Σε συνεργασία με το

Εργαστήριο Μοριακής Μικροβιολογίας και Ανοσολογίας

Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών

Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

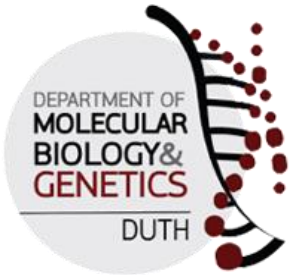
Μοριακή Ανίχνευση και Γενετική ανάλυση των υψηλού κινδύνου τύπων του ιού Papilloma (Human Papilloma Virus, HPV) σε ασθενείς με καρκίνο κεφαλής-τραχήλου

Διπλωματική Εργασία

Παναγιώτα Ρέστα (ΑΕΜ: 1844)

Επιβλέπων καθηγητής: Απόστολος Μπελούκας

Αθήνα, 2021



In collaboration with Molecular Microbiology and Immunology Laboratory

Department of Biomedical Sciences

University of West Attica

Molecular Detection and Genetic Analysis of High - Risk Human Papillomavirus Genotypes in Head and Neck Cancer Patients

Graduate Thesis

Panagiota Resta (1844)

Supervisor: Apostolos Beloukas

Athens, 2021

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Μικροβιολογίας και Ανοσολογίας του τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς τον επιβλέποντα καθηγητή Απόστολο Μπελούκα για την ευκαιρία που μου έδωσε να ενταχθώ στην ερευνητική του ομάδα καθώς και την υποψηφία διδάκτορα του τμήματος δις Αναστασία – Μαρία Κεφάλα και την επιστημονική συνεργάτιδα-μεταδιδακτορική ερευνήτρια Δρ. Αικατερίνη Γιώτη του Εργαστήριου Μοριακής Μικροβιολογίας & Ανοσολογίας του τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, για την συνεχή επιστημονική καθοδήγηση και για τον χρόνο που αφιέρωσαν καθ' όλη την διάρκεια της εργασίας αυτής. Μεγάλο ευχαριστώ οφείλω και στα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για την άριστη συνεργασία και την συνεχή υποστήριξη. Τέλος, η εργασία αυτή δεν θα μπορούσε να ολοκληρωθεί χωρίς την αμέριστη υποστήριξη της οικογένειάς μου, στους οποίους οφείλω ο, τι έχω καταφέρει.

Περίληψη

Την τελευταία δεκαετία έχουν αυξηθεί ολοένα και περισσότερο οι μελέτες που συνδέουν τον ιό των Ανθρώπινων Θηλωμάτων (Human Papillomavirus) με την εμφάνιση κακοηθειών στην ανατομική περιοχή Κεφαλής – Τραχήλου. Ο συγκεκριμένος ιός είναι εδώ και πολλά χρόνια γνωστός στην επιστημονική κοινότητα για τη συμμετοχή του στο σχηματισμό κονδυλωμάτων και καρκινωμάτων του τραχήλου της μήτρας. Ωστόσο, λίγα είναι γνωστά για την επίδρασή του στην περιοχή Κεφαλής – Τραχήλου, καθώς πολλοί παράγοντες κινδύνου φαίνεται να επηρεάζουν ποικιλοτρόπως την ογκογόνο δράση του. Οι επιδημιολογικές μελέτες αναφέρουν έντονη ετερογένεια γονοτύπων ανάλογα πρωτίστως την ανατομική περιοχή δειγματοληψίας και δευτερευόντως την γεωγραφική προέλευση των δειγμάτων που εξετάζονται. Συγκεκριμένα, στην περιοχή του λάρυγγα, τα ποσοστά συμμετοχής του ιού των Ανθρώπινων Θηλωμάτων στα διάφορα περιστατικά καρκίνου ποικίλουν από 2% έως 90%. Συχνότερα ανιχνεύεται ο γονότυπος HPV16 ενώ ακολουθούν και άλλοι γονότυποι υψηλού κινδύνου. Οι κύριες μέθοδοι ανίχνευσης του ιού βασίζονται στην μοριακή τεχνολογία ενώ συχνά χρησιμοποιείται ανοσοϊστοχημεία για τον προσδιορισμό διάφορων βιοδεικτών. Σκοπός της διπλωματικής εργασίας ήταν η ανίχνευση του ιού των Ανθρώπινων Θηλωμάτων σε ιστικές τομές γλωττιδικών βιοψιών και στην συνέχεια η γονοτύπησή του. Τα συνολικά εξήντα τρία δείγματα υποβλήθηκαν σε απομόνωση γενετικού υλικού, το οποίο στην συνέχεια ποσοτικοποιήθηκε ενώ μετρήθηκε και η καθαρότητά του. Με τη χρήση της τεχνικής της Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου (Real Time PCR) πραγματοποιήθηκε η ποιοτική ανάλυση των δειγμάτων και η γονοτύπηση όσων βρέθηκαν θετικά για τον ιό. Από τα εξήντα τρία δείγματα τα δεκαέξι βρέθηκαν θετικά για τον ιό των Ανθρώπινων Θηλωμάτων (16/63; 25,4%) και όλα έφεραν τον γονότυπο HPV16 (16/16; 100%). Αξίζει να σημειωθεί πως τα συγκεκριμένα δείγματα είχαν εξεταστεί με ανοσοϊστοχημεία για την παρουσία του ιού, αλλά κανένα δεν είχε χαρακτηριστεί ως θετικό, καθώς το σύνολο των εξηντατριών δειγμάτων ήταν αρνητικά στην ανοσοϊστοχημική χρώση. Η παρούσα μελέτη μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με μελλοντικές για τη συλλογή και την αξιολόγηση δεδομένων αναφορικά με τη συμβολή του ιού των Ανθρώπινων Θηλωμάτων στην εμφάνιση καρκινωμάτων στην περιοχή Κεφαλής – Τραχήλου.

Λέξεις – Κλειδιά:

Ιός Ανθρώπινων Θηλωμάτων, Καρκίνος Κεφαλής – Τραχήλου, Μοριακή Ανίχνευση, Γονοτύπηση, Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου

Abstract

In the last decade, numerous studies examine the association of Human Papillomavirus with the occurrence of malignancies in Head – Neck anatomical region. This virus has been known in the scientific community for its participation in the formation of warts and cervical cancer. However, little is known about its effect on Head and Neck region, as many risk factors seem to affect its oncogenic action in various ways. Epidemiological studies report strong heterogeneity of genotypes depending primarily on the anatomical region and secondarily on the geographical origin of the samples being examined. Specifically, in the laryngeal region, the rates of involvement of the Human Papillomavirus in various cases of cancer vary from 2% to 90%. The HPV16 genotype is most commonly detected, followed by other high-risk genotypes. The main methods of virus detection are based on molecular technology while immunohistochemistry is often used to determine various biomarkers. This thesis investigates the presence of Human Papillomavirus in tissue sections of glottis biopsies. DNA was extracted from a total of sixty-three samples and then quantified. Real- Time PCR was implemented for qualitative analysis and genotyping those who tested positive. Out of sixty-three samples, sixteen tested positive for the Human Papillomavirus (16/63; 25.4%) all with the genotype HPV16 (16/16; 100%). It is worth mentioning that, these samples were previously tested for virus detection with immunohistochemistry methods but none found positive. This study can be used for data collection and evaluation regarding the contribution of the Human Papillomavirus to the development of carcinomas in the Head - Neck anatomical region.

Keywords:

Human Papillomavirus (HPV), Head and Neck Cancer, Molecular Detection, Genotyping, Real – Time PCR

Περιεχόμενα

Α. Γενικό Μέρος **7**

ΕΝΟΤΗΤΑ 1η **10**

Ο ιός των Ανθρώπινων Θηλωμάτων **10**

1.1 Λοιμογόνος Παράγοντας 10

1.2 Μηχανισμός Λοίμωξης 12

1.3 Βιολογικός Κύκλος του Ιού 14

1.4 Τα γονίδια Ε6 και Ε7 17

1.5 Ταξινόμηση Γονοτύπων 19

ΕΝΟΤΗΤΑ 2η **22**

Ασθένειες και ιός Ανθρώπινων Θηλωμάτων **22**

2.1 Κονδυλώματα 22

2.2 Καρκίνος του Τραχήλου της Μήτρας 23

ΕΝΟΤΗΤΑ 3η **25**

Καρκίνος Κεφαλής – Τραχήλου **25**

3.1 Επιδημιολογία του Καρκίνου 25

3.2 Παράγοντες Κινδύνου 27

3.3 Ο Ιός των Ανθρώπινων Θηλωμάτων και ο Καρκίνος Κεφαλής – Τραχήλου 29

3.4 Πρόληψη 34

3.5 Διάγνωση 34

3.6 Θεραπεία 36

Β. Ειδικό Μέρος **37**

ΕΝΟΤΗΤΑ 4η **37**

Υλικά – Μέθοδοι **37**

4.1 Απομόνωση Γενετικού υλικού (DNA Extraction) από Ιστικές Τομές 37

4.2 Φωτομέτρηση 38

4.3 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου (Real Time PCR) ... 39

ΕΝΟΤΗΤΑ 5η **42**

Αποτελέσματα **42**

ΕΝΟΤΗΤΑ 6η **44**

Συμπεράσματα/Συζήτηση **45**

Βιβλιογραφία **50**

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1: Η δομή του ιού των Ανθρώπινων Θηλωμάτων. (https://viralzone.expasy.org/5) 10
Εικόνα 2: Η πορεία της λοίμωξης από τον HPV. (K. Nagasaka et.al., PDZ Domains and Viral Infection: Versatile Potentials of HPV-PDZ Interactions in relation to Malignancy,BioMes Research International,2013) 12
Εικόνα 3: Οι E6 και E7 ογκοπρωτεϊνες προάγουν τον κυτταρικό μετασχηματισμό. (Miller, D.L., M.D. Puricelli, and M.S. Stack, *Virology and molecular pathogenesis of HPV (human papillomavirus)-associated oropharyngeal squamous cell carcinoma.* Biochem J. 443(2): p. 339-53.) 13
Εικόνα 4: Χάρτης του γονιδιώματος του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV). (Pinatti, L.M., H.M. Walline, and T.E. Carey, *Human Papillomavirus Genome Integration and Head and Neck Cancer.* J Dent Res. 97(6): p. 691-700.).....15
Εικόνα 5: Η έκφραση των ιικών γονιδίων σε συνάρτηση με την εξέλιξη της λοίμωξης από τον ιό HPV. (Tomaic, V., *Functional Roles of E6 and E7 Oncoproteins in HPV-Induced Malignancies at Diverse Anatomical Sites.* Cancers (Basel). 8(10).) 17
Εικόνα 6: Τα ποσοστά θνησιμότητας του Καρκίνου του Τραχήλου της Μήτρας. (Hu, Z. and D. Ma, *The precision prevention and therapy of HPV-related cervical cancer: new concepts and clinical implications.* Cancer Med. 7(10): p. 5217-5236.) 23
Εικόνα 7: Τα ποσοστά θνησιμότητας του Καρκίνου του Τραχήλου της Μήτρας. (Castellsague, X., et al., *HPV Involvement in Head and Neck Cancers: Comprehensive Assessment of Biomarkers in 3680 Patients.* J Natl Cancer Inst. 108(6): p. djv403.) .. 24
Εικόνα 8: Ανατομικές περιοχές εμφάνισης (A) Καρκινωμάτων Κεφαλής – Τραχήλου και (B) Καρκινωμάτων του Στοματοφάρυγγα. (Miller, D.L., M.D. Puricelli, and M.S. Stack, *Virology and molecular pathogenesis of HPV (human papillomavirus)-associated oropharyngeal squamous cell carcinoma.* Biochem J. 443(2): p. 339-53.)..... 26
Εικόνα 9: Η σχέση του καπνίσματος με τον ιό HPV σε μοριακό επίπεδο. (Aguayo, F., et al., *High-Risk Human Papillomavirus and Tobacco Smoke Interactions in Epithelial Carcinogenesis.* Cancers (Basel). 12(8).)..... 28
Εικόνα 10: Η παρουσία του ιού HPV στις περιπτώσεις καρκίνου Κεφαλής – Τραχήλου σε διάφορες γεωγραφικές περιοχές.(Castellsague, X., et al., HPV Involvement in Head and Neck Cancers: Comprehensive Assessment of Biomarkers in 3680 Patients. J Natl Cancer Inst. 108(6): p. djv403.). 30
Εικόνα 11: Γονοτύπηση του ιού HPV. (HPV Genotypes 14 Real-TM Quant HANDBOOK.) 39
Εικόνα 12: Μία τυπική πλάκα μικροτιτλοποίησης για αντίδραση Real – Time PCR. (HPV Genotypes 14 Real-TM Quant HANDBOOK.) 40
Εικόνα 13: Η ανατομία του λάρυγγα. (https://www.bioclinic.gr/karkinos-tou-larigga/)..... 42

Κατάλογος Διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1: Οι γονότυποι του ιού των Ανθρώπινων Θηλωμάτων που εντοπίζονται σε όγκους του λάρυγγα. (Hernandez, B.Y., et al., *Human papillomavirus prevalence in invasive laryngeal cancer in the United States.* PLoS One. 9(12): p. e115931.) 32
Διάγραμμα 2: Οι Βαθμοί Κακοήθειας των Δειγμάτων 43
Διάγραμμα 3: Στάδια του Καρκίνου 44
Διάγραμμα 4: Αποτελέσματα από την εξέταση των γλωττιδικών βιοψιών για την παρουσία του ιού HPV. 44

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1: Οι διάφοροι γονότυποι του ιού των Ανθρώπινων Θηλωμάτων και οι ασθένειες με τις οποίες σχετίζονται. (Brianti, P., E. De Flammineis, and S.R. Mercuri, *Review of HPV-related diseases and cancers.* New Microbiol. 40(2): p. 80-85.)..... 20

Πίνακας 2: Η συμβολή των διάφορων γονοτύπων του ιού των Ανθρώπινω Θηλωμάτων (HPV) σε περιπτώσεις καρκίνου Κεφαλής – Τραχήλου (HNC) παγκοσμίως. (Tumban, E., *A Current Update on Human Papillomavirus-Associated Head and Neck Cancers.* Viruses. 11(10).)..... 31

Πίνακας 3: Κυτταρικά γονίδια που υπερεκφράζονται στους HPV θετικούς (+) όγκους (Miller, D.L., M.D. Puricelli, and M.S. Stack, *Virology and molecular pathogenesis of HPV (human papillomavirus)-associated oropharyngeal squamous cell carcinoma.* Biochem J. 443(2): p. 339-53.)..... 33

Πίνακας 4: Σύγκριση της αλληλουχίας των γονιδίων E6, L2, L1 και της LCR περιοχής από στελέχη HPV16. (Yamada, T., et al., *Human papillomavirus type 16 variant lineages in United States populations characterized by nucleotide sequence analysis of the E6, L2, and L1 coding segments.* J Virol, 1995. 69(12): p. 7743-53.) 35

Πίνακας 5: Η συσχέτισης του ιού των Ανθρώπινων Θηλωμάτων με την εμφάνιση καρκινωμάτων πλακωδών κυττάρων του λάρυγγα (LSCC) σε διάφορες μελέτες. (Yang, D., et al., *Effect of HPV Infection on the Occurrence and Development of Laryngeal Cancer: A Review.* J Cancer. 10(19): p. 4455-4462.)..... 48

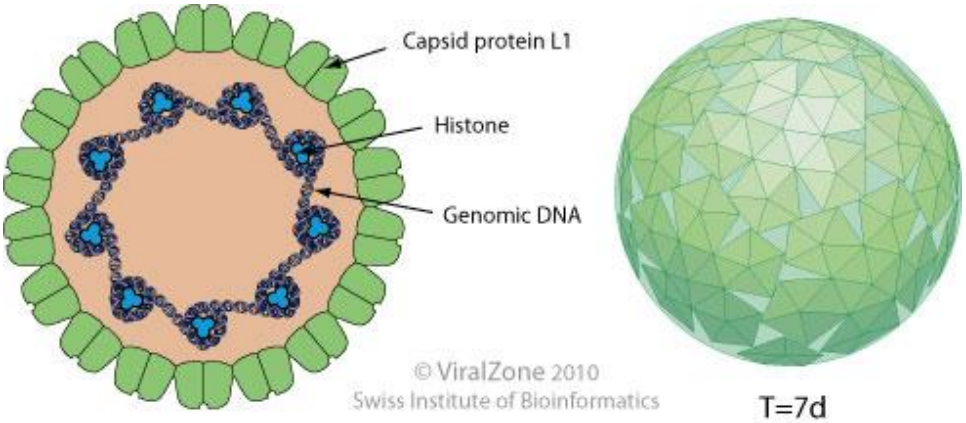
Α. Γενικό Μέρος

ΕΝΟΤΗΤΑ 1η
Ο ιός των Ανθρώπινων Θηλωμάτων

1.1 Λοιμογόνος Παράγοντας

Ο ιός των Ανθρώπινων Θηλωμάτων [Human papillomavirus (HPV)] είναι ένας μικρός σε μέγεθος ιός, της οικογένειας Papillomaviridae, με δίκλωνο, κυκλικό DNA περίπου 8.000 ζευγών βάσεων. Η οικογένεια Papillomaviridae περιλαμβάνει DNA ιούς χωρίς έλυτρο (non-enveloped), με διάμετρο περίπου 50 – 60nm.[1] Θεωρείται η παλαιότερη υπάρχουσα οικογένεια ιών και εντοπίζεται στην ύστερη Παλαιοζωική Εποχή, πριν από περίπου 330 εκατομμύρια χρόνια.[2, 3] Οι ιοί Papillomavirus παρουσιάζουν αυστηρή ειδικότητα αναφορικά με τα είδη που προσβάλλουν. Για παράδειγμα, ο ιός Canine Papilloma Virus (CPV) μεταδίδεται μεταξύ σκύλων, ενώ ο ιός HPV αφορά μόνο το ανθρώπινο είδος. Ιικά γονιδιώματα άλλων papilloma έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί σε ερπετά, πουλιά, μαρσιποφόρα και πολλά είδη θηλαστικών, γεγονός που υποστηρίζει αυτή τη μακρά εξελικτική ιστορία.[2]

