

COLLEGIUM MEDICUM UNIwersYTETU JAGIELLOŃSKIEGO  
W KRAKOWIE

**Sława Szostek**

**NOWOCZESNE METODY WYKRYWANIA ZAKAŻEŃ  
DRÓG RODNYCH WYWOŁANYCH WIRUSEM  
PAPILLOMA**

Rozprawa doktorska

**Promotor: Prof. dr hab. med. Izabella Zgórniak-Nowosielska**

Praca wykonana  
w Zakładzie Wirusologii Instytutu Mikrobiologii  
Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego  
w Krakowie

Kraków 1997

Bibl. Medyczna CM UJ



1816095446

Pani Profesor dr hab. med.  
**Izabelli Zgórniak-Nowosielskiej**  
składam serdeczne podziękowania  
za wszechstronną pomoc i cenne rady  
na każdym etapie wykonywanej pracy

## SPIS TREŚCI

<b>1.</b>	<b>Wstęp</b>	<b>4</b>
1.1	Rys historyczny	4
1.2.	Charakterystyka ludzkiego wirusa Papilloma i klasyfikacja	5
1.3.	Replikacja wirusowego DNA	8
1.4.	Postaci kliniczne zakażenia HPV	9
1.5.	Udział zakażenia HPV w karcinogenezie narządu rodneg	12
1.6.	Wykrywanie zakażeń HPV	19
1.7.	Leczenie i profilaktyka zakażeń HPV	22
<b>2.</b>	<b>Cel pracy</b>	<b>25</b>
<b>3.</b>	<b>Materiały i metody</b>	<b>26</b>
3.1.	Materiał kliniczny	26
3.2.	Odczynniki	27
3.3.	Enzymy i antybiotyki	28
3.4.	Pożywki i roztwory	29
3.5.	Stosowane metody	32
3.5.1.	Izolacja DNA z komórek nabłonka szyjki macicy	32
3.5.2.	Izolacja DNA ze skrawków parafinowych	33
3.5.3.	Wykrywanie antygenu kapsydowego HPV metodą immunoperoxy- dazową	33
3.5.4.	Wykrywanie DNA HPV metodą hybrydyzacji in situ z zastosowaniem sond znakowanych biotyną	34
3.5.5.	Przygotowanie sondy znakowanej <sup>32</sup> P zawierającej DNA HPV 16	34
3.5.5.1.	Izolacja plazmidowego DNA zawierającego insert DNA HPV 16	35
3.5.5.2.	Elektroforeza w żelu agarozowym	36

3.5.5.3.	Znakowanie DNA metodą "nick translation"	36
3.5.6.	Wykrywanie DNA HPV 16 metodą hybrydyzacji in situ z zastosowaniem sondy znakowanej <sup>32</sup> P.	36
3.5.7.	Amplifikacja DNA HPV 16 przy pomocy metody PCR	37
3.5.8.	Analiza produktów PCR	38
3.5.8.1.	Hybrydyzacja produktów PCR metodą Southern blot	38
3.5.9.	Wykrywanie DNA HPV metodą dot blot	39
3.5.10.	Wykazanie nadekspresji białka p53 metodą immunohistochemiczną	39
3.5.11.	Metody statystyczne	40
<b>4.</b>	<b>Wyniki</b>	<b>41</b>
4.1.	Wykrywanie zakażenia HPV w komórkach nabłonkowych szyjki macicy - porównanie wyników stosowanych metod	41
4.2.	Wykazanie zakażenia HPV w skrawkach parafinowych materiału biopsyjnego szyjki macicy - analiza wyników stosowanych metod	42
4.3.	Detekcja nadekspresji białka p53 metodą immunohistochemiczną u chorych zakażonych i niezakażonych HPV.	44
<b>5.</b>	<b>Dyskusja</b>	<b>46</b>
<b>6.</b>	<b>Wnioski</b>	<b>56</b>
<b>7.</b>	<b>Streszczenie</b>	<b>58</b>
<b>8.</b>	<b>Ryciny, tabele i dokumentacja fotograficzna</b>	<b>62</b>
<b>9.</b>	<b>Wykaz używanych skrótów</b>	<b>80</b>
<b>10.</b>	<b>Piśmiennictwo</b>	<b>81</b>

## 1. Wstęp

### 1.1. Rys historyczny

Zmiany kliniczne na skórze takie jak brodawki skórne i kłykciny kończyste znane już były w starożytności, natomiast ich wirusowa etiologia została ustalona dopiero w 1907 r. na podstawie eksperymentalnego zakażenia człowieka, bezkomórkowym ekstraktem uzyskanym z brodawki innej osoby (cyt. wg 116). Następnie na podstawie charakterystycznego obrazu histologicznego potwierdzono występowanie brodawek w różnych miejscach na ciele człowieka, głównie na skórze, narządach płciowych i w układzie oddechowym, jak również u wielu gatunków zwierząt (129).

W 1933 r. R. Shop wykazał onkogenne własności wirusa *Papilloma* występującego u królików. Wirus ten zwany obecnie wirusem Shop'a w warunkach naturalnych występuje w zmianach skórnych u królików bawelnianoogonowych, a po przeniesieniu na króliki domowe powoduje powstawanie brodawczaków prowadzących do zmian nowotworowych (cyt. wg 116).

W mikroskopie elektronowym po raz pierwszy stwierdzono obecność cząstek wirusowych w materiale z brodawek skórnych w 1949 r., a dwadzieścia lat później w preparatach z brodawek występujących na narządach płciowych. Dalszy rozwój badań był jednakże ograniczony z powodu braku modelu *in vitro*, w którym można by namnożyć wirusy. Sądzone więc, że istnieje tylko jeden wirus *Papilloma* odpowiedzialny za zmiany rozrostowe na skórze i błonach śluzowych.

Dopiero wprowadzenie technik biologii molekularnej w latach 70-tych pozwoliło na scharakteryzowanie sekwencji wirusowego DNA i rozróżnienie typów wirusa.

## 1.2. Charakterystyka ludzkiego wirusa *Papilloma* i klasyfikacja

Wirusy *Papilloma* charakteryzują się specyficzną gatunkową. Do tej pory nie powiodły się próby przeniesienia zakażenia ludzkim wirusem *Papilloma* na zwierzęta. Ten wysoki stopień swoistości wirusa obserwuje się także u szczepów zwierzęcych. Wyjątek stanowią wirusy bydłące, które mogą zakażać również konie (90).

Ludzki wirus *Papilloma* (HPV) należy do rodziny *Papovaviridae*, rodzaju *Papillomavirus*. Rodzaj ten obejmuje wirusy patogenne dla ludzi, ssaków i ptaków. Wirus HPV o średnicy 52-55nm nie posiada osłonki, jest złożony z 72 kapsomerów. Symetria kapsydu jest kubiczna o kształcie dwudziestościanu. Genom wirusa stanowi podwójna nić kolistego kwasu dezoksyrybonukleinowego (DNA), zbudowana z 8000 par zasad (pb) o ciężarze molekularnym  $5,2 \times 10^6$  daltonów (129)

Badania molekularne sekwencji genomu wykazały istnienie wielu typów wirusa. Poszczególne typy w obrębie gatunku zostały pierwotnie sklasyfikowane na podstawie analizy stopnia homologii DNA badanego wirusa do wcześniej poznanego. Za nowy typ uznawano wirus, którego sekwencje DNA wykazywały niższą niż 50% zdolność do hybrydyzacji z sekwencją znanego typu, określano go kolejnym numerem, w zależności od kolejności wykrycia.

Obecnie podział na typy i podtypy ustala się na podstawie porównania sekwencji nukleotydów w otwartych ramach odczytu (ORF) E6, E7, L1 badanego typu wirusa i wszystkich znanych typów HPV. Zgodność przekraczająca 90% w którymkolwiek z porównywanych ORF pozwala na zakwalifikowanie badanego wirusa do danego typu; różnice sekwencji w podtypach wynoszą 2%-10%, natomiast pomiędzy wariantami mniej niż 2% (15,148). Do tej pory znanych jest ponad 80 typów HPV (15,33,149).

Pomimo różnic w sekwencji DNA poszczególnych typów HPV organizacja genomu wszystkich wirusów *Papilloma* jest podobna i składa się z trzech regionów (Ryc.1);

- region wczesny (E) kodujący białka biorące udział w procesach replikacji i transkrypcji wirusowych genów,
- region późny (L) kodujący duże i małe białka wirusowego kapsydu.,
- region regulatorowy zwany też długim regionem kontrolnym (LCR - Long Control Region lub URR - Upstream Regulatory Region) , zawierający sekwencje niekodujące (ok.1000 bp), który kontroluje replikację wirusowego DNA i transkrypcję wirusowych genów.

Region późny (L) koduje dwie otwarte ramki odczytu (ORF) oznaczone L1 i L2, produktami których są strukturalne białka wirusa. Geny L1 i L2 ulegają ekspresji tylko w dojrzałych keratynocytach.

- L1 (ORF) jest najbardziej niezmiennym regionem w genomie wirusów *Papilloma*. Jego rola to kodowanie dużego białka kapsydu o masie 70 kD. Białko L1 stanowi 80% całkowitego białka wirusowego. Jest silnie glikozylowane co przypuszczalnie pomaga w stabilizacji struktury cząstek wirusa i zawiera grupowo specyficzne determinanty antygenowe.
- L2 (ORF) koduje małe białko kapsydu o masie cząsteczkowej 55 kD. Determinanty antygenowe L2 nie wykazują reakcji z białkami innych wirusów nawet z wirusami tej samej grupy.

Region wczesny (E) koduje do 8 różnych otwartych ramek odczytu. Poznano do tej pory funkcję sześciu spośród nich: E1, E2, E4, E5, E6 i E7.

- E1(ORF) jest największą ramką odczytu w genomie wirusów *Papilloma*. 3' E1(ORF) koduje gen R, którego produkt białkowy jest niezbędny do replikacji wirusowego DNA, natomiast 5' E1 (ORF) koduje białko pełniące rolę modulatora replikacji (białko M), które jest konieczne we wczesnej fazie replikacji jak również do stabilizacji wirusowego DNA w formie episomalnej (132).
- E2 (ORF) bierze udział w regulacji transkrypcji jak również replikacji wirusowego DNA. Produktami E2 są trzy białka: jedno o masie 48 kD

pełniące funkcję transaktywatora transkrypcji oraz białka o masie 31 i 28 kD, które są represorami transkrypcji (89).

Pełnej długości białko E2 może także nieznacznie aktywować transkrypcję genów w promotorach innych wirusów oraz w promotorach genów z komórek ssaków, nawet pozbawionych miejsc wiążących E2. Obecność jednak jednego miejsca wiązania dla białka E2 w promotorach genów z komórek ssaków zwiększa tempo transkrypcji 6-cio krotnie, natomiast dwóch miejsc wiążących od 20 do 100 krotnie. Sugeruje to, że kompleks dwóch dimerów E2 związany z DNA jest formą funkcjonalną białka E2.

Dwa dimery białka E2 związane z dwoma odległymi miejscami w cząsteczce DNA mogą także wzajemnie oddziaływać. W wyniku tych oddziaływań w DNA tworzą się pętle ułatwiające zbliżenie i oddziaływanie odlegle związanych z DNA dimerów białka E2 ze składnikami kompleksu transkrypcyjnego, polimerazą RNA II oraz licznymi aktywatorami i koaktywatorami transkrypcji.

Wykazano, że aktywacja transkrypcji przy udziale białka E2 znacznie zwiększa się w obecności aktywatorów transkrypcji genów komórkowych poprzez wiązanie się ze specyficznymi sekwencjami w cząsteczce DNA, jak również przez oddziaływanie z licznymi białkami komórkowymi, tworząc struktury ułatwiające reakcję polimerazy RNA z promotorem.

Mechanizm aktywacji transkrypcji przy udziale białka E2 jak również rola komórkowych czynników transkrypcyjnych w tym procesie nie są w pełni poznane (23,51).

- E4 (ORF) prawdopodobnie odgrywa ważną rolę w dojrzewaniu cząstek wirusa na co wskazuje wykrycie mRNA E4 (ORF) wśród transkryptów genów późnych.
- E5 (ORF) koduje hydrofobowe białko o ciężarze 10 kD o własnościach transformujących m.in. fibroblasty mysie. Białko E5 w połączeniu z EGF (epidermal growth factor) indukuje proliferację komórek nabłonkowych (36).
- E6 i E7 (ORF) kodują dwa małe białka o własnościach transformujących, zaliczane do wirusowych białek onkogennych.



Zarówno białko E6 jak i E7 zawierają w swojej budowie moduł o strukturze palców cynkowych, w których reszty cysteiny połączone są z atomem cynku. Przy czym białko E6 zawiera dwa takie moduły, a białko E7 tylko jeden.

Poza tym w strukturze obu białek można wyróżnić regiony oddziałujące z produktami komórkowych genów supresorowych. Białko E6 ma zdolność łączenia się z białkiem p53, a E7 z białkiem Rb. Mechanizm tych oddziaływań omówiono w dalszej części pracy.

### **1.3. Replikacja wirusowego DNA.**

Replikacja wirusowego DNA jest procesem regulowanym przez białka wirusowe jak również komórkowe i zależy od stopnia zróżnicowania komórek nabłonka wielowarstwowego płaskiego. W niedojrzałych keratynocytach replikacja episomalnej formy DNA zachodzi raz w ciągu jednego cyklu komórkowego. Całkowita replikacja wirusowego DNA oraz wytwarzanie cząstek potomnych przebiega tylko w dojrzałych keratynocytach. Badania wykonane metodą hybrydyzacji in situ wykazały, że transkrypty genów wczesnych wykrywane są w warstwie podstawnej nabłonka natomiast ekspresję genów późnych stwierdza się tylko w warstwie powierzchniowej (134).

W regulacji replikacji wirusa biorą udział wirusowe białka E1 i E2 (154). Białko E1 wykazuje aktywność adenzyno i guanozyno trójfosfatazy oraz helikazy. Kompleksacja białka E1 z E2 wyraźnie stymuluje jego aktywność co prawdopodobnie spowodowane jest przemianą allosteryczną E1 (143). Następnie powstały kompleks wiąże się specyficznie z sekwencjami regionu regulatorowego wirusa. Zostały poznane w rejonie URR sekwencje wirusowego DNA zdolne do zapoczątkowania wirusowej replikacji i jej regulacji (147).

Uszkodzenie struktury DNA w obrębie E2 ORF wirusa prowadzi do integracji wirusowego DNA do genomu gospodarza. Skutkiem tego jest niekontrolowany wzrost poziomu w komórce onkogennych białek E6 i E7.

#### 1.4. Postaci kliniczne zakażenia HPV

Wśród postaci klinicznych zakażenia HPV wyróżnić można brodawki skórne, które są przenoszone przez kontakt bezpośredni z osobą zakażoną lub pośrednio przez kontakt z zakażonymi przedmiotami. Są one najbardziej rozpowszechnione u dzieci i młodzieży. Ustępują często samoistnie w ciągu 2 lat od zakażenia. Najczęściej izoluje się z tych zmian HPV typu 1, 2, 3, 4, 10 rzadziej HPV 7, 26, 27, 28 (33,69).

Inną postacią zakażenia skóry jest epidermodysplasia verruciformis (EV). Przyjmuje się, że czynnikami etiologicznymi tej rzadkiej choroby są typy wirusa HPV 5, 8, 9, 12, 14, 15, 19-25. Choroba ta stanowi doskonały model do badań onkogenezy wirusowej u ludzi. Zmiany pojawiają się w dzieciństwie, nie ustępują, stopniowo obejmują całą skórę. Brodawki występują w dwóch postaciach, jako brodawki płaskie zawierające antygeny wirusów HPV 3, 10 oraz w postaci czerwonych lub czerwono-brązowych plamek, zawierających genomy conajmniej 17-stu innych wirusów HPV, spośród których HPV 5, 8 i 14 mają potencjalne własności onkogenne (76).

Średnio po 25 latach od początku choroby u 33% chorych rozwijają się nowotwory skóry, które występują głównie na odsłoniętych częściach ciała. Lokalizacja ta wskazuje na prawdopodobną karcinogenną rolę promieni ultrafioletowych, a mechanizm onkogenego działania UVB polega przypuszczalnie na lokalnym działaniu immunosupresyjnym. U większości chorych z EV obniżona jest odporność typu komórkowego co ułatwia infekcję wirusami HPV (94).

Analogiczne typy wirusów HPV, które występują w EV są wykazywane w brodawkach i rakach płaskonabłonkowych u biorców przeszczepów oraz u pacjentów z chorobą Hodgkin'a (6,54).

Zakażenia w obrębie układu oddechowego objawiają się głównie brodawczakami krtani umiejscowionymi na strunach głosowych jak również w tchawicy, płucach, nosie, jamie ustnej. Jest to rzadka choroba, ale ze względu na swą lokalizację i nawrotowy charakter, bardzo uciążliwa.

Obecnie wiadomo, że czynnikami etiologicznymi brodawczaków układu oddechowego są wirusy HPV 6 i HPV 11 (1). Wirusowy genom występuje w formie episomalnej i jest wykrywany również w normalnym nabłonku przylegającym do brodawczaka. Brodawczaki w układzie oddechowym występują u ludzi w różnym wieku, ale zwraca się uwagę na wysokie ryzyko zakażeń u dzieci poniżej 5 roku życia.

Inną postacią zakażenia, występującego na błonie śluzowej jamy ustnej jest choroba Hecka. Są to grudkowe zmiany w obrębie błon śluzowych jamy ustnej, występujące endemicznie u Eskimosów, w niektórych krajach Afryki, Ameryki, rzadko w Europie. Czynnikiem wywołującym zmiany są swoiste dla tej jednostki chorobowej wirusy HPV 13 i 32 (129).

Obecnie znanych jest ponad 30 typów HPV związanych ze zmianami występującymi w obrębie narządów płciowych i odbytu (33,158). Udowodniono, że zakażenie jest przenoszone drogą kontaktu płciowego, chociaż istnieje możliwość nieseksualnej transmisji wirusa (43).

Zakażenia dotyczą przede wszystkim osób młodych, aktywnych seksualnie. Istnieje korelacja między ryzykiem wystąpienia zmian a liczbą partnerów i młodym wiekiem rozpoczęcia kontaktów seksualnych. Zaobserwowano, że u 60% partnerów seksualnych osób zakażonych, brodawki pojawiają się w ciągu 3 miesięcy (116).

Coraz częściej opisywane są przypadki występowania kłykcin kończystych u dzieci przed okresem dojrzewania. Może to być zakażenie od matki w okresie okołoporodowym lub od zakażonych osób pielęgnujących dzieci. Konsekwencją zakażenia noworodka mogą być brodawczaki krtani, podniebienia miękkiego i spojówek oczu (21,48).

Infekcja narządów płciowych wirusami HPV może przebiegać w postaci objawowej, subklinicznej i utajonej. W objawowej postaci obserwowane są kalafiorowate zmiany rozrostowe, występujące głównie na zewnętrznych narządach płciowych, zwane kłykciną kończystą. Natomiast kłykciny płaskie wykazywane

badaniem kolposkopowym i/lub badaniem histopatologicznym, uważane są za postać subkliniczną. Postać utajoną zakażenia można natomiast stwierdzić jedynie przy pomocy metod wykazujących DNA HPV (116).

U mężczyzn zmiany występują na żołędzi, prąciu, mosznie, odbycie, u ok. 5% w cewce moczowej, u kobiet na sromie i w pochwie. Na szyjce macicy rzadko obserwuje się zmiany egzofityczne, głównie występują zmiany subkliniczne.

Morfologicznym wykładnikiem zakażenia nabłonka szyjki macicy wirusami HPV jest koilocytoza. Występujące w rozmazach cytologicznych koilocyty są komórkami warstwy pośredniej, zawierają jedno lub więcej hiperchromatycznych nieregularnych jąder otoczonych charakterystycznym przejaśnieniem cytoplazmy tzw. halo. Towarzyszące im często komórki z cechami dyskeratozy mają zagęszczoną cytoplazmę i małe, czasami nieregularne jądro (100). Niektórzy autorzy na podstawie badań kolposkopowych i histopatologicznych wyodrębniają 5 postaci zmian patologicznych w obrębie szyjki macicy, związanych z zakażeniem HPV: kłykcinę kończystą, kłykcinę płaską, kłykcinę o wzroście odwróconym, kłykcinę atypową i niedojrzałą atypową metaplazję (28,31,101). Najczęściej występującą zmianą jest kłykciną płaską, zaś pozostałe zdarzają się znacznie rzadziej.

Kłykciną kończystą związane są z zakażeniem HPV 6 i 11 (33). Zmiany te mają na ogół charakter łagodny, chociaż opisano przypadki wystąpienia zmian nowotworowych w postaci raka kolczystokomórkowego tzw. kłykciną olbrzymiej Büschke-Löwensteina, która w wyjątkowych przypadkach daje przerzuty np. do węzłów chłonnych (70).

Meisels i wsp. (101) zwrócili uwagę iż często dysplazja małego stopnia występująca w nabłonku szyjki macicy jest w istocie kłykciną płaską. W dysplazjach zaawansowanych i rakach okolicy analno-genitalnej, a szczególnie w rakach szyjki macicy najczęściej wykrywanym wirusem jest HPV 16 i 18, rzadziej 31,33,35,45,51,52,56 (33,158). Tę grupę wirusów wykryto również w przerzutach raka szyjki macicy do węzłów chłonnych oraz w komórkach otrzewnowych pobranych od chorych (45,91). W rakach inwazyjnych wykrywa się znacznie częściej

HPV 16 (50-60%) aniżeli HPV 18 (10-20%) oraz pozostałe typy wirusa (15%) (129,157). Kautski i wsp. (78) analizując wyniki 21 publikacji stwierdzili przewagę typów 16 i 18 w zaawansowanych zmianach przedrakowych i rakach inwazyjnych dotyczących szyjki macicy, sromu, prącia i odbytu. Obydwa typy wirusa są wykazywane w komórkach raka płaskonabłonkowego oraz raka gruczołowego szyjki macicy. W większości badanych przypadków raka szyjki macicy i hodowli uzyskanych z tych komórek stwierdzono obecność wirusowego DNA wbudowanego w genom komórki nowotworowej (22,96). Proces integracji wpływa na ekspresję wirusowych genów E6 i E7, które w badaniach *in vitro* okazały się odpowiedzialne za unieśmiertnienie keratynocytów napletka lub szyjki macicy (109,131,152). W hodowlach organotypowych te unieśmiertnione komórki przypominają śródnabłonkową neoplazję (152).

### **1.5. Udział zakażenia HPV w karcinogenezie narządu rodnego**

Na podstawie częstości występowania określonych typów HPV w zmianach przednowotworowych to jest w śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy i w raku szyjki macicy, podzielono wirusy na trzy grupy (93) :

I grupa HPV 6,11,42,43,44 - typy o niskim potencjale onkogennym, występujące głównie w kłykcinach, CIN1, rzadko w raku;

II grupa HPV 31,33,35,59,45,51,52,56 - typy o średnim potencjale onkogennym, występujące w kłykcinach, CIN oraz 20-25% przypadków raka szyjki macicy,

III grupa HPV 16 i 18 - typy o wysokim potencjale onkogennym, najsilniej związane z rakiem inwazyjnym, izolowane w 50-70% przypadków raka szyjki macicy pochwy, sromu, okolicy analnej oraz narządów płciowych męskich.

