

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

“Μοριακή ανίχνευση υψηλού κινδύνου τύπων ιών θηλώματος
σε δείγματα τραχηλικού, κοιλιακού υγρού και ούρων γυναικών
του γενικού πληθυσμού”



ΣΚΡΙΑΠΑ ΛΑΜΠΡΙΝΗ

Επιβλέπων Καθηγητής:
Πουρνάρας Σπυρίδων
Επικ. Καθηγητής Μικροβιολογίας
Τμήμα Ιατρικής
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Λάρισα, Σεπτέμβριος 2008



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 6604/1
Ημερ. Εισ.: 17-03-2009
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2008
ΣΚΡ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087344

Στοιχεία διπλωματικής εργασίας

Το πειραματικό μέρος της παρούσας διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Μικροβιολογίας του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας του Περιφερειακού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας το χρονικό διάστημα Φεβρουάριος 2008- Ιούνιος 2008 υπό την επίβλεψη του κ. Σπύρου Πουρνάρα, Επίκουρου Καθηγητή Μικροβιολογίας.

Τριμελής Επιτροπή: Πουρνάρας Σπυρίδων, Επίκουρος καθηγητής

Μαρκουλάτος Παναγιώτης, Αναπληρωτής καθηγητής

Σταθόπουλος Κωνσταντίνος, Επίκουρος καθηγητής

Πρόλογος

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Μικροβιολογίας του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας, που διευθύνει ο καθηγητής κ. Αντώνης Μανιάτης.

Η βασική εκπαίδευση, το πειραματικό μέρος και η ανάλυση των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης έγιναν υπό την επίβλεψη του κ. Σπύρου Πουρνάρα, Επίκουρου Καθηγητή Μικροβιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπεύθυνου του εργαστηρίου Μοριακής Μικροβιολογίας, τον οποίο και ευχαριστώ για την άριστη συνεργασία μας, την πολύτιμη καθοδήγησή του, τις υποδείξεις και διορθώσεις του σε όλες τις φάσεις διεκπεραίωσης της συγκεκριμένης εργασίας. Τον ευχαριστώ θερμά για την δυνατότητα που μου προσέφερε και το χρόνο που μου αφιέρωσε όλο αυτό το διάστημα. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω και την Επιμελήτρια Β' Μικροβιολογίας κ. Παρασκευή Μαντζάνα για την άριστη συνεργασία μας κατά τη διάρκεια όλων των σταδίων της διπλωματικής μου εργασίας.

Τέλος, η παρούσα διπλωματική εργασία δεν θα είχε ολοκληρωθεί χωρίς τη βοήθεια των υποψήφιων διδασκόντων του Εργαστηρίου Μοριακής Μικροβιολογίας, της κ. Έλενας Ντόκου και της κ. Μαρίας Λάμπρου, οι οποίες με ανεξάντλητη υπομονή δέχθηκαν να με βοηθήσουν σε οτιδήποτε χρειάστηκα κατά το χρονικό διάστημα που παρέμεινα στο εργαστήριο αλλά θα ήθελα να τις ευχαριστήσω και για το ιδιαίτερα φιλικό κλίμα που αναπτύχθηκε ανάμεσα μας κατά τη διάρκεια της διεξαγωγής των πειραμάτων μου.

Περιεχόμενα

1.	Περίληψη	5
2.	Summary	6
3.	Γενικά χαρακτηριστικά των Human Papilloma viruses (HPV) ^[1]	7
4.	Δομή των HPV ^[2]	8
5.	Ο κύκλος ζωής των HPV	12
5.1	Αντιγραφή των HPV ^[4]	12
5.2	Μεταγραφή των HPV ^[5]	13
5.3	Σύνθεση των ικών σωματιδίων και απελευθέρωση ^[6]	13
6.	Παθογένεση των HPV ^[2]	15
7.	Μετάδοση των HPV ^[8]	15
8.	Επιδημιολογία των HPV ^[9]	16
9.	Διάγνωση των HPV	17
9.1	Ορολογικές μέθοδοι	17
9.2	Μικροσκοπική εξέταση κυτταρολογικών τραχηλικών επιχρισμάτων (PAP test) ^[10]	17
9.3	Μοριακές τεχνικές για την διάγνωση HPV	18
10.	Ανοσολογία των HPV ^[2]	19
11.	Θεραπεία των HPV ^[2]	20
12.	Πρόληψη ενάντια στους HPV ^[2]	20
	<i>Εμβόλια ενάντια στους HPV</i>	20
12.1	Προληπτικά εμβόλια	20
12.2	Θεραπευτικά εμβόλια	21
13.	Παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη καρκίνου του τραχήλου της μήτρας ^[13-14]	22
14.	Υλικά και Μέθοδοι	25
15.	Αποτελέσματα	37
16.	Συζήτηση	39
17.	Βιβλιογραφία	42

1. Περίληψη

Οι λοιμώξεις από τους ιούς του θηλώματος του ανθρώπου (HPV, Human Papilloma Viruses) παρατηρούνται με διαρκώς αυξανόμενη συχνότητα σε ηλικίες ολοένα και μικρότερες. Είναι δίκλωνοι κυκλικοί επιθήλιο-πολλαπλασιαζόμενοι ιοί αλλά η κλινική τους εικόνα είναι ιδιαίτερα ήπια και για το λόγο αυτό η διάγνωσή τους καθυστερεί ή δεν γίνεται ποτέ. Παρ' όλα αυτά, η χρονιότητα των λοιμώξεων αυτών συσχετίζεται στις γυναίκες ασθενείς με ιδιαίτερα σοβαρές επιπλοκές, όπως ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας. Από τους τύπους HPV που προσβάλλουν τον άνθρωπο, οι περισσότεροι προκαλούν κονδυλώματα, ενώ αρκετοί θεωρούνται υψηλού κινδύνου για καρκινογένεση. Από τους πρώτους, συχνότεροι είναι οι τύποι 6 και 11, ενώ οι συχνότεροι ογκογόνοι τύποι είναι οι 16 και 18.

Η διάγνωση των HPV γίνεται κυρίως εργαστηριακά ενώ η επαφή με τους ιούς HPV γίνεται συνήθως στα πρώτα χρόνια της σεξουαλικής ζωής και είναι συνήθως ασυμπτωματική. Τα κλινικά δείγματα που συνήθως θεωρούνται καταλληλότερα για την διάγνωση των ιών HPV είναι τα τραχηλικά επιχρίσματα. Η λήψη, όμως, των δειγμάτων αυτών απαιτεί τη διενέργεια γυναικολογικής εξέτασης και την προσέλευση των ασθενών στον ιατρό και για αυτό η πρόληψη των νόσων αυτών υπολείπεται σημαντικά, με αποτέλεσμα απώτερες επιπλοκές να είναι ιδιαίτερα συχνές. Τα τελευταία χρόνια καταβάλλονται προσπάθειες να χρησιμοποιηθούν εναλλακτικά κλινικά δείγματα για τη διάγνωση των λοιμώξεων αυτών που δεν απαιτούν ιατρική παρέμβαση, έτσι ώστε να αυξηθεί η συμμετοχή των γυναικών στις διαδικασίες πρόληψης. Τέτοια δείγματα είναι τα κολπικά επιχρίσματα και τα δείγματα ούρων, που μπορούν να ληφθούν από τις ίδιες τις γυναίκες. Αυτός ήταν και ο σκοπός της παρούσας εργασίας όπου τεχνικές PCR σχεδιάστηκαν για την ανίχνευση ογκογόνων τύπων HPV σε εναλλακτικά του τραχηλικού δείγματα, όπως είναι το κολπικό και τα ούρα. Σε έναν μικρό αριθμό δειγμάτων που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη υπήρξε μεγάλη συμφωνία στην ανίχνευση των HPV από τραχηλικά και κολπικά δείγματα ενώ η έρευνα πάνω στο συγκεκριμένο θέμα συνεχίζεται στο εργαστήριο για την εξαγωγή συμπερασμάτων που θα συμβάλλουν σε επίπεδο πληθυσμού στην έγκαιρη αντιμετώπιση έναντι των HPV.

2. Summary

The infections from the HPV are observed in a continuous increasingly frequency in younger and younger ages. These are duplex, cyclical epithelium-multiplied viruses but their clinical status is particularly mild and for this reason its diagnosis is being delayed or it doesn't take place. However, the longevity of these infections is correlated in women patients with particularly serious implications such as cervical cancer. From the types of the HPV that affect human beings most of them cause genital warts (condylomata), while many are considered to be of high danger for carcinogenesis. From the first kind more frequent are types 6 and 11, while the most frequent oncogenic types are the HPV 16 and 18.

The diagnosis of HPV is taking place mostly in laboratories while the contact with the HPV viruses is taking place in the first years of the sexual life and is usually asymptomatic. The clinical samples which are usually more suitable for the diagnosis of the HPV viruses are the cervical samples. But, taking these samples, required a gynecological examination and the presence of the patient to the physician and for this reason the prevention of these illness is substantially lower and as a result we have very frequent future implications. The last years many efforts have been put into effect in order to use alternative clinical samples for the diagnosis of these infections without a medical intervention, so as to increase the participation of women in prevention procedures. Such samples are the vaginal and the urine samples which can be taken by women themselves. This was the purpose of our project during which we planned some PCR techniques for the detection of oncogenic types of HPV in other samples apart from the cervical ones, such as the vaginal and urine samples. In a small number of samples that were being examined in the current project there was a substantial accordance in the detection of HPV in cervical and vaginal sample while the investigation on this particular subject is being continued on the laboratory for taking more accurate results which will enable us to face timely the infection of HPV.

3. Γενικά χαρακτηριστικά των Human Papilloma viruses (HPV)^[1]

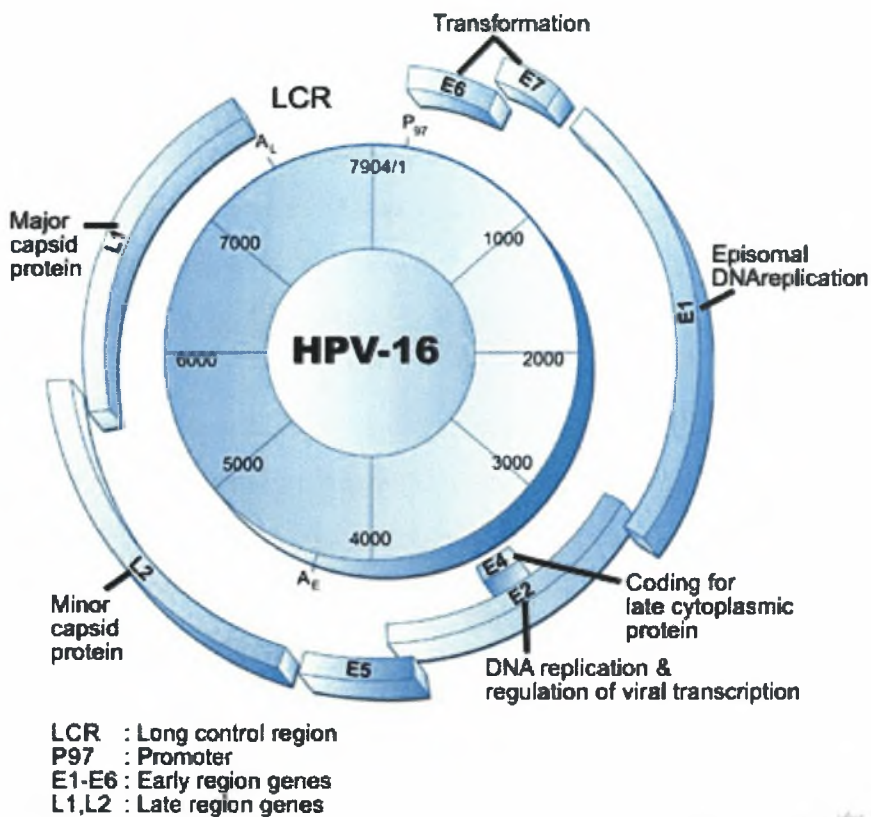
Οι ιοί του θηλώματος του ανθρώπου είναι μέλη της οικογένειας *Papillomaviridae* του γένους *Papillomavirus*. Οι ιοί αυτοί είναι μικροί, χωρίς μεμβρανικό φάκελο και με διάμετρο 55 nm. Έχουν ένα εξωτερικό εικοσαεδρικό καψίδιο που αποτελείται από δύο δομικές πρωτεΐνες, τις L1 και L2. Το γονιδίωμα τους αποτελείται από ένα κυκλικό DNA με μήκος 7900 bp.

Αποτελούν μία ομάδα επιθήλιο-πολλαπλασιαζόμενων ιών που οδηγούν σε καλοήθεις και σπανιότερα σε κακοήθεις όγκους. Μεταδίδονται κυρίως με δερματική επαφή ή κατά την σεξουαλική επαφή. Περισσότεροι από 142 τύποι ιών HPV έχουν αναγνωριστεί μέχρι σήμερα. Διακρίνονται βάση του τροπισμού τους σε δερματικούς και βλεννογόνιους τύπους ιών (προσβάλλουν το επιθήλιο του βλεννογόνου). Εισέρχονται στον οργανισμό από μία περιοχή τοπικού τραύματος και στη συνέχεια επεκτείνεται στα βασικά επιθηλιακά κύτταρα. Οι ιοί που προσβάλλουν το επιθήλιο του βλεννογόνου, σύμφωνα με τη συσχέτιση τους με την πρόκληση του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας διακρίνονται περαιτέρω σε τύπους ιών “υψηλής επικινδυνότητας” (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 και 82) και σε τύπους ιών “χαμηλής επικινδυνότητας” (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 και CP6108). Οι τύποι ιών “υψηλής επικινδυνότητας” συναντούνται σε δυσπλασίες και επιδερμικής προέλευσης καρκίνους ενώ εντοπίζονται σε μεγαλύτερη συχνότητα από τους τύπους ιών “χαμηλής επικινδυνότητας”, οι οποίοι βρίσκονται κυρίως σε καλοήθεις βλάβες, κονδυλώματα και σχεδόν ποτέ σε καρκινώματα.

