

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Katarina Kaja EĆIMOVIĆ

**OKUŽBA S HUMANIMI VIRUSI PAPILOMA PRI
BOLNIKI Z INVERTNIMI PAPILOMI**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

Ljubljana, 2006

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Katarina Kaja EĆIMOVIĆ

**OKUŽBA S HUMANIMI VIRUSI PAPILOMA PRI BOLNIKIHZ
INVERTNIMI PAPILOMI**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**HUMAN PAPILLOMAVIRUSES IN PATIENTS WITH INVERTED
PAPILLOMAS**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2006

Diplomsko delo je bilo opravljeno v Laboratoriju za molekularno mikrobiologijo in diagnostiko hepatitisov in aida, Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani.

Po sklepu Študijske komisije univerzitetnega dodiplomskega študija mikrobiologije z dne 05.09.2006 ter na osnovi Pravilnika o diplomskem delu je bil za mentorja diplomskega dela imenovan prof. dr. Mario Poljak in za recenzentko doc. dr. Katja Seme.

Mentor: prof. dr. Mario Poljak

Recenzentka: doc. dr. Katja Seme

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja Žgur Bertok

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Mario Poljak

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Članica: doc. dr. Katja Seme

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Katarina Kaja Ećimović

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK UDK 578.7: 616-006-074 (043) = 863
- KG virusi/ humani virusi papiloma/ benigni invertni papilomi/ diagnostične metode/ veriŹna reakcija s polimerazo/ PCR/ opredelitev genotipov humanih virusov papiloma
- AV EĆIMOVIĆ, Katarina Kaja
- SA POLJAK, Mario (mentor)/ SEME, Katja (recenzentka)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
- LI 2006
- IN OKUŹBA S HUMANIMI VIRUSI PAPILOMA PRI BOLNIKIHZ INVERTNIMI PAPILOMI
- TD diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP IX, 37 s., 4 pregl., 2 sl., 47 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Invertni papilomi so redke benigne novotvorbe, ki značilno zrastejo na lateralni steni nosne votline in se pogosto sekundarno razširijo v obnosne votline. So dva do petkrat bolj pogosti pri moških in jih primarno najdemo v starostni skupini od 40 do 70 let. Kliniĉno so pomembni zato, ker so nagnjeni k maligni transformaciji in recidivu po operativni odstranitvi. Odkar je leta 1987 Brandsma s sodelavci dokazal prisotnost DNA humanih virusov papiloma (HPV) v invertnih papilomih, so začeli z raziskavami s katerimi so Źeleli opredeliti vlogo HPV pri nastanku in razvoju invertnih papilomov. Najboljša metoda dokaza genoma HPV v arhivskih vzorcih je veriŹna reakcija s polimerazo (PCR). V naši raziskavi smo z dvema različicama PCR z začetnimi oligonukleotidi CPI/IIg in PGMY09/11^{MIX} za dokaz HPV testirali 92 tkivnih vzorcev invertnih papilomov fiksiranih v formalin ter vklopljenih v parafin slovenskih bolnikov. HPV DNA smo dokazali v 7 vzorcih (7,6 %). Prisotnost genotipa HPV-11 je bila pogostejša (6 vzorcev) kot prisotnost genotipa HPV-6 (1 vzorec).

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC UDC 578.7: 616-006-074 (043) = 863
- CX viruses/ human papillomaviruses/ benign inverted papilloma/ diagnostic methods/ polymerase chain reaction/ PCR/ defining genotypes of human papillomaviruses
- AU EĆIMOVIĆ, Katarina Kaja
- AA POLJAK, Mario (supervisor)/ SEME, Katja (reviewer)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Program in Microbiology
- PY 2006
- TI HUMAN PAPILOMAVIRUSES IN PATIENTS WITH INVERTED PAPILOMAS
- DT Graduation thesis (University studies)
- NO IX, 37 p., 4 tab., 2 fig., 47 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB Inverted papilloma (IP) is a rare benign neoplasm that usually arises on a lateral wall of nasal cavity with a tendency of spreading to the sinuses. IP is two to five times more common in males and in the age group from 40 to 70 years. They are clinically important because of possible malignant transformation and relapse after the surgical removal of primary lesion. Brandsma and coworkers established the presence of human papillomavirus (HPV) genome in IP in 1987, thus providing a basis for ongoing research to evaluate the role of HPV in formation and development of IP. The best method for determining HPV genome in archive samples is polymerase chain reaction (PCR). In our research we used two versions of PCR method with CPI/IIg and PGMY09/11^{MIX} primers, with intention to determine the presence of HPV in 92 formalin fixed paraffin embedded tissue samples of IP from Slovenian patients. We were able to detect HPV DNA in 7 samples (7.6 %). We also determined that the presence of HPV-11 genotype was more common (6 samples) than HPV-6 genotype (1 sample).

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	IX
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA IN HIPOTEZA	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 HUMANI PAPILOMA VIRUSI (HPV)	2
2.1.1 Zgradba HPV	2
2.1.2 Organizacija genoma HPV in vloga virusnih beljakovin	2
2.1.3 Genotipi HPV in njihovo razvrščanje	4
2.1.3.1 Razvrščanje glede na tkivni tropizem	4
2.1.3.2 Razvrščanje glede na skladnost nukleotidnih zaporedij	6
2.1.4 Razmnoževanje HPV	6
2.2 DIAGNOSTIKA OKUŽBE S HPV	8
2.2.1 Tradicionalne metode	9
2.2.2 Molekularne metode	9
2.2.2.1 Hibridizacijske metode	9
2.2.2.2 Metode pomnoževanja nukleinskih kislin	10
2.2.2.3 Metoda določanja nukleinskega zaporedja	11
2.3 INVERTNI PAPILOMI (SCHNEIDERJEVI PAPILOMI INVERTIRANEGA TIPA)	12
2.3.1 Epidemiologija	12
2.3.2 Etiologija	13
2.3.3 Lokalizacija	13
2.3.4 Klinična slika	14
2.3.5 Histopatologija	14

3	MATERIALI IN METODE	16
3.1	MATERIAL	16
3.1.1	Vzorci za raziskavo	16
3.1.2	Kontrole	16
3.2	METODE	16
3.2.1	Postopek osamitve celokupne DNA iz vzorcev vklopljenih v parafin	16
3.2.2	Preverjanje kakovosti osamljene DNA	17
3.2.3	Dokazovanje HPV DNA	18
3.2.4	Sestava reakcijskih mešanic za posamezne reakcije PCR in pogoji pomnoževanja s PCR	19
3.2.4.1	Dokazovanje HPV DNA z začetnimi oligonukleotidi PGMY09 ^{MIX} /PGMY11 ^{MIX}	19
3.2.4.2	Dokazovanje HPV DNA z začetnima oligonukleotidoma CPI/CPIIg	20
3.2.4.3	Dokazovanje in analiza pridelkov PCR	20
3.2.4.4	Avtomatsko sekveniranje in določanje HPV genotipa z metodo BLAST	21
4	REZULTATI	25
4.1	DOLOČANJE GENA ZA BETA-GLOBIN	25
4.2	DOLOČANJE HPV DNA	25
4.3	AVTOMATSKO SEKVENIRANJE IN DOLOČANJE HPV GENOTIPA Z METODO BLAST	26
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	27
5.1	RAZPRAVA	27
5.1.1	Uvod	27
5.1.2	Analiza rezultatov	27
5.2	SKLEPI	30
6	POVZETEK	31
7	VIRI	32
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1. Razvrstitev genotipov HPV glede na tkivni tropizem in onkogeni potencial (Poljak in sod., 2005).	5
Preglednica 2. Pregled najpomembnejših metod za odkrivanje okužb s HPV (Poljak in sod., 2005).	8
Preglednica 3. Nukleotidna zaporedja začetnih oligonukleotidov, tarčni gen in velikosti pričakovanih pridelkov PCR.	18
Preglednica 4. Genotipi HPV opredeljeni na 7 pozitivnih vzorcih, glede na rezultate PCR in podatke genske banke EMBL	26

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1. Organizacija genoma HPV (Longworth in Laimins, 2004).	3
Slika 2. Shematski prikaz razmnoževanja HPV (Brooks, 1998).	7

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

BLAST	software za primerjavo dobljenih baznih zaporedij izolatov HPV (angl. basic local alignment search tool)
bp	bazni par
E	zgodnja kodirajoča regija (angl. early)
EMBL	baza podatkov za nukleotidna zaporedja-banka (angl. European molecular biology laboratory)
HPV	humani papiloma virusi
ICTV	mednarodni komite za taksonomijo virusov (angl. International Committee for Taxonomy of Viruses)
IP	invertni papilom
L	pozna kodirajoča regija (angl. late)
LCR	dolge kontrolne regije LCR, nekodirajoča (angl. long-control region)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. polymerase chain reaction)
RFLP	polimorfizem dolžine restrikcijskih odsekov (angl. restriction fragment length polymorphism)
WHO	svetovna zdravstvena organizacija (angl. World Health Organization)

1 UVOD

Virusi papiloma predstavljajo zelo heterogeno skupino DNA virusov, med katerimi je največja in najpomembnejša skupina humanih papiloma virusov (HPV) (Poljak in sod., 2005). Do sedaj je bilo odkritih več kot 100 genotipov HPV (de Villers in sod., 2004).

Dokazovanje okuŹbe s HPV iz kliničnega materiala trenutno temelji izključno na uporabi molekularnih metod, med katerimi se največkrat uporabljata test tekočinske hibridizacije ter veriŹna reakcija s polimerazo (angl. Polymerase Chain Reaction, PCR) (Syrjanen, 2003).

Številne raziskave v zadnjih dvajsetih letih so pokazale, da so HPV nedvoumno tesno etiološko povezani z nastankom nekaterih benignih in malignih tumorjev glave in vratu (Syrjanen, 2003).

Invertni papilomi so redka benigna novotvorba, ki značilno zraste na lateralni steni nosne votline in se pogosto sekundarno razširi v obnosne votline. Nekateri invertne papilome povezujejo tudi z okuŹbo s HPV. Dejanska vloga okuŹbe s HPV pri razvoju invertnih papilomov je nejasna, saj znaša prevalenca okuŹbe s HPV, ugotovljena v različnih raziskavah od 0-100 % (Syrjanen, 2003).

1.1 NAMEN DELA IN HIPOTEZA

Namen diplomskega dela je bil oceniti pogostnost okuŹbe s HPV v reprezentativnem vzorcu slovenskih bolnikov z invertnimi papilomomi. Za dokazovanja HPV smo uporabili dve različici PCR z začetnimi oligonukleotidi CPI/IIg in PGMY09/11^{MIX}.

Predpostavili smo, da bomo s PCR dokazali prisotnost HPV DNA v 5-10 % tkivnih vzorcev invertnih papilomov. Poleg tega smo pričakovali, da bosta prevladovala HPV genotipa HPV-6 ter HPV-11.

2 PREGLED OBJAV

2.1 HUMANI PAPILOMA VIRUSI (HPV)

Humani papiloma virusi (HPV) so skupina majhnih virusov. Do danes je bilo tipiziranih več kot 100 genotipov HPV (de Villiers, 2004; Zheng in Baker, 2006; Poljak in sod., 2005).