W transformacji nowotworowej komórek biorą udział głównie produkty genów wczesnych HPV czyli białka E6 i E7. W celu zbadania zdolności białek E6 i E7 HPV 16 i 18 do immortalizacji i transformacji komórek *in vitro*, użyto ustalonych

lini komórkowych gryzoni NIH3T3, pierwotnych hodowli fibroblastów gryzoni i keratynocytów ludzkich.

Wykazano, że białka E7 HPV o wysokim potencjale onkogennym same indukują ogniska wzrostu komórek w ustalonej lini fibroblastów szczurzych jak i komórek NIH3T3 (111). Komórki NIH3T3 po kotransfekcji plazmidem z ekspresją genu E7 HPV 16 nie wykazywały hamowania kontaktowego wzrostu i były onkogenne dla bezgrasiczych myszy. Podobnie jak adenowirusowe białko E1A tak E7 HPV 16 może współdziałać z innymi onkogenami na przykład aktywując onkogen *ras* w transformacji pierwotnych komórek gryzoni (95). Uważa się, że dla pełnej transformacji komórek konieczny jest aktywny produkt genu *ras* lub *fos*. Stwierdzono również, że dla utrzymania transformowanego fenotypu pierwotnych komórek gryzoni wymagana jest stała ekspresja E7 (24).

Wykazano współdziałanie białka E6 z E7 w immortalizacji ludzkich keratynocytów. Białko E6 HPV o wysokim potencjale onkogennym może samodzielnie doprowadzić do immortalizacji komórek nabłonkowych sutka (3), jak również może współdziałać z aktywnym onkogenem *ras* w transformacji pierwotnych komórek myszy (136).

Wyniki eksperymentów przeprowadzonych w hodowlach komórek zmobilizowały do dalszych badań w celu poznania białek E6 i E7 HPV i mechanizmów ich oddziaływania na cykl komórkowy.

Białko E7, 98-aminokwasowa fosfoproteina, strukturalnie i funkcjonalnie jest spokrewniona z białkiem E1A adenowirusa (119). Na podstawie analogii z budową E1A adenowirusa można wyróżnić w strukturze E7 trzy regiony: konserwatywny 1 (CR 1) i 2 (CR 2), występujące na N-końcu oraz konserwatywny region 3 (CR3) występujący na C-końcu białka E7 HPV 16.

Mutacje w regionach CR1 i CR2 powodują zanik zdolności białka E7 do transformacji komórek *in vitro*. W obrębie regionu CR3 znajdują się dwa moduły o strukturze palców cynkowych (4). Wywołanie mutacji w jednym z tych miejsc

powoduje zniesienie aktywności transformującej E7, ale nie wpływa na zdolność tego białka do łączenia się z produktem komórkowego genu supresorowego retinoblastomy, pRb (99).

Mutacje w obrębie genu supresorowego Rb po raz pierwszy zostały wykazane w przypadkach glejaka siatkówki (retinoblastoma), a później w innych nowotworach (8,52).

Produkt genu Rb jest jądrową fosfoproteiną o ciężarze 110 kD i posiada zdolność regulacji cyklu komórkowego przez oddziaływanie z czynnikiem transkrypcyjnym E2F (Ryc.2a). Czynnikiem E2F kontroluje proces transkrypcji kilku genów koniecznych do replikacji komórkowego DNA.

Badania LaThangue (88) doprowadziły do sklonowania E2F i białka DP tworzącego z nim heterodimer. Połączenie białka Rb z heterodimerem E2F/DP powoduje zahamowanie aktywności transkrypcyjnej E2F i pozostanie komórki w fazie G1(52,88). Łączenie i rozłączanie kompleksu E2F/RB jest kontrolowane przez procesy fosforylacji i defosforylacji białka Rb. Na granicy faz G1/S, białko Rb jest fosforylowane przez kompleks białek kinazy składających się z cyklino-zależnej kinazy (CDK) i cykliny, to powoduje jego odłączenie od E2F. Wykazano, że nadekspresja cyklin A i E pobudza fosforylację białka Rb (66), natomiast działanie cyklin D1, D2, D3 jest dużo słabsze (42).

Działanie wirusowej onkoproteiny E7 HPV polega na łączeniu się jej z białkiem Rb, co powoduje uwalnianie czynnika transkrypcyjnego E2F z kompleksu E2F/Rb (Ryc.2b) i pozwala na aktywację transkrypcji genów indukujących fazę S cyklu komórkowego (120).

Badania wykazały, że dwa geny t.j. b-myc i cyklina A związane z działaniem cyklu komórkowego są transaktywowane przez E7 HPV 16. W tym procesie bierze udział element E2F obecny w promotorze obydwu genów (87).

Porównując białka E7 wirusów Papilloma okazuje się, że białka E7 typów HPV o wysokim potencjale onkogennym mają średnio 10 razy wyższe powinowa-

ctwo do wiązania pRb niż E7 HPV o niskim potencjale onkogennym (127), jest to związane z ich zdolnościami immortalizującymi (62).

Białka E7 HPV 6 i HPV 11 mają słabszy wpływ na transformację pierwotnych komórek gryzoni (135) jak również na immortalizację ludzkich keratynocytów (57). To tłumaczy się ich niskim powinowactwem do pRb i małą skutecznością w rozrywaniu kompleksu E2F/Rb w porównaniu z E7 HPV o wysokim potencjale onkogennym (110).

Miejsca wiążące pRb znajdujące się w białku E7 wirusów HPV o wysokim jak i niskim potencjale onkogennym różnią się jednym aminokwasem. Domena E7 HPV16 zawiera kwas asparaginowy w pozycji 21 natomiast HPV 6 i HPV11 glicynę w pozycji 22. Badania w których podstawiono glicynę kwasem asparaginowym w białku E7 HPV 6 wykazały zwiększenie zdolności tego białka do wiązania z pRb, a w analogicznym doświadczeniu z udziałem genu ras stwierdzono proliferację komórek gryzoni (62).

Nie zawsze jest zachowana zależność pomiędzy siłą wiązania pE7 z pRb, a aktywnością transformacyjną. Białko E7 wirusa HPV1, który z reguły nie występuje w zmianach nowotworowych, zawiera w regionie wiążącym pRb kwas asparaginowy i wiąże pRb *in vitro* i *in vivo* z tą samą zdolnością co E7 HPV 16 (18). Pomimo to E7 HPV 1 nie wykazuje żadnej aktywności w transformacji pierwotnych komórek gryzoni w kooperacji z onkogenem ras (18). Możliwe jest, że istnieją jeszcze inne regiony w białku E7 HPV 16, które mogą brać udział w transformacji nowotworowej komórek.

Białko E7 HPV oddziałuje nie tylko z pRb, ale również z innymi białkami należącymi do tzw. rodziny białek związanych z Rb. Dotychczas poznano dwa takie białka p107 i p130 (98,156), są one odpowiedzialne za regulację aktywności transkrypcyjnej członków rodziny E2F w różnych fazach cyklu komórkowego. Białko p130 jest regulatorem w miejscu przejścia komórki z fazy G0 w fazę G1 (20), natomiast p107 jest aktywne na granicy faz G1/S i w fazie G2 cyklu komórkowego.



Mechanizm działania p107 polega na wiązaniu cykliny E lub kompleksu cyklina A/CDK2 w późnej fazie G1 i w fazie S (108). Nie wiadomo jeszcze jaką rolę w tym kompleksie odgrywa cyklina E lub kompleks cyklina A/CDK2.

Wirusy Papilloma o niskim potencjale onkogennym wiążą p107 z niższym powinowactwem niż E7 HPV o wysokim potencjale onkogennym (18). Białka E7 HPV16 mają zdolność łączenia się zarówno z p107 jak i p130 (32). W fazie S cyklu komórkowego pE7 przyłącza się do kompleksu białek komórkowych p107/cyklina A/CDK2 związanych z E2F. W podobnej sytuacji adenowirusowe białko E1A wiąże się z p107 powodując uwalnianie czynnika transkrypcyjnego E2F (2,41,117).

Białko E7 HPV poprzez swoje oddziaływanie z pRb i białkami z rodziny pRb tj. p107 i p130, odgrywa rolę w kontrolowaniu wczesnych faz cyklu komórkowego. Uważa się, że istnieje również możliwość ingerencji pE7 HPV w późne fazy cyklu komórkowego, po replikacji DNA (144).

Fizjologiczne znaczenie oddziaływania białka E7 z kompleksem kinazy komórkowej nie jest jeszcze w pełni wyjaśnione. Przypuszcza się, że pE7 powoduje odłączenie kinazy związanej z cykliną A od jej normalnych komórkowych substratów. Tę hipotezę potwierdzają wyniki badań, które wykazują, że kompleks cyklina A/CDK2 może bezpośrednio przyłączyć się do N-końcowej domeny E2F w fazie S bez udziału białek z rodziny Rb (81). W takiej sytuacji E2F aktywuje transkrypcję genów charakterystycznych dla fazy G1/S. W zdrowej komórce w fazie S transkrypcja tych genów jest wyłączona przez aktywny kompleks cyklina A/CDK2. To pozwala komórce na kontrolę prawidłowego przebiegu replikacji DNA i chronologii procesów w cyklu komórkowym.

Białko E7 łącząc się z kompleksem cyklina A/CDK2 prawdopodobnie zapobiega inaktywacji kompleksu E2F/DP w fazie S pozwalając komórce wymknąć się spod kontroli. Potwierdza to fakt, że pE7 HPV16 indukuje anomalie chromosomalne (150).

Przypuszcza się również, że pE7 łącząc się z kompleksem cyklina A/CDK2

powoduje przesunięcie katalitycznej funkcji kinazy na białka wirusowe. Kinaza fosforylując duże wirusowe białko replikacyjne E1, stymulowała by replikację wirusowego DNA (145).

Białko E6 HPV składa się z 151 aminokwasów, zlokalizowane jest w jądrze i we frakcji błony niejądrowej komórki. Charakterystyczną cechą w budowie tego białka jest obecność modułów o strukturze palców cynkowych (4). Białko E6 HPV o wysokim potencjale onkogennym podobne jak i inne wirusowe onkoproteiny tj. adenowirusowe białko E1B (pE1B), duży antygen T SV40, może tworzyć kompleksy z produktem genu supresorowego p53 powodując zaburzenie jego funkcji w cyklu komórkowym (155,103).

Badania molekularne genu supresorowego p53 wykazały, że jest to jeden z najczęściej zmutowanych genów występujących w ludzkich komórkach nowotworowych. Fizjologiczna rola p53 polega na zatrzymaniu cyklu komórkowego w fazie G1/S, w odpowiedzi na działanie uszkodzających DNA czynników tj. promieniowanie UV, jonizujące, promienie X (83,75). To pozwala komórce na naprawę uszkodzonego DNA przed jego replikacją.

Mechanizm działania białka p53 polega na transaktywacji genu WAF1 lub Cip 1, których produktem jest białko o masie 21 kDa. Produkt ten łącząc się z cyklinami G1 hamuje ich aktywność (61,39) powodując blokadę cyklu komórkowego.

Zaobserwowano, że średni czas półtrwania p53 w hodowli normalnych keratynocytów ludzkich wynosi 1-4 godzin natomiast w przypadku hodowli keratynocytów unieśmiertelnień przez E6 HPV 16 okres półtrwania jest krótszy (15-30 min), a poziom p53 niższy niż w komórkach pierwotnych (67).

Inkubacja lizatów retikulocytów króliczych zawierających białko E6 HPV 16 lub HPV 18 i białko p53 powoduje specyficzną degradację p53. Degradacji tej nie obserwuje się jeśli w badaniu użyte zostaną białka E6 HPV o niskim potencjale onkogennym (126). Jest niemożliwe przeprowadzenie degradacji białka p53 przez pE6 HPV 16 w ekstrakcie z kielków pszenicy dopiero dodanie do próby lizatu

retikulocytów króliczych doprowadza do rozpadu p53. Nasunęło to przypuszczenie, że aby doszło do degradacji p53 oprócz pE6 HPV muszą działać jeszcze dodatkowe czynniki.

Kolejne eksperymenty prowadzone metodą immunoprecypitacji wykazały w lizacie retikulocytów obecność monomerycznego białka o ciężarze 100 kDa tzw. białka E6-AP czyli białka związanego z pE6 (68) Okazało się, że ani białko E6 ani E6-AP nie może trwale wiązać się z p53. Trwały jest tylko potrójny kompleks E6/E6-AP/p53.

Wykazano, że w degradacji p53 wywołanej przez białka E6/E6-AP bierze udział układ ubiquityny.(63). Układ ubiquityny jest jak dotąd najlepiej poznanym pozalizosomalnym układem proteolitycznym, wykorzystującym energię ATP w procesie rozpadu białek. Białkiem charakterystycznym dla tego układu jest ubiquityna. Jest to polipeptyd składający się z 76 aminokwasów, który występuje w komórkach zarówno roślinnych jak i zwierzęcych. Ubiquityna tworzy kowalencyjne połączenie z substratami białkowymi przez co stają się one podatne na działanie proteaz. Ubiquitynacja jest procesem złożonym, w którym biorą udział 3 klasy białek. W pierwszym etapie dochodzi do aktywacji ubiquityny w obecności ATP. Aktywacji podlega grupa karbonylowa C-końcowej glicyny w cząsteczce ubiquityny. Następnym etapem jest reakcja aktywowanej ubiquityny z akceptorem. Akceptorem ubiquityny mogą być grupy aminowe N-końcowych aminokwasów lub grupy ε-aminowe lizyny substratów białkowych. Tworzy się wówczas wiązanie izopeptydowe, a powstający produkt ma charakter rozgałęziony (63). Trzeci etap jest słabo poznany, białka biorące w nim udział, prawdopodobnie wspomagają działanie enzymów drugiego etapu, na co wskazuje obecność na ich powierzchni miejsc wiążących dla substratów tych enzymów (37). Badania *in vitro* wykazały, że prawdopodobnie podobną rolę w degradacji p53 mają białka E6/E6-AP HPV, które ułatwiają łączenie się enzymów drugiego etapu ubiquitynacji z substratem jakim jest p53. Tę hipotezę potwierdzają eksperymenty, w których białko E6-AP wykorzystano do stymulacji rozpadu innych białek komórkowych

łącząc go z enzymami biorącymi udział w drugim etapie ubikitynacji (127).

Prace tych samych autorów (127) wykazały, że tylko białka E6 HPV 16 i 18 wykazują aktywność w procesie degradacji p53 *in vitro*. Białka E6 HPV o niskim potencjale onkogennym mogą wiązać się z p53 ale to nie wyzwała reakcji enzymatycznych układu ubikityny (25).

Omówione powyżej prace wskazują na udział białek wirusowych tj. E6 i E7 HPV, E1A i E1B adenowirusów, antygen T wirusa SV40 w regulacji aktywności genów supresorowych p53 i Rb. Fakt, że różne wirusy DNA korzystają z tych samych mechanizmów regulacji cyklu komórkowego, pozwala sądzić, że mogą istnieć powiązania pomiędzy tymi procesami.

## **1.6. Wykrywanie zakażeń HPV**

Jak dotąd nie powiodły się próby namnożenia wirusów Papilloma w hodowlach komórkowych. Zakażenie hodowli ludzkich keratynocytów materiałem uzyskanym z brodawek prowadzi do replikacji wirusowego DNA, nie dochodzi jednak do syntezy białek wirusowego kapsydu (142). Nie obserwuje się także efektu cytopatycznego. Kolejne pasażę komórek hodowli prowadzą do utraty wirusowych transkryptów. Również w hodowli keratynocytów uzyskanych z brodawek nie stwierdzono powstawania pełnych cząstek wirusowych.

Jednakże uzyskano model doświadczalny, w którym udało się namnożyć jedynie HPV 11. Doświadczenie polegało na przeszczepieniu zakażonej tkanki nabłonka szyjki macicy lub napletka pod torebkę nerkową bezgranicznych myszom. Uzyskano po 3-6 miesiącach efekt cytopatyczny i rozrost tkanki przypominający wyglądem kłykcinę kończystą (80). W tym systemie są produkowane białka kapsydu i cząstki wirusowe HPV 11, natomiast nie udało się w tym modelu doświadczalnym namnożyć innych typów HPV.

W związku z trudnością uzyskania antygeny wirusowego w hodowlach *in vitro* nie mogą być stosowane standardowe metody serologiczne. Wykrycie infekcji

HPV stało się więc możliwe dopiero po wprowadzeniu metod stosowanych w biologii molekularnej.

Zastosowanie technik immunohistochemicznych pozwoliło na wykrycie grupowo swoistego antygenu kapsydowego lub białka L1 kapsydu wirusa w 37-80% patologicznych zmian szyjki macicy (84,130). Metoda immunopero-ksydazowa jest stosunkowo tania i łatwa do wykonania techniką, ale nie pozwala na odróżnienie typów wirusa. Poza tym istnieje możliwość, że w komórkach zakażonych przez HPV nie dochodzi do produkcji białek kapsydu wirusa.

Obecnie diagnostyka wirusologiczna zakażeń wywołanych przez HPV opiera się głównie na metodach hybrydyzacji wykazujących swoiste sekwencje DNA różnych typów wirusa. Najczęściej stosowane są : Southern blot, hybrydyzacja filter in situ , dot-blot lub slot-blot hybrydyzacja, hybrydyzacja in situ.

W metodzie hybrydyzacji Southern blot materiałem do badania jest DNA komórkowy pochodzący z wymazu szyjki macicy lub biopsji. DNA poddaje się działaniu enzymów restrykcyjnych. Otrzymane fragmenty DNA rozdziela się przy pomocy elektroforezy w żelu agarozowym, a po denaturacji i neutralizacji nanosi się na nitrocelulozowy filtr. Związane z filtrem DNA hybryduje się ze znakowaną, najczęściej radioaktywnie sondą, czyli ze znaną sekwencją wirusowego DNA.

Czułość tej metody zależy od ilości wirusowego DNA w komórce oraz specyficznej aktywności sondy i wynosi 0,1 - 0,001 kopii genomu HPV na komórkę (133,138). Metoda ta pozwala na określenie typu oraz formy wirusa (episomalnej lub zintegrowanej) w komórce. Southern blot jest techniką czasochłonną i wymagającą dużego nakładu pracy.

O wiele prostsze i szybsze w wykonaniu są metody slot-blot i dot-blot. Pominięty jest tu etap trawienia DNA enzymami restrykcyjnymi i etap rozdzielenia fragmentów w żelu agarozowym. Oczyszczona DNA jest bezpośrednio nakrapiana na filtr jako "dot"-kropla lub "slot"-śląd , denaturowane i hybrydyzowane ze znakowaną sondą. Metody te nadają się do szybkich badań przesiewowych (34). Wadą ich jest duży

odsetek fałszywie dodatnich wyników, natomiast czułość jest porównywalna z metodą Southern blot (129).

W metodzie hybrydyzacji "filter in situ" otrzymane komórki np. z wymazu szyjki macicy są przenoszone na filtr nitrocelulozowy i po ich utrwaleniu oraz denaturacji DNA, hybrydyzowane ze znakowaną sondą. Zaletą tej metody jest możliwość testowania wielu próbek w krótkim czasie. Natomiast czułość jej jest dość niska, oceniana na 50 a nawet więcej kopii genomu wirusa na komórkę. Często dochodzi także do niespecyficznego wiązania się sondy z fragmentami komórek.

Na uwagę zasługuje natomiast metoda hybrydyzacji in situ (ISH), która pozwala na jednoczesną identyfikację i lokalizację komórek zakażonych wirusem HPV oraz ocenę morfologii tkanki w skrawkach histologicznych (38,82,151). Technika ta umożliwia wykazanie podwójnej lub mnogiej infekcji HPV, poprzez dobór różnie znakowanych sond np. dioksygeniną i biotyną (105). Metoda pozwala na badania retrospektywne.

Czułość metody ocenia się na 20-50 kopii genomu HPV na komórkę (129). ISH jest techniką powszechnie stosowaną w laboratoriach ze względu na wyżej wymienione zalety, krótki czas pracy, szybką diagnozę, stosunkowo niskie koszty i dostępność zestawów komercyjnych, takich jak PathoGene kit (f-y Enzo Diagnostics), Vira Type kit (f-y Digene Diagnostics).

Za najbardziej czułą metodę wykazującą jedną kopię HPV na  $10^5$ - $10^6$  komórek uważa się PCR - łańcuchową reakcję polimerazy. Jest to metoda polegająca na szybkiej enzymatycznej syntezie in vitro pożądaných sekwencji DNA (124). Proces przebiega w obecności dwóch syntetycznych oligonukleotydowych starterów, dezo-ksyrybonukleotydów i polimerazy DNA. Reakcje prowadzi się w 30-40 cyklach w określonym czasie, aż osiągnięta zostanie oczekiwana ilość produktu amplifikacji. W skład każdego cyklu wchodzi trzy oddzielne procesy: denaturacja (w temperaturze  $95^{\circ}$  -  $95^{\circ}\text{C}$ ), annealing czyli wiązanie starterów ( w temperaturze  $40^{\circ}$ -  $60^{\circ}\text{C}$ ) i końcowy etap polimeryzacja czyli wydłużenie łańcucha DNA (w temperaturze

70<sup>o</sup>-75<sup>o</sup>C) W ciągu dwudziestu do trzydziestu cykli PCR otrzymuje się 10<sup>6</sup> do 10<sup>9</sup> kopii materiału wyjściowego. Szczególnie ważna w tej metodzie jest optymalizacja warunków reakcji i wielokrotne kontrole na każdym etapie badania w celu wykluczenia zanieczyszczeń, a tym samym fałszywie dodatnich wyników. Po amplifikacji produkt końcowy jest identyfikowany, najczęściej z zastosowaniem elektroforezy w żelu agarozowym i/lub hybrydyzacji ze specyficzną sondą.

Ostatnio wprowadzoną metodą jest amplifikacja sekwencji wirusowych bezpośrednio w materiale tkankowym, czyli technika PCR in situ (117). Łączy ona wysoką czułość reakcji PCR z zaletami opisaną powyżej hybrydyzacji in situ. Umożliwia wykazywanie i lokalizację amplifikowanego DNA w skrawkach histologicznych.

### **1.7. Leczenie i profilaktyka zakażeń HPV**

Leczenie zakażeń wywołanych wirusami HPV zależy od rodzaju, umiejscowienia i masywności powstałych zmian. Dobre wyniki leczenia uzyskuje się w przypadku skórnych brodawek u dzieci i w przypadku pojedynczych zmian. Również głębokie podeszwowe brodawki łatwiej poddają się leczeniu, aniżeli brodawki płaskie. Najpoważniejsze problemy terapeutyczne występują u zakażonych kobiet w ciąży, w nawracających brodawczakach krtani, u osób z obniżoną odpornością oraz chorych z epidermodysplasia verruciformis. Ocenę efektywności leczenia utrudnia często występująca spontanicznie regresja brodawek. Wzrost zakażeń narządu płciowego oraz następstwa tych zakażeń stymulują badania nad najbardziej skutecznym modelem leczenia.

Tradycyjna terapia zmian egzofitycznych opiera się na preparatach stosowanych miejscowo. Są to substancje działające złuszcząco na naskórek tj. lapis, maści z kwasem salicylowym. Do niedawna powszechnie stosowano podofilinę, naturalną substancję o działaniu cytotoksycznym. Obecnie jest wypierana przez jej najbardziej aktywną składową podofilotoksynę, która występuje w preparatach jako

0,5% roztwór (Condyline f-my Yamanouchi Europe, NL). W leczeniu kłykcin cewki moczowej dość dobre efekty uzyskano po zastosowaniu jednego z inhibitorów DNA, 5-fluorouracylu w 5% kremie (116). W przypadkach dużych, rozległych brodawek lub kłykcin kanału odbytu, cewki moczowej, gdzie rozmiar zmian nie jest dokładnie określony konieczna jest interwencja chirurgiczna. Stosuje się wtedy jedną z metod prowadzących do usunięcia zmiany tj. łyżeczkowanie, elektrokoagulację, krioterapię, lub działanie laserem. Badania Woźniaka i wsp. przeprowadzone w grupie kobiet ciężarnych wykazały, że zastosowanie lasera CO<sub>2</sub> jest skuteczną metodą leczenia kłykcin kończystych (153). Natomiast metody chirurgiczne są coraz częściej krytykowane z powodu występujących nawrotów choroby związanych z przetrwaniem wirusa w komórkach nabłonka.