Εκτός από τον καρκίνο στον τράχηλο της μήτρας ο HPV επίσης σχετίζεται με την εμφάνιση καρκίνου του πέους, της μήτρας και του πρωκτού. Ακόμα έχει παρατηρηθεί ότι καρκίνος του λάρυγγα, του οισοφάγου και του πνεύμονα ιστολογικά μοιάζει με τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας γεγονός που εμπλέκει τους HPV στους προαναφερθέντες τύπους καρκίνου

4. Δομή των HPV^[2]

Το γονιδίωμα των HPV περιλαμβάνει είναι ένα δίκλωνο κυκλικό μόριο DNA το οποίο αποτελείται από οκτώ περιοχές που ονομάζονται ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης (ORF, Open Reading Frames) και διακρίνονται σε έξι πρώιμες (E1, E2, E4, E5, E6, και E7) και δύο καθυστερημένες περιοχές (L1 και L2) οι οποίες κωδικοποιούν και τις αντίστοιχες πρωτεΐνες (Εικόνα 1). Κάθε μία από τις παραπάνω περιοχές κωδικοποιεί και τις αντίστοιχες πρωτεΐνες.



Εικόνα 1: Οργάνωση γονιδιώματος ιών HPV^[3]

Οι περιοχές L1 και L2 κωδικοποιούν για τα δομικά πολυπεπίδια του καψιδίου του ιού. Τα ιικά σωματίδια στην εξωτερική του επιφάνεια αποτελείται από 72 πενταμερή της καψιδιακής πρωτεΐνης L1, σχηματίζοντας εικοσαεδρικά καψίδια. Αναλυτικότερα, η πρωτεΐνη L1 μετατρέπεται αυθόρμητα σε ένα πενταμετρικό

καψομερές. Τα καψομερή συνδέονται μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς και σχηματίζουν τα καψίδια. Η πρωτεΐνη L2 συνεργάζεται με την L1 για να σχηματιστεί το σωματίδιο του ιού αλλά επίσης αλληλεπιδρά και με έναν σημαντικό αριθμό κυτταρικών πρωτεϊνών κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της ιϊκής μόλυνσης του κυττάρου. Η καψιδιακή πρωτεΐνη L1 είναι ο παράγοντας, ο οποίος συμβάλει στην αναγνώριση των ιικών σωματίων από το ανοσολογικό σύστημα του προσβεβλημένου ατόμου.

Οι πρωτεΐνες E1 και E2 εμπλέκονται στην αντιγραφή του ιού. Η πρωτεΐνη E1 συνδέεται στην περιοχή έναρξης της αντιγραφής στο DNA του ιού και χρησιμοποιεί ATP με την υδρόλυση του οποίου η DNA ελικάση ξετυλίγει τις δύο έλικες του DNA, προετοιμάζοντας έτσι το βακτηριακό γονιδίωμα για αντιγραφή. Επίσης, έχει την δυνατότητα να σχηματίζει σύμπλοκα με την E2 πρωτεΐνη και την μεγάλη υπομονάδα της DNA πολυμεράσης α .

Η E2 πρωτεΐνη δρα σαν διμερές και λειτουργεί ως μεταγραφικός ρυθμιστής των ιϊκών υποκινητών ενώ διευκολύνει και την σύνδεση της E1 πρωτεΐνης στην περιοχή έναρξης της μεταγραφής του ιού. Επίσης, έχει παρατηρηθεί ότι όταν το ιικό DNA είναι σε επισωμική μορφή σταματά η μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων E6 και E7 από την E2

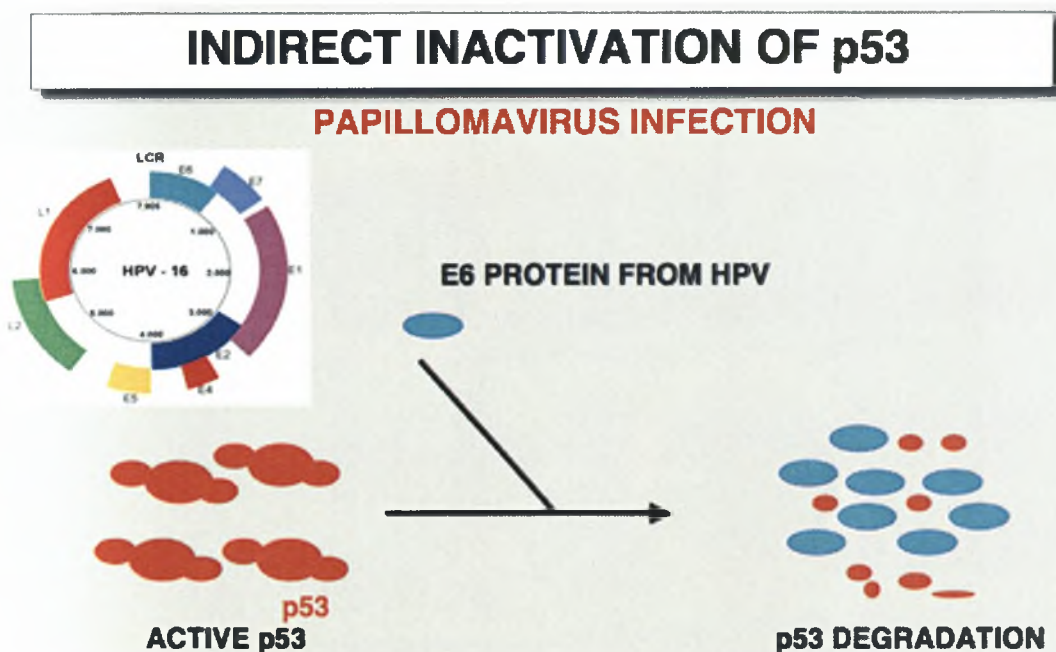
Η E4 πρωτεΐνη εκφράζεται στην όψιμη φάση μαζί με το E1 σχηματίζοντας την E1^{E4} πρωτεΐνη. Η πρωτεΐνη αυτή αλληλεπιδρά με το δίκτυο ινιδίων κερατίνης στα διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα επάγοντας την καταστροφή του δικτύου και την απελευθέρωση των νεοσχηματιζόμενων ιικών σωματιδίων, επίσης μπορεί να συνεισφέρει στη ρύθμιση του κύκλου ζωής του κυττάρου-ξενιστή.

Η E5 πρωτεΐνη είναι μια μικρή υδρόφοβη πρωτεΐνη που η λειτουργία της δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί αλλά ίσως ευθύνεται για τον κυτταρικό μετασχηματισμό διαδραματίζοντας και ένα σημαντικό ρόλο στον διπλασιασμό του ιού. Έχει προταθεί ότι η E5 των HPV συνδέεται με τον υποδοχέα του EGF. Οι παρατηρήσεις αυτές βασίζονται στο γεγονός ότι όταν υπάρχει υπερέκφραση της E5 αυξάνεται η φωσφορυλίωση του υποδοχέα του EGF με συνέπεια να αναστέλλεται η αποδόμηση του.

Οι πρωτεΐνες E6 και E7 διαδραματίζουν έναν σημαντικό ρόλο στον κακοήγη μετασχηματισμό των κυττάρων, οι ογκοπρωτεΐνες αυτές συνδέονται ειδικά με κυτταρικές πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από ογκοκατασταλτικά γονίδια. Η

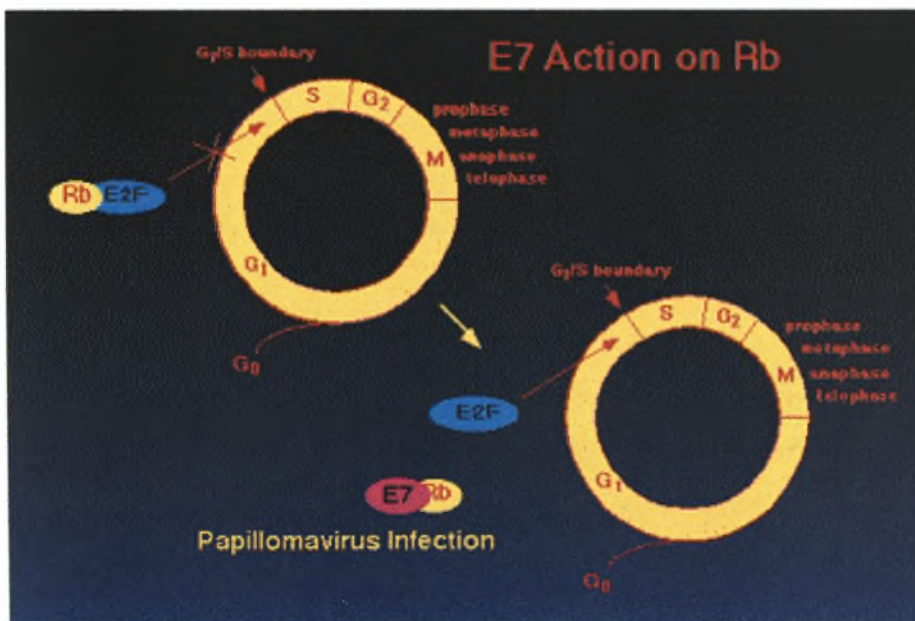
ογκοπρωτεΐνη E7 συνδέεται με την πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος (pRb), ενώ η ογκοπρωτεΐνη E6 συνδέεται με την p53.

Πιο αναλυτικά, η πρωτεΐνη p53 υπό την επίδραση διάφορων ερεθισμάτων (υποξία, ακτινοβολίες κλπ) αυξάνεται στα κύτταρα και προσδένεται ειδικά στο DNA. Η σύνδεση αυτή οδηγεί σε ενεργοποίηση κατασταλατικών γονιδίων που επιφέρουν σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου. Παρουσία ιών υψηλής επικινδυνότητας η ογκοπρωτεΐνη E6 δεσμεύεται στην πρωτεΐνη p53 δημιουργώντας ένα σύμπλοκο p53-E6, το οποίο δεν δίνει τη δυνατότητα στην p53 να επιτελέσει το φυσιολογικό της ρόλο (Εικόνα 2). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου και κάνει το κύτταρο αθάνατο. Επίσης, η E6 προκαλεί και πρωτεόλυση της p53. Η E6 πρωτεΐνη μπορεί να συνδεθεί με τις πρωτεΐνες Myc/Mak και Sp-1 σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο που συνδέεται στην περιοχή του υποκινητή της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης. Αυτή η αλληλεπίδραση οδηγεί στην αύξηση της δραστηριότητας της τελομεράσης, διευκολύνοντας έτσι την αθανασία.



Εικόνα 2: Αλληλεπίδραση μεταξύ της πρωτεΐνης E6 του ιού HPV και της φυσιολογικής p53

Όπως ήδη έχει αναφερθεί, η ογκοπρωτεΐνη E7 συνδέεται με την πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος (pRb). Απουσία ιού HPV, στη φάση G1 η πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος συνδέεται με τον παράγοντα E2F, εμποδίζοντας την μεταγραφή των γονιδίων που ρυθμίζονται από τον παράγοντα αυτό. Η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος οδηγεί σε αποδέσμευση του συμπλόκου pRb-E2F και πλέον ο παράγοντας E2F μπορεί να εξασφαλίσει τη μεταγραφική δραστηριότητα και την έκφραση των γονιδίων που ελέγχει στη φάση S. Η σύνδεση της πρωτεΐνης E7 με την μη φωσφορυλιωμένη μορφή της pRb αναιρεί την αρνητική επίδραση της pRb στη μεταγραφική δραστηριότητα του E2F και οδηγεί το κύτταρο απ' ευθείας στη φάση S (Εικόνα 3). Επίσης, η E7 πρωτεΐνη είναι σε θέση να συνδεθεί και με άλλες κυτταρικές πρωτεΐνες όπως ο αναστολέας p21 των κυκλινο- εξαρτώμενων κινασών οδηγώντας έτσι, πιθανών, στην απώλεια ρύθμισης του ελέγχου του κυτταρικού κύκλου. Η πρωτεΐνη E7 μπορεί να συνδεθεί και με τις απακετυλάσες των ιστονών (HDACs) με αποτέλεσμα την έκφραση του παράγοντα E2F και την ενεργοποίηση διάφορων γονιδίων που είναι απαραίτητα για την λειτουργία του κυτταρικού κύκλου.



Εικόνα 3: Η αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος με την ογκοπρωτεΐνη E7 προάγει την συνέχιση του κυτταρικού κύκλου αναστέλλοντας την σύνδεση της pRb με τον μεταγραφικό παράγοντα E2F και την αναστολή του κυτταρικού κύκλου

5. Ο κύκλος ζωής των HPV

Τα ιικά σωματίδια προσβάλλουν τους επιθηλιακούς ιστούς μέσω μικροτραυματισμών, με αποτέλεσμα ο ιός να εισβάλει στα κύτταρα της βασικής στοιβάδας μέσω της αλληλεπίδρασής του με ειδικούς υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης των κερατινοκυττάρων. Τα ιικά σωματίδια μπορεί να αλληλεπιδρούν άμεσα ή έμμεσα με τους υποδοχείς. Στην συνέχεια ο ιός ενδοκυτταρώνεται σε κυστίδια κλαθρίνης αλλά και σε κυστίδια καβεολίνης, ανάλογα με τον τύπο του ιού και εισέρχεται στο εσωτερικό του κυττάρου. Τα ιικά σωματίδια οδηγούνται από τα κυστίδια στα λυσοσώματα όπου και αποσυναρμολογούνται αφήνοντας πια ελεύθερο το ιικό DNA να μεταφερθεί στο εσωτερικό του πυρήνα. Το ιικό DNA μπορεί να βρίσκεται στον πυρήνα του κυττάρου ξενιστή σε δύο μορφές είτε ενσωματωμένο στο DNA του κυττάρου ή σε μορφή επισώματος.

5.1 Αντιγραφή των HPV ^[4]

Έχει αναφερθεί ότι το γονιδίωμα των HPV αντιγράφεται σε τρεις διαφορετικές περιόδους. Σε πρώτο επίπεδο ο ιός αντιγράφεται όταν εισέρχεται στα κύτταρα της βασικής στοιβάδας και αυξάνει τον αριθμό των αντιγράφων του σε αυτό το στάδιο μεταξύ 50-400 αντίγραφα παραμένοντας, όμως, σε επισωματική μορφή μέσα στον πυρήνα του κυττάρου ξενιστή. Το δεύτερο επίπεδο αντιγραφής συμβαίνει κατά την διαίρεση των κυττάρων της βασικής στοιβάδας διότι ο ιός είναι σε θέση να αντιγράφεται μαζί με το DNA του κυττάρου ξενιστή αυξάνοντας τη διάδοση του αφού δύο αντίγραφα δημιουργούνται, ένα σε κάθε θυγατρικό κύτταρο. Στο τρίτο και τελευταίο επίπεδο αντιγραφής παρατηρείται στα μολυσμένα κύτταρα στα οποία ο ιός αντιγράφεται με κύριο μέλημά του τη σύνθεση ιικού DNA που θα χρησιμοποιηθεί για τη δημιουργία νέων ιικών σωματιδίων.