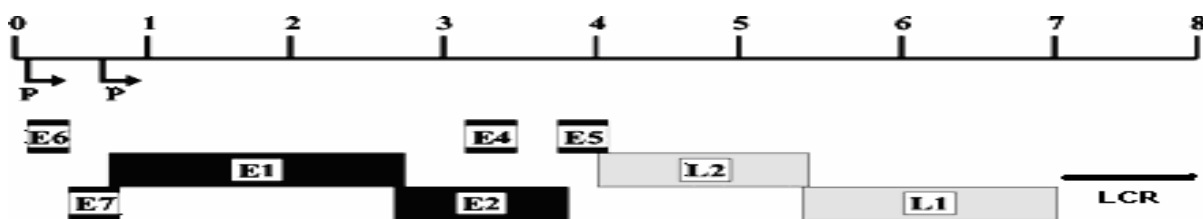
Nedavno je Mednarodni komite za taksonomijo virusov (angl. International Committee for Taxonomy of Viruses, ICTV) sprejel, da so papiloma virusi samostojna taksonomska družina *Papillomaviridae* rod *Papillomavirus* in niso v sorodu z polioma virusi ter SV40. Taksonomski status papiloma virusov je utemeljen z zaporedjem L1 genov. Tipe, podtipe in variante med seboj ločujemo glede na delež razlik v tem zaporedju. Genoma bovinega papiloma virusa tip 1 (BPV-1) in humanega papiloma virusa tip 1a (HPV-1a) sta bila prva popolnoma sekvenirana, zato sta služila zadnjih 20 let kot prototipa študijam molekularne biologije papiloma virusov (Zheng in Baker, 2006; de Villiers, 2004).

2.1.1 Zgradba HPV

HPV so majhni, goli, dvovijačni DNA virusi s premerom približno 55 nm (Longworth in Laimins, 2004). Virus ščiti dedni material s kapsido, to je dvoplastnim beljakovinskim plaščem. Kapsida je ikozaedrična in sestavljena iz 72 morfoloških enot, kapsomer, ki predstavljajo dva tipa strukturnih beljakovin, t.i. veliko (L1) in malo (L2) plaščno beljakovino. L1 ima povprečno molekulsko maso 54 kDa in tvori približno 80-90 % vseh beljakovin virusnega plašča. Ostali del beljakovin predstavlja L2 z molekulsko maso 74-80 kDa (Pfister in Fuchs, 1994).

2.1.2 Organizacija genoma HPV in vloga virusnih beljakovin

HPV je DNA virus, ki vsebuje krožen, kovalentno zaprt, dvovijačen genom z molekulsko maso $2,5 \times 10^6$ Da in dolžino 7500-8000 baznih parov (bp) (Pfister in Fuchs, 1994). Organizacija genoma HPV je shematsko prikazana na sliki 1.



Slika 1. Organizacija genoma HPV. Geni, ki kodirajo podvojevalne beljakovine so označeni s črno, kapsidni geni pa s sivo. Zgodnji in pozni promotorji so prikazani s puščicami (Longworth in Laimins, 2004).

Genom je sestavljen iz nekodirajoče dolge kontrolne regije LCR (angl. long-control region) in dveh kodirajočih regij, ki ju glede na fazo okužbe, v kateri se izražata, imenujemo zgodnja E (angl. early) ter pozna L (angl. late) (McKay in sod., 2005).

Območje E vsebuje zapis za beljakovine, ki so povezane s podvojevanjem virusa, uravnavanjem prepisovanja virusnega genoma in transformacijo okuženih celic. Večina do sedaj opredeljenih HPV ima najmanj 6 E genov: E1, E2, E4, E5, E6, E7 (Poljak in sod., 2005). Najbolje raziskana od teh sta gena E6 in E7. Večina raziskovalcev meni, da sta beljakovini E6 in E7 najpomembnejši v onkogenezi novotvorb, ki nastanejo zaradi okužbe s HPV (zur Hausen, 1999). Beljakovine E6 in E7 namreč pogosto najdemo v različnih tumorjih in celičnih linijah tkiv, ki so okužene s HPV. Zaenkrat pa še nimamo dokazov o tem pri nizko rizičnih tipih HPV (Longworth in Laimins, 2004). Beljakovina E5 naj bi prav tako izražala transformacijske lastnosti. Njena temeljna funkcija je indukcija celične transformacije prek tirozin-kinaznih receptorjev nekaterih rastnih faktorjev (Munger in Howley, 2002). Beljakovina E1 ima pomembno vlogo pri virusnem razmnoževanju in vzdrževanju HPV v obliki zunajkromosomskih delcev DNA ali episomov. E1 se veže na ori (angl. origin of replication) mesto podvojevanja virusnega genoma v nekodirajočem območju LCR in deluje kot encim z ATP-azno in helikazno aktivnostjo (Wilson in sod., 2005). Beljakovina E2 se veže na DNA in uravnava podvojevanje in prepisovanje virusnega genoma. Z vezavo na mesto ori fizično ovira vezavo celičnih dejavnikov prepisovanja SP1 in TFIID, ki so nujni za prepisovanje virusnih onkogenov E6 in E7 (Blachon in Demeret, 2003). Vloga virusne beljakovine E4 še ni povsem znana. Dosedanje študije so pokazale, da se E4 veže na citokeratine okuženih celic in povzroči, da se struktura citoskeleta v celicah poruši, zaradi česar celica privzame značilen videz kilocita.

Predvidevajo, da je porušenje citokeratinske mreže potrebno za lažje izstopanje zrelih virusnih delcev iz okuženih gostiteljskih celic (Wilson in sod., 2005; Blachon in Demeret, 2003).

Območje L nosi zapis za strukturne beljakovine virusnega plašča (L1, L2). Gen L1 vsebuje zapis za veliko plaščno beljakovino in je skupaj z odprtim območjem beljakovine E1 najbolj ohranjeni del genoma med različnimi genotipi HPV. Gen L2 ima zapis za malo plaščno beljakovino, ki je pri posameznih genotipih različna (zur Hausen, 1996).

Nekodirajoče območje LCR oziroma URR (angl. upstream regulatory region) ne vsebuje zapisa za beljakovine, ampak za zaporedja DNA, pomembna za uravnavanje virusnega razmnoževanja in prepisovanja virusnih genov. Nahaja se med genoma L1 in E6 (McGlennen, 2000).

2.1.3 Genotipi HPV in njihovo razvrščanje

Genotipe HPV razvrščamo v določene skupine na dva načina:

- glede na tropizem za določeno vrsto epitela;
- glede na skladnost nukleotidnih zaporedij.

2.1.3.1 Razvrščanje glede na tkivni tropizem

Na podlagi epidemioloških in molekularnih raziskav in glede na tropizem HPV za določeno vrsto epitela znane vrste HPV razvrščamo v štiri skupine. Razvrstitev genotipov HPV je shematsko prikazana v preglednici 1.

Preglednica 1. Razvrstitev genotipov HPV glede na tkivni tropizem in onkogeni potencial (Poljak in sod., 2005).

SKUPINA HPV	GENOTIPI
1. Sluznični (anogenitalni) genotipi HPV	
Visokorizični genotipi HPV	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, sub44 (55), 56, 58, 59, 68, 73, 82, 83
Verjetno visokorizični genotipi HPV	26, 53 in 66
Nizkorizični genotipi HPV	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, candHPV-89
2. Nesluznični (kožni) genotipi HPV	
Kožni genotipi HPV	1, 3, 4, 10, 28, 29, 41, 48, 50, 60, 63, 65, 78, 88, 94, 95,
3. Kožno-sluznični genotipi HPV	2, 7, 27, 40, 43, 57, candHPV-91
4. Genotipi EV-HPV, povezani z boleznijo <i>epidermodysplasia verruciformis</i>	5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 19-23, 25, 36-38, 47, 49, 75, 76, 80, 93, candHPV-92, candHPV-96,

V prvo skupino uvrščamo sluznične oziroma anogenitalne genotipe HPV, ki jih glede na njihov onkogeni potencial oziroma zmožnost povzročanja maligne preobrazbe ploščatoceličnega epitelija sluznic delimo na visokorizične, verjetno visokorizične, nizkorizične in genotipe HPV z nejasnim onkogenim potencialom (Munoz in sod., 2003). Okužbo z visokorizičnimi genotipi HPV etiološko povezujemo z intraepitelijsko novotvorbo najvišje stopnje in malignimi ploščatoceličnimi tumorji, medtem ko je okužba z nizkorizičnimi genotipi HPV povezana predvsem z razvojem benignih novotvorb ploščatoceličnega epitelija (zur Hausen, 1996). Verjetno visokorizični genotipi so tako opredeljeni, ker je do danes zbranih premalo epidemioloških in bioloških dokazov, s katerimi bi jih lahko uvrstili k visokorizičnim genotipom HPV (Longworth in Laimins, 2004).

V drugo skupino uvrščamo nesluznične oziroma kožne genotipe HPV, ki okužijo predvsem poroženevajoči večvrstni ploščatocelični epitelij. Najpogosteje povzročajo benigne novotvorbe kože oziroma navadne kožne bradavice (Poljak in sod., 2005).

V tretjo skupino uvrščamo genotipe HPV, ki lahko okužijo tako poroženjavajoči kot neporoženjavajoči večvrstni ploščatocelični epitelij (kožno-sluznični genotipi). V zadnjem času jih povezujejo z neoplastičnimi spremembami epitelija sluznic. (Poljak in sod., 2005).

V četrto skupino uvrščamo genotipe EV-HPV, oziroma viruse, ki so jih prvotno osamili iz resičastih novotvorb kože pri bolnikih z dedno boleznijo, imenovana bradavičasta epidermodisplazija (*epidermodysplasia verruciformis*). Po podatkih iz literature je s temi virusi v povprečju okuženih 40-70 % zdravih ljudi, vendar se značilne spremembe povrhnjice kože razvijejo le pri majhnem deležu okuženih, najverjetneje kot posledica dolgotrajne imunske pomanjkljivosti in posledične aktivacije virusa, npr. po presaditvi organov ali pri okužbi s HIV (Poljak in sod., 2005).