Ostatnie dyskusje dotyczą stosowania miejscowo i/lub parenteralnie interferonu. Gall (46) uważa, że jedynie iniekcja interferonu  $\alpha$ 2b do wnętrza zmiany może dać dobre efekty lecznicze. Zaobserwowano, że terapia interferonem  $\alpha$  lub  $\beta$  daje lepsze wyniki w leczeniu kłykcin kończystych, aniżeli w przypadkach nawracających brodawczaków krtani gdzie poleca się metodę chirurgii laserowej (129).

Zapobieganie zakażeniom wirusami HPV jest jak dotąd nieswoiste. Opiera się na przestrzeganiu higieny osobistej i higieny życia płciowego. W przypadku osoby leczonej, konieczna jest kontrola partnera seksualnego.

Najnowsze prace koncentrują się nad swoistą immunoprofilaktyką, czyli uzyskaniem szczepionki. Sukcesy tego kierunku badań obserwuje się w modelach zwierzęcych. Bydło szczepione ekstraktem z brodawek zawierającym bydłęcy wirus papilloma (BPV) nie jest wrażliwe na zakażenie BPV. Stwierdzono wzrost miana przeciwciał neutralizujących w surowicach szczepionych zwierząt (71). Największym problemem stanowi uzyskanie większych ilości antygenowych białek wirusa (47). Postępem w pracach jest wprowadzenie fragmentów wirusowego DNA do genomu bakterii (14) jak również genomu bakulowirusa (66). Uzyskany w ten sposób białkiem wirusowym szczepiono psy, co powodowało wzrost ochronnych przeciwciał



neutralizujących w ich surowicy (137). Natomiast Feltkamp i wsp.(44) stwierdzili, że podanie cytotoksycznych limfocytów T zawierających epitopy wczesnych genów wirusowych chroni przed tworzeniem guzów u myszy zakażanych wirusem HPV-16.

Wydaje się, że obserwowany postęp badań biochemicznych, molekularnych i immunologicznych daje nadzieje szybkiego wprowadzenia swoistej profilaktyki zakażeń HPV.

## 2. Cel pracy

1. Ocena częstości występowania antygeny kapsydowego HPV w komórkach nabłonka szyjki macicy kobiet z różnym stopniem zaawansowania zmian klinicznych oraz w grupie kontrolnej.
2. Porównanie metod - techniki immunoperoksydazowej, hybrydyzacji dot blot i PCR w wykrywaniu zakażenia HPV w rozmazach cytologicznych szyjki macicy u kobiet z śródnabłonkową neoplazją małego stopnia.
3. Wykazanie częstości zakażeń HPV i identyfikacja typów wirusa w materiale biopsyjnym kobiet z CIN i rakiem szyjki macicy, przy zastosowaniu techniki immunoperoksydazowej i hybrydyzacji in situ z sondą znakowaną biotyną.
4. Analiza wyników badań uzyskanych metodą hybrydyzacji in situ z sondą znakowaną biotyną i z sondą znakowaną  $^{32}\text{P}$  oraz metodą PCR.
5. Ocena zależności pomiędzy obecnością DNA HPV w nowotworowych komórkach nabłonka szyjki macicy, a prawdopodobieństwem 3-letniego, bezobjawowego przeżycia kobiet z rakiem szyjki macicy leczonych napromienianiem.
6. Określenie relacji pomiędzy czynnikiem prognostycznym procesu nowotworowego - białkiem p53, a zakażeniem HPV u kobiet z rozpoznaniem raka szyjki macicy.

### **3. Materiały i metody**

#### **3.1. Materiał kliniczny**

Przeprowadzono badania kobiet z rozpoznaniem śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy, z rakiem szyjki macicy lub kłykciami kończystymi. Pacjentki leczone były w Klinice Ginekologii i Położnictwa Coll.Medicum UJ, w Centrum Onkologii Oddział w Krakowie i w Przychodni Kolejowej w Krakowie.

Materiał do badania stanowiły skrawki parafinowe i wydzielina szyjki macicy, którą pobierano w formie rozmazu na szkiełka podstawowe opłaszczone 3-amino - propylo-trójetoksy silanem (Sigma) oraz do probówki z 2ml PBS.

Wydzielina szyjki macicy stanowiła materiał do badań metodą immunoperoksydazową, hybrydyzacji dot blot i PCR, natomiast skrawki parafinowe użyto w badaniach przeprowadzonych metodą immunoperoksydazową, hybrydyzacji in situ i PCR.

Skrawki parafinowe uzyskano dzięki uprzejmości Prof.dr hab.med. J.Stachury Kierownika Katedry Patomorfologii Coll.Medicum UJ, Prof. dr hab. med. A.Niezabitowskiego Kierownika Zakładu Histopatologii w Centrum Onkologii Oddz. w Krakowie i dr med. A. Sawickiej Kierownika Pracowni Cytologii i Histologii Przychodni Kolejowej w Krakowie.

### 3.2. Odczynniki

Nazwa	Firma
agar	POCH
agaroz	Sigma
akrylamid	Sigma
alkohol etylowy	POCH
alkohol izoamylowy	POCH
alkohol izopropylowy	POCH
bacto-trypton	Difco Laboratories
błękit bromofenolowy	Serva
bromek etydyny	Sigma
BSA	Promega
chlorek potasu	POCH
chlorek sodu	POCH
chloroform	POCH
cytrynian sodu	POCH
DTT	Sigma
DNA nasienia łososia	Sigma
EDTA	Sigma
fikol	Pharmacia
fenol	POCH
formamid	Fluca
glicerol	Sigma
glukoza	POCH
hydroksychinolina	Sigma

ksylen	POCH
ksylenocjanol	Sigma
kwask borowy	POCH
kwask cytrynowy	POCH
kwask octowy	POCH
octan amonu	Sigma
octan potasu	Sigma
octan sodu	Sigma
PBS	WSS w Lublinie
poliwinylopyrolidon	Sigma
SDS	Sigma
TRIS	Sigma
wodorotlenek sodu	POCH
żelatyna	Sigma

### **3.3. Enzymy i antybiotyki**

Enzymy	Firma
RNA-za A	Boehringer
proteinaza K	Sigma
Taq polimeraza	Promega
ampicylina	Polfa

### **3.4. Pożywki i roztwory**

#### **3.4.1. Pożywki do hodowli E.coli, szczep TG1 zawierający wektor pBluescript**

**KS z wbudowanym genomem wirusa HPV 16.**

##### **A. Pożywka płynna LB (Luria - Broth)**

10g bacto-trypton,

10g chlorek sodu

5g ekstrakt drożdżowy

rozpuszczono w 800 ml wody dejonizowanej, doprowadzono do pH 7.6 za pomocą 10N NaOH i uzupełniono wodą do 1000 ml. Pożywkę sterylizowano przez 20 min. w temp. 120°C.

##### **B. Pożywka stała LB**

1g ekstrakt drożdżowy,

2g bakto-trypton,

2g NaCl

3g agaroz

rozpuszczono w 150 ml wody dejonizowanej, doprowadzono pH jak wyżej i uzupełniono do 200 ml wodą. Pożywkę sterylizowano w temp. 120°C przez 20 min. Po schłodzeniu pożywki do 40°C dodano ampicyliny do stężenia końcowego 50mg/ml. Pożywkę wylano na jałowe szalki Petriego w ilości 20 ml na szalkę.

#### **3.4.2. Bufor do izolacji DNA z materiału klinicznego**

0.2 M Tris-HCl pH 8.0

50mM EDTA pH 8.0

0.1% SDS.

### 3.4.3. Roztwory stosowane do oczyszczania DNA

fenol - wysycono 0.5M roztworem Tris-HCl o pH 8.0. Po uzyskaniu pH 7.0 dodano 8-hydroksychinolinę do końcowego stężenia 0.1%

Chloroform z alkoholem izoamylowym:

do 24 objętości chloroformu dodano 1 objętość alkoholu izoamylowego.

Mieszanina fenol-chloroform-alkohol izoamylowy:

zmieszano 25 objętości fenolu, 25 objętości chloroformu z alkoholem izoamylowym

### 3.4.4. Roztwory stosowane do izolacji plazmidu metodą lizy alkalicznej

Roztwór I    GTE  
25mM Tris pH 8.0  
50mM glukoza  
10mM EDTA pH 8.0

Roztwór II    SN  
1% SDS  
200mM NaOH

### 3.4.5. Roztwory stosowane do elektroforezy w żelu agarozowym

#### A. Bufor 10x TBE

0.6M Tris  
0.6M kwas borowy  
20mM EDTA

#### B. Bufor 10xTAE

0.5M Tris-HCl pH 7.2  
100mM octan sodu  
50mM EDTA, pH 8.3

C. Barwnik obciążający próby w procesie elektroforezy w żelu agarozowym

50% glicerol

0.25% ksilenocjanol

0.25% błękit bromofenolowy

3.4.6. Roztwory stosowane do hybrydyzacji

A. Roztwór denaturujący

1.5 M NaCl

0.5 M NaOH

B. Roztwór neutralizujący

0.5 M Tris-HCl

3.0 M NaCl

C. Bufor 20x SSC o pH 7.0

3.0 M NaCl

0.3 M cytrynian sodu

D. 50x Denhardt

1% (w/V) fikor

1% (w/V) poliwinylpyrolidonu

1% (w/V) BSA (frakcja V)

E. Roztwór hybrydyzacyjny:

40% formamid

5x SSC,

5x Denhard,

1mM EDTA,

0.1% SDS.

50 µg/ml Salmon sperm (DNA nasienia łososia)



F. Roztwory do płukania filtrów po hybrydyzacji:

Roztwór RP :

2x SSC

0.1% SDS

Roztwór RO :

0.1x SSC

0.1% SDS

3.4.7. Bufory stosowane w badaniach immunohistochemicznych

A. TBS - pH 7.6

0.05 M Tris HCl

0.15 M NaCl

B. Bufor cytrynianowy pH 6.0

2,1g kwasu cytrynowego, jednowodnego

900ml wody dest.

Uzgodnić pH, 2 M NaOH i uzupełnić wodą dest. do 1000ml

### 3.5. Metody

#### 3.5.1. Izolacja DNA z komórek nabłonka szyjki macicy

Komórki nabłonka pobierano szczoteczką cytobrush (f-my MedScand) z kanału szyjki macicy do 2ml PBS (pH 7,5), dokładnie płukano, wirowano (400g, 10 min), supernatant odlewano, a osad zawieszano w 0.5 ml buforu do izolacji DNA zawierającym proteinazę K o końcowym stężeniu 20µg/ml. Próbki inkubowano w 37°C przez noc aż do całkowitego rozpuszczenia materiału komórkowego. Następnie materiał traktowano mieszaniną fenol-chloroform. DNA wytrącano z fazy wodnej 2,5 objętościami etanolu w obecności 2M octanu amonu w temp.-20°C przez

noc. Osad DNA otrzymany przez wirowanie (12000g, 20 min., w temp. 4°C), przemywano 75% etanolem, liofilizowano (liofilizator f-my Beckman) i rozpuszczano w wodzie destylowanej.

Ilość DNA w próbce oceniano spektrofotometrycznie mierząc absorbancję próby przy długości fali 260 nm.

### 3.5.2. Izolacja DNA ze skrawków parafinowych

Skrawki parafinowe o grubości 3µm odparafinowano w ksylenie (1x w temp. 60°C przez 30 min., 2x temp. pok. przez 10 min.) i przeprowadzono przez gradient alkoholi (etanol 100%, 96%, 70%). Po czym trawiono proteinazą K (20µg/ml) rozpuszczoną w buforze do izolacji DNA, w temp. 52°C przez 12 godz. Następnie próbki traktowano trzy-krotnie mieszaniną fenol-chloroform. Zebrano fazę wodną z krócej wytrącano DNA dodając do próbek 1/3 objętości 7,5M octanu amonu i 2/3 objętości alkoholu absolutnego. Materiały pozostawiono w temp. -70°C przez godzinę. Następnie wirowano (12000g, 20 min.) w temperaturze 4°C. Pelet przemyto 70% etanolem, wysuszono i rozpuszczono w wodzie destylowanej. Ilość DNA w próbce oceniano spektrofotometrycznie mierząc absorbancję próby przy długości fali 260 nm.

### 3.5.3. Wykrywanie antygeny kapsydowego HPV metodą immunoperoksydazową

Gatunkowo swoisty antygen kapsydowy wirusów Papilloma wykazywano przy użyciu surowic f-my Dako. Reakcję przeprowadzano w trzech etapach:

1. inkubacja materiału z nieznakowanym króliczym przeciwciałem dla bydłęcego wirusa *Papilloma* (w temp. pok. 20 min),
2. inkubacja z nieznakowaną antyglobuliną (w temp. pok. 20 min.),
3. inkubacja z kompleksem peroksydaza-antyperoksydaza (w temp. pok. 20min.).

Aktywność enzymatyczna peroksydazy powodowała w obecności nadtlenu

wodoru utlenienie substratu, aminoetylokarbazolu, do czerwono zabarwionego produktu. Wynik badania oceniano w mikroskopie świetlnym (pow. 120x, 480x) na podstawie reakcji barwnej obserwowanej w jądrach komórek nabłonka.

#### 3.5.4. Wykrywanie DNA HPV metodą hybrydyzacji in situ z zastosowaniem sond znakowanych biotyną (Digene Diagnostics)

Skrawki parafinowe odparafinowano w ksylenie (1x temp. 60°C przez 30 min., 2x temp. pok. przez 10 min.), odwodniono w gradiencie etanolu i wysuszono. Następnie trawiono proteolitycznie wg zaleceń firmy, w temp. 37°C przez 15 min.. Denaturację łańcuchów DNA próbki jak i sondy przeprowadzono równocześnie w temp. 95°C w ciągu 5 min. Hybrydyzację wykonano stosując sondy biotynylowane zawierające sekwencje specyficzne dla typów HPV 6/11, HPV16/18, HPV 31/33/35. Do reakcji dołączono firmową sondę zawierającą sekwencje charakterystyczne dla DNA genomu ludzkiego, jako kontrolę pozytywną. Jak również sondę specyficzną dla plazmidowego wektora pBR322, jako kontrolę ujemną.

Wykazanie wirusowego DNA opierało się na enzymatycznej reakcji barwnej z zastosowaniem koniugatu alkalicznej fosfatazy i substratów tj. roztwór 5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfatazy (BCIP) i błękitu tetrazolu (NBT) w dwumetyloformamidzie. W mikroskopie świetlnym (pow. 120x) stwierdzano obecność granatowo-niebieskiego precypitatu w jądrach komórek zakażonych wirusem.

#### 3.5.5. Przygotowanie sondy znakowanej $^{32}\text{P}$ , zawierającej DNA HPV 16

Dzięki uprzejmości Prof.dr hab. A. Goździckiej-Józefiak, Kierownika Pracowni Biochemi Stosowanej Inst. Biologii Molekularnej i Biotechnologii UAM w Poznaniu, uzyskano hodowlę E.coli szczep TG-1 zawierającą wektor pBluescript KS(+) z wbudowanym genomem wirusa HPV 16.

### 3.5.5.1. Izolacja plazmidowego DNA zawierającego insert DNA HPV 16

Pojedynczą kolonię bakteryjną *E. coli* (szczep TG-1) klonu stransformowanego plazmidem pBluescript KS zawierającym insert DNA HPV 16 przeniesiono do 200ml płynnej pożywki LB z ampicyliną o końcowym stężeniu 0.05 mg/ml. Hodowlę bakterii inkubowano i wytrząsano w łaźni wodnej w temp 37°C przez noc. Komórki bakterii zebrano przez wirowanie (1000g, 20 min. w temp. +4°C), usunięto supernatant, osad zawieszono w 4 ml roztworu GTE, dodawano 400µl lizozymu o stężeniu 50 mg/ml i inkubowano 5 min. w temp. pokojowej. Następnie dodano 5 ml roztworu II (SN) i inkubowano 5 min. w lodzie. Po inkubacji dodano do próby 3.75 ml 5M roztworu octanu potasu i ponownie inkubowano przez 5 min. w lodzie. Lizat bakterii wirowano (12000g, 20min. w 4°C), a następnie zbierano supernatant. Plazmidowy DNA wytrącano z supernatantu przez dodanie 0.8 objętości izopropanolu, inkubację w temp. pokojowej przez 10 min. i wirowanie (12000g, 20 min. w temp. 4°C). Osad DNA suszono, rozpuszczano w 400µl H<sub>2</sub>O i przeprowadzano 3 razy ekstrakcję fenolową.

Zebraną fazę wodną wytrącano 2.5 objętościami etanolu w obecności 2M octanu amonu przez 30 min. w temp. -75°C i wirowano w mikrowirówce (12000g, 20 min.). Osad DNA przemywano 75% etanolem, wirowano (12000g, 10 min.), suszono i rozpuszczano w 100µl H<sub>2</sub>O. Zawarte w preparacie RNA trawiono RNA-zą o stężeniu 50µl/ml przez 1,5 godz. w temp. 37°C. DNA wytrącano przy pomocy 2.5 objętości etanolu i 1/5 objętości 10 M octanu amonu przez 1 godz. w -75°C, a następnie wirowano (12000g, 20 min. w temp. 4°C). Osad DNA przemywano dwukrotnie 75% etanolem, wirowano (12000g, 10 min. w temp. 4°C), suszono i rozpuszczano w 100µl H<sub>2</sub>O. Ilość wyizolowanego DNA określano przez analizę na 1% żelu agarozowym lub metodą spektrofotometryczną mierząc absorbcję próby przy długości fali 260 nm.

### 3.5.5.2. Elektroforeza w żelu agarozowym

Elektroforezę DNA prowadzono w 1% żelu agarozowym. W tym celu 1g agarozy rozpuszczono w 100 ml TAE i dodano bromku etydyny do stężenia końcowego 0,5µg/ml. Elektroforezę prowadzono w medium TAE w temp. pokojowej przy napięciu 4V/cm. Wynik rozdziału oceniano obserwując żel w świetle UV.

### 3.5.5.3. Znakowanie DNA metodą "nick translation"

Znakowanie DNA przeprowadzono metodą "nick translation" przy użyciu zestawu odczynników firmy Amersham, zgodnie z zaleceniami firmy. Reakcję znakowania przeprowadzono przygotowując następującą mieszaninę reakcyjną:

DNA (0.5-1µg)

5µl buforu zawierającego mieszaninę nukleotydów:

dATP, dGTP, dTTP (o stężeniu 0.1mM każdego nukleotydu)

1µl znakowanego nukleotydu [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ] dCTP o stężeniu 20mCi/ml

1µl roztworu enzymu, zawierającego polimerazę I (0.5U/µl) i DNA-zę (10pg/µl)

H<sub>2</sub>O do 25µl

Mieszaninę reakcyjną inkubowano w temp. 16°C przez 1 godzinę. Następnie DNA wytrącano przy pomocy 2.5 objętości etanolu i 1/5 objętości 10 M octanu amonu przez 1 godz. w -75°C, wirowano, osad DNA przemywano 75% etanolem, ponownie wirowano, osad suszono i rozpuszczano w H<sub>2</sub>O. Aktywność specyficzną wyznakowanego DNA mierzono na liczniku scyntylicyjnym (Beckman).

### 3.5.6. Wykrywanie DNA HPV 16 metodą hybrydyzacji in situ z zastosowaniem sondy znakowanej $^{32}\text{P}$

Materiał stanowiły skrawki parafinowe grubości ok. 3-4µm pobrane na szkiełka podstawowe opłaszczony 3 - amino-propylotrójetoksy silanem (Sigma). Po ich

odparafinowaniu 3x w ksylenie i odwodnieniu w etanolu, poddawano działaniu proteiny K (20µg/ml), następnie płukano w buforze 0,1M TRIS-HCl pH 8,0 i denaturowano w temp. 95°C przez 5 min.

Sondę denaturowano w gotującej wodzie przez 5 min. Następnie materiał zanurzano w roztworze hybrydyzacyjnym z sondą zawierającą sekwencje DNA HPV 16 znakowane <sup>32</sup>P (o końcowej aktywności 10<sup>5</sup> cpm na szkiełko) i pozostawiono w 42°C na całą noc. Po inkubacji płukano w mieszaninie 2xSSC z 0,1% SDS, trzykrotnie po 30 minut.

Suche szkiełka układano w kasecie, nakrywano kliszą fotograficzną i pozostawiano w temp. -70°C na 2-8 dni. Wyniki odczytywano na podstawie autoradiografii.

### 3.5.7. Amplifikacja DNA HPV 16 przy pomocy metody PCR

Do amplifikacji wirusowego DNA użyto specyficznych primerów dla HPV 16 o sekwencjach zgodnych z podanymi przez Morrison i wsp.(106):

5' - GCC TGT GTA GGT GTT GAG GT - 3'

5' - TGG ATT TAC TGC AAC ATT GG - 3'

Oligonukleotydowe startery były komplementarne do 246 bp regionu L1 HPV 16, kodującego białka kapsydu wirusa.

Równolegle wykonywano amplifikację ze starterami specyficznymi dla β-globiny, regionu o długości 110 bp jako wewnętrznej kontroli przebiegu reakcji.

5' - ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC - 3'

5' - CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC - 3'

Kontrolę dodatnią stanowił wektor pBluescript KS z wirusowym insertem.

Materiałem do badania było DNA izolowane z materiału klinicznego wg metody opisanej w pkt. 3.5.1. i 3.5.2.

Amplifikację wirusowego DNA prowadzono w objętości 10µl w mieszaninie zawierającej:

100ng DNA

200 $\mu$ M dNTP (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)

1x stężony bufor do Taq polimerazy

1 $\mu$ M startery

1U/25 $\mu$ l Taq polimeraza

Do każdej z prób dodawano 15 $\mu$ l oleju mineralnego. Próby poddawano wstępnej denaturacji przez 5 min. w temp. 94 $^{\circ}$ C (DNA Thermal Cycler-Eppendorf) Następnie wykonano 31 cykli , każdy składał się z trzech etapów:

1. denaturacja 94 $^{\circ}$ C, 30 sek.
2. przyłączanie starterów 59 $^{\circ}$ C, 30 sek.
3. synteza komplementarnego DNA 72 $^{\circ}$ C, 1min.

W ostatnim cyklu etap końcowy przeprowadzano w temp. 72 $^{\circ}$ C przez 7 min.

### 3.5.8. Analiza produktów PCR

Produkty PCR analizowano poprzez elektroforezę w 2% żelu agarozowym z dodatkiem 0,5 $\mu$ g/ml bromku etydyny oraz metodą hybrydyzacji Southern blot.

