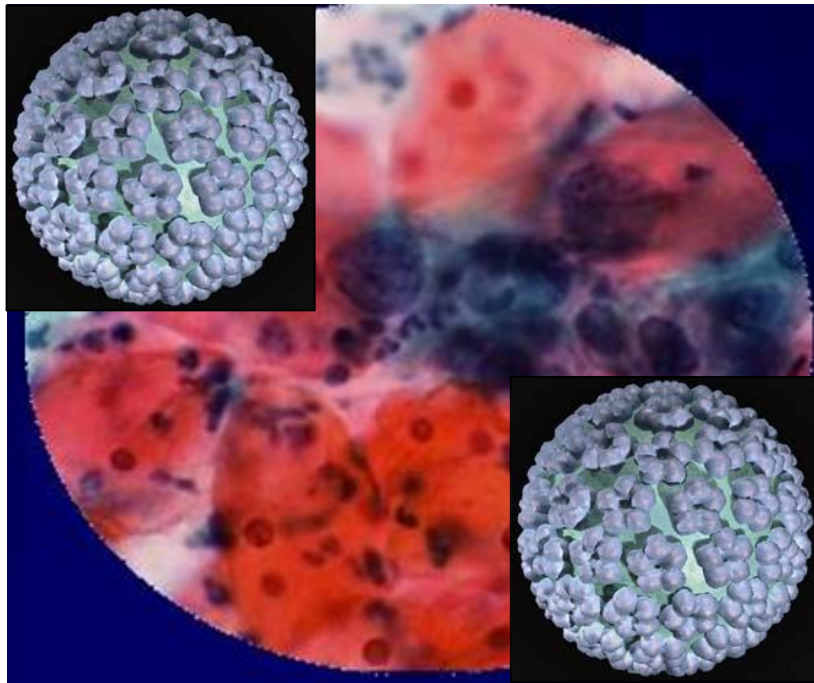




ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
Α' ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΑΝΔΡΕΑΣ ΛΑΖΑΡΗΣ

ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΠΟΡΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΩΝ ΜΟΡΙΩΝ
p16/cyclinD1/p53/MDM2 ΣΤΟ ΚΟΛΠΟΤΡΑΧΗΛΙΚΟ ΕΠΙΘΗΛΙΟ
ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΗΡV ΠΡΟΣΒΟΛΗ ΤΟΥ



ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
υπό του
ΓΕΩΡΓΙΟΥ Η. ΜΕΤΑΞΑ
Ειδ/νου Χειρουργού - Γυναικολόγου
ΑΘΗΝΑ 2020

**«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα»
(Οργανισμός του Πανεπιστημίου Αθηνών, αρθρ 202, παρ 2, Ν.5343/32)**

**Ημερομηνία κατάθεσης αίτησης: 19/08/2015
Ημερομηνία καθορισμού τριμελούς επιτροπής: 23/03/2016
Ημερομηνία ορισμού θέματος: 20/04/2016
Ημερομηνία 1^{ης} έκθεσης προόδου: 08/03/2017
Ημερομηνία 2^{ης} έκθεσης προόδου: 26/03/2018
Ημερομηνία κατάθεσης της διατριβής: 19/05/2021**

ΜΕΛΗ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

- 1. ΑΝΔΡΕΑΣ ΛΑΖΑΡΗΣ, Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής, Δντης Α Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής (Επιβλέπων)**
- 2. ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΚΑΒΑΝΤΖΑΣ, Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής**
- 3. ΕΥΣΤΡΑΤΙΟΣ ΠΑΤΣΟΥΡΗΣ, Ομ. Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής**

ΜΕΛΗ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

- 4. ΑΦΡΟΔΥΤΗ ΝΟΝΝΗ, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής**
- 5. ΧΑΡΙΚΛΕΙΑ ΓΑΚΙΟΠΟΥΛΟΥ, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής**
- 6. ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΑΓΡΟΓΙΑΝΝΗΣ, Αναπληρωτής καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής**
- 7. ΓΕΩΡΓΙΑ ΘΩΜΟΠΟΥΛΟΥ, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής**

ΟΡΚΟΣ

ΟΜΝΥΜΙ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΙΗΤΡΟΝ ΚΑΙ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑΝ
ΚΑΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ ΠΑΝΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΠΑΣΑΣ, ΙΣΤΟΡΑΣ
ΠΟΙΕΥΜΕΝΟΣ, ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ
ΕΜΗΝ ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΣΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ ἩΓΗΣΕΣΘΑΙ
ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΞΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗ,
ΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΩΣΕΣΘΑΙ ΚΑΙ ΧΡΕΩΝ ΧΡΗΖΟΝΤΙ
ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΕΣΘΑΙ, ΚΑΙ ΤΕΝΟΣ ΤΟ ΕΞ ΕΩΥΤΟΥ ΑΔΕΛ-
ΦΟΙΣ ΙΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝΕΕΙΝ ἈΡΡΕΣΙ, ΚΑΙ ΔΙΔΑΞΕΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ
ΤΑΥΤΗΝ, ΗΝ ΧΡΗΖΩΣΙ ΜΑΘΗΤΕΙΝ, ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΣΥΓ-
ΓΡΑΦΗΣ, ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΗΣ ΤΕ ΚΑΙ ΑΚΡΟΗΣΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΛΟΙΠΗΣ
ΑΠΑΣΗΣ ΜΑΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΕΣΘΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣ
ΚΑΙ ΤΟΙΣ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΔΑΞΑΝΤΟΣ ΚΑΙ ΜΑΘΗΤΗΣΙ ΣΥΓΓΕΓΡΑΜ-
ΜΕΝΟΙΣΙ ΤΕ ΚΑΙ ΟΡΚΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΩ, ΙΗΤΡΙΚΩ, ἈΛΛΩ ΔΕ ΟΥΔΕΝΙ.
ΔΙΑΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ' ὈΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ ΚΑΤΑ
ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙ ΔΗΛΗΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΗ, ΕΙΡΕΕΙΝ.
ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙ-
ΜΟΝ ΟΥΔΕ ΥΦΗΓΗΣΟΜΑΙ ΣΥΜΒΟΥΛΙΚΗΝ ΤΟΙΗΝΔΕ ὈΜΟΙΩΣ ΔΕ
ΟΥΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΙΟΝ ΔΩΣΩ. ΑΓΝΩΣ ΔΕ ΚΑΙ ΟΣΙΩΣ
ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ, ΟΥ ΤΕΜΕΩ
ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΛΙΘΙΩΝΤΑΣ, ΕΚΧΩΡΗΣΩ ΔΕ ΕΡΓΑΤΗΣΙΝ ἈΝΔΡΑΣΙ
ΠΡΗΒΙΟΣ ΤΗΣΔΕ, ΕΞ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ἈΝ ΕΣΙΩ, ΕΞΕΛΕΥΣΟΜΑΙ
ΕΠ' ὈΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤΟΣ ΕΩΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΣΙ-
ΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΙΗΣ ΤΗΣ ΤΕ ἈΛΛΗΣ ΚΑΙ ΑΦΡΟΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ ΕΠΙ
ΤΕ ΓΥΝΑΙΚΕΙΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ἈΝΔΡΩΩΝ, ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΤΕ ΚΑΙ
ΔΟΥΛΩΝ, Ἀ ΔΕ ΑΙΙ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΗ, Η ΙΔΩ Η ΑΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ
ΘΕΡΑΠΕΙΗΣ ΚΑΤΑ ΒΙΟΝ ἈΝΘΡΩΠΩΝ, Ἀ ΜΗ ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΛΑ-
ΛΕΙΣΘΑΙ ΕΞΩ, ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ, ἈΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟΙ-
ΑΥΤΑ, ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΕΟΝΤΙ, ΚΑΙ
ΜΗ ΣΥΓΧΕΟΝΤΙ, ΣΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ ΔΟΞΑ-
ΖΟΜΕΝΩ, ΠΑΡΑ ΠΑΣΙΝ ἈΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΙΣ ΤΟΝ ΑΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ
ΠΑΡΑΒΑΙΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΟΥΝΤΙ, ΤΑΝΑΤΙΑ ΤΟΥΤΕΩΝ

Αντί Προλόγου

Ευχαριστίες

Ο υποφαινόμενος συγγραφέας της εν λόγω Διδακτορικής Διατριβής επιθυμεί να ευχαριστήσει θερμά όλους όσους την βοήθησαν στην πραγματοποίηση της έρευνας και κυρίως τους :

Λάζαρη Ανδρέα, Καθηγητή Παθολογικής Ανατομικής, Δντης Α Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής (Επιβλέπων)

Καβαντζά Νικόλαο, Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής και

Πατσούρη Ευστράτιο, Ομ. Καθηγητή Παθολογικής Ανατομικής

Τσιάμπα Ευάγγελο, Κυτταρολόγο, MD, MSc, PhD, Επιστημονικό Συνεργάτη Κυτταρολογίας-Μοριακής Βιολογίας Α' Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

Βηλαρά Γεώργιο, Τεχνολόγο Α' Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

Αφιερώνεται

Στους

Πατέρα μου, Ηλία Μεταξά, Μαιευτήρα Γυναικολόγο, ο οποίος αποτέλεσε πηγή έμπνευσης και φωτεινό παράδειγμα στο δρόμο της επιστήμης και αλλά και της ζωής.

Μητέρα μου, Ευαγγελία Λαλιώτου, η οποία με την αγάπη, τη στοργή και την καθοδήγησή της συνέβαλε στο να γίνω, εγώ.

Σύντροφό μου, Χωριάτη Ευαγγελία, η οποία στέκεται δίπλα μου και στηρίζει τα βήματα μου με αγάπη, εμπιστοσύνη και κατανόηση.

Έχοντας πλήρη επίγνωση των συνεπειών του νόμου περί πνευματικής ιδιοκτησίας, δηλώνω ότι είμαι αποκλειστικός/ή συγγραφέας της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Δηλώνω, επίσης, ότι αναλαμβάνω όλες τις συνέπειες, όπως αυτές νομίμως ορίζονται, στην περίπτωση που διαπιστωθεί διαχρονικά ότι η εργασία μου αυτή ή τμήμα αυτής αποτελεί προϊόν λογοκλοπής.

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ (CV)

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

- **Φεβ 2019- Αυγ. 2020:** Ειδικευόμενος Μαιευτικής-Γυναικολογίας στην Α Μ/Γ κλινική του Π.Γ.Ν.Α “ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ”
Διευθυντής κλινικής: καθ. ΡΟΔΟΛΑΚΗΣ Αλέξανδρος
- **Δεκ 2017- Φεβ. 2019:** Ειδικευόμενος για **14 μήνες** στη Γενική Χειρουργική στην Α Χειρουργική κλινική του Γενικού Ογκολογικού Νοσοκομείου Κηφισιάς «Άγιοι Ανάργυροι»
Διευθυντής κλινικής: ΧΑΤΖΑΚΗΣ Δημήτριος
- **Μάιος 2017- Οκτ 2017:** Ειδικευόμενος για **6 μήνες** στη Μαιευτική και Γυναικολογία στο Νοσοκομείο του Simone Veil Eaubonne-Montmorency «Simone Veil» , Παρίσι, Γαλλία (Νοσοκομείο επιπέδου 2β)
Διευθυντής κλινικής: Dr VILLEFRANQUE Vincent
- **Νοεμ 2016- Απρ 2017:** Ειδικευόμενος για **6 μήνες** στη Μαιευτική και Γυναικολογία στο Νοσοκομείο του Marne La Vallee στο Παρίσι, Γαλλία. (Νοσοκομείο επιπέδου 2β με 3600 τοκετούς/έτος)
Διευθυντής κλινικής: Dr WAFO Estelle
- **Μάιος 2016- Οκτ 2016:** Ειδικευόμενος για **6 μήνες** στη Μαιευτική και Γυναικολογία στο Νοσοκομείο του Marne La Vallee στο Παρίσι, Γαλλία. (Νοσοκομείο επιπέδου 2β με 3600 τοκετούς/έτος)
Διευθυντής κλινικής: Dr WAFO Estelle
- **Νοεμ 2015- Απρ 2016:** Ειδικευόμενος για **6 μήνες** στη Μαιευτική και Γυναικολογία στο Νοσοκομείο του Pontoise «Rene Dubos» στο Παρίσι, Γαλλία. (Νοσοκομείο επιπέδου 3 με 5000 τοκετούς/έτος)
Διευθυντής κλινικής: Καθ. PONCELET Christoff
- **Μάιος 2015- Οκτ 2015:** Ειδικευόμενος για **6 μήνες** στη Μαιευτική και Γυναικολογία στο Νοσοκομείο του Pontoise «Rene Dubos» στο Παρίσι, Γαλλία. (Νοσοκομείο επιπέδου 3 με 5000 τοκετούς/έτος)
Διευθυντής κλινικής: Dr MURAY Jean-Michel
- **Φεβ 2015- Απρ 2015:** Τρεις μήνες πρακτικής άσκησης (stage) στην Παιδιατρική στα πλαίσια της ειδικότητας της Γενικής Ιατρικής στο Νοσοκομείο της Dunkerque (Centre Hospitalier de Dunkerque), Γαλλία
- **Νοέμ 2014- Ιαν 2015:** Τρεις μήνες πρακτικής άσκησης στη Μαιευτική και Γυναικολογία στα πλαίσια της Γενικής Ιατρικής στην Polyclinique de Grande Synthe στη Dunkerque, Γαλλία.
- **Μάιος 2014:** Επιτυχία στις εξετάσεις κατάταξης για ιατρική ειδικότητα στη Γαλλία (Épreuves Classantes Nationales, ECN) που πραγματοποιήθηκαν στη Μασσαλία.

ΣΠΟΥΔΕΣ

- **2018-2019:** Πανεπιστημιακό Δίπλωμα ενός χρόνου με θέμα Γυναικολογία της υπογονιμότητας και τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής από το

πανεπιστήμιο Paris Descartes - "Gynécologie de l'infertilité et AMP : Préserver la fertilité des patients".

- **2017-2018:** Πανεπιστημιακό Δίπλωμα στη **Λαπαροσκόπηση Χειρουργική** με πιστοποίηση ευρωπαϊκής αναγνώρισης από το Διεθνές Κέντρο Ενδοσκοπικής Χειρουργικής του Clermont- Ferrand, Γαλλία.
Centre International de Chirurgie Endoscopique- CICE (επίπεδο Bachelor)
- **2016-2017:** Διαπανεπιστημιακό δίπλωμα ενός χρόνου με θέμα την **Κολποσκόπηση και την Παθολογία Κόλπου, Τραχήλου και Αιδοίου** από τα πανεπιστήμια των Bordeaux, Montpellier, Nimes – Diplome Inter-universitaire de Colposcopie et Pathologie Cervico-Vaginale et Vulvaire.
- **2016-2017:** Πανεπιστημιακό Δίπλωμα ενός χρόνου με θέμα την **Παθολογία Μαστού** από το πανεπιστήμιο των Βερσαλλιών - Diplome Universitaire de Pathologie Mammaire (Versailles-Yvelines)
- **Αύγουστος 2014 :** Αποφοίτηση από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Αθηνών με βαθμολογία «Λίαν Καλώς»
- **2008-2014:** Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
- Επιπλέον συμμετοχή στο μάθημα της Ανατομίας ως ‘Παρασκευαστής Πτώματος’.
- **2005-2007:** 1ο Δημόσιο Λύκειο Πεύκης -Αθήνα. Αποφοίτηση με: 18/20

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

- Moreas, H., Tsiambas, E., Lazaris, A.C., Nonni, A., Karameris, A., **Metaxas, G.E.**, Armatas, H.E., Patsouris, E. 2014. Impact of HPV detection in colorectal adenocarcinoma: HPV protein and chromogenic in situ hybridization analysis based on tissue microarrays. *JBUON*; 19 (1):91-6.
- Tsiambas, E., Rallis, E., Papadas, T.A., Salemis, N., Christodoulou, I., **Metaxas, G.E.**, Athanasiou, A.E., Karameris, A. 2014. Amelanotic melanoma: a case with chr 9 monosomy. *JBUON* (2):582-3.
- Panagiotou, I., Tsiambas, E., Lazaris, A.C., Kavantzias, N., Konstantinou, M., Kalkandi, P., Ragkos, V., **Metaxas, G.E.**, Roukas, D.K., Vilaras, G., Patsouris, E. 2012. PTEN expression in nonsmall cell lung carcinoma based on digitized image analysis. *JBUON*; 17 (4):719-23.
- Tsiambas, E., Karameris, A., Lygeros, M., Athanasiou, A.E., Salemis, N.S., Gourgiotis, S., Ragkos, V., **Metaxas, G.E.**, Vilaras, G., Patsouris, E. 2012. Gene numerical imbalances in cytological specimens based on fluorescence/ chromogenic in situ hybridization analysis. *JBUON* (3):593-9.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

- 1. ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑ ΤΡΑΧΗΛΟΥ ΚΟΛΠΟΥ**
- 2. ΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΤΡΑΧΗΛΟΥ ΚΟΛΠΟΥ**
- 3. ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ ΤΡΑΧΗΛΟΥ ΚΟΛΠΟΥ**
- 4. Ο ΙΟΣ ΗΡV**
- 5. ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΑΧΗΛΟΥ**
 - ΠΑΠ ΤΕΣΤ/ΠΑΠ ΤΕΣΤ ΥΓΡΗΣ ΦΑΣΗΣ
 - ΓΕΝΟΤΥΠΙΚΑ ΤΕΣΤ
 - HPV DNA TEST
 - HPV mRNA TEST
 - ΑΝΟΣΟΚΥΤΤΑΡΟΧΗΜΕΙΑ ΔΙΠΛΟΥ ΣΗΜΑΤΟΣ P16/Ki67
 - ΚΟΛΠΟΣΚΟΠΗΣΗ
- 6. ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΟΥ ΙΟΥ ΗΡV**
 - ΕΙΣΟΔΟΣ ΣΤΟ ΚΥΤΤΑΡΟ ΣΤΟΧΟ
 - ΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗ ΜΟΛΥΝΣΗ
 - ΛΑΝΘΑΝΟΥΣΑ ΜΟΛΥΝΣΗ
- 7. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΗΡV ΛΟΙΜΩΞΗΣ ΣΤΗΝ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ ΤΟΥ ΤΡΑΧΗΛΟΥ**
 - ΤΑ ΒΛΑΣΤΟΚΥΤΑΡΑ ΚΑΙ Η ΜΟΛΥΝΣΗ ΑΠΟ ΤΟΝ ΙΟ ΗΡV
 - ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΕΣ/ΜΕΤΑΦΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ (SPLICING)
 - ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ ΗΡV ΜΕ ΤΟΥΣ ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΟΥΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥΣ ΤΟΥ ΚΥΤΑΡΟΥ
 - ΓΕΝΩΜΙΚΗ ΑΣΤΑΘΕΙΑ / ΕΠΙΣΩΜΑΤΙΚΕΣ ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ
 - ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗΣ
 - Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΩΝ
- 8. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ ΠΡΟΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΒΛΑΒΩΝ**
- 9. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΚΑΙ ΡΟΛΟΣ ΜΟΡΙΩΝ p16/cyclinD1/p53/MDM2**
- 10. ΑΡΧΕΣ ΑΝΟΣΟΙΣΤΟ-ΚΥΤΤΑΡΟΧΗΜΕΙΑΣ**
- 11. ΑΡΧΕΣ ΨΗΦΙΑΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗΣ ΕΙΚΟΝΑΣ**
- 12. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΕΙΚΟΝΩΝ ΓΕΝΙΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ**

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

2. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

- 2α. Προέλευση-Συλλογή-Διαχείριση του κυτταρολογικού βιοπτικού υλικού
- 2β. Εργαστηριακός αλγόριθμος μελέτης
- 2γ. Επιδημιολογικά-Κλινικοπαθολογοανατομικά γνωρίσματα υλικού μελέτης.
- 2δ. Κυτταρο-Ιστοχημική επεξεργασία
- 2ε. Πρωτόκολλο Μοριακής Διερεύνησης HPV Λοίμωξης
- 2στ. Πρωτόκολλο Μοριακής Διερεύνησης μικροβιακής Λοίμωξης

3. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

- Περιγραφική Ανάλυση
- Πίνακες

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

6. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

7. SUMMARY (ABSTRACT)

8. ΑΡΘΡΟΓΡΑΦΙΑ-BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ (REFERENCES)

9. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β. Εικόνες-Διαγράμματα

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑ ΤΡΑΧΗΛΟΥ - ΚΟΛΠΟΥ

Κατά την πρώιμη εμβρυική περίοδο και μετά από την έναρξη της μοναδικής διαφοροποίησης αρχίζει η ανάπτυξη των γεννητικών πόρων, οι οποίοι διέρχονται όπως και οι γονάδες διαμέσου ενός αδιαφοροποίητου σταδίου . το άρρεν και το θήλυ έμβρυο μεταξύ 5ης και 6ης εβδομάδας παρουσιάζουν αρχικά δυο ζεύγη γεννητικών πόρων:

Τους πόρους του Wolff (μεσονεφρικοί) και

Τους πόρους του Muller (παραμεσονεφρικοί)

Στο θήλυ έμβρυο εξαιτίας της έλλειψης της τεστοστερόνης οι μεσονεφρικοί πόροι εκφυλίζονται παραμένοντας μόνο μερικές υποτυπώδεις δομές. Τέτοια υπολείμματα των μεσονεφρικών πόρων μπορεί να ανευρεθούν στο τοίχωμα της μήτρας ή του κόλπου ή να ενσωματωθούν στον τράχηλο σχηματίζοντας σε μεταγενέστερα στάδια τις κύστες του Gartner. Οι παραμεσονεφρικοί πόροι παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση του αναπαραγωγικού συστήματος στο θήλυ έμβρυο. Η απουσία της AMH επιτρέπει την ανάπτυξη και διαφοροποίηση των παραμεσονεφρικών πόρων για το σχηματισμό των κύριων δομών της θηλυκής γεννητικής οδού.

Από τον τρίτο μέχρι τον πέμπτο μήνα της ενδομήτριας ζωής οι παραμεσονεφρικοί πόροι αρχίζουν να συνενώνονται σχηματίζοντας το γεννητικό σωλήνα ο οποίος θα διαφοροποιηθεί σε μήτρα και στο ανώτερο τμήμα του κόλπου. Αρχικά κατά τη συνένωση των μέσων τοιχωμάτων των παραμεσονεφρικών πόρων δημιουργείται στο κέντρο του μητροκολπικού σωλήνα ένα διάφραγμα, το μητριάιο διάφραγμα πλήρης ανάπτυξη της μήτρας σε μια μονήρη κοιλότητα επιτελείται από τη 13 έως την 20^η εβδομάδα και εξαρτάται από την εκφύλιση του μητριάιου διαφράγματος του μητροκολπικού σωλήνα. Στη αποτυχία επαναρρόφησης του μητριάιου διαφράγματος οφείλονται διάφορες ανωμαλίες της μήτρας και του κόλπου. Τα συνενωμένα τμήματα των παραμεσονεφρικών πόρων σχηματίζουν το σώμα και τον τράχηλο της μήτρας. Κατά τη 18 εβδομάδα σχηματίζεται η μήτρα με τον τράχηλο και αυλοποιείται ο κόλπος. (1,3)

2. ΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΤΡΑΧΗΛΟΥ - ΚΟΛΠΟΥ

Η μήτρα είναι ένα κοίλο όργανο που βρίσκεται μεταξύ της ουροδόχου κύστης και του ορθού. Το μήκος της κυμαίνεται μεταξύ 6-8 εκ. αποτελείται από τον πυθμένα το σώμα και τον τράχηλο. Ο τράχηλος της μήτρας χωρίζεται από το σώμα με τον ισθμό. Το κάτω

μέρος του τραχήλου εισέρχεται εντός του κόλπου ώστε να διακρίνονται δυο μέρη. Το υπερκοιλιακό και το ενδοκοιλιακό. Η κοιλότητα του τραχήλου προς τα κάτω καταλήγει μέσω του έξω τραχηλικού στομίου στον κόλπο και προς τα άνω μέσω του έσω τραχηλικού στομίου προς την κοιλότητα της μήτρας. Αντίθετα προς τη μήτρα ο τράχηλος στερείται λείων μυϊκών ινών. (1)

3. ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ ΤΡΑΧΗΛΟΥ - ΚΟΛΠΟΥ

Ο βλεννογόνος του ενδοτραχήλου εμφανίζει και στην πρόσθια και στην οπίσθια επιφάνεια της τραχηλικής κοιλότητας πτυχές και αποτελούνται από πολύστιβο κυλινδρικό επιθήλιο με εκκριτικά κύτταρα που παράγουν την τραχηλική βλέννα. Η εξωτερική ενδοκοιλιακή επιφάνεια του τραχήλου καλύπτεται από πολύστιβο πλακώδες επιθήλιο όπως εκείνο του κόλπου. Το επιθήλιο αυτό μεταπίπτει σε κυλινδρικό στην είσοδο του έξω τραχηλικού στομίου. (1,2)

4. Ο ΙΟΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΕΙΟΥ ΘΗΛΩΜΑΤΟΣ (HPV)

Οι κυτταρολογικές αλλαγές του HPV αναφέρθηκαν αρχικά το 1956 και τους δόθηκε ο όρος κοιλοκύττωση. Σε διάφορες μελέτες μοριακής βιολογίας φάνηκαν υψηλά επίπεδα HPV DNA και καψιδικού αντιγόνου δείχνοντας ενεργό ιογενή λοίμωξη σε αυτά τα κοιλοκύτταρα. Όσο οι CIN βλάβες γίνονται πιο σοβαρές τα κοιλοκύτταρα εξαφανίζονται το ιικό φορτίο του HPV μειώνεται και τα καψιδικά αντιγόνα εξαφανίζονται επίσης δείχνοντας ότι ο ιός δεν είναι ικανός να αναπαραχθεί σε κύτταρα χαμηλής διαφοροποίησης. Αντιθέτως φαίνεται ότι τμήματα του HPV DNA ενσωματώνονται στα κύτταρα του ξενιστή. η κακοήθης εξαλλαγή φαίνεται να προϋποθέτει την έκφραση των παραγόμενων από τον HPV ογκοπρωτεϊνών E6 και E7. Σειρές καρκινικών κυττάρων τραχήλου που εμπεριέχουν ενεργό ιικό φορτίο των HPV 16 η 18 αποδεικνύει την παρουσία των ογκοπρωτεϊνών E6 και E7. Συνήθως οι HPV λοιμώξεις δεν επιμένουν. Οι περισσότερες γυναίκες δεν έχουν κλινική απόδειξη νόσησης και η λοίμωξη τελικά εξαφανίζεται. Άλλες γυναίκες εμφανίζουν χαμηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακές βλάβες οι οποίες αυτοπεριορίζονται. Μια μειοψηφία γυναικών που εκτίθενται στον HPV αναπτύσσει μια εμμένουσα λοίμωξη η οποία μπορεί να εξελιχθεί σε CIN. Στους παράγοντες που εμπλέκονται σε αυτή την εξέλιξη συμπεριλαμβάνονται το κάπνισμα τα

αντισυλληπτικά δισκία και η λοίμωξη με άλλα σεξουαλικά μεταδιδόμενα νοσήματα. (2,3) (Εικόνα 16)

Οι ιοί των ανθρωπίνων θηλωμάτων (HPV) είναι μια μεγάλη οικογένεια μικρών δίκλωνων ιών DNA που μολύνουν πλακώδη επιθήλια και προκαλούν θηλώματα στα περισσότερα θηλαστικά. Οι ιοί είναι ειδικοί για κάθε είδος και έχουν ανιχνευθεί σε ποικίλα είδη θηλαστικών και πτηνών, συμπεριλαμβανομένων των ανθρώπων, των παπαγάλων, των σκύλων και των αιλουροειδών. Επιπλέον, ο HPV έχει γίνει αποδεκτός ως αιτιολογικός παράγοντας για καρκίνωμα του τραχήλου της μήτρας, ενώ η πρώτη συσχέτιση με καρκίνο κεφαλής και τραχήλου δημοσιεύθηκε το 1985. Ο HPV έχει επίσης αποδειχθεί ότι παίζει ρόλο στην παθογένεση μιας υποομάδας καρκίνων, πλακωδών κυττάρων στοματοφάρυγγα / head and neck squamous cell carcinomas (HNSCCs). Τα HNSCC ανήκουν στην πλειοψηφία των κακοηθειών του στοματοφάρυγγα. Ο όρος καρκίνος στοματοφάρυγγα περιλαμβάνει κακοήθειες σε περιοχές που περιλαμβάνουν το δέρμα, τη στοματική κοιλότητα, τους σιελογόνους αδένες, τα χείλη, τον φάρυγγα, τον λάρυγγα, τη ρινική κοιλότητα, τις παραρρινίους κόλπους και τους μαλακούς ιστούς του τραχήλου και του έτους. Σχεδόν 650.000 ασθενείς παγκοσμίως διαγιγνώσκονται με καρκίνο της κεφαλής ή τραχήλου κάθε χρόνο και 350.000 ασθενείς πεθαίνουν από αυτή την ασθένεια, καθώς αυτός ο καρκίνος είναι ο έκτος πιο επικρατής τύπος καρκίνου παγκοσμίως. Η αναλογία αρρένων προς θηλέων είναι περίπου 2: 1. (2,3)

Σε ασθενείς με καρκίνο της κεφαλής και του τραχήλου, έχουν διαπιστωθεί δύο τύποι κλινικών βλαβών πριν από τον καρκίνο: λευκές βλάβες (λευκοπλακία) και εξέρυθρες αλλοιώσεις (ερυθροπλακία). Οι προκαρκινικές αλλοιώσεις του στοματικού βλεννογόνου είναι οι επιθηλιακές μεταβολές που είναι σε θέση να υποστούν κακοήθη εξαλλαγή πιο πιθανά από τον κανονικό ιστό σε άλλες βλεννογονικές θέσεις. Ο HPV είναι επίσης κεντρικός αιτιολογικός παράγοντας στην καρκινογένεση του τραχήλου της μήτρας. Ο ιός αυτός επιμολύνει επιλεκτικά το επιθήλιο του δέρματος και των βλεννογόνων μεμβρανών. Ειδικό τύποι HPV σχετίζονται με καρκίνωμα πλακωδών κυττάρων, αδenoκαρκίνωμα και δυσπλασίες του τραχήλου της μήτρας, του πέους, του πρωκτού, του κόλπου και του αιδοίου. Συνολικά 150 γονότυποι HPV έχουν ταυτοποιηθεί και έχουν πλήρως προσδιοριστεί η αλληλουχίες τους. Ο προσδιορισμός του γονότυπου του HPV βασίζεται στον βαθμό ομολογίας εντός του ORF της L1 (κύριας πρωτεΐνης καψιδίου). Εάν η

αλληλουχία DNA του L1 ORF διαφέρει κατά περισσότερο από 10% από τον πλησιέστερα σχετικό γνωστό τύπο, θεωρείται ως ένας νέος τύπος. Οι τύποι HPV που σχετίζονται με κονδυλώματα του δέρματος είναι για παράδειγμα οι HPV-1, -2 και -4. Ένα ευρύ φάσμα τύπων HPV, συμπεριλαμβανομένων των HPV-5, -8, -9, -23 και -47 προκαλούν βλάβες επιδερμοδυσπλασίας verruciformis, οι οποίες μπορούν να μετατραπούν σε κακοήθεια μετά την έκθεση σε υπεριώδες φως. Η μεγαλύτερη υποομάδα αντιπροσωπεύεται από τους τύπους HPV που μολύνουν κυρίως τις βλεννογόνες επιφάνειες των γεννητικών και αναπνευστικών οδών. Περισσότεροι από 40 από τους αναγνωρισμένους τύπους HPV ανήκουν σε αυτήν την ομάδα. Οι τύποι HPV αναφέρονται συχνά ως «χαμηλού κινδύνου» ή «υψηλού κινδύνου» με βάση τις δυνατότητες ογκογένεσης. Οι τύποι HPV υψηλού κινδύνου περιλαμβάνουν HPV-16, -18, -31, -33, -35, -39, -45, -51, -52, -56, -58, -59, -68, -73 και -82. Οι τύποι HPV χαμηλού κινδύνου προκαλούν καλοήθεις βλάβες που επηρεάζουν τις πρωκτογεννητική περιοχή, όπως κονδυλώματα των γεννητικών οργάνων, χαμηλόβαθμες ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις (SIL) του τραχήλου της μήτρας και λαρυγγικά θηλώματα. Αυτοί οι τύποι χαμηλού κινδύνου περιλαμβάνουν τους HPV-6, -11, -40, -42, -43, -44, -53, -54, -61, -72 και -81. (2,3) (Εικόνα 17)

5. ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΑΧΗΛΟΥ

Τα νέα δεδομένα στην παρακολούθηση της παθολογίας του τραχήλου υπαγορεύουν το screening για τον καρκίνο του τραχήλου να βασίζεται όσο περνάει ο καιρός στο HPV DNA test. Είναι επιτακτική ανάγκη η παρουσία διαγνωστικών δοκιμασιών οι οποίες θα μπορούν να καταδείξουν την κλινικά σοβαρή λοίμωξη. Στο συνέδριο του EUROGIN του 2017 τονίστηκε η σημασία των πιο evidence based test για την παρακολούθηση της λοίμωξης HPV. Το τεστ Παπ είναι το τεστ με την περισσότερο αποδεδειγμένη επιστημονικά αξία. Η ύπαρξη ασθενών που είναι HR HPV + με αρνητική κυτταρολογία αποτελεί μια πρόκληση και τα ενδιάμεσα διαστήματα επανεκτίμησης για την ομάδα των ασθενών αυτών αλλά και η επιλογή του τεστ απαιτούν προσεκτική προσέγγιση και σχεδιασμό. Επιπλέον η αξιολόγηση του τεστ παπ είναι υποκειμενική ενώ η διπλή ανοσοχρώση για τις πρωτεΐνες p16/Ki67 μπορεί να μετριάσει την υποκειμενικότητα των διαφορετικών χειριστών. Συγκριτικά, οι δείκτες γονότυπου και μεθυλίωσης είναι

αντικειμενικοί. Ωστόσο, ο προσδιορισμός του γονοτύπου μπορεί να έχει μειωμένες αποδόσεις σε ανοσοποιημένους πληθυσμούς και ο τύπος του ιού που περιλαμβάνεται πρέπει να εξισορροπεί τον απόλυτο κίνδυνο για ασθένεια για να αποφευχθεί η χαμηλή ειδικότητα. Ενώ οι δείκτες ιικής και κυτταρικής μεθυλίωσης δείχνουν πολλά υποσχόμενοι, χρειάζονται περισσότερα επιστημονικά δεδομένα εκτός από τις βελτιώσεις στην αυτοματοποίηση. Αν κοιτάξουμε στο μέλλον, τα συστήματα που ανιχνεύουν πολλαπλούς στόχους ταυτόχρονα, όπως οι πλατφόρμες αλληλουχίας επόμενης γενιάς, θα βοηθήσουν στην ανάπτυξη εργαλείων ταξινόμησης. Επιπλέον, οι στρατηγικές πολλαπλής κλιμάκωσης μπορεί να είναι επωφελείς, με την προϋπόθεση ότι δεν δημιουργούν περίπλοκες, μη διαχειρίσιμες διαδρομές. Αναπόφευκτα, η ισορροπία του κινδύνου για το κόστος θα είναι καθοριστική για τη λήψη αποφάσεων, αν και ο καθορισμός ενός αποδεκτού κινδύνου πιθανόν να διαφέρει μεταξύ των ρυθμίσεων. Τέλος, λαμβάνοντας υπόψη τις σημαντικές αλλαγές στον προσυμπτωματικό έλεγχο της παθολογίας του τραχήλου και την ποικιλία των στρατηγικών ταξινόμησης, είναι απαραίτητη η κατάλληλη εκπαίδευση τόσο των παροχών υγειονομικής περίθαλψης όσο και του κοινού. (2,3,4)

ΤΕΣΤ ΠΑΠΑΝΙΚΟΛΑΟΥ (PAP TEST)

Το pap test κατάφερε επιτυχώς να μειώσει την επίπτωση καρκίνου του τραχήλου της μήτρας σε ποσοστό 79% και τη θνητότητα κατά 70% από το 1950. Η ευαισθησία του κλασσικού όμως παπ τεστ για να ανιχνεύσει τις προκαρκινικές βλάβες ήταν 51%. Ήταν προφανές ότι χρειάζονταν βελτιώσεις όσον αφορούσε στην τεχνική του κλασσικού τεστ παπ. Ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα προκύπτουν στη δειγματοληψία προετοιμασία αλλά και ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Λάθη δειγματοληψίας προκύπτουν είτε γιατί η βλάβη είναι πολύ μικρή ώστε να αποφολιδωθούν κύτταρα απ αυτήν ή η συσκευή συλλογής δεν περιμάζεψε τα κύτταρα ώστε να τα μεταφέρει στην αντικειμενοφόρο πλάκα. Σφάλματα προετοιμασίας συμβαίνουν εξαιτίας της κακής μονιμοποίησης που οδηγεί στην παγίδευση αέρα και στην μη ορθή ερμηνεία των αποτελεσμάτων ως εκ τούτου. Το υλικό μπορεί να είναι πολύ παχύ και να περιέχει αίμα η βλέννη. (2,3,4)

PAP TEST ΥΓΡΗΣ ΦΑΣΗΣ

Τα σφάλματα δειγματοληψίας και προετοιμασίας αποφεύγονται χρησιμοποιώντας ένα υγρό μέσο για να συλλεχτεί το δείγμα προς κυτταρολογική εξέταση. Η ευαισθησία του τεστ παπ με αυτή τη μέθοδο ανέβηκε στο 80%. Το δείγμα συλλέγεται με ένα ενδοτραχηλικό βουρτσάκι σε συνδυασμό με μια σπάτουλα. Μετά το δείγμα ξεπλένεται μέσα στο υγρό μέσο. Αυτή η τεχνική επιτρέπει τη συλλογή του 80 με 90% των κυττάρων σε σχέση με την κλασική τεχνική που επιτρέπει τη συλλογή του 20 % των κυττάρων. Τα κύτταρα περισυλλέγονται μετά από διήθηση του δείγματος από ειδικό φίλτρο ώστε να απομακρυνθούν αίμα και φλεγμονώδη κύτταρα. Αυτό αφήνει μια λεπτή στιβάδα από κύτταρα σωστά μονιμοποιημένα και πιο εύκολα εξεταζόμενα από τον κυτταρολόγο. (2,3,4) (Εικόνα 6)

ΓΕΝΟΤΥΠΙΚΑ ΤΕΣΤ

- HPV DNA TEST

Ο ακριβής γονότυπος του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV) είναι απαραίτητος για την έρευνα για τον εμβολιασμό κατά του HPV και για την επιτήρηση των βλαβών επί εδάφους λοίμωξης με τον ιό HPV. Συμπερασματικά, ένα συνεχιζόμενο παγκόσμιο πρόγραμμα επάρκειας έχει τεκμηριώσει την παγκόσμια βελτίωση της συγκρισιμότητας και της αξιοπιστίας των αποδόσεων ποσοτικού προσδιορισμού γονότυπου HPV. Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας είναι ο τρίτος συνηθέστερος καρκίνος μεταξύ των γυναικών παγκοσμίως, με περίπου 530.000 νέες περιπτώσεις να διαγιγνώσκονται ετησίως. Η μόλυνση από τον ιό των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV) συνδέεται με το 99% των καρκίνων του τραχήλου της μήτρας. Οι σημαντικότεροι υποτύποι ιών υψηλού κινδύνου (HPV16 και HPV18) αντιπροσωπεύουν περίπου το 70% του συνόλου των καρκίνων του τραχήλου της μήτρας παγκοσμίως. Η εισαγωγή εμβολίων κατά του HPV έχει επισημάνει την ανάγκη για ακριβείς και διεθνώς συγκρίσιμες μεθόδους ανίχνευσης και αποκωδικοποίησης του DNA του ιού. Αυτό αποτελεί ουσιώδες στοιχείο τόσο στην ανάπτυξη και την αξιολόγηση των εμβολίων κατά του HPV, όσο και στην αποτελεσματική εφαρμογή και παρακολούθηση των προγραμμάτων εμβολιασμού HPV. Οι προσδιορισμοί γονότυπου που χρησιμοποιούνται σήμερα διαφέρουν στις αναλυτικές τους επιδόσεις όσον αφορά την ευαισθησία και ειδικότητα ανάλογα με τον τύπο του ιού. Αρκετές μελέτες έχουν συγκρίνει διαφορετικές μεθόδους προσδιορισμού

του τύπου HPV για να αξιολογήσουν τις επιδόσεις τους όσον αφορά στη διαλογή και στην επιδημιολογία χρησιμοποιώντας κλινικά δείγματα. Με στόχο τη διευκόλυνση της ανάπτυξης και της εφαρμογής εμβολίων HPV με τη βελτίωση και την τυποποίηση της ποιότητας των εργαστηριακών υπηρεσιών για τον HPV, ο παγκόσμιος οργανισμός υγείας ίδρυσε το 2005 ένα παγκόσμιο εργαστηριακό δίκτυο HPV (HPV LabNet). Οι κύριες δραστηριότητες του HPV LabNet περιλαμβάνουν την εναρμόνιση και την τυποποίηση των εργαστηριακών διαδικασιών που χρησιμοποιούνται για την έρευνα για τον εμβολιασμό του HPV και την παρακολούθηση του αντίκτυπου του προγράμματος εμβολιασμού κατά τον HPV με την ανάπτυξη διεθνώς συγκρίσιμων μεθόδων διασφάλισης ποιότητας, διεθνών προτύπων και αντιδραστηρίων αναφοράς, καθώς και εργαστηριακού εγχειριδίου για την εμβολιολογία. Πολλές μελέτες υπογραμμίζουν τη διαφορετική χρησιμότητα και αξία των εξετάσεων ανίχνευσης του DNA του HPV και της πρωτεΐνης E6, την πρώτη ως εργαλείο διαλογής και τη δεύτερη ως διαγνωστικό εργαλείο, για την ανίχνευση προκαρκινικών βλαβών και του αρχόμενου καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Αυτές οι τεχνολογίες είναι χαμηλού κόστους, χρησιμεύουν στην ανίχνευση τύπων υψηλού κινδύνου ιών των ανθρώπινων θηλωμάτων (hrHPV) και παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον στη χρήση για την ανίχνευση του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Οι υποσχόμενες τεχνολογίες περιλαμβάνουν εκείνες που είναι ικανές να ανιχνεύσουν την πρωτεΐνη E6 HPV ή το DNA των HR HPV. Η ανίχνευση του DNA του ιού έδειξε εξαιρετική απόδοση διαλογής, λόγω της υψηλής ευαισθησίας και της αρνητικής προγνωστικής του αξίας. Η ανίχνευση HPV E6 έχει καλύτερη απόδοση στη διάγνωση, λόγω της εξειδίκευσής της και της θετικής πρόβλεψης.

Η αποτελεσματικότητα των εξετάσεων screening για τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας περιορίζεται αφενός από την έλλειψη ευαισθησίας του τεστ Pap και από την έλλειψη ειδικότητας του τεστ DNA του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV). Ο έλεγχος του DNA του HPV έχει αποδειχτεί πιο αποτελεσματικός στην ανίχνευση υψηλού βαθμού πλακώδους ενδοεπιθηλιακής βλάβης (HSIL) σε σύγκριση με την κυτταρολογία για την πρόληψη του επεμβατικού καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Η επόμενη πρόκληση για το πρόγραμμα πρωτογενούς ανίχνευσης του HPV είναι να βρεθεί η καλύτερη μέθοδος για την επιλογή, μεταξύ των HPV θετικών γυναικών, εκείνων των ασθενών που χρειάζονται άμεσα κολποσκόπηση επειδή έχουν υψηλότερο κίνδυνο

ανάπτυξης προκαρκινικής αλλοίωσης. Ένα κυτταρολογικό αποτέλεσμα HSIL ή η θετική διπλή χρώση p16 / Ki-67 θα μπορούσαν να είναι οι καλύτεροι δείκτες, αλλά απαιτούνται περαιτέρω τυχαιοποιημένες μελέτες προτού αυτές οι προσεγγίσεις μπορέσουν να χρησιμοποιηθούν στην πρακτική ρουτίνας. (2,3,4,7) (Εικόνα 3)

- HPV mRNA ΤΕΣΤ

Το τεστ Παπανικολάου και το τεστ DNA για τους υψηλού κινδύνου ιούς των ανθρώπινων θηλωμάτων (HR-HPV) είναι οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες μέθοδοι για τον έλεγχο του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, αλλά και οι δύο μέθοδοι περιορίζονται από τη χαμηλή τους ειδικότητα και την έλλειψη συσχέτισης με την κλινική πρόγνωση των ασθενών. Σκοπός της μελέτης ήταν η σύγκριση της κλινικής και προγνωστικής σημασίας του mRNA του HPV E6 / E7 ως πρώιμου βιολογικού δείκτη στην ανίχνευση του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Τα ευρήματά μας υποδεικνύουν ότι η υψηλότερη ειδικότητα και η θετική προγνωστική αξία του mRNA test είναι πολύτιμες για διαχωρισμό ασήμαντων λοιμώξεων από HPV σε σύνολο περιστατικών με παθολογική κυτταρολογική διάγνωση. Αυτή η δοκιμασία μπορεί να διεξαχθεί για την αποφυγή περιττών διαδικασιών βιοψίας και υπέρμετρης παραπομπής προς κολποσκόπηση περιπτώσεων παροδικής μόλυνσης από HPV καθώς και για τη μείωση του άγχους του ασθενούς κατά τη διάρκεια της περιόδου παρακολούθησης. (5) (Εικόνα 8)

Η έκφραση της πρωτεΐνης E7 του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV) προκαλείται από την ενσωμάτωση του ιικού DNA στο ανθρώπινο κυτταρικό DNA και αποτελεί προϋπόθεση για την ανάπτυξη και πρόοδο του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Διάφορες μελέτες έχουν εστιάσει στην αξιολόγηση του ρόλου της πρωτεΐνης E7 ως βιοδείκτη για την ταυτοποίηση των μετασχηματισμένων επιθηλιακών κυττάρων κατά τη διάρκεια των πρώτων σταδίων της καρκινογένεσης του τραχήλου της μήτρας. Συγκεκριμένα μονοκλωνικά αντισώματα για την πρωτεΐνη E7 των HPV υψηλού κινδύνου δημιουργήθηκαν και προοριστήκαν για εφαρμογές στην ανοσοκυτταροχημεία και ανοσοϊστοχημεία με τη χρήση επιθηλιακών κυττάρων τραχήλου ή ιστικών τεμαχιδίων βιοψίας. Δείχτηκε η αυξημένη ειδικότητα και η εφικτότητα ανίχνευσης προκαρκινικών κυττάρων σε αποφολιδωμένα επιθηλιακά κύτταρα του τραχήλου.