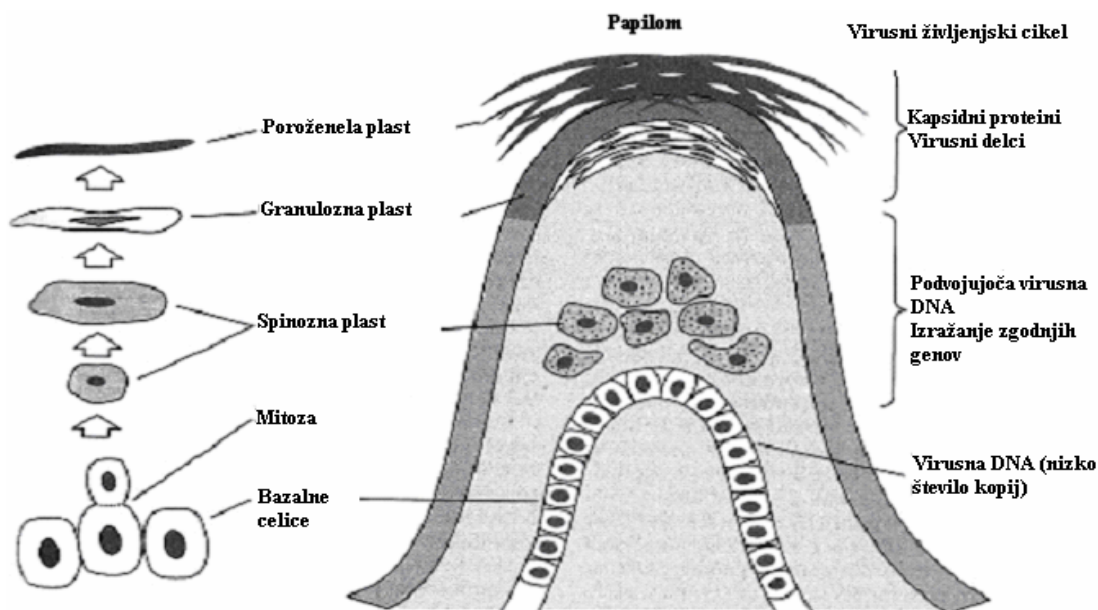
2.1.3.2 Razvrščanje glede na skladnost nukleotidnih zaporedij

Genotipe HPV taksonomsko uvrščamo v družino *Papillomaviridae* rod *Papillomavirus*, natančneje v različne rodove virusov papiloma alfa, beta, gama, mu in nu (Poljak in sod., 2005). De Villersova in sodelavci so leta 2004 objavili filogenetsko drevo s 16 rodovi in 45 vrstami papiloma virusov, ki so jih dobili s primerjavo celotnega zaporedja L1 ORF 96 genotipov HPV in 22 živalskih papiloma virusov (de Villiers in sod., 2004.). V rod papiloma virusov alfa uvrščamo sluznične, kožno-sluznične in nekatere kožne genotipe HPV. Rod papiloma virusov beta sestoji pretežno iz genotipov EV-HPV. V rodove papiloma virusov gama, mu in nu uvrščamo preostale kožne genotipe HPV. V druge rodove družine *Papillomaviridae* so uvrščeni različni živalski papiloma virusi (de Villiers in sod., 2004).

2.1.4 Razmnoževanje HPV

Tarčne celice HPV so bazalne celice večvrstnega ploščatoceličnega epitelija, ki so tudi mesto začetka okužbe s HPV. Domnevajo, da imajo zaradi specifične povezave med HPV in določeno vrsto epitela samo te celice receptorje za vstop HPV (Schneider, 1994).

Proces razmnoževanja HPV je natančno uravnavan. Odvisen je od prisotnosti nekaterih uravnalnih virusnih beljakovin ter stopnje dozorevanja epitelijskih celic gostitelja (Slika 2). Ker bazalne epitelijske celice še niso dozorele, je razmnoževanje HPV v njih močno omejeno. Pozneje se sočasno z dozorevanjem okuženih celic povečuje tudi sposobnost razmnoževanja HPV v celici, kompletni virioni pa se sproščajo le iz popolnoma dozorelih celic (Brooks, 1998).



Slika 2. Shematski prikaz razmnoževanja HPV, prilagojeno po (Brooks, 1998).

V bazalnih epitelijskih celicah se virusna DNA nahaja izključno v obliki zunajkromosomskih krožnih delcev ali episomov. Bazalne celice z episomi so nosilke latentne okužbe in jih histološko ni mogoče razlikovati od neokuženih celic. Na tej stopnji podvojevanje virusnega genoma tesno sledi celičnemu ciklu gostiteljske celice. Navadno pri eni celični delitvi nastane le ena kopija virusnega genoma. Pridelki zgodnjih virusnih genov E6 in E7, ki nastajajo v t.i. vegetativnem virusnem ciklu, stimulirajo bazalne epitelijske celice k pospešenemu razmnoževanju. Ob začetku diferenciacije bazalnih celic oziroma ko bazalne celice dozorejo v spinozne celice, se celični cikel ustavi. Od tu naprej poteka podvojevanje genoma HPV po načinu kotalečega se kroga (angl. rolling circle), tako da v gostiteljskih celicah nastaja veliko kopij virusnega genoma. Pod vplivom celičnih dejavnikov prepisovanja (angl. differentiation-induced transcription factors) se aktivirajo promotorji poznih genov L ter sinteze velike in male plaščne beljakovine. Nastali virioni se sproščajo s celično lizo in so sposobni okužiti sosednje celice. Zaradi razmnoževanja HPV

nastanejo v povrhnjih epitelijskih celicah za HPV značilne morfološke spremembe imenovane koilocitoza. Za koilocite so značilna skrčena hiperkromna jedra različnih oblik, kromatin je grudast, okoli jeder pa se pojavlja značilen svetel pas ali halo (zur Hausen, 2000; Schneider, 1994).

2.2 DIAGNOSTIKA OKUŽBE S HPV

V zadnjih 30 letih so razvili številne metode za dokazovanje HPV, ki jih delimo na tradicionalne in molekularne. Pregled pogosto uporabljenih metod za odkrivanje okužb s HPV je prikazan v preglednici 2 (Poljak in sod., 1998).

Preglednica 2. Pregled najpomembnejših metod za odkrivanje okužb s HPV (Poljak in sod., 2005)

Tradicionalne metode za odkrivanje okužbe s HPV
Svetlobna mikroskopija Elektronska mikroskopija Imunohistokemične metode
Molekularne metode
Hibridizacijske metode Hibridizacija po Southernu Hibridizacija dot-blot Tekočinska hibridizacija (test Hybrid Capture) Hibridizacija in situ Hibridizacija in situ na filtru Metode pomnoževanja nukleinskih kislin Verižna reakcija s polimerazo (PCR) s skupinsko značilnimi začetnimi oligonukleotidi Verižna reakcija s polimerazo (PCR) z genotipsko značilnimi začetnimi oligonukleotidi Verižna reakcija s polimerazo v realnem času (RT-PCR) PCR-encimsko oligonukleotidni test (Roche AMPLICATOR HPV Test) Pomnoževanje na podlagi zaporedja nukleinskih kislin (NASBA) Encimska razgradnja pridelkov PCR (RFLP) Določanje nukleotidnega zaporedja (sekveniranje)

2.2.1 Tradicionalne metode

Tradicionalne metode temeljijo na opazovanju značilnih citopatoloških sprememb epitelijskih celic s svetlobnim mikroskopom, opazovanju virusnih delcev z elektronskim mikroskopom in dokazovanju virusnih strukturnih beljakovin z imunohistokemičnimi metodami z uporabo monoklonskih in poliklonskih protiteles. Izolacija HPV v celični strukturi za zdaj ni možna, saj se virus razmnožuje le v terminalno dozorelih epitelih celicah. Tradicionalne metode niso dovolj občutljive in ne omogočajo genotipizacije HPV, zato so se v diagnostiki okužb s HPV uveljavile le molekularne metode (Poljak in sod., 1998).

2.2.2 Molekularne metode

Molekularne metode temeljijo na zaznavanju značilnih zaporedij virusne DNA. Največkrat se uporabljajo različni hibridizacijski testi z RNA in DNA lovkami, usmerjenimi proti značilnim odsekom genoma različnih genotipov HPV ter testi, zasnovani na verižni reakciji s polimerazo (PCR), v kateri pomnožujemo značilna kratka zaporedja virusnega genoma, pridelek pomnoževanja pa naknadno dokazujemo z različnimi tehnikami (elektroforeza v gelu, encimska razgradnja, dot blot, encimski oligonukleotidni test) (Poljak in sod., 2005).

2.2.2.1 Hibridizacijske metode

Hibridizacijske metode temeljijo na povezavi (hibridizaciji) med tarčno DNA in komplementarnimi predeli majhnih, označenih delcev nukleinskih kislin ali lovke. Lovke so lahko označene z različnimi radioaktivnimi (^3H , ^{32}P , ^{35}S) in neradioaktivnimi (biotin, dioksigenin, fluorescentna barvila) označevalci. Trdnost povezave med lovko in tarčno DNA je odvisna od skladnosti nukleotidnega zaporedja in od pogojev pri katerih poteka hibridizacija. Lovke so lahko značilne za določen genotip (genotipsko značilne lovke) ali za več genotipov HPV (skupinsko značilne lovke) (Gravitt in Manos, 1993).

2.2.2.2 Metode pomnoževanja nukleinskih kislin

PCR je trenutno najobčutljivejša metoda za dokazovanje okužb s HPV. Dokazovanje virusov s PCR temelji na in vitro pomnoževanju za virus značilnega majhnega odseka genoma. Reakcija je sestavljena iz 25 do 40 ponovitev temperaturnih ciklov zaporedne denaturacije osamljene DNA, spajanja izbranih začetnih oligonukleotidov s komplementarnimi zaporedji ter sinteze nove komplementarne DNA v območju med začetnima oligonukleotidoma. Vsaka novo sintetizirana kopija odseka DNA v naslednjem ciklu služi kot matrica. Tako se začetni tarčni odseki virusne DNA v reakciji eksponentno kopičijo (Poljak in sod., 1994).

Pravilni izbor začetnih oligonukleotidov je najpomembnejši korak optimizacije PCR, saj začetni oligonukleotidi določajo odsek genoma HPV, ki bo v reakciji pomnožen (Manos in sod., 1989). Za pomnoževanje virusnega genoma HPV izbiramo med dvema različnima vrstama začetnih oligonukleotidov, genotipsko značilnimi in skupinsko značilnimi. Značilna raznolikost nukleotidnih zaporedij posameznih genotipov HPV onemogoča razvoj preprostih in univerzalnih začetnih oligonukleotidov ter protokola PCR za dokazovanje vseh genotipov HPV. Za določitev genotipa HPV je tako treba izvesti veliko reakcij PCR z uporabo različnih genotipsko značilnih začetnih oligonukleotidov. Kljub učinkovitosti in veliki specifičnosti nekaterih genotipsko značilnih začetnih oligonukleotidov genotipizacija z njimi ni primerna za delo z velikim številom vzorcev. Veliko uporabnejše so metode, ki temeljijo na uporabi skupinsko značilnih začetnih oligonukleotidov, ki omogočajo pomnoževanje širokega spektra genotipov HPV v eni sami reakciji PCR. Za dokazovanje sluzničnih genotipov HPV so v literaturi opisani številni skupinsko značilni začetni oligonukleotidi. Izmed teh se največkrat uporabljajo PGMY09^{MIX}/PGMY11^{MIX}, GP5+/GP6+ in SPF10, ki pomnožujejo 450, 150 oziroma 65 bp dolg odsek močno ohranjenega virusnega gena L1 (Poljak in sod., 2005).

Vsaki reakciji PCR sledi dokazovanje specifičnosti pridelkov, za kar je na voljo več metod:

- Z elektroforezo na gelu ločimo pomnožene dele DNA in njihove velikosti primerjamo z velikostjo standardnih delov DNA, ločenih v enakih razmerah

elektroforeze. Specifičnost in občutljivost tovrstnega dokazovanja pridelka PCR je majhna (Poljak in sod., 2005).

