



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«Ο ρόλος των Toll - Like Receptors(TLRs) στην λοίμωξη από HPV»**

Μεταπτυχιακός φοιτητής: Τοροσιάδης Νικόλαος

Επιβλέπων καθηγητής: Δήμας Κωνσταντίνος

Λάρισα 2017





University of Thessaly  
Medicine School  
Master of Science (M.Sc.)  
«Human Genetics»

Master Thesis: «**The role of Toll Like Receptors (TLRs) in HPV infection**»

**TOROSIADIS NIKOLAOS**  
B.Sc. Medical Laboratory Scientist

Supervisor Professor: Dimas Konstantinos

Larissa 2017



Βεβαιώνω ότι η παρούσα Μεταπτυχιακή Διπλωματική εργασία είναι αποτέλεσμα δικής μου δουλειάς και δεν αποτελεί προϊόν υποκλοπής ή/και αντιγραφής.

Υπογραφή: .....

Copyright © Τοροσιάδης Νικόλαος, 2017

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Τριμελής επιτροπή:

Δήμας Κωνσταντίνος, Επίκουρος καθηγητής Φαρμακολογίας, ΠΘ

Τσέζου Ασπασία, Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής, ΠΘ

Τζέτη Μαρία, Αναπληρώτρια καθηγήτρια Γενετικής, ΕΚΠΑ

Supervisor: Dimas Konstantinos

Examiners Committee:

1. Dimas Konstantinos
2. Tsezou Aspasia
3. Tzeti Maria



## Περίληψη

Στην παρούσα Μεταπτυχιακή Διπλωματική εργασία, σκοπός της επιλογής του συγκεκριμένου θέματος ήταν η περαιτέρω διερεύνηση του ρόλου των ανθρωπίνων θηλωμάτων (HPV) και ο ρόλος των υποδοχέων τύπου Toll (TLRs) στην λοίμωξη από τον ιό αυτόν.

Η βασική διαδικασία που ακολουθήθηκε για την ολοκλήρωση της ΜΔΕ, ήταν η επιλογή ανάμεσα από έγκυρες και σύγχρονες βιβλιογραφικές πηγές, κυρίως της τελευταίας 5ετίας. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν ιστοσελίδες πλούσιες σε έγκριτο υλικό καθώς και άρθρα παλαιότερων ετών που παρείχαν γενικές πληροφορίες για ορισμένα θέματα.

Τα κύρια αποτελέσματα από την βιβλιογραφική μελέτη είναι εμφανώς πολλά αλλά και σημαντικά. Μερικά από αυτά είναι, πως ο καρκίνος του Τράχηλου της μήτρας αλλά και ο καρκίνος της Κεφαλής, αποτελούν τους σημαντικότερους καρκίνους που εμφανίζονται από την HPV λοίμωξη και ότι προσβάλλονται και τα δύο φύλλα με μεγαλύτερο ποσοστό, βέβαια, οι γυναίκες. Από πλευράς ανοσοποιητικού συστήματος, οι TLRs βοηθούν στην άμυνα του οργανισμού κατά της λοίμωξης από τον HPV και μελέτες έχουν δείξει ότι η αυξημένη παραγωγή των TLRs σχετίζεται με την εξάλειψη της συγκεκριμένης λοίμωξης.

Συμπερασματικά, μπορούμε να πούμε ότι ο ιός των ανθρωπίνων θηλωμάτων πρέπει να παραμένει υπό συνεχή μελέτη και παρακολούθηση, λόγω του υψηλού αριθμού περιστατικών κάθε χρόνο και κινδύνου εμφάνισης καρκίνου. Ακόμα, πρέπει να δίνονται περισσότερες πληροφορίες στα σεξουαλικά ενεργά άτομα σχετικά με τον ιό και τα προβλήματα που δημιουργεί αλλά κυρίως να ενημερώνονται σωστά για τα μέτρα πρόληψης ώστε τέτοια κακοήθη περιστατικά (Καρκίνος Τράχηλου της μήτρας & Καρκίνος Κεφαλής) να αποφεύγονται.





## **Abstract**

The particular subject for this postgraduate work was chosen in order to investigate further the virus of human papilloma (HPV) and the role of Toll – like receptors in the infection caused by this specific virus.

The main process that was followed for the completion of this work was the careful selection among various valid and modern bibliographical sources mainly from the last five years. In addition, sites rich in approved material were used as well as articles from earlier years that contained general information about special topics.

The most important results from the bibliographical study are obviously too many and important. The first one has to do with the finding that the cervical cancer as well as the Head/Neck cancer are the main types of the disease which appear as a result of the HPV infection that attacks both sexes, with the women of course to have the higher percentage. As far as the immunity system is concerned the TLRs helps the defence of the human body against HPV and the conducted studies have shown that the increasing production of TLRs is connected with the elimination of this infection.

In conclusion, it can be said that the virus of human papilloma has to remain under constant study and observation because of the high number of incidents which happen every year and the danger of cancer occurrence. Consequently more appropriate information about the threats that come from this virus should be given to the sexually active categories of the population in order to adopt all the precautionary measures so that all the malevolent incidents( cervical cancers and Head/Neck cancers) to be avoided.



## Ευχαριστίες

Με την ολοκλήρωση της Μεταπτυχιακής Διπλωματικής εργασίας μου, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέπων καθηγητή μου κ. Δήμα Κωνσταντίνο, επίκουρο καθηγητή Φαρμακολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την επίβλεψη, καθοδήγηση και τον σχεδιασμό της εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής αξιολόγησης της διπλωματικής μου εργασίας, την κυρία Τσέζου Α. (Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής, ΠΘ) και την κυρία Τζέτη Μ. (Αναπληρώτρια καθηγήτρια Γενετικής, ΕΚΠΑ).

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για τη συνεχή υποστήριξη και συμπαράσταση σε όλη τη διάρκεια, τόσο των σπουδών μου, όσο και της ζωής μου.



## Περιεχόμενα

Εισαγωγή

Κεφάλαιο 1: Ο ιός των ανθρωπίνων θηλωμάτων (HPV)

1.1 Γενικά – Ιστορική αναδρομή

1.2 Μοριακή δομή των Human Papillomaviruses (HPVs)

1.3 Είσοδος του ιού στον ξενιστή

1.4 HPV Epidemiology: Νεότερα δεδομένα

Κεφάλαιο 2: Ανοσοποιητικό σύστημα και υποδοχείς τύπου Toll (TLRs)

2.1 Ανοσοποιητικό σύστημα

2.2 Φυσική ή μη ειδική ανοσία

2.3 Υποδοχείς τύπου Toll (TLRs)

2.3.1 Ιστορική αναδρομή

2.3.2 Toll – like Receptors - Γενικά

2.3.3 Δομή των TLRs

2.3.4 Toll like Receptors και εξωγενείς συνδέτες

2.3.5 Μονοπάτια σηματοδότησης των TLRs

i. Μονοπάτι σηματοδότησης εξαρτώμενο από την MyD88

ii. Μονοπάτι σηματοδότησης ανεξάρτητο από την MyD88

Κεφάλαιο 3: Συσχέτιση των TLRs με την HPV λοίμωξη & Καρκίνος

3.1 HPV και καρκίνος του τραχήλου της μήτρας

3.2 HPV και καρκίνος της κεφαλής

3.3 TLRs και καρκίνος του τραχήλου της μήτρας και της κεφαλής

3.3.1 Ο ρόλος των TLRs στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας

3.3.2 Ο ρόλος των TLRs στον καρκίνο της κεφαλής

3.3 Ανοσιακή απάντηση των TLRs στην HPV λοίμωξη

Συμπεράσματα

Βιβλιογραφία



## Εισαγωγή

Ο ιός των ανθρωπίνων θηλωμάτων, είναι από τους πιο γνωστούς αλλά και σημαντικούς υπό μελέτη ιούς. Έγινε ευρέως γνωστός από τη μελέτη και παρακολούθηση αρχικά των κονδυλωμάτων στις περιοχές του δέρματος αλλά και αργότερα από την μελέτη του σε εμφανίσεις καρκίνων στην περιοχή του τράχηλου της μήτρας. Ο ιός, αυτός, απαριθμεί πάνω από 200 στελέχη, τα οποία διαχωρίζονται σε 2 μεγάλες κατηγορίες: α) Κατηγορία υψηλού κινδύνου και β) Κατηγορία χαμηλού κινδύνου.

