



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ**

Διευθυντής: Καθηγητής ΝΙΚΗ Ι. ΑΓΝΑΝΤΗ

**ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ C-erbB-2
ΚΑΙ ΑΡΙΘΜΗΤΙΚΩΝ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΙΚΩΝ
ΑΝΩΜΑΛΙΩΝ ΣΕ ΠΑΘΗΣΕΙΣ ΤΡΑΧΗΛΟΥ ΜΗΤΡΑΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΣΕΒΑΣΤΗΣ Α. ΚΑΜΗΝΑ
ΙΑΤΡΟΥ ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΟΥ**

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2002



ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000345795



ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΟΝ

1

ΑΝΤΙΣΤΑΣΕΩΣ

**Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου
Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα.**

N.5343/32 άρθρο 202 παράγραφος 2



ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπουσα: **Νίκη Ι. Αγνάντη**
Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής
Ιατρικής Σχολής Ιωαννίνων

Μέλη: **Βασιλική Μαλάμου-Μήτση**
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής
Ιατρικής Σχολής Ιωαννίνων

Μαρία Κ. Μπάη
Επίκουρος Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής
Ιατρικής Σχολής Ιωαννίνων



ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Νίκη Ι. Αγκάντη	Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής Ιατρικής Σχολής Ιωαννίνων
Δημήτριος Λώλης	Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας Ιατρικής Σχολής Ιωαννίνων
Παναγιώτης Καναβάρος	Καθηγητής Ανατομίας-Ιστολογίας-Εμβρυολογίας Ιατρικής Σχολής Ιωαννίνων
Βασιλική Μαλάμου-Μήτση	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής Ιατρικής Σχολής Ιωαννίνων
Ευάγγελος Παρασκευαΐδης	Αναπληρωτής Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας Ιατρικής Σχολής Ιωαννίνων
Δημήτριος Στεφάνου	Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής Ιατρικής Σχολής Ιωαννίνων
Μαρία Μπάη	Επίκουρος Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής Ιατρικής Σχολής Ιωαννίνων



ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ειλικρινά ευχαριστώ όλους όσους με βοήθησαν να ξεκινήσω και να ολοκληρώσω αυτή τη μελέτη.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ την Καθηγήτη της Παθολογικής Ανατομικής και δάσκαλό μου κ. Ν.Ι. Αγκνάντη για την ανάθεση της παρούσας μελέτης, την καρποφόρα επίβλεψη και την πολύτιμη επιστημονική της καθοδήγηση. Εκφράζω τη βαθειά ευγνωμοσύνη μου για τη θεμελιώδη συμβολή της στην επιστημονική και ηθικοδεοντολογική διαμόρφωσή μου ως ιατρού.

Ειλικρινά ευχαριστώ την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια της Παθολογικής Ανατομικής κ. Βασιλική Μαλάμου-Μήτση για την άψογη συνεργασία, τις εποικοδομητικές και εύστοχες παρατηρήσεις της στην τελική διαμόρφωση του κειμένου, αλλά και για τη σημαντική συνεισφορά της στην εκπαίδευσή μου.

Στην Επίκουρο Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής, υπεύθυνη του τμήματος Μοριακού Υβριδισμού του Εργαστηρίου μας, κ. Μαρία Μπάη, εκφράζω τις ειλικρινείς και θερμές ευχαριστίες μου για την τεράστια και καταλυτική συμβολή της στην εκπόνηση της διατριβής αυτής, μέσω της αποφασιστικής επιστημονικής καθοδήγησής της, του αδιάκοπου ενδιαφέροντος της και της αμέριστης συμπαράστασής της καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας. Επιπλέον, την ευχαριστώ για την πολύτιμη επιστημονική εμπειρία που απέκτησα εργαζόμενη δίπλα της.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον Αναπληρωτή Καθηγητή της Παθολογικής Ανατομικής και δάσκαλό μου κ. Δημήτριο Στεφάνου για την αγάπη που μου ενέπνευσε για το αντικείμενο της Παθολογικής Ανατομικής, το συνεχές ενδιαφέρον του και την πολύτροπη βοήθεια που μου προσέφερε σε οποιαδήποτε δυσκολία συνάντησα.

Ευχαριστώ θερμά τα μέλη της Επταμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής κ. Δημήτριο Λώλη, Καθηγητή Μαιευτικής-Γυναικολογίας, κ. Καναβάρο Παναγιώτη, Καθηγητή Ανατομίας-Ιστολογίας-Εμβρυολογίας, κ. Ευάγγελο Παρασκευαΐδη, Αναπληρωτή Καθηγητή Μαιευτικής-Γυναικολογίας για την άψογη συνεργασία και τις εποικοδομητικές παρατηρήσεις τους.

Θερμά ευχαριστώ τη Διευθύντρια του Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής του Νοσοκομείου "Γ.Χατζηκώστα" κ. Στέλλα Στεφανάκη-Νίκου που πρόθυμα μας παραχώρησε υλικό για τη μελέτη.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ τη συνάδελφο και φίλη κ. Μίνα Ντέμου για την πολύτιμη βοήθειά της κατά την εκπόνηση του τεχνικού μέρους της εργασίας.



Ευχαριστώ ειλικρινά όλους τους συναδέλφους και ιδιαίτερα την κ. Αφροδίτη Νόννη που μου συμπαραστάθηκαν ποικιλοτρόπως προκειμένου να διεκπεραιωθεί αυτή η μελέτη.

Θερμά επίσης ευχαριστώ τους παρασκευαστές και φίλους Μιχάλη Αλεξίου και Ειρήνη Πάτρα που βοήθησαν πρόθυμα στην παρασκευή των ιστολογικών τομών και στην εκτέλεση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης.



Πρόλογος

Η ραγδαία εξέλιξη της Μοριακής Βιολογίας και της Κυτταρογενετικής την τελευταία εικοσαετία έχει επιφέρει επανάσταση στο σύνολο της Ιατρικής πρακτικής. Η εφαρμογή νέων μοριακών γενετικών τεχνικών συντέλεσε στην πληρέστερη κατανόηση των μηχανισμών της νεοπλασματικής εξαλλαγής.

Σήμερα, αποτελεί πλέον αδιαμφισβήτητη επιστημονική γνώση ότι ο καρκίνος είναι γενετική νόσος. Η καρκινογένεση θεωρείται μακροχρόνια, σύνθετη, πολυσταδιακή και πολυπαραγοντική διαδικασία στην οποία εμπλέκονται περισσότερες της μιας γενετικές αλλαγές. Η συσσώρευση γενετικών μεταβολών φαίνεται να είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη και επέκταση των καρκινωμάτων, ενώ συγκεκριμένες αριθμητικές ή δομικές χρωμοσωματικές ανωμαλίες δείχνουν να σχετίζονται με τη βιολογική συμπεριφορά ορισμένων κακοήθων εξεργασιών.

Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας αποτελεί ένα ιδεώδες μοντέλο για τη μελέτη γενετικών ανωμαλιών στις διάφορες φάσεις της πολυσταδιακής διαδικασίας της καρκινογένεσης, αφού οι προκαρκινωμάτωσης αλλοιώσεις, από την ελαφρά δυσπλασία έως και το ενδοεπιθηλιακό (*in situ*) καρκίνωμα, αναγνωρίζονται εύκολα ιστολογικά.

Τα τελευταία χρόνια, με την εφαρμογή μοριακών τεχνικών, υπάρχει εντυπωσιακή αύξηση της γνώσης σε θέματα που αφορούν την τραχηλική νεοπλασία. Είναι πλέον σαφές, ότι ο ιός του ανθρώπινου θηλώματος (human papilloma virus-HPV) είναι βασικός αλλά όχι αποκλειστικά υπεύθυνος αιτιοπαθογενετικός παράγοντας για τη νεοπλασματική εξαλλαγή. Η συσσώρευση επιπλέον γενετικών ανωμαλιών θεωρείται απαραίτητη για την προαγωγή και εξέλιξη της τραχηλικής νεοπλασίας. Ο αριθμός των μελετών που αφορούν αριθμητικές ή δομικές χρωμοσωματικές ανωμαλίες, που εμπλέκονται στη διεργασία της καρκινογένεσης του τραχήλου, είναι ακόμη περιορισμένος και η γνώση συνεχώς εξελίσσεται.

Επιλέξαμε να μελετήσουμε, με την τεχνική του φθορίζοντος *in situ* υβριδισμού (FISH), τις αριθμητικές ανωμαλίες των χρωμοσωμάτων 3, 7, 8 και 17, καθώς και την ενίσχυση του ογκογονιδίου c-erbB-2, το οποίο παίζει βασικό ρόλο στην καρκινογένεση και θεωρείται ως δείκτης επιθετικότητας σε ορισμένους όγκους, σε προκαρκινωμάτωσης αλλοιώσεις και καρκινώματα τραχήλου μήτρας. Επιπλέον, ανιχνεύσαμε ανοσοϊστοχημικά την υπερέκφραση της πρωτεΐνης p185 του ογκογονιδίου c-erbB-2.



Έτσι, εκτιμήσαμε τους ίδιους δείκτες σε διαφορετικά στάδια της πολυσταδιακής διαδικασίας της καρκινογένεσης, συγκριτικά δε μελετήσαμε και το φυσιολογικό επιθήλιο. Συσχετήσαμε τις γονοτυπικές με τις φαινοτυπικές αλλαγές, τον ανοσοφαινότυπο και άλλες παθολογοανατομικές παραμέτρους, με σκοπό τη διερεύνηση του ρόλου τους στην τραχηλική καρκινογένεση.



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

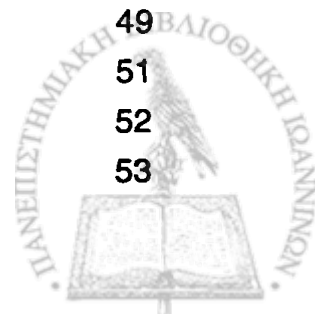
1

ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ, ΠΛΗΡΗΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

1.	ΑΝΑΤΟΜΙΑ-ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ ΤΡΑΧΗΛΟΥ ΜΗΤΡΑΣ	3
1.1.	Στοιχεία Εμβρυολογίας	3
1.2.	Στοιχεία Ανατομίας –Ιστολογίας	3
1.2.1.	Γενικά	3
1.2.2.	Πλακώδες επιθήλιο	4
1.2.3.	Κυλινδρικό επιθήλιο	6
1.2.4.	Ζώνη μετάπτωσης	6
1.2.5.	Πλακώδης μετάπλαση	6
2.	ΠΡΟΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΩΔΕΙΣ ΑΛΛΟΙΩΣΕΙΣ ΤΡΑΧΗΛΟΥ	8
2.1.	Ενδοεπιθηλιακές νεοπλασίες πλακώδους επιθηλίου	8
2.1.1.	Ορολογία-Ιστορική αναδρομή	8
2.1.2.	Επιδημιολογία	10
2.1.3.	Παράγοντες κινδύνου	10
2.1.4.	Εντόπιση- Επιθήλιο προέλευσης	10
2.1.5.	Φυσική Ιστορία- Εξέλιξη	11
2.2.	Προκαρκινωμάτωσης αλλοιώσεις αδενικού επιθηλίου	12
2.2.1.	Ορολογία – Ιστορική αναδρομή	12
2.2.2.	Επιδημιολογία	13
2.2.3.	Παράγοντες κινδύνου	13
2.2.4.	Φυσική Ιστορία- Εξέλιξη	13
3.	ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ ΤΡΑΧΗΛΟΥ	14
3.1.	Γενικά	14
3.2.	Πλακώδη καρκινώματα	16
3.2.1.	Επιδημιολογία	16
3.2.2.	Ιστογένεση-Παράγοντες κινδύνου	16
3.2.3.	Ιστολογικοί τύποι	17
3.2.4.	Ιστολογική διαβάθμιση	17
3.2.5.	Προγνωστικοί παράγοντες	18
3.3.	Αδενοκαρκινώματα	19
3.3.1.	Επιδημιολογία	19
3.3.2.	Ιστογένεση-Παράγοντες κινδύνου	19
3.3.3.	Προγνωστικοί παράγοντες	19
3.4.	Αδενοπλακώδη καρκινώματα	20



3.4.1.	Επιδημιολογία	20
3.4.2.	Ιστογένεση-Παράγοντες κινδύνου	20
3.4.3.	Προγνωστικοί παράγοντες	20
4.	ΙΟΙ ΘΗΛΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ	22
4.1.	Ταξινόμηση-τυποποίηση	22
4.2.	Δομή του γονιδιώματος του ιού	22
4.3.	Κύκλος ζωής	24
4.4.	Μηχανισμός κακοήθους εξαλλαγής	25
4.4.1.	Αλληλεπίδραση E6 ογκοπρωτεΐνης με γονίδιο p53	26
4.4.2.	Αλληλεπίδραση E7 ογκοπρωτεΐνης με γονίδιο Rb	28
4.4.3.	Αλληλεπίδραση E6, E7 ογκοπρωτεΐνης με ογκογονίδια	29
4.4.4.	Αλληλεπίδραση γονιδίων E6, E7 με κυτοκίνες	30
5.	ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΑ	32
5.1.	Γενικά	32
5.2.	Ογκογονίδια και καρκίνος	32
5.3.	Ογκογονίδιο c-erbB-2	34
6.	ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΟΣ ΤΡΑΧΗΛΟΥ	39
6.1.	Γενικά	39
6.2.	Χρωμόσωμα 1	40
6.3.	Χρωμόσωμα 3	40
6.4.	Χρωμόσωμα 4	41
6.5.	Χρωμόσωμα 5	41
6.6.	Χρωμόσωμα 6	42
6.7.	Χρωμόσωμα 7	42
6.8.	Χρωμόσωμα 8	42
6.9.	Χρωμόσωμα 11	42
6.10.	Χρωμόσωμα 17	43
6.11.	Χρωμοσώματα 18,19	43
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ		45
1.	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	47
1.1.	Υλικό	47
1.2.	Μέθοδοι	49
1.2.1.	Μέθοδος φθορίζοντος in situ υβριδισμού	49
1.2.2.	Ανοσοϊστοχημική μελέτη	51
1.2.3.	Στατιστική ανάλυση	52
2.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	53



2.1.	Αριθμητικές ανωμαλίες των χρωμοσωμάτων 3,17,8,7	53
2.1.1.	Φυσιολογικό επιθήλιο	53
2.1.2.	Πλακώδεις ενδοεπιθηλιακές βλάβες	53
2.1.3.	Διηθητικά καρκινώματα	57
2.1.4.	Συσχέτιση αριθμητικών ανωμαλιών ενδοεπιθηλιακών βλαβών και διηθητικών καρκινωμάτων	63
2.1.5.	Συσχέτιση ανωμαλιών ίδιου βαθμού ενδοεπιθηλιακών βλαβών, με ή χωρίς συνύπαρξη σοβαρότερης βλάβης	70
2.2.	Ογκογονίδιο c-erbB-2	73
2.2.1.	Ενίσχυση του γονιδίου c-erbB-2	73
2.2.2.	Υπερέκφραση της πρωτεΐνης c-erbB-2	76
	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	79
	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	87
	ΠΕΡΙΛΗΨΗ	89
	SUMMARY	91
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	93



ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



1. ΑΝΑΤΟΜΙΑ-ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ ΤΡΑΧΗΛΟΥ ΜΗΤΡΑΣ

1.1 Στοιχεία εμβρυολογίας

Το μεγαλύτερο μέρος του γεννητικού σωλήνα προέρχεται από τους παραμεσονεφρικούς πόρους του Müller. Αυτοί σχηματίζονται από την εξέλιξη του πρόσθιου νεφροτόμιου, περί την έκτη εβδομάδα της εμβρυικής ζωής, και εμφανίζονται σε μια πτυχή του σπλαγχνικού επιθηλίου. Από το κεφαλικό επίμηκες τμήμα των πόρων προέρχονται οι σάλπιγγες, ενώ τα μέσα και ουραία τμήματά τους συντήκονται για να σχηματίσουν το σώμα της μήτρας, τον τράχηλο και τον κόλπο. Οι μεσονεφρικοί πόροι μπορούν να εντοπιστούν κατά μήκος του γεννητικού σωλήνα από το επωοφόριο ως τον υμένα. Αυτοί εκφυλίζονται σταδιακά, αλλά μη λειτουργικά υπολλείμματα τους μπορεί να παραμείνουν, όπως οι πόροι του Gartner [1,2].

1.2. Στοιχεία ανατομίας και ιστολογίας

1.2.1. Γενικά

Ο τράχηλος αποτελεί το κατώτερο τμήμα της μήτρας το οποίο προβάλλει στο ανώτερο τμήμα του κόλπου. Έχει κυλινδρικό σχήμα, μήκος 2,5 - 3 εκ., διάμετρο 2 - 2,5 εκ. και βρίσκεται σε ελαφρά γωνίωση ως προς το σώμα της μήτρας.

Ο κόλπος περιβάλλει το κατώτερο τμήμα του τραχήλου και τον χωρίζει σε δύο τμήματα, το ενδοκολπικό και το υπερκολπικό. Το ενδοκολπικό τμήμα του τραχήλου ονομάζεται εξωτράχηλος, έχει κυρτή επιφάνεια και αφορίζεται από τον πρόσθιο και οπίσθιο κολπικό θόλο. Στο κέντρο του υπάρχει το έξω τραχηλικό στόμιο, το οποίο είναι κυκλικό στην άτοκο και σαν εγκάρσια σχισμή στην τεκούσα.

Το υπερκολπικό τμήμα του τραχήλου εμφανίζει δύο επιφάνειες, την πρόσθια και την οπίσθια και δύο πλάγια χείλη. Η οπίσθια επιφάνεια είναι βραχύτερη από την πρόσθια και επαλείφεται από περιτόναιο με το οποίο χωρίζεται από το απευθυσμένο. Η πρόσθια επιφάνεια χωρίζεται από την ουροδόχο κύστη με την παρεμβολή συνδετικού ιστού, ο οποίος εκτείνεται και προς τα πλάγια και ονομάζεται παραμήτριο. Τα πλάγια χείλη του υπερκολπικού τμήματος έρχονται σε σχέση με τη βάση του πλατέος συνδέσμου, το παραμήτριο και το χιασμό της μητριάας αρτηρίας με τον ουρητήρα .



Στο ύψος της μετάπτωσης του σώματος της μήτρας στον τράχηλο υπάρχει περιοχή μεγαλύτερης στένωσης, που ονομάζεται ισθμός και αντιστοιχεί στο έσω τραχηλικό στόμιο. Αυτό χωρίζει τη μητρική από την τραχηλική κοιλότητα. Το έξω τραχηλικό στόμιο συνδέεται με το έσω, διά μέσου του ενδοτραχηλικού αυλού. Ο τελευταίος είναι μία ελλειπτική κοιλότητα που εμφανίζει επιμήκεις βλεννογόνιες πτυχές.

Η αιμάτωση του τραχήλου γίνεται από τους κατιόντες κλάδους των μητριάων αρτηριών, οι οποίες πορεύονται κατά μήκος των πλαγίων τοιχωμάτων του τραχήλου, διατρέχοντας το ανώτερο τμήμα του εγκάρσιου τραχηλικού συνδέσμου. Αυτοί οι σύνδεσμοι μαζί με τους ιερομητρικούς, οι οποίοι συνδέουν το υπερκολπικό τμήμα του τραχήλου με τους ιερούς σπονδύλους (2^ο, 3^ο, 4^ο) είναι τα κύρια στοιχεία στήριξης του τραχήλου.

Η φλεβική αποχέτευση είναι παράλληλη με το αρτηριακό σύστημα και υπάρχει επικοινωνία μεταξύ του τραχηλικού πλέγματος και του πλέγματος της ουροδόχου κύστης.

Τα λεμφαγγεία του τραχήλου βρίσκονται κάτω από το βλεννογόνο και βαθειά μέσα στο ινώδες στρώμα. Από τις περιοχές αυτές καταλήγουν στην περιοχή του ισθμού και από εκεί ξεκινούν τέσσερις απαγωγοί οδοί προς α) τους έξω λαγόνιους και θυρεοειδείς λεμφαδένες, β) τους ιερούς, γ) τους υπογάστριους και κοινούς λαγόνιους και δ) τους λεμφαδένες του οπίσθιου τοιχώματος της ουροδόχου κύστης.

Η νεύρωση του τραχήλου γίνεται από τα συμπαθητικά και παρασυμπαθητικά πλέγματα που συνδέονται με το 2^ο, 3^ο και 4^ο ιερά νεύρα.

Ο τράχηλος αποτελείται από ένα μίγμα ινώδους, μυϊκού και ελαστικού ιστού, που επικαλύπτεται από κυλινδρικό ή πλακώδες επιθήλιο. Ο ινώδης συνδετικός ιστός είναι το κυρίαρχο στοιχείο. Οι λείες μυϊκές ίνες βρίσκονται κυρίως στον ενδοτράχηλο ενώ ο εξωτράχηλος δεν έχει σχεδόν καθόλου λείες μυϊκές ίνες. Σε αντίθεση, στον ισθμό το 50 - 60% του σθηρικτικού ιστού αποτελείται από μυϊκά στοιχεία τοποθετημένα συγκεντρικά, έχοντας λειτουργία σφιγκτήρα [1-4].

1.2.2. Πλακώδες επιθήλιο

Ο εξωτράχηλος επικαλύπτεται από πολύστοιβο μη κερατινοποιούμενο πλακώδες επιθήλιο, το οποίο αποτελείται από τρεις ζώνες: τη βασική, την ενδιάμεση και την επιπολής.

Η βασική στιβάδα αποτελείται από δύο τύπους κυττάρων : τα βασικά και τα παραβασικά. Τα βασικά κύτταρα διατάσσονται σε ένα στοίχο, κάθετα προς την υποκείμενη βασική μεμβράνη. Κυρίαρχη λειτουργία των βασικών κυττάρων είναι η επιθηλιακή αναγέννηση.



Τα παραβασικά κύτταρα συνδέονται μεταξύ τους με συμπλέγματα τονοϊνιδίων - δεσμοσωμάτων. Μελέτες με τριπομένη θυμιδίνη έχουν αποδείξει υψηλή πρόσληψη αυτής, γεγονός που σημαίνει ότι η στιβάδα αυτή συμμετέχει στην ανάπτυξη του επιθηλίου.

Η ενδιάμεση ζώνη αποτελείται από πολλαπλές στιβάδες ελαφρά πολυεδρικών κυττάρων τα οποία έχουν άφθονο γλυκογόνο, υπεύθυνο για τη διαυγή κενοδοτιώδη εμφάνιση του κυτταροπλάσματος.

Η επιπολής ζώνη αποτελεί το πιο διαφοροποιημένο τμήμα του πλακώδους επιθηλίου. Αποτελείται από λίγες στιβάδες κυττάρων με άφθονο ηωσινόφιλο κυτταρόπλασμα πλούσιο σε γλυκογόνο και ενδιάμεσα ινίδια που προσδίνουν στερεότητα.

Το πλακώδες επιθήλιο του τραχήλου χωρίζεται από το υποκείμενο ινώδες στρώμα με τη βασική μεμβράνη που έχει πάχος 0,03μm. Το στρώμα δεν περιέχει ενδοτραχηλικά αδένια. Στη συμβολή επιθηλίου - στρώματος υπάρχει ένα καλά αναπτυγμένο αγγειακό δίκτυο ενώ κατά διαστήματα υπάρχουν προσεκβολές του στρώματος στο επιθήλιο που ονομάζονται θηλές.

Το πλακώδες επιθήλιο ανανεώνεται με πολλαπλασιασμό, ωρίμανση και αποφολίωση κατά τη διάρκεια του αναπαραγωγικού κύκλου. Αντικαθίσταται με καινούργιο πληθυσμό κυττάρων κάθε 4-5 μέρες. Η διαδικασία της πλακώδους ωρίμανσης επιταχύνεται με τη χορήγηση οιστρογονικών σκευασμάτων. Ανοσοϊστοχημικά, έχουν εντοπιστεί υποδοχείς οιστρογόνων στους πυρήνες των βασικών και παραβασικών κυττάρων καθώς και των κυττάρων της ενδιάμεσης ζώνης. Σε αντίθεση με το ενδομήτριο, η έκφραση αυτών κατά τις διάφορες φάσεις του κύκλου δεν εμφανίζει μεγάλες μεταβολές. Υποδοχείς προγεστερόνης ανευρέθησαν μόνον κατά την ωχρινική φάση του κύκλου και κατά την κύηση στους πυρήνες των παραβασικών κυττάρων. Επίσης υποδοχείς οιστρογόνων και προγεστερόνης ανιχνεύτηκαν στα ινοβλαστικού τύπου κύτταρα του στρώματος καθ'όλη τη διάρκεια του κύκλου. Γενικά η 17β-οιστραδιόλη επιταχύνει την ωρίμανση του επιθηλίου ενώ η προγεστερόνη την αναστέλλει. Σαν αποτέλεσμα αυτών, το επιθήλιο μετά τη γέννηση είναι πλήρως ώριμο και περιέχει μεγάλα ποσά γλυκογόνου υπό την επίδραση των μητρικών οιστρογόνων. Αμέσως μετά η ωρίμανση σταματά και το γλυκογόνο εξαφανίζεται καθ'όσον τα επίπεδα των οιστρογόνων πέφτουν. Το επιθήλιο παραμένει ατροφικό μέχρι τη στιγμή της εμμηναρχής. Κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης τα επίπεδα της προγεστερόνης είναι ψηλά και η επιφανειακή ωρίμανση των κυττάρων απουσιάζει. Σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες το επιθήλιο είναι ατροφικό με λίγο ή καθόλου ενδοκυτταρίο γλυκογόνο.



1.2.3. Κυλινδρικό επιθήλιο

Ο βλεννογόνος του τραχηλικού αυλού αποτελείται από ένα στοίχο κυλινδρικών βλεννοεκκριτικών κυττάρων, που καλύπτει τόσο την επιφάνεια όσο και τις υποκείμενες αδενικές δομές. Οι τελευταίες ονομάζονται ενδοτραχηλικοί αδένες και σύμφωνα με τον Fluhman [5] στην πραγματικότητα αντιπροσωπεύουν βαθιές καταδύσεις του επιθηλίου με πολυάριθμες διακλαδώσεις.

Με ανοσοϊστοχημικές χρώσεις, στο ενδοτραχηλικό επιθήλιο μπορεί να ανιχνευτούν μεμονωμένα νευροενδοκρινικά κύτταρα.

Κάτω από τα κυλινδρικά κύτταρα υπάρχουν τα εφεδρικά, τα οποία υπό φυσιολογικές συνθήκες αναγνωρίζονται σπάνια ακόμη και σε μελέτες με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

1.2.4. Ζώνη μετάπτωσης

Η πρωτογενής θέση της συμβολής του πλακώδους με το κυλινδρικό επιθήλιο συνήθως εντοπίζεται στην περιοχή του εξωτερικού στομίου, αλλά η ακριβής εντόπιση αυτής μετά τη γέννηση επηρεάζεται από την προηγηθείσα έκθεση του εμβρύου σε μητρικές ορμόνες.

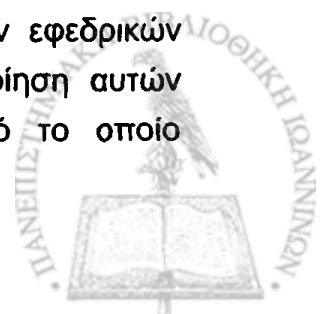
Κατά την εφηβεία και την εγκυμοσύνη, ορμονικά ερεθίσματα προκαλούν την επέκταση του κυλινδρικού επιθηλίου στον εξωτράχηλο με επακόλουθο τη δημιουργία εκτροπίου. Λόγω της μακροσκοπικής εμφάνισης του βλεννογόνου, οι κλινικοί χρησιμοποιούν τον όρο τραχηλική διάβρωση (erosion) για να περιγράψουν την αλλοίωση. Ο όρος όμως αυτός δεν είναι ακριβής.

Η έκθεση του ευαίσθητου κυλινδρικού επιθηλίου στο μετεφηβικό όξινο pH του κόλπου επάγει την πλακώδη μετάπλασή του. Η περιοχή ανάμεσα στην πρωτογενή και μετεφηβική επιθηλιακή συμβολή του πλακώδους με το κυλινδρικό επιθήλιο ονομάζεται ζώνη μετάπτωσης και επικαλύπτεται από μεταπλαστικό πλακώδες επιθήλιο.

Στις μεγαλύτερης ηλικίας και μετεμνηνοπαυσιακές γυναίκες η επιθηλιακή συμβολή μπορεί να οπισθοχωρήσει μέσα στον ενδοτραχηλικό σωλήνα.

1.2.5. Πλακώδης μετάπλαση

Στον τράχηλο, με τον όρο πλακώδη μετάπλαση εννοούμε την αντικατάσταση του βλεννοεκκριτικού κυλινδρικού επιθηλίου από πολύστοιβο πλακώδες επιθήλιο. Αρχίζει στη ζώνη μετάπτωσης και μπορεί να αφορά το επικαλυπτικό επιθήλιο ή να επεκτείνεται και προς τους ενδοτραχηλικούς αδένες. Ο μηχανισμός δημιουργίας του μεταπλαστικού επιθηλίου έχει μελετηθεί εκτενώς και σύμφωνα με τον Fluhman [5] και άλλους εξελίσσεται σε τρία στάδια. Στο πρώτο στάδιο παρατηρείται υπερπλασία των εφεδρικών κυττάρων του κυλινδρικού επιθηλίου. Ακολουθεί η διαφοροποίηση αυτών προς ανώριμο μεταπλαστικό πλακώδες επιθήλιο πάνω από το οποίο



αναγνωρίζονται βλεννοεκκριτικά κύτταρα, υπολείμματα του ενδοτραχηλικού επιθηλίου, που αντικαταστάθηκε από το μεταπλαστικό. Το ανώριμο πλακώδες επιθήλιο διαφέρει από το ώριμο λόγω της απουσίας επιφανειακής ωρίμανσης, ενδοκυττάριου γλυκογόνου και μεσοκυττάρων γεφυρών. Στο τρίτο στάδιο το μεταπλαστικό επιθήλιο ωριμάζει και γίνεται όμοιο με το αυθεντικό πλακώδες επιθήλιο [3,4].



2. Προκαρκινωματώδεις αλλοιώσεις τραχήλου μήτρας

- Πλακώδους επιθηλίου
- Αδενικού επιθηλίου

2.1. Ενδοεπιθηλιακές νεοπλασίες πλακώδους επιθηλίου (CIN)

2.1.1. Ορολογία - Ιστορική αναδρομή

Ήδη από το 1886, ο Sir John Williams [6] παρατήρησε ότι σε παρακείμενες του διηθητικού καρκινώματος θέσεις συνυπήρχαν ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις. Αργότερα, κατά το 1930, οι Broders [7] χρησιμοποίησαν τον όρο καρκίνωμα *in situ* για τις μη διηθητικές αλλοιώσεις, που μορφολογικά ήταν όμοιες με το διηθητικό καρκίνωμα. Ακολούθησαν εκτεταμένες μελέτες, οι οποίες κατέδειξαν ότι το καρκίνωμα *in situ* είναι προκαρκινωματώδης αλλοίωση, που αν δε θεραπευτεί, μπορεί να εξελιχθεί σε διηθητικό καρκίνωμα [8].

Στη συνέχεια άρχισαν να εφαρμόζονται προγράμματα πρωτογενούς κυτταρολογικού πληθυσμιακού ελέγχου στα οποία αναγνωρίστηκαν επιθηλιακές αλλοιώσεις λιγότερο σοβαρές από το καρκίνωμα *in situ*. Για τον ορισμό αυτών των αλλοιώσεων, το 1956, ο Reagan [9] εισήγαγε τον όρο *δυσπλασία*. Ως *δυσπλασία* ορίστηκε η υπερπλασία ανώμαλων πλακωδών επιθηλιακών κυττάρων που μοιάζουν με τα βασικά κύτταρα, αλλά εμφανίζουν κυτταρική ατυπία και διαταραχή στον προσανατολισμό τους. Αυτή διακρίθηκε σε τρεις βαθμούς (ελαφρού, μέτριου, σοβαρού), ανάλογα με το πάχος του επιθηλίου που καταλαμβάνουν τα αδιαφοροποίητα βασικού ή παραβασικού τύπου κύτταρα. Η *δυσπλασία* θεωρήθηκε ως δυνητικά αναστρέψιμη βλάβη, ενώ αντίθετα το καρκίνωμα *in situ* ως μη αναστρέψιμη, που θα μεταπέσει σε διηθητικό καρκίνωμα, συνήθως μετά παρέλευση μεγάλου χρονικού διαστήματος.

Οι δυσκολίες, που υπήρχαν στη διαφορική διάγνωση της σοβαρής *δυσπλασίας* από το καρκίνωμα *in situ*, οδήγησαν στην αναζήτηση ενός περισσότερο αναπαραγωγίμου συστήματος ταξινόμησης των ενδοεπιθηλιακών αλλοιώσεων του τραχήλου [8].

Στηριζόμενος στα αποτελέσματα βιολογικών μελετών, ο Richart θεώρησε ότι τόσο οι *δυσπλαστικές* αλλοιώσεις όσο και το καρκίνωμα *in situ* αντιπροσωπεύουν διαφορετικά στάδια της ίδιας νόσου και εισήγαγε τον όρο *τραχηλική ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία (cervical intraepithelial neoplasia -CIN)* [10,11]. Σύμφωνα με την ταξινόμηση της τραχηλικής ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας, οι προκαρκινωματώδεις αλλοιώσεις του τραχήλου διακρίθηκαν σε



τρεις βαθμούς: CIN 1 (αντιστοιχεί στην ελαφρά δυσπλασία), CIN 2 (αντιστοιχεί στην μέτριου βαθμού δυσπλασία) και CIN 3 (περιλαμβάνει την σοβαρού βαθμού δυσπλασία και το καρκίνωμα *in situ*) [8,10,11].

Με την πρόοδο και εφαρμογή νέων μοριακών βιολογικών τεχνικών αυξήθηκαν εντυπωσιακά οι γνώσεις για την αιτιοπαθογένεια του καρκίνου και των προκαρκινωματώδων αλλοιώσεων. Αναθεωρήθηκε πλέον η άποψη ότι το φάσμα των αλλοιώσεων, που ορίσθηκαν ως ενδοεπιθηλιακές νεοπλασίες, αντιπροσωπεύουν διαφορετικά στάδια εξέλιξης της ίδιας νόσου. Αντίθετα υπέθεσαν ότι πρόκειται για δύο διαφορετικές βιολογικές οντότητες, η μια εκ των οποίων αντιστοιχεί σε παραγωγική λοίμωξη και η άλλη σε αληθή νεοπλασματική διεργασία, που εντοπίζεται στο επιθήλιο. Η παραγωγική λοίμωξη συνήθως υποχωρεί από μόνη της και εκδηλώνεται συχνότερα σαν επίπεδη αλλοίωση και σπανιότερα σαν εξωφυτική (οξυτενές κονδύλωμα). Οι επίπεδες αλλοιώσεις μπορεί να είναι διπλοειδείς ή πολυπλοειδείς και περιλαμβάνουν το επίπεδο κονδύλωμα και την ελαφρά επιθηλιακή δυσπλασία. Αυτές συσχετίζονται με περισσότερους από 22 τύπους του ιού HPV. Η άλλη οντότητα περιλαμβάνει τη μέτρια και σοβαρή δυσπλασία καθώς και το ενδοεπιθηλιακό καρκίνωμα (CIN 2, CIN 3). Οι αλλοιώσεις αυτές είναι συνήθως ανευπλοειδείς και αντιπροσωπεύουν σαφώς ενδοεπιθηλιακές νεοπλασίες που μπορεί να μεταπέσουν σε διηθητικό καρκίνωμα, αν δεν θεραπευθούν. Αυτές συσχετίζονται με μικρό μόνον αριθμό τύπων HPV, κυρίως τους 16, 18 και 31 [8].

Με βάση τα ανωτέρω προέκυψε η ανάγκη τροποποίησης του συστήματος ταξινόμησης των τραχηλικών ενδοεπιθηλιακών νεοπλασιών. Μια τροποποίηση προτάθηκε από τον Richart, ο οποίος αντικατέστησε την αρχική ταξινόμηση με τους όρους *χαμηλού βαθμού τραχηλική ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία (low grade CIN)* [περιλαμβάνονται το επίπεδο κονδύλωμα και η CIN 1] και *υψηλού βαθμού τραχηλική ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία (high grade CIN)* [περιλαμβάνονται οι CIN 2 και CIN 3] [12].

Μια άλλη τροποποίηση της ορολογίας ενσωματώθηκε στο σύστημα ταξινόμησης Bethesda και χρησιμοποιεί τον όρο *πλακώδεις ενδοεπιθηλιακές βλάβες (squamous intraepithelial lesions –SIL)*, τις οποίες διακρίνει σε χαμηλού βαθμού (low grade SIL) και υψηλού βαθμού (high grade SIL). Αυτή χρησιμοποιήθηκε αρχικά για τις κυτταρολογικές διαγνώσεις, αλλά σήμερα χρησιμοποιείται από αρκετούς και στις ιστολογικές διαγνώσεις [13,14].



2.1.2. Επιδημιολογία

Οι ενδοτραχηλικές νεοπλασίες αποτελούν νόσο των γυναικών που βρίσκονται στην αναπαραγωγική ηλικία. Η επίπτωση των δυσπλαστικών αλλοιώσεων του τραχήλου είναι δύσκολο να προσδιορισθεί και τα αποτελέσματα των μελετών διαφέρουν. Υποστηρίζεται μάλιστα ότι άλλοι παράγοντες, όπως η εθνικότητα, σχετίζονται με την επίπτωση της νόσου [15].

Τελευταία, παρατηρείται δραματική αύξηση της συχνότητας των ενδοεπιθηλιακών νεοπλασιών ιδιαίτερα σε εφήβους και γυναίκες μικρότερες των 30 ετών. Οι επιδημιολογικές αυτές μεταβολές αποδίδονται σε αλλαγές στη σεξουαλική συμπεριφορά των σύγχρονων κοινωνιών και στην έγκαιρη ανίχνευση των αλλοιώσεων μέσω των προγραμμάτων πρωτογενούς κυτταρολογικού πληθυσμιακού ελέγχου [16-18].

2.1.3. Παράγοντες κινδύνου

Οι σημαντικότεροι παράγοντες κινδύνου που εμπλέκονται στην ανάπτυξη των ενδοεπιθηλιακών νεοπλασιών και των διηθητικών καρκινωμάτων του τραχήλου της μήτρας είναι οι λοιμώξεις από τους ιούς HPV η ανοσοκαταστολή και το κάπνισμα [19-28]. Την τελευταία 15ετία οι περισσότερες μελέτες επικεντρώνουν την προσοχή τους στον ιό HPV, τον οποίο θεωρούν ως βασικότερο αιτιοπαθογενετικό παράγοντα στην πολυπαραγοντική διαδικασία της καρκινογένεσης του τραχήλου της μήτρας [27-33]. Αναλυτικά θα αναφερθούμε στον ιό HPV και τους μηχανισμούς με τους οποίους φαίνεται να οδηγεί στη νεοπλασματική εξαλλαγή, σε επόμενο κεφάλαιο.

2.1.4. Εντόπιση - επιθήλιο προέλευσης

Οι τραχηλικές ενδοεπιθηλιακές νεοπλασίες αρχίζουν συνήθως να αναπτύσσονται από τη ζώνη μετάπτωσης, σε εστίες πλακώδους μετάπλασης. Μόνο το 10% περίπου των CIN εντοπίζονται στον ενδοτράχηλο, αφήνοντας άθικτη τη ζώνη μετάπτωσης. Γενικά οι ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις που εντοπίζονται στον εξωτράχηλο είναι χαμηλού βαθμού, ενώ αυτές που εκτείνονται προς τον ενδοτράχηλο είναι υψηλού βαθμού.

Διαφορετικές είναι οι απόψεις των ερευνητών για το κύτταρο προέλευσης των CIN. Μερικοί υποστηρίζουν ότι αυτές προέρχονται από τα βασικά κύτταρα του πλακώδους επιθηλίου, άλλοι θεωρούν ως κύτταρα προέλευσης τα εφεδρικά κύτταρα του ενδοτραχηλικού επιθηλίου, οι περισσότεροι όμως πιστεύουν ότι οι ενδοεπιθηλιακές νεοπλασίες προέρχονται από τα βασικά κύτταρα του μεταπλαστικού επιθηλίου της ζώνης μετάπτωσης [8].