- Z metodo določanja polimorfizma dolžine restrikcijskih odsekov (angl. restriction fragment length polymorphism, RFLP) pridelek reakcije PCR izpostavimo delovanju restrikcijskih endonukleaz in nastali vzorec razgradnje primerjamo s teoretično določenim vzorcem razgradnje pričakovanega odseka DNA. Opisanih je več različic metode RFLP, ki se med seboj razlikujejo glede na število in vrsto uporabljenih restrikcijskih encimov. Zanesljivost metode narašča s povečanjem števila uporabljenih restrikcijskih endonukleaz. Najzanesljivejša je metoda RFLP z uporabo 7 restrikcijskih encimov, s katero je mogoče opredeliti 44 različnih anogenitalnih genotipov HPV (Bernard in sod., 1994).
- V encimsko oligonukleotidnem testu dokazujemo pridelek PCR z značilnimi lovkami v mikrotitracijskih ploščicah. Rezultat hibridizacije odčitamo spektrofotometrično. Roche AMPLICOR HPV Test (Roche Diagnostics) je najnovejši komercialno dostopen test, ki temelji na encimsko oligonukleotidnem testu in s katerim je mogoče dokazati skupino 13 visokorizičnih genotipov HPV (HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33, HPV-35, HPV-39, HPV-45, HPV-51, HPV-52, HPV-56, HPV-58, HPV-59 in HPV-68). Njegova pomanjkljivost je v tem, da ne omogoča neposredne genotipizacije HPV (Poljak in Seme, 1996).

PCR v realnem času (angl. real time PCR) predstavlja nadgradnjo klasične PCR, kjer pomnoževanje tarčne DNA HPV poteka istočasno kot določanje specifičnosti pomnoženih pridelkov PCR z uporabo različnih fluorescentno obarvanih lovk. Metoda bo v nekaj letih najverjetneje postala najbolj uporabljana metoda za dokazovanje in genotipizacijo HPV (Poljak in sod., 2005).

2.2.2.3 Metoda določanja nukleinskega zaporedja

Metoda določanja nukleotidnega zaporedja je edina, s katero dokončno opredelimo genotip HPV. V primerjavi z drugimi molekularnimi metodami za genotipizacijo HPV je določanje nukleotidnega zaporedja metoda, ki omogoča natančnejšo opredelitev že znanih genotipov HPV, odkrivanje mutacij, določanje podtipskih različic HPV in opredeljevanje novih

genotipov HPV. Metoda je posebno primerna za dokazovanje in genotipizacijo kožnih genotipov HPV in genotipov EV-HPV, saj je metod, s katerimi bi lahko potrdili specifičnost pridelkov PCR nastalih s pomnoževanjem s skupinsko značilnimi začetnimi oligonukleotidi, zelo malo. Zaradi velikega deleža mešanih okužb (do 30 % pri okužbah z genotipi EV-HPV) je take pridelke PCR priporočljivo najprej vklonirati v plazmidne vektorje, jih razmnožiti v ustreznih bakterijskih sistemih in šele nato iz osamljene plazmidne DNA določiti specifična nukleotidna zaporedja (Kocjan in sod., 2005). Ker je določanje nukleotidnega zaporedja časovno zamudno, drago in tehnično zahtevno, se danes večinoma uporablja le v raziskovalne namene.

2.3 INVERTNI PAPILOMI (SCHNEIDERJEVI PAPILOMI INVERTIRANEGA TIPA)

Schneiderjeva membrana je drugo ime za ektodermalno migetalčno respiratorno sluznico v nosni in obnosnih votlinah. Na njej se pojavljajo trije morfološko različni tipi papilomov, ki jih je razvrstil Hyams leta 1971: invertni, onkocitni ter eksofitni papilomi, s skupnim imenom Schneiderjevi papilomi (Hyams, 1971). Kot skupina tumorjev so Schneiderjevi papilomi redki in predstavljajo le 0,4-4,7 % vseh tumorjev nosu in obnosnih votlin. Porazdelitev Schneiderjevih papilomov je, povzeto po svetovni zdravstveni organizaciji (WHO): invertni papilomi 62 %, onkocitni papilomi 6 % in eksofitni papilomi 32 % (Karcioglu in sod., 1984).

Invertni papilomi (IP), ki so tema naše naloge, se razvijejo z uvihom epitelija. Epitelijske celice se razmnožujejo v spodaj ležeči stromi in razraščajo v novotvorbo, ki ni očitna, saj za razliko od običajnih papilomov raste pod nivojem sluznice in ne eksofitično (Barnes in sod., 2005). Celice tu so podvržene hitremu obratu in so posebej izpostavljene delovanju karcinogenov (McKay in sod., 2005).

2.3.1 Epidemiologija

Invertni papilomi so 2 do 5 krat bolj pogosti pri moških in jih primarno najdejo v starostni skupini od 40 do 70 let, redki so pri otrocih (Barnes in sod., 2005; Syrjanen, 2003).

2.3.2 Etiologija

Čeprav so dolgo sumili na povezavo med virusno okužbo in nastankom invertnih papilomov, niso nikoli uspeli neizpodbitno dokazati virusnih inkluzij s svetlobnim ali elektronskim mikroskopom. Tudi barvanje z imunoperoksidazno metodo je pri invertnih papilomih običajno negativno ne glede na prisotnost HPV. Genom HPV so v invertnih papilomih uspeli dokazati z *in situ* hibridizacijo ter PCR. Dokazani so bili zlasti HPV-6, HPV-11, včasih HPV-16 in HPV-18 ter redko HPV-57. Pogostost dokaza HPV s tema specializiranima tehnikama je zelo variabilna (0–100 %). V svoji študiji je Syrjanen naredil pregled raziskav, ki so zajemale testiranje 397 invertnih papilomov na prisotnost HPV DNA s PCR ter *in situ* hibridizacijo 32 % je bilo pozitivnih (Syrjanen, 2003). Kljub rastočim dokazom pa še vedno ni jasno, ali je HPV tudi etiološko povezan z invertnim papilomom. (Sarkar in sod., 1992; Gillison in Shah, 2001).

Povezave nastanka invertnega papiloma z alergijami, vnetjem, kajenjem, uporabo alkohola in poklicem niso mogli dokazati (McKaig in sod., 1998; Smith in sod., 2004).

2.3.3 Lokalizacija

Invertni papilom značilno zraste na lateralni nosni steni v področju sredine etmoidnega recessusa. Pogosto se sekundarno razširi v obnosne sinuse, še posebej v maksilarnega in etmoidnega ter v manjšem obsegu v sfenoidnega in frontalnega. Možne so tudi izolirane lezije obnosnih sinusov brez udeležbe nosu. Zelo redko se invertni papilom pojavi primarno na nosnem septumu (Karcioglu in sod., 1984).

Izjemoma lahko invertni papilom zraste na lokacijah izven nosne in obnosnih votlin, v srednjem ušesu (mastoidu), nosnem in ustnem delu žrela ter solzni vrečki. Možno je, da ektopična migracija celic Schneiderjeve membrane med embriogenezo omogoča prisotnost teh odstopanj od običajnih anatomskih lokacij (Karcioglu in sod., 1984). Prav tako ni potrjeno, ali so ti ektopični primeri resnično invertni papilomi.

Najpogosteje se invertni papilom nahaja unilateralno, obstajajo pa redki opisani primeri bilateralnih invertnih papilomov. Vendar se pri pojavu take oblike bolezni vedno poraja sum na erozijo nosnega pretina in perforacijo iz unilateralne oblike bolezni (Karcioglu in sod., 1984).

2.3.4 Klinična slika

Najpogostejši začetni simptom je občutek zamašenega nosu. Ostali simptomi in znaki vključujejo izcedek ali krvavitev iz nosu, izgubo vonja, glavobol (posebej v čelnem predelu), prekomerno solzenje, izbočenje očesnega zrkla in dvojni vid. Bolečina je na začetku redka, pojavlja se le pri 10 % primerov(Karcioglu in sod., 1984).

Pri kliničnem pregledu so invertni papilomi videti kot rožnate, potemnjene ali sivkaste lise na sluznici. So neprosojni, mehki do zmerno trdni, z zavito ali nagubano površino. Rentgenološki videz je odvisen od faze napredovanja bolezni. V zgodnji fazi je lahko vidna le zgostitev mehkega tkiva v nosni votlini in/ali obnosnih sinusih. V pozni fazi se običajno pojavijo unilateralne motnjave in zadebeljevanje stene enega ali več sinusov, pojavlja se razmikanje mejnih struktur. Rentgenološko je lahko vidna erozija kosti zaradi pritiska, ki pa jo je potrebno ločiti od destruktivne invazije malignega tumorja, bodisi zaradi maligne spremembe papiloma ali novo nastalega karcinoma (Syrjanen, 2003).

2.3.5 Histopatologija

Invertni papilomi so sestavljeni predvsem iz epitelnih celic, obdanih z bazalno membrano, ki vraščajo v stromo. Redko je videti izraščajoče tkivo. Epitelij papiloma je večplasten, debeline 5 do 30 celic. Sestavljen je iz ploščatih ali resasto stebričastih celic (dihalna sluznica), pomešanih z mukociti. Neporoženevajoč ploščatocelični ali prehodni tip epitelija ponavadi prevladuje in je pogosto prekrit z eno plastjo resasto stebričastih celic. Včasih je papilom lahko sestavljen izključno iz celic respiratornega epitelija. Stopnje med tema skrajnima primeroma niso neobičajne in po videzu spominjajo na epitelij sečnega trakta. Vsi ti epiteljski tipi so lahko prisotni v eni sami leziji, njihova zastopanost je lahko

različna pri različnih lezijah in celo v različnih predelih iste lezije. Mitoza je vidna predvsem v bazalnem in parabazalnem epiteliju (Karcioglu in sod., 1984).

10 do 20 % papilomov lahko kaže omejeno površinsko poroženelost, 5 do 10 % jih kaže nihanja v stopnjah displazije. Ti dve morfološki značilnosti nista nujno pokazatelja malignosti, vendar sta potrebni za temeljito patohistološko oceno papiloma. Struktura strome niha od goste in fibrozne do rahle in miksoidne z ali brez vnetnih komponent. Vnetne celice, zlasti neutrofilci, pogosto migrirajo skozi epitelij. Zadebeljevanje bazalne membrane tipično ni vidno. Normalnost seromucinoznih žlez je redka ali odsotna, ker jih preraščajoči epitelij uporablja za oporo pri širjenju v stromo (Karcioglu in sod., 1984).

Z rastjo invertnega papiloma pride lahko do oviranja drenaže sinusov, kar vzpodbuja rast navadnih polipov. Zato ni redko, da najdejo navadne polipe v vzorcu invertnega papiloma. Med seboj se ločijo po bolj miksoidnem videzu in prosojnosti za svetlobo (Syrjanen, 2003).

Redko invertni papilom kaže točkovne površinske spremembe podobne navadni bradavici (*verruca vulgaris*), kar pomeni točkovno papilarnoskvamozno epitelijsko hiperplazijo z vidno poroženelostjo ali paraporoženelostjo ter z izrazito plastjo granularnih celic (Karcioglu in sod., 1984).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Vzorci za raziskavo

V raziskavo so bili vključeni 103 tkivni vzorci invertnih papilomov slovenskih bolnikov. Vzorci so bili odvzeti med leti 1994 in 2005 in po standardnem postopku fiksirani v formalin ter vklopljeni v parafin za rutinske patološke preiskave. Dobili smo jih iz arhivske zbirke Inštituta za patologijo, Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani. Kriterij za vključitev vzorca v raziskavo je bila postavljena patološka diagnoza invertnega papiloma.