Συνεχώς, χρόνο με το χρόνο, οι επιστήμονες ανακαλύπτουν νέα στελέχη. Αυτό, φυσικά, οδηγεί στην εύρεση νέων μεθόδων/τεχνικών ανίχνευσης του ιού, νέων μεθόδων πρόληψης [νέα εμβόλια – 9HPV(9δύναμο)] και νέων θεραπειών έναντι του ιού.

Ο HPV, εκτός από τα κοινά κονδυλώματα και τον καρκίνο στον τράχηλο της μήτρας, μπορεί και προκαλεί καρκινικές αλλοιώσεις και σε άλλα μέρη του σώματος τόσο σε γυναίκες όσο και σε άνδρες. Άλλα μέρη που ο ιός έχει συσχετισθεί με την εμφάνιση καρκίνου είναι: ο στοματοφάρυγγας, ο πρωκτός και το πέος.

Από πλευράς του ανθρώπινου οργανισμού, ο συγκεκριμένος ιός αντιμετωπίζεται με τη φυσική ανοσία του ανοσοποιητικού συστήματος. Το ανοσοποιητικό σύστημα, με την φυσική ανοσία, είναι ικανό να αναγνωρίζει μικροβιακά ή ιογενή ερεθίσματα με την έκφραση των μορίων αναγνώρισης προτύπων (Pattern Recognition Molecules, PRMs). Για την έναρξη και ρύθμιση της φυσικής και ειδικής ανοσοαπόκρισης διαδραματίζουν οι υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων. Τέτοιοι υποδοχείς είναι και οι Toll – like Receptors, που μελετήθηκαν και θα παρουσιαστούν σε αυτή την Μεταπτυχιακή Διπλωματική εργασία.

Οι υποδοχείς τύπου Toll, όπως και ονομάζονται, είναι μια ομάδα διαμεμβρανικών πρωτεϊνών και σκοπό έχουν να εντοπίζουν παθογόνους παράγοντες και να βοηθούν στην παραγωγή προφλεγμονωδών μεσολαβητών.

Στην ΜΔΕ μου, θα παρουσιάσω με σύγχρονη βιβλιογραφία τον ιό των ανθρωπίνων θηλωμάτων και τους υποδοχείς τύπου Toll που συνδράμουν στην ανοσιακή απάντηση σε HPV λοίμωξη. Στο **Κεφάλαιο 1**, δίνονται γενικές πληροφορίες για τον ιό των ανθρωπίνων θηλωμάτων (HPV) καθώς επίσης και επιδημιολογικά στοιχεία των τελευταίων ετών. Στο **Κεφάλαιο 2**, αναφέρονται οι ορισμοί του ανοσοποιητικού συστήματος και της φυσικής ανοσίας. Επίσης, παρουσιάζονται οι υποδοχείς τύπου Toll (TLRs) με αναφορές στη δομή, στους συνδέτες και στα μονοπάτια σηματοδότησής τους. Στο **Κεφάλαιο 3**, αναφέρονται λεπτομερώς πληροφορίες για τον Καρκίνο στον τράχηλο της μήτρας και για τον Καρκίνο της κεφαλής που οφείλονται στον HPV και ακόμη γίνεται αναφορά στον ρόλο των TLRs στους δύο παραπάνω τύπους καρκίνου. Τέλος, στα συμπεράσματα, παρουσιάζονται όλα τα προβλήματα και οι σκέψεις για το μέλλον όσον αφορά τον HPV και την αντιμετώπισή του.



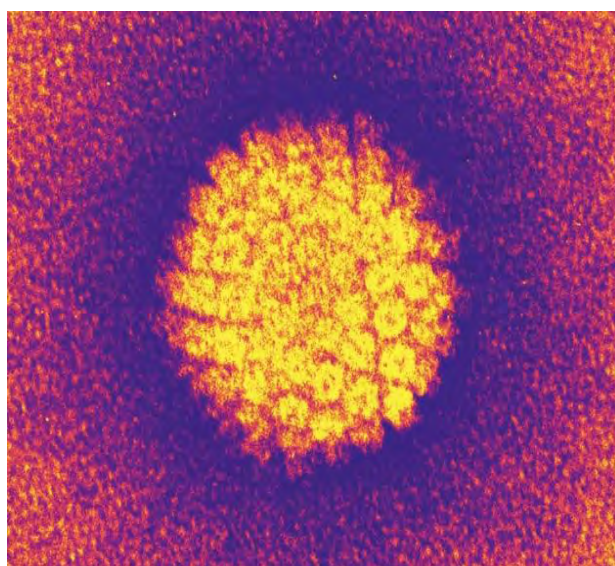


# Κεφάλαιο 1 – Ο ιός των ανθρωπίνων θηλωμάτων (HPV)

## 1.1 Γενικά – Ιστορική αναδρομή

Οι ιοί ανθρωπίνων κονδυλωμάτων ανήκουν στην οικογένεια Papillomaviridae. Ονομάζονται έτσι λόγω ότι προκαλούν θηλώματα (papillomas). Σήμερα, έχουν περιγραφεί περισσότερα από 200 στελέχη του ιού. Οι ιοί των ανθρωπίνων θηλωμάτων, προσβάλλουν τον άνθρωπο προκαλώντας λοίμωξη στα κερατινοκύτταρα του δέρματος ή και των βλεννογόνων. Τις περισσότερες φορές δεν προκαλούν συμπτώματα, όμως σε μερικούς ανθρώπους, μετά τη μόλυνση, μπορεί να εκδηλωθούν καλοήγη θηλώματα, καρκίνος του τραχήλου της μήτρας, του στοματοφάρυγγα και του πρωκτού. (1, 2)

Οι HPVs ταξινομούνται σε χαμηλού και υψηλού κινδύνου. Οι τύποι χαμηλού κινδύνου, συμπεριλαμβάνουν τους HPV 6, 11, 42, 43 και 44 κ.α. ενώ οι υψηλού κινδύνου HPV, συμπεριλαμβάνουν τους τύπους 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 και 70. (3)



**Εικόνα 1:** Απεικόνιση του ιού των ανθρωπίνων θηλωμάτων σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (4)

Τα γεννητικά θηλώματα είναι γνωστά από την αρχαιότητα και αναφέρονται σε δοκίμια αρχαίων Ελλήνων, όπως του Ιπποκράτη, ο οποίος ήταν ο πρώτος που αναφέρει τη λέξη «κονδυλώματα». Η λέξη «κονδυλώματα», αναφέρεται και στους Ρωμαϊκούς χρόνους, τον 2<sup>ο</sup> αιώνα μ.Χ. (5, 6) Από το 1937 μέχρι το 1954, ερευνητές ύστερα από συνεχείς μελέτες και έρευνες κατέληξαν στο συμπέρασμα, ότι τα γεννητικά κονδυλώματα μεταδίδονται με τη σεξουαλική επαφή. Στα τέλη του 1940, ο Strauss μαζί με τους συνεργάτες του και με τη βοήθεια του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου, παρατηρούν σωματίδια του HPV σε μυρμηγκιές του δέρματος. (7, 8)

Η πρώτη περιγραφή των αλλοιώσεων στα κύτταρα από τα οξυτενή κονδυλώματα, γίνεται από τον ιατρό Παπανικολάου, το 1960. Ο Crawford, το 1965, αρχίζει να μελετάει το DNA του ιού. (9)