Κάθε ιικό σωματίδιο αποτελείται από ένα εικοσάεδρο καψίδιο με διάμετρο ~600 Å, το οποίο περιέχει ένα μοναδικό μόριο δίκλωνου κυκλικού DNA (dsDNA, double-stranded DNA) συνδεδεμένο με ιστόνες, σε ένα νουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο που μοιάζει με χρωματίνη. Το καψίδιο αποτελείται από δύο ιικές πρωτεΐνες, L1 και L2, που συντίθενται αργά (L, late proteins) κατά τον κύκλο ζωής του ιού. [4] Αποτελείται από 72 πενταμερή (καψομερή) της πρωτεΐνης L1, σε συνδυασμό με 12 ή περισσότερα αντίγραφα της πρωτεΐνης L2. Τα κύρια πενταμερή L1 έχουν την εγγενή ιδιότητα της αυτό-συναρμολόγησης κενών καψιδίων. [5]



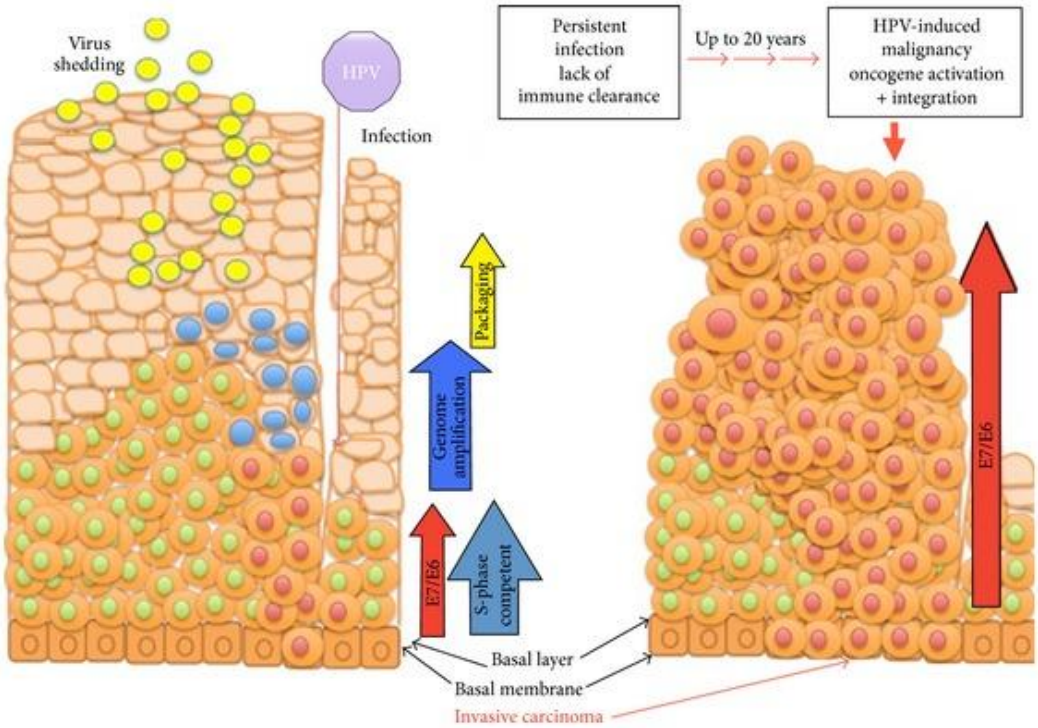
Εικόνα 1: Η δομή του ιού των Ανθρώπινων Θηλωμάτων. (**https://viralzone.expasy.org/5**)

Οι πρώτοι ιοί θηλωμάτων με τροπισμό προς το βλεννογόνο άρχισαν να εμφανίζονται πριν από περίπου 90 εκατομμύρια χρόνια. Κατά τη διάρκεια αυτής της μακράς εξελικτικής πορείας, οι ιοί των Ανθρώπινων Θηλωμάτων (HPV) έχουν εξελιχθεί σε εισβολείς των κυτταρικών και ανοσοποιητικών συστημάτων. Συγκεκριμένα, ο ιός των Ανθρώπινων Θηλωμάτων προσβάλλει κύτταρα της επιδερμίδας και επιθηλιακά κύτταρα του βλεννογόνου των γεννητικών οργάνων και της στοματικής περιοχής. [3]

Εισέρχεται στο σώμα μέσω τραυμάτων του δέρματος ή των βλεννογόνων. Ένα αυστηρά ρυθμιζόμενο πρόγραμμα διαφοροποίησης, επιτρέπει στα επιθηλιακά κύτταρα την συνεχή ανανέωσή τους και κατ' επέκταση τον πολλαπλασιασμό του ιού. Η μετάβαση των επιθηλιακών κυττάρων από τα βασικά στρώματα στις ανώτερες στιβάδες επιτρέπει την συγκρότηση και την απελευθέρωση του ιού στο υπόλοιπο σώμα.[6]

Ο ιός των Ανθρώπινων Θηλωμάτων μεταδίδεται μέσω της σεξουαλικής επαφής και θεωρείται ο αιτιολογικός παράγοντας πολλών συχνών δερματολογικών και σεξουαλικώς μεταδιδόμενων ασθενειών. Συγκεκριμένα οι λοιμώξεις των γεννητικών οργάνων που προκαλούνται από τον ιό θεωρούνται οι πιο συνήθεις σεξουαλικά μεταδιδόμενες ασθένειες στις ΗΠΑ, με επίπτωση 70 εκατομμυρίων ατόμων ετησίως. Συμπεριφορές που αφορούν την σεξουαλική δραστηριότητα καθώς και η κακή υγιεινή, αναγνωρίζονται ως οι κύριοι παράγοντες κινδύνου για τη μετάδοση του ιού. [4, 7, 8]

Μέσω της συν-εξέλιξης με το ανθρώπινο είδος έχει προσαρμοστεί με τέτοιον τρόπο ώστε οι περισσότερες λοιμώξεις είναι πλέον κοινές, σιωπηλές, μη παθογόνες και καταπολεμούνται από τους μηχανισμούς άμυνας του ξενιστή. Το ιικό γονιδίωμα μπορεί να εντοπίζεται στον οργανισμό του ξενιστή ως επίσωμα για πολλά χρόνια μετά την αρχική λοίμωξη. Σε ορισμένα άτομα, ωστόσο, το ιικό γονιδίωμα ενσωματώνεται στο DNA του ξενιστή και αυτό σηματοδοτεί σημαντικές αλλαγές για την εξέλιξη της λοίμωξης. Κατά τον σπάνιο αυτό, μη ειδικό ανασυνδυασμό, το ιικό γονιδίωμα μπορεί να ενσωματωθεί στο χρωμόσωμα του ξενιστή. [1] Ο ιός φαίνεται να απενεργοποιείται αλλά μπορεί να δώσει στο κύτταρο - ξενιστή ένα πολλαπλασιαστικό χαρακτήρα που μερικές φορές οδηγεί σε κακοήθεις όγκους. [9]



Εικόνα 2: Η πορεία της λοίμωξης από τον HPV. **(K. Nagasaka et.al., PDZ Domains and Viral Infection: Versatile Potentials of HPV-PDZ Interactions in relation to Malignancy,BioMes Research International,2013)**

Η κλινική εικόνα της λοίμωξης αφορά συχνότερα κονδυλώματα ή θηλώματα του δέρματος και του άνω αναπνευστικού συστήματος. Είναι πλέον ξεκάθαρη η σχέση του ιού με επιπλοκές στον τράχηλο της μήτρας ενώ ερευνάται έντονα η επίδραση της λοίμωξης από τον ιό των Ανθρώπινων Θηλωμάτων, στην εμφάνιση όγκων σε πολλές ανατομικές θέσεις της κεφαλής και του τραχήλου. [10]

1.2 Μηχανισμός Λοίμωξης

Η λοίμωξη από τον ιό των Ανθρώπινων Θηλωμάτων ξεκινά όταν τραύματα του δέρματος ή των βλεννογόνων επιτρέπουν στα ιικά σωμάτια να εισέλθουν στο στρώμα των βασικών, μη – διαφοροποιημένων, επιθηλιακών κυττάρων. [4]

Για την αναπαραγωγή του, ο ιός των Ανθρώπινων Θηλωμάτων εξαρτάται από τον μηχανισμό διαφοροποίησης του κυττάρου - ξενιστή καθώς ο ίδιος δεν διαθέτει δικό του μηχανισμό αντιγραφής. Τα μόνα κύτταρα ικανά να υποστούν κυτταρική διαίρεση στο πλακώδες επιθήλιο είναι βασικά κύτταρα. Κατά συνέπεια, ο ιός μολύνει επιλεκτικά τα κύτταρα στο βασικό επιθηλιακό στρώμα, όπου υπάρχουν και βλαστοκύτταρα.[4]

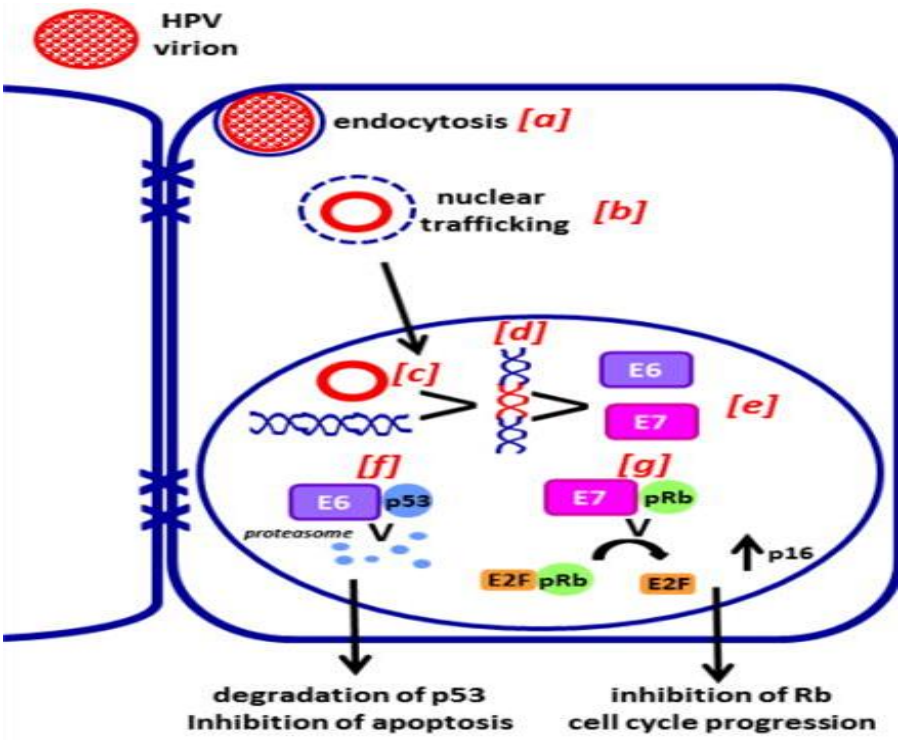
Τα ιικά σωματίδια μέσω των πρωτεϊνών L1 που βρίσκονται στο καψίδιο προσδένονται στις πρωτεογλυκάνες θειϊκής ηπαράνης [Heparan Sulfate

Proteoglycans (HSPGs)]. Αυτές χρησιμεύουν ως πρωτογενείς υποδοχείς προσκόλλησης του ιού στα βασικά κύτταρα, γεγονός που προκαλεί δομικές αλλαγές στο ιικό καψίδιο. Ακολουθεί ενδοκυττάρωση του ιού και περεταίρω επεξεργασία του καψιδίου του στο εσωτερικό του κυττάρου. [4]

Είναι πλέον γνωστό ότι για να επιτραπεί η έκφραση των ιικών γονιδίων αλλοιώνεται το πρόγραμμα διαφοροποίησης των κυττάρων του ξενιστή, μέσω της δράσης των ιικών ογκογονιδίων Ε6 και Ε7. Η κοινή δράση των δύο αυτών γονιδίων επιδρά σε πολλά μονοπάτια ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης και συγκεκριμένα στις κρίσιμες, για την κυτταρική λειτουργία, πρωτεΐνες p53/pRb. [11]

Αρχικά, το ιικό γονιδίωμα διατηρείται σε χαμηλό αριθμό αντιγράφων, περίπου 10–200 αντίγραφα ανά κύτταρο ως επίσωμα, και ως εκ τούτου, είναι σε θέση να καθιερώσει λανθάνουσες λοιμώξεις για δεκαετίες. Στην λανθάνουσα αυτή φάση, το ιικό γονιδίωμα αναπαράγεται μία φορά σε κάθε κυτταρικό κύκλο. [12]

Ο ιός παραμένει συνήθως στα κύτταρα ως επίσωμα, αλλά μπορεί επίσης να ενσωματωθεί στο γονιδίωμα του ξενιστή γεγονός που θεωρείται απαραίτητο για την ογκογόνο δράση του ιού. Η ενσωμάτωση του ιικού γονιδιώματος είναι μια στοχαστική διαδικασία που πραγματοποιείται σε εύθραυστες περιοχές του DNA του κυττάρου – ξενιστή, σε περιοχές με μικρή ομολογία, σε εξαιρετικά ενεργές μεταγραφικά περιοχές ή κοντά σε microRNAs. [13]



Εικόνα 3: Οι Ε6 και Ε7 ογκοπρωτεΐνες προάγουν τον κυτταρικό μετασχηματισμό. **(Miller, D.L., M.D. Puricelli, and M.S. Stack, *Virology and molecular pathogenesis***

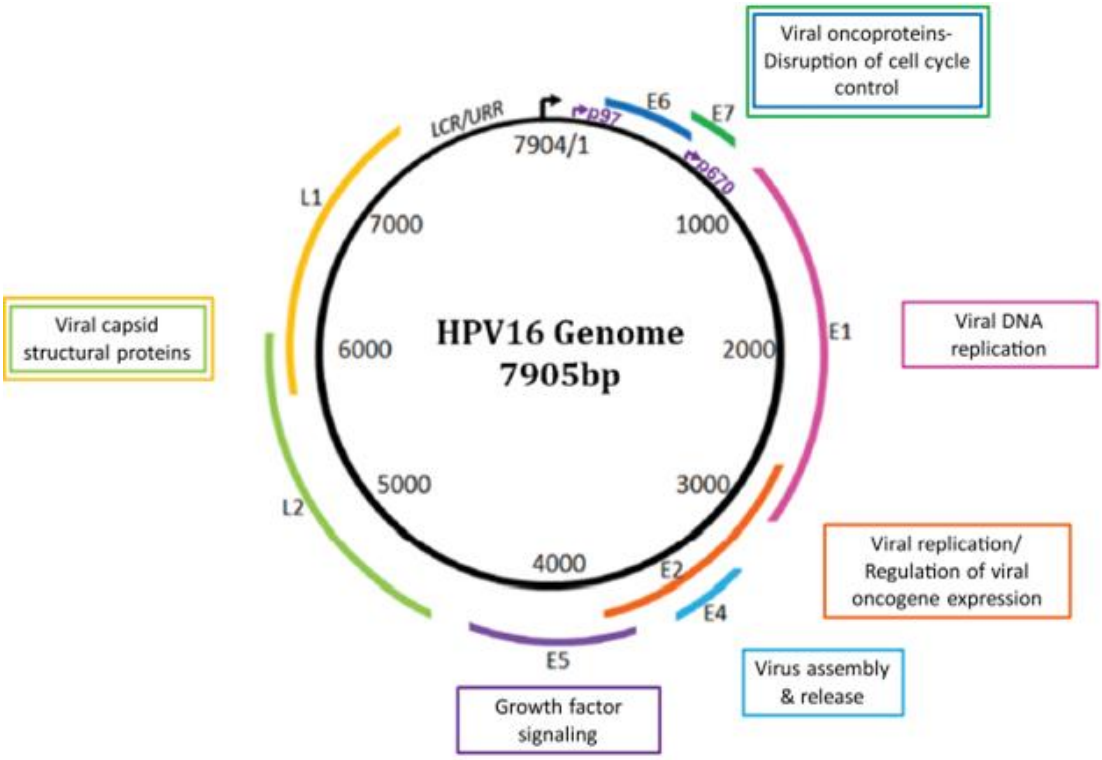
of HPV (human papillomavirus)-associated oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Biochem J. 443(2): p. 339-53.)**

Η έξοδο από τον κυτταρικό κύκλο συνδυάζεται με την έκφραση των γονιδίων L1 και L2 που επιτρέπουν το πακετάρισμα του ιικού γονιδιώματος σε νέα καψίδια. Καθώς ο ιός των Ανθρώπινων Θηλωμάτων είναι μη – λυτικός, η απελευθέρωση των νέων ιικών σωματιδίων πραγματοποιείται κατά την φυσιολογική διαφοροποίηση των μολυσμένων επιθηλιακών κυττάρων προς κερατινοκύτταρα, η οποία συνοδεύεται από μερική απώλεια του κυτταροπλάσματος. [4]

1.3 Βιολογικός Κύκλος του Ιού

Το ιικό γονιδίωμα των 8.000 ζευγών βάσεων χωρίζεται σε τρεις περιοχές και σε συνολικά οκτώ ORFs: την ρυθμιστική περιοχή Long control region (LCR), τα πρώιμα γονίδια [Early Gene Region] E6, E7, E1, E2, E4, και E5, και τα όψιμα γονίδια [Late Gene Region] L2 και L1 (LCR). Η περιοχή LCR περιέχει μια θέση έναρξης της αντιγραφής (Ori) στην οποία προσδένονται τα αντιγραφικά ένζυμα E1 και E2 κατά την έναρξη της ιικής αντιγραφής. [14]

Βάσει των λειτουργιών τους τα πρώιμα γονίδια εκφράζονται σε διαφορετικά στάδια του ιικού κύκλου ζωής. Οι πρώιμες πρωτεΐνες εμπλέκονται στη ρύθμιση της αντιγραφής και της έκφρασης του γονιδιώματος του ιού καθώς και στην προσαρμογή του κυττάρου - ξενιστή στις απαιτήσεις του ιού. Οι όψιμες πρωτεΐνες είναι δομικά συστατικά του ιικού καψιδίου. Η περιοχή LCR τοποθετείται ανοδικά της περιοχής E – πρώιμων γονιδίων, καταλαμβάνει περίπου το 15% του ιικού γονιδιώματος και περιέχει ρυθμιστικά στοιχεία που εμπλέκονται στον έλεγχο της αντιγραφής του ιού. [15]



Εικόνα 4: Χάρτης του γονιδιώματος του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV). (**Pinatti, L.M., H.M. Walline, and T.E. Carey, *Human Papillomavirus Genome Integration and Head and Neck Cancer.* J Dent Res. 97(6): p. 691-700.)**

Οι πρωτεΐνες Ε1 και Ε2 διευκολύνουν την αντιγραφή του ιικού γονιδιώματος σε χαμηλά επίπεδα πάντα σε συνεργασία με την μηχανή αντιγραφής του ξενιστή. Πιο συγκεκριμένα η Ε1 είναι μια ελικάση - ΑΤΡαση που καταλύει την μερική αποδιάταξη του DNA, ενώ η πρωτεΐνη Ε2 λειτουργεί ως μεταγραφικός παράγοντας που ρυθμίζει την έκφραση των πρώιμων γονιδίων. Ακόμα η έκφραση του γονιδίου Ε2 καταστέλλει μεταγραφικά τα γονίδια Ε6 και Ε7.[16]