3.1.2 Kontrole

Pozitivne kontrole so bili dokazano pozitivni vzorci genoma HPV v tkivih, pridobljeni v drugih raziskavah in shranjeni v Laboratoriju za molekularno mikrobiologijo in diagnostiko hepatitisov in aidsa, Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani.

Negativna kontrola postopkov je bila voda, ki smo jo dodali v vsak poskus namesto enega HPV DNA vzorca in sicer pred pozitivno kontrolo.

3.2 METODE

Vzorci invertnega papiloma smo obdelovali v Laboratoriju za molekularno mikrobiologijo in diagnostiko hepatitisov in aidsa, Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani, kjer smo opravili osamitev celične DNA in dokazovali prisotnost HPV DNA.

3.2.1 Postopek osamitve celokupne DNA iz vzorcev vklopljenih v parafin

Preden smo se lotili PCR reakcije smo potrebovali osamljeno celično DNA. V ta namen smo vzorce invertnih papilomov, ki so bili fiksirani v formalinu in vklopljeni v parafin, najprej deparafinizirali. Sledil je postopek izolacije DNA po protokolu za osamitev

nukleinskih kislin iz tkiv vklopljenih v parafin QIAamp DNA Mini Tissue kit (Qiagen, Hilden, Nemčija) po navodilih proizvajalca.

3.2.2 Preverjanje kakovosti osamljene DNA

Vsak vzorec osamljene DNA smo pred začetkom dokazovanja okužbe s HPV testirali s PCR z začetnimi oligonukleotidi PC04 (CAACTTCATCCACGTTCCACC) in GH20 (GAAGAGCCAAGGACAGGTAC), ki omogočajo pomnoževanje 268 bp velikega dela gena za humani β -globin (Resnick in sod., 1990). Za pomnoževanje DNA smo uporabili računalniško vodeno napravo LightCycler Instrument tip 1.5 (Roche Diagnostics), ki omogoča zaznavanje pridelkov PCR v realnem času.

Za pomnoževanje smo uporabili mešanico kemikalij, ki so sestavni del kompleta LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics). Pomnoževanje smo izvedli po naslednjem postopku. V sterilno reakcijsko kapilaro smo odpipetirali 18 μ l reakcijske mešanice in 2 μ l osamljene DNA. Reakcijska mešanica je vsebovala 4 mM $MgCl_2$, po 5 pmol oligonukleotidnih začetnikov PC04 in GH20, 2 μ l LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I in 1 IU N-uracil glikozilaze.

Pomnoževanje gena za β -globin smo izvedli s 55-kratnim ponavljanjem temperaturnega cikla PCR, sestavljenega iz treh inkubacij: 15 sekund pri 95 °C, 4 sekunde pri 67 °C in 10 sekund pri 72 °C. Pred začetkom prvega cikla smo reakcijsko mešanico 10 minut inkubirali pri 95 °C, kar naj bi zagotavljalo popolno denaturacijo DNA in aktivacijo FastStart Taq DNA polimeraze.

Pomnoževanju DNA je sledilo ugotavljanje specifičnosti pridelkov PCR z metodo talilne krivulje (angl. melting curve analysis). Metodo smo izvedli z enkratnim temperaturnim ciklom: 0 sekund pri 95 °C, 30 sekund pri 72 °C, 0 sekund pri 95 °C in 30 sekund ohlajevanja reakcijske mešanice na 40 °C. Kot β -globin pozitivne smo opredelili vzorce z vrednostmi talilne temperature pridelkov PCR (T_m , angl. melting temperature) 88-89 °C oziroma enakim T_m kot pozitivna kontrola PCR.

3.2.3 Dokazovanje HPV DNA

Prisotnost HPV DNA smo v vsakem vzorcu IP dokazovali z uporabo dveh občutljivih različic PCR, ki pokrivata dve različni genski področji večine znanih anogenitalnih genotipov HPV. Primarno smo uporabili skupinsko značilne začetne oligonukleotide PGMY09^{MIX} in PGMY11^{MIX}, ki pomnožujejo 450 bp velik del gena L1 HPV najmanj 42 različnih anogenitalnih genotipov HPV (Gravitt in sod., 2000). Nato smo uporabili še degenerativna skupinsko značilna začetna oligonukleotida CPI/CPIIg, ki pomnožujeta 188 bp velik del gena E1 HPV najmanj 37 različnih genotipov HPV, in sicer večinoma anogenitalnih genotipov HPV (Tieben in sod., 1993). Nukleotidna zaporedja začetnih oligonukleotidov, tarčni gen pomnoževanja in velikosti pričakovanih pridelkov PCR so podani v preglednici 3.

Preglednica 3. Nukleotidna zaporedja začetnih oligonukleotidov, tarčni gen in velikosti pričakovanih pridelkov PCR (Gravitt in sod., 2000; Tieben in sod., 1993).

Začetni oligonukleotidi	Nukleotidno zaporedje začetnega oligonukleotida	Gen	Velikost pridelka PCR	Vir			
PGMY11-A	5'-GCA CAG GGA CAT AAC AAT GG-3'	L1	450 bp	Gravitt in sod., 2000			
PGMY11-B	5'-GCG CAG GGC CAC AAT AAT GG-3'						
PGMY11-C	5'-GCA CAG GGA CAT AAT AAT GG-3'						
PGMY11-D	5'-GCC CAG GGC CAC AAC AAT GG-3'						
PGMY11-E	5'-GCT CAG GGT TTA AAC AAT GG-3'						
PGMY09-F	5'-CGT CCC AAA GGA AAC TGA TC -3'						
PGMY09-G	5'-CGA CCT AAA GGA AAC TGA TC-3'						
PGMY09-H	5'-CGT CCA AAA GGA AAC TGA TC-3'						
PGMY09-I	5'-G CCA AGG GGA AAC TGA TC -3'						
PGMY09-J	5'-CGT CCC AAA GGA TAC TGA TC-3'						
PGMY09-K	5'-CGT CCA AGG GGA TAC TGA TC-3'						
PGMY09-L	5'-CGA CCT AAA GGG AAT TGA TC-3'						
PGMY09-M	5'-CGA CCT AGT GGA AAT TGA TC-3'						
PGMY09-N	5'-CGA CCA AGG GGA TAT TGA TC-3'						
PGMY09-P	5'-G CCC AAC GGA AAC TGA TC -3'						
PGMY09-Q	5'-CGA CCC AAG GGA AAC TGG TC-3'						
PGMY09-R	5'-CGT CCT AAA GGA AAC TGG TC-3'						
CPI	5'-TTA TCW TAT GCC CAY TGT ACC AT-3'				E1	188 bp	Tieben in sod., 1993
CPIIg	5'-ATG TTA ATW SAG CCW CCA AAA TT-3'						

3.2.4 Sestava reakcijskih mešanic za posamezne reakcije PCR in pogoji pomnoževanja s PCR

Za pomnoževanje HPV DNA z dvema kompletoma začetnih oligonukleotidov (preglednica 3) smo uporabili mešanico kemikalij, ki so sestavni del kompleta FastStart Taq Polymerase (Roche Diagnostics) in mešanico nukleotidov iz kompleta PCR Nucleotid Mix oziroma PCR Nucleotid Mix^{PLUS} (Roche Diagnostics).

Za pomnoževanje DNA smo uporabili računalniško vodeni GeneAmp[®] PCR System tip 2400 oziroma 9700 (Applied Biosystems).

3.2.4.1 Dokazovanje HPV DNA z začetnimi oligonukleotidi PGMY09^{MIX}/PGMY11^{MIX}

V sterilno reakcijsko posodico za pomnoževanje s PCR z začetnimi oligonukleotidi PGMY09^{MIX}/PGMY11^{MIX} smo odpipetirali 22,5 µl reakcijske mešanice in 2,5 µl osamljene DNA IP. Reakcijska mešanica je vsebovala po 0,2 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 5 µl 10x PCR pufra (10× PCR Reaction Buffer), 1,5 mM MgCl₂, 2 IU encima FastStart Taq DNA Polymerase in po 4 pmol oligonukleotidnih začetnikov PGMY09^{MIX}/PGMY11^{MIX}.

Pomnoževanje dela gena L1 z začetnimi oligonukleotidi PGMY09^{MIX}/PGMY11^{MIX} smo izvedli s 40-kratnim ponavljanjem temperaturnega cikla PCR, sestavljenega iz treh inkubacij: 1 minuto pri 95 °C, 1 minuto pri 55 °C in 1 minuto pri 72 °C. Pred začetkom prvega cikla smo reakcijsko mešanico 6 minut inkubirali pri 95 °C, kar naj bi zagotavljalo popolno denaturacijo DNA in aktivacijo termostabilnega encima FastStart Taq DNA Polymerase. Zadnjemu ciklu PCR je sledila 4 minutna inkubacija pri 72 °C. Encimsko reakcijo smo ustavili z ohladitvijo reakcijske mešanice na 4 °C.

3.2.4.2 Dokazovanje HPV DNA z začetnima oligonukleotidoma CPI/CPIIg

V sterilno reakcijsko posodico za pomnoževanje s PCR z začetnima oligonukleotidoma CPI/CPIIg smo odpipetirali 22,5 μ l reakcijske mešanice in 2,5 μ l osamljene DNA. Reakcijska mešanica je vsebovala po 0,2 mM dATP, dCTP, dGTP in 0,6 mM UTP, 5 μ l 10 \times PCR pufra (10 \times PCR Reaction Buffer), 3 mM MgCl₂, 2 IU encima FastStart Taq DNA Polymerase, 17 pmol začetnega oligonukleotida CPI in 26 pmol začetnega oligonukleotida CPIIg.

Pomnoževanje dela gena E1 z začetnima oligonukleotidoma CPI/CPIIg smo izvedli s 40-kratnim ponavljanjem temperaturnega cikla PCR, sestavljenega iz treh inkubacij: 45 sekund pri 95 °C, 45 sekund pri 55 °C in 80 sekund pri 72 °C. Pred začetkom prvega cikla smo reakcijsko mešanico 4 minute inkubirali pri 95 °C, kar naj bi zagotavljalo popolno denaturacijo DNA in aktivacijo termostabilnega encima FastStart Taq DNA Polymerase. Zadnjemu ciklu PCR je sledila 4 minutna inkubacija pri 72 °C. Encimsko reakcijo smo ustavili z ohladitvijo reakcijske mešanice na 4 °C.

3.2.4.3 Dokazovanje in analiza pridelkov PCR

Pridelke PCR smo dokazovali z elektroforezo v gelu. Uporabljali smo elektroforezno aparaturo SEA 2000[®] (Elchrom Scientific AG, Cham, Švica) in komercialno dostopne, že pripravljene hidrogelne za večkratno uporabo Wide Mini Clearose BG (Elchrom Scientific AG). Geli so sestavljeni iz 1 % agaroze, prečno zamrežene s polimerom BG (1,4-butandiol-diglicidileter) in omogočajo optimalno zaznavanje delcev DNA, velikih med 100 in 2000 bp.

Elektroforezni pufer smo pripravili iz 1950 ml dvojno deionizirane vode, 50 ml 40 \times pufra TAE (Elchrom Scientific AG) in 100 μ l (10 mg/ml) etidijevega bromida (Innogenetics N.V., Gent, Belgija) in z njim prelili gel, vstavljen v elektroforezno kadičko.