#### 3.5.8.1. Hybrydyzacja produktów PCR metodą Southern blot

Po rozdiale elektroforetycznym produktów PCR, żel agarozowy umieszczano w buforze denaturującym DNA na 30 min. w temp 37 $^{\circ}$ C. Poczym żel płukano w jałowej wodzie destylowanej i umieszczano w roztworze neutralizującym na 30 min. w temp 37 $^{\circ}$ C., następnie DNA z żelu przenoszono na filtr nylonowy Hybond-N (Amersham). Filtr zapiekano w temp. 80 $^{\circ}$ C przez 2 godz. Tak przygotowany filtr był gotowy do hybrydyzacji ze znakowaną radioaktywnie sondą DNA HPV 16. Do znakowania DNA sondy używano metody "nick translation" (w/g pkt.3.5.5.3.).

Prehybryzację prowadzono w roztworze prehybrydyzacyjnym w temp. 42 $^{\circ}$ C, przez 2 godz., a następnie hybrydyzację przez noc w temp. 42 $^{\circ}$ C, w roztworze hybrydyzacyjnym zawierającym znakowaną  $^{32}$ P sondę DNA HPV 16 o aktywności 5x10<sup>6</sup>cpm/ $\mu$ g. Filtry po hybrydyzacji płukano w roztworze RP kolejno przez 5 min.,

3 x 20 min. w temp. pokojowej, a następnie przez 1 godz. w temp. 42°C w roztworze RO oraz przez 10 min. w temp. pokojowej ponownie w roztworze RP. Po odplukaniu filtry poddawano autoradiografii przez 7-14 dni w temp. -75°C.

### 3.5.9. Wykrywanie DNA HPV 16 metodą dot blot

Izolowane DNA z komórek nabłonkowych szyjki macicy (w/g pkt.3.5.1.) nakrapiano bezpośrednio na filtr nylonowy Hybond-N (Amersham) w ilości 1µg, a następnie postępowano analogicznie jak w pkt 3.5.8.1.

### 3.5.10. Wykrywanie nadekspresji białka p53 metodą immunohistochemiczną

Skrawki parafinowe odparafinowano i odwodniono a następnie po przemyciu w wodzie destylowanej zanurzono w 10mM buforze cytrynianowym pH 6.0 i traktowano mikrofalami o mocy 650W (kuchenka mikrofalowa DMR-901, Elektrim) 2 razy po 5 min. Następnie pozostawiono materiały w buforze do ostygnięcia (15-20min.). Po płukaniu w TBS pH 7.6 (5min.), nałożono na każdą próbkę mysie przeciwciała monoklonalne dla ludzkiego p53, klon DO-7 f-my Dako, rozcieńczone 1:100 w roztworze TBS pH 7.6

Próby inkubowano w temp. pokojowej przez 30 min. Obecność p53 stwierdzano przy użyciu zestawu surowic Dako LSAB+ kit,AP, na podstawie reakcji enzymatycznej z alkaliczną fosfatazą. Jako chromogenu użyto fuksyny (New Fuchsin) w 2N HCl. W mikroskopie świetlnym obserwowano czerwono zabarwione jądra komórek, w których wystąpiła nadekspresja p53.

Jako pozytywną kontrolę użyto skrawki parafinowe z materiału biopsyjnego raka sutka, uzyskane dzięki uprzejmości Pani A. Ziółkowskiej konsultanta d.s. produktów f-my Dako.



### 3.5.11. Metody statystyczne

Do oceny istotności stwierdzanych różnic statystycznych zastosowano test  $\chi^2$ , za poziom znamienności przyjmując  $p < 0.05$ .

Przy zastosowaniu programu statystycznego Statistica (f-my Statsoft) dokonano analizy związku między zakażeniem HPV, a prawdopodobieństwem 3-letniego przeżycia kobiet z rakiem szyjki macicy, hospitalizowanych w Centrum Onkologii Oddział w Krakowie.

Wykorzystując w/w program statystyczny wykreślono krzywe prognozowane przeżyć bezobjawowych i całkowitych, w okresie 3 lat, chorych zakażonych i niezakażonych wirusem.

## 4. Wyniki

### 4.1. Wykrywanie zakażenia HPV w komórkach nabłonkowych szyjki macicy.

#### 4.1.1. Wykazanie antygeny kapsydowego metodą immunoperoksydazową oraz DNA HPV metodą hybrydyzacji dot blot i PCR.

Badania objęły 273 kobiety w wieku 18 - 68 lat (śr.37), w tym 33 z podejrzeniem infekcji wirusowej w badaniu cytologicznym, 170 z śródnabłonkową neoplazją szyjki macicy, 10 z rakiem płaskonabłonkowym szyjki macicy, 13 ze zmianami kłykcinopodobnymi na sromie oraz grupa kontrolna, którą stanowiło 47 kobiet w wieku 18 - 60 lat (śr. 35lat), u których nie stwierdzono zmian patologicznych szyjki macicy.

Zastosowanie metody immunoperoksydazowej pozwoliło na wykrycie antygeny kapsydowego w jądrach komórek nabłonka, zakażonych HPV (Fot.1). Pozytywne wyniki uzyskano u 11% pacjentek leczonych z powodu CIN lub raka szyjki macicy. Wykazano znamienne częstszą obecność antygeny w nabłonku szyjki macicy kobiet z CIN III (32%) w porównaniu ze stopniem I i II CIN ( $p<0.05$ ) (Tab.1). Nie stwierdzono wirusowego antygeny u kobiet badanych z powodu kłykcin kończystych na sromie i w grupie kontrolnej.

U 24 pacjentek z rozpoznaniem CIN I przeprowadzono równocześnie badanie w kierunku obecności DNA HPV 16 metodą dot blot i PCR. Zaobserwowano znamienne różnice pomiędzy wynikami uzyskanymi trzema różnymi metodami. Zakażenie HPV wykryto u 2 (8%) kobiet metodą immunoperoksydazową, u 10 (42%) metodą dot blot i u 16 (67%) metodą PCR (Tab.2, Fot.2 i 3).

## **4.2. Wykrywanie zakażenia HPV w skrawkach parafinowych materiału biopsyjnego szyjki macicy.**

### **4.2.1. Wykazanie antygeny kapsydowego metodą immunoperoksydazową DNA HPV metodą hybrydyzacji in situ z zastosowaniem sondy znakowanej biotyną.**

Badania przeprowadzono w skrawkach parafinowych uzyskanych od 108 kobiet z histologicznie potwierdzoną śródnabłonkową neoplazją (CIN) lub rakiem szyjki macicy.

Antygen kapsydowy HPV wykazano u 11% badanych (12/108), w tym u 2 pacjentek z CIN III i 10 z rakiem płaskonabłonkowym (Tab.3). Stwierdzono częstsze występowanie zakażenia HPV u kobiet z rakiem w porównaniu z pacjentkami, u których rozpoznano CIN.

Badanie metodą hybrydyzacji in situ wykonano przy użyciu sond zawierających specyficzne sekwencje dla HPV 16/18, HPV 31/33/35, HPV 6/11. Wykazano DNA HPV u 36% kobiet z CIN i 56% pacjentek z rozpoznaniem raka płaskonabłonkowego. Infekcja była wywołana głównie typami wirusa o wysokim potencjale onkogennym HPV 16/18 (52/108 t.j. 94,5%). Żadna z badanych kobiet nie była zakażona wirusami HPV 6/11.

Wyniki dotyczące częstości zakażeń HPV ilustruje tabela 3. Spośród 80 chorych na raka szyjki macicy u 26 (32,5%) stwierdzono obecność HPV 16/18, w 3 przypadkach HPV 31/33/35 natomiast aż 16 pacjentek (20%) miało infekcję mieszaną (HPV 16/18 i HPV 31/33/35).

W grupie 28 kobiet z śródnabłonkową neoplazją szyjki macicy u 10 (36%) wykryto obecność DNA HPV 16/18. Zaobserwowano częstsze występowanie wirusa u pacjentek z CIN III aniżeli w niższych stopniach zaawansowania neoplazji.

Pozytywny wynik hybrydyzacji in situ z sondą biotynylowaną dla sekwencji

HPV 16/18 w materiale biopsyjnym szyjki macicy przedstawiono na fotografii 4 i 5.

Badania wykonane przy współpracy z Kliniką Ginekologii Onkologicznej Centrum Onkologii Oddział w Krakowie dotyczące 39 pacjentek leczonych napromienianiem z powodu raka szyjki macicy wykazały, że chore zakażone HPV mają niższe 3-letnie przeżycie całkowite i bezobjawowe. Porównanie prognozowanych krzywych przeżyć całkowitych chorych zakażonych i niezakażonych wirusem HPV przedstawia rycina 3. Trzyletnie przeżycia całkowite chorych, u których nie stwierdzono infekcji HPV wynoszą 65%, natomiast u kobiet HPV dodatnich 30%. Różnice te są statystycznie nieznamienne ( $p=0,16$ ). Na rycinie 4 porównano przeżycia bezobjawowe obu badanych grup. U chorych HPV ujemnych przeżycia bezobjawowe wynoszą 63%, natomiast w grupie HPV-dodatniej 18%. Różnica ta jest znamienna statystycznie ( $p=0,04$ ).

#### 4.2.2. Hybrydyzacja in situ z zastosowaniem sondy znakowanej $^{32}P$ .

U 40 kobiet chorych na raka szyjki macicy wykonano równocześnie badanie metodą hybrydyzacji in situ z sondą zawierającą sekwencje DNA HPV 16, znakowaną  $^{32}P$  jak i sondą biotynylowaną charakterystyczną dla HPV 16/18. Obecność wirusa stwierdzono u 21 pacjentek (52,5%), w tym u 6 kobiet u których nie stwierdzono infekcji w badaniu przy udziale sondy biotynylowanej (Tab. 4).

Zgodność wyników w obu metodach uzyskano u 15 chorych, u 6 innych wykazano obecność HPV 16 tylko metodą izotopową. U 9 kobiet stwierdzono obecność DNA wirusa stosując sondę biotynylowaną HPV 16/18, przy ujemnych wynikach z sondą HPV 16 znakowaną  $^{32}P$ .

#### 4.2.3. Amplifikacja DNA HPV 16 metodą PCR

Materiałem użytym do amplifikacji było DNA izolowane ze skrawków parafinowych ( pkt.3.5.2.) uzyskanych od 40 kobiet z rakiem szyjki macicy. Pacjentki badano uprzednio metodami hybrydyzacji in situ. Analiza produktów PCR po ich

rozdziale elektroforetycznym w żelu agarozowym wykazała pozytywne wyniki w 35 przypadkach (87,5%). Elektroforetyczną analizę produktów PCR materiałów negatywnych w badaniu metodami hybrydyzacji in situ przedstawiono na zdjęciu (Fot. 6a). W pięciu przypadkach stwierdzono DNA HPV 16 (linia 3,4,5,8,9).

Następne zdjęcie (Fot. 6b) ilustruje wyniki uzyskane po przeniesieniu żelu agarozowego na filtr nylonowy i wykonaniu hybrydyzacji (Southern blot) produktów PCR z sondą znakowaną  $^{32}\text{P}$ . Pozytywny sygnał hybrydyzacyjny w liniach 3,4,5,7,8,9 potwierdził wyniki uzyskane metodą rozdziału elektroforetycznego produktów PCR.

Zwraca uwagę fakt, że w miejscu linii 7, po hybrydyzacji uzyskano pozytywny rezultat, pomimo że nie obserwowano żadnych prążków na żelu agarozowym w tym materiale. Jest to dowód na to, że jeszcze jeden materiał zawierał DNA HPV 16. Ogółem zakażenie HPV 16 oceniane metodą PCR wykazano u 36 (90%) chorych na raka szyjki macicy.

Porównanie wyników badań wykonanych metodami hybrydyzacji in situ z sondą biotynylowaną dla HPV 16/18 i izotopową dla HPV 16 oraz PCR ze starterami dla regionu L1 HPV 16 (Tab.5) wykazało zgodność wyników pozytywnych u 15 kobiet. Korelacja wyników obu metod hybrydyzacji do PCR wyniosła 75%, natomiast korelacja wyników hybrydyzacji względem siebie 87,5%. Czułość metody PCR okazała się najwyższa. Na uwagę zasługuje fakt, że u dwóch kobiet uzyskano wynik pozytywny tylko w badaniu metodą hybrydyzacji in situ z sondą biotynylowaną (HPV 16/18), przy ujemnych wynikach badań metodami wykazującymi HPV 16. To może sugerować, że te pacjentki są zakażone HPV 18.

#### **4.3. Wykrywanie nadekspresji p53 metodą immunohistochemiczną u chorych zakażonych i niezakażonych HPV**

Przeprowadzono badania 35 kobiet z rozpoznaniem w Przychodni Kolejowej w Krakowie rakiem szyjki macicy. Białko p53 wykazano u 9 badanych (26%)(Tab.6).

Zdjęcie (Fot. 7) przedstawia pozytywny wynik reakcji immunohistochemicznej ze swoistymi przeciwciałami monoklonalnymi dla p53 w materiale biopsyjnym raka szyjki macicy.

Zakażenie wirusami Papilloma stwierdzono metodą hybrydyzacji in situ u 16 pacjentek (46%), w tym HPV 16/18 u 9 (26%), HPV 31/33/35 u 3 (8,5%), natomiast u 4 (11%) wykryto infekcję mieszaną HPV 16/18 i 31/33/35.

Nadekspresja p53 występowała częściej u kobiet zakażonych HPV (31%) niż w grupie pacjentek HPV-ujemnych (21%). Różnice te nie były znamienne statystycznie.

## 5. Dyskusja

Zakażenie wirusami *Papilloma* towarzyszy zmianom przednowotworowym i nowotworowym szyjki macicy (79,158). Obecność wirusa może być czynnikiem rokowniczym w procesie karcinogenezy (5,49,139), zatem prawidłowe diagnozowanie infekcji HPV ma istotne znaczenie. Częstość wykrywanych typów wirusa i ich potencjał onkogenny jest zróżnicowany w zależności od obrazu klinicznego (93). Najczęściej izolowanym typem w raku szyjki macicy jest HPV 16 zwany typem wysokiego ryzyka (29).

Badania własne przeprowadzono w komórkach nabłonka szyjki macicy, uzyskanych na drodze wymazu cytologicznego oraz w materiale biopsyjnym szyjki macicy. Wymazy cytologiczne z kanału i tarczy szyjki macicy są materiałem rutynowo pobieranym do przesiewowych badań cytopatologicznych. Materiał ten jest łatwo dostępny, uzyskiwany na drodze nieinwazyjnej. W grupie kobiet, u których na podstawie cytologii i/lub kolposkopii stwierdza się zmiany sugerujące infekcję wirusową, wykrywanie zakażenia wirusami *Papilloma* powinno być badaniem uzupełniającym w profilaktyce raka szyjki macicy.

Badaniami objęto 273 kobiety ze zmianami cytopatologicznymi nabłonka szyjki macicy, 13 pacjentek ze zmianami kłykciniopodobnymi na sromie oraz 47 kobiet bez zmian patologicznych szyjki macicy, które stanowiły kontrolę. Zastosowanie metody immunoperoksydazowej pozwoliło na wykazanie obecności typowoswoistego antygeny kapsydowego wirusów *Papilloma* u 10% badanych kobiet ze zmianami przednowotworowymi i nowotworowymi szyjki macicy. Ekspresja antygeny wystąpiła znamiennej częściej u kobiet z CIN III w porównaniu ze stopniem I i II.

Większość autorów stwierdza spadek częstości wykrywania antygeny kapsydowego wraz ze wzrostem stopnia zaawansowania CIN (7,35,130). Jednakże w badaniach przeprowadzonych wśród pacjentek regionu krakowskiego Basta (7) wykazał obecność antygeny kapsydowego aż u 19,9% kobiet z CIN III i u 1,3%

chorych z rakiem z inwazją mikroskopową. Autor sugeruje, że wyniki te dotyczą komórek pochodzących z obszarów szyjki macicy spoza ognisk CIN i raka szyjki macicy.

W niniejszej pracy nie stwierdzono obecności antygeny kapsydowego w komórkach nabłonka kobiet bez zmian patologicznych szyjki macicy, podobnie jak w badaniach Shepherd i wsp. (130).

U kobiet z prawidłowym obrazem cytologicznym komórek nabłonka szyjki macicy wielu autorów wykazywało natomiast, obecność latentnej infekcji HPV przy zastosowaniu metod hybrydyzacji i PCR. Częstość wykrywanego DNA HPV wynosiła, w zależności od stosowanej metody i grupy badanych kobiet od 2-53% (9,50,56,58,106,121,123).

Badania własne wydzieliny szyjki macicy uzyskanej od 24 pacjentek z rozpoznaniem śród nabłonkowej neoplazji małego stopnia (CIN I) przeprowadzono trzema różnymi metodami. Tylko w dwóch przypadkach wykazano obecność antygeny kapsydowego, natomiast DNA HPV 16 stwierdzono aż u 67% badanych metodą PCR. W grupie tej było 10 kobiet (42%) z pozytywnym wynikiem hybrydyzacji dot blot z zastosowaniem sondy znakowanej  $^{32}P$ . Badania niniejsze potwierdziły wysoką czułość metody PCR, w wykrywaniu wirusowego DNA w komórkach nabłonka szyjki macicy.

Zbliżone wyniki do niniejszej pracy uzyskał Borg i wsp. (9). Badaniem objęli 311 kobiet zgłaszających się po raz pierwszy do Kliniki Chorób Przenoszonych Drogą Seksualną. Zakażenie HPV stwierdzili u 12,6% pacjentek metodą hybrydyzacji dot blot, a u 23,5% metodą PCR. Wydzielając spośród badanych, 37 kobiet ze zmianami śród nabłonkowymi szyjki macicy małego stopnia, uzyskali wartości zbliżone do przedstawionych w niniejszej pracy; wynosiły one 51% metodą hybrydyzacji dot blot, a metodą PCR 65% (9). Niższe wartości uzyskali Hallam i wsp. (58) oceniając wymazy cytologiczne 131 kobiet uczęszczających do przychodni planowania rodziny. Obecność DNA HPV wykazali metodą hybrydyzacji dot blot u 7% pacjentek,



metodą PCR u 53% kobiet, a przy użyciu dwóch metod wykryto DNA HPV u 56% badanych. Analizując wyniki dotyczące 20 pacjentek ze śródnabłonkową neoplazją małego stopnia, DNA HPV stwierdzili u 15% kobiet badanych metodą hybrydyzacji dot blot z sondą zawierającą wspólne sekwencje dla HPV 16/18/31 oraz u 50% pacjentek ocenianych metodą PCR przy użyciu starterów charakterystycznych dla HPV 16/31/11 (58).

Spośród zastosowanych metod do oceny zakażenia HPV w komórkach nabłonka szyjki macicy najwyższe wartości uzyskano metodą PCR.

Następnym etapem badań własnych było przeprowadzenie analizy wyników dotyczących oceny materiałów biopsyjnych szyjki macicy kobiet z rozpoznaniem CIN i raka płaskonabłonkowego. Obecność antygeny kapsydowy wykazano u 11% (12/108) badanych metodą immunoperoksydazową, w tym u 2 pacjentek z CIN III i 10 z rakiem płaskonabłonkowym.

Wyższą częstość występowania ekspresji antygenowych białek kapsydu wykazali Hara i wsp. (60) w badaniach dotyczących kobiet z analogicznym rozpoznaniem klinicznym. Autorzy przeprowadzili analizę histopatologiczną materiałów i wykazali dodatnią reakcję immunoperoksydazową tylko w komórkach koilocytarnych i dys-keratocytarnych. Natomiast nie stwierdzili obecności wirusowego antygeny w jądrach komórek rakowych, tłumacząc tę obserwację tym, że najprawdopodobniej doszło do wbudowania wirusowego DNA do genomu komórki, co pociąga za sobą utratę zdolności wirusa do "pełnej" replikacji i produkcji powierzchniowych białek wirusowych.

W pracach innych autorów, antygen kapsydowy HPV wykazano głównie w materiale biopsyjnym kobiet ze zmianami brodawkowymi szyjki macicy - 50% i ze śródnabłonkową neoplazją - 26%, natomiast w badaniu 8 biopsji raka szyjki macicy, uzyskano wyniki ujemne (130). Częstsze występowanie antygeny kapsydowego w zmianach śródnabłonkowych małego stopnia w porównaniu ze zmianami bardziej zaawansowanymi, wykazywali również Delvenne i wsp. (35), odpowiednio 18% i 4%.

Zmniejszanie się odsetka kobiet z dodatnim testem immunoperoksydazowym w miarę wzrostu stopnia zaawansowania CIN, można również tłumaczyć integracją wirusowego DNA z genomem zakażonej komórki i utratą zdolności wirusa do ekspresji późnych genów w komórkach dysplastycznych i rakowych.

Materiały omawiane w niniejszej pracy, uprzednio badane metodą immunoperoksydazową oceniano pod kątem obecności DNA HPV metodą hybrydyzacji *in situ* z sondami znakowanymi biotyną (f-my Digene Diagnostics). Wykazano obecność wirusowego DNA u 36% kobiet z CIN i 56% pacjentek z rakiem płaskonabłonkowym (140). Dominowały typy wirusa o wysokim potencjale onkogennym HPV16/18 (94,5%).

W badaniach innych autorów, przeprowadzonych tą samą metodą wyniki są zróżnicowane, DNA HPV wykazano od 13,6% do 60% kobiet z CIN i od 25% do 62% pacjentek z rakiem szyjki macicy (7,35,60,102,130). Nieco rzadziej wykrywano wirusowy DNA w materiałach badanych metodą hybrydyzacji *in situ* z użyciem plazmidowych sond znakowanych biotyną (130,60).

W badaniach własnych, użycie metody hybrydyzacji *in situ* pozwoliło na stwierdzenie utajonej infekcji HPV u 43 pacjentek, u których nie wykazano uprzednio antygeny kapsydowego świadczącego o zakażeniu aktywnym. Podobne rezultaty uzyskali inni autorzy (7,55).

Porównując wyniki badań niniejszej pracy uzyskane metodą hybrydyzacji *in situ* z zastosowaniem sondy charakterystycznej dla HPV 16/18, znakowanej biotyną oraz sondy plazmidowej, znakowanej <sup>32</sup>P, zawierającej sekwencje dla HPV 16, uzyskano wyniki dodatnie obiema metodami u 50% kobiet z rakiem szyjki macicy. U 6 pacjentek wykazano obecność HPV 16 tylko metodą izotopową. Natomiast u 9 kobiet stwierdzono DNA wirusa stosując sondę biotynylowaną (HPV 16/18) przy ujemnych wynikach badań z zastosowaniem sondy radioaktywnej (HPV 16), co mogłoby sugerować, obecność u tych pacjentek zakażenia HPV 18.

Pomimo iż, uważa się, że wyższa jest czułość metod hybrydyzacji *in situ*

stosujących sondy radioaktywne w porównaniu do sond nieizotopowych (55,118), to istnieją również opinie przeciwne (19). W pracy Clevel i wsp. (19) zaobserwowali jednakową czułość metody hybrydyzacji z zastosowaniem sondy znakowanej <sup>35</sup>S jak również z sondą znakowaną digoksygeniną.

Zastosowanie w badaniach własnych metody amplifikacji wirusowego DNA u 40 pacjentek z rakiem szyjki macicy, uprzednio ocenianych metodami hybrydyzacji in situ, spowodowało wzrost wykrywalności infekcji HPV do 90% (141). Podobne wyniki uzyskali Chang i wsp. (16). Inni autorzy rzadziej wykazywali obecność DNA HPV 16 (54-83%) przy użyciu metody PCR w komórkach raka szyjki macicy (40,74,112,146).

Stosowane w niniejszej pracy metody hybrydyzacji okazały się mniej czułe, ale pozwoliły na jednoczesną identyfikację i lokalizację komórek zakażonych HPV oraz ocenę morfologii tkanki w skrawkach histologicznych.