Τα πρώτα γονίδια τα οποία εκφράζονται μετά από την μόλυνση είναι τα E1 και E2, τα οποία όπως ήδη έχει αναφερθεί επάγουν την αντιγραφή του DNA.

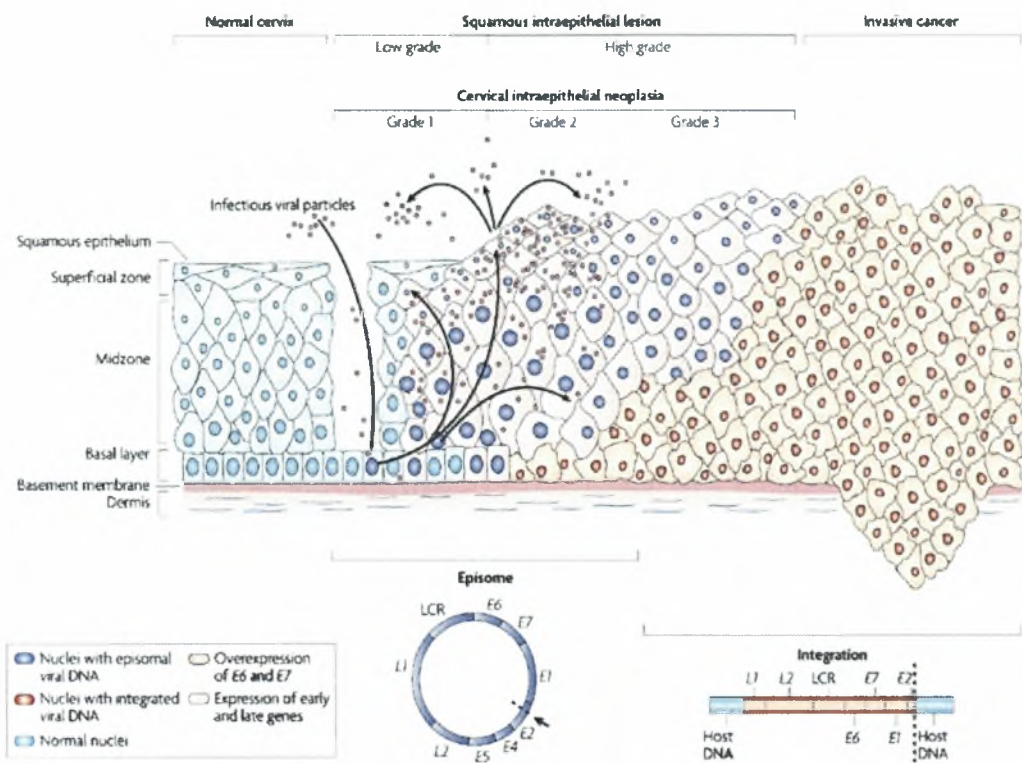
5.2 Μεταγραφή των HPV^[5]

Τα έξι πρώιμα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης των γονιδίων E1, E2, E4, E5, E6, E7 βρίσκονται υπό τον άμεσο έλεγχο του πρώιμου μεταγραφικού ενεργοποιητή (p97 για τον HPV-16, HPV-31 και p105 για τον HPV-18). Ο παράγοντας p97 εντοπίζεται ανοδικά του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης του E6 και είναι υπεύθυνος για την ενεργοποίηση όλων των πρώιμων γονιδίων. Τα όψιμα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης των γονιδίων των καψιδιακών πρωτεϊνών L1 και L2, οι οποίες είναι απαραίτητες για τον σχηματισμό του ιικού καψιδίου και το πακετάρισμα του ιικού γενώματος στα νεοσχηματιζόμενα ιικά σωματίδια, βρίσκονται υπό τον έλεγχο του πρώιμου μεταγραφικού ενεργοποιητή p670. Ο παράγοντας p670 βρίσκεται στο εσωτερικό του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης του γονιδίου E7 και είναι υπεύθυνος για την έκφραση των όψιμων ιικών γονιδίων.

5.3 Σύνθεση των ιικών σωματιδίων και απελευθέρωση^[6]

Οι papilloma ιοί ολοκληρώνουν τον κύκλο ζωής τους με την τοποθέτηση των αντιγράφων του γονιδιώματος τους εντός των νεοσχηματιζόμενων καψιδίων και την σύνθεση των ιικών σωματιδίων. Η πρωτεΐνη E2 απαιτείται για την τοποθέτηση του ιικού γενώματος εντός των νεοσχηματιζόμενων καψιδίων και συνεργάζεται με τις καψιδικές πρωτεΐνες L1 και L2 για την συναρμολόγηση των νέων ιικών σωματιδίων.

Οι HPV δεν προκαλούν λύση των μολυσμένων κερατινοκυττάρων και ο ακριβής μηχανισμός απελευθέρωσης από το κύτταρο δεν είναι γνωστός. Πιθανόν στην απελευθέρωση των ιικών σωματιδίων να εμπλέκεται η πρωτεΐνη E4 η οποία αλληλεπιδρά και καταστρέφει το δίκτυο ινιδίων κερατίνης, που αναπτύσσεται στην επιφάνεια των μολυσμένων κερατινοκυττάρων, με αποτέλεσμα τα νεοσχηματιζόμενα ιικά σωματίδια να απελευθερώνονται από το κύτταρο.



Nature Reviews | Cancer

Εικόνα 4: Τα βασικά κύτταρα στο επιθήλιο του τραχήλου βρίσκονται στη βασική μεμβράνη, η οποία υποστηρίζεται από ένα μεσοδερμικό στρώμα επιδερμίδας. Έχει αποδειχθεί ότι οι HPV εισέρχονται στα βασικά κύτταρα μέσω μικροτραυματισμών στο επιθήλιο του τραχήλου της μήτρας. Μετά την μόλυνση, τα πρώιμα HPV γονίδια 1, E2, E4, E5, E6 και E7 εκφράζονται και το ιικό DNA αντιγράφεται από το επισωματικό DNA (μωβ πυρήνες). Στα ανώτερα στρώματα το ιικό DNA αντιγράφεται περαιτέρω και τα καθυστερημένα ή όψιμα γονίδια L1, L2 και E4 εκφράζονται. Τα L1 και L2 ενθυλακώνουν το ιικό γονιδίωμα για να σχηματίσουν νέα ιικά σωματίδια στον πυρήνα. Ο νέοσχηματιζόμενος ιός μπορεί να ξεκινήσει τη μόλυνση ενός άλλου κυττάρου. Ένας άγνωστος αριθμός υψηλής επικινδυνότητας HPV προάγουν υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας του τραχήλου. Η ανάπτυξη ενός ανίατου επεκτατικού ή λιγότερο επεκτατικού καρκίνου συνδέεται με την ενσωμάτωση του γονιδιώματος των HPV στα χρωμοσώματα του κυττάρου ξενιστή (κόκκινοι πυρήνες). Στο στάδιο αυτό χάνεται ή διασπάται η πρωτεΐνη E2 η οποία λειτουργεί ως ρυθμιστής της έκφρασης των ογκογονιδίων E6 και E7. [7]

6. Παθογένεση των HPV^[2]

Σε περιπτώσεις καρκίνου έχει παρατηρηθεί ενσωμάτωση του γονιδιώματος του HPV σε αυτό του κυττάρου-ξενιστή. Αντίθετα, σε προκαρκινωματώδεις βλάβες συνήθως ο ιός βρίσκεται σε επισωματική κατάσταση. Η ενσωμάτωση του ιού στο κυτταρικό γονιδίωμα προκαλεί γονιδιακή απορρύθμιση. Παρατηρείται αύξηση της έκφρασης των γονιδίων E6 και E7 λόγω διαταραχής των περιοχών ORF E1 και E2 στους HPV υψηλής επικινδυνότητας. Οι πρωτεΐνες E1 και E2 ασκούν κατασταλτική δράση στις περιοχές ORF E6 και E7. Συνεπώς, η ενσωμάτωση του ιικού DNA στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή οδηγεί σε αυξημένη έκφραση των ογκοπρωτεϊνών E6 και E7 με αποτέλεσμα την ειδική σύνδεση τους με τις ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες p53 και pRB και τελικά τον κυτταρικό μετασχηματισμό των κυττάρων

7. Μετάδοση των HPV^[8]

Σεξουαλική μετάδοση: Οι HPV μεταδίδονται πολύ εύκολα κατά την σεξουαλική επαφή. Η περίοδος ανάμεσα από την μόλυνση και την ταυτοποίηση και την εμφάνιση της βλάβης ποικίλει, κάνοντας απίθανο για τις περισσότερα άτομα που προσβάλλονται να προσδιορίσουν πότε και από ποίον έχουν μολυνθεί.

Εξωγεννητική και μολυσματική μετάδοση: Οι HPV μπορούν να μεταδοθούν μέσω της επαφής με μολυσμένα χείλη, με μολυσμένο όσχεο ή μολυσμένο πρωκτό. Η μολυσματική μετάδοση είναι πολύ σπάνια. Οι HPV είναι ανθεκτικοί στη θερμότητα. Έχει παρατηρηθεί ότι είναι ανθεκτικοί σε θερμοκρασία 56° C για μία ώρα.

Κάθετη μετάδοση: Παρατηρείται όταν οι ιοί μεταδίδονται από μία μολυσμένη μητέρα στο νεογνήτο μωρό της. Ο τρόπος αυτός μετάδοσης είναι λιγότερο συχνός και είναι δύσκολο να διαγνωσθεί λόγω της λανθάνουσας περιόδου ανάμεσα στην έκθεση του εμβρύου και στην παρουσίαση των συμπτωμάτων.

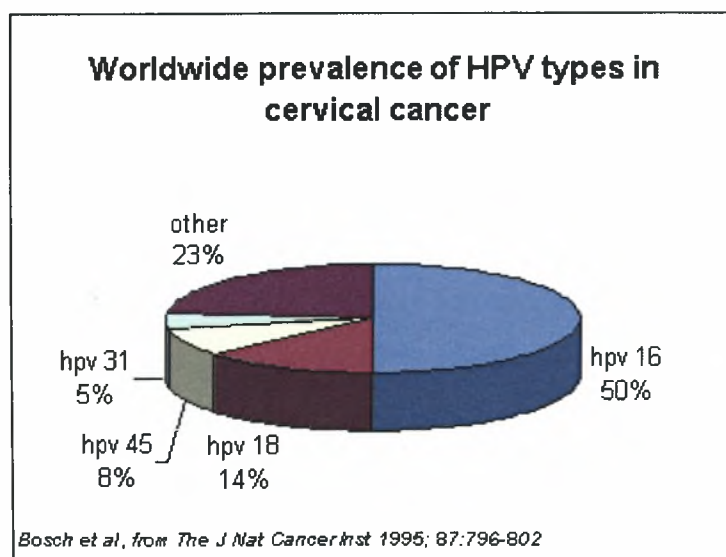
8. Επιδημιολογία των HPV^[9]

Οι HPV είναι οι πιο συχνή σεξουαλικά μεταδιδόμενη ασθένεια στον κόσμο. Υπολογίζεται ότι τουλάχιστον το 50% των ενεργών σεξουαλικά ανθρώπων προσβάλλονται από έναν τύπο HPV τουλάχιστον μία φορά. Οι HPV μπορούν να προσβάλλουν άνδρες και γυναίκες εξίσου, αλλά είναι περισσότερο πιθανό οι γυναίκες να εμφανίσουν τα συμπτώματα της ασθένειας.

Οι HPV αποτελούν την αιτία για περισσότερο από το 90% των περιπτώσεων καρκίνου της μήτρας, την δεύτερη αιτία θανάτου στις γυναίκες παγκοσμίως. Ωστόσο, μόνο το 1-5% των γυναικών που θα προσβληθούν από HPV θα αναπτύξουν κακοήθειες. Πιο συχνά, οι HPV συνδέονται με καλοήθειες νεοπλασίες.

Οι συχνότητα των HPV και οι ασθένειες που σχετίζονται με αυτούς εξαρτώνται από τον τύπο των HPV. Σε διάφορες έρευνες, έχει παρατηρηθεί ότι οι τύποι των HPV συσσωρεύονται σε κάθε περιοχή. Είναι γενικά αποδεκτό, ότι οι τύποι των HPV κατανέμονται σε διαφορετικές περιοχές με διαφορετική συχνότητα. Για παράδειγμα ο HPV-45 επικρατεί στην Δυτική Αφρική ενώ στην Κεντρική και Ανατολική Αμερική επικρατούν σε μεγαλύτερη συχνότητα οι HPV-39, HPV-54.

Από διάφορες επιδημιολογικές μελέτες προκύπτει ότι οι πιο επικρατείς τύποι HPV είναι οι HPV-16 και HPV-18 σε ποσοστό 50% και 23 % αντίστοιχα και ακολουθούν οι HPV-45 σε ποσοστό 8%, και ο HPV-31 σε ποσοστό 5% (Εικόνα 4).



Εικόνα 5: Διάγραμμα με βάση την παγκόσμια συχνότητα των HPV που προκαλούν καρκίνο του τραχήλου της μήτρας

9. Διάγνωση των HPV

9.1 Ορολογικές μέθοδοι

Στην συγκεκριμένη μέθοδο χρησιμοποιούνται αντισώματα έναντι των καψιδικών αντιγόνων L1 και L2. Τα αντιγόνα αυτά δεν ανιχνεύονται στην πρόωμη φάση της λοίμωξης ενώ η παραμονή των αντισωμάτων ποικίλει για τους διάφορους τύπους HPV. Η μέθοδος είναι ικανή να ανίχνευση το 50%-80% των γυναικών που έχουν μολυνθεί με HPV.