Κάποια στιγμή, κατά την διάρκεια του κύκλου ζωής του ιού αρχίζει η έκφραση και των πρωτεϊνών Ε4 και Ε5. Οι πρωτεΐνες αυτές σε συνδυασμό με τις Ε1 και Ε2 συμμετέχουν στον πολλαπλασιασμό του ιικού DNA. Πιο αναλυτικά, το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF) του γονιδίου Ε4 περιέχεται εντός του ORF του γονιδίου Ε2. Χάριν του εναλλακτικού ματίσματος το κύριο προϊόν Ε1^Ε4 να μεταφράζεται σε ένα, ενιαίο mRNA. Πειραματικά αποτελέσματα προτείνουν τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης γονιδίου αυτού προϊόντος κατά την διάρκεια πολλαπλασιασμού του ιικού γονιδιώματος. [17]

Επιπλέον η πρωτεΐνη Ε4 φαίνεται να αλληλεπιδρά με τον κυτταρικό σκελετό ενώ το γονίδιο Ε5 πρόσφατα αποδείχθηκε ότι συμβάλλει στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου και στην μη προγραμματισμένη σύνθεση του DNA του ξενιστή κατά την διαφοροποίηση των κυττάρων. Έχει αναφερθεί ότι οι ογκοπρωτεΐνες Ε5 των HR-HPVs ενισχύουν την ενεργοποίηση του EGFR που μεταφέρει σήματα του

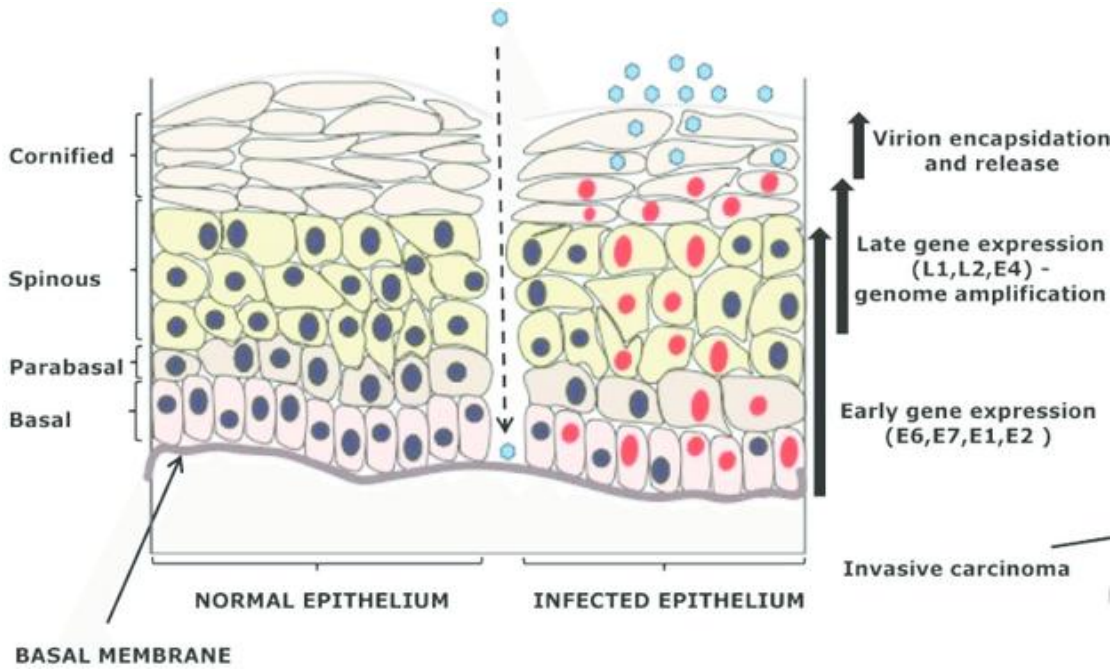
μονοπατιού MAPK / ERK και τελικά οδηγεί στην έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με πολλαπλασιασμό κυττάρων. [15, 18, 19] Τέλος, μία ακόμα λειτουργία του φαίνεται να εμπλέκεται στην αθανατοποίηση των κυττάρων – ξενιστών την ιδιότητα, δηλαδή, των καρκινικών κυττάρων να διατηρούν το μήκος των τελομερών τους, παρακάμπτοντας έτσι τη γήρανση.

Η πρωτεΐνη E6 με την σειρά της φαίνεται να παρεμβαίνει στη λειτουργία p53, εμφανίζοντας αντι-αποπτωτική δράση, ενώ η E7 προσδένεται με υψηλή συγγένεια στον παράγοντα pRb και σταματά τη δράση του στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. [15]

Μόλις πολλαπλασιασθεί το ιικό DNA, αρχίζει η έκφραση των πρωτεϊνών καψιδίου L1 και L2 και ακολουθεί η συναρμολόγηση των ιικών σωματιδίων. Οι νεοσυντιθέμενοι ιοί στη συνέχεια εγκαταλείπουν τα επιθηλιακά κύτταρα με την συμβολή της πρωτεΐνης E4 η οποία λειτουργεί δεσμεύοντας τα νήματα κερατίνης και διαταράσσοντας τη δομή τους. [15]

Η ακολουθία αυτή αφορά τις περιπτώσεις λοιμώξεων από τον ιό των Ανθρώπινων Θηλωμάτων που δεν οδηγούν σε καρκινογένεση. Στις περιπτώσεις που η μόλυνση από τον ιό οδηγεί στον σχηματισμό όγκων η έκφραση των ιικών γονιδίων είναι διαταραγμένη και ιδιαίτερη βαρύτητα δίνεται στα δύο ογκογονίδια, το E6 και το E7. [17]

Συνολικά, η πρωτεΐνη L1 είναι η μείζονα και η L2 η ελάσσονα πρωτεΐνη του ιικού καψιδίου, η E1 σχετίζεται με την αντιγραφή του ιικού γονιδιώματος σε συνεργασία με την E2, η οποία ρυθμίζει επιπλέον την έκφραση των γονιδίων E6 και E7. Η E4 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην απελευθέρωση των νεοσυντιθέμενων ιικών σωματιδίων και η πρωτεΐνη E5 ενισχύει τα κυτταρικά μονοπάτια πολλαπλασιασμού. Τέλος οι πρωτεΐνες E6 και E7 παίζουν καθοριστικό ρόλο στην ογκογόνο δράση του ιού. [20]



Εικόνα 5: Η έκφραση των ιικών γονιδίων σε συνάρτηση με την εξέλιξη της λοίμωξης από τον ιό HPV. **(Tomaic, V., *Functional Roles of E6 and E7 Oncoproteins in HPV-Induced Malignancies at Diverse Anatomical Sites.* Cancers (Basel). 8(10).)**

Αυτή η σχετικά απλή οργάνωση του κύκλου ζωής του ιού των Ανθρώπινων Θηλωμάτων καταδεικνύει πως η έκφραση των ιικών γονιδίων ρυθμίζεται στενά και συνδέεται αυστηρά με την επιθηλιακή διαφοροποίηση. [15]

1.4 Τα γονίδια E6 και E7

Η συσχέτιση του ιού των Ανθρώπινων Θηλωμάτων με την δημιουργία καρκινικών όγκων σε διάφορες ανατομικές περιοχές είναι πλέον γνωστή και σε αρκετές περιπτώσεις, καλά μελετημένη. Μοριακά, η μετάβαση από την λοίμωξη στην καρκινογένεση σχετίζεται στενά με τα δύο ιικά ογκογονίδια E6 και E7. Όταν συνεκφράζονται τα δύο αυτά γονίδια δίνουν στο κύτταρο – ξενιστή τα χαρακτηριστικά ενός έντονα πολλαπλασιαζόμενου, αθανατοποιημένου κυττάρου. [21]

Τα δύο ογκογονίδια φαίνεται πως ενεργοποιούνται μετά την ενσωμάτωση του ιικού γονιδιώματος στο γονιδίωμα του ξενιστή. Είναι σε θέση να προκαλέσουν την επαγωγή όλων των χαρακτηριστικών ενός καρκινικού κυττάρου, δηλαδή ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, αγγειογένεση, μετάσταση, απορυθμισμένη δράση του ενζύμου της τελομεράσης μαζί με την αποφυγή της απόπτωσης. Τόσο το E6 όσο και το E7 μεταγράφονται σε πολυκιστρονικά mRNAs από έναν κοινό υποκινητή που βρίσκεται στο 3 'άκρο της περιοχής LCR. [20]

Το E7 δρα κυρίως αναστέλλοντας τη δραστηριότητα των βασικών ρυθμιστών του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου. Είναι μια σχετικά μικρή φωσφοπρωτεΐνη περίπου 100 αμινοξέων, με τρεις συντηρημένες περιοχές 1/2/3 (CR1 / 2/3). Φαίνεται πως αλληλεπιδρά κυρίως με την πρωτεΐνη Rb, έναν βασικό ρυθμιστή του σημείου ελέγχου των φάσεων G1-S του κυτταρικού κύκλου. [20] Η απορύθμιση που προκαλείται, επιδρά στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου οδηγώντας στην κυτταρική απόπτωση μέσω ενεργοποίησης της πρωτεΐνης p53. [21] Στο σημείο αυτό η E6, μία μεγαλύτερη πρωτεΐνη 150-160 αμινοξέων και συνολικά 18 kDa, μεσολαβεί στην αναστολή της p53 αποφεύγοντας έτσι πολλά σημεία ελέγχου στον κυτταρικό κύκλο.[20]

Εκτός από την δράση των δύο αυτών πρωτεϊνών στα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου μέσω της επίδρασης στους δύο πολύ βασικούς ρυθμιστές pRB και p53, οι E6 και E7 διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην απορρύθμιση και άλλων κυτταρικών μονοπατιών.

Όταν προκληθεί βλάβη λόγω εξωγενών ή ενδογενών παραγόντων, τα κύτταρα επιλέγουν να πεθάνουν είτε με απόπτωση είτε μέσω αυτοφαγίας, νέκρωσης κ.λπ. Οι μηχανισμοί αυτοί είναι μέρος της φυσιολογικής προστασίας του οργανισμού από το ανοσοποιητικό σύστημα για την εξάλειψη των καρκινικών κυττάρων. Και σε αυτή την περίπτωση σημαντικό ρόλο παίζει η κυτταρική πρωτεΐνη p53. Για να αποφευχθεί η απόπτωση, η E6 εμποδίζει τη λειτουργία του p53 οδηγώντας τα κύτταρα σε μη ελεγχόμενη κυτταρική διαίρεση, αποφεύγοντας σημεία ελέγχου. Πιο συγκεκριμένα , η E6 συνδέεται με την p53 και την προσδένει στην E6 - AP, μια E3 λιγάση ουβικιτίνης, γεγονός που οδηγεί στην άμεση αποδόμηση του p53 μειώνοντας σημαντικά τον χρόνο ημιζωής του. [20, 21]

Πολλά εξωκυτταρικά σήματα, υπό φυσιολογικές συνθήκες, αλληλεπιδρούν με υποδοχείς στην επιφάνεια των κυττάρων και ενεργοποιούν διάφορα μονοπάτια που σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση ή τις μεταβολικές διαδικασίες του κυττάρου. Σε περίπτωση καρκινικού κυττάρου ωστόσο, αυτές οι οδοί σηματοδότησης απορυθμίζονται με διάφορα μέσα, τα οποία οδηγούν σε μη ελεγχόμενο πολλαπλασιασμό. Ένα τέτοιο μονοπάτι σηματοδότησης είναι αυτό των Ras/MAPK. Έχει βρεθεί ότι η E6 ενεργοποιεί το μονοπάτι MAPK και προωθεί τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό. [20]

Μετά από κάθε νέο γύρο πολλαπλασιασμού, τα τελομερή μειώνονται σε μήκος ως το σημείο της κυτταρικής γήρανσης. Ως εκ τούτου, στην περίπτωση των καρκινικών κυττάρων, πρέπει να αποτραπεί αυτή η μείωση προκειμένου να διατηρηθεί η εξέλιξη του όγκου. Η τελομεράση είναι το ένζυμο που καταλύει την προσθήκη επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών πλούσιων σε γουανίνη στα άκρα των χρωμοσωμάτων, διατηρώντας το μήκος των τελομερών. Υπερεκφράζεται στα καρκινικά κύτταρα ενώ μένει ανενεργή σε ένα φυσιολογικό, υγιές

κύτταρο.[22] Οι ογκοπρωτεΐνες E6 και E7 καταφέρνουν να επηρεάσουν την έκφραση της καταλυτικής υπομονάδας hTERT (αντίστροφη μεταγραφάση της ανθρώπινης τελομεράσης) του ενζύμου της τελομεράσης, συστατικό που συμβάλλει στην αθανατοποίηση του κυττάρου.[20]

Ακόμα μια σημαντική προϋπόθεση για την ογκογένεση είναι η στρατολόγηση της κυκλοφορίας του αίματος στα μετασχηματισμένα κύτταρα από το υπάρχον αγγειακό σύστημα, μια διαδικασία που ονομάζεται «αγγειογένεση». Τα γονίδια E6 και E7 βοηθούν τα προσβεβλημένα κύτταρα να αποκομίσουν θρεπτικά συστατικά και οξυγόνο από τους γύρω ιστούς μέσω της αγγειογένεσης, ρυθμίζοντας την έκφραση διάφορων ενζύμων. Αξιοσημείωτη είναι η αλλαγή στην έκφραση του καταστολέα p53 και της pRb από E6 και E7 αντίστοιχα, γεγονός που βρέθηκε να συνδέεται την διαδικασία της αγγειογένεσης. [20]

Τέλος, τα ογκογονίδια E6 και E7 φανίνεται πως προκαλούν επιθηλιακο-μεσεγχυματική μετάβαση (EMT), μια διαδικασία που απαιτείται για την εισβολή στην κυκλοφορία του αίματος των καρκινικών κυττάρων και στην μετάσταση. [20]

Αν και οι πρωτεΐνες E6 και E7 είναι απαραίτητες για την έναρξη και τη διατήρηση του μετασχηματισμένου φαινοτύπου, η έκφραση αυτών των δύο πρωτεϊνών δεν είναι επαρκής για να μετατρέψει πλήρως τα πρωτογενή κύτταρα σε καρκινικά. Η ανάπτυξη γενετικής αστάθειας θεωρείται το σημείο κλειδί για την καρκινογένεση. Η έκφραση των γονιδίων E6 / E7 σε φυσιολογικά κύτταρα οδηγεί σε χρωμοσωμικές βλάβες και σε τομές του κυτταρικού DNA. Επιπλέον, έκθεση σε διάφορες ορμόνες, ανεπάρκεια του υποδοχέα ρετινοειδών, χρόνια φλεγμονή, ιστορικό καπνίσματος και παρουσία τοπικών συν-μολύνσεων έχουν αναγνωριστεί ως παράγοντες κινδύνου που προάγουν την ανάπτυξη καρκίνου σε άτομα που έχουν προσβληθεί από τον ιό των Ανθρώπινων Θηλωμάτων.[21]

1.5 Ταξινόμηση Γονοτύπων

Επί του παρόντος, είναι γνωστό ότι υπάρχουν περισσότεροι από 200 διαφορετικοί τύποι του ιού των Ανθρώπινων Θηλωμάτων (HPV), οι οποίοι ταξινομούνται σε πέντε γένη (alpha, beta, gamma, mu και nu). Το γένος των Alphapapillomavirus (α-HPVs) προσβάλλει κυρίως το βλεννογόνο του στόματος και των γεννητικών οργάνων σε ανθρώπους, καθώς και άλλα πρωτεύοντα. Το γένος αυτό έχει μελετηθεί εκτενώς και μέχρι τώρα είναι το πιο καλά χαρακτηρισμένο. Οι α-HPV ταξινομούνται περαιτέρω ως χαμηλού κινδύνου (Low Risk, LR-HPV) ή υψηλού κινδύνου (High Risk, HR-HPV) βάσει της συσχέτισής τους με καρκίνους στον άνθρωπο.[1, 7] Ο παγκόσμιος οργανισμός υγείας (WHO) έχει ορίσει δώδεκα γονότυπους του ιού ως υψηλού κινδύνου οι οποίοι παρουσιάζουν ογκογόνο δυναμικό. [23, 44]

Οι τύποι LR-HPV προκαλούν καλοήθη κονδυλώματα όπως τα κονδυλώματα των γεννητικών οργάνων (AGWs), κάποια είδη δερματικών κονδυλωμάτων, και τη Υποτροπιάζουσα Αναπνευστική Θηλωμάτωση, ενώ οι ογκογόνοι τύποι υψηλού κινδύνου, HR-HPVs, σχετίζονται με τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, με καρκίνους του κόλπου, του αιδοίου και του στοματοφάρυγγα.

Συγκεκριμένα, οι HR-HPVs έχουν αναγνωριστεί ως η κύρια αιτία ανάπτυξης καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, με περισσότερες από 600.000 νέες περιπτώσεις ετησίως σε όλο τον κόσμο. Συγκεκριμένα οι γονότυποι HPV-16 και ο HPV-18 σχετίζονται με το 80% των περιπτώσεων παγκοσμίως, ενώ το υπόλοιπο 20% συνδέεται με μόλυνση από άλλους HR-HPVs (π.χ. HPV-31, HPV-33, HPV-45 και HPV-58). [1, 7]

Βάσει συγκρίσεων κλίμακας whole-genome ο γονότυπος HPV16 κατηγοριοποιείται σε τέσσερις ακόμα υποκατηγορίες: την Α, συμπεριλαμβανομένων των Α1–3 (Ευρώπη) και Α4 (Ασία) , την Β (Αφρική 1), την Γ (Αφρική 2) και την Δ, συμπεριλαμβανομένων των ΑΑ (Ασία –Αμερική) και ΝΑ (Βόρεια Αμερική). [24]

Τουλάχιστον 10 από τους ογκογόνους γονότυπους HPV (HPV16, 18, 31, 33, 45, 51, 52, 56, 58 και 59)καθώς και 6 γονότυποι χαμηλού κινδύνου (11, 32, 44, 53, 57 και 81), έχουν απομονωθεί από όγκους Κεφαλής - Τραχήλου. Ο HPV16 αντιπροσωπεύει, και σε αυτή την περίπτωση, τον συχνότερο γονότυπο με ποσοστό εμφάνισης 87%. Οι HPV18 και HPV33, είναι οι αμέσως επόμενοι, σε ποσοστά εμφάνισης, γονότυποι. [23]

Ασθένεια	**Γονότυπος HPV**
Δερματικά κονδυλώματα	1, 2, 3, 4, 27, 57
Κονδυλώματα Γεννητικών Οργάνων	6, 11, 53
Καρκίνοι σε κύτταρα βλεννογόνου	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82
Καρκίνοι Δέρματος (πλην μελανωμάτων) / Non-melanoma skin cancers (NMSCs)	1, 5, 8, 9, 17, 20, 23, 38
Νόσος του Bowen	16, 18, 31, 32, 34
Epidermodysplasia verruciformis – Tree man syndrome	5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 19-25, 36-38, 46, 47, 49, 50

Πίνακας 1: Οι διάφοροι γονότυποι του ιού των Ανθρώπινων Θηλωμάτων και οι ασθένειες με τις οποίες σχετίζονται. **(Brianti, P., E. De Flammineis, and S.R.**

Mercuri, *Review of HPV-related diseases and cancers.* New Microbiol. 40(2): p. 80-85.)