Przeprowadzone badania metodą PCR wykazały że, analiza produktów amplifikacji metodą elektroforezy w żelu agarozowym jest niewystarczająca, a pełnej oceny obecności DNA wirusa można było dokonać po zastosowaniu hybrydyzacji ze specyficzną sondą. Prawdopodobnie jest to spowodowane tak małą ilością DNA HPV w badanym materiale, że barwienie bromkiem etydyny w żelu agarozowym nie jest wystarczające do jego ujawnienia (141).

W badaniach Morrison i wsp. wykazano że, zastosowanie hybrydyzacji Southern blot z użyciem sondy znakowanej izotopem lub digoksygeniną powoduje 100-krotny wzrost czułości detekcji produktów PCR w porównaniu z metodą elektroforezy w żelu agarozowym (107). Ostatnio Karlsen i wsp. zaproponowali nowe metody barwienia w celu uwidocznienia produktu PCR w żelu poliakrylamidowym (73).

Odrębnym zagadnieniem rozpatrywanym przy współpracy z Centrum Onkologii Oddział w Krakowie była ocena wpływu obecności zakażenia HPV na 3-letnie przeżycia chorych w zaawansowanych stadiach raka szyjki macicy.

Badania wykazały znamienne wyższe prawdopodobieństwo (63%) bezobjawowego przeżycia pacjentek niezakażonych wirusem, w porównaniu z 18% prawdopodobieństwem dla HPV-dodatnich kobiet. To sugeruje, że obecność zakażenia HPV może być czynnikiem rokowniczym dla chorych na raka szyjki macicy. Tego typu analizę przeprowadzili inni autorzy (5,11,30,49,64,77,122).

Girardi i wsp. (49) w badaniach 43 kobiet z inwazyjnym rakiem szyjki macicy stwierdzili, że u pacjentek u których wykazano obecność DNA HPV 16 częściej występowały przerzuty do węzłów chłonnych miednicy mniejszej niż u chorych HPV-negatywnych. Podobne wyniki uzyskali Chen i wsp. badając 433 pacjentki z rakiem płaskonabłonkowym lub gruczolakorakiem szyjki macicy (17). Stwierdzili oni znamienne częstsze występowanie przerzutów do węzłów chłonnych u chorych zakażonych HPV (24,3%) w porównaniu z kobietami u których nie wykazano obecności wirusa (11%) z tym że, dotyczyło to kobiet z rozpoznany rakiem płaskonabłonkowym a nie gruczolakorakiem szyjki macicy.

Kędzia i wsp. (77) wskazują na możliwość monitorowania leczenia poprzez oznaczanie obecności wirusa HPV w tkance nowotworowej i we krwi przed i po leczeniu.

Natomiast badania Riou i wsp. (122) oraz Higgins i wsp. (64) wykazały że, gorsze rokowanie mają chore, które nie są zakażone wirusami Papilloma. Jak widać z przedstawionego piśmiennictwa omawiane zagadnienie jest problemem kontrowersyjnym.

W ostatnich latach poszukuje się związków pomiędzy infekcją HPV, a obecnością innych czynników współdziałających w progresji procesu nowotworowego (7,85,86,97).

W niniejszej pracy podjęto badania w celu określenia relacji pomiędzy czynnikiem prognostycznym - białkiem p53, a zakażeniem HPV u kobiet z rakiem szyjki macicy.

Gen p53 jest jednym z najważniejszych antyonkogenów czyli genów hamujących transformację nowotworową. Mutacje w obrębie tego genu są szeroko rozpowszechnione w ludzkich nowotworach.

Produktem genu p53 jest fosfoproteina jądrowa, tzw. białko p53. W komórkach z uszkodzonym DNA wzrasta ilość białka p53, co powoduje hamowanie cyklu komórkowego na granicy faz G1/S. Niemożliwa staje się wtedy replikacja uszkodzonego DNA i podział komórki. Po ukończeniu procesów naprawczych, komórka znowu może kontynuować przerwany cykl rozpoczynając fazę syntezy DNA. Jeśli reperacja jest nieskuteczna wzrost ilości białka p53 wpływa na spadek aktywności genu przeżycia bcl2, co kieruje komórkę na drogę apoptozy czyli śmierci programowanej.

Na skutek mutacji powstaje nieaktywne białko p53, które nie jest w stanie zatrzymać komórki w fazie G1, jak również nie ma zdolności oddziaływania na gen przeżycia. Komórka z uszkodzonym DNA, zamiast umrzeć śmiercią samobójczą zaczyna się dzielić. Powoduje to gromadzenie się w organizmie komórek genetycznie niestabilnych, obarczonych mutacjami i w konsekwencji szybką selekcję komórek nowotworowych.

W komórkach zawierających zmutowany gen p53 dochodzi do nagromadzenia zmienionego białka p53, co wynika z przedłużonego czasu półtrwania tego białka. To pozwala na jego wykrycie metodami immunohistochemicznymi.

W badaniach własnych podjęto próbę korelacji dwóch czynników prognostycznych procesu karcinogenezy, nadekspresji p53 i obecności DNA HPV w raku szyjki macicy. Badania przeprowadzono u 35 kobiet z rozpoznaniem raku szyjki macicy. U 16 badanych wykazano obecność DNA HPV metodą hybrydyzacji in situ. W tej grupie nadekspresję p53 wykryto u 5 (31%) pacjentek. Spośród 19 kobiet HPV-ujemnych, nadekspresję p53 stwierdzono w 4 przypadkach (21%). Nie wykryto znamienych różnic pomiędzy obecnością nadekspresji p53 u kobiet zakażonych i niezakażonych HPV.

Wyniki te są zgodne z badaniami Ngan i wsp. (113), którzy wykazali obecność p53 metodą immunohistochemiczną, w 2 przypadkach raka szyjki macicy spośród 46 badanych, w tym jeden przypadek był HPV-pozytywny, a drugi HPV-negatywny.

Podobne rezultaty uzyskali Jeffers i wsp. (72) badając 31 pacjentek z śródnaślenną neoplazją szyjki macicy. Białko p53 wykazano u 52% badanych kobiet, u których jednocześnie wykryto DNA HPV metodą hybrydyzacji in situ i u 40% HPV-ujemnych pacjentek. Różnice nie były znamienne statystycznie.

Badania innych autorów (104) również potwierdzają brak korelacji między infekcją HPV, a występowaniem mutacji w genie p53 w komórkach raka szyjki macicy.

Powyższe wyniki nie są zgodne z wcześniejszymi pracami Crook i wsp. (26,27), którzy wysunęli hipotezę o występowaniu w komórkach raka szyjki macicy, odwrotnej korelacji pomiędzy infekcją HPV, a obecnością mutacji w genie p53. Autorzy zasugerowali istnienie dwóch mechanizmów powstawania raka szyjki macicy: pierwszy związany z infekcją HPV i działaniem wirusowej onkoproteiny E6 prowadzącym do degradacji "dzikiego" (fizjologicznego) białka p53 przy udziale ubiquityny, drugi związany z powstawaniem mutacji somatycznych genu p53, przy braku zakażenia HPV. Powyższa hipoteza znalazła potwierdzenie w badaniach, w których wykazano punkt mutacyjny w genie p53, znamienne częściej u kobiet z rakiem szyjki macicy, HPV-negatywnych, natomiast nie było mutacji w genie p53 w przypadkach potwierdzonej infekcji HPV (27).

Ponadto badania tych samych autorów potwierdziły obecność mutacji w obrębie genu p53, w 8 liniach komórek pochodzących z raka szyjki macicy, w których nie wykazano DNA HPV (6).

Hipotezie wysuniętej przez Crook i wsp. przeczą wyniki autorów, którzy nie znaleźli mutacji genu p53 w badanych, HPV-negatywnych rakach szyjki macicy (10,12).

Natomiast Milde-Langosh i wsp. (104) przeprowadzili badania porównawcze

w materiale uzyskanym z 25 raków płaskonabłonkowych i 26 gruczolakorakach szyjki macicy oraz 40 rakach płaskonabłonkowych sromu. Wykazali, że przetrwałe zakażenie HPV jest ważnym czynnikiem w rozwoju zmian nowotworowych w obrębie szyjki macicy, w przeciwieństwie do raka sromu, gdzie mutacja p53 i brak infekcji HPV jest wskaźnikiem onkogenezy (104).

Chociaż przyjęto za istotną rolę mutacji punktowej w zaburzeniu ekspresji p53 w ludzkich rakach to sądzi się, że mogą być również inne mechanizmy inaktywacji p53. Badania w tym zakresie przeprowadzono na modelu eksperymentalnej karcinogenezy nabłonka myszy. Wykazano, że w tym modelowym systemie poziom p53 był związany ze stopniem zróżnicowania nowotworu i nie wymagał obecności mutacji punktowej (59). Mimo postępu prac dotyczących funkcji białka p53 w raku szyjki macicy jego związek z zakażeniem HPV pozostaje problemem otwartym.

W badaniach dotyczących wykrywania zmutowanego białka p53 znalazły zastosowanie metody immunohistochemiczne. Czułość tych metod w przypadku badań prowadzonych w skrawkach parafinowych zależy m.in. od stosowanych technik ujawniających antygeny. W tkance utrwalonej w formalinie wiele antygenów jest zamaskowanych, wobec tego konieczne jest użycie enzymów proteolitycznych lub mikrofal w celu odsłonięcia antygeny (53,114). Zastosowanie mikrofal, wydaje się być niezawodną metodą w ujawnieniu białka p53 w materiale archiwalnym, zarówno przy użyciu przeciwciał monoklonalnych, jak i poliklonalnych (13,53,114). W oparciu o doświadczenia innych autorów, w badaniach własnych, użyto przeciwciał DO-7 firmy Dako, które w porównaniu z pięcioma różnymi przeciwciałami dla p53, wykazały najlepszą immunoreaktywność (92).

W diagnostyce wirusologicznej zakażeń wirusami Papilloma zasadnicze znaczenie ma wykrywanie postaci subklinicznej i latentnej. Różna patogenność poszczególnych typów wirusa wymaga zastosowania odpowiednich metod w celu ich identyfikacji.

Sądzę, że metoda hybrydyzacji in situ pomimo niższej czułości ma wiele zalet.

które uzasadniają jej stosowanie w badaniach materiałów klinicznych. Stwarza bowiem możliwość rozpoznania zakażenia z równoczesnym typowaniem wirusa i oceną morfologii badanych komórek.

Spośród stosowanych w niniejszej pracy metod na uwagę zasługuje metoda PCR pozwalająca na amplifikację pojedynczego wirionu. Zastosowanie jej w połączeniu z metodami hybrydyzacji jako technikami wykrywającymi końcowy produkt, stanowi najczulszą z obecnie znanych metod stosowanych w diagnostyce medycznej.

Różnorodność metod wykorzystywanych w wykrywaniu zakażeń wirusami *Papilloma* wymaga od badaczy dużej ostrożności w porównywaniu otrzymanych wyników oraz znajomości wad i zalet danych technik.



## 6. Wnioski

1. Częstość zakażeń HPV u kobiet z patologią szyjki macicy zależy od rozpoznania klinicznego; u pacjentek z rakiem szyjki macicy stwierdzono infekcję znacznie częściej niż u kobiet z śród nabłonkową neoplazją szyjki macicy (56% vs 36%).
2. Brak ekspresji antygenu kapsydowego HPV w badanym materiale nie może być podstawą do wykluczenia infekcji wirusowej, konieczne jest badanie w kierunku obecności wirusowego DNA; badania porównawcze przeprowadzone w materiale cytologicznym szyjki macicy metodą immunoperoxydazową, hybrydyzacji dot blot i PCR wykazały infekcję HPV u odpowiednio 8%, 42%, 67% pacjentek.
3. Rozpoznanie zakażenia HPV zależy od czułości stosowanych metod; częściej wykazywano obecność DNA HPV w materiale biopsyjnym szyjki macicy stosując metodę PCR aniżeli metodę hybrydyzacji in situ (90% vs 75%).
4. Pomimo, że metoda hybrydyzacji in situ jest mniej czuła w porównaniu z PCR to pozwala na jednoczesną identyfikację i lokalizację komórek zakażonych wirusami HPV.
5. Ponieważ analiza produktów amplifikacji DNA HPV metodą elektroforezy w żelu agarozowym może być niewystarczająca zaleca się zastosowanie metody hybrydyzacji Southern blot do detekcji produktów PCR.



6. Wykazano znamienne wyższe prawdopodobieństwo bezobjawowego przeżycia kobiet z rakiem szyjki macicy niezakażonych HPV, w porównaniu z grupą pacjentek zakażonych wirusami Papilloma o wysokim potencjale onkogennym. Sugeruje to, że obecność infekcji HPV może być czynnikiem rokowniczym dla chorych na raka szyjki macicy.
  
7. Wyniki badania relacji pomiędzy obecnością zakażenia HPV a nadekspresją p53 w raku szyjki macicy wskazują na brak występowania zależności pomiędzy tymi czynnikami; wydaje się jednak konieczne pogłębienie tego tematu o badania molekularne dotyczące mutacji genu *p53* w komórkach zakażonych i niezakażonych HPV.

## 7. Streszczenie

W pracy omówiono metody stosowane w wykrywaniu zakażeń wirusami *Papilloma*. Badaniami objęto 273 kobiety ze zmianami cytopatologicznymi nabłonka szyjki macicy, 13 pacjentek ze zmianami kłykcinopodobnymi na sromie oraz 47 kobiet bez zmian patologicznych szyjki macicy, które stanowiły kontrolę. Zastosowanie metody immunoperoksydazowej pozwoliło na wykazanie obecności typowo-swoistego antygeny kapsydowego wirusów *Papilloma* u 10% badanych kobiet ze zmianami przednowotworowymi i nowotworowymi szyjki macicy. Nie stwierdzono wirusowego antygeny u kobiet z grupy kontrolnej.

U 24 pacjentek z rozpoznaniem CIN I przeprowadzono równocześnie z wykrywaniem antygeny kapsydowego badanie w kierunku obecności DNA HPV 16 metodą dot blot i PCR. Zaobserwowano znamienne różnice pomiędzy wynikami uzyskanymi trzema różnymi metodami. Zakażenie HPV wykryto u 8% kobiet metodą immunoperoksydazową, u 42% metodą dot blot i u 67% metodą PCR. Badania niniejsze potwierdziły wysoką czułość metody PCR w wykrywaniu wirusowego DNA w komórkach nabłonka szyjki macicy.

W następnym etapie, przeprowadzono analizę wyników badań materiałów biopsyjnych szyjki macicy kobiet z rozpoznaniem CIN lub raka płaskonabłonkowego. Badania przeprowadzono techniką immunoperoksydazową i metodą hybrydyzacji in situ.

Obecność antygeny kapsydowego HPV wykazano u 11% badanych. Stwierdzono częstsze występowanie zakażenia HPV u kobiet z rakiem w porównaniu z pacjentkami, u których rozpoznano CIN. Badanie metodą hybrydyzacji in situ wykonano przy użyciu sond zawierających specyficzne sekwencje dla HPV 16/18, HPV 31/33/35, HPV 6/11. Wykazano DNA HPV u 36% kobiet z CIN i 56%

pacjentek z rozpoznaniem raka płaskonabłonkowego. Infekcja była wywołana głównie typami wirusa o wysokim potencjale onkogennym HPV 16/18 (94,5%).

Żadna z badanych kobiet nie była zakażona wirusami HPV 6/11.

Należy podkreślić, że infekcję mieszaną (HPV 16/18 i HPV 31/33/35) wykazano tylko u chorych z rozpoznaniem rakiem szyjki macicy (20%).

Następnie porównano wyniki badań uzyskanych metodą hybrydyzacji in situ z sondą znakowaną <sup>32</sup>P, zawierającą sekwencje DNA HPV 16 jak również z sondą biotynylowaną charakterystyczną dla HPV 16/18. Zgodność wyników w obu metodach uzyskano u 50% badanych.

Obecność DNA HPV wykazywano również metodą PCR. Materiał stanowiły skrawki parafinowe uzyskane od 40 kobiet z rakiem szyjki macicy. Zastosowanie metody PCR spowodowało wzrost wykrywalności wirusa HPV 16 w porównaniu z wynikami uzyskanymi metodą hybrydyzacji in situ (90% vs 75%). Analiza produktów PCR metodą elektroforezy w żelu agarozowym okazała się niewystarczająca. Zastosowanie hybrydyzacji Southern blot do detekcji produktów PCR zwiększyło czułość metody z 87% do 90%.

Porównanie wyników badań wykonanych metodami hybrydyzacji in situ z sondą biotynylowaną dla HPV 16/18 i izotopową dla HPV 16 oraz PCR ze starterami dla regionu L1 HPV 16 wykazało zgodność wyników pozytywnych u 15 kobiet. Korelacja wyników obu technik hybrydyzacji do PCR wyniosła 75%, natomiast korelacja wyników hybrydyzacji względem siebie 87,5%. Czułość metody PCR okazała się najwyższa. Na uwagę zasługuje fakt, że u dwóch kobiet uzyskano wynik pozytywny tylko w badaniu metodą hybrydyzacji in situ z sondą biotynylowaną (HPV 16/18), przy ujemnych wynikach badań metodami wykazującymi HPV 16. To może sugerować, że pacjentki te były zakażone HPV 18.

W pracy oceniono również wpływ obecności zakażenia HPV na 3-letnie przeżycia chorych w zaawansowanych stadiach raka szyjki macicy. Badania przeprowadzono przy współpracy z Centrum Onkologii Oddział w Krakowie.

Wykazano znamienne wyższe prawdopodobieństwo (63%) bezobjawowego przeżycia pacjentek niezakażonych wirusem, w porównaniu z 18% prawdopodobieństwem dla kobiet HPV-dodatnich. Sugeruje to, że obecność zakażenia HPV może być czynnikiem rokowniczym dla chorych na raka szyjki macicy.

Podjęto również badania w celu określenia relacji pomiędzy czynnikiem prognostycznym - białkiem p53, a zakażeniem HPV u 35 kobiet z rakiem szyjki macicy.

U 9 badanych (26%) wykazano w materiale biopsyjnym raka szyjki macicy obecność nadekspresji białka p 53 przy użyciu swoistych przeciwciał monoklonalnych. Nadekspresja p53 występowała częściej u kobiet zakażonych HPV (31%) niż w grupie pacjentek HPV-ujemnych (21%). Wyniki te nie były znamienne statystycznie.

Powyższe badania prowadzą do następujących konkluzji:

1. znamienne częściej wykazano obecność antygenu kapsydowego wirusów *Papilloma* w rozmazach cytologicznych u kobiet ze zmianami przednowotworowymi i nowotworowymi szyjki macicy w porównaniu z grupą kontrolną.
2. częstość zakażenia HPV 16 w materiale biopsyjnym szyjki macicy badanych kobiet oceniana metodami hybrydyzacji in situ wynosiła 75%, natomiast po zastosowaniu metody PCR wzrosła do 90%.
3. pomimo, że metoda hybrydyzacji in situ jest mniej czuła w porównaniu z PCR to pozwala na jednoczesną identyfikację i lokalizację komórek zakażonych wirusami HPV.
4. analiza produktów amplifikacji DNA HPV metodą elektroforezy w żelu agarozowym była niewystarczająca; zastosowanie metody hybrydyzacji do detekcji produktów PCR zwiększyło czułość metody.
5. wykazano znamienne wyższe prawdopodobieństwo bezobjawowego przeżycia kobiet z rakiem szyjki macicy, niezakażonych HPV, w porównaniu z grupą pacjentek zakażonych wirusami *Papilloma* o średnim i wysokim potencjale onko-

gennym. Sugeruje to że, obecność infekcji HPV może być czynnikiem rokowniczym dla chorych na raka szyjki macicy.

6. nie wykryto znamienych różnic pomiędzy obecnością nadekspresji p53 w materiale biopsyjnym kobiet zakażonych i niezakażonych HPV.

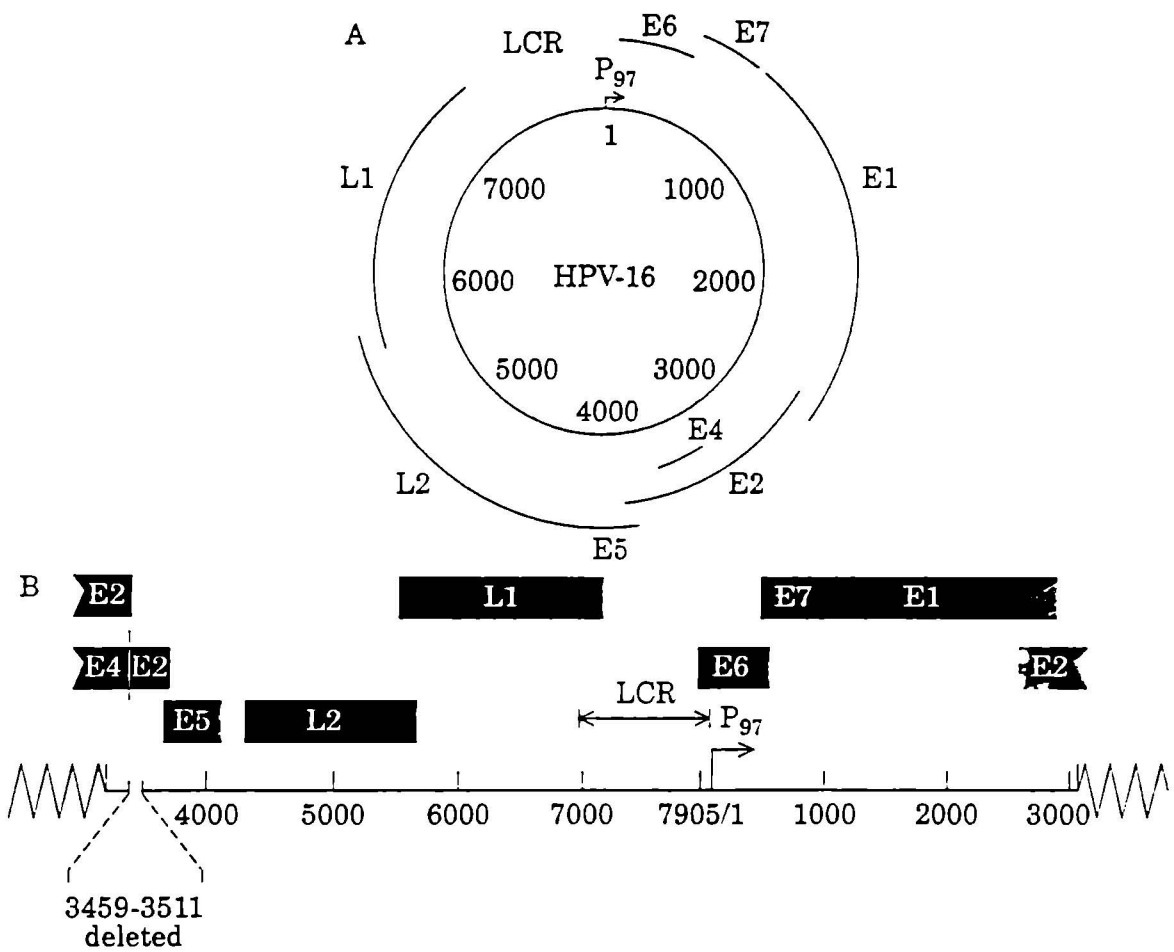
Podsumowując, w diagnostyce wirusologicznej zakażeń wirusami *Papilloma* zasadnicze znaczenie ma wykrywanie postaci subklinicznej i latentnej. Różna patogenność poszczególnych typów wirusa wymaga użycia metod, które pozwalają na ich identyfikację.

