοχές είναι οι 3p, 9p, 9q, 13p, 17p και 17q.

Η αναφερόμενη παρουσία ιικού DNA σε δείγματα πτερυγίου (HPV, HSV, CMV) αλλά και ΑΚ (HPV, KSHV) και η γνωστή πρόκληση γενετικών αλλοιώσεων από τους παραπάνω ιούς, οδήγησε στην πρόταση να διερευνηθεί η παρουσία των ιών HSV και HPV στο πτερύγιο σε σχέση και με την ανίχνευση αλλοιώσεων του μικροδορυφορικού DNA.

Εξάλλου, η λεπτομερής καταγραφή κλινικοεπιδημιολογικών δεδομένων για τους ασθενείς από τους οποίους εξαιρέθηκαν τα δείγματα πτερυγίων, κρίθηκε απαραίτητη προκειμένου να καταστεί δυνατή η ανίχνευση πιθανής στατιστικής συσχέτισης μεταξύ των γενετικών αλλοιώσεων, της ιικής παρουσίας και της κλινικής συμπεριφοράς των υπό έρευνα αλλοιώσεων. Με τον τρόπο αυτό, η παρούσα εργασία, θα μπορούσε να συμβάλλει, πέρα από την καλύτερη κατανόηση της φύσης και της παθογένειας του πτερυγίου και στον καθορισμό πιθανών προγνωστικών δεικτών της βιολογικής του συμπεριφοράς και κυρίως της τάσης του για μετεγχειρητική υποτροπή, που αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα στην αντιμετώπιση της κατάστασης αυτής.

## B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 1. Ασθενείς, υλικά και μεθοδολογία

#### Επιλογή ασθενών και προεγχειρητικός έλεγχος

Τα δείγματα πτερυγίου, αίματος και φυσιολογικού επιπεφυκότα συλλέχθηκαν από ασθενείς που συνεχόμενα εξετάζονταν στην Οφθαλμολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου κατά το χρονικό διάστημα συλλογής του υλικού (Μάιος-Δεκέμβριος 1996). Η διάγνωση σε όλες τις περιπτώσεις έγινε κλινικά, με εξέταση στη σχισμοειδή λυχνία. Σε κάθε περίπτωση έγινε προεγχειρητική καταγραφή ιστορικού που περιλάμβανε την ηλικία, το επάγγελμα, τον τόπο διαβίωσης κατά τα 20 πρώτα χρόνια της ζωής αλλά και τον τόπο της σημερινής διαβίωσης, το ατομικό και οικογενειακό ιστορικό οφθαλμολογικών και συστηματικών νοσημάτων με ιδιαίτερη έμφαση σε νεοπλασματικά νοσήματα και νοσήματα του δέρματος που συνδέονται με την έκθεση στο ηλιακό φως, φαρμακευτική αγωγή που χρησιμοποιήθηκε τοπικά και συστηματικά, τυχόν προηγηθείσα επέμβαση πτερυγίου και μετεγχειρητικές υποτροπές.

Ακολούθησε μια λεπτομερής κλινική οφθαλμολογική εξέταση και φωτογράφιση των πτερυγίων.

Καταγράφηκαν στοιχεία όπως η παρουσία φλεγμονής ή έντονης αγγείωσης στο πτερύγιο, το μέγεθος της βλάβης (σε mm επί καθαρού κερατοειδή), η εντόπιση (δεξιός ή αριστερός οφθαλμός), η παρουσία ετερόπλευρου ή αμφοτερόπλευρου πτερυγίου καθώς και η θέση του πτερυγίου σε σχέση με τον κερατοειδή (κροταφικά, ρινικά ή αμφίπλευρα).



Στην κάρτα κάθε ασθενούς επίσης καταγράφηκε η ημερομηνία της επέμβασης και η εγχειρητική τεχνική που ακολουθήθηκε, το υλικό των ραμμάτων που χρησιμοποιήθηκαν, τυχόν διεγχειρητικά προβλήματα καθώς και η τυχόν διεγχειρητική χρήση μιτομυκίνης C. Επίσης σημειώθηκε η θέση λήψης βιοψίας φυσιολογικού επιπεφυκότα.

Οι ασθενείς εξετάζονταν μετεγχειρητικά μία εβδομάδα μετά την επέμβαση, οπότε γινόταν αφαίρεση και των ραμμάτων που είχαν χρησιμοποιηθεί. Επίσης, έγινε προσπάθεια μετεγχειρητικής εξέτασης και σε μεταγενέστερη χρονική στιγμή (1 περίπου έτος μετεγχειρητικά), προκειμένου να διαπιστωθούν περιπτώσεις μετεγχειρητικής υποτροπής ή άλλων επιπλοκών.

Η κάρτα που συμπληρώθηκε για κάθε ασθενή φαίνεται παρακάτω [Εικ 7].

Κλινικά και επιδημιολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών

Συνολικά εξετάστηκαν στην παρούσα εργασία 50 πτερύγια από ισάριθμους ασθενείς, 24 άνδρες (48%) και 26 γυναίκες (52%). Η μέση ηλικία των ασθενών ήταν 65(1.96 (30-92)έτη (μέση τιμή(σταθερή απόκλιση), 69(2.95 (30-92) έτη για τους άνδρες και 61(2.43 (39-84) έτη για τις γυναίκες. Η εντόπιση του πτερυγίου ήταν στο δεξιό οφθαλμό σε 22 περιπτώσεις (44%) και στον αριστερό οφθαλμό σε 28 περιπτώσεις (56%). Σε 48 περιπτώσεις (96%) η εντόπιση του πτερυγίου ήταν ρινικά και σε 2 (4%) κροταφικά σε σχέση με τον κερατοειδή. Σε 26 περιπτώσεις (52%) το πτερύγιο εκτεινόταν κάτω του 1mm επί της κερατοειδικής επιφάνειας, σε 22 περιπτώσεις η κερατοειδική του προέκταση ήταν 2-3mm και σε 2 περιπτώσεις (4%), ήταν άνω των 3mm επί του κερατοειδή. Σε 37 περιπτώσεις (74%) η επέμβαση γινόταν για πρώτη φορά, σε 6(12%) για δεύτερη, σε 6(12%) για τρίτη και σε μια περίπτωση (2%) για τέταρτη φορά. Η χρονική διάρκεια κατά την οποία ήταν γνωστή η ύπαρξη πτερυγίου ήταν κατά μέσο όρο 11.89(1.37έτη (0.5-35 έτη) προ της επεμβάσεως.

Περαιτέρω οφθαλμολογικός κλινικός έλεγχος και καταγραφή του ιστορικού, έδειξαν καταρράκτη σε 15 περιπτώσεις (30%), γλαύκωμα σε 3 (6%), επιπεφυκίτιδα σε 7 (14%), οφθαλμικές αλλεργικές

αντιδράσεις σε 1 (2%) ενώ σε 24 ασθενείς (48%) δεν προέκυψαν άλλα κλινικά ευρήματα πλην του πτερυγίου. Ως προς τη φαρμακευτική αγωγή, 39 ασθενείς (78%) δεν χρησιμοποιούσαν καμία τοπική αγωγή προ της επεμβάσεως, 7 ασθενείς (14%) χρησιμοποιούσαν τοπικά στεροειδή, 1 ασθενής (2%) τοπικά αποσυμφορητικά και 1 (2%) αντιαλλεργικά σκευάσματα. 3 ασθενείς (6%) χρησιμοποιούσαν αντιγλαυκωματική αγωγή στο μάτι με το πτερύγιο για 1-6 έτη. Δεν παρατηρήθηκαν σε καμία περίπτωση κλινικά στοιχεία ενεργού οφθαλμικής λοίμωξης από τον ιό HSV ή από τον ιό HPV, όπως θηλώματα. Επίσης κανείς ασθενής δεν ανέφερε ιστορικό ερπητικής κερατίτιδας.

Θετικό οικογενειακό ιστορικό πτερυγίου (παρουσία πτερυγίου σε συγγενείς πρώτου βαθμού), αναφέρθηκε σε 11 ασθενείς (22%). Σε 1 περίπτωση (2%) αναφέρονταν νεοπλασία (καρκίνος στομάχου) στο ατομικό αναμνηστικό και σε 3 περιπτώσεις (6%) αναφέρονταν νεοπλασίες στο οικογενειακό ιστορικό (συγγενείς πρώτου βαθμού). Όλοι οι ασθενείς προέρχονταν από αγροτικές ή ημιαστικές περιοχές της Κρήτης [Εικ 8]. Το μορφωτικό επίπεδο ήταν κατώτερης ή μέσης εκπαίδευσης σε 42 περιπτώσεις (84%), ανώτερης σε 6 (12%) και ανώτατης σε 2 (4%). Το μέσο υψόμετρο του τόπου της κατοικίας κατά το χρόνο της επέμβασης ήταν 208.8(30,608 (0-800)m, ενώ το μέσο υψόμετρο του τόπου διαβίωσης κατά τα πρώτα 20 έτη της ζωής των ασθενών ήταν 239.1(29,335 (0-630)m.

#### Εγχειρητική τεχνική

Σε όλες τις περιπτώσεις ακολουθήθηκε η χειρουργική τεχνική του "ακάλυπτου σκληρού" (bare sclera). Μετά την υπό τον επιπεφυκότα ένεση ξυλοκαΐνης 2%, παρασκευάζονταν το άκρο της κεφαλής του πτερυγίου επί του κερατοειδή και γινόταν μικρής έκτασης επιπολής κερατεκτομή. Ακολούθως, παρασκευάζονταν η κεφαλή και το σώμα και γινόταν εκτομή του πτερυγίου. Επίσης διατομή του επιπεφυκότα προς την 6<sup>η</sup> και 12<sup>η</sup> ώρα παρά το σκληροκεράτριο όριο και λήψη τεμαχιδίου επιπεφυκότα από θέση απομακρυσμένη από το πτερύγιο και καλυμμένη από τα βλέφαρα

(12<sup>η</sup> ώρα παρά το σκληροκεράτριο όριο). Ακολουθούσε απόξεση και καθαρισμός από ιστικά ράκη της κοίτης του πτερυγίου τόσο επί του κερατοειδή όσο και επί του παρά το σκληροκεράτριο όριο σκληρού. Έτσι παρέμενε εκτεθειμένη και ακάλυπτη από επισκλήριο μια περιοχή σκληρού χιτώνα, παρά το σκληροκεράτριο όριο. Αν ήταν αναγκαίο γινόταν τοπική διαθερμία για λόγους αιμόστασης. Στη συνέχεια, καθηλώνόταν ο επιπεφυκότας απευθείας επί του σκληρού με 2-3 απορροφήσιμα ράμματα Vicryl 6.0, γύρω στα 4mm πίσω από το σκληροκεράτριο όριο, ώστε παρέμενε τελικά τριγωνική περιοχή "γυμνού σκληρού". Σε μια μόνο περίπτωση ασθενούς που είχε 3 μετεγχειρητικές υποτροπές, χρησιμοποιήθηκε μιτομυκίνη C. Στο τέλος της επέμβασης εφαρμόζοταν πιεστική επίδεση με αλοιφή τομπραμυκίνης-δεξαμεθαζόνης.

Μετεγχειρητικά, χρησιμοποιήθηκε μεικτό κολλύριο τομπραμυκίνης-δεξαμεθαζόνης qid για 1 εβδομάδα. Στο τέλος του διαστήματος αυτού, γινόταν αφαίρεση των ραμμάτων.

#### Παθολογοανατομική εξέταση δειγμάτων

Σε επιλεγμένες περιπτώσεις, όπου υπήρχε διαφοροδιαγνωστικό πρόβλημα, πραγματοποιήθηκε παθολογοανατομική εξέταση σε τεμαχίδιο από το εξαιρεθέν ιστικό δείγμα προς επιβεβαίωση της κλινικής διάγνωσης. Σε όλες τις περιπτώσεις, η ιστολογική εικόνα ήταν τυπική πτερυγίου.

#### Συλλογή και αποθήκευση δειγμάτων

Μετά την αφαίρεσή τους τα πτερύγια και τα τεμαχίδια φυσιολογικού επιπεφυκότα τοποθετούνταν σε σωληνάρια και αποθηκεύονταν σε θερμοκρασία  $-20^{\circ}\text{C}$ . Επίσης, γινόταν αιμοληψία στους ασθενείς και η ποσότητα αίματος που λαμβάνονταν, τοποθετούνταν σε σωληνάρια με αντιπηκτικό (EDTA) και αποθηκεύονταν σε θερμοκρασία  $4^{\circ}\text{C}$ . Τόσο στην περίπτωση των ιστικών δειγμάτων όσο και στην περίπτωση των δειγμάτων αίματος, η αποθήκευση διαρκούσε το πολύ 1 μήνα, μέχρις ότου πραγματοποιηθεί η απομόνωση του DNA.

## Απομόνωση DNA

Η απομόνωση του DNA γινόταν με βάση τυποποιημένο πρωτόκολλο με πρωτεϊνάση K και οργανικούς διαλύτες (φαινόλη και χλωροφόρμιο)<sup>123</sup>.

A. Απομόνωση DNA από αίμα. Μετά από φυγοκέντρηση για την απομόνωση των λευκών αιμοσφαιρίων, τα δείγματα επωάζονταν σε 37°C για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου (RT). Ακολούθως γινόταν προσθήκη NaOC14.H<sub>2</sub>O, τα σωληνάρια αναδεύονταν για 15 min (RT) και ακολούθως επωάζονταν για 25 min (RT). Μετά την προσθήκη χλωροφορμίου ακολουθούσε νέα φυγοκέντρηση (5 min, 13000 στροφές/min, RT). Το υπερκείμενο μεταφέρονταν σε νέα σωληνάρια, γινόταν προσθήκη ίσων όγκων φαινόλης-χλωροφόρμιου και νέα φυγοκέντρηση (5 min σε 13000 στροφές/min, RT). Τέλος το υπερκείμενο μεταφέρονταν σε άλλα σωληνάρια όπου γινόταν προσθήκη αιθανόλης 100% (-200°C) για κατακρήμιση του DNA. Μετά από ελαφρά ανάδευση, τα δείγματα αποθηκεύονταν σε θερμοκρασία -200°C, όπου παρέμεναν επί 24h. Τέλος, ακολουθούσε φυγοκέντρηση (5 min, 13000 στροφές/min, 40°C), απόρριψη της αιθανόλης 100% και προσθήκη 50 ml απεσταγμένου H<sub>2</sub>O. Τα δείγματα παρέμεναν αρχικά σε θερμοκρασία 40°C για 24h και ακολούθως αποθηκεύονταν σε -200°C.