V začetno vdolbinico smo vedno dodali molekularni označevalec. Uporabili smo dva različna označevalca:

- molekularni označevalec 50 bp (Roche Diagnostics), ki vsebuje delce velikosti 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 ... 750 bp in dodatni 2642 bp dolg delec DNA;
- molekularni označevalec 100 bp (Roche Diagnostics), ki vsebuje delce velikosti 100, 200, 300, 400, 500, 600 ... 1500 bp in dodatni 2642 bp dolg delec DNA.

V ostale vdolbinice gela smo nanašali mešanico, ki smo jo pripravili iz 6 µl pridelka PCR in 1,6 µl ustrezne tamponske raztopine Sample Loading Buffer (Elchrom Scientific AG). Elektroforeza v gelu je potekala pri sobni temperaturi 15 minut, s samodejno vključitvijo črpalke za kroženja pufra 1,5 minute po začetku elektroforeze in napetosti med elektrodama 120 V.

Po končani elektroforezi smo gel pregledali pod UV-svetlobo in ga fotografirali z digitalnim sistemom BioRad Gel Doc 2000 System (Bio-Rad, Hercules, ZDA). Specifičnost namnoženega pridelka PCR je določala njegova velikost glede na velikost pozitivne kontrole in elektroforezne dolžinske lestvice 50 oziroma 100 bp. Kot negativne smo opredelili vzorce brez zaznanih pridelkov PCR.

3.2.4.4 Avtomatsko sekveniranje in določanje HPV genotipa z metodo BLAST

Za opredeljevanje genotipov HPV, ki smo jih zaznali z začetnimi oligonukleotidi CPI/CPII_g ter PGMY09^{MIX}/PGMY11^{MIX}, smo uporabili metodo določanja nukleotidnega zaporedja in primerjavo dobljenih, parcialnih zaporedij z znanimi nukleotidnimi zaporedji genomov HPV v genski banki EMBL (EMBL, 2006).

Za opredeljevanje podtipske različnosti izolatov HPV-6 in HPV-11 smo uporabili metodo določanja nukleotidnega zaporedja celotnega gena E4 in primerjavo dobljenih zaporedij z nukleotidnimi zaporedji ORF E4 referenčnih izolatov HPV-6 in HPV-11 v genski banki EMBL.

Pridelke PCR, ki so ustrezali pričakovanim velikostim, smo očistili s komercialnim kompletom za čiščenje pridelkov PCR, QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Hilden, Nemčija). Eni volumski enoti pridelka PCR smo dodali 5 volumskih enot puфра PB in dobro premešali. Nastalo mešanico smo prenesli v mikrokolono, vloženo v 2 ml zbiralno tubico in centrifugirali 1 minuto pri 13000 rpm. Izpirek in zbiralno tubico smo zavrgli, mikrokolono pa postavili v novo zbiralno tubico in dodali 750 μ l puфра PE. Sledilo je enominutno centrifugiranje vzorca pri 13000 rpm. V nadaljevanju smo mikrokolono prestavili v novo zbiralno tubico in centrifugirali 1 minuto pri 15000 rpm. V zadnji fazi smo mikrokolono postavili v novo 1,5 ml tubico, dodali 30-50 μ l puфра EB (10 mM Tris-Cl, pH = 8,5) in vzorec inkubirali 1 minuto pri sobni temperaturi. Pridelke PCR smo iz membranskega filtra mikrokolone eluirali z enominutnim centrifugiranjem pri hitrosti 13000 rpm in jih do uporabe shranili pri -20 °C.

Koncentracijo očiščenih pridelkov PCR smo določevali na 1,7 % agaroznem gelu, ki smo ga pripravili po standardnem postopku. V stekleno čašo smo odtehtali 0,85 g agaroze v prahu A9539 AGAROSE (Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA) in dodali 50 ml 1x puфра TAE (0,04 M Tris-HCl; 0,02 M NaCl; 2 mM EDTA; 0,02 M Na-acetat pH = 8,3). Rastopino agaroze smo premešali in jo v mikrovalovni pečici segreli do vrelišča. Rastopini smo dodali 5 μ l etidijevnega bromida (10 mg/ml) (Innogenetics N.V.) in jo ohladili v kalupu z elektroforeznimi glavnički.

Strjen gel smo položili v elektroforezno kadičko HE 33 Mini Submarine Unit (Hofer, San Francisco, ZDA) in ga prelili s pufrom 1x TAE, ohlajenim na 4 °C. V začetno vdolbinico smo dodali 10 μ l koncentracijskega molekularnega označevalca MassRuler™ DNA Ladder, Low Range (Fermentas, Vilnius, Litva), ki vsebuje različno velike delce DNA (80-1031 bp) v koncentracijah 0.8, 1, 2, 3, 4, 10, 6, 7, 8, 9 in 10 ng/ μ l. V ostale vdolbinice gela smo nanašali mešanico, ki smo jo pripravili iz 10 μ l očiščenega pridelka PCR in 2 μ l ustrezne tamponske raztopine 6X MassRuler™ Loading Dye Solution (Fermentas).

Elektroforeza v gelu je potekala pri sobni temperaturi 30 minut in napetosti med elektrodama 120 V. Po končani elektroforezi smo gel pregledali pod UV-svetlobo in ga fotografirali z digitalnim sistemom BioRad Gel Doc 2000 System (Bio-Rad). Iz primerjave

intenzitete delcev DNA koncentracijskega molekularnega označevalca in pridelkov PCR, smo s pomočjo programa Gel Doc določili koncentracije pridelkov PCR.

Pridelkom PCR smo določili nukleotidno zaporedje s komercialno dostopnim kompletom BigDye[®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Reakcijska mešanica za določevanje nukleotidnega zaporedja izbranega pridelka PCR je vsebovala 2 µl 5x sekvenčnega pufra (5X Sequencing Buffer), 4 µl BigDye[®] Terminator v 1,3 µl levega oziroma desnega začetnega oligonukleotida (50 µM), 3-10 ng očiščenega pridelka PCR in deionizirano vodo do 20 µl skupnega reakcijskega volumna.

Sekvenčno reakcijo smo izvedli s 25-kratnim ponavljanjem temperaturnega cikla PCR, sestavljenega iz treh inkubacij: 10 sekund pri 96 °C, 5 sekund pri 50 °C in 4 minute pri 60 °C.

Odstranitev nevgrajenih dideoksinukleotidov smo izvedli s pomočjo kompleta DyeEx 2.0 Spin kit (Qiagen) po navodilih proizvajalca. Mikrokolono s filtrom, ki vsebuje raztopino resina, smo narahlo pretresli, za četrtno navoja odvili pokrovček in odlomili spodnji del mikrokolone. Nato smo mikrokolono vložili v 2 ml zbiralno tubico in centrifugirali 3 minute pri 3000 rpm. Zbiralno tubico smo zavrgli, mikrokolono pa postavili v novo 1,5 ml tubico. Na sredino strjenega gela, ki je v mikrokoloni nastal po centrifugiranju raztopine resina, smo nanесли celotno sekvenčno reakcijo in ponovno centrifugirali 3 minute pri 3000 rpm. Reakcijske posodice z eluirano DNA smo nato prenesli v vakuumsko centrifugo Speed VAC SC110 (Global Medical Instrumentation, Ramsey, ZDA) in sušili natanko 20 minut. V nadaljevanju smo posušeni DNA dodali 25 µl na sobno temperaturo ogrete denaturacijske raztopine Template Supresion Reagent (TSR) ali Hi-Di[™] Formamide (Applied BioSystems) in nastalo mešanico prenesli v 0,2 ml reakcijske posodice za PCR. V zadnji fazi smo vzorce denaturirali 2 minuti pri 95 °C in jih takoj, za najmanj 2 minuti, postavili v ledeni blok (-20 °C).

Sekvenčna analiza oziroma določanje nukleotidnega zaporedja je bila izvedena na aparaturi za avtomatsko sekveniranje ABI PRISM[™] 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Po končanem delu računalniški program Sequencing Analysis, ki je povezan

z aparaturo ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer, avtomatsko obdela zbrane podatke v obliko elektroferograma s pripadajočim nukleotidnim zaporedjem.

Nukleotidno zaporedje iz elektroferograma smo analizirali in obdelali z uporabo računalniškega programa BioEdit Sequence Alignment Editor (North Carolina State University, ZDA). Iz primerjave komplementarnih nukleotidnih zaporedij smo za posamezen izolat HPV sestavili smiselno (angl. sense) nukleotidno zaporedje in ga uporabili za določitev genotipa HPV.

Primerjavo dobljenih nukleotidnih zaporedij izolatov HPV z uradno priznanimi in potencialno novimi genotipi HPV smo izvedli z računalniškim programom BLAST (BLAST, 2006). Program BLAST deluje tako, da iz množice nukleotidnih zaporedij v genski banki EMBL izbere tisto(a), ki z izbranim nukleotidnim zaporedjem doseže najboljšo pozicijsko homologijo ($E = \sim 0$). Rezultate BLASTA smo potrdili s primerjavo (angl. pairwise alignment) izbranega nukleotidnega zaporedja z nukleotidnim zaporedjem gena referenčnega izolata HPV in izračunali odstotek podobnosti (angl. percentage of similarity).

4 REZULTATI

4.1 DOLOČANJE GENA ZA β -GLOBIN

V naši raziskavi smo iz 103 tkivnih vzorcev invertnih papilomov fiksiranih v formalin in vklopljenih v parafin, izolirali DNA HPV z metodo za osamitev nukleinskih kislin iz tkiv vklopljenih v parafin QIAamp DNA Mini Tissue kit (Qiagen, Hilden, Nemčija). Kvaliteto izolirane DNA smo preverjali s pomnoževanjem 268 bp velikega dela ubikvitarnega gena za β -globin. Omenjen gen smo v reakciji PCR pomnoževali s parom začetnih oligonukleotidov GH20/PC04. 268 bp dolg odsek gena za β -globin smo uspešno pomnožili v 92 vzorcih, 11 vzorcev je imelo preslabo kvaliteto DNA, zato smo jih izključili iz nadaljnje raziskave. Izolacija DNA po metodi za osamitev nukleinskih kislin iz tkiv vklopljenih v parafin QIAamp DNA Mini Tissue kit (Qiagen, Hilden, Nemčija) je bila tako 89,3 %.

4.2 DOLOČANJE HPV DNA

Vzorec 92 deparafiniziranih invertnih papilomov v katerem smo uspešno pomnožili odsek gena za humani β -globin, smo uporabili za nadaljnjo raziskavo in izvedli PCR s parom začetnih oligonukleotidov CPI/CPII_g, ki pomnožujeta 188 bp velik del gena E1 HPV. Pomnoževanje HPV DNA je bilo uspešno v 5 vzorcih, 87 vzorcev je bilo HPV DNA negativnih.

Ta vzorec 92 invertnih papilomov v katerih smo uspešno pomnožili odsek gena za humani β -globin, smo ponovno uporabili še za PCR s skupinsko značilnimi začetnimi oligonukleotidi PGMY09^{MIX} in PGMY11^{MIX}, ki pomnožujejo 450 bp velik del gena L1 HPV. Pomnoževanje HPV DNA je bilo uspešno v 7 vzorcih, 85 vzorcev je bilo HPV DNA negativnih.