Επιπλέον, η χρώση με αντισώματα των βιοψιών του τραχήλου κατέδειξε τα διαφορετικά παθολογικά στάδια του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας και των προκαρκινικών αλλοιώσεων. Έτσι καταδείχτηκε το πιθανό όφελος από τη χρήση της E7 πρωτεΐνης ως νέου και ειδικού κλινικού διαγνωστικού δείκτη για τη διάκριση των παροδικών λοιμώξεων από HPV από τις κακοήθειες και προ-κακοήθειες αλλοιώσεις. Σκοπός αυτής της μελέτης ήταν η διερεύνηση της κλινικής αξιοπιστίας της ανάλυσης των mRNA E6 / E7 των υψηλού κινδύνου (HR) HPV για την ανίχνευση υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας και καρκίνου τραχήλου στις γυναίκες με άτυπα πλακώδη κύτταρα με απροσδιόριστη σημασία (ASCUS) στο τεστ παπ . (4,5)

Η ποσοτική ανάλυση των E6 / E7 mRNA του ιού HPV μπορεί να είναι ένα πολύτιμο εργαλείο για την ταξινόμηση των κυττάρων ASCUS στα τεστ παπ. Η υψηλή ειδικότητα της ποσοτικής ανάλυσης των mRNA E6 / E7 ως δοκιμασία διαλογής σε γυναίκες με ASCUS μπορεί να μεταφραστεί σε χαμηλή παραπομπή για κολποσκόπηση. Στόχος είναι να αξιολογηθεί η κλινική εφαρμογή και η συσχέτιση του mRNA E6 / E7 του HPV με την εξέλιξη των βλαβών του τραχήλου σε γυναίκες με άτυπα πλακώδη κύτταρα αδιευκρίνιστης σημασίας (ASCUS) ή χαμηλού βαθμού πλακώδεις ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις (LSIL). το θετικό τεστ mRNA E6 / E7 έδειξε ότι οι γυναίκες με ASCUS ή LSIL στο Pap τεστ ήταν σε μια πραγματικά επικίνδυνη θέση, η οποία είναι ένας αρνητικός προγνωστικός παράγοντας. δείχτηκε ότι οι βλάβες του τραχήλου της μήτρας θα παραμείνουν σε προοδευτική κατάσταση και οι γυναίκες αυτές θα πρέπει να παραπεμφθούν για κολποσκόπηση και να εντείνουν την παρακολούθηση. Ενώ οι γυναίκες με αρνητικό αποτέλεσμα τεστ mRNA E6 / E7 μπορούν να επιμηκύνουν το διάστημα παρακολούθησης, εξετάζοντας συνολικά την κατάστασή τους, αποφεύγοντας έτσι την περιττή κολποσκόπηση και μειώνοντας το ποσοστό κολποσκόπησης και βιοψίας. Ο διαγνωστικός έλεγχος με βάση το HPV DNA test είναι αποτελεσματικότερος από ένα τεστ Παπανικολάου για την πρόληψη του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, αλλά σαν δοκιμασία έχει μικρότερη ειδικότητα. Έχουν προταθεί νέα HPV test για screening. Η δοκιμασία του HPV mRNA τεστ έδειξε παρόμοια ή ελαφρώς χαμηλότερη ευαισθησία από το HPV DNA τεστ αλλά με υψηλότερη ειδικότητα. Σε μελέτη που διεξήχθη σε 23.200 γυναίκες φάνηκε ότι ένα πρόγραμμα screening βασιζόμενο στο mRNA τεστ έλαβε αποτελέσματα παρόμοια με αυτά που

παρατηρήθηκαν με το HPV DNA τεστ. Στα προγράμματα διαλογής ρουτίνας, ακόμη και μια περιορισμένη αύξηση του επιπολασμού του HPV μπορεί να αποκρύψει το πλεονέκτημα που αντιπροσωπεύει η υψηλότερη ειδικότητα του HPV mRNA. (10,12,14,15)

Η ανίχνευση του mRNA E6 / E7 του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV) σε μια τραχηλική βλάβη υποδεικνύει τον κίνδυνο περαιτέρω επιδείνωσης αυτής της αλλοίωσης. Εξετάστηκε η κλινική αξία της ανίχνευσης mRNA E6 / E7 του HPV σε screening για τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας σε γυναίκες που είναι θετικές για τον ιό HPV ή με μη φυσιολογικό τεστ παπ υγρής φάσης. Η ανίχνευση mRNA HPV E6 / E7 είναι ανώτερη από το HPV DNA τεστ για τη διάγνωση υψηλόβαθμων τραχηλικών βλαβών. Οι τυχαιοποιημένες κλινικές δοκιμές που εξετάζουν το HPV DNA τεστ έχουν αποδείξει την αξία του στην προστασία από τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας και το screening για τον HPV συνιστάται σε παγκόσμιο επίπεδο για όλες τις γυναίκες ηλικίας ≥ 30 ετών. Το HPV-mRNA είναι ένας ελπιδοφόρος εναλλακτικός στόχος του screening για τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, αλλά η σύγκριση της ισοδυναμίας η ανωτερότητας του ως δοκιμασία απαιτεί διαχρονική αξιολόγηση σε τουλάχιστον το χρονικό διάστημα μιας περιόδου screening. Συμπερασματικά σε βάθος χρόνου 7 ετών το mRNA τεστ έδειξε να έχει παρόμοια ευαισθησία με το HPV-DNA τεστ, υποδηλώνοντας ότι η δοκιμασία HPV-mRNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί με ασφάλεια σαν τεστ διαλογής για τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας.(11)

Το τρέχον DNA τεστ για τον υπότυπο 16 του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων έχει υψηλή ευαισθησία αλλά χαμηλή ειδικότητα, ενώ η δοκιμή mRNA (ποιοτική) βελτιώνει την ειδικότητα. Ωστόσο, και οι δύο τεχνικές δεν είναι σε θέση να κάνουν διάκριση μεταξύ παροδικών και χρόνιων λοιμώξεων. Τα αποτελέσματά μελέτης έδειξαν ότι τα επίπεδα έκφρασης του mRNA E6 ή E7 αυξήθηκαν σημαντικά σε HPV16-θετικά περιστατικά από ότι στις αρνητικές περιπτώσεις. Επιπλέον, σε περιπτώσεις HPV16 +, τα επίπεδα έκφρασης του mRNA E6 ήταν σημαντικά αυξημένα στον διηθητικό καρκίνο σε σύγκριση με την υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία (HSIL), και στα HSIL σε σύγκριση με τα περιστατικά χαμηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας (LSIL). Δεν υπήρξαν σημαντικές μεταβολές μεταξύ του LSIL και των καλοήθων αλλοιώσεων. Τα επίπεδα έκφρασης του E7 mRNA δεν παρουσίασαν σημαντική διαφορά μεταξύ των

προαναφερθεισών τεσσάρων ομάδων. Έτσι, η ποσοτική ανίχνευση των επιπέδων έκφρασης του mRNA E6 στα κύτταρα του τραχηλικού επιχρίσματος δεν δύναται να χρησιμοποιηθεί μόνο ως βοηθητικό εργαλείο για την κυτταρολογική διάγνωση της νεοπλασίας του τραχήλου της μήτρας, αλλά μπορεί επίσης να βοηθήσει στον προσδιορισμό της βαρύτητας των βλαβών και της ταξινόμησης της παροδικής μόλυνσης.(13) (Εικόνα 14)

Μερικές μελέτες που προηγήθηκαν στο παρελθόν θεωρούσαν ότι το αγγελιοφόρο RNA του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων E6 μπορεί να υπάρχει ισόποσα σε όλα τα στάδια της τραχηλικής ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας (CIN), ενώ το ποσοστό ανίχνευσης του mRNA E7 μπορεί να αυξηθεί με την εξέλιξη της νόσου από το CIN χαμηλού βαθμού έως το διηθητικό καρκίνωμα. Η παρουσία του mRNA E7 συσχετίστηκε σημαντικά με την εξέλιξη από χαμηλού βαθμού CIN σε διηθητικό καρκίνωμα, σε αντίθεση με την παρουσία του mRNA E6 ή την ύπαρξη DNA HPV υψηλού κινδύνου (HR-HPV). Η παρουσία αμφοτέρων των E6 και E7 mRNAs συνδέθηκε σημαντικά με την παρουσία του DNA των HPV16 / 18 αλλά όχι με την παρουσία DNA γενικά στελεχών υψηλού κινδύνου HR-HPV, ενώ η παρουσία του mRNA E6 συνδέθηκε σημαντικά με την ύπαρξη DNA HR-HPV αλλά όχι ειδικά με τα DNA των στελεχών HPV16 / 18. Η παρουσία αμφοτέρων των mRNA E6 και E7 έδειξε υψηλή ειδικότητα και χαμηλή ευαισθησία για την ανίχνευση του CIN2 + σε αντίθεση με τη θετικότητα του DNA test για HR-HPV που εμφανίζει χαμηλή ειδικότητα και υψηλή ευαισθησία. Η θετική προγνωστική αξία για την ανίχνευση του CIN2 + ενισχύθηκε ακόμα περισσότερο λόγω της παρουσίας των mRNA E6 και E7 σε σχέση με τη θετικότητα για το HR-HPV DNA μόνο. Τα ευρήματά αυτά υποστηρίζουν προηγούμενες μελέτες σύμφωνα με τις οποίες το E7 mRNA εμπλέκεται πιο στενά στην τραχηλική καρκινογένεση από το E6 mRNA. Επιπλέον, η ξεχωριστή ανάλυση των mRNA E6 και E7 μπορεί να είναι πιο χρήσιμη από τη δοκιμή HR-HPV DNA για την ακριβή ανίχνευση του CIN2 + και την πρόβλεψη της εξέλιξης της νόσου.(8)

Το HPV DNA τεστ χρησιμοποιείται στην κατάταξη των γυναικών με οριακό αποτέλεσμα στο τεστ παπ. Η αποτελεσματικότητα του τεστ στις γυναίκες με χαμηλό βαθμό ενδοεπιθηλιακής βλάβης (LSIL) και με άτυπα πλακώδη κύτταρα αδιευκρίνιστης σημασίας (ASCUS) είναι λιγότερο ξεκάθαρη. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε το

mRNA test που ανιχνεύει το αγγελιοφόρο RNA (mRNA) E6 / E7 και έχει υψηλότερη ειδικότητα. Ο στόχος αυτής της προοπτικής μελέτης ήταν να εκτιμηθεί κατά πόσο η θετική επίδραση HPV E6 / E7 mRNA σε γυναίκες με ASCUS και LSIL κατά την έναρξη είναι σε θέση να προβλέψει εκείνες τις γυναίκες που έχουν υψηλό κίνδυνο να αναπτύξουν ιστολογική αυχενική ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία (CIN2) ή χειρότερη βλάβη. Λάβαμε υπόψη την ηλικία των γυναικών και τον γονότυπο του HPV DNA και τους παρακολουθήσαμε για 3 χρόνια. Η μελέτη δείχνει ότι οι γυναίκες που είναι θετικές στη δοκιμασία mRNA του HPV E6 / E7 έχουν μεγαλύτερο κίνδυνο κακοήθους εξέλιξης των τραχηλικών τους βλαβών και γι 'αυτό αξίζουν μεγαλύτερη προσοχή και μικρότερα μεσοδιαστήματα εξετάσεων. (9,10,12,16,17) (Εικόνα 9)

-P16/Ki67 ΔΙΠΛΗ ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΗ ΑΝΟΣΟΚΥΤΤΑΡΟΧΗΜΕΙΑ

Η δυνατότητα ανεύρεσης θετικών γυναικών με τον ιό των ανθρωπίνων θηλωμάτων (HPV) είναι απαραίτητη για να αποφευχθεί η υπερβολική εφαρμογή της τεχνικής της κολποσκόπησης. Η p16 (INK4a) ανοσοχρώση είναι μια αποτελεσματική μέθοδος τυποποίησης. Η p16 (INK4a) / Ki-67 διπλή χρώση εισήχθη κυρίως για την αύξηση της αναπαραγωγισιμότητας και της εξειδίκευσης σε σύγκριση με την ανεξάρτητη χρώση p16 (INK4a). Η ανοσοχρώση p16 (INK4a) / Ki-67 κατέδειξε καλή αναπαραγωγισιμότητα και ειδικότητα για την αναγνώριση γυναικών με θετικό HPV. Η ερμηνεία της τεχνικής της διπλής χρώσης μπορεί να γίνει μετά από σύντομη εκπαίδευση, ακόμη και από προσωπικό που δεν είναι εξειδικευμένο στην κυτταρολογική ανάγνωση του τραχήλου της μήτρας. Αυτό επιτρέπει τη διενέργεια διαλογής ιστών θετικών η αρνητικών στον HPV βάσει τεχνικών οι οποίες δεν απαιτούν την ύπαρξη διαθέσιμου προσωπικού εμπειρογνομόνων.

Ο αιτιολογικός ρόλος των ανθρωπίνων θηλωμάτων (HPV) στον στοματοφαρυγγικό καρκίνο (OPC) είναι επιστημονικά τεκμηριωμένος. Παρόλα αυτά, οι πληροφορίες σχετικά με τις διαφορές επιβίωσης σε σχέση με την ανατομική υποπεριοχή ή τη θεραπεία παραμένουν σπάνιες και εξακολουθεί να είναι ασαφής η διαγνωστική ακρίβεια και προγνωστική αξία της ύπαρξης του HPV ως τεστ. Η διπλή θετικότητα για το HPV-DNA / p16INK4a, μια δοκιμή που μπορεί εύκολα να εφαρμοστεί στην κλινική πρακτική, έχει τη βέλτιστη διαγνωστική ακρίβεια και την προγνωστική αξία. Τα

αποτελέσματά μας έχουν ισχυρές κλινικές επιπτώσεις για την ταξινόμηση και τον χειρισμό των ασθενών και επίσης υποδεικνύουν ότι δεν συμπεριφέρονται όλα τα OPC που σχετίζονται με τον HPV παρόμοια. Η διπλή χρώση p16 / Ki67 μπορεί να βελτιώσει την ειδικότητα της ανίχνευσης τραχηλικών βλαβών και να έχει παρόμοια ευαισθησία με το τεστ HPV για την ανίχνευση βλαβών CIN2 +. Κατά την ταξινόμηση των γυναικών με κυτταρολογία υγρής φάσης σε ASC-US ή LSIL, σε σύγκριση με θετικό HR-HPV DNA test , η ειδικότητα της ανίχνευσης αλλοιώσεων CIN2 + αυξήθηκε με τη διενέργεια της διπλής χρώσης p16 / Ki67. Η διπλή χρώση p16 / Ki67 θα μπορούσε να μειώσει τις παραπομπές στην κολποσκόπηση και να αποτρέψει την υπερβολική διάγνωση και θεραπεία. (6,23,24)

-ΚΟΛΠΟΣΚΟΠΗΣΗ

Η κολποσκόπηση όπως το δείχνει η ετυμολογία της λέξης είναι η παρατήρηση του τραχήλου της μήτρας. Οι σκοπιμότητες αυτής, τρεις. Να γίνει μια χαρτογράφηση των τραχηλικών βλαβών, να καθοδηγήσουμε τις βιοψίες ώστε να είναι κατά το δυνατόν πιο αντιπροσωπευτικές και να κατευθύνουμε τη θεραπεία ώστε να είναι κατά το δυνατόν πιο πλήρης ως προς την εξαίρεση της βλάβης αλλά και λιγότερο επιθετική ως προς τη μάζα του τραχήλου κυρίως στις ασθενείς που επιθυμούν μια κύηση. Η αρχή της κολποσκόπησης είναι η τροποποίηση της φυσιολογικής εικόνας των δυο επιθηλίων ώστε να μας οδηγήσουν στην αποκάλυψη βλαβών που δε φαίνονται με γυμνό μάτι. Γι αυτό το σκοπό χρησιμοποιούμε δυο αντιδραστήρια: το οξικό οξύ και το ιώδιο (Lugol). Το οξικό οξύ λειτουργεί μετουσιώνοντας τις πρωτεΐνες δημιουργώντας έτσι ένα λεύκασμα των ιστών που είναι πλούσιοι σε πρωτεΐνες. Ένα φυσιολογικό πλακώδες επιθήλιο που διαθέτει μόνο 2 ή 3 στιβάδες νεαρών κυττάρων και μιτώσεων δεν είναι αρκετά φορτισμένο σε πρωτεΐνη ώστε να μεταβληθεί κάτω από την επίδραση το οξικού οξέως. Ένα δυσπλαστικό πλακώδες επιθήλιο εξαιτίας της μεγάλης κυτταρικής δραστηριότητας διαθέτει μεγάλη πυκνότητα σε πρωτεΐνες αλλάζει επομένως το χρώμα του υπό την επίδραση του οξικού οξέως. Το ιώδιο έχει σαν ιδιότητα να χρωματίζει σκούρο καφέ το ενδοκυττάριο γλυκογόνο. Σε ένα φυσιολογικό πλακώδες επιθήλιο τα ώριμα κύτταρα χαρακτηρίζονται από αφθονία σε γλυκογόνο, βάφονται λοιπόν από το Lugol. Αυτή η χρώση διαρκεί περίπου 15 λεπτά. Τα παθολογικά επιθήλια τα οποία παρατηρούμε σε μια

δυσπλασία δεν ωριμάζουν επομένως δεν γαμίζονται με γλυκογόνο μένοντες ανεπηρέαστα από τη χρώση του Lugol. Προφανώς ένα επιθήλιο μη πλακώδες όπως το μονόστιβο κυλινδρικό επιθήλιο του ενδοτραχήλου μένει επίσης ανέπαφο από τη δράση του Lugol.(2)

6. Ο ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΟΥ ΙΟΥ HPV

Οι ιοί HPV είναι μικροί με διάμετρο 55 νανόμετρα και χωρίς καψίδιο. Όλοι οι HPV περιέχουν ένα κυκλικό δίκλωνο DNA μεγέθους 8kb. Το γενετικό τους υλικό μπορεί να διαχωριστεί σε 3 περιοχές. Την περιοχή που κωδικοποιεί τις πρώιμες μη δομικές πρωτεΐνες E1 έως E8, την περιοχή που κωδικοποιεί τις όψιμες δομικές πρωτεΐνες L1 και L2 του καψιδίου που είναι απαραίτητες για το σχηματισμό μετάδοσης και εξάπλωση του ιού και την περιοχή LCR (περιοχή ελέγχου). Τα πρώιμα γονίδια είναι υπεύθυνα για τον κύκλο ζωής του ιού και ελέγχουν τον κυτταρικό κύκλο του μολυσμένου κυττάρου προς την αντιγραφή μεταγραφή και μετάφραση των ιικών πρωτεϊνών επαναδιαμορφώνουν τον κυτταρικό σκελετό και προκαλούν διαταραχές στον κυτταρικό κύκλο. Οι πρωτεΐνες E2 του HPV είναι ζωτικής σημασίας για τον κύκλο ζωής του ιού και έχουν καλώς διακριτές λειτουργίες στην ρύθμιση της μεταγραφής, έναρξη της αντιγραφής του DNA και στην κατανομή του ιικού γονιδιώματος. Οι πρωτεΐνες E2 επίσης λειτουργούν στον αναδιπλασιασμό του DNA, στις μετά-μεταγραφικές διεργασίες και ενδεχομένως στην αναδίπλωση του.(25)

Οι ιοί των ανθρώπινων θηλωμάτων διαθέτουν κυκλικά γονιδιώματα διπλού κλώνου DNA μεγέθους περίπου 8 kb από τα οποία συντίθενται πολλαπλά mRNAs κατά τη διάρκεια ενός μολυσματικού κύκλου ζωής. Αν και τουλάχιστον τρεις ιικοί υποκινητές χρησιμοποιούνται για την έναρξη της μεταγραφής, τα ιικά mRNAs είναι σε μεγάλο βαθμό το προϊόν της επεξεργασίας των προ-mRNAs με εναλλακτικό μάτισμα και πολυαδενυλίωση. Ο κύκλος ζωής του HPV και η έκφραση του ιικού γονιδιώματος συνδέονται στενά με τη διαφοροποίηση του επιθηλίου που προσβάλλει ο ιός: υπάρχει ενορχηστρωμένη παραγωγή ιικών mRNAs και πρωτεϊνών. Η πρωτεΐνη E2 του ιού του θηλώματος έχει δραστηριότητες σχετικές με το splicing. Υπογραμμίζεται η πιθανότητα η μεσολάβηση του HPV για τον έλεγχο του splicing σε διαφοροποιούμενα επιθηλιακά κύτταρα μπορεί να είναι απαραίτητη για να επιτευχθεί ο κύκλος του ιικού

αναδιπλασιασμού. Οι ιοί HPV μολύνουν σωματοποιημένα επιθήλια και προκαλούν ποικίλες βλάβες που κυμαίνονται από καλοήθη κονδυλώματα έως διεισδυτικούς όγκους. Ο κύκλος ζωής του ιού είναι στενά συνδεδεμένος με τη διαδικασία διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων που μολύνει: οι ιοί των θηλωμάτων τροποποιούν την έκφραση του γονιδίου ξενιστή για να εξασφαλίσουν την αποτελεσματική αναπαραγωγή του ιού. Για παράδειγμα, ο παράγοντας μεταγραφής του ιού E2 μπορεί απευθείας να αυξάνει, κατά τρόπο εξαρτώμενο από την επιθηλιακή διαφοροποίηση, τους κυτταρικούς παράγοντες SRSFs [SR (πλούσιοι σε σερίνη / αργινίνη)] που ελέγχουν το δομικό και εναλλακτικό splicing. Οι αλλαγές στο εναλλακτικό splicing και οι μηχανισμοί που το ελέγχουν για τα ιικά mRNAs αποτέλεσαν αντικείμενο έντονης έρευνας. Ωστόσο, μέχρι σήμερα έχουν πραγματοποιηθεί πειράματα μόνο σε συστήματα μοντέλων επειδή τα γενετικά συστήματα που είναι κατάλληλα για τη μελέτη της εναλλακτικού splicing των ιικών RNA στο πλαίσιο του κύκλου ζωής του ιού είναι σχετικά νέα και τεχνικά δύσκολα στην επεξεργασία. Χρησιμοποιώντας αυτά τα συστήματα υποστήριξης του κύκλου ζωής έχουν αναγνωριστεί οι πρωτεΐνες SR ως σημαντικοί παράγοντες στην εξαρτώμενη από τη διαφοροποίηση ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης του HPV. Απαιτείται καλύτερη κατανόηση του ρόλου των κυτταρικών παραγόντων στη ρύθμιση του κύκλου ζωής του ιού, καθώς αυτό μπορεί να συμβάλει στην ανάπτυξη νέων διαγνωστικών προσεγγίσεων και αντιικών θεραπειών στο μέλλον. (20,21,22)

-ΠΡΟΣΒΟΛΗ ΚΥΤΤΑΡΟΥ ΣΤΟΧΟΥ

Η είσοδος του ιού στο κύτταρο στόχο φαίνεται ότι επιτυγχάνεται μέσα από τη σύνδεση πρωτεογλυκανών της κυτταρικής μεμβράνης με ένα τμήμα της πρωτεΐνης L1. Τότε το καψίδιο του ιού υφίσταται δομικές αλλαγές που προκαλούν την έκθεση και την σύνδεση της L2 πρωτεΐνης στη μεμβράνη του κυττάρου. Έπειτα το καψίδιο αλλάζει περαιτέρω κάνοντας την L1 πιο διαθέσιμη προς σύνδεση. Μέσω αυτής της διαδικασίας ο ιός εισέρχεται στο κύτταρο. (51,52)

-ΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗ ΛΟΙΜΩΞΗ VS ΛΑΝΘΑΝΟΥΣΑ ΛΟΙΜΩΞΗ

Είναι κοινώς αποδεκτό ότι ο ιός HPV είναι ικανός να μολύνει μόνο το κερατινοκύτταρο και ο κύκλος ζωής του είναι σε άμεση εξάρτηση από το στάδιο της

διαφοροποίησης αυτού. Πιστεύεται ότι ο ιός μολύνει τα αρχέγονα κερατινοκύτταρα της βασικής στιβάδας και μετέπειτα τραυματίζει τα κερατινοκύτταρα των ανώτερων στιβάδων μολύνοντας τα. Αυτά πιθανώς αποκτούν φαινότυπο βλαστοκυττάρων κατά τη διαδικασία αυτή. Είναι γνωστό ότι η παραγωγική φάση της λοίμωξης με παραγωγή μεγάλου αριθμού ιικού γενετικού υλικού, έκφρασης ικών πρωτεϊνών και σχηματισμών νέων ικών σωματιδίων συμβαίνει μόνο στην ανώτατες διαφοροποιημένες στιβάδες (παραβασική, πλακώδη και ώριμη πλακώδη. (Εικόνα 1)

Μέχρι και την παραβασική στιβάδα του επιθηλίου, μέσα στα μολυσμένα κύτταρα ο αριθμός των ικό φορτίο παραμένει σταθερό και η έκφραση ικών γονιδίων ελάχιστη. Σε αυτή τη φάση του ικού κύκλου ζωής των HR-HPVs η έκφραση των εν δυνάμει ογκογονιδίων E6 και E7 είναι υπό αυστηρό έλεγχο. Όταν το μολυσμένο κερατινοκύτταρο ακολουθώντας την οδό διαφοροποίησης του μπαίνει στην πλακώδη στιβάδα και βγαίνει από τον κυτταρικό κύκλο τότε ξεκινά μια υπερέκφραση ικών γονιδίων και αντιγραφή ικού DNA με μεγιστοποίηση του αριθμού των αντιγράφων του ιού σε πολλές χιλιάδες ανά κύτταρο. Επίσης παρατηρούμε αυξημένη έκφραση των E6 και E7 πρώιμων γονιδίων και έκφραση των όψιμων γονιδίων L1 και L2 οδηγώντας τελικά στο σχηματισμό ικών σωματιδίων. Ο πολλαπλασιασμός του ιού μπορεί να συμβεί μόνο σε διαφοροποιημένα κύτταρα τα οποία έχουν εξέλθει του κυτταρικού κύκλου. Βέβαια οι παράγοντες που είναι υπεύθυνοι για την αντιγραφή του DNA όπως η DNA πολυμεράση παράγονται μόνο σε κύτταρα που βρίσκονται σε μίτωση και συνεπώς ακόμα εν μέσω κυτταρικού κύκλου. Για να καταφέρουν να υπερπηδήσουν αυτό το εμπόδιο οι HPVs παράγουν πρωτεΐνες που εκκινούν τη σύνθεση DNA σε κύτταρα που έχουν εξέλθει του κυτταρικού κύκλου, αναστέλλουν την κυτταρική απόπτωση και καθυστερούν την διαδικασία της διαφοροποίησης δημιουργώντας ένα ευοδωτικό περιβάλλον για την αντιγραφή του ικού DNA. Σε αυτό το αποτέλεσμα συμβάλουν και τα γονίδια E6 και E7 των High risk HPV. Το mRNA E7 προσδέεται με τη μη φωσφορυλιωμένη μορφή της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος (Rb) παρακάμπτοντας τον έλεγχο της φάσης G1 προς S του κυτταρικού κύκλου. Το mRNA E6 συνδέεται με την πρωτεΐνη p53 και έτσι η p53 οδηγείται σε καταστροφή μέσω του μηχανισμού της ουβικουιτίνης. Ο συνδυασμός αυτών των γεγονότων παρακάμπτει τα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου και επιτρέπει στο ικό DNA να αντιγράφεται σε κύτταρα που βρίσκονται εκτός κυτταρικού κύκλου.

Ένα μη επιθυμητό επακόλουθο αυτού είναι η αποδιοργάνωση του ελέγχου αύξησης του μολυσμένου κυττάρου κάτι το οποίο μπορεί να οδηγήσει στην καρκινογένεση. (Εικόνα 12)

Οι ιοί των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV) προκαλούν ασθένειες που κυμαίνονται από καλοήγη κονδυλωμάτων έως διηθητικούς καρκίνους. Οι HPV μολύνουν επιθηλιακά κύτταρα και ο κύκλος αντιγραφής τους είναι στενά συνδεδεμένος με τη διαδικασία διαφοροποίησης των μολυσμένων κερατινοκυττάρων. Ο κανονικός κύκλος αναπαραγωγής περιλαμβάνει μια πρόιμη και μία όψιμη φάση. Η πρόιμη φάση περιλαμβάνει την είσοδο του ιού και την αρχική αντιγραφή του γονιδιώματος του, την πυροδότηση της κυτταρικής διαίρεσης και την αναστολή της απόπτωσης στο μολυσμένο κύτταρο. Τα όψιμα συμβάντα στον κύκλο ζωής του HPV περιλαμβάνουν την ενίσχυση του ιικού γονιδιώματος, τον σχηματισμό του ιικού σωματιδίου και την απελευθέρωση του στο περιβάλλον από την επιφάνεια του επιθηλίου. Οι κύριες πρωτεΐνες που απαιτούνται στο τελευταίο στάδιο της μόλυνσης για τον πολλαπλασιασμό του ιικού γονιδιώματος περιλαμβάνουν τις E1, E2, E4 και E5. Οι όψιμες πρωτεΐνες L1 και L2 είναι δομικές πρωτεΐνες που σχηματίζουν το ιικό καψίδιο. Η ρύθμιση αυτών των όψιμων γεγονότων περιλαμβάνει τόσο κυτταρικές όσο και ιικές πρωτεΐνες. Τα όψιμα ιικά mRNAs εκφράζονται από έναν συγκεκριμένο όψιμο υποκινητή, αλλά τα τελικά επίπεδα όψιμου mRNA στο μολυσμένο κύτταρο ελέγχονται με συρραφή/ splicing, πολυαδενυλίωση, την έξοδο από τον πυρήνα και τη σταθεροποίηση του RNA. Η έκφραση των όψιμων πρωτεϊνών του ιού ελέγχεται επίσης στο επίπεδο της μετάφρασης.

Οι ιοί χειρίζονται τον κυτταρικό κύκλο του κυττάρου ξενιστή για να βελτιστοποιήσουν τις συνθήκες για την πιο αποτελεσματική αντιγραφή του ιικού τους γονιδιώματος. Μία στρατηγική που χρησιμοποιείται από DNA ιούς είναι η αναπαραγωγή των γονιδιωμάτων τους μη ταυτόχρονα με το γονιδίωμα του ξενιστή. Στην περίπτωση αυτή, το γονιδίωμα του ιού πολλαπλασιάζεται έξω από τη φάση S. Αυτό το φαινόμενο έχει επίσης περιγραφεί για τον αναδιπλασιασμό του γονιδιώματος του HPV, κάτι το οποίο συμβαίνει σε κύτταρα των οποίων ο κυτταρικός κύκλος έχει σταματήσει στη φάση G2. Ωστόσο, δεν έχει μελετηθεί η ακριβής στιγμή της αντιγραφής του ιικού DNA. Έχει δείχτει ότι η αντιγραφή του ιικού DNA αρχίζει κατά τη διάρκεια της φάσης S και επεκτείνεται στην G2 κατά τη διάρκεια του αρχικού πολλαπλασιασμού αλλά ακολουθεί

το μοτίβο αντιγραφής του κυτταρικού DNA κατά τη διάρκεια της φάσης S κατά τη σταθερή περίοδο συντήρησης. Η υπερέκφραση των πρωτεϊνών E1 και E2 αλλάζει τον χρόνο αντιγραφής από τη φάση S στις φάσεις S και G2 μόνο σε κύτταρα που διαθέτουν ενσωματωμένο ιικό DNA. Αυτά τα δεδομένα αποδεικνύουν ότι η ενεργή σύνθεση και αναδιπλασιασμός του γονιδιώματος του HPV επεκτείνονται στη φάση G2 για να ενισχυθεί ο αριθμός αντιγράφων του και ότι η διάρκεια αναπαραγωγής του γονιδιώματος του HPV ελέγχεται από το επίπεδο των πρωτεϊνών αντιγραφής του ιού E1 και E2. Η χρήση της φάσης G2 για τον πολλαπλασιασμό του γονιδιώματος μπορεί να είναι μια σημαντική προσαρμογή που επιτρέπει την εκμετάλλευση των μεταβαλλόμενων κυτταρικών συνθηκών κατά την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου.

Οι HPV είναι αποκλειστικά ενδοεπιθηλιακοί παθογόνοι παράγοντες και η μόλυνση και η ανάπτυξη των εξαρτώνται απόλυτα από την έκφραση του πλήρους προγράμματος διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων. Πιστεύεται ότι ο ιός μολύνει πρωτόγονα βασικά κερατινοκύτταρα, πιθανώς τραυματισμένα κερατινοκύτταρα, τα οποία πιθανώς αποκτούν φαινότυπο βλαστικών κυττάρων κατά τη διάρκεια της διαδικασίας τραυματισμού. Ωστόσο, η έκφραση του ιικού γονιδιώματος με παραγωγή ιικών πρωτεϊνών και συναρμολόγηση του ιού συμβαίνει μόνο στα ανώτερα διαφοροποιημένα στρώματα της ακανθωτής και κοκκώδους στιβάδας του πλακώδους επιθηλίου. Η έκφραση του ιικού γονιδιώματος περιορίζεται στα κερατινοκύτταρα. Δεν υπάρχουν μέχρι τώρα αποδείξεις ότι τα ιικά γονίδια εκφράζονται σε οποιοδήποτε κύτταρο εκτός από τα κερατινοκύτταρα και επιπλέον υπάρχει ένα συγκεκριμένο τοπικό και χρονικό πρότυπο έκφρασης των γονιδίων του HPV στο μολυσμένο επιθήλιο. Μετά από τη μόλυνση των βασικών κυττάρων στο τραύμα, πιστεύεται ότι υπάρχει ένας κύκλος αντιγραφής ιικού DNA που φαίνεται να είναι ανεξάρτητος από τον κυτταρικό κύκλο και ενισχύει τον αριθμό των αντιγράφων του ιού σε περίπου 50 έως 100 αντίγραφα ανά κύτταρο. Το μολυσμένο κύτταρο αφήνει τότε αυτό το πρωτόγονο διαμέρισμα και εισέρχεται στο μεταβατικό ενισχυτικό πολλαπλασιαστικό διαμέρισμα του επιθηλίου όπου υπάρχει μια φάση πλασμιδικής ή επισωματικής συντήρησης όπου ο αριθμός των αντιγράφων του ιού παραμένει σταθερός και η έκφραση του ιικού γονιδιώματος είναι ελάχιστη. Σε αυτή τη φάση του κύκλου ζωής του ιού των HPV υψηλού κινδύνου, η έκφραση των ισχυρών ογκογόνων πρωτεϊνών E6 και E7 είναι υπό αυστηρό έλεγχο και τα

αντίγραφα E6 και E7 των τύπων HPV υψηλού κινδύνου είναι δύσκολα ανιχνεύσιμα στο πολλαπλασιαζόμενο τμήμα του επιθηλίου. Όταν το μολυσμένο κερατινοκύτταρο εισέλθει στο διαφοροποιημένο τμήμα, στην ακανθωτή στιβάδα που εξέρχεται από τον κυτταρικό κύκλο, τότε υπάρχει μια εκτεταμένη αύξηση της έκφρασης του ιικού γονιδιώματος και της αντιγραφής του ιικού DNA, με ενίσχυση του αριθμού των αντιγράφων ιού σε πολλά χιλιάδες αντίγραφα ανά κύτταρο, των πρώιμων γονιδίων E6 και E7 και έκφραση των όψιμων γονιδίων από τον όψιμο προαγωγό, οδηγώντας τελικά σε σχηματισμό των HPV.

Είναι σημαντικό να γνωρίζουμε ότι αυτά τα συμβάντα εμφανίζονται σε κύτταρα που διαφοροποιούνται και έχουν εξέλθει του κυτταρικού κύκλου. Το γονιδίωμα του ιού είναι μικρό και οι ιοί κωδικοποιούν μόνο ένα ένζυμο αντιγραφής DNA, το E1. εκτός από αυτό και την ιική πρωτεΐνη E2, η αντιγραφή εξαρτάται τελείως από το μηχανισμό σύνθεσης κυτταρικού DNA. Οι κυτταρικές DNA πολυμεράσες του ιού και άλλοι παράγοντες αναδιπλασιασμού παράγονται μόνο σε κύτταρα που βρίσκονται σε διαδικασία μίτωσης. Για να ξεπεραστεί αυτό το πρόβλημα, οι HPVs κωδικοποιούν πρωτεΐνες που, στο πλαίσιο του κύκλου ζωής του ιού, αρχίζουν τη σύνθεση κυτταρικού DNA σε μη διαιρούμενα κύτταρα, αναστέλλουν την απόπτωση που διαφορετικά θα προέκυπτε και καθυστερούν το πρόγραμμα διαφοροποίησης των μολυσμένων κερατινοκυττάρων δημιουργώντας ένα ευνοϊκό περιβάλλον για αντιγραφή ιικού DNA. Σε αυτές τις λειτουργίες συνεισφέρουν τα γονίδια E6 και E7. Το γονίδιο E7 των ιών υψηλού κινδύνου συνδέεται με τη μη φωσφοριωμένη μορφή της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος, παρακάμπτοντας το σημείο ελέγχου G1 / S του κυτταρικού κύκλου. Το γονίδιο E6 των HPV υψηλού κινδύνου συνδέεται με το p53 και στοχεύει τη p53 για την ουβικουιτίνωση. Ο συνδυασμός αυτών των γεγονότων υπερισχύει των σημείων ελέγχου κυτταρικού κύκλου και επιτρέπει την αντιγραφή του ιικού DNA σε μη διαιρούμενα κύτταρα. Ένα ανεπιθύμητο σπάνιο παραπροϊόν αυτού είναι η απορύθμιση του ελέγχου της ανάπτυξης στο μολυσμένο κύτταρο και η ανάπτυξη του καρκίνου.

Η είσοδος του ιού στο κύτταρο φαίνεται να επιτυγχάνεται μέσω δέσμευσης σε πρωτεογλυκάνες θειικής ηπαρίνης στην επιθηλιακή βασική μεμβράνη μέσω της πρωτεΐνης L1. Το καψίδιο του ιού στη συνέχεια υφίσταται μεταβολή διαμόρφωσης που επιτρέπει την έκθεση της πρωτεΐνης L2, η οποία στη συνέχεια διασπάται σε μια συγκεκριμένη θέση φουρίνης στο N-τελικό άκρο. Αυτή η νέο-εκτιθέμενη θέση στην L2

δεσμεύεται με επιφανειακά μόρια στο τραυματισμένο κερατινοκύτταρο και εκτιμάται ότι εκεί το καψίδιο υφίσταται μια περαιτέρω δομική μεταβολή και ότι η θέση δέσμευσης του κυτταρικού υποδοχέα στην L1 εκτίθεται ή καθίσταται περισσότερο προσβάσιμη. Ο ιός δεσμεύεται μέσω της L1 στον κυτταρικό υποδοχέα και επιτυγχάνεται η είσοδος στο κύτταρο.

Μετά από τη μόλυνση το DNA του HPV ιού μπορεί να παραμείνει «ανενεργό» ακόμα και αν σε άλλα κύτταρα ο ιός έχει εισέλθει στην παραγωγική φάση. Η αυτόματη ύφεση των κονδυλωμάτων επιτυγχάνεται με τη βοήθεια της ανοσολογικής απόκρισης αλλά αυτό δεν οδηγεί στην κάθαρση από το DNA του ιού και έτσι ιικά γονιδιώματα μπορούν να παρατηρηθούν σε μακροσκοπικά φυσιολογικά επιθήλια πολλά χρόνια μετά από την ύφεση μιας βλάβης. Η ανοσοκαταστολή προδιαθέτει στην επανενεργοποίηση του ιού όπως φαίνεται από τα υψηλά ποσοστά HPV λοίμωξης της γεννητικής περιοχής που παρατηρείται σε ανοσοκατασταλμένους λήπτες μετά από μεταμοσχεύσεις και αυτούς με λοίμωξη από τον ιό του HIV. Μετά τον πολλαπλασιασμό του ιικού DNA τα επόμενα βήματα του κύκλου ζωής του ιού είναι η έκφραση των mRNA E1, E2 και E4, όπως και των πρωτεϊνών L1 και L2. Τέλος η είσοδος του ιικού DNA μέσα στο καψίδιο του και η έξοδος από το κύτταρο των νεοσχηματισμένων ιικών σωματιδίων. Η πρωτεΐνη L1 ανιχνεύεται μόνο σε τελικώς διαφοροποιημένα κύτταρα στις ανώτερες στιβάδες του επιθηλίου. Η L1 είναι η κύρια καψιδική πρωτεΐνη του HPV σχηματίζοντας 72 πενταμερή από 5 μόρια L1 το καθένα. Έχει τη δυνατότητα να σχηματίζει από μόνη της σωματίδια τα οποία χρησιμοποιούνται στην παρασκευή των εμβολίων. Η πρωτεΐνη L2 χρειάζεται για το σχηματισμό του καψιδίου γιατί είναι αναγκαία για τη σύνδεση του ιού στο κύτταρο στόχο. (Εικόνα 8)

Η λανθάνουσα φάση στον κύκλο ζωής του ιού τον βοηθά να κρύβεται από το ανοσοποιητικό σύστημα χρησιμεύει δηλαδή ως στρατηγική αποφυγής αποκρύπτοντας μη αναγκαίες ιικές πρωτεΐνες οι οποίες ίσως να ενεργοποιούσαν την ανοσολογική απάντηση του μολυσμένου κυττάρου. Ο ιός παραμένει ως ένα «γυμνό» νουκλειικό οξύ που επαφίεται στους μηχανισμούς του κυττάρου για να αντιγράψει όποτε αυτό διπλασιάζεται. Η λανθάνουσα φάση του ιού δε θα πρέπει να συγχέεται με τη κλινική λανθάνουσα φάση που σημαίνει ασυμπτωματική νόσηση. Οι ιοί των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV) στοχεύουν τις στιβάδες της επιδερμίδας και μπορούν να προκαλέσουν ασθένειες που

κυμαίνονται από καλοήγη κονδυλώματα έως κακοήθεις όγκους. Οι λοιμώξεις HPV του γεννητικού συστήματος είναι από τις πιο συχνές σεξουαλικά μεταδιδόμενες ασθένειες και αποτελούν σημαντικό παράγοντα κινδύνου για τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Ο ιός στοχεύει τα επιθηλιακά κύτταρα στη βασική στιβάδα του επιθηλίου, ενώ τα παραγόμενα ιικά σωματίδια αναδύονται από τελικώς διαφοροποιημένα κύτταρα στην κεράτινη στιβάδα, την επιφανειακή στιβάδα του επιθηλίου. Στα μολυσμένα βασικά κύτταρα, ο ιός διατηρεί το γονιδιώμα του σε χαμηλό αριθμό αντιγράφων, στα οποία δεν μπορεί να προχωρήσει ο παραγωγικός κύκλος ζωής του ιού. Η πρόοδος του παραγωγικού κύκλου ζωής απαιτεί τη διαφοροποίηση του κυττάρου-ξενιστή, υποδεικνύοντας ότι υπάρχει στενή αλληλοσύνδεση μεταξύ της αναπαραγωγής του ιού και της διαδικασίας διαφοροποίησης του κυττάρου ξενιστή.

Μετά τη μόλυνση, ένα ποσοστό του DNA του HPV μπορεί να παραμείνει λανθάνον εντός των κυττάρων, ενώ ένα άλλο έχει εισέλθει στον παραγωγικό κύκλο. Η αυθόρμητη παλινδρόμηση των κονδυλωμάτων είναι μεσολαβούμενη από ανοσία, αλλά αυτό δεν οδηγεί σε κάθαρση ιού και τα ιικά γονιδιώματα μπορούν να ανιχνευθούν σε μακροσκοπικά φυσιολογικό επιθήλιο, πολλούς μήνες και χρόνια μετά την ύφεση των κονδυλωμάτων. Αν όλα εξελιχθούν όπως πρέπει, η ισχυρή, τοπική, προκαλούμενη από το κύτταρο ανοσία που προάγει την υποχώρηση των μολυσμένων με HPV αλλοιώσεων πιθανώς κρατά ελεγχόμενη λανθάνουσα λοίμωξη και, σε υγιή ανοσολογικά άτομα, η υποτροπή της νόσου είναι σπάνια. Αντίθετα, η ανοσοκαταστολή προδιαθέτει στην επανενεργοποίηση, όπως αποδεικνύεται από τα υψηλά επίπεδα λοίμωξης από HPV γεννητικής περιοχής και νεοπλασίας που παρατηρούνται σε ανοσοκατασταλμένους δέκτες μοσχεύματος οργάνου και σε ασθενείς με μόλυνση με τον ιό της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV) (Εικόνα 2). Ως αποτέλεσμα, οι αντιικές θεραπείες είναι απαραίτητες για αυτούς τους ασθενείς. Ο πολλαπλασιασμός του ιού σε πάνω από 1.000 αντίγραφα περιορίζεται σε διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα τα οποία κανονικά έχουν εξέλθει του κυτταρικού κύκλου. Ως εκ τούτου, οι HPV, ειδικά οι ιικές πρωτεΐνες E5, E6 και E7, έχουν αναπτύξει μεθόδους για να υπονομεύσουν τις ρυθμιστικές οδούς κυτταρικής ανάπτυξης και είναι σε θέση να αποσυνδέσουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό από τη διαφοροποίηση. Μετά τον πολλαπλασιασμό του ιικού DNA, τα επόμενα βήματα στην παραγωγική φάση του κύκλου ζωής του ιού περιλαμβάνουν:

- (1) την έκφραση των πρωτεϊνών E1-E4,
- (2) την εμφάνιση των όψιμων γονιδίων L1 και L2,
- (3) εγκλεισμό του ιικού DNA σε καψίδιο, και
- (4) την απελευθέρωση νεοσχηματισμένων μολυσματικών ιικών σωματιδίων.

Η ενεργοποίηση των όψιμων υποκινητών οδηγεί στην έκφραση των γονιδίων L1 και L2. Η λειτουργία των L γονιδίων που κωδικοποιούν την L1 και η παραγωγή του ιού συνδέονται αυστηρά με το στάδιο διαφοροποίησης των μολυσμένων κυττάρων και οι πρωτεΐνες L1 ανιχνεύονται κυρίως σε τελικά διαφοροποιημένα κύτταρα στα ανώτερα στρώματα του επιθηλίου. Η L1 είναι η κύρια πρωτεΐνη καψιδίου του HPV, σχηματίζοντας 72 πενταμερή από πέντε μόρια L1 επιπλέον ενός μορίου L2. Η πρωτεΐνη L1 έχει την ικανότητα να αυτοσυναρμολογείται σε σωματίδια που ομοιάζουν με ιούς (VLPs) όταν εκφράζεται ως ευκαρυωτική ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη, η οποία χρησιμοποιείται στην παραγωγή εμβολίων κατά του HPV. Η πρωτεΐνη L2 είναι απαραίτητη για την καψιδίωση του DNA του HPV, επειδή η πρωτεΐνη L2 και όχι η πρωτεΐνη L1 μπορεί να δεσμεύσει το DNA του ιού. Οι ιοί σαν τον ιό HPV έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν βιρίονια και γίνονται μεταδιδόμενοι σε κάποια στιγμή στην πορεία του φυσικού τους κύκλου ζωής, αλλά μέσα στους όγκους αυτές οι μολύνσεις είναι γενικά λανθάνουσες, έτσι ώστε η παραγωγικός διπλασιασμός του ιού (επίσης γνωστός ως λυτικός διπλασιασμός) είτε μειώνεται είτε απουσιάζει. Η λανθάνουσα κατάσταση του ιού χρησιμεύει ως στρατηγική αποφυγής του ανοσοποιητικού συστήματος που επιτρέπει στον ιό να κρύβεται από το ανοσοποιητικό σύστημα με την απενεργοποίηση των περιττών ιικών πρωτεϊνών που μπορεί να ανιχνευθούν από την ανοσολογική αναγνώριση που προκαλείται από κύτταρα. Ο ιός επιμένει ως ένα γυμνό νουκλεϊκό οξύ, συχνά ως ένα πλασμίδιο ή επισωματική περιοχή, το οποίο βασίζεται στους μηχανισμούς των κυττάρων του ξενιστή για να αναπαράγεται όποτε διαιρείται το κύτταρο. Η λανθάνουσα φάση του ιού δεν πρέπει να συγχέεται με την κλινικά λανθάνουσα λοίμωξη, που σημαίνει ασυμπτωματική μόλυνση.