B. Απομόνωση DNA από ιστικά δείγματα. Αρχικά τα ιστικά δείγματα επωάζονταν σε θερμοκρασία 60°C με διάλυμα πρωτεϊνάσης K (20 mg/ml). Μετά γινόταν προσθήκη φαινόλης-χλωροφόρμιου (συνήθως 200+200 ml) και φυγοκέντρηση (5 min, 13000 στροφές/min, RT). Το υπερκείμενο (υδατική φάση) μεταφέρονταν σε νέα σωληνάρια όπου μετά την προσθήκη χλωροφόρμιου (400 μl), ακολουθούσε νέα φυγοκέντρηση (5 min, 13000 στροφές/min, RT). Το υπερκείμενο μεταφέρονταν σε νέα σωληνάρια, όπου γινόταν προσθήκη αιθανόλης 100% (-200°C) και NaCl 5M. Με ανάδευση και παραμονή σε θερμοκρασία -200°C (24h) γινόταν η κατακρήμιση του DNA. Ακολούθως νέα φυγοκέντρηση (5 min, 13000 στροφές/min, 40°C) και μετά την απόρριψη της αιθανόλης 100% προσθήκη αιθανόλης 70% και νέα φυγοκέντρηση (5 min, 13000 στροφές/min, 40°C). Μετά την

απόρριψη της αιθανόλης 70% γινόταν προσθήκη 50μl H<sub>2</sub>O και τα δείγματα αποθηκεύονταν σε 40C (24h) και ακολούθως σε -200C.

#### Επιλογή δεικτών μικροδορυφορικού DNA

Οι χρωμοσωμικές περιοχές στις οποίες δόθηκε προτεραιότητα στην παρούσα ερευνητική προσπάθεια, με βάση τα αναφερόμενα από προηγούμενες εργασίες τόσο στην ΑΚ όσο και στο περυγίο ήταν, όπως προαναφέρθηκε, οι 3p, 9p, 9q, 13q, 17p και 17q. Οι γενετικοί δείκτες που επιλέχθηκαν στις περισσότερες περιπτώσεις εντοπίζονταν κοντά σε ογκο-κατασταλτικά γονίδια ή ογκογονίδια, ευρισκόμενα στις αντίστοιχες χρωμοσωμικές περιοχές. Με τον τρόπο αυτό, βάσει του νόμου της γενετικής σύνδεσης, υπάρχει αυξημένη πιθανότητα η βλάβη γενετικού δείκτη να συσχετίζεται με αντίστοιχη βλάβη γονιδίου. Συνολικά ενισχύθηκαν 20 δείκτες μικροδορυφορικού DNA σε 6 χρωμοσωμικές περιοχές. Σε κάθε μια από τις περιοχές 17q, 17p, 13q, 9p και 3p ενισχύθηκαν 3 μικροδορυφορικοί δείκτες. Στην περιοχή 9q ενισχύθηκαν 5 δείκτες, αφού από την πρώτη φάση της έρευνας προέκυψε ότι η συγκεκριμένη χρωμοσωμική περιοχή πιθανώς παρουσιάζει αυξημένο ενδιαφέρον ως προς τον καθορισμό δεικτών πρόβλεψης της μετεγχειρητικής υποτροπής του περυγίου. Στον πίνακα 1 παρουσιάζονται οι γενετικοί δείκτες που επιλέχθηκαν, οι αντίστοιχοι γενετικοί τόποι (Loci) και τα γονίδια που αναφέρεται ότι ευρίσκονται σε γεινίαση με τους δείκτες αυτούς καθώς και παθολογικές καταστάσεις για τις οποίες υπάρχουν αναφορές σύνδεσης με τους γενετικούς αυτούς τόπους. Στην Εικ. 9 παρουσιάζεται η εντόπιση των μικροδορυφορικών δεικτών στα εξετασθέντα χρωμοσώματα.

#### Εκκινητές για μικροδορυφορικούς δείκτες και ικές αλληλουχίες

Οι εκκινητές για τις μικροδορυφορικές αλληλουχίες, επιλέχθηκαν από υπάρχουσες βάσεις γενετικών δεδομένων (<http://www.gdb.org/gdb/>).

Οι εκκινητές για ιικές αλληλουχίες στηρίχτηκαν σε προηγούμενες δημοσιεύσεις για την ανίχνευση ιών με τη μεθοδολογία της PCR.

Στην περίπτωση του HSV χρησιμοποιήθηκαν αρχικά γενικοί εκκινητές για την ενίσχυση μιας ακολουθίας 476 βάσεων του γονιδίου της DNA πολυμεράσης των HSV-1 και HSV-2124. Ακολούθως στα θετικά δείγματα έγινε τυποποίηση του ιού HSV σε HSV-1 και HSV-2 με τη χρήση ειδικών εκκινητών, μέσω των οποίων ενισχύθηκε μια αλληλουχία 93 βάσεων του γονιδίου της γλυκοπρωτεΐνης C του HSV-2 και μια αλληλουχία 110 βάσεων του γονιδίου της θυμιδικής κινάσης του HSV-1125. Για την ανίχνευση του HPV χρησιμοποιήθηκαν γενικοί εκκινητές, οι GP5 και GP6 (από το γονίδιο HPV L1, με προϊόν PCR 150 βάσεων)<sup>126</sup>. Η τυποποίηση του HPV στηρίχτηκε σε ειδικούς εκκινητές, για ενίσχυση αλληλουχιών εντός του γονιδίου E6127.

#### PCR για μικροδορυφορικό DNA

Ο συνολικός όγκος του διαλύματος της αντίδρασης ήταν 25μl. Σε αυτόν τον όγκο περιέχονταν 200ng γενωμικού DNA, 1μM από κάθε εκκινητή, 250 μM dNTPs, 2.5 μl ρυθμιστικού διαλύματος (buffer) 10X [670mM TRIS.HCl, pH 8.5; 166mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 67mM MgCl<sub>2</sub>; 1.7 mg/ml BSA; 100μM β-μερκαπτοαιθανόλη, 1% κατ' όγκο Triton X-100] και 1U Taq DNA πολυμεράσης.

Αρχικά πραγματοποιούνταν αποδιάταξη σε θερμοκρασία 94oC για 3min. Ακολουθούσαν 30 κύκλοι ενίσχυσης του DNA, που περιλάμβαναν αποδιάταξη (94oC), πρόσδεση (500C, 550C ή 580C ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο εκκινητή κάθε φορά) και πολυμερισμό (720C).

Ακολουθούσε μια τελική φάση πολυμερισμού (6min, 720C).

#### PCR για ιικές αλληλουχίες

Το αρχικό διάλυμα της αντίδρασης ήταν το ίδιο με αυτό που χρησιμοποιήθηκε για τους μικροδορυφορικούς δείκτες. Στην περίπτωση μόνο της τυποποίησης του HPV, χρησιμοποιήθηκε αντίδραση με όγκο διαλύματος 50μl.

Ως προς τις συνθήκες της αντίδρασης, μετά από μια φάση αρχικής αποδιάταξης 94oC για 3min, ακολουθούσαν 35 κύκλοι ενίσχυσης του DNA που περιλάμβαναν αποδιάταξη (94oC), πρόσδεση (55-62oC, ανάλογα με τον εκκινητή) και πολυμερισμό (720C). Ακολουθούσε μια τελική φάση πολυμερισμού (6min, 720C ).

Ηλεκτροφόρηση και χρώση πηκτής πολυακρυλαμιδίου για μικροδορυφορικούς δείκτες

Η ηλεκτροφόρηση στην περίπτωση των μικροδορυφορικών δεικτών γινόταν με 10 μl από το προϊόν της αντίδρασης, σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 10% (μείγμα ακρυλαμιδίου/bis-ακρυλαμιδίου 19:1), με στόχο την υψηλότερη διακριτική ικανότητα στις ηλεκτροφορητικές ζώνες. Μετά την επεξεργασία με σταθεροποιητή (διάλυμα οιοπνεύματος-ιόντων με 9.6% αιθανόλη και 3.8% οξείκό οξύ) επί 20min, η χρώση της πηκτής γινόταν με επίδραση AgNO<sub>3</sub> (0.1%) επί 20min, και εμφάνιση των ηλεκτροφορητικών ζωνών με NaOH (0.5N) και φορμαλδεύδη (700μl).

Ηλεκτροφόρηση και χρώση γέλης αγαρόζης για ικές αλληλουχίες

Η ηλεκτροφόρηση για ικές αλληλουχίες γινόταν επίσης με 10μl προϊόντος της αντίδρασης σε πηκτή αγαρόζης 2% με πρόσμειξη βρωμιούχου αιθιδίου. Ακολουθούσε εξέταση της γέλης σε υπεριώδες φως. Στην περίπτωση της τυποποίησης του ιού HSV χρησιμοποιήθηκε γέλη πολυακρυλαμιδίου, λόγω υψηλότερης διακριτικής ικανότητας.

Διαγνωστική τεχνική περιπτώσεων LOH/MI

Στην περίπτωση των μικροδορυφορικών δεικτών, τα προϊόντα των αντιδράσεων από δείγματα πτερυγίου, φυσιολογικού επιπεφυκότα και αίματος, τοποθετούνταν κατά τριάδες, με

σκοπό να είναι δυνατή η άμεση συγκριτική τους εκτίμηση. Η αρχική εκτίμηση ήταν οπτική, σε οριακές όμως περιπτώσεις η ψηφιακή εικόνα της πηκτής πολυακρυλαμιδίου υποβάλλονταν σε επεξεργασία φωτομέτρησης με το πρόγραμμα ανάλυσης εικόνας Adobe Photoshop 5.0 (Adobe, San Jose, CA). Με τον τρόπο αυτό, προσδιορίζονταν αριθμητικά η οπτική πυκνότητα σε μια περιοχή ίσης έκτασης και στις 3 περιπτώσεις (πτερύγιο, φυσιολογικός επιπεφυκότας και αίμα), που αντιστοιχούσε στη ηλεκτροφορητική ζώνη της μικροδορυφορικής αλληλουχίας που ελέγχονταν κάθε φορά. Ως περιπτώσεις LOH χαρακτηρίστηκαν αυτές στις οποίες παρατηρήθηκε ανισοκατανομή αλληλομόρφων (allelic imbalance), δηλαδή στατιστικά σημαντική μείωση της οπτικής πυκνότητας της ζώνης του ενός αλληλομόρφου στο πτερύγιο σε σχέση με την οπτική πυκνότητα του αντίστοιχου αλληλόμορφου στο φυσιολογικό επιπεφυκότα ή στο αίμα, χωρίς αντίστοιχη μείωση πυκνότητας στο άλλο αλληλόμορφο<sup>101</sup>[Εικ. 10]. Ως περιπτώσεις MI χαρακτηρίστηκαν αυτές όπου παρατηρήθηκε η ύπαρξη επιπλέον ηλεκτροφορητικών ζωνών στο DNA του όγκου, εκτός όσων υπήρχαν στο DNA του αίματος ή του φυσιολογικού επιπεφυκότα<sup>102</sup>, καθώς και περιπτώσεις όπου παρατηρήθηκε μετατόπιση ηλεκτροφορητικών ζωνών στο πτερύγιο σε σχέση με τους ιστούς μάρτυρες<sup>128</sup>.

#### Διαγνωστική τεχνική για ικές αλληλουχίες/θετικοί μάρτυρες

Η ανίχνευση των ιών στηρίχτηκε σε απευθείας σύγκριση των ηλεκτροφορητικών ζωνών από τους εξετασθέντες ιστούς με τις ζώνες DNA από καλλιέργειες κυττάρων μολυσμένες με HSV και HPV, που χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες.

#### Μετεγχειρητική εξέταση ασθενών

Έγινε συστηματική προσπάθεια επανελέγχου των ασθενών σε χρονικό διάστημα 1 περίπου έτος μετεγχειρητικά. Βιβλιογραφικά αναφέρεται ότι η συντριπτική πλειοψηφία των υποτροπών στο



περύγιο συμβαίνει πολύ γρήγορα μετεγχειρητικά, κυρίως εντός των πρώτων 6-8 μετεγχειρητικών εβδομάδων, ενώ όλες σχεδόν οι υποτροπές έχουν εκδηλωθεί εντός έτους από την επέμβαση<sup>2</sup>. Οι ασθενείς εξετάζονταν στο ΠNH και λαμβάνονταν φωτογραφίες των χειρουργημένων οφθαλμών. Επίσης καταγράφονταν τυχόν μεταβολές στη χρήση φαρμάκων και στην αναφερόμενη συμπτωματολογία καθώς και η κατάσταση στον έτερο οφθαλμό.

Συνολικά ανταποκρίθηκαν στην πρόσκληση επανεξέτασης 28 ασθενείς (56% των χειρουργημένων συνολικά), από τους οποίους 16 ήταν άνδρες (66.66% των ανδρών) και 12 γυναίκες (46.15% των γυναικών). Η μέση ηλικία ήταν 65.92(2.72 (36-92) και το μέσο υψόμετρο του τόπου διαμονής 198.84(40.21m (0-620).

## Στατιστική ανάλυση

Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων που προέκυψαν έγινε με το στατιστικό πακέτο SPSS 8.0 (SPSS, Chicago, IL). Εφαρμόστηκαν οι στατιστικές δοκιμασίες "X<sup>2</sup>" (Pearson), "Fischer's exact test", "t-test" (Student's test), "Mantel-Haenszel" test και διμεταβλητή συσχέτιση κατά Pearson. Στατιστικά σημαντικά θεωρήθηκαν τα αποτελέσματα όταν  $p < 0.05$  και ενδεικτικά όταν  $p < 0.1$ .