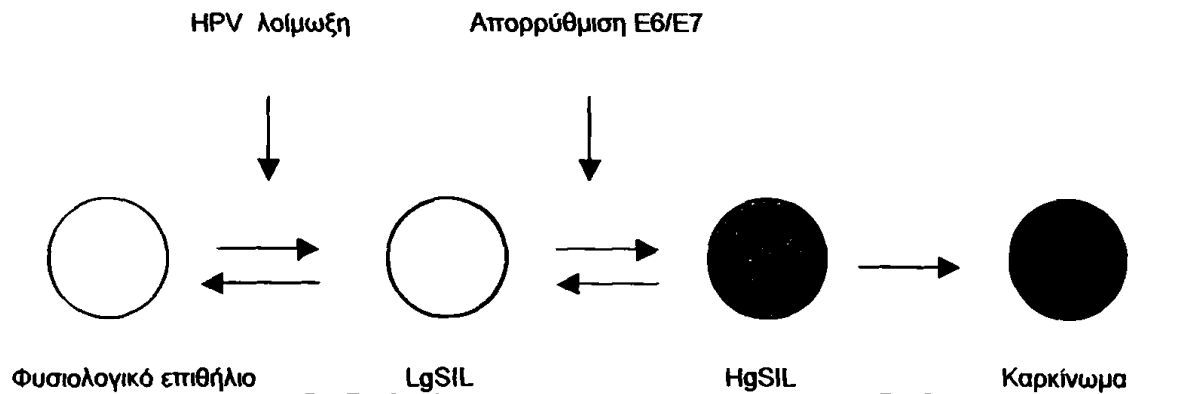
2.1.5. Φυσική Ιστορία - εξέλιξη

Μελέτες της φυσικής ιστορίας και εξέλιξης των δυσπλαστικών αλλοιώσεων του τραχήλου έχουν δείξει ότι μερικές μπορεί να υποστρέψουν, άλλες να παραμείνουν όπως έχουν σε όλη τη διάρκεια της ζωής της γυναίκας και άλλες να μεταπέσουν σε βαρύτερες βλάβες και διηθητικό καρκίνωμα. Όσο βαρύτερη είναι η ενδοεπιθηλιακή βλάβη, τόσο μεγαλύτερη είναι η πιθανότητα προόδου αυτής και μικρότερο το χρονικό διάστημα μετάπτωσης. Πάντως, τα συστήματα ταξινόμησης των δυσπλαστικών αλλοιώσεων του τραχήλου δεν επαρκούν για να προσδιορίσουν τη βιολογική συμπεριφορά αυτών. Παράγοντες, οι οποίοι φαίνεται να σχετίζονται με την εξέλιξή τους, είναι η λοίμωξη από υψηλού κινδύνου τύπους HPV και η εμμονή της ιϊκής λοίμωξης [8,34,36-38]. Επιπλέον, από τις περισσότερες μελέτες προκύπτει ότι η πλοειδία είναι καλός δείκτης κλινικής συμπεριφοράς των ενδοεπιθηλιακών νεοπλασιών του τραχήλου, αφού οι περισσότερες από τις αλλοιώσεις που επιμένουν ή εξελίσσονται είναι ανευπλοειδείς, ενώ αυτές που υποστρέφουν διπλοειδείς [8,36-38]. Τα επίπεδα έκφρασης των ιϊκών ογκοπρωτεϊνών, η απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων, οι διαταραχές ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου, το κάπνισμα και η ανοσοκαταστολή μπορεί επίσης να σχετίζονται με την εξέλιξη των ενδοεπιθηλιακών νεοπλασιών του τραχήλου [39].

Τα αποτελέσματα μελετών, που εκτιμούν την πιθανότητα και τα ποσοστά υποστροφής και εξέλιξης των ενδοεπιθηλιακών νεοπλασιών, είναι διαφορετικά. Πάντως, από μεγάλες και με μακρύ διάστημα παρακολούθησης μελέτες, προκύπτει ότι σε ποσοστό 57% περίπου των γυναικών με ελαφρά δυσπλασία (CIN 1) παρατηρείται υποστροφή της αλλοίωσης, σε 25% η βλάβη επιμένει και σε 15% εξελίσσεται προς CIN 3. Οι αντίστοιχες αναλογίες σε γυναίκες με μέτρια δυσπλασία είναι περίπου 50%, 15% και 35%. Η πιθανότητα υποστροφής των CIN 3 είναι κατά μέσο όρο 33%, ενώ η πιθανότητα μετάπτωσης τους σε διηθητικό καρκίνωμα ποικίλλει στις διάφορες μελέτες και κυμαίνεται από 22 έως 70%. Οι διαφορές οφείλονται κυρίως στο διαφορετικό διάστημα παρακολούθησης των ασθενών. Πάντως, έχει παρατηρηθεί ότι όσο μεγαλύτερο είναι το διάστημα παρακολούθησης, τόσο αυξάνει το ποσοστό μετάπτωσης των CIN 3 σε διηθητικό καρκίνωμα. Με βάση τα ανωτέρω, είναι δύσκολο να προβλεφθεί η έκβαση κάθε αλλοίωσης, σε γενικές όμως γραμμές φαίνεται ότι οι χαμηλού βαθμού CIN έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να υποστρέψουν, ενώ οι υψηλού βαθμού είναι πιθανότερο να επιμείνουν ή να εξελιχθούν [31, 40] (Σχήμα 1).



Σχήμα 1. Εξέλιξη ενδοεπιθηλιακών νεοπλασιών τραχήλου μήτρας.



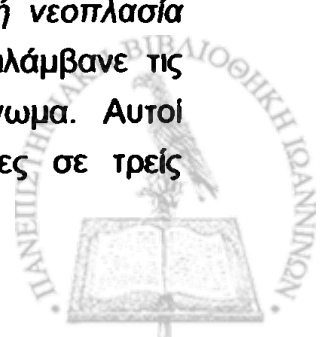
Θα πρέπει βέβαια παράλληλα να σημειωθεί ότι μερικοί ερευνητές διαφωνούν με την άποψη ότι οι υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακές νεοπλασίες προέρχονται από χαμηλού βαθμού CIN. Αυτοί θεωρούν ότι αναπτύσσονται *de novo* από το παρακείμενο των χαμηλού βαθμού αλλοιώσεων CIN επιθήλιο [41,42].

2.2. Προκαρκινωμάτωσης αλλοιώσεις αδενικού επιθηλίου

2.2.1. Ορολογία - Ιστορική αναδρομή

Ο όρος ενδοεπιθηλιακό (*in situ*) αδενοκαρκίνωμα εισήχθη το 1953 από τους Friedel και McKay [43] και έχει πλέον αποδειχθεί ότι αποτελεί προκαρκινωμάτωση αλλοίωση.

Μερικοί μελετητές πρότειναν ένα σύστημα ταξινόμησης των προκαρκινωμάτωσης αδενικών αλλοιώσεων ανάλογο του CIN, στο οποίο συμπεριέλαβαν το ενδοεπιθηλιακό αδενοκαρκίνωμα και τις χαμηλού βαθμού υποτιθέμενες προκαρκινωμάτωσης αλλοιώσεις, που εμφανίζουν μικρότερη ατυπία και μιτωτική δραστηριότητα από το ενδοεπιθηλιακό αδενοκαρκίνωμα. Οι τελευταίες ορίσθηκαν αρχικά ως *ενδοτραχηλική δυσπλασία* και αργότερα χρησιμοποιήθηκε ο όρος *άτυπη υπερπλασία*. Μεταγενέστερα, ο Gloor και οι συν. [44] εισήγαγαν τον όρο *τραχηλική ενδοεπιθηλιακή αδενική νεοπλασία* (*cervical intraepithelial glandular neoplasia -CIGN*), που περιλάμβανε τις δυσπλαστικές αλλοιώσεις και το ενδοεπιθηλιακό αδενοκαρκίνωμα. Αυτοί διέκριναν τις τραχηλικές ενδοεπιθηλιακές αδενικές νεοπλασίες σε τρεις



δυσπλαστικές αλλοιώσεις και το ενδοεπιθηλιακό αδενοκαρκίνωμα. Αυτοί διέκριναν τις τραχηλικές ενδοεπιθηλιακές αδενικές νεοπλασίες σε τρεις βαθμούς και τις μεν δυπλαστικές αλλοιώσεις τις όρισαν ως CIGN 1 και 2, ενώ το ενδοεπιθηλιακό αδενοκαρκίνωμα ως CIGN 3.

Ευρύτερα πάντως χρησιμοποιείται ο όρος *άτυπη ενδοτραχηλική υπερπλασία* για τις αλλοιώσεις, που από άλλους χαρακτηρίζονται ως δυσπλαστικές, αφού δεν έχει ακόμη τουλάχιστον αποδειχθεί, ότι αυτές αντιπροσωπεύουν πραγματικά προκαρκινωμάτεις αλλοιώσεις [8].

2.2.2. Επιδημιολογία

Η συχνότητα του ενδοεπιθηλιακού αδενοκαρκινώματος ποικίλλει στις διάφορες μελέτες, αλλά είναι κατά πολύ μικρότερη αυτής των CIN και παραδόξως μικρότερη της συχνότητας των διηθητικών αδενοκαρκινωμάτων. Αυτό μπορεί να οφείλεται στις δυσκολίες ανίχνευσης των μη διηθητικών αδενικών αλλοιώσεων τόσο κυτταρολογικά, όσο και με την κολπόσκόπηση.

Η ηλικία των γυναικών με ενδοεπιθηλιακό αδενοκαρκίνωμα κυμαίνεται από 39 έως 46 ετών και είναι κατά 10 περίπου χρόνια μικρότερη της μέσης ηλικίας των ασθενών με διηθητικό αδενοκαρκίνωμα [8].

2.2.3. Παράγοντες κινδύνου

Συχνά, σε ποσοστό που κυμαίνεται από 24% έως 75%, το ενδοεπιθηλιακό αδενοκαρκίνωμα συνυπάρχει με τραχηλική ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία CIN, γεγονός που υποδεικνύει πιθανά κοινή αιτιοπαθογένεια [45,46]. Η εφαρμογή μοριακών τεχνικών ανίχνευσης του DNA του ιού HPV σε ενδοεπιθηλιακά αδενοκαρκινώματα κατέδειξε τον αιτιοπαθογενετικό ρόλο του ιού. Συγκεκριμένα, σε 60% - 90% των ενδοεπιθηλιακών αδενοκαρκινωμάτων ανιχνεύθηκε DNA του ιού HPV και στο μεγαλύτερο ποσοστό του τύπου HPV18 [47-49].

Τα αποτελέσματα μελετών ανίχνευσης του HPV DNA σε αλλοιώσεις άτυπης ενδοτραχηλικής υπερπλασίας είναι πολύ αντιφατικά. Το ποσοστό των άτυπων ενδοτραχηλικών υπερπλασιών στις οποίες ανιχνεύεται HPV DNA κυμαίνεται από 6% έως 94% [50,51].

2.2.4. Φυσική Ιστορία - εξέλιξη

Τα ενδοεπιθηλιακά αδενοκαρκινώματα του τραχήλου είναι σπάνιες αλλοιώσεις, και ως εκ τούτου είναι δύσκολο να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα για τη βιολογική τους συμπεριφορά και εξέλιξη.



3. Καρκινώματα τραχήλου μήτρας

3.1. Γενικά

Σύμφωνα με την ταξινόμηση της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας σε συνεργασία με τη Διεθνή Εταιρεία Γυναικολογικής Παθολογοανατομίας [52] οι επιθηλιακοί όγκοι του τραχήλου ταξινομούνται σε τρεις γενικές κατηγορίες: πλακώδη καρκινώματα, αδenoκαρκινώματα και άλλοι κακοήθεις επιθηλιακοί όγκοι (Πίνακας 1).

Πίνακας 1. Ιστολογική ταξινόμηση καρκινωμάτων τραχήλου μήτρας

I. Πλακώδη καρκινώματα

- 1) Μικροδιηθητικά
- 2) Διηθητικά
 - Κερατινοποιούμενα
 - Μη κερατινοποιούμενα
- 3) Ακροχορδονώδη
- 4) Κονδυλωματώδη
- 5) Θηλώδη
- 6) Λεμφοεπιθηλιακά

II. Αδenoκαρκινώματα

- 1) Βλεννώδη
 - Ενδοτραχηλικού τύπου
 - Εντερικού τύπου
 - Από κύτταρα τύπου <<σφραγιστήρος δακτυλίου>>
- 2) Ενδομητριοειδή
- 3) Διαυγοκυτταρικά
- 4) Αδenoκαρκινώματα ελάχιστης απόκλισης
- 5) Ορώδη
- 6) Μεσονεφρικά
- 7) Καλά διαφοροποιημένα θηλοσωληνώδη

III. Άλλοι κακοήθεις επιθηλιακοί όγκοι

- 1) Αδenoπλακώδη
 - 2) Καρκινώματα από υαλοειδή κύτταρα
 - 3) Βλεννοεπιδερμοειδή
 - 4) Αδenoκυστικά
 - 5) Αδenoειδή βασικοκυτταρικά
 - 6) Καρκινοειδή
 - 7) Μικροκυτταρικά
 - 8) Αδιαφοροποίητα
-



Η σχετική συχνότητα των διαφόρων τύπων ποικίλλει από μελέτη σε μελέτη, αλλά φαίνεται ότι τα πλακώδη καρκινώματα είναι τα συχνότερα και αποτελούν το 60%-80% των καρκινωμάτων του τραχήλου [53].

Το ευρύτερα αποδεκτό σύστημα σταδιοποίησης των καρκινωμάτων του τραχήλου είναι εκείνο της Παγκόσμιας Ένωσης Γυναικολόγων και Μαιευτήρων (FIGO, 1988) [54] (Πίνακας 2).

Πίνακας 2. Σταδιοποίηση καρκινωμάτων τραχήλου μήτρας κατά FIGO.

Στάδιο

- 0** Ενδοεπιθηλιακό καρκίνωμα (in situ)
 - I** Καρκίνωμα εντοπιζόμενο στον τράχηλο
 - IA** Μικροδιηθητικό καρκίνωμα (ΜΙΚΑ)
 - IA1** ΜΙΚΑ με αρχόμενη μη μετρήσιμη διήθηση στρώματος
 - IA2** ΜΙΚΑ με βάθος διήθησης <5χιλ. και οριζόντια επέκταση <7χιλ.
 - IB** Αλλοίωση > IA2
 - II** Καρκίνωμα επεκτεινόμενο πέραν του τραχήλου, χωρίς προσβολή πνευλικού τοιχώματος ή κατώτερου τριτημόριου κόλπου
 - IIA** Χωρίς εμφανή διήθηση παραμητρίων
 - IIB** Με εμφανή διήθηση παραμητρίων
 - III** Επέκταση στο πνευλικό έδαφος. Διήθηση κατώτερου τριτημόριου κόλπου, υδρονέφρωση ή μη λειτουργικός νεφρός που δεν οφείλονται σε άλλα γνωστά αίτια
 - IIIA** Χωρίς διήθηση πνευλικού τοιχώματος
 - IIIB** Διήθηση πνευλικού τοιχώματος και/ή υδρονέφρωση ή μη λειτουργικός νεφρός
 - IV** Επέκταση πέραν της πυέλου ή διήθηση βλεννογόνου ουροδόχου κύστης ή ορθού
 - IVA** Επέκταση σε γειτονικά όργανα
 - IVB** Διήθηση απομακρυσμένων οργάνων
-



3.2. Πλακώδη καρκινώματα

3.2.1. Επιδημιολογία

Το καρκίνωμα του τραχήλου αποτελεί ένα σημαντικό πρόβλημα υγείας σε παγκόσμια κλίμακα. Είναι ο δεύτερος σε συχνότητα κακοήθης όγκος στις γυναίκες, μετά το καρκίνωμα του μαστού. Η επίπτωση της νόσου παγκόσμια κυμαίνεται από 5 έως 48 στις 100.000 γυναίκες και είναι χαμηλότερη στις αναπτυγμένες χώρες, ενώ αποτελεί τον συχνότερο κακοήθη όγκο στις γυναίκες σε αναπτυσσόμενες χώρες [55].

Την τελευταία εικοσαετία παρατηρείται πτώση της συχνότητας και θνησιμότητας από το καρκίνωμα του τραχήλου σε αναπτυγμένες χώρες, που αποδόθηκε κυρίως στα καλά οργανωμένα προγράμματα πρωτογενούς πληθυσμιακού ελέγχου [56,57]. Ταυτόχρονα όμως παρατηρείται αύξηση της συχνότητας και θνησιμότητας από τη νόσο σε νέες γυναίκες μικρότερες των 35 ετών [58-60], γεγονός το οποίο μπορεί να οφείλεται είτε στην έγκαιρη ανίχνευση μέσω των προγραμμάτων πρωτογενούς κυτταρολογικού πληθυσμιακού ελέγχου [61], είτε σε αλλαγές στη σεξουαλική συμπεριφορά και εντονότερη έκθεση σε παράγοντες κινδύνου [62,63].

Κατά τη διάρκεια της τελευταίας δεκαετίας, η μέση ηλικία διάγνωσης των ασθενών με διηθητικό πλακώδες καρκίνωμα είναι τα 40 έτη, ενώ αυτών με μικροδιηθητικό καρκίνωμα είναι τα 30 έτη, κατά 10 χρόνια δηλαδή μικρότερη της ηλικίας των ασθενών με διηθητικό καρκίνωμα [58-60].

3.2.2. Ιστογένεση - Παράγοντες κινδύνου

Το πλακώδες καρκίνωμα του τραχήλου θεωρείται ότι στις περισσότερες περιπτώσεις αναπτύσσεται σε έδαφος ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας. Ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα εμφανίζουν όμοια επιδημιολογικά χαρακτηριστικά με τις ασθενείς με ενδοεπιθηλιακές βλάβες. Αυτές ανήκουν κυρίως σε κατώτερα κοινωνικοοικονομικά στρώματα, έχουν πρώιμη σεξουαλική δραστηριότητα και εναλλάσσουν πολλαπλούς σεξουαλικούς συντρόφους [53,62-64].

Η λοίμωξη από τον ιό θηλώματος του ανθρώπου αποτελεί τον βασικότερο αιτιοπαθογενετικό παράγοντα στην ανάπτυξη του πλακώδους καρκινώματος. Σύμφωνα με πρόσφατες μοριακές μελέτες στο 99,7% των πλακωδών καρκινωμάτων ανιχνεύτηκε DNA του ιού, μερικοί δε θεωρούν ότι και στις υπόλοιπες περιπτώσεις ενέχονται τύποι του ιού, οι οποίοι ακόμη δε μπορούν να προσδιορισθούν [32].



3.2.3. Ιστολογικοί τύποι:

- Κερατινοποιούμενο
- Μη κερατινοποιούμενο

Σε μερικές μελέτες παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση του ιστολογικού τύπου με την πρόγνωση ασθενών που υποβλήθηκαν σε ακτινοθεραπεία, ενώ σε άλλες μελέτες ασθενών που υποβλήθηκαν σε ριζική χειρουργική εκτομή δεν παρατηρήθηκε τέτοια συσχέτιση [53].

3.2.4. Ιστολογική διαβάθμιση

Η πρώτη μέθοδος ιστολογικής διαβάθμισης του πλακώδους καρκινώματος του τραχήλου ήταν εκείνη του Broder [65], που προτάθηκε το 1920 για τη διαβάθμιση του πλακώδους καρκινώματος των χειλέων. Η μέθοδος αυτή, τροποποιημένη και βασιζόμενη στο βαθμό διαφοροποίησης, αποτελεί το ευρύτερα χρησιμοποιούμενο σήμερα σύστημα ιστολογικής διαβάθμισης. Σύμφωνα με αυτή τα πλακώδη καρκινώματα διακρίνονται σε:

- καλής διαφοροποίησης (grade I)
- μέτριας διαφοροποίησης (grade II)
- φτωχής διαφοροποίησης (grade III)

Για την προγνωστική σημασία της ιστολογικής διαβάθμισης δεν υπάρχει γενική συμφωνία. Στις περισσότερες πάντως μελέτες δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση της πρόγνωσης με την ιστολογική διαβάθμιση, που καθορίζεται από το βαθμό διαφοροποίησης. Αυτό οδήγησε τους ερευνητές στην αναζήτηση νέων συστημάτων βαθμοποίησης στα οποία συνεκτιμούνται ο βαθμός κερατινοποίησης, η πυρηνική ατυπία, ο αριθμός των μιτώσεων, το μέγεθος των κυττάρων, η σχέση πυρήνα-κυτταροπλάσματος, η φλεγμονώδης και στρωματική αντίδραση στον όγκο, η διήθηση αγγείων και το πρότυπο διήθησης του όγκου στο υποκείμενο αυτού στρώμα. Αυτή η προσέγγιση εισήχθη από τους Stendall και συν.[66] και ορίσθηκε ως βαθμολογία βαθμού κακοηθείας (MGS, malignancy grade score). Σε αρχικές μελέτες βρέθηκε ότι αποτελεί σημαντικό προγνωστικό δείκτη, αργότερα όμως σε μελέτες μεγαλύτερων σειρών δεν επιβεβαιώθηκε η προγνωστική του σημασία [53]. Συνοψίζοντας, κανένα σύστημα ιστολογικής διαβάθμισης ή ιστολογικής τυποποίησης δεν αποτελεί αξιόπιστο προγνωστικό δείκτη στο πλακώδες καρκίνωμα του τραχήλου.

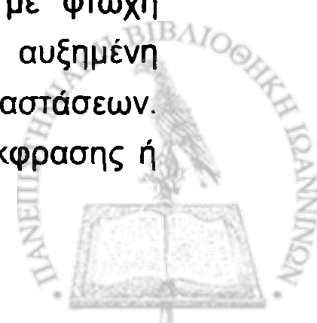


3.2.5. Προγνωστικοί παράγοντες

Ο κυριότερος προγνωστικός παράγοντας είναι το στάδιο της νόσου. Επίσης το μέγεθος του όγκου, το βάθος διήθησης του τοιχώματος, η παρουσία αγγειακών εμβόλων και η αγγειοβρίθεια του όγκου επηρεάζουν την πρόγνωση, ενώ μικρότερο ρόλο παίζουν ο ιστολογικός τύπος και ο βαθμός κακοηθείας του όγκου [53,67-70]. Επιπλέον, η ηλικία των ασθενών φαίνεται να σχετίζεται με την πρόγνωση και παρόλο που τα αποτελέσματα των διαφόρων μελετών είναι αντιφατικά, οι περισσότερες συγκλίνουν στο ότι η πρόγνωση των ασθενών σταδίου I και IIA ελάχιστα επηρεάζεται από την ηλικία, ενώ οι νεότερης ηλικίας ασθενείς με όγκους μεγαλύτερου σταδίου εμφανίζουν χειρότερη πρόγνωση [71,72]. Σε πρόσφατες μελέτες, η πρόγνωση φαίνεται ότι σχετίζεται με λοίμωξη από συγκεκριμένους τύπους του ιού HPV [73,74].

Η κλινική σημασία της ανευπλοειδίας στην πρόγνωση δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί. Υπάρχουν αρκετές μελέτες στις οποίες βρέθηκε ότι η ανευπλοειδία συσχετίζεται με δείκτες φτωχής πρόγνωσης όπως οι λεμφαδενικές μεταστάσεις, το υψηλό στάδιο και η μεγάλη ηλικία [75,76], σε άλλες όμως μελέτες δε βρέθηκε να έχει προγνωστική αξία [75,77,78].

Αλλαγές στην έκφραση ή τη λειτουργία γονιδίων, που ελέγχουν την κυτταρική αύξηση και διαφοροποίηση, έχουν διερευνηθεί όσον αφορά την προγνωστική τους σημασία. Σημειακές μεταλλάξεις ή επαυξήσεις των γονιδίων *ras* έχουν περιγραφεί σε καρκινώματα του τραχήλου [79,80]. Σε μελέτες ανάλυσης του ογκογονιδίου *H-ras-1* παρατηρήθηκε απώλεια ετεροζυγωτίας σε 36% των καρκινωμάτων προχωρημένων σταδίων, στο 90% από τα οποία ανιχνεύθηκαν οι τύποι 16 και 18 του ιού HPV. Μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 12 του *H-ras-1* ανευρέθηκαν σε 2% των πρώιμων και 24% των προχωρημένου σταδίου όγκων, οι οποίοι ταυτόχρονα εμφάνιζαν υπερέκφραση ή ενίσχυση του γονιδίου *c-myc* [81,82]. Επίσης, υπερέκφραση της πρωτεΐνης p21 του γονιδίου *ras* παρατηρήθηκε σε κερατινοποιούμενα και μη κερατινοποιούμενα πλακώδη καρκινώματα [83,84] και αυτή φάνηκε να σχετίζεται με φτωχή πρόγνωση και αυξημένη πιθανότητα λεμφαδενικών μεταστάσεων [84]. Στα καρκινώματα του τραχήλου, έχουν περιγραφεί αντιμεταθέσεις ή και ενίσχυση του γονιδίου *c-myc*, οι οποίες φαίνεται να είναι συχνότερες στα στάδια III και IV [85]. Σύμφωνα με κάποιες αναφορές, υπερέκφραση του γονιδίου *c-myc* παρατηρείται σε ποσοστό 44%-57% των καρκινωμάτων του τραχήλου και αυτή φαίνεται να σχετίζεται με φτωχή πρόγνωση σε καρκινώματα αρχόμενου σταδίου, καθώς και με αυξημένη πιθανότητα υποτροπής και χορήγησης απομακρυσμένων μεταστάσεων. Αντίθετα, σε άλλες μελέτες δεν ανευρέθηκε συσχέτιση της υπερέκφρασης ή



ενίσχυσης του c-myc με την πρόγνωση των ασθενών [86,87]. Σε μία πρόσφατη μελέτη, φάνηκε ότι η υπερέκφραση του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR), η οποία παρατηρήθηκε σε ποσοστό 54% των καρκινωμάτων σταδίου I και II, αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό δείκτη για τα καρκινώματα αρχόμενου σταδίου ανάπτυξης [88]. Υπάρχουν επίσης αναφορές, σύμφωνα με τις οποίες η υπερέκφραση της πρωτεΐνης του ογκογονιδίου c-erbB-2 αποτελεί δείκτη φτωχής πρόγνωσης για τα πλακώδη καρκινώματα του τραχήλου [89,90] και σχετίζεται με το στάδιο της νόσου [90].

3.3. Αδενοκαρκινώματα

3.3.1. Επιδημιολογία

Τα αδενοκαρκινώματα αντιπροσωπεύουν το 8%-25% των καρκινωμάτων του τραχήλου. Την τελευταία εικοσαετία παρατηρείται αύξηση της σχετικής συχνότητας των αδενοκαρκινωμάτων που οφείλεται στην μείωση της συχνότητας των πλακωδών καρκινωμάτων, αλλά και απόλυτη αύξηση της συχνότητας των αδενοκαρκινωμάτων σε νέες κυρίως γυναίκες μεσαίων και ανώτερων κοινωνικών στρωμάτων.

Η ηλικία των ασθενών με διηθητικό αδενοκαρκίνωμα κυμαίνεται μεταξύ 47 και 53 ετών [53].

3.3.2. Ιστογένεση - Παράγοντες κινδύνου

Ως κύτταρο προέλευσης των διηθητικών αδενοκαρκινωμάτων του τραχήλου θεωρείται το εφεδρικό κύτταρο του κυλινδρικού επιθηλίου του ενδοτραχήλου.

Αιτιοπαθογενετικά, τα αδενοκαρκινώματα σχετίζονται με τον ιό HPV, κυρίως τον τύπο 18, και με τους άλλους παράγοντες κινδύνου των πλακωδών καρκινωμάτων, τους οποίους αναλύσαμε παραπάνω. Η μακροχρόνια λήψη αντισυλληπτικών έχει επίσης ενοχοποιηθεί από μερικούς, ενώ αμφισβητείται από άλλους. Επιπλέον, σε ασθενείς με σύνδρομο Peutz-Jeghers φαίνεται να υπάρχει γενετική προδιάθεση για την ανάπτυξη διηθητικού αδενοκαρκινώματος [53].

3.3.3. Προγνωστικοί παράγοντες

Οι κυριότεροι προγνωστικοί δείκτες των αδενοκαρκινωμάτων του τραχήλου είναι το μέγεθος του όγκου, το βάθος διήθησης του τοιχώματος, η



παρουσία αγγειακών εμβόλων, το στάδιο και η παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων [91-93].

Δείκτες φτωχής πρόγνωσης είναι ο υψηλός βαθμός κακοηθείας και μέγεθος όγκου μεγαλύτερο των 3 εκ.. Η πλοειδία φαίνεται επίσης ότι σχετίζεται με τον βαθμό κακοηθείας και την πρόγνωση της νόσου [94,95]. Ασθενείς με υποτριπλοειδείς όγκους έχουν σημαντικά μεγαλύτερο ποσοστό επιβίωσης(45-55%) από εκείνες με υπερτριπλοειδείς όγκους(10- 18%) [95].

Από μία μελέτη των Mandai και συν. [96] προέκυψε ότι η υπερέκφραση της πρωτεΐνης του ογκογονιδίου c-erbB-2 (p185) καθώς και η απουσία έκφρασης της πρωτεΐνης του αντιμεταστατικού γονιδίου nm23-H1 συσχετίζονται με την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων και με φτωχή πενταετή επιβίωση των ασθενών με αδενοκαρκίνωμα σταδίου I και II. Η υπερέκφραση της p185 φάνηκε ότι αποτελεί δείκτη φτωχής πρόγνωσης των αδενοκαρκινωμάτων του τραχήλου από τη μελέτη των Kihana και συν. [97] Στη μελέτη των Costa και συν. [98] υπερέκφραση της p185 παρατηρήθηκε σε ποσοστό 50% των καρκινωμάτων τραχήλου με αδενική διαφοροποίηση και αυτή συσχετίσθηκε με πρώιμη υποτροπή (στα δύο πρώτα χρόνια), αλλά όχι με τη συνολική ελεύθερη νόσου επιβίωση.

Τα αποτελέσματα μελετών που συγκρίνουν την πρόγνωση των ασθενών με τον ιστολογικό τύπο του καρκινώματος είναι αντιφατικά [99-102].

3.4. Αδενοπλακώδη καρκινώματα

3.4.1. Επιδημιολογία

Τα αδενοπλακώδη καρκινώματα αντιπροσωπεύουν το 5% έως 25% των καρκινωμάτων του τραχήλου. Αναπτύσσονται τόσο σε νέες όσο και σε ηλικιωμένες γυναίκες και μπορεί να συνδυάζονται με κύηση [53].

3.4.2. Ιστογένεση - Παράγοντες κινδύνου

Ως κύτταρο προέλευσης των αδενοπλακωδών καρκινωμάτων θεωρείται το πολυδύναμο εφεδρικό κύτταρο του ενδοτραχηλικού επιθηλίου.

Οι επιδημιολογικοί παράγοντες κινδύνου των αδενοπλακωδών καρκινωμάτων ομοιάζουν περισσότερο με αυτούς των πλακωδών καρκινωμάτων παρά των αδενοκαρκινωμάτων [53].

3.4.3. Προγνωστικοί παράγοντες

Στη μελέτη των Costa και συν. [98] υπερέκφραση της p185 πρωτεΐνης παρατηρήθηκε σε ποσοστό 50% των αδενοπλακωδών καρκινωμάτων του



τραχήλου και αυτή φάνηκε να συσχετίζεται με πρώιμη υποτροπή (στα δύο πρώτα χρόνια), αλλά όχι με τη συνολική ελεύθερη νόσου επιβίωση. Στην ίδια μελέτη διερευνήθηκε η υπερέκφραση της πρωτεΐνης του γονιδίου c-erbB-2 και σε περιπτώσεις αδеноκαρκινωμάτων και διαπιστώθηκε υπερέκφραση στο ίδιο ποσοστό με αυτό των αδеноπλακωδών καρκινωμάτων.

Γενικά, οι ασθενείς με αδеноπλακώδη καρκινώματα εμφανίζουν συχνότερα λεμφαδενικές μεταστάσεις και έχουν χειρότερη πρόγνωση σε σύγκριση με αυτές που έχουν πλακώδη καρκινώματα ή αδеноκαρκινώματα. Πάντως, τα αποτελέσματα μελετών συσχέτισης του ιστολογικού τύπου με την πρόγνωση των ασθενών είναι αντιφατικά [53,99,100].



4. Ιοί θηλώματος του ανθρώπου (Human Papillomaviruses) και τραχηλική νεοπλασία

4.1. Ταξινόμηση - τυποποίηση

Οι ιοί του θηλώματος που προσβάλλουν τον άνθρωπο είναι επιθηλιοτρόποι DNA ιοί, που ανήκουν στην οικογένεια Papovaviridae. Από τους 90 διαφορετικούς τύπους του ιού [103], που μέχρι σήμερα έχουν χαρακτηριστεί μοριακά, οι 36 σχετίζονται με βλάβες του γεννητικού συστήματος [104,105]. Οι τύποι αυτοί διακρίνονται σε "χαμηλού κινδύνου" (οι συχνότεροι εξ' αυτών είναι οι 6, 11, 42, 43, 44), που ανιχνεύονται κυρίως σε χαμηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακές βλάβες και σε "υψηλού κινδύνου" (16, 18 και λιγότερο 31, 33, 35, 45, 51, 52, 56, 58), που σχετίζονται με υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακές βλάβες και διηθητικά καρκινώματα. Στα διηθητικά καρκινώματα φαίνεται να επικρατεί ο τύπος 16 και μάλιστα αυτός συσχετίζεται κυρίως με τα κερατινοποιούμενα πλακώδη καρκινώματα, ενώ σε μη κερατινοποιούμενα έχουν ανιχνευθεί διάφοροι "υψηλού κινδύνου" τύποι του ιού. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι οι τύποι 18 και 45 συσχετίζονται κυρίως με τα αδενοκαρκινώματα και αδenoπλακώδη καρκινώματα [8,28,29,32,35,106].

4.2. Δομή του γονιδιώματος του ιού

Οι ιοί θηλώματος περιέχουν κυκλικό δίκλωνο και υπερελικωμένο DNA με 8000 περίπου ζεύγη βάσεων. Είναι μικροί σε μέγεθος με διάμετρο 55nm. Εμφανίζουν εικοσαεδρική συμμετρία και το καψίδιό τους αποτελείται από 72 καψομερίδια. Το γονιδιώμά τους χωρίζεται σε τρεις περιοχές, την ανοδικά ρυθμιστική (upstream regulatory region, URR), την πρώιμη (early, E) και την όψιμη (late, L), είναι δε έτσι οργανωμένο ώστε η μεταγραφή των πρώιμων και όψιμων γονιδίων να γίνεται από την ίδια αλυσίδα DNA (Σχήμα 2). Η ανοδικά ρυθμιστική (URR) είναι μη κωδικοποιούσα περιοχή που ρυθμίζει την αντιγραφή και μεταγραφή των καθοδικών αλληλουχιών της πρώιμης περιοχής. Τόσο η πρώιμη όσο και η όψιμη περιοχή περιέχουν ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης (open reading frames), τα οποία αντιστοιχούν σε περιοχές του γονιδιώματος που στερούνται κωδικονίων τερματισμού και ως εκ τούτου μπορούν να μεταφραστούν σε πρωτεΐνες. Η πρώιμη περιοχή μεταγράφεται νωρίς στον κύκλο ζωής του ιού και κωδικοποιεί πρωτεΐνες, που είναι σημαντικές για την αντιγραφή του ιού, ενώ η όψιμη περιοχή κωδικοποιεί δομικές πρωτεΐνες του ιού που παράγονται όψιμα στον κύκλο ζωής αυτού.

Η ανοδικά ρυθμιστική περιοχή περιέχει θέσεις σύνδεσης ποικίλων παραγόντων μεταγραφής, συμπεριλαμβανομένου του ενεργοποιητή



πρωτεϊνών 1 (AP 1), του παράγοντα μεταγραφής- ειδικού των κερατινοκυττάρων 1 (KRF 1), καθώς και παραγόντων μεταγραφής που προέρχονται από τον ιό. Η σύνδεση των ανωτέρω καθώς και άλλων παραγόντων μεταγραφής ρυθμίζει τη μεταγραφή των ανοικτών πλαισίων ανάγνωσης της πρώιμης περιοχής [8].

Η **πρώιμη περιοχή** κωδικοποιεί πρωτεΐνες, που είναι απαραίτητες για την αντιγραφή του ιού και τη διατήρηση μεγάλου αριθμού ιικών σωματίων στα κύτταρα του ξενιστή. Η Ε περιοχή περιλαμβάνει έξι διαφορετικά ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης (E1, E2, E4, E5, E6, E7).

Ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης E1

Κωδικοποιεί μια φωσφοπρωτεΐνη M.B.68kDa με ενδογενή ελικάση, ΑΤΡάση και ειδική ικανότητα σύνδεσης με το DNA. Η E1 πρωτεΐνη, σε συνδυασμό με την E2, είναι βασική για την αντιγραφή του ιού.

Ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης E2

Κωδικοποιεί την E2 πρωτεΐνη, που ρυθμίζει τη μεταγραφή της πρώιμης Ε περιοχής, καταστέλλοντας γενικά τη μεταγραφή των E6 και E7 γονιδίων. Σε πρόσφατες μελέτες υποθέτουν ότι η E2 πρωτεΐνη ενεργοποιεί το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 ανεξάρτητα από την E6 πρωτεΐνη και οδηγεί τα κύτταρα σε απόπτωση [8, 107-109].

Ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης E4

Κωδικοποιεί την E4 πρωτεΐνη, η λειτουργία της οποίας παραμένει ακόμη άγνωστη. Σε μερικούς τύπους HPV αυτή μεταγράφεται μόνο σε κερατινοποιημένα κερατινοκύτταρα, ενώ στον HPV1 η μεταγραφή συμβαίνει στις κατώτερες στιβάδες του επιθηλίου. Η αλληλεπίδραση μεταξύ της E4 και των κυτοκερατινών μπορεί να οδηγεί σε σύμπτωση του ενδιάμεσου κυτταρικού δικτύου, που έχει σαν αποτέλεσμα την δημιουργία κοιλοκυττάρων [8, 107].

Ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης E5

Αυτό απουσιάζει από μερικούς τύπους HPV και είναι ακρωτηριασμένο σε άλλους. Στους τύπους 1, 6 και 16, η E5 πρωτεΐνη φαίνεται να εμπλέκεται στο μετασχηματισμό των κυττάρων και μπορεί σε συνεργασία με τον υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) και το ογκογονίδιο ErbB-2 να οδηγήσει σε ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό [107, 110, 111].

Ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης E6 και E7

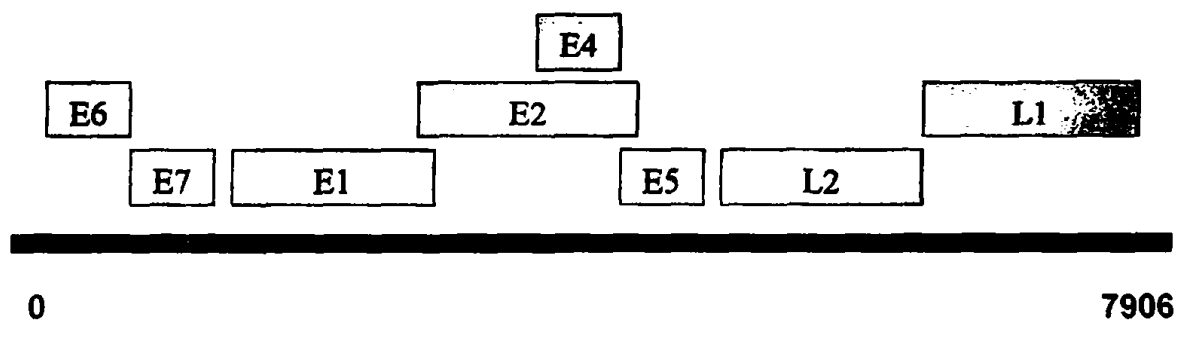
Κωδικοποιούν τις E6 και E7 πρωτεΐνες, οι οποίες αποτελούνται από μία αλυσίδα 150 και 100 αμινοξέων αντίστοιχα και εμπλέκονται στο μετασχηματισμό των κυττάρων.

Η **όψιμη περιοχή** του ιού περιέχει δύο ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης, τα L1 και L2, που κωδικοποιούν τις δομικές πρωτεΐνες του καψιδίου. Μεταγραφή



των L1 και L2 ανοικτών πλαισίων ανάγνωσης γίνεται όψιμα, κατά την περίοδο που ο ιός αρχίζει να παράγεται. Η μεταγραφή αυτής της περιοχής φαίνεται να ρυθμίζεται από παράγοντες μεταγραφής, που παράγονται μόνον από διαφοροποιημένα κύτταρα της ενδιάμεσης και επιφανειακής στιβάδας του πλακώδους επιθηλίου. Για το λόγο αυτό μεγάλα ποσά πρωτεϊνών του καψιδίου, που κωδικοποιούνται από τα L1 και L2 πλαίσια ανάγνωσης, βρίσκονται σε εξωφυτικά κονδυλώματα και χαμηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακές βλάβες ενώ, στις υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακές βλάβες και στα διηθητικά καρκινώματα ανιχνεύονται μικρά ποσά αυτών των πρωτεϊνών [8,107,112].

Σχήμα 2. Δομή του γονιδιώματος του ιού HPV 16. Πρώϊμα (E) και όψιμα (L) γονίδια.



4.3. Κύκλος ζωής του ιού

Ο ιός HPV προσβάλλει τα βασικά κύτταρα σε θέσεις επιθηλιακής διάβρωσης, η αντιγραφή όμως του ιού γίνεται σε διαφοροποιημένα κύτταρα. Αν και δεν έχει ακόμη οριστικά ταυτοποιηθεί ο υποδοχέας του ιού στα κύτταρα του ξενιστή, θεωρείται πιθανότερο να πρόκειται για την αββ4 ιντεγκρίνη.

Η περίοδος επώασης διαρκεί από λίγες εβδομάδες έως και περισσότερο από 18 μήνες. Η μετάβαση από λανθάνουσα σε παραγωγική λοίμωξη επάγεται από τη διαφοροποίηση των κυττάρων, καθώς αυτά ανεβαίνουν προς τις ανώτερες στιβάδες του επιθηλίου. Στις θέσεις αυτές, ενώ συνεχίζουν να εκφράζονται τα E γονίδια, κυριαρχεί η μεταγραφή των L1/L2 με αποτέλεσμα το σχηματισμό ιικών σωματίων.

Σε χαμηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακές νεοπλασίες συνήθως συμβαίνει επιτρεπτική λοίμωξη και απελευθέρωση ιοσωματίων με το μηχανισμό που



περιγράψαμε ανωτέρω. Το DNA του ιού στις περιπτώσεις αυτές παραμένει ως επισωματικό κυκλοτερές μόριο. Αντίθετα, στις υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακές νεοπλασίες καθώς και στα διηθητικά καρκινώματα το ιϊκό DNA ενσωματώνεται συνήθως στο DNA του ξενιστή και δεν παρατηρείται παραγωγική επιτρεπτική λοίμωξη [8,107,112,113].