9.2 Μικροσκοπική εξέταση κυτταρολογικών τραχηλικών επιχρισμάτων (PAP test)^[10]

Το test Παπανικολάου ελέγχει για τυχόν αλλαγές στα επιθηλιακά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας. Τα αλλοιωμένα επιθηλιακά κύτταρα παρουσιάζουν μία ποικιλία μορφολογικών αλλαγών, όπως μεταβολές στο μέγεθος και στο σχήμα του κυτταροπλάσματος και του πυρήνα. Η τραχηλική ενδοθηλιακή νεοπλασία είναι ένας όρος που χρησιμοποιείται για μη φυσιολογικά ευρήματα. Η “νεοπλασία” δείχνει την ανώμαλη ανάπτυξη των κυττάρων και ο όρος “ενδοθηλιακός” αναφέρεται στο στρώμα των κυττάρων που σχηματίζει την επιφάνεια του τραχήλου της μήτρας. Ο όρος CIN, μαζί με έναν αριθμό (1 έως 3), περιγράφει πόσα μη φυσιολογικά κύτταρα επενδύουν το εσωτερικό του τραχήλου της μήτρας. Παρόλα αυτά η ευαισθησία των κυτταρολογικών εξετάσεων ποικίλλει σημαντικά και εξαρτάται κυρίως από την εμπειρία των κυτταρολόγων και τον ποιοτικό έλεγχο που εφαρμόζεται σε κάθε εργαστήριο. Για ένα επίχρισμα το οποίο θα είναι κατάλληλο για βάσιμα συμπεράσματα απαιτείται πυελική εξέταση, ένα ικανό δείγμα επιθηλιακών κυττάρων, σωστή μονιμοποίηση των κυττάρων καθώς και σωστή κυτταροπαθολογική επεξεργασία και εκτίμηση από τον κυτταρολόγο ιατρό. Ακόμη και αν όλοι οι παραπάνω παράμετροι τηρηθούν από το επίχρισμα ανιχνεύονται μόνο το 15 – 50% των HPV λοιμώξεων.

9.3 Μοριακές τεχνικές για την διάγνωση HPV

Οι μοριακές τεχνικές είναι σε θέση να ανιχνεύσουν το DNA των HPV στα επιθηλιακά κύτταρα. Μία από αυτές είναι η τεχνική Hybrid Capture^[2] η οποία είναι η πιο συχνή μοριακή τεχνική που χρησιμοποιείται σε διαγνωστικά εργαστήρια. Η τεχνική Hybrid Capture είναι εγκεκριμένη από την FDA για την ανίχνευση HPV. Στις μέρες μας χρησιμοποιείται η τεχνική Hybrid Capture δεύτερης γενιάς η οποία ανιχνεύει 13 τύπους “υψηλής επικινδυνότητας” (HPV-16, 18,31, 33, 35, 39, 45, 51, 56, 58, 59, 68) και 5 τύπους “χαμηλής επικινδυνότητας” (HPV-6, 11, 42, 43, 44). Κατά τη διάρκεια της τεχνικής το DNA στόχος υβριδίζεται με DNA ανιχνευτές οι οποίοι είναι συμπληρωματικοί με γενωμικές αλληλουχίες των ιών που αναφέρθηκαν παραπάνω. Το παραγόμενο σήμα μετράται με χημειοφωταύγεια και εκφράζεται σε μονάδες φωτός ανιχνεύοντας την παρουσία των HPV.

Επίσης, PCR με ειδικούς εκκινητές ειδικούς για κάθε τύπο ιού υψηλού κινδύνου σε μονή (single) ή πολλαπλή (multiplex) αντίδραση μπορεί να χρησιμοποιηθεί. Οι PCR που χρησιμοποιούν εκκινητές που ενισχύουν την συντηρημένη περιοχή L1 του ιού χρησιμοποιούνται ευρέως σε κλινικές μελέτες. Τέτοια συστήματα ενίσχυσης για την ανίχνευση των HPV είναι η PCR με συνδυασμό εκκινητών MY09/MY11 (MY-PCR) και η PCR με GP5+/GP6+. Το δύο αυτά συστήματα έχουν περίπου την ίδια ευαισθησία αλλά διαφέρουν στην αξιοπιστία ανίχνευσης σε κάποιους τύπους HPV. Γενικά το σύστημα MY09/MY11 φαίνεται να είναι πιο αξιόπιστο για τον εντοπισμό πολλαπλών μολύνσεων.

Μια σημαντική μέθοδος για την ανίχνευση και την ταυτοποίηση των HPV είναι η Nested Multiplex PCR.^[11] Για την πραγματοποίηση της διαδικασίας αυτής χρησιμοποιούνται εκκινητικά μόρια, τα οποία είναι σχεδιασμένα με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε να ενισχύουν τις περιοχές των ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης των ογκογονιδίων E6 και E7 των πιο συχνά εμφανιζόμενων γονοτύπων HPV υψηλού κινδύνου. Από την διαδικασία δημιουργείται ένας σημαντικός αριθμός αντιγράφων των γονιδίων E6 και E7, με αποτέλεσμα να υπάρχει αρκετά διαθέσιμο υλικό για να ενισχυθεί ξανά το προϊόν της PCR αυτής με Nested Multiplex PCR. Στην Nested Multiplex PCR χρησιμοποιούνται εν συνεχεία τύπο-ειδικά εκκινητικά μόρια, τα οποία είναι σχεδιασμένα έτσι ώστε να μπορούν να ενισχύουν ειδικά για κάθε τύπο HPV το εσωτερικό τμήμα των ήδη ενισχυμένων από την πρώτη PCR ογκογονιδίων E6 και E7. Με αυτόν τον τρόπο είναι δυνατόν να γίνει η ακριβής ταυτοποίηση του ιού.

Η ποσοτική Real-Time PCR^[12] κατά την οποία μετρείται το ιικό φορτίο είναι μία άλλη μέθοδος ανίχνευσης των HPV. Οι ανιχνευτές και τα τύπο-ειδικά εκκινητικά μόρια της μεθόδου είναι σχεδιασμένα, έτσι ώστε να ανιχνεύουν και να ενισχύουν ειδικά για κάθε τύπο ιού τα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης των ογκογονιδίων E6-E7 των HPV υψηλής επικινδυνότητας. Τα γονίδια αυτά είναι αρκετά συντηρημένα ανάμεσα στους ογκογόνους τύπους των HPV και παραμένουν άθικτα και στην επισωμική μορφή και στην ενσωματωμένη τους μορφή στο γένωμα του ξενιστή. Εκτός από την υπερβολική ευαισθησία και επαναληψιμότητα της μεθόδου η διαδικασία της real time PCR δίνει την δυνατότητα στον χρήστη να παρακολουθεί την αντίδραση της PCR σε πραγματικό χρόνο.

10. Ανοσολογία των HPV^[2]

Η μόλυνση από HPV μπορεί να μην είναι μόνιμη καθώς στο 70% των γυναικών ο ιός απομακρύνεται μέσα σε ένα χρόνο προτείνοντας ότι το ανοσοποιητικό σύστημα εκτελεί έναν σημαντικό ρόλο στην απομάκρυνση του ιού. Ωστόσο, η ανοσοαπάντηση κατά των HPV είναι ασθενής και διάφορες έρευνες, χρησιμοποιώντας μόρια που μοιάζουν με τους HPV (VLPs) έχουν αποδείξει ότι τα αντισώματα ανιχνεύονται σχεδόν εννέα μήνες μετά από την μόλυνση με τον ιό. Άλλες έρευνες έχουν δείξει ότι γυναίκες που νοσούν από HIV έχουν περισσότερες πιθανότητες να μολυνθούν από HPV και να αναπτύξουν δυσπλασίες λόγω του αδύναμου ανοσοποιητικού συστήματος που διαθέτουν.

Κατά τη διάρκεια την ανοσοαπάντησης έναντι των HPV τα κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα είναι εκείνα που αναλαμβάνουν την παραγωγή των αντισωμάτων έναντι των ιικών E6 και E7 πεπτιδίων.

11. Θεραπεία των HPV^[2]

Η θεραπεία για νεοπλασίες στον τράχηλο της μήτρας εξαρτάται από το στάδιο της ασθένειας. Οι μη επιθετικές μορφές καρκίνου θεραπεύονται με αφαιρετικές μεθόδους όπως η κρυοθεραπεία, η κρυοπηξία και η θεραπεία χρησιμοποιώντας laser. Στην κρυοθεραπεία, χρησιμοποιείται ένα όργανο για να παγώσει τους μη φυσιολογικούς ιστούς και να τους καταστρέψει. ο επιθετικός καρκίνος που όμως βρίσκεται σε πρώιμη φάση θεραπεύεται με ριζική υστερεκτομή ή ακτινοθεραπεία. Ο προχωρημένος καρκίνος σε ασθενείς θεραπεύεται με ακτινοθεραπεία και χημειοθεραπεία αλλά και με αφαιρετικές μεθόδους. Ωστόσο, η πλήρης εξάλειψη των καρκινικών κυττάρων από τον τράχηλο σε προχωρημένα στάδια του καρκίνου είναι σχεδόν αδύνατη.

12. Πρόληψη ενάντια στους HPV^[2]

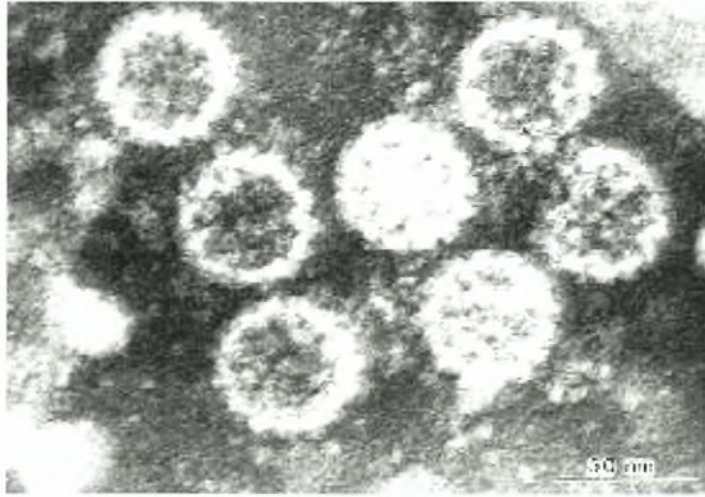
Εμβόλια ενάντια στους HPV

Υπάρχουν δύο είδη εμβολίων που χρησιμοποιούνται ενάντια στην μόλυνση από HPV, τα προληπτικά εμβόλια και τα θεραπευτικά εμβόλια.

12.1 Προληπτικά εμβόλια

Τα εμβόλια αυτά αποτελούνται από μόρια που μοιάζουν με ιούς (virus-like particles, VLPs) τα οποία αποτελούνται από τις καψιδικές πρωτεΐνες του ιού L1 και L2 αλλά δεν περιέχουν καθόλου DNA για να είναι επικίνδυνα (*Εικόνα 6*). Τα εμβόλια αυτά προλαμβάνουν την μόλυνση από HPV προκαλώντας την παραγωγή αντισωμάτων έναντι των ιών από του οποίους προέρχονται οι L1 και L2 πρωτεΐνες.

Δύο είδη εμβολίων χρησιμοποιούνται, τα δισθενή εμβόλια τα οποία είναι δραστικά έναντι των HPV 16 και 18 και τα τετρασθενή εμβόλια τα οποία είναι δραστικά έναντι των HPV 6,11,16 και 18.



Εικόνα 6: φωτογραφία από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο στην οποία απεικονίζονται μόρια που μοιάζουν με ιούς (VLPs) τα οποία κατασκευάστηκαν *in vitro*^[10].

Για την πλήρη δράση του εμβολίου αποτελούνται 3 δόσεις, με την δεύτερη δόση μετά από 2 μήνες μετά την αρχική δόση και την τρίτη δόση μετά από 6 μήνες μετά από την αρχική δόση. Το εμβόλιο είναι εξαιρετικά αποτελεσματικό σε γυναίκες που δεν έχουν εκτεθεί σε HPV, για αυτό το λόγο συνίσταται το εμβόλιο να πραγματοποιείται πριν οι γυναίκες να γίνουν σεξουαλικά ενεργές. Το εμβόλιο προσφέρει προστασία για τουλάχιστον 5.5 χρόνια ενώ διάφορες μελέτες πραγματοποιούνται ακόμη για να καθοριστεί αν ακόμη μία ενισχυτική δόση απαιτείται.

Αξίζει να σημειωθεί ότι ακόμη και μετά την χορήγηση του εμβολίου, η τακτική εξέταση καθώς και η πραγματοποίηση ενός test PAP είναι επιτακτική ανάγκη διότι δεν προστατεύει από όλους του τύπους HPV οι οποίοι προκαλούν καρκίνο του τραχήλου της μήτρας.

12.2 Θεραπευτικά εμβόλια

Τα θεραπευτικά εμβόλια χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία των ήδη μολυσμένων ασθενών με HPV. Οι ογκοπρωτεΐνες E6 και E7 αποτελούν τον στόχο των θεραπευτικών εμβολίων καθώς όταν εκφράζονται, βοηθούν τον κύκλο ζωής του ιού και η παρουσία τους είναι απαραίτητη για να διατηρηθεί ο κυτταρικός μετασχηματισμός των κυττάρων. Σε πολλές μελέτες έχει αναφερθεί ότι εμβολιασμός

με ένα μεγάλο μέρος της E7 πρωτεΐνης του HPV 16 αποσπά μία ισχυρή ανοσοαπάντηση τόσο από CD4 T λεμφοκύτταρα όσο και από CD8 κύτταρα.

13. Παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη καρκίνου του τραχήλου της μήτρας^[13-14]

Σε αυτό το σημείο είναι σημαντικό να αναφερθεί πως η μόλυνση από κάποιον τύπο HPV δεν οδηγεί απόλυτα σε καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Όπως και άλλοι τύποι καρκίνου, έτσι και ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας είναι μία πολύσταδιακή ασθένεια και το ξεκίνημα της μπορεί να οφείλεται σε διάφορους παράγοντες. Πολλοί παράγοντες κινδύνου έχουν αναφερθεί, όπως ο τρόπος ζωής, οι κοινωνικές συνθήκες και διάφορες φαρμακευτικές ουσίες.

Κάποιες γυναίκες αντιμετωπίζουν μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του τραχήλου της μήτρας από άλλες. Στη συνέχεια αναφέρονται παράγοντες που αυξάνουν την πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου του τραχήλου της μήτρας στις γυναίκες.