Το γένος Betapapillomavirus περιλαμβάνει περίπου 50 τύπους HPV και μπορεί να εντοπιστεί σε φυσιολογικούς και προ-καρκινικούς ιστούς, καθώς και σε καρκινικούς ιστούς του δερματικού επιθηλίου. Παρόλο που οι β-HPVs θεωρούνται κυρίως μη ογκογόνοι στο γενικό πληθυσμό, ορισμένοι τύποι β-HPV, όπως οι HPV-5 και HPV-8, μπορεί να αποτελούν πιθανό αιτιολογικό παράγοντα για την ανάπτυξη καρκίνου σε συγκεκριμένες ομάδες του πληθυσμού με ιδιαίτερες ευαισθησίες (π.χ., σε περιπτώσεις σοβαρής ανοσοανεπάρκειας και σε ασθενείς με ακροχορδονοειδή επιδερμοδυσπλασία). Διάφοροι γονότυποι β-HPV έχουν βρεθεί σε κονδυλώματα του δέρματος και σε δερματικά καρκινώματα πλακωδών κυττάρων (CSCC). Τέλος, οι τύποι β-HPVs χαρακτηρίζονται επίσης ως συν-παράγοντες, οι οποίοι, σε συνδυασμό με την υπεριώδη (UV) ακτινοβολία, πιστεύεται ότι συμβάλλουν στην ανάπτυξη καρκίνων του δέρματος μη-μελανώματα(NMSC). [1]

ΕΝΟΤΗΤΑ 2η

Ασθένειες και ιός Ανθρώπινων Θηλωμάτων

2.1 Κονδυλώματα

Τα κονδυλώματα των γεννητικών οργάνων (Condyloma acuminata), είναι μια κοινή ασθένεια, που προσβάλλει περίπου το 1% των σεξουαλικά ενεργών ενηλίκων παγκοσμίως. Περίπου 1,4 εκατομμύρια άνθρωποι στις Ηνωμένες Πολιτείες εμφανίζουν κονδυλώματα στα γεννητικά όργανα και τα ποσοστά αυξάνονται, με περισσότερες από 500.000 νέες περιπτώσεις να αναφέρονται κάθε χρόνο. Η υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης κονδυλωμάτων των γεννητικών οργάνων αφορά άτομα ηλικίας 20 έως 29 ετών. [25]

Τα κονδυλώματα των γεννητικών οργάνων θεωρήθηκαν αρχικά αφροδίσια ασθένεια. Η φύση της νόσου και η πορεία μετάδοσης δεν είχε διευκρινιστεί μέχρι τις δεκαετίες του 1950 και του 1960. Η σχέση μεταξύ των κονδυλωμάτων των γεννητικών οργάνων και μιας ιογενούς αιτίας καθιερώθηκε το 1968 όταν τα ιικά σωματίδια ταυτοποιήθηκαν σε ασθενείς. Οι γονότυποι 6 και 11 του ιού των Ανθρώπινων Θηλωμάτων δεν είναι ογκογόνοι και μπορούν να προκαλέσουν κονδυλώματα των γεννητικών οργάνων. [25]

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι περισσότερες λοιμώξεις από τον ιό HPV είναι καλοήθεις, παροδικές και θεραπεύσιμες, όπως και τα κονδυλώματα. Τα τελευταία 20 χρόνια, διάφορες μελέτες έχουν ερευνήσει τη σχέση μεταξύ των κονδυλωμάτων των γεννητικών οργάνων και διάφορων μορφών κακοηθειών.[25]

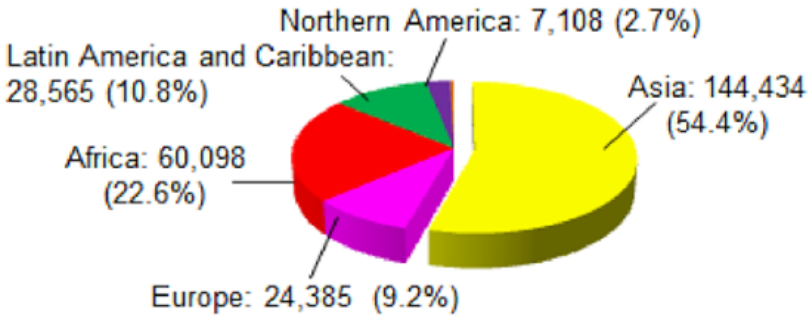
Η κλινική εικόνα των κονδυλωμάτων είναι κυρίως ομαδοποιημένες βλατίδες. Τόσο στους άντρες όσο και στις γυναίκες, κονδυλώματα μπορούν να παρουσιαστούν σε διάφορες περιοχές των γεννητικών τους οργάνων, ενώ η εμφάνισή τους στην στοματική κοιλότητα και τον φάρυγγα εξαρτώνται από σεξουαλικές πρακτικές. [8]

Πρώιμη έναρξη της σεξουαλικής δραστηριότητας, πολλαπλοί σεξουαλικοί σύντροφοι, σεξουαλικές πρακτικές υψηλού κινδύνου και κακή υγιεινή αναγνωρίζονται ως οι κύριοι παράγοντες κινδύνου για τη μετάδοση λοιμώξεων από τον ιό των Ανθρώπινων Θηλωμάτων και κατ' επέκταση και για την εμφάνιση κονδυλωμάτων. Η τακτική χρήση προφυλακτικών μπορεί να μειώσει, αλλά όχι να αποτρέψει εντελώς τις λοιμώξεις από τον ιό. Φυσικά ο εμβολιασμός έναντι του ιού αποτελεί ένα ισχυρό όπλο για την προφύλαξη και την αποτροπή εμφάνισης κονδυλωμάτων. [8]

Τα κονδυλώματα μπορεί να παραμείνουν για μεγάλο χρονικό διάστημα στο σώμα, αλλά είναι δυνατή η αυθόρμητη επούλωσή τους. Η πιο κοινή θεραπευτική προσέγγιση είναι η χρήση τοπικών παραγόντων όπως το Imiquimod, το Podophyllotoxin και το Sinecatechins. Ευρέως χρησιμοποιούμενη φαίνεται πως είναι η ηλεκτροκαυτηρίαση ακολουθούμενη από επεξεργασία με λέιζερ και κρυοθεραπεία. Συχνά προτιμάται μια συνδυασμένη προσέγγιση. [8]

2.2 Καρκίνος του Τραχήλου της Μήτρας

Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας είναι ο τρίτος πιο κοινός καρκίνος σε γυναίκες παγκοσμίως, με περίπου 500.000 νέες περιπτώσεις και 275.100 θανάτους ετησίως. Τα περιστατικά καρκίνου του τραχήλου της μήτρας κατανέμονται δυσανάλογα μεταξύ ανεπτυγμένων και λιγότερο ανεπτυγμένων χωρών. [24]



Εικόνα 6: Τα ποσοστά θνησιμότητας του Καρκίνου του Τραχήλου της Μήτρας. **(Hu, Z. and D. Ma, *The precision prevention and therapy of HPV-related cervical cancer: new concepts and clinical implications.* Cancer Med. 7(10): p. 5217-5236.)**

Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας είναι μια κακοήθης νεοπλασία που αναπτύσσεται στον τράχηλο, στο κάτω μέρος της μήτρας που τη συνδέει με τον κόλπο. Αυτή η ασθένεια ξεκινά μέσω μίας πρόδρομης επιθηλιακής βλάβης με αργή και προοδευτική εξέλιξη, γνωστή ως αυχενική ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία (CIN I, II, και III). [16]

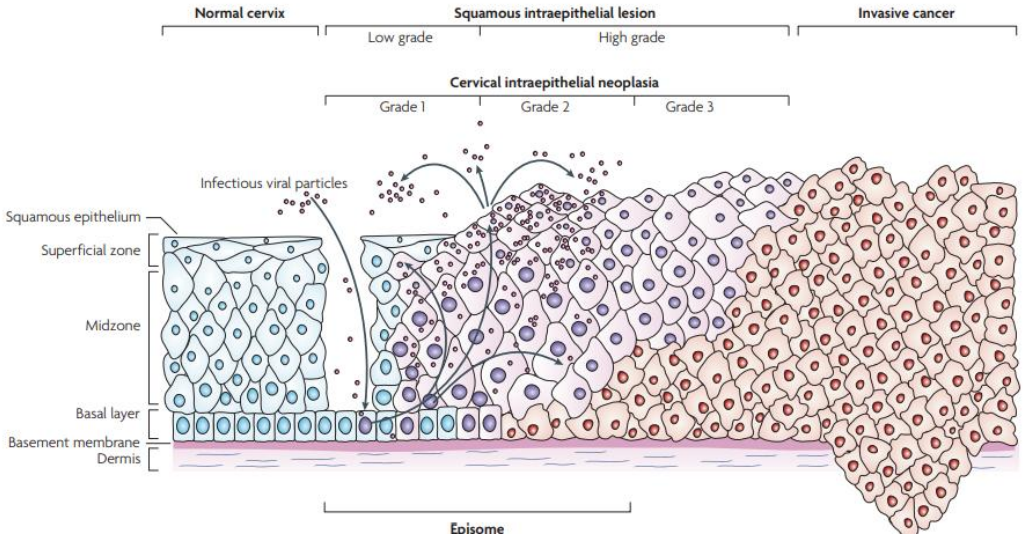
Έρευνες σχετικά με την πρόληψη και τη θεραπεία του καρκίνου εξελίσσονται ραγδαία. Ο ιός των Ανθρώπινων Θηλωμάτων (HPV) έχει αναγνωριστεί ως σημαντικός παράγοντας στην εμφάνιση του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, αν και από μόνη της η μόλυνση από τον ιό δεν μπορεί να προκαλέσει την ασθένεια. Διάφοροι παράγοντες που αφορούν την αναπαραγωγική διαδικασία, το κάπνισμα και λοίμωξη από το Chlamydia trachomatis έχουν επίσης χαρακτηριστεί ως παράγοντες κινδύνου. [26]

Όπως πολλοί άλλοι τύποι κακοηθειών έτσι και ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας είναι χρόνια και σύνθετη ασθένεια που προκαλείται από τον συνδυασμό τόσο κληρονομικών όσο και περιβαλλοντικών παραγόντων. Οι μολύνσεις από τον

ιό των Ανθρώπινων Θηλωμάτων δεν επαρκούν για την πρόκληση καρκίνου καθώς το 60% των λοιμώξεων υποχωρούν εντός 1 έτους και το 90% υποχωρεί εντός 2 ετών. [24]

Μεταξύ των γονότυπων υψηλού κινδύνου HR - HPVs, ο HPV16 αντιπροσωπεύει περισσότερες από το τις μισές περιπτώσεις του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας στον κόσμο, ενώ Ο HPV18 εμφανίζεται σε ποσοστό 16,5% .

Έχουν προταθεί διάφοροι μηχανισμοί που αφορούν την συσχέτιση του ιού των Ανθρώπινων Θηλωμάτων με τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Είναι γνωστό πως οι γονότυποι υψηλού κινδύνου, HR-HPVs, επηρεάζουν πληθώρα μονοπατιών σηματοδότησης που εμπλέκονται στην εμφάνιση και την εξέλιξη του καρκίνου. Συγκεκριμένα η αυξημένη έκφραση των ογκογονιδίων E6 και E7, η ενσωμάτωση του ιικού DNA στο γονιδίωμα των κυττάρων – ξενιστών και βλάβες του DNA των επιθηλιακών κυττάρων φαίνεται πως αποτελούν τους αιτιολογικούς παράγοντες εμφάνισης του καρκίνου. [16, 24]



Εικόνα 7: Τα ποσοστά θνησιμότητας του Καρκίνου του Τραχήλου της Μήτρας. (**Castellsague, X., et al., *HPV Involvement in Head and Neck Cancers: Comprehensive Assessment of Biomarkers in 3680 Patients.* J Natl Cancer Inst. 108(6): p. djv403.)**

Αναμφίβολα, τα υψηλής ποιότητας τεστ – Pap ευθύνονται σημαντικά για την μείωση περί του 80% της θνησιμότητας από καρκίνο του τραχήλου της μήτρας στις ανεπτυγμένες χώρες και τα μοριακά tests για τον ιό HPV αναγνωρίζονται πλέον ως ένα εργαλείο υψηλής ευαισθησίας. Το εγκεκριμένο δισθενές εμβόλιο Cervarix κατά του HR-HPV16 / 18 θεωρείται πως προφυλάσσει περίπου σε ποσοστό 70% τις γυναίκες αναφορικά με την εμφάνιση του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Τέλος, το εμβόλιο Gardasil, που αποτρέπει τη μόλυνση από τους γονότυπους HPV6 / 11 και το 9-δύναμο εμβόλιο Gardasil9 έναντι επιπλέον πέντε τύπων 31, 33, 45, 52 και 58, βρίσκονται στην πρώτη γραμμή πρόληψης. [24]

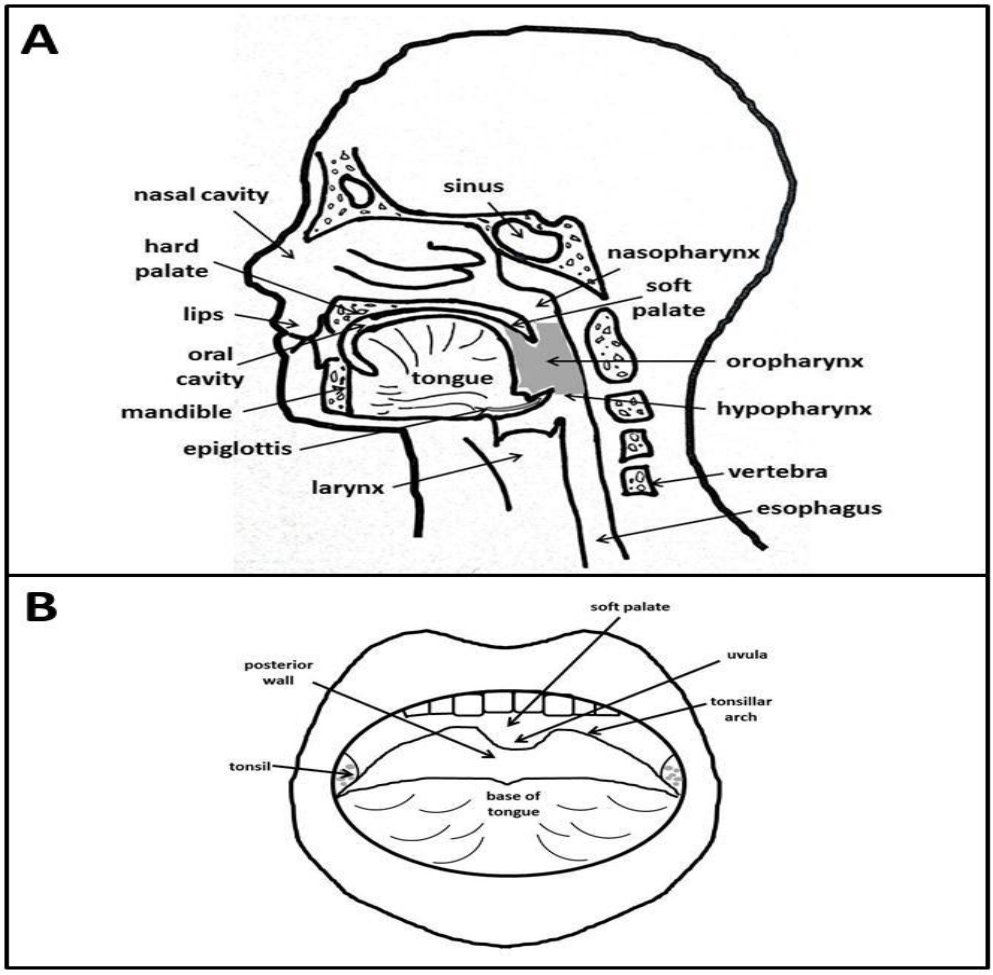
ΕΝΟΤΗΤΑ 3η

Καρκίνος Κεφαλής – Τραχήλου

3.1 Επιδημιολογία του Καρκίνου

Ο Καρκίνος Κεφαλής – Τραχήλου είναι μια ετερογενής ομάδα κακοηθειών που σχηματίζονται πάνω από τη θωρακική είσοδο και κάτω από τη βάση του κρανίου. Σύμφωνα με τον ορισμό της Αμερικανικής Επιτροπής για τον Καρκίνο (American Joint Committee on Cancer), η ογκολογία του καρκίνου Κεφαλής – Τραχήλου περιλαμβάνει κακοήθειες που προκύπτουν από βλεννογόνες επιφάνειες της στοματικής κοιλότητας, του φάρυγγα, λάρυγγα, των παραρρίνιων κόλπων και όγκους που προέρχονται από τους μείζονες και δευτερεύοντες σιελογόνους αδένες. [27]