Αργότερα, το 1970, ο Γερμανός H. zur Hausen, μελετάει την πιθανή συσχέτιση του HPV με τα επιθηλιακά καρκινώματα. Το 1980, ο ίδιος και ο Gissmann, περιγράφουν τους τύπους 6 και 11 του ιού, ενώ το 1983-1984 ταυτοποιούνται οι τύποι 16 και 18. Τη δεκαετία του '90, επιδημιολογικές μελέτες θα επιβεβαιώσουν ότι ο HPV είναι το κύριο αίτιο στην ανάπτυξη του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Στην τελευταία μελέτη του Walboomers και των συνεργατών του (1999), το 99,7% των δειγμάτων του καρκίνου τραχήλου μήτρας περιείχε HPV, ποσοστό που συνδέει άμεσα τον ιό με τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. (10,11,12,13,14)

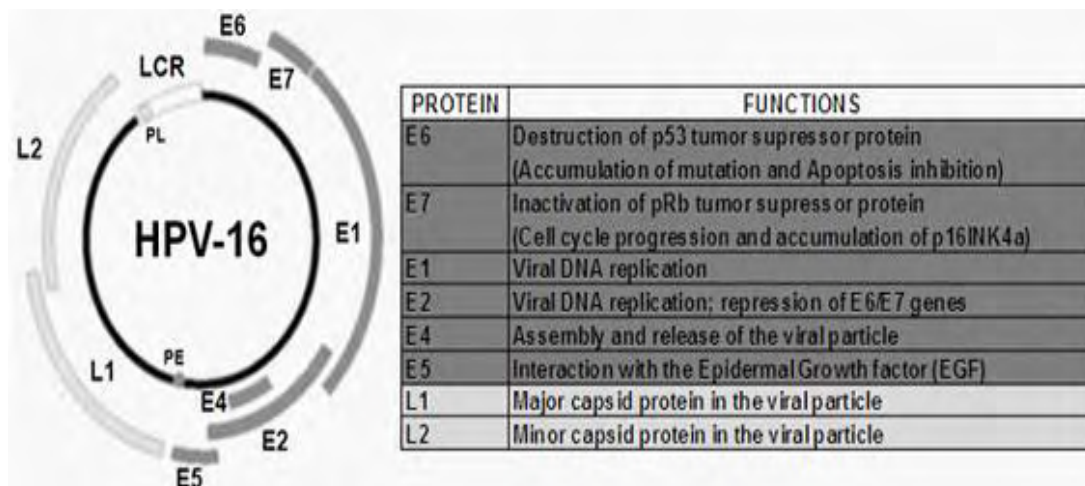
Ο 21<sup>ος</sup> αιώνας, σηματοδοτήθηκε από την ανακάλυψη του εμβολίου κατά του καρκίνου του τράχηλου της μήτρας, το οποίο συμπληρώνει τις ήδη υφιστάμενες μεθόδους πρόληψης. (15)

## 1.2 Μοριακή δομή των Human papillomaviruses (HPVs)

Το σωματίδιο του ιού έχει διάμετρο περίπου 55 nm και αποτελείται από διπλή κυκλική έλικα DNA, μεγέθους περίπου 8000 bp (base pairs – ζεύγη βάσεων). (2) Ο HPV αποτελείται από μία μεγάλη πρωτεΐνη MB 60 kda που κωδικοποιείται από το γονίδιο L1 και μια μικρότερη MB 43-53 kda, που κωδικοποιείται από το γονίδιο L2. (16)

Η λειτουργική περιοχή των γονιδίων του ιού αντιπροσωπεύει το γενετικό υλικό του και χωρίζεται σε τρία μέρη:

- Την πρώιμη περιοχή (E, early) που κωδικοποιεί τις πρωτεΐνες E1 έως E7, οι οποίες κωδικοποιούν μη δομικές πρωτεΐνες, των οποίων η λειτουργία είναι να ελέγχουν την αντιγραφή του DNA και να προκαλέσουν κακοήγη μετασχηματισμό του κυττάρου ξενιστή (17)
- Την όψιμη περιοχή (L, late) που κωδικοποιεί την κύρια πρωτεΐνη καψιδίου L1 (major capsid protein) και τη δευτερεύουσα πρωτεΐνη καψιδίου L2 (minor capsid protein) (17)
- Μία εκτενή περιοχή ελέγχου ή μη κωδικοποιούσα περιοχή (long control region ή non-coding region) που περιέχει ρυθμιστικές νουκλεοτιδικές αλληλουχίες υπεύθυνες για τον έλεγχο της έκφρασης και της αντιγραφής του ιικού γονιδιώματος (18)



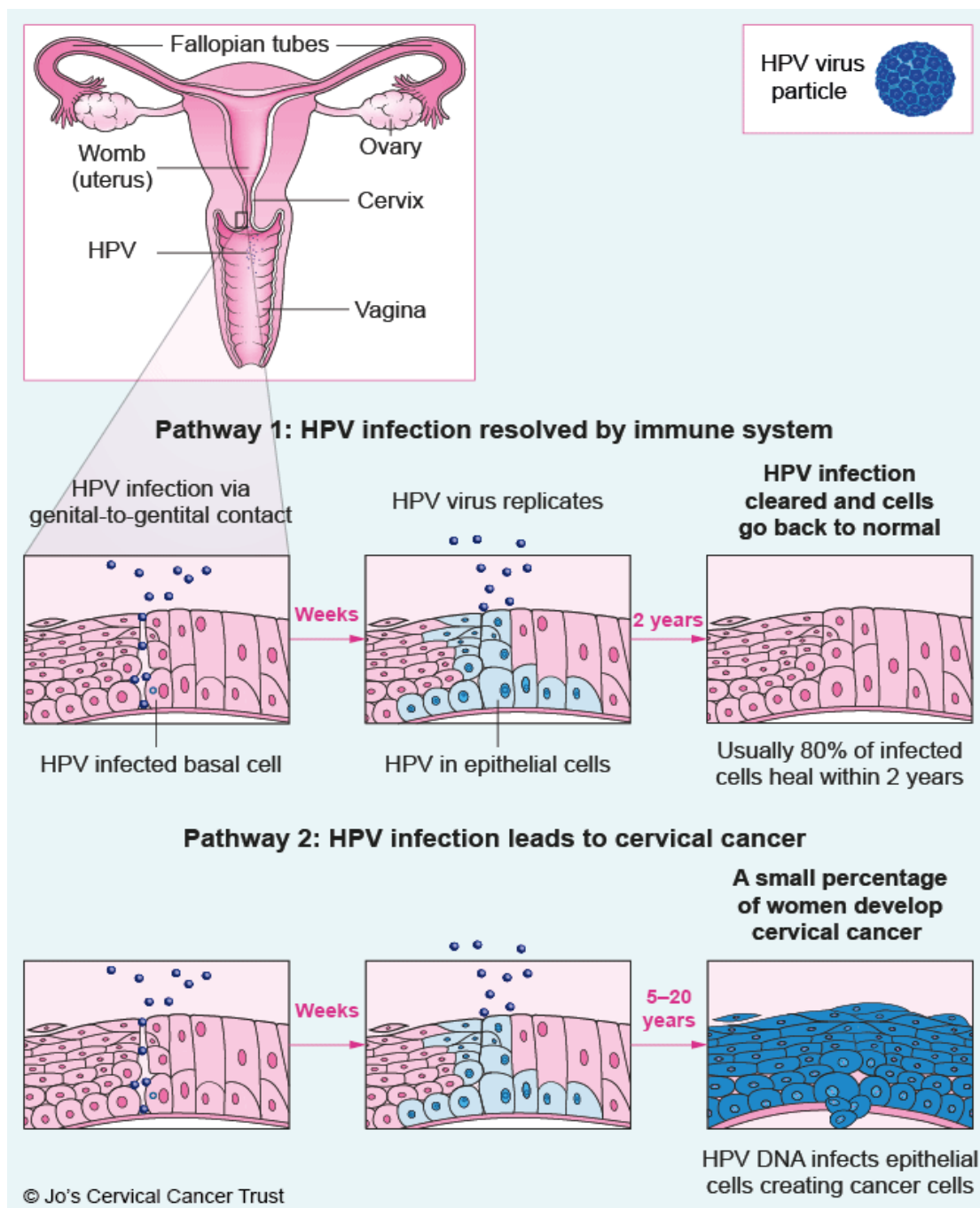
**Εικόνα 2:** Οργάνωση και δομή του HPV-16 και συνοπτικά οι λειτουργίες των πρωτεϊνών του ιού. (21)