- **Ηλικία:** Ο κίνδυνος τού καρκίνου του τραχήλου της μήτρας είναι υψηλότερος σε γυναίκες που βρίσκονται σε όψιμη εφηβεία έως και την ηλικία των 35 ετών περίπου. Κοπέλες μικρότερες των 15 ετών σπάνια εμφανίζουν καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Μετά την ηλικία των 40 ετών, ο κίνδυνος για τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας τυπικά δεν αυξάνεται αλλά ούτε και μειώνεται. Γυναίκες όλων των ηλικιών μπορούν να εμφανίσουν καρκίνο του τραχήλου της μήτρας ακόμη και μετά την εμμηνόπαυση. Επιπλέον, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι οι γυναίκες θα πρέπει να υποβάλλονται σε test Παπανικολάου ετησίως σε τακτά χρονικά διαστήματα ανάλογα με την ηλικία τους.
- **Φυλή:** Έχει παρατηρηθεί ότι στην Αμερική ο αριθμός των γυναικών που πεθαίνουν εξαιτίας του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας είναι μεγαλύτερος από ότι σε οποιαδήποτε άλλη χώρα. Άλλες φυλές με υψηλή θνησιμότητα

εξαιτίας του καρκίνου της μήτρας είναι γυναίκες από την Ισπανία και την Αφρική. Οι ερευνητές πιστεύουν ότι η μεγάλη θνησιμότητα σε αυτούς τους πληθυσμούς οφείλεται στην χαμηλή οικονομική τους κατάσταση και στην μικρότερη πιθανότητα που υπάρχει να υποβληθούν σε γυναικολογική εξέταση και να διεξαχθεί από τον γυναικολόγο το test Παπανικολάου. Το test Παπανικολάου αυξάνει την πιθανότητα της έγκαιρης ανίχνευσης σε προκαρκινωματώδες στάδιο ή σε πολύ πρώιμα καρκινικά στάδια στα οποία η θεραπεία είναι πιο αποτελεσματική.

- **Σεξουαλική αγωγή:** Γυναίκες με πρόιμη έναρξη της σεξουαλικής ζωής (πριν από την ηλικία των 16) αντιμετωπίζουν μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας από τις γυναίκες που καθίστανται σεξουαλικά ενεργές σε μεγαλύτερη ηλικία. Στην ίδια κατηγορία μπορεί να συμπεριληφθεί και ένας άλλος παράγοντας, η εναλλαγή πολλών ερωτικών συντρόφων η οποία αυξάνει κατά κύριο λόγο την μόλυνση από HPV.
- **HPV:** Συγκεκριμένοι τύποι HPV αυξάνουν τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Η μόλυνση από HPV είναι ένα συνιθισμένο σεξουαλικά μεταδιδόμενο νόσημα το οποίο προσβάλλει άντρες και γυναίκες. Υπάρχουν πάνω από 80 τύποι HPV για τους οποίους δεν υπάρχει κάποιος κίνδυνος για τα άτομα που τους φέρουν. Παρ' όλα αυτά κάποιοι τύποι HPV, όπως ο HPV 16 και HPV 18 μπορούν να προκαλέσουν κυτταρικές αλλοιώσεις οι οποίες να οδηγήσουν σε καρκίνο του τραχήλου της μήτρας.
- **Κάπνισμα:** Όπως και άλλοι τύποι καρκίνου, έτσι και σε αυτήν την περίπτωση το κάπνισμα συμβάλει στην ανάπτυξη του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Έχουν βρεθεί διάφορα παραπροϊόντα του καπνού στη βλέννα του τραχήλου γυναικών οι οποίες καπνίζουν και πιστεύεται από τους ερευνητές ότι αυτά τα παραπροϊόντα καταστρέφουν το DNA των κυττάρων του τραχήλου, αυξάνοντας τον κίνδυνο για την ανάπτυξη του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας.

- **HIV:** Ο ιός που προκαλεί το AIDS αυξάνει, επίσης, τον κίνδυνο για την ανάπτυξη καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Αυτό συμβαίνει διότι ο HIV καταστρέφει το ανοσοποιητικό σύστημα του οργανισμού, καθιστώντας πιο εύκολη τη μόλυνση των HPV στις γυναίκες αυτές. Ο HIV μπορεί, επίσης, να επιταχύνει το ρυθμό με τον οποίο τα προ-καρκινικά κύτταρα μετασχηματίζονται σε καρκινικά.
- **DES:** Η δισαιθυλο-στιλβοϊστρόλη (DES), ένα ορμονικό φάρμακο που χορηγήθηκε σε γυναίκες μεταξύ 1940-1971 έχει βρεθεί ότι προάγει την ανάπτυξη του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας στις κόρες αυτών των γυναικών. Το συγκεκριμένο φάρμακο δεν χορηγείται πια.
- **Δίαιτα:** Υπάρχει κάποια σύνδεση ανάμεσα στην διαίτα και στον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Πιο συγκεκριμένα, η είσοδος στον οργανισμό σημαντικών ποσοτήτων ιχνοστοιχείων όπως η καροτίνη, η βιταμίνη C και η βιταμίνη E μπορούν να μειώσουν τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του τραχήλου της μήτρας.
- **Χρήση αντισυλληπτικών χαπιών:** Διάφορες μελέτες έχουν διεξαχθεί για να τεκμηριωθεί η σχέση μεταξύ της χρήσης αντισυλληπτικών χαπιών και της εμφάνισης του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Σύμφωνα με το National Cancer Institute, υπάρχει συσχέτιση ανάμεσα στην μακρόχρονη λήψη αντισυλληπτικών χαπιών (περισσότερο από 5 χρόνια) και στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Ωστόσο, η συσχέτιση αυτή παραμένει ακόμη σε μεγάλο βαθμό ασαφής εξαιτίας της δυσκολίας να διευκρινιστεί αν είναι ο συγκεκριμένος παράγοντας που αυξάνει την εμφάνιση του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας και όχι κάποιος άλλος.
- **Οικογενειακό ιστορικό:** Κάποιες οικογένειες δείχνουν υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Κάποιοι ερευνητές πιστεύουν ότι είναι πιθανό να μεταφέρουν μία γενετική κατάσταση που τους κάνει περισσότερο ευαίσθητους στις αρνητικές επιπτώσεις των HPV.

14. Υλικά και Μέθοδοι

14.1 Κλινικά δείγματα

Συνολικά 121 σετ δειγμάτων συλλέχθηκαν από κέντρα υγείας της Θεσσαλίας αλλά και από τα εξωτερικά ιατρεία του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας. Τα 67 σετ δειγμάτων αποτελούνται από τραχηλικά, κοιλικά και δείγματα ούρων, τα 44 από δείγματα κοιλικών και ούρων ενώ τα 10 από δείγματα τραχηλικού και κοιλικού. Τα δείγματα ούρων που χρησιμοποιήθηκαν για την παρούσα μελέτη ήταν από την αρχή της ούρησης ενώ τα κοιλικά και τραχηλικά δείγματα ελαιωρήθηκαν σε 1 ml phosphate-buffer saline (PBS).πριν την απομόνωση του DNA τα δείγματα διατηρήθηκαν στους 4° C.

14.2 Προετοιμασία DNA

Κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας των δειγμάτων των ούρων, 5 ml φυγοκεντρήθηκαν σε 2000 x g για 5 min, τα ίζημα επαναδιαλύθηκαν και 0,5 ml εξετάστηκαν στο μικροσκόπιο για την παρουσία επιθηλιακών κυττάρων, λευκών αιμοσφαιρίων και ερυθροκυττάρων. Στη συνέχεια ακολούθησε απομόνωση του DNA από το κάθε ένα από τα δείγματα.

Η εξαγωγή DNA είναι μία διαδικασία ρουτίνας στην οποία συλλέγεται DNA, για επακόλουθη χρήση σε μοριακή ανάλυση. Υπάρχουν τρία βασικά στάδια στην εξαγωγή DNA, οι λεπτομέρειες των οποίων μπορεί να διαφέρουν ανάλογα με τον τύπο του δείγματος και οποιεσδήποτε ουσίες μπορεί να παρεμβαίνουν στην εξαγωγή και στην περαιτέρω ανάλυση. ^[15]

- Άνοιγμα των κυττάρων με μηχανική τριβή (grinding) ή καταστροφή με υπερήχους (sonication) και αφαίρεση των μεμβρανικών λιπιδίων με πρόσθεση ενός απορρυπαντικού.
- Αφαίρεση των κυτταρικών πρωτεϊνών και των ιστονών που είναι προσδεμένες στο DNA, προσθέτοντας μία πρωτεάση, με καθίζηση με sodium ή ammonium acetate ή με την χρήση του βήματος της φαινόλης/χλωροφόρμιου.
- Καθίζηση του DNA σε ψυχρή αιθανόλη ή ισοπροπανόλη

Πρωτόκολλο του DNA extraction

Για την εξαγωγή του DNA χρησιμοποιήθηκε Kit της Qiagen που ονομάζεται Qiaamp DNA Mini Kit. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

Αρχικά μεταφέρω 200 μl από το δείγμα μου σε ένα tube και προσθέτω 180 μl ATL Buffer. Προσθέτω 20μl Proteinase K, κάνω vortex και επωάζω στους 56°C για 2h. Κάνω vortex στο ενδιάμεσο για να επιτευχθεί η λύση. Στη συνέχεια, προσθέτω 200μl AL Buffer. Κάνω vortex για 15sec (είναι σημαντική η ομογενοποίηση του μείγματος) και επωάζω στους 70°C για 10min. Κάνω spin και έπειτα, προσθέτω 200μl απόλυτης αιθανόλης και κάνω vortex για 15sec (είναι σημαντική η ομογενοποίηση του μείγματος). Μεταφέρω το δείγμα μαζί με το ίζημα σε μία QIAamp Spin στήλη μέσα σε 2ml collection tube και φυγοκεντρώ για 1min στις 8000rpm (rounds per meter, στροφές). Αλλάζω collection tube και προσθέτω 500μl AW1 Buffer στη στήλη και φυγοκεντρώ για 1min στις 8000rpm. Αδειάζω το collection tube και προσθέτω 500μl AW2 Buffer στη στήλη και φυγοκεντρώ για 3min στη μέγιστη ταχύτητα. Αδειάζω το collection tube και φυγοκεντρώ για 1min στη μέγιστη ταχύτητα ώστε να αποφύγω υπολείμματα του AW2 Buffer που μπορεί να δημιουργήσουν προβλήματα σε ακόλουθες αντιδράσεις. Τοποθετώ την στήλη σε 1.5ml tube και προσθέτω 200μl AE Buffer ή dH₂O. Επωάζω σε RT (Room Temperature) για 5min και φυγοκεντρώ για 1min στις 8000rpm. Στη συνέχεια, απομακρύνω την στήλη και συλλέγω το DNA που έχω απομονώσει σε tubes των 1.5 ml.

14.3 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) ^[16]

Η PCR χρησιμοποιείται για να ενισχυθεί ένα μικρό, καλά προσδιορισμένο τμήμα ενός κλώνου DNA. Αυτό το τμήμα μπορεί να είναι ένα απλό γονίδιο, ή απλά ένα τμήμα ενός γονιδίου. Σε αντίθεση με τους ζωντανούς οργανισμούς, η τεχνική της PCR μπορεί να αντιγράψει μόνο μικρά τμήματα DNA, συνήθως μέχρι 10 kb. Συγκεκριμένες μέθοδοι μπορούν να αντιγράψουν τμήματα μεγέθους μέχρι 47kb, που όμως δεν παύει να είναι πολύ μικρότερο από το χρωμοσωμικό DNA ενός ευκαρυωτικού κυττάρου. Για παράδειγμα, ένα ανθρώπινο κύτταρο περιέχει περίπου τρία δισεκατομμύρια ζεύγη βάσεων.

Η πραγματοποίηση μίας PCR απαιτεί τα παρακάτω συστατικά:

- Τον κλώνο DNA, που περιέχει την περιοχή του τμήματος DNA που θα ενισχυθεί
- Δύο εκκινητές, που προσδιορίζουν την αρχή και το τέλος της περιοχής που θα ενισχυθεί
- Την Taq πολυμεράση, μία DNA πολυμεράση, που αντιγράφει την περιοχή που θα ενισχυθεί
- Τριφωσφορικά - δεοξυριβονουκλεοτίδια (deoxynucleotides-triphosphate, dNTP's) από τα οποία η DNA πολυμεράση χτίζει το νέο DNA
- Διάλυμα (buffer), που παρέχει το κατάλληλο χημικό περιβάλλον για την βέλτιστη λειτουργία της DNA πολυμεράσης.

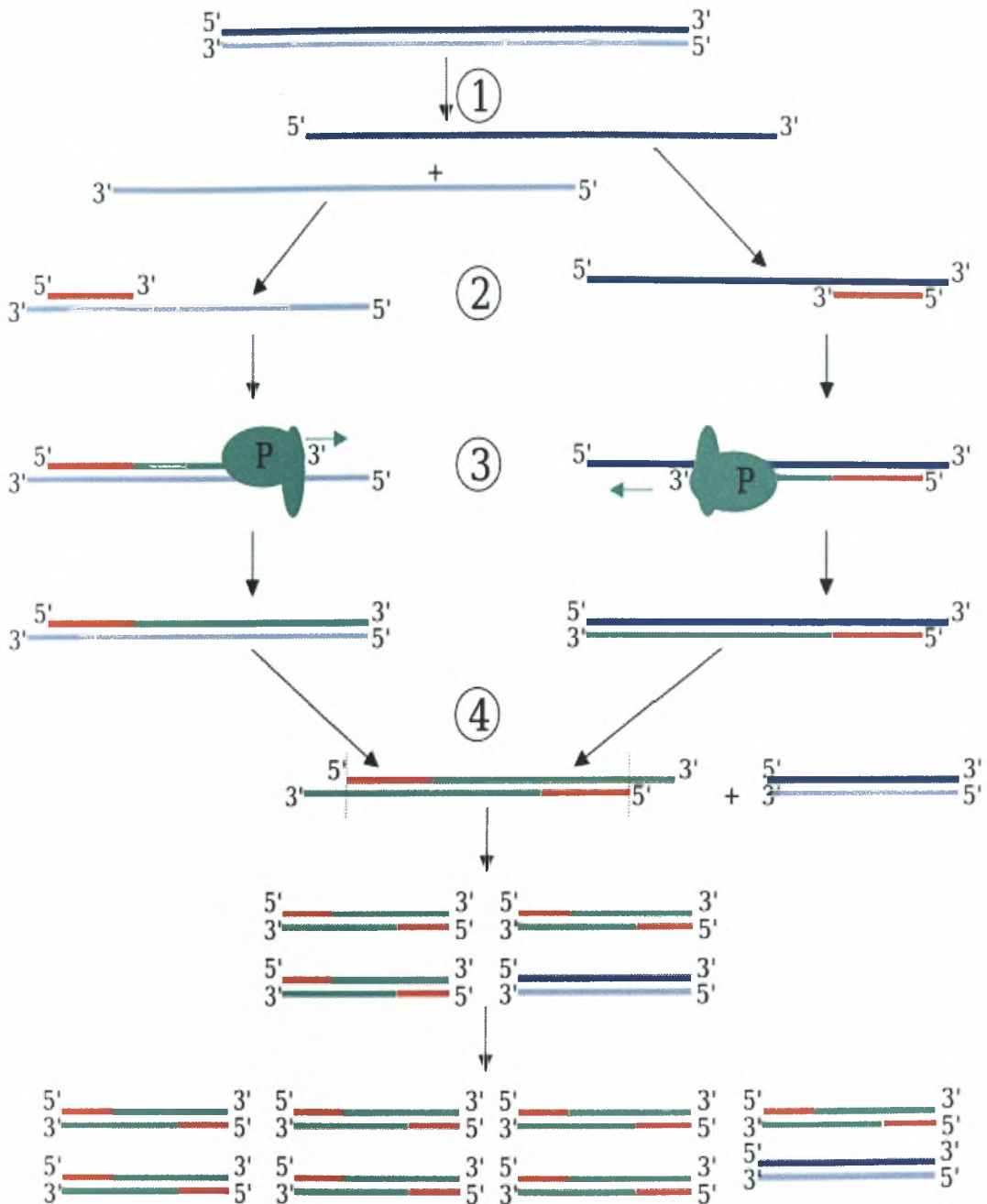
Η τεχνική της PCR εκτελείται μέσα σε έναν θερμοκυκλοποιητή (thermal cycler). Αυτή είναι μία μηχανή που θερμαίνει και ψύχει τους σωλήνες αντιδράσεων αγγίζοντας έτσι τις κατάλληλες θερμοκρασίες για κάθε βήμα της αντίδρασης. Για να αποφευχθεί η εξάτμιση του μείγματος της αντίδρασης (τυπικοί όγκοι μεταξύ 15-100μl ανά σωλήνα), ένα θερμαινόμενο καπάκι τοποθετείται πάνω από τους σωλήνες αντίδρασης ή μία στρώση λαδιού μπαίνει στην επιφάνεια του μείγματος της αντίδρασης.