Η πιο ευνοϊκή εξήγηση για τη σχέση μεταξύ της λανθάνουσας φάσης του ιού και της ογκογένεσης είναι ότι οι παραγωγικά πολλαπλασιαζόμενοι ιοί προκαλούν κυτταρικό θάνατο, τον γνωστό cytopathic effect (CPE). Το επαγόμενο από τους ιούς CPE μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να εξοντώσει καρκινικά κύτταρα σε ιικές ογκολυτικές θεραπείες, που απεικονίζουν την αντικαρκινική δραστικότητα της ενεργού αντιγραφής του ιού. Παρόλο που η CPE συχνά θεωρείται ως επαγόμενη από τον ιό, στην πραγματικότητα είναι μια στερεότυπη και μη ειδική ενδογενής ανοσολογική απόκριση των κυττάρων κατά τη λοίμωξη από πολλούς τύπους ιών. Όταν οι λανθάνοντες ιοί μετατρέπονται σε παραγόμενα ιικά σωματίδια, ο πολλαπλασιασμός του ιού δημιουργεί μοριακά μοτίβα από μερικώς συντιθέμενα ιικά χρωμοσώματα, δίκλωνες έλικες RNA και κενά κοψίδια που πυροδοτούν αποκρίσεις βλάβης του DNA του κυττάρου και ενδογενή ανοσολογική σηματοδότηση. Για ορισμένους ιούς, ο λυτικός αναδιπλασιασμός δημιουργεί ένα γραμμικό ιικό χρωμόσωμα το οποίο μπορεί να αναγνωριστεί ως θραύσμα DNA εκτός εάν τα άκρα του DNA κρύβονται μέσω αλλαγής της δομής τους από τους αισθητήρες απόκρισης της βλάβης του DNA ή αυτοί οι αισθητήρες έχουν απενεργοποιηθεί. Η ενεργοποίηση του υποδοχέα toll-like και η σηματοδότηση της ιντερφερόνης από τη μόλυνση του ιού ενεργοποιεί και ενισχύει αυτήν την ενδογενή ανοσολογική απόκριση. Μαζί, αυτές οι κυτταρικές αποκρίσεις γενικά καταστρέφουν τα μολυσμένα κύτταρα που υφίστανται παραγωγικό πολλαπλασιασμό του ιού - εξ ου και ο όρος lytic replication. Όταν ξεκινήσει, ο λυτικός πολλαπλασιασμός του ιού είναι σχεδόν μη αναστρέψιμος και έτσι ξεκινά μια κούρσα μεταξύ του ιού για να αναπαράγει με επιτυχία τον εαυτό του και του θανάτου του κυττάρου ξενιστή. Μεταξύ των μικρών DNA ογκογόνων ιών, ο κατακερματισμός και η ενσωμάτωση του ιικού DNA στο νεοδημιουργητό κύτταρο του όγκου εξαλείφει την ικανότητά τους να αναπαράγονται ως βιρίονια, μια κατάσταση που ονομάζεται 'pseudo-latency' «ψευδό-λανθάνουσα φάση». Η ενσωμάτωση στο DNA του ξενιστή παρέχει στοιχεία για την αιτιοπαθογένεια του καρκίνου. (26,27,29,30,37,44,45,46)

7. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ HPV ΛΟΙΜΩΞΗΣ ΣΤΗΝ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ ΤΟΥ ΤΡΑΧΗΛΟΥ

Οι ιοί των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV) συνιστούν μια ετερογενή ομάδα που έχουν διαφορετικούς τροπισμούς κατά των επιθηλίων και διαφορετικές στρατηγικές κύκλου ζωής. Πολλοί HPV χαρακτηρίζονται ως χαμηλού κινδύνου, καθώς σπάνια συνδέονται με νεοπλασία ή καρκίνο στο γενικό πληθυσμό. Αυτοί οι υπότυποι HPV προκαλούν κλασσικά μη ορατές / ασήμαντες μολύνσεις ή καλοήγη θηλώματα, που μπορεί να παραμείνουν για μήνες ή χρόνια, αλλά τελικά απομακρύνονται από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή. Οι HPV χαμηλού κινδύνου είναι δύσκολο να αντιμετωπιστούν σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς και σε άτομα με γενετική προδιάθεση και μπορεί να προκαλέσουν θηλωμάτωση, και σε σπάνιες περιπτώσεις, καρκίνο. Οι υπότυποι HPV υψηλού κινδύνου είναι, αντιθέτως, αιτία πολλών σημαντικών καρκίνων στον άνθρωπο, συμπεριλαμβανομένων σχεδόν όλων των περιπτώσεων καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, μεγάλου ποσοστού άλλων καρκίνων της πρωκτογεννητικής περιοχής και μεγάλου αριθμού όγκων κεφαλής και λαιμού. Οι τύποι HPV υψηλού κινδύνου αποτελούν ένα υποσύνολο του γένους Alpha papillomavirus που ανευρίσκεται συχνά στο γενικό πληθυσμό και στα περισσότερα άτομα προκαλούν μόνο ήσσονος σημασίας στοματοφαρυγγικές και γεννητικές βλάβες. Η εξέλιξη του καρκίνου συνδέεται με την εμμένουσα λοίμωξη από HPV υψηλού κινδύνου και με την απορύθμιση της γονιδιακής έκφρασης του ιού, η οποία οδηγεί σε άμετρο πολλαπλασιασμό των κυττάρων, ελλειμματική επιδιόρθωση του DNA και σε συσσώρευση γενετικών βλαβών στο μολυσμένο κύτταρο. Αν και η οργάνωση του κύκλου ζωής τους είναι σε γενικές γραμμές παρόμοια με εκείνη των HPV τύπων χαμηλού κινδύνου, οι δύο ομάδες διαφέρουν σημαντικά όσον αφορά στην ικανότητά τους να καθοδηγούν τον κυτταρικό κύκλο του κυττάρου και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων στη βασική και παραβασική στιβάδα των κυττάρων. Αυτό πιστεύεται ότι συνδέεται, τουλάχιστον εν μέρει, με τις διαφορετικές ιδιότητες των υψηλού και χαμηλού κινδύνου πρωτεϊνών E6 στη μεταβολή της δραστηριότητας της πρωτεΐνης p53 και των πρωτεϊνών PDZ-domain και στην ικανότητα των E7 πρωτεϊνών να στοχεύουν τα διάφορα μέλη της οικογένειας πρωτεϊνών του ρετινοβλαστώματος. (34,39,53)

- ΤΑ ΒΛΑΣΤΟΚΥΤΑΡΑ ΚΑΙ Η ΜΟΛΥΝΣΗ ΑΠΟ ΤΟΝ ΙΟ HPV

Έχουν παρατηρηθεί αρκετές ομοιότητες μεταξύ της ομοιόστασης των καρκινικών κυττάρων και εκείνης των βλαστοκυττάρων. Αρκετές δημοσιεύσεις έχουν δείξει ότι οι κλασικοί καταστολείς όγκων όπως το p53 και το pRb έχουν σημαντικούς ρόλους στη ρύθμιση του stemness. Οι HPV συνδέονται στενά με έναν αριθμό κακοηθειών, κυρίως με καρκίνωμα του τραχήλου της μήτρας (CC). Αρκετές μελέτες έχουν υποστηρίξει την ύπαρξη πολλαπλών κυττάρων-στόχων του HPV εντός του επιθηλίου του ξενιστή. Όλο και περισσότερο υποστηρίζεται η υπόθεση ότι τα βλαστοκύτταρα της ζώνης μετάπτωσης (TZ) του τραχηλικού επιθηλίου είναι η πρωταρχική θέση της εμμένουσας λοίμωξης από τον HPV. Δεδομένης της παρατήρησης ότι πολλοί καρκίνοι του τραχήλου της μήτρας προέρχονται από την TZ, έχει προταθεί μια σύνδεση μεταξύ της λοίμωξης βλαστοκύτταρων των ιστών και ενδεχόμενης καρκινογένεσης. Η μακρά περίοδος λανθάνουσας φάσης μεταξύ της μόλυνσης με τον HPV και της ανάπτυξης των τραχηλικών δυσπλασιών υποστηρίζει την υπόθεση ότι αυτά τα κύτταρα μπορούν να είναι στόχοι μόλυνσης από τον HPV και να χρησιμεύουν ως όχημα για μια μακροχρόνια εγκατάσταση λανθάνουσας περιόδου στον τράχηλο. Τα καρκινικά βλαστοκύτταρα (CSCs) είναι κύτταρα εντός του όγκου που διαθέτουν ιδιότητες βλαστοκυττάρων, δηλαδή την ικανότητα αυτοανανέωσης και τη δυνατότητα γένεσης κυττάρων προοριζόμενων για διαφοροποίηση ώστε να δημιουργήσουν την ποικιλομορφία των κυττάρων του όγκου. Αν και οι γενετικές μεταβολές ή η ογκογόνος μόλυνση ενός αδιαφοροποίητου κυττάρου θεωρείται συνήθως ότι προκαλούν την εμφάνιση κυττάρων πυροδότησης της ογκογένεσης, διάφοροι όγκοι έχουν αποδειχθεί ότι προέρχονται επίσης από διαφοροποιημένα κύτταρα. Ο κυτταρικός επαναπρογραμματισμός που διαμεσολαβείται από ογκογόνους ιούς μπορεί να προάγει τον σχηματισμό κυττάρων πυροδότησης όγκου ή CSCs. Ο όρος "κύτταρα που πυροδοτούν όγκους", που αναφέρεται αυστηρά στα αρχικά κύτταρα από τα οποία εμφανίζεται ο ογκογόνος μετασχηματισμός, χρησιμοποιείται στις περισσότερες περιπτώσεις εναλλακτικά, περιγράφοντας την ικανότητα των CSCs να αναγεννηθούν πλήρως ή να "επαναπυροδοτήσουν" τη διαδικασία της ογκογένεσης. Το μακρύ χρονικό διάστημα της μόλυνσης από τον ιό των ανθρώπινων θηλωμάτων που συνήθως προηγείται των κακοήθων παθολογιών έχει συσχετιστεί με την λανθάνουσα περίοδο της ιογενούς μόλυνσης στα βλαστοκύτταρα των ιστών. Τα μολυσμένα βλαστοκύτταρα του ιστού μπορούν να χρησιμεύσουν ως κύτταρα

πυροδότησης όγκων ή CSCs σε καρκινώματα του τραχήλου που προκαλούνται από τον HPV (CCs). σε υποστήριξη αυτής της υπόθεσης, μια μελέτη έδειξε ότι το διθητικό και μεταστατικό δυναμικό του πλακώδους κυττάρου του καρκινώματος του τραχήλου (CSCC) συσχετίστηκε με γονίδια που σχετίζονται με καρκινικά βλαστοκύτταρα και υποστήριξε την ιδέα ότι οι HPV υψηλού κινδύνου μπορεί να προκαλέσουν φαινότυπο CSC στη ζώνη μετάπτωσης του τραχηλικού επιθήλιου. Επιπροσθέτως, η έκφραση των ιικών ογκογονιδίων E6 και E7 αποδείχθηκε ότι επάγει τον επιγενετικό επαναπρογραμματισμό σε ανθρώπινα κερατινοκύτταρα, μέσω διαμόρφωσης της δομής της χρωματίνης και γεγονότων μεθυλίωσης/ακετυλίωσης που περιλαμβάνουν κυτταρικούς παράγοντες που παίζουν σημαντικό ρόλο στην ογκογένεση και την ικανότητα αναγέννησης/stemness. Αυτά τα ευρήματα υποστηρίζουν την πιθανότητα ότι ο επαγόμενος από τον ιό HPV επιγενετικός επαναπρογραμματισμός είναι σημαντικός στην ιική ογκογένεση και υπογραμμίζει περαιτέρω τις ομοιότητες μεταξύ stemness και καρκινογένεσης, τουλάχιστον στο πλαίσιο του κύκλου ζωής του ογκογόνου αυτού ιού. Ωστόσο, είναι πιθανό η λοίμωξη των βλαστοκυττάρων του ιστού να επηρεάσει θετικά τον κύκλο ζωής του ιού, ειδικά όσον αφορά την εγκατάσταση μιας επιτυχούς χρόνιας λοίμωξης. Πρέπει να σημειωθεί ότι η ρύθμιση της ενδογενούς/innate ανοσίας και της φλεγμονώδους αντίδρασης, που επίσης είναι γνωστό ότι συνδέεται με την καρκινογένεση, τώρα αρχίζει να συνδέεται και με τη έννοια stemness.(47,54)

- **SPLICING PROCESS / ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΣΥΝΑΡΜΟΛΟΓΗΣΗΣ ΚΑΙ ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΟΥ HPV**

Πρέπει να σημειωθεί ότι μια σημαντική διαδικασία στον κύκλο ζωής του ιού είναι επίσης η διαδικασία του splicing. Το splicing είναι μια κυτταρική διαδικασία απαραίτητη για τη βιογένεση του mRNA. Υπάρχουν δύο τύποι ματίσματος: το συνεχές και το διακοπτόμενο splicing. Κατά τη διάρκεια της συνεχούς συναρμολόγησης, απομακρύνονται μη κωδικοποιητικές αλληλουχίες εσωνίων και οι κωδικοποιητικές αλληλουχίες των εξωνίων συνενώνονται για να σχηματίσουν ώριμα mRNAs. Το διακοπτόμενο splicing μπορεί να μεγιστοποιήσει την ικανότητα κωδικοποίησης του γονιδιώματος με ειδική επιλογή εξωνίων από pre-mRNAs. Το μάτισμα είναι μια αυστηρά ρυθμιζόμενη διαδικασία, οπότε αν χαθεί ο έλεγχος μπορεί να εμφανιστούν ασθένειες,

συμπεριλαμβανομένων γενετικών διαταραχών, αυτοάνοσων ασθενειών και καρκίνου. Οι πρωτεΐνες SR (πλούσιες σε σερίνη / αργινίνη πρωτεΐνες) είναι μια υψηλής σημασίας οικογένεια ρυθμιστικών μορίων συναρμολόγησης που εμπλέκονται επίσης σε άλλα στάδια της βιογένεσης και έκφρασης του RNA. Πολλοί ιοί έχουν εξελιχθεί για να χρησιμοποιήσουν τους μηχανισμούς κυτταρικής συναρμολόγησης για να ενισχύσουν το πρωτεϊνωμα τους από περιορισμένο αριθμό γονιδίων. Ο ιός HPV είναι ένα παράδειγμα ενός τέτοιου ιού. Ο παράγοντας μεταγραφής / αναπαραγωγής του HPV, E2, αυξάνει την έκφραση των SR πρωτεϊνών SF2 / ASF (συντελεστής συρραφής 2 / παράγοντας διακοπτόμενου ματίσματος splicing factor 2 / alternative splicing factor), SRp20 και SC35 σε μολυσμένα επιθηλιακά κύτταρα. Αυτές οι πρωτεΐνες SR είναι απαραίτητες για την επεξεργασία του ιικού RNA. Τα γονίδια SF2 / ASF είναι πρωτο-ογκογονίδια των οποίων η έκφραση επίσης αυξάνεται σε αρκετούς καρκίνους. Εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα σε καρκίνους όπως ο καρκίνος του μαστού, του προστάτη και του τραχήλου της μήτρας. Για παράδειγμα, τα SF2 / ASF μαζί με τα SRp20 και SC35 εκλεκτικώς αυξάνονται σε όγκους του τραχήλου της μήτρας που προκαλούνται από την εμμένουσα ογκογόνο μόλυνση από τον HPV. Ωστόσο, ο τρόπος αύξησης των πρωτεϊνών SR σε κακοήθεις όγκους είναι διαφορετικός από την κατευθυνόμενη από την E2 μεταγραφική ρύθμιση σε φυσιολογική παροδική λοίμωξη από τον HPV. Οι πρωτεΐνες SR θα μπορούσαν να παράσχουν εξαιρετικούς στόχους για αντιϊκή θεραπεία κατά του HPV καθώς και για αντικαρκινική θεραπεία.(31,37)

- ΟΙ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ HPV ΜΕ ΤΟΥΣ ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΟΥΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥΣ ΤΟΥ ΚΥΤΑΡΟΥ

Η ικανότητα του HPV να επιμένει σε κύτταρα ξενιστές για μεγάλα χρονικά διαστήματα χωρίς να αποβάλλεται από το ανοσοποιητικό σύστημα είναι λόγω της ανωτερότητας των μηχανισμών άμυνας του. Έχει δείχτεί ότι οι ογκοπρωτεΐνες των HR-HPV δηλαδή οι E5, E6 και E7 μπορούν να αναστείλουν την μετάδοση σήματος για κυτταρικό θάνατο σε σημεία κλειδιά του κυτταρικού κύκλου. Η ικανότητα του HPV να προσκολλάται στον ξενιστή για μεγάλα χρονικά διαστήματα χωρίς να αποβάλλεται από τους μηχανισμούς άμυνας του οφείλεται στην πολυπλοκότητα και επιτήδευση των μηχανισμών διαφυγής του. Δεδομένα από μελέτες υποδεικνύουν ότι οι ογκοπρωτεΐνες

των HR-HPV, E6, E7 και E5, μπορούν να αναστείλουν τη σηματοδότηση του υποδοχέα απόπτωσης σε βασικά σημεία του μονοπατιού. Στη συνέχεια, ο HPV είναι σε θέση να στηρίζει την επιβίωση των μολυσμένων κυττάρων για να διευκολύνει τον κύκλο αντιγραφής του, εξασφαλίζοντας έτσι την παραγωγή και την εξάπλωση του γονιδιώματος του. Οι καρκίνοι του τραχήλου της μήτρας που είναι θετικοί για τον ιό HPV και διάφορες κυτταρικές σειρές προερχόμενες από αυτούς εμφανίζουν την έκφραση αρκετών κασπασών αλλά και μείωση της έκφρασης της πρωτεΐνης Fas, οδηγώντας σε μειωμένη απόπτωση. Πολλαπλές αλλαγές στην έκφραση και στην ενεργοποίηση της κασπάσης έχουν αναφερθεί σε βιοψίες και σε κυτταρικές σειρές προερχόμενες από καρκίνο του τραχήλου της μήτρας που είναι θετικές για τον HPV. (44,45,46)

- EPISOMES, INTEGRATION AND GENOMIC INSTABILITY

Τα αντίγραφα του DNA του HPV διατηρούνται σε χαμηλό αριθμό αντιγράφων στον πυρήνα και μόνο πρώιμες πρωτεΐνες εκφράζονται από το ιικό γονιδίωμα. Συγκεκριμένα, το γονιδίωμα του HPV έχει αποδειχθεί ότι είναι ενσωματωμένο εντός των κοινών εύθραυστων θέσεων των ανθρώπινων χρωμοσωμάτων και εντός ή κοντά σε γονίδια, όπως τα VMP1, PVRL1, CHERP, CEACAM5, AHR και MRF-2, σε ένα σημαντικό αριθμό υψηλόβαθμων αλλοιώσεων σχετιζόμενων με τον HPV, αλλά όχι χαμηλόβαθμων, κάτι που δείχνει ότι αυτό είναι ένα καθυστερημένο και κρίσιμο γεγονός στην πρόοδο του καρκίνου. Οι όγκοι με επισωματικό DNA βρέθηκαν να είναι μεγαλύτεροι σε σύγκριση με τους μεικτού τύπου και αυτούς με ενσωματωμένο ιικό DNA. Πιθανώς το DNA του HPV στην επισωματική μορφή του είναι ικανό να επιφέρει μεγαλύτερη ανάπτυξη με την έκφραση των ικών ογκογόνων πρωτεϊνών του.

Η ενσωμάτωση του ικού γονιδιώματος είναι ένα τερματικό γεγονός για τον κύκλο ζωής του ιού και συχνά οδηγεί σε διαγραφή άλλων ικών γονιδίων. Επιπλέον, τα κύτταρα που εκφράζουν τις πρωτεΐνες E6 και E7 των υψηλού κινδύνου ιών HPV έχουν μειωμένη ικανότητα να διατηρούν την γονιδιωματική ακεραιότητα τους. Η ογκοπρωτεΐνη E7 των HPV υψηλού κινδύνου δρα ως παράγοντας μετάλλαξης της διαδικασίας της μίτωσης και επάγει πολλαπλές μορφές μιτωτικών ανωμαλιών, συμπεριλαμβανομένων των γεφυρών ανάφασης, των μη ευθυγραμμισμένων χρωμοσωμάτων και κυρίως των μιτώσεων με πολλά πολικά σωματίδια. Οι μιτώσεις με

πολλά πολικά σωματία αποτελούν χαρακτηριστικά γνωρίσματα τραχηλικών βλαβών και καρκίνου οφειλόμενων σε υψηλού κινδύνου στελέχη HPV και προκαλούνται από την ικανότητα του HPV να αποσυνδέσει το διπλασιασμό των κεντροσωματίων από τον κύκλο κυτταρικής διαίρεσης. Ως εκ τούτου, οι ογκοπρωτεΐνες του HPV E6 / E7 συνεισφέρουν μέσω ειδικών μηχανισμών στην έναρξη και εξέλιξη του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας.(18,19,39)

- ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗΣ

Η καρκινογένεση είναι μια διαδικασία πολλαπλών σταδίων που σχετίζεται με τη συσσώρευση γενετικών μεταβολών στα κύτταρα. Ο καρκίνος οφείλεται στη συσσώρευση συγκεκριμένων γενετικών μεταλλάξεων, πολλές από τις οποίες έχουν πλέον ανακαλυφθεί. Αυτές οι μεταλλάξεις μπορούν να προκαλέσουν την ενεργοποίηση γονιδίων που προάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ή αναστέλλουν τον κυτταρικό θάνατο (ογκογονίδια) ή μπορούν να απενεργοποιήσουν γονίδια που αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό ή προάγουν τον κυτταρικό θάνατο (ογκοκατασταλτικά γονίδια). Οι πρωτεΐνες που προέρχονται από διάφορα ογκογονίδια, είτε κυτταρικά είτε ιικά, όπως αυτά του γονιδίου SV40 T του polyomavirus ή τα ογκογονίδια E6 και E7 του ιού HPV, γενικά είτε αυξάνουν την ταχύτητα κυτταρικής διαίρεσης είτε αναστέλλουν τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, αυξάνοντας έτσι τον κίνδυνο κακοήθειας. Ο μοριακός μηχανισμός της HPV καρκινογένεσης μπορεί να εξηγηθεί από τη ρύθμιση και τη λειτουργία των δύο ιικών ογκογονιδίων E6 και E7. Τα γονίδια E6 και E7 βρίσκονται υπό τη ρύθμιση της πρωτεΐνης του γονιδίου E2. Το γονίδιο E2 είναι συχνά η θέση που λαμβάνει χώρα η ενσωμάτωση, με αποτέλεσμα τη διάσπαση του γονιδίου E2 και την επακόλουθη απενεργοποίηση των E6 και E7. Η πρωτεΐνη E6 συνδέεται με το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53. Η σύνδεση του E6 με το p53 οδηγεί στην ουβικουιτίνωση και αποδόμηση της πρωτεΐνης p53. Η πρωτεΐνη E7 στοχεύει μια άλλη ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη, την πρωτεΐνη του γονιδίου του ρετινοβλαστώματος (pRb). Η δέσμευση της E7 στο pRb μεταβάλλει την κατάσταση φωσφορυλίωσης του και έτσι απενεργοποιεί λειτουργικά αυτή την πρωτεΐνη, η οποία, όπως η p53, βοηθούν στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου. Φυσιολογικά, η πρωτεΐνη pRb δεσμεύει τον παράγοντα μεταγραφής E2F, κάτι το οποίο οδηγεί στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου από τη

φάση G1 στη φάση S. Η δέσμευση της E7 στην pRb έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός ανενεργού συμπλόκου E7-pRb ενώ από την άλλη πλευρά, η απώλεια της δέσμευσης του E2F στην pRb επιτρέπει στον E2F να δεσμεύσει το DNA και να επάγει την κυτταρική ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό. Πολλά ογκογονίδια κωδικοποιούν αυξητικούς παράγοντες που πυροδοτούν τον πολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων συμπεριλαμβανομένου του αυξητικού παράγοντα (TGF- α) και του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGF). Και οι δύο πρωτεΐνες συχνά υπερεκφράζονται σε καρκινώματα εκ πλακωδών κυττάρων (SCC) της κεφαλής και του λαιμού, ιδιαίτερα της στοματικής κοιλότητας. Συνολικά, περίπου οι μισοί από τους καρκίνους του βλεννογόνου της κεφαλής και του λαιμού πιστεύεται ότι περιέχουν μεταλλάξεις σε μια συγκεκριμένη περιοχή του γονιδίου p53. Η διακοπή της λειτουργίας του p53 φαίνεται να είναι ένα πρώιμο συμβάν στη διαδικασία ογκογένεσης της κεφαλής και του λαιμού και έχει συνδεθεί με την έκθεση σε μεταλλαξογόνους παράγοντες, όπως τα βενζοπυρένια, που βρίσκονται στον καπνό. Η απενεργοποίηση της πρωτεΐνης του γονιδίου του ρετινοβλαστώματος (pRB), αν και είναι λιγότερο συχνή από την p53, προκαλεί τη δυσλειτουργία της στο SCC της κεφαλής και του λαιμού. Αν και η σημασία των p53 και pRb είναι γνωστή εδώ και πολλά χρόνια, η πρόσφατη ανακάλυψη ότι η δυσλειτουργία άλλων γονιδίων που ελέγχουν τον κυτταρικό κύκλο μπορεί να οδηγήσει σε κακοήγη μετασχηματισμό, αποτελεί σημαντική πρόοδο στη βιολογία του καρκίνου.(38,41) (Εικόνα 19)

Η αλλαγή του μεταβολισμού της γλυκόζης είναι ένα από τα πρώτα βιοχημικά χαρακτηριστικά που συνδέονται με τα καρκινικά κύτταρα, καθώς τα περισσότερα από αυτά αυξάνουν την κατανάλωση γλυκόζης και το ποσοστό γλυκόλυσης ακόμη και υπό την παρουσία οξυγόνου, διαδικασία που ονομάζεται αερόβια γλυκόλυση ή το Warburg effect. Οι ιοί HPV σχετίζεται με περίπου το 5% όλων των ανθρώπινων καρκίνων παγκοσμίως, και κυρίως τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Οι πρωτεΐνες E6 και E7 είναι οι κύριες ιικές ογκοπρωτεΐνες οι οποίες είναι απαραίτητες για τη διατήρηση του κακοήθους δυναμικού. Αυτές οι ιικές πρωτεΐνες ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο μέσω της αλληλεπίδρασής τους με τις ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες p53 και pRB, αντίστοιχα. Μαζί με τις ιικές πρωτεΐνες E5 και E2, οι E6 και E7 μπορούν να ευοδώσουν το Warburg effect και να συμβάλλουν στη μείωση της ακτινοευαισθησίας και χημειοευαισθησίας

μέσω της αύξησης της δραστηριότητας των γλυκολυτικών ενζύμων, καθώς και της αναστολής του κύκλου του Krebs και της αναπνευστικής αλυσίδας. Αυτές οι διαδικασίες οδηγούν σε μια γρήγορη παραγωγή ATP από το Warburg effect, η οποία βοηθά στην ικανοποίηση των υψηλών ενεργειακών απαιτήσεων των καρκινικών κυττάρων κατά τη διάρκεια του πολλαπλασιασμού τους. Με αυτό τον τρόπο οι πρωτεΐνες του HPV υποστηρίζουν τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα του καρκινικού όγκου.(42,55)

- Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΩΝ

Δεδομένου του ρόλου των μιτοχονδρίων στην κατανάλωση οξυγόνου, στον μεταβολισμό και στη ρύθμιση του κυτταρικής απόπτωσης, οι μεταβολές στη λειτουργία των μιτοχονδρίων ή η δυσλειτουργία των μονοπατιών του κυτταρικού θανάτου συμβάλλουν στη γένεση και την εξέλιξη του καρκίνου. Τα καρκινικά κύτταρα εμφανίζουν μια σειρά μεταβολικών μετασχηματισμών που δημιουργούνται από μεταλλάξεις που οδηγούν σε αύξηση της λειτουργίας των ογκογονιδίων και απώλεια της λειτουργίας των ογκοκατασταλτικών γονιδίων που περιλαμβάνουν αυξημένη κατανάλωση γλυκόζης, μειωμένη λειτουργία της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας, αυξημένη παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου και αντίσταση στην επέλευση του κυτταρικού θανάτου, τα οποία εξασφαλίζουν την εξέλιξη του καρκίνου. Ο μεταβολισμός της χοληστερόλης διαταράσσεται στα καρκινικά κύτταρα και υποστηρίζει την ανεξέλεγκτη κυτταρική ανάπτυξη. Συγκεκριμένα, η συσσώρευση χοληστερόλης στα μιτοχόνδρια εμφανίζεται ως ένα μοριακό συστατικό που ενορχηστρώνει μερικές από τις μεταβολικές αλλαγές στα καρκινικά κύτταρα, μειώνοντας τη λειτουργία των μιτοχονδρίων. Κατά συνέπεια, η φόρτιση χοληστερόλης στα μιτοχόνδρια των καρκινικών κυττάρων μπορεί να συμβάλει εν μέρει στο φαινόμενο Warburg που διεγείρει την αερόβια γλυκόλυση με σκοπό να ικανοποιήσει την ζήτηση σε ενέργεια των πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων, προστατεύοντας ταυτόχρονα τα καρκινικά κύτταρα από τη μιτοχονδριακή απόπτωση λόγω μεταβολών στη δυναμική των μιτοχονδριακής μεμβράνης. Περαιτέρω κατανόηση της πολυπλοκότητας στις μεταβολικές αλλαγές των καρκινικών κυττάρων που προκαλούνται κατά κύριο λόγο από μεταβολές στη λειτουργία των μιτοχονδρίων μπορεί να ανοίξει το δρόμο για τον εντοπισμό αποτελεσματικότερων στρατηγικών για τη θεραπεία του καρκίνου που περιλαμβάνουν τη χρήση μικρών μορίων

που στοχεύουν στα μιτοχόνδρια, στην ομοιοστασία της χοληστερόλης και ειδικά μεταβολικά μονοπάτια. Μελέτες έδειξαν ότι το μόριο κυτταρικής προσκόλλησης cell adhesion molecule 1 (CADM1) μειώνεται σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του τραχήλου προσβεβλημένες από τον ιό HPV μέσω της υπερμεθυλίωσης και απομεθυλίωσης. Η υπερέκφραση του CADM1 αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Η πρωτεΐνη p53 συμμετέχει στη ρύθμιση του CADM1. Αποτελέσματα μελετών καταδεικνύουν ότι η επιγενετική αλλαγή του CADM1 είναι συχνότερη στους HPV θετικούς καρκίνους του τραχήλου της μήτρας και ότι η αποκατάσταση της έκφρασης του CADM1 μπορεί να αποτελέσει πιθανή στρατηγική για τη θεραπεία του.(35,36)

Οι HR-HPV προκαλούν καρκίνους της πρωκτογεννητικής περιοχής, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας και των καρκίνων της κεφαλής και του λαιμού. Ο υπότυπος 16 του ιού (HPV16) είναι ο επικρατέστερος High Risk-HPV. Η ικανότητα ογκογένεσης του HPV στηρίζεται σε δύο ικές ογκοπρωτεΐνες, τις E6 και E7, οι οποίες εκφράζονται και αποδίδουν τέσσερις κύριες ισομορφές (την E6 πλήρους μήκους, την E6 - I, την E6 - II, και την E6 - X). Η παραγωγή πολλαπλών ισομορφών mRNA από ένα μόνο γονίδιο ελέγχεται από πλούσιους σε σερίνη / αργινίνη παράγοντες splicing (SRSFs) και η μόλυνση με τον HPV16 προκαλεί υπερέκφραση ενός υποσυνόλου αυτών, των SRSFs 1, 2 και 3. Πειράματα σχετικά με τα small interfering RNA (siRNA) αποκάλυψαν ότι το SRSF1 δεν επηρέασε τα επίπεδα RNA των ογκοπρωτεϊνών. Ενώ η μείωση του SRSF3 προκαλεί κάποια μείωση στην έκφραση των E6 και E7, η ολοκληρωτική απώλεια του SRSF2 είχε σαν αποτέλεσμα σημαντική μείωση των E6 και E7 RNAs, με αποτέλεσμα μειωμένα επίπεδα της πρωτεΐνης p53 που ρυθμίζεται από την E6 αλλά και της ογκοπρωτεΐνης E7. Το SRSF2 συμβάλει στον φαινότυπο του όγκου των HPV16 θετικών καρκινικών κυττάρων του τραχήλου της μήτρας, καθώς η μείωση του έχει ως αποτέλεσμα το μειωμένο πολλαπλασιασμό των κυττάρων, μειωμένο σχηματισμό αποικιών και αυξημένη απόπτωση. Ο SRSF2 δεν επηρεάζει τη μεταγραφή από τον υποκινητή P-97 που ελέγχει την έκφραση των ικών ογκοπρωτεϊνών. Αντίθετα, πειράματα έδειξαν ότι ο SRSF2 απαιτείται για να διατηρηθεί η σταθερότητα των E6 και E7 mRNAs. Αυτά τα δεδομένα δείχνουν ότι ο SRSF2 είναι βασικός ρυθμιστής της έκφρασης των ογκοπρωτεϊνών του HPV16 και της εξέλιξης του όγκου του τραχήλου.(43) (Εικόνα 14)

Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο του ρετινοβλαστώματος (RB) ρυθμίζει τη μετάβαση G1 / S κατά την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου ρυθμίζοντας τη δραστηριότητα των παραγόντων μεταγραφής E2F. Το μονοπάτι έκφρασης του RB παίζει κεντρικό ρόλο στην καταστολή των περισσότερων καρκίνων και η μετάλλαξη του αρχικά ανακαλύφθηκε λόγω του ρόλου της στην έναρξη της καρκινογένεσης. Έχει καταστεί όλο και πιο σαφές ότι στην πλειοψηφία των καρκίνων, η απενεργοποίηση του RB συμβαίνει κατά την εξέλιξη του όγκου. Επιπλέον, παρά την απώλεια του ελέγχου του κυτταρικού κύκλου λόγω της διαγραφής του INK4A, της επιπρόσθετης αύξησης του CCND ή άλλων μεταλλάξεων στο μονοπάτι του RB, παρατηρείται συχνά μετάλλαξη ή διαγραφή του γονιδίου του RB κατά τη διάρκεια της εξέλιξης του καρκίνου. Αξιοσημείωτο είναι ότι η απενεργοποίηση του RB κατά τη διάρκεια της προόδου του καρκίνου όχι μόνο διευκολύνει τη μετάβαση της φάσης G1 σε S αλλά και ενισχύει ορισμένα χαρακτηριστικά της κακοήθειας, συμπεριλαμβανομένης της αλλαγής στην ευαισθησία κατά των φαρμάκων και της επιστροφής στην αδιαφοροποίητη κατάσταση του κυττάρου. Τα MicroRNAs είναι μη-κωδικοποιητικά RNA με σημαντικές λειτουργίες σε διάφορες βιολογικές διεργασίες, όπως η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, η ανοσολογική απόκριση, η φλεγμονή και η απόπτωση. Στην πραγματικότητα, η απορύθμιση και η ανώμαλη έκφραση αυτών των μορίων συνδέεται με παθολογικές καταστάσεις του ανθρώπου, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου, και μερικά τέτοια μόρια έχουν ήδη αναδειχθεί ως δυνητικοί προγνωστικοί βιοδείκτες σε διάφορες νεοπλασίες. Το miR-34a ρυθμίζεται άμεσα από την p53 και δρα ως ογκοκατασταλτικό μόριο ενώ το miR-125b παίζει σημαντικό ρόλο στην ανοσολογική απάντηση και την απόπτωση. Στην καρκινογένεση του τραχήλου της μήτρας, οι πρωτεΐνες του HPV φαίνεται να αλληλεπιδρούν τόσο με το miR-34a όσο και με το miR-125b αλλάζοντας την έκφρασή τους και προάγοντας την εμμενουσα λοίμωξη και την ανάπτυξη του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Η συνεχής παραγωγή της πρωτεΐνης E7 από διαφορετικούς υποτύπους ιών HPV υψηλού κινδύνου απαιτείται για την εξέλιξη της κακοήθειας. Μελετήθηκε η αξία των πρωτεϊνών E7 και E2 ως βιοδείκτες για τη διάγνωση του πρώιμου σταδίου του καρκίνου του τραχήλου. Η έκφραση των E2 και E7 του HPV16 που σχετίζονται με την έκφραση της πρωτεΐνης p16 επιβεβαιώνουν την αξία των ικών

ογκογόνων πρωτεϊνών ως συμπληρωματικής της ιστολογικής απόδειξης επειδή η ενσωμάτωση του DNA του HPV στο DNA του κυττάρου συνεπάγεται την καταστροφή του γονιδίου που κωδικοποιεί την E2 η οποία καταστέλλει την έκφραση των E6 και E7 ογκοπρωτεϊνών. Η πρωτεΐνη E2 του HPV16 επομένως θα μπορούσε να είναι βιοδείκτης για τα LSIL. Έχει χαρτογραφηθεί ένα παγκόσμιο δίκτυο αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών ιού με αυτές του ξενιστή. Η ενσωμάτωση αυτού του χάρτη με τους άτλαντες του γονιδιώματος του όγκου δείχνει ότι ο ιός στοχεύει ανθρώπινες πρωτεΐνες. Για παράδειγμα, διαπιστώνουμε ότι η μεταγραφική οδός NRF2, η οποία προστατεύει από το οξειδωτικό στρες, ενεργοποιείται μέσω αλληλεπίδρασης του ρυθμιστή του NRF2, KEAP1, με την πρωτεΐνη E1 του ιού. Επίσης, αποδεικνύεται ότι η πρωτεΐνη L2 HPV αλληλεπιδρά φυσικά με την ουβικουϊτίνωση του συμπλέγματος ιστονών RNF20 / 40 και προάγει την εισβολή των κυττάρων του όγκου με τρόπο εξαρτώμενο από το RNF20 / 40. Αυτή η συνδυασμένη προσέγγιση πρωτεϊνών και γονιδιώματος παρέχει ένα συστηματικό μέσο για τη μελέτη των κυτταρικών μηχανισμών που παρακάμπτονται και εκμεταλλεύονται από τους καρκίνους που επάγονται από ιούς. Ο ιός HPV είναι ένας μικρός δίκλωνος ιός DNA με τροπισμό για επιθηλιακά κύτταρα. Μέχρι σήμερα, πάνω από 150 γονότυποι είναι γνωστοί και ταξινομούνται σε δύο κύριες ομάδες, στελέχη χαμηλού κινδύνου και υψηλού κινδύνου, ανάλογα με την ικανότητα του ιού να προκαλεί κακοήγη μετασχηματισμό του κυττάρου του ξενιστή. Η ανοσία του ξενιστή διαδραματίζει κεντρικό ρόλο κατά τη διάρκεια της μόλυνσης. Επομένως, είτε μπορεί να μην εκδηλωθεί κλινικά ή μπορεί να προκαλέσει διάφορες καλοήθεις ή κακοήθεις βλάβες. Οι παθογόνοι μηχανισμοί είναι πολύπλοκοι και πλημμυρώς αποκωδικοποιημένοι. Πρόσφατες έρευνες υποδεικνύουν το ρόλο της χρόνιας φλεγμονής και του οξειδωτικού στρες (OS) στην παθογένεια της λοίμωξης από τον HPV και σχετιζόμενης διαδικασίας της καρκινογένεσης. Η χρόνια φλεγμονή προκαλεί οξειδωτικό στρες, το οποίο με τη σειρά του προάγει τη διαίωση της φλεγμονώδους διαδικασίας με αποτέλεσμα την απελευθέρωση πολυάριθμων μορίων που προκαλούν κυτταρική βλάβη. Τα δραστικά μόρια οξυγόνου ασκούν βλαβερή επίδραση στις πρωτεΐνες, τα λιπίδια και τα νουκλεϊκά οξέα. Οι ιικές ογκοπρωτεΐνες του ιού E5, E6 και E7 εμπλέκονται στην ανάπτυξη χρόνιας φλεγμονής μέσω διαφόρων μηχανισμών. Επιπλέον, ο HPV μπορεί να παρεμβαίνει στην ομοίωση της οξειδοαναγωγής των κυττάρων-ξενιστών, προκαλώντας οξειδωτικό

στρες που μπορεί να εμπλέκεται στην χρονιότητα της λοίμωξης και διαδραματίζει βέβαιο ρόλο στην ενσωμάτωση των ιών στα κύτταρα και στην προώθηση της καρκινογένεσης. Η ικανότητα του ξενιστή να ενεργοποιεί την απόπτωση σε μολυσμένα κύτταρα είναι ίσως το πιο ισχυρό εργαλείο με το οποίο οι ιοί μπορούν να καθαριστούν από τον οργανισμό-ξενιστή. Για να αποφευχθεί η εξάλειψη με αυτόν τον μηχανισμό, οι ιοί HPV έχουν αναπτύξει αρκετούς μηχανισμούς που επιτρέπουν στα κύτταρα που μολύνουν να ξεφύγουν από την εξωγενή και την ενδογενή απόπτωση. Πολλές από τις τρέχουσες προσπάθειες όσον αφορά την ανάπτυξη αντικαρκινικών φαρμάκων επικεντρώνονται στην κατεύθυνση των κυττάρων όγκου να υποβάλλονται σε απόπτωση. Ωστόσο, η ικανότητα των HPV-μολυσμένων κυττάρων να αντιστέκονται στα αποπτωτικά σήματα καθιστά τέτοιες θεραπείες αναποτελεσματικές. (32,33,38,40)

Μία από τις σημαντικότερες διαδικασίες για τη διατήρηση της ομοιόστασης στους οργανισμούς είναι η απόπτωση, που ονομάζεται επίσης προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος. Αυτός ο μηχανισμός λειτουργεί μέσω δύο οδών: Την ενδογενή ή μιτοχονδριακή, κατά την οποία το κύτταρο ανταποκρίνεται σε βλάβες του DNA από εξωτερικούς παράγοντες όπως η ακτινοβολία UV, και την εξωγενή ή με μεσολάβηση υποδοχέα, κατά την οποία το κύτταρο δεσμεύεται με συγκεκριμένους συνδέτες για να ξεκινήσει την αποπτωτική διαδικασία. Η αποφυγή της απόπτωσης είναι ένας από τους κύριους μηχανισμούς μετασχηματισμού του καλοήθους κυττάρου σε κακόηθες. Πολλοί ιοί έχουν δείξει σημαντική ικανότητα να τροποποιούν την αποπτωτική διαδικασία μεταξύ των οποίων είναι και ο ιός των ανθρωπίνων θηλωμάτων, ο οποίος, μέσω των ογκοπρωτεϊνών του, παρεμβαίνει στα κυτταρικά μονοπάτια, αντιδρά με τους υποδοχείς και τα μόρια και συμμετέχει στο μηχανισμό θανάτου. Αυτό δημιουργεί ιδανικές συνθήκες για την ανάπτυξη καρκίνου. Η ρύθμιση της απόπτωσης του ξενιστή με τη μεσολάβηση από τις ογκοπρωτεΐνες E6 και E7 έχει συγκεντρώσει την προσοχή επειδή πιστεύεται ότι είναι μια σημαντική στρατηγική που χρησιμοποιείται από τους υψηλού κινδύνου ιούς των ανθρωπίνων θηλωμάτων (HR-HPV) για να αποφεύγουν την παρακολούθηση του ανοσοποιητικού συστήματος. Επιπροσθέτως, η αποκάλυψη ότι το γονίδιο E5 μπορεί να προστατεύσει τα κύτταρα από την σχετιζόμενη με τον παράγοντα νέκρωσης όγκου προκαλούμενη απόπτωση (TRAIL) σημαίνει ότι μπορεί επίσης να παίζει ρόλο στην υπονόμευση των αμυντικών μηχανισμών του ξενιστή. Ο κυτταρικός

μετασχηματισμός είναι μια ακούσια συνέπεια της επίμονης μόλυνσης από HR-HPVs και είναι επομένως πιθανό ότι η πρωταρχική λειτουργία των E5, E6 και E7 είναι η ρύθμιση της κυτταρικής επιβίωσης σε όλο τον φυσιολογικό κύκλο ζωής του ιού, προκειμένου να διασφαλιστεί η αναπαραγωγή του ιού και να προωθηθεί η εξάπλωση των απογόνων του.(44,45,46)

8. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ ΠΡΟΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΒΛΑΒΩΝ

Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας προέρχεται από κύτταρα εντοπισμένα στον τράχηλο της μήτρας τα οποία εξαλλάσσονται μετά από εμμένουσα λοίμωξη με έναν από τους περίπου 13 γονότυπους υψηλού κινδύνου του ιού των ανθρωπίνων θηλωμάτων. Η πλειοψηφία των μολύνσεων από HPV προκαλεί καλοήθεις επιθηλιακές βλάβες χαμηλού βαθμού, οι οποίες σε ποσοστό μεγαλύτερο από το 90% των περιπτώσεων υποχωρούν αυθόρμητα και σε περίπου 10% τελικά προχωρούν σε βλάβες υψηλού βαθμού και ακόμη λιγότερο συχνά εξελίσσονται σε διηθητικό καρκίνο. Η πρόοδος του όγκου χαρακτηρίζεται από πρώτον αυξημένη έκφραση των γονιδίων E6 και E7 των HPV υψηλού κινδύνου, που είναι γνωστό ότι δεσμεύουν και απενεργοποιούν τα γονίδια p53 και pRb, αντίστοιχα. Δεύτερον ενσωμάτωση του ιικού DNA στο γονιδίωμα του ξενιστή, με διάσπαση των ιικών γονιδίων E2, και τρίτον μοριακές μεταβολές βασικών ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου. Οι μοριακοί δείκτες με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα στη διαφοροποίηση των ιογενών λοιμώξεων που σχετίζονται με κυτταρικές ανωμαλίες με υψηλό κίνδυνο εξέλιξης σε κακοήθεια είναι απαραίτητοι για τη διαλογή και την ταξινόμηση του καρκίνου του τραχήλου. (49,52)

Η καρκινογένεση του τραχήλου που επάγεται από την εμμένουσα λοίμωξη από τον ιό HPV αντιπροσωπεύει μια σταδιακή εξέλιξη από προκαρκινικές βλάβες σε διηθητικό καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Διάφορες μελέτες έχουν δείξει παρεκκλίνουσα έκφραση micro-RNAs (miRNAs) σε ιστούς και κύτταρα καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Περαιτέρω μελέτες αποκαλύπτουν ότι τα miRNAs παίζουν βασικό ρόλο στην έναρξη και εξέλιξη του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, μέσω ειδικών μονοπατιών σηματοδότησης, συμπεριλαμβανομένων των E6-p53, E7-pRb, κινάσης της φωσφοϊνοσιτόλης-3 (PI3K) -Akt, Notch, Wnt / β-κατενίνης. Μερικές μελέτες αποδεικνύουν ότι τα miRNAs μπορούν να χρησιμεύσουν ως βιοδείκτες ή θεραπευτικούς

στόχους, παρουσιάζοντας μια πιθανή προοπτική στην κλινική πρακτική. Όλα τα αποτελέσματα παρέχουν νέες γνώσεις σχετικά με τη λειτουργία των miRNAs και την παθογένεση του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας που επάγεται από τις ιογενείς ογκοπρωτεΐνες. Οι μορφολογικά διαγνωσμένες πλακώδεις ενδοεπιθηλιακές βλάβες (SIL / CIN) υποχωρούν αυτόματα σε περισσότερες από τις μισές περιπτώσεις, αλλά ο προσδιορισμός εκείνων που είναι πιθανόν να παραμείνουν ή να εξελιχθούν δεν είναι επί του παρόντος δυνατή με βάση τη μορφολογία. Η έλλειψη έκφρασης της κύριας πρωτεΐνης καψιδίου L1 έχει προταθεί ως χαρακτηριστικό στις εξελικτικές βλάβες, ενώ η έκφραση της δευτερεύουσας πρωτεΐνης καψιδίου L2 δεν έχει αξιολογηθεί επαρκώς. (40,50)

9. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΚΑΙ ΡΟΛΟΣ ΜΟΡΙΩΝ p16/cyclinD1/p53/MDM2

Από την εισαγωγή της ανίχνευσης προκαρκινικών αλλοιώσεων κατά Παπανικολάου, η επίπτωση και η θνησιμότητα του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας μειώθηκαν δραστικά στις ΗΠΑ και σε άλλες δυτικές χώρες. Ωστόσο, ο καρκίνος του τραχήλου παραμένει η κύρια αιτία θανάτου από τους γυναικολογικούς καρκίνους στις αναπτυσσόμενες χώρες. Όλο και περισσότεροι άνθρωποι υποβάλλονται σε μια διαδικασία διαλογής, συνήθως σε συνδυασμό με το HPV DNA τεστ, αυξάνοντας την έγκαιρη διάγνωση των ενδοεπιθηλιακών βλαβών που σχετίζονται με τον HPV. Ο μακρύς χρόνος διέλευσης από την πρόωμη βλάβη του τραχήλου σε διηθητικό καρκίνο παρέχει την ευκαιρία να εντοπιστούν οι προκαρκινικές αλλοιώσεις στις οποίες το αποτέλεσμα της θεραπείας είναι το μέγιστο. Στην πραγματικότητα, όταν εμφανίζεται ένα επεμβατικό καρκίνωμα τραχήλου, το συνολικό ποσοστό επιβίωσης εξαρτάται από το στάδιο της νόσου με μέση επιβίωση 70% σε 5 χρόνια. Ορισμένοι δείκτες έδειξαν ότι είναι σε θέση να ανιχνεύσουν τις ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις που έχουν περισσότερες πιθανότητες να εξελιχθούν σε διηθητικές μορφές καρκίνου (p16ink4a, p16, E-καδερίνη, Ki67, pRb, p53).