## 2. Αποτελέσματα

### Συχνότητα LOH και MI στα συλλεχθέντα δείγματα

Η κατανομή των ασθενών ανάλογα με τον αριθμό των περιπτώσεων LOH για τους εξετασθέντες δείκτες παρουσιάζεται στην Εικ.11. Επίσης, η κατανομή του ποσοστού ασθενών με έστω και μια περίπτωση LOH κατά χρωμοσωμικό σκέλος, παρουσιάζεται στην Εικ 12. Συνολικά, μόνο 3 περιπτώσεις MI παρατηρήθηκαν. Ο μέσος αριθμός περιπτώσεων LOH που παρουσιάστηκε ανά εξετασθέν δείγμα για τους 20 γενετικούς δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 3.08 (Η μέση

πιθανότητα ένα δείγμα πτερυγίου να εκδηλώσει LOH για κάποιο από τους εξετασθέντες δείκτες στην παρούσα εργασία ήταν 15.4%). LOH σε τουλάχιστο 1 γενετικό δείκτη διαγνώστηκε σε ποσοστό 94% των πτερυγίων που εξετάστηκαν. Η συχνότητα LOH και MI για τους εξετασθέντες δείκτες μικροδορυφορικού DNA και για τις εξετασθείσες χρωμοσωμικές περιοχές, παρουσιάζεται στους Πίνακες 2 και 3. Χαρακτηριστικές περιπτώσεις LOH και MI παρουσιάζονται στην Εικ. 13. Στις Εικ. 14-17 παρουσιάζονται περιπτώσεις LOH, για 10 τυχαία επιλεγμένους ασθενείς, στους δείκτες που εξετάστηκαν και στα χρωμοσώματα 3, 9, 14 και 17.

#### Συχνότητα ανεύρεσης ιών

Η συχνότητα ανεύρεσης των ιών που εξετάστηκαν παρουσιάζεται στον Πίνακα 4, τόσο για τα δείγματα πτερυγίου, όσο και για τα δείγματα φυσιολογικού επιπεφυκότα. Η διαφορά της συχνότητας ανίχνευσης HPV μεταξύ πτερυγίου και φυσιολογικού επιπεφυκότα ήταν στατιστικά μη σημαντική (2-tail Fischer's exact test,  $p=0.23$ ). Σε όλες τις περιπτώσεις, ο ιός HSV που απομονώθηκε ανήκε στον τύπο HSV-1, ενώ ο ιός HPV, στον τύπο HPV-18. Σε 3 περιπτώσεις, ανιχνεύτηκε ταυτόχρονα DNA των HPV και HSV στα εξετασθέντα δείγματα. Στην Εικ 18 παρουσιάζονται ηλεκτροφορητικές εικόνες προϊόντος PCR από DNA ιών HPV και HSV αντίστοιχα σε γέλη αγαρόζης.

#### Στατιστική ανάλυση κλινικοεπιδημιολογικών δεδομένων των ασθενών

Η ηλικία των ασθενών συσχετίστηκε αρνητικά σε βαθμό στατιστικά πολύ σημαντικό με το οικογενειακό ιστορικό πτερυγίου (συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson  $-0.49$ ,  $p<0.00$ ) καθώς επίσης και με το μέγεθος του πτερυγίου (συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson  $-0.3$ ,  $p=0.03$ ). Σε μικρότερο βαθμό, η ηλικία των ασθενών συσχετίστηκε αρνητικά με το ιστορικό επιπεφυκίτιδας και

τη μετεγχειρητική υποτροπή (συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson  $-0.25$ ,  $p=0.08$  και  $-0.3$ ,  $p=0.1$ , αντίστοιχα).

Ο αριθμός των επεμβάσεων στις οποίες αναφέρεται ότι έχει υποβληθεί το πτερύγιο (που θεωρήθηκε δείκτης της τάσης για μετεγχειρητική υποτροπή), συσχετίστηκε σε βαθμό στατιστικά πολύ σημαντικό με την αμφοτερόπλευρη παρουσία πτερυγίου, σε σχέση με την ετερόπλευρη (συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson  $+0.41$ ,  $p=0.01$ ). Επιπλέον, η μετεγχειρητική υποτροπή ήταν συχνότερη σε ασθενείς με θετικό οικογενειακό ιστορικό πτερυγίου (συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson  $+0.40$ ,  $p=0.04$ ) και επίσης συχνότερη σε ασθενείς με εμφάνιση πτερυγίου σε μικρότερη ηλικία (συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson  $+0.36$ ,  $p=0.02$ ).

Συσχέτιση μεταξύ κλινικοεπιδημιολογικών δεδομένων και LOH/MI

Η συνολική συχνότητα LOH (συνεκτιμώμενη σε όλους τους μικροδορυφορικούς δείκτες) δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις με τα κλινικοεπιδημιολογικά δεδομένα που καταγράφηκαν. Παρατηρήθηκαν ωστόσο επιμέρους στατιστικά σημαντικές ή σχεδόν σημαντικές σχέσεις για ορισμένους από τους εξετασθέντες δείκτες ή χρωμοσωμικές περιοχές.

Υψόμετρο των τόπων γέννησης και τωρινής διαβίωσης των ασθενών. Συσχετίστηκε με τη συχνότητα LOH στη χρωμοσωμική περιοχή 17p (συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson  $+0.31$ ,  $p=0.03$ ). Επίσης συσχετίστηκε με τη συχνότητα LOH στο δείκτη D9S112 (1-tail Fischer's exact test,  $p=0.05$ , 2-tail Fischer exact test,  $p=0.1$ ). Η συσχέτιση της συχνότητας LOH στις ίδιες περιοχές με το υψόμετρο του τόπου διαβίωσης κατά τα 20 πρώτα έτη της ζωής ήταν πολύ λιγότερο σημαντική από στατιστική άποψη, στον πληθυσμό μελέτης της παρούσας έρευνας.

Ηλικία. Αρνητική συσχέτιση με την ηλικία των ασθενών παρουσίασε η συχνότητα LOH στο δείκτη D9S59 (1-tail Fischer's exact test,  $p=0.06$ , 2-tail Fischer exact test,  $p=0.09$ ).

Οικογενειακό ιστορικό πτερυγίου. Συσχετίστηκε σε βαθμό στατιστικά σημαντικό με τη συχνότητα LOH στο δείκτη D17S855 (συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson  $0.3$ ,  $p=0.03$ ).

Χρονικό διάστημα κατά το οποίο αναφέρεται η ύπαρξη του περυγίου. Παρατηρήθηκε συσχέτιση με τη συχνότητα LOH στο δείκτη D9S144 (1-tail Fisher's exact test,  $p=0.04$ , 2-tail Fisher exact test,  $p=0.06$ ) και ασθενέστερη στον D17S855 (1-tail Fisher's exact test,  $p=0.08$ , 2-tail Fisher exact test,  $p=0.14$ ).

Φύλο. Δεν σημειώθηκαν διαφορές κατά φύλο ως προς τη συχνότητα LOH στους γενετικούς δείκτες που ελέγχθηκαν.

Μετεγχειρητική υποτροπή. Ο αριθμός των επεμβάσεων στις οποίες έχει υποβληθεί ο ασθενής για την εξαίρεση του περυγίου, χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης της τάσης για μετεγχειρητική υποτροπή. Όταν οι στατιστικές δοκιμασίες επαναλήφθηκαν καθορίζοντας την υποτροπή με βάση τη μετεγχειρητική παρακολούθηση, τα αποτελέσματα από άποψη στατιστικής σημαντικότητας ήταν παραπλήσια. Η ισχυρότερη συσχέτιση που καταγράφηκε αφορούσε τη συνολική συχνότητα LOH στην περιοχή 9q (συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson 0.41,  $p=0.02$ ), ενώ ασθενέστερες συσχετίσεις προέκυψαν με τη συχνότητα LOH στους επιμέρους δείκτες D9S270 (1-tail Fisher's exact test,  $p=0.09$  και 2 tail Fisher exact test,  $p=0.16$ ) και D9S59 ( $X^2=2.55$ ,  $p=0.11$ , Mantel-Haenszel test=2.49,  $p=0.11$ ).

Ιστορικό χρόνιας επιπεφυκίτιδας. Συσχετίστηκε σε βαθμό στατιστικά σημαντικό με τη συχνότητα LOH στο δείκτη HXB (συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson +0.29,  $p=0.04$ ), στο δείκτη D3S1100 (συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson +0.48,  $p=0.00$ ) καθώς και στη χρωμοσωμική περιοχή 3p (συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson +0.52,  $p=0.00$ ).

Μέγεθος του περυγίου. Συσχετίστηκε με τη συχνότητα LOH στο δείκτη HXB (συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson 0.33,  $p=0.02$ ) και ασθενέστερα στο δείκτη D3S1298 (συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson 0.25,  $p=0.08$ ).

Συσχέτιση μεταξύ ιικής παρουσίας, κλινικοεπιδημιολογικών δεδομένων και LOH/MI

Από τη στατιστική διερεύνηση της συσχέτισης μεταξύ των κλινικοεπιδημιολογικών δεδομένων που αξιολογήθηκαν και της ιικής παρουσίας προέκυψε ότι η συνύπαρξη των ιών HSV και HPV στα εξετασθέντα πτερύγια, συσχετίζεται σε βαθμό στατιστικά σημαντικό με το ιστορικό χρόνιας επιπεφυκίτιδας (συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson 0.38,  $p=0.00$ ) και τη μετεγχειρητική υποτροπή (συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson 0.28,  $p=0.07$ ). Δεν προέκυψε καμία στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των καταγραφέντων κλινικοεπιδημιολογικών δεδομένων και της παρουσίας του HPV σε δείγματα φαινοτυπικά φυσιολογικού επιπεφυκότα.

Η παρουσία του HSV στα εξετασθέντα πτερύγια συσχετίστηκε σε βαθμό στατιστικά σημαντικό με τη συχνότητα LOH στα χρωμοσωμικά σκέλη 9q (συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson +0.33,  $p=0.01$ ). Επίσης ασθενέστερα συσχετίστηκε με τη συχνότητα LOH στην περιοχή 3p (συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson +0.20,  $p=0.06$ ) καθώς και με τη συνολική συχνότητα LOH (συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson +0.26,  $p=0.06$ ).

Ως προς τον HPV, η παρουσία του στα εξετασθέντα δείγματα πτερυγίων συσχετίστηκε σε βαθμό στατιστικά σημαντικό με τη συχνότητα LOH στο μικροδορυφορικό δείκτη D17S855 (συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson +0.41,  $p=0.03$ ), και με τη συνολική συχνότητα LOH στην περιοχή 17q (συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson +0.26,  $p=0.05$ ).

Η συνύπαρξη HPV-HSV συσχετίστηκε σε βαθμό στατιστικά πολύ σημαντικό με τη συχνότητα LOH στις χρωμοσωμικές περιοχές 3p (συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson +0.34,  $p=0.01$ ), 9q (συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson +0.42,  $p=0.0$ ) και 17q (συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson +0.34,  $p=0.01$ )

#### Αποτελέσματα μετεγχειρητικής παρακολούθησης ασθενών

Από τους 28 ασθενείς που εξετάστηκαν μετεγχειρητικά, παρουσίασαν υποτροπή ποσοστό 35.7% των εξετασθέντων (10/28), εύρημα σύμφωνο με τα βιβλιογραφικά δεδομένα (αναφερόμενο ποσοστό υποτροπής 23% ως 75%) αλλά και με το ποσοστό των χειρουργηθέντων ασθενών που

ανέφεραν προηγηθείσα επέμβαση (21/50, 42%). Από τους ασθενείς αυτούς, οι 7 δεν ανέφεραν συμπτώματα σχετιζόμενα με την ύπαρξη πτερυγίου ενώ οι 3 ανέφεραν χρόνιο ερεθισμό του προσβεβλημένου οφθαλμού [Εικ 19].

### 3. Συζήτηση

Σημασία της ανεύρεσης LOH/MI στο πτερύγιο

Δεν υπάρχει απόλυτη ταύτιση απόψεων (consensus) στη βιβλιογραφία, σχετικά με τον αριθμό των δεικτών μικροδορυφορικού DNA που πρέπει να εξεταστούν προκειμένου να χαρακτηριστεί μια νεοπλασματική κατάσταση ως γενετικά ασταθής (LOH/MI+) ή σταθερή (LOH/MI-)101. Σύμφωνα με μια άποψη, αν ληφθεί υπόψη ότι η πιθανότητα εκδήλωσης γενετικής αστάθειας σε ένα προδιατεθειμένο άτομο είναι τυχαία κατανομημένη σε ολόκληρο το γονιδίωμα, είναι δυνατό μια ακολουθία (CA)<sub>n</sub> που παρουσιάζει σταθερότητα να βρίσκεται δίπλα σε μια γενετικά ασταθή (CA)<sub>n</sub> αλληλουχία. Έτσι, προτείνεται ότι διαπίστωση MI ακόμη και σε μια μόνο αλληλουχία, μπορεί να είναι αρκετή για να χαρακτηρίσει ένα όγκο MI+101.

Ένα άλλο σημείο που πρέπει να ληφθεί υπόψη είναι ο αριθμός των βάσεων που βρίσκονται στο γενετικό δείκτη που ελέγχεται. Έχει φανεί από προηγούμενες εργασίες ότι ο ρυθμός αυτόματων μεταλλάξεων σε αλληλουχίες μικροδορυφορικού DNA 3 και 4 βάσεων, είναι ως και 50 φορές μεγαλύτερος αυτού σε αλληλουχίες 2 βάσεων<sup>129</sup>. Άρα, οι αλληλουχίες 2 βάσεων είναι χρησιμότερες ως γενετικοί δείκτες αστάθειας από τις αλληλουχίες με μεγαλύτερο αριθμό βάσεων. Όλοι οι γενετικοί δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία ήταν επαναλήψεις δινουκλεοτιδίων.