Πιο συγκεκριμένα, στην ομάδα αυτή, με ποσοστό εμφάνισης 90%, περιλαμβάνονται: (i) καρκινώματα πλακωδών κυττάρων της στοματικής κοιλότητας (OSCC) δηλαδή όγκοι που προκύπτουν από τα χείλη, τη γλώσσα, το έδαφος του στόματος (το κάτω τοίχωμα της στοματική κοιλότητας), την στοματική κοιλότητα, κ.λπ. (ii) καρκινώματα πλακωδών κυττάρων του στοματοφάρυγγα (OPSCC), όγκοι που προκύπτουν από τη βάση της γλώσσας, τον ουρανίσκο, τις αμυγδαλές και το πίσω μέρος του λαιμού. (iii) καρκινώματα πλακωδών κυττάρων του λάρυγγα (LSCC), τα οποία προκύπτουν από την γλωττίδα, την υπεργλωττίδα και την υπογλωττίδα (iv) ρινικά καρκινώματα πλακωδών κυττάρων (NSCC), τα οποία προκύπτουν από πλακώδη επιθηλιακά κύτταρα που καλύπτουν τη ρινική κοιλότητα και τους παραρρινικούς κόλπους. Το υπόλοιπο 10% των περιπτώσεων προκύπτει από λεμφοκύτταρα, κύτταρα συνδετικού ιστού (μυών, αιμοφόρων αγγείων) και κύτταρα των σιελογόνων αδένων.[28]



Εικόνα 8: Ανατομικές περιοχές εμφάνισης (Α) Καρκινωμάτων Κεφαλής – Τραχήλου και (Β) Καρκινωμάτων του Στοματοφάρυγγα. **(Miller, D.L., M.D. Puricelli, and M.S. Stack, *Virology and molecular pathogenesis of HPV (human papillomavirus)-associated oropharyngeal squamous cell carcinoma*. Biochem J. 443(2): p. 339-53.)**

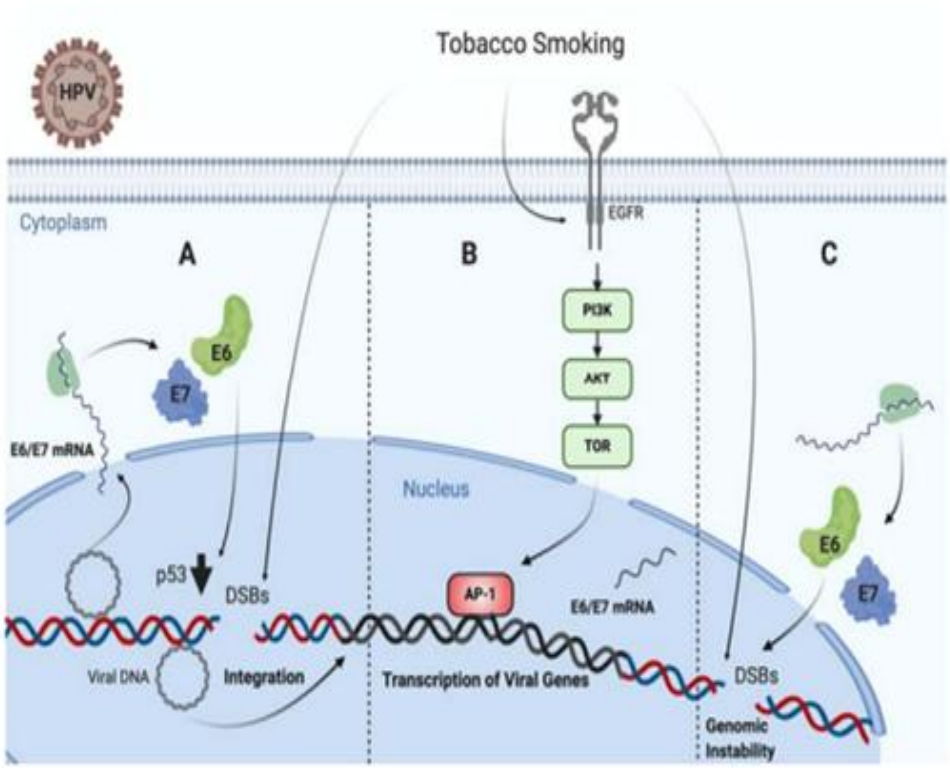
Τα καρκινώματα Κεφαλής – Τραχήλου, συλλογικά, αντιπροσωπεύουν την έκτη πιο συχνή κακοήθεια παγκοσμίως με 932.000 νέες περιπτώσεις και 379.000 καταγεγραμμένους θανάτους το 2015. Τις τελευταίες τέσσερις δεκαετίες, παρατηρήθηκαν εντυπωσιακές επιδημιολογικές τάσεις. Αν και η συνολική συχνότητα εμφάνισης του καρκίνου Κεφαλής – Τραχήλου έχει μειωθεί ελαφρώς, η σχετική συχνότητα κάθε ανατομικής θέσης έχει αλλάξει ανεξάρτητα από τις υπόλοιπες. Τα ποσοστά εμφάνισης όγκων που προέρχονται από μη στοματοφαρυγγικές θέσεις έχουν μειωθεί ενώ η συχνότητα εμφάνισης καρκινώματος πλακώδους στοματοφαρυγγικού επιθηλίου (στοματική κοιλότητα, υποφάρυγγα και λάρυγγα) αυξάνεται σταθερά. Αυτές οι επιδημιολογικές τάσεις έχουν αποδοθεί σε μεταβολές κοινωνικών παραγόντων που έχουν ως αποτέλεσμα την διαφορετική έκθεση των ασθενών σε δύο αποκλίνουσες αλλά συμπληρωματικές κατηγορίες παραγόντων κινδύνου: (1) την κατανάλωση

καπνού και αλκοόλ και (2) την λοίμωξη από τον ιό των Ανθρώπινων Θηλωμάτων. [23]
Ιδιαίτερα υψηλές συχνότητες περιστατικών καρκίνου Κεφαλής – Τραχήλου εμφανίζονται στη Νότια Ασία, τη Βραζιλία και την Κεντρική Ευρώπη. Περίπου το 50% των ασθενών αποτυγχάνουν θεραπείας και παρουσιάζουν υποτροπή παρά τις εντατικές προσπάθειες για βελτίωση. Περιστατικά καρκίνου Κεφαλής – Τραχήλου φαίνεται να είναι πιο διαδεδομένα μεταξύ ανδρών απ' ότι μεταξύ γυναικών και εμφανίζονται στο εύρος ηλικιών 60-80 ετών. Η μέση ηλικία διάγνωσης είναι 62 χρόνια για τους άνδρες και 63 χρόνια για τις γυναίκες. [29]

3.2 Παράγοντες Κινδύνου

Υπάρχουν δύο κύριες αιτίες εμφάνισης καρκίνου Κεφαλής – Τραχήλου: (1) η χρήση καπνού και αλκοόλ και (2) η λοίμωξη από τον ιό των Ανθρώπινων Θηλωμάτων. Ιστορικά, τα περισσότερα περιστατικά καρκίνου φαίνεται να έχουν προκληθεί από την υπέρογκη κατανάλωση καπνού και αλκοόλ, αλλά κατά την τελευταία δεκαετία, ο ιός των Ανθρώπινων Θηλωμάτων έχει αναγνωριστεί ως ένας εξίσου σημαντικός παράγοντας κινδύνου. [30]

Περίπου το 90% των ασθενών με καρκίνο Κεφαλής - Τραχήλου ήταν χρόνιοι καπνιστές με τη συχνότητα εμφάνισης καρκίνου στοματικής κοιλότητας να είναι αυξημένη έως πέντε φορές, στοματοφαρυγγικού και υποφαρυγγικού καρκίνου έως δέκα φορές και εξίσου αυξημένος παρουσιάζεται ο κίνδυνος σχηματισμού κακοηθών όγκων στον λάρυγγα. Οι ογκογόνες επιδράσεις του καπνού φαίνεται να είναι δοσο-εξαρτώμενες, με τον κίνδυνο εμφάνισης κακοήθειας να σχετίζεται στενά με τη συχνότητα, τη διάρκεια και την ένταση του καπνίσματος. [30]



Εικόνα 9: Η σχέση του καπνίσματος με τον ιό HPV σε μοριακό επίπεδο. **(Aguayo, F., et al., *High-Risk Human Papillomavirus and Tobacco Smoke Interactions in Epithelial Carcinogenesis.* Cancers (Basel). 12(8).)**

Η κατανάλωση αλκοόλ αυξάνει τον κίνδυνο ανάπτυξης όγκων στην ευρύτερη ανατομική περιοχή Κεφαλής – Τραχήλου με ποσοστό γύρω στο 4% των περιπτώσεις να οφείλεται αποκλειστικά σε αυτόν τον παράγοντα. Συγκεκριμένα, η χρήση αλκοόλ φαίνεται να επιδρά περισσότερο στον σχηματισμό όγκων στον υποφάρυγγα σε σύγκριση με άλλες περιοχές. Τα ποσοστά αυξάνονται κατακόρυφα στις περιπτώσεις ατόμων που συνδυάζουν το χρόνιο κάπνισμα με την κατανάλωση αλκοόλ. [30]

Στους παράγοντες κινδύνου συγκαταλέγονται επίσης η ηλικία, με τη μέση ηλικία διάγνωσης, για τις περισσότερες ανατομικές περιοχές, να είναι στα τέλη της έκτης και της έβδομης δεκαετίας ζωής, καθώς και το φύλο, με τους άντρες να έχουν διπλάσιο έως πενταπλάσιο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου Κεφαλής – Τραχήλου σε σχέση με τις γυναίκες. [30]

3.3 Ο Ιός των Ανθρώπινων Θηλωμάτων και ο Καρκίνος Κεφαλής – Τραχήλου

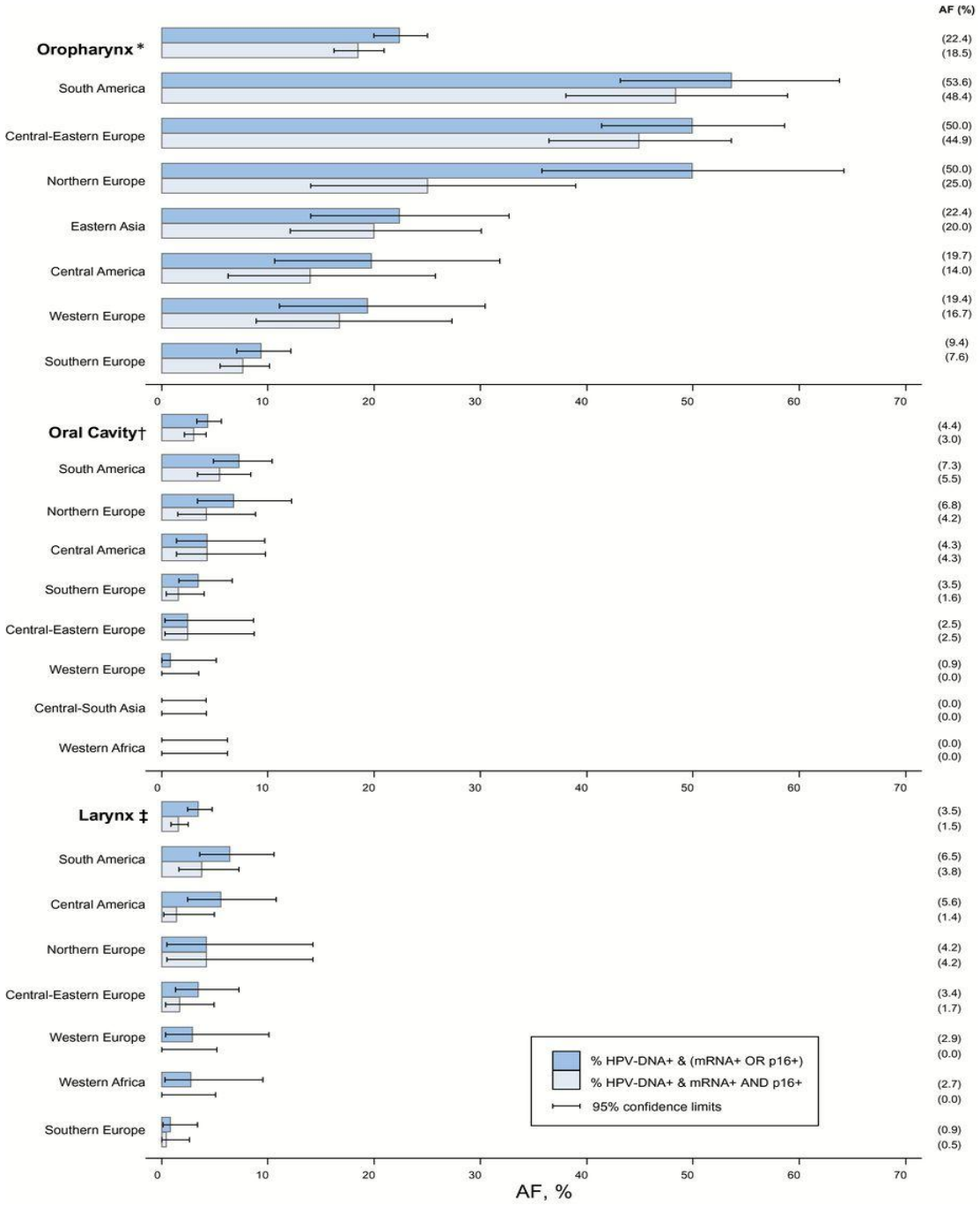
Ο ιός των Ανθρώπινων Θηλωμάτων φαίνεται να σχετίζεται με την εμφάνιση κακοηθών όγκων στην περιοχή του στοματοφάρυγγα, με τις τρέχουσες εκτιμήσεις επιπολασμού στις Ηνωμένες Πολιτείες να αγγίζουν το 80%. Ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι ο ιός ανιχνεύεται σε λιγότερους από το 20% των όγκων των υπολοίπων ανατομικών θέσεων Κεφαλής - Τραχήλου. [30] Ενώ ο συγκεκριμένος ιός φαίνεται να είναι συνυφασμένος με περιστατικά καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, το 2009 υπήρχαν περισσότερες περιπτώσεις εμφάνισης καρκίνου του στοματοφάρυγγα υπό την λοίμωξη του HPV στις Ηνωμένες Πολιτείες.[13] Η λοίμωξη από τον ιό στην περιοχή της στοματικής κοιλότητας είναι ο πιθανός πρόδρομος της εμφάνισης καρκίνου Κεφαλής –Τραχήλου. [13]

Οι συνηθέστερες περιοχές σχηματισμού όγκων στον στοματοφάρυγγα είναι οι υπερώιες και γλωσσικές αμυγδαλές. Η ποσοστιαία συνεισφορά της λοίμωξης από τον ιό των Ανθρώπινων Θηλωμάτων διαφέρει μεταξύ των ανατομικών θέσεων (δηλαδή, μεταξύ στοματικών, στοματοφαρυγγικών και λαρυγγικών περιοχών). Για παράδειγμα, οι περισσότερες περιπτώσεις αφορούν καρκινώματα πλακωδών κυττάρων του στοματοφάρυγγα (OPSCC) (33,6%), λιγότερες τα καρκινώματα πλακωδών κυττάρων της στοματικής κοιλότητας (OSCC) (22,2%) και ακόμα λιγότερες τα καρκινώματα πλακωδών κυττάρων του λάρυγγα (LSCC) (20,2%), παγκοσμίως. Δεν είναι ακόμα απολύτως σαφές γιατί ο επιπολασμός του ιού και η εμφάνιση καρκίνου διαφέρει μεταξύ των ανατομικών περιοχών. [28]

Η αιτιολογική σχέση ανάμεσα τον ιό και την εμφάνιση καρκίνου Κεφαλής – Τραχήλου δεν ποικίλλει μόνο μεταξύ ανατομικών περιοχών αλλά και μεταξύ των διάφορων γεωγραφικών περιοχών σε όλο τον κόσμο. Καρκινώματα πλακωδών κυττάρων του στοματοφάρυγγα (OPSCC) παρουσιάζονται με υψηλή συχνότητα στη Βόρεια Αμερική σε σύγκριση με την Ασία, την Ευρώπη και την Αφρική. Από την άλλη, καρκινώματα πλακωδών κυττάρων της στοματικής κοιλότητας (OSCC) είναι συχνότερα στην Ασία σε σύγκριση με την Κεντρική / Νότια Αμερική, την Ευρώπη και την Αφρική. Τα καρκινώματα πλακωδών κυττάρων του λάρυγγα (LSCC) παρατηρούνται κυρίως στην Κεντρική / Νότια Αμερική σε σύγκριση με την Ασία, την Ευρώπη και την Αφρική. Οι διαφορές αυτές μεταξύ των γεωγραφικών περιοχών αποδίδονται στις διαφορετικές κοινωνικοοικονομικές δραστηριότητες της κάθε χώρας. [28]

Στο διάγραμμα που ακολουθεί παρουσιάζεται η υπερέκφραση επιλεγμένων βιοδεικτών του ιού HPV σε περιστατικά καρκίνου Κεφαλής Τραχήλου ανά τον κόσμο. Όπως γίνεται φανερό υπάρχει μία σημαντική γεωγραφική ετερογένεια

στην παρουσία του ιού των Ανθρώπινων Θηλωμάτων η οποία γίνεται ιδιαίτερα εμφανής στις περιπτώσεις καρκίνου του στοματοφάρυγγα.