Το p16 είναι ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο που θεωρείται ένας σημαντικός βιοδείκτης για την εξέλιξη και πρόγνωση μιας πλειάδας κακοηθειών και προκαρκινικών βλαβών συμπεριλαμβανομένων των HR-HPV σχετιζόμενων ενδοεπιθηλιακών βλαβών (SILs). Αυτό βασίζεται σε κυτταρολογικά ευρήματα και στην παθολογοανατομική κατηγοριοποίηση των προκαρκινικών νεοπλασματικών αλλοιώσεων. Το p16 είναι ένα

ογκοκατασταλτικό γονίδιο που θεωρείται σημαντικός βιοδείκτης για την εξέλιξη και πρόγνωση μιας σειράς κακοηθειών και προκαρκινικών βλαβών, συμπεριλαμβανομένων των HR-HPV σχετιζόμενων ενδοεπιθηλιακών βλαβών (SILs). (Εικόνα 5)

Το p53 είναι ογκοκατασταλτικό γονίδιο και βασικός ρυθμιστής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Λόγω του κεντρικού ρόλου της πρωτεΐνης του στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, η p53 συστηματικά απορυθμίζεται σε καρκίνους. Η πρωτεΐνη p53 είναι μία πολυλειτουργική πρωτεΐνη που αποτελείται από 393 αμινοξέα.

Η κυτταρική πρωτεΐνη MDM2, που είναι γνωστή αρχικά ως μεταγραφικός στόχος της p53, έχει βρεθεί ότι δρα ως λιγκάση της ουβικουϊτίνης E3, η οποία μεταφέρει ουβικουϊτίνη (Ub) στην p53, στοχεύοντας έτσι σε αποδόμηση της πρωτεΐνης. Η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 είναι ο πρώτος περιγραφόμενος και πλέον γνωστός στόχος της πρωτεΐνης E6. Αυτή η αποδόμηση στη συνέχεια εμποδίζει την p53 να ενεργοποιηθεί από την απόπτωση των μολυσμένων κυττάρων. Η οδός Arf / p53 προστατεύει τα κύτταρα από την καταστροφή του DNA που προκαλείται από το οξύ στρες. Αυτό το χαρακτηριστικό είναι το υπεύθυνο για την κατασταλτική δράση επί του όγκου. Επιπλέον, ρυθμίζει τον χρόνιο στρες που σχετίζεται με τη γήρανση. Αυτή είναι η βάση της δραστηριότητας κατά της γήρανσης. Πράγματι, η αυξημένη δραστηριότητα του Arf / p53 εξασφαλίζει μακροζωία και καθυστερημένη γήρανση. Σε κυτταρικό επίπεδο, έχει πρόσφατα αποδειχθεί ότι τα αυξημένα επίπεδα του Arf / p53 καθυστερούν την εξάντληση των βλαστοκυττάρων που σχετίζονται με την ηλικία και την επακόλουθη μείωση της ομοιόστασης και της αναγέννησης των ιστών. Ωστόσο, η p53 μπορεί επίσης να προωθήσει τη γήρανση εάν ενεργοποιηθεί ιδιοσυστασιακά. Σε αυτό το πλαίσιο, η p53 μειώνει την αναγέννηση των ιστών, η οποία συσχετίζεται με την πρόωρη εξάντληση των βλαστοκυττάρων. Η κατάργηση της λειτουργικής p53 είναι υπεύθυνη για τον μετασχηματισμό των κυττάρων σε κακοήθη κύτταρα και τη συντήρηση των καρκινικών κυττάρων που έχουν μολυνθεί από τον ιό HPV. Η αποκατάσταση της p53 έχει επομένως θεωρηθεί ως μια σημαντική στρατηγική για τη μοριακή παρέμβαση στις κακοήθειες που σχετίζονται με τον HPV. (Εικόνα 15)

Πρόσφατες μελέτες συνδέουν το MDM2 με αυξημένη κυτταρική δραστηριότητα, και τη διαδικασία της μετάστασης που καταδεικνύουν έναν μηχανισμό που εξαρτάται από την ουβικουϊτίνωση με τη μεσολάβηση MDM2. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι, στο

καρκίνωμα νεφρικών κυττάρων (RCC), η p53-MDM2 συν-έκφραση σχετίζεται με μειωμένη επιβίωση ανεξάρτητα με την ύπαρξη μετάστασης. Τα δεδομένα αποδεικνύουν ότι το MDM2 προάγει αυξημένη δραστηριότητα και διεισδυτικότητα σε κύτταρα RCC.

Η απώλεια του ογκοκατασταλτικού γονιδίου του ρετινοβλαστώματος (RB) που κωδικοποιεί μια πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη που ρυθμίζει τον κυτταρικό κύκλο, βρίσκεται σε πολλούς ανθρώπινους καρκίνους και πιθανώς οδηγεί σε διάσπαση της οδού p16-κυκλίνης D1-CDK4/6 - RB. Η κυκλίνη D1 είναι γνωστό ότι ενεργοποιεί το CDK4, το οποίο στη συνέχεια φωσφορυλιώνει την πρωτεΐνη RB, οδηγώντας στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Το p16 αναστέλλει το CDK4, διατηρώντας την υποφωσφορυλιωμένη RB και παρεμποδίζοντας την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου. Η σημασία αυτών των τριών δεικτών, κυκλίνης D1, CDK4 και p16, για τον καρκίνο του μαστού και την καρκινογένεση εξακολουθεί να είναι αμφιλεγόμενη. Η αυξημένη έκφραση της κυκλίνης D1 έχει συσχετιστεί στατιστικά σημαντικά με τη θετική ιστολογική για καρκίνο, το μειωμένο πολλαπλασιαστικό δυναμικό σε όγκους του μαστού, την αυξημένη επιβίωση σε καρκίνου του μαστού και τη συνολική επιβίωση. Η έκφραση της CDK4 δεν συσχετίζεται με την έκφραση της κυκλίνης D1 ή τα δεδομένα επιβίωσης. Η έκφραση της p16 συσχετίστηκε με την αρνητική έκφραση του ανθρώπινου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα 2 (HER2) και την αυξημένη επιβίωση στον καρκίνο του μαστού αλλά και την επιβίωση χωρίς ασθένεια. Δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ της κυκλίνης D1, της CDK4 και της p16. Η κυκλίνη D1 συσχετίστηκε με καλή πρόγνωση στον καρκίνο του μαστού. (60) (Εικόνα 18)

Οι υψηλού κινδύνου ιοί HPV συνδέονται στενά με τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας και τις πρόδρομες βλάβες των μέσω αλληλεπιδράσεων μεταξύ των ογκοπρωτεϊνών E6 και E7 και των ρυθμιστικών πρωτεϊνών του κυτταρικού κύκλου, όπως οι p53 και pRb, αντίστοιχα. Μελέτες έχουν δείξει ότι η έκφραση της κυκλίνης D1 μειώθηκε σημαντικά σε υψηλόβαθμες προκαρκινικές βλάβες. Επίσης τα επίπεδα των p16 και p53 αυξήθηκαν αναλογικά με το επίπεδο της κυτταρικής στιβάδας και τη σοβαρότητα της βλάβης. Εξ'άλλου ανιχνεύτηκε, αυξημένη συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης της p16 και της κυκλίνης D1 με τη λοίμωξη από τον HPV-16.

Άλλη μελέτη συνέκρινε με μοριακές τεχνικές τα επίπεδα έκφρασης της κυκλίνης D1 στα φυσιολογικά και στα νεοπλασματικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας (CIN) και τη

σχέση τους με την έκφραση του γονιδίου E7 του ιού HPV16. Τα επίπεδα έκφρασης του mRNA της κυκλίνης D1 και της ίδιας της πρωτεΐνης στο CIN και το πλακώδες καρκίνωμα ανιχνεύθηκαν με PCR και ανοσοϊστοχημεία (IHC) αντίστοιχα. Η κυκλίνη D1 εκφράστηκε στα βασικά κύτταρα του φυσιολογικού επιθηλίου του τραχήλου της μήτρας και η έκφραση βαθμιαία μειώθηκε στην εξέλιξη από CIN1 σε CIN3. Το πλακώδες καρκίνωμα έδειξε αρνητική ή διασκορπισμένη έκφραση της κυκλίνης D1. Τα επίπεδα τόσο του mRNA όσο και της πρωτεΐνης της κυκλίνης D1 σε κύτταρα που εξέφραζαν την πρωτεΐνη E7 ήταν χαμηλότερα από εκείνα κυττάρων που δεν την εξέφραζαν. Υποδεικνύεται έτσι ότι το γονίδιο E7 αναστέλλει την έκφραση της κυκλίνης D1.

Το γονίδιο p16 ανήκει στην οικογένεια γονιδίων INK4 και αποτελείται από τέσσερα μέλη τα οποία όλα μοιράζονται βιολογικές ιδιότητες, δηλαδή, αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης και καταστολή του όγκου. Μετά από τη p53, το p16 είναι το δεύτερο πιο συνηθισμένο ογκοκατασταλτικό γονίδιο. Μια κοινή εφαρμογή της ανοσοϊστοχημείας του p16 είναι ως δείκτης λοίμωξης από τον ιό των ανθρωπίνων θηλωμάτων (HPV) και έχει δείξει ότι η πρωτεΐνη p16 υπερεκφράζεται σε όγκους που σχετίζονται με τον HPV.(28,51,56,57,58,59,61,62,63) (Εικόνα 13 και 11)

10. ΑΡΧΕΣ ΑΝΟΣΟΙΣΤΟ-ΚΥΤΤΑΡΟΧΗΜΕΙΑΣ

Η ανάγκη για εξεύρεση νέων μεθόδων με σκοπό την προαγωγή της διαγνωστικής διαδικασίας στην Παθολογική Ανατομική και Κυτταρολογία οδήγησε στην ανακάλυψη της ανοσοϊστοχημείας. Αυτή αποτελεί τομέα της ιστοπαθολογίας και ασχολείται με την αναγνώριση φυσιολογικών ή παθολογικών συστατικών των κυττάρων και ιστών. Τα νεοπλασματικά κύτταρα έχουν διαφορετική βιολογική συμπεριφορά με αποτέλεσμα την έκκριση μεταλλαγμένων βιολογικών προϊόντων ειδικού ή όχι τύπου για το συγκεκριμένο είδος κυττάρων εξόρμησης του όγκου (βιολογικοί ή βιοχημικοί ή καρκινικοί δείκτες- Tumor markers). Η αναγνώριση αυτή επιτυγχάνεται με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων εναντίον των αντιγόνων-στόχων, τα οποία είναι συνδεδεμένα με ειδικές χρωστικές, καθιστώντας κατ' αυτό τον τρόπο ορατές τις θέσεις εντοπισμού των αντιγόνων αυτών. Αν και ο ανοσοφθορισμός –πρόδρομη τεχνική ανίχνευσης πρωτεϊνών μέσω μιας διαδικασίας σύνδεσης αντισωμάτων με φθορίζουσα χρωστική, την ισοθιοκυανική φλουροσκεΐνη–

υπήρξε για μεγάλο χρονικό διάστημα η μοναδική μέθοδος αναγνώρισης στους ιστούς ειδικών αντιγόνων, ανοσοσφαιρινών και διαφόρων κλασμάτων του συμπληρώματος, αναπτύχθηκαν πιο αξιόπιστες και εξειδικευμένες τεχνικές για άμεση και ορατή με συμβατική μικροσκόπηση εκτίμηση του αποτελέσματος⁹¹.

Οι τεχνικές αυτές βασίζονται στη χρησιμοποίηση ενζύμων ή ενζυματικών συστημάτων που εφαρμόζονται στους ιστούς ή σε κυτταρικά επιχρίσματα μετά τη σύνδεση αντιγόνου-αντισώματος, χρωματίζοντας έντονα τις θέσεις εντόπισής τους καθιστώντας τις έτσι ορατές με το κοινό μικροσκόπιο. Οι τεχνικές αυτές ονομάζονται ανοσοενζυμικές και οι πιο σημαντικές είναι οι μέθοδοι ανοσουπεροξειδάσης, αβιδίνης-βιοτίνης, στεπταβιδίνης καθώς και νέες μέθοδοι παράκαμψης της βιοτίνης με τη χρήση πολυμερούς δεξτράνης. Κομβικό ρόλο στην αύξηση της ευαισθησίας και ειδικότητας των προαναφερθέντων μεθόδων αποτέλεσε η παραγωγή ειδικών αντιωρών ,δηλ ειδικών αντισωμάτων για σύνδεση με τα αντίστοιχα αντιγόνα. Αναπτύχθηκαν έτσι δύο κατηγορίες αντισωμάτων, που ανάλογα με ο κριτήριο της στοχευμένης ειδικότητάς τους διακρίνονται σε πολυκλωνικά και μονοκλωνικά. Τα πρώτα είναι λιγότερο εξειδικευμένα, επειδή στοχεύουν περισσότερους του ενός αντιγονικούς επίτοπους, ενώ αντίθετα τα μονοκλωνικά αντισώματα στοχεύουν συγκεκριμένες αντιγονικές θέσεις προσδίδοντας μεγαλύτερη ειδικότητα από τα προηγούμενα.

Δομικά τα μονοκλωνικά αντισώματα είναι ανοσοσφαιρίνες (Ig), που συγκροτούνται από δύο βαριές (Heavy-H) και δύο ελαφρές (Light-L) αλυσίδες με κριτήριο το μοριακό τους βάρος. Οι βαριές αλυσίδες διακρίνονται σε πέντε διαφορετικούς υπότυπους (α, μ, γ, δ, ε), ενώ οι ελαφρές αλυσίδες σε δύο τύπους. Ο ισότυπος μιας ανοσοσφαιρίνης χαρακτηρίζεται από τον τύπο της βαριάς αλυσίδας της ανοσοσφαιρίνης π.χ IgA, IgG, IgM. Οι τέσσερις αλυσίδες των ανοσοσφαιρινών συνδέονται ομοιοπολικά μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς. Κάθε ελαφριά αλυσίδα αποτελείται από μία σταθερή (τμήμα Fc) και μία μεταβλητή περιοχή, ενώ κάθε βαριά από μία μεταβλητή και και 3-4 σταθερές περιοχές. Οι μεταβλητές περιοχές αποτελούν τη θέση πρόσδεσης των αντιγόνων επί των ανοσοσφαιρινών και ονομάζονται τμήματα Fab.

Η παραγωγή των αντισωμάτων συσχετίζεται με την ανοσολογική ανταπόκριση του οργανισμού. Η τελευταία σε κάθε αντιγόνο που εισάγεται στον οργανισμό είναι

πολυκλωνική, δηλαδή πολλοί διαφορετικοί κλώνοι Β-λεμφοκυττάρων διεγείρονται για να παράγουν αντισώματα. Τα αντισώματα αυτά έχουν διαφορετική μοριακή δομή και αναγνωρίζουν αντίστοιχα διαφορετικούς επιτόπους του αντιγόνου. Για την ανοσοποίηση ζωικού οργανισμού χρησιμοποιείται καθαρό αντιγόνο, όμως ο οργανισμός αυτός παράγει ποικιλία αντισωμάτων έναντι πολύ μικρών ποσοτήτων ξένων ουσιών, που περιέχονται υποχρεωτικά στο αντιγόνο. Οι πιο ειδικοί αντιοροί περιέχουν μείγμα αντισωμάτων, τα οποία διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τη βιολογική συμπεριφορά. Για τους λόγους αυτούς οι ανοσολόγοι προσπαθούν να παράγουν μεγάλες ποσότητες αντισωμάτων με ομοιογένεια στη συμπεριφορά του. Οι πρωτείνες του πολλαπλού μυελώματος είναι γνωστό ότι αποτελούν ομοιογενείς ανοσοσφαιρίνες (μονοκλωνικές), οι οποίες εμφανίζονται στην περιοχή των γ-σφαιρινών κατά την ηλεκτροφόρηση. Αυτό συμβαίνει γιατί η νεοπλασματική εξαλλαγή πραγματοποιείται μόνο σε ένα κλώνο Β-λεμφοκυττάρων, τα οποία παράγουν μεγάλες ποσότητες ανοσοσφαιρινών, ίδιας βιοχημικής σύστασης. Οι βιολόγοι ανέπτυξαν τη σύντηξη (fusion) των κυττάρων – πειραματοζώων σε ιστικές καλλιέργειες. Τα κύτταρα αυτά με τα ιδιάζοντα γενετικά χαρακτηριστικά σχηματίζουν ένα νέο κύτταρο, το λεγόμενο υβρίδιο. Η παραγωγή μονοκλωνικού πραγματοποιείται με την ευαισθητοποίηση του πειραματόζωου σε ένα συγκεκριμένο αντιγόνο. Μετά από καθορισμένο χρόνο γίνεται θανάτωση του πειραματόζωου και εν συνεχεία λήψη κυττάρων σπληνός από τα οποία διαχωρίζονται τα Β-λεμφοκύτταρα και γίνεται σύντηξη τους με άλλα κύτταρα πολλαπλού μυελώματος. Η σύντηξή τους έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή κυττάρων με την ιδιότητα της συνεχούς παραγωγής κυττάρων με τα ίδια γνωρίσματα (υβριδώματα). Ποσότητες υβριδικών κυττάρων είναι δυνατό να αποθηκευθούν σε βαθιά κατάψυξη, ενώ άλλα κύτταρα ενίοτε στην περιτοναϊκή κοιλότητα πειραματοζώων, τα οποία παράγουν ασκτικό υγρό. Το υγρό αυτό περιέχει υψηλό τίτλο αντισώματος. Τα μονοκλωνικά αντισώματα και οι πολυκλωνικοί αντιοροί χρησιμοποιούνται στην ιστοπαθολογία για τη διαφορική διάγνωση νοσημάτων και κυρίως νεοπλασμάτων. Τα πλεονεκτήματα των μονοκλωνικών αντισωμάτων είναι ότι παράγονται σε μεγάλες ποσότητες και με μεγάλη καθαρότητα, η εφαρμογή τους είναι εύκολη και γίνεται με το συνδυασμό ανοσοενζυμικών μεθόδων ή ανοσοφθορισμού και η ευαισθησία τους εξαιρετικά μεγάλη. Το πρόβλημα των διασταυρούμενων αντιδράσεων, αν και πολύ μικρότερο σε έκταση απ αυτό των

πολυκλωνικών αντισωμάτων, υπάρχει και οφείλεται στα διάφορα αντιγόνα που έχουν τις ίδιες ή παρόμοιες αντιγονικές ιδιότητες.

Η ανοσοιστοχημεία, σε αντίθεση με τις κλασικές ιστοχημικές μεθόδους, βασίζεται σε αντιδράσεις με εξειδίκευση στην αναγνωρισιμότητα του αντιγονικού στόχου. Οι μη σημασμένες τεχνικές (ενζυματικές) βασίζονται στην ανοσοδραστηριότητα των αντισωμάτων και στις χημικές ιδιότητες ενζύμων ή ενζυμικών συμπλεγμάτων. Αυτά αντιδρούν με αχρωμάτιστα υποστρώματα χρωμογόνων ενώσεων προς σχηματισμό ενός χρωματισμένου τελικού προϊόντος. Τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται κυρίως είναι η υπεροξειδάση του υδρογόνου, η αλκαλική φωσφατάση και δευτερευόντως η οξειδάση της γλυκόζης. Οι κύριες μέθοδοι παρατίθενται περιληπτικά ως εξής:

1. Μέθοδος της ανοσουπεροξειδάσης

Χαρακτηριστικό γνώρισμα της μεθόδου αποτελεί η σύνδεση των αντισωμάτων με το ένζυμο υπεροξειδάση. Η εφαρμογή της μεθόδου πραγματοποιείται είτε με άμεσο είτε με έμμεσο τρόπο, αφού προηγηθεί σειρά μη συνδεδεμένων αντισωμάτων εναντίον του αντιγόνου στόχου για την έμμεση μέθοδο. Η αναγνώριση των εναποθέσεων (αντιγόνων) με το κοινό μικροσκόπιο επιτυγχάνεται τελικά με τη χρήση χρωμογόνων, συνηθέστερα με την επίθεση της διαμινιβενζιδίνης (DAB). Η DAB πολυμερίζεται με την παρουσία υπεροξειδάσης και υπεροξειδίου του υδρογόνου σχηματίζοντας αδιάλυτο πολυμερές στα συμπλέγματα αντιγόνου-αντισώματος αποδίδοντας μια καφέ απόχρωση στο κοινό οπτικό μικροσκόπιο. Ακριβώς αυτές οι μοριακές μεταβολές της DAB οδηγούν στο σχηματισμό σταθερού χρώματος που δεν είναι διαλυτό σε οργανικούς διαλύτες. Εν συνεχεία οι τομές τοποθετούνται σε διάλυμα αιματοξυλίνης (Harris, Mayer's) για να καθοριστούν τα υπόλοιπα μορφολογικά ιστολογικά χαρακτηριστικά ή κυττάρων. Αναλυτικά:

α) Η άμεση μέθοδος είναι απλούστερη, αλλά ταυτόχρονα είναι αρκετά ευαίσθητη για την ανίχνευση κυρίως ανοσοσφαιρινών, κλασμάτων του συμπληρώματος και αρκετών αντιγόνων με τη χρήση πολυκλωνικών και μονοκλωνικών αντισωμάτων. Τα αντισώματα είναι συνδεδεμένα απευθείας με την υπεροξειδάση.

β) Η έμμεση μέθοδος (τεχνική Sandwich) είναι πιο ευαίσθητη από την προαναφερθείσα και χρησιμοποιούνται δύο σειρές αντισωμάτων. Ο πρώτος αντιορός, ο οποίος είναι και ο πρωτογενής προέρχεται συνήθως από κουνέλια (πολυκλωνικά αντισώματα) ή από

ποντίκια (μονοκλωνικά αντισώματα) και δεν είναι συνδεδεμένος με υπεροξειδάση. Ο δεύτερος αντιορός είναι συνδεδεμένος με υπεροξειδάση και προέρχεται από άλλο είδος ζώου (χοίρος) που έχει ήδη ευαισθητοποιηθεί με την IgG ανοσοσφαιρίνη του πρώτου. Έτσι τα αντισώματα αυτά στοχεύουν τα της πρώτης σειράς που δρουν στην περίπτωση αυτή ως αντιγόνο και αποκαλύπτουν την πρωτογενή αντιγονική θέση.

γ) Η μέθοδος της “γέφυρας” (γεφυρική ανοσουπεροξειδάση) αποτελεί προέκταση της έμμεσης μεθόδου. Χρησιμοποιούνται τρεις σειρές βαντιορών και παρεμβάλλεται ένα μη συνδεδεμένο αντίσωμα μεταξύ του πρώτου και του τελευταίου αντισώματος. Αυτό επίσης δεν είναι συνδεδεμένο και στοχεύει την υπεροξειδάση του ζωικού είδους από το οποίο προέρχεται το πρωτογενές αντίσωμα. Ακολουθεί επώαση των τομών με αντιορό που περιέχει ελεύθερη υπεροξειδάση, η οποία συνδέεται με το τελευταίο αντίσωμα με αντίδραση αντιγόνου-αντισώματος. Ακολουθεί επώαση των τομών με αντιορό που περιέχει ελεύθερη υπεροξειδάση, η οποία συνδέεται με το τελευταίο αντίσωμα με αντίδραση αντιγόνου-αντισώματος.

δ) Η μέθοδος υπεροξειδάσης-αντιυπεροξειδάσης (PAP μέθοδος) αποτελεί τροποποίηση της μεθόδου της ενζυμικής γέφυρας. Η υπεροξειδάση συνδέεται πριν από την εφαρμογή της με το αντίσωμα της (αντιυπεροξειδάση) σχηματίζοντας κυκλικό σύμπλεγμα σε αναλογία 3 μορίων υπεροξειδάσης προς 2 μόρια αντιυπεροξειδάσης. Ο πρώτος και ο δεύτερος αντιορός δεν είναι συνδεδεμένος, ενώ το σύμπλεγμα υπεροξειδάσης-αντιυπεροξειδάσης αποτελεί την τρίτη σειρά. Το μεγάλο πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η δυνατότητα χρησιμοποίησης του πρωτογενούς αντισώματος σε μεγάλη αραιώση, ελαττώνοντας έτσι το βαθμό σύνδεσής του με ανεπιθύμητα αντιγόνα των ιστών. Η μέθοδος αυτή μειώνει την πιθανότητα αποσύνδεσης των αντισωμάτων από τα αντιγόνα, επειδή όλες οι αντιγονικές θέσεις δεσμευσής τους (Fab τμήματα), είναι κορεσμένες και περιορίζει το βαθμό της μη ειδικής χρώσης (background).

2. Μέθοδος Συμπλέγματος αβιδίνης-βιοτίνης-υπεροξειδάσης (ABC)

Αποτελεί ανοσοενζυμική μέθοδο, ανάλογη της PAP και θεωρείται πιο ευαίσθητη μέθοδος απ αυτή, λόγω της ισχυρής δεσμευτικής ιανότητας μεταξύ βιοτίνης και αβιδίνης. Η αβιδίνη είναι μια γλυκοπρωτεΐνη προερχόμενη από το λευκό του αυγού και έχει μεγάλη τάση σύνδεσης (4 συνδετικές θέσεις ανά μόριο). Η βιοτίνη αποτελεί βιταμίνη με χαμηλό μοριακό βάρος και βρίσκεται στη λέκιθο του αυγού, συνδέεται δε με το δεύτερο

αντιορό με τον ίδιο τρόπο που συνδέεται η υπεροξειδάση. Εν συνεχεία ο τρίτος αντιορός αποτελείται από ένα σύμπλεγμα αβιδίνης και ενζύμου συνδεδεμένου με βιοτίνη, το οποίο έχει μερικές ελεύθερες θέσεις αβιδίνης για σύνδεση με τη βιοτίνη του δεύτερου αντισώματος. Παραλλαγή της μεθόδου αποτελεί η αντικατάσταση της αβιδίνης από τη στρεπταβιδίνη στην προαναφερόμενη τριάδα ABC. Η στρεπταβιδίνη, η οποία παράγεται από το βακτήριο *Streptomyces avidinii*, αποτελεί πρωτεΐνη μοριακού βάρους 60 KD και περιλαμβάνει τέσσερις όμοιες υπομονάδες, η κάθε μία εκ των οποίων έχει μια θέση σύνδεσης με τη βιοτίνη. Η χρήση της έναντι της αβιδίνης προτιμάται διότι δεν περιέχει υδατάνθρακες, οι οποίοι συνδέονται μη ειδικά με τις λεκτίνες των ιστών και επίσης διότι το ισοηλεκτρικό της σημείο είναι ουδέτερο. Η στρεπταβιδίνη βρίσκει εφαρμογή είτε ως σύμπλεγμα με τη βιοτίνη, είτε σημασμένη με ένζυμο (labeled streptavidin). (Εικόνα 7)

3. Μέθοδος αλκαλικής φωσφατάσης

Η αλκαλική φωσφατάση εφαρμόζεται είτε ως σύμπλεγμα αβιδίνης-βιοτίνης-αλκαλικής φωσφατάσης είτε ως σύμπλεγμα αλκαλικής φωσφατάσης-αντιαλκαλικής φωσφατάσης. Το τελευταίο σύμπλεγμα αποτελείται από δύο μόρια αντιγόνου συνδεδεμένα με ένα μόριο αντισώματος. Η διάταξη αυτή μοιάζει με τη φυσιολογική αντίδραση σύνδεσης ενός δισθενούς αντισώματος και κατά συνέπεια το σύμπλεγμα είναι σταθερό για μεγάλο χρονικό διάστημα.

4. Μέθοδος του ενός ή των δύο σταδίων με τη χρήση πολυμερούς δεξτράνης (EPOS ή two step method- Dako En Vision⁺ dextran technology)

Η κύρια αρετή της μεθόδου στηρίζεται στην παράκαμψη της βιοτίνης (το πάγκρεας ανήκει στα όργανα που παράγουν μέτρια επίπεδα βιοτίνης-ενδογενής βιοτίνη). Το σύστημα βασίζεται σε ένα ενζυμικά σημασμένο (HRP-Horse Radish Peroxidase ή AP-Alkaline Phosphatase) υδατοδιαλυτό πολυμερές δεξτράνης, στο οποίο προσδένονται τα δευτεροταγή αντισώματα μετά την επίθεση του πρωτοταγούς αντισώματος. Σε αντίθεση με το κλασικό αυτό πρότυπο ανοσοιστοχημικής επεξεργασίας, το σύστημα του ενός σταδίου (one step method) βασίζεται στη σύνδεση του πρωτοταγούς αντισώματος με το πολυμερές δεξτράνης, αφού έχει συντελεσθεί η δέσμευση της ενδογενούς υπεροξειδάσης. Η συνολική τεχνική επιτρέπει την ταχύτερη και πιο ευαίσθητη τελική ανοσοχρώση, καθώς συρρικνώνονται τα απαιτούμενα στάδια της

ανοσοιστοχημείας και λόγω της μη διασταυρούμενης αντίδρασης με την ενδογενώς παραγόμενη βιοτίνη δε σχηματίζεται υπόστρωμα χρώσης. Η τεχνική αυτή εφαρμόστηκε με τροποποιημένο κατά αντίσωμα πρωτόκολλο στη πρωτεϊνική ανάλυση των καρκινικών ιστών (Εικόνα 4).

11. ΑΡΧΕΣ ΨΗΦΙΑΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗΣ ΕΙΚΟΝΑΣ

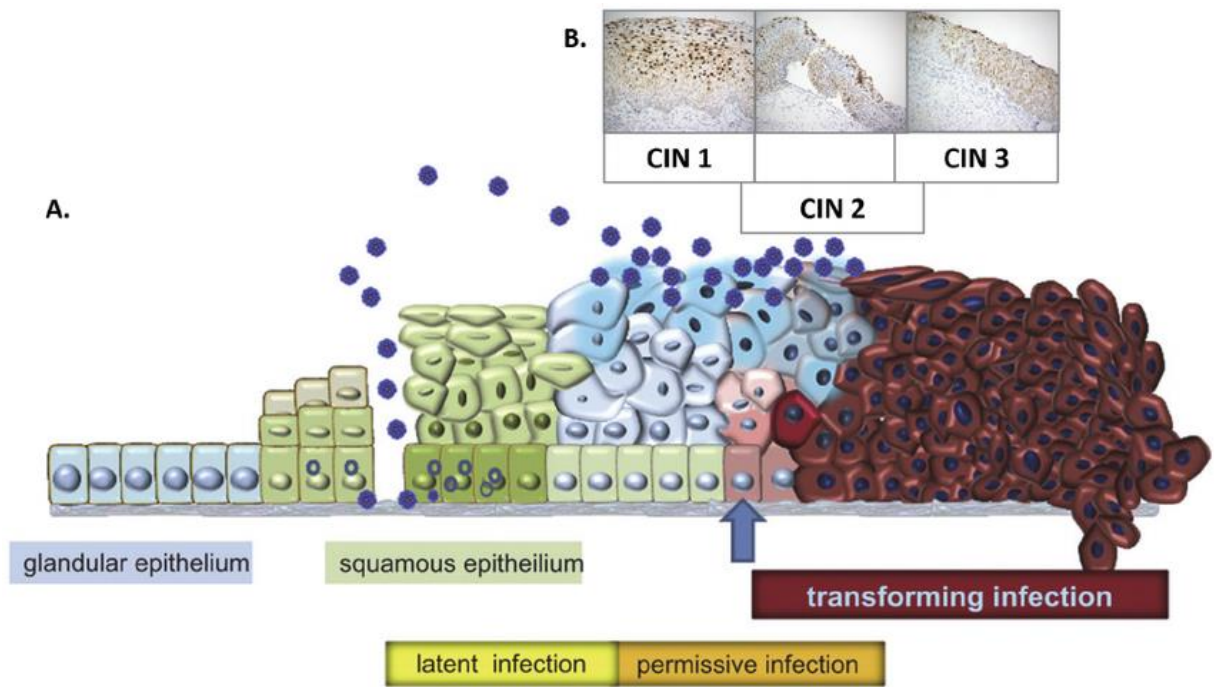
Τα συστήματα ανάλυσης εικόνας προέκυψαν ως αποτέλεσμα της αδήρητης ανάγκης για ποιοτικότερους ελέγχους στα προϊόντα υψηλής μικροτεχνολογίας (transistors, microchips) στις αρχές της δεκαετίας του 80 στον κλάδο της Ηλεκτρονικομηχανικής. Προσφέρουν τη δυνατότητα ποσοτικοποίησης του ποιοτικού μέσω μιας ταχείας και ακριβούς εκτίμησης των μετρούμενων παραμέτρων. Οι μορφομετρικές αναλύσεις στο επίπεδο της παθολογικής ανατομικής και κυτταρολογίας αφορούν μετρήσεις απόλυτου αριθμού κυτταρικών χώρων (πχ πυρήνων) ή γεωμετρικών χαρακτηριστικών όπως διαμέτρων πυρήνων ή κυττάρων, λόγων διαμέτρων ή χώρων (N/C ratio), καθώς και πυκνομετρικές μελέτες (densitometry), όπου μετρώνται η έκταση και η οπτική πυκνότητα (βαθυχρωματικότητα) πυρηνικών ή κυτταροπλασματικών ιστοχημικών ή ανοσοιστοχημικών χρώσεων. Αναγνωρίζονται δύο ειδών συστήματα ανάλυσης εικόνας ανάλογα με την ανεξαρτησία της δραστηριότητάς τους: τα αυτόματα (full automated), τα οποία με ρομποτικούς μηχανισμούς και βάση τροποποιημένων μακροεντολών εκτελούν τη διαχείριση και μέτρηση των επιθυμούμενων χαρακτηριστικών με απόλυτα αυτόματοποιημένο τρόπο και εκείνα τα οποία χαρακτηρίζονται ως ημιαυτόματα (semi automated) στα οποία ο χειριστής-ιατρός επεμβαίνει αποκόπτοντας ή ενσωματώνοντας χώρους ενδιαφέροντος⁹⁴.

Σε κάθε ιστολογικό ή κυτταρολογικό παλκίδιο επιλέγονται αντιπροσωπευτικά πεδία υπό την επιθυμητή μεγέθυνση και υπό σταθερή ένταση φωτός και μετράται ο απόλυτος αριθμός των πυρήνων και η οπτική πυκνότητα (optical density) ή η ένταση της ανοσοιστοχημικής χρώσης (staining intensity) στα επιλεγμένα κυτταρικά υποσυστήματα (πχ μεμβράνη, κυτταρόπλασμα), αφού προηγουμένως κατασκευάζονται οι αντίστοιχες μακροεντολές δομημένες σε γλώσσα Basic για τον καθορισμό του χρωματικού εύρους (στην προκειμένη περίπτωση αποχρώσεις του καφέ λόγω DAB κατά το πρότυπο RGB

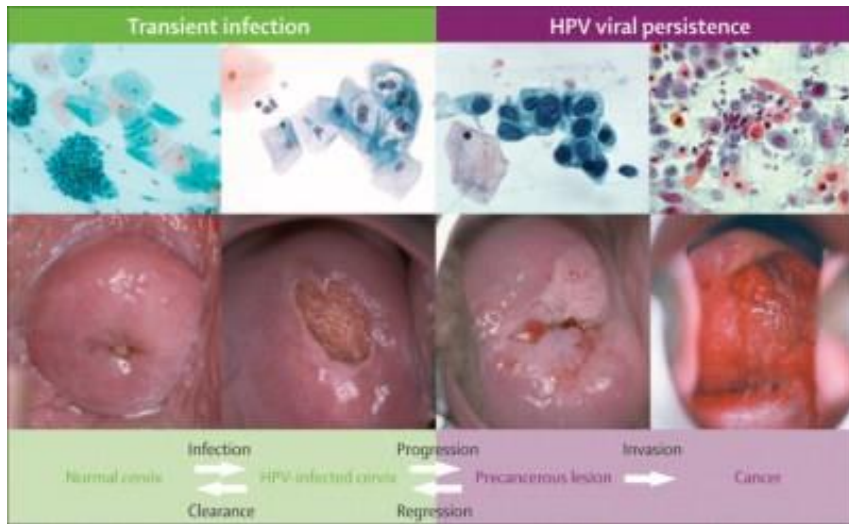
(Red/Green/Blue). Η ψηφιοποιημένη εικόνα του μικροσκοπίου καταλαμβάνει σταθερό πλαίσιο μέτρησης στην οθόνη του υπολογιστή (" ενεργό κάδρο"-active window) εκτάσεως 16848 μm^2 σε μεγέθυνση 40x, δηλ το $\frac{1}{4}$ του οπτικού πεδίου του μικροσκοπίου. Κάθε εικονοστοιχείο (pixel) λαμβάνει μια τιμή του χρωματικού φάσματος, που αποτελεί τη συνισταμένη των προαναφερθέντων βασικών χρωμάτων. Το εύρος της οπτικής πυκνότητας στο συγκεκριμένο σύστημα καλύπτει το εύρος των τιμών από 0 (απόλυτο μαύρο) έως 255 (απόλυτο λευκό). Κατ αυτό τον τρόπο μεταφράζεται σε κλινικό επίπεδο η συσχέτιση της έντασης της χρώσης (μειούμενες τιμές-βαθυχρωματικότητα) με τη βιολογική συμπεριφορά του νεοπλάσματος (διαφοροποίηση-σταδιοποίηση).

Κατά τη διαδικασία της μέτρησης η αναλογική εικόνα του μικροσκοπίου φιλτράρεται ψηφιακά (σηματισμός προσωρινού ή αποθηκευμένου ψηφιακού αρχείου τύπου jpeg ή TIFF) και μετά την ακινητοποίησή της, μέσω της προκατασκευασμένης μακροεντολής αποτυπώνονται οι χώροι της μέτρησης σημαινόμενοι με κάποιο χρώμα (π.χ κόκκινο), ώστε στο τελικό στάδιο, πριν δηλαδή σχηματισθεί η τελική κάρτα αποτελεσμάτων (τύπου Excel sheet), να επιτραπεί στο χειριστή η παρέμβαση μέσω ενσωμάτωσης ή αποκοπής χώρων ενδιαφέροντος, τους οποίους αγνόησε ή υπερεκτίμησε το σύστημα. Ο συνδυασμός σωστής μακροεντολής, ποιότητας χρωσμένου πλακιδίου (καθαρότητα-ειδικότητα ανοσοιστοχημικής χρώσης) και εμπειρίας του χρήστη μειώνουν δραματικά το στατιστικό σφάλμα (<5%).

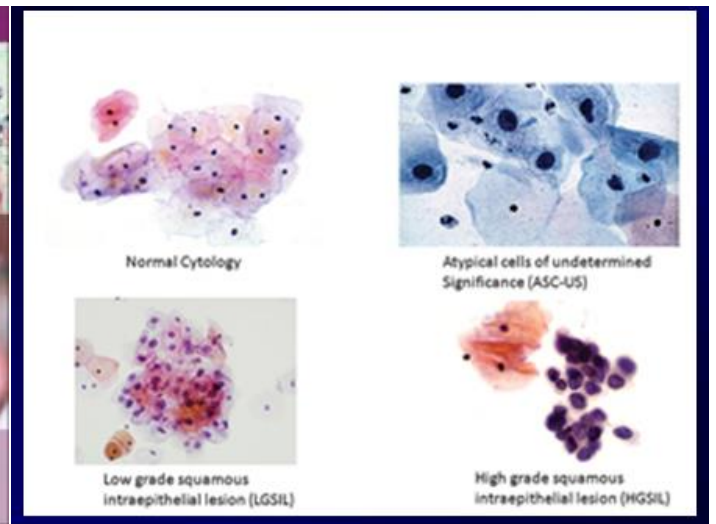
12. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΕΙΚΟΝΩΝ ΓΕΝΙΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ



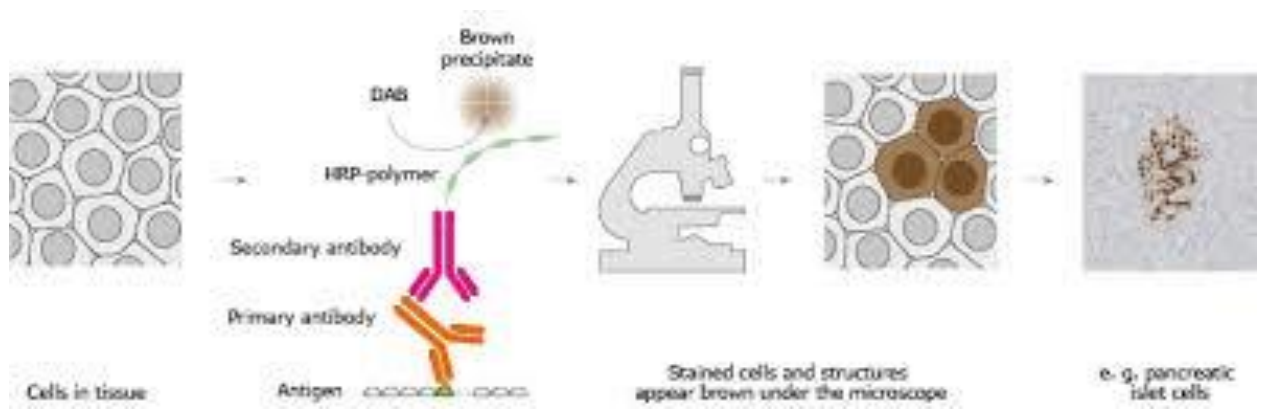
Εικόνα 1



Εικόνα 2

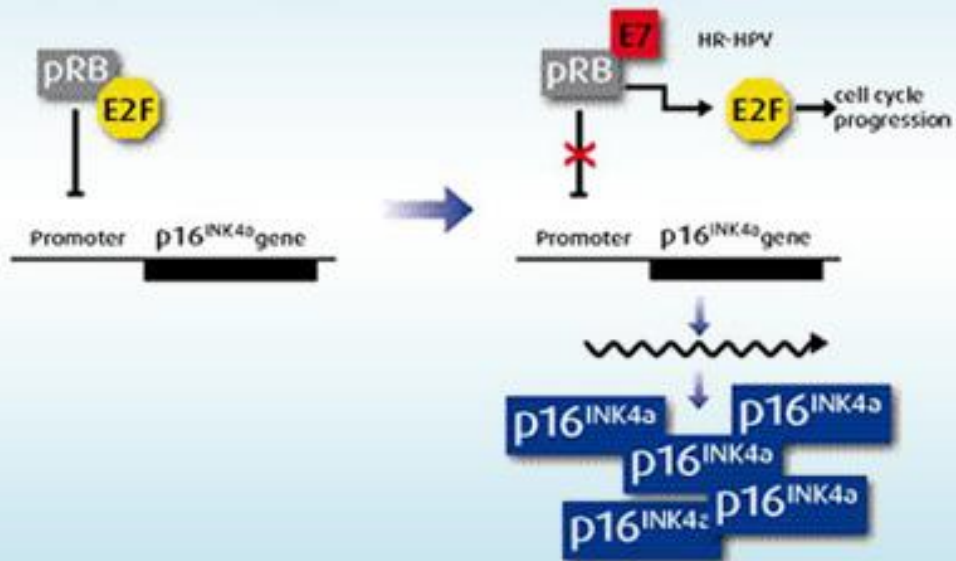


Εικόνα 3

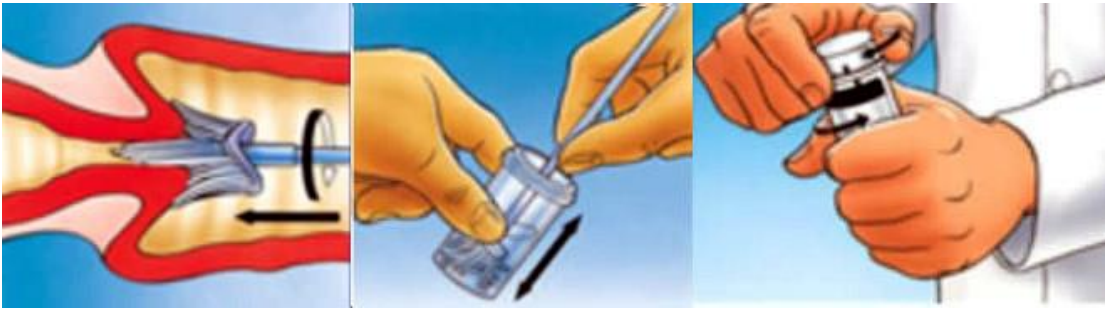


Εικόνα 4

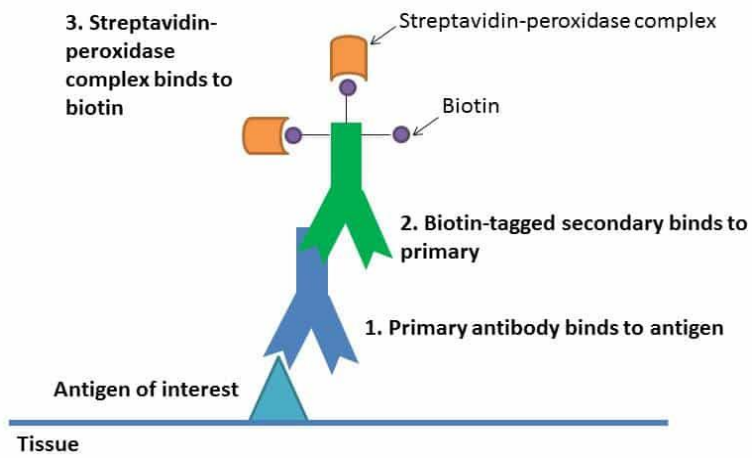
Mechanism of p16^{INK4a} over-expression in pre-cancerous and cancerous cells