Επιπρόσθετα, τα στοιχεία που προέρχονται από ανάλυση ιστών, είναι πιθανότατα πιο αξιόπιστα από αυτά που προέρχονται από κυτταροκαλλιέργειες, αφού έχει αναφερθεί ότι η γενετική αστάθεια μπορεί να αυξηθεί αθροιστικά με την πάροδο του χρόνου σε κυτταροκαλλιέργειες<sup>101,130</sup>.

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα, μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε (ικανός αριθμός δεικτών, διουκλεοτιδικές επαναλήψεις, ανάλυση δειγμάτων ιστών) είναι επαρκής για να δείξει ότι στο πτερύγιο μπορεί να παρατηρηθεί γενετική αστάθεια. Το γεγονός ότι η συχνότητα εμφάνισης του φαινομένου LOH είναι υψηλή στα εξετασθέντα πτερύγια, μπορεί να σημαίνει ότι στην παθογένεια της κατάστασης αυτής εμπλέκονται ογκοκατασταλτικά γονίδια. Η καλοήθης φύση του πτερυγίου δεν βρίσκεται σε αντίθεση με το εύρημα αυτό, δεδομένου ότι γενετική αστάθεια με τη μορφή της LOH έχει βρεθεί, εκτός από κακοήθεις και καλοήθεις νεοπλασματικές καταστάσεις και σε πολλές μη νεοπλασματικές καταστάσεις όπως νευροεκφυλιστικά νοσήματα<sup>131</sup>, αθηροσκληρυντικές πλάκες<sup>132</sup> ή εμβρυϊκούς ιστούς από αυτόματες αποβολές<sup>133</sup>. Απεναντίας, η πολύ χαμηλή συχνότητα MI μάλλον υποδηλώνει ότι η ανίχνευση η του φαινομένου αυτού είναι τυχαίο εύρημα, που δεν παίζει ουσιαστικό ρόλο στην παθογένεια της νόσου.

Αν ορισμένες γενετικές θέσεις (loci) εμφανίζονται να έχουν υψηλή συχνότητα γενετικής αστάθειας, με τη μορφή MI ή LOH, σε μια συγκεκριμένη κατάσταση, θεωρείται ότι αντιπροσωπεύουν θερμά σημεία ("hot spots") αστάθειας, δηλαδή σημεία στα οποία υπάρχει αυξημένη πιθανότητα να εντοπίζονται γονίδια που εμπλέκονται στην κατάσταση αυτή. Ωστόσο, θα πρέπει να γίνει σύγκριση της συχνότητας αστάθειας με αυτή που παρατηρείται και σε άλλες καταστάσεις, προκειμένου να διαπιστωθεί ότι το φαινόμενο είναι χαρακτηριστικό και ταυτοποιεί τη συγκεκριμένη μελετώμενη νοσολογική οντότητα<sup>101</sup>. Εξάλλου η αστάθεια μπορεί να εμφανίζεται με αυξημένη συχνότητα σε ολόκληρες χρωμοσωμικές περιοχές ή χρωμοσώματα (hot-spot chromosomal regions). Έτσι π.χ. στο καρκίνωμα του οισοφάγου έχει βρεθεί ότι πολλές αλληλουχίες που εντοπίζονται στην περιοχή 3p, είναι ασταθείς σε σχέση με άλλες περιοχές<sup>134</sup>.

Επιπλέον σε ορισμένες νεοπλασματικές καταστάσεις, υπάρχει γενικευμένη γενετική αστάθεια σε αλληλουχίες με μεγάλη διασπορά στο γονιδίωμα<sup>101</sup>.

Σε προηγούμενη εργασία σχετικά με την ανάλυση αλληλουχιών μικροδορυφορικού DNA στο πτερύγιο, είχε αναφερθεί ότι η LOH είναι συχνότερη στην περιοχή 17q. Στην παρούσα εργασία, η υψηλότερη συχνότητα παρατηρήθηκε στην περιοχή 9p, αλλά η υψηλή συχνότητα στην περιοχή 17q επιβεβαιώνεται. Οι χρωμοσωμικές περιοχές 9p και 17q αναφέρεται ότι επίσης παρουσιάζουν υψηλά ποσοστά LOH σε πολλές νεοπλασματικές καταστάσεις όπως ο καρκίνος του μαστού<sup>135</sup>, του πνεύμονα<sup>136</sup>, του οισοφάγου<sup>137</sup>, του νεφρού<sup>138</sup>, της ουροδόχου κύστης<sup>139</sup>, του δέρματος<sup>140</sup> καθώς και αιματολογικές νεοπλασίες<sup>141</sup> και αυτό υποδηλώνει ότι στις περιοχές αυτές πιθανώς εδράζονται γονίδια με γενικότερο ρόλο στην ογκογόνο διαδικασία.

Εξάλλου, το ότι δεν βρέθηκε LOH ή MI σε κανένα δείγμα από γειτονικό προς το πτερύγιο, μακροσκοπικά φυσιολογικό επιπεφυκότα συμφωνεί με τα ευρήματα προηγούμενης ερευνητικής προσπάθειας που έγινε με την ίδια μεθοδολογία<sup>56</sup>. Σε άλλη ωστόσο εργασία, με μεθοδολογία ανοσοϊστοχημείας, περιγράφεται ανώμαλη και αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης p53 από φαινοτυπικά φυσιολογικά επιπεφυκότα οφθαλμών με πτερύγιο, εύρημα που αποδόθηκε σε σημειακή μετάλλαξη στο γονίδιο P53 και θεωρήθηκε ένδειξη της νεοπλασματικής φύσης της νόσου<sup>142</sup>. Είναι γεγονός ότι έχει περιγραφεί LOH σε φαινοτυπικά φυσιολογικό ιστό, όπως στην περίπτωση μακροσκοπικά φυσιολογικού βλεννογόνου ουροδόχου κύστης που βρίσκεται δίπλα σε καρκίνο ουροδόχου κύστης<sup>143</sup>, καθώς και στην περίπτωση μακροσκοπικά φυσιολογικού ιστού, που βρίσκεται δίπλα σε καρκίνο μαστού<sup>144</sup>. Επίσης σε πρόσθιο περιφάκιο και ίριδα από μη ψευδοαποφολιδωτικούς ασθενείς<sup>145</sup>. Στις περιπτώσεις αυτές, η LOH θα μπορούσε να αντιπροσωπεύει μια "σιωπηλή" γενετική διαταραχή, χωρίς φαινοτυπικές εκδηλώσεις<sup>145</sup>. Στην παρούσα εργασία, το ότι τα δείγματα επιπεφυκότα ελήφθησαν από θέσεις σχετικά προστατευμένες από την έκθεση στο ηλιακό φως (12<sup>η</sup> ώρα στο σκληροκεράτριο όριο), ενώ τα δείγματα πτερυγίων προέρχονταν από τη μεσοβλεφάρια σχισμή που είναι περιοχή εκτεθειμένη στο ηλιακό φως, μπορεί



να υποδηλώνει πιθανή συσχέτιση ανάμεσα στην εμφάνιση LOH και στην έκθεση στο ηλιακό φως. Η πιθανότητα αυτή ενισχύεται από το γεγονός ότι και σε άλλες καταστάσεις που είναι επίσης γνωστό ότι συνδέονται στενά με την έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία, όπως είναι τα δερματικά μελανώματα, έχει αναφερθεί υψηλή συχνότητα LOH στην περιοχή 9p, η οποία παρουσίασε και την υψηλότερη συχνότητα LOH στα πτερύγια που εξετάστηκαν<sup>146</sup>.

Σημασία της ιικής παρουσίας στο πτερύγιο

HSV

Το γονιδίωμα του HSV αποτελείται από μοναδικές (unique, U) περιοχές, μακρές (UL) και βραχείες (Us), στις οποίες παρεμβάλλονται ανάστροφες επαναλαμβανόμενες περιοχές<sup>147</sup>. Τα γονίδια του ιού χωρίζονται σε ενδιάμεσα πρώιμα (intermediate early) ή "α", πρώιμα (early) ή "β" και όψιμα (late) ή "γ", ανάλογα με τη σειρά με την οποία εκφράζονται κατά τη λοίμωξη από τον ιό<sup>148</sup>.

Ο HSV συμμετέχει στην ογκογένεση, κυρίως ευνοώντας την επίδραση άλλων παραγόντων, όπως είναι χημικά καρκινογόνα, πιθανώς μέσω αδρανοποίησης ογκο-κατασταλτικών γονιδίων, όπως είναι το P53<sup>103</sup>. Εξάλλου, ο HSV μπορεί να προκαλέσει μεταλλάξεις, τόσο σημειακές όσο και εκτεταμένες γονιδιακές ανακατατάξεις, ενώ μπορεί επίσης να ενεργοποιήσει την έκφραση ενδογενών ρετροϊών τύπου C103. Έχει επίσης δειχτεί η ικανότητα του HSV να ενεργοποιεί την κυτταρική αντιγραφή ή να στρέφει την κυτταρική πρωτεϊνοσύνθεση προς πρωτείνες που φυσιολογικά δεν εκφράζονται στα μολυσμένα κύτταρα. Ενδεχομένως μάλιστα ο ρόλος του HSV στην πολυσταδιακή καρκινογένεση να έχει υποτιμηθεί, δεδομένου ότι το DNA του ιού δεν απομονώνεται πάντα από νεοπλασματικές βλάβες στις οποίες μπορεί να συμμετέχει<sup>103</sup>. Στα νεοπλασματικά κύτταρα μπορεί να βρίσκονται θραύσματα του γενετικού υλικού του ιού, όπως π.χ. το θραύσμα BC 24 του ιού HSV που έχει απομονωθεί από καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Για την ανίχνευση τέτοιων θραυσμάτων μπορεί να απαιτούνται πιο εξειδικευμένες τεχνικές<sup>149</sup>.

Η λοίμωξη από HSV-1 αποτελεί την πρώτη κατά σειρά συχνότητας αιτία τύφλωσης από λοιμώδη αίτια στις ΗΠΑ<sup>150</sup>. Μετά την ενεργό φάση, η λοίμωξη από HSV μπορεί να γίνει λανθάνουσα, κάτι που έχει επιβεβαιωθεί τόσο με κλασσικές τεχνικές καλλιέργειας όσο και με τεχνικές DNA υβριδισμού<sup>151,152</sup>. Η αρχική εντόπιση του ιού σε λανθάνουσα κατάσταση έγινε σε νευρώνες. Ωστόσο από πολύ νωρίς υποτέθηκε ότι ιός μπορεί να παραμένει και σε μη νευρωνικά κύτταρα<sup>152</sup>. Σύμφωνα θεωρία του δερματικού ερεθίσματος ("skin trigger theory"), ο ιός μπορεί να φτάνει διαρκώς σε περιφερικές θέσεις επί υγιών ατόμων (απελευθερούμενος από γαγγλιακά κύτταρα) και να επανενεργοποιείται "in situ" σε κλινικό επίπεδο, μετά από κάποιο ερέθισμα<sup>153</sup>. Έτσι, έχει αποδειχτεί ότι ηλεκτρικός ερεθισμός του γασσέριου γαγγλίου σε κουνέλια με λανθάνουσα λοίμωξη, μπορεί να οδηγήσει σε απομόνωση HSV από τα δάκρυα<sup>154</sup>.

Έχει αναφερθεί ότι ο HSV-1 μπορεί να προκαλέσει χρόνια βλεφαρίτιδα, επιπεφυκίτιδα και κερατίτιδα στον άνθρωπο<sup>155</sup> και υποστηρίζεται με βάση πειραματικά δεδομένα ότι οι αλλοιώσεις στον επιπεφυκότα, τα βλέφαρα και τον κερατοειδή μπορεί να εξελίσσονται ταυτόχρονα, αποτελώντας εξωνευρωνικές θέσεις χρόνιας παρουσίας του ιού<sup>155</sup>. Η ανίχνευση του HSV στα πτερύγια που συμπεριλήφθηκαν στην παρούσα εργασία, επιβεβαιώνει τα αποτελέσματα προηγούμενης ερευνητικής προσπάθειας πάνω στο θέμα αυτό<sup>51</sup>. Το γεγονός ότι DNA του HSV ανιχνεύτηκε αποκλειστικά σε δείγματα πτερυγίου και όχι σε παρακείμενο φυσιολογικό επιπεφυκότα, υποδηλώνει ότι ο HSV ενδεχομένως έχει κάποιο ειδικό ρόλο στην παθογένεια της νόσου. Ωστόσο, δεν μπορεί να υποστηριχτεί με βάση την παρούσα εργασία ότι η συσχέτιση της παρουσίας του HSV με το πτερύγιο είναι αναγκαστικά αιτιολογικού χαρακτήρα. Είναι πιθανό η συσχέτιση αυτή να είναι συγκυριακή και να οφείλεται στο ότι ευνοείται η εγκατάσταση του ιού επί του πτερυγίου εξαιτίας μιας υποξείας φλεγμονής που πυροδοτεί μηχανισμό τύπου "δερματικού ερεθίσματος" (skin trigger). Η ανίχνευση του στελέχους HSV-1 και όχι του HSV-2 είναι σύμφωνη με τη γνωστή υπεροχή του HSV-1 στις οφθαλμικές λοιμώξεις<sup>152</sup>.

## HPV

Ο HPV ανήκει στην οικογένεια Papovaviridae, που περιλαμβάνει επίσης τους γνωστούς ογκογόνους ιούς polyomavirus και simian virus 40 (SV40)<sup>156</sup>. Πάνω από 70 τύποι HPV έχουν περιγραφεί ως σήμερα<sup>102</sup>. Αν και υπάρχουν επιμέρους διαφορές, όλοι οι τύποι HPV περιλαμβάνουν τουλάχιστο 7 "πρώιμα" ("early", E1-E7) και 2 "όψιμα" ("late", L1-L2) πρωτεϊνικά συστατικά<sup>157</sup>. Η πρωτεΐνη E7 των τύπων 16 και 18 φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση μέσω επίδρασης στον κυτταρικό κύκλο (πιθανώς αδρανοποιώντας την πρωτεΐνη Rb). Η πρωτεΐνη E6 πιθανώς έχει ρόλο ορμονικού υποδοχέα, κάτι που ενδεχομένως εξηγεί την ευαισθησία ορισμένων κυττάρων μολυσμένων από HPV σε ορμονικές επιδράσεις<sup>95</sup>.