Η διαδικασία της PCR συνήθως αποτελείται από μία σειρά από είκοσι έως τριάντα πέντε κύκλους. Κάθε κύκλος αποτελείται από τρία βήματα.

1. Το δίκλωνο DNA πρέπει να θερμανθεί στους 94-96⁰C (ή στους 98⁰C αν χρησιμοποιείται μία ιδιαίτερα θερμοσταθερή πολυμεράση) έτσι ώστε να διαχωριστούν οι κλώνοι. Αυτό το στάδιο ονομάζεται *αποδιάταξη* (denaturation). Σπάνε οι δεσμοί υδρογόνου που συνδέουν τους δύο κλώνους του DNA. Πριν από το πρώτο βήμα, το DNA συχνά αποδιατάσσεται για εκτεταμένο χρόνο έτσι ώστε να διασφαλιστεί ότι οι κλώνοι του DNA αλλά και οι εκκινητές έχουν διαχωριστεί και είναι όλοι μονόκλωνοι. Χρόνος: συνήθως 1-2 λεπτά, αλλά μπορεί να φτάσει μέχρι και 5 λεπτά. Επίσης μερικές πολυμεράσες ενεργοποιούνται σε αυτό το στάδιο.

2. Αφού αποχωριστούν οι κλώνοι του DNA, η θερμοκρασία μειώνεται για να προσδεθούν οι εκκινητές σε μονόκλωνο DNA. Το στάδιο αυτό ονομάζεται *υβριδισμός* (annealing). Η θερμοκρασία στο στάδιο αυτό εξαρτάται από τους εκκινητές και είναι συνήθως 5°C χαμηλότερα από την θερμοκρασία τήξης τους (45-60°C). Μία λάθος θερμοκρασία στην διάρκεια του σταδίου του υβριδισμού μπορεί να καταλήξει στην μη πρόσδεση των εκκινητών στο DNA ή στην τυχαία πρόσδεσή τους. Χρόνος: 1-2 λεπτά.

3. Τέλος, η DNA πολυμεράση πρέπει να αντιγράψει του κλώνους του DNA. Ξεκινάει από τον υβριδισμένο εκκινητή και συνεχίζει κατά μήκος του κλώνου του DNA. Το στάδιο αυτό ονομάζεται *επιμήκυνση* (elongation). Η θερμοκρασία επιμήκυνσης εξαρτάται από τις πολυμεράσες. Ο χρόνος αυτού του σταδίου εξαρτάται τόσο από την πολυμεράση όσο και από το μήκος του τμήματος του DNA που θα ενισχυθεί. Ένας απλός εμπειρικός κανόνας που ακολουθείται σε αυτή την περίπτωση είναι 1 λεπτό ανά 1000 ζεύγη βάσεων. Ένα τελικό στάδιο επιμήκυνσης χρησιμοποιείται συχνά μετά τον τελευταίο κύκλο για να διασφαλιστεί η αντιγραφή των τελευταίων μονόκλωνων DNA. Αυτό διαφέρει από τα άλλα στάδια επιμήκυνσης, μόνο στο ότι είναι πιο παρατεταμένο, συνήθως 10-15 λεπτά.



Εικόνα .6. Σχηματική απεικόνιση του κύκλου της PCR (1) Αποδιάταξη στους $94-96^{\circ}\text{C}$. (2) Υβριδισμός στους (π.χ.) 68°C . (3) Επιμήκυνση στους 72°C (P =Polymerase=Πολυμεράση). (4) Ο πρώτος κύκλος έχει ολοκληρωθεί. Οι δύο νέοι κλώνοι θα αποτελέσουν το εκμαγείο για τον επόμενο κύκλο, διπλασιάζοντας έτσι την ποσότητα του DNA που αντιγράφεται σε κάθε νέο κύκλο.

Βελτιστοποίηση της PCR ^[16]

Αφού η PCR είναι μία ιδιαίτερα ευαίσθητη διαδικασία, πρέπει να παρθούν επαρκή μέτρα αποφυγής επιμόλυνσης από άλλα DNA που είναι παρόντα στο περιβάλλον του εργαστηρίου (βακτήρια, ιοί, το δικό μας DNA). Επίσης, η προετοιμασία του δείγματος DNA, η συλλογή του μείγματος της αντίδρασης και η διαδικασία της PCR πρέπει να τελούνται σε διαφορετικούς χώρους. Για την προετοιμασία του μείγματος της αντίδρασης ένα laminar flow cabinet με λάμπα UV συνίσταται. Καινούρια γάντια πρέπει να χρησιμοποιούνται σε κάθε στάδιο της PCR όπως επίσης και αντικατάσταση των ακρορυγχίων (tips) στις πιπέτες. Τα αντιδραστήρια της PCR πρέπει να προετοιμάζονται ξεχωριστά και να χρησιμοποιούνται μόνο για αυτό τον σκοπό. Τα aliquots των δειγμάτων DNA πρέπει να αποθηκεύονται ξεχωριστά από τα ίδια τα δείγματα. Μία αντίδραση ελέγχου (εσωτερικός έλεγχος), πρέπει πάντα να εκτελείται, για να πιστοποιηθεί η απουσία επιμόλυνσης ή σχηματισμού πολυμερών εκκινητή.

Δυσκολίες που αντιμετωπίζονται κατά την διενέργεια της PCR^[16]

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης δεν είναι τέλεια και σφάλματα και λάθη μπορούν να συμβούν. Αυτά είναι τα πιο κοινά σφάλματα και προβλήματα που μπορεί να προκύψουν.

➤ Σφάλματα πολυμεράσης

Η Taq πολυμεράση στερείται 3'-5' εξωνουκλεολυτική δράση. Έτσι είναι αδύνατο για αυτή να εξετάζει τις βάσεις που έχει τοποθετήσει και να τις αφαιρεί αν αυτές είναι λάθος, μία διαδικασία κοινή στους ανώτερους οργανισμούς. Αυτό καταλήγει σε υψηλά ποσοστά σφαλμάτων, περίπου 1 στις 10000 βάσεις. Έτσι αν ένα λάθος προκύψει νωρίς, μπορεί να τροποποιήσει μεγάλες ποσότητες του τελικού προϊόντος.

Άλλες πολυμεράσες είναι διαθέσιμες για ακρίβεια σε κρίσιμες χρήσεις όπως είναι η ενίσχυση τμήματος DNA για αλληλούχιση. Παραδείγματα πολυμερασών με 3'-5' εξωνουκλεολυτική δράση συμπεριλαμβάνουν τις: KOD DNA πολυμεράση, μία

ανασυνδυασμένη μορφή της *Thermococcus kodakaraensis* KOD1, η Vent που την λαμβάνουμε από το *Thermococcus litoralis*, την Pfu DNA πολυμεράση από το *Pyrococcus furiosus*, και τέλος την Pwo DNA πολυμεράση από το *Pyrococcus woesei*.

➤ **Περιορισμοί μεγέθους**

Η PCR λειτουργεί άρτια με DNA μήκους δύο έως και τριών χιλιάδων ζευγών βάσεων, αλλά πάνω από αυτό το μήκος η πολυμεράση έχει την τάση να πέφτει από το DNA και ο τυπικός κύκλος θέρμανσης δεν αφήνει αρκετό χρόνο για την επιμήκυνση να ολοκληρωθεί. Είναι πιθανό να ενισχυθούν μεγαλύτερα τμήματα ως και 50000 ζεύγη βάσεων, με έναν πιο αργό κύκλο θέρμανσης και με ειδικές πολυμεράσες. Αυτές οι ειδικές πολυμεράσες είναι συχνά πολυμεράσες συντηγημένες με μία πρωτεΐνη που προσδένεται στο DNA, κάνοντας αυτές έτσι ικανές κυριολεκτικά να κολλάνε πάνω στο DNA για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα.

➤ **Μη ειδικοί εκκινητές**

Η μη ειδική πρόσδεση των εκκινητών αποτελεί πάντα μία πιθανότητα λόγω της ύπαρξης πανομοιότυπων αλληλουχιών, της μη ειδικής πρόσδεσης και της μερικής πρόσδεσης των εκκινητών αφήνοντας το 5' άκρο αδέσμευτο. Αυτό αυξάνεται από την χρήση εκφυλισμένων αλληλουχιών ή βάσεων ή εκκινητών. Χειρισμός της θερμοκρασίας υβριδισμού και της συγκέντρωσης των ιόντων μαγνησίου (που σταθεροποιούν τις αλληλεπιδράσεις του DNA και του RNA) μπορούν να αυξήσουν την ειδικότητα. Η μη ειδική εκκίνηση μπορεί να αποφευχθεί κατά τις χαμηλές θερμοκρασίες της προετοιμασίας της αντίδρασης με χρήση της hot-start πολυμεράσης όπου το ενεργό σημείο μπλοκάρεται από ένα αντίσωμα ή κάποιο χημικό που αποκολλάται μόνο όταν η αντίδραση έχει θερμανθεί στους 95°C κατά την διάρκεια του σταδίου της αποδιάταξης στον πρώτο κύκλο. Άλλες μέθοδοι που αυξάνουν την ειδικότητα είναι η Nested PCR και η Touchdown PCR.

Εκκινητές (primers) ^[16]

Το τμήμα DNA που πρόκειται να ενισχυθεί προσδιορίζεται από τους εκκινητές που θα επιλεγθούν. Οι εκκινητές είναι μικροί, τεχνητοί κλώνοι DNA – όχι περισσότερο από 50 και συνήθως μόνο 17 με 30 ζεύγη βάσεων μήκος – που είναι συμπληρωματικοί στην αρχή και στο τέλος του τμήματος DNA που θα ενισχυθεί. Αυτοί προσδένονται στο DNA με το να προσφύονται σε αυτά τα σημεία στην αρχή και στο τέλος, όπου η DNA πολυμεράση προσδένεται και ξεκινάει την σύνθεση του νέου DNA κλώνου.

Η επιλογή του μήκους των εκκινητών και η θερμοκρασία τήξης (melting temperature, T_m) τους εξαρτάται από ένα αριθμό από παράγοντες. Η θερμοκρασία τήξης ενός εκκινητή – δεν πρέπει να συγγέεται με την θερμοκρασία τήξης του DNA στο πρώτο βήμα της διαδικασίας PCR – προσδιορίζεται ως η θερμοκρασία στην οποία τα μισά σημεία πρόσδεσης του εκκινητή έχουν καταληφθεί. Η θερμοκρασία τήξης αυξάνει με το μήκος του εκκινητή. Οι εκκινητές που είναι πολύ μικροί σε μήκος θα είχαν την ικανότητα να προσδεθούν σε πολλές θέσεις πάνω σε ένα μακρύ τμήμα DNA, γεγονός το οποίο θα κατέληγε σε μη ειδικά αντίγραφα. Από την άλλη πλευρά όμως, το μήκος του εκκινητή περιορίζεται από την θερμοκρασία τήξης που απαιτεί. Θερμοκρασίες τήξης που είναι πολύ υψηλές π.χ. πάνω από 80°C , μπορούν να προκαλέσουν προβλήματα αφού η DNA πολυμεράση είναι λιγότερο ενεργή σε τέτοιες θερμοκρασίες. Το βέλτιστο μήκος ενός εκκινητή γενικά είναι από 17 έως 30 νουκλεοτίδια με μία θερμοκρασία τήξης ανάμεσα στους 55°C και 65°C .

Οι παραπάνω παράγοντες κάνουν τον σχεδιασμό των εκκινητών μία διαδικασία ακριβείας, το προϊόν της οποίας βασίζεται στα εξής:

- Το περιεχόμενο σε GC (GC content) πρέπει να είναι ανάμεσα στο 40-60%
- Το υπολογισμένο T_m και των δύο εκκινητών που χρησιμοποιούνται στην αντίδραση δεν πρέπει να διαφέρει $>5^{\circ}\text{C}$ και το T_m του προϊόντος της ενίσχυσης δεν πρέπει να διαφέρει από τους εκκινητές $>10^{\circ}\text{C}$.

- Η θερμοκρασία πρόσδεσης των εκκινητών είναι συνήθως 5°C χαμηλότερα από την υπολογισμένη χαμηλότερη Tm. Ωστόσο πρέπει να επιλέγεται εμπειρικά για κάθε ξεχωριστή περίπτωση.
- Ατομικές φουρκέτες συμπληρωματικότητας >4 και διμερή >8 πρέπει να αποφεύγονται.
- Η 3' τελική περιοχή είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη περίπτωση – δεν πρέπει να είναι συμπληρωματική με καμία περιοχή του άλλου εκκινητή (ή ακόμη και του ίδιου του εκκινητή) που χρησιμοποιείται στην αντίδραση και πρέπει να παρέχει σωστή συμπληρωματικότητα στο αντίγραφο.