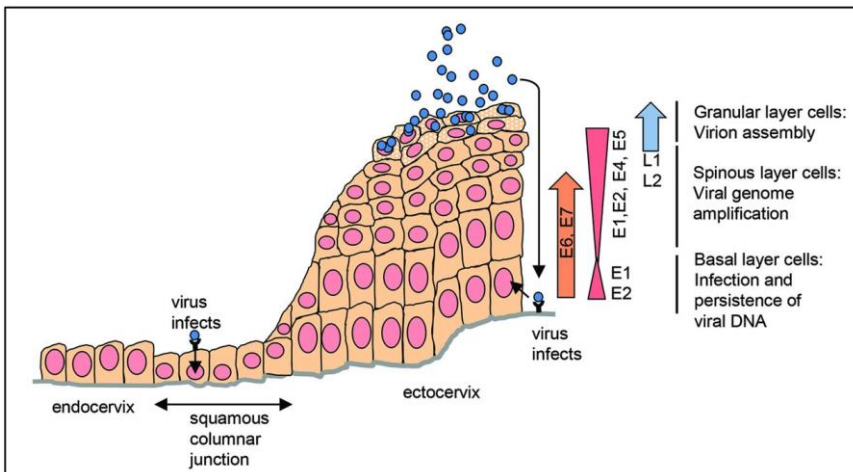
Εικόνα 5



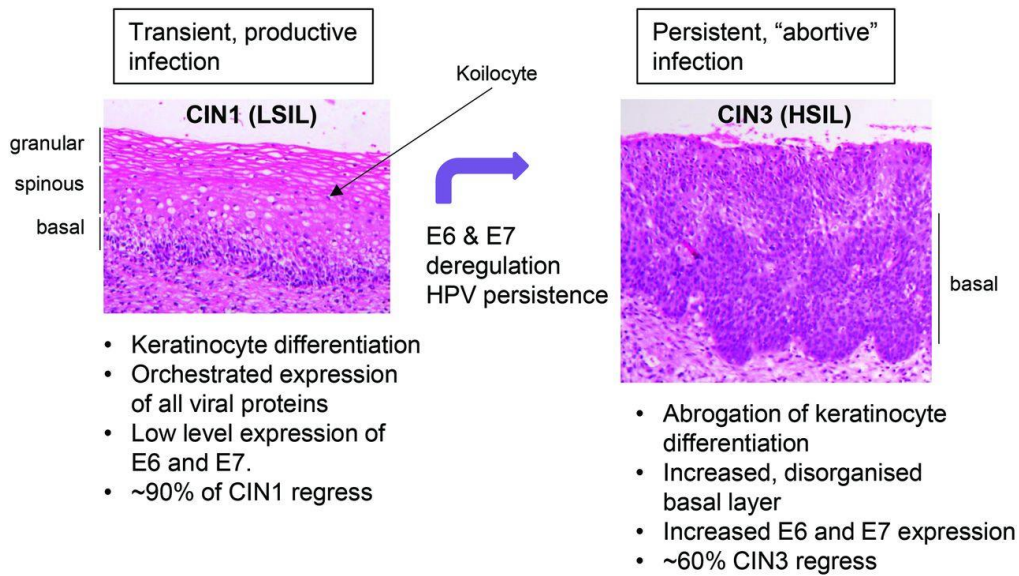
Εικόνα 6



Εικόνα 7



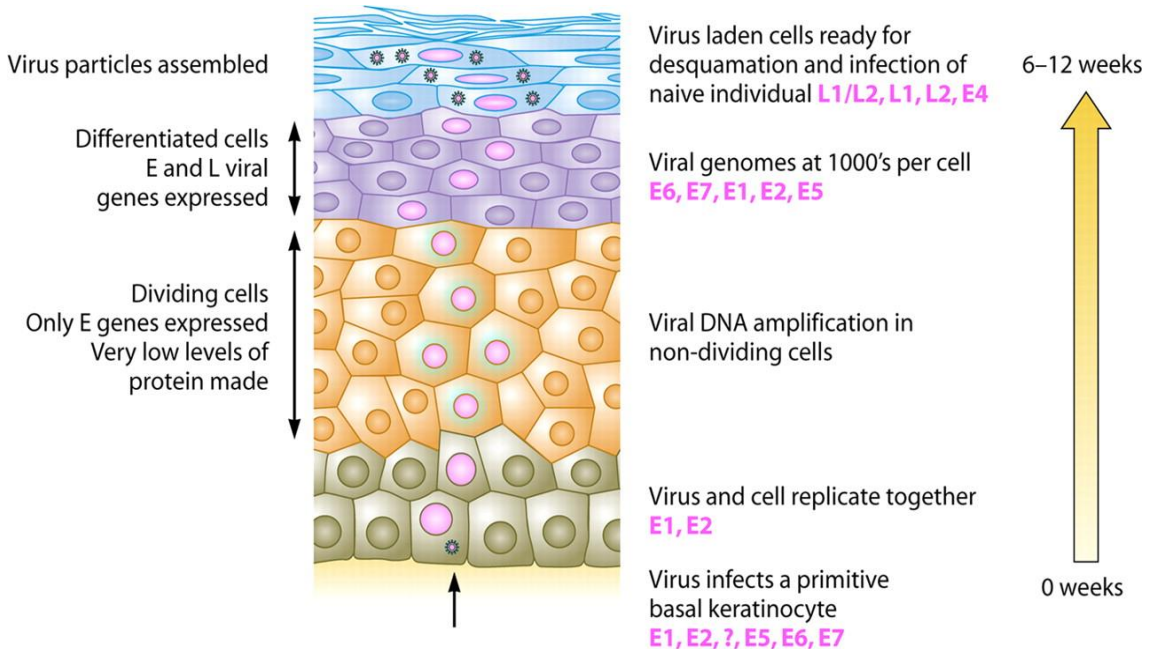
Εικόνα 8



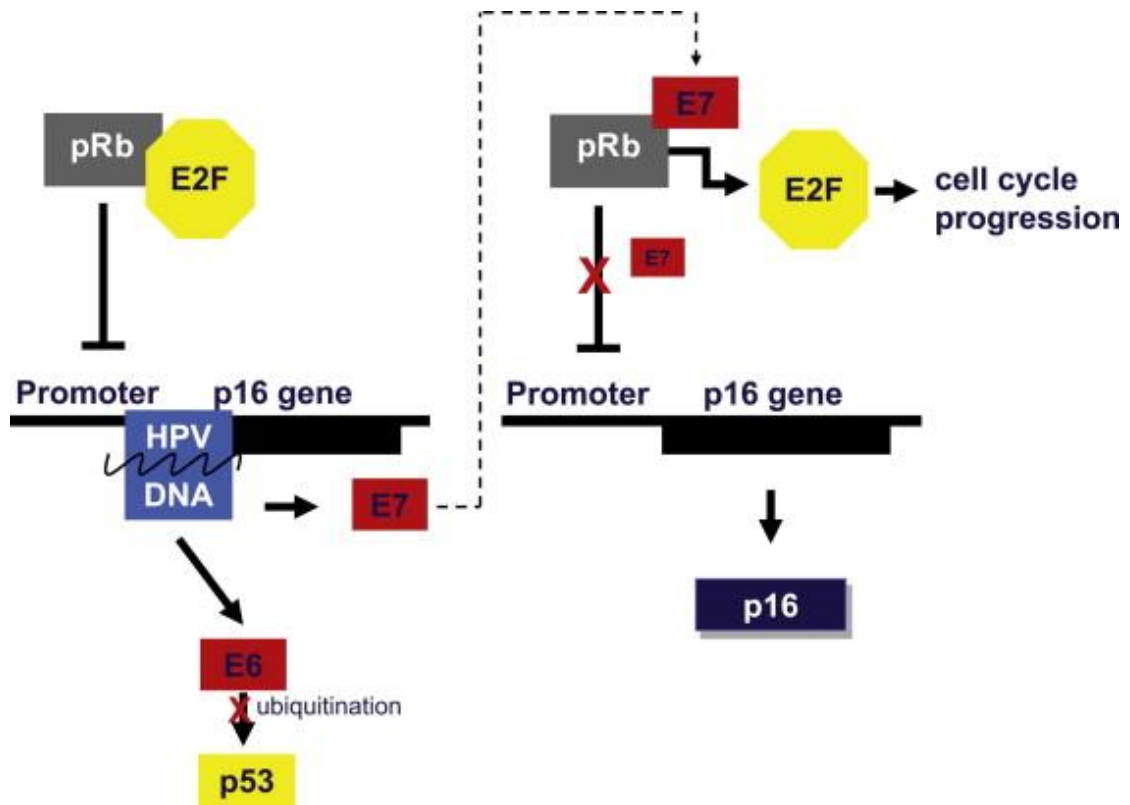
Cervical disease progression

- Altered cellular gene expression
- Altered viral gene expression
- Epigenetic changes: viral and cellular DNA methylation, microRNAs
- Viral genome integration and insertional mutagenesis
- Cellular insults, carcinogens, other infections

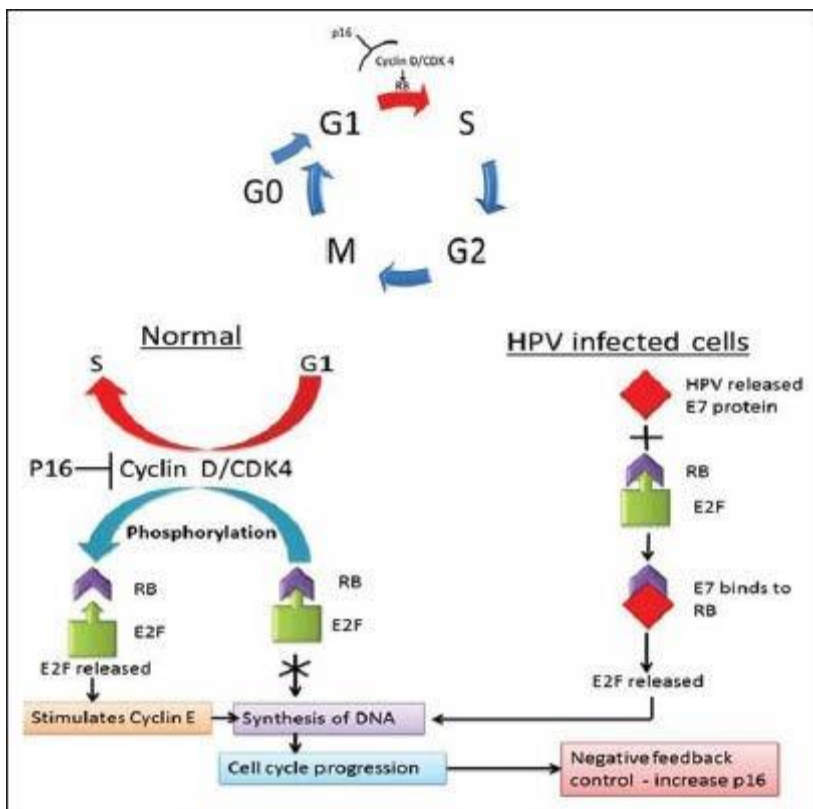
Εικόνα 9



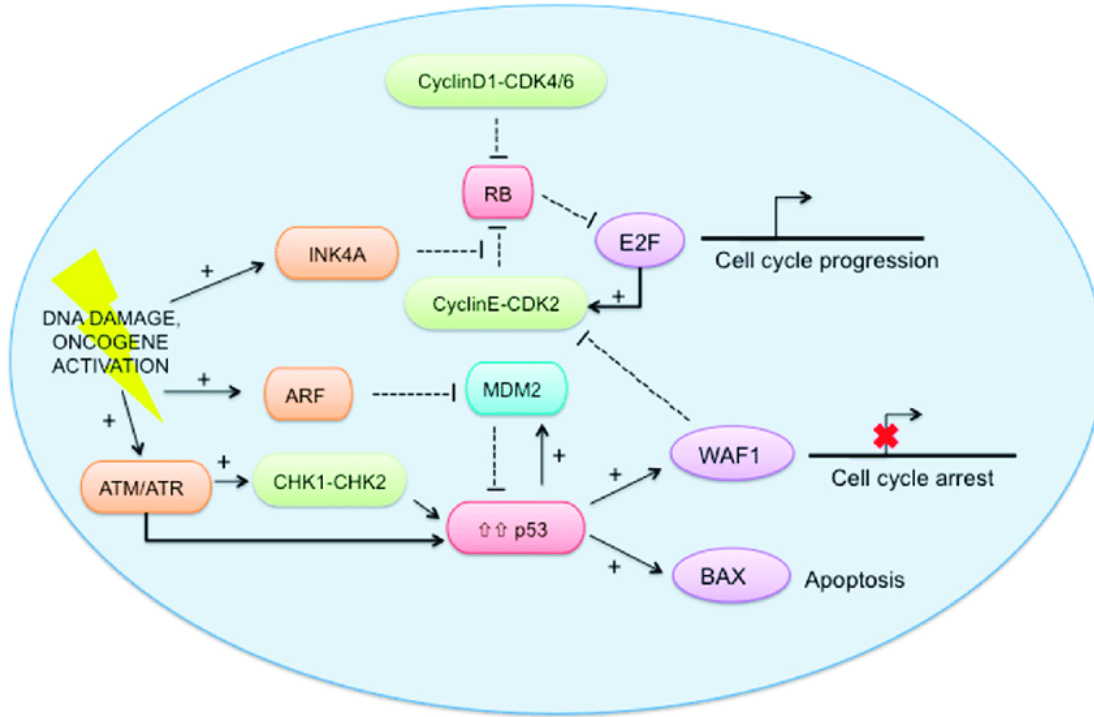
Εικόνα 10



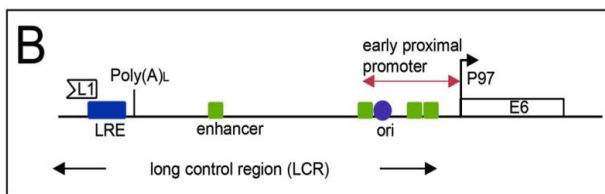
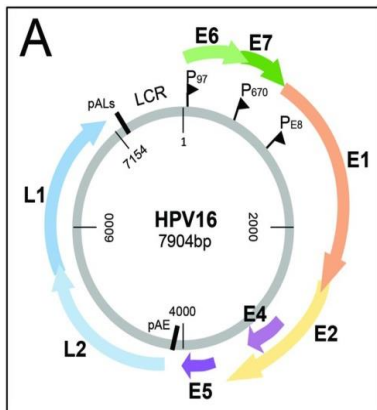
Εικόνα 11



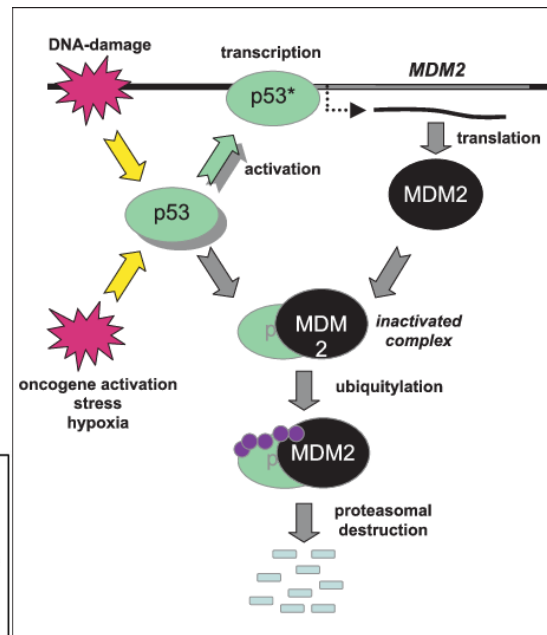
Εικόνα 12



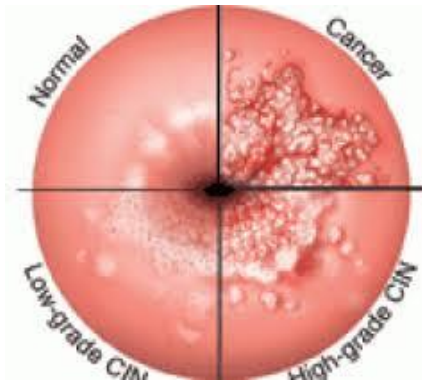
Εικόνα 13



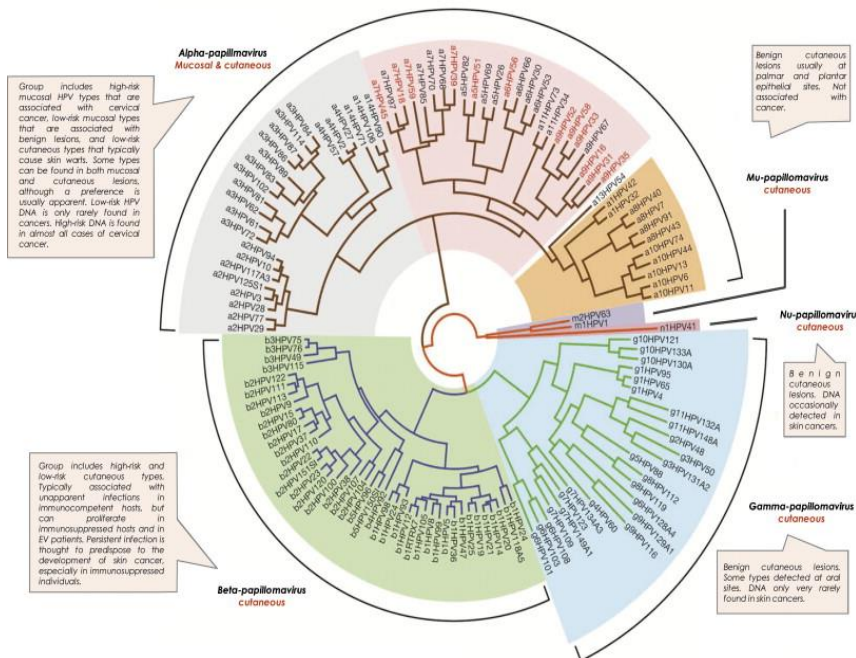
Εικόνα 14



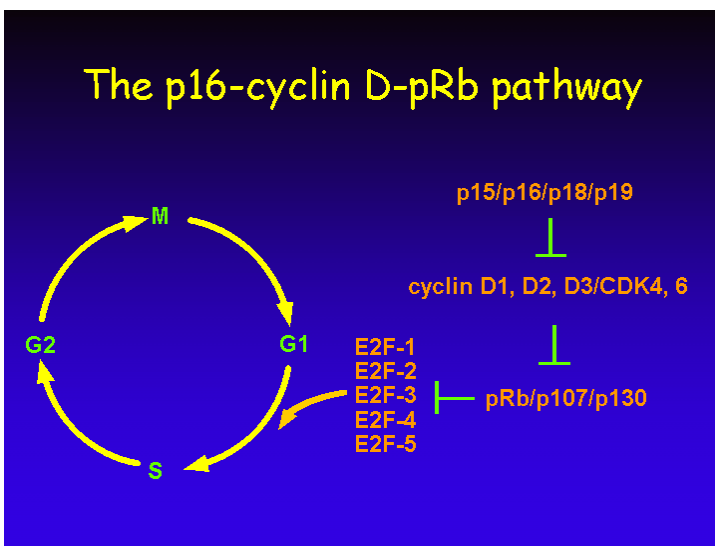
Εικόνα 15



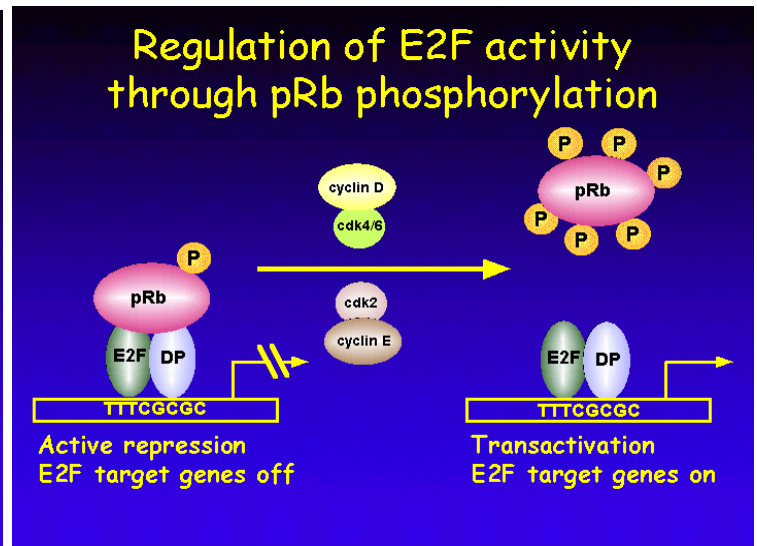
Εικόνα 16



Εικόνα 17



Εικόνα 18



Εικόνα 19

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η κυτταρολογική και μοριακή διερεύνηση δεκαετιών έρευνας κατέδειξε ότι η συντριπτική πλειοψηφία (~99%) των καρκίνων του τραχήλου της μήτρας συσχετίζεται ευθέως με την επίδραση της χρόνιας λοίμωξης από τον ιο του ανθρώπινου θηλώματος (Human Papilloma Virus-HPV). Ο τελευταίος αποτελεί έναν DNA ιό με ταυτοποιημένα περίπου 200 στελέχη (υπότυπους) εκ των οποίων τα 16/18/30/31/33/45/51/52 κ.α. ευθύνονται για την καρκινογένεση με στόχους κυρίως τα ευαίσθητα -στη χρόνια εμμένουσα προσβολή -κύτταρα της μεταβατικής ζώνης του κυλινδρικού σε πλακώδες επιθήλιο (μεταπλαστικά) κύτταρα του τραχήλου της μήτρας, ενώ αντίθετα υπότυποι όπως οι 6/11 δημιουργούν τα κονδυλώματα της γενετικής/περιγενετικής περιοχής. Ειδικά το στέλεχος HPV 18 ενοχοποιείται κυρίαρχα στην καρκινογένεση αδενοκαρκινωμάτων. Η μετάδοση του ιού και η διείσδυσή του στο τραχηλικό επιθήλιο – μέσω λύσης της συνέχειάς του λόγω μικροτραυματισμών- οφείλεται κυρίως (σε ποσοστό ~95%) στη σεξουαλική επαφή – καθώς και με τη δερματική επαφή περιγενετικά - και έχει παρατηρηθεί ότι η ηλικιακή αιχμή στο φάσμα της προσβολής απαντάται μεταξύ 15 και 25 ετών. Ο ιός φαίνεται να μολύνει σχεδόν ισότιμα τα δύο φύλα, αλλά συνδέεται με την καρκινογένεση στις γυναίκες, ενώ οι άνδρες εμφανίζουν υποκλινικά τη λοίμωξη έως την παρουσία των προαναφερόμενων κονδυλωμάτων και σπάνια αναπτύσσουν πλακώδη καρκινώματα. Σπάνια επίσης παρατηρείται κάθετη μετάδοση (κυοφορούσα γυναίκα στο έμβryo - ενοχοποιείται αυτός ο τρόπος μετάδοσης και για άλλους ιούς). Η προσβολή της γυναίκας από τον ιό δε σημαίνει απαραίτητα ότι θα την οδηγήσει στην ανάπτυξη του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Τουναντίον μόνο ένα μικρό ποσοστό (της τάξεως του 1-3%) και σε παραμελημένη διαγνωστικά και θεραπευτικά κατάσταση εκδηλώνει τη νόσο. Η πλειονότητα των προσβολών χαρακτηρίζονται ασυμπτωματικές με τάση υποστροφής, ενώ η δημιουργία εμφανών κυτταρομορφολογικών αλλοιώσεων (κοιλοκύτταρα) στο τεστ ΠΑΠ εκτείνεται σε ένα διάστημα από 3 εβδομάδες έως 9 μήνες μετά την ενσφήνωση του ιού στο κολποτραχηλικό επιθήλιο. Παράγοντες που ευθύνονται για τη μείωση της ανοσολογικής ικανότητας του οργανισμού ώστε να ανταποκριθεί στην ιογενή αυτή προσβολή (κάπνισμα, στρες, χρόνια χρήση αντισυλληπτικών, συνοδός λοίμωξη και από άλλους ιούς) οδηγούν στην αναζωπύρωση του ιού και ενισχύουν την

ογκογόνο δράση του. Η ενσωμάτωση –σε αντίθεση με την απλή επισωματική προσβολή- των υψηλής επικινδυνότητας υπότυπων του ιού HPV στο DNA των κυττάρων του ξενιστή τροποποιεί τα επιθηλιακά κύτταρα με την απενεργοποίηση των ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών p53 και Rb. Κατά την HPV προσβολή του τραχηλικού συστήματος, η υπερέκφραση της πρωτεΐνης p16 διοχετεύεται μέσω της ενεργοποίησης του E7 γονιδίου που οδηγεί σε αποσυγχρονισμό του Rb και του E2F μεταγραφικού παράγοντα. Ο αποσυγχρονισμός του κυτταρικού κύκλου κατά την εμμένουσα High Risk HPV προσβολή του κολποτραχηλικού επιθηλίου εμπλέκει εκτός των προαναφερθέντων και τα μόρια cyclinD1 και MDM2, καθώς παρατηρείται διαταραχή στην έκφραση τους στα εν λόγω επιθήλια και αποτελεί νέο πεδίο έρευνας ειδικά για τα δίπολα p16/cyclinD1 και p53/MDM2.

Κατά συνέπεια, το εν λόγω ερευνητικό πρωτόκολλο σχεδιάστηκε με γνώμονα τη διερεύνηση του ρόλου της απορρύθμισης των **πρωτεϊνών p16/cyclinD1/p53/MDM2** στο κολποτραχηλικό επιθήλιο κατά την προσβολή του από τον ιο των ανθρωπίνων θηλωμάτων (HPV) με βάση τα επίπεδα της έκφρασής τους σε παθολογικά κολποτραχηλικά επιχρίσματα..

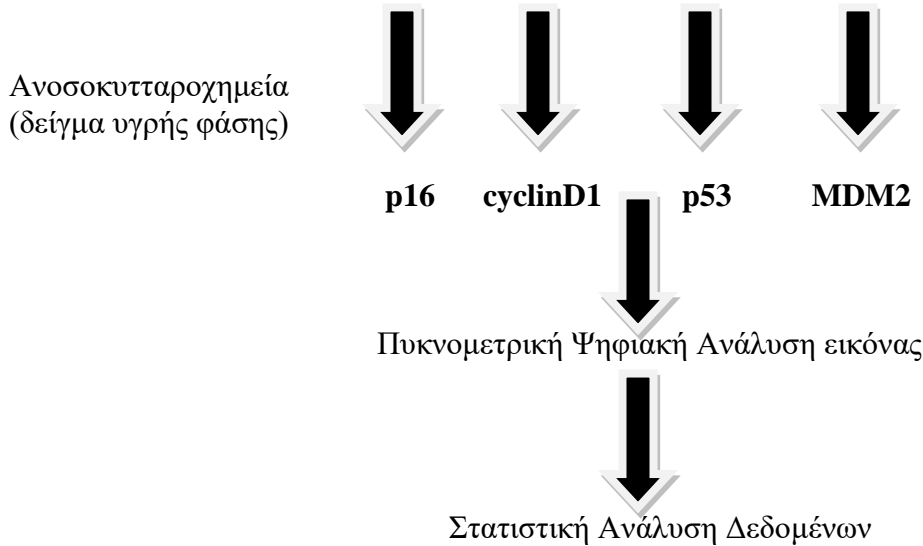
2. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

- 2α. Προέλευση-Συλλογή-Διαχείριση του κυτταρολογικού βιοπτικού υλικού

Η μελέτη περιέλαβε συνολικά ογδόντα (**n=80**) παθολογικά κολποτραχηλικά επιχρίσματα (pap tests) με διάγνωση LGSIL, HGSIL & ASCUS κατά BETHESDA 2001 (revised 2014). Επί αυτών πραγματοποιήθηκε βιοπτική εξαίρεση παθολογικού ιστού και παθολογοανατομική ταξινόμηση της διάγνωσης κατά σύστημα CIN (WHO). Ως ομάδα ελέγχου (control group) χρησιμοποιήθηκαν είκοσι (**n=20**) κολποτραχηλικά επιχρίσματα (pap tests) αρνητικά για κακοήθεια ή SIL (NILM) κατά BETHESDA 2001 (revised 2014).

- **2β. Εργαστηριακός αλγόριθμος μελέτης**

Κυτταρολογική διάγνωση LGSIL to HGSIL & HPV κατά BETHESDA 2001
Παθολογοανατομική διάγνωση CIN κατά WHO



- **2γ. Επιδημιολογικά-Κλινικοπαθολογοανατομικά γνωρίσματα υλικού μελέτης**

Η μελέτη αφορούσε σε ομάδα γυναικών (n=80) με μέση ηλικία 31.55 έτη (εύρος ηλικιών 19-53). Κατά την κυτταρολογική ταξινόμηση ευρέθησαν 66 LSIL, 8 HSIL και 8 ASCUS. Αντίστοιχα, η παθολογοανατομική ταξινόμηση των εξεταζόμενων περιστατικών ανέδειξε 73 CIN I, 5 CIN II και 2 CIN III. Από το μοριακό φάκελο των εξεταζόμενων όσον αφορά την ανάλυση HPV DNA, προέκυψε ότι 13/80 ευρέθησαν θετικά για στέλεχος υψηλού κινδύνου (High Risk-HR), ενώ 67/80 ευρέθησαν θετικά για στέλεχος χαμηλού κινδύνου (Low Risk-LR).

- **2δ. Κυτταροχημική επεξεργασία**

Η κυτταρολογική λήψη των κολποτραχηλικών επιχρισμάτων κατέληξε σε εγκλεισμό των ληφθέντων κυττάρων σε μονιμοποιητικό υγρό για ανάλυση κυτταρολογίας υγρής φάσης (liquid-based cytology: CellSolutions, Menarini, It). Επακολούθησε η ανάλυση και επίστρωση των δειγμάτων σε ειδικά πλακίδια τα οποία χρώστηκαν με την κυτταροχημική χρώση κατά Παπανικολάου. Το αποτέλεσμα της μικροσκόπησης των πλακιδίων εξήχθη και εκφράστηκε σύμφωνα με το σύστημα ταξινόμησης

κυτταρομορφολογικών χαρακτηριστικών Bethesda 2001 (revised 2014). Η συνολική διαδικασία πραγματοποιήθηκε από εξειδικευμένο τεχνολόγο-παρασκευαστή.

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ PAP TEST ΜΕ ΧΡΩΣΗ ΚΑΤΑ ΠΑΠΑΝΙΚΟΛΑΟΥ

- (Κατευθυντήριες Οδηγίες-Guidelines to cytotechnologist provided by the **University of Nottingham/the Queens Medical Centre NHS**)
 - **PAPANICOLAOU METHOD** (modified protocol)
 - 1. Fix slides in acetic/alcohol fixative **15 minutes**
 - 2. Absolute 100-**95%** alcohol **2 minutes**
 - 3. 70% alcohol **2 minutes**
 - 4. 50% alcohol **2 minutes**
 - 5. Tap water **2 minutes**
 - 6. Stain in **haematoxylin** **4 minutes**
 - 7. Rinse in tap water briefly.
 - 8. Differentiate in acid alcohol **5 seconds**
 - 9. Blue in tap water.
 - 10. Dehydrate in absolute alcohol-**95%** **x2**
 - 11. Stain in **orange G** **10 seconds**
 - 12. Rinse in absolute alcohol **-95%** **x2**
 - 13. Stain in **E.A. 50** **2 minutes**
 - 14. Rinse in absolute alcohol **x2**
 - 15. Clear in **xylene** **x3**
 - 16. Mount sections in DPX
-
- **Acetic Alcohol Fixative.**
 - Add 60 mls of glacial acetic acid to 100 mls of distilled water then add this solution to 2 l of absolute alcohol.

2ε. Πρωτόκολλο Ανοσοκυτταροχημείας

Για την ανοσοκυτταροχημική ανάλυση των επιλεγμένων πρωτεϊνικών δεικτών **p16/cyclinD1/p53/MDM2** κατασκευάστηκαν πλακίδια από το δείγμα υγρής φάσης (liquid-based cytology: CellSolutions, Menarini, It).με τη μέθοδο των πολλαπλών σταγόνων (cell drops). Κατασκευάστηκαν 40 (4x10) πλακίδια με εντάλλαξη κηλίδων/σταγόνων διαμ 0.5 cm. Σε κάθε ένα από αυτά εμπεριέχονται 8 spots/drops από αντίστοιχα περιστατικά (σύνολο 80). Η συνολική διαδικασία πραγματοποιήθηκε από εξειδικευμένο τεχνολόγο-παρασκευαστή. Τα αντισώματα που εφαρμόστηκαν κατά τη διαδικασία της αυτοματοποιημένης ανοσοκυτταροχημείας παρατίθενται κάτωθι:

anti-**p53** (clone DO7- Dako, Glostrup, Dk dilution at 1:40) mouse monoclonal antibody
anti-**MDM2** (clone IF2, Novocastra, UK dilution at 1:40) mouse monoclonal antibody
anti-**cyclin D1** (clone DSC6- Dako, Glostrup, Dk dilution at 1:50) mouse monoclonal antibody

anti-**p16^{INK4}** (clone E6H4, Dako Corp., Glostrup, Dk; dilution at 1:50) mouse monoclonal antibody

Το τροποποιημένο πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε κατά την ανοσοκυτταροχημική ανάλυση των ειδικού τύπου πλακιδίων (cell spots) και των συμβατικών της ομάδας ελέγχου (control group-NILM) παρατίθεται κάτωθι:

Πρωτόκολλο Ανοσοιστοχημείας –IHC EnVision⁺ two step method (Dako)

- Αποπαραφίνωση (Deparaffinization) Δεν εφαρμόστηκε (κυτταρικό υπόστρωμα)
- **Αδρανοποίηση της ενδογενούς υπεροξειδάσης (Peroxidase blocking)**

Επώαση των πλακιδίων σε διάλυμα 0,03% H₂O₂ για 5 min

Έκπλυση με αποσταγμένο H₂O για 5 min x 2 φορές

Εμβάπτιση σε ισοτονικό διάλυμα TBS για 5 min x 2 φορές

- **Αποκάλυψη αντιγονικών θέσεων (Antigen Retrieval)**

Ενζυματική πέψη επί 10λέπτου στους 37° C

Επώαση με το πρωτοταγές αντίσωμα για 40-50 min, αντίστοιχα.

Έκπλυση με αποσταγμένο H₂O για 5 min x 2 φορές

Εμβάπτιση σε ισοτονικό διάλυμα TBS για 5 min x 2 φορές

- **Σύνδεση με το σύμπλεγμα Υπεροξειδάσης-Πολυμερούς (Peroxidase Labelled Polymer)**

Επώαση με διάλυμα σημασμένης με πολυμερές δεξτράνης Υπεροξειδάσης (Horseradish peroxidase labeled polymer-HRP LP)

Έκπλυση με αποσταγμένο H₂O για 5 min x 2 φορές

Εμβάπτιση σε ισοτονικό διάλυμα TBS για 5 min x 2 φορές

Προσθήκη 3 σταγόνων διαλύματος χρωμογόνου DAB για 30 min

Έκπλυση με αποσταγμένο H₂O για 5 min x 2 φορές

Εμβάπτιση σε ισοτονικό διάλυμα TBS για 5 min x 2 φορές

- **Αντίγρωση και Επικάλυψη**

Εμβάπτιση σε διάλυμα Αιματοξυλίνης (Hematoxylin MAYRES-water based) για 5-10 δευτερόλεπτα

Έκπλυση των τομών με νερό βρύσης για 2-3 min

Προοδευτική αφυδάτωση (Dehydration with graded alcohol)

70% Αιθανόλη εμβάπτιση για 3 min σε θερμοκρασία δωματίου

85% Αιθανόλη εμβάπτιση για 3 min σε θερμοκρασία δωματίου

96% Αιθανόλη εμβάπτιση για 3 min x 2 φορές σε θερμοκρασία δωματίου

100% Αιθανόλη εμβάπτιση για 3 min x 2 φορές σε θερμοκρασία δωματίου

Εμβάπτιση σε καθαρή Ξυλόλη για 2-3 min x 3 φορές και επικόλληση καλυπτρίδων (επικάλυψη με Histomount αμέσως πριν εξατμιστεί η Ξυλόλη).

Η όλη διαδικασία, η οποία βασίζεται στην παράκαμψη της δέσμευσης με τη βιοτίνη αποδίδοντας καθαρότερο υπόστρωμα, πραγματοποιήθηκε με το αυτόματο μηχάνημα ανοσοϊστοχημείας I 6000 της εταιρείας Biogenex. Ως αποδεκτή ανά δείκτη κρίθηκε η ανοσοκυτταροχημική χρώση ως εξής:

MARKER	ΠΡΟΤΥΠΟ ΧΡΩΣΗΣ
P53	ΠΥΡΗΝΙΚΗ/ΠΕΡΙΠΥΡΗΝΙΚΗ
MDM2	ΠΥΡΗΝΙΚΗ/ΠΕΡΙΠΥΡΗΝΙΚΗ
P16	ΠΥΡΗΝΙΚΗ/ΚΥΤΤΑΡΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ
CYCLIN D1	ΠΥΡΗΝΙΚΗ/ΠΕΡΙΠΥΡΗΝΙΚΗ

2στ. Πρωτόκολλο Ψηφιακής Ανάλυσης Εικόνας

Η αντικειμενική αποτίμηση της πρωτεϊνικής έκφρασης των εξεταζόμενων δεικτών **P53, MDM2, P16, CYCLIN D1** πραγματοποιήθηκε με εφαρμογή πρωτοκόλλου ψηφιακής ανάλυσης εικόνας με δομή και λογισμικό Intel Pentium Dual-Core, Digital Camera Sony Cyber-shot (5mPx digital analysis), Microscope Olympus CX-31, Windows XP/ NIS-elements image analysis software, Nikon, Jp, 2009. Η προοδευτική μέτρηση της έντασης της ανοσοκυτταροχημικής χρώσης πραγματοποιήθηκε στα cell

spots και σε 5 οπτικά πεδία . Η ψηφιακή βάση δεδομένων σε excel προωθήθηκε για στατιστική ανάλυση. Η μέτρηση βασίζεται σε φάσμα 256 RGB (combined Red, Green, Blue colors per pixel) συνεχών τιμών (τιμές οδεύουσες προς το 0 αντιστοιχούν σε πρωτεϊνική υπερέκφραση, ενώ προς το 255 σε σταδιακή απώλεια της χρώσης). Φυσιολογικά κυτταρικά υποστρώματα από λήψη κολποτραχηλικών επιχρισμάτων τέθηκαν ως ομάδα ελέγχου (control group). Με βάση τις τιμές μέτρησης τα περιστατικά κατηγοριοποιήθηκαν ως υψηλής/μέσης και χαμηλής πρωτεϊνικής έκφρασης (high/low) (ΠΙΝΑΚΑΣ 1).

3. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με την εφαρμογή του λογισμικού στατιστικής IBM SPSS v25 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) 0. Εφαρμόστηκαν οι δοκιμασίες Pearson Chi-Square (χ^2) test and Fisher's exact για τη διενέργεια των συγκρίσεων μεταξύ των της ανοσοκυτταροχημικής μοριακής ανάλυσης και των κλινικοπαθολογοανατομικών παραμέτρων, αντίστοιχα. Οι κλινικοπαθολογοανατομικές παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν περιελάμβαναν την ηλικία, την κυτταρολογική ταξινόμηση κατά BETHESDA 2001 (revised 2014), την παθολογοανατομική ταξινόμηση κατά CIN, την ταξινόμηση του HPV DNA σε HR/LR. Τέλος, ως επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας μεταξύ των ανωτέρω συσχετίσεων ορίστηκε $p < 0,05$.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

- Περιγραφική Ανάλυση

Όλοι οι εξεταζόμενοι πρωτεϊνικοί δείκτες εμφάνισαν διαφορετική έκφραση επί των εξεταζόμενων ανοσοχρωσμένων πλακιδίων (υπερέκφραση ως υψηλή και μέτρια ένταση χρώσης καθώς και χαμηλή). Υπερέκφραση της **p53** παρατηρήθηκε σε 13/80 (16.25%), της **MDM2** σε 27/80 (33.75%) της **cyclin D1** σε 8/80 (10%) και της **p16^{INK4}** σε 9/80 (11.25%). Στατιστικές συσχετίσεις των δεικτών με τα παθολογοανατομικά μοριακά χαρακτηριστικά επακολουθούν.

- Πίνακες

ΠΙΝΑΚΑΣ 1

A/A ID	BETHESDA CATEGORIZATION	age	HPV type	CIN	cyclinD1	p16	p53	mdm2
1	LSIL & HPV	27	LR	CIN I	L	L	H	L
2	LSIL & HPV	37	LR	CIN I	L	L	L	L
3	LSIL & HPV	22	LR	CIN I	L	L	L	L
4	LSIL & HPV	46	LR	CIN I	L	L	L	L
5	LSIL & HPV	23	LR	CIN I	L	L	L	L
6	LSIL & HPV	36	LR	CIN I	L	L	L	L
7	LSIL & HPV	31	HR	CIN I	H	L	H	L
8	LSIL & HPV	25	LR	CIN I	L	L	L	H
9	LSIL & HPV	32	HR	CIN I	H	L	H	L
10	LSIL & HPV	29	HR	CIN I	H	L	H	L
11	LSIL & HPV	36	LR	CIN I	L	L	L	H
12	LSIL & HPV	23	LR	CIN I	L	L	L	L
13	LSIL & HPV	31	LR	CIN I	L	L	L	L
14	LSIL & HPV	32	LR	CIN I	L	L	L	H
15	LSIL & HPV	27	LR	CIN I	L	L	L	H
16	LSIL & HPV	45	LR	CIN I	L	L	L	H
17	LSIL & HPV	43	LR	CIN I	L	L	L	H
18	LSIL & HPV	22	LR	CIN I	L	L	L	L
19	LSIL & HPV	23	LR	CIN I	L	L	L	L
20	LSIL & HPV	49	LR	CIN I	L	L	L	L
21	LSIL & HPV	27	LR	CIN I	L	L	L	L
22	LSIL & HPV	53	LR	CIN I	L	L	L	H
23	LSIL & HPV	36	LR	CIN I	L	L	L	L
24	LSIL & HPV	42	LR	CIN I	L	L	L	H
25	LSIL & HPV	31	HR	CIN II	L	H	L	H
26	LSIL & HPV	28	LR	CIN I	L	L	L	L
27	LSIL & HPV	23	LR	CIN I	L	L	L	L
28	LSIL & HPV	21	LR	CIN I	L	L	L	H
29	LSIL & HPV	28	LR	CIN I	L	L	L	H
30	ASCUS	30	LR	CIN I	L	L	L	L
31	LSIL & HPV	29	LR	CIN I	L	L	L	L
32	LSIL & HPV	38	LR	CIN I	L	L	L	L
33	HSIL & HPV	39	HR	CIN III	L	H	H	L
34	LSIL & HPV	19	LR	CIN I	L	L	L	H
35	LSIL & HPV	30	LR	CIN I	L	L	L	H
36	LSIL & HPV	40	LR	CIN I	L	L	L	L

HR: HIGH RISK HPV
 LR: LOW RISK HPV
 L: LOW EXPRESSION
 H: HIGH EXPRESSION

37	LSIL & HPV	28	HR	CIN I	H	L	H	L
38	LSIL & HPV	29	LR	CIN I	L	L	L	L
39	LSIL & HPV	22	LR	CIN I	L	L	L	H
40	LSIL & HPV	21	LR	CIN I	L	L	L	H
41	HSIL & HPV	42	HR	CIN II	H	H	H	L
42	LSIL & HPV	21	LR	CIN I	L	L	L	L
43	LSIL & HPV	35	LR	CIN I	L	L	L	H
44	ASCUS	21	LR	CIN I	L	L	L	H
45	ASCUS	44	LR	CIN I	L	L	L	L
46	ASCUS	31	LR	CIN I	L	L	L	H
47	LSIL & HPV	29	LR	CIN I	L	L	L	L
48	LSIL & HPV	24	LR	CIN I	L	L	L	L
49	LSIL & HPV	30	LR	CIN I	L	L	L	L
50	LSIL & HPV	23	LR	CIN I	L	L	L	H
51	LSIL & HPV	27	LR	CIN I	L	L	L	L
52	LSIL & HPV	31	HR	CIN I	H	H	H	H
53	LSIL & HPV	27	LR	CIN I	L	L	L	H
54	HSIL & HPV	35	HR	CIN III	L	H	H	L
55	LSIL & HPV	20	LR	CIN I	L	L	L	L
56	LSIL & HPV	45	LR	CIN I	L	L	L	L
57	LSIL & HPV	43	LR	CIN I	L	L	L	L
58	HSIL & HPV	31	HR	CIN II	H	H	H	L
59	ASCUS	24	LR	CIN I	L	L	L	H
60	LSIL & HPV	32	LR	CIN I	L	L	L	H
61	LSIL & HPV	22	LR	CIN I	L	L	L	L
62	LSIL & HPV	34	LR	CIN I	L	L	L	L
63	ASCUS	26	LR	CIN I	L	L	L	H
64	LSIL & HPV	25	LR	CIN I	L	L	L	L
65	LSIL & HPV	22	LR	CIN I	L	L	L	L
66	LSIL & HPV	49	LR	CIN I	L	L	L	L
67	LSIL & HPV	34	LR	CIN I	L	L	L	L
68	LSIL & HPV	35	LR	CIN I	L	L	L	L
69	HSIL & HPV	22	HR	CIN II	L	H	H	H
70	LSIL & HPV	42	LR	CIN I	L	L	L	H
71	LSIL & HPV	36	LR	CIN I	L	L	L	L
72	LSIL & HPV	35	LR	CIN I	L	L	L	L
73	ASCUS	30	LR	CIN I	L	L	L	L
74	HSIL & HPV	34	HR	CIN II	L	H	H	L
75	LSIL & HPV	35	LR	CIN I	L	L	L	L
76	LSIL & HPV	39	LR	CIN I	L	L	L	L
77	LSIL & HPV	38	LR	CIN I	L	L	L	L

78	LSIL & HPV	32	HR	CIN I	H	H	H	L
79	LSIL & HPV	29	LR	CIN I	L	L	L	H
80	ASCUS	37	LR	CIN I	L	L	L	L
81	NILM control		NEGATIVE		L	L	L	L
82	NILM control		NEGATIVE		L	L	L	L
83	NILM control		NEGATIVE		L	L	L	L
84	NILM control		NEGATIVE		L	L	L	H
85	NILM control		NEGATIVE		L	L	L	L
86	NILM control		NEGATIVE		L	L	L	L
87	NILM control		NEGATIVE		L	L	L	L
88	NILM control		NEGATIVE		L	L	L	H
89	NILM control		NEGATIVE		L	L	L	L
90	NILM control		NEGATIVE		L	L	L	L
91	NILM control		NEGATIVE		L	L	L	L
92	NILM control		NEGATIVE		L	L	L	L
93	NILM control		NEGATIVE		L	L	L	L
94	NILM control		NEGATIVE		L	L	L	H
95	NILM control		NEGATIVE		L	L	L	L
96	NILM control		NEGATIVE		L	L	L	L
97	NILM control		NEGATIVE		L	L	L	L
98	NILM control		NEGATIVE		L	L	L	L
99	NILM control		NEGATIVE		L	L	L	L
100	NILM control		NEGATIVE		L	L	L	H

Study cohort

- N= 80
- Mean age: 31.55 , SD 7.9
- Age Range 19-53

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
➔	Valid ASCUS	8	10.0	10.0	10.0
	LSIL & HPV	66	82.5	82.5	92.5
	HSIL & HPV	6	7.5	7.5	100.0
	Total	80	100.0	100.0	

P16* Bethesda

Chi-Square Tests				
	Value	df	Asymptotic Significance (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	51.319 ^a	2	.000	.000
Likelihood Ratio	31.866	2	.000	.000
Fisher's Exact Test	28.131			.000
N of Valid Cases	80			

a. 2 cells (33.3%) have expected count less than 5. The minimum expected count is .68.

p<0.001

p16 * HPV type

Chi-Square Tests					
	Value	df	Asymptotic Significance (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	52.264 ^a	1	.000	.000	.000
Continuity Correction ^b	45.560	1	.000		
Likelihood Ratio	40.225	1	.000	.000	.000
Fisher's Exact Test				.000	.000
N of Valid Cases	80				

p<0.001

a. 1 cells (25.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1.46.
 b. Computed only for a 2x2 table

P16 * CIN

p<0.001

Chi-Square Tests				
	Value	df	Asymptotic Significance (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	60.518 ^a	2	.000	.000
Likelihood Ratio	37.940	2	.000	.000
Fisher's Exact Test	35.313			.000
N of Valid Cases	80			

a. 4 cells (66.7%) have expected count less than 5. The minimum expected count is .23.

p16* Cyclin D1

p=0.004

Chi-Square Tests					
	Value	df	Asymptotic Significance (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	13.368 ^a	1	.000	.004	.004
Continuity Correction ^b	9.404	1	.002		
Likelihood Ratio	8.867	1	.003	.004	.004
Fisher's Exact Test				.004	.004
N of Valid Cases	80				

a. 1 cells (25.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is .90.
 b. Computed only for a 2x2 table

p16* p53

p<0.001

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymptotic Significance (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	39.316 ^a	1	.000	.000	.000
Continuity Correction ^b	33.532	1	.000		
Likelihood Ratio	28.556	1	.000	.000	.000
Fisher's Exact Test				.000	.000
N of Valid Cases	80				

a. 1 cells (25.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1.46.

b. Computed only for a 2x2 table

p16* MDM2

p=1

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymptotic Significance (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	.001 ^a	1	.978	1.000	.645
Continuity Correction ^b	.000	1	1.000		
Likelihood Ratio	.001	1	.978	1.000	.645
Fisher's Exact Test				1.000	.645
N of Valid Cases	80				

a. 1 cells (25.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 3.04.

b. Computed only for a 2x2 table

HPV type * BETHESDA CATEGORIZATION Crosstabulation

Count

		BETHESDA CATEGORIZATION			Total
		ASCUS	LSIL & HPV	HSIL & HPV	
HPV type	Low risk	8	59	0	67
	High Risk	0	7	6	13
Total		8	66	6	80

P<0.001

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymptotic Significance (2-sided)
➡ Pearson Chi-Square	34.020 ^a	2	.000
Likelihood Ratio	26.365	2	.000
N of Valid Cases	80		

a. 2 cells (33.3%) have expected count less than 5. The minimum expected count is .98.