4.4. Μηχανισμός κακοήθους εξαλλαγής

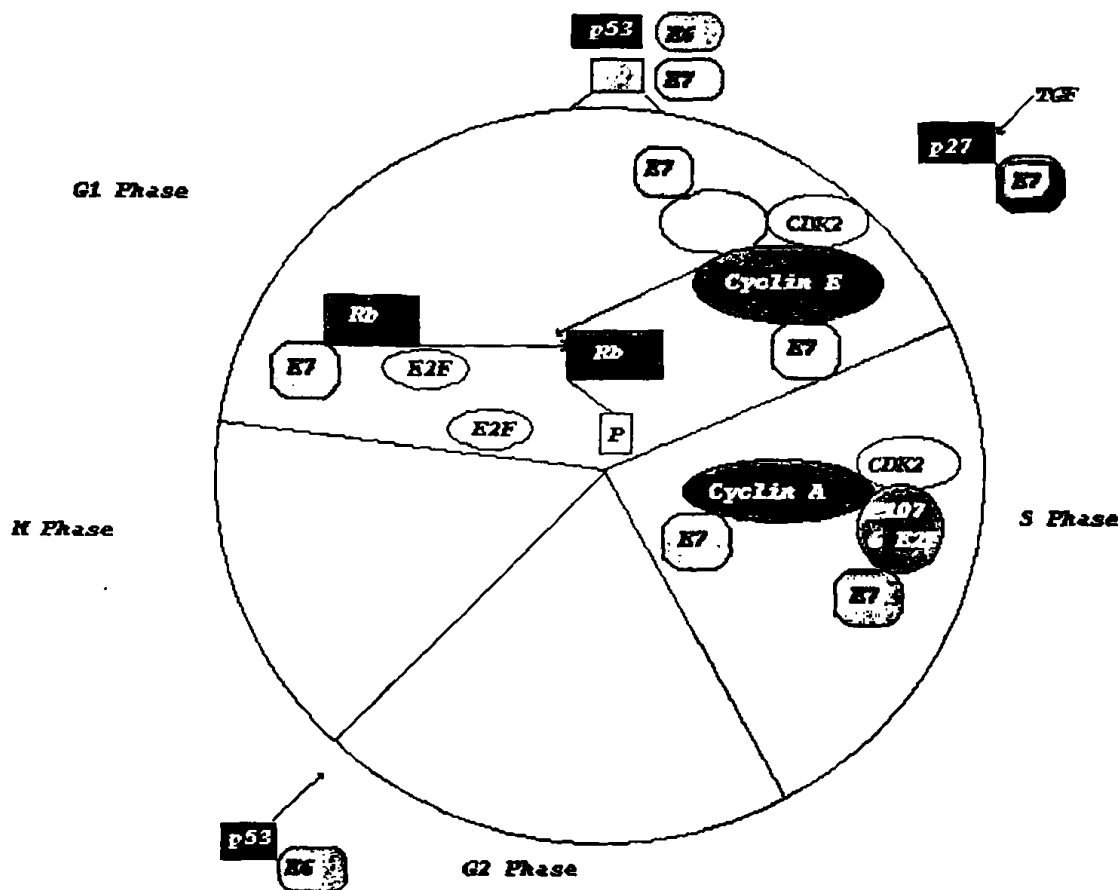
Όπως ήδη αναφέραμε, στις υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακές νεοπλασίες και στα διηθητικά καρκινώματα το DNA του ιού βρίσκεται συνήθως ενσωματωμένο στο γονιδίωμα των κυττάρων. Η ενσωμάτωση του ιϊκού DNA γίνεται σε διάφορες θέσεις του γονιδιώματος του κυττάρου στόχου, γειτονικές προς τους τόπους γνωστών ογκογονιδίων [114,115]. Οι αλληλουχίες του ιϊκού DNA και του DNA των κυττάρων στα οποία ενσωματώνεται δεν είναι ομόλογες [115]. Θεωρείται ότι πρόκειται μάλλον για μή ομόλογο ανασυνδυασμό του ιϊκού και κυτταρικού DNA, πιθανώς σε περισσότερο προσιτές, εύθραυστες θέσεις του γονιδιώματος των κυττάρων [116].

Συχνά, κατά την ενσωμάτωση του ιού σπάζουν οι περιοχές E1/E2 με επακόλουθο τη συνεχή μεταγραφή των E6 / E7 γονιδίων. Σε καλλιέργειες κυτταρικών σειρών, οι E6 και E7 πρωτεΐνες των υψηλού κινδύνου τύπων HPV (16, 18), επάγουν την αθανатоποίηση και το μετασχηματισμό των κυττάρων. Αντίθετα, οι πρωτεΐνες E6 και E7 των χαμηλού κινδύνου τύπων HPV (6, 11) δεν εμφανίζουν τέτοια δράση. Για το μετασχηματισμό των κυττάρων είναι απαραίτητη η συνύπαρξη και των δύο γονιδίων (E6, E7) και για τη διατήρηση

Ο μετασχηματισμός των κυττάρων αποδίδεται κυρίως στην του κακοήθους φαινότυπου απαιτείται η υπερέκφραση αμφοτέρων των πρωτεϊνών [27,112,115]. αλληλεπίδραση των ιϊκών ογκοπρωτεϊνών με άλλους παράγοντες, οι σημαντικότεροι των οποίων είναι ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια [39,107]. Βασικό επίσης ρόλο στην τραχηλική καρκινογένεση παίζει η αλληλεπίδραση των E6 και E7 ογκοπρωτεϊνών με πρωτεΐνες που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο (Σχήμα 3).



Σχήμα 3. Επίδραση ιικών ογκοπρωτεϊνών E6 και E7 στον κυτταρικό κύκλο.



4.4.1. Αλληλεπίδραση της E6 ογκοπρωτεΐνης με το γονίδιο p53

Το p53 θεωρείται ως το σημαντικότερο ογκοκατασταλτικό γονίδιο και αποτελεί έναν από τους πλέον συχνά εμπλεκόμενους στην καρκινογένεση γενετικούς παράγοντες [117,118]. Το γονίδιο έχει χαρτογραφηθεί στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 17 και κωδικοποιεί μία πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη 53kDa, η οποία δρα ως μεταγραφικός παράγοντας [119]. Η πρωτεΐνη p53 συνδέεται με ειδικές ακολουθίες του DNA και ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου [120-123]. Επάγει την έκφραση των γονιδίων p21 (WAF1/CP1), GADD45 και mdm-2 [124].

Σε περίπτωση βλάβης του DNA, η λειτουργικά δραστική πρωτεΐνη του φυσικού στελέχους του p53 ενεργοποιείται. Ανάλογα με τη βαρύτητα της βλάβης, είτε οδηγεί σε G1 αναστολή, για να δώσει χρόνο για επιδιόρθωση της βλάβης πριν την αντιγραφή του DNA, είτε οδηγεί τα κύτταρα σε απόπτωση [125-127]. Η αναστολή προόδου του κυτταρικού κύκλου και η επαγωγή της απόπτωσης αποτελούν τις σπουδαιότερες λειτουργίες του p53, ενώ πρόσφατα

πρόσφατα αποδείχθηκε ότι παίζει ενεργό ρόλο στον έλεγχο διπλασιασμού του κεντροσώματος, εξασφαλίζοντας φυσιολογικές διπολικές ατράκτους και ακριβή διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων κατά τη διάρκεια της μίτωσης [128].

Μεταλλάξεις του γονιδίου ή σύνδεση του trans-ενεργοποιημένου τμήματος αυτού από ογκοπρωτείνες οδηγούν σε απενεργοποίηση της πρωτεΐνης p53. Οι μεταλλάξεις συνίστανται σε απάλειψη του ενός αλληλίου και σημειακές μεταλλάξεις του άλλου [129-131].

Στην τραχηλική νεοπλασία η απενεργοποίηση της p53 πρωτεΐνης αποδίδεται κυρίως στην HPV E6 ογκοπρωτεΐνη, και πολύ λιγότερο σε μεταλλάξεις του γονιδίου, οι οποίες παρατηρούνται σε λιγότερο από 10% των περιπτώσεων [132,133]. Σε αρκετές μελέτες διαπιστώνεται αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας ιϊκού DNA και μεταλλάξεων του p53, ενώ σε άλλες δε φαίνεται να σχετίζονται [133,134]. Επιπλέον, η ανίχνευση μεταλλάξεων του p53 σε μεταστάσεις πλακωδών καρκινωμάτων HPV+, υποδηλώνουν ότι οι μεταλλάξεις του p53 μπορεί να παίζουν κάποιο ρόλο στην επέκταση ορισμένων πρωτοπαθών HPV+ καρκινωμάτων [135].

Η E6 πρωτεΐνη των "υψηλού κινδύνου" τύπων του ιού (HPV-16, HPV-18) συνδέεται με την p53 πρωτεΐνη και μία λιγκάση της ουμπικουΐνης, την E6-συνδεόμενη πρωτεΐνη (E6-AP). Το σύμπλεγμα E6, E6-AP και p53 επιτρέπει την ουμπικουΐίνωση της p53, η οποία στη συνέχεια διασπάται από το πρωτεόσωμα 26S. Σε μελέτη με συνεστιακό μικροσκόπιο το σύμπλεγμα E6-p53 εντοπίστηκε στο κυτταρόπλασμα, γεγονός που υποδηλώνει ότι η σύνδεση και διάσπαση εμποδίζουν την p53 να ασκήσει τη δράση της στον πυρήνα των κυττάρων. Έχει αποδειχθεί ότι μείωση της E6-AP, σε κύτταρα που έχουν μολυνθεί από τον ιό HPV, οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα p53, ενώ δεν επηρεάζει καθόλου τα επίπεδα της p53 σε φυσιολογικά κύτταρα [39,107,136,137].

Δεδομένου του ρόλου της p53 στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης, η απενεργοποίησή της θεωρείται ότι οδηγεί σε αθανατοποίηση και ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων, που έχουν υποστεί γενετικές ανωμαλίες λόγω της HPV λοίμωξης. Ως εκ τούτου, η E6 ογκοπρωτεΐνη είναι ο σημαντικότερος παράγοντας, ο οποίος ευθύνεται για τη γενετική αστάθεια, το αυξημένο ποσοστό μεταλλάξεων και την ανευπλοειδία που παρατηρούνται σε υψηλού βαθμού CIN και καρκινώματα.

Επίσης η E6 ενεργοποιεί την τελομεράση, trans-ενεργοποιεί τον προαγωγό του c-myc και απορρυθμίζει τον υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα [107].



4.4.2. Αλληλεπίδραση E7 ογκοπρωτεΐνης με το γονίδιο Rb

Το γονίδιο Rb εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 13q14 και κωδικοποιεί μία πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη, η οποία φαίνεται να ελέγχει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Η πρωτεΐνη Rb φωσφορυλιώνεται κατά το τέλος της G1 φάσης και παραμένει έτσι κατά τη διάρκεια των φάσεων πολλαπλασιασμού του κυτταρικού κύκλου. Κατά το τέλος της G2-M φάσης, η πρωτεΐνη αποφωσφορυλιώνεται και το κύτταρο εξέρχεται από τη φάση αντιγραφής. Η φωσφορυλίωση της pRb ελέγχεται από τα συμπλέγματα κυκλίνης D/cdk4. Κατά το τέλος της G1 φάσης του κύκλου, αυξάνονται τα επίπεδα της κυκλίνης D και της κυκλινοεξαρτώμενης κινάσης 4 (cdk4). Αυτές συνδέονται με την pRb και την φωσφορυλιώνουν. Τότε η pRb απελευθερώνει τον μεταγραφικό παράγοντα E2F, ο οποίος με τη σειρά του συνδέεται με το DNA και ευοδώνει τη μεταγραφή γονιδίων, εμπλεκόμενων στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την αντιγραφή του DNA. Κατά τις υπόλοιπες φάσεις του κυτταρικού κύκλου η pRb είναι συνδεδεμένη με τον παράγοντα μεταγραφής E2F και τον απενεργοποιεί. Αυτή η λειτουργία ρύθμισης της κυτταρικής αύξησης φαίνεται να είναι σημαντική για την ομαλή μετάβαση από την G1 στην S φάση του κυτταρικού κύκλου, που εξασφαλίζει την αντιγραφή του DNA και την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου [138].

Μεταλλάξεις αμφοτέρων των αλληλίων του γονιδίου προκαλούν απενεργοποίηση της πρωτεΐνης pRb. Αυτές όμως ανιχνεύονται σπάνια στο καρκίνωμα του τραχήλου.

Στην τραχηλική νεοπλασία η λειτουργική απενεργοποίηση της pRb οφείλεται στην E7 πρωτεΐνη του HPV 16, η οποία σχηματίζει συμπλέγματα με την πρωτεΐνη του ογκοκατασταλτικού γονιδίου Rb. Η δημιουργία συμπλεγμάτων E7-pRb οδηγεί σε απελευθέρωση του μεταγραφικού παράγοντα E2F με επακόλουθο τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Πρόσφατα, έχουν ανευρεθεί και άλλες πρωτεΐνες-στόχοι της HPV E7, οι οποίες ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο. Συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη E7 των υψηλού κινδύνου τύπων του ιού απορρυθμίζει τις G1-S κυκλίνες A, B και E και ενεργοποιεί την cdk2 κινάση. Επιπλέον, η E7 συνδέεται με τους αναστολείς των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών (cyclin-dependent kinase inhibitory proteins) όπως η p21 και p27 και τις απενεργοποιεί [39, 107, 113, 137].



4.4.3. Αλληλεπίδραση των ογκοπρωτεϊνών E6, E7 με διάφορα ογκογονίδια

Σε *in vitro* μελέτες παρατηρήθηκε ότι τα γονίδια E6 και E7 του HPV 16, υπό τον έλεγχο ενός ετερόλογου προαγωγού, είναι ικανά να αθανατοποιούν BRK (baby rat kidney) κύτταρα και σε συνεργασία με το ενεργοποιημένο γονίδιο H-ras να τα μετασχηματίζουν έτσι, ώστε αυτά να καθίστανται ογκογόνα σε συγγενετικά ζώα [139]. Χρησιμοποιώντας τα ίδια (BRK) κύτταρα, διαπιστώθηκε ότι το E7 γονίδιο, ελεγχόμενο από τον προαγωγό SV40, προκαλεί μετασχηματισμό των κυττάρων σε συνδυασμό με το ενεργοποιημένο H-ras-1 [140]. Οι μελέτες αυτές επεκτάθηκαν και σε άλλους τύπους HPV (HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33) και καταδείχθηκε ότι και οι HPV 16, 18, 31 και 33 μπορούσαν, σε συνεργασία με το ενεργοποιημένο H-ras, να μετασχηματίσουν τα BRK κύτταρα, ενώ δε συνέβαινε το ίδιο με τους HPV 6 και 11 [141]. Μεταγενέστερα, παρατηρήθηκε ότι τα E7 γονίδια των τύπων 6 και 11 συνεργαζόταν με το H-ras-1, μόνον υπό την επίβλεψη ενός ισχυρού προαγωγού, γιά τη διατήρηση δε του κακοήθους φαινότυπου ήταν απαραίτητη η συνεχής έκφραση του E7 γονιδίου [142,143]. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι τα γονίδια της E περιοχής του ιού HPV συνεργαζόταν με το ενεργοποιημένο H-ras μόνον όταν η έκφραση τους ενισχυόταν από γλυκοκορτικοειδή [144]. Το εύρημα αυτό σχετίζεται με την παρουσία ενός, ανεξάρτητου της E2 πρωτεΐνης, ενισχυτή στην ανοδικά ρυθμιστική περιοχή (URR) του HPV 16 που ρυθμίζεται από γλυκοκορτικοειδή και λειτουργεί σε περίπτωση διάσπασης της E2 πρωτεΐνης κατά τη διαδικασία ενσωμάτωσης του ιού [145].

Οι HPV 16, 18, 31 και 33 υπό τον έλεγχο ενός ετερόλογου προαγωγού, μπορούσαν να συνεργαστούν με το ογκογονίδιο c-fos αλλά όχι με τα c-myc, v-fms, v-mos και c-src [144]. Όμως το προϊόν του E7 γονιδίου δεν ήταν από μόνο του ικανό να μετασχηματίσει αρχικές κυτταροκαλλιέργειες σε συνδυασμό με το ενεργοποιημένο H-ras, υποδηλώνοντας ότι άλλα γονίδια της πρώϊμης E περιοχής του ιού απαιτούνται γιά τον μετασχηματισμό των κυττάρων.

Σε καλλιέργειες ανθρώπινων κυττάρων, που επιμολύνθηκαν με τον HPV16 και στα οποία προστέθηκε ένας ισχυρός προαγωγός και ενεργοποιημένο H-ras, παρατηρήθηκαν αντιμεταθέσεις των χρωμοσωμάτων 1 και 11[t(1:11) (q12;q23)], αύξηση του αριθμού των χρωμοσωμάτων (85- 88) και αύξηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού, ενώ όταν δεν προστέθηκε ενεργοποιημένο H-ras, τα κύτταρα παρέμεναν διπλοειδή και διατηρούσαν φυσιολογική μορφολογία [39].



Οι παραπάνω μελέτες απέδειξαν ότι οι αλληλουχίες του HPV επάγουν την αθανатоποίηση των κυττάρων και μπορούν να συνεργασθούν με γνωστά ογκογονίδια *in vitro*. Επιπλέον υποδηλώνουν ότι η HPV λοίμωξη δεν είναι ικανή από μόνη της να προκαλέσει κακοήγη εξαλλαγή των κυττάρων.

Σε μία πρόσφατη μελέτη [55], με τη μέθοδο RT-PCR, παρατηρήθηκε ανώμαλη έκφραση 49 διαφορετικών γονιδίων σε ογκογόνα HPV-αθανατοποιημένα ανθρώπινα κερατινοκύτταρα. Όπως ήταν αναμενόμενο, τα γονίδια αυτά εμφάνιζαν μεγάλη ετερογένεια και ανήκαν τουλάχιστον σε πέντε διαφορετικές ομάδες. Μερικά από αυτά είναι γνωστό ότι σχετίζονται με ανθρώπινες νόσους. Με βάση τις ανωτέρω παρατηρήσεις ήταν δύσκολο να εκτιμηθεί ποιά από αυτά τα γονίδια, συσχετιζόταν με την HPV - επαγόμενη καρκινογένεση. Γιά το λόγο αυτό μελέτησαν την έκφραση των ίδιων γονιδίων σε βιοπτικό υλικό από φυσιολογικό επιθήλιο, προκαρκινωμάτωδεις αλλοιώσεις και καρκινώματα τραχήλου με τη μέθοδο του RNA-RNA *in situ* υβριδισμού. Σε 10 από τις 24 υψηλού βαθμού προκαρκινωμάτωδεις αλλοιώσεις και σε 20 από τα 24 διηθητικά καρκινώματα παρατηρήθηκε ανώμαλη έκφραση του γονιδίου C4.8, ενώ σε 11 από τις 24 υψηλού βαθμού CIN και σε 14 από τα 24 καρκινώματα παρατηρήθηκε υπερέκφραση του γονιδίου C21.7, υποδηλώνοντας πιθανή εμπλοκή τους στην εξέλιξη των υψηλού βαθμού προκαρκινομάτωδων αλλοιώσεων. Το γονίδιο C4.8 είναι μέλος της οικογένειας των διαμεμβρανικών 4 (TM-4) πρωτεϊνών, η οποία περιλαμβάνει αντιγόνα που σχετίζονται με την ανάπτυξη όγκων όπως το TAPA-1 και CD63. Αν και η βιολογική λειτουργία των TM-4 πρωτεϊνών είναι ακόμη άγνωστη, πρόσφατα έχουν περιγραφεί συμπλέγματα μεταξύ των πρωτεϊνών της ίδιας οικογένειας, με τις ιντεγκρίνες κυτταρικής επιφανείας και την κινάση της φωσφατιδυλο-ϊνοσιτόλης 4, υποδηλώνοντας ότι μπορεί να παίζουν κάποιο ρόλο στην κυτταρική προσκόλληση και τη μεταγωγή μηνυμάτων. Το γονίδιο C21.7 δεν εμφανίζει σημαντική ομολογία με κανένα γνωστό γονίδιο και η λειτουργία του παραμένει άγνωστη [55].

Επίσης η ενσωμάτωση του ιϊκού DNA σε εύθραυστες θέσεις του γονιδιώματος του ξενιστή, όπως οι 8q24, 12q14 - 15 και 3p14 - 21 επηρεάζουν άμεσα τα γονίδια που εδράζονται στις αντίστοιχες θέσεις. Έτσι παρατηρείται διαταραχή στην έκφραση και απορρύθμιση της λειτουργίας του γονιδίου *c-myc* που εντοπίζεται στο 8q24, του FHIT στο 3q14 - 21 και του JUN- B στο 19q13.2 [114, 146-149].

4.4.4. Αλληλεπίδραση των γονιδίων E6, E7 με Κυτοκίνες



Σε *in vitro* μελέτες καταδείχθηκε ότι οι ιντερφερόνες α , β και γ αναστέλλουν τη μεταγραφή του E6 γονιδίου του HPV 16 στην κυτταρική σειρά SiHa, που προέρχεται από καρκίνωμα τραχήλου [150]. Επίσης παρατηρήθηκε ότι η λευκορεγκουλίνη και η ιντερφερόνη- γ μπορούν να αναστείλουν τη μεταγραφή των E6 / E7 γονιδίων των HPV 16, 18 και 33 σε αθανатоποιημένες κυτταρικές σειρές και ταυτόχρονα να ελαττώσουν το ρυθμό κυτταρικού πολλαπλασιασμού, ενώ η ιντερφερόνη - α δεν φάνηκε να ασκεί καμία επιρροή [151]. Παρόμοια, παρατηρήθηκε ότι ο αυξητικός παράγοντας του μετασχηματισμού β αναστέλλει τα γονίδια E6 και E7 των HPV 16 και 18 σε HPV μετασχηματισμένα κερατινοκύτταρα [152]. *In vivo*, χρησιμοποιήθηκε επίσης επιτυχώς ιντερφερόνη για τη θεραπεία του καρκινώματος του τραχήλου [153].



5. Ογκογονίδια

5.1. Γενικά

Από δεκαετίες, υπήρχαν πολλαπλές ενδείξεις που υποδήλωναν ότι γενετικές ανωμαλίες εμπλέκονται στην καρκινογένεση. Αυτές οι ενδείξεις ενισχύθηκαν και τεκμηριώθηκαν τα τελευταία χρόνια με την ανακάλυψη και ταυτοποίηση πλειάδας ογκογονιδίων και ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Σήμερα, υπό το φως των γνώσεων της μοριακής γενετικής του καρκίνου, ο κακοήθης μετασχηματισμός των νεοπλασματικών κυττάρων αποδίδεται σε ανώμαλη έκφραση διαφόρων ογκογονιδίων και ογκοκατασταλτικών γονιδίων που οδηγεί σε διαταραχή του ρυθμού πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης και της απόπτωσης των κυττάρων [154]. Για την καρκινογένεση της πλειονότητας των συμπαγών όγκων των ενηλίκων υποστηρίζεται μάλιστα ότι απαιτούνται πέντε έως έξι κρίσιμα γενετικά συμβάντα [155].

5.2. Ογκογονίδια και καρκίνος

Τα πρωτοογκογονίδια περιέχονται στα ευκαρυωτικά φυσιολογικά κύτταρα και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης και της απόπτωσης των κυττάρων. Αυτά κωδικοποιούν τη σύνθεση πρωτεϊνών, που απαρτίζουν ένα ενδοκυττάριο δίκτυο υποδοχής, ελέγχου και προώθησης μηνυμάτων κυτταρικής αύξησης και διαφοροποίησης προερχομένων από αυξητικούς παράγοντες, ορμόνες και άλλα ρυθμιστικά μόρια [156]. Γενικά τα προϊόντα των πρωτοογκογονιδίων λειτουργούν ως αυξητικοί παράγοντες, υποδοχείς αυξητικών παραγόντων, μεταγωγείς μηνυμάτων και μεταγραφικοί παράγοντες [157,158].

Έχει αναγνωρισθεί μεγάλος αριθμός ογκογονιδίων, τα οποία δρουν ως αυξητικοί παράγοντες και τα οποία λειτουργούν με αυτοκρινή ή παρακρινή τρόπο. Άλλα από αυτά κωδικοποιούν πολυπεπτίδια, άλλα ολιγοπεπτίδια και άλλα ορμονοστεροειδικούς παράγοντες. Οι αυξητικοί παράγοντες συνδέονται με ειδικούς κυτταρικούς υποδοχείς και πυροδοτούν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό [159].

Τα ογκογονίδια τα οποία δρουν ως υποδοχείς αυξητικών παραγόντων κωδικοποιούν πρωτεΐνες οι οποίες προσθέτουν ή αφαιρούν φωσφορικές ρίζες από υπολειμματικά τμήματα τυροσίνης ή σερίνης - θρεονίνης, συμμετέχοντας



με αυτό τον τρόπο στο μηχανισμό μεταγωγής μηνυμάτων. Οι περισσότεροι από τους ογκογονιδιακούς υποδοχείς αυξητικών παραγόντων ανήκουν σε μία από τις οκτώ κατηγορίες των διαμεμβρανικών υποδοχέων της κινάσης της τυροσίνης με κύρια ομάδα την οικογένεια erbB (erbB-1/EGFR, c-erbB-2/Her-2 και erbB-3). Αλλαγές στη δομή των υποδοχέων αυξητικών παραγόντων ή στην έκφραση των προϊόντων τους έχει βρεθεί ότι σχετίζονται άμεσα με την καρκινογένεση [160-164].

Τα ογκογονίδια τα οποία δρουν ως μεταγωγείς μηνυμάτων κωδικοποιούν πρωτείνες ομόλογες σε δομή και λειτουργία με τις πρωτείνες G που είναι υπεύθυνες για τη μεταφορά ενός ερεθίσματος από το μεμβρανικό υποδοχέα στο εσωτερικό του κυττάρου [165]. Οι πρωτείνες G βρίσκονται κατανεμημένες στην εσωτερική επιφάνεια της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και υπό την επίδραση ερεθίσματος από το εξωτερικό περιβάλλον του κυττάρου, ενεργοποιούνται και μεταφέρουν το μήνυμα στο κυτταροπλασματικό μέρος της μεμβράνης [166]. Δομικές αλλαγές των ογκογονιδίων αυτής της κατηγορίας, όπως σημειακές μεταλλάξεις και ποσοτικές επαυξήσεις, έχουν σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της κωδικοποιούμενης από αυτά πρωτεΐνης και τη συνεχή ανεξέλεγκτη μεταφορά ερεθίσματος [167].

Τα ογκογονίδια τα οποία λειτουργούν ως μεταγραφικοί παράγοντες κωδικοποιούν πυρηνικές πρωτείνες, οι οποίες με τη σειρά τους ρυθμίζουν την μεταγραφή άλλων γονιδίων που ελέγχουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Κυριότερα μέλη της οικογένειας αυτής είναι τα γονίδια myc (c - myc, N - myc, L - myc), το c - fos και το c - jun. Μεταλλάξεις αυτών οδηγούν σε διαταραχές του κυτταρικού πολλαπλασιασμού [168, 169].

Τα πρωτοογκογονίδια, υπό την επίδραση ποικίλων παραγόντων ενεργοποιούνται και μετατρέπονται σε ογκογονίδια. Εκτρέπονται δηλαδή από τη φυσιολογική τους λειτουργία και καθίστανται ικανά να προκαλέσουν κακοήθη εξαλλαγή των κυττάρων [170,171].

Πίσω από την ενεργοποίηση των πρωτοογκογονιδίων υποκρύπτεται σχεδόν πάντα κυτταρογενετική βλάβη [172]. Τα πρωτοογκογονίδια ενεργοποιούνται είτε από τυχαίο σφάλμα του μηχανισμού που αφορά στην αντιγραφή και την ακεραιότητα του DNA, είτε κάτω υπό την επίδραση διαφόρων χημικών ή φυσικών καρκινογόνων παραγόντων ή ιών. Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων γίνεται η ενεργοποίηση των πρωτοογκογονιδίων σε ογκογονίδια είναι πέντε. Πρόκειται για τη μεταλλαξιγένεση από παρεμβολή, τη σημειακή μετάλλαξη, τη γονιδιακή επαύξηση ή ενίσχυση, το χρωμοσωματικό ανασυνδυασμό-αντιμετάθεση και



την απάλειψη. Αποτέλεσμα της γενετικής βλάβης είναι η διαταραχή της έκφρασης των ογκογονιδίων [173-175].

Σημειακές μεταλλάξεις και γονιδιακοί ανασυνδυασμοί κατά τις χρωμοσωματικές αντιμεταθέσεις ευθύνονται για την παραγωγή ογκοπρωτεϊνών με ανώμαλα χαρακτηριστικά και ανώμαλη λειτουργία [170,177].

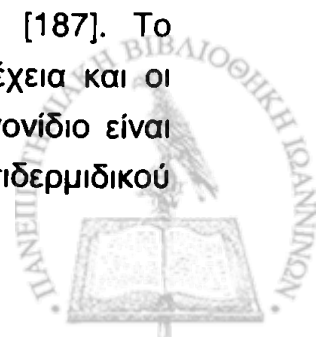
Η γονιδιακή ενίσχυση αφορά στον πολλαπλασιασμό του γονιδιώματος με τη μορφή πολλαπλών γονιδιακών αντιγράφων, η οποία οδηγεί συνήθως σε παραγωγή αυξημένων ποσών της κωδικοποιούμενης από αυτό πρωτεΐνης που προσδίδει βιολογική υπεροχή πολλαπλασιαστικής ικανότητας στα κύτταρα στα οποία επισυμβαίνει [178]. Βέβαια, σε άλλες μελέτες δεν παρατηρήθηκε υπερέκφραση πρωτεϊνών σε περιπτώσεις στις οποίες ανιχνεύθηκε ενίσχυση των γονιδίων [179]. Πιθανώς, στις περιπτώσεις αυτές να εμπλέκονται διαταραχές μεταγραφικών παραγόντων [180]. Η ενίσχυση των ογκογονιδίων φαίνεται ότι σχετίζεται με τη διεργασία της καρκινογένεσης. Επιπλέον, ο βαθμός της ενίσχυσης, εκφραζόμενος ως αριθμός αντιγράφων του ογκογονιδίου, φέρεται να σχετίζεται με την πρόοδο-επέκταση της κακοήθους νόσου [178,181-183].

Χρωμοσωμικές απαλείψεις ή απώλεια ετεροζυγωτίας συγκεκριμένων γενετικών τόπων έχουν διαπιστωθεί σε αρκετούς συμπαγείς όγκους. Συνήθως οι απαλείψεις αφορούν μεγάλο αριθμό γονιδίων, στην πλειονότητά τους ογκοκατασταλτικά [184].

Συνοψίζοντας, η ενεργοποίηση των πρωτοογκογονιδίων σε ογκογονίδια οδηγεί σε υπερέκφραση των πρωτεϊνών τους, η οποία ευοδώνει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και καταστέλλει τη διαφοροποίηση αυτών με επακόλουθο τον κακοήθη μετασχηματισμό και την επέκταση των κακοήθων νεοπλασμάτων.

5.3. Ογκογονίδιο c-erbB-2

Το ογκογονίδιο c-erbB-2 ή Her-2/neu χارτογραφείται στο χρωμόσωμα 17q12-21.32 και κωδικοποιεί μια διαμεμβρανική φωσφορική γλυκοπρωτεΐνη M.B 185 kda [162,163,185,186]. Περιγράφηκε για πρώτη φορά σε νευροβλάστωμα νεογέννητου αρουραίου και ονομάστηκε neu λόγω της ικανότητάς του να μετασχηματίζει κύτταρα NIH 3T3 *in vitro* [187]. Το ανθρώπινο ομόλογο του γονιδίου neu κλωνοποιήθηκε στη συνέχεια και οι ονομασίες που χρησιμοποιούνται συχνότερα για το ανθρώπινο γονίδιο είναι Her2 [188] , λόγω της ομολογίας του με τον υποδοχέα του επιδερμικού



αυξη-τικού παράγοντα (human epidermal growth factor receptor 2) και c-erbB-2 λόγω της ομολογίας του με το V-erbB [189].

Η πρωτεΐνη c-erbB-2 εμφανίζει υψηλή ομολογία με τον υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR). Πάνω από 50% των αμινοξέων της είναι όμοια με τα αμινοξέα του EGFR, υπάρχει δε 80% ομολογία στην περιοχή με δραστηριότητα τυροσινικής κινάσης. Αυτή ανήκει στην υποομάδα I των πρωτεϊνικών κυτταρικών υποδοχέων κινάσης της τυροσίνης (subclass I RTKs-receptor tyrosine kinases), η οποία αποτελείται από τέσσερα μέλη: τον υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR / ErbB-1), την ErbB-2, ErbB-3 και ErbB-4 [190].

Οι πρωτεϊνικές κινάσες της τυροσίνης αποτελούν υποδοχείς της κυτταρικής επιφανείας, οι οποίοι έχουν έναν εξωκυττάριο υποδοχέα πρόσδεσης αυξητικών παραγόντων, ένα διαμεμβρανικό τμήμα και μια υποπεριοχή 200-300 αμινοξέων με δραστικότητα κινάσης της τυροσίνης, που βρίσκεται στο ενδοκυττάριο τμήμα του μορίου. Η πρόσδεση του αυξητικού παράγοντα στον εξωκυττάριο υποδοχέα οδηγεί σε διμερισμό του διαμεμβρανικού τμήματος με το σχηματισμό ομο- ή ετεροδιμερών και επακόλουθο ενεργοποίηση της δραστικότητας της κινάσης, η οποία φωσφορυλιώνει κατάλοιπα τυροσινών διαφόρων υποστρωμάτων, συμπεριλαμβανομένου και του ίδιου του υποδοχέα (αυτοφωσφορυλίωση). Οι φωσφορυλιωμένες τυροσίνες του ενδοκυττάριου τμήματος του υποδοχέα προσελκύουν τα άμεσα υποστρώματα της κινάσης και συνδέονται μαζί τους μέσω των SH2 περιοχών που διαθέτουν τα τελευταία, διευκολύνοντας τη δική τους φωσφορυλίωση και συνακόλουθη ενεργοποίηση. Τα άμεσα υποστρώματα ενός υποδοχέα αυξητικού παράγοντα με δραστικότητα τυροσινικής κινάσης είναι μόρια-τελεστές γνωστών οδών ενδοκυττάριας μεταγωγής του σήματος αύξησης που αντιπροσωπεύει ο εκάστοτε παράγοντας [191-193].

Μέχρι σήμερα, έχει ταυτοποιηθεί σημαντικός αριθμός συνδετών των RTKs, οι οποίοι αφορούν τους ErbB-1, ErbB-3 και ErbB-4 [194], ενώ δεν έχει ταυτοποιηθεί συνδέτης που να αντιστοιχεί στον ErbB-2. Παρά την απουσία όμως γνωστού συνδέτη, ο ρόλος της πρωτεΐνης c-erbB-2 φαίνεται να είναι καταλυτικός στο μηχανισμό της καρκινογένεσης. Αυτό οφείλεται στο ότι έχει τη δυνατότητα να λειτουργεί είτε ως αυτόνομος αυξητικός παράγοντας, σε περίπτωση εκτραπείσας έκφρασής του, είτε παράλληλα με τα άλλα μέλη ErbB, τα οποία, όταν ενεργοποιηθούν, σχηματίζουν ετεροδιμερή με τον c-erbB-2 μέσω του μηχανισμού ετεροφωσφορυλίωσης [195]. Υποστηρίζεται ότι το χαμηλής συγγένειας c-τελικό άκρο των συνδετών τύπου EGF προτιμά να



αντιδρά με την c-erbB-2, η οποία φαίνεται να λειτουργεί σαν υπομονάδα-ενεργοποιητής όλων των υπολοίπων ErbB πρωτεϊνών [196]. Έτσι σημαντική παρουσία της πρωτεΐνης c-erbB-2 ενισχύει το σχηματισμό ετεροδιμερών με συμμετοχή της c-erbB-2 σε απάντηση ποικίλων αυξητικών παραγόντων του τύπου EGF. Επιπλέον, φαίνεται ότι η πρωτεΐνη c-erbB-2 επιβραδύνει το ρυθμό διάσπασης του συμπλέγματος συνδέτη - αυξητικού παράγοντα στα ετεροδιμερή που περιλαμβάνουν την c-erbB-2. Με αυτόν το μηχανισμό ενισχύεται η προαγωγή του σήματος κυτταρικού πολλαπλασιασμού από την ενεργοποίηση κάθε συνδέτη ErbB [197]. Σημαντικό επίσης ρόλο παίζει η δυνατότητα της c-erbB-2 στην πλάγια μεταβίβαση του σήματος, γεγονός που ενισχύει την σημασία της στην διαδικασία της καρκινογένεσης [198]. Πιθανόν όμως, η ογκογενετική δραστηριότητα της c-erbB-2 να σχετίζεται με κάποιο συνδέτη, ο οποίος μέχρι σήμερα δεν έχει οριστικά ταυτοποιηθεί [199].

Η πρωτεΐνη c-erbB-2 φυσιολογικά απαντά κατά την πρώιμη εμβρυϊκή ζωή [200]. Υπερέκφραση αυτής παρατηρείται σε αρκετές νεοπλασίες. Η συνηθέστερη υποκείμενη μοριακή βλάβη του γονιδίου c-erbB-2 που οδηγεί σε υπερέκφραση της ομόλογης πρωτεΐνης στα καρκινώματα του ανθρώπου φαίνεται να είναι η ενίσχυση του γονιδίου [201,202]. Σημειακές μεταλλάξεις, οι οποίες έχουν παρατηρηθεί σε ζώα, δεν έχουν διαπιστωθεί στον άνθρωπο [192].

Υπερέκφραση της c-erbB-2 πρωτεΐνης παρατηρήθηκε για πρώτη φορά σε αδenoκαρκίνωμα σιελoγόνου αδένα [189], καθώς και στην κυτταρική σειρά MAC117 από καρκίνωμα μαστού [204]. Ενίσχυση του γονιδίου ή υπερέκφραση της πρωτεΐνης αυτού παρατηρήθηκε σε καρκινώματα μαστού, ωοθήκης, στομάχου, πνεύμονα, προστάτη και ενδομητρίου [181-183,205-217].

Πρώτοι οι Slamon και συν. κατέδειξαν ότι η ενίσχυση του γονιδίου c-erbB-2, η οποία ανευρέθηκε σε ποσοστό 30% των καρκινωμάτων του μαστού, συσχετίζεται με πρώιμη υποτροπή και φτωχότερη επιβίωση [183]. Τα αποτελέσματά τους επιβεβαιώθηκαν και από άλλες μελέτες. Σήμερα, είναι πλέον κοινώς αποδεκτό ότι η ενίσχυση του γονιδίου c-erbB-2 αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό δείκτη συνολικής επιβίωσης και επιβίωσης ελεύθερης νόσου για τα καρκινώματα του μαστού [218, 219].

Η υπερέκφραση της πρωτεΐνης και η ενίσχυση του γονιδίου c-erbB-2 έχει μελετηθεί και σε καρκινώματα του τραχήλου της μήτρας. Ο αριθμός όμως των μελετών αυτών είναι περιορισμένος, τα δε αποτελέσματα ποικίλουν (Πίνακας 3).



Πίνακας 3. Υπερέκφραση/ενίσχυση του c-erbB-2 σε καρκινώματα τραχήλου μήτρας

Βιβλιογραφικές αναφορές	Αριθμός περιπτώσεων	Ιστολογικός τύπος	Ποσοστό θετικότητας	Μέθοδος
Brumm και συν. [220]	8	Π	75%	IH
Berchuchk και συν.[221]	26	Π	4%	IH
Hale και συν.[222]	20	Π	45%	IH
Oka και συν. [89]	192	Π	19%	IH
Nakano και συν. [90]	64	Π	42%	IH
Kersemaekers και συν. [88]	136	Π	8,8%	ICH
Kristensen και συν.[223]	132	Π	12,1%	IH
Ndubisi και συν. [224]	150	Π	22%	IH
Mandai και συν. [96]	39	Π	37%	IH
	39	A	49%	
Mitra και συν. [225]	50	Π	14%	Southern blot
Mark και συν. [226]	18	Π	0%	FISH
	5	A	40%	
Ngan και συν. [227]	101	Π	17,2%	Southern blot
			19,8%	IH
Sharma και συν. [228]	60	Π	36,6%	Μη-φθορίζων υβριδισμός
Kihana και συν. [97]	44	A	25%	IH
Costa και συν. [98]	82	A	50%	IH

Συντμήσεις: IH = Ανοσοϊστοχημεία, Π = Πλακώδη Καρκινώματα, A = Αδενοκαρκινώματα

Στη μελέτη των Oka και συν. [89] εξετάσθηκαν 192 περιπτώσεις ασθενών με πλακώδες καρκίνωμα τραχήλου σταδίου III. Υπερέκφραση της πρωτεΐνης ανιχνεύθηκε σε 37 από τις περιπτώσεις που μελετήθηκαν (19%) και αυτή συσχετίσθηκε με φτωχότερη πενταετή επιβίωση. Η ίδια ομάδα ερευνητών [90], τρία χρόνια αργότερα, παρατήρησε υπερέκφραση της c-erbB-2 πρωτεΐνης σε ποσοστό 42% των πλακωδών καρκινωμάτων. Αυτή συσχετίσθηκε με το στάδιο της νόσου, το δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67 και την επιβίωση των ασθενών. Η διαφορά στα ποσοστά υπερέκφρασης της πρωτεΐνης μεταξύ των δύο μελετών τους, αποδόθηκε στη χαμηλή αντιγονικότητα των υλικών της πρώτης μελέτης, στην οποία χρησιμοποιήθηκαν παλαιά παρασκευάσματα, και στη διαφορετική μέθοδο μονιμοποίησης των υλικών των δύο μελετών. Στην πρώτη μελέτη ως μονιμοποιητικό χρησιμοποιήθηκε η φορμόλη ενώ στη δεύτερη η παραφορμαλδεΐδη.