Υπάρχουν προγράμματα στον ηλεκτρονικό υπολογιστή που βοηθούν στον σχεδιασμό των σωστών εκκινητών.

Στην παρούσα μελέτη κάθε σετ δειγμάτων ελέγχθηκε, αρχικά, για την ποιότητά του με βάση την ανίχνευση β-σφαιρίνης στο δείγμα και στη συνέχεια για τους τύπους HPV 16, 18, 31 και 45 σε μονές αντιδράσεις αλλά και για τους τύπους 16, 18, 33, 6 και 11 σε μία multiplex PCR. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στις μονές αντιδράσεις PCR παρουσιάζονται στον πίνακα 1 ενώ οι εκκινητές για την β-σφαιρίνη στον πίνακα 2. το kit το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τη multiplex PCR είναι το MPCR Kits For Human Papilloma Viruses από την Maxim Biotech, Inc ενώ οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε μία από τις αντιδράσεις φαίνονται στον πίνακα 3.

Τύπος HPV	Εκκινητές	Αλληλουχία	Ενισχυμένο τμήμα(bp)
HPV 16	L 7012	CCT TAT TGG TTA TTA CAA CGA GCA C	448 bp
	U 6564	GCG TCC TAA AGG AAA CTG ATC TA	
HPV 18	L 6993	CGT CCA AGG GGA TAT TGA TC	445 bp
	U6548	GGT ACA TAA GGC ACA GGG TCA T	
HPV 31	L 6930	GCG ACC CAG TGG AAA CTG ATC TA	441 bp
	U 6490	GAT GCA ACG TGC TCA GGG A	
HPV 45	L 6950	TTA GGT CAA CAG TCC AAA ACT TAA	414 bp
	U6536	TTA ATA AGC CAT ATT GGT TAC A ... AAG	

Πίνακας 1: Εκκινητικά μόρια που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR

Εκκινητές	Αλληλουχία	Ενισχυμένο τμήμα(bp)
BGPC03.1	ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC	509 bp
BGPC07.1	GAA AAC ATC AAG GGT CCC AT	

Πίνακας 2: Εκκινητικά μόρια που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR β- σφαιρίνης

Αντίδραση PCR	Συνθήκες Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης	Ενισχυμένο τμήμα(bp)
PCR για HPV 45	96° C για 45 sec } 49° C για 45 sec } 33 κύκλοι	414 bp
PCRs για HPV 16, HPV 18, HPV 31 και β-σφαιρίνη	94° C για 45 sec } 52° C για 45 sec } 35 κύκλοι 72° C για 1 min	HPV 16: 448 bp HPV 18: 445 bp HPV 31: 441 bp
Multiplex PCR για HPV 6, HPV 11, HPV 16, HPV 18 και HPV 33	96° C για 1 min } 62° C για 4 min } 2 κύκλοι 94° C για 1 min } 62° C για 2 min } 35 κύκλοι	HPV 6: 263 bp HPV 11: 144 bp HPV 16: 601 bp HPV 18: 360 bp

Πίνακας 3: Συνθήκες PCR που χρησιμοποιήθηκαν

11.4 Ηλεκτροφόρηση ^[17]

Ύστερα από την διεξαγωγή της PCR για να λάβουμε τα αποτελέσματα της σε μία μορφή την οποία να μπορούμε να αναλύσουμε ηλεκτροφορούμε το προϊόν της PCR σε gel. Βάση αυτής της τεχνικής διαχωρίζονται σε ένα gel με την βοήθεια ηλεκτρικού δυναμικού διαφορετικού μεγέθους τμήματα DNA. Αυτού του είδους η τεχνική, που βασίζεται στον διαχωρισμό των μορίων DNA μόνο βάσει μεγέθους απαιτεί σχετικά μεγάλες ποσότητες DNA και είναι ανίκανη να διακρίνει μικρές αλλαγές στο μέγεθος ενός DNA μορίου. Το DNA είναι ένα πολύ φορτισμένο μόριο. Οι φωσφορικές ομάδες που σχηματίζουν το σκελετό σακχάρου-φωσφορικής ομάδας σε κάθε κλώνο του DNA παρέχουν ένα μεγάλο βαθμό αρνητικού φορτίου. Ένα μικρό τμήμα DNA θα έχει μικρότερο αρνητικό φορτίο από ένα μεγαλύτερο τμήμα, αφού αυτό περιέχει λιγότερες φωσφορικές ομάδες. Το ολικό φορτίο, όμως, ανά μονάδα μήκους και για το μικρό και για το μεγάλο τμήμα DNA είναι το ίδιο. Έτσι αν εφαρμοζόταν ηλεκτρικό ρεύμα σε ένα δείγμα από μικρό και μεγάλο τμήμα DNA σε ελεύθερο διάλυμα, θα μετακινούνταν και τα δύο προς το θετικό ηλεκτρόδιο (άνοδος) με τον ίδιο ρυθμό, υποθέτοντας ότι η τριβή είναι αμελητέα στο ελεύθερο διάλυμα. Επομένως, ένας μηχανισμός με τον οποίο τα μόρια του DNA θα μπορούσαν να διαχωριστούν θα ήταν να αυξηθεί η ποσότητα της τριβής έτσι ώστε τα μικρά τμήματα DNA να κινούνται προς την άνοδο γρηγορότερα έχοντας το πλεονέκτημα του ότι έχουν λιγότερη τριβή από τα μεγαλύτερα τμήματα DNA. Το τρέξιμο των τμημάτων DNA μέσα από ένα gel μπορεί να παρέχει την απαραίτητη τριβή για τον διαχωρισμό των τμημάτων DNA διαφορετικών μεγεθών.

Gel Αγαρόζης ^[17]

Η αγαρόζη είναι ένα φυσικό κολλοειδές που εξάγεται από τα φύκια. Είναι ένας γραμμικός πολυσακχαρίτης φτιαγμένος από την βασική επαναλαμβανόμενη μονάδα αγαροβιόζης, που αποτελείται από μονάδες γαλακτόζης και 3,6- αφυδρογαλακτόζης. Κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης το gel υποβάλλεται σε ένα συνεχές ηλεκτρικό πεδίο (εύρους 10 V/cm gel) και το DNA κινείται προς το θετικό ηλεκτρόδιο (άνοδος).

Εφόσον τα τμήματα DNA έχουν διαχωριστεί μέσα σε ένα gel αγαρόζης, πρέπει να σηματοδοτηθούν ώστε να γίνουν ορατά. Ο πιο κοινός τρόπος

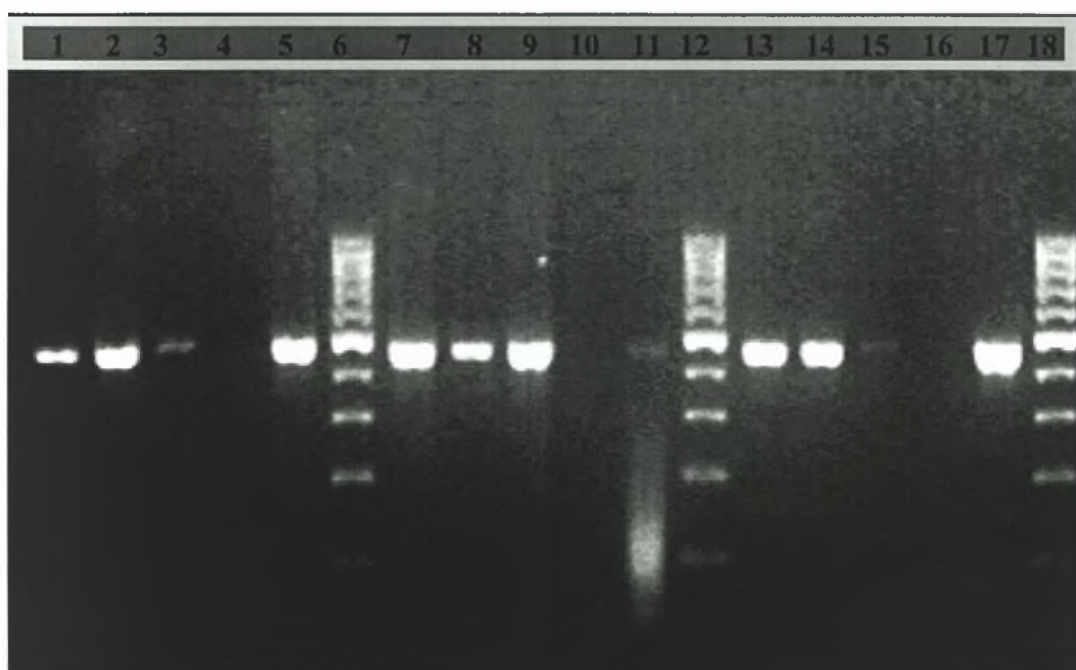
σηματοδότησης των τμημάτων συμπεριλαμβάνει την εμφάνιση του gel σε ένα διάλυμα που περιέχει βρωμιούχο αιθίδιο. Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι ένα επίπεδο δυσδιάστατο μόριο που έχει την δυνατότητα να παρεμβάλλεται ανάμεσα στα στοιβαγμένα ζεύγη βάσεων του DNA. Η πρόσδεση του βρωμιούχου αιθιδίου στο DNA καταλήγει στην διαστροφή της δομής της διπλής έλικας και στην τοπική αποδιάταξη της έλικας. Το βρωμιούχο αιθίδιο μπορεί να προσδεθεί πολύ καλά στο δίκλωνο DNA, αλλά πολύ πιο ασθενώς στο μονόκλωνο DNA και RNA. Η εμφάνιση ενός gel που περιέχει DNA σε βρωμιούχο αιθίδιο θα καταλήξει στην συγκέντρωση του χημικού μέσα στο DNA. Φωτίζοντας το gel αυτό με υπεριώδες φως (260-300nm) καταλήγει στον φθορισμό του βρωμιούχου αιθιδίου, και έτσι το DNA φαίνεται πάνω στο gel σαν μπάντες φθορισμού.

Χρησιμοποιώντας gel αгарόζης επιτυγχάνεται άριστος διαχωρισμός των μορίων DNA εύρους 200 – 15000bp. Οι δύο βασικοί παράγοντες, που ελέγχουν την ταχύτητα με την οποία ένα τμήμα DNA κινείται μέσα σε ένα gel αгарόζης όταν εφαρμόζεται συνεχές ηλεκτρικό ρεύμα, είναι ο μοριακός όγκος (ή μήκος) και το σχήμα του. Γενικώς μικρά τμήματα DNA μετακινούνται γρηγορότερα μέσα σε ένα gel αгарόζης από μεγαλύτερα τμήματα. Ωστόσο, αν παρατηρήσουμε προσεκτικά τον τρόπο με τον οποίο τμήματα DNA γνωστού μήκους τρέχουν μέσα σε ένα gel αгарόζης, μπορούμε να δούμε ότι δεν υπάρχει άμεσα αντίστροφη σχέση ανάμεσα στο μήκος του DNA τμήματος και στην απόσταση που έχει διανυθεί.

Ο δεύτερος σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την κίνηση μέσα στο gel είναι η τοπολογία ή η δομή ενός τμήματος DNA. Για παράδειγμα, το πλασμιδιακό DNA που έχει απομονωθεί από κύτταρα *E. coli* αποτελείται από σταθερά, αρνητικά, υπερελικωμένα μόρια. Αυτές είναι σχετικά συμπαγής δομές που τρέχουν γρήγορα μέσα στα gel αгарόζης. Αν μία έλικα της πλασμιδιακής διπλής έλικας σπάσει (nicked) τότε η υπερελίκωση μέσα στο πλασμίδιο χάνεται, και η πιο ανοιχτή δομή του πλασμιδίου κινείται πιο αργά μέσα στο gel. Αν χειριστούμε το πλασμίδιο με ένα περιοριστικό ένζυμο, τότε αυτό το γραμμικό DNA θα τρέχει με μία κινητικότητα ενδιάμεση από αυτή του υπερελικωμένου και του σπασμένου μορίου. Συνεπώς, μόρια DNA που περιέχουν ακριβώς τον ίδιο αριθμό ζευγών βάσεων μπορούν να τρέχουν σε διαφορετικά σημεία πάνω σε ένα gel αгарόζης ανάλογα με την τοπολογία του DNA.

15. Αποτελέσματα

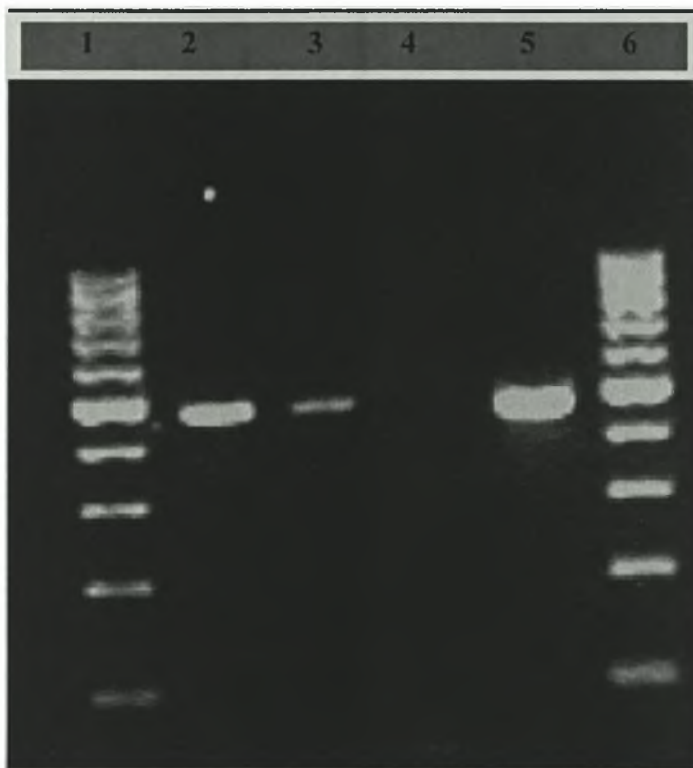
Στην παρούσα μελέτη αναλύθηκαν συνολικά 121 δείγματα γυναικών από τα οποία 67 περιείχαν ένα πλήρες σετ από τραχηλικό και κολπικό δείγμα καθώς και ένα δείγμα ούρων. Τα 44 δείγματα πάρθηκαν από έγκυες και αποτελούνται από ένα κολπικό δείγμα και ένα δείγμα ούρων ενώ συνολικά 10 δείγματα αποτελούνται από ένα τραχηλικό και ένα κολπικό δείγμα γιατί για διάφορους λόγους δεν μπόρεσαν να παρθούν δείγματα ούρων.