4.3 AVTOMATSKO SEKVENIRANJE IN DOLOČANJE HPV GENOTIPA Z METODO BLAST

Za opredeljevanje genotipov HPV, ki smo jih zaznali z začetnimi oligonukleotidi CPI/CPIIg ter PGMY09^{MIX}/PGMY11^{MIX}, smo uporabili metodo določanja nukleotidnega zaporedja in primerjavo dobljenih, parcialnih zaporedij z znanimi nukleotidnimi zaporedji genomov HPV v genski banki EMBL. Metodo smo torej izvedli na 7 pozitivnih vzorcih in dobili rezultate, kot kaže preglednica 4.

Preglednica 4. Genotipi HPV opredeljeni na 7 pozitivnih vzorcih, glede na rezultate PCR in podatke genske banke EMBL.

VZOREC ŠTEVILKA	HPV CPI/Iig	OPREDELJENI GENOTIP HPV	HPV PGMY09 ^{MIX} /11 ^{MIX}	OPREDELJENI GENOTIP HPV
38	+	HPV-6	+	HPV-6
49	+	HPV-11	+	HPV-11
50	+	HPV-11	+	HPV-11
96	+	HPV-11	+	HPV-11
108	+	HPV-11	+	HPV-11
28	-	/	+	HPV-11
102	-	/	+	HPV-11

Po opredelitvi HPV genotipa z metodo določanja nukleinskega zaporedja smo pri 6 invertnih papilomih dokazali genotip HPV-11 (85,7 %) ter pri enem HPV-6 genotip (14,3 %).

V vzorcu 92 invertnih papilomov predstavlja tako 6,5 % okužbe genotip HPV-11 in 1 % okužbe genotip HPV-6.

Pri petih invertnih papilomih pozitivnih z obema različicama PCR so se genotipi HPV popolnoma ujemali (preglednica 4).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Uvod

Odkar je leta 1987 Brandsma s sodelavci dokazal prisotnost HPV DNA v Schneiderjevih papilomih, se je zanimanje za oceno vloge HPV pri nastanku in razvoju Schneiderjevih papilomov močno povečalo. Glede na najobčutljivejšo metodo PCR je bila prevalenca HPV pri pregledu raziskav tumorjev glave in vratu med leti 1990 in 2001 34.5 % (416 od 1205 tumorjev) (McKaig in sod., 1998) ter pri pregledu raziskav invertnih papilomov 32 % (127 od 397 invertnih papilomov) (Syrjanen, 2003). Nekatere študije so nakazale, da sta starost manj kot 60 let in moški spol povezana s prisotnostjo HPV v tumorjih, medtem ko uporaba tobaka in alkohola nista (Barnes in ed., 2005; Syrjanen, 2003; McKaig in sod., 1998).

PCR je trenutno najbolj občutljiva metoda, s katero lahko dokažemo HPV v zelo različnih kliničnih vzorcih (Guerrero in sod., 1992; Kuypers in sod., 1993). PCR zazna HPV DNA celo v primerih, ko je tarčna DNA manj kvalitetna ali v količinah, ki jih druge tehnike dokazovanja HPV ne zaznajo. Zaradi visoke občutljivosti je metoda primerna tudi za dokazovanje prisotnosti HPV DNA v arhivskih vzorcih.

5.1.2 Analiza rezultatov

Pred izvedbo pomnoževanja tarčnih odsekov DNA HPV smo preverili kvaliteto izolirane DNA. To smo izvedli s pomnoževanjem gena za β -globin, ki nam je služil kot notranja kontrola. Uspešno pomnoževanje gena za β -globin pomeni, da v vzorcu ni zaviralcev PCR reakcije, medtem ko v primeru negativnega pomnoževanja notranje kontrole dobljenega rezultata PCR reakcije ne moremo opredeliti. V našem primeru je bila izolacija DNA HPV z izolacijskim kompletom QIAamp DNA Mini Tissue kit (Qiagen, Hilden, Nemčija) uspešna, saj smo v 89,3 % deparafiniziranih vzorcev invertnih papilomov gen za β -globin uspešno pomnožili. Kljub uspešnemu pomnoževanju notranje kontrole lahko v nadaljevanju pri specifičnem pomnoževanju s PCR dobimo lažno negativne rezultate PCR,

saj se zaradi prevlade β -globina tarčna DNA ne pomnoži. Težavam bi se lahko izognili z uporabo standardiziranih notranjih kontrol (Poljak in Seme, 1996).

Pri dokazovanju HPV DNA s PCR je zelo pomembno vključevanje kombinacij več parov skupinsko značilnih začetnih oligonukleotidov, saj lahko v primeru, ko uporabljamo samo en par, okužba ostane neodkrita. Gena L1 in E1 sta najbolj ohranjeni regiji HPV genoma in tako najprimernejši tarči za skupinsko značilne začetne oligonukleotide (Manos in sod., 1989). V določenih primerih gena nista nujno ohranjena, saj prihaja ob integraciji genoma HPV v gostiteljsko celico mnogokrat do prekinitve genoma na omenjenih mestih (Poljak in sod., 2005).

V naši raziskavi smo za odkrivanje HPV DNA v deparafiniziranih vzorcih invertnih papilomov, uporabili skupinsko značilne začetne oligonukleotide PGMY09^{MIX}/PGMY11^{MIX}, ki pomnožujejo del gena L1 ter CPI/CPIIg, ki pomnožujeta del gena E1. Prednost skupinsko značilnih začetnih oligonukleotidov je ta, da so izbrani v najbolj ohranjenih regijah genoma HPV. Tako je mogoče z uspešnim pomnoževanjem tarčnega odseka DNA v eni sami reakciji PCR zajeti več različnih genotipov HPV. Slabost skupinsko značilnih začetnih oligonukleotidov je v tem, da z njihovo uporabo dokažemo prisotnost HPV v vzorcu, ne moremo pa opredeliti genotipa HPV. Te smo opredelili naknadno z metodo določanja nukleotidnega zaporedja.

V naši raziskavi je bila za dokazovanje HPV DNA bolj občutljiva različica PCR, v katerih smo za pomnoževanje tarčnih odsekov uporabili mešanico skupinsko značilnih začetnih oligonukleotidov PGMY09/11^{MIX} (Gravitt in sod., 2000). Gre za mešanico skupinsko značilnih začetnih oligonukleotidov, ki pomnožujejo 450 bp dolg odsek najbolj ohranjenega dela genoma HPV, gena L1. So nedegenerirani in tako bolj specifični pri dokazovanju pomnoženih tarčnih sekvenc.

Skupinsko značilni začetni oligonukleotidi CPI/IIg (Tieben in sod., 1993) pomnožujejo 188 bp dolg odsek močno ohranjenega dela genoma HPV, gena E1. Pomnožujejo širok spekter genotipov HPV in so zaradi dokaj kratke dolžine pomnoževanega odseka primerni za pomnoževanje specifičnih odsekov tudi v tistih vzorcih, kjer je DNA delno razgrajena.

Taki so bili tudi naši arhivski vzorci fiksirani v formalinu in vklopljeni v parafin (Tieben in sod., 1993). Vendar pa je bila občutljivost te različice PCR manjša (5,4 %).

Vzroke za razlike v rezultatih PCR z različnimi začetnimi oligonukleotidi lahko pripišemo več dejavnikom, kot so izguba delov genoma, kar je posledica vključevanja virusa v genom gostiteljske celice, variacije v afiniteti do začetnih oligonukleotidov, mutacije nukleotidov (predvsem delecije) na prijemališčih za začetne oligonukleotide, prisotnost zaviralcev PCR. Na razlike v rezultatih lahko vplivajo tudi različne količine DNA v mešanici PCR in sami pogoji pomnoževanja. Uspešnost PCR je odvisna tudi od količine in kvalitete kliničnega vzorca. Najbolj pa je pomembna kvaliteta izolirane DNA in pravilna izbire začetnih oligonukleotidov. DNA je lahko poškodovana tudi zaradi fiksiranja vzorcev v formalin ter vklopljanja v parafin. Greer je leta 1994 dokazal, da se z večanjem starosti parafinskih vzorcev slabša uspešno pomnoževanje DNA tarč, večjih od 268 bp. V vzorcih starejših od 10 let naj bi bilo pomnoževanje uspešno le še v 40 % (Greer et al, 1994).

Ugotovili smo, da so naši rezultati glede prevalence HPV v vzorcu invertnih papilomov primerljivi z rezultati nekaterih do sedaj objavljenih študij. Prevalenca je znašala od 6,8 % do 9 % (Hwang in sod., 1998; McKay in sod., 2005; Weiner in sod., 1999). Zanimivo bi bilo prevalenco v našem vzorcu primerjati z vzorcem negativnih kontrol, ljudi v populaciji brez invertnega papiloma, ki ga mi nismo uporabili. Nekateri viri navajajo, da je do 5 % vzorcev negativnih kontrol populacije pozitivnih za HPV (Smith in sod., 1998).

Po opredelitvi HPV genotipa z metodo določanja nukleinskega zaporedja smo ugotovili, da en HPV pozitiven vzorec vsebuje HPV-6 genotip, 6 ostalih HPV pozitivnih vzorcev pa HPV-11 genotip. Genotip HPV-11 je bolj pogost tudi v prej navedenih študijah. Obstaja hipoteza, da bo invertni papilom, okužen s HPV-11, bolj verjetno maligno transformiral (Weiner in sod., 1999).

5.2 SKLEPI

- V naši raziskavi, ki je zajela 103 tkivne vzorce invertnih papilomov fiksiranih v formalin in vklopljenih v parafin, smo DNA uspešno osamili iz 92 (89,3 %) tkivnih vzorcev invertnih papilomov.
- Z uporabo dveh različic PCR z začetnimi oligonukleotidi CPI/IIg in PGMY09/11^{MIX} za dokaz okužbe s HPV smo ugotovili, da je prevalenca HPV DNA v invertnih papilomih slovenskih bolnikov 7,6 %.
- Prisotnost genotipa HPV-11 je bila v našem vzorcu invertnih papilomov bolj pogosta kot prisotnost genotipa HPV-6, kar se ujema s podatki iz literature.
- Za opredelitev pomena HPV v etiologiji invertnih papilomov bodo potrebne nadaljnje raziskave na tkivnih vzorcih histološko normalne sluznice nosne in obnosne votline.

6 POVZETEK

Invertni papilom je redka benigna novotvorba, ki značilno zraste na lateralni nosni steni in se pogosto sekundarno razširi v obnosne votline. Invertni papilomi so dva do petkrat bolj pogosti pri moških in jih primarno najdemo v starostni skupini od 40 do 70 let (Barnes in sod., 2005; Syrjanen, 2003). Klinično so pomembni zato, ker so nagnjeni k maligni transformaciji in recidivu po operativni odstranitvi (Weiner in sod., 1999).

Odkar je leta 1987 Brandsma s sodelavci dokazal prisotnost DNA humanih virusov papiloma (HPV) v invertnih papilomih, so začeli z raziskavami s katerimi so želeli opredeliti vlogo HPV pri nastanku in razvoju invertnih papilomov. Najboljša metoda dokaza genoma HPV v arhivskih vzorcih je verižna reakcija s polimerazo (PCR).

V naši raziskavi smo želeli z uporabo dveh različic PCR z začetnimi oligonukleotidi CPI/IIg in PGMY09/11^{MIX} za dokaz okužbe s HPV ugotoviti prevalenco HPV v reprezentativnem vzorcu slovenskih bolnikov z invertnimi papilomi.