Έχει πλέον αποδειχτεί ότι ο HPV ασκεί καρκινογόνο δράση, συμμετέχοντας στην παθογένεια πολλών νεοπλασματικών καταστάσεων, όπως ο καρκίνος του ουροποιογεννητικού συστήματος<sup>158</sup> αλλά και προδιηθητικών βλαβών, όπως η νόσος Bowen του δέρματος<sup>159</sup>. Αν και για πολλούς τύπους του ιού έχει αναφερθεί πιθανή εμπλοκή στην καρκινογένεση, ειδικά σε νεοπλασίες αλλά και δυσπλασίες του επιπεφυκότα και κερατοειδή έχουν ανιχνευτεί οι τύποι 16 και 18<sup>110,160</sup>. Δεν είναι διευκρινισμένος ο μηχανισμός πρόκλησης λοίμωξης του επιπεφυκότα και κερατοειδή.

Υποστηρίζεται πάντως ότι απαιτείται άμεση επαφή, με αυτο- ή ετεροενοφθαλμισμό ενώ ενδεχομένως είναι δυνατή η μόλυνση κατά τη διάρκεια του τοκετού<sup>156</sup>.

Στο παρελθόν είχε αναφερθεί η παρουσία αντιγόνου HPV σε μια ομάδα πτερυγίων με μεθόδους ανοσοϊστοχημείας<sup>52</sup>. Με τα ευρήματα της παρούσας εργασίας που στηρίζεται σε διαφορετική μεθοδολογία (ενίσχυση του DNA του ιού με PCR), επιβεβαιώνεται η πιθανότητα της συσχέτισης του HPV με το οφθαλμικό πτερύγιο. Ωστόσο, το γεγονός ότι η ανίχνευση του HPV δεν διέφερε σε βαθμό στατιστικά σημαντικό μεταξύ του πτερυγίου και του φαινοτυπικά υγιούς επιπεφυκότα υποδηλώνει ότι η συσχέτιση αυτή πιθανώς δεν είναι ειδική. Η ανίχνευση του HPV-18 στο οφθαλμικό πτερύγιο, κατάσταση που όπως προαναφέρθηκε έχει θεωρηθεί πιθανώς νεοπλασματική, είναι σε συμφωνία με προηγηθείσες αναφορές σχετικά με την εμπλοκή αυτού του στελέχους του

ιού σε δυσπλασίες και νεοπλασίες της εξωτερικής επιφάνειας των οφθαλμών<sup>160</sup>. Εξάλλου και στην περίπτωση νεοπλασιών του γυναικείου γεννητικού συστήματος έχει αναφερθεί ότι η συχνότητα λοίμωξης από το στέλεχος HPV-18 στον ελλαδικό χώρο είναι υψηλότερη από άλλες περιοχές<sup>161,162</sup>.

Αξιολόγηση των στατιστικών συσχετίσεων που προέκυψαν

Η ενδεικτική ( $p=0.1$ ) συσχέτιση της συχνότητας LOH στο δείκτη D9S112 (9q33) με το υψόμετρο του τόπου διαμονής των ασθενών, που είναι γνωστό ότι επίσης συσχετίζεται με το επίπεδο έκθεσης στην ηλιακή (και ειδικότερα στην υπεριώδη) ακτινοβολία, είναι σε συμφωνία με βιβλιογραφικές αναφορές για αυξημένη συχνότητα LOH στην περιοχή 9q σε καταστάσεις που αποδεδειγμένα συνδέονται με αυξημένη έκθεση στο ηλιακό φως. Έτσι, στα βασικοκυτταρικά καρκινώματα του δέρματος έχει αναφερθεί υψηλή συχνότητα LOH στην περιοχή 9q<sup>163</sup>. Ωστόσο, η αντίστοιχη συσχέτιση της συχνότητας LOH στο συγκεκριμένο δείκτη με το υψόμετρο του τόπου διαμονής κατά τα 20 πρώτα έτη της ζωής ήταν σημαντικά ασθενέστερη ( $p=0.28$ ), παρά το γεγονός ότι υπάρχουν ενδείξεις ότι η έντονη έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία κατά τις πρώτες 2-3 δεκαετίες της ζωής μπορεί να έχει θετική αθροιστική δράση στην πιθανότητα ανάπτυξης πτερυγίου<sup>6</sup>. Η στατιστικά σημαντική ( $p=0.03$ ) θετική συσχέτιση της συχνότητας LOH στην περιοχή 17p με το υψόμετρο του τόπου διαμονής, παρά το γεγονός ότι η συχνότητα LOH σε επιμέρους δείκτες που εντοπίζονταν στην ίδια χρωμοσωμική περιοχή δεν παρουσίασε αντίστοιχη συσχέτιση, υποδηλώνει πιθανώς μη ειδική ευαισθησία του γενετικού υλικού στη συγκεκριμένη περιοχή σε περιβαλλοντικές επιδράσεις όπως είναι το υπεριώδες φως. Υπάρχουν αναφορές για αυξημένη ευπάθεια του γενετικού υλικού στις περιοχές αυτές στην υπεριώδη ακτινοβολία<sup>163,164</sup>.

Όπως έχει προαναφερθεί, στο πτερύγιο μπορεί να υπάρχει γενετική προδιάθεση, ενδεχομένως με επικρατούσα κληρονομικότητα<sup>3,30</sup>. Η συσχέτιση του οικογενειακού ιστορικού πτερυγίου με τη μικρή ηλικία εμφάνισης και τη μετεγχειρητική υποτροπή που παρατηρήθηκε στην παρούσα έρευνα

συμφωνεί με προηγούμενες αναφορές<sup>165,166</sup>. Η LOH μπορεί να θεωρηθεί ένα "σωματικό" σύμβαμα που χαρακτηρίζει μια ομάδα κυττάρων με κλωνική προέλευση. Αυτή η θεώρηση της LOH μπορεί ενδεχομένως να ερμηνεύσει το γεγονός ότι δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση του οικογενειακού ιστορικού πτερυγίου με τη συνολική συχνότητα LOH.

Η θετική συσχέτιση της συχνότητας LOH με το χρονικό διάστημα κατά το οποίο αναφερόταν η ύπαρξη πτερυγίου (ισχυρότερη στο δείκτη D9S144, με  $p=0.06$ ) μπορεί να υποδηλώνει ότι κατά τη διάρκεια της νόσου προστίθενται συμβάματα γενετικής βλάβης που επιτείνουν τη γενετική αστάθεια και ενδεχομένως συμβάλλουν στη σταθεροποίηση και πρόοδο του πτερυγίου. Η πιθανότητα μιας ανάλογης με το χρονικό διάστημα επαύξησης της γενετικής βλάβης ενισχύεται από το ότι η συχνότητα στο δείκτη D9S144 (στον οποίο διαπιστώθηκε η ισχυρότερη συσχέτιση με το χρόνο) ήταν σχετικά υψηλή (22%) ενώ στο δείκτη D17S855 (όπου επίσης παρουσιάστηκε συσχέτιση με το χρόνο, σχετικά ασθενέστερη με  $p=0.14$ ), η συχνότητα LOH ήταν ακόμη υψηλότερη (26%).

Αν και σε προηγούμενη εργασία αναφέρεται ότι η LOH στο πτερύγιο ήταν συχνότερη σε γυναίκες<sup>56</sup>, δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση της συνολικής συχνότητας LOH με το φύλο, εύρημα που συμφωνεί με άλλες εργασίες για την πιθανή συσχέτιση της συχνότητας LOH με διάφορες κλινικές παραμέτρους<sup>167,168,169</sup>.

Παρόλο που είναι γνωστό ότι τα πτερύγια υποτροπιάζουν πολύ συχνά μετά τη χειρουργική τους εξαίρεση και πολλές φορές οι υποτροπιάζουσες βλάβες παρουσιάζουν ταχύτερη ανάπτυξη, δεν έχουν μέχρι τώρα εντοπιστεί αξιόπιστοι δείκτες πρόγνωσης των υποτροπών<sup>170</sup>. Στην παρούσα εργασία παρουσιάστηκε μια ασθενής συσχέτιση της τάσης για μετεγχειρητική υποτροπή, όπως αυτή τεκμαίρεται από τον αριθμό των επεμβάσεων για μια συγκεκριμένη βλάβη αλλά και με βάση τη μετεγχειρητική παρακολούθηση των ασθενών, με τη συχνότητα LOH στους δείκτες D9S59 ( $p=0.11$ ) και D9S270 ( $p=0.16$ ). Όμως, το ποσοστό LOH για τους δείκτες αυτούς δεν ήταν πολύ υψηλό (16%) συγκρινόμενο με το αντίστοιχο ποσοστό σε άλλους δείκτες. Έτσι, είναι πιθανό ότι η

LOH είναι ένα φαινόμενο γενικά ανεξάρτητο από την τάση για μετεγχειρητική υποτροπή. Ωστόσο η LOH στο δείκτη D9S59 (9q31-q33) βρέθηκε συχνότερη σε νεώτερα άτομα σε βαθμό σχεδόν στατιστικά σημαντικό ( $p=0.06$ ) και είναι γνωστό ότι η νεαρή ηλικία είναι παράγοντας που συσχετίζεται με τη μετεγχειρητική υποτροπή στα πτερύγια<sup>166</sup>. Με βάση όπως προαναφέρθηκε τα πρώτα αποτελέσματα, έγινε προσπάθεια για λεπτομερέστερο έλεγχο της περιοχής 9q, με τη χρήση 5 μικροδορυφορικών δεικτών εστιασμένων στην περιοχή 9q31-33 (αντί 3 σε άλλα χρωμοσωμικά σκέλη) και η συνολική συχνότητα LOH συσχετίστηκε σε βαθμό στατιστικά σημαντικό με τη μετεγχειρητική υποτροπή. Αν λάβει κανείς υπόψη ότι στην περιοχή 9q αναφέρεται επίσης υψηλή συχνότητα LOH σε καταστάσεις που είναι γνωστό ότι συνδέονται με αυξημένη έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία<sup>163</sup>, κάτι που αποτελεί όπως προαναφέρθηκε αναγνωρισμένο παράγοντα κινδύνου και για την ανάπτυξη πτερυγίου, μπορεί να υποτεθεί ότι η παρουσία LOH στην περιοχή αυτή πιθανώς έχει προγνωστική αξία για τη μετεγχειρητική υποτροπή. Ωστόσο το συμπέρασμα αυτό θα πρέπει να επιβεβαιωθεί με λεπτομερέστερη ανάλυση της συγκεκριμένης περιοχής (fine mapping) και περαιτέρω έρευνα προοπτικού χαρακτήρα.

Η αρνητική συσχέτιση του μεγέθους του πτερυγίου αλλά και του ιστορικού χρόνιας επιπεφυκίτιδας με την ηλικία πιθανώς αντικατοπτρίζει ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της νόσου όταν αυτή εμφανίζεται σε νεαρή ηλικία. Αναφέρεται ότι στην περίπτωση αυτή το πτερύγιο εμφανίζει ταχύτερη ανάπτυξη και αυξημένη τάση για μετεγχειρητική υποτροπή<sup>31</sup>, η παρουσία του είναι συχνά αμφοτερόπλευρη ενώ δεν έχει συσχέτιση με την έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία και ενδεχομένως κληρονομείται με επικρατούσα κληρονομικότητα<sup>165,171</sup>. Στο πλαίσιο αυτό πιθανώς εντάσσεται η στατιστικά σημαντική σχέση του μεγέθους του πτερυγίου αλλά και του ιστορικού χρόνιας επιπεφυκίτιδας με τη συχνότητα LOH στο δείκτη HXB (9q32-q34), που εντοπίζεται σε χρωμοσωμική περιοχή με αυξημένη πιθανότητα να συνδέεται με τη μετεγχειρητική υποτροπή.

Εξάλλου, η συσχέτιση του ιστορικού επιπεφυκίτιδας με τη συχνότητα LOH στην περιοχή 3p πιθανώς συνδέεται με την παρουσία των ιών HSV και HPV, που επίσης συσχετίστηκε με την

παράμετρο αυτή. Εκτός από τον HSV που είναι γνωστό ότι σχετίζεται με χρόνια επιπεφυκίτιδα<sup>155</sup>, ογκογόνα στελέχη του HPV αναφέρεται επίσης ότι έχουν απομονωθεί από οφθαλμούς με παρόμοιο ιστορικό<sup>172</sup>, ενώ είναι γνωστή η σχέση της παρουσίας HPV με τη συχνότητα LOH στην περιοχή 3p111,112. Είναι ωστόσο ενδιαφέρον ότι στα εξετασθέντα πτερυγία παρατηρήθηκε συσχέτιση της παρουσίας του HPV με τη συχνότητα LOH στην περιοχή 17q, ενώ βιβλιογραφικά, σε εργασίες με ανάλογη μεθοδολογία που αφορούσαν καρκίνο τραχήλου μήτρας, περιγράφεται, όπως έχει ήδη αναφερθεί, συσχέτιση με τη συχνότητα LOH κυρίως στις περιοχές 3p, 13q, 9p και 11p111,112. Αναφέρεται πάντως συσχέτιση της γενετικής βλάβης στην περιοχή 17qter με την προδιάθεση για προσβολή από μυρμηκιδώδη επιδερμοδυσπλασία (epidermodysplasia verruciformis) καθώς και από οικογενή ψωρίαση, καταστάσεις στενά συνδεδεμένες με λοίμωξη από ογκογόνα στελέχη HPV<sup>173</sup>.