### 1.3 Είσοδος του ιού στον ξενιστή

Ο ιός των ανθρωπίνων θηλωμάτων, μπορεί να μεταδοθεί με διάφορους τρόπους. Για να σχηματιστούν οι δερματικές μυρμηγκιές, σημαντικό είναι να υπάρχουν πάντοτε δερματικές εκδορές, σχισμές ή μικρές δερματικές βλάβες. Για να δημιουργηθούν θηλώματα στα γεννητικά όργανα χρειάζεται η σεξουαλική επαφή. Επίσης, ο ιός μπορεί να μεταδοθεί και από τη μητέρα στο έμβρυο κατά την κύηση, με την κάθετη μετάδοση. Συνεπώς, ο ιός εισέρχεται στα βασικά κύτταρα του σώματος μέσω των παραπάνω τρόπων. Έτσι γίνεται η σύνδεση του με κατάλληλους υποδοχείς. Στην συνέχεια, μπορεί να ενσωματωθεί στο γονιδίωμα του ξενιστή και να προκαλέσει την καρκινογένεση. (19, 20)

Μετά την είσοδο και απελευθέρωση του ιικού DNA από το καψίδιο του HPV, αυτό μεταφέρεται στον πυρήνα και διατηρείται σε χαμηλό αριθμό αντιγράφων εντός των βασικών κυττάρων. Για να διασφαλιστεί ότι το ιικό DNA θα αντιγραφεί, ο ιός πρέπει να επανεκκινήσει την κυτταρική διαίρεση στα διαφοροποιημένα κύτταρα. Οι πρωτεΐνες E6 και E7, απενεργοποιούν το p53 και την πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος pRb και με αυτό τον τρόπο διατηρείται η ικανότητα αντιγραφής του κυττάρου. Αμέσως μετά και αφού το ανοσολογικό σύστημα δεν καταφέρει να απομακρύνει τον ιό, το επιθήλιο εμφανίζει υπερπλασία καθώς η έκφραση των ιικών γονιδίων αυξάνεται σημαντικά και το ιικό DNA πολλαπλασιάζεται σε πολλές χιλιάδες αντίγραφα για κάθε μολυσμένο κύτταρο.

Μια μορφή λοίμωξης, ακόμη, από τον HPV, είναι η λανθάνουσα λοίμωξη όπου εκεί η ανοσιακή απάντηση του οργανισμού είναι ισχυρή και έτσι δεν αφήνει τον ιό να χρησιμοποιήσει το γενετικό μηχανισμό των κυττάρων και να πολλαπλασιαστεί παράλληλα με τις κυτταρικές διαιρέσεις. Η λοίμωξη, αυτή, είναι ασυμπτωματική και αναγνωρίζεται / ανιχνεύεται με μεθόδους υβριδισμού που ανιχνεύουν το DNA του ιού.



**Εικόνα 3:** Η είσοδος του ιού στον ξενιστή από τον γυναικείο κόλπο.

Υπάρχουν δύο περιπτώσεις και δύο μονοπάτια, αντίστοιχα, όταν ο ιός εισέρχεται στην μήτρα της γυναίκας. Το πρώτο μονοπάτι μας δείχνει σταδιακά την μόλυνση των βασικών κυττάρων που με την πάροδο μερικών εβδομάδων, μολύνονται και τα επιθηλιακά κύτταρα. Μετά από περίπου 2 χρόνια, συνήθως, ένα μεγάλο ποσοστό των μολυσμένων κυττάρων θεραπεύονται με την παρέμβαση του ανοσοποιητικού συστήματος, με αποτέλεσμα τα κύτταρα να γυρνάνε στη φυσιολογική τους μορφή. Το δεύτερο μονοπάτι, αντίθετα, μας δείχνει ακριβώς την ίδια πορεία της HPV λοίμωξης όμως μετά την προσβολή των επιθηλιακών κυττάρων και την πάροδο μερικών χρόνων το ανοσοποιητικό σύστημα δεν μπορεί να απομακρύνει τον ιό κι έτσι δημιουργείται η καρκινογένεση των κυττάρων με αποτέλεσμα τον καρκίνο του τράχηλου της μήτρας. (22)

## 1.4 HPV Epidemiology: Νεότερα δεδομένα

Το 2017, στην Ολλανδία, πραγματοποιήθηκε τυχαία επιδημιολογική μελέτη σε συνολικά 4637 άνδρες και γυναίκες, 6 διαφορετικών εθνικοτήτων, μεταξύ ηλικιών 18-44. Οι εθνικότητες των ατόμων, ήταν από την Ολλανδία, την Νότια Ασία (Surinamese), Αφρική (Surinamese), Γκάνα, Μαρόκο ή και Τουρκία. Η μελέτη, αυτή, είχε στόχο την ανίχνευση συγκεκριμένων hrHPV αντισωμάτων. Οι hrHPV, που ενδιέφερε την μελέτη ήταν οι, HPV-16, 18, 31, 33, 45, 52 και 58.

Τα αποτελέσματα για τους άνδρες ήταν: 18%, 12%, 23%, 19%, 17%, και 15%, αντίστοιχα για τον κάθε τύπο ενώ για τις γυναίκες ήταν: 30%, 22%, 34%, 31%, 14%, και 15%. Μεταξύ ανδρών, δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στα ποσοστά των Ολλανδών με αυτών των άλλων εθνικοτήτων. Στις γυναίκες, υψηλότερα ποσοστά κατείχαν αυτές από την Αφρική, συγκριτικά με τις γυναίκες από την Ολλανδία, ενώ σημαντική στατιστική μείωση στα ποσοστά είχαν οι γυναίκες, μεταξύ τους, από το Μαρόκο, την Τουρκία και την Ολλανδία. (23)

Στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής, για την περίοδο 2002-2012, το Εθνικό Ινστιτούτο για τον καρκίνο της Αμερικής, πραγματοποίησε μια επιδημιολογική μελέτη σε 149.301 υποθέσεις καρκίνου κεφαλής (Head – Neck Cancer, HNC), οι οποίες θα αφορούσαν και ικούς παράγοντες όπως είναι ο HPV, ο οποίος είναι και υπεύθυνος για πολλές περιπτώσεις HNC τα τελευταία χρόνια. Όλα τα δείγματα, διαχωρίστηκαν βάσει ηλικίας και φύλου.

Αναλύοντας, με βάση το φύλο, στους άνδρες παρατηρήθηκε αύξηση ποσοστού 2,89%, κάθε χρόνο, για καρκίνο στοματοφάρυγγα στον οποίο ο HPV ήταν υπεύθυνος παράγοντας. Στις γυναίκες, να μην παρατηρήθηκε, επίσης, αύξηση του ποσοστού αλλά σε ποσοστό 0,57% ετησίως. Για τον καρκίνο του λάρυγγα, σημειώθηκε πτώση του ποσοστού και για τα δύο φύλα.