Στη μελέτη των Mitra και συν. [225] διερευνήθηκε η παρουσία ενίσχυσης 22 πρωτοογκονιδίων σε 50 πλακώδη καρκινώματα τραχήλου σταδίου II και III με ανάλυση Southern blot . Ενίσχυση του γονιδίου c-erbB-2 παρατηρήθηκε σε 7 από τα 50 (14%) καρκινώματα, με παρουσία πέντε έως 68 αντιγράφων του γονιδίου. Επιπλέον, σε δύο από τους όγκους που εμφάνιζαν ενίσχυση του c-erbB-2 παρατηρήθηκαν ταυτόχρονα θραύσματα εκ περιορισμού, τα οποία υποδήλωναν πιθανές μεταλλάξεις ή αντιμεταθέσεις του γονιδίου. Αργότερα, με τη μέθοδο του μη-φθορίζοντος υβριδισμού μελέτησαν 60 πλακώδη καρκινώματα και παρατήρησαν γονιδιακή ενίσχυση σε ποσοστό 36,6% των περιπτώσεων. Οι ερευνητές θεώρησαν ότι η μέθοδος του υβριδισμού είναι καλύτερη για την εκτίμηση της ενίσχυσης του γονιδίου c-erbB-2 από την ανάλυση Southern blot [228].

Υπερέκφραση της c-erbB-2 πρωτεΐνης παρατηρήθηκε σε 11 από τα 44 (25%) αδενοκαρκινώματα τραχήλου που μελέτησαν οι Kihana και συν. [97]. Η υπερέκφραση της πρωτεΐνης συσχετίσθηκε σημαντικά με την ενίσχυση του γονιδίου που ανιχνεύθηκε με slot blot υβριδισμό. Επιπλέον, η υπερέκφραση της πρωτεΐνης συσχετίσθηκε με το στάδιο της νόσου και την επιβίωση των ασθενών ανεξάρτητα από την παρουσία ή μη λεμφαδενικών μεταστάσεων, τον ιστολογικό βαθμό κακοηθείας και τον ιστολογικό τύπο. Οι Costa και συν. [98] μελέτησαν την έκφραση της πρωτεΐνης c-erbB-2 σε 82 καρκινώματα τραχήλου με αδενική διαφοροποίηση (41 αδενοκαρκινώματα και 41 αδenoπλακώδη καρκινώματα) και παρατήρησαν υπερέκφραση αυτής σε ποσοστό 50% των καρκινωμάτων (20 αδενοκαρκινώματα και 21 αδenoπλακώδη). Η υπερέκφραση της c-erbB-2 πρωτεΐνης συσχετίσθηκε με τα στάδια III και IV της νόσου και αναδείχθηκε ως δείκτης πρόγνωσης πρώιμων υποτροπών.

Στη μελέτη των Mandai και συν. [96], η οποία περιλάμβανε 39 αδενοκαρκινώματα και 39 πλακώδη καρκινώματα, υπερέκφραση της πρωτεΐνης c-erbB-2 παρατηρήθηκε σε ποσοστό 49% των αδενοκαρκινωμάτων και 37% των πλακωδών καρκινωμάτων. Η υπερέκφραση της πρωτεΐνης συσχετίσθηκε με την πρόγνωση των ασθενών με αδενοκαρκίνωμα, αλλά όχι αυτών με πλακώδες καρκίνωμα τραχήλου.

Πρόσφατα, οι Mark και συν. μελέτησαν την ενίσχυση του γονιδίου c-erbB-2 σε 23 καρκινώματα τραχήλου (18 πλακώδη, 5 αδενοκαρκινώματα) με την τεχνική του φθορίζοντος *in situ* υβριδισμού (FISH). Ενίσχυση του γονιδίου παρατηρήθηκε μόνο σε 2/5 περιπτώσεις αδενοκαρκινωμάτων [226].



6. Μοριακή γενετική του καρκινώματος του τραχήλου της μήτρας

6.1. Γενικά

Το καρκίνωμα του τραχήλου της μήτρας ήταν ένα από τα πρώτα καρκινώματα του ανθρώπου που μελετήθηκε κυτταρογενετικά. Ήδη από το 1950, σε μελέτες βιοπτικών υλικών καρκινωμάτων τραχήλου βρέθηκε τριπλοειδία ή τετραπλοειδία σε μεγάλο ποσοστό των όγκων [229]. Πέντε χρόνια αργότερα, οι Moricard και Cartier [230] περιέγραψαν πολυπλοειδία σε προκαρκινωματώδεις αλλοιώσεις, που συχνά συνοδεύονταν από ανωμαλίες της ατράκτου, με παρουσία τριπολικών μιτώσεων και κατανομή χρωμοσωμάτων που πιθανά οδηγούσε σε ανισότιμο διαχωρισμό αυτών στα θυγατρικά κύτταρα. Τριομαδικές μεταφάσεις στις οποίες μερικά χρωμοσώματα παρέμεναν στους πόλους, περιγράφηκαν σε τραχηλικά επιχρίσματα από ενδοεπιθηλιακό καρκίνωμα [229,231]. Επιπλέον, σε μελέτη με μικροσπεκτροφωτομετρία Feulgen παρατηρήθηκε ότι ο κυτταρικός πληθυσμός σε αλλοιώσεις CIN III ήταν υπερδιπλοειδής (52 χρωμοσώματα) [229]. Τριπλοειδία ή τετραπλοειδία παρατηρήθηκε σε μεγάλο ποσοστό προκαρκινωματωδών αλλοιώσεων σε χρωμοσωματικές μελέτες που έγιναν μεταγενέστερα, κατά τη δεκαετία του 1970 [232]. Αξιόλογη επίσης είναι η αναφορά των Park και συν. [233], οι οποίοι εφαρμόζοντας μοριακή τεχνική βρήκαν ότι όλες οι υψηλού βαθμού τραχηλικές ενδοεπιθηλιακές νεοπλασίες ήταν μονοκλωνικές, ενώ οι χαμηλού βαθμού διακρινόταν σε δύο ομάδες, μονο- ή πολυκλωνικές. Επιπλέον, παρατήρησαν ότι οι μονοκλωνικές βλάβες σχετιζόταν με "υψηλού κινδύνου" τύπους HPV, ενώ οι πολυκλωνικές με "χαμηλού κινδύνου" τύπους του ιού .

Τελευταία, η εισαγωγή νέων γενετικών τεχνικών G-ζώνωσης διευκόλυσε τη μελέτη αριθμητικών και δομικών χρωμοσωματικών αλλαγών. Τεχνικής όμως φύσης προβλήματα, που είχαν σχέση με τον ιστό, καθυστέρησαν την πρόοδο αυτών των μελετών, με αποτέλεσμα ο αριθμός τους να είναι περιορισμένος [229].

Για την ανάπτυξη της τραχηλικής νεοπλασίας φαίνεται ότι απαιτείται η συσσώρευση πολλαπλών γενετικών αλλαγών υπό τη μορφή μεταθέσεων, απαλείψεων, σημειακών μεταλλάξεων, ενισχύσεων, απώλειας ετεροζυγωτίας ή αριθμητικών ανωμαλιών. Οι αλλαγές αυτές αφορούν πολλά χρωμοσώματα, καμμία όμως μέχρι σήμερα δεν αποδείχθηκε ειδική για το καρκίνωμα του τραχήλου. Επιπλέον, οι μελέτες κυτταρογενετικής ανάλυσης προκαρκινωματωδών αλλοιώσεων είναι δυστυχώς πολύ λίγες και ως εκ τούτου υπάρχουν



πολλά κενά στη γνώση μας για την εξέλιξη αυτών [115]. Στη συνέχεια παραθέτουμε τις σημαντικότερες, μέχρι σήμερα, ευρεθείσες γενετικές αλλαγές ανά χρωμόσωμα.

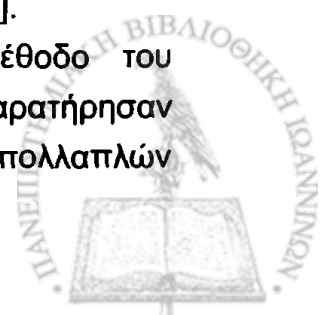
6.2. Χρωμόσωμα 1

Αντιμεταθέσεις του χρωμοσώματος 1 ανευρέθηκαν συχνά σε καρκινώματα του τραχήλου [234], επιπλέον δε παρατηρήθηκαν και σε κυτταρικές σειρές HPV-αθανατοποιημένων κερατινοκυττάρων [235]. Πολλαπλασιασμός του χρωμοσώματος 1 έχει περιγραφεί τόσο σε προκαρκινωμάτωσης αλλοιώσεις όσο και σε καρκινώματα του τραχήλου [236]. Σε μελέτη με την τεχνική του φθορίζοντος *in situ* υβριδισμού (FISH) παρατηρήθηκε, ότι η μετάπτωση των προκαρκινωματώδων αλλοιώσεων σε διηθητικό καρκίνωμα συνοδεύεται από πολυσωμία του χρωμοσώματος 1 και υπερδιπλοειδία του DNA [237].

6.3. Χρωμόσωμα 3

Δομικές αλλαγές στο χρωμόσωμα 3, οι οποίες συνίστανται κυρίως σε απαλείψεις του 3p ή 3q έχουν περιγραφεί σε προκαρκινωμάτωσης αλλοιώσεις και καρκινώματα τραχήλου [115,229,238-240]. Από διαφορετικές ομάδες μελετητών βρέθηκε ότι η απώλεια ετεροζυγωτίας του 3p14-p22 είναι συχνή στα καρκινώματα του τραχήλου. Συγκεκριμένα, απώλεια ετεροζυγωτίας παρατηρήθηκε σε δύο υποπεριοχές την 3p14.2 και 3p21. Βάσει των ανωτέρω ευρημάτων θεωρείται πιθανό ότι δύο ογκοκατασταλτικά γονίδια που εντοπίζονται στις περιοχές αυτές εμπλέκονται στην καρκινογένεση του τραχήλου [115]. Στην περιοχή 3p14.2 εντοπίζεται το γονίδιο FHIT. Αυτό περιλαμβάνει την εύθραυστη θέση FRA3B στην οποία έχει βρεθεί ότι ενσωματώνεται συχνά ο ιός HPV16 [148,241]. Το γονίδιο FHIT έχει μελετηθεί αρκετά σε καρκινώματα του τραχήλου [242-244]. Απώλεια ετεροζυγωτίας του γονιδίου FHIT έχει ανιχνευθεί σε προκαρκινωμάτωσης αλλοιώσεις και καρκινώματα του τραχήλου και συσχετίσθηκε σημαντικά με λοίμωξη από ογκογόνους τύπους του ιού HPV [243]. Η απώλεια φυσιολογικού αντιγράφου συσχετίζεται με μειωμένη έκφραση της πρωτεΐνης FHIT [244]. Στην περιοχή 3p21 εντοπίζονται το γονίδιο hMLH1 και το γονίδιο της β-κατενίνης, τα οποία γενικά σχετίζονται με την ανάπτυξη κακοήθους φαινοτύπου. Αμφότερα όμως δε φαίνεται να εμπλέκονται στην καρκινογένεση του τραχήλου [115].

Σε μία πρόσφατη αναφορά, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο του συγκριτικού υβριδισμού του γονιδιώματος (C.G.H.), παρατήρησαν πολλαπλασιασμό του 3q24 - 3q28, υπό τη μορφή κυρίως πολλαπλών



αντιγράφων, σε 9/10 (90%) καρκινώματα καθώς και σε 1/13 περιπτώσεις CIN III που εξετάστηκαν, ενώ καμμία από τις περιπτώσεις ελαφράς και μέτριας δυσπλασίας δεν εμφάνιζε δομικές χρωμοσωματικές ανωμαλίες. Επιπλέον, στις ίδιες περιπτώσεις με κυτταρομετρία ελέγχθηκε το περιεχόμενο του DNA και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όλες οι περιπτώσεις ελαφράς (n=4) και μέτριας (n=6) δυσπλασίας ήταν τετραπλοειδείς, ενώ μεγαλύτερες τιμές DNA παρατηρήθηκαν στις σοβαρού βαθμού δυσπλασίες και στα διηθητικά καρκινώματα. Οι παρατηρήσεις αυτές υποδηλώνουν ότι η τετραπλοειδία προηγείται των ειδικών χρωμοσωματικών αλλαγών, και η επέκταση του 3q αντιπροσωπεύει μία βασική γενετική παρεκτροπή κατά τη μετάβαση από την "υψηλού βαθμού" δυσπλασία στο διηθητικό καρκίνωμα [238].

Αριθμητικές ανωμαλίες, οι οποίες αφορούν σε πολυσωμία του χρωμοσώματος 3, έχουν παρατηρηθεί τόσο σε προκαρκινωμάτεις αλλοιώσεις όσο και σε διηθητικά καρκινώματα τραχήλου μήτρας [229,245-249].

6.4. Χρωμόσωμα 4

Η συχνότερη ανωμαλία του χρωμοσώματος 4 στα καρκινώματα του τραχήλου είναι η παρουσία ενός ισοχρωμοσώματος i(4). Επίσης έχει παρατηρηθεί ότι η απώλεια ετεροζυγωτίας στις θέσεις 4p16 και 4q21 - 35 είναι συχνή στα πλακώδη καρκινώματα. Γενικά, θεωρείται πιθανότερο ότι στην ανάπτυξη της τραχηλικής νεοπλασίας εμπλέκονται δύο γονίδια του χρωμοσώματος 4 [115,235].

6.5. Χρωμόσωμα 5

Η πρώτη ένδειξη πιθανής εμπλοκής του χρωμοσώματος 5 στην τραχηλική καρκινογένεση, προήλθε από την παρατήρηση ισοχρωμοσώματος 5 με ενσωματωμένο τον ιό HPV 18 σε κυτταρική σειρά HeLa [250]. Στη συνέχεια, σε κυτταρογενετική ανάλυση 43 καρκινωμάτων τραχήλου σταδίου IIb έως IV ανιχνεύθηκε επίσης i(5p) σε ποσοστό 75% των περιπτώσεων, και συχνά εντοπίστηκαν δύο αντίγραφα του ισοχρωμοσώματος [238]. Αργότερα, εφαρμόζοντας τη μέθοδο του συγκριτικού υβριδισμού του γονιδιώματος παρατήρησαν επέκταση του 5p σε σημαντικό αριθμό περιπτώσεων προχωρημένου σταδίου IIb έως IV [251]. Πρόσφατα, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο του μικροδορυφορικού πολυμορφισμού, ο Mitra και συν. βρήκαν απώλεια ετεροζυγωτίας στο 5p σε ποσοστό 55,6% των καρκινωμάτων και 21% των προκαρκινωματιδών αλλοιώσεων που εξέτασαν [252]. Τα αποτελέσματα αυτά θεωρούνται σημαντικά διότι υποδηλώνουν την παρουσία ενός σημαντικού για την καρκινογένεση του τραχήλου γονιδίου στο 5p.



6.6. Χρωμόσωμα 6

Από αρκετές μελέτες προκύπτει ότι μεγάλο ποσοστό (41%) καρκινωμάτων του τραχήλου εμφανίζουν απώλεια ετεροζυγωτίας στο βραχύ βραχίονα του χρωμοσώματος 6p21.3 - p25 [253-255]. Στή θέση 6p21.3 είναι γνωστό ότι εντοπίζεται το γονίδιο TNF-α. Σε μία πρόσφατη μελέτη στην οποία χρησιμοποίησαν δείκτες ειδικούς για το γονίδιο αυτό παρατηρήθηκε απώλεια ετεροζυγωτίας σε 17 από τα 43 (40%) καρκινώματα σταδίου I και II [255]. Αν και ακόμη δεν είναι γνωστός ο ρόλος του TNF-α στην τραχηλική νεοπλασία, είναι πιθανό να καθιστά τα νεοπλασματικά κύτταρα ανθεκτικά στην απόπτωση [256].

Απαλείψεις στις θέσεις 6q21-q25.1 βρέθηκαν επίσης σε προκαρκινωματώδεις αλλοιώσεις και καρκινώματα [257], υποδηλώνοντας την πιθανή εμπλοκή κάποιων ογκοκατασταλτικών γονιδίων που εντοπίζονται στο μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 6 στην τραχηλική καρκινογένεση.

6.7. Χρωμόσωμα 7

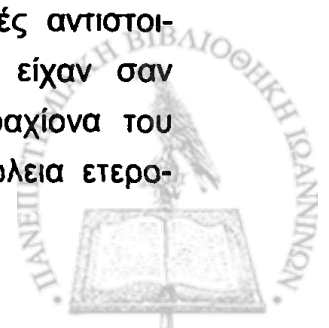
Αριθμητικές ανωμαλίες του χρωμοσώματος 7 έχουν περιγραφεί τόσο σε προκαρκινωματώδεις αλλοιώσεις όσο και σε διηθητικά καρκινώματα του τραχήλου της μήτρας. Αυτές αφορούσαν σε πολυσωμία του χρωμοσώματος [245-249].

6.8. Χρωμόσωμα 8

Πρόσφατα, σε μελέτη κυτταρικών σειρών πλακώδους καρκινώματος τραχήλου παρατηρήθηκε πολλαπλασιασμός του 8q σε όλες τις μελετηθείσες κυτταρικές σειρές [258]. Επίσης, με τη μέθοδο του φθορίζοντος υβριδισμού διαπιστώθηκε τρισωμία του χρωμοσώματος 8 σε ποσοστό 44.4% των πλακωδών καρκινωμάτων και σε 80% των αδενοκαρκινωμάτων του τραχήλου [259]. Η ανίχνευση i(8q) σε κυτταρικές σειρές καρκινωμάτων τραχήλου και κερατινοκυττάρων τραχήλου, τα οποία είχαν επιμολυνθεί από HPV33 θεωρείται ενδιαφέρουσα, διότι στο μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 8 έχει βρεθεί ότι ενσωματώνεται ο ιός [260,261].

6.9. Χρωμόσωμα 11

Σε μελέτη των Atkin και συν. παρατηρήθηκαν δομικές αλλαγές του χρωμοσώματος 11 σε ποσοστό 37% των καρκινωμάτων. Αυτές αντιστοιχούσαν σε απαλείψεις και αντιμεταθέσεις, οι οποίες συχνά είχαν σαν αποτέλεσμα την απώλεια γενετικού υλικού από το βραχύ βραχίονα του χρωμοσώματος [238]. Σε μία άλλη μελέτη έχει περιγραφεί απώλεια ετερο-



ζυγωτίας του 11p στο 42% των καρκινωμάτων που εξετάστηκαν (n=53) [252]. Πρόσφατα, βρέθηκε ότι η απώλεια ετεροζυγωτίας του 11p σχετίζεται με φτωχή πρόγνωση των ασθενών σταδίου IB [262]. Το ότι η απώλεια ενός ογκοκατασταλτικού γονιδίου στο 11p είναι σημαντική στην τραχηλική καρκινογένεση, επιβεβαιώθηκε και από πειραματικές μελέτες σε ανθρώπινες εμβρυϊκές ινοβλάστες, στις οποίες παρατηρήθηκε ότι οι ινοβλάστες με απάλειψη του 11p, σε αντίθεση με τις διπλοειδείς ινοβλάστες, ήταν ευαίσθητοι σε μετασχηματισμό από τον HPV 16 [263].

Απώλεια ετεροζυγωτίας παρατηρήθηκε επίσης συχνά στο 11q22 - 24 και πιθανολογείται ότι το ογκοκατασταλτικό γονίδιο, το οποίο εμπλέκεται στην τραχηλική καρκινογένεση, βρίσκεται κάτω από το 11q23 [264]. Απώλεια ετεροζυγωτίας στο 11q23 παρατηρήθηκε συχνά σε διηθητικά καρκινώματα σταδίου I και II [239,251]. Επίσης ανώμαλη έκφραση του ογκογονιδίου BCL-1 (PRAD1), που εδράζεται στο 11q13, έχει περιγραφεί σε καλλιέργειες κυττάρων τραχηλικού καρκινώματος [265].

Οι Kurtycz και συν. παρατήρησαν πολυσωμία του χρωμοσώματος 11 σε τρία από τα τέσσερα καρκινώματα και σε εννέα από τις δεκαέξι περιπτώσεις HgSIL που μελέτησαν με την τεχνική του FISH [266].

6.10. Χρωμόσωμα 17

Δομικές μεταβολές του χρωμοσώματος 17 έχουν ανευρεθεί από τους Atkin και συν. στο 47% των καρκινωμάτων που μελετήθηκαν (n=43) [234]. Αυτές αντιστοιχούσαν σε μεταθέσεις στα 17p και 17q ισοχρωμοσώματα. Υποθέτουν ότι ένα μικρό χρωμόσωμα, πιθανά το 22, εμπλέκεται στις μεταθέσεις στο χρωμόσωμα 17, αλλά αυτό θα πρέπει να αποδειχθεί με μοριακές μελέτες [267]. Απώλεια ετεροζυγωτίας στο 17p13.3 παρατηρήθηκε σε ποσοστό 24% των καρκινωμάτων και συνήθως δεν εντοπιζόταν στη θέση του γονιδίου p53, υποδηλώνοντας ότι η απώλεια ενός άλλου ογκοκατασταλτικού γονιδίου από το 17p μπορεί να είναι σημαντική στη διαδικασία της καρκινογένεσης του τραχήλου [115,268].

Σε προκαρκινωμάτωσης αλλοιώσεις και καρκινώματα του τραχήλου έχουν επίσης παρατηρηθεί αριθμητικές ανωμαλίες στο χρωμόσωμα 17. Αυτές αφορούσαν κυρίως σε πολυσωμία και λιγότερο σε μονοσωμία [247-249, 269-271].

6.11. Χρωμοσώματα 18 και 19

Τα χρωμοσώματα 18 και 19 δεν έχουν μελετηθεί επαρκώς. Στο χρωμόσωμα 18 παρατηρήθηκε απώλεια ετεροζυγωτίας στην περιοχή 18q21



στο 24% των περιπτώσεων και στην περιοχή 18p11 στις 22 από τις 172 περιπτώσεις (12%) [253-255]. Δεν υπάρχουν όμως πληροφορίες για τα γονίδια που πιθανά εμπλέκονται. Σε μία πρόσφατη μελέτη [258] βρέθηκε ότι η απώλεια του 18q σχετιζόταν με φτωχή πρόγνωση των ασθενών σταδίου IB .

Στο χρωμόσωμα 19 βρέθηκαν επίσης δύο περιοχές με απώλεια ετεροζυγωτίας, σε μικρό όμως ποσοστό (<20%). Οι περιοχές αυτές είναι οι 19q12-13 και 19p13 [255,256] και αντιστοιχούν στις θέσεις διάσπασης (breakpoints) του χρωμοσώματος 19, που εμπλέκονται συχνά σε μεταθέσεις [272].



ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



1. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1.1. Υλικό της μελέτης

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε σε υλικό μονιμοποιημένο σε διάλυμα φορμαλδεύδης και εγκλεισμένο σε παραφίνη. Ιστολογικές τομές πάχους 5μη χρώσθηκαν με αιματοξυλίνη - ηωσίνη (H+E) για την ιστολογική επανεκτίμηση των αλλοιώσεων. Αντίστοιχες αχρωμάτιστες τομές χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια για την εφαρμογή της μεθόδου FISH και για ανοσοϊστοχημική μελέτη. Το υλικό προερχόταν από το Παθολογοανατομικό Εργαστήριο του Περιφερικού Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου και του Περιφερικού Νοσοκομείου "Γ. Χατζηκώστα" Ιωαννίνων [υλικό αρχείου της δεκαετίας (1991-2001)].

Μελετήθηκαν 10 περιπτώσεις μορφολογικά φυσιολογικού τραχηλικού επιθηλίου, 25 περιπτώσεις πλακώδους ενδοεπιθηλιακής βλάβης (squamous intraepithelial lesion-SIL) και 47 περιπτώσεις καρκινωμάτων του τραχήλου της μήτρας, προερχόμενες από βιοπτικό υλικό, υλικό διαγνωστικής απόξεσης ενδομητρίου, παρασκευάσματα κωνοειδούς εκτομής τραχήλου ή ολικής υστερεκτομής. Από τις 25 περιπτώσεις ενδοεπιθηλιακής βλάβης που αναλύθηκαν, οι 10 ήταν χαμηλού βαθμού και οι 15 υψηλού. Η ηλικία των ασθενών με ενδοεπιθηλιακή βλάβη κυμαινόταν από 18 έως 50 έτη. Από τις 47 περιπτώσεις καρκινωμάτων που αναλύθηκαν, τα 30 ήταν πλακώδη καρκινώματα (28 διηθητικά, 2 μικροδιηθητικά), τα 10 αδenoκαρκινώματα και τα 7 αδenoπλακώδη (Πίνακας 3). Η ηλικία των ασθενών με καρκίνωμα τραχήλου κυμαίνονταν από 33 έως 85 έτη. Σε 15 περιπτώσεις διηθητικών καρκινωμάτων, στις οποίες στην ιστολογική τομή συνυπήρχε υψηλόβαθμη ενδοεπιθηλιακή βλάβη, καθώς και σε όλες τις περιπτώσεις υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακής βλάβης στις οποίες συνυπήρχε χαμηλού βαθμού βλάβη, η μελέτη επεκτάθηκε και στις αλλοιώσεις αυτές. Συνολικά δηλαδή εκτιμήθηκαν 25 αλλοιώσεις χαμηλόβαθμης και 30 υψηλόβαθμης ενδοεπιθηλιακής βλάβης.



Πίνακας 3. Χαρακτηριστικά του υλικού μελέτης

ΠΛΑΚΩΔΕΙΣ ΕΝΔΟΕΠΙΘΗΛΙΑΚΕΣ ΒΛΑΒΕΣ (SIL)				
<i>Ταξινόμηση SIL</i>	<i>n</i>			
LgSIL	10			
HgSIL	15			
ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ				
<i>Ιστολογικός τύπος</i>	<i>n</i>	<i>grade I</i>	<i>grade II</i>	<i>grade III</i>
Πλακώδη	30			
Μικροδιθητικά	2			
Διθητικά	28	6	12	10
Αδενοκαρκινώματα	10	4	4	2
Αδενοπλακώδη	7	-	7	-

Συντμήσεις: LgSIL= Χαμηλού βαθμού πλακώδης ενδοεπιθηλιακή βλάβη, HgSIL= Υψηλού βαθμού πλακώδης ενδοεπιθηλιακή βλάβη, grade=Βαθμός κακοηθείας



1.2. ΜΕΘΟΔΟΙ

1.2.1. Μέθοδος φθορίζοντος *in-situ* υβριδισμού διπλού χρώματος (Dual color FISH)

Η μέθοδος του φθορίζοντος *in situ* υβριδισμού (FISH) σε ιστολογικές τομές παραφίνης εφαρμόστηκε για πρώτη φορά στο Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής του Π.Π.Γ.Ν. Ιωαννίνων. Η εφαρμογή της μεθόδου σε ιστολογικές τομές παραφίνης εμφανίζει ιδιαίτερες δυσκολίες σε σχέση με άλλα υλικά, όπως κυτταρολογικά επιχρίσματα ή εντυπώματα ιστών. Χρειάστηκαν επανειλημμένα πειράματα για να επιτύχουμε να αυξήσουμε τη διαπερατότητα του ιστού στους ιχνηθέτες, διατηρώντας παράλληλα τη μορφολογία του. Ένα άλλο σημαντικό πρόβλημα, για το οποίο απαιτήθηκε αρκετός χρόνος εργασίας και πολλαπλά πειράματα ήταν τα μη ειδικά σήματα υβριδισμού. Τα τελευταία οφείλονται σε διάφορους παράγοντες και για το λόγο αυτό ήταν δύσκολο να αντιμετωπισθούν. Τελικά, επιτύχαμε να έχουμε άριστα αποτελέσματα τόσο στα βιοπτικά υλικά όσο και στα χειρουργικά παρασκευάσματα. Η μελέτη έγινε με τον τρόπο που περιγράφεται παρακάτω.

Ιστολογικές τομές παραφίνης πάχους 4μm τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες επεξεργασμένες με 3-αμινο-προπυλ-τριοξοσιλάνιο, αποξηράνθηκαν στον αέρα και τοποθετήθηκαν σε κλίβανο θερμοκρασίας 65° C για 16 ώρες. Ακολούθησε αποπαραφίνωση των τομών σε ξυλόλη 2X10 λεπτά, ενυδάτωσή τους σε οινόπνευμα 100% και αποξήρανση. Στη συνέχεια οι τομές επεξεργάστηκαν με διάλυμα διάλυσης λιπιδίων (Pretreatment solution, Oncor, Gaithesburg, MD) σε θερμοκρασία 45° C για 16-20 λεπτά και ακολούθησε ενζυμική πέψη με πρωτεΐνάση K (Oncor, Gaithesburg, MD) σε θερμοκρασία 45° C για 20-32 λεπτά. Ακολούθησε αφυδάτωση σε ανιόντα οινόπνευμα και αποξήρανση για 10 λεπτά.

Χρησιμοποιήθηκαν DNA ιχνηθέτες έναντι α-δορυφορικών αλληλουχιών του κεντρομεριδίου των χρωμοσωμάτων 3 και 7 σημασμένοι με διγοξιγενίνη, των χρωμοσωμάτων 8 και 17 σημασμένοι με βιοτίνη και ιχνηθέτης έναντι της αλληλουχίας του γονιδίου *c-erbB-2* (Her2/neu) σημασμένος με διγοξιγενίνη (Oncor, Gaithesburg, MD).

Οι ιχνηθέτες τοποθετήθηκαν στους 37° C για 5 λεπτά και οι κεντρομεριδιακοί αραιώθηκαν στη συνέχεια σε μίγμα υβριδισμού που περιείχε 2 x SSC/ 70% φορμαμίδη (Hybrisol VI, Oncor). Εφαρμόστηκαν ταυτόχρονα δύο ιχνηθέτες σε κάθε ιστολογική τομή, σε ποσότητα ανάλογη της έκτασης της τομής. Σε μία τομή εφαρμόστηκαν ταυτόχρονα οι α-δορυφορικοί ιχνηθέτες

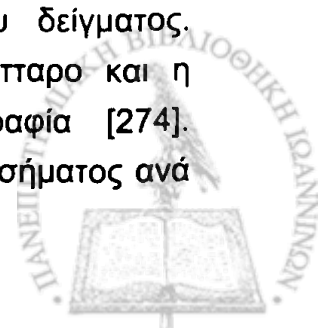


των χρωμοσωμάτων 3 και 8, σε μία δεύτερη τομή οι α-δορυφορικοί ιχνηθέτες των χρωμοσωμάτων 7 και 17 και σε μία τρίτη ο ιχνηθέτης Her2/neu μαζί με τον α-δορυφόρο του κεντρομεριδίου 17. Οι ιστολογικές τομές τοποθετήθηκαν σε θερμαινόμενη πλάκα και έγινε αποδιάταξη του DNA των κυττάρων και των ιχνηθετών σε θερμοκρασία 70° C. Ακολούθησε ολονύκτιος *in situ* υβριδισμός σε κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας 37° C. Στη συνέχεια οι τομές τοποθετήθηκαν σε γυάλινο δοχείο, το οποίο περιείχε διάλυμα SSC θερμοκρασίας 72° C μέσα σε υδατόλουτρο για 6 λεπτά και ακολούθησε έκπλυση σε διάλυμα 1XPBD (Phosphate Buffer saline/1% Tween 20), για την απομάκρυνση των μη συνδεδεμένων μορίων του ιχνηθέτη. Η ανίχνευση της αντίδρασης υβριδισμού έγινε με την ταυτόχρονη εφαρμογή ενός αντισώματος έναντι διγοξιγενίνης σημασμένο με ροδαμίνη (Rhodamine-labeled Antidigoxigenin, Oncor, Gaithesburg, MD) και ενός αντισώματος έναντι βιοτίνης σημασμένο με FITC (Fluorescein-labeled Avidin, Oncor, Gaithesburg, MD) για 15 λεπτά σε 37° C. Στη συνέχεια έγινε έκπλυση σε διάλυμα 1XPBD, 3X2 λεπτά και ακολούθησε η διαδικασία ενίσχυσης των σημάτων φθορισμού εφαρμόζοντας αρχικά το αντίσωμα Rabbit Anti-Sheep για 15 λεπτά, στη συνέχεια το Rhodamine/ Anti-Rabbit για 15 λεπτά, το Anti-Avidin και Fluorescein-labeled Avidin (Oncor, Gaithesburg, MD) για 5 λεπτά το καθένα. Η επώαση κατά τη διαδικασία ενίσχυσης των σημάτων φθορισμού έγινε σε 37° C και η έκπλυση των αντισωμάτων με διάλυμα 1X PBD, 3X2 λεπτά. Ακολούθησε η χρώση των πυρήνων με 4,5-διαμινο-2-φαινυλ-ινδόλη (DAPI).

Σε όλα τα πειράματα συμπεριλήφθηκαν θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες. Σαν θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τομές από καρκινώματα μαστού στα οποία σε προηγούμενη μελέτη [273] είχαν ανιχνευθεί ικανοποιητικά σήματα υβριδισμού για το γονίδιο c-erbB-2 και το χρωμόσωμα 17. Σαν αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν ιστολογικές τομές από φυσιολογικό τράχηλο της μήτρας στις οποίες παραλήφθηκε το στάδιο της τοποθέτησης του ιχνηθέτη.

Τα σήματα υβριδισμού εκτιμήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού Zeiss Axioscope100. Η επεξεργασία, αξιολόγηση και αποθήκευση των εικόνων έγινε με τη χρήση λογισμικού CGH και συστήματος ψηφιακής απεικόνισης ISIS (Metasystem, Heidelberg, Germany).

Σε κάθε περίπτωση μετρήθηκαν τουλάχιστον 200 άθικτοι, μη επικαλυπτόμενοι πυρήνες. Αξιολογήθηκαν μόνο οι περιπτώσεις στις οποίες υπήρχαν σήματα υβριδισμού στο 90% των κυττάρων του δείγματος. Καταγράφηκε ο αριθμός των φθοριζόντων σημάτων ανά κύτταρο και η αξιολόγηση έγινε με κριτήρια καθιερωμένα στη βιβλιογραφία [274]. Συγκεκριμένα, χαρακτηρίστηκε ως μονοσωμία η παρουσία ενός σήματος ανά



κύτταρο σε ποσοστό >45% του κυτταρικού πληθυσμού, ενώ ως πολυσωμία η παρουσία τριών ή περισσότερων σημάτων ανά κύτταρο σε ποσοστό >10% των κυτάρων. Για την εκτίμηση της ενίσχυσης του γονιδίου c-erbB-2 εκτιμήθηκε ο λόγος των σημάτων του γονιδίου προς τα σήματα του κεντρομεριδίου του χρωμοσώματος 17, ανά κύτταρο. Ενίσχυση θεωρήθηκε η παρουσία κυτάρων με λόγο μεγαλύτερο του 2 σε ποσοστό >10% του κυτταρικού πληθυσμού.

1:2.2. Ανοσοϊστοχημική μελέτη

Ιστολογικές τομές παραφίνης πάχους 4μm τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες επεξεργασμένες με πολυ-L-λυσίνη. Οι τομές αποπαραφινώθηκαν σε ξυλόλη και ενυδατώθηκαν σε κατιόντα οινόπνεύματα.

Για την ανοσοϊστοχημική χρώση χρησιμοποιήθηκε το πακέτο υλικών LSAB (Dako) σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών. Για την ανάδειξη αντιγονικών θέσεων, που ενδεχομένως καλύπτονται εξαιτίας της μονιμοποίησης του ιστού, οι τομές τοποθετήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα (0,1M κιτρικό οξύ-0,1M κιτρικό νάτριο) για 15 λεπτά σε φούρνο μικροκυμάτων (300 Watt). Η δράση της ενδογενούς υπεροξειδάσης εξουδετερώθηκε με εμπύθιση των τομών σε 1% H₂O₂ σε απόλυτη μεθανόλη για 30 λεπτά. Ακολούθησε έκπλυση των τομών με ρυθμιστικό διάλυμα Tris - άλατος (TBS, pH=7,6, Dako) και στη συνέχεια επικάλυψη των τομών με το μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της p185 (NCL-CB11, Novocastra) σε αραιώση 1:40. Η επώαση έγινε σε θερμοκρασία δωματίου για μία ώρα. Μετά από έκπλυση των τομών σε διάλυμα TBS εφαρμόσθηκε μίγμα βιοτυνιλιωμένων αντισωμάτων (anti-mouse, anti-rabbit, anti-goat immunoglobulins), το οποίο περιλαμβάνεται στο πακέτο υλικών LSAB (Dako). Ακολούθησε επικάλυψη των τομών με σύμπλεγμα στρεπταβιδίνης-υπεροξειδάσης και επώαση για 30 λεπτά. Η ανοσοαντίδραση ανιχνεύθηκε με την εφαρμογή διαλύματος του χρωμογόνου 3-3'-διαμινοβενζιδινο-τετραϋδροχλωρικού (DAB, Dako) σε Tris. Στη συνέχεια οι τομές εκπλύθηκαν με απεσταγμένο νερό, χρώσθηκαν με αιματοξυλίνη Harris και εκπλύθηκαν με νερό βρύσης. Ακολούθησε αφυδάτωση των τομών σε ανιόντα οινόπνεύματα, εμπύθιση σε ξυλόλη και επικάλυψη.

Σαν θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν περιπτώσεις καρκινωμάτων μαστού από προηγούμενη μελέτη, οι οποίες εμφάνιζαν υπερέκφραση της πρωτεΐνης c-erbB-2 σε μεγάλο ποσοστό κυτάρων. Σαν αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν παράλληλες τομές από τους ίδιους όγκους, στις οποίες παραλήφθηκε το στάδιο της εφαρμογής του πρωταρχικού αντισώματος.



Θετικές χαρακτηρίσθηκαν οι περιπτώσεις στις οποίες παρατηρήθηκε μεμβρανική χρώση, που αφορούσε όλη την περιφέρεια της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, σε ποσοστό >10% του κυτταρικού πληθυσμού [275,276].

1.2.3. Στατιστική ανάλυση

Τα αποτελέσματα της μελέτης καθώς και τα παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά των περιπτώσεων καταχωρήθηκαν σε στατιστικό πρόγραμμα ηλεκτρονικού υπολογιστή (Statistica for Windows, Statsoft, Tulsa, USA). Η στατιστική ανάλυση έγινε με τη χρήση της δοκιμασίας ακριβούς πιθανότητας του Fisher. Κάθε τιμή στατιστικού σφάλματος μικρότερη του 0.05 θεωρήθηκε σημαντική.



2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Ο υβριδισμός ήταν επιτυχής σε όλες τις περιπτώσεις με ευκρινή και εύκολα αξιολογήσιμα σήματα φθορισμού.

2.1. Αριθμητικές ανωμαλίες των χρωμοσωμάτων 3, 17, 8 και 7

2.1.1. Φυσιολογικό επιθήλιο

Στο μορφολογικά φυσιολογικό επιθήλιο των περιπτώσεων που μελετήθηκαν και στο παρακείμενο πλακώδους ενδοεπιθηλιακής βλάβης ή διηθητικού καρκινώματος φυσιολογικό επιθήλιο δεν παρατηρήθηκαν αριθμητικές χρωμοσωματικές ανωμαλίες.

2.1.2. Πλακώδεις ενδοεπιθηλιακές βλάβες τραχήλου

Ανευπλοειδία σε τουλάχιστον ένα από τα μελετηθέντα χρωμοσώματα ανιχνεύθηκε σε 15/25 (60%) περιπτώσεις ενδοεπιθηλιακής βλάβης. Σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρήθηκε πολυσωμία και η κατανομή των ανευπλοειδών κυττάρων ήταν ετερογενής. Αριθμητικές ανωμαλίες ανιχνεύθηκαν ακόμη και σε κοιλοκύτταρα (Εικόνες 1,2,3).

Από τα αποτελέσματα που παρατίθενται στον Πίνακα 4. είναι εμφανές, ότι αυξανόμενου του βαθμού της ενδοεπιθηλιακής βλάβης αυξάνεται και ο αριθμός των ανευπλοειδών περιπτώσεων, η διαφορά όμως αυτή δεν αναδείχθηκε στατιστικά σημαντική.

Πίνακας 4. Συσχέτιση της ανευπλοειδίας με το βαθμό της ενδοεπιθηλιακής βλάβης

Ενδοεπιθηλιακή βλάβη	Ανευπλοειδία	
	θετικές	αρνητικές
LgSIL	5(50%)	5(50%)
HgSIL	10(66,7%)	5(33,3%)
Σύνολο	15(60%)	10(40%)
LgSIL vs HgSIL	$p = 0.3374$	



Τα αποτελέσματα της χρωμοσωματικής ανάλυσης στις περιπτώσεις με πλακώδη ενδοεπιθηλιακή βλάβη φαίνονται αναλυτικότερα στον Πίνακα 5. Η πολυσωμία του χρωμοσώματος 3 ήταν η συχνότερη αριθμητική ανωμαλία τόσο στις χαμηλού όσο και στις υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακές βλάβες. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός, ότι όλες οι ανευσωμικές περιπτώσεις χαμηλόβαθμης ενδοεπιθηλιακής βλάβης παρουσίαζαν τη συγκεκριμένη αριθμητική ανωμαλία. Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι αυξανόμενου του βαθμού της ενδοεπιθηλιακής βλάβης αυξανόταν και η συχνότητα των αριθμητικών ανωμαλιών όλων των χρωμοσωμάτων. Η αύξηση αυτή ήταν στατιστικά σημαντική για το χρωμόσωμα 8 ($p=0.0339$) και ασθενής (τάση θετικής συσχέτισης) για το χρωμόσωμα 17 ($p=0.0654$). Αντίθετα, η ανευπλοειδία των χρωμοσωμάτων 3 και 7 δεν συσχετίστηκε με το βαθμό της ενδοεπιθηλιακής βλάβης.

Πίνακας 5. Συσχέτιση των αριθμητικών ανωμαλιών των χρωμοσωμάτων 3, 17, 8 και 7 με το βαθμό της ενδοεπιθηλιακής βλάβης.