Η συσχέτιση της παρουσίας του HSV με τη συνολική συχνότητα LOH πιθανώς μπορεί να αποδοθεί στη δυνατότητα του ιού αυτού να προσβάλλει περιοχές του γονιδιώματος προκαλώντας, όπως προαναφέρθηκε, ποικίλες γενετικές βλάβες. Η πιο εστιασμένη συσχέτιση με τη συχνότητα LOH στη χρωμοσωμική περιοχή 9q είναι ενδεχόμενο να αντικατοπτρίζει ιδιαίτερη ευπάθεια του γενετικού υλικού της συγκεκριμένης περιοχής. Αναφέρεται ότι εκεί έχουν παρατηρηθεί σωματικές ανακατατάξεις γενετικού υλικού και αυξημένη συχνότητα LOH μετά από επίδραση αλκυλιόντων παραγόντων κάτι που πιθανώς αποδίδεται σε προϋπάρχουσες βλάβες του DNA<sup>174</sup>.

Το γεγονός ότι η μετεγχειρητική υποτροπή ήταν συχνότερη σε ασθενείς στους οποίους ανιχνεύτηκε DNA τόσο του HPV όσο και του HSV, ενώ δεν ήταν συχνότερη σε ασθενείς με ανίχνευση μόνο HPV ή μόνο HSV, ενδεχομένως σημαίνει ότι οι 2 εξετασθέντες ιοί επηρεάζουν συνεργικά τη βιολογική συμπεριφορά του πτερυγίου. Είναι γνωστό ότι ο HPV πιθανώς δρα συνεργικά με θραύσματα του HSV κατά την πολυσταδιακή ογκογόνο διαδικασία<sup>108,149</sup>. Μια τέτοια συνέργεια θα μπορούσε να συνδέεται με την υψηλότερη συχνότητα ιστορικού χρόνιας επιπεφυκίτιδας σε ασθενείς με συνλοίμωξη από HSV και HPV, σε σχέση με ασθενείς στους οποίους ανιχνεύτηκε

μόνο HSV αν και ο τελευταίος είναι γνωστό ότι μπορεί να προκαλέσει χρόνια φλεγμονή του επιπεφυκότα και κερατοειδή<sup>155</sup>. Δεν μπορεί να διευκρινιστεί αν η συσχέτιση μεταξύ της συνλοίωξης από HSV και HPV και της μετεγχειρητικής υποτροπής του πτερυγίου που αναδείχτηκε στην παρούσα εργασία είναι αιτιολογική ή δευτερογενής. Στην περίπτωση που, με περαιτέρω ερευνητική προσπάθεια στο θέμα αυτό, προκύψουν ενδείξεις για αιτιολογική συσχέτιση, μπορεί να διερευνηθεί ο πιθανός ρόλος της επιλεκτικής αντικής αγωγής για τη θεραπευτική αντιμετώπιση του υποτροπιάζοντος πτερυγίου.

#### 4. Συμπεράσματα

Η LOH είναι συχνό εύρημα στα εξετασθέντα πτερύγια, ιδίως στις περιοχές 9p και 17q, ενώ η MI ασύνηθες. Τέτοιου είδους γενετικές βλάβες δεν παρατηρούνται σε παρακείμενο φαινοτυπικά φυσιολογικό επιπεφυκότα.

Οι ιοί HPV-18 και HSV-1 μπορούν να απομονωθούν από οφθαλμικό πτερύγιο, ενώ ο HPV-18 μπορεί να απομονωθεί και από παρακείμενο φαινοτυπικά φυσιολογικό επιπεφυκότα. Σε ορισμένες περιπτώσεις, οι 2 ιοί συνυπάρχουν στα πτερύγια.

Η ανεύρεση LOH υποδηλώνει γενετική αστάθεια και πιθανή εμπλοκή ογκο-κατασταλτικών γονιδίων στην παθογένεια της νόσου, ενώ δεν μπορεί να διευκρινιστεί με βάση τα τωρινά ευρήματα αν η παρουσία των HPV και HSV είναι δευτερογενής ή αιτιολογικού χαρακτήρα.

Η συσχέτιση της συχνότητας LOH στην περιοχή 9q με το υψόμετρο του τόπου διαβίωσης (και συνεπώς με το επίπεδο έκθεσης στην ηλιακή ακτινοβολία), η αρνητική συσχέτιση με την ηλικία των ασθενών καθώς και η συσχέτιση με τον αριθμό των επεμβάσεων που προηγήθηκαν, υποδηλώνουν πιθανή προγνωστική αξία του ευρήματος αυτού για τη μετεγχειρητική υποτροπή.



Η συσχέτιση της LOH σε ορισμένες περιοχές με την παρουσία των HPV και HSV ενδεχομένως αντικατοπτρίζει γενετική βλάβη που σχετίζεται με την παρουσία των ιών αυτών, ενώ η συσχέτιση της μετεγχειρητικής υποτροπής με τη συνλοίμωξη από HSV και HPV, στην περίπτωση που με περαιτέρω έρευνα υπάρξουν ενδείξεις ότι είναι αιτιολογικού χαρακτήρα, θα μπορούσε να δικαιολογήσει τη διερεύνηση του πιθανού ρόλου αντικής αγωγής στην αντιμετώπιση του πτερυγίου.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Duke-Elder S: System of Ophthalmology, Vol 8, Diseases of the Outer Eye, p573. St. Louis, CV Mosby, 1965.
2. Pterygium. Vol 6, Chapt 35, p:1-10. In: Duane's Ophthalmology. Tasman W, Jaeger E (eds). 1994, Philadelphia., J.B.Lippincott (co).
3. M.T. Coroneo. Pterygium as an early indicator of ultraviolet insolation : A hypothesis. Br J Ophthalmol 1993; 77: 734-739.
4. Dake Y, Mukae R, Soda Y et al: Immunohistochemical localization of collagen types I, II, III, and IV in pterygium tissues. Acta Histochem 1989;87:71-74.
5. Forsius H, Eriksson A: Pterygium and its relation to arcus senilis, pinguecula and other similar conditions. Acta Ophthalmol 1962 ;40:402.
6. Mackenzie FD, Hirst LW, Battistutta D, Green A: Risk analysis in the development of pterygia. Ophthalmology 1992;99:1056-1061.
7. Markakis, G. Le pterygion en Crete (Etude de facteurs etiopathogeniques). 3<sup>rd</sup> International Congress of Geographical Ophthalmology. Cadix, Spain. 1973.

8. Adamis AP, Starck T, Kenyon KR: The management of pterygium. *Ophthalmol Clin North Am* 1990;3:611.
9. Lin S, Reiter K, Dreher AW et al: The effect of pterygia on contrast sensitivity and glare disability. *Am J Ophthalmol* 1989;107:407-410.
10. Gans L. Surgical treatment of pterygium. In: Belin MW, editor. *Focal Points. Clinical modules for Ophthalmologists*. Vol. XIV, Number 12. 1996. San Francisco. American Academy of Ophthalmology.
11. Jaros PA, DeLuise VP: Pingueculae and pterygia. *Surv Ophthalmol* 1988;33:41-49.
12. Char D: Corneal tumors. In: Smolin G, Thoft RA (eds): *The Cornea*, p 499. 1987. Boston, Little, Brown & Co.
13. Austin P, Jakobiec FA, Iwamoto T: Elastodysplasia and elastodystrophy as the pathologic bases of ocular pterygia and pinguecula. *Ophthalmology* 1983;90:96-109.
14. Spencer WH, Zimmerman LE: Conjunctiva. In Spencer WH (ed): *Ophthalmic Pathology*, vol 1, p 174. 1985. Philadelphia, WB Saunders.
15. Cogan DG, Kuwabara T, Howard J: The nonelastic nature of pingueculas. *Arch Ophthalmol* 61:388, 1959.
16. Daroczy J, Vajda K, Kiraly K: Study of the ultrastructure of normal and pathologic human dermal elastic fibre. In Robert L (ed): *Frontiers of Matrix Biology*, Vol 4, *Studies on the Biology and Pathology of Skin*, p 122. 1977. Basel. Karger.
17. Hogan MJ, Alvarado J: Pterygium and pinguecula: Electron microscopic study. *Arch Ophthalmol* 1967;78:174-186.
18. Townsend WM: Pterygium. In Kaufman HE, McDonald MB, Barron BA et al (eds): *The Cornea*, p 461. 1988. New York. Churchill Livingstone.
19. Cameron ME: *Pterygium Throughout the World*, p 141. 1965. Springfield, IL. Charles C Thomas.

20. Cameron ME: The treatment of beta irradiation necrosis of the sclera. *Aust J Ophthalmol* 1978;6:86.
21. Goldman KN, Kaufman HE: Atypical pterygium. A clinical feature of Terrien's marginal degeneration. *Arch Ophthalmol* 1978; 96:1027-1029.
22. Kawano K, Uehara F, Ohba N: Lectin-cytochemical study on epithelial mucus glycoprotein of conjunctiva and pterygium. *Exp Eye Res* 1988;47:43-51.
23. Kaneko M, Takaku I, Katsura N: Glycosaminoglycans in pterygium tissues and normal conjunctiva. *Jpn J Ophthalmol* 1986;30:165-173.
24. Kaneko M: Proteoglycans from pterygium tissues. *Ophthalmic Res* 1987;19:170-177.
25. Taylor HR, West SK, Rosenthal FS et al: Corneal changes associated with chronic UV irradiation. *Arch Ophthalmol* 1989;107:1481-1484.
26. Kerkenezov A. A pterygium survey of the far north east of New South Wales. *Trans Ophthalmol Soc Aust.* 1956;16:110-119.
27. Hammer H, Korom I. Photodamage of the conjunctiva in patients with porphyria cutanea tarda. *Br J Ophthalmol* 1992;76:592-593.
28. Fletcher DC, Romanchuk KG, Lane PR. Conjunctivitis and pterygium associated with the American Indian type polymorphous light eruption. *Can J Ophthalmol* 1988;23:30-33.
29. El-Hefnawi H, Mortada A. Ocular manifestations of xeroderma pigmentosum. *Br J Dermatol* 1965;77:261-276.
30. Hilgers JHC: Pterygium: Its incidence, heredity and etiology. *Am J Ophthalmol* 50:635, 1960.
31. Detels R, Dhir SP: Pterygium: A geographical study. *Arch Ophthalmol* 1967;78:485-91.
32. Diponegoro RMA, Mulock-Houwer AW. A statistical contribution to the study of the aetiology of pterygium. *Folia Ophthalmol Orient* 1936;2:195-210.
33. Kadayifcilar SC, Orhan M, Irkec M. Tear functions in patients with pterygium. *Acta Ophthalmol* 1998;76:176-179.

34. Biender B, Biger Y, Rothkoff L, Sachs U. Pterygium and basic tear secretion. *Ann Ophthalmol* 1979;11:1235-1236.
35. Taylor HR. Studies on the tear film in climatic droplet keratopathy. *Arch Ophthalmol* 1980;98:86-88.
36. Eliot R. The etiology of pterygium. *Trans Ophthalmol Soc NZ* 1961;13:22-41.
37. Pico G. Pterygium-current concepts on the etiology and management, p:280-291. In: King JH, Mc Tigue JW (editors). *The cornea. World Congress, 1965. Washington. Butterworth.*
38. Finger PT, Curtin BJ, Packer S, Svitra PP, Iwamoto T, Whitmore WG, et al. Scleral hyperplasia induced by heat. *Am J Ophthalmol* 1986;102:25-32.
39. Ioachim-Velogianni E, Tsironi E, Agnantis N, Datseris G, Psilas K. HLA-DR antigen expression in pterygium epithelial cells and lymphocyte subpopulations: an immunohistochemistry study. *German J Ophthalmol* 1995;4:123-129.
40. Pinkerton OD, Hokama Y, Shigemura L. Immunologic basis for the pathogenesis of pterygium. *Am J Ophthalmol* 1984;98:225-228.
41. Miller D. Light and the cornea and conjunctiva. Chapter 4, p:55-63. In: Miller D, et al (eds). *Clinical light damage to the eye. 1987. New York. Springer Verlag.*
42. Jensen OL. Pterygium, the dominant eye and the habit of closing one eye in the sunlight. *Acta Ophthalmol* 1982;60:568-574.
43. Coroneo MT. Albedo concentration in the anterior eye: a phenomenon that locates some solar diseases. *Ophthalmic Surg* 1990;21:60-66.
44. Cameron ME. Histology of pterygium: An electron microscopic study. *Br J Ophthalmol* 1983;67:604-608.
45. Cilova-Atanasovsa B. Histological and histochemical changes of epithelium, basement membrane and Bowman's membrane in the avascular corneal part of pterygium. *Folia Med* 1968;10:23-26.

46. Zigman S, Vaughan T. Near-ultraviolet light effects on the lenses and retinas of mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1974;13:462-465.
47. Chen JJY, Tseng SCG. Corneal epithelial wound healing in partial limbal deficiency. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990;31:1301-1314.
48. Ley RD, Applegate LA. Hair growth induction by ultraviolet radiation in the marsupial *Monodelphis domestica*. *Arch Dermatol* 1987;123:1032-1035.
49. Blum HF. Hyperplasia induced by ultraviolet light: possible relationship to cancer induction. In: Urbach F (ed). *The biologic effects of ultraviolet radiation (with emphasis on the skin)*. p:83-89. 1969, Oxford, Pergamon Press.
50. Kwok LS, Coroneo MT. A model for pterygium formation. *Cornea* 1994;13:219-224.
51. Spandidos DA, Xinarianos G, Ergazaki M, Giannoudis A, Tsambarlakis J : The presence of herpesvirus in pterygium. *Int J Oncol* 1994;5:749-752.
52. Varinli S, Varinli I, Koksali Erkisi M, Doran F: Human papillomavirus in pterygium. *Centr Afr J Med* 1994;40:24-26.
53. Chen JK, Tsai RJ, Lin SS. Fibroblasts isolated from human pterygia exhibit transformed cell characteristics. *In vitro cell dev biol anim* 1994;30A:243-248.
54. Degrassi M, Piantanida A, Nucci P: Unexpected histological findings in pterygium. *Optom Vis Sci* 1993;70:1058-1060.
55. McDonnell JM, Mayr AJ, Martin WJ: DNA of human papillomavirus type 16 in dysplastic and malignant lesions of the conjunctiva and cornea. *N Engl J Med* 1989;320:1442-1446.
56. Spandidos DA, Sourvinos G, Kiaris H, Tsambarlakis J. Microsatellite instability and loss of heterozygosity in human pterygia. *Br J Ophthalmol* 1997; 81:493-496.
57. Gibson JBC: Brisbane surgery of pterygium. *Trans Ophthalmol Soc Aust* 1956;16:125.
58. Rich AM, Keitzman B, Payne T et al: A simplified way to remove pterygia. *Ann Ophthalmol* 1974;6:739-742.