Sądzę, że spośród omówionych metod na uwagę zasługuje metoda PCR pozwalająca na amplifikację pojedynczego wirionu. Zastosowanie jej w połączeniu z metodami hybrydyzacji jako technikami wykrywającymi końcowy produkt, stanowi najczulszą z obecnie znanych metod w diagnostyce medycznej.

**RYCINY, TABELE I DOKUMENTACJA  
FOTOGRAFICZNA**

Ryc. 1.

Struktura genomu HPV 16; A kolista, B. liniowa



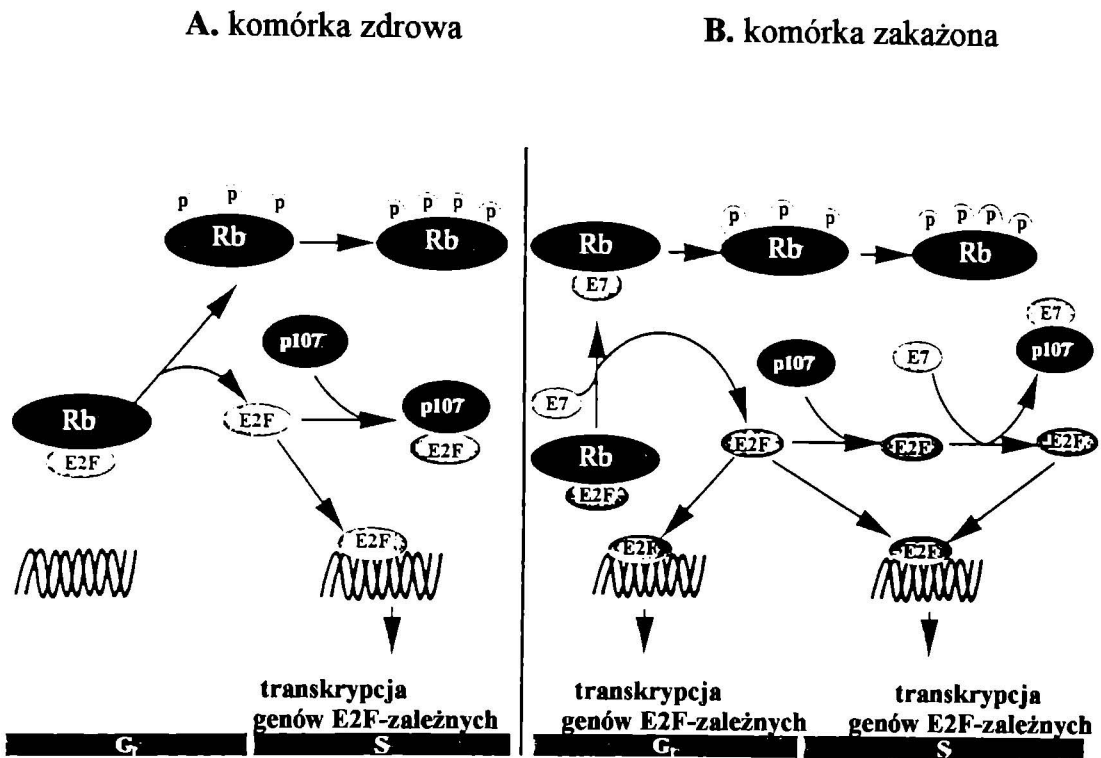
E1, E2, E4, E5, E6, E7 - wczesne geny wirusowe  
L1, L2 - pózne geny wirusowe  
LCR - (long control region) długi region kontrolny = region regulatorowy

wg. J.M.Huibregtse i M.Scheffner - Virology 1994, 5, 358.



Ryc. 2.

Mechanizm oddziaływania białka E7 wirusów HPV o wysokim potencjale onkogennym, na cykl komórkowy.



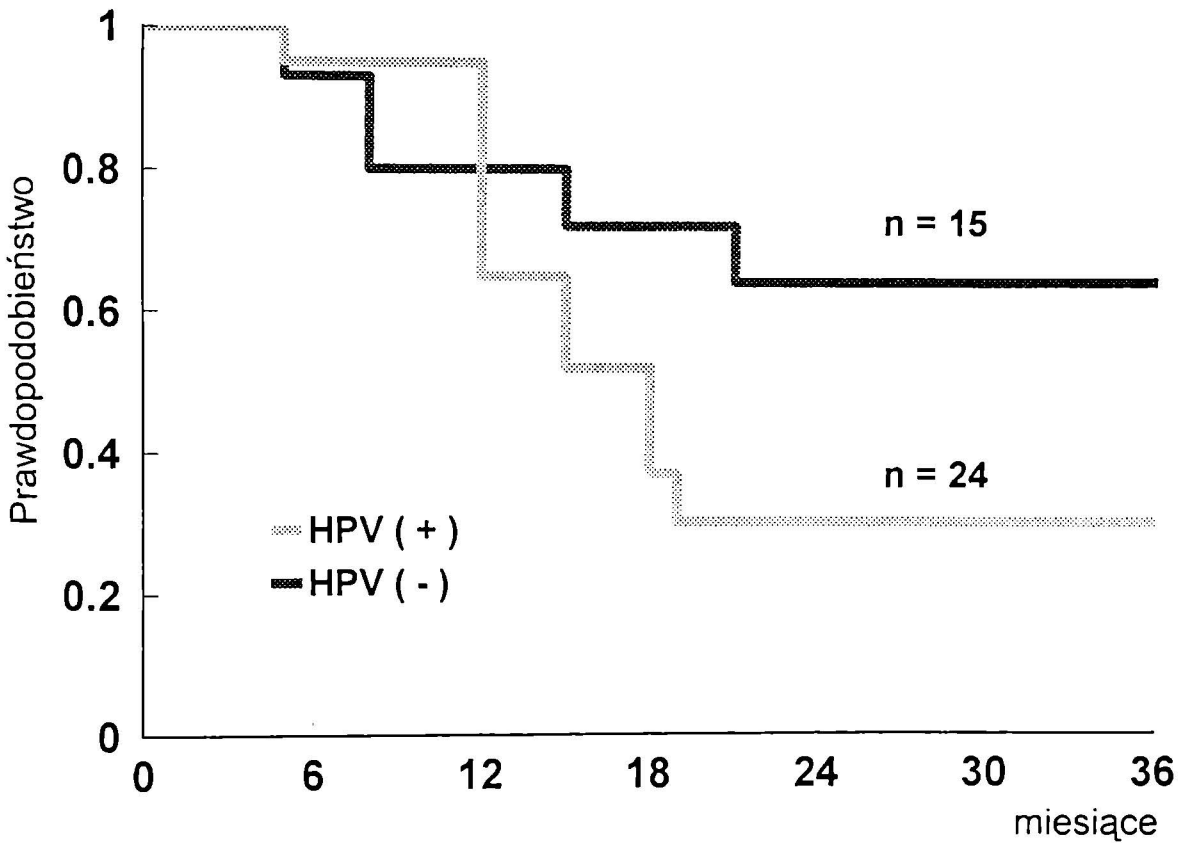
**A.** W zdrowej komórce aktywność czynnika transkrypcyjnego E2F jest regulowana przez białko Rb. Połączenie białka Rb z E2F powoduje zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G1. Fosforylacja białka Rb wpływa na uwolnienie E2F. Następuje transkrypcja genów E2F-zależnych i rozpoczęcie fazy S cyklu komórkowego. W fazie S aktywność E2F regulowana jest przez p107.

**B.** W zakażonej komórce wirusami HPV o wysokim potencjale onkogennym dochodzi do łączenia się wirusowego białka E7 z niefosforylowanym białkiem Rb, co powoduje uwolnienie czynnika transkrypcyjnego E2F i rozpoczęcie fazy S cyklu komórkowego. Wirusowe białko E7 ma również powinowactwo do p107, a wiążąc go zaburza kontrolę cyklu komórkowego w fazie S.

**Ryc. 3.**

Aktualizowane przeżycia całkowite chorych zakażonych i niezakażonych HPV

## PRZEŻYCIA CAŁKOWITE

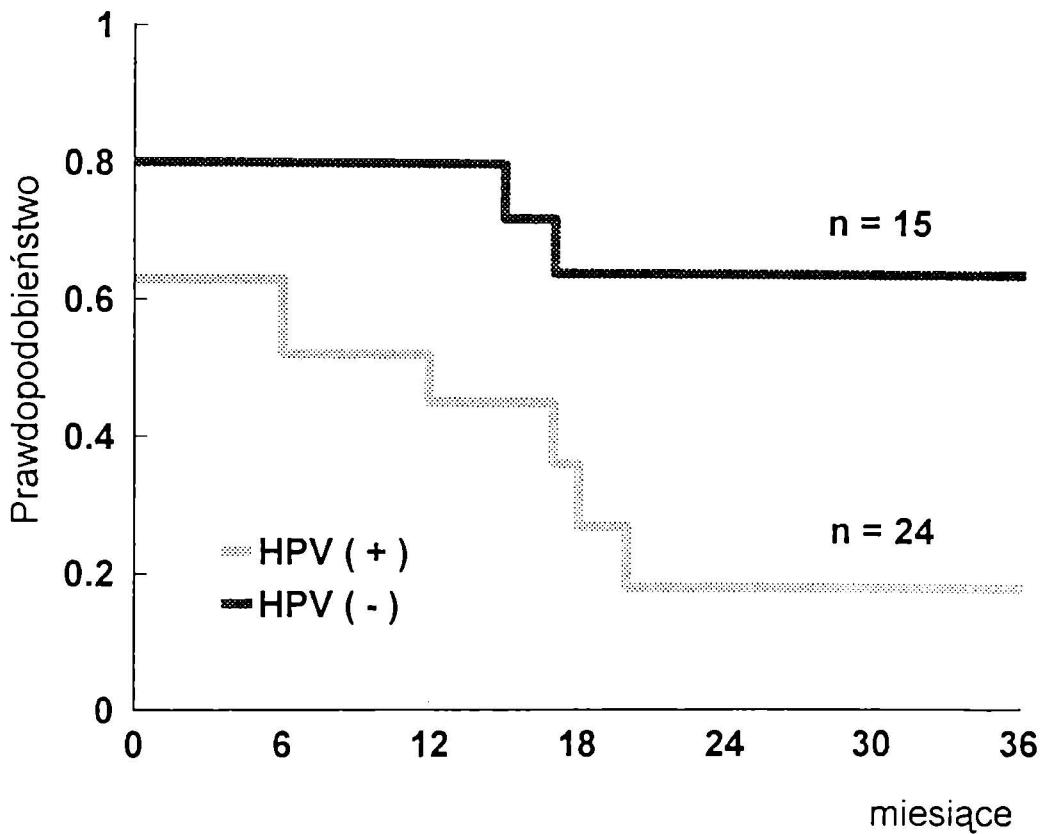


(log-rang test;  $p = 0.16$ )

**Ryc. 4.**

Aktualizowane przeżycia bezobjawowe chorych zakażonych i niezakażonych HPV

## PRZEŻYCIA BEZOBJAWOWE



(log-rank test;  $p = 0.0432$ )

**Tab.1.**

Zastosowanie metody immunoperoksydazowej w wykrywaniu antygeny kapsydowego HPV, w komórkach nabłonkowych szyjki macicy.

rozpoznanie kliniczne	I.HPV(+)/I.bad.	%
podejrzenie infekcji wirusowej w badaniu cytologicznym	2/33	6
CIN I	10/129	8
CIN II	0/13	
CIN III	9/28	32
rak płaskonabłonkowy	1/10	10
zmiany kłykciniopodobne na sromie	0/13	
<b>ogółem</b>	<b>22/226</b>	<b>8</b>
<b>grupa kontrolna</b>	<b>0/47</b>	

**Tab.2.**

Porównanie wyników badań w kierunku zakażenia HPV komórek nabłonkowych szyjki macicy metodą immunoperoksydazową (PAP), hybrydyzacji dot blot i PCR.

Materiał uzyskany od kobiet z rozpoznaniem CIN I.

Rozpoznanie	n	Liczba pacjentek HPV-dodatnich (%)		
		PAP	dot-blot	PCR
<b>CIN I</b>	<b>24</b>	<b>2 (8)</b>	<b>10 (42)</b>	<b>16 (67)</b>

**Tab.3.**

**Zakażenie HPV u kobiet z śródnabłonkową neoplazją i rakiem szyjki macicy wykazane w materiale biopsyjnym, metodą immunoperoxydazową (PAP) oraz hybrydyzacji in situ z użyciem sond znakowanych biotyną.**

Rozpoznanie kliniczne	n	PAP (%)		liczba pacjentek HPV+		ogółem	%
		16/18 (+)	16/18 (-)	sondy biotyńlowane dla HPV typu 31/33/35(-)	31/33/35(+)		
CIN I	8	0	0	2	0	2	
CIN II	3	0	0	0	0	0	10
CIN III	17	2	0	8	0	8	36
rak płasko-nabłonkowy	80	10	3	26	16	45	56
<b>ogółem</b>	<b>108</b>	<b>12 (11)</b>	<b>3</b>	<b>36</b>	<b>16</b>	<b>55</b>	<b>51</b>

**Tab.4.**

**Porównanie wyników badań wykonanych metodą hybrydyzacji in situ z sondą biotynylowaną dla HPV 16/18 i z sondą znakowaną <sup>32</sup>P dla HPV 16.  
Materiał biopsyjny pobrano od kobiet z rakiem szyjki macicy.**

rozpoznanie kliniczne	n	HPV + ogółem	liczba pacjentek			
			HPV 16 <sup>32</sup> P HPV 16/18 biotyn.(+)	(-) HPV 16 <sup>32</sup> P HPV 16/18 biotyn.(-)	(+) HPV 16 <sup>32</sup> P HPV 16/18 biotyn.(+)	(-) HPV 16 <sup>32</sup> P HPV 16/18 biotyn.(-)
I B	4	2	2	0	0	0
II A	13	9	2	1	6	6
II B	7	4	1	1	2	2
III B	16	15	4	4	7	7
<b>ogółem</b>	<b>40</b>	<b>30(75%)</b>	<b>9</b>	<b>6</b>	<b>15</b>	<b>15</b>

**Tab.5.**

**Porównanie wyników badań wykonanych metodami hybrydyzacji in situ z sondą biotynylowaną dla HPV 16/18 i izotopową dla HPV 16 oraz PCR ze starterami dla regionu L1 HPV 16**

	HPV 16 <sup>32</sup> P HPV 16/18 biotyn. (+)	HPV 16 <sup>32</sup> P HPV 16/18 biotyn. (-)	HPV 16 <sup>32</sup> P HPV 16/18 biotyn. (+)	HPV 16 <sup>32</sup> P HPV 16/18 biotyn. (-)	HPV 16 <sup>32</sup> P HPV 16/18 biotyn. (-)	<b>razem</b>
<b>PCR (+)</b>	<b>15</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>36</b>	
<b>PCR (-)</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	



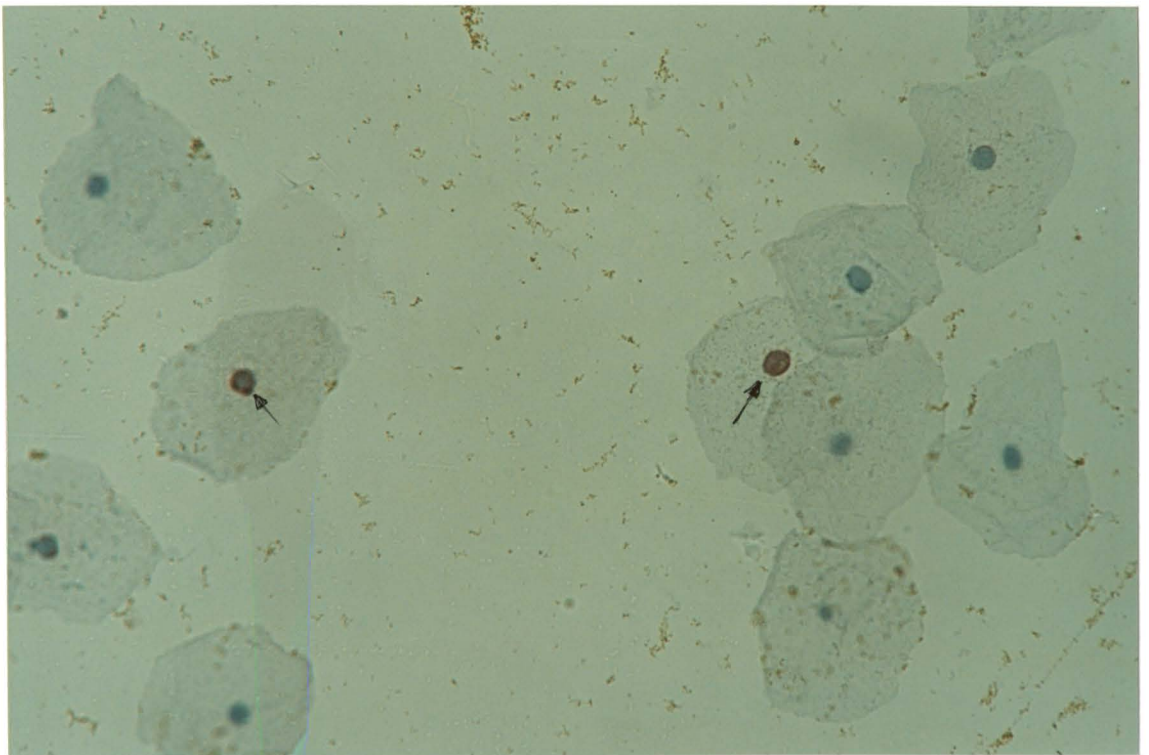
**Tab.6.**

Nadekspresja białka p53 wykazana metodą immunoperoksydazową u chorych z rakiem szyjki macicy, zakażonych i niezakażonych HPV

liczba badanych	liczba badanych		
	p53 (+)	p53 (-)	ogółem
16/18	3	6	9
HPV (+) 31/33/35	1	2	3 } <b>16</b>
16/18 i 31/33/35	1	3	4
HPV (-)	4	15	<b>19</b>
<b>Ogółem</b>	<b>9</b>	<b>26</b>	<b>35</b>

**Fot. 1.**

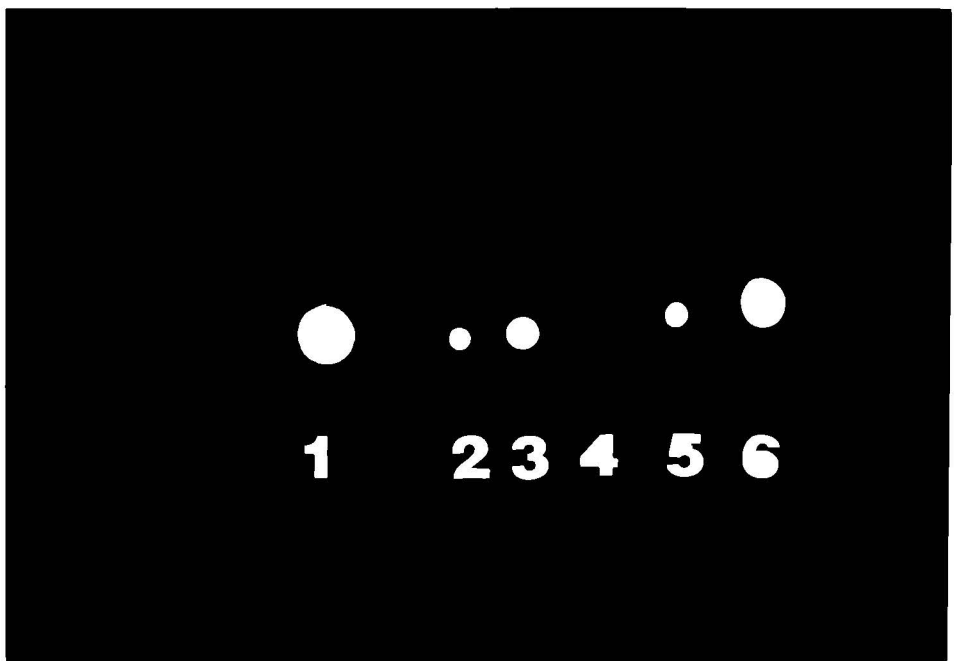
**Wykazanie obecności antygeny kapsydowego HPV metodą immunoperoksydazową, w jądrach komórek nabłonkowych pobranych z kanału szyjki macicy pacjentki B.B. 1.29 (pow. 400x).**



**Fot. 2.**

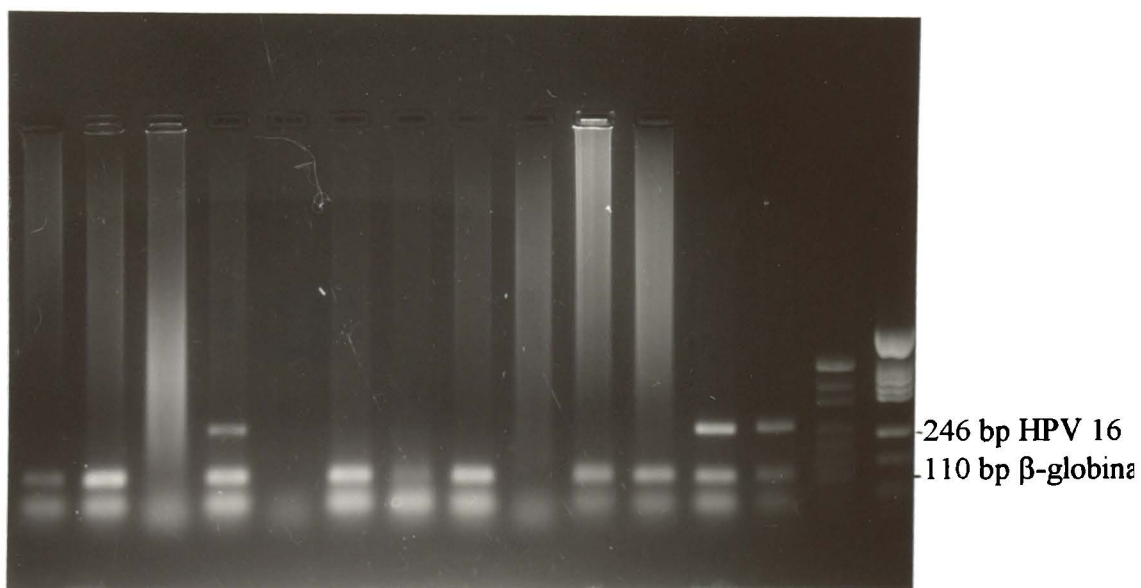
Wynik pozytywny uzyskany metodą hybrydyzacji dot blot z użyciem sondy charakterystycznej dla HPV 16 znakowanej izotopem  $^{32}\text{P}$ .

1. kontrola pozytywna - HPV 16 (+), 2-6 próby badane.