Εικόνα 7: Αποτελέσματα PCR κλινικών δειγμάτων για HPV 16 (θέσεις 1-5), HPV 18 (θέσεις 7-11) και HPV 31 (θέσεις 13-17). Στις θέσεις 1,7 και 13 απεικονίζονται δείγματα τραχηλικού υγρού, στις θέσεις 2,8 και 14 απεικονίζονται δείγματα κολπικού υγρού και στις θέσεις 3,9 και 15 απεικονίζονται δείγματα ούρων. Στις θέσεις 4, 10 και 16 έχουν ηλεκτροφορηθεί οι αρνητικοί μάρτυρες της κάθε αντίδρασης ενώ στις θέσεις 5, 11 και 18 οι θετικοί μάρτυρες για κάθε ιό.

Με βάση τα αποτελέσματα μας οι τύποι με την μεγαλύτερη συχνότητα είναι οι HPV 6 και HPV 16 ενώ ακολουθούν οι τύποι HPV 11 και HPV 31. Επίσης, ένα από τα σημαντικότερα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης είναι ότι υπάρχει πλήρης συμφωνία ανίχνευσης HPV μεταξύ των τραχηλικών και των κολπικών δειγμάτων (Εικόνα 7) για όλους τους τύπους του ιού.

Στα δείγματα των εγκύων υπάρχει συμφωνία ανίχνευσης HPV μεταξύ κολλικών δειγμάτων και δειγμάτων ούρων (Εικόνα 8) για όλους τους τύπους του ιού οι οποίοι ανιχνεύτηκαν. Ένας από τους σημαντικότερους λόγους για αυτό είναι το γεγονός ότι στα ούρα των εγκύων η πιθανότητα ύπαρξης επιθηλιακών κυττάρων είναι πολύ μεγαλύτερη λόγω της πάχυνσης των επιθηλιακών στοιβάδων που παρατηρείται στον τράχηλο και στον κόλπο των εγκύων αλλά και λόγω των κολλικών εκκρίσεων που παρατηρείται στις έγκυες.



Εικόνα 8: Αποτελέσματα PCR για HPV 16 από δείγματα εγκύου. Στις θέσεις 2 και 3 βρίσκονται δείγματα κολλικού υγρού και ούρων, αντίστοιχα ενώ στις θέσεις 4 και 5 έχουν ηλεκτροφορηθεί ο αρνητικός μάρτυρας για την αντίδραση και ο θετικός μάρτυρας για HPV 16, αντίστοιχα.

Σε αντίθεση με τα δείγματα των εγκύων, σε πολλές περιπτώσεις τα ούρα των υπόλοιπων ασθενών δεν δίνουν θετικά αποτελέσματα στην ανίχνευση τύπων HPV καθώς σε πολλά από τα δείγματα ούρων δεν βρέθηκαν επιθηλιακά κύτταρα. Το αποτέλεσμα διαφαίνεται από ο γεγονός ότι όλα τα τραχηλικά και κολλικά δείγματα ήταν θετικά για β-σφαιρίνη ενώ πολλά από τα δείγματα των ούρων (εκτός από αυτά των εγκύων) ήταν αρνητικά για την ενίσχυση του γονιδίου της β-σφαιρίνης.

16. Συζήτηση

Η εφαρμογή προγραμμάτων πρόληψης κατά του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας τα τελευταία 50 χρόνια, οδήγησε σε σημαντική μείωση της συχνότητάς του και έσωσε τις ζωές εκατομμυρίων γυναικών. Η πρόληψη κατά του καρκίνου του τραχήλου στηρίζεται μέχρι σήμερα στον κυτταρολογικό έλεγχο τραχηλικών επιχρισμάτων κατά Παπανικολάου, με κάποιες σύγχρονες τροποποιήσεις. Ο καρκίνος του τραχήλου όμως παραμένει και σήμερα αρκετά συχνός. Έχει μάλιστα αποδειχθεί ότι το 60 % των νέων περιστατικών καρκίνου του τραχήλου συμβαίνουν σε γυναίκες που δε συμμετέχουν στα προγράμματα προληπτικού ελέγχου. Για το λόγο αυτό, γίνονται τα τελευταία χρόνια προσπάθειες βελτίωσης της πρόληψης του καρκίνου του τραχήλου, οι οποίες στηρίζονται στην ανίχνευση της λοίμωξης από ιούς HPV και τελευταία στον εμβολιασμό κατά των HPV. Η μοριακή ανίχνευση των ιών HPV γίνεται με μεγαλύτερη ευαισθησία σε δείγματα τραχηλικού υγρού. Η λήψη όμως τραχηλικών δειγμάτων προϋποθέτει τακτική επίσκεψη στον γυναικολόγο και γυναικολογική εξέταση, που σε αρκετές γυναίκες θεωρείται δυσχερές και προκαλεί πλημμελή συμμόρφωση ή και πλήρη αποχή από την πρόληψη του καρκίνου του τραχήλου. Η ανάπτυξη μιας απλής μοριακής μεθόδου ανίχνευσης HPV από δείγματα που μπορούν να παρθούν απ' ευθείας από τους εξεταζόμενους θα μπορούσε να αποτελέσει μια σημαντική ευκαιρία για τον αποτελεσματικό έλεγχο πολλών γυναικών, ιδιαίτερα γυναικών από αναπτυσσόμενες χώρες, από απομακρυσμένες ή φτωχές περιοχές, ηλικιωμένων γυναικών, νεαρών γυναικών που θέλουν να ανοσοποιηθούν με εμβολιασμό κατά των HPV κ.ά. Δείγματα που παίρνονται από την ίδια την εξεταζόμενη είναι το κολπικό υγρό και το δείγμα ούρων. Ας σημειωθεί εδώ ότι κολπικό υγρό και δείγμα ούρων μπορούν να ληφθούν με ασφάλεια και από έγκυες γυναίκες, στις οποίες δε συνιστάται η λήψη τραχηλικού επιχρίσματος για Παπ-τεστ ή μοριακό έλεγχο, κάτι που θα επιτρέψει τον προληπτικό έλεγχο και αυτής της ομάδας πληθυσμού, η οποία απέχει από την πρόληψη για ένα ή περισσότερα χρόνια

Έχει αποδειχθεί ότι ακόμη και μετά από μόλυνση μιας γυναίκας από HPV είναι δυνατόν ο ιός να αποβληθεί από τον οργανισμό χωρίς κάποιου είδους θεραπεία. Αυτό σημαίνει ότι η θετική ανίχνευση για υψηλού κινδύνου τύπους HPV δε σημαίνει απαραίτητα και εξέλιξη σε κυτταρικές αλλοιώσεις και δεν πρέπει να προκαλεί αδικαιολόγητο εκνευρισμό των γυναικών, παρά μόνο συχνότερο έλεγχο του τραχήλου

τους για έγκαιρη ανίχνευση τέτοιων αλλοιώσεων. Γι' αυτό λοιπόν, η έγκαιρη ανίχνευση πολύ πριν από οποιαδήποτε κυτταρολογική αλλοίωση που προσφέρουν οι μοριακές τεχνικές ανίχνευσης είναι πολύ σημαντικό εργαλείο για την πρόληψη κατά του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Μεγαλύτερη ακόμη αξία έχει η αρνητική εξέταση για HPV, κάτι που καθιστά αμελητέα την πιθανότητα ανάπτυξης τραχηλικών βλαβών για τα επόμενα 1-3 χρόνια. Όπως ήδη έχει αναφερθεί, ο έλεγχος αυτός θα είναι ακόμη πιο εύκολος αν γίνεται από δείγματα τα οποία θα μπορούν να παίρνονται από τους εξεταζόμενους χωρίς να υπάρχει επιτακτική ανάγκη γυναικολογικής εξέτασης.

Με τα σημερινά δεδομένα, ο έλεγχος με μοριακές μεθόδους για υψηλού κινδύνου τύπους HPV έχει μεγαλύτερη ευαισθησία στα δείγματα τραχηλικού υγρού, συγκριτικά με τα δείγματα κολπικού υγρού και ούρων. Αυτό οφείλεται κυρίως στην παρουσία περισσότερων μολυσμένων με των ιό κυττάρων στα δείγματα που παίρνονται απευθείας από τον τράχηλο. Με την πρόοδο όμως των μοριακών τεχνικών και τη βελτίωση της ευαισθησίας των αντιδράσεων, θεωρείται βέβαιο ότι η ανίχνευση θα είναι επαρκώς αποτελεσματική και στα εναλλακτικά δείγματα.

Προς την κατεύθυνση αυτή, διεξάγεται κατά τα τελευταία χρόνια σημαντική έρευνα στο Εργαστήριο Μοριακής Μικροβιολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας^[18-20]. Το Εργαστήριο διεξάγει διάφορες μελέτες για την μοριακή ανίχνευση διαφόρων τύπων HPV, κυρίως των τύπων υψηλού κινδύνου, καθώς και για την ανίχνευση HPV από εναλλακτικά δείγματα του τραχηλικού.

Η παρούσα εργασία αποτελεί ένα μικρό μέρος αυτής της ερευνητικής δραστηριότητας του εργαστηρίου ενώ η μελέτη συνεχίζεται με σκοπό την εξέταση ενός πολύ μεγαλύτερου αριθμού δειγμάτων για την εξαγωγή βάσιμων συμπερασμάτων που θα μπορούσαν να συμβάλλουν σε επίπεδο πληθυσμού στην έγκαιρη αντιμετώπιση, κυρίως, των ογκογόνων τύπων HPV με σκοπό τον εμβολιασμό κατά των ιών HPV. Στην παρούσα εργασία, εξετάστηκαν για πρώτη φορά και δείγματα κολπικού υγρού και ούρων, όχι τραχηλικά, από έγκυες γυναίκες.

Τα ευρήματα από τα δείγματα που μελετήθηκαν στη διάρκεια της πτυχιακής αυτής εργασίας ενισχύουν τα ευρήματα προηγούμενων μελετών του Εργαστηρίου Μοριακής Μικροβιολογίας^[16-18], σύμφωνα με τις οποίες το κολπικό υγρό έχει συγκρίσιμα αποτελέσματα με το τραχηλικό υγρό, ενώ στα ούρα τα ποσοστά ανίχνευσης είναι σημαντικά χαμηλότερα. Τα προκαταρκτικά μας όμως ευρήματα από έγκυες γυναίκες δείχνουν ότι σε αυτή την ομάδα αυτή του πληθυσμού τα ούρα έχουν

πιθανόν πολύ υψηλή ομολογία ανίχνευσης HPV με το κολπικό, λόγω της μεγαλύτερης περιεκτικότητάς τους σε κολπικό υγρό σε σύγκριση με τις μη έγκυες γυναίκες. Αν τα προκαταρκτικά αυτά ευρήματα επιβεβαιωθούν σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων, θα είναι σημαντικό για τη συμμετοχή και των εγκύων στα προγράμματα πρόληψης του καρκίνου του τραχήλου.

17. Βιβλιογραφία

1. Zhi-Ming Zheng and Carl C. Baker 2006. Papillomavirus genome structure expression and post transcriptional regulation *Front Biosci.* 11: 2286–2302
2. Gnanomy M, Peedicayil A, P Abraham 2007. “An overview of human papillomaviruses and current vaccine strategies”. *Journal of Medical Microbiology* 25 (1): 10-7
3. Vermeulen C. 2007 *Biomolecular and Epidemiological Aspects of Human Papillomavirus Induced Cervical Carcinogenesis* Doctoral thesis, Leiden University
4. Fields, B. N., D. Knipe, and P. M. Howley (ed.). 1996. *Fields virology*, 3rd ed., p. 2060. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, Pa
5. Grassmann K, Rapp B, Maschek H, Petry KU, Iftner T 1996. Identification of a differentiation-inducible promoter in the E7 open reading frame of human papillomavirus type 16 (HPV-16) in raft cultures of a new cell line containing high copy numbers of episomal HPV-16 DNA. *J Virol.* 70(4):2339-49
6. Fay A, Yutzy WH 4th, Roden RB, Moroianu J. 2004. The positively charged termini of L2 minor capsid protein required for bovine papillomavirus infection function separately in nuclear import and DNA binding. *J Virol.* (24):13447-54
7. www.nature.com/.../v7/n1/fig_tab/nrc2050_F1.html
8. Cutts FT, Franceschi S, Goldie S, Castellsague X, S de Sanjose, Garnett G, Edmundus WJ, Claeys P, Goldenthal KL, Harpre DM, Markowitz L 2007. “Human papillomavirus and HPV vaccines: a review”. *Bulletin of the World Health Organization* 85:719-726

9. Fraiser, LD *et al* 1994 "HPV infections in children" *Pediatric Annals*; 23:354-360
10. Kufe Donald, Pollock Raphael, Weichselbaum Ralph R, Bast Robert C, Gansler Ted, Holland James F, Frei III Emil, 2003, *Cancer Medicine*, BC Decker Inc.
11. Sotlar K, Diemer D, Dethleffs A, Hack Y, Stubner A, Vollmer N, Menton S, Menton M, Dietz K, Wallwiener D, Kandolf R, Bültmann B. 2004 "Detection and typing of human papillomavirus by E6 nested multiplex PCR". *J Clin Microbiol.* 42(7):3176-84
12. Payan C, Ducancelle A, Aboubaker M, Caer J, Tapia M, Chauvin A, Peyronnet D, Hen E, Arab Z, Legrand M, Tran A, Postec E, Tournem F, Avenel M, Malbois C, Brux M, Descamps P, Lunel F 2007 "Human papillomavirus quantification in urine and cervical samples by using the Mx 4000 and LightCycler general real-time PCR systems" *J Clin Microbiol.* 45 (3): 897-901
13. www.cancer.org
14. www.cervicalcancer.org
15. "DNA Extraction", http://en.wikipedia.org/wiki/DNA_extraction
16. "PCR", <http://en.wikipedia.org/wiki/PCR>
17. Richard J. Reece, "Analysis of Genes and Genomes", 2004, 88-95
18. Daponte A, Pournaras S, Mademtzis I, Hadjichristodoulou C, Kostopoulou E, Maniatis AN, Messinis IE 2006 "Evaluation of high-risk human papillomavirus types PCR detection in paired urine and cervical samples of women with abnormal cytology". 36(3):189-93