Ενδοεπιθηλιακή βλάβη	Α ν ε υ π λ ο ε ι δ ί α			
	Χρ 3	Χρ 17	Χρ 8	Χρ 7
LgSIL	5/10(50%)	1/10(10%)	1/10(10%)	2/10(20%)
HgSIL	9/15(60%)	7/15(46,7%)	8/15(53,3%)	7/15(46,7%)
Σύνολο	14/25(56%)	8/25(32%)	9/25(36%)	9/25(36%)
LgSIL vs HgSIL	$p=0.4660$	$p=0.0654$	$p=0.0339$	$p=0.1757$

Σε ορισμένες περιπτώσεις ενδοεπιθηλιακής βλάβης παρατηρήθηκαν αριθμητικές ανωμαλίες σε περισσότερα του ενός χρωμοσώματα. Οι περιπτώσεις αυτές αφορούσαν συχνότερα σε υψηλού παρά σε χαμηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακές βλάβες. Από τα αποτελέσματα, τα οποία παρατίθενται στον Πίνακα 6, διαπιστώνεται ότι σε ποσοστό 10% των περιπτώσεων χαμηλόβαθμης και σε 46,7% των περιπτώσεων υψηλόβαθμης ενδοεπιθηλιακής βλάβης ανευρέθηκαν αριθμητικές ανωμαλίες σε περισσότερα από δύο χρωμοσώματα. Η ανάλυση έδειξε τάση θετικής συσχέτισης της ανευπλοειδίας σε περισσότερα από δύο χρωμοσώματα με το βαθμό της ενδοεπιθηλιακής βλάβης ($p=0.0654$).

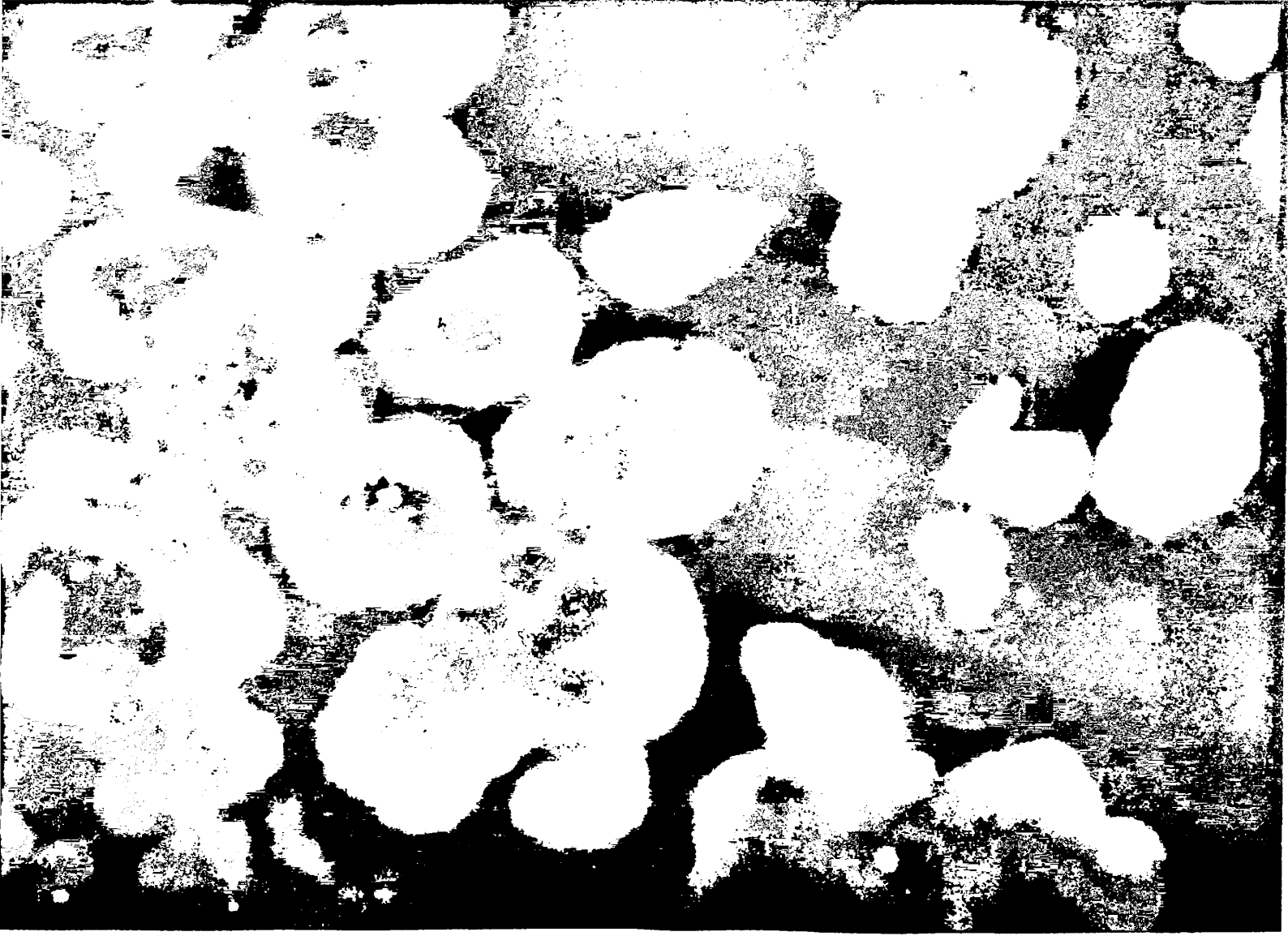


Πίνακας 6. Ανευπλασειοί σε ένα ή περισσότερα χρωμοσώματα στις πλακώδεις ενδοεπιθηλιακές βλάβες.

Ενδοεπιθηλιακή βλάβη	Α ν ε υ π λ ο ε ι δ ί α			
	1 χρωμοσώματος	2 χρωμοσωμάτων	3 χρωμοσωμάτων	4 χρωμοσωμάτων
LgSIL	3/10(30%)	1/10(10%)	0/10(0%)	1/10(10%)
HgSIL	2/15(13,3%)	1/15(6,7%)	1/15(6,7%)	6/15(40%)
Σύνολο	5/25(20%)	2/25(8%)	1/25(4%)	7/25(28%)



Εικόνα 1. Πολυσωμία του χρωμοσώματος 3 σε κοιλοκύτταρο (5 κόκκινα σήματα, βέλος) σε περίπτωση επίπεδου κονδυλώματος.



Εικόνα 3. Τρισωμία του χρωμοσώματος 7 (κόκκινα σήματα) και 17 (πράσινα σήματα) σε βασικά και παραβασικά κύτταρα γαιηλόβαθους ενδοεπιθηλιακής

2.1.3. Διηθητικά καρκινώματα

Ανευπλοειδία τουλάχιστον ενός χρωμοσώματος ανευρέθηκε σε 42/ (89,4%) περιπτώσεις (Πίνακας 7). Ετερογένεια παρατηρήθηκε στην κατανομή των ανευπλοειδών κυττάρων σε όλες τις περιπτώσεις (Εικόνα 4). Από την ανάλυση δεν διαπιστώθηκε σημαντική συσχέτιση της ανευπλοειδίας με το ιστολογικό τύπο του καρκινώματος (Πίνακας 7).

Πίνακας 7. Συσχέτιση ανευπλοειδίας με τον ιστολογικό τύπο του καρκινώματος

Ιστολογικός τύπος	Ανευπλοειδία	
	θετικές	αρνητικές
Πλακώδη ¹	27/30(90%)	3/30(10%)
Αδενοκαρκινώματα ²	8/10(80%)	2/10(20%)
Αδενοπλακώδη ³	7/7(100%)	0/7(0%)

vs 2 : $p=0.3666$, 2 vs 3 : $p= 0.3309$, 1 vs 3: $p= 0.5225$.



Εικόνα 4. Πολυσωμία του χρωμοσώματος 3 (κόκκινα σήματα) και 8 (πράσινα σήματα) σε διηθητικό καρκίνωμα.

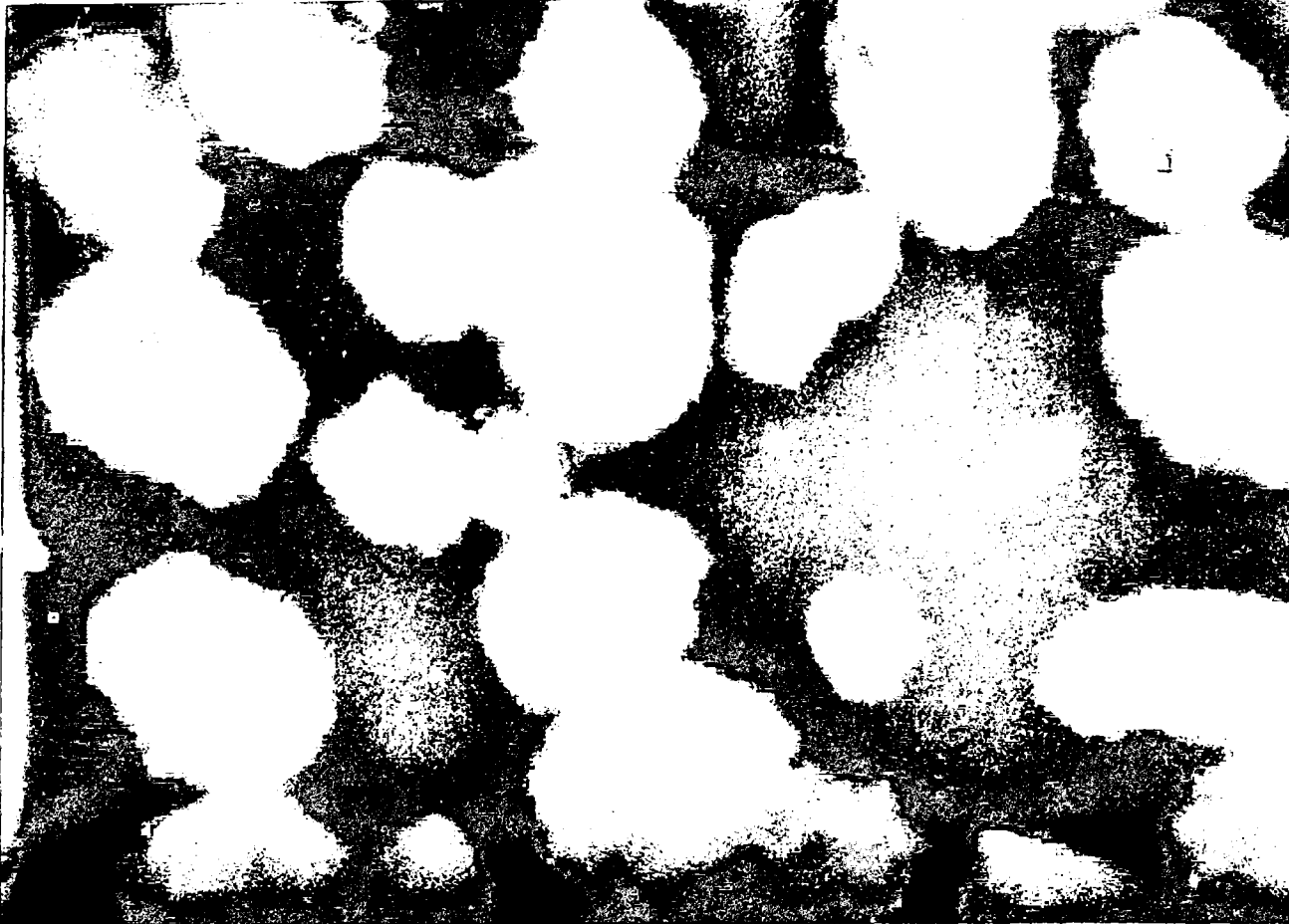
Στατιστικώς σημαντικές διαφορές προέκυψαν μεταξύ των πλακωδών καρκινωμάτων και των αδενοκαρκινωμάτων όσον αφορά την ανευπλοειδία των χρωμοσωμάτων 3 και 7 και μεταξύ αδenoπλακωδών καρκινωμάτων και αδenoκαρκινωμάτων όσον αφορά την ανευπλοειδία των χρωμοσωμάτων 3, 7 και 17. Μεταξύ των πλακωδών και αδenoπλακωδών καρκινωμάτων δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές (Πίνακας 8).

Πίνακας 8. Αριθμητικές ανωμαλίες των χρωμοσωμάτων 3, 17, 8 και 7 στα διηθητικά καρκινώματα. Συσχέτιση με τον ιστολογικό τύπο.

Ιστολογικός τύπος	Α ν ε υ π λ ο ε ι δ ί α			
	Χρ 3	Χρ 17	Χρ 8	Χρ 7
Πλακώδη ¹	23/30(76,7%)	20/30(66,7%)	18/30(60%)	17/30(56,7%)
Αδenoκαρκινώματα ²	4/10(40%)	4/10(40%)	5/10(50%)	2/10(20%)
Αδenoπλακώδη ³	7/7(100%)	7/7(100%)	6/7(85,7%)	6/7(85,7%)
Σύνολο	34/47(72,3%)	31/47(66%)	29/47(61,7%)	25/47(53,2%)
1 vs 2	p=0.0420	p=0.1322	p=0.4235	p=0.0481
2 vs 3	p=0.0170	p=0.0170	p=0.1595	p=0.0134
1 vs 3	p=0.1977	p =0.0863	p =0.2036	p =0.1611

Η πιο συχνή αριθμητική ανωμαλία ήταν η πολυσωμία. Σε σπάνιες περιπτώσεις παρατηρήθηκε μονοσωμία των χρωμοσωμάτων 17, 8 και 7(Πίνακας 9) (Εικόνα 5).





Εικόνα 5. Μονοσωμία του χρωμοσώματος 7 (κόκκινα σήματα) και 17 (πράσινα σήματα) σε πλακώδες καρκίνωμα τραχήλου.

Πίνακας 9. Αναλυτικά αποτελέσματα αριθμητικών χρωμοσωματικών ανωμαλιών στις περιπτώσεις διηθητικών καρκινωμάτων.

στολογικός τύπος	Α ν ε υ π λ ο ε ι δ ί α							
	Χρ 3		Χρ 17		Χρ 8		Χρ 7	
	Π	Μ	Π	Μ	Π	Μ	Π	Μ
Πλακώδη	23(100%)	0(0%)	18(90%)	2(10%)	17(94,4%)	1(5,6%)	16(94,1%)	1(5,9)
Αδενοκαρκινώματα	4(100%)	0(0%)	4(100%)	0(0%)	5(100%)	0(0%)	2(100%)	0(0%)
Αδενοπλακώδη	7(100%)	0(0%)	7(100%)	0(0%)	6(100%)	0(0%)	6(100%)	0(0%)
Σύνολο	34(100%)	0(0%)	29(93,6%)	2(6,4%)	28(96,6%)	1(3,4%)	24(96%)	1(4%)

Ανωμαλίες . Π: Πολυσωμία, Μ: Μονοσωμία

Σε ποσοστό 68,1% των διηθητικών καρκινωμάτων παρατηρήθηκαν αριθμητικές ανωμαλίες σε περισσότερα του ενός χρωμοσώματα. Τα αδενοπλακώδη και πλακώδη καρκινώματα εμφάνιζαν συχνότερα ανευπλοειδία σε όλα τα χρωμοσώματα που μελετήθηκαν σε σύγκριση με τα αδενοκαρκινώματα (Πίνακας 10)



Πίνακας 10. Ανευπλοειδία σε ένα ή περισσότερα χρωμοσώματα στα διηθητικά καρκινώματα. Συσχέτιση με τον ιστολογικό τύπο.

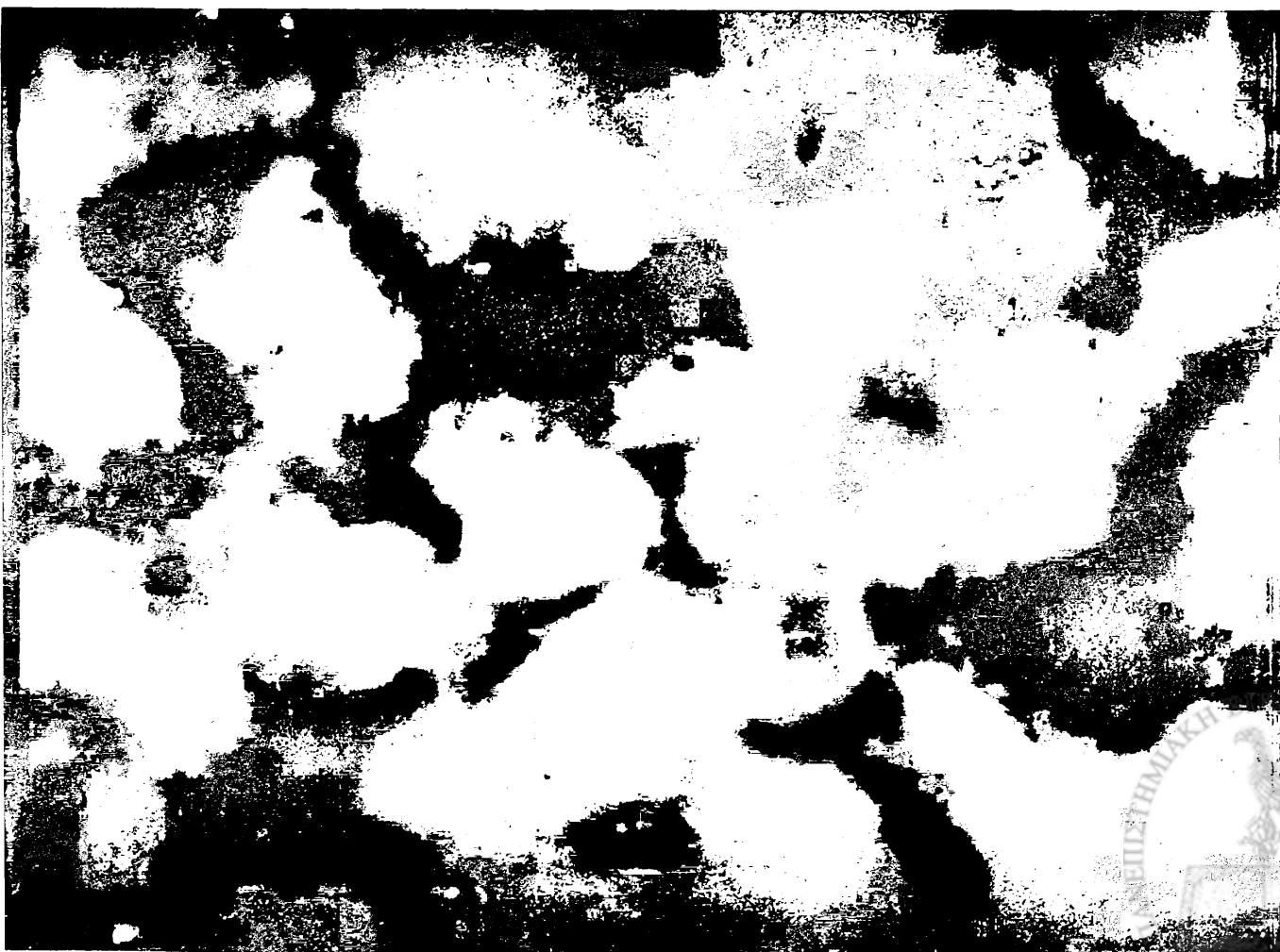
Ιστολογικός τύπος	Α ν ε υ π λ ο ε ι δ ί α			
	1 χρωμοσώματος	2 χρωμοσωμάτων	3 χρωμοσωμάτων	4 χρωμοσωμάτων
Πλακώδη ¹	6/30(20%)	4/30(13,3%)	4/30(13,3%)	13/30(43,3%)
Αδενοκαρκινώματα ²	4/10(40%)	2/10(20%)	1/10(10%)	1/10(10%)
Αδενοπλακώδη ³	0/10(0%)	0/10(0%)	2/7(28,6%)	5/7 (71,4%)
Σύνολο	10/47(21,3%)	6/47(12,8%)	7/47(14,9%)	19/47(40,4%)
1 vs 2	p=0.1969	p=0.4720	p=0.6331	p=0.0579
2 vs 3	p=0.0882	p=0.3309	p=0.3603	p=0.0175
1 vs 3	p=0.2554	p =0.4149	p =0.3152	p =0.1797

Ανευπλοειδία σε περισσότερα από δύο χρωμοσώματα παρατηρήθηκε σε όλα τα αδενοπλακώδη καρκινώματα, σε 17/30(56,6%) περιπτώσεις πλακωδών καρκινωμάτων και σε 2/10(20%) αδενοκαρκινώματα (Πίνακας 10) (Εικόνες 6,7). Η διαφορά αναδείχθηκε σημαντική μεταξύ των αδενοκαρκινωμάτων και πλακωδών καρκινωμάτων ($p=0.0481$), μεταξύ των πλακωδών και αδενοπλακωδών καρκινωμάτων ($p=0.0336$) καθώς και μεταξύ των αδενοπλακωδών καρκινωμάτων και αδενοκαρκινωμάτων ($p=0.0019$).





Εικόνα 6. Ανευπλοειδία των χρωμοσωμάτων 3 και 8 σε αδενοπλάκωδες καρκίνωμα. Πυρήνας με 3 πράσινα και 6 κόκκινα σήματα (βέλη).



Εικόνα 7. Ανευπλοειδία του χρωμοσώματος 17 (πράσινα σήματα) στην ίδια

Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση της ανευπλοειδίας με τον ιστολογικό βαθμό κακοηθείας των καρκινωμάτων (Πίνακας 11).

Πίνακας 11. Συσχέτιση της ανευπλοειδίας με τον ιστολογικό βαθμό κακοηθείας των καρκινωμάτων.

Βαθμός κακοηθείας	Ανευπλοειδία	
	θετικές	αρνητικές
I	7/10(70%)	3/10(30%)
II	22/23(95,7%)	1/23(4,3%)
III	12/12 (100%)	0/12(0%)

I vs II: $p=0.0726$, II vs III: $p=0.6571$, I vs III: $p=0.0779$.



2.1.4. Συσχέτιση των αριθμητικών ανωμαλιών των ενδοεπιθηλακών βλαβών και διηθητικών καρκινωμάτων.

Ανευπλοειδία παρατηρήθηκε σε 15/25 (60%) περιπτώσεις ενδοεπιθηλιακής βλάβης και σε 42/47 (89,4%) περιπτώσεις διηθητικών καρκινωμάτων (Πίνακες 4, 7). Η διαφορά αναδείχθηκε στατιστικά σημαντική ($p=0.0051$).

Τα διηθητικά καρκινώματα εμφάνιζαν συχνότερα αριθμητικές χρωμοσωματικές ανωμαλίες σε όλα ανεξαιρέτως τα μελετηθέντα χρωμοσώματα, οι διαφορές όμως αναδείχθηκαν στατιστικά σημαντικές μόνο για τα χρωμοσώματα 17 και 8. (Πίνακας 12).

Πίνακας 12. Συσχέτιση των αριθμητικών ανωμαλιών των χρωμοσωμάτων 3, 17, 8 και 7 μεταξύ των ενδοεπιθηλιακών βλαβών και των διηθητικών καρκινωμάτων.

Αλλοίωση	Ανευπλοειδία			
	Χρ 3	Χρ 17	Χρ 8	Χρ 7
SIL	14/25(56%)	8/25(32%)	9/25(36%)	9/25(36%)
Ca	34/47(72,3%)	31/47(66%)	29/47(61,7%)	25/47(53,2%)
SIL Vs Ca	$p=0.1280$	$p=0.0059$	$p=0.0332$	$p=0.1263$

Συντμήσεις: Ca= Διηθητικό καρκίνωμα

Στα διηθητικά καρκινώματα παρατηρήθηκε συχνότερα συσσώρευση αριθμητικών ανωμαλιών σε περισσότερα του ενός χρωμοσώματα σε σύγκριση με τις ενδοεπιθηλιακές βλάβες (Πίνακας 13). Στατιστικά σημαντική αναδείχθηκε η διαφορά μεταξύ των διηθητικών καρκινωμάτων και των ενδοεπιθηλακών βλαβών όσον αφορά την ανευπλοειδία σε περισσότερα από δύο χρωμοσώματα ($p=0.0499$).



Πίνακας 13. Ανευπλοειδία σε ένα ή περισσότερα χρωμοσώματα σε ενδοεπιθηλιακές βλάβες και διηθητικά καρκινώματα τραχήλου. Συσχέτιση με την ιστολογική αλλοίωση.

Αλλοίωση	Ανευπλοειδία			
	1 χρωμοσώματος	2 χρωμοσωμάτων	3 χρωμοσωμάτων	4 χρωμοσωμάτων
SIL	5/25(20%)	2/25(8%)	1/25(4%)	7/25(28%)
Ca	10/47(21,3%)	6/47(12,8%)	7/47(14,9%)	19/47(40,4%)

Στα διηθητικά καρκινώματα παρατηρήθηκαν συχνότερα αριθμητικές ανωμαλίες [42/47(89,4%)] σε σύγκριση με τις χαμηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακές βλάβες [5/10(50%)] (Πίνακες 4, 7). Η διαφορά αναδείχθηκε στατιστικά σημαντική ($p=0.0099$).

Από τη συγκριτική μελέτη κάθε χρωμοσώματος ξεχωριστά, προέκυψαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των χαμηλόβαθμων ενδοεπιθηλιακών βλαβών και των καρκινωμάτων για τα χρωμοσώματα 17 και 8 και στατιστικά ασθενής για το χρωμόσωμα 7(Πίνακας 14).

Πίνακας 14. Συσχέτιση των αριθμητικών ανωμαλιών των χρωμοσωμάτων 3, 17, 8 και 7 μεταξύ των LgSIL και των διηθητικών καρκινωμάτων.

Αλλοίωση	Ανευπλοειδία			
	Χρ 3	Χρ 17	Χρ 8	Χρ 7
LgSIL	5/10(50%)	1/10(10%)	1/10(10%)	2/10(20%)
Ca	34/47(72,3%)	31/47(66%)	29/47(61,7%)	25/47(53,2%)
LgSIL vs Ca	$p = 0.1571$	$p = 0.0016$	$p = 0.0035$	$p=0.0572$

Στις περισσότερες περιπτώσεις χαμηλόβαθμης ενδοεπιθηλιακής βλάβης παρατηρήθηκε ανευπλοειδία ενός μόνο χρωμοσώματος, ενώ στα διηθητικά καρκινώματα οι αριθμητικές ανωμαλίες αφορούσαν συνήθως περισσότερα χρωμοσώματα (Πίνακας 15). Στατιστικά σημαντική αναδείχθηκε η διαφορά μεταξύ των χαμηλόβαθμων ενδοεπιθηλιακών βλαβών και των διηθητικών καρκινωμάτων όσον αφορά την ανευπλοειδία περισσότερων των δύο χρωμοσωμάτων ($p=0.0096$).



Πίνακας 15. Ανευπλοειδία σε ένα ή περισσότερα χρωμοσώματα σε LgSIL και διηθητικά καρκινώματα τραχήλου. Συσχέτιση με τον ιστολογική αλλοίωση.

Αλλοίωση	Ανευπλοειδία			
	1 χρωμοσώματος	2 χρωμοσωμάτων	3 χρωμοσωμάτων	4 χρωμοσωμάτων
LgSIL	3/10(30%)	1/10(10%)	0/10(0%)	1/10(10%)
Ca	10/47(21,3%)	6/47(12,8%)	7/47(14,9%)	19/47(40,4%)

Στα διηθητικά καρκινώματα παρατηρήθηκαν συχνότερα αριθμητικές ανωμαλίες [42/47(89,4%)] σε σύγκριση με τις υψηλόβαθμες ενδοεπιθηλιακές βλάβες [10/15(66,7%)] (Πίνακες 4, 7). Η διαφορά όμως ήταν στατιστικά οριακή ($p=0.0522$).

Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των υψηλόβαθμων ενδοεπιθηλιακών βλαβών και των διηθητικών καρκινωμάτων όταν αξιολογήθηκαν οι αριθμητικές ανωμαλίες κάθε χρωμοσώματος χωριστά (Πίνακας 16).

Πίνακας 16. Συσχέτιση των αριθμητικών ανωμαλιών των χρωμοσωμάτων 3, 17, 8 και 7 μεταξύ των HgSIL και των διηθητικών καρκινωμάτων.

Αλλοίωση	Ανευπλοειδία			
	Χρ 3	Χρ 17	Χρ 8	Χρ 7
HgSIL	9/15(60%)	7/15(46,7%)	8/15(53,3%)	7/15(46,7%)
Ca	34/47(72,3%)	31/47(66%)	29/47(61,7%)	25/47(53,2%)
HgSIL vs Ca	$p=0.2762$	$p=0.1514$	$p=0.3891$	$p=0.4425$

Δεν διαπιστώθηκαν επίσης σημαντικές διαφορές μεταξύ των υψηλόβαθμων ενδοεπιθηλιακών βλαβών και των διηθητικών καρκινωμάτων όσον αφορά την ανευπλοειδία σε περισσότερα από δύο χρωμοσώματα ($p=0.3860$) (Πίνακας 17).



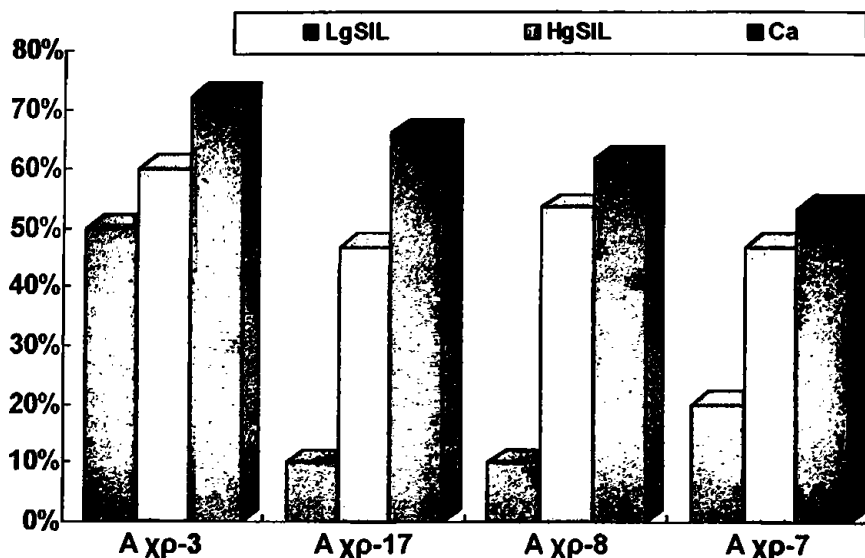
Πίνακας 17. Ανευπλοειδία σε ένα ή περισσότερα χρωμοσώματα σε υψηλόβαθμες ενδοεπιθηλιακές βλάβες και διηθητικά καρκινώματα τραχήλου.

Αλλοίωση	Ανευπλοειδία			
	1 χρωμοσώματος	2 χρωμοσωμάτων	3 χρωμοσωμάτων	4 χρωμοσωμάτων
HgSIL	2/15(13,3%)	1/15(6,7%)	1/15(6,7%)	6/15(40%)
Ca	10/47(21,3%)	6/47(12,8%)	7/47(14,9%)	19/47(40,4%)



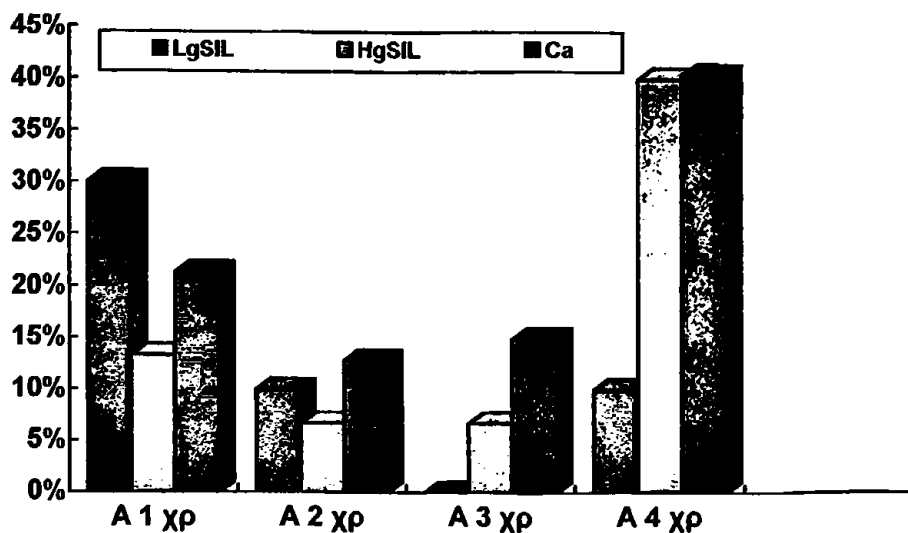
Διάγραμμα 1. Συγκριτική γραφική απεικόνιση της συχνότητας της ανευπλοειδίας των χρωμοσωμάτων 3, 17, 8 και 7 σε ενδοεπιθηλιακές βλάβες και καρκινώματα τραχήλου.

Περιπτώσεις %



Διάγραμμα 2. Συγκριτική γραφική απεικόνιση της συχνότητας της ανευπλοειδίας σε ένα ή περισσότερα χρωμοσώματα σε ενδοεπιθηλιακές βλάβες και καρκινώματα τραχήλου.

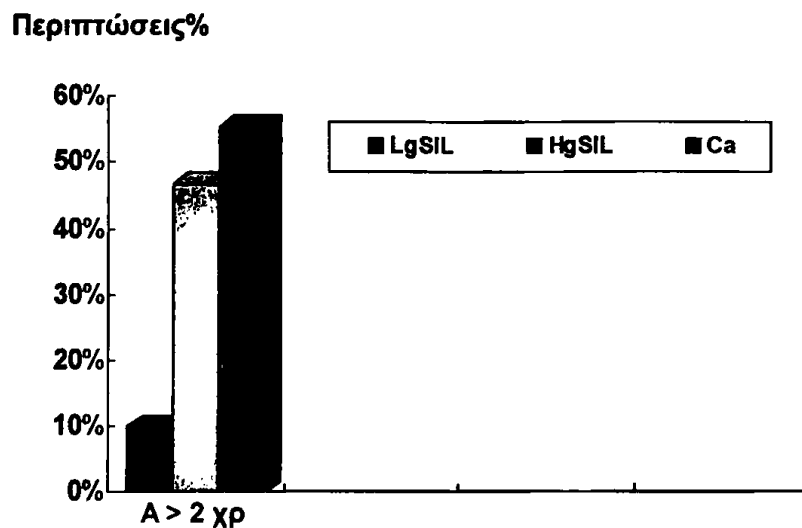
Περιπτώσεις %



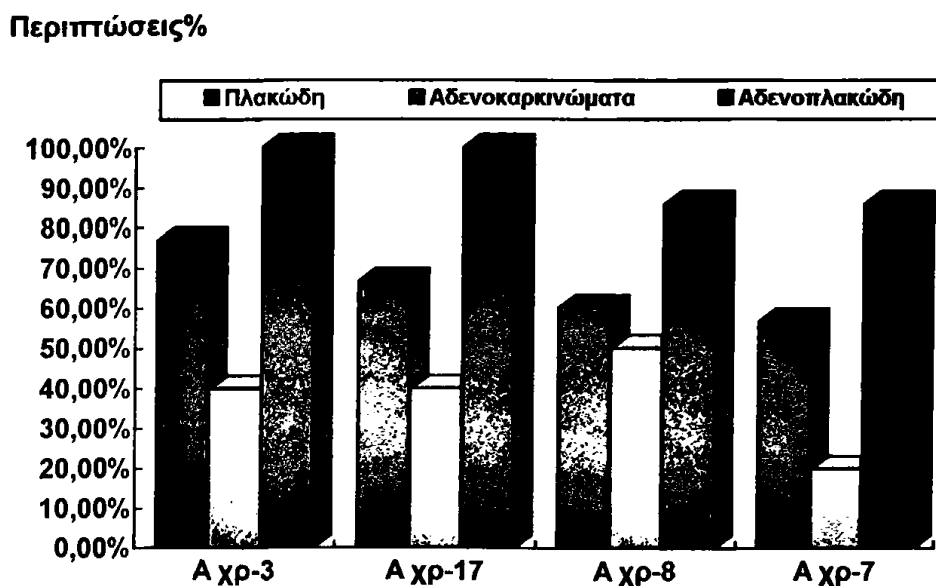
Συντμήσεις A = Ανευπλοειδία, χρ = χρωμόσωμα



Διάγραμμα 3. Συγκριτική γραφική απεικόνιση της συχνότητας ταυτόχρονης ανευπλοειδίας σε περισσότερα από 2 χρωμοσώματα σε ενδοεπιθηλιακές βλάβες και καρκινώματα.

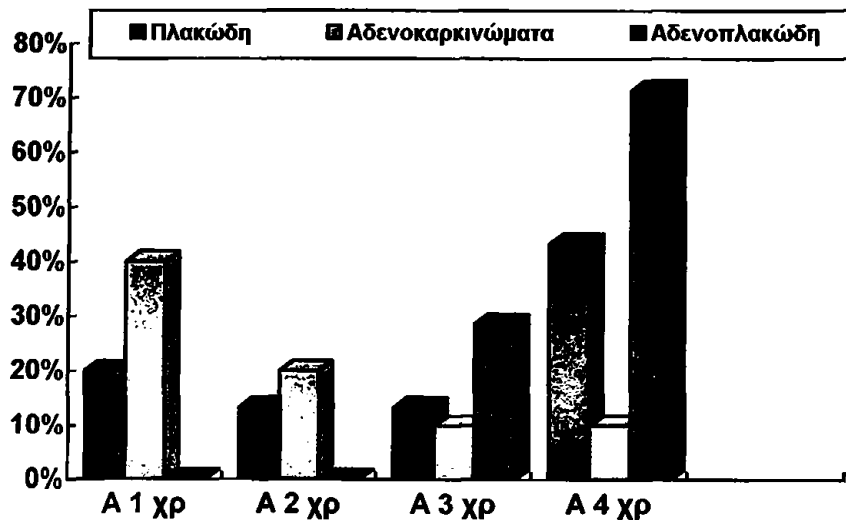


Διάγραμμα 4. Συγκριτική γραφική απεικόνιση της συχνότητας της ανευπλοειδίας των χρωμοσωμάτων 3, 17, 8 και 7 στους ιστολογικούς τύπους των καρκινωμάτων.



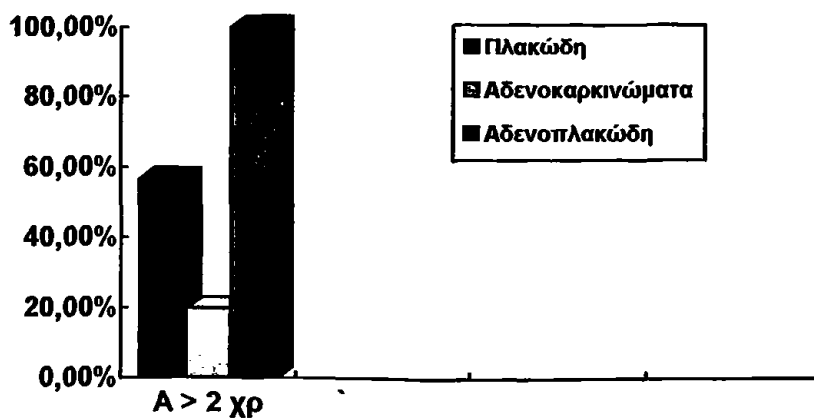
Διάγραμμα 5. Συγκριτική γραφική απεικόνιση της συχνότητας της ανευπλοειδίας σε ένα ή περισσότερα χρωμοσώματα στους ιστολογικούς τύπους των καρκινωμάτων.

Περιπτώσεις %



Διάγραμμα 6. Συγκριτική γραφική απεικόνιση της συχνότητας της ταυτόχρονης ανευπλοειδίας σε περισσότερα από 2 χρωμοσώματα στους ιστολογικούς τύπους των καρκινωμάτων.

Περιπτώσεις %



2.1.5. Συσχέτιση των αριθμητικών ανωμαλιών ιδίου βαθμού ενδοεπιθηλιακών βλαβών, με ή χωρίς συνύπαρξη σοβαρότερης βλάβης

Στις 15 περιπτώσεις υψηλόβαθμης ενδοεπιθηλιακής βλάβης συνυπήρχε χαμηλού βαθμού βλάβη και σε 15 περιπτώσεις διηθητικών καρκινωμάτων συνυπήρχε υψηλόβαθμη ενδοεπιθηλιακή βλάβη. Όπως ήδη αναφέρθηκε, η μελέτη επεκτάθηκε και στις συνυπάρχουσες αλλοιώσεις. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός, ότι οι υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις, οι οποίες συνυπήρχαν παρακείμενα διηθητικών καρκινωμάτων παρουσίαζαν όμοιες αριθμητικές ανωμαλίες με το διηθητικό καρκίνωμα, σε μικρότερο όμως ποσοστό κυττάρων. Το ίδιο παρατηρήθηκε και στις χαμηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακές βλάβες, οι οποίες συνυπήρχαν σε περιπτώσεις υψηλόβαθμης ενδοεπιθηλιακής βλάβης (Εικόνες 8, 9). Δεν διαπιστώθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των αμιγών υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακών βλαβών και αυτών στις οποίες συνυπήρχε διηθητικό καρκίνωμα (Πίνακες 18 - 20).

Όπως προαναφέρθηκε, οι χαμηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακές βλάβες, οι οποίες συνυπήρχαν σε παρακείμενες υψηλού βαθμού αλλοιώσεων θέσεις, εμφάνιζαν τις ίδιες αριθμητικές ανωμαλίες με τις υψηλού βαθμού βλάβες, στοιχεία που έχουν παρατεθεί στους Πίνακες 4-6.



Πίνακας 18. Συσχέτιση ανευπλοειδίας μεταξύ αμιγών HgSIL και HgSIL που συνυπήρχαν με διηθητικό καρκίνωμα.