DNA smo uspešno osamili iz 92 (89,3 %) od 103 tkivnih vzorcev invertnih papilomov fiksiranih v formalin ter vklopljenih v parafin.

Dokazali smo, da je pri vzorcu 92 invertnih papilomov pogostost okužbe s HPV 7,6 %. Pri tem je bila prisotnost genotipa HPV-11 pogostejša (6 vzorcev) kot prisotnost genotipa HPV-6 (1 vzorec).

7 VIRI

Barnes L., Tse L.L.Y., Hunt J.L. 2005. Schneiderian papillomas. V: Pathology and genetics of head and neck tumours. Barnes L., Eveson J.W., Reichart P., Sidransky D. (eds.). Lyon, IARC Press: 28-32.

Bernard H.U., Chan S.Y., Manos M.M., Onq C.K., Villa L.L., Delius H., Peyton C.L., Bauer H.M., Wheeler C.M. 1994. Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. *Journal of Infectious Disease*, 170: 1077-1085.

Blachon S., Demeret C. 2003. The regulatory E2 proteins of human genital papillomaviruses are pro-apoptotic. *Biochimie*, 85: 813-819.

BLAST, basic local alignment search tool. 2006. Bethesda, National Center for Biotechnology Information. (maj 2006)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> (oktober 2006): software.

Brandsma J., Abramson A., Sciubba J. 1987. Papillomavirus infection of the nose. *Cancer Cell*, 5: 301-308.

Brooks G.F. 1998. Papillomavirus V: Jawetz, Melnick, and Adelberg's medical microbiology. 19th ed. Brooks G.F., Butel J.S., Morse S.A. (eds.). New York, McGraw-Hill: 559-562.

de Kok J.B., Hendriks J.C.M., van Solinge W.W., Willems H.L., Menisk E.J., Swinkels D.W. 1998. Use of real-time quantitative PCR to compare DNA isolation methods. *Clinical Chemistry*, 44: 2201-2204.

de Villiers E.M., Fauquet C., Broker T.R., Bernard H.U., zur Hausen H. 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology*, 324: 17-27.

EMBL nucleotide sequence database. 2006. Cambridgeshire, European Bioinformatics Institute. (september 2006)

<http://www.ebi.ac.uk/embl/> (oktober 2006): software.

Gillison M.L., Koch W.M., Capone R.B., Spafford M., Westra W.H., Wu L., Zahurak M.L., Daniel R.W., Viglione M., Symer D.E., Shah K.V., Sidransky D. 2000. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *Journal of National Cancer Institute*, 92, 9: 709-720.

Gillison M.L., Shah K.V. 2001. Human papillomavirus-associated head and neck squamous cell carcinoma: mounting evidence for an etiologic role for human papillomavirus in a subset of head and neck cancers. *Current Opinion in Oncology*, 13, 3: 183-188.

Gravitt P.E., Manos M.M. 1993. Nucleic acid hybridization methods to detect microorganisms. *Laboratory Animal Science*, 43: 5-10.

Gravitt P.E., Peyton C.L., Alessi T.Q., Wheeler C.M., Coutlee F., Hildesheim A., Schiffman M.H., Scott D.R., Apple R.J. 2000. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *Journal of Clinical Microbiology*, 38: 357-361.

Greer C.E., Wheeler C.M., Manos M.M. 1994. Sample preparation and PCR amplification from paraffin-embedded tissues. *PCR Methods and Applications*, 3, 6: S 113-S 122.

Guerrero E., Daniel R., Bosch F., Castellsague X., Muñoz N., Gili M., Viladiu P., Navarro C., Zubiri M.L., Ascunce N., Gonzalez L.C., Tafur L., Izarzugaza I., Shah K.V. 1992. Comparison of ViraPap, Southern hybridization and polymerase chain reaction methods for human papillomavirus identification in an epidemiological investigation of cervical cancer. *Journal of Clinical Microbiology*, 33: 2951-2959.

Herrero R., Castellsague X., Pawlita M., Lissowska J., Kee F., Balaram P., Rajkumar T., Sridhar H., Rose B., Pintos J., Fernandez L., Idris A., Sanchez M.J., Nieto A., Talamini R., Tavani A., Bosch F.X., Reidel U., Snijders P.J., Meijer C.J., Viscidi R., Munoz N., Franceschi S. 2003. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *Journal of National Cancer Institute*, 95, 23: 1772-1783.

Hwang C.S., Yang H.S., Hong M.K. 1998. Detection of human papillomavirus (HPV) in sinonasal inveted papillomas using polymerase chain reaction (PCR). *American Journal of Rhinology*, 12, 5: 363-366.

Hyams V.J. 1971. Papillomas of the nasal cavity and paranasal sinuses: a clinicopathological study of 315 cases. *Annals of Otology, Rhinology and Laryngology*, 80: 192-206.

Karcioglu Z.A., Caldwell D.R., Reed H.T. 1984. Papillomas of lacrimal drainage system: a clinicopathologic study. *Ophthalmic Surgery*, 15, 8: 670-676.

Kocjan B.J., Poljak M., Seme K., Potočnik M., Fujs K., Babič D.Z. 2005. Distribution of human papillomavirus genotypes in plucked eyebrow hairs from Slovenian males with genital warts. *Infection Genetics and Evolution*, 5: 255-259.

Kuypers J., Critchlow C., Gravitt P., Vernon D., Sayer J., Manos M., Kiviat N. 1993. Comparison of dot filter hybridization, Southern hybridization, and polymerase chain reaction amplification for diagnosis of anal human papillomavirus infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 31: 1003-1006.

Longworth M.S., Laimins L.A. 2004. Pathogenesis of Human Papillomavirus in differentiating epithelia. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68, 2: 362-372.

Manos M.M., Ting Y., Wright D.K. 1989. Use of the polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells*, 7: 209-215.

McGlennen R.C. 2000. Human papillomavirus oncogenesis. *Clinical Laboratory Medicine*, 20: 383-405.

McKaig R.G., Baric R.S., Olshan A.F. 1998. Human papillomavirus and head and neck cancer: epidemiology and molecular biology. *Head and Neck*, 20, 3: 250-265.

McKay S.P., Gregoire L., Leonardo F., Reidy P., Mathog R.H., Lancaster W.D. 2005. Human papillomavirus (HPV) transcripts in malignant inverted papilloma are from integrated HPV DNA. *Laryngoscope*, 115, 8: 1428-1431.

Munger K., Howley P.M. 2002. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Research*, 89: 213-228.

Munoz N., Bosch F.X., de Sanjose S., Herrero R., Castellsague X., Shah K.W., Snijders P.J., Meier C.J. 2003. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *New England Journal of Medicine*, 348: 518-527.

Pfister H., Fuchs P.G. 1994. Anatomy, taxonomy and evolution of papillomaviruses. *Intervirology*, 37: 143-149.

Poljak M., Avšič-Županc T., Seme K. 1994. Verižna reakcija s polimerazo - nova raziskovalna in diagnostična metoda v virologiji. *Medicinski Razgledi*, 33: 379-400.

Poljak M., Kocjan B.J., Seme K., Fujs K., Potočnik M., Luzar B., Gale N. 2005. Humani virusi papiloma (HPV). *Onkologija*, 9: 60-72.

Poljak M., Seme K. 1996. Rapid detection and typing of human papillomaviruses by consensus polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Virology Methods*, 56: 231-238.

Poljak M., Seme K., Gale N. 1998. Detection of human papillomaviruses in tissue specimens. *Advances in Anatomic Pathology*, 5: 216-234.

Resnick R.M., Cornellsen M.T.E., Wright D.K., Eichinger G.H., Fox H.S., ter Schegget J., Manos M.M. 1990. Detection and typing of human papillomavirus in archival cervical cancer specimens by DNA amplification with consensus primers. *Journal of the National Cancer Institute*, 82, 18: 1477-1484.

Sarkar F.H., Visscher D.W., Kintanar E.B., Zarbo R.J., Crissman J.D. 1992. Sinonasal Schneiderian papillomas: human papillomavirus typing by polymerase chain reaction. *Modern Pathology*, 5, 3: 329-332.

Schneider A. 1994. Natural history of genital papillomavirus infections. *Intervirology*, 37: 201-14.

Shen J., Tate J.E., Crum C.P., Goodman M.L. 1996. Prevalence of human papillomaviruses (HPV) in benign and malignant tumors of the upper respiratory tract. *Modern Pathology*, 9: 15-20.

Smith E.M., Hoffman H.T., Summersgill K.S., Kirchner H.L., Turek L.P., Haugen T.H. 1998. Human papillomavirus and risk of oral cancer. *Laryngoscope*, 108, 7: 1098-1103.

Smith E.M., Ritchie J.M., Summersgill K.F., Hoffman H.T., Wang D.H., Haugen T.H., Turek L.P. 2004. Human papillomavirus in oral exfoliated cells and risk of head and neck cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 96, 6: 449-455.

Syrjanen K.J. 2003. HPV infections in benign and malignant sinonasal lesions. *Journal of Clinical Pathology*, 56: 174-181.

Tieben L.M., ter Schegget J., Minnaar R.P., Bouwes Bavnick J.N., Berkhout R.J., Vermeer B.J., Jebbink M.F., Smits H.L. 1993. Detection of cutaneous and genital HPV types in clinical samples by PCR using consensus primers. *Journal of Virology Methods*, 42: 265-279.

Weiner J.S., Sherris D., Kasperbauer J., Lewis J., Li H., Persing D. 1999. Relationship of human papillomavirus to schneiderian papillomas. *Laryngoscope*, 109: 21-26.

Wilson R., Fehrmann F., Laimins L.A. 2005. Role of the E1-E4 protein in the differentiation-dependent life cycle of human papillomavirus type 31. *Journal of Virology*, 79: 6732-6740.

Zheng Z.M., Baker C.C. 2006. Papillomavirus genome structure, expression and post-transcriptional regulation. *Frontiers in Bioscience*, 11: 2286-2302.

zur Hausen H. 1996. Papillomavirus infections a major cause of human cancers. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1288, 2: F 55-F78.

zur Hausen H. 1999. Papillomaviruses in human cancers. *Proceedings of the Association of American Physicians*, 111, 6: 581-587.

zur Hausen H. 2000. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *Journal of the National Cancer Institute*, 92, 9: 690-698.

ZAHVALA

Prof. dr. Mariu Poljaku, dr. med. se zahvaljujem za mentorstvo, pomoč in prenekateri koristen nasvet.

Doc. dr. Katji Seme, dr. med. se zahvaljujem za nasvete in pomoč pri pisanju naloge.

Za pomoč pri laboratorijskem delu se zahvaljujem Boštjanu, Kristini, Robiju, Dunji, Tini, Mojci, Evi in ostalim članom Laboratorija za molekularno mikrobiologijo in diagnostiko hepatitisov in aidsa, Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete, Univerze v Ljubljani za mnoge nasvete, potrpljenje, prijetno vzdušje pri delu in za zelo potrebno kavo.

Patriciji hvala za zaupanje v moje sposobnosti ter ure, porabljene za pomoč pri končnem izdelku. Upam, da bova še kdaj delali skupaj.

Na koncu še zahvala družini in prijateljem za prijaznost in potrpljenje.