Εικόνα 10: Η παρουσία του ιού HPV στις περιπτώσεις καρκίνου Κεφαλής – Τραχήλου σε διάφορες γεωγραφικές περιοχές.**(Castellsague, X., et al., HPV Involvement in Head and Neck Cancers: Comprehensive Assessment of Biomarkers in 3680 Patients. J Natl Cancer Inst. 108(6): p. djv403.).**

Περίπου 19 γονότυποι HPV υψηλού κινδύνου (16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51–53, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73 και 82) έχουν ανιχνευθεί στις διάφορες ανατομικές περιοχές της Κεφαλής - Τραχήλου. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, οι περισσότερες λοιμώξεις από τον ιό των Ανθρώπινων Θηλωμάτων (σε ποσοστό

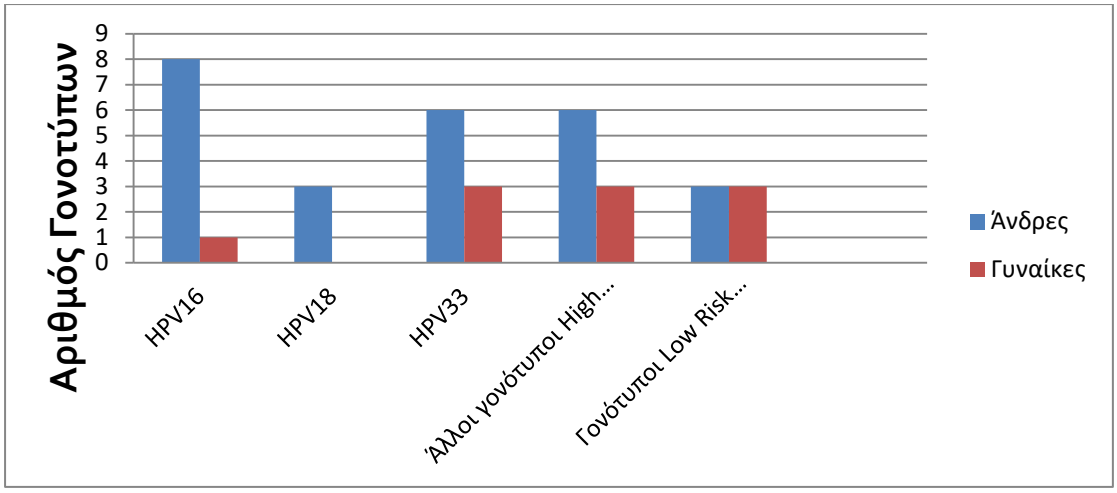
80%) αντιμετωπίζονται φυσιολογικά, από υγιή άτομα, εντός 6-20 μηνών από τη μόλυνση. Ο γονότυπος HPV16 φαίνεται πως είναι αυτός που δυσκολεύει περισσότερο το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή στην προσπάθεια εξάλειψής του και η λοίμωξη παραμένει στο σώμα έως και 20 μήνες. Στον πίνακα 2 ακολουθεί παρουσιάζονται οι διάφοροι γονότυποι του ιού HPV, σε συνάρτηση με την συμβολή τους στην εμφάνιση καρκίνων Κεφαλής – Τραχήλου. [28]

HPV Type	Worldwide Contribution to HNCs
HPV16	70.7%
HPV18	14%–17%
HPV33	4.5%
HPV35	4.5%
HPV52	2.7%
HPV45	1.5%
HPV39	1.04%
HPV58	0.6%
HPV31	0.56%
HPV53	0.3%
HPV56	0.25%

Πίνακας 2: Η συμβολή των διάφορων γονοτύπων του ιού των Ανθρώπινω Θηλωμάτων (HPV) σε περιπτώσεις καρκίνου Κεφαλής – Τραχήλου (HNC) παγκοσμίως. **(Tumban, E., *A Current Update on Human Papillomavirus-Associated Head and Neck Cancers.* Viruses. 11(10).)**

Μελέτη που διεξήχθη στο Πανεπιστήμιο του Μίσιγκαν επιβεβαίωσε τα παραπάνω, καταλήγοντας στο συμπέρασμα πως περίπου το 90% των περιπτώσεων καρκίνου του στοματοφάρυγγα σχετίζονται με τον γονότυπο HPV16 του ιού των Ανθρώπινων Θηλωμάτων και το 10% σχετίζεται με άλλους, υψηλού κινδύνου, τύπους του ιού. [13]

Στο διάγραμμα που ακολουθεί παρουσιάζεται η συνεισφορά των διάφορων γονοτύπων του ιού των Ανθρώπινων Θηλωμάτων (HPV) σε καρκίνους της περιοχής του λάρυγγα.



Διάγραμμα 1: Οι γονότυποι του ιού των Ανθρώπινων Θηλωμάτων που εντοπίζονται σε όγκους του λάρυγγα. **(Hernandez, B.Y., et al., *Human papillomavirus prevalence in invasive laryngeal cancer in the United States.* PLoS One. 9(12): p. e115931.)**

Έχει ήδη αναφερθεί πως η ογκογόνος δράση του ιού των Ανθρώπινων Θηλωμάτων έχει συνδεθεί, μοριακά, με την ενσωμάτωση του ιικού γονιδιώματος στο χρωμόσωμα του ξενιστή και την υπερέκφραση των ογκογονιδίων E6 και E7. Όπως και στην περίπτωση του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, δεν υπάρχει συντηρημένη ακολουθία νουκλεοτιδίων η οποία να σχετίζεται με την στοχευμένη ενσωμάτωση του ιού, καθώς υπάρχουν αλληλουχίες ανασυνδυασμού σε ολόκληρο το κυτταρικό γονιδίωμα. [13]

Μετά την ενσωμάτωση του ιικού γονιδιώματος ακολουθεί μία σειρά αλλαγών που προάγουν την ογκογένεση. Η υπερέκφραση των ογκοπρωτεϊνών E6 και E7, οδηγεί στον αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την γενετική αστάθεια. Μερικά βήματα προς την επίτευξη της ογκογένεσης είναι η απώλεια της λειτουργίας των ογκο–κατασταλτικών γονιδίων του κυττάρου – ξενιστή, η υπερέκφραση των κυτταρικών πρωτο-ογκογονιδίων και διάφορες χρωμοσωμικές αναδιατάξεις που οδηγούν στην απορρυθμισμένη γονιδιακή έκφραση πολλών γενετικών τόπων. [13]

Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται ορισμένα κυτταρικά γονίδια που φαίνεται να υπερεκφράζονται στους HPV θετικούς (+) όγκους:

Gene Upregulated in HPV + tumors	**Function**
CDKN2A	Cell cyle inhibitor, product of E2f transcription
PCNA	Cell cycle-dependent auxillary protein for DNA polymerase (pol) delta (also required for SV40 DNA replication in vitro).
RFC4	Accessory protein (with PCNA) for DNA pol delta and epsilon. Part of a large multisubunit protein complex of DNA damage sensors called BASC.
MCM2	Early S phase protein involved in DNA replication, likely regulated by E2F motifs.
MCM3	Involved in DNA replication, likely serves as helicase that links a histone chaperone to a histone H3–H4 bridge
*CDC7 (*cell- division cycle-7)-	Protein kinase essential for the G1/S transition and initiation of DNA replication. May regulate DNA replication by modulating MCM functions.
TYMS (thymidylate synthetase)-	Maintains the dTMP (thymidine-5-prime monophosphate) pool critical for DNA replication and repair.
CCNE2 (cyclin E2	Activates CDK2 and is involved in DNA synthesis.
USP1 (Ubiquitin-specific protease 1)-	Negatively regulates PCNA polyubiquitination, a process normally induced by DNA damaging agents.
BRG1	Involved in a switch in ATP-dependent chromatin-remodeling mechanisms that coincide with the final mitotic division. Note that this essential transition is mediated by repression of BAF53a by miR-9* and miR-124.

Πίνακας 3: Κυτταρικά γονίδια που υπερεκφράζονται στους HPV θετικούς (+) όγκους. **(Miller, D.L., M.D. Puricelli, and M.S. Stack, *Virology and molecular pathogenesis of HPV (human papillomavirus)-associated oropharyngeal squamous cell carcinoma.* Biochem J. 443(2): p. 339-53.)**

3.4 Πρόληψη

Αναφορικά με την πρόληψη έναντι του καρκίνου Κεφαλής – Τραχήλου υπάρχουν επί του παρόντος τρία εγκεκριμένα εμβόλια που ήδη αναφέρθηκαν, τα Cervarix, Gardasil-4 και Gardasil-9. Το Cervarix είναι δισθενές εμβόλιο που προστατεύει κυρίως από τους γονότυπους υψηλού κινδύνου HPV16 και HPV18, ενώ το Gardasil-4 είναι ένα τετρασθενές εμβόλιο έναντι αυτών των δύο γονοτύπων (16 και 18) καθώς και των HPV6 και HPV11. Το Gardasil-9 είναι ένα πρόσφατα εγκεκριμένο εμβόλιο που παρέχει προστασία έναντι στις λοιμώξεις που προκαλούνται από τους γονότυπους HPV16, HPV18, HPV6, HPV11 του ιού των Ανθρώπινων Θηλωμάτων καθώς και από τους γονότυπους HPV31, 33, 45, 52 και 58. Το Cervarix έχει εγκριθεί για γυναίκες ηλικίας μεταξύ 9 και 25 ετών, ενώ το Gardasil4 και το Gardasil-9 έχουν εγκριθεί για άνδρες και γυναίκες μεταξύ 9 και 26 ετών. [28]

Πρέπει να τονιστεί η διαφορετική προσέγγιση στην λήψη προληπτικών μέτρων ανάλογα με τον γονότυπο του ιού που προκαλεί την λοίμωξη καθώς και την ανατομική περιοχή στην ευρύτερη ομάδα της Κεφαλής – Τραχήλου στην οποία εντοπίζεται.

3.5 Διάγνωση

Η έγκαιρη διάγνωση της λοίμωξης από τον ιό των Ανθρώπινων Θηλωμάτων βασίζεται στην μοριακή ανίχνευση του ιικού DNA. Αρκετά σημαντική έχει αποδειχθεί η εξέταση του γονότυπου του ιού καθώς παίζει καθοριστικό ρόλο στην εξέλιξη της νόσου και η ανάλυση μεταλλάξεων μέσω αλληλούχισης του γονιδιώματος όπως για παράδειγμα η μελέτη πολυμορφισμών SNPs (Single Nucleotide Polymorphism). [29]

Πιο συγκεκριμένα, ορισμένες μεταλλάξεις του γονότυπου υψηλού κινδύνου HPV16 έχει αποδειχθεί πως σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνιση κακοήθειας. Για παράδειγμα η αντικατάσταση *T350G* στο γονίδιο E6 οδηγεί σε αλλαγή του αμινοξικού καταλοίπου (L83V) της ογκοπρωτεΐνης και έχει συσχετιστεί με την επιμονή της λοίμωξης του συγκεκριμένου γονότυπου που συχνά φέρεται να οδηγεί στην εμφάνιση όγκου, όχι όμως πάντα.[31]

Στον πίνακα που ακολουθεί γίνεται μία σύγκριση των πολυμορφισμών της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των γονιδίων E6, L2, L1 και της LCR περιοχής από στελέχη HPV16.

Region	No. of bases sequenced	Variable positions[a]		Mutations[b]		Maximum pairwise distance[c]		Maximum pairwise pS[d] (%)	Maximum pairwise pN[e] (%)
		n	%	*n*	%	*n*	%		
E6	456	15	3.3	21	4.6	6	1.3	3.3	0.82
L2	1,386	64	4.6	79	5.7	33	2.4	5.8	1.2
L1	1,484	32	2.2	36	2.4	18	1.2	3.0	0.69
LCR	364	18	4.9	21	5.8	9	2.5		
Aggregate[f]	3,690	129	3.2	157	4.2	66	1.8	4.3[g]	0.94[g]

Πίνακας 4: Σύγκριση της αλληλουχίας των γονιδίων E6, L2, L1 και της LCR περιοχής από στελέχη HPV16. **(Yamada, T., et al., *Human papillomavirus type 16 variant lineages in United States populations characterized by nucleotide sequence analysis of the E6, L2, and L1 coding segments.* J Virol, 1995. 69(12): p. 7743-53.)**

Συγκρίνοντας τα ποσοστά πολυμορφισμών των τεσσάρων αυτών γενετικών τόπων, το γονίδιο L2 φαίνεται να είναι αυτό που ποικίλλει περισσότερο από τις άλλες κωδικοποιούσες περιοχές (εξαιρείται η περιοχή LCR) καθώς επίσης το γονίδιο L1 μοιάζει να φέρει την πιο συντηρημένη αλληλουχία. [32]

Τα συμπεράσματα αυτά, καθώς και η έλλειψη βιβλιογραφίας αναφορικά με την παρουσία πολυμορφιμών στα υπόλοιπα ιικά γονίδια, όπως το E7, καθιστά την μελέτη των SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) μία ενδιαφέρουσα διαγνωστική, και όχι μόνο, προσέγγιση.

Πέρα από τη συμβατική PCR που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση του ιικού DNA συχνά χρησιμοποιούνται ως διαγνωστικές μέθοδοι: η RT-PCR για την ανίχνευση των mRNA των γονιδίων E6 και E7, η ανίχνευση της p16 με ανοσοϊστοχημεία, η in situ υβριδοποίηση DNA (DNA ISH) και RNA (RNA ISH). [33]

Τέλος, από την σκοπιά της πρωτεομικής, μια πολλά υποσχόμενη προσέγγιση για τον προσδιορισμό βιοδεικτών είναι η μελέτη των κυτταρικών πρωτεϊνών. Στα καρκινώματα των πλακωδών κυττάρων Κεφαλής - Τραχήλου, έχουν μελετηθεί αρκετοί πρωτεϊνικοί δείκτες όπως οι NFκB - p50, IκB και η κινάση C1 (RACK1). [29]

3.6 Θεραπεία

Η αφαίρεση των μη φυσιολογικών ιστών με χειρουργική επέμβαση είναι, επί του παρόντος, η συνιστώμενη θεραπευτική προσέγγιση για τις κακοήθειες Κεφαλής – Τραχήλου. Οι μέθοδοι χημειοθεραπείας και ακτινοθεραπείας σε συνδυασμό με τον έγκαιρο εμβολιασμό επηρεάζουν τη ρυθμιστική δραστηριότητα του ανοσοποιητικού συστήματος του ασθενή, αυξάνοντας την αποτελεσματικότητα της ανοσίας έναντι της λοίμωξης από τον ιό HPV. Επιπροσθέτως, η ανοσοθεραπεία έχει αναδειχθεί ως συμπληρωματική μέθοδος αντιμετώπισης δυσάρεστων επιπλοκών σε συνδυασμό τις θεραπείες που αναφέρθηκαν παραπάνω. [34]

Ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα αποτελέσματα μίας μελέτης σχετικά με το θεραπευτικό δυναμικό της κουρκουμίνης, ουσίας που παράγεται από τα φυτά του είδους *Curcuma longa*. Σε καρκινικά κύτταρα μολυσμένα από γονότυπο υψηλού κινδύνου του ιού HPV, η κουρκουμίνη φαίνεται να μειώνει την έκφραση των κυτταρικών μεταγραφικών παραγόντων AP-1 και NFκB και να παρεμποδίζει, επιλεκτικά, την καταστροφική αποικοδόμηση του p53 από την ογκοπρωτεϊνη E6. [35]

Για την εξάλειψη κακοηθειών σε πρώιμο στάδιο η φωτοδυναμική θεραπεία (Photodynamic Therapy - PDT) είναι μια επιλογή που έχει ήδη εγκριθεί από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA). Τέλος, Το cis-ρετινοϊκό οξύ χρησιμοποιείται ως συμπληρωματική θεραπεία έναντι των βλαβών που προκαλούνται από τον ιό των Ανθρώπινων Θηλωμάτων στην περιοχή του λάρυγγα. [34]

Β. Ειδικό Μέρος

ΕΝΟΤΗΤΑ 4η

Υλικά – Μέθοδοι

- 1.5mL tubes για φυγοκέντρηση τύπου Eppendorf
- 0.2 mL PCR tubes
- Σύστημα ηλεκτροφόρησης για τζελ αγαρόζης (gel tank with power supply)
- Freezers (-80°C, -20°C)
- Πιπέτες (P1000, P200, P20, and P10) και tips με φίλτρα
- Θερμικός Κυκλοποιητής 3720 Thermal Cycler (Applied Biosystems)
- Κυκλοποιητής Real Time
- Λάμπες UV
- Vortex
- Φυγόκεντρος (bench-top, capable of spinning 1.5 mL centrifuge tubes)
- Φωτόμετρο NanoDrop 1000 Spectrophotometer

4.1 Απομόνωση Γενετικού υλικού (DNA Extraction) από Ιστικές Τομές

Για την απομόνωση γενετικού υλικού από ιστικές τομές στην ανατομική περιοχή Κεφαλής – Τραχήλου, χρησιμοποιήθηκε το εμπορικά διαθέσιμο kit QIAamp® DNA FFPE Tissue από την εταιρία Qiagen.

Αντιδραστήρια:

1. RNάση A (17,500 U) 2.5 mL (100 mg/ mL; 7000 units/ mL)
2. Ρυθμιστικό Διάλυμα ATL (200 mL) 200 mL
3. Ρυθμιστικό Διάλυμα AL (216 mL) 216 mL
4. Ρυθμιστικό Διάλυμα AW1 242 mL
5. Ρυθμιστικό Διάλυμα AW2 324 mL
6. Tubes Συλλογής (2 mL)

Τα βήματα του πρωτοκόλλου που χρησιμοποιήθηκε είναι τα ακόλουθα:

1. Ρύθμιση του επωαστήρα στους 56°C.
2. Προσθήκη 300 μL διαλύματος Diparafinization (Qiagen Lot.166018008) σε κάθε δείγμα. Έντονο vortex για 10s. Spin down για 2s.
3. Επώαση στους 56°C για 3min και αναμονή 2 min σε θερμοκρασία δωματίου για να μειωθεί η θερμοκρασία. Spin down για 2s

4. Προσθήκη 180 μL Ρυθμιστικού Διαλύματος ATL and έντονο vortex για 10s.
5. Φυγοκέντρηση στα 10.000g για 1min σε θερμοκρασία δωματίου.
6. Προσθήκη 20 μL πρωτεϊνάσης K στο κάτω μέρος του1.5 microcentrifuge tube
7. Επώαση στους 56°C για 1 ώρα (ή επώαση overnight)
8. Επώαση στους 90°C για 1 ώρα.
9. Μεταφορά του δείγματος, εκτός της μπλε ζώνης, σε νέο 1.5 microcentrifuge tubes.
10. Προσθήκη 200 μL Ρυθμιστικού Διαλύματος AL και 200 μL αιθανόλης. Έντονο vortex και στην συνέχεια spin down.
11. Προσθήκη ολόκληρης της ποσότητας του δείγματος σε στήλη που παρέχεται με το kit.
12. Φυγοκέντρηση στα 8.000g για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου.
13. Προσθήκη 500 μL Ρυθμιστικού Διαλύματος AW1 και φυγοκέντρηση στα 8.000g για 1 min θερμοκρασία δωματίου.
14. Προσθήκη 500 μL Ρυθμιστικού Διαλύματος AW2 και φυγοκέντρηση στα 8.000g για 1 min θερμοκρασία δωματίου.
15. Απομάκρυνση του flow – through.
16. Φυγοκέντρηση με μέγιστη ταχύτητα (12.300g) για 3 min θερμοκρασία δωματίου.
17. Προσθήκη 70 μL Ρυθμιστικού Διαλύματος ATE στην μέση του φίλτρου. Αναμονή ενός λεπτού.
18. Φυγοκέντρηση με μέγιστη ταχύτητα (12.300g) για 1 min θερμοκρασία δωματίου.

19. Στο διερχόμενο διάλυμα βρίσκεται το DNA.

Αποθήκευση στους -20˚C ή στους - 80˚C για μακροπρόθεσμη χρήση.

4.2 Φωτομέτρηση

Η φωτομέτρηση πραγματοποιήθηκε με σκοπό την μερική ποσοτικοποίηση του απομονωμένου γενετικού υλικού (extracted DNA) και την εκτίμηση της καθαρότητάς του, στο φωτόμετρο NanoDrop 1000 Spectrophotometer.

2,5 μL από κάθε δείγμα αραιώθηκαν σε DNase - RNase free νερό πριν την μέτρηση σε λόγο ½ και τελικό όγκο 5μL.