HgSIL	Ανευπλοειδία	
	θετικές	αρνητικές
Αμιγείς ¹	10/15(66,7%)	5/15(33,3%)
Συνυπάρχουσες με διηθητικό καρκίνωμα ²	13/15(86,7%)	2/15(13,3%)
1 vs 2	p = 0.1949	

Πίνακας 19. Αριθμητικές ανωμαλίες των χρωμοσωμάτων 3, 17, 8 και 7 σε περιπτώσεις αμιγών HgSIL και HgSIL που συνυπήρχαν με διηθητικό καρκίνωμα.

HgSIL	Ανευπλοειδία			
	Χρ 3	Χρ 17	Χρ 8	Χρ 7
Αμιγείς ¹	9/15(60%)	7/15(46,7%)	8/15 (53,3%)	7/15(46,7%)
Συνυπάρχουσες με διηθητικό καρκίνωμα ²	11/15(73,3%)	11/15(73,3%)	8/15(53,3%)	10/15(66,7%)
1 vs 2	p = 0.3499	p = 0.1318	-	p=0.2311

Πίνακας 20. Ανευπλοειδία σε ένα ή περισσότερα χρωμοσώματα σε περιπτώσεις αμιγών HgSIL και HgSIL που συνυπήρχαν με διηθητικό καρκίνωμα.

HgSIL	Ανευπλοειδία			
	1 χρωμοσώματος	2 χρωμοσωμάτων	3 χρωμοσωμάτων	4 χρωμοσωμάτων
Αμιγείς ¹	2/15(13,3%)	1/15(6,7%)	1/15(6,7%)	6/15(40%)
Συνυπάρχουσες με διηθητικό καρκίνωμα ²	2/15(13,3%)	3/15(20%)	0/15(0%)	8/15(53,3%)
1 vs 2	-	p = 0.2989	p = 0.5000	p = 0.3576



2.2. Ογκογονίδιο c-erbB-2 (Her2/neu)

2.2.1. Ενίσχυση του γονιδίου c-erbB-2

Στο μορφολογικά φυσιολογικό επιθήλιο των περιπτώσεων που μελετήθηκαν και στο παρακείμενο πλακώδους ενδοεπιθηλακής βλάβης ή διηθητικού καρκινώματος φυσιολογικό επιθήλιο δεν παρατηρήθηκε ενίσχυση του γονιδίου c-erbB-2.

Σε καμία επίσης από τις 25 αμιγείς περιπτώσεις ενδοεπιθηλακής βλάβης, ακόμη και στις υψηλού βαθμού, δεν παρατηρήθηκε γονιδιακή ενίσχυση. Σε μία περίπτωση διηθητικού πλακώδους καρκινώματος στην οποία παρατηρήθηκε ενίσχυση του γονιδίου c-erbB-2, συνυπήρχε υψηλόβαθμη ενδοεπιθηλιακή βλάβη. Στην τελευταία ανευρέθηκε επίσης γονιδιακή ενίσχυση.

Ενίσχυση του c-erbB-2 ανευρέθηκε σε 10/47 (21,3%) περιπτώσεις διηθητικών καρκινωμάτων. Αναλυτικότερα, γονιδιακή ενίσχυση παρατηρήθηκε στο ίδιο περίπου ποσοστό αδenoκαρκινωμάτων και αδenoπλακωδών καρκινωμάτων (30% και 28,6% αντίστοιχα) και σε μικρότερο ποσοστό πλακωδών καρκινωμάτων (16,7%), οι διαφορές όμως δεν ήταν στατιστικά σημαντικές (Πίνακας 21).

Σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρήθηκε ετερογένεια στην κατανομή των κυττάρων που εμφάνιζαν ενίσχυση του γονιδίου. Το επίπεδο της ενίσχυσης του γονιδίου ήταν συνήθως χαμηλό (< 10 αντίγραφα). Μόνο σε μία περίπτωση πλακώδους καρκινώματος παρατηρήθηκε υψηλού βαθμού ενίσχυση υπό τη μορφή αθροίσεων-συμπλεγμάτων σημάτων (Εικόνες 10, 11,12).

Πίνακας 21. Συσχέτιση της ενίσχυσης του γονιδίου c-erbB-2 με τον ιστολογικό τύπο των καρκινωμάτων.

Ιστολογικός τύπος	Ενίσχυση του γονιδίου c-erbB-2	
	θετικές	αρνητικές
Πλακώδη ¹	5/30(16,7%)	25/30(83,3%)
Αδenoκαρκινώματα ²	3/10(30%)	7/10(70%)
Αδenoπλακώδη ³	2/7(28,6%)	5/7(71,4%)

1 vs 2: p=0.3117, 2 vs 3 : p=0.6855, 1 vs 3: p=0.3976.

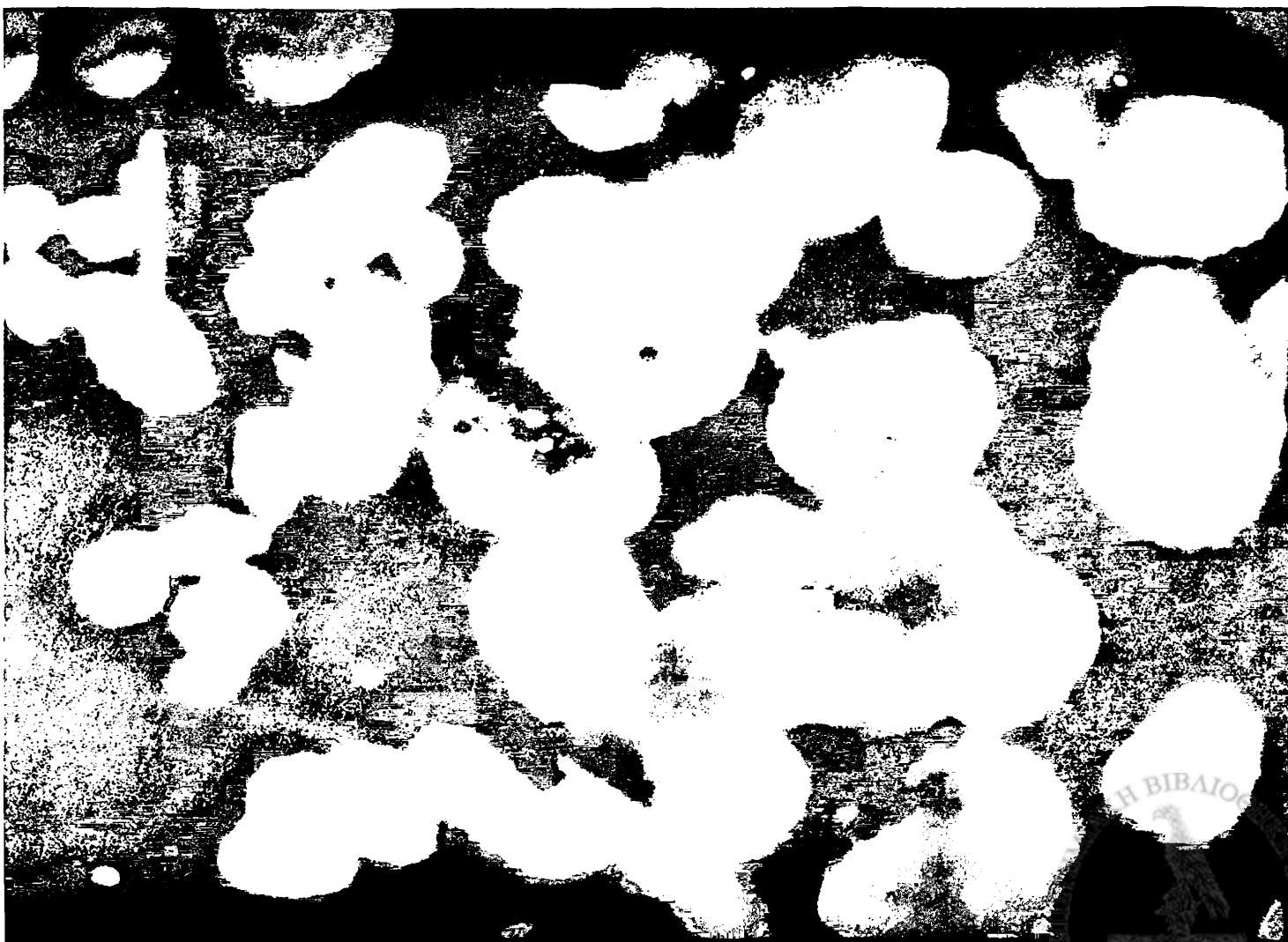


Ενίσχυση του γονιόσιου c-erbB-2 παρατηρήθηκε συχνότερα στα υψηλά στα χαμηλού και μέτριου βαθμού κακοηθείας καρκινώματα, διαφορά η οποία αναδείχθηκε στατιστικά σημαντική (Πίνακας 22).

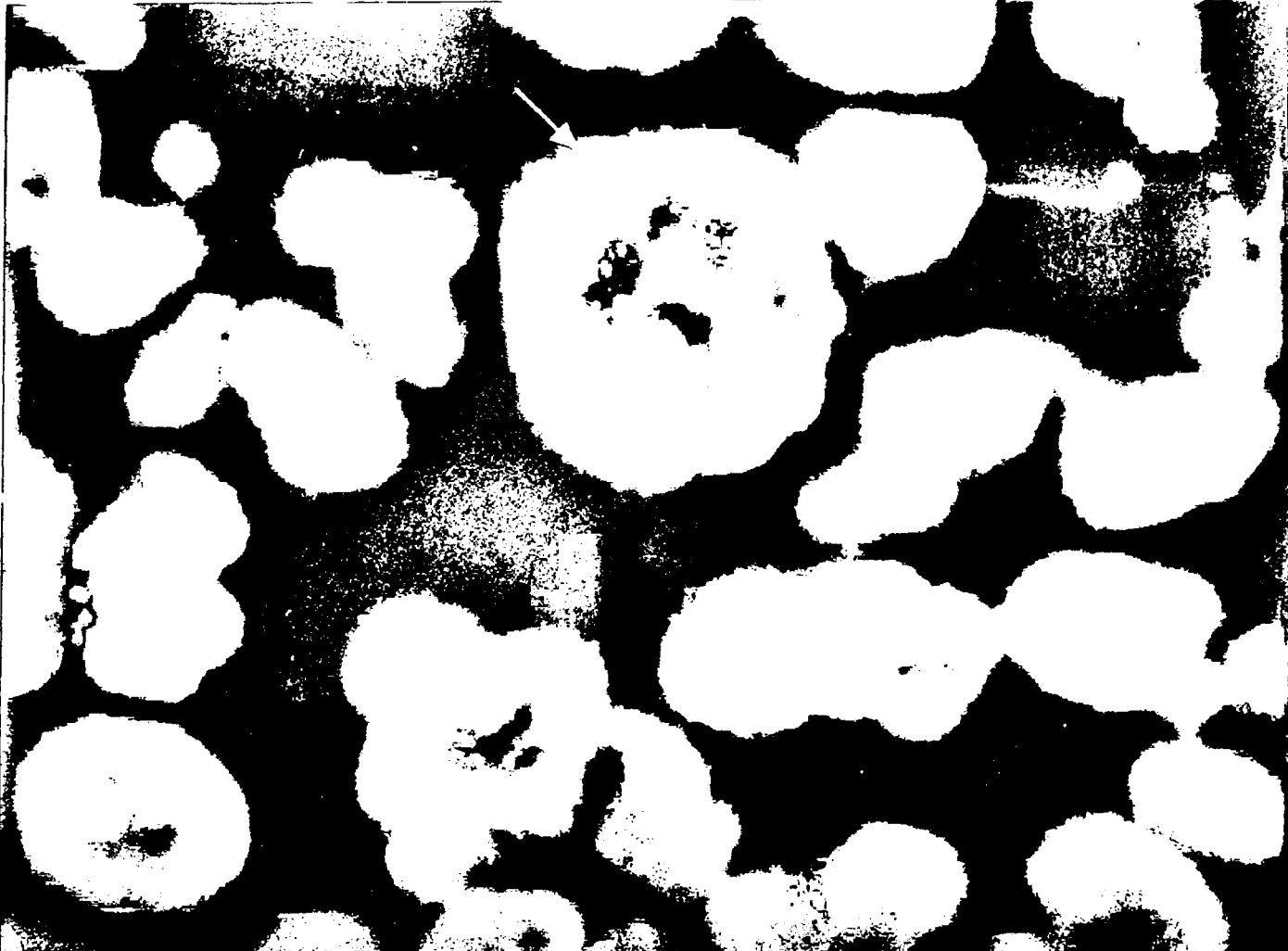
Πίνακας 22. Συσχέτιση της ενίσχυσης του γονιδίου c-erbB-2 με τον ιστολογικό βαθμό κακοηθείας των καρκινωμάτων.

Βαθμός κακοηθείας	Ενίσχυση γονιδίου c-erbB-2	
	θετικές	αρνητικές
I	1/10(10%)	9/10(90%)
II	3/23(13%)	20/23(87%)
III	6/12(50%)	6/12(50%)

vs II: $p=0.6492$, II vs III: $p=0.0262$, I vs III: $p=0.0588$.



Εικόνα 10. Υψηλού βαθμού ενίσχυση του γονιδίου c-erbB-2 υπό τη μορφή συμπλεγμάτων κόκκινων σημάτων σε καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων.



Εικόνα 11. Νεοπλασματικό κύτταρο με πολλαπλά αντίγραφα του γονιδίου c-erbB-2 (κόκκινα σήματα, βέλος).



2.2.2. Υπερέκφραση της πρωτεΐνης c-erbB-2

Στο μορφολογικά φυσιολογικό επιθήλιο των περιπτώσεων που μελετήθηκαν και το παρακείμενο ενδοεπιθηλιακής βλάβης ή διηθητικού καρκινώματος φυσιολογικό επιθήλιο δεν παρατηρήθηκε μεμβρανική έκφραση της πρωτεΐνης c-erbB-2. Σε αρκετές βέβαια περιπτώσεις παρατηρήθηκε κυτταροπλασματική χρώση, η οποία δεν αξιολογήθηκε.

Σε καμμία από τις μελετηθείσες αμιγείς ενδοεπιθηλιακές βλάβες δεν παρατηρήθηκε υπερέκφραση της πρωτεΐνης. Σε μία όμως περίπτωση διηθητικού πλακώδους καρκινώματος που εμφάνιζε υπερέκφραση της πρωτεΐνης c-erbB-2, συνυπήρχε υψηλόβαθμη ενδοεπιθηλιακή βλάβη, στην οποία παρατηρήθηκε επίσης υπερέκφραση της πρωτεΐνης. Στην περίπτωση αυτή ανιχνεύθηκε ενίσχυση του γονιδίου τόσο στο διηθητικό καρκίνωμα όσο και στην ενδοεπιθηλιακή βλάβη.

Υπερέκφραση της πρωτεΐνης c-erbB-2 ανευρέθηκε σε 4/47 (8,5%) διηθητικά καρκινώματα. Δεν διαπιστώθηκε συσχέτιση της έκφρασης της πρωτεΐνης με τον ιστολογικό τύπο των καρκινωμάτων (Πίνακας 23).

Πίνακας 23. Συσχέτιση της υπερέκφρασης της πρωτεΐνης c-erbB-2 με τον ιστολογικό τύπο των καρκινωμάτων.

Ιστολογικός τύπος	Υπερέκφραση πρωτεΐνης c-erbB-2	
	θετικές	αρνητικές
Πλακώδη ¹	2/30(6,7%)	28/30(93,3%)
Αδενοκαρκινώματα ²	1/10(10%)	9/10(90%)
Αδενοπλακώδη ³	1/7(14,3%)	6/7(85,7%)

1 vs 2: $p=0.5769$, 2 vs 3: $p=0.6691$, 1 vs 3: $p=0.4730$.

Από την ανάλυση δεν διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση της υπερέκφρασης της πρωτεΐνης με τον ιστολογικό βαθμό κακοηθείας των καρκινωμάτων (Πίνακας 24).



Πίνακας 24. Συσχέτιση της υπερέκφρασης της πρωτεΐνης c-erbB-2 με τον ιστολογικό βαθμό κακοηθείας των καρκινωμάτων.

Βαθμός κακοηθείας	Υπερέκφραση πρωτεΐνης c-erbB-2	
	θετικές	αρνητικές
I	0/10(0%)	10/10(100%)
II	2/23(8,7%)	21/23(91,3%)
III	2/12(16,7%)	10/12(83,3%)

I vs II: $p=0.4792$, II vs III: $p=0.4250$, I vs III: $p=0.2857$.

Σε όλες τις περιπτώσεις, στις οποίες παρατηρήθηκε υπερέκφραση της πρωτεΐνης, ανιχνεύθηκε ενίσχυση του γονιδίου c-erbB-2. Σε έξι όμως περιπτώσεις στις οποίες ανιχνεύθηκε ενίσχυση του γονιδίου δεν παρατηρήθηκε υπερέκφραση της πρωτεΐνης (Πίνακας 25).

Πίνακας 25. Συσχέτιση της ενίσχυσης του γονιδίου c-erbB-2 με την υπερέκφραση της πρωτεΐνης αυτού σε καρκινώματα τραχήλου.

Ενίσχυση γονιδίου	Υπερέκφραση πρωτεΐνης	
	θετικές	αρνητικές
θετικές	4	6
αρνητικές	0	37



ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Βασικός αιτιοπαθογενετικός παράγοντας για την ανάπτυξη της τραχηλικής νεοπλασίας θεωρείται ότι είναι ο ιός HPV [27-33,104]. Η λοίμωξη όμως από ογκογόνους, "υψηλού κινδύνου" τύπους του ιού δεν αρκεί για την πλήρη ανάπτυξη κακοήθους φαινοτύπου [115]. Από μελέτες *in vitro*, σε καλλιέργειες ανθρωπίνων κερατινοκυττάρων επιμολυσμένων με τους HPV-16, HPV-18, ή HPV-33, έχει αποδειχθεί ότι το τελευταίο επιτυγχάνεται είτε μετά από εκτεταμένες και μακράς διάρκειας καλλιέργειες, είτε μετά από προσθήκη ενεργοποιημένου ογκογονιδίου *ras* [277,278]. *In vivo*, μόνο εμμένουσες, πιθανώς λόγω αποτυχίας του ανοσοποιητικού συστήματος να εκριζώσει τα μολυσμένα από τον ιό κύτταρα, λοιμώξεις από "υψηλού κινδύνου" τύπους HPV μπορεί να εξελιχθούν [34]. Κυτταρογενετικές επίσης μελέτες, καθώς και αναλύσεις απώλειας ετεροζυγωτίας σε προκαρκινωμάτωσης αλλοιώσεις και πρωτοπαθή καρκινώματα του τραχήλου έχουν δείξει ότι η ανάπτυξη της τραχηλικής νεοπλασίας, μετά από τη λοίμωξη με τον ιό HPV, συνδυάζεται με τη σταδιακή συσσώρευση γενετικών ανωμαλιών σε αρκετά χρωμοσώματα όπως τα 1, 3, 4, 5, 6, 11, 15, 17, και 18 [235, 255, 279].

Στις υψηλόβαθμες ενδοεπιθηλιακές βλάβες και κυρίως στα διηθητικά καρκινώματα συνήθως το ιϊκό DNA ενσωματώνεται στο γένωμα των κυττάρων του ξενιστή [8,107,112,113]. Η ενσωμάτωση των "υψηλού κινδύνου" τύπων του ιού αποτελεί από μόνη της μετάλλαξη με επακόλουθα στο γονιδίωμα του ιού και των κυττάρων [115]. Κατά την ενσωμάτωση σπάζουν οι περιοχές E1/E2 του DNA του ιού με αποτέλεσμα τη συνεχή ανεξέλεγκτη μεταγραφή των E6/E7 γονιδίων. Στην υπερέκφραση αμφοτέρων των πρωτεϊνών E6 και E7 και την αλληλεπίδραση αυτών με ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια αποδίδεται ο μετασχηματισμός των κυττάρων και η γενετική αστάθεια [26,112,115]. Οι E6 και E7 πρωτεΐνες απενεργοποιούν πρωτεΐνες, οι οποίες ελέγχουν τον κυτταρικό κύκλο, κυριότερες εκ των οποίων είναι η p53 και Rb. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό και την αθανатоποίηση των κυττάρων που έχουν υποστεί γενετικές ανωμαλίες λόγω της HPV λοίμωξης. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι η p53 πρωτεΐνη παίζει ενεργό ρόλο στον έλεγχο διπλασιασμού του κεντροσώματος, εξασφαλίζοντας φυσιολογικές διπολικές ατράκτους και ακριβή διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων κατά τη διάρκεια της μίτωσης [128]. Απενεργοποίηση αυτής από την E6 ιϊκή ογκοπρωτεΐνη πιθανώς να οδηγεί σε σταδιακή ανώμαλη επαύξηση-ενίσχυση των κεντροσωμάτων με αποτέλεσμα τον ανώμαλο

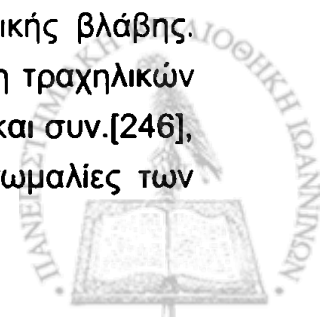


διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων και την πρόκληση ανευπλοειδίας και γενετικής αστάθειας [280].

Μελέτες της φυσικής ιστορίας και εξέλιξης των δυσπλαστικών αλλοιώσεων του τραχήλου έχουν δείξει ότι μερικές μπορεί να υποστρέψουν, άλλες να παραμείνουν όπως έχουν σε όλη τη διάρκεια της ζωής της γυναίκας και άλλες να μεταπέσουν σε βαρύτερες βλάβες και διηθητικό καρκίνωμα. Είναι δύσκολο να προβλεφθεί η έκβαση κάθε αλλοίωσης, σε γενικές όμως γραμμές φαίνεται ότι οι χαμηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακές βλάβες έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να υποστρέψουν, ενώ οι υψηλού βαθμού είναι πιθανότερο να επιμένουν ή να εξελιχθούν [8,31,33]. Πάντως, τα συστήματα ταξινόμησης των ενδοεπιθηλιακών νεοπλασιών δεν επαρκούν για να προσδιορίσουν τη βιολογική συμπεριφορά αυτών.

Στην παρούσα μελέτη αριθμητικές χρωμοσωματικές ανωμαλίες ανιχνεύθηκαν στο 50% των περιπτώσεων με χαμηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακή βλάβη, στο 66,7% των περιπτώσεων με υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακή βλάβη και στο 89,4% των διηθητικών καρκινωμάτων. Από τις περισσότερες μελέτες προκύπτει ότι η πλοειδία είναι καλός δείκτης κλινικής συμπεριφοράς των ενδοεπιθηλιακών αλλοιώσεων του τραχήλου, αφού οι περισσότερες από τις αλλοιώσεις που επιμένουν ή εξελίσσονται είναι ανευπλοειδείς, ενώ αυτές που υποστρέφουν διπλοειδείς [8,36-38]. Τα αποτελέσματα συμφωνούν με αυτά προηγούμενων κλινικών μελετών εξέλιξης των δυσπλαστικών αλλοιώσεων του τραχήλου της μήτρας. Σύμφωνα με τις τελευταίες το 43% των περιπτώσεων με χαμηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακή βλάβη και το 66% αυτών με υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακή βλάβη επιμένουν ή εξελίσσονται [33].

Η ανάλυση της παρούσας μελέτης έδειξε ότι οι αριθμητικές ανωμαλίες ήταν σημαντικά συχνότερες στα διηθητικά καρκινώματα σε σχέση με τις ενδοεπιθηλιακές βλάβες. Η διαφορά ήταν επίσης σημαντική μεταξύ των χαμηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακών βλαβών και των διηθητικών καρκινωμάτων και οριακή μεταξύ των υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακών βλαβών και των διηθητικών καρκινωμάτων. Επιπλέον, αριθμητικές ανωμαλίες ανιχνεύθηκαν ακόμη και σε κοιλοκύτταρα σε περιπτώσεις επίπεδων κονδυλωμάτων. Τα ανωτέρω ευρήματα υποδεικνύουν ότι η ανευπλοειδία παρατηρείται ήδη από τα αρχόμενα στάδια της καρκινογένεσης του τραχήλου, επάγεται προφανώς από τον ιό HPV και συσχετίζεται με τη βαρύτητα της τραχηλικής βλάβης. Ανάλογα είναι και τα αποτελέσματα άλλων μελετών. Στη μελέτη τραχηλικών επιχρισμάτων με δυσπλαστικές αλλοιώσεις των Christine Mian και συν.[246], στην οποία με τη μέθοδο FISH διερευνήθηκαν αριθμητικές ανωμαλίες των



χρωμοσωμάτων 7, X και 3, ανευπλοειδία παρατηρήθηκε σε 54,8% των περιπτώσεων χαμηλόβαθμων ενδοεπιθηλιακών βλαβών και σε 86,2% των υψηλόβαθμων. Στη μελέτη των Graham DA και συν. [248] ανευπλοειδία παρατηρήθηκε σε 11/25 (44%) περιπτώσεις υψηλόβαθμων ενδοεπιθηλιακών βλαβών και σε 18/25 (72%) περιπτώσεις πλακωδών καρκινωμάτων. Η μελέτη έγινε σε τομές παραφίνης με τη μέθοδο FISH και χρησιμοποιήθηκαν ιχνηθέτες για τα χρωμοσώματα 1, 3, 11, 17 και X. Σε μία πρόσφατη μελέτη [249], η παρουσία τετρασωμίας σε χαμηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις συσχετίστηκε με λοίμωξη από υψηλού και ενδιάμεσου-κινδύνου τύπους HPV, ενώ όλες οι περιπτώσεις στις οποίες παρατηρήθηκε λοίμωξη από χαμηλού κινδύνου τύπους του ιού είχαν φυσιολογικό αριθμό χρωμοσωμάτων. Εντούτοις, υψηλού και ενδιάμεσου-κινδύνου τύποι HPV ανιχνεύθηκαν και σε περιπτώσεις στις οποίες δεν ανευρέθηκαν αριθμητικές χρωμοσωματικές ανωμαλίες. Οι ερευνητές υπέθεσαν ότι οι παρατηρηθείσες αριθμητικές ανωμαλίες εξαρτώνται μάλλον και από άλλους παράγοντες, εκτός της λοίμωξης από ογκογόνους τύπους HPV. Πιθανώς, η επαγωγή ανευπλοειδίας να συσχετίζεται και με το επίπεδο έκφρασης των ιικών ογκοπρωτεϊνών, την παρουσία συγκεκριμένων υποτύπων HPV και την εμμονή της ιικής λοίμωξης, η οποία φαίνεται να αποτελεί σημαντικό παράγοντα προσδιορισμού της εξέλιξης των ενδοεπιθηλιακών αλλοιώσεων του τραχήλου [34]. Η ενεργοποίηση ογκογονιδίων και η απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων, οι διαταραχές ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου, το κάπνισμα και η ανοσοκαταστολή μπορεί επίσης να εμπλέκονται [8,39,113,137].

Ενδιαφέρουσα είναι η παρατήρηση της συσσώρευσης αριθμητικών ανωμαλιών σε μεγαλύτερο αριθμό χρωμοσωμάτων παράλληλα με την αύξηση της βαρύτητας της τραχηλικής βλάβης. Αnevπλοειδία σε περισσότερα από δύο χρωμοσώματα παρατηρήθηκε στο 10% των περιπτώσεων χαμηλόβαθμης ενδοεπιθηλιακής βλάβης, στο 46,7% των περιπτώσεων υψηλόβαθμης βλάβης και στο 55,3% των διηθητικών καρκινωμάτων. Από τη στατιστική ανάλυση προέκυψε ότι η διαφορά ήταν στατιστικά σημαντική μεταξύ των χαμηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακών βλαβών και των διηθητικών καρκινωμάτων και επιπλέον παρατηρήθηκε ασθενής τάση συσχέτισης της ανευπλοειδίας σε περισσότερα των δύο χρωμοσωμάτων με το βαθμό της ενδοεπιθηλιακής βλάβης. Τα αποτελέσματά μας συμφωνούν με αυτά μιας πρόσφατης μελέτης στην οποία παρατηρήθηκε σταδιακή συσσώρευση αριθμητικών ανωμαλιών των κεντροσωμάτων και χρωμοσωμάτων καθώς και αύξηση του ποσοστού των κυττάρων που εμφάνιζαν τις παραπάνω διαταραχές παράλληλα με την αύξηση του βαθμού της ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης και τη διηθητική



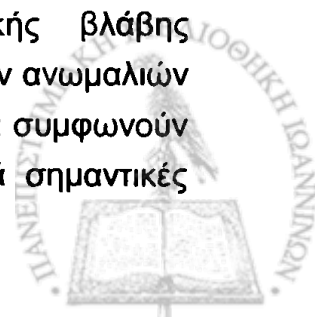
ανάπτυξη [280]. Πιθανώς, οι αριθμητικές ανωμαλίες να σχετίζονται με τη χρονική διάρκεια της HPV λοίμωξης, το ιϊκό φορτίο και το επίπεδο έκφρασης των ιϊκών ογκοπρωτεϊνών. Δεδομένου ότι η ανευπλοειδία ταυτίζεται με γενετική αστάθεια, θεωρείται πιθανότερο ότι όσο μεγαλύτερος αριθμός χρωμοσωμάτων εμφανίζει αριθμητικές ανωμαλίες σε περιπτώσεις ενδοεπιθηλιακής βλάβης τόσο μεγαλύτερη πιθανότητα έχουν να εξελιχθούν.

Επιπρόσθετα, παρατηρήσαμε ότι υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις, οι οποίες συνυπήρχαν παρακείμενες διηθητικών καρκινωμάτων, παρουσίαζαν όμοιες αριθμητικές ανωμαλίες με το διηθητικό καρκίνωμα, σε μικρότερο όμως ποσοστό κυττάρων. Το ίδιο παρατηρήθηκε και σε χαμηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακές βλάβες, οι οποίες συνυπήρχαν σε περιπτώσεις υψηλόβαθμης ενδοεπιθηλιακής βλάβης. Τα παραπάνω ευρήματα συνηγορούν υπέρ της άποψης ότι η διαδικασία της τραχηλικής καρκινογένεσης είναι μονοκλωνική και πολυσταδιακή. Βεβαίως, δεν αποκλείεται η περίπτωση της *de novo* ανάπτυξης διηθητικού καρκινώματος.

Από τα αποτελέσματα καταδεικνύεται ότι τόσο στις ενδοεπιθηλιακές βλάβες όσο και στα διηθητικά καρκινώματα του τραχήλου η ανευπλοειδία του χρωμοσώματος 3 ήταν η συχνότερη από τις μελετηθείσες χρωμοσωματικές ανωμαλίες και επιπλέον ανιχνεύθηκε σε όλες τις περιπτώσεις χαμηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακής βλάβης στις οποίες παρατηρήθηκε ανευπλοειδία. Στο χρωμόσωμα 3 έχουν παρατηρηθεί συχνά γενετικές ανωμαλίες τόσο σε προκαρκινωμάτωσης αλλοιώσεις όσο και σε διηθητικά καρκινώματα του τραχήλου [115,235,242-249]. Αυτές πιθανώς να σχετίζονται με το γεγονός ότι ο ιός HPV ενσωματώνεται συχνά στο συγκεκριμένο χρωμόσωμα, στην εύθραυστη θέση FRA3B [115,281].

Σε όλες τις ανευπλοειδείς περιπτώσεις ενδοεπιθηλιακής βλάβης και στο μεγαλύτερο ποσοστό διηθητικών καρκινωμάτων που εμφάνιζαν αριθμητικές ανωμαλίες παρατηρήθηκε πολυσωμία. Μονοσωμία των χρωμοσωμάτων 17, 8 και 7 ανευρέθηκε μόνο σε 4,3%, 2,1% και 2,1% των διηθητικών καρκινωμάτων αντίστοιχα, ενώ σε καμία περίπτωση δεν παρατηρήθηκε μονοσωμία του χρωμοσώματος 3. Σύμφωνα και με άλλες μελέτες η ανευπλοειδία, τόσο σε δυσπλαστικές αλλοιώσεις όσο και σε διηθητικά καρκινώματα του τραχήλου, φαίνεται ότι οφείλεται κυρίως σε αύξηση του αριθμού ορισμένων χρωμοσωμάτων [115,235,242-249].

Αυξανόμενου του βαθμού βαρύτητας της τραχηλικής βλάβης παρατηρήθηκε σταδιακή αύξηση της συχνότητας των αριθμητικών ανωμαλιών όλων των μελετηθέντων χρωμοσωμάτων. Τα ανωτέρω ευρήματα συμφωνούν με τα αποτελέσματα άλλων μελετών [246,248,249]. Στατιστικά σημαντικές



διαφορές προέκυψαν μόνο κατά τη σύγκριση της ανευπλοειδίας των χρωμοσωμάτων 17 και 8 μεταξύ των αλλοιώσεων ενδοεπιθηλιακής βλάβης και των διηθητικών καρκινωμάτων. Επιπλέον, οι διαφορές για τα συγκεκριμένα χρωμοσώματα αναδείχθηκαν σημαντικές μεταξύ των χαμηλόβαθμων ενδοεπιθηλιακών βλαβών και των διηθητικών καρκινωμάτων και όχι μεταξύ των υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακών βλαβών και των διηθητικών καρκινωμάτων. Επίσης, παρατηρήθηκε ασθενής τάση συσχέτισης της ανευπλοειδίας των χρωμοσωμάτων 17 και 8 με το βαθμό της ενδοεπιθηλιακής βλάβης. Με βάση τα ανωτέρω, θεωρείται πιθανότερο ότι η ανευπλοειδία των χρωμοσωμάτων 17 και 8 σχετίζεται με την εξέλιξη των αλλοιώσεων ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας. Μελλοντικά, ίσως να μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης βιολογικής συμπεριφοράς των χαμηλόβαθμων ενδοεπιθηλιακών βλαβών.

Η μη ανεύρεση στατιστικά σημαντικών διαφορών μεταξύ των υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακών βλαβών και των διηθητικών καρκινωμάτων είναι πιθανότερο να σχετίζεται με την νεοπλασματική φύση των περισσότερων υψηλόβαθμων ενδοεπιθηλιακών βλαβών. Τα αποτελέσματά μας συμφωνούν με την ευρέως αποδεκτή μέχρι σήμερα άποψη, ότι η ανευπλοειδία αποτελεί πρώιμο γεγονός στη διαδικασία της καρκινογένεσης που συνοδεύεται από γενετική αστάθεια και στη συνέχεια συσσωρεύονται ειδικές γονιδιακές μεταλλάξεις [115,220]. Πιθανώς, ο ρόλος της ανευπλοειδίας να είναι ουσιαστικός για τη μετάπτωση των χαμηλόβαθμων ενδοεπιθηλιακών βλαβών σε υψηλόβαθμες ενώ, για τη μετάπτωση των υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακών βλαβών σε διηθητικό καρκίνωμα απαιτείται επιπλέον και η συσσώρευση μεταλλάξεων διαφόρων γονιδίων.

Κατά τη συγκριτική μελέτη των αριθμητικών ανωμαλιών μεταξύ των διαφόρων τύπων καρκινωμάτων παρατηρήθηκε ότι τα αδеноπλακώδη εμφάνιζαν παρόμοιες ανωμαλίες με τα πλακώδη καρκινώματα, ενώ σημαντικές διαφορές προέκυψαν μεταξύ των πρώτων και των αδενοκαρκινωμάτων. Αναλυτικότερα, τα αδеноπλακώδη καρκινώματα παρουσίαζαν σημαντικά συχνότερα ανευπλοειδία των χρωμοσωμάτων 3, 8 και 7 καθώς και συσσώρευση αριθμητικών ανωμαλιών σε περισσότερα από δύο ή και σε όλα τα χρωμοσώματα σε σχέση με τα αδενοκαρκινώματα. Οι διαφορές ήταν μικρότερες μεταξύ των αδενοκαρκινωμάτων και των πλακωδών καρκινωμάτων και αφορούσαν τα χρωμοσώματα 3 και 7 καθώς και την ταυτόχρονη ανευπλοειδία σε περισσότερα από δύο χρωμοσώματα. Η μόνη σημαντική διαφορά που παρατηρήθηκε μεταξύ των πλακωδών και αδενοπλακωδών καρκινωμάτων αφορούσε στην ανευπλοειδία σε



περισσότερα από δύο χρωμοσώματα. Οι ομοιότητες που παρατηρήθηκαν ανάμεσα στα πλακώδη και αδеноπλακώδη καρκινώματα πιθανώς να σχετίζονται με το γεγονός ότι οι επιδημιολογικοί παράγοντες κινδύνου των αδеноπλακωδών καρκινωμάτων ομοιάζουν περισσότερο με αυτούς των πλακωδών καρκινωμάτων παρά των αδеноκαρκινωμάτων. Επιπλέον, από τα αποτελέσματα διαπιστώθηκε ότι τα αδеноκαρκινώματα παρουσίαζαν μικρότερη γενετική αστάθεια σε σχέση με τους υπόλοιπους τύπους καρκινωμάτων του τραχήλου. Βέβαια, στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκαν οι αριθμητικές ανωμαλίες μόνο τεσσάρων από τα 24 χρωμοσώματα. Πιθανόν στα αδеноκαρκινώματα να υπάρχουν αριθμητικές ανωμαλίες σε άλλα εκτός των μελετηθέντων χρωμοσωμάτων. Ανάλογες μελέτες συσχέτισης των αριθμητικών ανωμαλιών με τον ιστολογικό τύπο των καρκινωμάτων του τραχήλου δεν προκύπτουν από τη διεθνή βιβλιογραφία.

Ενίσχυση του γονιδίου c-erbB-2 παρατηρήθηκε σε ποσοστό 21,2% των διηθητικών καρκινωμάτων, ενώ υπερέκφραση της πρωτεΐνης ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 8,5% αυτών. Οι διαφορές που προέκυψαν μεταξύ της ενίσχυσης του γονιδίου και της υπερέκφρασης της πρωτεΐνης πιθανώς να σχετίζονται με το επίπεδο της γονιδιακής ενίσχυσης, το οποίο ήταν συνήθως χαμηλό (< 10 αντίγραφα). Η άποψη αυτή ενισχύεται και από τα αποτελέσματα προηγούμενης μελέτης του εργαστηρίου μας [273]. Στην τελευταία, στην οποία εφαρμόστηκαν οι ίδιες μέθοδοι και χρησιμοποιήθηκαν τα ίδια αντισώματα και ιχνηθέτες, παρατηρήθηκε ότι τα 2 από τα 6 αδеноκαρκινώματα μαστού, στα οποία ανιχνεύθηκε ενίσχυση του c-erbB-2, ανοσοϊστοχημικά δεν εμφάνιζαν υπερέκφραση της πρωτεΐνης. Σε αμφότερες τις περιπτώσεις το επίπεδο ενίσχυσης του γονιδίου ήταν χαμηλό. Παρόμοια ήταν και τα αποτελέσματα πρόσφατης μελέτης από άλλους ερευνητές σε καρκινώματα του μαστού [275]. Στην τελευταία ανιχνεύθηκε ανοσοϊστοχημικά η υπερέκφραση της πρωτεΐνης c-erbB-2 με την εφαρμογή του ίδιου αντισώματος που χρησιμοποιήθηκε και στη δική μας μελέτη και αυτή συγκρίθηκε με την ενίσχυση του γονιδίου, η οποία ανιχνεύθηκε με τη μέθοδο του φθορίζοντος *in situ* υβριδισμού. Σε δύο περιπτώσεις, στις οποίες βρέθηκε χαμηλού επιπέδου γονιδιακή ενίσχυση (6-7 αντίγραφα) δεν παρατηρήθηκε υπερέκφραση της πρωτεΐνης. Επιπλέον, σε καμία περίπτωση δεν ανιχνεύθηκε υπερέκφραση της πρωτεΐνης χωρίς να συνυπάρχει ενίσχυση του γονιδίου.

Η δυνατότητα θεραπευτικής παρέμβασης με αντι-p185^{HER2} μονοκλωνικά αντισώματα σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνωμα μαστού, κατέστησε έντονη την ανάγκη επιλογής της καταλληλότερης μεθόδου για την εκτίμηση του c-erbB-2 και του προσδιορισμού κριτηρίων θετικότητας [275,276,282,283].



Καλύτερη μέθοδος θεωρείται η ανοσοϊστοχημική που εφαρμόζεται σε τομές κρουστάτη [182]. Η μέθοδος όμως αυτή είναι πρακτικά αδύνατο να εφαρμοσθεί λόγω του ότι το υλικό είναι συνήθως μονιμοποιημένο σε φορμόλη και εγκλεισμένο σε παραφίνη. Η ανοσοϊστοχημική μέθοδος μπορεί να εφαρμοσθεί εύκολα σε ιστολογικές τομές παραφίνης αλλά η μονιμοποίηση ελαττώνει την αντιγονικότητα του ιστού. Επιπλέον, υπάρχουν προβλήματα που αφορούν την ευαισθησία και ειδικότητα των χρησιμοποιούμενων αντισωμάτων και η επιλογή του καταλληλότερου ερευνάται ακόμη. Η μέθοδος του φθορίζοντος *in situ* υβριδισμού πλεονεκτεί έναντι των άλλων μεθόδων διότι συνδυάζει υψηλή ευαισθησία, ειδικότητα και αναπαραγωγιμότητα. Επιπλέον, θεωρείται ως η μέθοδος εκλογής για την εκτίμηση του c-erbB-2 σε καρκινώματα μαστού που εμφανίζουν μέτριας ή χαμηλής έντασης ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης [276].