**Fot. 3.**

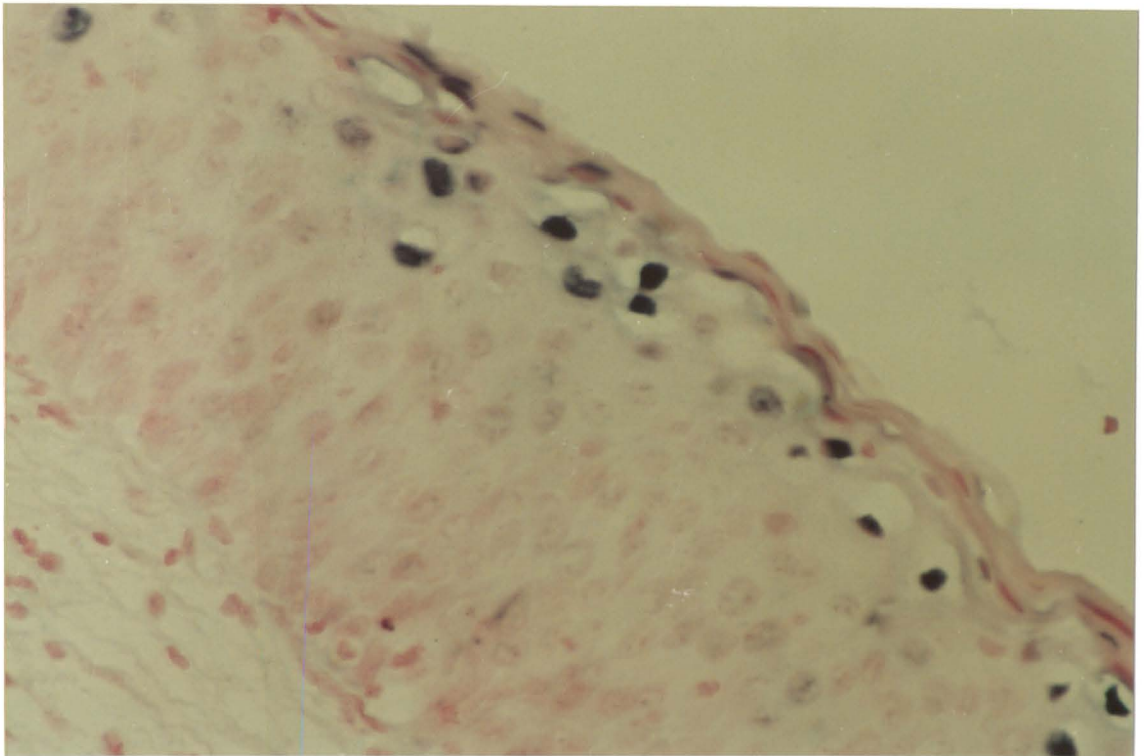
Analiza produktów PCR uzyskanych po amplifikacji DNA izolowanego z rozmazów szyjki macicy kobiet z rozpoznaniem śród nabłonkowej neoplazji szyjki macicy małego stopnia (CIN 1).



Zastosowano metodę elektroforezy w 2% żelu agarozowym.  
Wykazano obecność DNA HPV 16 w lini nr 4, 12;  
linia nr 13 kontrola dodatnia; linia nr 14, 15 - markery masy.

**Fot. 4.**

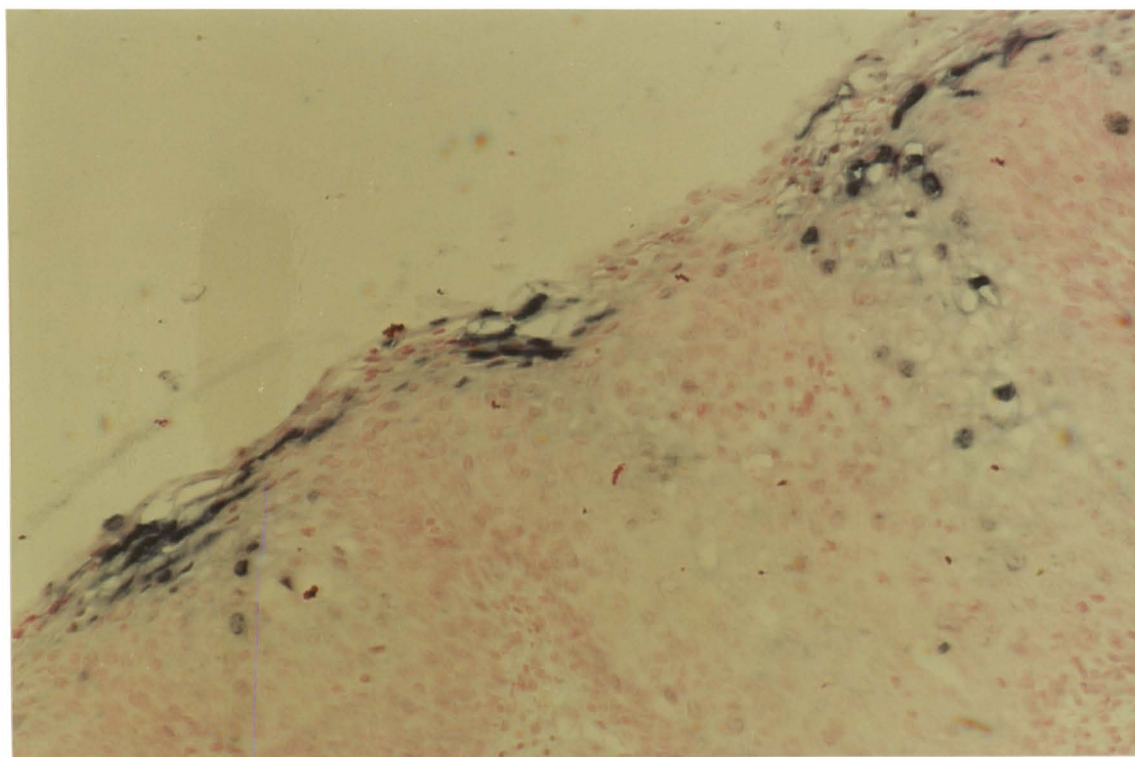
Materiał biopsyjny pobrany od pacjentki (B.R. 1.39) z rozpoznaniem śród nabłonkowej neoplazji szyjki macicy dużego stopnia. Metoda hybrydyzacji in situ z zastosowaniem sondy znakowanej biotyną. Wykazano obecność DNA HPV 16/18 w jądrach komórek nabłonka (pow. 400x).



**Fot. 5.**

Materiał biopsyjny pobrany od pacjentki (M.S. 1.53) z rozpoznaniem rakiem szyjki macicy.

Metoda hybrydyzacji in situ z zastosowaniem sondy znakowanej biotyną. Wykazano obecność DNA HPV 16/18 w jądrach komórkowych (pow. 400x).



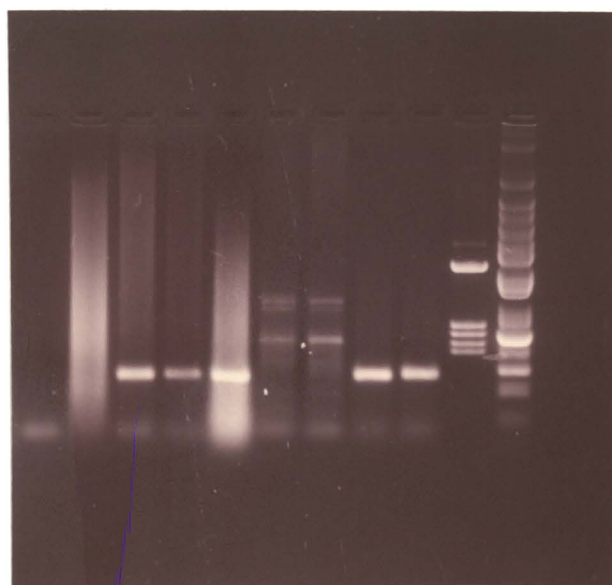
**Fot. 6.**

Analiza produktów PCR uzyskanych po amplifikacji DNA izolowanego z materiałów negatywnych w badaniu metodą hybrydacji in situ.

**A.** metodą elektroforezy w 2% żelu agarozowym wykazano obecność DNA HPV 16 w lini nr 3,4,5,8,9; linia nr 10,11 - markery masy

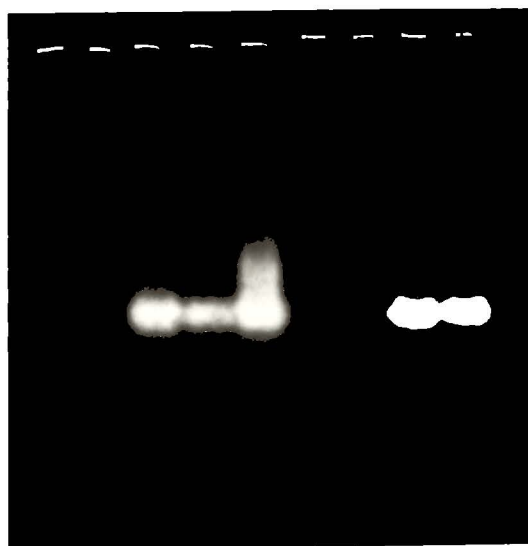
**B.** metodą Southern blot wykazano obecność DNA HPV 16 w lini nr 3,4,5,7,8,9.

**A**



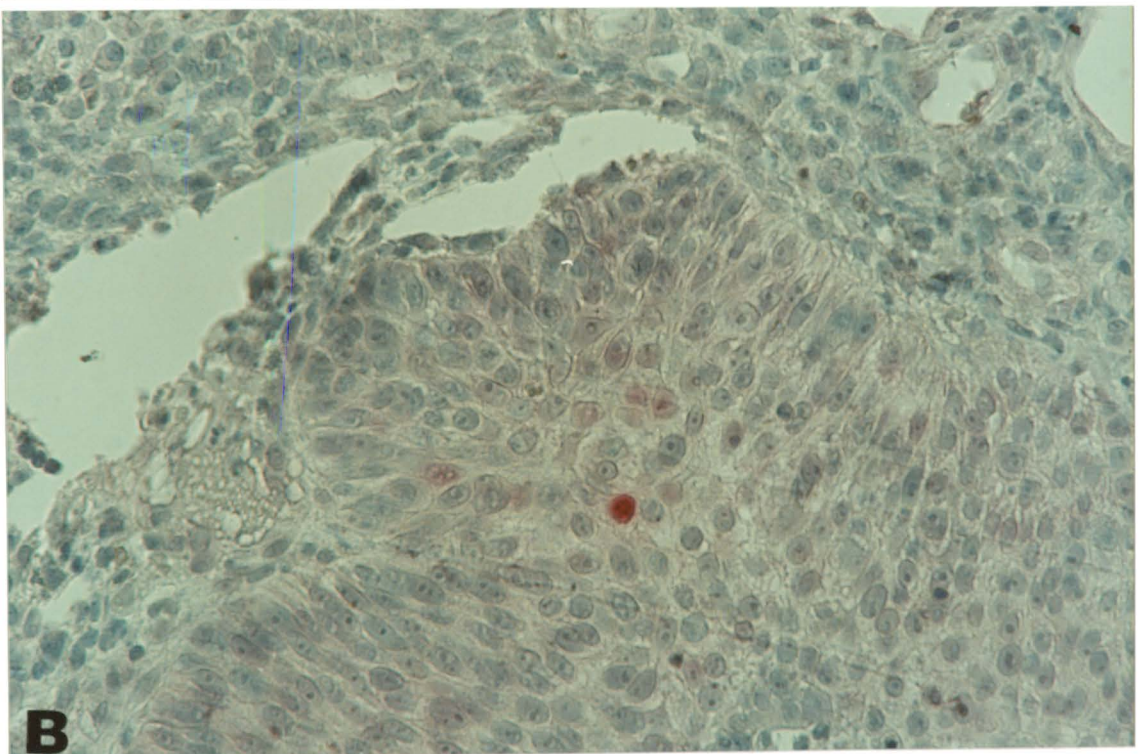
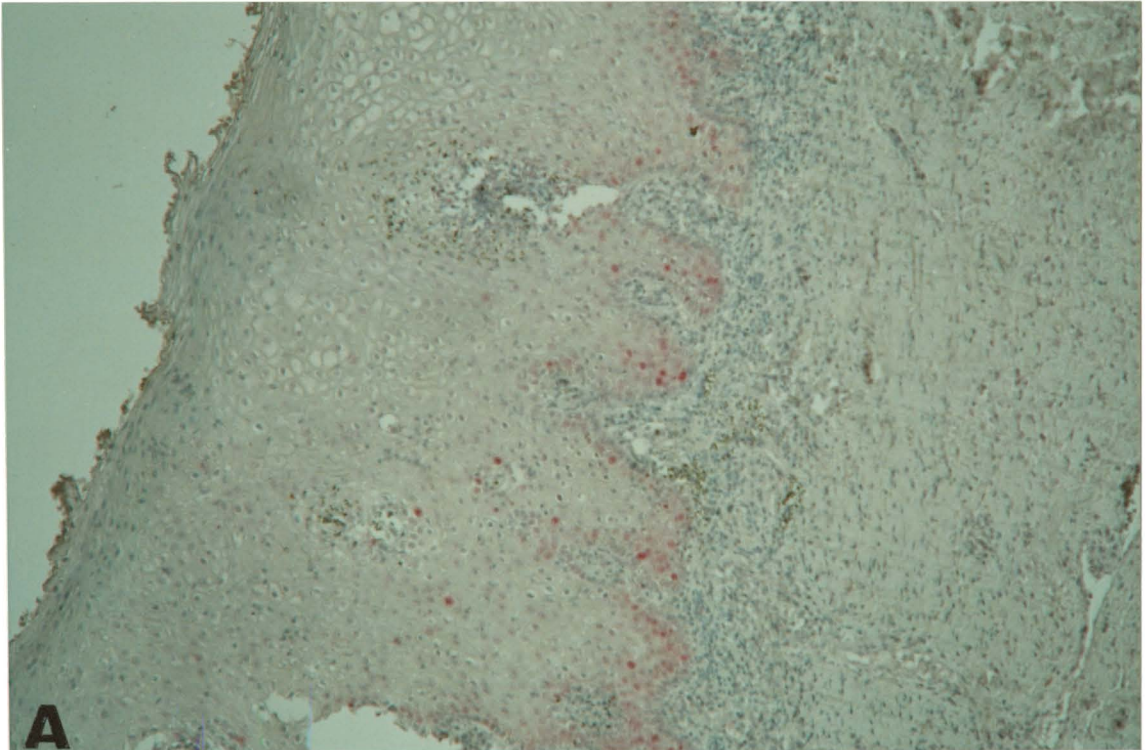
— 246 bp HPV 16

**B**



**Fot. 7.**

Wykazanie obecności białka p53 metodą immunohistochemiczną z zastosowaniem swoistych przeciwciał monoklonalnych. Materiał biopsyjny pacjentki (J.S. 1.41) z rozpoznaniem raka szyjki macicy; **A.** - powiększenie 100x, **B.** - powiększenie 400x.





## 9. STOSOWANE SKRÓTY

**bp** - (ilość) par zasad

**BSA** - albumina surowicy bydłej

**CDK** - (cyclin - dependent -kinase) kinaza cyklino-zależna

**CIN** - (cervical intraepithelial neoplasia) śródnabłonkowa neoplazja szyjki  
macicy

**E** - (early genes) geny wczesne wirusa

**E2F** - komórkowy czynnik transkrypcyjny

**E6-AP** - białko związane z wirusowym białkiem E6

**EDTA** - sól sodowa kwasu etylenodiaminoczworoocowego

**EGF** - (epidermal growth factor) naskórkowy czynnik wzrostu

**EV** - epidermodysplasia verruciformis

**HPV** - (human papillomavirus) ludzki wirus *Papilloma*

**ISH** - (in situ hybridization) metoda hybrydyzacji in situ

**L** - (late genes) geny późne wirusa

**ORF** - (open reading frame) otwarta ramka odczytu

**p53** - białko będące produktem genu supresorowego

**PBS** - zbuforowany roztwór soli fizjologicznej z chlorkiem wapnia i chlorkiem  
magnezu

**PCR** - (polymerase chain reaction) łańcuchowa reakcja polimerazy

**pRb** - białko będące produktem genu supresorowego

**RNA-za** - rybonukleaza

**SDS** - siarczan dodecyłu sodu

**temp.** - temperatura

**Tris** - trójhydroksymetylenoamino metan

**URR** - (upstream regulatory region) region regulatorowy genomu wirusa

## 10. PIŚMIENICTWO

1. Abramson A.L., Steinberg B.M., Winkler B.: Laryngeal papillomatosis: clinical, histopathologic and molecular studies. *Laryngoscope* 1987, 97, 678.
2. Arroyo M., Bagchi S., Raychaudhuri P.: Association of the human papillomavirus type 16 E7 protein with the S-phase-specific E2F-cyclin A complex. *Mol. Cell Biol.* 1993, 13, 6537.
3. Band V., Zajchowski D., Kulesa V. i wsp.: Human Papilloma virus DNAs immortalize normal human mammary epithelial cells and reduce their growth factor requirements. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 1990, 87, 463.
4. Barbosa M.S., Lowy D.R., Schiller J.T.: Papillomavirus polipeptides E6 and E7 are zinc-binding proteins. *J. Virol.* 1989, 63, 1404.
5. Barnes W., Delgado G., Kurman R.J. i wsp.: Possible prognostic significance of human papillomavirus type in cervical cancer. *Gynecol.Oncol.* 1988, 29, 267.
6. Barr B.B., Benton E.C., McLaren K i wsp. Human papillomavirus infection and skin cancer in renal allograft recipients. *Lancet* 1989, i, 124.
7. Basta A. Znaczenie infekcji wirusowej (HPV) oraz obniżonego poziomu witaminy A w surowicy krwi jak i niektórych czynników osobniczych i środowiskowych w morfogenezie raka szyjki macicy. Praca habilitacyjna 1990, CM UJ, Kraków.
8. Benedict W.F., Xu H.J., Takahaski R.: The retinoblastoma gene: its role in human malignances. *Cancer Invest.* 1990, 8, 535.
9. Borg A., Medley G., Garland S.M.: Polymerase chain reaction. A sensitive indicator of the prevalence of human papillomavirus DNA in a population with sexually transmitted disease. *Acta Cytol.* 1995, 39, 654.
10. Borresen A.L., Helland A., Nesland J. i wsp.: Papillomaviruses, p53, and cervical cancer. *Lancet.* 1992, 339, 1350.
11. Burger R.A., Monk B.J., Kurosaki T. i wsp.: Human papillomavirus type 18: association with poor prognosis in early stage cervical cancer. *J.Natl.Cancer Inst.* 1996, 88, 1361.

12. Busby-Earle R.M.C., Steel C.M., Williams A.R.W. i wsp.: Papillomaviruses, p53, and cervical cancer. *Lancet*. 1992, 339, 1350.
13. Campani D., Cecchetti D.: Immunocytochemical p53 detection by microwave oven heating of routinely formalin-fixed paraffin sections. *J.Pathol*. 1993, 171, 151.
14. Campo M.S., Grindlay G.J., O'Neil B.W. i wsp. : Effective vaccination against a mucosal papillomavirus. *J.Gen.Virol*. 1993, 74, 945.
15. Chan S-Y, Delius H., Halpern A.L. i wsp.: Analysis of genomic sequences of 95 papillomavirus types: uniting typing, phylogeny, and taxonomy; *J.Virol*. 1995; 69, 3074.
16. Chang D.Y., Hsieh C.Y., Chen R.J. i wsp.: Comparison of detection of human papillomavirus 16 DNA in cervical carcinoma tissues by Southern blot hybridisation and nested polymerase chain reaction. *J.Med.Microbiol*. 1995, 43, 430.
17. Chen T.M., Chen C.A., Wu C.C. i wsp.: The genotypes and prognostic significance of human papillomaviruses in cervical cancer. *Int.J.Cancer* 1994, 57, 181.
18. Ciccolini F., Di Pacquale G., Carlotti F. i wsp.: Functional studies of E7 proteins from different HPV types. *Oncogene* 1994, 9, 2633.
19. Clavel C., Binninger I., Bouterin M.C. i wsp.: Comparison of four non-radioactive and <sup>35</sup>S-based methods for the detection of human papillomavirus DNA by in situ hybridization. *J.Virol.Meth.*, 1991, 33, 253.
20. Cobrinik D., Whyte P., Peeper D.S. i wsp.: Cell cycle-specific association of E2F with the p130 E1A-binding protein. *Genes Dev*. 1993, 7, 2392.
21. Cohen B.A., Honig P., Androphy E. Anogenital warts in children. *Arch. Dermatol*. 1990, 126, 1575.
22. Cooper K., Herrington C.S., Graham A.K. i wsp.: In situ evidence for HPV 16, 18, 33 integration in cervical squamous cell cancer in Britain and South Africa. *J.Clin Pathol*. 1991, 44, 406.
23. Cripe P., Haugen H., Turk J.P.: Transcriptional regulation of the human papillomavirus-16 E6-E7 promoter by keratinocyte-dependent enhancer, and by viral E2 trans-activator and repressor gene products: implications for cervical carcinogenesis. *EMBO J*. 1987, 6, 3745.

24. Crook T., Morgenstern J.P., Crawford L. i wsp.: Continued expression of HPV-16 E7 protein is required for maintenance of the transformed phenotype of cells co-transformed by HPV-16 plus EJ-ras. *EMBO J.* 1989, 8, 513.
25. Crook T., Tidy J.A., Vousden K.H.: Degradation of p53 by HPV E6 sequences distinct from those required for p53 binding and trans-activation. *Cell*, 1991, 67, 547.
26. Crook T., Wrede D., Vousden K.H.: p53 point mutation in HPV negative human cervical carcinoma cell lines. *Oncogene* 1991,6,873.
27. Crook T., Wrede D., Tidy J.A. i wsp.: Clonal p53 mutation in primary cervical cancer: association with human-papillomavirus-negative tumours. *Lancet* 1992, 339, 1070.
28. Crum C.P., Egawa K., FU Y.S. i wsp. Atypical immature metaplasia (AIM): A subset of human papillomavirus infection of the cervix. *Cancer* 1983, 51, 2214.
29. Crum C.P.: Identifying high-risk precursors of cervical cancer. *Am.J.Clin.Pathol.* 1990, 92, 379.
30. Czegledy J., Evander M., Hernadi Z. i wsp.: Human papillomavirus type 18 E6 mRNA in primary tumors and pelvic lymph nodes of hungarian patients with squamous cervical cancer. *Int.J.Cancer* 1994, 56, 182.
31. Danilewicz M., Wągrowaska-Danilewicz M.: Zmiany patologiczne szyjki macicy w przypadku zakażenia Human Papilloma Virus (HPV). *Gin.Pol.* 1987, 58, 1
32. Davies R., Hicks R., Crook T. i wsp.: Human Papillomavirus type 16 E7 associates with a histone H1 kinase activity and with p107 through sequences necessary for transformation. *J. Virol.* 1993, 67, 2521.
33. De Villiers E.M.: Heterogeneity of the human papillomavirus group. *J.Virol.* 1989, 63, 4898.
34. De Villiers E.M.: Laboratory techniques in the investigation of human papillomavirus infection. *Genitourin.Med.* 1992, 68, 50.
35. Delvenne P., Fontaine M.A., Delvenne C. i wsp.: Methods in pathology. Detection of human papillomaviruses in paraffin-embedded biopsies of cervical intraepithelial lesions: analysis by immunohistochemistry, in situ hybridization, and the polymerase chain reaction. 1994, 7, 113.