4.3 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου (Real Time PCR)

Η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου (Real Time PCR) πραγματοποιήθηκε με σκοπό την ανίχνευση των θετικών, για τον ιό, δειγμάτων σε συνδυασμό με την ταυτόχρονη γονοτύπησή τους. Χρησιμοποιήθηκε το εμπορικά διαθέσιμο kit HPV Genotypes 14 Real-TM Quant, Real Time PCR Kit for quantitative detection and genotyping of Human Papillomavirus (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 and 68) από την εταιρία Sacace.

Οι δεκατέσσερις γονότυποι που εξετάζονται στο συγκεκριμένο kit κατηγοριοποιούνται σε τέσσερις ομάδες. Η πρώτη ομάδα αφορά την εξέταση των γονοτύπων 16-18-31 μαζί με τον Θετικό Μάρτυρα (IC), το ανθρώπινο γονίδιο της β-γλοβίνης, η δεύτερη ομάδα τους γονότυπους 39-45-59 και πάλι μαζί με το ανθρώπινο γονίδιο της β-γλοβίνης, η τρίτη ομάδα τους γονότυπους 33-35-56-68 και η τελευταία τους 51-52-58-66. Ο κυκλοποιητής αποτελείται από τέσσερα κανάλια, το κανάλι FAM/Green, το κανάλι JOE/Yellow/HEX, το ROX/Orange και το Cy5/Red.

Τα αποτελέσματα της γονοτύπησης βασίζονται στο κανάλι που δίνει σήμα. Το κανάλι FAM/Green δίνει σήμα στην περίπτωση που το δείγμα αντιστοιχεί σε έναν από τους 16, 39, 33, 58 HPV γονότυπους. Αντίστοιχα, το σήμα στο κανάλι JOE/Yellow/HEX θα αντιστοιχεί σε δείγμα με έναν από τους γονότυπους 31, 45, 35, 52 HPV. Το ROX/Orange αφορά τους γονότυπους 18, 59, 68, 66 ενώ, το κανάλι Cy5/Red τους δύο θετικούς μάρτυρες και τους γονότυπους 56 και 51.

Στην εικόνα που ακολουθεί παρουσιάζονται σχηματικά τα όσα αναφέρθηκαν:

FAM	JOE	ROX	Cy5
16	31	18	IC
39	45	59	IC
33	35	68	56
58	52	66	51

Εικόνα 11: Γονοτύπηση του ιού HPV. (HPV Genotypes 14 Real-TM Quant HANDBOOK.)

Αντιδραστήρια:

• PCR-mix-1 "16-18-31-IC", 4 x 0,3 mL

• PCR-mix-1 "39-45-59-IC", 4 x 0,3 mL

• PCR-mix-1 "33-35-56-68", 4 x 0,3 mL

• PCR-mix-1 "51-52-58-66", 4 x 0,3 mL

• PCR- buffer-FRT, 4 x 0,6 mL

• Hot Start DNA Polymerase, 4 x 0,06 mL

• Αρνητικός Μάρτυρας, 1,2 mL

Δείγματα Αναφοράς:

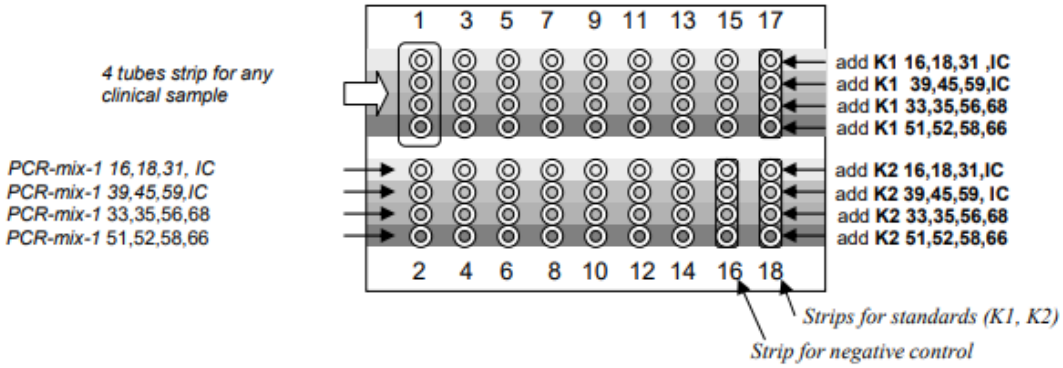
❖ K2 "16-18-31-IC", 0,2 mL (mix HPV DNA C+ 16, 18, 31 και ανθρώπινο DNA) – 1.000 GE/ mL

❖ K2 "39-45-59-IC", 0,2 mL (mix HPV DNA C+ 39, 45, 59 και ανθρώπινο DNA) – 1.000 GE/ mL

❖ K2 "33-35-56-68", 0,2 mL (mix HPV DNA C+ 33, 35, 56, 68) - 1.000 GE/ mL

❖ K2 "51-52-58-66", 0,2 mL (mix HPV DNA C+ 51, 52, 58, 66) – 1.000 GE/ mL

Στην εικόνα που ακολουθεί αναπαριστάται σχηματικά μία τυπική πλάκα μικροτιτλοποίησης για Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου.



Εικόνα 12: Μία τυπική πλάκα μικροτιτλοποίησης για αντίδραση Real – Time PCR. **(HPV Genotypes 14 Real-TM Quant HANDBOOK.)**

Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε είναι το εξής:

1. Προετοιμασία του Μίγματος Αντίδρασης (Reaction Mix) για 132 αντιδράσεις: προσθήκη στο διάλυμα του αντιδραστηρίου PCR-buffer-FRT, 60 μL από την Hot Start DNA Πολυμεράση.
2. Ετοιμασία ενός Eppendorf για κάθε αντιδραστήριο PCR-mix-1, στο σύνολο τέσσερα, για την παρασκευή των Τελικών Μιγμάτων.
3. Προσθήκη στα Eppendprf ενός από τέσσερα αντιδραστήρια PCR-mix-1 σε ποσότητα 10*N+3 μL, όπου N ο αριθμός δειγμάτων προς εξέταση, και 5*N+3 (+2 για ποιοτική ανάλυση) μL από το Μίγμα Αντίδρασης (Reaction Mix - PCR-buffer-FRT μαζί με την Hot Start DNA Πολυμεράση). Τα τέσσερα αυτά αντιδραστήρια είναι τα Τελικά Μίγματα, το καθένα από τα οποία περιέχει ένα διαφορετικό PCR-mix-1.
4. Προσθήκη στην πρώτη σειρά αντιδράσεων της πλάκας μικροτιτλοποίησης, 15 μl από το Τελικό Μίγμα "16, 18, 31, IC", στην δεύτερη σειρά 15 μl από το Τελικό Μίγμα "39, 45, 59, IC", στην τρίτη σειρά 15 μl από το Τελικό Μίγμα "33, 35, 56, 68", στην τέταρτη σειρά 15 μl από το Τελικό Μίγμα "51, 52, 58, 66".
5. Προσθήκη 10 μL DNA από κάθε δείγμα στα σωστά Eppendorf.
6. Για κάθε κανάλι (στο σύνολο τέσσερα) προετοιμάζονται οι μάρτυρες και τα δείγματα αναφοράς:
• Προσθήκη 10 μL του αρνητικού μάρτυρα στα δείγματα της λωρίδας (strip) N°16.

• Προσθήκη 10 μL από κάθε δείγμα αναφοράς K2 στα δείγματα της λωρίδας (strip) N°18.

Συνολικά τοποθετούμε 4 Eppendorf για κάθε δείγμα που εξετάζεται, 4 για το δείγμα αναφοράς K2 και 4 για τον αρνητικό μάρτυρα.

Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε στον κυκλοποιητή είναι το εξής:

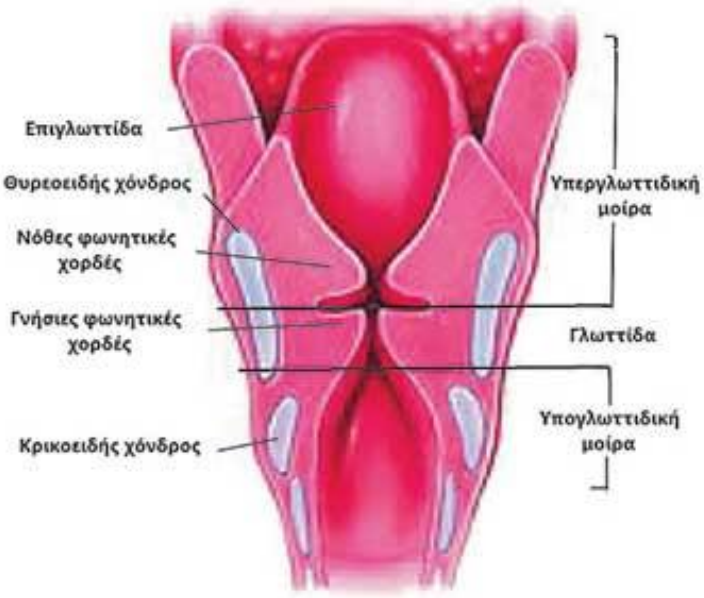
Βήματα	**Θερμοκρασία, °C**	**Χρόνος**	**Επαναλήψεις**
1	**95**	15 min	1
2	**95**	5 s	5
	60	20 s	
	72	15 s	
3	**95**	5 s	40
	60	20 s (Ανίχνευση φθορισμού *)	
	72	15 s	

*Ανίχνευση του φθορισμού από τα κανάλια Fam (Green), Joe (Yellow)/Hex, Rox (Orange) and Cy5 (Red).

ΕΝΟΤΗΤΑ 5η

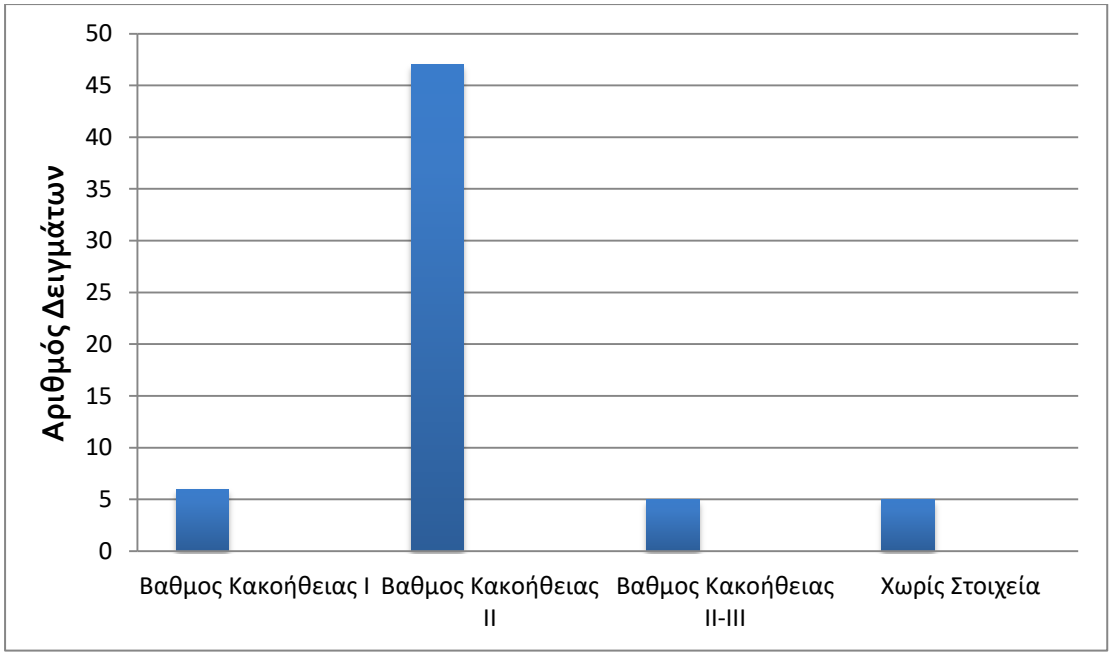
Αποτελέσματα

Η απομόνωση γενετικού υλικού πραγματοποιήθηκε σε συνολικά 63 δείγματα από ιστικές τομές βιοψιών. Οι περιοχές από τις οποίες αντλήθηκαν τα δείγματα υπάγονται στην ευρύτερη ανατομική περιοχή Κεφαλής – Τραχήλου. Οι βιοψίες είναι στην πλειοψηφία τους γλωττιδικές, ενώ υπάρχουν δεκατρείς υπεργλωττιδικές και άλλες τόσες διαγλωττιδικές. Όλες ανήκουν στην ανατομική περιοχή του λάρυγγα. Τα προφίλ των ασθενών καθώς και ο βαθμός κακοήθειας, ποικίλουν.



Εικόνα 13: Η ανατομία του λάρυγγα. **(https://www.bioclinic.gr/karkinos-toularigga/)**

Στο διάγραμμα που ακολουθεί παρουσιάζονται οι βαθμοί Κακοήθειας των συνολικά εξηντατριών δειγμάτων, ταξινομημένοι από τον Βαθμό κακοήθειας I (αργός ρυθμός πολλαπλασιασμού των κυττάρων) έως τον Βαθμό III (πολύ γρήγορος ρυθμός πολλαπλασιασμού των κυττάρων).

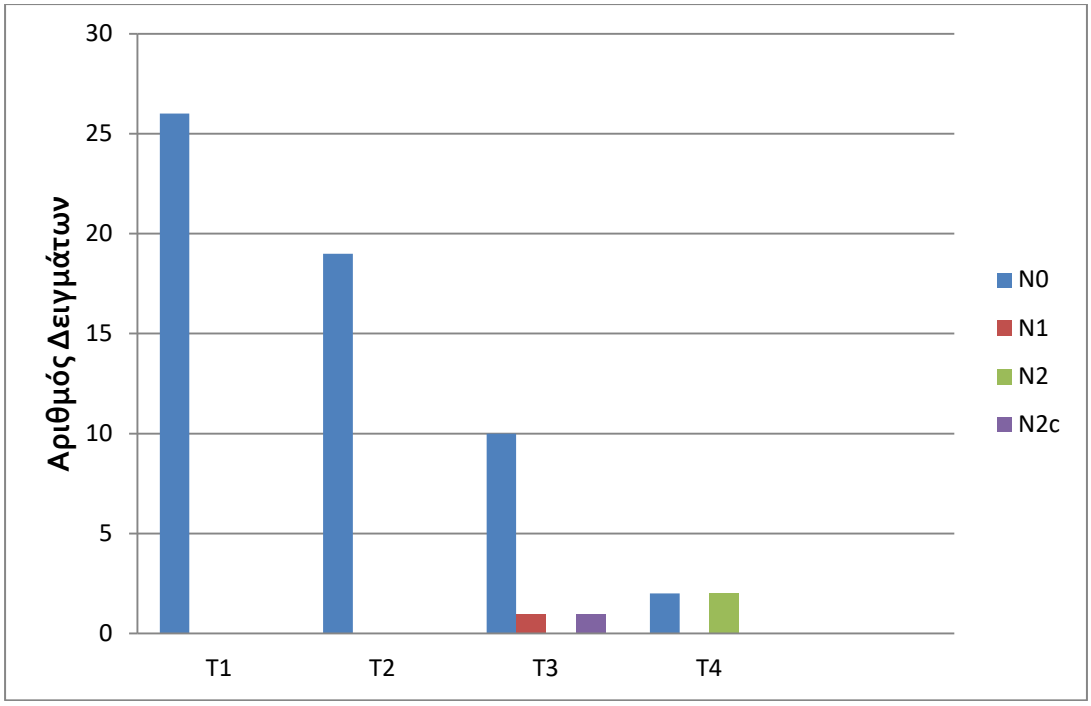


Διάγραμμα 2: Οι Βαθμοί Κακοήθειας των Δειγμάτων

Στην συνέχεια, στο διάγραμμα 3 παρουσιάζονται, για τα δείγματα που εξετάστηκαν, τα στάδια του καρκίνου βάσει του συστήματος TNM, όπου:

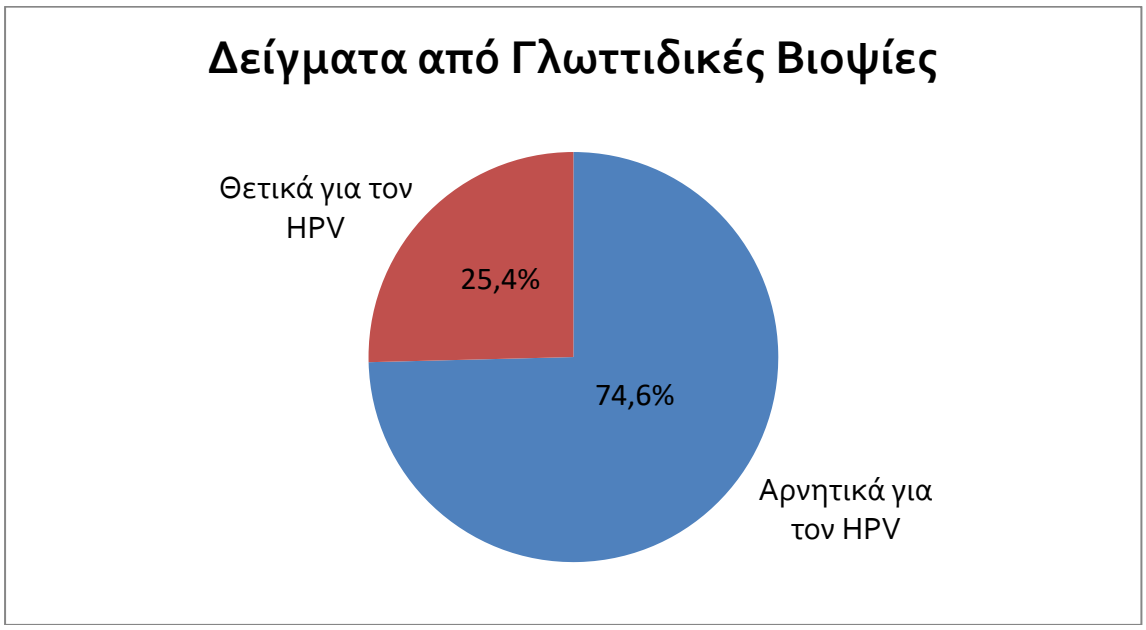
T: (primary tumor) – Πρωτοπαθής όγκος
N:(regional lymph nodes) – Ενδείξεις προσβολής επιχώριων λεμφαδένων
M: (distant metastasis) – Ενδείξεις απομακρυσμένων μεταστάσεων

Οι αριθμητικοί δείκτες αποτυπώνουν την αύξηση του μεγέθους του όγκου (T1,T2,T3,T4), την αύξηση της συμμετοχής των επιχώριων λεμφαδένων (N1,N2,N3) και την παρουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων (M1). Στην συγκεκριμένη περίπτωση όλα τα δείγματα είναι M0.