Συγκρίνοντας τις τιμές με βάση την ηλικία για περιστατικά καρκίνου του στοματοφάρυγγα, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση, ποσοστού της τάξης 7,75% σε ηλικίες μεταξύ 50-59. Ακόμη, αυξημένα ήταν τα ποσοστά σε ηλικίες μεταξύ 0-29 (2,53%). Ιδίως, αυξημένα βρέθηκαν και τα ποσοστά για τον καρκίνο του λάρυγγα. (24)

Δεδομένα από έρευνα στην Κροατία, που δημοσιεύτηκαν τον Ιούλιο του 2017, στο PLoS ONE (25), έδειξαν πως ο επιπολασμός του ιού των ανθρωπίνων θηλωμάτων παραμένει ο ίδιος ή αυξάνει σταδιακά. Η συγκεκριμένη μελέτη, έγινε σε 4.432 γυναίκες για μια περίοδο 16 χρόνων. Οι τύποι του ιού που παρατηρήθηκαν ήταν: low-risk HPV -6 και 11 και high-risk HPV - 16, 18, 31, 33, 45, 52, 58. Οι ηλικίες που πήραν μέρος στην μελέτη κυμαίνονταν από 18 έως 85, με μέση τιμή 35,5 έτη.

Οι νεαρές γυναίκες, μεταξύ 18-24 ετών, ήταν εκείνες με τη συχνότερη εμφάνιση του ιού (26,2%) σε αντίθεση με γυναίκες ηλικίας 65 και άνω που εμφάνισαν ποσοστό 1%. Από τα 4.432 δείγματα, τα 2.652 ήταν θετικά με τη μέθοδο HPV DNA Test, από τα οποία τα 1.621 ήταν hrHPV. Ο HPV-16, ήταν αυτός με τη συχνότερη εμφάνιση στα δείγματα υψηλού κινδύνου. Σημαντικό να αναφέρουμε πως το test, με τη μέθοδο PCR, εμφάνισε 796 θετικά δείγματα (17,8%) σε έναν απροσδιόριστο, ακόμα, τύπο HPV (HPV – X). (25)

## Κεφάλαιο 2: Ανοσοποιητικό σύστημα και υποδοχείς τύπου Toll (TLRs)

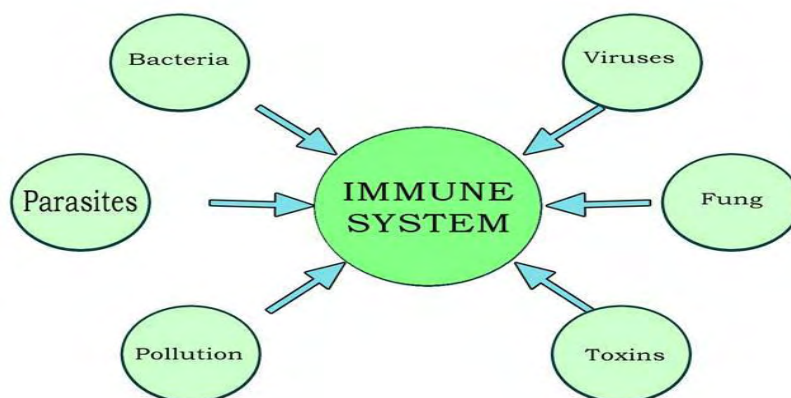
### 2.1 Ανοσοποιητικό σύστημα

Το ανοσοποιητικό σύστημα είναι φτιαγμένο για να προστατεύει πολυκύτταρους οργανισμούς (πχ. Άνθρωπος) από παθογόνα. Το σύστημα αυτό προστατεύει τον οργανισμό από διαφόρους εισβολείς όπως, για παράδειγμα, είναι οι ιοί. Στον άνθρωπο, υπάρχουν δύο είδη ανοσίας: α) η φυσική (έμφυτη) και β) η ειδική (επίκτητη). Η διάκριση μεταξύ τους εξαρτάται από τους τύπους υποδοχέων που χρησιμοποιούνται για να αναγνωρίσουν τα παθογόνα. Η αναγνώριση από την φυσική ανοσία γίνεται με τους υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων (Pattern Recognition Receptors, PRRs). Εν αντιθέσει με το πρώτο είδος ανοσίας, στην ειδική ανοσία η αναγνώριση πραγματοποιείται με αντιγονικούς υποδοχείς (T και B λεμφοκύτταρα). (26, 27)

Σε αυτή τη μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία θα μας απασχολήσει η φυσική ανοσία και η επίδρασή της στην λοίμωξη από τον ιό των ανθρωπίνων θηλωμάτων.

Το ανοσοποιητικό σύστημα, με την φυσική ανοσία, είναι ικανό να αναγνωρίζει μικροβιακά ή ιογενή ερεθίσματα με την έκφραση των μορίων αναγνώρισης προτύπων (Pattern Recognition Molecules, PRMs). Τα μόρια αναγνώρισης προτύπων, χωρίζονται σε δυο μεγάλες κατηγορίες. Στην πρώτη κατηγορία βρίσκονται υποδοχείς, οι οποίοι είναι συνδεδεμένοι με κύτταρα ενώ στην δεύτερη κατηγορία βρίσκονται οι οψωνίνες. (28, 29)

Σημαντικό ρόλο για την έναρξη και ρύθμιση της φυσικής και ειδικής ανοσοαπόκρισης διαδραματίζουν οι υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων, αναγνωρίζοντας μοριακά πρότυπα που σχετίζονται με την παθογένεια (Pathogen - Associated Molecular Patterns, PAMPs) ή μοριακά πρότυπα που σχετίζονται με κίνδυνο (Danger - Associated Molecular Patterns, DAMPs). Από τους PRRs, ξεχωρίζουν οι Toll-Like Receptors (TLRs), οι οποίοι είναι οι καλύτερα μελετημένοι υποδοχείς. (30)



**Εικόνα 4:** Το ανοσοποιητικό σύστημα είναι αυτό που συμβάλει στην αντιμετώπιση διαφόρων παθογόνων παραγόντων, που προσβάλουν τον οργανισμό. (18)

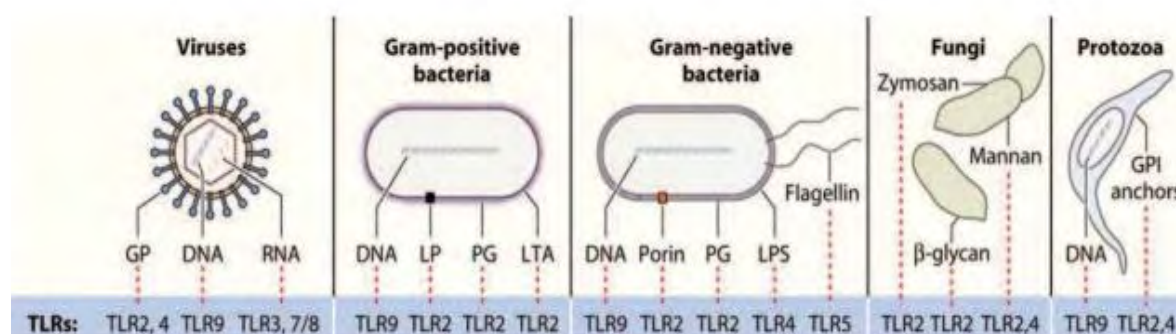


## 2.2 Φυσική ή μη ειδική ανοσία

Η φυσική ανοσία, αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας του οργανισμού, κατά τη διάρκεια μιας λοίμωξης. Κύριος ρόλος της, η έγκαιρη αναγνώριση εισβολέων και η ενεργοποίηση των προφλεγμονωδών αποκρίσεων. (26) Η φυσική ή μη ειδική ανοσία, χαρακτηρίζεται από τη μεσολάβηση των μακροφάγων, ουδετερόφιλων, ηωσινόφιλων, δενδριτικών κυττάρων (DCs) και NK κυττάρων. Στη μη ειδική ανοσία, δεν απαιτείται προηγούμενη έκθεση στο αντιγόνο και ο οργανισμός δρα με τη φαγοκυττάρωση και την άμεση ενεργοποίηση του συμπληρώματος.