59. Sugar HS: A surgical treatment for pterygium based on new concepts as to its nature. *Am J Ophthalmol* 1949;32:912.
60. Tomas T: Sliding flap of conjunctival limbus to prevent recurrence of pterygium. *Refract Corneal Surg* 1992;8:394-395.
61. Stocker FW: Operation for removal of pterygium. *Arch Ophthalmol* 1942;27:925.
62. Kenyon KR, Wagoner MD, Hettinger ME: Conjunctival autograft transplantation for advanced and recurrent pterygium. *Ophthalmology* 1985;92:1461.
63. Rivaud C, Vingtain P, Cozette P et al: Autografts in pterygium surgery: Techniques and results. *J Fr Ophthalmol* 1986;9:217.
64. Moore TE: Keratoplasty. In Leibowitz HM (ed): *Corneal Disorders*, p 530. 1984. Philadelphia. WB Saunders.
65. Youngson RM: Recurrence of pterygium after excision. *Br J Ophthalmol* 1972;56:120.
66. Insler MS, Caldwell DR, Leach DH: Pterygium. In Brightbill FS (ed): *Corneal Surgery*, p336. 1993. St. Louis, CV Mosby.
67. Krag S, Ehlers N: Excimer laser treatment of pterygium. *Acta Ophthalmol* 1992;70:530-533.
68. Herbstein AU, Donovan JK: Pterygium removal. *Br J Ophthalmol* 1968;52:162-165.
69. Liddy BSL, Morgan JF: Triethylene thiophosphoramidate (thio-tepa) and pterygium. *Am J Ophthalmol* 1966; 61:888.
70. Hayasaka S, Noda S, Yamamoto Y et al: Postoperative instillation of low-dose mitomycin C in the treatment of primary pterygium. *Am J Ophthalmol* 1988; 106:715-718.
71. Alaniz-Camino F: The use of postoperative beta radiation in the treatment of pterygia. *Ophthalmic Surg* 1982; 13:1022-1025.
72. Strachan T, Read AP. *Human Molecular Genetics*. 1996. Oxford. Bios Scientific Publishers.
73. Koreth J, O'Leary JJ, McGee J. Microsatellites and PCR genomic analysis. *J Pathol* 1996;178:239-248.

74. Braaten DC, Thomas JR, Little RD, et al. Locations and contexts of sequences that hybridize to poly(dG-dT).(dC-dA) in mammalian ribosomal DNAs and two X-linked genes. *Nucleic Acids Res* 1988;16:865-881.
75. Levinson G, Gutman GA. Slipped strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol Biol Evol* 1987;4:203-221.
76. Charlesworth B, Sniegowski P, Stephan W. The evolutionary dynamics of DNA in eukaryotes. *Nature* 1994;371:215-220.
77. Eischer EM. Sex and trinucleotide repeats. *Nature Genet* 1994;6:221-223.
78. Loeb LA. Microsatellite instability: A marker of a mutator phenotype in cancer. *Cancer Res* 1994;54:5059-5063.
79. Richards RI, Sutherland GR. Dynamic mutations: a new class of mutations causing human disease. *Cell* 1992;70:709-712.
80. Yu S, Pritchard M, Kremer E, et al. Fragile-X genotype characterized by an unstable region of DNA. *Science* 1991;255:1179-1181.
81. Oberle I, Rousseau F, Heitz D, et al. Instability of a 550 base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science* 1991;252:1097-1102.
82. Pieretti M, Zhang F, Fu YH et al. Absence of expression of the FMR-1 gene in fragile X syndrome. *Cell* 1991;66:817-822.
83. Wang YH, Amirhaeri S, Kang S, Wells RD, Griffith JD. Preferential nucleosome assembly at DNA triplet repeats from the myotonic dystrophy gene. *Science* 1994;265:669-671.
84. La Spada AR, Wilson EM, Lubahn DB, Harding AE, Fischbeck KH. Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature* 1991;352:77-79.
85. Nagafuchi S, Yanagisawa H, Sato K et al. Dentatorubral and pallidolucysian atrophy: expansion of an unstable CAG trinucleotide on chromosome 2p. *Nature Genet* 1994; 6:14-18.
86. Beckmann JS, Weber JL. Survey of human and rat microsatellites. *Genomics* 1992;12:627-631.

87. Richards RI, Sutherland GR. Simple repeat DNA is not replicated simply. *Nature Genet* 1994;6:114-116.
88. Gelehrter TD, Collins FS. Principles of Medical genetics. Gardner JN(ed). 1993. Baltimore. Williams & Wilkins.
89. Edwards A, Hammond HA, Jin L, Caskey CT, Chakraborty R. Genetic variation in five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomics* 1992;12:241-253.
90. Mc Pherson MJ, Quirke P, Taylor GR. PCR. A Practical Approach. 1991. Oxford. Oxford University Press.
91. Holland MM, Fischer DL, Lee DA, Bryson CK, Weedn VW. Short tandem repeat loci: application to forensic and human remains identification. *EXS* 1993;67:267-274.
92. Shibata D. Extraction of DNA from paraffin embedded tissues for analysis by polymerase chain reaction: new tricks from an old friend. *Hum Pathol* 1994;25:561-563.
93. Newton CR, Graham A. Instrumentation, reagents, consumables. In: Graham JM, Billington D (eds). PCR. Oxford: Bios Scientific Publishers, 1994;9-25.
94. Vogelstein B, Fearon ER, Kern SE et al. Allelotype of colorectal carcinomas. *Science* 1989;244:207-211.
95. Freireich EJ, Stass AS (eds). *Molecular Basis of Oncology* Blackwell Science. 1995.
96. Spalton, Hitchings, Hunter (eds). *Atlas of Clinical Ophthalmology*. 1994. Wolfe
97. Hoffmann JS, Cazaux C. DNA synthesis, mismatch repair and cancer (Review). *Int J Oncol* 1998;12:377-382.
98. Liu B, Parsons RE, Hamilton SR, Petersen GM, Lynch HT, Watson P, et al. HSMH2 mutations in hereditary nonpolyposis colorectal cancer kindreds. *Cancer Res* 1994;54:4590-4594.
99. Liu B, Nicolaidis N, Markowitz S, Wilson J, Parsons R, Jen J et al. Mismatch repair gene defects in sporadic colorectal cancers with microsatellite instability. *Nat Genet* 1995;9:48-55.



100. Peltomaki P, Aaltonen LA, Sistonen P et al. Genetic mapping of a locus predisposing to human colorectal cancer. *Science* 1993;260:810-812.
101. Arzimanoglou II, Gilbert F, Barber H. Microsatellite instability in Human Solid Tumors. *Cancer* 1988;82:1808-1820.
102. Zur Hausen H. Papillomavirus infections-a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta* 1996;1288:55-78.
103. Galloway DA, McDougall JK Alterations in the cellular phenotype induced by herpes simplex viruses. *J Med Virol* 1990;31:36-42.
104. Ahn JH, Hayward GS The major immediate-early proteins IE1 and IE2 of human cytomegalovirus colocalize with and disrupt PML-associated nuclear bodies at very early times in infected permissive cells. *J Virol* 1997 Jun;71:4599-613.
105. Mutirangura A, Tanunyutthawongese C, Pornthanakasem W, Kerekhanjanarong V, Sriuranpong V, Yenrudi S, Supiyaphun P, Voravud N Genomic alterations in nasopharyngeal carcinoma: loss of heterozygosity and Epstein-Barr virus infection. *Br J Cancer* 1997;76:770-776.
106. Park NH, Li SL, Xie JF, Cherrick HM In vitro and animal studies of the role of viruses in oral carcinogenesis. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1992;28B:145-52.
107. Macnab JC Herpes simplex virus and human cytomegalovirus: their role in morphological transformation and genital cancers. *J Gen Virol* 1987;68:2525-2550.
108. Dhanwada KR, Veerisetty V, Zhu F, Razzaque A, Thompson KD, Jones C Characterization of primary human fibroblasts transformed by human papilloma virus type 16 and herpes simplex virus type 2 DNA sequences. *J Gen Virol* 1992;73:791-799.
109. McDonnell JM, McDonnell PJ, Stout WC et al: Human papillomavirus DNA in a recurrent squamous carcinoma of the eyelid. *Arch Ophthalmol* 1989;107:1631-1634.
110. Lauer SA, Malter JS, Meier JR: Human papillomavirus type 18 in conjunctival intraepithelial neoplasia. *Am J Ophthalmol* 1990;110:23-27.

111. Wistuba II, Montellano FD, Milchgrub S, Virmani AK, Behrens C, Chen H, Ahmadian M, Nowak JA, Muller C, Minna JD, Gazdar AF Deletions of chromosome 3p are frequent and early events in the pathogenesis of uterine cervical carcinoma. *Cancer Res* 1997 ;57:3154-3158.
112. Steenbergen RD, Hermsen MA, Walboomers JM, Meijer GA, Baak JP, Meijer CJ, Snijders PJ Non-random allelic losses at 3p, 11p and 13q during HPV-mediated immortalization and concomitant loss of terminal differentiation of human keratinocytes. *Int J Cancer* 1998;76:412-417.
113. Mutirangura A, Tanunyutthawongese C, Pornthanakasem W, Kerekhanjanarong V, Sriuranpong V, Yenrudi S, Supiyaphun P, Voravud N Genomic alterations in nasopharyngeal carcinoma: loss of heterozygosity and Epstein-Barr virus infection. *Br J Cancer* 1997;76:770-776.
114. Hacker SM, Flowers FP. Squamous cell carcinoma of the skin. Will heightened awareness of risk factors slow its increase? *Postgraduate Medicine* 1993;93:115-126.
115. Kantor GR, Spielvogel RL, Yanoff M. Skin and Lacrimal Drainage System. In: Duane's Ophthalmology. Tasman W, Jaeger E (eds). 1994, Philadelphia., J.B.Lippincott (co).
116. Mortemousque B, Leger F, Brindeau C, Dorot N, Barac'h D, Verin P Actinic keratosis of the conjunctiva. Apropos of a clinical case *J Fr Ophtalmol* 1998 Jun-Jul;21(6):458-61.
117. Brooks Crawford J, Yanoff M, Fine BS. Conjunctiva. In: Duane's Ophthalmology. Tasman W, Jaeger E (eds). 1994, Philadelphia., J.B.Lippincott (co).
118. Rehman I, Quinn AG, Healy E, Rees JL: High frequency of loss of heterozygosity in actinic keratoses, a usually benign disease. *Lancet* 1994;344:788-789.
119. Rehman I, Takata M, Wu YY, Rees JL. Genetic change in actinic keratoses. *Oncogene* 1996;12:2483-2490.
120. Tieben LM, Berkhout RJ, Smits HL, Bouwes Bavinck JN, Vermeer BJ, Bruijn JA, Van der Woude FJ, Ter Schegget J Detection of epidermodysplasia verruciformis-like human papillomavirus types in malignant and premalignant skin lesions of renal transplant recipients. *Br J Dermatol* 1994;131:226-30.

121. Lu S, Syrjanen K, Havu VK, Syrjanen No evidence of human papillomavirus DNA in actinic keratosis. *Arch Dermatol Res* 1995;287:649-651.
122. Ely SA, Powers J, Lewis D, Chang S, Rubio A, O'Leary J, Knowles D Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-positive primary effusion lymphoma arising in the subarachnoid space. *Hum Pathol* 1999;30:981-984.
123. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2<sup>nd</sup> ed. New York, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
124. Rogers BB, Josephson SL, Mak SK: Detection of herpes simplex virus using the polymerase chain reaction followed by endonuclease cleavage. *Am J Pathol* 1991;139:1-6.
125. Nicoll JA, Love S, Burton PA, Berry PJ Autopsy findings in two cases of neonatal herpes simplex virus infection: detection of virus by immunohistochemistry, in situ hybridization and the polymerase chain reaction. *Histopathol* 1994;24:257-64.
126. Snijders PJF, van den Brule AJC, Schrijemakers HFJ, Snow G, Meijer CJLM, 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 Virolol* 1990;71:173-181.
127. Arends MJ, Donaldson YK, Duvall E, Wyllie AM, Bird CC. HPV in full thickness cervical biopsies: high prevalence in CIN2 and CIN3 detected by a sensitive PCR method. *J Pathol* 1991;165:301-309.
128. Wooster R, Cleton-Jansen A, Collins N, Mangion J, Cornelis RS, Gurstrn BA,. Instability of short tandem repeats in human cancers. *Nat Genet* 1994;6:152-156.
129. Eshelman JR, Markowitz SD, Donover PS, Lang EZ, Luterbaugh JD, Li GM et al. Diverse hypermutability of multiple sequence motifs present in a cancer with microsatellite instability. *Oncogene* 1996;12:1425-1432.
130. Orth K, Hung J, Gazdar A, Bowcock A, Mathis M, Shambrook J. Genetic instability in human ovarian cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci* 1994;91:9495-9499.