Ενίσχυση του γονιδίου c-erbB-2 παρατηρήθηκε σε ποσοστό 30% των αδενοκαρκινωμάτων, 28,6% των αδenoπλακωδών καρκινωμάτων και σε μικρότερο ποσοστό (16,7%) των πλακωδών καρκινωμάτων. Τα αποτελέσματά μας συμφωνούν με αυτά της μελέτης του Mitra και συν. [225], στην οποία ενίσχυση του γονιδίου c-erbB-2 παρατηρήθηκε σε 7/50 (14%) πλακώδη καρκινώματα τραχήλου και της μελέτης του Kihana και συν.[97], στην οποία γονιδιακή ενίσχυση ανιχνεύθηκε σε 11/44 (25%) αδενοκαρκινώματα. Αντίθετα, τα ευρήματα της δικής μας μελέτης και των ανωτέρω αναφερομένων μελετών δεν συμφωνούν με αυτά μιας πρόσφατης μελέτης στην οποία όμως εξετάσθηκε μικρός αριθμός περιστατικών [226]. Στην τελευταία, ενίσχυση του c-erbB-2 παρατηρήθηκε μόνο σε 2/5 αδενοκαρκινώματα και σε καμία από τις 18 περιπτώσεις καρκινωμάτων εκ πλακωδών κυττάρων. Οι διαφορές θα μπορούσαν κυρίως να αποδοθούν στο μικρό αριθμό των περιπτώσεων, που μελετήθηκαν.

Από τα αποτελέσματά μας προκύπτει ότι τα αδenoπλακώδη καρκινώματα παρουσιάζουν ενίσχυση του γονιδίου c-erbB-2 στο ίδιο περίπου ποσοστό με τα αδenoκαρκινώματα, εύρημα το οποίο πιθανώς να σχετίζεται με την αδενική διαφοροποίηση, και αριθμητικές ανωμαλίες παρόμοιες με αυτές των πλακωδών καρκινωμάτων. Αυτά χαρακτηρίστηκαν από μεγαλύτερη γενετική αστάθεια και εμφάνιζαν σε σχετικά μεγάλο ποσοστό ενίσχυση του γονιδίου c-erbB-2, το οποίο θεωρείται ως δείκτης επιθετικότητας. Ο συνδυασμός αυτών των κυτταρογενετικών ανωμαλιών ίσως να σχετίζεται με την πρόγνυσή τους που είναι χειρότερη από αυτή των υπολοίπων τύπων καρκινωμάτων του τραχήλου [53,99, 100].



Υπερέκφραση της πρωτεΐνης c-erbB-2 παρατηρήθηκε σε 2/30 (6,7%) πλακώδη καρκινώματα, σε 1/10 (10%) αδеноκαρκινώματα και σε 1/7 (14,3%) αδеноπλακώδη καρκινώματα. Η υπερέκφραση της πρωτεΐνης c-erbB-2 σε καρκινώματα του τραχήλου της μήτρας έχει μελετηθεί πολύ περισσότερο από ότι η ενίσχυση του γονιδίου, τα αποτελέσματα όμως των μελετών είναι διαφορετικά [88-90,96-98,220-228]. Οι διαφορές οφείλονται πιθανόν στη χρήση διαφορετικών αντισωμάτων, στους διαφορετικούς τρόπους μονιμοποίησης των υλικών και στην ανάλυση μικρού σχετικά αριθμού περιπτώσεων, διαφορετικών σταδίων στις περισσότερες από αυτές. Επιπλέον, είναι ευρέως αποδεκτό ότι η εκτίμηση της μεμβρανικής χρώσης, ιδιαίτερα στις περιπτώσεις με μικρή χρωστική ένταση, είναι υποκειμενική και μη αναπαραγώγιμη, λόγω του ότι συνήθως έχουμε ταυτόχρονα και κυτταροπλασματική χρώση .

Στο μορφολογικά φυσιολογικό επιθήλιο και στις αμιγείς πλακώδεις ενδοεπιθηλιακές βλάβες δεν ανιχνεύθηκε ενίσχυση του γονιδίου c-erbB-2 ή υπερέκφραση της p185. Γονιδιακή ενίσχυση και υπερέκφραση της πρωτεΐνης παρατηρήθηκε σε μία μόνο υψηλόβαθμη ενδοεπιθηλιακή βλάβη, η οποία συνυπήρχε παρακείμενα διηθητικού καρκινώματος, γεγονός το οποίο συνηγορεί υπέρ της άποψης ότι η ενίσχυση του γονιδίου c-erbB-2 αποτελεί σημαντική γενετική παρεκτροπή, η οποία σχετίζεται με τη μετάπτωση των υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακών βλαβών σε διηθητικό καρκίνωμα. Επιπλέον, η μη ανεύρεση ενίσχυσης του γονιδίου σε όλες τις περιπτώσεις αμιγούς ενδοεπιθηλιακής βλάβης, συμφωνεί με την υπόθεση ότι στην πολυσταδιακή διαδικασία της τραχηλικής καρκινογένεσης προηγείται η ανευπλοειδία και στη συνέχεια συσσωρεύονται γονιδιακές μεταλλάξεις [242].



ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Στην παρούσα μελέτη, εφαρμόζοντας την τεχνική του φθορίζοντος *in situ* υβριδισμού (FISH), εκτιμήθηκαν ταυτόχρονα στις ίδιες τομές αλλοιώσεις διαφόρων σταδίων καρκινογένεσης στον τράχηλο της μήτρας. Απ' όσο είμαστε σε θέση να γνωρίζουμε, μετά από την ανασκόπηση της διεθνούς βιβλιογραφίας, μέχρι τώρα δεν έχει δημοσιευθεί άλλη παρόμοια μελέτη.
- Η τεχνική FISH εφαρμόσθηκε με επιτυχία για πρώτη φορά στο Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής του Π.Π.Γ.Ν. Ιωαννίνων. Η εφαρμογή της μεθόδου σε ιστολογικές τομές παραφίνης επέτρεψε τον προσδιορισμό γενετικών μεταβολών σε μονήρες κυτταρικό επίπεδο, ακόμη και σε αλλοιώσεις που καταλάμβαναν μικρή έκταση και ως εκ τούτου δεν μπορούσαν να αναλυθούν με άλλες μοριακές τεχνικές. Επιπλέον, η διατήρηση της μορφολογίας του ιστού διευκόλυνε τον εντοπισμό και την ταυτόχρονη εκτίμηση στην ίδια ιστολογική τομή περισσοτέρων της μίας αλλοιώσεων.
- Η ανευπλοειδία αποτελεί πρώιμο γεγονός στη διαδικασία της τραχηλικής καρκινογένεσης, που προφανώς επάγεται από τον ιό HPV.
- Τα συστήματα ταξινόμησης των ενδοεπιθηλιακών νεοπλασιών δεν επαρκούν για να προσδιορίσουν τη βιολογική συμπεριφορά αυτών. Η ανίχνευση ανευπλοειδίας σε ποσοστά των ενδοεπιθηλιακών βλαβών παρόμοια με αυτά που από τις μελέτες Φυσικής Ιστορίας και εξέλιξης των δυσπλαστικών αλλοιώσεων του τραχήλου προκύπτουν να επιμένουν ή εξελίσσονται, υποδηλώνει ότι μπορεί μελλοντικά να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης βιολογικής συμπεριφοράς αυτών.
- Αυξανόμενου του βαθμού βαρύτητας της τραχηλικής βλάβης παρατηρήθηκε αύξηση της συχνότητας των αριθμητικών ανωμαλιών των χρωμοσωμάτων 3, 17, 8 και 7, συσσώρευση ανωμαλιών σε περισσότερα του ενός χρωμοσώματα και αύξηση του ποσοστού των ανευσωμικών κυτάρων. Οι διαφορές αναδείχθηκαν σημαντικές μεταξύ των χαμηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακών βλαβών και των διηθητικών καρκινωμάτων και όχι μεταξύ των υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακών βλαβών και των καρκινωμάτων. Πιθανώς, ο ρόλος της ανευπλοειδίας να είναι ουσιαστικός για τη μετάπτωση των χαμηλόβαθμων ενδοεπιθηλιακών βλαβών σε υψηλόβαθμες, ενώ για τη μετάπτωση των υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακών βλαβών σε διηθητικό καρκίνωμα απαιτείται επιπλέον η συσσώρευση μεταλλάξεων διαφόρων γονιδίων.
- Η ανευπλοειδία των χρωμοσωμάτων 17 και 8 συσχετίσθηκε με το βαθμό της ενδοεπιθηλιακής βλάβης και ήταν σημαντικά συχνότερη στα διηθητικά



καρκινώματα σε σχέση με τις ενδοεπιθηλιακές βλάβες, γεγονός το οποίο υποδηλώνει πιθανή εμπλοκή τους στην εξέλιξη των χαμηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακών βλαβών.

- Υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις, οι οποίες συνυπήρχαν παρακείμενα διηθητικών καρκινωμάτων παρουσίαζαν όμοιες αριθμητικές ανωμαλίες με το διηθητικό καρκίνωμα, σε μικρότερο όμως ποσοστό κυττάρων. Το ίδιο παρατηρήθηκε και σε χαμηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακές βλάβες, οι οποίες συνυπήρχαν σε περιπτώσεις υψηλόβαθμης ενδοεπιθηλιακής βλάβης. Τα ευρήματα συνηγορούν υπέρ της άποψης ότι η διαδικασία της τραχηλικής καρκινογένεσης είναι μονοκλωνική και πολυσταδιακή.
- Ενίσχυση του γονιδίου c-erbB-2 παρατηρήθηκε στο 21,2% των διηθητικών καρκινωμάτων, ενώ υπερέκφραση της πρωτεΐνης στο 8,5% αυτών. Η μέθοδος FISH πλεονεκτεί έναντι της ανοσοϊστοχημείας για την εκτίμηση του c-erbB-2.
- Γονιδιακή ενίσχυση παρατηρήθηκε συχνότερα στα υψηλού παρά στα μέτριου και χαμηλού βαθμού κακοηθείας καρκινώματα, ενώ η υπερέκφραση της πρωτεΐνης δε συσχετίστηκε με το βαθμό κακοηθείας.
- Στο μορφολογικά φυσιολογικό επιθήλιο και στις αμιγείς πλακώδεις ενδοεπιθηλιακές βλάβες δεν ανιχνεύθηκε ενίσχυση του γονιδίου c-erbB-2 ή υπερέκφραση της p185. Γονιδιακή ενίσχυση και υπερέκφραση της πρωτεΐνης παρατηρήθηκε σε υψηλόβαθμη ενδοεπιθηλιακή βλάβη ή οποία συνυπήρχε παρακείμενα διηθητικού καρκινώματος. Πιθανώς, η ενίσχυση του γονιδίου c-erbB-2 να αποτελεί σημαντική γενετική παρεκτροπή, η οποία σχετίζεται με τη μετάπτωση των υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακών βλαβών σε διηθητικό καρκίνωμα.
- Τα αδеноπλακώδη καρκινώματα παρουσίαζαν αριθμητικές ανωμαλίες παρόμοιες με αυτές των πλακωδών καρκινωμάτων και χαρακτηρίστηκαν από μεγαλύτερη γενετική αστάθεια. Επιπλέον εμφάνιζαν ενίσχυση του γονιδίου c-erbB-2 σε μεγάλο ποσοστό, όμοιο με αυτό των αδenoκαρκινωμάτων. Ο συνδυασμός αυτών των κυτταρογενετικών ανωμαλιών ίσως να σχετίζεται με την πρόγνυσή τους που είναι χειρότερη από αυτή των υπολοίπων τύπων καρκινωμάτων του τραχήλου.



ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα μελέτη αναλύσαμε, με την τεχνική του φθορίζοντος *in situ* υβριδισμού (FISH), τις αριθμητικές ανωμαλίες των χρωμοσωμάτων 3, 7, 8 και 17, καθώς και την ενίσχυση του ογκογονιδίου *c-erbB-2* σε προκαρκινωμάτωσης αλλοιώσεις και καρκινώματα τραχήλου μήτρας. Επιπλέον, ανιχνεύσαμε ανοσοϊστοχημικά την υπερέκφραση της πρωτεΐνης του ογκογονιδίου *c-erbB-2*.

Μελετήθηκαν ιστολογικές τομές παραφίνης από 10 περιπτώσεις μορφολογικά φυσιολογικού τραχηλικού επιθηλίου, 25 περιπτώσεις πλακώδους ενδοεπιθηλιακής βλάβης [10 LgSIL, 15 HgSIL] και 47 περιπτώσεις καρκινωμάτων του τραχήλου της μήτρας [30 πλακώδη (28 διηθητικά, 2 μικροδιηθητικά), 10 αδenoκαρκινώματα, 7 αδenoπλακώδη]. Επιπλέον, στις περιπτώσεις στις οποίες συνυπήρχαν διαφορετικής βαρύτητας αλλοιώσεις, αυτές εκτιμήθηκαν επιπρόσθετα.

Αριθμητικές χρωμοσωματικές ανωμαλίες δεν παρατηρήθηκαν στο μορφολογικά φυσιολογικό τραχηλικό επιθήλιο. Ανευπλοειδία ανιχνεύθηκε στο 50% των περιπτώσεων χαμηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακής βλάβης, στο 66,7% των περιπτώσεων υψηλόβαθμης ενδοεπιθηλιακής βλάβης και στο 89,4% των διηθητικών καρκινωμάτων. Αυξανόμενη της βαρύτητας της τραχηλικής βλάβης παρατηρήθηκε σταδιακή αύξηση των αριθμητικών ανωμαλιών.

Η ανευπλοειδία του χρωμοσώματος 3 ήταν η συχνότερη ανωμαλία. Η ανευπλοειδία των χρωμοσωμάτων 17 και 8 συσχετίστηκε ασθενώς με το βαθμό της ενδοεπιθηλιακής βλάβης και ήταν στατιστικά σημαντικά συχνότερη στα διηθητικά καρκινώματα σε σχέση με τις ενδοεπιθηλιακές βλάβες.

Υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακές βλάβες, παρακείμενες διηθητικών καρκινωμάτων, παρουσίαζαν όμοιες αριθμητικές ανωμαλίες με το διηθητικό καρκίνωμα, σε μικρότερο όμως ποσοστό κυττάρων. Το ίδιο παρατηρήθηκε και σε χαμηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακές βλάβες, οι οποίες συνυπήρχαν σε περιπτώσεις υψηλόβαθμης ενδοεπιθηλιακής βλάβης.

Κατά τη συγκριτική μελέτη των αριθμητικών χρωμοσωματικών ανωμαλιών μεταξύ των διαφόρων τύπων καρκινωμάτων παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των αδenoπλακωδών καρκινωμάτων και των αδenoκαρκινωμάτων, ενώ τα αδenoπλακώδη εμφάνιζαν παρόμοιες αριθμητικές ανωμαλίες με τα πλακώδη καρκινώματα.

Ενίσχυση του γονιδίου *c-erbB-2* παρατηρήθηκε στο 21,2% των διηθητικών καρκινωμάτων. Αναλυτικότερα, γονιδιακή ενίσχυση παρατηρήθηκε



στο ίδιο περίπου ποσοστό αδενοκαρκινωμάτων και αδenoπλακωδών καρκινωμάτων (30% και 28,6% αντίστοιχα) και σε μικρότερο ποσοστό (16,7%) των πλακωδών καρκινωμάτων. Υπερέκφραση της πρωτεΐνης c-erbB-2 ανιχνεύθηκε στο 8,5% των διηθητικών καρκινωμάτων. Σε όλες τις περιπτώσεις στις οποίες ανιχνεύθηκε υπερέκφραση της πρωτεΐνης παρατηρήθηκε και γονιδιακή ενίσχυση.

Στο μορφολογικά φυσιολογικό τραχηλικό επιθήλιο και στις αμιγείς πλακώδεις ενδοεπιθηλιακές βλάβες δεν ανιχνεύθηκε ενίσχυση του γονιδίου c-erbB-2 ή υπερέκφραση της πρωτεΐνης. Γονιδιακή ενίσχυση και υπερέκφραση της πρωτεΐνης c-erbB-2 παρατηρήθηκε σε μία μόνο υψηλόβαθμη ενδοεπιθηλιακή βλάβη, παρακείμενη διηθητικού καρκινώματος.

Τα αποτελέσματά μας υποδηλώνουν την πιθανή εμπλοκή της ανευπλοειδίας, κυρίως των χρωμοσωμάτων 17 και 8, στην εξέλιξη των χαμηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακών βλαβών. Η ενίσχυση του γονιδίου c-erbB-2 φαίνεται να αποτελεί σημαντική γενετική παρεκτροπή, η οποία σχετίζεται με τη μετάπτωση των υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακών βλαβών σε διηθητικό καρκίνωμα.



Summary

Molecular analysis of the c-erbB-2 oncogene and of numerical chromosomal abnormalities in cervical lesions

Sevasti A. Kamina

In the present study we investigated the numerical abnormalities of chromosomes 3, 7, 8 and 17 and the amplification of the c-erbB-2 oncogene, in precancerous lesions and invasive carcinomas of the cervix, using fluorescence in situ hybridization (FISH). We studied, also, the overexpression of the c-erbB-2 oncoprotein by immunohistochemistry.

Formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections from 10 cases of morphologically normal cervical epithelium, 25 squamous intraepithelial lesions [10 LgSIL, 15HgSIL] and 47 invasive carcinomas [30 squamous (28 invasive, 2 microinvasive), 10 adenocarcinomas, 7 adenosquamous] were studied. Moreover, coexistent of different severity lesions were analysed additionally.

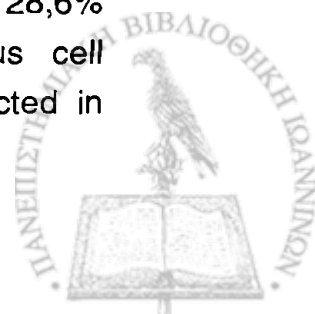
Morphologically normal cervical epithelium did not show numerical abnormalities for any of the investigated chromosomes. Chromosomal aneuploidy was detected in 50% of LgSIL cases, 66,7% of HgSIL cases and 89,4% of invasive carcinomas. Numerical abnormalities increased with advancing severity of the cervical lesion.

Aneuploidy of chromosome 3 was the most frequent aberration. Aneuploidy of chromosomes 17 and 8 was correlated with the grade of the intraepithelial lesion and it was statistically significantly more frequent in invasive carcinomas than in intraepithelial lesions.

HgSIL, adjacent to invasive carcinomas, showed the same numerical aberrations as the invasive carcinomas, but in a smaller percentage of cells. The same was found in LgSIL which coexisted with HgSIL.

Numerical abnormalities were significantly different between adenocarcinomas and adenosquamous carcinomas, while the later showed similar abnormalities to squamous cell carcinomas.

Amplification of the c-erbB-2 oncogene was detected in 21,2% of invasive carcinomas. Gene amplification was found in a similar percentage of adenocarcinomas and adenosquamous carcinomas (30% and 28,6% respectively), and in a smaller percentage (16,7%) of squamous cell carcinomas. Overexpression of the c-erbB-2 oncoprotein was detected in



8,5% of invasive carcinomas. All cases that overexpressed c-erbB-2 protein showed gene amplification.

Morphologically normal cervical epithelium and pure SIL cases did not show amplification of the c-erbB-2 oncogene or overexpression of the protein. Gene amplification and protein overexpression was found only in a HgSIL adjacent to invasive carcinoma.

Our results suggest the possible implication of the aneuploidy, particularly of chromosomes 17 and 8, in the progression of LgSIL. The amplification of the c-erbB-2 oncogene seems to be an important genetic aberration at the transition from HgSIL to invasive cervical carcinoma.

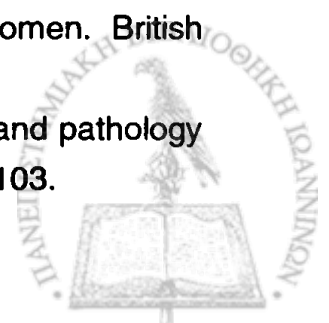


ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Σάββας Α. Επίτομη Ανατομική του Ανθρώπου. Τόμος Α, Θεσσαλονίκη, 1985.
2. Moore K. Βασική Εμβρυολογία και συγγενείς ανωμαλίες, Αθήνα, 1978.
3. Sternberg S.S. Histology for Pathologist. Raven Press L.t.d. New York, 1992.
4. Ferenczy A, Wright T. Anatomy and Histology of the cervix. Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract. Edited by Kurman RJ. New York, Springer- Verlag, 1994, 185- 200.
5. Fluhman CF. The cervix uteri and its diseases. Philadelphia, WB Saunders, 1961.
6. Williams J. Cancer of the uterus: Harveian Lectures for 1886. H.K. Lewis, London, 1888.
7. Broders AC. Carcinoma in situ contrasted with benign penetrating epithelium. JAMA1932; 99: 1670-74.
8. Wright T, Kurman R, Ferenczy A. Precancerous lesions of the cervix. Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract. Edited by Kurman RJ. New York, Springer- Verlag, 1994, 229-277.
9. Reagan JW, Hanomic MJ. The cellular pathology in carcinoma in situ; a cytohistopathological correlation. Cancer 1956; 9: 385.
10. Richart RM. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia. Clin Obstet Gynecol 1968; 10: 748-84.
11. Richart RM. Cervical intraepithelial neoplasia : A review. In Sommers SC(eds) Pathology Annual. East Norwalk, CT, Appleton-Century-Crofts, 1973: 301-28.
12. Richart RM. A modified terminology for cervical intraepithelial neoplasia. Obstet Gynecology 1990; 75: 131-133.
13. National Cancer Institute Workshop. The 1988 Bethesda system for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses. JAMA 1989; 262: 931-34.
14. Luff RD. The Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses: Report of the 1991 Bethesda Workshop. Human Pathology 1992; 23: 719-721.
15. Ezra D, Baithun SI, Dodd SM, Brown CL. Ethnic factors in the pathology of the uterine cervix cervical screening: a population at variance with national targets. Cytopathology 2000; 11(6): 480-7.



16. Bamford PN, Barber M, Beilby JOW. Changing patterns of cervical intraepithelial neoplasia seen in a family planning Clinic. *Lancet* 1982; i :747-827.
17. Sadeghi SB, Hsie EW, Gunn SW. Prevalence of cervical intraepithelial neoplasia in sexually active teenagers and young adults. *Am J Obstet Gynecol* 1984; 148: 726.
18. Dillner J. Trends over time in the incidence of cervical neoplasia in comparison to trends over time in human papillomavirus infection. *J Clin Virology* 2000 19(1-2): 7-23.
19. Moscicki AB, Hillis N, Shiboski S, Powell K, Jay N, Hanson E, Miller S, Clayton L, Farhat S, Broering J, Darragh T, Palefsky J. Risks for incident human papillomavirus infection and low grade squamous intraepithelial lesion development in young females. *JAMA* 2001 285(23): 2995-3002.
20. Arends MJ, Benton EC, Mc Laren KM, Stark LA, Hunter JA, Bird CC. Renal allograft recipients with susceptibility to cutaneous malignancy have an increased prevalence of human papillomavirus DNA in skin tumours and a greater risk of anogenital malignancy. *British Journal of Cancer* 1997; 75:722-728.
21. Khare S, Tang S-C, Pater MM, et al. Cofactors with HPV in infection and oncogenesis. In: Lacey C, ed. *Papillomavirus reviews: current research on papillomaviruses*. Leeds: Leeds University Press, 1996: 239 -46.
22. Benton EC, Arends MJ. Human papillomavirus in the immunosuppressed. In: Lacey C, ed. *Papillomavirus reviews: current research on papillomaviruses*. Leeds: Leeds University Press, 1996: 271-9.
23. Luesley D, Blomfield P, Dunn J, Shafi M, Chenoy R, Buxton J. Cigarette smoking and histological outcome in women with mildly dyskaryotic cervical smears. *British Journal Obstet. Gynaecol.* 1994; 101: 49-52.
24. Sasson IM, Haley NJ, Hoffmann D, Wynder EL, Hellberg D, Nilsson S. Cigarette smoking and neoplasia of the uterine cervix: smoke constituents in cervical mucus. *New England Journal of Medicine* 1985: 312:315
25. Ali S, Astley Sb, Sheldon TA, Peel KR, Wells M. Detection and measurement of DNA adducts in the cervix of smokers and non-smokers. *International Journal Gynecol Cancer* 1994; 4:188-93.
26. Parazzini F, Chatenoud L, Vecchia C, Negri E, Franceschi S and Bolis G. Determinants of risk of invasive cervical cancer in young women. *British Journal of Cancer* 1998; 77(5): 838-41.
27. Arends MJ, Buckley CH, Wells M. Aetiology, pathogenesis, and pathology of cervical neoplasia. *Journal of Clinical Pathology* 1998; 51:96-103.



28. Malamou-Mitsi V, Paraskevaïdis E. Human papillomavirus infection and cervical neoplasia. " Ioannina experience". Journal of BUON 2001; 6: 365-370.
29. Zehbe I, Wilander E. Human papilloma virus infection and invasive cervical neoplasia: a study of prevalence and morphology. Journal of Pathology 1997; 181: 270-5.
30. Zur Hausen H. Human papillomaviruses in the pathogenesis of anogenital cancer. Virology 1991;184: 9-13.
31. Woodman CBJ, Rollason T, Ellis J, Tierney R, Wilson S and Young L. Human papillomavirus infection and risk of progression of epithelial abnormalities of the cervix. British Journal of Cancer 1996; 73; 553-556.
32. Walboomers J, Jacobs M, Manos M, Bosch F, Kummer J, Shah K, Snijders P, Peto J, Meijer C and Munoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. Journal of Pathology 1999; 189: 112-9.
33. Schiffman M, Brinton L. The epidemiology of cervical carcinogenesis. Cancer 1995; 76:1888-901.
34. Nobbenhuis M, Walboomers J, Helmerhorst T, Rozental L, Remmink A, Risse E, Linden H, Voorhost F, Kenemans P, Meijer C. Relation of human papillomavirus status to cervical lesions and consequences for cervical cancer screening: a prospective study. Lancet 1999; 354: 20-25.
35. Paraskevaïdis E, Kaponis A, Malamou-Mitsi V, Davidson AJ, Hirsch PM, Koliopoulos G, Pappa L, Zikopoulos K, Paschopoulos M, Lolis E and Agnantis NJ. The Natural History of HPV Infection of the Uterine Cervix. Long-term Observational and Histological Data. Anticancer Research 2002; in press.
36. Melsheimer P, Klaes R, Doeberitz MV, Bastert G. Prospective clinical study comparing DNA flow cytometry and HPV typing as predictive tests for persistence and progression of CIN I / II. Cytometry 2001 Jun 15; 46(3): 166-171.
37. Lorenzato M, Clavel C, Masure M, Nou JM, Bouttens D, Evrard G, Bory JP, Maugard B, Quereux C, Birembaut P. DNA image cytometry and human papillomavirus (HPV) detection help select smears at high risk of high grade cervical lesions. Journal of Pathology 2001 Jun; 194(2): 171-6.
38. Kashyap V, Das BC. DNA aneuploidy and infection of human papillomavirus type 16 in preneoplastic lesions of the uterine cervix: correlation with progression to malignancy. Cancer Lett 1998 Jan 16; 123(1): 47-52.



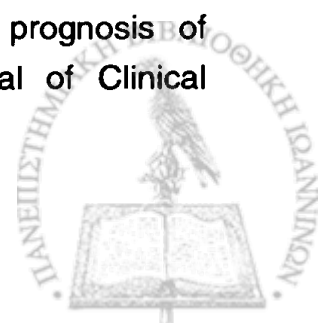
39. Herrington CS. Human papillomaviruses and cervical neoplasia. II. Interaction of HPV with other factors. *Journal of Clinical Pathology* 1995; 48: 1-6.
40. Ostor A. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *International Journal of Gynecologic Pathology* 1993; 12: 186-92.
41. Koutsky L, Holmes K, Critchlow C, Stevens CE, Paavonen J, Beckmann AM, DeRonen TA, Galloway DA. A cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to papillomavirus infection. *New England Journal of Medicine* 1992; 327: 1272-8.
42. Koss L. *Diagnostic Cytology and its Histopathologic basis*. 1992. New York, J.B. Lippinkott Co.
43. Friedell Gh, McKay DG. Adenocarcinoma in situ of endocervix. *Cancer* 1953; 6: 887-97.
44. Gloor E, Hurlimann J. Cervical intraepithelial glandular neoplasia (adenocarcinoma in situ and glandular dysplasia). A correlative study of 23 cases with histologic grading, histochemical analysis of mucins and immunohistochemical determination of the affinity for four lectins. *Cancer* 1986; 58: 1272-80.
45. Weisbrot I, Stabinsky C, Davis M. Adenocarcinoma in situ of the uterine cervix. *Cancer* 1972; 29: 1179-87.
46. Tobon H, Dave H. Adenocarcinoma in situ of the cervix. *International Journal of Gynecologic Pathology* 1988; 7: 139-51.
47. Tase T, Okagaki T, Clark B, Twiggs LB, Ostrow RS, Faras AJ. Human papillomavirus DNA in adenocarcinoma in situ, microinvasive adenocarcinoma of the uterine cervix and coexisting cervical squamous intraepithelial neoplasia. *International Journal of Gynecologic Pathology* 1989; 8: 8-17
48. Griffin N, Dockey D, Lewis F, Wells M. Demonstration of low frequency of human papillomavirus DNA in cervical adenocarcinoma and adenocarcinoma in situ by the polymerase chain reaction and in situ hybridisation. *International Journal of Gynecologic Pathology* 1991; 10:36-43.
49. Farnsworth A, Lavery C, Stoler MH. Human papillomavirus messenger RNA expression in adenocarcinoma in situ of the uterine cervix. *International Journal of Gynecologic Pathology* 1989; 8: 321-30.
50. Tase T, Okagaki T, Clark B, et al. Human papillomavirus DNA in glandular dysplasia and microglandular hyperplasia: Presumed precursors of adenocarcinoma of the uterine cervix. *Obstetrics and Gynecology* 1989; 73:1005-8.



51. Higgins GD, Phillips GE, Smith LA, Uzelin DM, Burrell CJ. High prevalence of human papillomavirus transcripts in all grades of cervical intraepithelial glandular neoplasia. *Cancer* 1992; 70: 136 –46.
52. Scully RE, Poulson H, Dsobin LH. International histological classification and histologic typing of female genital tract tumors. Springer-Verlag, Berlin, 1994.
53. Wright T, Ferenczy A, Kurman R. Carcinoma and other tumors of the cervix. *Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract*. Edited by Kurman RJ. New York, Springer- Verlag, 1994, 279-326.
54. Peterson F (ed). Annual report on results of treatment in gynaecologic cancer. F160 Vol 20, Stockholm, 1989.
55. Nees M, Wijgaarden E, Bakos E, Schneider A and Durst M. Identification of novel molecular markers wich correlate with HPV-induced tumor progression. *Oncogene* 1998; 16: 2447-2458.
56. McGregor J, Moss S, Parkin D, Day N. A case control study of cervical cancer screening in north- east Scotland. *British Medicine Journal* 1985; 290: 1543-1546.
57. Devesa SJ, Young J, Brinton L, Fraunemi JF. Recent trends in cervix uteri cancer. *Cancer* 1989; 64: 2184-90.
58. Παρασκευαΐδης Ε. Καρκίνος τραχήλου μήτρας. Γυναικολογία και Μαιευτική. Τόμος 1. Υπό Δ.Ε. Λώλη, Εκδόσεις Παρισιάνος, Αθήνα, 1996.
59. Mac Leod A, Kitchener HC, Parkin DE, Sarkar T, Miller ID, Mann E, Campbell M. Cervical carcinoma in the Grampian Region (1980-1991): a population study of survival and cervical cytology. *British Journal of Obstetrics and Gynecology* 1994; 101: 797-803.
60. Paraskevoidis E, Kitchener HC, Miller ID, Mann E, Jandial L, Fisher PM. A population- based study of microinvasive disease of the cervix - A colposcopic and cytologic analysis. *Gynecologic Oncology* 1992; 45: 9-12.
61. Benedet JL, Anderson GH, Maticic JP. A comprehensive program for cervical cancer detection and management. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 1992; 166: 1254-9.
62. Cannistra SA, Niloff JM. Cancer of the uterine cervix. *New England Journal of Medicine* 1996; 344: 1030-39.
63. Lamont DW, Symonds RP, Brodie MM, Nwabineli NJ, Gillis CR. Age, socioeconomic status and survival from cancer of cervix in the West of Scotland. *British Journal of Cancer* 1993; 67: 351-57.



64. Brinton LA. Epidemiology of cervical cancer- an overview. In: Munoz N, Bosch FX, Shah K, Meheus A(eds). The Epidemiology of Cervical Cancer and Human Papillomavirus. Lyon, IARC Scientif Publication, 1992, pp 3-23.
65. Broders AC. Squamous-cell epithelioma of the lip : A study of five hundred and thirty-seven cases. JAMA 1920; 74: 656-64.
66. Stendahl U, Willen H, Willen R. Classification and grading of invasive squamous cell carcinoma of the uterine cervix. I. Acta Radiol Oncol 1979; 18: 481-496.
67. Trattner M, Graft AH, Lax S, Forstner R, Dandachi N, Haas J, Pickel H, Reich O, Staudach A, Winter R. Prognostic factors in surgically trated stage ib- iib cervical carcinomas with special emphasis on the importance of tumor volume. Gynecological Oncology 2001 Jul; 82(1): 11-6.
68. Inoue T, Morita K. The prognostic significance of number of positive nodes in cervical carcinoma stages IB, IIA, and IIB.Cancer 1990; 65:1923 - 7.
69. Zaino RJ, Ward S, Delgado G, Bundo B, Goree H, Fetter G, Ganjei P, Fraunhoffer E. Histopathologic predictors of the behavior of surgically treated stage IB squamous cell carcinoma of the cervix. Cancer 1992; 69: 1750-8.
70. Hockel S, Schlenger K, Vaupel P, Hockel M. Association between host tissue vascularity and the prognostically relevant tumor vascularity in human cervical cancer. Énternational Journal of Oncology 2001 Oct; 19(4): 827-32.
71. Peel KR, Khoury GG, Joslin CAF, O'Donovan PJ, Mgaya H, Keates G, Head C, Thorogood DJ. Cancer of cervix in women under 40 years of age, a regional survey,, 1975-1984. British Journal of Obstetrics and Gynecology 1991; 98: 993- 1000.
72. Rutledge FN, Mitchell MF, Munsell M, Bass S, McGufee V, Atkinson EN.Youth as a prognostic factor in carcinoma of the cervix: A matched analysis. Gynecologic Oncology 1992; 44: 123 -130.
73. Pilch H, Gumzel S, Schaffer U, Tanner b, Brockerhoff P, Maeurer M, Hockel M, Hommel G, Knapstein PG. The presence of HPV DNA in cervical cancer: correlation with clinico-pathologic parameters and prognostic significance: 10 years experience at the Department of Obstetrics and Gynecology of the Mainz University. International Journal of Gynecological Cancer 2001 Jan-Feb; 11(1): 39-48.
74. Schwartz SM, Daling JR, Shera KA, Madeleine MM, McKnight B, Galloway DA, Porter PL. McDougall JK. Human papillomavirus and prognosis of invasive cervical cancer: a population- based study. Journal of Clinical Oncology 2001 Apr 1: 19(7): 1906-15.



75. Jarrell MA, Heintz N, Howard P, Collins C, Badger G, Belinson J, Nason F. Squamous cell carcinoma of the cervix: HPV 16 and DNA ploidy as predictors of survival. *Gynecologic Oncology* 1992; 46: 361-6.
76. Dyson JED, Joslin CAF, Rothwell RI, et al. Flow cytometric evidence for the differential radioresponsiveness of aneuploid and diploid cervix tumors. *Radiother Oncology* 1987; 8: 263-72.
77. Kenter GG, Cornelisse CJ, Aartsen EJ, et al. DNA ploidy level as a prognostic factor in low stage carcinoma of the uterine cervix. *Gynecologic Oncology* 1990; 39: 181-5.
78. Davis JR, Artizabal S, Way DL, Weiner SA, Hicks MJ, Hagaman RM. DNA ploidy, grade and stage in prognosis of uterine cervical cancer. *Gynecologic Oncology* 1989; 32: 4-7.
79. Barbacid M. ras Genes *Annual Review Biochemistry* 1987; 56: 779-827.
80. Koffa M, Koumantakis E, Ergazaki M, Malamou-Mitsi V and Spandidos DA. Detection of ras gene mutation and HPV in lesions of the human female tract. *International Journal of Oncology* 1994; 5: 189-195.
81. Riou G, Barrois M, Sheng Z-m, Duvillard P, L'homme C. Somatic deletions and mutations of c-Ha-ras gene in human cervical cancers. *Oncogene* 1988; 3: 329-33.
82. Riou G, Le MG, Favre M, Jeannel D, Bourhis J, Orthi G. Human papillomavirus- negative status and c-myc gene overexpression: independent prognostic indicators of distant metastasis for early - stage invasive cervical cancers. *Journal of National Cancer Institute* 1992; 84:1525-6.
83. Agnantis N, Spandidos DA, Mahera H, Parissis P, Kakkanas A, Printzas A, Papaharalampous NX. Immunohistochemical study of the ras oncogene expression in endometrial and cervical human lesions. *European Journal of Gynecologic Oncology* 1988; 9: 360-5.
84. Sagae S, Kuzumaki N, Hizada T, et al. ras Oncogene expression and prognosis of invasive squamous cell carcinomas of the uterine cervix. *Cancer* 1989; 63: 1577-82.
85. Riou GF. Protooncogenes and prognosis in early carcinoma of the uterine cervix. *Cancer Surv* 1988; 7: 441-56.
86. Riou G, Le MG, Le Doussal V and Haie C. c-myc protooncogene expression and prognosis in early carcinoma of the uterine cervix. *Lancet ii* 1987: 761-3.
87. Iwasaka T, Yokoyama M, Oh- Uchida M, Matsuo N, Hara K, Fukuyama K, Hachisuga T, Fukuda K, Sugimori H. Detection of human papillomavirus



genome and analysis of expression of c-myc and Ha-ras oncogenes in invasive cervical carcinomas. *Gynecologic Oncology* 1992; 46: 298-303.

88. Kersemaekers A M, Fleuren G J, Kenter G, Van den Broek L, Uljee S, Hermans J and Van de Vijver M. Oncogene alterations in carcinomas of the uterine cervix: Overexpression of the Epidermal Growth Factor Receptor is associated with poor prognosis. *Clinical Cancer Research* 1999; 5: 577-86.

89. Oka K, Nakano T, Arai T. C-erbB-2 oncoprotein expression is associated with poor prognosis in squamous cell carcinoma of the cervix. *Cancer* 1994; 73: 668-71.

90. Nakano T, Oka K, Ishikawa A, Morita S. Correlation of cervical carcinoma c-erbB-2 oncogene with cell proliferation parameters in patients treated with radiation therapy for cervical carcinoma. *Cancer* 1997; 79: 513-20.

91. Raju KS, Kjorstad KE, Abeler V. Prognostic factors in the treatment of stage IB adenocarcinoma of the cervix. *International Journal of Gynecologic Cancer* 1991; 1 69- 74.

92. Korhonen MO. Adenocarcinoma of the uterine cervix. Prognosis and prognostic significance of histology. *Cancer* 1984; 53: 1760-3.

93. Angel C, Du Beshter B, Lin JY. Clinical presentation and management of stage I cervical adenocarcinoma: A 25 year experience. *Gynecologic Oncology* 1992; 44: 71-78.

94. Atkin NB. Prognostic significance of ploidy level in human tumors. I. Carcinomas of the uterus. *Journal of National Cancer Institute* 1976; 56: 909.

95. Fu YS, Regan JW, Fu AS, Janiga KE. Adenocarcinoma and mixed carcinoma of the uterine cervix. II. Prognostic value of nuclear DNA analysis. *Cancer* 1982; 49: 2571-77.

96. Mandai M, Konishi I, Koshiyama M, Komatsu T, Yamamoto S, Nanbu K, Mori T and Fucumoto M. Altered expression of nm23-H1 and c-erbB-2 proteins have prognostic significance in adenocarcinoma but not in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Cancer* 1995; 75:2523-9.

97. Kihana T, Tsuda H, Teshina S, Nomoto K, Tsugane S, Sonoda T, Matsuura S and Hirohashi S. Prognostic significance of the overexpression of the c-erbB-2 protein in adenocarcinoma of the uterine cervix. *Cancer* 1994; 73: 148-53.

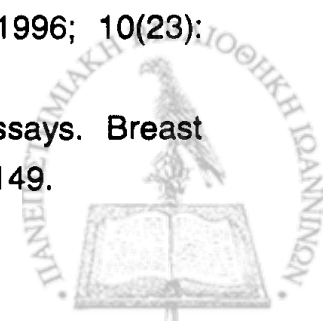
98. Costa M, Walls J and Trelford J. c-erbB-2 oncoprotein overexpression in uterine cervix carcinoma with glandular differentiation. *American Journal of Clinical Pathology* 1995; 104: 634-42.