Η ανίχνευση των παθογόνων εισβολέων, λαμβάνει μέρος από τους υποδοχείς της φυσικής ανοσίας, υποδοχείς αναγνώρισης μοριακών προτύπων (pattern recognition receptors, PRRs), αναγνωρίζοντας τα μοριακά πρότυπα παθογόνων μικροοργανισμών (pathogen associated molecular patterns, PAMPs). Τέτοιου είδους υποδοχείς (PRRs) είναι και οι τύπου Toll (TLRs), οι οποίοι έχουν μελετηθεί ευρύτερα.

Οι υποδοχείς αναγνώρισης μοριακών προτύπων (PRRs), μετά την αναγνώριση των PAMPs, εκφράζονται ή ενδοκυττάρια ή στην επιφάνεια των κυττάρων που συμβάλλουν στη φυσική ανοσία. Με τον τρόπο αυτό, ενεργοποιούν ενδοκυττάριας οδούς μεταγωγής μηνυμάτων που περιλαμβάνουν μόρια, κινάσες και μεταγραφικούς παράγοντες. Με τη μεταγωγή των μηνυμάτων, ενεργοποιείται η γονιδιακή έκφραση και η σύνθεση κυτταροκινών (IL-1, IL-12, TNF-α), ενδοθηλιακά μόρια προσκόλλησης και υποδοχείς. Όλα αυτά, μαζί, συμβάλλουν στην πρώιμη ανταπόκριση του οργανισμού και στην μετανάστευση διαφόρων κυττάρων στην περιοχή της λοίμωξης. (31, 32, 33, 34, 35)



**Εικόνα 5:** Οι υποδοχείς τύπου Toll και οι συνδέτες τους. Χαρακτηριστικοί συνδέτες είναι: νουκλεϊκά οξέα (DNA, RNA), επιφανειακές γλυκοπρωτεΐνες –GP, λιποπρωτεΐνες –LP και τα συστατικά μεμβράνης( πεπτιδογλυκάνη –PG) (36)

## 2.3 Υποδοχείς τύπου Toll (TLRs)

### 2.3.1 Ιστορική αναδρομή

Οι υποδοχείς τύπου Toll, πρώτη φορά, ανακαλύφθηκαν στην *Drosophila m.* Το 1996, ανακαλύφθηκε ο ρόλος που διαδραματίζει ο υποδοχέας Toll στην πρόκληση ανοσίας έναντι σε λοιμώξεις από μύκητες. Ο J. Hoffmann και οι συνεργάτες του, ήταν εκείνοι που έφτασαν στην ανακάλυψη. Η ανακάλυψη, αυτή, οδήγησε σε έρευνες αντίστοιχων υποδοχέων στον άνθρωπο. Αυτό δεν άργησε και τελικώς, το 1997, έγινε η ταυτοποίηση των ανθρώπινων υποδοχέων τύπου Toll (TLRs), σε μοντέλα ποντικών. (37, 38, 39)

Μέχρι στιγμής, στον άνθρωπο, έχουν ταυτοποιηθεί 11 TLRs. Οι TLRs 1,2,4,5,6 και 10 εντοπίζονται στην κυτταρική επιφάνεια, ενώ οι TLRs 3,7,8,9 στα ενδοσώματα. (32) Ο TLR 11, πρέπει να τονίσουμε πως όσο λειτουργικός είναι στα μοντέλα ζώων ποντικών, τόσο μη λειτουργικός είναι στον άνθρωπο, εξαιτίας των πολλαπλών κωδικονίων τερματισμού στο αντίστοιχο ανθρώπινο γονίδιο, με αποτέλεσμα να μην παράγεται μια ολοκληρωμένη λειτουργικά πρωτεΐνη. (44, 45)



**Εικόνα 6:** *Drosophila melanogaster*.

Η προέλευση της ανακάλυψης των Toll-like Receptors. Η *Drosophila*, είναι μια, υπό συνεχή, μελέτη μύγα, που απασχολεί τόσο την Ιατρική όσο και την Βιολογική/Γεωργική κοινότητα. (40, 41, 42)



### 2.3.2 Toll - Like Receptors – Γενικά

Οι TLRs, είναι μια ομάδα διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, με το ενδοκυττάριο τμήμα τους να μοιάζει με αυτό του υποδοχέα της IL-1 (ιντερλευκίνης-1). Η ιντερλευκίνη-1, είναι μια κυττοκίνη και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη φυσική ανοσία. Η έκφραση των υποδοχέων τύπου Toll, παρατηρείται, επίσης, σε επιθηλιακά ενδοθηλιακά κύτταρα καθώς και σε ιστούς. (46, 47, 48)

Οι υποδοχείς Toll, είναι PRRs και εντοπίζουν παθογόνους παράγοντες. Επίσης, ενεργοποιούν ενδοκυτταρικές οδούς μεταγωγής μηνυμάτων που επάγουν την παραγωγή προφλεγμονωδών μεσολαβητών. Οι TLRs, έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν και μοριακά πρότυπα που παράγονται σε βλάβες ιστών ή κατά την κυτταρική απόπτωση. (49)

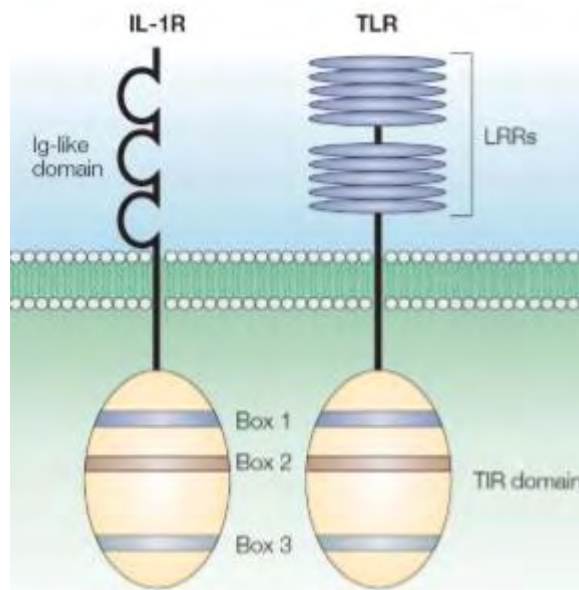
Η ανακάλυψη των TLRs, μας βοήθησε αρκετά να κατανοήσουμε τους μηχανισμούς της φυσικής ανοσιακής αντίδρασης. Η οικογένεια των Toll-Like Receptors, θεωρείται ως ένα από τα πιο παλιά συστήματα ανοσιακής απάντησης.

### 2.3.3 Δομή των Toll-Like Receptors

Οι Toll-Like Receptors, είναι τύπου 1 διαμεμβρανικές πρωτεΐνες και αποτελούνται από τρία μέρη:

- a) Ένα εξωκυττάριο τμήμα, το οποίο είναι πλούσιο σε λευκίνες και είναι υπεύθυνο για την αναγνώριση του συνδέτη
- b) Ένα βραχύ διαμεμβρανικό τμήμα και
- c) Ένα ενδοκυττάριο τμήμα, το οποίο μοιάζει με τον υποδοχέα της IL-1 και ονομάζεται Toll/IL-1 Receptor (TIR). (50, 51)

Το εξωκυττάριο τμήμα, περιέχει 16-28 επαναλαμβανόμενες περιοχές LRRs (Leucine Rich repeats). Το διαμεμβρανικό τμήμα, αποτελείται από 22 μη φορτισμένα αμινοξέα που φτιάχνουν μια α-έλικα, η οποία εκτείνεται στη μεμβράνη. Τέλος, το ενδοκυττάριο τμήμα, περιέχει TIR περιοχές, μήκους 135-160 αμινοξέων. (52, 53)



**Εικόνα 7:** Η δομή ενός Toll-Like Receptor και η δομή ενός υποδοχέα της IL-1. Στην εικόνα, αυτή, παρατηρούμε και την ομοιότητα του ενδοκυττάριου τμήματος των 2 υποδοχέων. (35)

### 2.3.4 Εξωγενείς συνδέτες των Toll-Like Receptors

Ο TLR-4, ήταν ο πρώτος υποδοχέας τύπου Toll που ταυτοποιήθηκε. Το 1998, αποδείχθηκε ότι ο TLR-4 συμμετέχει στην αναγνώριση λιποσακχαριτών (LPS), οι οποίοι αποτελούν συστατικό του τοιχώματος των Gram (-) βακτηρίων. Μετά την ανακάλυψη, αυτή, άρχισε η μελέτη συνδετών και άλλων υποδοχέων τύπου Toll. (38, 54)

Οι Toll – like Receptors, συμπεριλαμβάνονται ανάμεσα στα μόρια του ανοσοποιητικού συστήματος που το κρατούν σε εγρήγορση απέναντι σε λοιμώξεις.