Διάγραμμα 3: Στάδια του Καρκίνου

Μετά την εκπόνηση της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου (Real Time PCR) εντοπίστηκαν συνολικά 16 θετικά δείγματα για τον ιό των Ανθρώπινων Θηλωμάτων (16/63; 25,4%) και όλα έφεραν τον γονότυπο HPV 16 (16/16; 100%). Τα αποτελέσματα αυτά παρουσιάζονται και σχηματικά στο διάγραμμα που ακολουθεί.



Διάγραμμα 4: Αποτελέσματα από την εξέταση των γλωττιδικών βιοψιών για την παρουσία του ιού HPV.

ΕΝΟΤΗΤΑ 6η

Συμπεράσματα/Συζήτηση

Έχει πλέον καθιερωθεί η συσχέτιση του ιού των Ανθρώπινων Θηλωμάτων με την εμφάνιση κακοηθειών στην ανατομική περιοχή Κεφαλής – Τραχήλου. Πιο συγκεκριμένα, στην περίπτωση των καρκινωμάτων πλακωδών κυττάρων του λάρυγγα (LSCC), τα οποία προκύπτουν από την γλωττίδα, την υπεργλωττίδα και την υπογλωττίδα, ο ιός συγκαταλέγεται στους παράγοντες υψηλού κινδύνου για την εμφάνιση κακοηθειών και συχνά συνδυάζεται με την δράση άλλων παραγόντων όπως το κάπνισμα, το αλκοόλ, η ηλικία κ.α. [28]

Ωστόσο, η ανατομική περιοχή του λάρυγγα, τοποθετείται χαμηλότερα στην κλίμακα συσχέτισης του ιού των Ανθρώπινων Θηλωμάτων με την εμφάνιση καρκίνου Κεφαλής – Τραχήλου, σε σχέση με άλλες ανατομικές περιοχές της ομάδας αυτής, όπως για παράδειγμα ο στοματοφάρυγγας. [28]

Οι επιδημιολογικές μελέτες αναφέρουν ότι τα ποσοστά μόλυνσης από τον ιό HPV σε περιστατικά όγκων στον λάρυγγα, κυμαίνονται από 8% έως 83% ενώ μια πρόσφατη μελέτη μετα-ανάλυσης ανέδειξε το ποσοστό λοίμωξης από τον ιό των Ανθρώπινων Θηλωμάτων στο 28% όλων των περιπτώσεων LSCC. [36]

Υπάρχει μία, σχετικά μεγάλη, απόκλιση στα ποσοστά συσχέτισης του ιού HPV με τον καρκίνο του λάρυγγα στις διάφορες μελέτες που έχουν δημοσιευτεί. Για παράδειγμα, σε μια μελέτη 674 ασθενών με καρκίνο του λάρυγγα στην Κίνα, ο επιπολασμός της λοίμωξης από τον ιό HPV ήταν μόνο 4,9% [37] ενώ σε μία πιο πρόσφατη μελέτη, και πάλι στην Κίνα, το 62.6% από τους συνολικά 211 ασθενείς βρέθηκαν θετικοί για τον ιό.[38] Αντίστοιχη έρευνα στην Ισπανία το 2015 αναφέρει την παρουσία του γονότυπου υψηλού κινδύνου του ιού HPV16 σε ποσοστό μόλις 1.6% από τα συνολικά δείγματα που ερευνήθηκαν. [39]

Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται επιλεγμένες μελέτες συσχέτισης του ιού των Ανθρώπινων Θηλωμάτων με την εμφάνιση καρκινωμάτων πλακωδών κυττάρων του λάρυγγα (LSCC). Γίνονται εμφανείς οι διαφορές τόσο στα ποσοστά των θετικών, στον ιό HPV, ασθενών με καρκίνο στο λάρυγγα, όσο και στους γονότυπους που έχουν εντοπιστεί.

Source	Publication date	Country, region	Sample size	Detection methods	HPV+ (%)	Genotypes
Peng, et al.	2009	Southwest China (Chongqing)	123	PCR	76.42%	16, 18, 33, 45, 31, 52
Liu, et al.	2010	Central China (Beijing)	84	qRT-PCR	34.5%	16, 18
Yao, et al.	2010	Central China (Shanxi)	40	RT-PCR, IHC	57.5%	16, 18
Wang, et al.	2011	Central China (Beijing)	84	PCR, ISH	36.9%	16, 18
Lu, et al	2012	East China (Shandong)	57	PCR	7.02%	16, 11, 43
Wu, et al.	2012	East China (Shanghai)	46	PCR	6.52%	16, 11
Wang, et al	2014	South China (Hainan)	50	PCR	NA	16, 18
Wang, et al	2014	South China (Guangdong)	163	PCR	9.8%	NA

Guan, et al	2015	East China (Shanghai)	31	PCR	19.4%	16
Lu, et al.	2016	South China (Guangdong)	82	PCR	2.4%	16
Zhang, et al.	2017	Northwest China (Ningxia)	101	PCR	13.86%	16, 51, 58, 45, 67, 40, 84
Tong, et al.	2018	Northeast China (Heilongjiang)	211	PCR, ISH	62.6%	16, 18, 11, 58, 13
Rodrigo, et al.	2015	Northern Spain	62	PCR	1.6%	16
Atighechi, et al	2016	Iran	44	PCR	25%	16, 18, 6
Erkul, et al.	2017	Istanbul, Turkey	78	Genotyping Assay RT-PCR	26.02%	16, 59
Shaikh, et al.	2017	Bangladesh	NA	Nested PCR, automated DNA sequencing	21%	16, 33, 31

Kariche, et al.	2018	Algeria	42	NA	2.38%	6
Milad, et al.	2018	Egypt	56	PCR	3.6%	NA
Vazquez-Guillen, et al.	2018	Mexico	195	PCR	47.7%	11, 52

Πίνακας 5: Η συσχέτισης του ιού των Ανθρώπινων Θηλωμάτων με την εμφάνιση καρκινωμάτων πλακωδών κυττάρων του λάρυγγα (LSCC) σε διάφορες μελέτες. **(Yang, D., et al., *Effect of HPV Infection on the Occurrence and Development of Laryngeal Cancer: A Review.* J Cancer. 10(19): p. 4455-4462.)**

Αυτές οι διαφορές αποδίδονται σε μια ποικιλία παραγόντων. Χαρακτηριστικά, καταλυτικής σημασίας φαίνεται πως είναι γεωγραφική κατανομή του δείγματος καθώς, όπως έχει ήδη αναφερθεί, στις διάφορες γεωγραφικές περιοχές εντοπίζονται διαφορετικοί γονότυποι του ιού. [23]

Υψίστης σημασίας είναι τόσο η ποιότητα του δείγματος όσο και η ανατομική περιοχή δειγματοληψίας. Ακόμα, ο ασαφής μοριακός μηχανισμός του καρκίνου του λάρυγγα και η συσχέτισή του σε μοριακό επίπεδο με τον ιό των Ανθρώπινων Θηλωμάτων, δυσχεραίνει περισσότερο τις μελέτες και την ασφαλή εξαγωγή συμπερασμάτων. Τέλος, η ευαισθησία και η ειδικότητα των μεθόδων που χρησιμοποιούνται στην εκάστοτε μελέτη φαίνεται να καθορίζουν το τελικό αποτέλεσμα.[36, 38, 40]

Σε κάθε περίπτωση γίνεται αντιληπτό ότι ο γονότυπος υψηλού κινδύνου HR – HPV16 εντοπίζεται συχνότερα από κάθε άλλο σε καρκινικά κύτταρα λάρυγγα. Ακολουθούν οι γονότυποι HPV33 και HPV18 σε σχετικά μικρά ποσοστά εντοπίζονται και άλλοι γονότυποι υψηλού κινδύνου. [41]

Επί του παρόντος, η ανίχνευση και η γονοτύπηση του ιού των Ανθρώπινων Θηλωμάτων βασίζεται κυρίως στην τεχνική της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR) και δευτερευόντως σε μεθόδους ανοσοϊστοχημείας (IHC), in situ υβριδοποίησης (ISH) και ανάλυσης Western.

Σε μία μελέτη 211 ασθενών που παρουσίαζαν καρκινώματα πλακωδών κυττάρων του λάρυγγα (LSCC), οι 132 (62,6%) βρέθηκαν θετικοί για τον ιό των Ανθρώπινων Θηλωμάτων (HPV) όταν χρησιμοποιήθηκε ως διαγνωστική μέθοδος η PCR. Από αυτά τα 131 βρέθηκαν επίσης θετικά και με ανάλυση in situ υβριδοποίησης (ISH). [38] Όταν χρησιμοποιήθηκε ως διαγνωστική μέθοδος η ανοσοϊστοχημεία (IHC) και συγκεκριμένα ερευνήθηκε η ύπαρξη της πρωτεΐνης p16, η οποία θεωρείται πως συνδέεται στενά με την κατάσταση της λοίμωξης από τον ιό, από το σύνολο των δειγμάτων (211) που εξετάστηκαν, τα 115 (54%) ήταν θετικά. [38]

Τέτοιου είδους διαφορές στην ειδικότητα της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR) σε σύγκριση με αυτήν της ανοσοϊστοχημείας (IHC) εντοπίζονται και σε άλλες μελέτες. Για παράδειγμα, στην μελέτη των Smeets et. al η ειδικότητα της μεθόδου ανίχνευσης της προτεϊνης p16 μέσω ανοσοϊστοχημείας υπολογίστηκε στο 79% ενώ η ειδικότητα της PCR στην ανίχνευση του ιικού DNA άγγιξε το 97%. [42]

Αξίζει να αναφερθεί πως τα 63 δείγματα που ελέγχθηκαν με την χρήση Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου στην συγκεκριμένη εργασία, είχαν προηγουμένως εξεταστεί με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας όμως κανένα από αυτά δεν βρέθηκε θετικό για το ιό. Τα δεδομένα αυτά συμφωνούν με όσα αναφέρθηκαν παραπάνω, τονίζοντας την μεγαλύτερη διαγνωστική ευαισθησία της PCR συγκριτικά με τις άλλες μεθόδους ανίχνευσης του ιού. [43]

Βιβλιογραφία

1. Dukic, A., et al., *HPV Oncoproteins and the Ubiquitin Proteasome System: A Signature of Malignancy?* Pathogens. **9**(2).
2. Burk, R.D., A. Harari, and Z. Chen, *Human papillomavirus genome variants.* Virology. **445**(1-2): p. 232-43.
3. Syrjanen, S., *Oral manifestations of human papillomavirus infections.* Eur J Oral Sci. **126 Suppl 1**: p. 49-66.
4. Harden, M.E. and K. Munger, *Human papillomavirus molecular biology.* Mutat Res Rev Mutat Res. **772**: p. 3-12.
5. Bishop, B., et al., *Crystal structures of four types of human papillomavirus L1 capsid proteins: understanding the specificity of neutralizing monoclonal antibodies.* J Biol Chem, 2007. **282**(43): p. 31803-11.
6. White, E.A., *Manipulation of Epithelial Differentiation by HPV Oncoproteins.* Viruses. **11**(4).
7. Brianti, P., E. De Flammineis, and S.R. Mercuri, *Review of HPV-related diseases and cancers.* New Microbiol. **40**(2): p. 80-85.
8. Clanner-Engelshofen, B.M., et al., *Condylomata acuminata: A retrospective analysis on clinical characteristics and treatment options.* Heliyon. **6**(3): p. e03547.
9. Gradissimo, A. and R.D. Burk, *Molecular tests potentially improving HPV screening and genotyping for cervical cancer prevention.* Expert Rev Mol Diagn. **17**(4): p. 379-391.
10. Hennessey, P.T., W.H. Westra, and J.A. Califano, *Human papillomavirus and head and neck squamous cell carcinoma: recent evidence and clinical implications.* J Dent Res, 2009. **88**(4): p. 300-6.
11. Tomaic, V., *Functional Roles of E6 and E7 Oncoproteins in HPV-Induced Malignancies at Diverse Anatomical Sites.* Cancers (Basel). **8**(10).
12. Nagasaka, K., et al., *PDZ domains and viral infection: versatile potentials of HPV-PDZ interactions in relation to malignancy.* Biomed Res Int. **2013**: p. 369712.
13. Pinatti, L.M., H.M. Walline, and T.E. Carey, *Human Papillomavirus Genome Integration and Head and Neck Cancer.* J Dent Res. **97**(6): p. 691-700.
14. Kajitani, N. and S. Schwartz, *Role of Viral Ribonucleoproteins in Human Papillomavirus Type 16 Gene Expression.* Viruses. **12**(10).
15. Lazarczyk, M., et al., *The EVER proteins as a natural barrier against papillomaviruses: a new insight into the pathogenesis of human papillomavirus infections.* Microbiol Mol Biol Rev, 2009. **73**(2): p. 348-70.
16. Aguayo, F., et al., *High-Risk Human Papillomavirus and Tobacco Smoke Interactions in Epithelial Carcinogenesis.* Cancers (Basel). **12**(8).
17. Doorbar, J., *Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer.* Clin Sci (Lond), 2006. **110**(5): p. 525-41.
18. Yeo-Teh, N.S.L., Y. Ito, and S. Jha, *High-Risk Human Papillomaviral Oncogenes E6 and E7 Target Key Cellular Pathways to Achieve Oncogenesis.* Int J Mol Sci. **19**(6).

19. Hochmann, J., et al., *Human papillomavirus type 18 E5 oncoprotein cooperates with E6 and E7 in promoting cell viability and invasion and in modulating the cellular redox state.* Mem Inst Oswaldo Cruz. **115**: p. e190405.
20. Pal, A. and R. Kundu, *Human Papillomavirus E6 and E7: The Cervical Cancer Hallmarks and Targets for Therapy.* Front Microbiol. **10**: p. 3116.
21. Marullo, R., et al., *HPV16 E6 and E7 proteins induce a chronic oxidative stress response via NOX2 that causes genomic instability and increased susceptibility to DNA damage in head and neck cancer cells.* Carcinogenesis. **36**(11): p. 1397-406.
22. Zvereva, M.I., D.M. Shcherbakova, and O.A. Dontsova, *Telomerase: structure, functions, and activity regulation.* Biochemistry (Mosc). **75**(13): p. 1563-83.
23. Faraji, F., et al., *Molecular mechanisms of human papillomavirus-related carcinogenesis in head and neck cancer.* Microbes Infect. **19**(9-10): p. 464-475.
24. Hu, Z. and D. Ma, *The precision prevention and therapy of HPV-related cervical cancer: new concepts and clinical implications.* Cancer Med. **7**(10): p. 5217-5236.
25. Cho, C.Y., et al., *Risk of cancer in patients with genital warts: A nationwide, population-based cohort study in Taiwan.* PLoS One. **12**(8): p. e0183183.
26. Crosbie, E.J., et al., *Human papillomavirus and cervical cancer.* Lancet. **382**(9895): p. 889-99.
27. Cohen, N., S. Fedewa, and A.Y. Chen, *Epidemiology and Demographics of the Head and Neck Cancer Population.* Oral Maxillofac Surg Clin North Am. **30**(4): p. 381-395.
28. Tumban, E., *A Current Update on Human Papillomavirus-Associated Head and Neck Cancers.* Viruses. **11**(10).
29. Konings, H., et al., *A Literature Review of the Potential Diagnostic Biomarkers of Head and Neck Neoplasms.* Front Oncol. **10**: p. 1020.
30. Rettig, E.M. and G. D'Souza, *Epidemiology of head and neck cancer.* Surg Oncol Clin N Am. **24**(3): p. 379-96.
31. Marongiu, L., et al., *Human papillomavirus type 16 long control region and E6 variants stratified by cervical disease stage.* Infect Genet Evol. **26**: p. 8-13.
32. Yamada, T., et al., *Human papillomavirus type 16 variant lineages in United States populations characterized by nucleotide sequence analysis of the E6, L2, and L1 coding segments.* J Virol, 1995. **69**(12): p. 7743-53.
33. Augustin, J.G., et al., *HPV Detection in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas: What Is the Issue?* Front Oncol. **10**: p. 1751.
34. Dadar, M., et al., *Advances in Designing and Developing Vaccines, Drugs and Therapeutic Approaches to Counter Human Papilloma Virus.* Front Immunol. **9**: p. 2478.
35. Divya, C.S. and M.R. Pillai, *Antitumor action of curcumin in human papillomavirus associated cells involves downregulation of viral oncogenes, prevention of NFkB and AP-1 translocation, and modulation of apoptosis.* Mol Carcinog, 2006. **45**(5): p. 320-32.
36. Yang, D., et al., *Effect of HPV Infection on the Occurrence and Development of Laryngeal Cancer: A Review.* J Cancer. **10**(19): p. 4455-4462.

37. Xu, Y., et al., *Human papillomavirus infection in 674 Chinese patients with laryngeal squamous cell carcinoma.* PLoS One. **9**(12): p. e115914.
38. Tong, F., et al., *Prevalence and Prognostic Significance of HPV in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma in Northeast China.* Cell Physiol Biochem. **49**(1): p. 206-216.
39. Rodrigo, J.P., et al., *Prevalence of human papillomavirus in laryngeal and hypopharyngeal squamous cell carcinomas in northern Spain.* Cancer Epidemiol. **39**(1): p. 37-41.
40. Gama, R.R., et al., *Detection of human papillomavirus in laryngeal squamous cell carcinoma: Systematic review and meta-analysis.* Laryngoscope. **126**(4): p. 885-93.
41. Hernandez, B.Y., et al., *Human papillomavirus prevalence in invasive laryngeal cancer in the United States.* PLoS One. **9**(12): p. e115931.
42. Smeets, S.J., et al., *A novel algorithm for reliable detection of human papillomavirus in paraffin embedded head and neck cancer specimen.* Int J Cancer, 2007. **121**(11): p. 2465-72.
43. Moulnti Dimitra, *Etiologic correlation of Human Papilloma Virus (HPV) with the head and neck cancer,* University of West Attica, 2019
44. WHO, Immunization, Vaccines and Biological Diseases, Human Papilloma Virus Vaccine, https://www.who.int/teams/immunization-vaccines-and-biologicals/diseases/human-papillomavirus-vaccines-(HPV)
45. ViralZone, Papillomaviridae, https://viralzone.expasy.org/5
46. Όμιλος Βιοιατρική, Βιοκλινική, Καρκίνος του Λάρυγγα, https://www.bioclinic.gr/karkinos-tou-larigga/