**CIN * BETHESDA CATEGORIZATION
Crosstabulation**

Count

P<0.001

		BETHESDA CATEGORIZATION			Total
		ASCUS	LSIL & HPV	HSIL & HPV	
CIN	CIN 1	8	65	0	73
	CIN 2	0	1	4	5
	CIN III	0	0	2	2
Total		8	66	6	80

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymptotic Significance (2-sided)
Pearson Chi-Square	68.496 ^a	4	.000
Likelihood Ratio	37.848	4	.000
N of Valid Cases	80		

a. 6 cells (66.7%) have expected count less than 5. The minimum expected count is .15.

**cyclinD1 * BETHESDA CATEGORIZATION
Crosstabulation**

Count

P=0.101

		BETHESDA CATEGORIZATION			Total
		ASCUS	LSIL & HPV	HSIL & HPV	
cyclinD1	Low expr	8	60	4	72
	High expr	0	6	2	8
Total		8	66	6	80

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymptotic Significance (2-sided)
Pearson Chi-Square	4.579 ^a	2	.101
Likelihood Ratio	4.163	2	.125
N of Valid Cases	80		

a. 2 cells (33.3%) have expected count less than 5. The minimum expected count is .60.

cyclinD1 * CIN Crosstabulation

Count

P=0.065

		CIN			Total
		CIN 1	CIN 2	CIN III	
cyclinD1	Low expr	67	3	2	72
	High expr	6	2	0	8
Total		73	5	2	80

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymptotic Significance (2-sided)
Pearson Chi-Square	5.479 ^a	2	.065
Likelihood Ratio	3.806	2	.149
Linear-by-Linear Association	1.108	1	.293
N of Valid Cases	80		

a. 4 cells (66.7%) have expected count less than 5. The minimum expected count is .20.

P<0.001

cyclinD1 * HPV type Crosstabulation

Count

		HPV type		Total
		Low risk	High Risk	
cyclinD1	Low expr	67	5	72
	High expr	0	8	8
Total		67	13	80

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymptotic Significance (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	45.812 ^a	1	.000		
Continuity Correction ^b	39.229	1	.000		
Likelihood Ratio	34.690	1	.000		
Fisher's Exact Test				.000	.000
Linear-by-Linear Association	45.239	1	.000		
N of Valid Cases	80				

CIN * HPV type Crosstabulation

P< 0.001

Count

		HPV type		Total
		Low risk	High Risk	
CIN	CIN 1	67	6	73
	CIN 2	0	5	5
	CIN III	0	2	2
Total		67	13	80

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymptotic Significance (2-sided)
Pearson Chi-Square	39.536 ^a	2	.000
Likelihood Ratio	29.530	2	.000
Linear-by-Linear Association	34.389	1	.000
N of Valid Cases	80		

a. 4 cells (66.7%) have expected count less than 5. The minimum expected count is .33.

P53* Bethesda

P<0.001

BETHESDA CATEGORIZATION * p53 Crosstabulation

Count		p53		Total
		H	L	
BETHESDA CATEGORIZATION	ASCUS	0	8	8
	LSIL & HPV	7	59	66
	HSIL & HPV	6	0	6
Total		13	67	80

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymptotic Significance (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	34.020 ^a	2	.000	.000
Likelihood Ratio	26.365	2	.000	.000
Fisher's Exact Test	22.456			.000
N of Valid Cases	80			

a. 2 cells (33.3%) have expected count less than 5. The minimum expected count is .98.

P53 * HPV type

p53 * HPV type Crosstabulation

Count		HPV type		Total
		HR	LR	
p53	H	12	1	13
	L	1	66	67
Total		13	67	80

P<0.001

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymptotic Significance (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	65.979 ^a	1	.000		
Continuity Correction ^b	59.475	1	.000		
Likelihood Ratio	53.561	1	.000		
Fisher's Exact Test				.000	.000
N of Valid Cases	80				

a. 1 cells (25.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 2.11

P53* CIN

P< 0.001

CIN * p53 Crosstabulation

Count		p53		Total
		H	L	
CIN	CIN I	7	66	73
	CIN II	4	1	5
	CIN III	2	0	2
Total		13	67	80

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymptotic Significance (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	27.619 ^a	2	.000	.000
Likelihood Ratio	19.873	2	.000	.000
Fisher's Exact Test	19.228			.000
N of Valid Cases	80			

a. 4 cells (66.7%) have expected count less than 5. The minimum expected count is .33.

P53 * Cyclin D1

P<0.001

cyclinD1 * p53 Crosstabulation

Count		p53		Total
		H	L	
cyclinD1	H	8	0	8
	L	5	67	72
Total		13	67	80

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymptotic Significance (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	45.812 ^a	1	.000	.000	.000
Continuity Correction ^b	39.229	1	.000		
Likelihood Ratio	34.690	1	.000	.000	.000
Fisher's Exact Test				.000	.000
N of Valid Cases	80				

a. 1 cells (25.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1.30.

b. Computed only for a 2x2 table

P53 * MDM2

P=0.2

p53 * mdm2 Crosstabulation

Count		mdm2		Total
		H	L	
p53	H	2	11	13
	L	25	42	67
Total		27	53	80

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymptotic Significance (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	2.342 ^a	1	.126		
Continuity Correction ^b	1.463	1	.226		
Likelihood Ratio	2.615	1	.106		
Fisher's Exact Test				.200	.110
N of Valid Cases	80				

a. 1 cells (25.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 4.39.

b. Computed only for a 2x2 table

MDM2 * bethesda

P=0.469

BETHESDA CATEGORIZATION * mdm2 Crosstabulation

Count		mdm2		Total
		H	L	
BETHESDA CATEGORIZATION	ASCUS	4	4	8
	LSIL & HPV	22	44	66
	HSIL & HPV	1	5	6
Total		27	53	80

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymptotic Significance (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	1.733 ^a	2	.420	.469
Likelihood Ratio	1.781	2	.410	.469
Fisher's Exact Test	1.642			.469
N of Valid Cases	80			

a. 3 cells (50.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 2.03.

HPV * MDM2

P=0.526

HPV type * mdm2 Crosstabulation

Count

		mdm2		Total
		H	L	
HPV type	HR	3	10	13
	LR	24	43	67
Total		27	53	80

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymptotic Significance (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	.791 ^a	1	.374	.526	.291
Continuity Correction ^b	.324	1	.569		
Likelihood Ratio	.834	1	.361	.526	.291
Fisher's Exact Test				.526	.291
N of Valid Cases	80				

a. 1 cells (25.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 4.39.

b. Computed only for a 2x2 table

MDM2 * CIN

P=0.846

CIN * mdm2 Crosstabulation

Count

		mdm2		Total
		H	L	
CIN	CIN I	25	48	73
	CIN II	2	3	5
	CIN III	0	2	2
Total		27	53	80

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymptotic Significance (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	1.114 ^a	2	.573	.695
Likelihood Ratio	1.740	2	.419	.695
Fisher's Exact Test	.890			.846
N of Valid Cases	80			

a. 4 cells (66.7%) have expected count less than 5. The minimum

MDM2 * CyclinD1

P= 0.174

cyclinD1 * mdm2 Crosstabulation

Count

		mdm2		Total
		H	L	
cyclinD1	H	1	7	8
	L	26	46	72
Total		27	53	80

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymptotic Significance (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	1.795 ^a	1	.180	.255	.174
Continuity Correction ^b	.894	1	.344		
Likelihood Ratio	2.086	1	.149	.255	.174
Fisher's Exact Test				.255	.174
N of Valid Cases	80				

a. 1 cells (25.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 2.70.

b. Computed only for a 2x2 table

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η ερευνητική αυτή μελέτη εστιάστηκε στην πρωτεϊνική ανάλυση των δεικτών **p16/cyclinD1/p53/MDM2** και στη συσχέτιση της έκφρασης τους με την ιστολογική, κυτταρολογική και μοριακή σε επίπεδο HPV DNA ταξινόμηση των εξεταζομένων κυτταρικών υποστρωμάτων. Εφαρμόστηκε η τεχνική cell spots και η συγκρότηση των αντίστοιχων πλακιδίων τα οποία χρώστηκαν ανοσοκυτταροχημικά. Από τα εξαγόμενα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν στατιστικές σημαντικότητες όσον αφορά την p16 σε σχέση με την κατηγοριοποίηση κατά SIL και CIN, καθώς και την επικινδυνότητα της ιογενούς προσβολής (HR-HPV types). Όσον αφορά στην cyclin D1 στατιστικά σημαντική αναδείχθηκε η συσχέτιση επίσης με επικινδυνότητα της ιογενούς προσβολής (HR-HPV types), ενώ η υπερέκφραση της p53 ευρέθη να συσχετίζεται ισχυρά με την κατηγοριοποίηση κατά SIL και CIN, καθώς και την επικινδυνότητα της ιογενούς προσβολής (HR-HPV types). Ενδιαφέρουσα ήταν η θετική συσχέτιση που αναδείχθηκε κατά τη σύγκριση των επιπέδων ανοσοχρώσης μεταξύ των μορίων p16 vs cyclin D1, p16 vs p53, cyclin D1 vs p53, ενώ η MDM2 παρά το γεγονός ότι ευρέθη υπερεκφρασμένη σε ένα υποσύνολο των εξεταζόμενων περιστατικών με εστίαση περισσότερο σε HR-HPV κυτταρικά υποστρώματα δεν αλληλεπίδρασε συνεκφραζόμενη με τα υπόλοιπα εξετασθέντα μόρια. Τέλος, επιβεβαιώθηκαν οι συσχετίσεις μεταξύ των κατηγοριών κατά SIL και CIN, καθώς και με βάση την επικινδυνότητα της ιογενούς προσβολής (HR-HPV types).

Μια ομάδα ερευνητών χρησιμοποιώντας την τεχνική του προσδιορισμού της αλληλουχίας γονιδίων έδειξε ότι υπάρχει αυξημένη έκφραση του μορίου RNA FAM83H-AS1 στα κύτταρα θετικά για τον τύπο 16 του HPV ανεξάρτητα από τη ρύθμιση της πρωτεΐνης p53. Η λοίμωξη με υψηλού κινδύνου στελέχη του ιού HPV είναι ένα από τα πρώτα γεγονότα στη διαδικασία της καρκινογένεσης στους καρκίνους του τραχήλου και του στοματοφάρυγγα. Η έκφραση των ικών ογκοπρωτεϊνών E6 και E7 είναι θεμελιώδους σημασίας σε αυτή τη διαδικασία και δρουν απενεργοποιώντας τις ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες p53 και Rb αντίστοιχα εκτός από τις αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες του ξενιστή. Μη κωδικοποιήσιμα RNAs όπως μακριά μη κωδικοποιήσιμα RNAs (lncRNAs) βρέθηκαν να έχουν απορρυθμιστεί σε αρκετούς

καρκίνους κάτι το οποίο συνηγορεί υπέρ σημαντικού ρόλου τους στην καρκινογένεση. Με σκοπό να αναγνωρίσουν τα lncRNAs του ξενιστή που έχουν μολυνθεί από τον HPV οι ερευνητές εξέφρασαν την ογκοπρωτεΐνη E6 του υψηλού κινδύνου ιού HPV-16 σε μη διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα και μέτρησαν το προφίλ της συνολικής έκφρασης των lncRNA με τη βοήθεια της τεχνικής high-through put sequencing (RNA-seq). Βρέθηκαν αρκετά lncRNAs του ξενιστή να έχουν διαφορετική έκφραση υπό την επίδραση της E6 συμπεριλαμβανόμενων των GAS5, H19, και FAM83H-AS1. Συγκεκριμένα το μόριο FAM83H-AS1 βρέθηκε να υπερκφράζεται στις κυτταρικές σειρές καρκίνου τραχήλου θετικές με τον HPV-16 σε συσχέτιση με την πρωτεΐνη E6 του HPV16 αλλά με ανεξάρτητο τρόπο από τη ρύθμιση της πρωτεΐνης p53. Επιπλέον το μόριο FAM83H-AS1 φάνηκε να ρυθμίζεται μέσω του μονοπατιού E6-p300. Η μείωση των επιπέδων του FAM83H-AS1 από τα siRNAs μείωσαν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και αύξησαν την απόπτωση. Τα επίπεδα του FAM83H-AS1 βρέθηκαν επίσης διαταραγμένα σε ιστό καρκίνου τραχήλου και η υψηλή έκφραση αυτού του lncRNA συσχετίστηκε με χειρότερη συνολική επιβίωση ενισχύοντας τη σημαντικότητα του ρόλου του στην καρκινογένεση του τραχήλου της μήτρας.(64)

Μια άλλη ομάδα ερευνητών προσπάθησε να υπολογίσει τον κίνδυνο νεοπλασίας και την εξέλιξη προνεοπλασματικών βλαβών σε κακοήθεια σε κύτταρα τραχήλου της μήτρας σε έδαφος λοίμωξης με τον ιό HPV. Ο σκοπός της μελέτης ήταν να αναγνωριστούν οι επιδράσεις του ιού HPV αξιολογώντας τη σχετική υπερέκφραση της p16 αλλά και την έκφραση της p53 και του μορίου RARβ σε συνάρτηση με την παθολογοανατομική μελέτη για τον κίνδυνο τραχηλικών προκαρκινικών βλαβών. Ανοσοϊστοχημική μελέτη διενεργήθηκε σε 100 περιστατικά τραχηλικών προκαρκινικών βλαβών ως προς την έκφραση βιοδεικτών όπως η p16, η p53, και το μόριο RARβ σε σύγκριση με ευρήματα αιματοξιλίνης/ιοσίνης (HE). Έγινε στατιστική ανάλυση για όλα τα πειραματικά δεδομένα. Σε αυτή τη μελέτη στο 70% των περιστατικών φάνηκε υπερέκφραση του μορίου p16INK4A σταδιακά αυξανόμενης από CIN I σε CIN II αλλά μειωμένο στο CIN III. Έκφραση της ογκοπρωτεΐνης p53 παρατηρήθηκε στο 51% των περιστατικών πάλι με αυξητική τάση από CIN I σε CIN II και μια μικρή μείωση στο CIN III. Στο 24% των περιστατικών φάνηκε αρνητική ανοσοδραστικότητα για το ογκοκατασταλτικό γονίδιο RARβ. Η μελέτη αυτή υποστηρίζει την ιδέα ότι η πρωτεΐνη p16 μπορεί να

χρησιμοποιηθεί για να αναγνωριστούν συσχετίσεις με τον ιό HPV αλλά και δυνητικά μαζί με την p53 και την RARβ για την κατηγοριοποίηση προκαρκινικών τραχηλικών βλαβών οι οποίες έχουν ένα μεγαλύτερο ρίσκο να εξελιχθούν σε νεοπλασία. Έτσι μπορεί να θεωρηθεί ότι η ακριβής κατηγοριοποίηση του κινδύνου μπορεί να επιτευχθεί με τη βοήθεια γενετικών δεικτών όπως επίσης και με τη βοήθεια της παθολογικής ανατομικής. (65)

Ερευνητικά δεδομένα σχετικά με τον καρκίνο του τραχήλου και τον ιό HPV, προερχόμενα από μια κινεζική ομάδα, προτείνουν σημεία κλειδιά της καρκινογένεσης ως πιθανούς θεραπευτικούς στόχους. Οι ιοί των ανθρωπίνων θηλωμάτων είναι οι πρώτοι ιοί που έχει αποδειχθεί ότι προκαλούν καρκινογένεση και συνδέονται με καρκίνους του τραχήλου της μήτρας, όγκους της πρωκτό-γεννητικής περιοχής και κακοήθειες της περιοχής του στοματοφάρυγγα. Οι ογκογόνες πρωτεΐνες E6 και E7 διαταράσσουν τον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου μέσω της επικοινωνίας τους με την πρωτεΐνη p53 και την πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος. Σημαντικό ρόλο παίζουν το οξειδωτικό στρες και τα microRNAs στην καρκινογένεση του τραχήλου επομένως τέτοιου είδους μελέτες μπορούν να οδηγήσουν σε νέες μεθόδους διάγνωσης και θεραπείας. Ένας ιδιαίτερα σημαντικός τομέας είναι η μελέτη των μηχανισμών που εμπλέκονται στην τροποποίηση της λοίμωξης και της ανάπτυξης του καρκίνου στα σημεία μόλυνσης. Οι καρκίνοι που έχουν προκληθεί από τον HPV μπορεί να είναι ευαίσθητοι στην ανοσοθεραπεία προσφέροντας έτσι την ευκαιρία να αντιμετωπιστεί συντηρητικά μια προχωρημένη νόσος του τραχήλου. Φαίνεται ότι το οξειδωτικό στρες, το mRNA και οι μηχανισμοί της HPV λοίμωξης θα είναι κρίσιμα σημεία για έρευνα σχετική με τον καρκίνο από τον ιό HPV την επόμενη δεκαετία. (66)

Άλλη βιβλιογραφική ανασκόπηση συνέκρινε γενετικούς πολυμορφισμούς ανάμεσα σε άτομα αφρικανικής καταγωγής και τη σχέση τους με την ανάπτυξη καρκίνου τραχήλου σε έδαφος λοίμωξης με τον ιό HPV. Ο ιός των ανθρωπίνων θηλωμάτων είναι απαραίτητος αλλά όχι επαρκής αιτιολογικός παράγοντας για την ανάπτυξη καρκίνου τραχήλου. Οι παράγοντες που προωθούν την ανάπτυξη καρκίνου όπως οι γονιδιακές μεταλλάξεις του ξενιστή τροποποιούν αξιοσημείωτα την απόκριση στη θεραπεία και το βαθμό επιρρέπειας του οργανισμού. Ειδικά κατά την τελευταία δεκαετία οι Αφρικανικοί πληθυσμοί λειτούργησαν ως πρόσφορο έδαφος για πολλές καινοτομίες σχετικά με

βιοδείκτες και στοχευμένες θεραπευτικές προσεγγίσεις ανανεώνοντας έτσι τις παγκόσμιες στρατηγικές ανάπτυξης βιοδεικτών. Εφτά αφρικανικές χώρες διεξήγαγαν μοριακές στατιστικές μελέτες για τον καρκίνο του τραχήλου σε κάθε ένα από τα γονίδια Casp8, p53, CCR2, FASL, HLA, IL10, TGF-beta, και TNF-alpha. Αυτή η ανάλυση αποκαλύπτει ένα αξιοσημείωτο κενό στη μοριακή επιδημιολογία του καρκίνου του τραχήλου μεταξύ των αφρικανών ενώ παράλληλα ο καρκίνος του τραχήλου συνεχίζει να έχει δυσανάλογα μεγάλη επίπτωση στους αφρικανικούς πληθυσμούς. Έτσι λοιπόν ο ρόλος των βιοδεικτών γενετικής ευαισθησίας μπορεί να εκμεταλλευτεί για να αναπτυχθούν καινοτόμες παρεμβάσεις ώστε να βελτιωθούν οι παρούσες μέθοδοι screening και πρόγνωσης της νόσου παγκοσμίως. (67)

Με τη βοήθεια της τεχνικής της ανοσοιστοχημείας μελετήθηκε ένα σύμπλεγμα δισθενούς χαλκού σε σχέση με την ογκοπρωτεΐνη E6 και την πρωτεΐνη p53. Η ογκοπρωτεΐνη E6 του ιού HPV είναι ένας πολύ σημαντικός παράγοντας που καθορίζει την συμπεριφορά του καρκίνου του τραχήλου στον άνθρωπο. Σε μοριακό επίπεδο ο σχηματισμός του συμπλέγματος E6-E6AP-p53 που οδηγεί στην αποδόμηση της πρωτεΐνης p53 είναι ο κύριος στόχος που μελετάται ανάμεσα στα μετασχηματιζόμενα από τον καρκίνο μόρια. Και τα δυο μόρια E6 και E6AP χρειάζονται για την ουβικουιτίνωση και αποδόμηση της p53. Το σύμπλεγμα Cu^{2+} αλληλεπιδρά με την E6 στα τμήματα που συνδέονται με τα μόρια p53 και E6AP. Φαίνεται ότι η λειτουργία της E6 καταστέλλεται από τη συσσωμάτωση κάνοντας την ανίκανη να απενεργοποιήσει την p53 και συνεπώς αυξάνει τα κυτταρικά της επίπεδα. Αναμένεται ότι αυτό το σύμπλεγμα Cu^{2+} μπορεί να ανοίξει ένα νέο θεραπευτικό μονοπάτι για το σχεδιασμό και ανάπτυξη νέων χημικών οντοτήτων για τη διάγνωση και θεραπεία των προκαλούμενων από τους ιούς HPV καρκίνων. (68)

Μια άλλη ομάδα ερευνητών χρησιμοποίησε την τεχνική της ανοσοιστοχημείας για να μελετήσει την έκφραση των πρωτεϊνών p16 και p53 σε συνάρτηση με τη λοίμωξη από τον ιό HPV και τη σχέση τους με σπάνιες μορφές καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Ο καρκίνος του τραχήλου παραμένει ανάμεσα στους πιο συχνά διαγνώσιμους καρκίνους στις αναπτυγμένες χώρες. Εκτός από το πλακώδες καρκίνωμα και το αδενοκαρκίνωμα η παθοφυσιολογία και οι ογκογονικοί μηχανισμοί των σπάνιων τύπων καρκίνου παραμένουν ευρέως άγνωστοι. Ερευνήθηκε η άξια της HPV λοίμωξης και η έκφραση

των p16^{INK4A} και TP53 στους σπάνιους αρχέγονους καρκίνους του τραχήλου. Η έκφραση των p16^{INK4A} και TP53 αναλύθηκε με τη βοήθεια ανοσοιστοχημείας. Οι σπάνιοι καρκίνοι του τραχήλου είναι επιθετικοί και σχετιζόμενοι με πτωχή πρόγνωση. Σε αντίθεση με τους μεσεγχοματικούς όγκους οι τύποι βασικοκυτταρικό πλακώδες καρκίνωμα (BSCC) και μικροκυτταρικό νευροενδοκρινικό καρκίνωμα (SCNEC) είναι αιτιολογικά σχετιζόμενοι με λοίμωξη από HPV υψηλού κινδύνου και θα μπορούσαν να αναγνωριστούν μπλοκάροντας την θετική p16^{INK4A} υπερέκφραση όπως στους κοινούς καρκίνους του τραχήλου. Οι μεταλλάξεις του TP53 δεν είναι ένα αμελητέο γονιδιακό γεγονός στους σπάνιους καρκίνους του τραχήλου. Επιπλέον αξιολογήθηκε μια σειρά πρωτεϊνών ως προς τη χρήση τους ως βιοδείκτες για τον καρκίνο του τραχήλου σε έδαφος λοίμωξης με τον ιό HPV. Αξιολογήθηκαν τα επίπεδα έξι πρωτεϊνών σχετιζόμενων με τον καρκίνο του τραχήλου (SLeA, CA 15-3, p53, Hsp70, Hsp27, SCCA) και δύο πρωτεϊνών του HPV16 η E7 και η L1. Τα επίπεδα της SLeA μειώθηκαν αντιστρόφως ανάλογα με την αύξηση της σοβαρότητας της βλάβης ενώ τα επίπεδα άλλων υποψήφιων πρωτεϊνών αυξήθηκαν. Τα επίπεδα των SLeA, L1 και p53 φάνηκαν πιο χρήσιμα για την ανίχνευση τραχηλικών βλαβών από τις άλλες υποψήφιες πρωτεΐνες. Ο συνδυασμός των SLeA και L1 μπόρεσαν να διαχωρίσουν αποτελεσματικά τις τραχηλικές βλάβες από τον φυσιολογικό ιστό. Ο συνδυασμός των SLeA και p53 μπόρεσε να διαχωρίσει με βεβαιότητα τα καρκινικά κύτταρα από τα φυσιολογικά με μεγάλη ευαισθησία και ειδικότητα. (69,70)

Συγκρίθηκε η έκφραση της πρωτεΐνης p63 και η σχέση της με την ογκοπρωτεΐνη E7 σε έδαφος λοίμωξης με τον ιό HPV. Ο κύριος αιτιολογικός παράγοντας που οδηγεί στην κακοήγη εξαλλαγή των κυττάρων στον καρκίνο τραχήλου είναι η εμμένουσα λοίμωξη με υψηλού κινδύνου στελέχη του ιού HPV (HR-HPV) με πάνω από το 99% των περιστατικών να είναι θετικά για κάποιο στέλεχος HPV. Τα δεδομένα δείχνουν ότι η ογκοπρωτεΐνη E7 των HR-HPV διεγείρει τη μετάφραση του μέλους της οικογένειας των πρωτεϊνών p53, την p63, κάτι το οποίο μεταβάλλει τα μονοπάτια της απάντησης στη βλάβη του DNA ώστε να διευκολυνθεί η επισκευή της βλάβης του DNA. Έτσι λοιπόν φαίνεται ότι τα HR-HPV στελέχη θα μπορούσαν να αλληλεπιδράσουν με το βαθμό ευαισθησίας των μετασχηματισμένων κυττάρων στην ακτινοθεραπεία τροποποιώντας την αποτελεσματικότητα της επιδιόρθωσης των βλαβών του DNA. (71)

Φαίνεται επιπλέον από μελέτη που έγινε σε 268 περιστατικά ότι υπάρχει συσχέτιση του πολυμορφισμού R72P του γονιδίου TP53 με τη ευαισθησία των κυττάρων ως προς τον ιό HPV μεταξύ γυναικών φορέων του ιού HIV. Επιπλέον όταν αναλύθηκε σύμφωνα με συμπεριφορικούς παράγοντες ο γονότυπος R72P αναγνωριζόταν πιο συχνά ανάμεσα HPV θετικές γυναίκες που κάπνιζαν. Η παραλλαγή R72P του p53 δε σχετίζεται με τη λοίμωξη από τον ιό HPV και την εξέλιξη των βλαβών. (72)

Σε άλλη μελέτη οι ερευνητές χρησιμοποιώντας ανοσοιστοχημικές μεθόδους εξέτασαν το ρόλο μιας σειράς μορίων στο φαινότυπο ασθενών με καρκίνο του τραχήλου. Τα ογκογονίδια του HPV είναι υπεύθυνα για την ανάπτυξη κακοήθειας και η ογκοπρωτεΐνη E6 που εκφράζει ο HPV προκαλεί την αποδόμηση της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53. Αυτή η αποδόμηση οδηγεί στη αύξηση της έκφρασης της p16 αλλά και άλλων πρωτεϊνών οι οποίες επίσης παίζουν ρόλο στην ανάπτυξη και εξέλιξη του καρκίνου του τραχήλου. Τα δείγματα καρκίνου τραχήλου έδειξαν σημαντικά αυξημένη ανοσοχρώση για την πρωτεΐνη E6. Τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών E6, p53 και p16 διέφεραν σημαντικά στο πλακώδες καρκίνωμα του τραχήλου σε σχέση με το αδενοκαρκίνωμα. Για τα μόρια MDM2 και gal-3 δείχτηκε θετική συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης τους για τον καρκίνο του τραχήλου. Επιπρόσθετα η έκφραση του gal-3 συσχετίστηκε με πτωχή πρόγνωση στα περιστατικά αρνητικά για την πρωτεΐνη p16. Επίσης αναγνωρίστηκε αρνητική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης της E6 και μιας μεταλλαγμένης μορφής της p53 στα περιστατικά καρκίνου τραχήλου. Η μετάλλαξη της p53 φάνηκε να είναι κοινή στον καρκίνο του τραχήλου και τα μόρια gal-3 and MDM2 φάνηκε να δρουν με συνδυασμένο τρόπο σε αυτόν τον τύπο καρκίνου. Επομένως η πρωτεΐνη gal-3 υπερεκφράζεται στους ιστούς καρκίνου τραχήλου των ασθενών με πτωχή πρόγνωση. (73)

Οι υψηλού βαθμού βλάβες CIN θεωρούνται αληθείς προκαρκινικές βλάβες όταν τα ικά ογκογονίδια E6 και E7 εκφράζονται ανεξέλεγκτα στα διαιρούμενα κύτταρα. Αυτό συνεπάγεται την απεμπόληση του φυσιολογικού κυτταρικού ελέγχου μέσω της αποδόμησης των πρωτεϊνών p53 και pRb. Παρόλα αυτά έχει γίνει ξεκάθαρο ότι αυτά τα ικά ογκογονίδια διατηρούν επιπρόσθετα ογκογονικές ιδιότητες συμπεριλαμβανομένων της αλληλεπίδρασης/παρεμπόδισης του μηχανισμού μεθυλιοποίησης του DNA και των σημείων ελέγχου της διαδικασίας της μίτωσης. Η ική πρωτεΐνη E6 του ιού HPV παίζει

μείζων ρόλο στην πρωτεοσωμική αποδόμηση της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53. Ως συνέπεια διευκολύνεται η ανάπτυξη καρκίνου του τραχήλου. Ένα μαθηματικό μοντέλο των αλληλεπιδράσεων της E6 με την p53 αναπτύχθηκε χρησιμοποιώντας μαθηματικούς νόμους. Δείχτηκε λοιπόν ότι η καταστολή των σχετιζόμενων με την E6 πρωτεϊνών από ένα δοκιμαστικό νέο μικρομοριακό φάρμακο ενισχύει την συσσώρευση της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53 και τη διατήρηση της λειτουργίας της. Επομένως το μόριο αυτό βρέθηκε ότι μπλοκάρει την αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης p53 με την E6. (74,75)

Με τη βοήθεια της τεχνικής της ανοσοιστοχημείας μελετήθηκε επίσης η αλληλεπίδραση της εξωκυττάριας πρωτεΐνης Tat με την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 και το ρόλο της στον καρκίνο του τραχήλου. Ένα σημαντικό στοιχείο είναι ότι η επίπτωση αυτού του τύπου καρκίνου είναι σημαντικά πιο αυξημένη σε γυναίκες που έχουν προσβληθεί ταυτόχρονα από ιούς δυο τύπων: του τύπου 1 ιού ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV-1) και του τύπου των υψηλού κινδύνου ιών των ανθρωπίνων θηλωμάτων (HR-HPVs). Με αυτό υπόψιν, προηγούμενες μελέτες συνέδεσαν την πρωτεΐνη Tat του HIV-1, έναν trans-activator της έκφρασης του ιικού γονιδιώματος, με την παθογένεση των κακοηθειών σχετιζόμενων με τον HIV. Ειδικότερα έχειδειχθεί ότι όταν απελευθερωθεί από τα μολυσμένα κύτταρα η πρωτεΐνη Tat μπορεί να εισχωρήσει στα ανθρώπινα κύτταρα τροποποιώντας έτσι το φαινότυπο τους. Αξιολογήθηκε λοιπόν εάν η ενδοκυττάρια πρωτεΐνη Tat θα μπορούσε να προσβάλλει ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα τραχήλου μήτρας και αν αυτό θα μπορούσε να επηρεάσει την έκφραση των πρωτεϊνών E6 και E7 του ιού HPV ή των κυτταρικών μορίων p16 και p53 τα οποία αποτελούν κλειδί στην ανάπτυξη και εξέλιξη του καρκινώματος του τραχήλου. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η εξωκυττάρια βιολογικά ενεργή πρωτεΐνη Tat προσλαμβάνεται από τα καρκινικά τραχηλικά κύτταρα και ότι αυτό ακολουθείται από μια αύξηση στην έκφραση της πρωτεΐνης E6 του ιού HPV και από μια μείωση στα επίπεδα της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53. Από τη στιγμή που η απώλεια της p53 έχει σχετιστεί με μια λειτουργία αποδιαφοροποίησης και αντιαπόπτωσης των κυττάρων, αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν μια πιθανή σχέση μεταξύ την εξωκυττάριας πρωτεΐνης Tat και της υψηλής επίπτωσης και κλινικής επιθετικότητας του καρκινώματος του

τραχήλου της μήτρας που παρατηρείται σε γυναίκες που είναι φορείς των ιών HIV και HPV. (76)

Είναι γνωστό ότι οι υψηλού κινδύνου υπότυποι του ιού HPV (π.χ. 16 και 18) οδηγούν σε καρκίνο τραχήλου μήτρας όπως επίσης και σε καρκίνο στοματο-φαρυγγικού συστήματος (OSCC). Η καρκινογένεση σε έδαφος λοίμωξης HPV πυροδοτείται από ειδικές ογκοπρωτεΐνες του ιού, τις E6 και E7. Η πρωτεΐνη E6 των υποτύπων 16 και 18 του HPV αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη E3 οδηγώντας σε ουβικουϊτίνωση και πρωτεόλυση της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53. Η πρωτεΐνη E7 απενεργοποιεί την πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος (Rb) με τη διαδικασία της φωσφορυλίωσης η οποία ακολουθείται από μια αύξηση του ελεύθερου ευκαριωτικού μεταγραφικού παράγοντα E2F στο κύτταρο. Αυτό οδηγεί σε μια αύξηση της p16, ενός κυκλινο- εξαρτώμενου αναστολέα κινάσης ο οποίος χρησιμοποιείται σαν ανοσοισοχημικός δείκτης για τους OSCC σε έδαφος λοίμωξης με HPV. Δυστυχώς η p16 δεν αυξάνεται αποκλειστικά από τη δράση της ογκοπρωτεΐνης E7 στην καρκινογένεση. Αναλύθηκαν 130 ιστοτεμάχια παραφίνης καρκινικού τραχηλικού ιστού. Τα αποτελέσματα της μελέτης αποκάλυψαν ένα χρήσιμο πρωτόκολλο ανοσοχρώσης για την ανοσοισοχημική αξιολόγηση της έκφρασης των ογκοπρωτεϊνών E6/E7 στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας όπως επίσης και στον στοματοφαρυγγικό καρκίνο σε έδαφος λοίμωξης με HPV. Τα πλεονεκτήματα αυτής της μεθόδου σε σχέση με την mRNA in situ υβριδοποίηση των E6/E7 είναι το πολύ μικρότερο κόστος όπως επίσης και η ευρεία εφαρμοσιμότητα στην καθημερινή πρακτική της παθολογικής ανατομικής. (77)

Μια συγκεκριμένη μετάλλαξη του γονιδίου p53 ανακαλύφθηκε ότι παίζει ιδιαίτερο ρόλο στην πρόγνωση του καρκίνου του τραχήλου. Η ογκοπρωτεΐνη E6 του ιού HPV παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση. Η πρωτεΐνη E6 αλληλεπιδρά με την E3 λιγκάση της ουβικουϊτίνης που έχει ως αποτέλεσμα την πρωτεόλυση της πρωτεΐνης p53. Σε ένα σύνολο από 248 περιστατικά βρέθηκε ότι η συνολική επιβίωση ήταν καλύτερη για τους ασθενείς που εξέφραζαν τη μεταλλαγμένη p53 στον πυρήνα. Βρέθηκαν πολύ υψηλά ποσοστά μετάλλαξης της TP53 σε έναν τύπο καρκίνου που το γονίδιο p53 απενεργοποιείται εξαρχής μέσω της επίδρασης της E6 κατά την εξέλιξη του καρκίνου του τραχήλου. Ένα απρόσμενο εύρημα είναι η συσχέτιση αυτής της

μετάλλαξης με μεγαλύτερη επιβίωση πιθανόν λόγω καλύτερης απόκρισης στη θεραπεία.
(78)

Μελετήθηκε εξ'άλλου η έκφραση του γονιδίου της β-ντιφενσίνης 3 (hBD3) και ο τρόπος που αυτή ρυθμίζεται από την ογκοπρωτεΐνη E6 του ιού HPV ώστε να συντείνει στην καρκινογένεση. Η ανθρώπινη β-ντιφενσίνη-3 (hBD3) είναι ένα ρυθμιστικό μόριο της ενδογενούς ανοσολογικής απόκρισης που παράγεται από κύτταρα του επιθηλίου και το οποίο υπερεκφράζεται σε δυσπλαστικές βλάβες του στοματικού βλεννογόνου και εγκαθιστά ένα μικροπεριβάλλον που προωθεί την ανάπτυξη του όγκου. Η έκφραση του hBD3 ενισχύεται από το μονοπάτι σηματοδότησης του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα. Περιγράφεται ένα νέο μονοπάτι μέσω του οποίου η ογκοπρωτεΐνη E6 του υψηλού κινδύνου ιού HPV-16 ενισχύει την έκφραση του hBD3 στα βλεννώδη κερατινοκύτταρα. Η εκτομή της E6 από siRNA ενισχύει την έκφραση της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53 και μειώνει την έκφραση του hBD3 σε καρκινικά τραχηλικά κύτταρα τύπου CaSki σε έδαφος λοίμωξης από τον ιό HPV-16 και στα καρκινικά κύτταρα στοματοφάρυγγα. Τα κακοήθη κύτταρα υπερεκφράζουν την hBD3. Η πρωτεΐνη E6 του HPV διεγείρει την έκφραση του mRNA της hBD3, την παραγωγή πεπτιδίων και την δραστηριότητα του υποκινητή των γονιδίων στα βλεννώδη κερατινοκύτταρα. Η μείωση των κυτταρικών επιπέδων της πρωτεΐνης p53 διεγείρει την έκφραση της hBD3 ενώ η ενεργοποίηση της p53 από την δοξουρουβικίνη αναστέλλει την έκφραση της στα πρωτογενή κερατινοκύτταρα του στοματικού βλεννογόνου και στα κύτταρα CaSki υποδεικνύοντας ότι η πρωτεΐνη p53 καταστέλλει την έκφραση της hBD3. Έτσι λοιπόν η ογκοπρωτεΐνη E6 των υψηλού κινδύνου ιών HPV μπορεί να διεγείρει την έκφραση της hBD3 στα κύτταρα του όγκου για να διευκολυνθεί έτσι η διαδικασία της καρκινογένεσης. (79)

Μελετήθηκε επιπλέον ο ρόλος μιας συγκεκριμένης μετάλλαξης της ογκοπρωτεΐνης E6 του ιού HPV αλλά και ενός πολυμορφισμού της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53 στην εξέλιξη των ενδοεπιθηλιακών βλαβών. Σκοπός ήταν να μελετηθεί η κατανομή του γονιδίου E6 του ιού HPV 16 και του πολυμορφισμού του κωδικωνίου 72 της πρωτεΐνης p53 μεταξύ γυναικών με προκαρκινικές βλάβες τραχήλου με λοίμωξη από HPV16 και να διερευνηθεί η σχέση τους με τον κίνδυνο της ανάπτυξης CINII και CINIII. Δείχτηκε ότι η μετάλλαξη T178G της πρωτεΐνης E6 του HPV 16 αυξάνει τον κίνδυνο εξέλιξης της

ενδοεπιθηλιακής βλάβης σε CINII και III. Εν τω μεταξύ συγκρινόμενη με τους γονότυπους Arg/Arg και Arg/Pro ο γονότυπος Pro/Pro του κωδικωνίου 72 του γονιδίου p53 σχετίστηκε ακόμα περισσότερο με τον κίνδυνο εξέλιξης στα άτομα με CINII και CINIII. (80)

Μια μεγάλη σειρά 47 περιστατικών αδενοκαρκινώματος τραχήλου και κόλπου που αναλύθηκαν με την τεχνική της ανοσοιστοχημείας έδειξε ότι η αυξημένη έκφραση της ογκοπρωτεΐνης p16 δε σχετίζεται απαραίτητα με την καρκινογένεση σε έδαφος λοίμωξης από υψηλού κινδύνου ιό HPV. Τα αδενοκαρκινώματα που παρουσιάζουν γαστρικού τύπου διαφοροποίηση αντιπροσωπεύουν ένα πρόσφατα περιγραφόμενο και σπάνιο υπότυπο αδενοκαρκινώματος τραχήλου μη σχετιζόμενο με τον ιό HPV. Αυτά συμπεριλαμβάνουν ένα φάσμα από μια καλά διαφοροποιημένη παραλλαγή (adenoma malignum/ βλεννώδες αδενοκαρκίνωμα ελάχιστης διαφοροποίησης) μέχρι ένα πιο φτωχής διαφοροποίησης εμφανώς κακοήθους μορφής επονομαζόμενο ως γαστρικού τύπου αδενοκαρκίνωμα κόλπου. Συχνά μεθίστανται σε μη συχνές θέσεις όπως η ωοθήκη και το περιτόναιο όπου μπορούν να αναγνωριστούν λανθασμένα ως μεταστατικά αδενοκαρκινώματα από άλλα συστήματα εκτός του γυναικολογικού. Δεν υπάρχουν αρκετές πληροφορίες σχετικά με τον ανοσοφαινότυπο των γαστρικού τύπου αδενοκαρκινωμάτων. Αναλύθηκαν ένας μεγάλος αριθμός δεικτών μεταξύ των οποίων και η p16 και ο PAX8. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης δείχνουν ανοσοφαινοτυπική αλληλοεπικάλυψη με τα αδενοκαρκινώματα παγκρέατος και συστήματος χοληφόρων αλλά συμπεραίνουν επίσης ότι η θετική ανοσοαντίδραση της PAX8 μπορεί να είναι πολύ χρήσιμη στο διαχωρισμό των γαστρικού τύπου αδενοκαρκινωμάτων από τα καρκινώματα παγκρέατος και χοληφόρων και άλλων μη γυναικολογικών αδενοκαρκινωμάτων τα οποία είναι συνήθως αρνητικά. Η αυξημένη ανοσοαντίδραση για την p16 σε αδενοκαρκίνωμα του τραχήλου της μήτρας δεν είναι απαραίτητα ενδεικτικό ενός όγκου σχετιζόμενου με λοίμωξη από υψηλού κινδύνου ιό HPV. (81)

Η ανάλυση της πρωτεϊνικής έκφρασης του μορίου της κυκλίνης D1 σε 60 περιστατικά κατέδειξε τη σημαντικότητα του ρόλου της εν λόγω πρωτεΐνης στην παθογένεια του αδενοκαρκινώματος του τραχήλου της μήτρας σε έδαφος λοίμωξης από τον ιό HPV-16. Το μόριο της κυκλίνης D1 είναι ένας από τα μόρια στόχους για την ενεργοποίηση της σηματοδότησης του μονοπατιού Notch συμμετέχοντας στην

παθογένεια της νόσου. Οι βιοψίες των ασθενών με αδενοκαρκίνωμα θετικό στον HPV 16 έδειξαν μια ισχυρή συσχέτιση με την έκφραση της κυκλίνης D1. Οι σηματοδοτικές πρωτεΐνες JAG1 και Notch-3 έδειξαν τον συνεργικό τους ρόλο στην τροποποίηση της κυκλίνης D1 η οποία με τη σειρά της ρυθμίζει την έκφραση του φαινοτύπου του σχετιζόμενου με τον HPV-16 αδενοκαρκινώματος του τραχήλου της μήτρας. (82)

Με τη βοήθεια της τεχνικής της ανοσοιστοχημείας καταδείχτηκε και ο σημαντικός ρόλος του μορίου της Ριβοσικλίμπη (Ribociclib) ως ένας νέος πιθανός θεραπευτικός στόχος για τους τραχηλικούς καρκίνους που δεν οφείλονται σε λοίμωξη του HPV. Στις μέρες μας έχουν αναπτυχθεί και χρησιμοποιούνται πολλές στρατηγικές για τη θεραπεία του καρκίνου. Ένας από τους στόχους πολλών ομάδων είναι ο περιορισμός της μειωμένης αποτελεσματικότητας της χημειοθεραπείας. Επιπλέον το μοριακό μονοπάτι της εξαρτώμενης από την κυκλίνη D πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος και ο E2F είναι ένας σημαντικός μηχανισμός για τον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου και η απορύθμιση του είναι ένας από τους παράγοντες κλειδιά για την ανάπτυξη καρκίνου. Η ριβοσικλίμπη είναι ένας από τους εκλεκτικούς αναστολείς της CDK4/6 και αποτελεί μια νέα θεραπευτική προσέγγιση υποσχόμενη πολλά ως μια καλή στρατηγική θεραπείας σε πολλούς τύπους καρκίνου στον άνθρωπο. Βρέθηκε ότι η CDK4, CDK6 και η κυκλίνη D1 εκφράζονται έντονα και εντοπίζονται κυρίως στον πυρήνα και λιγότερο στο κυτταρόπλασμα των καρκινικών κυτταρικών σειρών. Επιπλέον η ριβοσικλίμπη προκαλεί τη στάση του κυτταρικού κύκλου στην G0-G1 φάση όπως και την απόπτωση του κυττάρου και αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό με δόσοεξαρτώμενο τρόπο. Επίσης μειώνει την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων όπως το CDK4, CDK6, E2F1, P-Rb και αυξάνει την έκφραση του γονιδίου Bax. Συνεπώς αναστέλλει την ανάπτυξη του όγκου που σχετίστηκε με τη μείωση της έκφρασης αυτών των μορίων και επιπλέον αυξάνει σημαντικά την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων. Το μοριακό μονοπάτι Rb-E2F λοιπόν μπορεί να θεωρηθεί ως ένας σημαντικός παράγοντας στην παθογένεια του καρκίνου του τραχήλου και ο μηχανισμός της Ριβοσικλίμπης μια πιθανή θεραπευτική στρατηγική, για τη βελτίωση νέων θεραπευτικών μέσων για τον αρνητικό στον HPV καρκίνο του τραχήλου της μήτρας.(83)

Ένα άλλο μόριο, ο πυρηνικός παράγοντας kappa B (NF-kB), δείχτηκε ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην αποτελεσματικότητα της ακτινοθεραπείας και της συστηματικής

χημειοθεραπείας στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Ο NF-kB εμπλέκεται στην μοριακή έναρξη της ανθρώπινης καρκινογένεσης, στην εξέλιξη της νόσου και στην αντίσταση στη θεραπεία. Ο NF-kB λειτουργεί σαν ένα τμήμα ενός δικτύου που ρυθμίζει το μοτίβο των επιδράσεων του στην έκφραση διαφόρων άλλων γονιδίων όπως τα p53, STAT3 και miRNAs και επομένως τη λειτουργία του. Η ενεργοποίηση του NF-kB όταν πυροδοτείται από μια λοίμωξη HPV παίζει σημαντικό ρόλο στην ποιότητα της ανοσολογικής απάντησης του ξενιστή. Ο ιός προκαλεί μείωση της έκφρασης του NF-kB ώστε να σταματήσει την ανασταλτική σηματοδότηση της αντιγραφής του η οποία πυροδοτείται από το ανοσολογικό σύστημα. Αυτό οδηγεί σε μια κατάσταση εμμένουσας HPV λοίμωξης. Κατά την εξέλιξη σε υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία και καρκίνο τραχήλου ο NF-kB γίνεται δομικά ενεργός ξανά. Μεταλλάξεις που προκαλούν αυξημένη έκφραση μορίων όπως τα RAS, EGFR, PGF, HER2 έχουν συσχετιστεί με αυξημένη σηματοδότηση του NF-kB. Ο NF-kB μπορεί να ενεργοποιήσει τη μετάφραση γονιδίων που ελέγχουν τον πολλαπλασιασμό (όπως τα μόρια cyclinD1 και c-myc), γονιδίων που εμπλέκονται στο μηχανισμό της μετάστασης, στην εξαρτώμενη με τον VEGF αγγειογένεση και στην σχετιζόμενη με την τελομεράση κυτταρική αθανασία. Η ενεργοποίηση του NF-kB μπορεί επίσης να επιφέρει την έκφραση των ενεργοποιημένων πρωτεϊνών διαμινάση της κυττοδίνης (cytodine deaminase (AID)) και APOBEC παρέχοντας μια μηχανική σύνδεση μεταξύ του μονοπατιού NF-kB και του χαρακτηριστικού του καρκίνου του τραχήλου, της γέννησης μεταλλάξεων. Η αναστολή του NF-kB θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για να αντιστρέψει την αντίσταση στην ακτινοθεραπεία και τη συστηματική αντικαρκινική θεραπεία. (84)