Ο κάθε ένας υποδοχέας τύπου Toll, αναγνωρίζει διαφορετικούς συνδέτες. Οι μέχρι τώρα υποδοχείς που έχουν αναγνωρισθεί, είναι διατηρημένα μικροβιακά προϊόντα που φανερώνουν την παρουσία λοίμωξης.

Ο TLR - 1, 2 & 6, εντοπίζονται στα μακροφάγα και αναγνωρίζουν λιποπεπτίδια των Gram (+) βακτηρίων. Ο TLR-2, επίσης, αναγνωρίζει λιποπρωτεΐνες, λιποτειχοϊκό οξύ(LTA) και γλυκολιπίδια. (46)

Ο TLR – 3, αναγνωρίζει διπλής έλικας RNA ιών, αντίθετα με τον TLR – 8 που αναγνωρίζει μονής έλικας RNA καθώς και μη μεθυλιωμένο βακτηριακό CpG DNA. (55, 56)

Ο TLR – 4, αναγνωρίζει κυρίως ενδοτοξίνες - λιποπολυσακχαρίτες (LPS). Οι λιποπολυσακχαρίτες, αποτελούν εξωκυττάριο στοιχείο στο κυτταρικό τοίχωμα των Gram (-) βακτηρίων και θεωρούνται υπεύθυνοι για την έναρξη της λοίμωξης. (57, 58)

Ο TLR – 5, αναγνωρίζει την flagellin στα Gram (+) και Gram (-) βακτήρια. Η flagellin, είναι μια πρωτεΐνη και προφλεγμονώδης παράγοντας που βρίσκεται στα μαστίγια των βακτηρίων. (46, 59)

Ο TLR – 9, αναγνωρίζει μη μεθυλιωμένο CpG DNA. Το CpG DNA, διεγείρει τα B - λεμφοκύτταρα, τα μακροφάγα και τα δένδριτικά, τα οποία παράγουν κυτταροκίνες.

Οι TLR – 7 & 8, αναγνωρίζουν φαρμακευτικούς παράγοντες όπως για παράδειγμα την Imiquimod. Η χρήση της Imiquimod, συμβάλει στην θεραπεία των κονδυλωμάτων που οφείλονται στον HPV. (46, 60)

Για τον TLR – 10 και τον TLR – 11, δεν έχει διευκρινιστεί ακόμα η δράση τους και οι αντίστοιχοι συνδέτες τους.

Receptor	Ligand	Origin of ligand
TLR1	Triacyl lipopeptides Soluble factors	Bacteria and mycobacteria <i>Neisseria meningitidis</i>
TLR2	Lipoprotein/lipopeptides Peptidoglycan Lipoteichoic acid Lipoarabinomannan Phenol-soluble modulin Glycoinositolphospholipids Glycolipids Porins Atypical lipopolysaccharide Atypical lipopolysaccharide Zymosan Heat-shock protein 70*	Various pathogens Gram-positive bacteria Gram-positive bacteria Mycobacteria <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Trypanosoma cruzi</i> <i>Treponema maltophilum</i> <i>Neisseria</i> <i>Leptospira interrogans</i> <i>Porphyromonas gingivalis</i> Fungi Host
TLR3	Double-stranded RNA	Viruses
TLR4	Lipopolysaccharide Taxol Fusion protein Envelope protein Heat-shock protein 60* Heat-shock protein 70* Type III repeat extra domain A of fibronectin* Oligosaccharides of hyaluronic acid* Polysaccharide fragments of heparan sulphate* Fibrinogen*	Gram-negative bacteria Plants Respiratory syncytial virus Mouse mammary-tumour virus <i>Chlamydia pneumoniae</i> Host Host Host Host Host
TLR5	Flagellin	Bacteria
TLR6	Diacyl lipopeptides Lipoteichoic acid Zymosan	<i>Mycoplasma</i> Gram-positive bacteria Fungi
TLR7	Imidazoquinoline Loxoribine Bropiramine Single-stranded RNA	Synthetic compounds Synthetic compounds Synthetic compounds Viruses
TLR8	Imidazoquinoline Single-stranded RNA	Synthetic compounds Viruses
TLR9	CpG-containing DNA	Bacteria and viruses
TLR10	N.D.	N.D.
TLR11	N.D.	Uropathogenic bacteria

**Εικόνα 8:** Αναλυτικός πίνακας με τους TLRs και τους αντίστοιχους εξωγενείς συνδέτες τους. (35)

### 2.3.5 Μονοπάτια σηματοδότησης των Toll – Like Receptors

Τα μονοπάτια σηματοδότησης που παίρνουν μέρος οι TLRs, είναι δύο. Το πρώτο, ονομάζεται «Μονοπάτι σηματοδότησης εξαρτώμενο από την MyD88» και το δεύτερο «Μονοπάτι σηματοδότησης ανεξάρτητο από την MyD88».

#### i. Μονοπάτι σηματοδότησης εξαρτώμενο από την MyD88

Το μονοπάτι, αυτό, ξεκινάει από την Myeloid Differentiation factor 88 (MyD88) και καταλήγει στην ενεργοποίηση του NF - κB. Η MyD88 είναι πρωτεΐνη που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην έμφυτη ανοσία και την ανοσοαπόκριση. Ο NF - κB, είναι ο παράγοντας που ρυθμίζει την έκφραση πολλών γονιδίων, με βασικό ρόλο στην μη ειδική ανοσία. Όλοι οι Toll – Like Receptors, εκτός του TLR – 3, χρησιμοποιούν την MyD88.

Αρχικά, η πρωτεΐνη MyD88 είναι το μόριο που ενεργοποιεί τους TLRs, μέσω της συμμετοχής της στο μονοπάτι μετάδοσης σήματος. Το τμήμα TIR της πρωτεΐνης συνδέεται με το αντίστοιχο τμήμα του TLR. Για την μετάδοση σήματος, όμως, από τον TLR – 2 και TLR – 4, χρειάζεται ένα επιπλέον μόριο, η πρωτεΐνη MAL (MyD88 adaptor – like receptor). Το άλλο άκρο της MyD88, αντιδρά με την κινάση IRAK – 4 και εν συνεχεία γίνεται φωσφορυλίωση της IRAK – 1, η οποία αντιδρά με τον παράγοντα TRAF – 6. Το σύμπλοκο, MyD88 – IRAK 1 – TRAF 6, ξεκινά μια σειρά σηματοδοτικών γεγονότων, που περιλαμβάνουν τα μόρια TAB –1 και 2 και TAK – 1, που οδηγούν στην ενεργοποίηση του NF – κB. (35, 61, 62)