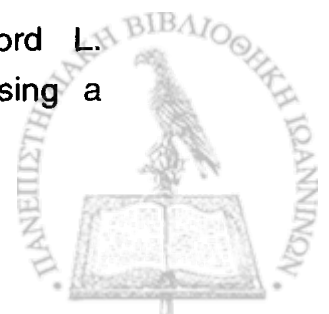
99. Pekin T, Kavak Z, Yildizhan B, Kaya H. Prognosis and treatment of adenocarcinoma and adenosquamous cell carcinoma of the uterine cervix. *European Journal of Gynaecologic Oncology* 2001; 22(2): 160-3
100. Lai CH, Hsueh S, Hong JH, Chang TC, Tseng CJ, Chou HH, Huang KG, Lin JD. Are adenocarcinomas and adenosquamous carcinomas different from squamous carcinomas in stage IB and II cervical cancer patients undergoing primary radical surgery? *International Journal of Gynecologic Cancer* 1999 Jan; 9(1): 28-36.
101. Nakanishi T, Ishiwaka H, Suzuli Y, Inoue T, Nakamura S, Kuzuya K. A comparison of prognoses of pathologic stage Ib adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Gynecologic Oncology* 2000 Nov; 79(2): 289-93.
102. Irie T, Kigawa J, Minagawa Y, Itamochi H, Sato S, Akeshima R, Terakawa N. Prognosis and clinicopathological characteristics of Ib-IIb adenocarcinoma of the uterine cervix in patients who had hysterectomy. *European Journal of Surgical Oncology* 2000 Aug; 26(5): 464-7.
103. De Villiers EM. Heterogeneity of the human papillomavirus group. *Journal of Virology* 1989; 63: 4898-903.
104. Zur Hausen H. Are human papillomavirus infections not necessary or sufficient causal factors for invasive cancer of the cervix? *International Journal of Cancer* 1995; 63: 315-6.
105. De Villiers EM. Human pathogenic papillomaviruses: an update. In zur Hausen H, ed. *Current Topics in Microbiology*. 1994; 86: 1-12.
106. Malamou-Mitsi V, Zachariou CH, Tzallas S, Tavoulari S, Paraskevaidis E, and Agnantis NJ. Detection and typing of HPV by PCR and Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLPs) in tissue samples from human cervical lesions. *Electronic Journal of Pathology and Histology* (in press)2002.
107. Sonnex S. Human papillomavirus infection with particular reference to genital disease. *Journal of Clinical Pathology* 1998; 51: 643-648.
108. Desaintes C, Demeret C, Goyat S, Yaniv M, Thierry F. Expression of the papillomavirus E2 protein in HeLa cells leads to apoptosis. *EMBO Journal* 1997; 16: 504-14.
109. Frattini MG, Hurst SD, Lim HB, Swaminathan S, Laimins LA. Abrogation of a mitotic checkpoint by E2 proteins from oncogenic human papillomaviruses corellates with increased turnover of the p53 tumor suppressor protein. *EMBO Journal* 1997; 16: 318-31.



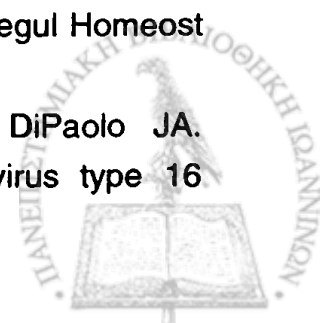
110. Pim D, Collins and Banks L. Human papillomavirus type 16E5 gene stimulates the transforming activity of the epidermal growth factor receptor. *Oncogene* 1992; 7:27-32.
111. Auvinen E, Crusius K, Steuer B and Alonso A. Human papillomavirus type 16E5 protein (Review) . *International Journal of Oncology* 1997; 11:1297-304.
112. Herrington CS. Human papillomaviruses and cervical neoplasia.I. Classification, virology, pathology and epidemiology. *Journal of Clinical Pathology* 1994; 47: 1066-72.
113. Alani R, Munger K. Human papillomaviruses and associated malignancies. *Journal of Clinical Oncology* 1998; 16: 330-7.
114. Durst M, Croce C, Gissman L, Schwartz E, and Huebner K. Papillomavirus sequences integrate near cellular oncogenes in some cervical carcinomas. *Proc. Natl Acad Sci US* 1987; 84: 1070-4.
115. Lazo P.A. The molecular genetics of cervical carcinoma. *British Journal of Cancer* 1999; 80(12);2008-18.
116. Popescu NC, Di Paolo JA. Integration of human papilloma virus 16 DNA and genomic rearrangements in immortalised human keratinocyte lines. *Cancer Research* 1990; 50:1316-23.
117. Koshland DE, Jr. Molecule of the year. *Science* 1993; 262-1953
118. Culotta E and Koshland DE, Jr. p53 sweeps through cancer research. *Science* 1993;262:1958- 61.
119. McBride OW, Merry D, and Givol D. The gene for human p53 cellular tumor antigen is located on chromosome 17 short arm(17q13). *Proc Natl Acad Sci US A* 1986; 83: 130-4.
120. Kern SE,, Pietenpol JA, Thiagalingam S, Seymour A, Kinzler KW, Vogelstein B. Oncogenic forms of p53 inhibit p53- regulated gene expression. *Science* 1992; 256(5058):827-30.
121. Bargoneti J, Friedman PN, Kern SE, Vogelstein B, PZrives C. Wild type but not mutant p53 immunopurified proteins bind to sequences adjacent to the SV40 origin of replication. *Cell* 1991; 65(6): 1083-91.
122. Vogelstein B, Kinzler KW. p53 function and dysfunction. *Cell* 1992; 70: 523-40.
123. Murphy M, Hinman A, Levine AJ. Wild - type p53 negatively regulates the expression of microtubule- associated protein. *Genes Dev* 1996; 10(23): 2971-80.
124. Symmans W F, Inghirami G. *Molecular Pathologic Assays. Breast Cancer*. Edited by Roses DF. Churchill Livingstone 2000, p 129-149.



125. Pellegata NS, Antoniono RJ, Redpath JL, Stanbridge EJ. DNA damage and p53- mediated cell cycle arrest: A reevaluation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(26): 15209-14.
126. Lane DP. The regulation of p53 function: Steiner award lecture. *International Journal of Cancer* 1994; 57: 623-627.
127. NJ Agnantis, Goussia A. Apoptosis and cancer. *Bull Acad Natl Méd* 1999;2:183, 2, 277-287.
128. Fukusava K, Choi T, Kuriyama SR, Rulong S, Vande Woune GF. Abnormal Centrosome amplification in the absence of p53. *Science* 1996; 271:1744-7 .
129. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science* 1991; 253: 49-53.
130. Vousden KH. Regulation of the cell cycle by viral oncoproteins. *Semin Cancer Biol* 1990; 6: 109-16
131. Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 1990;248:76-9.
132. Borresen AL, Helland A, Nesland J, Holm R, Trope C, Kaern J. Papillomaviruses, p53 and cervical cancer. *Lancet* 1992; 339: 1350-1.
133. Busby-Earle RM, Steel CM, Williams AR, Cohen B, Bird CC. p53 mutations in cervical carcinogenesis- low frequency and lack of correlation with human papillomavirus status. *British Journal of Cancer* 1994; 69: 732-7.
134. Park DJ, Wilczynski SP, Paquette RL, Miller CW, Koeffler HP. p53 mutations in HPV-negative cervical carcinoma. *Oncogene* 1994; 9: 205-10.
135. Crook T., Vousden KH. Properties of p53 mutations detected in primary and secondary cervical cancers suggest mechanisms of metastasis and involvement of environmental carcinogens. *EMBO Journal* 1992; 11: 3935-40.
136. Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ. and Howley PM. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 1990; 63: 1129-36.
137. Xu Fang Pei. The human papillomavirus E6/E7 genes induce discordant changes in the expression of cell growth regulatory proteins. *Carcinogenesis* 1996;17(7): 1395-1401.
138. Gallie BL, Hei YJ, Mostachfi H and Dunn JM. Retinoblastoma: for the next generation. *Molecular Genetics of Cancer*. Edited by Cowell JK. UK, BIOS Scientific Publishers, 1995; p.1-16.
139. Matlashewski G, Osborn K, Murray A, Banks L, Crawford L. Transformation of mouse fibroblasts with HPV type 16 DNA using a heterologous promoter. *Cancer cells* 1987; 5: 195-9.



140. Phelps W, Howley PM. Transcriptional transactivation by the human papillomavirus type 16 E2 gene product. *Journal of Virology* 1987; 61:1630-8.
141. Storey A, Pim D, Murray A, Osborn K, Banks L, Crawford L. Comparison of the in vivo transforming activities of human papillomavirus types *EMBO Journal* 1988; 7: 1815-20.
142. Storey A, Almond N, Osborn K, Crawford L. Mutations of the human papillomavirus type 16 E7 gene that affect transformation, transactivation and phosphorylation by the E7 protein. *J Gen Virol* 1990; 71: 965-70.
143. Crook T, Morgenstein J, Crawford L, Banks L. Continued expression of HPV 16 E7 protein is required for maintenance of the transformed by HPV 16 plus EJ-ras. *EMBO Journal* 1989; 8: 513-9.
144. Crook T, Storey A, Almond N, Osborn K, Crawford L. Human papillomavirus type 16 cooperates with activated ras and fos oncogenes in the hormone-dependent transformation of primary mouse cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 8820-4.
145. Gloss B, Bernard HU, Seedorf K, Klock G. The upstream regulatory region of the human papilloma virus-16 contains an E2 protein-independent enhancer which is specific for cervical carcinoma cells and regulated by glucocorticoid hormones. *EMBO Journal* 1987; 6: 3735-43.
146. Choo K, Huang C, Chen CM, Han CP and Au LC. Jun-B oncogene aberrations in cervical cancer cell lines. *Cancer Lett* 1995; 93: 249-253.
147. Cuturier J, Sastre-Garau X, Schneider-Maunoury S, Labib A and Orth G. Integration of papillomavirus DNA near MYC genes in genital carcinomas and its consequences for protooncogene expression. *Journal of Virology* 1991; 65: 4534-4538.
148. Wilke CM, Hall BK, Hoge A, Paradee W, Smith DI and Glover TW. FRA3B extends over a broad region and contains a spontaneous HPV 16 integration site: direct evidence for the coincidence of viral integration sites and fragile sites. *Hum Mol Genet* 1996; 5:187-95.
149. Koopman LA, Szuhai K, Van Eendenburg JDH, Bezrookove V, Kenter GG, Schuurin E, Tanke H and Fleuren GJ. Recurrent integration of human papillomaviruses 16, 45, and 67 near translocation breakpoints in new cervical cancer cell lines. *Cancer Research* 1999 Nov 1; 59: 5615-24.
150. De Marco F, Marcante ML. HPV- 16 E6-E7 differential transcription induced in SiHa cervical cancer cell line by interferons. *J Biol Regul Homeost Agents* 1993; 7: 15-21.
151. Woodworth CD, Lichti U, Simpson S, Evans CH, DiPaolo JA. Leukoregulin and gamma-interferon inhibit human papillomavirus type 16



gene transcription in human papillomavirus-immortalized human cervical cells. *Cancer Research* 1992; 52:456-63.

152. Braun L, Durst M, Mikumo R, Crowley A, Robinson M. Regulation of growth and gene expression in human papillomavirus-transformed keratinocytes by transforming growth factor-beta: implications for the control of papillomavirus infection. *Mol Carcinog* 1992; 6: 100-11.

153. Lippman SM, Kavanagh JJ, Paredes-Espinoza M, Delgadillo-Modrueno F, Paredes-casillas P, Hong WK, et al. 13-cis-retinoic acid plus interferon alpha-2a: highly active systemic therapy for squamous cell carcinoma of cervix. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84: 241-5.

154. Weinberg RA. Oncogenes, antioncogenes and the molecular basis of multistep carcinogenesis. *Cancer Research* 1989; 49: 3713-21.

155. Hollywood D, Sikora K, Pontin J, Peckham M, Pinedo HM, Veronesi U, editors. *Oxford Textbook of Oncology*. Oxford, UK: Oxford University Press, 1995; 1.6, Oncogenes.

156. Rayter SI, Iwaza K, Mitchisch RW, Sorvilo JM, Valenzuela DM, Foulkes JG, Glovers DM, Hames BD, editors. *Oncogenes*. Oxford: IRL Press, 1989; Biochemical function of oncogenes, p.112-89.

157. Bishop JM. Molecular themes in oncogenesis. *Cell* 1991; 64: 235-248.

158. Basergaa R, Porcu P, Sell C. Imerial Cancer Research Fund, editors. *The Molecular Biology of Cancer*. London, 1993; Oncogenes, Growth Factors and Control of the cycle. p. 201-13.

159. Aaranson SA. Growth factors and cancer. *Science* 1991; 254: 1146-1153.

160. Druker BJ, Mamon HJ, Roberts TM. Oncogenes, growth factors and signal transduction. *New England Journal of Medicine*, 1989; 321: 1383- 91.

161. Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factors. *Annu Rev Biochem* 1979; 48: 193-216.

162. Bargman CI, Hung CM and Weinberg RA. The neu oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein. *Nature* 1986 16 Jan; 319: 226-30.

163. Schechter AL, Hung CM, Vaidyanathan L, Weinberg RA, Yang-Feng TL, Francke U, Ullrich A, Coussens L. The neu gene: An erbB-homologous gene distinct from and unlinked to the gene encoding the EGF receptor. *Science* 1985; 229: 976-87.

164. Kraus MH, Issing W, Miki T, Popescu NC. and Aaronson SA. Isolation and characterization of erbB-3, a third member of the erbB/epidermal growth



factor receptor family: Evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86: 9193-97.

165. Varmus HE. The molecular genetics of cellular oncogenes. Annual Review of Genetics, 1984; 18: 553- 612.

166. Lewin Benjamin. Genes IV, (Oncogenes: Gene expression and Cancer) John Wiley & Sons, 1989; p.772.

167. Levy JP. Les Oncogenes. Rv. Prat. 1988; 38: 55- 61.

168. Porte D, Oertel- Buchheit P, John M, Granger-Schnarr M, Schnarr M. DNA binding and transactivation properties of Fos variants with homodimerization capacity. Nucleic Acids Research 1997; 25(15): 3026-33.

169. Kato GJ, Dang CV. Function of the c-myc oncoprotein. Faseb J 1992; 6: 3065-3072.

170. Bishop JM. The molecular Genetics of Cancer. Science 1987; 235: 305-11.

171. Spandidos DA, Pintzas A, Kakkanas K, Yiagnissis and Agnantis N. Quantitative and qualitative changes in oncogene expression during carcinogenesis. " Breast Cancer: Origins, Detection and Treatment ". Eds. Rich MA, Hager JC, Lopez DL. Publ. Martinus Nijhoff 1988, p. 24.

172. Ilson DH, Motzer RJ, Rodriguez E, Chaganti R, et al. Genetic analysis in the diagnosis of neoplasms of unknown primary tumor site. Semin Oncol 1993; 20: 229-37.

173. Duesberg PH. Retroviruses as carcinogens and pathogens: expectations and reality. Cancer Research 1987; 47(1199): 1220.

174. Alitalo K. Amplification of cellular oncogenes in cancer cells. Med Biol 1984; 62: 62(6): 304-17.

175. Rabbits TH, Rabbits RH, Glover DM, Hames BD, editors. Molecular pathology of chromosomal abnormalities and cancer genes in human tumors. Oncogenes. IRL Press, 1989, p. 67-111.

176. Knuutila, S, Bjorkqvist AM, Autio K, Tarkkanen M, Wolf M, Monni O, Szymanska J, Larramendy ML, Tapper J, Pere H, El-Rifai W, Hemmer S, Wasenius VM, Vidgren V and Zhu Ying. DNA copy number amplifications in human neoplasms: A review. American Journal of Pathology 1998, 152: 1107-1123.

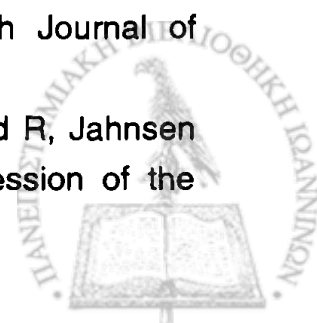
177. De Klein A, Hagemeijer A, Bartram CR, Houwen R, Hoefsloot L, Carbonell F, Chan L, Barnett M, Greaves M, Kleinbauer E. bcr rearrangement and translocation of the c-abl oncogene in Philadelphia positive acute lymphoblastic leukemia. Blood 1986; 68(6): 1369-75.



178. Hudiak RM, Schlessinger J and Ullrich A. Increased expression of the putative growth factor receptor p185 causes transformation and tumorigenesis of NIH 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 7159-63.
179. Van de Vijver MJ, Van de Berselaar R, Devilee P, Cornelisse C, Peterse J, Nusse R. Amplification of the neu (c-erbB-2) oncogene in human mammary tumors is relatively frequent and is often accompanied by amplification of the linked c-erbBA oncogene. *Molecular and Cell Biology* 1987, 7: 2019-23.
180. Boshier JM, Williams T, Hurst HC. The developmentally regulated transcription factor AP-2 is involved in c-erbB-2 overexpression in human mammary carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 744-47.
181. Press MF, Pike MC, Chazin VR, Hung G, Udove JA, Markowicz M, Danyluk J, Godolphin W, Sliwkowski M, Akita R, Paterson MC and Slamon DJ. HER-2/neu in node-negative breast cancer: direct tissue quantitation by computerized image analysis and association of overexpression with increased risk of recurrent disease. *Cancer Research* 1993; 53: 4960-70.
182. Pauletti G, Godolphin W, Press MF and Slamon DJ. Detection and quantitation of HER-2/neu gene amplification in human breast cancer archival material using fluorescence in situ Hybridization. *Oncogene* 1996; 13: 63-72.
183. Slamon DJ, Clark GM, Wong S, Levin WJ, Ullrich A and McGuire WL. Human breast cancer: Correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987, 235: 177-182.
184. Mathew S, Murty VV, Bosl GJ, Chaganti RS. Loss of heterozygosity identifies multiple sites of allelic deletions on chromosome 1 in human male germ cell tumors. *Cancer Research* 1994; 54: 6265-69.
185. Popescu NC, King CR, Kraus MH. Localization of the human erbB-2 gene on normal and rearranged chromosomes 17 to bands q12-21.32. *Genomics* 1989; 4: 362-66.
186. Akaiyama T, Sudo C, Ogawara H, Tuyoshima K, Yamamoto T. The product of the human c-erbB-2 gene: a 1855- kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. *Science* 1986; 232: 1644-5.
187. Schechter AL, Stern DF, Vaidyanathan L, Decker SJ, Drebin JA, Greene MJ, and Weinberg RA. The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen. *Nature* 1984; 312: 513- 516.
188. Coussens L, Yang-Feng TL, Liao Y-C, Chen E, Gray A, McGrath J, Seeburg PH, Libermann TA, Schlessinger J, Francke U, Levinson A and Ullrich A. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science* 1985; 230, 1132-1139.



189. Semba K, Kamata N, Toyoshima K, and Yamamoto T. A v-erbB-related proto-oncogene, c-erbB-2 is distinct from c-erbB-1/ epidermal growth factor receptor gene and is amplified in human salivary gland adenocarcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 6497-6501.
190. Ullrich A and Schlessinger J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 1990; 61: 203-12.
191. Κιπράκη Ε, Τρούγκος Κ. Βιολογία του καρκίνου. Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ.Πασχαλίδης, 1999.
192. Van der Geer P, Hunter T, Lindberg RA. Receptor protein- tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annu Rev Cell Biol* 1994; 10(251): 251-337.
193. Cohen GB, Ren R, Baltimore D. Modular binding domains in signal transduction proteins. *Cell* 1995; 80: 237- 248
194. Beerli RR, Hynes NE. Epidermal growth factor-related peptides activate distinct subsets of ErbB receptors and differ in their biological activities. *J Biol Chem* 1996; 271: 6071- 76.
195. Riese DJ, van Raaij TM, Plowman GD, Stern DF. The cellular response to neuregulins is governed by complex interactions of the erbB receptor family. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 5770-76.
196. Tzahar E, Ratkin BJ, Moyer JD, Klapper LN, Alroy I, Levkowitz G, Shelly M, Henis S, Eisenstein M, Sela M, Andrews GC, Yarden Y. Bivalence of EGF-like ligands drives the ErbB-2 signaling network. *Embo Journal* 1997; 16(16): 4938-50.
197. Karunagaran D, Tzahar E, Beerli RR, Chen X, Grauss-Porta D, Ratzkin BJ, Seger R, Hynes NE, Yarden Y. ErbB-2 is a common auxillary subunit of NDF and EGF receptors: implications for brast cancer. *Embo Journal* 1996; 15(2): 254- 264.
198. Grauss-Porta D, Beerli RR, Daly JM, Hynes NE. ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *Embo Journal* 1997; 17(7): 1647-55.
199. Samanta A, LeVea CM, Dougall WC, Qian X, Greene MI. ligand and p185^{c-neu} density govern receptor interactions and tyrosine kinase activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 1711-15.
200. Quirke P, Pickles A, Tuzi NL, Mohamdee O, Gullick WJ. Pattern of expression of c-erbB-2 oncoprotein in human fetuses. *British Journal of Cancer* 1989; 60: 64-69.
201. Borresen AL, Ottestad L, Gaustad A, Andersen TI, Heikkild R, Jahnsen T, Tveit KM, Nesland JM. Amplification and protein overexpression of the



neu/Her-2/c-erbB-2 protooncogene in human breast carcinomas: relationship to loss of gene sequences on chromosome 17, family history and prognosis. *British Journal of Cancer* 1990; 62(4):585-590.

202. Berger MS, Locher GW, Saurer S, Gullick WJ, Waterfield MD, Groner B, Hynes NE. Correlation of c-erbB-2 gene amplification and protein expression in human carcinoma with nodal status and nuclear grading. *Cancer Research* 1988; 48(5): 1238-43.

203. Bargmann CI, Hung MC, Weinberg RA. Multiple independent activations of the neu oncogene by a point mutation altering the transmembrane domain of p185. *Cell* 1986; 45:649-57.

204. King CR, Draus MH, Aaronson SA. Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma. *Science* 1985; 229: 974-76.

205. Goussia A, Agnantis NJ, Athanassiadou S, Stefanou D. Prognostic significance of c-erbB-2 and hormone receptor's status in human benign and malignant breast lesions. *Anticancer Research* 1995; 15(5B): 2313-18.

206. Pavlidis N, Briassoulis E, Bai M, Foutzilas G, Agnantis NJ. Overexpression of c-myc, ras and c-erbB-2 oncoproteins in carcinoma of unknown primary origin. *Anticancer Research* 1995; 15(6B): 2563-68.

207. Ioachim E, Kamina S, Athanassiadou S and Agnantis NJ. The prognostic significance of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR), C-erbB-2, Ki-67 and PCNA expression in breast cancer. *Anticancer Research* 1996;16:3141-8.

208. Ioachim E, Charchanti A, Stavropoulos NE, Scopelitou A, Athanassiou ED and Agnantis NJ. Immunohistochemical expression of Retinoblastoma gene product (Rb), p53 protein, MDM-2, c-erbB-2, HLA-DR and proliferation indices in human urinary bladder carcinoma. *Histology Histopathology* 2000 ; 15 : 721-727.

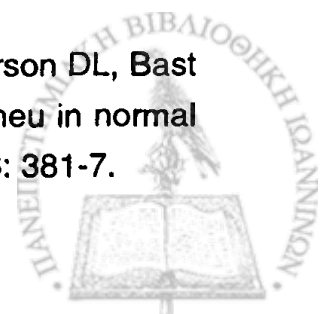
209. Veloudakis-Baltatzis, Michailidou A, Gavriel A, Chrisochou M and Agnantis NJ. Electron immunocytochemical distribution of c-erbB-2, p-glycoprotein, prolactin and HGF receptors in malignant breast tissues. *Edit J Cardoso da Silva, Publ.Monduzzi Editore, S.P.A., Bologna, Italy, 1998, p 675-680.*

210. Ishikawa T, Kobayashi M, Mai M, Suzuki T, Ooi A. Amplification of the c-erbB-2 (HER-2/neu) gene in gastric cancer cells. Detection by fluorescence in situ hybridization. *American Journal of Pathology* 1997: 151(3): 761-68.

211. Felip E, Del CJ, Rubio D, Vidal MT, Colomer R, Bermejo B. Overexpression of c-erbB-2 in epithelial ovarian cancer. Prognostic value and relationship with response to chemotherapy. *Cancer* 1995; 75(8): 2147-52.



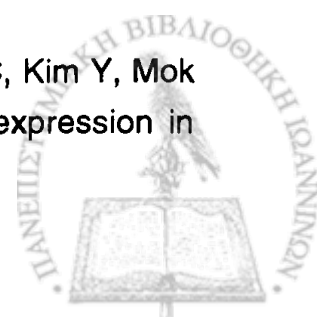
212. Persons DL, Borelli KA, Hsu PH. Quantitation of HER-2/neu and c-myc gene amplification in breast carcinoma using fluorescence in situ hybridization. *Modern Pathology* 1997;10(7): 720-27.
213. Riben MW, Malfetano JH, Nazeer T, Muraca PJ, Ambros RA, Ross JS. Identification of HER-2/neu oncogene amplification by fluorescence in situ hybridization in stage I endometrial carcinoma. *Modern Pathology* 1997;10(8): 823-31.
214. Ross JS, Sheehan C, Hayner-Buchan AM, Ambros RA, Kallakury BVS, Kaufman RP, Fisher HA, Muraca PJ. HER-2/neu gene amplification status in prostate cancer by fluorescence in situ hybridization. *Human Pathology* 1997; 28(7): 827-33.
215. Kallakury BVS, Sheehan C, Ambros RA, Fisher HA, Kaufman RP, Muraca PJ, and Ross JS. Correlation of p34cdc2 cyclin dependent kinase overexpression, cd44s downregulation, and HER-2/neu oncogene amplification with recurrence in prostatic adenocarcinomas. *Journal of Clinical Oncology* 1998; 16(4): 1302-09.
216. Kameda T, Yasui W, Yoshida K, Tsujino T, Nakayama H, Ito H, Tahara E. Expression of erbB-2 in human gastric carcinomas: Relationship between p185erbB-2 expression and the gene amplification. *Cancer Research* 1990; 50: 8002-09.
217. Tateishi M, Ishida T, Mitsudomi T, Kaneko S, Sugimachi K. Prognostic value of erbB-2 protein expression in human lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *European Journal of Cancer* 1991; 27: 1372-75.
218. Ross JS, Fletcher JA. The HER-2/neu oncogene in breast cancer: Prognostic factor, predictive factor, and target for therapy. *The Oncologist* 1998; 3: 237-52.
219. Press MF, Bernstein L, Thomas PA, Meisner LF, Zhou J, Ma Y, Hung G, Robinson RA, Harris C, El-naggar A, Slamon DJ, Phillips RN, Ross JS, Wolman SR and Flom KJ. HER-2/neu gene amplification characterized by fluorescence in situ hybridization: Poor prognosis in node-negative breast carcinomas. *Journal of Clinical Oncology* 1997; 15(8): 2894-2904.
220. Brumm C, Reviere A, Wilckens C, Loning T. Immunohistochemical investigation and Northern blot analysis of c-erbB-2 expression in normal, premalignant and malignant tissues of the corpus and cervix uteri. *Virchows Arch Pathol Anat Histopathol* 1990; 147: 477-84.
221. Berchuck A, Rodriguez G, Kamel A, Soper JT, Clarke-Pearson DL, Bast RC. Expression of epidermal growth factor receptor and HER-2/neu in normal and neoplastic cervix, vulva and vagina. *Obstet Gynecol* 1990; 76: 381-7.



222. Hale RJ, Buckley CH, Fox H, Williams J. Prognostic value of c-erbB-2 expression in uterine cervical carcinoma. *Journal of Clinical Pathology* 1992; 45: 594-6.
223. Kristensen GB, Holm R, Abeler VM, Trope CG. Evaluation of the prognostic significance of cathepsin D, epidermal growth factor receptor, and c-erbB-2 in early cervical squamous cell carcinoma. An immunohistochemical study. *Cancer* 1996; 78(3): 433-40.
224. Ndubisi B, Sanz S, Lu L, Podczaski E, Benrubi G, Masood S. The prognostic value of HER-2/neu oncogene in cervical cancer. *Ann Clin Lab Sci* 1997; 27(6): 396-401.
225. Mitra AB, Murty V, Pratap M, Dodhani P and Chaganti RSK. ERBB2 (HER2/neu) oncogene is frequently amplified in squamous carcinoma of the uterine cervix. *Cancer Research* 1994b;54: 637-9.
226. Mark HF, Feldman D, Das S, Sun CL, Samy M, Lathrop J. HER-2/neu oncogene amplification in cervical cancer studied by fluorescent in situ hybridization. *Genetic Test* 1999; 3(2): 237-42.
227. Ngan HY, CHEung AN, Liu SS, Cheng DK, Ng TY, Wong LC. Abnormal expression of epidermal growth factor receptor and c-erbB-2 in squamous cell carcinomas of the cervix: correlation with human papillomavirus and prognosis. *Tumour Biol* 2001; 22(3): 176-83.
228. Sharma A, Pratap M, Sawhney VM, Kahn IU, Bhambhani S, Mitra AB. Frequent amplification of c-erbB-2 (HER-2/neu) oncogene in cervical carcinoma as detected by non-fluorescence in situ hybridization technique on paraffin sections. *Oncology* 1999; 56(1): 83-7.
229. Atkin NB. Cytogenetics of carcinoma of the uterine cervix: A review. *Cancer Genetics Cytogenetics* 1997; 95: 33-39.
230. Moricard R, Cartier R. Chromosomal and cytoplasmic cytopathology of intraepithelial squamous-cell epithelioma of the cervix uteri. Ciba Foundation Study group No. 3. *Cancer of the Cervix, Diagnosis of Early Forms*. GEW Woltenholme, M.O'Connor, eds. J&A Churchill Ltd, London, 1959, pp.28-43.
231. Therman E, Timonen S. The prophase index and the occurrence of multipolar divisions in human cancer cells. *Hereditas* 1954; 40: 313-323.
232. Spriggs AI, Boddington MM, Clarke CM. Chromosomes of precancerous lesions of the cervix uteri. *Cancer* 1971; 27: 1239-53.
233. Park TW, Richart RM, Sun X-W, Wright Jr TC. Association between human papillomavirus type and clonal status of cervical squamous intraepithelial lesions. *Journal of National Cancer Institute* 1996; 88: 355-358.



234. Atkin NB, Baker MC, Fox MF. Chromosome changes in 43 carcinomas of the cervix uteri. *Cancer Genetics Cytogenetics* 1990;44: 229-241.
235. Smith PP, Bryant EM, Kaur P, McDougall JK. Cytogenetic analysis of eight human papillomavirus immortalized human keratinocyte cell lines. *International Journal of Cancer* 1989; 44(6): 1124-31.
236. Umayahara K, Numa F, Suehiro Y, Sakata A, Nawata S, Ogata H, Suminami Y, Sakamoto M, Kato H. Comparative genomic hybridization detects genetic alterations during early stages of cervical cancer progression. *Genes Chromosomes Cancer* 2002 Jan; 33(1) : 98-102.
237. Segers P, Haesen S, Castelain P, Amy J-J, De Sutter P, Van Dam P, Kirsch-Volders M. Study of numerical aberrations of chromosome 1 by fluorescence in situ hybridization and DNA content by densitometric analysis on (pre)-malignant cervical lesions. *Histochem J* 1995; 27:24- 34.
238. Heselmeyer K, Schrock A, DuManoir S, Blegen H, Shah K, Steinbeck R, Auer G, and Ried T. Gain of chromosome 3q defines the transition from severe dysplasia to invasive carcinoma of the uterine cervix. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*1996; 93: 479-84.
239. Kersemeakers AMF, Hermans J, Fleuren GJ and Vande Vijer MJ. Loss of heterozygosity for defined regions on chromosomes 3, 11 and 17 in carcinomas of the uterine cervix. *British Journal of Cancer* 1998 ; 77(2): 192-200.
240. Zhongmin Guo, Wilander E, Sallstrom J and Potten J. Deletion of chromosome 3p is an early event in malignant progression of cervical cancer. *Anticancer Research* 1998; 18: 707-12.
241. Ziminjic DB, Druck T, Ohta M, Kastury K, Coce CM, Popescu N and Huebner K. Position of chromosome 3p14.2 fragile site (FRA3B) within the FHIT gene. *Cancer Research* 1997; 57:1166-70.
242. Muller CY, O' Boyle JD, Fong KM, Wistuba II, Biesterveld E, Ahmadian M, Miller DS, Gazdar AF and Minna JD. Abnormalities of fragile histidine triad genomic and complementary DNA in cervical cancer: association with human papillomavirus type. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 433-39.
243. Butler D, Collins C, Mabruk M, Barry Walsh C, Reader MB, Kay EW. Deletion of the FHIT gene in neoplastic and invasive cervical lesions is related to high -risk HPV infection but is independent of histopathological features. *Journal of Pathology* 2000; 192(4): 502-10.
244. Greenspan DL, Connolly DC, Wu R, Lei RY, Vogelstein JTC, Kim Y, Mok JE, Munoz N, Bosch FX, Shah K and Cho KR. Loss of FHIT expression in



cervical carcinomacell lines and primary tumors. *Cancer Research* 1997; 57: 4692-98.

245. Bulten J, Poddighe PJ, Robben J, Gemmink J, deVilde P, and Hanselaar A. Interphase cytogenetic analysis of cervical intraepithelial neoplasia. *American Journal of Pathology* 1998; 152(2): 495-503.

246. Mian C, Baner D, Kohlberger P, Kainz C, Haitel A, Czerwenka K, Stani J, Breitenacker G, and Wiener H. Fluorescence in situ hybridization in cervical smears: Detection of numerical aberrations of chromosomes 7, 3 and X and relationship to HPV infection. *Gynecologic Oncology* 1999;75:41-6.

247. Graham DA, Southern SA, McDicken IW, Herrington CS. Interphase cytogenetic evidence for distinct genetic pathways in the development of squamous neoplasia of the uterine cervix. *Laboratory Investigation* 1998; 78(3): 289-96.

248. Graham DA, Herrington CS. HPV-16 E2 gene disruption and sequence variation in CIN 3 lesions and invasive squamous cell carcinomas of the cervix: relation to numerical chromosome abnormalities. *Molecular Pathology* 2000; 53(4): 201-6.

249. Giannoudis A, Evans MF, Southern SA, Herrington CS. Basal keratinocyte tetrasomy in low-grade squamous intraepithelial lesions of the cervix is restricted to high and intermediate risk HPV infection but is not type specific. *British Journal of Cancer* 2000; 82(2): 424-8.

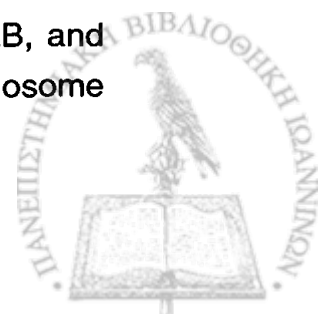
250. Popescu NC, DiPaolo JA and Amsbaugh SC. Integration sites of human papillomavirus 18 DNA sequences on HeLa cell chromosomes. *Cytogenetics Cell Genetics* 1987; 44: 58-62.

251. Heselmeyer K, MacVillem M, Schrock E, Du Manoir S, Blegen H, Shah KV, Auer G and Ried T. Advanced-stage cervical carcinomas are defined by a recurrent pattern of chromosomal aberrations revealing high genetic instability and a consistent gain of chromosome arm 3q. *Genes Chromosomes Cancer* 1997; 19: 233-240.

252. Mitra AB, Murty VS, Singh V, Li R-G, Pratap M, Sodhani P, Luthra UK, Chaganti RSK. Genetic alterations at 5p15: a potential marker for progression of precancerous uterine cervix lesions. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87:742-45.

253. Mitra AB, Murty VS, Li R-G, Pratap M, Luthra UK, Chaganti RSK. Allelotype analysis of cervical carcinoma. *Cancer Research* 1994a; 54: 4481-4487.

254. Mullokandov MR, Kholodilov NG, Atkin NB, Burk RD, Johnson AB, and Klinger HP. Genomic alterations in cervical carcinoma: losses of chromosome



heterozygosity and human papillomavirus tumor status. *Cancer Research* 1996; 56: 197-205.

255. Kersemaekers AM, Kenter GG, Hermans J, Fleuren GJ, and van de Vijver. Allelic loss and prognosis in carcinoma of the uterine cervix. *International Journal of Cancer* 1998b; 79: 75-79.

256. Hueber A, Zornig M, Lyon D, Suda T, Nagata S and Evan GI. Requirement for CD95 receptor-ligand pathway in c-myc-induced apoptosis. *Science* 1997; 278: 1305-1309.

257. Chuaqui R, Silva M, Emmert-Buck M. Allelic deletion mapping on chromosome 6q and X chromosome inactivation clonality patterns in cervical intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma. *Gynecol Oncol* 2001; 80(3): 364-71.

258. Thein A, Trkova M, Fox M, Parrington J. The application of comparative genomic hybridization to previously karyotyped cervical cancer cell lines. *Cancer Genetics Cytogenetics* 2000; 116(1): 59-65.

259. Mark HF, Feldman D, Samy M, Sun C, Das S, Mark S, Lathrop J. Assessment of chromosome 8 copy number in cervical cancer by fluorescent in situ hybridization. *Exp Mol Pathol* 1999; 66(2): 157-62.

260. Mark HF, Hann E, Mikumo R, Lauchlan S, Beauregard L, Braun L. Cytogenetic characterization of three cell lines derived from primary cervical tumors. *Ann Clin Lab Sci* 1995; 25(2): 185-9.

261. Gilles C, Piette J, Rombonts S, Laurent C, Foidart JM. Immortalization of human cervical keratinocytes by human papillomavirus type 33. *International Journal of Cancer* 1993; 53(5): 872-9.

262. Dellas A, Tohorst J, Jiang F, Proffitt J, Schultheiss E, Holzgreve W, Sauter G, Mihatsch MJ, Mosch H. Prognostic value of genomic alterations in invasive cervical squamous cell carcinoma of clinical stage IB detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Research* 1999; 59(14): 3475-9.

263. Smits HL, Raadsheer E, Rood I, Mehendale S, Slater RM, VanDer Noordaa J, Ter Schegget J. Induction of anchorage-independent growth of human embryonic fibroblasts with a deletion in the short arm of chromosome 11 by human papillomavirus type 16 DNA. *Journal of Virology* 1988; 62: 4538-4543.

264. Bethwaite PB, Koreth J, Herrington Cs, McGee JOD. Loss of heterozygosity occurs at the D11S29 locus on chromosome 11q23 in invasive cervical carcinoma. *British Journal of Cancer* 1995; 71: 814-18.



265. Kurzrock R, Ku S, Talpaz M. Abnormalities in the PRAD1 (CYCLIN D1/BCL1) oncogene are frequent in cervical and vulvar squamous cell carcinoma cell lines. *Cancer* 1995; 75:584-590.
266. Kurtycz D, Nunez M, Arts T, Bauman C, Harris C, Inhom S, Meisner L. Use of fluorescent in situ hybridization to detect aneuploidy in cervical dysplasia. *Diagnostic Cytopathology* 1996; 15(1):46-51.
267. Atkin NB, Baker MC. Derivative chromosome, der(17;22)(q10;q10), in two carcinomas of the cervix uteri and one of the skin. *Cancer Genetics Cytogenetics* 1994; 74: 153-155.
268. Park S, Kang Y, Kim B, Lee K, Park K and Lee J. Loss of heterozygosity on the short arm of chromosome 17 in uterine cervical carcinomas. *Cancer Genetics Cytogenetics* 1995; 79: 74-78.
269. Kudo K, Sato S, Yokoyama Y, Fukushi Y, Maruyama H, Saito Y. Clinical significance of numerical aberrations on chromosome 17 in uterine cervical and endometrial neoplasias. *Eur J Gynaecol Oncol* 2000; 491-3.
270. Southern SA, Herrington CS. Interphase karyotypic analysis of chromosomes 11, 17 and X in invasive squamous-cell carcinoma of the cervix: morphological correlation with HPV infection. *International Journal of Cancer* 1997; 70(5): 502-7.
271. Hariu H, Matsuta M. Cervical ccytology by means of fluorescence in situ hybridization with a set of chromosome-specific DNA probes. *J Obstet Gynaecol Res* 1996; 22(2): 163-70.
272. Mitelman F, Mertens F and Johansson B. A breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia. *Nat Genet* 1997; 15:417-74.
273. Μελέτη των αριθμητικών ανωμαλιών του χρωμοσώματος 17 και της ενίσχυσης του γονιδίου C-erbB-2 σε υπερπλαστικές αλλοιώσεις και καρκινώματα του μαστού με τη μέθοδο FISH. Σούφη Μ, Μπάη Μ, Ντέμου Α, Καμηνά Σ, Ζαγοριανάκου Π, και Αγκνάντη Ν.Ι. *Αρχεία Παθολογικής Ανατομικής* 2000; 14(6): 442.
274. Micale MA, Visscher DW, Gulino SE, Wolman SR. Chromosomal aneyploidy in proliferative breast disease. *Human Pathology* 1994; 25: 29-35.
275. Hanna W, Kahn HJ, Pienkowska M, Blondal J, Seth A, Marks A. Defining a test for HER-2/neu evaluation in breast cancer in the diagnostic setting, *Modern Pathology* 2001; 14(7): 677-85.
276. Ridolfi RL, Jamehdor MR, Arber JM. HER-2/neu testing in breast carcinoma: a combined immunohistochemical and fluorescence in situ hybridisation approach. *Modern Pathology* 2000; 13(8): 866-73.



277. Pecoraro G, Lee M, Morgan D, Defendi V. Evolution of in vitro transformation and tumorigenesis of HPV16 and HPV18 immortalized primary cervical epithelial cells. *American Journal of Pathology* 1991; 138: 1-8.
278. Durst M, Gallahan D, Jay G, Rhim JS. Glycocorticoid-enhanced neoplastic transformation of human keratinocytes by human papillomavirus type 16 and an activated ras oncogene. *Virology* 1989; 173: 767-71.
279. Larson AA, Liao SY, Stanbridgen EJ, Cavenee WK, Hampton GM. Genetic alterations accumulate during cervical tumorigenesis and indicate a common origin for multifocal lesions. *Cancer Research* 1997; 57: 4171-76.
280. Skylberg B, Fujioka K, Hellstrom AC, Sylven L, Moberger B, Auer G. Human papillomavirus infection, centrosome aberration, and genetic stability in cervical lesions. *Modern Pathology* 2001; 14: 279-84.
281. Thorland E.C., Myers S.L., Persing D.H., Sarkar G., Mc Govern R.M., Gostout B.S., and Smith D.I. Human Papillomavirus type 16 integrations in cervical tumors frequently occur in common fragile sites. *Cancer Research* 2000; 60: 5916-21.
282. Van de Vijver MJ. Assessment of the need and appropriate method for testing for the human epidermal growth factor receptor-2(HER2). *European Journal of Cancer* 2001;37:S11-S17.
283. Hanna W, Kahn HJ, Trudeau M. Evaluation of HER-2/neu(erbB-2) status in breast cancer: From bench to bedside. *Modern Pathology* 1999; 12(8):827-834.