Μελέτη 164 περιστατικών κατέδειξε τη σημαντικότητα του μορίου OVCA 1 και της σχέσης του με την cyclin D1 στον καρκίνο του τραχήλου. Εξετάστηκαν οι σχέσεις μεταξύ των επιπέδων των εκφρασμένων πρωτεϊνών και mRNAs των μορίων: ωοθηκικό καρκινικό γονίδιο 1 (OVCA1), cyclin D1 και του p16 σε τραχηλικές βλάβες μετά από λοίμωξη με HPV υψηλού κινδύνου (HR-HPV). Ανακαλύφθηκε ότι τα επίπεδα των πρωτεϊνών του OVCA1 αυξήθηκαν ενώ τα αντίστοιχα επίπεδα των μορίων mRNA μειώθηκαν κατά την εξέλιξη από φυσιολογικό τραχηλικό ιστό σε τραχηλική ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία (CIN) και καρκίνο του τραχήλου. Επιπλέον παρατηρηθήκαν σημαντικές διαφορές στα επίπεδα πρωτεϊνών του OVCA1 μεταξύ της χαμηλής και της

υψηλόβαθμης CIN, όπως επίσης και μεταξύ των πρώιμων και όψιμων σταδίων καρκίνου του τραχήλου ενώ δεν αναγνωρίστηκαν σημαντικές συσχετίσεις στα επίπεδα των πρωτεϊνών και των μορίων mRNA του OVCA1 ανάλογα με τον παθολογοανατομικό τύπο του καρκίνου του τραχήλου ή της παρουσίας ή όχι λεμφαδενικών μεταστάσεων. Τα επίπεδα των mRNA και των πρωτεϊνών του OVCA1 συσχετίστηκαν θετικά με τα επίπεδα τα έκφρασης του p16. Επίσης παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στα επίπεδα των mRNA και των πρωτεϊνών του OVCA1 μεταξύ των ομάδων με HR-HPV (+) και HR-HPV (-). Επομένως η εκτροπή στην έκφραση πρωτεϊνών και mRNA του OVCA1 μπορεί να είναι πολύ σημαντική κατά την ανάπτυξη τραχηλικών βλαβών, ειδικά στα πρώιμα στάδια. Τα επίπεδα επομένως των μορίων OVCA1 όσον αφορά στον καρκίνο του τραχήλου συσχετίστηκαν με ασυνήθιστη έκφραση του p16 αλλά και με λοίμωξη με υψηλού κινδύνου στελέχη HPV. (85)

Έχει φανεί ότι η αυξημένη έκφραση του γονιδίου P16^{INK4A} είναι απαραίτητη για την αντίσταση σε χημειοθεραπευτικούς παράγοντες όπως η σισπλατίνη (DDP). Οι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες όπως η σισπλατίνη (DDP) θεωρούνται ως πρώτης γραμμής θεραπεία για τον καρκίνο τραχήλου. Παρόλο που αρχικά οι ασθενείς συχνά επιδεικνύουν υψηλή ανταπόκριση η πλειοψηφία τελικώς αναπτύσσει αντίσταση στην DDP. Παρόλα αυτά οι μηχανισμοί που κρύβονται πίσω απ' αυτή τη διαδικασία δεν έχουν διευκρινιστεί πλήρως. Αναγνωρίστηκε υψηλό επίπεδο έκφρασης του γονιδίου P16^{INK4A} και υψηλή αλληλεπίδραση με την εξαρτώμενη από την κινάση 4 κυκλίνη κυττάρων ανθεκτικών στα DDP (SiHa-DDP) κάτι το οποίο σχετίστηκε με την αδρανοποίηση της φωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος (pRb). Η μείωση του P16^{INK4A} πυροδότησε την κυτταρική ανάπτυξη όταν συγκρίθηκε με τα κύτταρα ελέγχου μέσω της αύξησης της έκφρασης της pRb και επίσης ενίσχυσε την απόπτωση μετά από θεραπεία με DDP. Δείχτηκε έτσι ότι το μόριο P16^{INK4A} είναι απαραίτητο για την αντίσταση στην DDP της κυτταρικής σειράς SiHa στον καρκίνο του τραχήλου. (86)

Μελέτη 343 περιστατικών κατέληξε στο ότι το φορτίο του HPV, η έκφραση του p16(INK4A) και του μορίου GLUT1 παίζουν καθοριστικό ρόλο στην πρόβλεψη της βαρύτητας της σχετιζόμενης με τον HPV βλάβης στον τράχηλο. Συγκεκριμένα το ιικό φορτίο σχετίστηκε με την ιστολογική βαρύτητα της τραχηλικής βλάβης. Επίσης η

έκφραση του p16(INK4A) και το GLUT1 αυξήθηκε σταδιακά ανάλογα με την ιστολογική βαρύτητα της τραχηλικής βλάβης. (87)

Συγκεκριμένα μόρια του κυτταρικού κύκλου χρησιμοποιούνται ως βιοδείκτες που εκφράζονται σε προκαρκινικές βλάβες του τραχήλου. Οι υψηλού κινδύνου ιοί των ανθρωπίνων θηλωμάτων σχετίζονται με τον καρκίνο του τραχήλου και τις προκαρκινικές του βλάβες μέσω αλληλεπιδράσεων μεταξύ των ογκοπρωτεϊνών E6 και E7 και των πρωτεϊνών ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου όπως η p53 και η pRb αντίστοιχα. Ανευρέθηκε μια σημαντική αύξηση στην έκφραση του p16 και του p21 σταδιακά από τις χαμηλόβαθμες στις υψηλόβαθμες βλάβες και στον καρκίνο. Σε αντίθεση, η έκφραση της κυκλίνης D1 μειώθηκε σημαντικά στις πιο σοβαρές βλάβες. Τα μόρια p16, Ki-67, p21 και p53 είχαν αναλογική αύξηση με τη βαρύτητα της βλάβης και πιο ισχυρές συσχετίσεις παρατηρήθηκαν για το p16 και το Ki-67. Επίσης αναδείχθηκε μεγάλη συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης p16 και cyclinD1 και της λοίμωξης με τον HPV16. (88)

Επιπλέον η ανοσοιστοχημική έκφραση ορισμένων μορίων συσχετίστηκε με την πρωτεΐνη L1 του καψιδίου του HPV στην παθογένεια των καλοήθων και κακοήθων βλαβών του τραχηλικού επιθηλίου. Δείχτηκε πρώτον ότι ο συνδυασμός της πρωτεΐνης L1 του καψιδίου και της πρωτεΐνης p16 μπορεί να προβλέψει τον κίνδυνο εξέλιξης μιας προκαρκινικής βλάβης σε αδενοκαρκίνωμα ενδοτραχήλου. Δεύτερον, ότι η συναξιολόγηση των p53 - COX2 - p16 είναι χρήσιμη σαν μια ομάδα σχετικών βιοδεικτών για τη συσχέτιση L1 και p16. Επιπλέον ότι ο παράγοντας EGFR αυξάνεται ανάλογα με την εξέλιξη της βαρύτητας των βλαβών. Και τέλος ότι η κυκλίνη D1 είναι ένας αξιόπιστος δείκτης της δυνατότητας διήθησης. (89)

Ενώ η προσθήκη της αναζήτησης του γονότυπου των HR-HPV στο τραχηλικό επίχρισμα έχει βελτιώσει την ευαισθησία στη διάγνωση των βλαβών, λόγω της χαμηλής ειδικότητας του, περισσότεροι βιοδείκτες κακοήθειας έχουν αναζητηθεί. Δεδομένου του ότι ο ογκογονικός ρόλος του HPV έγκειται κυρίως στη διαταραχή του ελέγχου του κυτταρικού κύκλου δεν προκαλεί έκπληξη ότι οι περισσότεροι από τους χρήσιμους βιοδείκτες των σχετιζόμενων με τον HPV τραχηλικών βλαβών είναι πρωτεΐνες του κυτταρικού κύκλου με την p16 και την Ki-67 να είναι οι περισσότερο χρησιμοποιούμενες. Τα μόρια p53, κυκλίνη D1, TOP2A και MCM2 έχουν επίσης

μελετηθεί ευρέως και έχουν αποδείξει την αξία τους ως πολλά υποσχόμενοι νέοι βιοδείκτες. (90)

Η μελέτη σε 738 περιστατικά του γονιδίου CCND1 της κυκλίνης D1 έδειξε ότι τα άτομα που παρουσιάζουν τον πολυμορφισμό rs9344 σε αυτό το γονίδιο είναι επιρρεπή να αναπτύξουν καρκίνο του τραχήλου. Η κυκλίνη D1 με έναν κοινό G/A πολυμορφισμό στο rs9344 είναι ένας σημαντικός ρυθμιστής της φάσης G1 στον κυτταρικό κύκλο και παίζει σημαντικό ρόλο σε αρκετούς τύπους όγκων. Η σχέση της κυκλίνης D1 με την πρωτεΐνη E7 του HPV16 οδήγησε στη μελέτη του γονιδίου CCND1 στον καρκίνο του τραχήλου. Παρατηρήθηκε ότι ο γονότυπος AA είχε μειωμένο κίνδυνο να αναπτύξει καρκίνο τραχήλου. Και οι δυο ισομορφές mRNA μεταγράφηκαν από το A και το G αλληλίο. Φάνηκε ότι το αλληλίο A έχει μια σχετικά προστατευτική δράση εναντίον της καρκινογένεσης σχετιζόμενης με τον HPV πιθανώς μέσω της αναστολής της κυκλίνης D1b. (91)

Η σημασία των πρωτεϊνών του κυτταρικού κύκλου φάνηκε και στη μελέτη 144 περιστατικών στα οποία χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της ανοσοιστοχημείας έτσι ώστε να δειχθεί ότι ορισμένες πρωτεΐνες μπορούν να βοηθήσουν στη διάκριση μεταξύ καλοήθων και προκαρκινικών βλαβών τραχήλου της μήτρας. Η έκφραση των p16, Ki67, και ProExC (βιοδείκτης που περιέχει αντισώματα για τα μόρια Τοποισομεράση 2A (TOP2A) και MCM2) σχετίστηκε περισσότερο με τη βαρύτητα της δυσπλασίας. Η θετική έκφραση των p16, Ki67 και ProExC και η αρνητική έκφραση της p53 φαίνεται να σχετίζονται με τη λοίμωξη με τον HPV16. Περιστατικά με ιστολογική διάγνωση άτυπης ανώριμης μεταπλασίας επιδεικνύουν ένα ανοσοιστοχημικό μοτίβο περισσότερο συμβατό με βλάβη LSIL παρά με HSIL. Η ανοσοιστοχημική εκτίμηση λοιπόν των πρωτεϊνών του κυτταρικού κύκλου μπορεί να βοηθήσει να διακρίνουμε τις φυσιολογικές και καλοήθειες καταστάσεις του τραχήλου από τις προκαρκινικές τραχηλικές βλάβες. (92)

Η επίδραση της γενετικής ποικιλομορφίας μορίων που εμπλέκονται στο μηχανισμό της ανοσολογικής απάντησης στην ανάπτυξη του καρκίνου του τραχήλου μελετήθηκε σε περίπου 2600 περιστατικά στη Σουηδία. Μελετήθηκαν τα αλληλία για το HLA (αντιγόνο ανθρώπινου λευκοκυττάρου) και 24 ακόμα άλλοι πολυμορφισμοί σε 14 γονίδια λόγω αναφερόμενης στη βιβλιογραφία συσχέτισης με τη λοίμωξη από τον ιό HPV ή με την ανάπτυξη καρκίνου τραχήλου. Παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση του καρκίνου

τραχήλου με διάφορους πολυμορφισμούς για αυτά τα άτομα που έχουν το σπάνιο αλληλίο. Παρέχονται λοιπόν αποδείξεις ως προς την γενετική προδιάθεση για την ανάπτυξη καρκίνου του τραχήλου λόγω ποικιλομορφιών σε γονίδια που εμπλέκονται στην ανοσολογική απάντηση και στον κυτταρικό κύκλο. (93)

Η τεχνική της ανοσοιστοχημείας βοήθησε στη μελέτη σε 400 περιστατικά της σχέσης των πολυμορφισμών του γονιδίου της κυκλίνης D1, CCND1, με την ανάπτυξη του καρκίνου του τραχήλου σε έδαφος λοίμωξης με τον ιό HPV. Τα στοιχεία έδειξαν ότι ο πολυμορφισμός G870A του γονιδίου CCND1 μπορεί να δράσει ως παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη καρκίνου τραχήλου ενώ ο πολυμορφισμός G1722C θα μπορούσε να παίζει προστατευτικό ρόλο ως προς την ανάπτυξη καρκίνου τραχήλου σε έδαφος λοίμωξης με HPV. (94)

Επιπλέον η τεχνική FISH αλλά και η ανοσοιστοχημεία βοήθησαν να αναλυθούν οι γενετικές μεταβολές συγκεκριμένων γονιδίων και η έκφραση κάποιων πρωτεϊνών και δείχτηκε ότι αυτές μπορούν να αλλάζουν το φαινότυπο της βλάβης και να συμβάλουν στην εξέλιξη της νόσου. Η δυσπλασία του τραχήλου ταξινομείται ως CIN I, CIN II και CIN III. Έχει παρατηρηθεί ότι τουλάχιστον στο 60% του CIN I και του CIN II η παθολογία υποστρέφει αυτόματα ενώ περίπου στο 30% επιμένει για 24 μήνες, στο 10% εξελίσσεται σε CIN III και στο 1% εξελίσσεται σε καρκίνωμα τραχήλου. Η αναγνώριση γενετικών αλλαγών είναι ένα βασικό στοιχείο για την κατανόηση της διαδικασίας της καρκινογένεσης αλλά και της ενδεχόμενης επιρρέπειας ορισμένων ασθενών να αναπτύξουν βλάβες οι οποίες έχουν μεγαλύτερα ποσοστά αρνητικής εξέλιξης παρά υποτροφής. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι γενετικές μεταβολές των PIK3CA, ZNF217 και CCND1 σχετίστηκαν με την εξέλιξη του φυσιολογικού ιστού σε CIN I, αυτές των hTERT και ERBB με την εξέλιξη του LSIL σε HSIL, αυτές των hTERT και MYC με την εξέλιξη του CIN II και CIN III σε καρκίνωμα τραχήλου in situ και αυτές των BCL-2 με τα πρώιμα στάδια του in situ καρκίνου τραχήλου. Συμπερασματικά, όσον αφορά στις πρωτεΐνες MYC και CCND1, η έκφρασή τους στα αρχικά στάδια της νόσου συμβάλει στην μετατροπή του φαινοτύπου του κυττάρου. (95)

Η μελέτη τριών άλλων μορίων κατάφερε να συσχετίσει τα επίπεδα τους με τη βαρύτητα της βλάβης του τραχήλου. Αναλύθηκε λοιπόν η προγνωστική αξία τριών δεικτών (Ki-67, c-erbB2 και Cyclin D1) σε περιπτώσεις χαμηλόβαθμης ενδοεπιθηλιακής

αλλοίωσης (CINI), υψηλόβαθμης ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης (CINIΙΙ) και διηθητικού πλακώδους καρκινώματος σε μια ομάδα βιοψιών τραχήλου. Παρατηρήθηκε ότι η έκφραση της κυκλίνης D1 του κυτταροπλάσματος αυξήθηκε με την βαρύτητα της βλάβης ενώ η αντίστοιχη πρωτεΐνη του πυρήνα μειώθηκε με την εξέλιξη της παθολογίας. Η έκφραση της πυρηνικής και κυτταροπλασματικής κυκλίνης D1 φάνηκε να σχετίζονται με τη λοίμωξη με HPV υψηλού κινδύνου. Συνεπώς η έκφραση των μορίων Cyclin D1, cerbB2 και Ki-67 διαφοροποιείται σε συνάρτηση με τη βαρύτητα της βλάβης. (96)

Η έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων και η συσχέτισή τους με τη βαρύτητα της τραχηλικής βλάβης και την ύπαρξη ή όχι υποτύπων HPV υψηλού κινδύνου μελετήθηκε και σε κύτταρα τραχηλικού επιθηλίου που λήφθηκαν με τεστ Παπανικολάου σε γυναίκες με φυσιολογικό επιθήλιο και σε γυναίκες με πλακώδες καρκίνωμα τραχήλου σε έδαφος HPV λοίμωξης. Αυτά μελετήθηκαν ως προς το προφίλ γονιδιακής έκφρασης ούτως ώστε να αξιολογηθεί η βιολογική συμπεριφορά και το κλινικό αποτέλεσμα των τραχηλικών κακοηθειών. Η υπερέκφραση του DNA πολλών γονιδίων μεταξύ των οποίων και αυτού της κυκλίνης D1 (CCND1) ήταν σημαντική σε κύτταρα με πλακώδες καρκίνωμα τραχήλου. Η γονιδιακή έκφραση για 13 γονίδια ήταν μειωμένη στα καρκινικά κύτταρα. Παρατηρηθήκαν μοτίβα γονιδιακής έκφρασης και μονοπάτια σηματοδότησης που επιτρέπουν τη διάκριση μεταξύ καλοήθων κυττάρων πλακώδους τραχηλικού επιθηλίου και κυττάρων πλακώδους καρκινώματος ανεξάρτητα με τη λοίμωξη ή μη από HPV. (97)

Σε μελέτη 50 περιστατικών συγκρίθηκαν τα ποσοστά έκφρασης ορισμένων πρωτεϊνών σε κύτταρα που βρίσκονται σε διαφορετικά στάδια της ενδοεπιθηλιακής τραχηλικής καρκινογένεσης. Η αλληλεπίδραση των ογκοπρωτεϊνών του ιού των ανθρωπίνων θηλωμάτων E6 και E7 με πρωτεΐνες του κυτταρικού κύκλου οδηγεί σε διαταραχές στο μηχανισμό λειτουργίας του και συνεπώς σε αλλαγές στην έκφραση ορισμένων πρωτεϊνών όπως οι p16INK4a, cyclin D1, p53 και Ki67. Έτσι μελετήθηκαν διαφορές στην έκφραση αυτών των πρωτεϊνών κατά τα διάφορα στάδια ενδοεπιθηλιακής καρκινογένεσης του τραχήλου. Η πρωτεΐνη p16INK4a ακολουθούμενη από την Ki67 έδειξε μεγαλύτερη συσχέτιση με την εξέλιξη του καρκίνου από την p53 και την cyclin D1. Συμπερασματικά οι δείκτες αυτοί μπορούν να εφαρμοστούν στην κλινική πράξη ώστε να διαχωρίσουν τους ασθενείς που χρειάζονται μια συντηρητική θεραπευτική αντιμετώπιση από εκείνους που απαιτούν μια πιο επιθετική προσέγγιση. (98)

Το μικροκυτταρικόκαρκίνωμα (SmCC) του τραχήλου της μήτρας είναι σπάνιος όγκος. 9 περιστατικά μικροκυτταρικού καρκινώματος του τραχήλου της μήτρας ως προς την έκφραση συγκεκριμένων πρωτεϊνών και τη σχέση τους με τον ιό HPV. Η γνώση σχετικά με την έκφραση διαφόρων πρωτεϊνών που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο είναι περιορισμένη. Επιλέχθηκαν περιστατικά μικροκυτταρικού καρκινώματος που θεραπεύτηκαν χειρουργικά προς ανοσοιστοχημική χρώση (με νευροενδοκρινικούς δείκτες, την p53, την p16, την p14, και την cyclin D1). Τα αποτελέσματα υποστηρίζουν ότι η πρωτεΐνη p16 αυξάνει την έκφραση της ή συσσωρεύεται στα μικροκυτταρικά καρκινώματα του τραχήλου της μήτρας κάτι που πιθανά οφείλεται σε λοίμωξη με τον HPV. Η απενεργοποίηση της p14 έχει υψηλό επιπολασμό στα SmCCs και τα ποσοστά ανίχνευσης της p53 είναι παρόμοια με άλλους ιστολογικούς τύπους καρκίνων τραχήλου. (99)

Πλέον είναι ευρέως γνωστό ότι η αλληλεπίδραση πρωτεϊνών του ιού HPV όπως η E6 και E7 με πρωτεΐνες του κυττάρου και ιδιαίτερα με αυτές που εμπλέκονται στον κυτταρικό κύκλο επηρεάζουν τη φυσιολογική του λειτουργία και επομένως εμπλέκονται στην διαδικασία της καρκινογένεσης. Το χρονικό διάστημα μεταξύ της λοίμωξης με τον HPV και της διάγνωσης του καρκίνου δείχνει ότι πολλά βήματα όπως και πολλοί παράγοντες μπορεί να είναι απαραίτητοι για την ανάπτυξη καρκίνου του τραχήλου. Η ανάπτυξη και εξέλιξη του τραχηλικού καρκίνου έχει δειχθεί ότι εξαρτώνται από διάφορα γενετικά και επιγενετικά συμβάματα και ειδικότερα μετατροπές στον μηχανισμό ελέγχου του κυτταρικού κύκλου. Στα κύτταρα των θηλαστικών ο έλεγχος του κυτταρικού κύκλου ελέγχεται από τη δραστηριότητα των εξαρτώμενων από τις κυκλίνες κινάσες (CDKs) και από τα απαραίτητα συνένζυμά τους από τα οποία ενεργοποιούνται, τις κυκλίνες. Γενικά οι CDKs, οι κυκλίνες, και οι αναστολείς των CDKs λειτουργούν μέσω διαφόρων μονοπατιών συμπεριλαμβανομένων των p16(INK4A)-cyclinD1-CDK4/6-pRb-E2F, p21(WAF1)- p27(KIP1)-cyclinE-CDK2, και p14(ARF)-MDM2-p53. Τα αποτελέσματα διαφόρων μελετών έδειξαν διαταραγμένη ρύθμιση διαφόρων πρωτεϊνών του κυτταρικού κύκλου όπως οι cyclin D, cyclin E, p16(INK4A), p21(WAF1), και p27(KIP1) σαν χαρακτηριστικό των καρκινωμάτων τραχήλου και των προκαρκινικών βλαβών σε έδαφος λοίμωξης με HPV όπου εκφράζονται οι πρωτεΐνες E6 και E7. Αυτά τα αποτελέσματα ισχυροποιούν τις ενδείξεις ότι οι αλληλεπιδράσεις των ιικών πρωτεϊνών με τις πρωτεΐνες

των κυττάρων του ξενιστή και ειδικά τις πρωτεΐνες του κυτταρικού κύκλου εμπλέκονται στην ενεργοποίηση ή καταστολή της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου στην καρκινογένεση του τραχήλου. (100)

Επιπλέον αναλύθηκε η πρωτεϊνική έκφραση των μορίων του p53 και του ρετινοβλαστώματος σε 28 περιστατικά και συσχετίστηκαν με τις εμμένουσες και τις υποστραφείσες υψηλόβαθμες ενδοεπιθηλιακές βλάβες του τραχήλου σε έδαφος λοίμωξης HPV. Οι περισσότερες υψηλού βαθμού τραχηλικές βλάβες πλακώδους επιθηλίου (HSILs) επιμένουν αλλά περίπου το ένα τρίτο υποστρέφει. Όλες οι βλάβες ήταν θετικές για την πρωτεΐνη p16 και θετικές για υψηλού κινδύνου υπότυπο HPV. Στις εμμένουσες βλάβες HSIL ανιχνεύτηκαν χαμηλότερα επίπεδα p53 και πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος (pRb) στο βαθύτερο μισό του επιθηλίου από τις υποστραφείσες βλάβες HSIL. Οι βλάβες που ήταν θετικές για τον υπότυπο HPV16 αλλά και άλλους υποτύπους είχαν μικρότερα ποσοστά θετικών πυρήνων για τα μόρια pRb, p53, και cyclin D στα εν τω βάθει στρώματα του επιθηλίου. Συμπερασματικά τα περιστατικά με βλάβες HSIL με συνδυασμένη αρνητικότητα ή χαμηλή θετικότητα για την πρωτεΐνη p53 και την pRb στις βιοψίες είναι αρκετά πιθανό να επιμένουν σε αντίθεση με εκείνα στα οποία ένας από αυτούς τους ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου είναι ισχυρά θετικός. (101)

Σε μελέτη που έγινε σε 246 περιστατικά συσχετίστηκε ο πολυμορφισμός A870G της κυκλίνης D1 με τον κίνδυνο για ανάπτυξη καρκίνου τραχήλου. Για την εξέλιξη μιας βλάβης τραχήλου σε διηθητικό καρκίνο του τραχήλου απαιτείται μια πολύπλοκη συσχέτιση μεταξύ ικόν γονιδίων και γονιδίων του κυττάρου ξενιστή ώστε να απορυθμιστεί ο έλεγχος του κυτταρικού κύκλου. Η Cyclin D1 (CCND1) είναι ένας σημαντικός θετικός ρυθμιστής της G1/S φάσης του κυτταρικού κύκλου. Το γονίδιο CCND1 εντοπίζεται στο σημείο 11q13 και συχνά υπόκειται εξαλλαγή στους καρκίνους του ανθρώπινου είδους. Φαίνεται ότι ο πολυμορφισμός A870G του CCND1 θα μπορούσε να δράσει σαν συν-παράγοντας του HPV στην έναρξη της καρκινογένεσης του τραχήλου ειδικά στην ζώνη μετάπτωσης του τραχήλου στις γυναίκες με λοίμωξη HPV, αποτελώντας έτσι απόδειξη για αιτιολογικό γενετικό παράγοντα στο διηθητικό καρκίνο τραχήλου. (102)

Η αλληλεπίδραση της κυκλίνης D1 με τις πρωτεΐνες E6 και E7 των υψηλού κινδύνου ιών HPV και ο ρόλος της στην καρκινογένεση μελετήθηκε και σε κύτταρα ποντικού. Δείχτηκε επίσης ότι οι E6 και E7 του υπότυπου 16 ιού HPV συμπράττουν με το μόριο Erb-2 για να επιφέρουν την κυτταρική μετάπλαση των φυσιολογικών επιθηλιακών κυττάρων του στοματοφάρυγγα του ανθρώπου. Αυτό συνοδεύεται από την υπερέκφραση της κυκλίνης D1 στα κύτταρα αυτά. Αυτές οι αναλύσεις αποκαλύπτουν ότι η κυκλίνη D1 είναι στόχος στο μοριακό μονοπάτι της νεοπλασματικής μετάπλασης που προκαλείται από τη σύμπραξη των E6 και E7 ή των E6,E7 και ErbB-2 στα φυσιολογικά κύτταρα. (103)

Ο σκοπός της μελέτης μια άλλης ομάδας ερευνητών ήταν να αναλύσουν την κλινική συσχέτιση μεταξύ του υπότυπου 16 και 18 του ιού HPV και της έκφρασης των γονιδίων p53, cyclinD1, Ki-67, c-erbB2 και EGFR στα καρκινικά τραχηλικά κύτταρα όπως επίσης και το βαθμό πυρηνικής πλοειδίας τους. Τα δεδομένα δείχνουν ότι η υπερέκφραση του EGFR και η μέτρια έκφραση του Ki-67 φαίνεται να είναι δυσμενείς προγνωστικοί παράγοντες ανεξάρτητα από την παρουσία ή όχι των HPV 16 και 18. (104)

Ένα άλλο μόριο που αξιολογήθηκε με τη βοήθεια της τεχνικής της ανοσοϊστοχημείας (IHC) και αναζητήθηκε η συσχέτιση της έκφρασης του σε ενδοεπιθηλιακές βλάβες πλακώδους επιθηλίου (SIL) με την εξέλιξη της νεοπλασίας του τραχήλου της μήτρας από CIN 1 έως CIN2+ ή της υποτροπής βλάβης CIN2+ είναι η πρωτεΐνη p16. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η υπερέκφραση της πρωτεΐνης p16 σχετίζεται με την εξέλιξη της βλάβης σε CIN2+ αλλά και την υποτροπή της βλάβης CIN2+. Η χρήση της ανοσοχρώσης p16 μπορεί να συμβάλει στη στρωματοποίηση των ασθενών ως ομάδων χαμηλού κινδύνου και υψηλού κινδύνου στην εξέλιξη ή επανεμφάνιση CIN2 +. (105)

Ομάδα βιολογικών δεικτών μεταξύ των οποίων και οι p16 και Ki67 μελετήθηκαν ως προς την έκφραση σε ιστούς με βλάβες από HPV υψηλού κινδύνου όπως οι HPV 16, 18, 31, 33, 35 και 51 έναντι βλαβών που περιέχουν τους τύπους χαμηλού κινδύνου HPV 2, 6 ή 11. Οι περιπτώσεις CIN 1-2 με υποτύπους υψηλού κινδύνου είχαν ισχυρή έκφραση του αυτών όπου κάθε πρωτεΐνη εντοπίστηκε στα κύτταρα της παραβασικής στιβάδας. Η p16 είχε μειωμένη έκφραση στα επιθήλια των βλαβών με τους τύπους HPV χαμηλού κινδύνου. Το Ki67 έδειξε ποικίλη έκφραση. Η ιϊκή πρωτεΐνη L1 του καυιδίου του ιού και το ιικό DNA ήταν εξαιρετικοί δείκτες λοίμωξης στις αλλοιώσεις με τύπους χαμηλού

κινδύνου. Φάνηκε ότι το μόριο p16 δεν είναι μόνο βιοδείκτης λοίμωξης με HPV υψηλού κινδύνου, αλλά μπορεί επίσης να διαφοροποιήσει τέτοιες βλάβες από εκείνες που περιέχουν τύπους HPV χαμηλού κινδύνου. Οι λοιμώξεις με HPV χαμηλού κινδύνου μπορούν να διαφοροποιηθούν καλύτερα με ανίχνευση του ιϊκού καψιδίου L1 ή / και του HPV DNA με in situ υβριδοποίηση. (106)

Το μόριο p16INK4a είναι μια ογκοκατασταλτική πρωτεΐνης και αναστολέας της εξαρτώμενης από την κυκλίνη κινάσης (cdk) ο οποίος εμποδίζει τη μεσολαβούμενη από τα μόρια cdk4 και cdk6 φωσφορυλίωση του μορίου pRb ώστε να αναστείλει τη μεταγραφή του μορίου E2F και την τελικώς την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Επειδή η πρωτεΐνη E7 των HPV υψηλού κινδύνου απενεργοποιεί το pRB, η επακόλουθη υπερέκφραση του p16INK4a είναι ένας σημαντικός δείκτης για τη λοίμωξη με τύπους HPV υψηλού κινδύνου. Η ανοσοχρώση για το p16INK4a επιτρέπει την ακριβή αναγνώριση ακόμη και μικρών αλλοιώσεων CIN. Εκτιμήθηκε λοιπόν η έκφραση της p16INK4a σε βιοψίες του τραχήλου της μήτρας και συγκρίθηκε ο βαθμός νεοπλασίας του τραχήλου της μήτρας ανάλογα με την ένταση της χρώσης. Τα αποτελέσματα έδειξαν μία αυξανόμενη τάση για άνοσο-δραστικότητα για το μόριο p16INK4a από τις καλοήθειες έως του υψηλότερου βαθμού αλλοιώσεις. Υπάρχει σημαντική συσχέτιση της έκφρασης p16INK4a με τον ιστολογική βαθμό της βλάβης του τραχήλου. Η ένταση της χρώσης αυξάνεται αναλογικά με το βαθμό της βλάβης. (107)

Η τεχνική της ανοσοιστοχημείας για το μόριο p16^{INK4a} χρησιμοποιείται ευρέως για τη διάγνωση προκαρκινικών τραχηλικών βλαβών που σχετίζονται με τον ιό HPV. Παρόλο που συνήθως τα αποτελέσματα του p16 είναι σαφώς θετικά ή αρνητικά, ορισμένα είναι διαφορούμενα δηλαδή πληρούν ορισμένες αλλά όχι όλες τις προϋποθέσεις για το μοτίβο του θετικού μπλοκ. Δεν είναι σαφές εάν η διαφορούμενη ανοσοδραστικότητα για το p16 υποδεικνύει ογκογόνο μόλυνση από τον HPV ή κίνδυνο εξέλιξης της βλάβης. Η ακρίβεια της διαφορούμενης ανοσοδραστικότητας για το p16 στην πρόβλεψη της πιθανότητας ογκογόνου λοίμωξης από τον ιό HPV και της βλάβης HSIL είναι σημαντικά χαμηλότερη από εκείνη του μοτίβου του θετικού μπλοκ αλλά μεγαλύτερη από την αρνητική χρώση. (108)

Η γεμινίνη είναι μια πρωτεΐνη που εμπλέκεται στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου. Αξιολογήθηκε η διαγνωστική αξία της έκφρασης της γεμινίνης σε μια ενδοεπιθηλιακή

αλλοίωση του τραχήλου (CIN). Βρέθηκε ότι η θετική προγνωστική αξία και η ακρίβεια της γεμινίνης ήταν υψηλότερες από τις p16 και Ki67. Φάνηκε ότι η γεμινίνη είχε υψηλό βαθμό ευαισθησίας και ειδικότητας στον προσδιορισμό του CIN2/3. Και θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης για να γίνει διάκριση μεταξύ CIN1 και CIN2 / 3. (109)

Σε άλλη μελέτη διερευνήθηκε η αποτελεσματικότητα δύο αντικειμενικών ποσοτικών μεθόδων σε σύγκριση με την οπτική εκτίμηση του ιστικού τεμαχιδίου για την αξιολόγηση μιας ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας δηλαδή η μοριακή ανίχνευση του mRNA του γονιδίου του μορίου p16 και η ανοσοιστοχημική ανάλυση της πρωτεΐνης p16. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η προσθήκη της μοριακής ανίχνευσης του mRNA της p16 στην οπτική ανάγνωση της ανοσοχρώσης για την πρωτεΐνη p16 βελτίωσε την αντικειμενικότητα της μεθόδου. (110)

Το αν οι υψηλόβαθμες ενδοεπιθηλιακές βλάβες του τραχήλου της μήτρας (CIN \geq 2) που προκαλούνται από υπότυπους HPV που δεν περιλαμβάνονται στα εμβόλια μπορεί να εξελιχθούν σε καρκίνο τραχήλου της μήτρας είναι σε μεγάλο βαθμό άγνωστο. Τα συμπεράσματα μελέτης έδειξαν ότι οι βλάβες που μπορεί να αναπτυχθούν εξαιτίας υπότυπων υψηλού κινδύνου που δεν περιλαμβάνονται στα εμβόλια HPV έχουν παρόμοιο κακόηθες δυναμικό, γεγονός που υποδηλώνει ότι χρειάζεται να αναπτυχθούν προγράμματα πληθυσμιακού ελέγχου σε συνδυασμό με μη βασιζόμενες σε εμβόλια στρατηγικές για τη διαχείριση του κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. (111)

Σε άλλη αναδρομική μελέτη αξιολογήθηκε η έκφραση των βιοδεικτών p16INK4a και p53 σε δείγματα κωνοειδούς εκτομής από ασθενείς με υψηλόβαθμη ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία τραχήλου μήτρας και συσχετίστηκαν με την ικανότητα πρόβλεψης της υποτροπής της βλάβης μετά την επέμβαση. Οι δείκτες αυτοί φάνηκε ότι έχουν χαμηλή ευαισθησία και ειδικότητα ως προγνωστικοί δείκτες της υποτροπής της υψηλόβαθμης ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης μετά από θεραπεία κωνοειδούς εκτομής. (112)

Άλλα στατιστικά στοιχεία δείχνουν ότι οι γυναίκες με βλάβες CIN 2+ που είναι θετικές για την ανοσοχρώση της πρωτεΐνης p16 διαγνωσμένες με τυχαία βιοψία είναι μεγαλύτερες σε ηλικία και λιγότερο πιθανό να έχουν τον υπότυπο HPV 16. Εξ'άλλου, η βλάβη CIN διαγνωσμένη με τυχαία βιοψία μπορεί να μην είναι τόσο επιθετική και

προχωρημένη όσο η βλάβη CIN που διαγνώστηκε με βιοψία κατευθυνόμενη με κολποσκόπηση. (113)

Η δοκιμασία για την παρουσία του DNA του HPV είναι ευρέως αποδεκτή για την κατηγοριοποίηση των κυτταρολογικών αποτελεσμάτων κατά Παπανικολάου που ταξινομούνται ως άτυπα πλακώδη κύτταρα αδιευκρίνιστης σημασίας (ASC-US). Αντίθετα, ο έλεγχος του HPV DNA έχει περιορισμένη χρήση στην κατηγοριοποίηση των χαμηλόβαθμων ενδοεπιθηλιακών βλαβών πλακωδών κυττάρων (LSILs) λόγω του ποσοστού επιπολασμού των, > 80%. Σε μεγάλη προοπτική μελέτη αξιολογήθηκαν οι διαγνωστικές επιδόσεις της διπλής ανοσοϊστοχημικής χρώσης p16/Ki-67 στην ταξινόμηση των περιπτώσεων ASC-US και LSIL. Δείχθηκε η υψηλή θετική προγνωστική αξία της δοκιμασίας της διπλής ανοσοχρώσης για την παρουσία υψηλόβαθμης CIN αλλοίωσης η οποία μπορεί να βοηθήσει στη μείωση του αριθμού των περιπτώσεων κολποσκοπήσεων. (114)

Όσον αφορά στην έκφραση της πρωτεΐνης p16INK4a στις αλλοιώσεις CIN1 σε σχέση με τις CIN2/3 φαίνεται ότι η βλάβη CIN1 που είναι θετική για τη χρώση p16INK4a συσχετίστηκε με την εξέλιξη της βλάβης, αλλά η ευαισθησία δεν ήταν αρκετά υψηλή. Ωστόσο, η αρνητική προγνωστική αξία ήταν αρκετά πιο σημαντική και έτσι δείχνεται ότι η p16 INK4a μπορεί να αντιπροσωπεύει ένα χρήσιμο βιοδείκτη που μπορεί να αναγνωρίσει τις αλλοιώσεις CIN1 που χρειάζονται ιδιαίτερη προσοχή και έχουν ένα πιο επιθετικό δυναμικό. (115)

Η αυξημένη διαγνωστική ακρίβεια της πρωτεΐνης p16INK4a διαφαίνεται και όταν υπάρχει ασυμφωνία μεταξύ των παθολογοανατόμων. Πολλές φορές η μορφολογική αξιολόγηση των βλαβών είναι υποκειμενική και υπάρχουν χαμηλά ποσοστά συμφωνίας μεταξύ των παρατηρητών. Η προσθήκη της ανοσοχρώσης για την p16 (INK4a) μπορεί να βελτιώσει την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Φαίνεται ότι υπάρχουν αυξημένα ποσοστά συμφωνίας μεταξύ των παθολογοανατόμων όσον αφορά στη διάγνωση του CIN2 + με τη συνδυασμένη χρήση της χρώσης αιματοξιλίνης/ηωσίνης με την ανοσοχρώση για την p16 (INK4a) σε σύγκριση με τη χρήση μόνο αιματοξιλίνης/ηωσίνης. (116)

Η κλινική και προγνωστική σημασία όμως της έκφρασης της πρωτεΐνης p16 φαίνεται και σε ασθενείς με καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Η υπερέκφραση του p16INK4a που παρατηρείται στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας συνδέεται με αυξημένη

συνολική επιβίωση και επιβίωση άνευ νόσου και ως εκ τούτου σηματοδοτεί μια καλύτερη πρόγνωση. (117,118)

Συμπερασματικά η εκτενής ανάλυση των επιλεγέντων συνεξεταζόμενων πρωτεϊνικών δεικτών **p16/cyclinD1/p53/MDM2** κατέδειξε ότι η υπερέκφραση της κυκλίνης D1 παρατηρείται σε ένα υποσύνολο ενδοεπιθηλιακών αλλοιώσεων οι οποίες αναπτύσσονται σε έδαφος εμμένουσας λοίμωξης με υψηλού κινδύνου στελέχη του ιού HPV. (96,103) Παρόλο που η κατηγοριοποίηση SIL και CIN φαίνεται να μην επηρεάζεται από τα επίπεδα έκφρασης της κυκλίνης D1, οι μηχανισμοί απορρύθμισης της έκφρασης του γονιδίου φαίνεται να είναι ένα πολλά υποσχόμενο πεδίο μοριακής μελέτης για τη διάκριση ειδικών γενετικών χαρακτηριστικών ανάλογα με τον τύπο της αρχόμενης νεοπλασματικής βλάβης του τραχήλου. Η υπερέκφραση του μορίου p53 και ειδικά του MDM2 παρατηρείται σε ένα υποσύνολο ενδοεπιθηλιακών βλαβών στα τραχηλικά κύτταρα ξενιστές ιών HPV υψηλού κινδύνου.(73,101,104) Η κατηγοριοποίηση SIL και CIN φαίνεται να σχετίζεται έντονα με τα επίπεδα έκφρασης του μορίου p53 αλλά όχι με αυτά του MDM2. Επιπλέον η υπερέκφραση της πρωτεΐνης p16 φαίνεται να συνιστά ένα σημαντικό και χρήσιμο βιοδείκτη για την αξιολόγηση της εξέλιξης των βλαβών SIL/CIN. (115,118)

6. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η πλειονότητα των προσβολών του κολποτραχηλικού επιθηλίου από τον ιο του ανθρώπινου θηλώματος (Human Papilloma Virus-HPV) χαρακτηρίζονται ασυμπτωματικές με τάση υποστροφής, ενώ η δημιουργία εμφανών κυτταρομορφολογικών αλλοιώσεων (κοιλοκύτταρα) στο τεστ ΠΑΠ εκτείνεται σε ένα διάστημα από 3 εβδομάδες έως 9 μήνες μετά την ενσφήνωση του ιού στο κολποτραχηλικό επιθήλιο. Η ενσωμάτωση –σε αντίθεση με την απλή επισωματική προσβολή- των υψηλής επικινδυνότητας υπότυπων του ιού HPV στο DNA των κυττάρων του ξενιστή τροποποιεί τα επιθηλιακά κύτταρα με την απενεργοποίηση των ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών p53 και Rb (5,9,22). Κατά την HPV προσβολή του τραχηλικού συστήματος, η υπερέκφραση της πρωτεΐνης p16 πραγματοποιείται μέσω της ενεργοποίησης του E7 γονιδίου που οδηγεί σε αποσυγχρονισμό του Rb και του E2F μεταγραφικού παράγοντα. (11) Ο αποσυγχρονισμός του κυτταρικού κύκλου κατά την εμμένουσα High Risk HPV προσβολή του κολποτραχηλικού επιθηλίου εμπλέκει εκτός των προαναφερθέντων και τα μόρια cyclinD1 και MDM2, καθώς παρατηρείται διαταραχή στην έκφραση τους στα εν λόγω επιθήλια και αποτελεί νέο πεδίο έρευνας ειδικά για τα δίπολα p16/cyclinD1 και p53/MDM2. (23,26,56,58,59,82,85,103) Το εν λόγω ερευνητικό πρωτόκολλο σχεδιάστηκε με γνώμονα τη διερεύνηση του ρόλου της απορρύθμισης των πρωτεϊνών p16/cyclinD1/p53/MDM2 στο κολποτραχηλικό επιθήλιο κατά την προσβολή του από τον ιο των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV) με βάση τα επίπεδα της έκφρασής τους σε παθολογικά κολποτραχηλικά επιχρίσματα. Όλοι οι εξεταζόμενοι πρωτεϊνικοί δείκτες εμφάνισαν διαφορετική έκφραση επί των εξεταζόμενων ανοσοχρωσμένων πλακιδίων (υπερέκφραση ως υψηλή και μέτρια ένταση χρώσης καθώς και χαμηλή). Υπερέκφραση της **p53** παρατηρήθηκε σε 13/80 (16.25%), της **MDM2** σε 27/80 (33.75%) της **cyclin D1** σε 8/80 (10%) και της **p16^{INK4}** σε 9/80 (11.25%).

7. ABSTRACT (SUMMARY)

Human papillomavirus (HPV) involvement in cervical carcinogenesis represents a classical template of analyzing viral-mediated carcinogenesis. High Risk (HR) HPV subtypes cause initially a simple (episomal) penetration in target host cells. Persistent HR-HPV infection leads to an HPV-DNA integration into the host cell genome resulting to an aberrant oncogene E6/E7 expression. MDM2, a proto-oncogene encoding for a nuclear-localized E3 ubiquitin ligase, acts as a major negative regulator in p53-MDM2 auto-regulatory pathway. MDM2 directly binds to p53 and represses its transcriptional activity and promotes p53 proteasomal degradation. Our aim was to investigate the role of abnormal p53/MDM2 protein co-expression in HPV-mediated cervical squamous intraepithelial lesions (SIL) and also the role of abnormal Cyclin D1 in them combined with p16^{INK4A} expression. Eighty (n=80) cases characterized as SILs and also borderline ones with molecularly proven HPV infection were examined. Using liquid-based cytology, we constructed ten (n=10) slides each containing eight (n=8) cell spots. Immunocytochemistry (ICC) was performed using anti-Cyclin D1/MDM2/p16/p53 antibodies. Digital image analysis was also implemented for evaluating objectively the protein expression levels on the corresponding stained slides. Cyclin D1 protein over expression was observed in 8/80 (10%) cell spots, whereas low expression rates were detected in 72/80 (90%) cases. Cyclin D1 expression was strongly associated with the HPV type group (HR-HPV) (p=0.001) and borderline with the Cervical Intraepithelial Neoplasia (CIN) categorization (p=0.06). Concerning the influence of marker's protein expression in SIL categorization, no statistical significance was identified (p=0.10). Cyclin D1 overexpression is observed in a sub set of SILs developed by HR-HPV persistent infection. Although SIL and CIN categorization seem to be not influenced by Cyclin D1 expression levels, mechanisms of gene's deregulation should be a promising molecular target for discriminating specific genetic signatures in the corresponding initial cervical neoplastic lesions. P53 and especially MDM2 over expression is observed in a sub set of SILs developed by HR-HPV persistent infection in cervical epithelial host cells. SIL and CIN categorization seem to be strongly influenced by p53 expression

levels, but not by MDM2 aberrant expression. p16 overexpression also represents a significant and useful biomarker for evaluating progression of SILs/CINs.