131. Snell RG, Mc Millan JC , Cheadle JP, Fenton I, Lazarou LP, Davies P et al. Relationship between trinucleotide repeat expansion and phenotypic variation in Huntington's disease. *Nat Genet* 1993;4:393-397.
132. Spandidos DA, Ergazaki M, Arvanitis D and Kiaris H. Microsatellite instability in human atherosclerotic plaques. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;220: 137-140.
133. Kiaris H, Ergazaki M, Spandidos DA. Instability at the H-ras minisatellite is associated with the spontaneous abortion of the embryo. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 214: 788-792.
134. Ogasawara S, Maesava C, Tamura G, Satodate R. Frequent microsatellite alterations on chromosome 3p in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 1995;55:891-894.
135. Beckmann MW, Picard F , An HX , van Roeyen CR , Dominik SI , Mosny DS , Schnurch HG Bender HG , Niederacher D . Clinical impact of detection of loss of heterozygosity of BRCA1 and BRCA2 markers in sporadic breast cancer. *Br J Cancer* 1996;73:1220-1226.
136. Kim SK , Ro JY , Kemp BL , Lee JS , Kwon TJ , Fong KM, Sekido Y, Minna JD, Hong WK Mao L . Identification of three distinct tumor suppressor loci on the short arm of chromosome 9 in small cell lung cancer. *Cancer Res* 1997 ; 57:400-403.
137. Shibagaki I , Shimada Y, Wagata T , Ikenaga M, Imamura M, Ishizaki K . Allelotype analysis of esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 1994; 54:2996-3000.
138. Thrash-Bingham CA, Salazar H, Freed JJ, Greenberg RE, Tartof KD. Genomic alterations and instabilities in renal cell carcinomas and their relationship to tumor pathology. *Cancer Res* 1995; 55: 6189-6195.
139. Simoneau AR , Spruck CH 3<sup>rd</sup>, Gonzalez-Zulueta M , Gonzalgo ML, Chan MF, Tsai YC, Dean M, Steven K , Horn T Jones PA. Evidence for two tumor suppressor loci associated with proximal chromosome p to q and distal chromosome q in bladder cancer and the initial screening for GAS1 and PTC mutations. *Cancer Res* 1996 ; 56:5039-5043.

140. Quinn AG , Sikkink S, Rees JL. Delineation of two distinct deleted regions on chromosome 9 in human non-melanoma skin cancers. *Genes Chromosomes Cancer* 1994; 11:222-225.
141. Chaganti SR, Gaidano G, Louie DC, Dalla-Favera R, Chaganti RS. Diffuse large cell lymphomas exhibit frequent deletions in 9p21-22 and 9q31-34 regions. *Genes Chromosomes Cancer* 1995; 12:32-36.
142. Tan DT, Lim AS, Goh HS, Smith DR. Abnormal Expression of the P53 Tumor Suppressor Gene in the Conjunctiva of Patients with Pterygium. *Am J Ophthalmol* 1997;123:404-405.
143. Baud E, Catilina P, Boiteux JP, Bignon YJ. Human Bladder cancers and normal bladder mucosa present the same hot spot of heterozygous chromosome-9 deletion. *Int J Cancer* 1998;77:821-824.
144. Deng C, Zlotnikov G, Thor AD, Smith HS. Loss of heterozygosity in Normal tissue adjacent to breast carcinoma. *Science* 1996;274:2057-2059.
145. VP Kozobolis, ET Detorakis, G Sourvinos, IG Pallikaris, DA Spandidos Loss of Heterozygosity in pseudoexfoliation syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:1255-1260.
146. Healy E, Belgaid C, Takata M, Harrison D, Zhu NW, Burd DA, Rigby HS, Matthews JN, Rees J Prognostic significance of allelic losses in primary melanoma. *Oncogene* 1998 ;16:2213-2218.
147. Wagner E, Anderson K, Costa R et al: Isolation and characterization of HSV-1 mRNA. In Becker Y (ed): *Herpesvirus DNA: Developments in Molecular Virology*, Vol 1, pp 45-67. The Hague, Martinus Nijhoff, 1981.
148. Honess RW, Roizman B: Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. Part 1. Cascade regulation of synthesis of viral proteins. *J Virol* 1974;14:8.
149. Yamakawa Y, Forslund O, Chua KL, Dillner L, Boon ME, Hansson BG Detection of the BC 24 transforming fragment of the herpes simplex virus type 2 (HSV-2) DNA in cervical carcinoma tissue by polymerase chain reaction (PCR). *APMIS* 1994;102:401-406.

150. Pavan-Langston D: Ocular viral diseases. In Galasso GJ et al (eds): Antiviral Agents and Viral Diseases of Man, p:207-245.1984, New York , Raven Press.
151. Stevens JG, Nesburn AB et al: Latent herpes simplex virus from trigeminal ganglia of rabbits with recurrent eye infection. Nature 1972;235:216.
152. Sabbaga EMH, Dunkel EC, Pavan-Langston D et al: Detection of HSV nucleic acid sequences in the cornea during acute and latent ocular disease. Exp Eye Res 1988;47:545.
153. Hill TJ, Blyth WA: An alternative theory of herpes simplex recurrence and a possible role for prostaglandins. Lancet 1976;1:397.
154. Green MT, Rosborough JP, Dunkel EC: In vivo reactivation of herpes simplex virus in rabbit trigeminal ganglia: Electrode model. Infect Immun 1981; 34:69.
155. Maggs DJ, Chang E, Nasisse MP, Mitchell WJ Persistence of herpes simplex virus type 1 DNA in chronic conjunctival and eyelid lesions of mice. J Virol 1998;72:9166-72.
156. Oh OJ. Human papillomavirus. In: Duane's Ophthalmology. Tasman W, Jaeger E (eds). 1994, Philadelphia., J.B.Lippincott (co).
157. Bedell MA, Jones KH, Laimins LA. The E6-E7 region of human papillomavirus type 18 is sufficient for transformation of NIH 3T3 and Rat- I cells. 1987; J Virol 61:3635.
158. zur Hausen H, Schneider A: The role of papillomavirus in human anogenital cancer. In Salzman NP, Honley PM (eds): The Papovaviridae: The Papillomavirus. New York, Plenum, 1987.
159. Collina G, Rossi E, Bettelli S, Cook MG, Cesinaro AM, Trentini GP Am J Detection of human papillomavirus in extragenital Bowen's disease using in situ hybridization and polymerase chain reaction. Dermatopathol 1995;17:236-241.
160. Lauer SA, Malter JS, Meier JR: Human papillomavirus type 18 in conjunctival intraepithelial neoplasia. Am J Ophthalmol 1990;110:23-27.
161. Koffa M, Koumantakis E, Ergazaki M, Malamou-Mitsi V, Spandidos DA. Detection of ras mutations and HPV in lesions of the human female reproductive tract. Int J Oncol 1994;5:189-195.

162. Dokianakis DN, Sourvinos G, Sakkas S, Athanasiadou E, Spandidos DA. Detection of HPV and ras gene mutations in cervical smears from female genital lesions. *Oncology Reports* 1998;5:1195-1198.
163. Gailani MR, Leffell DJ, Ziegler A, Gross EG, Brash DE, Bale AE. Relationship between sunlight exposure and a key genetic alteration in basal cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1996 ; 88:349-354.
164. Gordon KB, Thompson CT, Char DH, O'Brien JM, Kroll S, Ghazvini S, Gray JW. Comparative genomic hybridization in the detection of DNA copy number abnormalities in uveal melanoma. *Cancer Res* 1994; 54:4764-4768.
165. Hecht F, Shoptaugh MG . Winglets of the eye: dominant transmission of early adult pterygium of the conjunctiva. *J Med Genet* 1990; 27:392-394.
166. Kaimbo K Surgical treatment of pterygium: 42 cases of excision. *J Fr Ophtalmol* 1988; 11: 335-338.
167. Purdie CA, Piris J ,Bird CC, Wyllie AH .17q allele loss is associated with lymph node metastasis in locally aggressive human colorectal cancer. *J Pathol* 1995; 175:297-302.
168. Mitsudomi T, Oyama T, Nishida K , Ogami A, Osaki T , Sugio K, Yasumoto K , Sugimachi K , Gazdar AF. Loss of heterozygosity at 3p in non-small cell lung cancer and its prognostic implication. *Clin Cancer Res* 1996; 2:1185-1189.
169. Cunningham C, Dunlop MG, Wyllie AH , Bird CC. Deletion mapping in colorectal cancer of a putative tumour suppressor gene in 8p22-p21.3. *Oncogene* 1993 ; 8:1391-1396.
170. Rohrbach IM, Starc S, Knorr M. Predicting recurrent pterygium based on morphologic and immunohistologic parameters. *Ophthalmologe* 1995; 92: 463-468.
171. Zhang J An investigation of aetiology and heredity of pterygium. Report of 11 cases in a family. *Acta Ophthalmol* 1987;65:413-436.

172. Waddell KM, Lewallen S, Lucas SB, Atenyi-Agaba C, Herrington CS, Liomba G. Carcinoma of the conjunctiva and HIV infection in Uganda and Malawi. *Br J Ophthalmol* 1996;80:503-508.
173. Ramoz N, Rueda LA, Bouadjar B, Favre M, Orth G A susceptibility locus for epidermodysplasia verruciformis, an abnormal predisposition to infection with the oncogenic human papillomavirus type 5, maps to chromosome 17qter in a region containing a psoriasis locus. *J Invest Dermatol* 1999;112:259-263.
174. Mamuris Z, Aurias A, Dutri llaux Identification of a break-prone structure in the 9q1 heterochromatic region. *Hum Genet* 1991;86:261-264.



**Πίνακας 1.** Μικροδορυφορικοί δείκτες που εξετάστηκαν και σχετιζόμενα γονίδια ή κλινικές καταστάσεις

<b>Μικροδορυφορικός δείκτης</b>	<b>Εντόπιση</b>	<b>Αναφερόμενη σύνδεση με γονίδια ή παθολογικές καταστάσεις</b>
thra1	17q11.2-q12	thyroid hormone receptor, NGF receptor
D17S579	17q21	BRCA1, adhalin, metalloprotease-like gene
D17S855	17q21	BRCA1, adhalin, metalloprotease -like gene
TP53	17pter-p11.22	p53, Charcot-Marie-Tooth syndrome
D17S515	17p13	p53 tumour antigen gene, retinal guanylate cyclase gene, phosphatidylinositol transfer protein gene, beta-arrestin 2 gene, RPE-derived factor gene, recoverin gene
D17S678	17p13	p53 tumour antigen gene, retinal guanylate cyclase gene, phosphatidylinositol transfer protein gene
D13S155	13q14.3-q21.2	Rb, CLN5
D13S168	13q14.3	Rb, BRCA2
D13S175	13q11	Rb, BRCA2
D9S59	9q31-q33	Multiple self healing epitheliomata, Tangier
D9S112	9q31-q34	Multiple self healing epitheliomata, Tangier
D9S109	9q31	Multiple self healing epitheliomata, Tangier
HXB	9q32-q34	Tear Lipocalin gene, Torsion dystonia, Xeroderma Pigmentosum A
D9S290	9q32-q34.1	Tear Lipocalin gene, Torsion dystonia, Xeroderma Pigmentosum A
D9S50	9p21	p16, melanoma susceptibility locus
D9S270	9p23-p22	Friedrich's ataxia, p16, melanoma susceptibility locus
D9S144	9pter-p22	Friedrich's ataxia, p16, melanoma susceptibility locus
D3S1100	3p22-21.3	c-erbA2, serine threonine kinase gene
D3S1260	3p24.2-22	c-erbA2, COLQ
D3S1298	3p24.2-23	c-erbA2, COLQ

**Πίνακας 2.** Συχνότητα LOH και MI για τους εξετασθέντες δείκτες μικροδορυφορικού DNA (\*)

Μικροδορυφορικός δείκτης	Εντόπιση	H (n, %)	O (n, %)	LOH (n, %)	MI (n, %)
thra1	17q11.2-q12	41 (82%)	0	8 (16%)	1 (2%)
D17S579	17q21	44 (88%)	1 (2%)	5 (10%)	0
D17S855	17q21	37 (74%)	0	13 (26%)	0
TP53	17pter-p11.22	44 (88%)	0	5 (10%)	1 (2%)
D17S515	17p13	47 (94%)	0	3 (6%)	0
D17S678	17p13	49 (98%)	0	1 (2%)	0
D13S155	13q14.3-q21.2	49 (98%)	1(2%)	0	0
D13S168	13q14.3	41 (82%)	0	9 (18%)	0
D13S175	13q11	41 (82%)	0	9 (18%)	0
D9S59	9q31-q33	42 (84%)	0	8 (16%)	0
D9S112	9q31-q34	46 (92%)	0	4 (8%)	0
D9S109	9q31	39 (78%)	0	11 (22%)	0
HXB	9q32-q34	34 (68%)	7 (140%)	9 (18%)	0
D9S290	9q32-q34.1	40 (80%)	1 (2%)	9 (18%)	0
D9S50	9p21	38 (76%)	0	11 (22%)	1 (2%)
D9S270	9p23-p22	42 (84%)	0	8 (16%)	0
D9S144	9pter-p22	39 (78%)	0	11 (22%)	0
D3S1100	3p22-21.3	43 (86%)	1 (2%)	6 (12%)	0
D3S1260	3p24.2-22	34 (68%)	2 (4%)	15 (30%)	0
D3S1298	3p24.2-23	35 (70%)	2 (4%)	11 (22%)	0

H: Heterozygous    LOH: Loss of Heterozygosity  
O: Homozygous    MI: Microsatellite Instability

**Πίνακας 3.** Συχνότητα LOH και MI για τις εξετασθείσες χρωμοσωμικές περιοχές

ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΟ ΣΚΕΛΟΣ	Αριθμός εξετασθέντων δεικτών	LOH (n,%)	LOH/δείκτη	MI (n,%)
17q	3	21 (42%)	7	1 (2%)
17p	3	14 (28%)	4.6	1 (2%)
13q	3	14 (28%)	4.6	0
9q	5	26 (52%)	5.2	0
9p	3	24 (48%)	8	1 (2%)
3p	3	19 (38%)	6.3	0

**Πίνακας 4.** Συχνότητα ανεύρεσης των ιών που εξετάστηκαν

<b>ΙΟΣ</b>	<b>Θετικά δείγματα πτερυγίου (n,%)</b>	<b>Θετικά δείγματα επιπεφυκότα (n,%)</b>
HPV	12 (24%)	4 (8%)
HSV	11 (22%)	0