36. DiMaio D., Petti L., Hwang E-S.: The E5 transforming proteins of the papillomaviruses. *Semin. Virol.* 1994,5, 369.
37. Dohmen R.J., Madura K., Bartel. i wsp.: The N-end rule is mediated by the UBC2(RAD6) ubiquitin-conjugating enzyme. *Proc.Natl.Acad Sci.USA* 1991, 88, 7351.
38. Durst M., Glitz D., Schneider A. i wsp.: Human papillomavirus type 16 (HPV 16) gene expression and DNA replication in cervical neoplasia: Analysis by in situ hybridisation. *Virology* 1992, 189, 132.
39. El-Deiry W.S., Tokino T., Velculescu V.E. iwsp.: WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 1993, 75, 817.
40. Eluf-Neto J.M., Booth N., Munoz F.X. i wsp.: Human papillomavirus and invasive cervical cancer in Brazil. *Br.J.Cancer* 1994, 69, 114.
41. Ewen M., Faha B., Harlow E. i wsp.: Interaction of p107 with cyclin A independent of complex formation with viral oncoproteins. *Science* 1992, 255, 85.
42. Ewen M.E., Sluss H.K., Sherr C.J. i wsp.: Functional interaction of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins. *Cell* 1993, 73, 487.
43. Fairley C.K., Tabrizi S.N., McNeil J.J. i wsp. Is HPV always sexually acquired? *Med. J. Australia* 1993, 159, 724.
44. Feltkamp M.C., Smits H.L., Vierboom M.P.: Vaccination with cytotoxic T lymphocyte epitope-containing peptide protects against a tumor induced by human papillomavirus type 16-transformed cells. *Eur.Immunol.* 1993, 23, 2242.
45. Fucks P.G., Girardi F., Pfister H. ; Human papillomavirus 16 DNA in cervical cancer and in lymph nodes of cervical cancer patients a diagnostic marker for early metastases? *Int.J.Cancer* 1989, 43, 41.
46. Gall S.A.: Human papillomavirus infection and therapy with interferon. *Am.J.Obstet. Gynecol.* 1995, 172, 1354.
47. Galloway D.A.: Human papillomavirus vaccines: A warty problem. *Infect.Agent Dis.* 1994, 3, 187.
48. Gibson P.A., Gardener S.D., Best S.J.: Human papillomavirus types in anogenital warts of children. *J.Med.Virol.* 1990, 30, 142.

49. Girardi F., Fucks P., Haas J.: Prognostic importance of human papillomavirus type 16 DNA in cervical cancer. *Cancer* 1992, 96, 2502.
50. Gjoen K., Olsen A.O., Magnus P. i wsp.: Prevalence of human papillomavirus in cervical scrapes, as analyzed by PCR, in a population-based sample of women with and without cervical dysplasia. *APMIS*, 1996, 104, 68.
51. Gloss B., Bernard H.H., Seedorf K i wsp.: The upstream regulatory region of the human papillomavirus-16 contains an E2 protein-independent enhancer which is specific for cervical carcinoma cells and regulated by glucocorticoid hormones. *EMBO J.* 1987, 6, 3735.
52. Goodrich D.W., Lee W.H.: Molecular characterization of the retinoblastoma susceptibility gene. *Biochim. Biophys. Acta* 1993, 1155, 43.
53. Gown A.M., de Wever N., Battifora H.: Microwave-based antigenic unmasking. A revolutionary new technique for routine immunohistochemistry. *Appl. Immunohistochem.* 1993, 1, 256.
54. Gross G., Ellinger K., Roussaki A. i wsp. Epidermodysplasia verruciformis in a patient with Hodgkin's disease: characterization of the new papillomavirus type and interferon treatment. *J.Invest.Dermatol.* 1988, 91, 43.
55. Grusendorf E.I., Cremer A.S.: The demonstration of human Papillomavirus 16 genomes in the nuclei of genital cancers using two different methods in situ hybridization. *Cancer* 1990, 65, 238.
56. Hagmar B., Kalantari M., Skyldberg B. i wsp.: Human Papillomavirus in cell samples from Stockholm gynecologic health screening. *Acta Cytol.* 1995, 39, 4, 741.
57. Halbert C.L., Demers G.W., Galloway D.A.: The E6 and E7 genes of human papillomavirus type 6 have weak immortalizing activity in human epithelial cells. *Virol.* 1992, 66, 2125.
58. Hallam N., Green J., Gibson P. i wsp.: Prevalence of HPV cervical infection in a family planning clinic determined by polymerase chain reaction and dot blot hybridisation. *J.Med.Virol.* 1991, 34, 154.
59. Han K.A., Kulesz-Martin M.: Altered expression of wild type p53 tumor suppressor gene during murine epithelial transformation. *Cancer Res.* 1992, 52, 749.

60. Hara Y., Tsuchida S., Nakamura T. i wsp.: Human Papillomavirus infection of the uterine cervix analyzed by nonisotopic in situ hybridization. *J.Med.Virol.* 1990, 31, 120.
61. Harper J.W., Adami G.R., Wei N. i wsp.: The p21 CDK-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 1993, 75, 805.
62. Heck D.V., Yee C.L., Howley P.M. i wsp.: Efficiency of binding the retinoblastoma protein correlates with the transforming capacity of the E7 oncoproteins of the human papillomaviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992, 89, 4442.
63. Hershko A., Ciechanover A.: The ubiquitin system for protein degradation. *Ann. Rev. Biochem.* 1992, 61, 761.
64. Higgins D.D., Davy M., Roder D. i wsp.: Increased age and mortality associated with cervical carcinomas negative for human papillomavirus RNA. *Lancet*, 1991, 338, 910.
65. Hinds P.W., Mittnacht S., Dulic V. i wsp.: Regulation of retinoblastoma protein functions by ectopic expression of human cyclins. *Cell* 1992, 70, 993.
66. Hines J.F., Ghim S.J., Christensen N.D. i wsp.: Role of conformational epitopes expressed by human papillomavirus major capsid proteins in the serologic detection of infection and prophylactic vaccination. *Gynecol. Oncol.* 1994, 55, 13.
67. Hubbert N.L., Sedman S.A., Schiller J.T.: Human papillomavirus type 16 E6 increases the degradation rate of p53 in human keratinocytes. *J.Virol.* 1992, 66, 6237.
68. Huibregtse J.M., Scheffner M., Howley P.M.: A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus type 16 or 18. *EMBO J.* 1991, 10, 4129.
69. Jabłońska S., Orth G., Obałek S. i wsp.: Cutaneous warts. Clinical, histologic and virologic correlations. *Clin.Dermatol.* 1985, 3, 71.
70. Jabłońska S., Kawashima M., Obałek S. i wsp. Human papillomavirus-related cutaneous benign lesions and skin malignancies. *Cancer Cells* 1989, 5, 309.

71. Jarett W.F., O'Neil B.W., Gaukroger J.M. i wsp. Studies on vaccination against papillomaviruses: A comparison of purified virus, tumour extract and transformed cells in prophylactic vaccination. *Vet.Rec.* 1990, 126, 449.
72. Jeffers M.D., Richmond J., Farquharson M. i wsp.: P53 immunoreactivity in cervical intraepithelial neoplasia and non-neoplastic cervical squamous epithelium. *J.Clin.Pathol.* 1994, 47,1073.
73. Karlsen F, Steen H.B., Nesland J.M.: SYBR Green I DNA staining increases the detection sensitivity of viruses by polymerase chain reaction. *J.Virol.Methods* 1995, 55, 153.
74. Karlsen F., Kalantari M., Jenkins A. i wsp.: Use of multiple PCR primer sets for optimal detection of human papillomavirus. *J.Clin.Microbiol.* 1996, 34, 2095.
75. Kastan M.B., Onyerkwere O., Sidransky D. i wsp.: Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res.* 1991, 53, 6304.
76. Kawashima M.: Epidermodysplasia verruciformis. *J. Dermatol.* 1992, 9, 219.
77. Kędzia H., Goździcka-Józefiak A., Wolna M. i wsp.: Ludzki wirus Papilloma (HPV) 16/18 w ustroju kobiet z rakiem szyjki macicy. *Gin.Pol.* 1991, 62, 10.
78. Koutsky L.A., Galloway D.A., Holmes K.K.: Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Epidemiol.Rev.* 1988, 10, 122.
79. Koutsky L.A., Holmes K.K., Critchlow C.W. i wsp.: A cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to papillomavirus infection. *N.Engl.J.Med.* 1992, 397, 1272.
80. Kreider J.W.,Howett M.K., Wolfe S.A. i wsp. Morfological transformation in vitro of human uterine cervix with papillomavirus from condylomata acuminata. *Nature* 1985, 317, 639.
81. Krek W., Ewen M.E., Shirodkar S. i wsp.: Negative regulation of the growth-promoting transkrypcyjny czynnik E2F-1 by a stably bound cyclin A-dependent protein kinase. *Cell* 1994, 78, 161.



82. Krzeszowiak A., Kosz-Vnenchak M.: Hybrydyzacja in situ i jej wykorzystanie w badaniach infekcji wirusowych. *Mikrobiol.Med.* 1996, 2, 6.
83. Kuerbitz S.J, Plunkett B.S., Walsh W.V. i wsp.: Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc.Natl. Acad. Sci.USA* 1992, 80, 7491.
84. Kurman R.J., Shah K.H., Lancaster M.D. i wsp.: Immunoperoxidase localization of papillomavirus antigens in cervical dysplasia and vulvar condylomas. *Am.J.Obstet.Gynecol.* 1981, 140, 931.
85. Kwaśniewska A., Tukendorf A., Semczuk M.: Częstość infekcji HPV oraz poziom glutationu w surowicy krwi u kobiet z patologią szyjki macicy. *Med.Dośw.Mikrobiol.* 1995, 47, 213-218.
86. Kwaśniewska A., Tukendorf A.: Poziom retinolu w surowicy krwi kobiet zakażonych HPV i ze zmianami dysplastycznymi szyjki macicy. *Med.Dośw.Mikrobiol.* 1996, 48, 71.
87. Lam E.W.F., Morris J.D.H., Davies R. i wsp.: HPV 16 E7 oncoprotein deregulates b-myc expression: correlation with targeting of p107/E2F complexes. *EMBO J.* 1994, 13, 871.
88. La Thangue N.B.: DRTF1/E2F: an expanding family of heterodimeric transcription factors implicated in cell cycle control. *Trends Biochem. Sci.* 1994, 19, 108.
89. Lambert P.F., Spalholz B.A., Howley P.M.: Genetic assignment of the multiple E2 gene products in bovine papillomavirus-transformed cells. *J.Virol.* 1989, 63, 3151.
90. Lancaster W.D., Olson C., Meinke W.: Bovine papillomavirus: presence of virus-specific DNA sequences in naturally occurring equine tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1977, 74, 524.
91. Lancaster W.D., Castellano C., Santos C. i wsp.: Human papillomavirus deoxyribonucleic acid in cervical carcinoma from primary and metastatic sites. *Am.J.Obstet.Gynecol.* 1986, 154, 115.
92. Linden M.D., Nathanson S.D., Zarbo R.J.: Evaluation of anti-p53 antibody staining. Quality control and technical considerations. *Appl. Immunohistochemistry.* 1994, 2, 218-224.

93. Lorincz A.T., Reid R., Jenson A.B. i wsp.: Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of fifteen common anogenital types. *Obstet.Gynecol.* 1992, 79, 328.
94. Majewski S., Jabłońska S.: Epidermodysplasia verruciformis as a model of human papillomavirus-induced genetic cancers: the role of local immunosurveillance. *Am.J.Med.Sci.* 1992, 304, 174-179.
95. Mansur C.P., Androphy E.J.: Cellular transformation by papillomavirus oncoproteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1993, 1155, 323.
96. Mark H.F.L., Santoro K., Campbell W. i wsp.: Intergration of human papillomavirus sequences in cervical tumor cell lines. *Ann.Clin.Lab.Sci.* 1996, 26, 147.
97. Markowska J., Harłodzińska A., Bar J.K. i wsp.: Badania nad zakażeniem Wirusem Ludzkiego Brodawczaka (HPV) i ekspresją onkoproteiny p21 w rakach szyjki macicy. *Gin.Pol.* 1996, 67, 403.
98. Mayol X., Grana X., Baldi A. i wsp.: Cloning of the new member of the retinoblastoma gene family (pRb2) which binds to the E1A transforming domain. *Oncogene* 1993, 8, 2561.
99. Mc Intyre M., Frattini M.G., Grossman S.R. i wsp.: Human Papilloma virus type 18 E7 protein requires intact cys-x-x-cys motifs for binding, dimerization, and transformation but not for Rb binding. *J. Virol.* 1993, 67, 3142.
100. Meisels A., Fortin R.: Condylomatous lesions of the cervix and vagina. I.Cytologic patterns. *Acta Cytol.* 1976, 20, 505.
101. Meisels A., Mortin C., Casas-Cordero M.: Human papillomavirus infection of the uterine cervix. *Int.J.Gynecol.Pathol* 1982, 1, 75.
102. Meyer M.P., Markiw C.A., Matuscak R.R. i wsp.: Detection of human papillomavirus DNA in genital lesions by using a modified commercially available in situ hybridization assay. *J.Clin.Microbiol.* 1991, 1308.
103. Mietz J.A., Unger T., Huibregtse J.M. i wsp.: The transcriptional transactivation function of wild-type p53 is inhibited by SV40 large T-antigen and by HPV-16 E6 oncoprotein. *EMBO J.* 1992, 11, 5013.

104. Milde-Langosch K., Albrecht K., Joram Simone. i wsp.: Presence and persistence of HPV infection and p53 mutation in cancer of the cervix uteri and the vulva. *Int.J.Cancer*. 1995, 63, 639.
105. Morris R.G., Arends M.J., Bishop P.E. i wsp.: Sensitivity of digoxigenin and biotin labelled probes for detection of human papillomavirus by in situ hybridization. *J.Clin.Pathol.* 1990, 43, 800.
106. Morrison E.A.B., Ho G.Y.F., Vermund S.H. i wsp.: Human papillomavirus infection and other risk factors for cervical neoplasia: a case-control study. *Int.J.Cancer* 1991, 49, 6.
107. Morrison E.A.B., Goldberg G.L., Kadish A.S. i wsp.: Polymerase chain reaction detection of human papillomavirus: Quantitation may improve clinical utility. *J.Clin.Microbiol.* 1992,30,2539.
108. Motokura T., Arnold A.: Cyclin and oncogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1993, 1155, 63.
109. Munger K., Phelps W.C., Bubb V.: The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation primary human keratinocytes. *J.Virol.* 1989, 63, 4417.
110. Munger K., Werness B.A., Dyson N. i wsp.: Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumour suppressor gene product. *EMBO J.* 1989, 8, 4099.
111. Munger K., Phelps W.C.: The papillomavirus E7 protein as a transforming and transactivating factor. *Biochim.Biophys.Acta* 1993, 1155, 111.
112. Muñoz N., Bosch F.X., de Sanjose S. i wsp.: The role of HPV in the etiology of cervical cancer. *Mutat.Res.* 1994, 305, 293.
113. Ngan H.Y.S., Stanley M., Liu S.S. i wsp.: HPV and p53 in cervical cancer. *Genitourin Med.* 1994, 70, 167.
114. Norton A.J.: Microwave oven heating for antigen unmasking in routinely processed tissue sections. *J.Pathol.* 1993, 171, 79.
115. Nuovo G.J., Becker J., Margiotta M. i wsp.: Histological distribution of polymerase chain reaction amplified human papillomavirus-6 and papillomavirus-11 DNA in penile lesions. *Am.J.Surg. Pathol.* 1992, 16, 269.

116. Oriel I.D., Walker P.G.: Genital papillomavirus infections w: Sexually Transmitted Diseases, red. Csonka G.W., Oates I.K., Bailliere Tindall, London, 1990, 153.
117. Pagano M., Durst M., Joswig S. i wsp.: Binding of the human E2F transcription factor to the retinoblastoma protein but not to cyclin A is abolished in HPV 16-immortalized cells. *Oncogene* 1992, 7, 1681.
118. Park J.S., Kurman R.J., Kessis T.D. i wsp.: Comparison of peroxidase-labeled DNA probes with radioactive RNA probes for detection of human papillomaviruses by in situ hybridization in parafin sections. *Modern Pathol.* 1991, 4, 81.
119. Phelps W.C., Yee C.L., Munger K. i wsp.: The human papillomavirus type 16 E7 gene encodes transactivation and transformation functions similar to those of adenovirus E1A. *Cell* 1988, 53, 539.
120. Phelps W.C., Bagchi S., Barnes J.A.: Analysis of trans activation by human papillomavirus type 16 E7 and adenovirus 12s E1A suggests a common mechanizm. *J.Virol.* 1991, 65, 6922.
121. Ramael M., Segers K., Pannemans N. i wsp.: Detection of human papillomavirus in cervical scraping by in situ hybridization and the polymerase chain reaction in relation to cytology. *Histochem.J.* 1995, 27, 54.
122. Riou G., Favre M., Jeannel L. i wsp.: Association between poor prognosis in early-state invasive cervical carcinomas and non-detection of HPV DNA. *Lancet*, 1990, 335, 1171.
123. Rzepka-Górska I., Błogowska A., Zielińska D. i wsp.: Zakażenie wirusem HPV oraz inne czynniki promocyjne w procesie karcinogenezy u dziewcząt. *Gin.Pol.* 1993, 64, 322.
124. Saiki R.K., Scharf s., Faloona F. i wsp.: Enzymatic amplification of betaglobin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985, 230, 1350.
125. Sang B.C., Barbosa M.S.: Single amino acid substitutions in "low-risk" human papillomavirus (HPV) types 6 E7 protein enhance features characteristic of the "high-risk" HPV E7 oncoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992, 89, 8063.
126. Scheffner M., Werness B.A., Huibregtse J.M. i wsp.: The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus type 16 and 18 promotes the egradation of p53. *Cell* 1990, 63, 1129.

127. Scheffner M., Huibregtse J.M., Vierstra R.D. i wsp.: The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 1993, 75, 495.
128. Schneider A., Meinhardt G., Kirchmayer R. i wsp.: Prevalence of human papillomavirus genomes in tissues from the lower genital tract as detected by molecular in situ hybridization. *Int.J.Gynecol.Pathol.*1991, 10, 1.
129. Shah K.V., Howley P.M.: *Papillomaviruses*,w: *Virology red. Fields B.N., Knipe D.M., Chanock R.M. i wsp. Raven Press, 2 ed., New York, 1990, 1651.*
130. Shepherd P., Lunny D., Brookes R. i wsp: The detection of human papillomaviruses in cervical biopsies by immunohistochemistry and in situ hybridization. *Scand.J.Immunol.* 1992, 36, Suppl.11, 69.
131. Shirasawa H., Tomita Y., Fuse A. i wsp. Structure and expresion of an integrated human papillomavirus type 16 genome amplified in a cervical carcinoma cell line. *J.Gen.Virol.* 1989, 70, 1913.
132. Sousa R., Dostatni N., Yanir M.: Control of papillomavirus gene expression. *Biochim. Biophys. Acta* 1990, 1032, 19.
133. Southern E.M.: Detection of specyfic sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J.Mol.Biol.*1975, 98, 503.
134. Stoler M.H., Broker T.R.: In situ hybridization detection of human papilloma virus DNA and messenger RNA in genital condylomas and a cervical carcinoma. *Hum. Pathol.* 1986,17, 1250.
135. Storey A., Pim D., Murray A. i wsp.: Comparison of the in vitro transforming activities of human papillomavirus types. *EMBO J.* 1988, 7, 1815.
136. Storey A., Banks L.: Human papillomavirus type 16 E6 gene cooperates with J-ras to immortalize primary mouse cells. *Oncogene* 1993, 8, 919.
137. Suzich J.A., Ghim S., Palmer-Hill F.J i wsp. Systemic immunization with papillomavirus L1 protein completely prevents the development of viral mucosal papillomas. *Proc.National Acad.Sci. USA* 1995, 92, 11553.
138. Syrjanen S.M.: Basic concepts and practical applications of recombinant DNA techniques in detection of human papilloma 16 virus (HPV) infections. *APMIS* 1990, 98, 95.

139. Szostek S., Klimek M., Urbański K. i wsp.: Zakażenie wirusem Papilloma a rokowanie u chorych na raka szyjki macicy leczonych napromienianiem. *Nowotwory*, 1994, 44, 343.
140. Szostek S., Zgórnjak-Nowosielska I.: Zastosowanie metody immuno-peroksydazowej i hybrydyzacji in situ w wykrywaniu zakażeń wirusami Papilloma (HPV). *Mat.Nauk.Konf.PAN i Pol.Tow.Mikrob.*, Puławy 1994, 12.
141. Szostek S., Poręba E., Goździcka-Józefiak A. i wsp.: Detection of human papillomaviruses in cervical cancer by in situ hybridization and PCR. *ZBL Bakt.- Int. J. Med. Microbiol.* 1996 (w druku).
142. Taichman L.B., La Porta R.F.: The expression of papillomaviruses in epithelial cells. w: *The Papovaviridae, vol. 2: The Papillomaviruses*, red. Salzman N.P., Howley P.M., Nowy Jork, Plenum Press, 1987, 109.
143. Thorner L.K., Lim D.A., Botchan M.R.: DNA-binding domain of bovine papillomavirus type 1 E1 helicase: structural and functional aspects. *J.Virol.* 1993, 67, 6000.
144. Tommasino M., Adamczewski J.P., Carlotti F.: HPV 16 E7 protein associates with the protein kinase p33CDK2 and cyclin A. *Oncogene* 1993, 8, 195.
145. Tommasino M., Crawford L.: Human Papillomavirus E6 and E7: proteins which deregulate the cell cycle. *BioEssays* 1995, 17, 509.
146. Tompson C.H., Rose B.R., Cossart Y.E.: Detection of HPV DNA in archival specimens of cervical cancer using in situ hybridisation and the polimerase chain reaction. *J.Med.Virol.* 1992, 36, 54.
147. Ustav M., Ustav E., Szymański P. i wsp.: Identification of the origin of replication of bovine papillomavirus and characterization of the viral origin recognition factor E1. *EMBO J.* 1991, 10, 4321.
148. Van Ranst M.A., Tachezy R., Delius H. i wsp.: Taxonomy of the Human Papillomaviruses. *Papillomavirus Rep.* 1993; 4; 61.
149. Van Ranst M.A., Tachezy R., Burk R.D.: Human papillomavirus nucleotide sequences: what's in stock? *Papillomavirus Rep.* 1994, 5, 65.
150. White A.E., Livanos E.M., Tisty T.D.: Differential disruption of genomic integrity and cell cycle regulation in normal human fibroblast by the HPV oncoproteins. *Genes Dev.* 1994, 8, 666.

151. Wilcox J.: Fundamental principles of in situ hybridization. Histochem.Cytochem. 1993, 41, 1725.
152. Woodworth C.D., Doninger J., DiPaolo J.A. i wsp. Immortalization of human foreskin keratinocytes by various human papilloma virus DNAs corresponds to their association with cervical carcinoma. J.Virol. 1989, 63, 159.
153. Woźniak J., Szczepańska M., Opala T. i wsp.: Zastosowanie lasera CO<sub>2</sub> w leczeniu kłykcin kończystych narządów płciowych i okolicy odbytu u kobiet ciężarnych. Gin.Pol. 1995, 66, 103.
154. Yang L., Li R., Mohr I.J., Clark R. i wsp.: Activation of BPV-1 replication in vitro by the transcription factor E2. Science 1991, 353, 628.
155. Yew P.R., Berk A.J.: Inhibition of p53 transactivation required for transformation by adenovirus early 1B protein. Nature 1992, 357, 82.
156. Zhu L., Vandenheuevel S., Helin K. i wsp.: Inhibition of cell proliferation by p107, a relative of the retinoblastoma protein. Gene Develop. 1993 ,7, 1111.
157. Zur Hausen H.: Papillomavirus in anogenital cancer as a model to understand the role of viruses in human cancer. Cancer Res. 1989, 49, 4677.
158. Zur Hausen H.: Human papillomaviruses in the pathogenesis of anogenital cancer. Virology 1991, 184, 9.