8. ΑΡΘΡΟΓΡΑΦΙΑ-BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ (REFERENCES)

1. Μαιευτική και Γυναικολογία Εκδ. Broken Hill Publishers LTD 2018 Συγγραφείς: Δ.Λουτράδης, Ε.Δεληγεώρογλου, Ν.Παπαντωνίου
2. La colposcopie Techniques et diagnostics Εκδ. Elsevier Masson 2012 Συγγραφείς: J.Marchetta, P.Deschamps
3. Σύγχρονη Γυναικολογία και Μαιευτική Τόμος 1 Εκδ. Π.Χ. ΠΑΣΧΑΛΙΔΗΣ 2009 Συγγραφέας: Γ.Κρεατσάς
4. Cuschieri K, Ronco G, Lorincz A, et al. Eurogin roadmap 2017: Triage strategies for the management of HPV-positive women in cervical screening programs. *Int J Cancer*. 2018;143(4). doi:10.1002/ijc.31261
5. Ruttkay-nedecky B, Jimenez Jimenez AM, Nejdil L, et al. Relevance of infection with human papillomavirus: The role of the p53 tumor suppressor protein and E6/E7 zinc finger proteins (Review). *Int J Oncol*. 2013;43(6):1754-1762. doi:10.3892/ijo.2013.2105
6. Zhang R, Ge X, You K, et al. p16/Ki67 dual staining improves the detection specificity of high-grade cervical lesions. *J Obstet Gynaecol Res*. 2018;44(11):2077-2084. doi:10.1111/jog.13760
7. Eklund C, Forslund O, Wallin KL, Dillner J. Global improvement in genotyping of human papillomavirus DNA: The 2011 HPV LabNet international proficiency study. *J Clin Microbiol*. 2014. doi:10.1128/JCM.02453-13
8. Valdez M, Jeronimo J, Bansil P, et al. Effectiveness of novel, lower cost molecular human papillomavirus-based tests for cervical cancer screening in rural China. *Int J Cancer*. 2016;138(6). doi:10.1002/ijc.29877
9. Bergeron C, von Knebel Doeberitz M. The Role of Cytology in the 21st Century: The Integration of Cells and Molecules. *Acta Cytol*. 2016;60(6):540-542. doi:10.1159/000449402

10. Wang H, Kim H, Park KH. Diagnostic performance of the E6/E7 mRNA-based OPTIMYGENE HR-HPV RT-qDx assay for cervical cancer screening. *Int J Infect Dis*. September 2018. doi:10.1016/j.ijid.2018.09.014
11. Shi L, Han F, Shi C, Huang Y, Liu Y, Chang X. Immunohistochemical detection of E7 human papillomavirus protein in pre-malignant and malignant lesions of the uterine cervix. *Mol Med Rep*. 2018;18(4):3949-3956. doi:10.3892/mmr.2018.9416
12. Ren C, Zhu Y, Yang L, Zhang X, Liu L, Ren C. Diagnostic performance of HPV E6/E7 mRNA assay for detection of cervical high-grade intraepithelial neoplasia and cancer among women with ASCUS Papanicolaou smears. *Arch Gynecol Obstet*. 2018;297(2):425-432. doi:10.1007/s00404-017-4588-1
13. Yang L, Zhu Y, Bai Y, Zhang X, Ren C. The clinical application of HPV E6/E7 mRNA testing in triaging women with atypical squamous cells of undetermined significance or low-grade squamous intra-epithelial lesion Pap smear: A meta-analysis. *J Cancer Res Ther*. 2017;13(4):613. doi:10.4103/jcrt.JCRT_56_17
14. Maggino T, Sciarrone R, Murer B, et al. Screening women for cervical cancer carcinoma with a HPV mRNA test: first results from the Venice pilot program. *Br J Cancer*. 2016;115(5):525-532. doi:10.1038/bjc.2016.216
15. Han L, Husaiyin S, Zhao F, Rezhake R, Niyazi M. Clinical Value of Human Papillomavirus E6/E7 mRNA Detection in Screening for Cervical Cancer in Women Positive for Human Papillomavirus DNA or. *Clin Lab*. 2018;64(09/2018):1363-1371. doi:10.7754/Clin.Lab.2018.180138
16. Forslund O, Miriam Elfström K, Lamin H, Dillner J. HPV-mRNA and HPV-DNA detection in samples taken up to seven years before severe dysplasia of cervix uteri. *Int J Cancer*. October 2018. doi:10.1002/ijc.31819
17. Wu M-Z, Li W-N, Cha N, et al. Diagnostic Utility of HPV16 E6 mRNA or E7 mRNA Quantitative Expression for Cervical Cells of Patients with Dysplasia and Carcinoma. *Cell Transplant*. 2018;27(9):1401-1406. doi:10.1177/0963689718788521
18. Liu S, Minaguchi T, Lachkar B, et al. Separate analysis of human papillomavirus E6 and E7 messenger RNAs to predict cervical neoplasia progression. Tornesello ML, ed. *PLoS One*. 2018;13(2):e0193061. doi:10.1371/journal.pone.0193061

19. Bruno MT, Ferrara M, Fava V, Barrasso G, Panella MM. A prospective study of women with ASCUS or LSIL pap smears at baseline and HPV E6/E7 mRNA positive: a 3-year follow-up. *Epidemiol Infect.* 2018;146(05):612-618. doi:10.1017/S0950268818000250
20. McBride AA. The Papillomavirus E2 proteins. *Virology.* 2013;445(1-2):57-79. doi:10.1016/j.virol.2013.06.006
21. Graham S V., Faizo AAA. Control of human papillomavirus gene expression by alternative splicing. *Virus Res.* 2017;231:83-95. doi:10.1016/j.virusres.2016.11.016
22. Klymenko T, Graham SV. Human papillomavirus gene expression is controlled by host cell splicing factors. *Biochem Soc Trans.* 2012;40(4):773-777. doi:10.1042/BST20120079
23. Pinidis P, Tsikouras P, Iatrakis G, et al. Human Papilloma Virus' Life Cycle and Carcinogenesis. *Mædica.* 2016;11(1):48. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5394500/>. Accessed November 21, 2018.
24. Arora R, Chang Y, Moore PS. MCV and Merkel cell carcinoma: A molecular success story. *Curr Opin Virol.* 2012;2(4):489-498. doi:10.1016/j.coviro.2012.05.007
25. Moore PS, Chang Y. *Timeline | Some Major Discoveries and Events during the First Century of Tumour Virology.*; 2010. doi:10.1038/nrc2961
26. Egawa N, Egawa K, Griffin H, Doorbar J. Human papillomaviruses; Epithelial tropisms, and the development of neoplasia. *Viruses.* 2015;7(7):3863-3890. doi:10.3390/v7072802
27. Model organisms in inflammation and cancer - Βιβλία Google. <https://books.google.gr>. Accessed February 26, 2020.
28. Ruttkay-nedecky B, Jimenez Jimenez AM, Nejdil L, et al. Relevance of infection with human papillomavirus: The role of the p53 tumor suppressor protein and E6/E7 zinc finger proteins (Review). *Int J Oncol.* 2013;43(6):1754-1762. doi:10.3892/ijo.2013.2105
29. DNA Replication, Recombination, and Repair: Molecular Mechanisms and

- Pathology - Βιβλία Google. <https://books.google.gr>. Accessed February 26, 2020.
30. Graham S V. Keratinocyte differentiation-dependent human papillomavirus gene regulation. *Viruses*. 2017;9(9). doi:10.3390/v9090245
 31. Reinson T, Henno L, Toots M, Ustav M, Ustav M. The Cell Cycle Timing of Human Papillomavirus DNA Replication. Zheng Z-M, ed. *PLoS One*. 2015;10(7):e0131675. doi:10.1371/journal.pone.0131675
 32. Kajitani N, Satsuka A, Kawate A, Sakai H. Productive lifecycle of human papillomaviruses that depends upon squamous epithelial differentiation. *Front Microbiol*. 2012;3(APR):152. doi:10.3389/fmicb.2012.00152
 33. Doorbar J, Quint W, Banks L, et al. The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses. *Vaccine*. 2012;30:F55-F70. doi:10.1016/J.VACCINE.2012.06.083
 34. Martínez-Ramírez I, Carrillo-García A, Contreras-Paredes A, Ortiz-Sánchez E, Cruz-Gregorio A, Lizano M. Regulation of Cellular Metabolism by High-Risk Human Papillomaviruses. *Int J Mol Sci*. 2018;19(7). doi:10.3390/ijms19071839
 35. Ribas V, García-Ruiz C, Fernández-Checa JC. Mitochondria, cholesterol and cancer cell metabolism. *Clin Transl Med*. 2016;5(1):22. doi:10.1186/s40169-016-0106-5
 36. Woo HJ, Kim SJ, Song KJ, et al. Hypermethylation of the tumor-suppressor cell adhesion molecule 1 in human papillomavirus-transformed cervical carcinoma cells. *Int J Oncol*. 2015;46(6):2656-2662. doi:10.3892/ijo.2015.2945
 37. McFarlane M, MacDonald AI, Stevenson A, Graham S V. Human Papillomavirus 16 Oncoprotein Expression Is Controlled by the Cellular Splicing Factor SRSF2 (SC35). Imperiale MJ, ed. *J Virol*. 2015;89(10):5276-5287. doi:10.1128/JVI.03434-14
 38. Kitajima S, Takahashi C. Intersection of retinoblastoma tumor suppressor function, stem cells, metabolism, and inflammation. *Cancer Sci*. 2017;108(9):1726-1731. doi:10.1111/cas.13312
 39. Litwin T, Clarke M, Dean M, Wentzensen N. Somatic Host Cell Alterations in HPV Carcinogenesis. *Viruses*. 2017;9(8):206. doi:10.3390/v9080206
 40. Ribeiro J, Sousa H. MicroRNAs as biomarkers of cervical cancer development: a

- literature review on miR-125b and miR-34a. *Mol Biol Rep.* 2014;41(3):1525-1531. doi:10.1007/s11033-013-2998-0
41. Ramirez N, Guerra F, Camporeale G, et al. Expressions of E2 and E7-HPV16 proteins in pre-malignant and malignant lesions of the uterine cervix. *Biotech Histochem.* 2015;90(8):573-580. doi:10.3109/10520295.2015.1047794
 42. Eckhardt M, Zhang W, Gross AM, et al. Multiple Routes to Oncogenesis Are Promoted by the Human Papillomavirus–Host Protein Network. *Cancer Discov.* 2018;8(11):1474-1489. doi:10.1158/2159-8290.CD-17-1018
 43. Georgescu SR, Mitran CI, Mitran MI, et al. New Insights in the Pathogenesis of HPV Infection and the Associated Carcinogenic Processes: The Role of Chronic Inflammation and Oxidative Stress. *J Immunol Res.* 2018;2018:5315816. doi:10.1155/2018/5315816
 44. Yuan C-H, Filippova M, Duerksen-Hughes P. Modulation of Apoptotic Pathways by Human Papillomaviruses (HPV): Mechanisms and Implications for Therapy. *Viruses.* 2012;4(12):3831-3850. doi:10.3390/v4123831
 45. Jave-Suárez LF, Ratkovich-González S, Olimón-Andalón V, Aguilar-Lemarroy A. [Apoptosis modulation by human papillomavirus]. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* 2015;53 Suppl 2:S200-5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26462517>. Accessed February 13, 2019.
 46. Garnett TO, Duerksen-Hughes PJ. Modulation of apoptosis by human papillomavirus (HPV) oncoproteins. *Arch Virol.* 2006;151(12):2321-2335. doi:10.1007/s00705-006-0821-0
 47. Qin Z -l., Zheng X -x., Xu Y -h. Increased Angiogenesis and Decreased Programmed Cell Death Increases the Risk of Uterine Cervical Cancer. *Drug Res (Stuttg).* 2014;65(10):535-539. doi:10.1055/s-0034-1390459
 48. Adler DH, Wallace M, Bennie T, et al. Cumulative Impact of HIV and Multiple Concurrent Human Papillomavirus Infections on the Risk of Cervical Dysplasia. *Adv Virol.* 2016;2016. doi:10.1155/2016/7310894
 49. Tornesello ML, Buonaguro L, Giorgi-Rossi P, Buonaguro FM. Viral and Cellular Biomarkers in the Diagnosis of Cervical Intraepithelial Neoplasia and Cancer. *Biomed Res Int.* 2013;2013:1-10. doi:10.1155/2013/519619

50. Wang F, Li B, Xie X. The roles and clinical significance of microRNAs in cervical cancer. *Histol Histopathol.* 2016;31(2):131-139. doi:10.14670/HH-11-666
51. Yemelyanova A, Gravitt PE, Ronnett BM, et al. Immunohistochemical detection of human papillomavirus capsid proteins L1 and L2 in squamous intraepithelial lesions: potential utility in diagnosis and management. *Mod Pathol.* 2013;26(2):268-274. doi:10.1038/modpathol.2012.156
52. Valenti G, Vitale SG, Tropea A, Biondi A, Laganà AS. Tumor markers of uterine cervical cancer: A new scenario to guide surgical practice? *Updates Surg.* 2017;69(4):441-449. doi:10.1007/s13304-017-0491-3
53. Martínez-Ramírez I, Carrillo-García A, Contreras-Paredes A, Ortiz-Sánchez E, Cruz-Gregorio A, Lizano M. Regulation of cellular metabolism by high-risk human papillomaviruses. *Int J Mol Sci.* 2018;19(7). doi:10.3390/ijms19071839
54. Carrasco-Garcia E, Moreno M, Moreno-Cugnon L, Matheu A. Increased Arf/p53 activity in stem cells, aging and cancer. *Aging Cell.* 2017;16(2):219-225. doi:10.1111/accel.12574
55. Saha B, Adhikary A, Ray P, et al. Restoration of tumor suppressor p53 by differentially regulating pro- and anti-p53 networks in HPV-18-infected cervical cancer cells. *Oncogene.* 2012;31(2):173-186. doi:10.1038/onc.2011.234
56. Chen J, Wang J, Pang L, Zhu W. Inhibiting mechanism of small molecule toward the p53-MDM2 interaction: A molecular dynamic exploration. *Chem Biol Drug Des.* 2018;92(4):1763-1777. doi:10.1111/cbdd.13345
57. Ribeiro C, Rodrigues C, Moreira R, Santos M. Chemical Variations on the p53 Reactivation Theme. *Pharmaceuticals.* 2016;9(2):25. doi:10.3390/ph9020025
58. Shangary S, Wang S. Targeting the MDM2-p53 interaction for cancer therapy. *Clin Cancer Res.* 2008;14(17):5318-5324. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-5136
59. Polański R, Warburton HE, Ray-Sinha A, et al. MDM2 promotes cell motility and invasiveness through a RING-finger independent mechanism. *FEBS Lett.* 2010;584(22):4695-4702. doi:10.1016/j.febslet.2010.10.049
60. Peurala E, Koivunen P, Haapasaari K-M, Bloigu R, Jukkola-Vuorinen A. The prognostic significance and value of cyclin D1, CDK4 and p16 in human breast

- cancer. *Breast Cancer Res.* 2013;15(1):R5. doi:10.1186/bcr3376
61. Portari EA, Russomano FB, de Camargo MJ, et al. Immunohistochemical Expression of Cyclin D1, p16Ink4a, p21WAF1, and Ki-67 Correlates With the Severity of Cervical Neoplasia. *Int J Gynecol Pathol.* 2013;32(5):501-508. doi:10.1097/PGP.0b013e31826f5cf6
62. Wang P, Liu S, Cheng B, et al. [Expression of cyclin D1 in cervical intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma and its relationship with HPV16 E7 gene]. *Zhonghua bing li xue za zhi = Chinese J Pathol.* 2015;44(12):884-888. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26888506>. Accessed November 11, 2018.
63. Serra S, Chetty R. p16. *J Clin Pathol.* 2018;71(10):853-858. doi:10.1136/jclinpath-2018-20521
64. Barr JA, Hayes KE, Brownmiller T, et al. Long non-coding RNA FAM83H-AS1 is regulated by human papillomavirus 16 E6 independently of p53 in cervical cancer cells. *Sci Rep.* 2019;9(1):3662. doi:10.1038/s41598-019-40094-8
65. 60. Ghosh D, Roy AK, Murmu N, Mandal S, Roy A. Risk Categorization with Different Grades of Cervical Pre-Neoplastic Lesions - High Risk HPV Associations and Expression of p53 and RAR β . *Asian Pac J Cancer Prev.* 2019;20(2):549-555. doi:10.31557/APJCP.2019.20.2.549
66. Wang X, Huang X, Zhang Y. Involvement of human papillomaviruses in cervical cancer. *Front Microbiol.* 2018;9(NOV). doi:10.3389/fmicb.2018.02896
67. Kuguyo O, Tsikai N, Thomford NE, et al. Genetic susceptibility for cervical cancer in African populations: What are the host genetic drivers? *Omi A J Integr Biol.* 2018;22(7):468-483. doi:10.1089/omi.2018.0075
68. Kumar A, Kuhn LT, Balbach J. A Cu²⁺ complex induces the aggregation of human papillomavirus oncoprotein E6 and stabilizes p53. *FEBS J.* 2018;285(16):3013-3025. doi:10.1111/febs.14591
69. Missaoui N, Mestiri S, Bdioui A, et al. HPV infection and p16INK4A and TP53 expression in rare cancers of the uterine cervix. *Pathol Res Pract.* 2018;214(4):498-506. doi:10.1016/j.prp.2018.03.004
70. Jin Y, Kim SC, Kim HJ, Ju W, Kim YH, Kim HJ. Use of protein-based

- biomarkers of exfoliated cervical cells for primary screening of cervical cancer. *Arch Pharm Res.* 2018;41(4):438-449. doi:10.1007/s12272-018-1015-5
71. Eldakhakhny S, Zhou Q, Crosbie EJ, Sayan BS. Human papillomavirus E7 induces p63 expression to modulate DNA damage response article. *Cell Death Dis.* 2018;9(2):127. doi:10.1038/s41419-017-0149-6
 72. Lahsen AO, Baba H, Bensghir R, et al. TP53 R72P Polymorphism and Susceptibility to Human Papillomavirus Infection Among Women With Human Immunodeficiency Virus in Morocco: A Case-control Study. *J cancer Prev.* 2017;22(4):248-253. doi:10.15430/JCP.2017.22.4.248
 73. Stiasny A, Freier CP, Kuhn C, et al. The involvement of E6, p53, p16, MDM2 and Gal-3 in the clinical outcome of patients with cervical cancer. *Oncol Lett.* 2017;14(4):4467-4476. doi:10.3892/ol.2017.6752
 74. Wilting SM, Steenbergen RDM. Molecular events leading to HPV-induced high grade neoplasia. *Papillomavirus Res.* 2016;2:85-88. doi:10.1016/j.pvr.2016.04.003
 75. Khattak F, Haseeb M, Fazal S, Bhatti AI, Ullah M. Mathematical modeling of E6-p53 interactions in cervical cancer. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 2017;18(4):1057-1061. doi:10.22034/APJCP.2017.18.4.1057
 76. Barillari G, Palladino C, Bacigalupo I, Leone P, Falchi M, Ensoli B. Entrance of the tat protein of HIV-1 into human uterine cervical carcinoma cells causes upregulation of HPV-E6 expression and a decrease in p53 protein levels. *Oncol Lett.* 2016;12(4):2389-2394. doi:10.3892/ol.2016.4921
 77. Immunohistochemical Evaluation of E6/E7 HPV Oncoproteins Staining in Cervical Cancer. - PubMed - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Immunohistochemical+Evaluation+of+E6%2FE7+HPV+Oncoproteins>. Accessed February 27, 2020.
 78. Freier CP, Stiasny A, Kuhn C, et al. Immunohistochemical evaluation of the role of p53 mutation in cervical cancer: Ser-20 p53-mutant correlates with better prognosis. In: *Anticancer Research.* Vol 36. International Institute of Anticancer Research; 2016:3131-3137.
 79. DasGupta T, Nweze EI, Yue H, et al. Human papillomavirus oncogenic E6

- protein regulates human β -defensin 3 (hBD3) expression via the tumor suppressor protein p53. *Oncotarget*. 2016;7(19):27430-27444. doi:10.18632/oncotarget.8443
80. Piao J, You K, Guo Y, Zhang Y, Li Z, Geng L. HPV16 E6 mutations and p53 codon72 polymorphism among women with cervical intraepithelial neoplasia 2 and 3 in China. *Eur J Gynaecol Oncol*. 37(5):649-652. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29787003>. Accessed February 20, 2020.
 81. Carleton C, Hoang L, Sah S, et al. A detailed immunohistochemical analysis of a large series of cervical and vaginal gastric-type adenocarcinomas. *Am J Surg Pathol*. 2016;40(5):636-644. doi:10.1097/PAS.0000000000000578
 82. Tripathi R, Rath G, Jawanjal P, Bharadwaj M, Mehrotra R. \leq Cyclin D1 protein affecting global women's health by regulating HPV mediated adenocarcinoma of the uterine cervix. *Sci Rep*. 2019;9(1):5019. doi:10.1038/s41598-019-41394-9
 83. Xiong Y, Li T, Assani G, et al. Ribociclib, a selective cyclin D kinase 4/6 inhibitor, inhibits proliferation and induces apoptosis of human cervical cancer in vitro and in vivo. *Biomed Pharmacother*. 2019;112:108602. doi:10.1016/j.biopha.2019.108602
 84. Tilborghs S, Corthouts J, Verhoeven Y, et al. The role of Nuclear Factor-kappa B signaling in human cervical cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2017;120:141-150. doi:10.1016/j.critrevonc.2017.11.001
 85. Tong R, Yang Q, Wang C, Bi F, Jiang B. OVCA1 expression and its correlation with the expression levels of cyclin D1 and p16 in cervical cancer and intraepithelial neoplasia. *Oncol Lett*. 2017;13(5):2929-2936. doi:10.3892/ol.2017.5848
 86. Li Y, Xiao S, Dan L, Xue M. P16INK4A is required for cisplatin resistance in cervical carcinoma SiHa cells. *Oncol Lett*. 2015;9(3):1104-1108. doi:10.3892/ol.2014.2814
 87. Chang MS, Oh S, Jung EJ, et al. High-risk human papillomavirus load and biomarkers in cervical intraepithelial neoplasia and cancer. *APMIS*. 2014;122(5):427-436. doi:10.1111/apm.12163
 88. Portari EA, Russomano FB, de Camargo MJ, et al. Immunohistochemical expression of cyclin D1, p16Ink4a, p21WAF1, and Ki-67 correlates with the

- severity of cervical neoplasia. *Int J Gynecol Pathol.* 2013;32(5):501-508. doi:10.1097/PGP.0b013e31826f5cf6
89. Balan R, Caruntu I-D, Amalinei C. The Immunohistochemical Assessment of HPV Related Adenocarcinoma: Pathologic and Clinical Prognostic Significance. *Curr Pharm Des.* 2013;19(8):1430-1438. doi:10.2174/1381612811319080010
90. Conesa-Zamora P. Role of cell cycle biomarkers in human papillomavirus related uterine lesions. *Curr Pharm Des.* 2013;19(8):1412-1424. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23016774>. Accessed February 20, 2020.
91. Wang N, Qian X, Wang S, et al. CCND1 rs9344 polymorphisms are associated with the genetic susceptibility to cervical cancer in Chinese population. *Mol Carcinog.* 2012;51(2):196-205. doi:10.1002/mc.20801
92. Conesa-Zamora P, Doménech-Peris A, Orantes-Casado FJ, et al. Effect of human papillomavirus on cell cycle-related proteins p16, Ki-67, Cyclin D1, p53, and ProEx C in precursor lesions of cervical carcinoma: a tissue microarray study. *Am J Clin Pathol.* 2009;132(3):378-390. doi:10.1309/AJCPO0WY1VIFCYDC
93. Castro FA, Haimila K, Sareneva I, et al. Association of HLA-DRB1, interleukin-6 and cyclin D1 polymorphisms with cervical cancer in the Swedish population--a candidate gene approach. *Int J cancer.* 2009;125(8):1851-1858. doi:10.1002/ijc.24529
94. Thakur N, Hussain S, Kohaar I, et al. Genetic variant of CCND1: association with HPV-mediated cervical cancer in Indian population. *Biomarkers.* 2009;14(4):219-225. doi:10.1080/13547500902825274
95. Costa C, Espinet B, Molina MA, et al. Analysis of gene status in cervical dysplastic lesions and squamous cell carcinoma using tissue microarrays. *Histol Histopathol.* 2009;24(7):821-829. doi:10.14670/HH-24.821
96. Carreras R, Alameda F, Mancebo G, et al. A study of Ki-67, c-erbB2 and cyclin D-1 expression in CIN-I, CIN-III and squamous cell carcinoma of the cervix. *Histol Histopathol.* 2007;22(6):587-592. doi:10.14670/HH-22.587
97. Manavi M, Hudelist G, Fink-Retter A, Gschwandtler-Kaulich D, Pischinger K, Czerwenka K. Gene profiling in Pap-cell smears of high-risk human papillomavirus-positive squamous cervical carcinoma. *Gynecol Oncol.*

- 2007;105(2):418-426. doi:10.1016/j.ygyno.2006.12.032
98. Queiroz C, Silva TC, Alves VAF, et al. Comparative study of the expression of cellular cycle proteins in cervical intraepithelial lesions. *Pathol Res Pract.* 2006;202(10):731-737. doi:10.1016/j.prp.2006.07.003
99. Horn L-C, Lindner K, Szepankiewicz G, et al. p16, p14, p53, and Cyclin D1 Expression and HPV Analysis in Small Cell Carcinomas of the Uterine Cervix. *Int J Gynecol Pathol.* 2006;25(2):182-186. doi:10.1097/01.pgp.0000185406.85685.df
100.
Kim YT, Zhao M. Aberrant cell cycle regulation in cervical carcinoma. *Yonsei Med J.* 2005;46(5):597-613. doi:10.3349/ymj.2005.46.5.597
101.
Baak JPA, Kruse A-J, Garland SM, et al. Combined p53 and retinoblastoma protein detection identifies persistent and regressive cervical high-grade squamous intraepithelial lesions. *Am J Surg Pathol.* 2005;29(8):1062-1066. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16006801>. Accessed February 20, 2020.
102. Catarino R, Matos A, Pinto D, et al. Increased risk of cervical cancer associated with cyclin D1 gene A870G polymorphism. *Cancer Genet Cytogenet.* 2005;160(1):49-54. doi:10.1016/j.cancergencyto.2004.11.017
103. Al Moustafa AE, Foulkes WD, Wong A, et al. Cyclin D1 is essential for neoplastic transformation induced by both E6/E7 and E6/E7/ErbB-2 cooperation in normal cells. *Oncogene.* 2004;23(30):5252-5256. doi:10.1038/sj.onc.1207679
104. Kedzia W, Schmidt M, Frankowski A, Spaczyński M. Immunohistochemical assay of p53, cyclin D1, c-erbB2, EGFr and Ki-67 proteins in HPV-positive and HPV-negative cervical cancers. *Folia Histochem Cytobiol.* 2002;40(1):37-41. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11885807>. Accessed February 20, 2020.
105. Charoonwatana T, Boonlikit S, Yanaranopcycle M. Progression of precancerous cervical lesion predicted by p16 protein immunohistochemistry in Rajavithi Hospital. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 2019;20(6):1809-1815.

doi:10.31557/APJCP.2019.20.6.1809

106. Nuovo G, Schwartz Z, Magro C. A comparison of the detection of biomarkers in infections due to low risk versus high-risk human papillomavirus types. *Ann Diagn Pathol.* 2019;41:57-61. doi:10.1016/j.anndiagpath.2019.05.010
107. Sarma U, Biswas I, Das A, Das GC, Saikia C, Sarma B. p16INK4a Expression in Cervical Lesions Correlates with Histologic Grading - a Tertiary Level Medical Facility Based Retrospective Study. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2017;18(10):2643-2647. doi:10.22034/APJCP.2017.18.10.2643
108. Liu Y, Alqatari M, Sultan K, et al. Using p16 immunohistochemistry to classify morphologic cervical intraepithelial neoplasia 2: correlation of ambiguous staining patterns with HPV subtypes and clinical outcome. *Hum Pathol.* 2017;66:144-151. doi:10.1016/j.humpath.2017.06.014
109. Xing Y, Wang C, Wu J. Expression of geminin, p16, and Ki67 in cervical intraepithelial neoplasm and normal tissues. *Med (United States).* 2017;96(26):e7302. doi:10.1097/MD.00000000000007302
110. Vasiljević N, Carter PD, Reuter C, et al. Role of quantitative p16INK4A mRNA assay and digital reading of p16INK4A immunostained sections in diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer.* 2017;141(4):829-836. doi:10.1002/ijc.30783
111. Badiga S, Chambers MM, Huh W, Eltoum IEA, Piyathilake CJ. Expression of p16INK4A in cervical precancerous lesions is unlikely to be preventable by human papillomavirus vaccines. *Cancer.* 2016;122(23):3615-3623. doi:10.1002/cncr.30229
112. Fonseca FV, Tomasich FDS, Jung JE, Maestri CA, Carvalho NS de. The role of P16ink4a and P53 immunostaining in predicting recurrence of HG-CIN after conization treatment. *Rev Col Bras Cir.* 2016;43(1):35-41. doi:10.1590/0100-69912016001008
113. Chen Q, Du H, Pretorius RG, et al. High-Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia Detected by Colposcopy-Directed or Random Biopsy Relative to Age, Cytology, Human Papillomavirus 16, and Lesion Size. *J Low Genit Tract Dis.* 2016;20(3):207-212. doi:10.1097/LGT.0000000000000184

114. Bergeron C, Ikenberg H, Sideri M, et al. Prospective evaluation of p16/Ki-67 dual-stained cytology for managing women with abnormal Papanicolaou cytology: PALMS study results. *Cancer Cytopathol.* 2015;123(6):373-381. doi:10.1002/cncy.21542
115. da Costa LBE, Triglia RDM, França Junior MC, Andrade LALDA. p16(INK) (4a) expression as a potential marker of low-grade cervical intraepithelial neoplasia progression. *APMIS.* 2015;123(3):185-189. doi:10.1111/apm.12338
116. Reuschenbach M, Wentzensen N, Dijkstra MG, Von Knebel Doeberitz M, Arbyn M. P16INK4a Immunohistochemistry in cervical biopsy specimens a systematic review and meta-analysis of the interobserver agreement. *Am J Clin Pathol.* 2014;142(6):767-772. doi:10.1309/AJCP3TPHV4TRIZEK
117. Krishnappa P, Mohamad IB, Lin YJ, Barua A. Expression of P16 in high-risk human papillomavirus related lesions of the uterine cervix in a government hospital, Malaysia. *Diagn Pathol.* 2014;19(1):202. doi:10.1186/s13000-014-0202-z
118. Lin J, Albers AE, Qin J, Kaufmann AM. Prognostic significance of overexpressed p16INK4a in patients with cervical cancer: a meta-analysis. *PLoS One.* 2014;9(9):e106384. doi:10.1371/journal.pone.0106384

EIKONEΣ ΓΕΝΙΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ

Εικόνα 1

[https://www.google.com/imgres?imgurl=https%3A%2F%2Fwww.researchgate.net%2Fprofile%2FXiao-](https://www.google.com/imgres?imgurl=https%3A%2F%2Fwww.researchgate.net%2Fprofile%2FXiao-Jun_Ma%2Fpublication%2F260808679%2Ffigure%2Ffig4%2FAS%3A296648908525581%401447738019928%2FCorrespondence-of-HPV-E6-E7-RNA-staining-patterns-with-HPV-infective-biology-A-HPV.png&imgrefurl=https%3A%2F%2Fwww.researchgate.net%2Ffigure%2FCorrespondence-of-HPV-E6-E7-RNA-staining-patterns-with-HPV-infective-biology-A-HPV_fig4_260808679&tbnid=U7j8oMQM-ReTAM&vet=12ahUKEwiSlvyMtvDpAhXY_IUKHdY_Bc4QMygGegUIARCdAQ..i&)

[Jun_Ma%2Fpublication%2F260808679%2Ffigure%2Ffig4%2FAS%3A296648908525581%401447738019928%2FCorrespondence-of-HPV-E6-E7-RNA-staining-patterns-with-HPV-infective-biology-A-](https://www.google.com/imgres?imgurl=https%3A%2F%2Fwww.researchgate.net%2Ffigure%2Ffig4%2FAS%3A296648908525581%401447738019928%2FCorrespondence-of-HPV-E6-E7-RNA-staining-patterns-with-HPV-infective-biology-A-HPV.png&imgrefurl=https%3A%2F%2Fwww.researchgate.net%2Ffigure%2FCorrespondence-of-HPV-E6-E7-RNA-staining-patterns-with-HPV-infective-biology-A-HPV_fig4_260808679&tbnid=U7j8oMQM-ReTAM&vet=12ahUKEwiSlvyMtvDpAhXY_IUKHdY_Bc4QMygGegUIARCdAQ..i&)

[HPV.png&imgrefurl=https%3A%2F%2Fwww.researchgate.net%2Ffigure%2FCorrespondence-of-HPV-E6-E7-RNA-staining-patterns-with-HPV-infective-biology-A-](https://www.google.com/imgres?imgurl=https%3A%2F%2Fwww.researchgate.net%2Ffigure%2Ffig4%2FAS%3A296648908525581%401447738019928%2FCorrespondence-of-HPV-E6-E7-RNA-staining-patterns-with-HPV-infective-biology-A-HPV.png&imgrefurl=https%3A%2F%2Fwww.researchgate.net%2Ffigure%2FCorrespondence-of-HPV-E6-E7-RNA-staining-patterns-with-HPV-infective-biology-A-HPV_fig4_260808679&tbnid=U7j8oMQM-ReTAM&vet=12ahUKEwiSlvyMtvDpAhXY_IUKHdY_Bc4QMygGegUIARCdAQ..i&)

[HPV_fig4_260808679&tbnid=U7j8oMQM-](https://www.google.com/imgres?imgurl=https%3A%2F%2Fwww.researchgate.net%2Ffigure%2Ffig4%2FAS%3A296648908525581%401447738019928%2FCorrespondence-of-HPV-E6-E7-RNA-staining-patterns-with-HPV-infective-biology-A-HPV.png&imgrefurl=https%3A%2F%2Fwww.researchgate.net%2Ffigure%2FCorrespondence-of-HPV-E6-E7-RNA-staining-patterns-with-HPV-infective-biology-A-HPV_fig4_260808679&tbnid=U7j8oMQM-ReTAM&vet=12ahUKEwiSlvyMtvDpAhXY_IUKHdY_Bc4QMygGegUIARCdAQ..i&)

[ReTAM&vet=12ahUKEwiSlvyMtvDpAhXY_IUKHdY_Bc4QMygGegUIARCdAQ..i&](https://www.google.com/imgres?imgurl=https%3A%2F%2Fwww.researchgate.net%2Ffigure%2Ffig4%2FAS%3A296648908525581%401447738019928%2FCorrespondence-of-HPV-E6-E7-RNA-staining-patterns-with-HPV-infective-biology-A-HPV.png&imgrefurl=https%3A%2F%2Fwww.researchgate.net%2Ffigure%2FCorrespondence-of-HPV-E6-E7-RNA-staining-patterns-with-HPV-infective-biology-A-HPV_fig4_260808679&tbnid=U7j8oMQM-ReTAM&vet=12ahUKEwiSlvyMtvDpAhXY_IUKHdY_Bc4QMygGegUIARCdAQ..i&)

docid=MNrM7iduEYPL2M&w=850&h=484&q=latent%20hpv%20infection&hl=el&ved=2ahUKEwiSlvyMtvDpAhXY_IUKHdY_Bc4QMygGegUIARCdAQ

Εικόνα 2

<https://oncologypro.esmo.org/content/download/203099/3638054/version/1/file/4+Jeronimo+-+Cervical+cancer.pdf>

Εικόνα 3

<https://www.google.com/imgres?imgurl=x-raw-image%3A%2F%2F%2F846b89419e529693668407119a0c5abc4c70979d78c7dae69d32b44da916eae2&imgrefurl=https%3A%2F%2Fwww.flasco.org%2Fwp-content%2Fuploads%2FSat-4-McMillan-Clinical-Pearls.pdf&tbnid=k5ZSnkGJa4TqBM&vet=10CE8QMyiLAWoXChMIyLmVw7bw6QIVAAAAAB0AAAAAEAM..i&docid=NUGjNqS05uzVLM&w=300&h=225&itg=1&q=LGSIL&ved=0CE8QMyiLAWoXChMIyLmVw7bw6QIVAAAAAB0AAAAAEAM>

Εικόνα 4

<https://www.proteinatlas.org/learn/method/immunohistochemistry>

Εικόνα 5

<https://www.google.com/imgres?imgurl=http%3A%2F%2Fwww.p16.pl%2Fgrafika%2Fdla-lekarzy.jpg&imgrefurl=http%3A%2F%2Fwww.p16.pl%2Fdla-lekarzy.html&tbnid=74a28oC6i7ITdM&vet=10CA0QxiAoCmoXChMIkJbvzbfw6QIVAAAAAB0AAAAAEAc..i&docid=W8ijIzhzZrEHKM&w=460&h=330&itg=1&q=P16%20overexpression&ved=0CA0QxiAoCmoXChMIkJbvzbfw6QIVAAAAAB0AAAAAEAc>

Εικόνα 6

https://www.google.gr/imgres?imgurl=https%3A%2F%2Fobstetric.gr%2Fimages%2Ftest.jpg&imgrefurl=https%3A%2F%2Fobstetric.gr%2Findex.php%2Fgynekologia%2Fgynekologia-themata%2Fhpv%2Fhpv-test&docid=64TseMPpoi1nOM&tbnid=_QE3FYiNLpxtBM%3A&vet=10ahUKEwjVkaaCqozhAh

Εικόνα 7

<https://bitesizebio.com/7619/immunohistochemistry-getting-the-stain-you-want/>

Εικόνα 8

<https://portlandpress.com/clinsci/article/131/17/2201/71573/The-human-papillomavirus-replication-cycle-and-its>

Εικόνα 9

<https://portlandpress.com/clinsci/article/131/17/2201/71573/The-human-papillomavirus-replication-cycle-and-its>

Εικόνα 10

https://www.google.gr/imgres?imgurl=https%3A%2F%2Fcmr.asm.org%2Fcontent%2Fcmr%2F25%2F2%2F215%2FF3.large.jpg&imgrefurl=https%3A%2F%2Fcmr.asm.org%2Fcontent%2F25%2F2%2F215&docid=IdII93HjsLGpfM&tbnid=pwe6sLBEfxXT5M%3A&vet=10ahUKEwiruJztqIzhAhUDaFAKHXS_AVAQMwh

Εικόνα 11

https://www.google.gr/imgres?imgurl=https%3A%2F%2Fars.els-cdn.com%2Fcontent%2Fimage%2F1-s2.0-S0278239113002139-gr1.jpg&imgrefurl=https%3A%2F%2Fwww.sciencedirect.com%2Fscience%2Farticle%2Fpii%2FS0278239113002139&docid=_4p7vESNPxD-qM&tbnid=rj-4UIoDFkyLIM%3A

Εικόνα 12

https://www.google.com/imgres?imgurl=http%3A%2F%2Fwww.jispcd.org%2Farticles%2F2014%2F4%2F1%2Fimages%2FJIntSocPreventCommunitDent_2014_4_1_61_131269_f6.jpg&imgrefurl=http%3A%2F%2Fwww.jispcd.org%2Fviewimage.asp%3Fimg%3DJIntSocPreventCommunitDent_2014_4_1_61_131269_f6.jpg&tbnid=NOtlOqOpNSnGUM&vet=10CBUQMygKahcKEwi4jv6hufDpAhUAAAAAHQAAAAAQBA..i&docid=N6FTBYg3hY5oHM&w=410&h=404&itg=1&q=prb%20e2f%20pathway&hl=el&ved=0CBUQMygKahcKEwi4jv6hufDpAhUAAAAAHQAAAAAQBA

Εικόνα 13

https://www.researchgate.net/figure/The-RB-E2F-and-p53-pathways-INK4A-p16-protein-RB-retinoblastoma-E2F-E2-factor-CDK_fig2_312264730

Εικόνα 14

<https://portlandpress.com/clinsci/article/131/17/2201/71573/The-human-papillomavirus-replication-cycle-and-its>

Εικόνα 15

https://www.google.com/imgres?imgurl=https%3A%2F%2Fwww.researchgate.net%2Fprofile%2Fian_Hardcastle%2Fpublication%2F247829768%2Ffigure%2Ffig1%2FAS%3A347136098095106%401459775103516%2FThe-MDM2-p53-feedback-loop.png&imgrefurl=https%3A%2F%2Fwww.researchgate.net%2Ffigure%2FThe-MDM2-p53-feedback-loop_fig1_247829768&tbnid=Z5OWm-J_IiG_M&vet=12ahUKEwjypOPdufDpAhXikaQKHawIAZkQMygFegUIARCdAQ..i&docid=qvQg87MyHS0lGM&w=458&h=534&q=mdm2%20p53&hl=el&ved=2ahUKEwjypOPdufDpAhXikaQKHawIAZkQMygFegUIARCdAQ

Εικόνα 16

https://www.google.com/imgres?imgurl=http%3A%2F%2Fwww.%25CE%25BA%25CE%25BF%25CE%25BD%25CE%25B4%25CF%2585%25CE%25BB%25CF%2589%25CE%25BC%25CE%25B1%25CF%2584%25CE%25B1.com%2Fimages%2FIMAGES_ARTICLES%2Fcancer_hpv.jpg&imgrefurl=http%3A%2F%2Fwww.xn--mxaahxggep4cg9b.com%2Fhpv-parent%2Fhpv-trachilos&tbnid=8IuMnA98ISITQM&vet=12ahUKEwjk4tLkvfDpAhUquaQKHdOiACAQMygCegUIARCoAQ..i&docid=sGbdE8fFNS2enM&w=567&h=330&q=lgasil%20&ved=2ahUKEwjk4tLkvfDpAhUquaQKHdOiACAQMygCegUIARCoAQ

Εικόνα 17

<https://www.google.gr/imgres?imgurl=https%3A%2F%2Fars.els-cdn.com%2Fcontent%2Fimage%2F1-s2.0-S0264410X12009735-gr1.jpg&imgrefurl=https%3A%2F%2Fwww.sciencedirect.com%2Fscience%2Farticle%2Fpii%2FS0264410X12009735&docid=Bn2B9T2kiSEyDM&tbnid=SeoL2pdwuYRtxM%3A>

Εικόνα 18

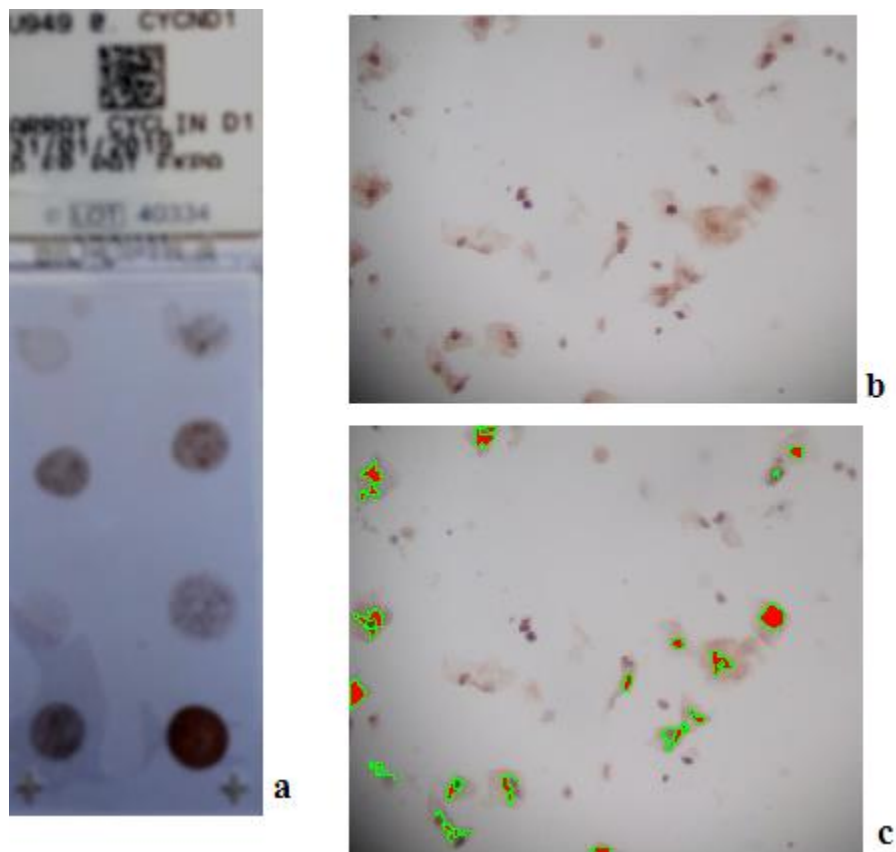
<http://streaming.cineca.it/sestri/courses/cancgen/Bernards.htm>

Εικόνα 19

<http://streaming.cineca.it/sestri/courses/cancgen/Bernards.htm>

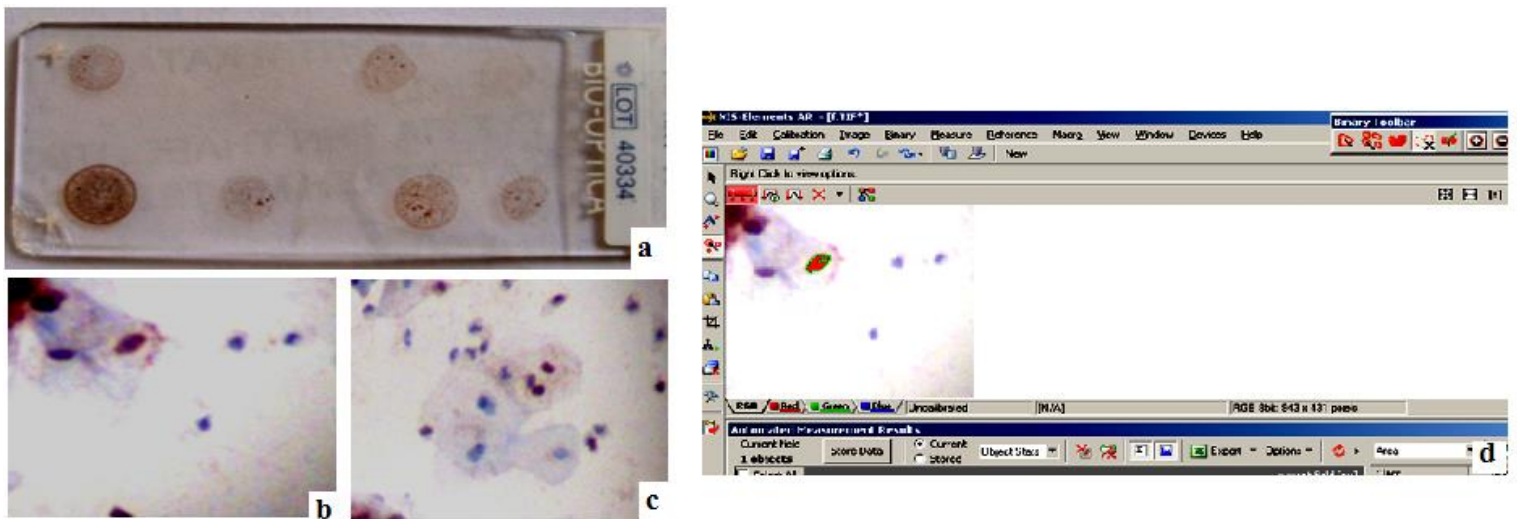
10. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β. Εικόνες-Διαγράμματα

Figure 1. Cyclin D1 protein expression analysis in SILs **a.** A cell spot based cytological slide. Note 8 spots immunostained by applying anti-Cyclin D1 **b.** LSIL case immunostained. Note dark and dense brown nuclear and peri-nuclear staining pattern for Cyclin D1 expression **c.** Digital image analysis of the same case. Red/green areas represent different levels of Cyclin D1 expression (original magnification 100x).



Metaxas G, Tsiambas E, Kavantzias N, Stavraka C, Patsouris E, Lazaris AC, Thomopoulou GE. Impact of Cyclin D1 deregulation in HPV-mediated squamous intraepithelial lesions based on cell spots analysis. *JBUON 2020; 25(2):792-796*

Figure 2. p53/MDM2 protein expression analysis in SILs **a.** A cell spot based cytological slide. Note spots immunostained by applying anti-P53 **b-c.** LSIL cases immunostained. Note dark and dense brown nuclear and peri-nuclear staining pattern for P53 and MDM2 expression, respectively **d.** Digital image analysis of the p53 stained spot. Red/green areas represent different immunostaining intensity levels of nuclear p53 expression (original magnification 100x).



Metaxas G, Tsiambas E, Kavantzias N, Stavraka C, Patsouris E, Lazaris AC, Thomopoulou GE. P53/mdm2 co-expression in HPV-mediated cervical squamous

intraepithelial lesions based on cell spots analysis. *JBUON 2020*; accepted for publication

Figure 3. P16 analysis on cytological specimens for estimating p16 protein expression levels. Digitized snapshot of a microscopic field is analyzed by a macro focused on staining intensity values (0-255 at RGB). Red areas show different expression of the marker. The final value is the result of a synthetic approach of all stained pixels (original magnification400x)