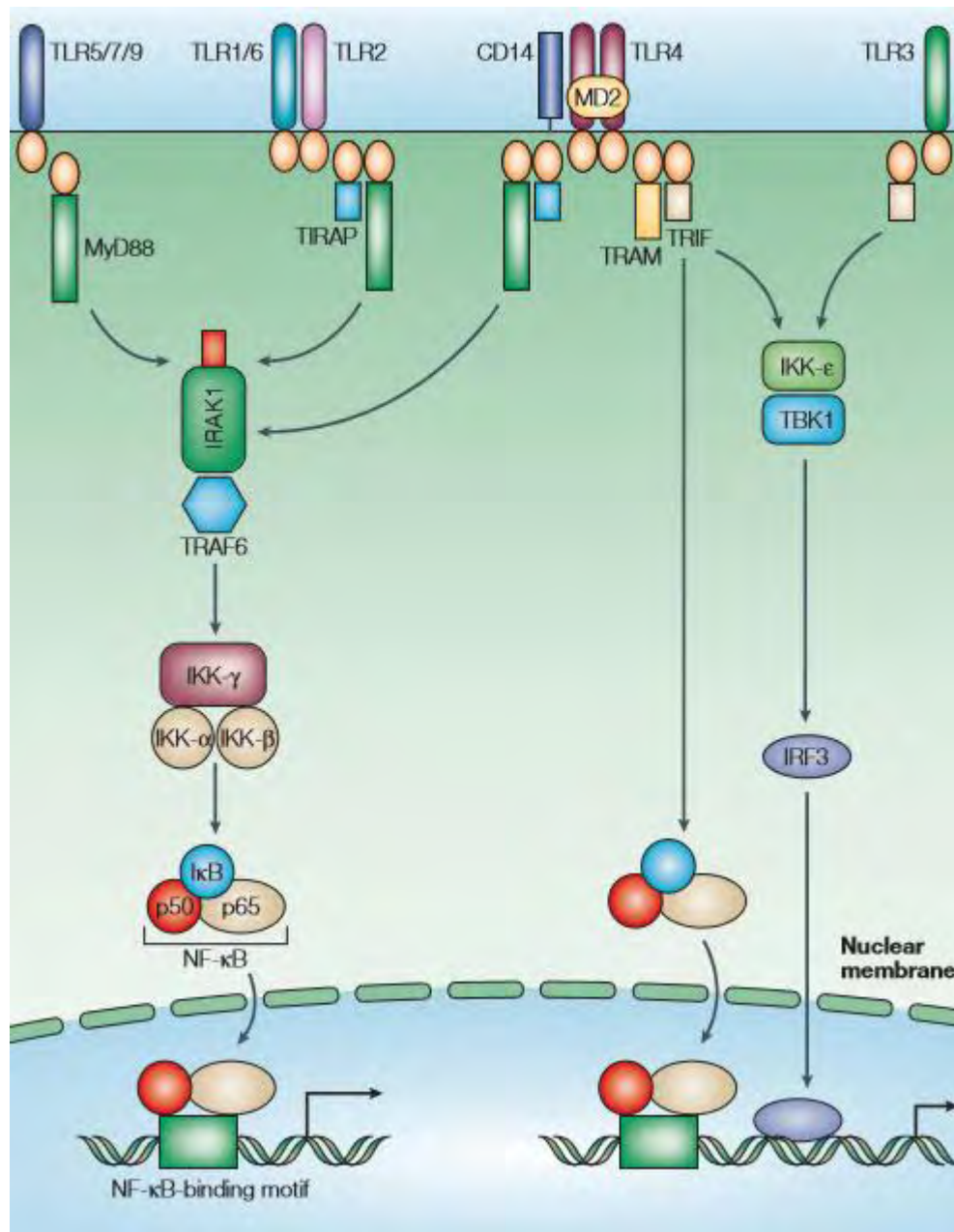
#### ii. Μονοπάτι σηματοδότησης ανεξάρτητο από την MyD88

Ο TLR -3 και εναλλακτικά, σε ορισμένες περιπτώσεις, ο TLR – 4, χρησιμοποιούν το μονοπάτι αυτό. Το σήμα μεταδίδεται στο μόριο TRIF, από τον TLR -3 ή από τον TLR -4 μέσω του TRAM. Στη συνέχεια, ο TRIF, αντιδρά με διάφορα μόρια για να ενεργοποιηθούν οι IR3, IRF7 ή ο NF – κB.

Ο TRIF, αλληλοεπιδρά με την κινάση TBK – 1, με το N – άκρο του, και στη συνέχεια γίνεται η ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων IRF -3 και IRF – 7 για να γίνει η παραγωγή της ιντερφερόνης (ιντερφερόνη - α, IFN – α ).

Οι Ιντερφερόνες είναι γλυκοπρωτεΐνες που εκκρίνονται από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Ανήκουν στις κυτταροκίνες και η κύρια δράση τους είναι η προστασία έναντι των ιογενών λοιμώξεων και των κακοήθων νεοπλασιών.

Η ενεργοποίηση του NF – κB από τον TRIF, γίνεται με δύο τρόπους, με την σύνδεση του παράγοντα TRAF – 6 με το N – άκρο του TRIF και με την αλληλεπίδραση του παράγοντα RIP – 1 με το C – άκρο του. (61)

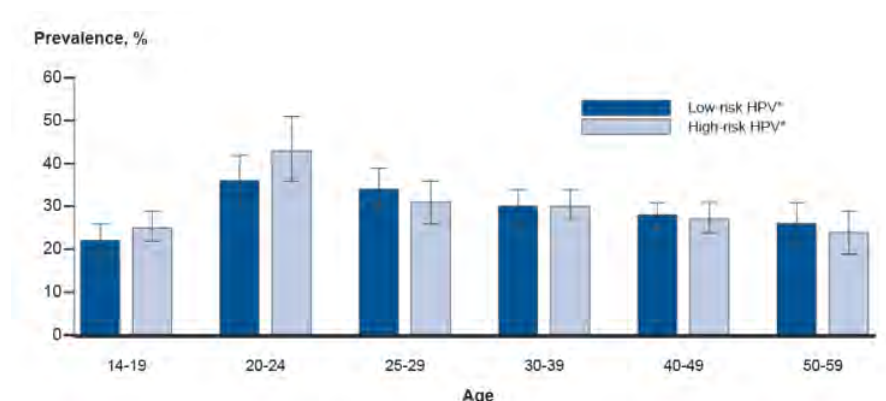


**Εικόνα 9:** Η δράση των Toll – like Receptors, με τα δύο διαφορετικά μονοπάτια σηματοδότησης. (35)

## Κεφάλαιο 3: Συσχέτιση των TLRs με την HPV λοίμωξη και καρκίνος

### 3.1 HPV και καρκίνος του τραχήλου της μήτρας

Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας (KTM) είναι ο τέταρτος σε σειρά συχνότητας που εμφανίζεται στις γυναίκες σε παγκόσμια κλίμακα. Η προσβολή του KTM εκτιμήθηκε σε 530.000 περιπτώσεις το 2008 παγκοσμίως. Τα ποσοστά προσβολής έχουν μεγάλες διακυμάνσεις μεταξύ των περιοχών και κυμαίνονται σε λιγότερο από 6 ανά 100.000 γυναίκες στη Βόρεια Αμερική, τη Δυτική Ασία και την Αυστραλία ενώ σε μέρη της Αφρικής πάνω από 30 ανά 100.000 γυναίκες. Παρά τις σημαντικές προόδους στην Ευρώπη τις τελευταίες δεκαετίες περίπου 34.000 νέες περιπτώσεις KTM και 13.000 θάνατοι από την ασθένεια εμφανίζονται ετησίως στην Ευρωπαϊκή Ένωση. (63) Ο επιπολασμός της λοίμωξης εκτός από τις διακυμάνσεις που παρουσιάζει μεταξύ των γεωγραφικών περιοχών, ποικίλλει και με βάση την ηλικία, με την συχνότερα προσβεβλημένη αυτή των 24-25 ετών ενώ φθίνει με την αύξηση της ηλικίας. (64)



**Εικόνα 10:** Επιπολασμός της λοίμωξης HPV (χαμηλού και υψηλού κινδύνου) με βάση την ηλικία. (65)

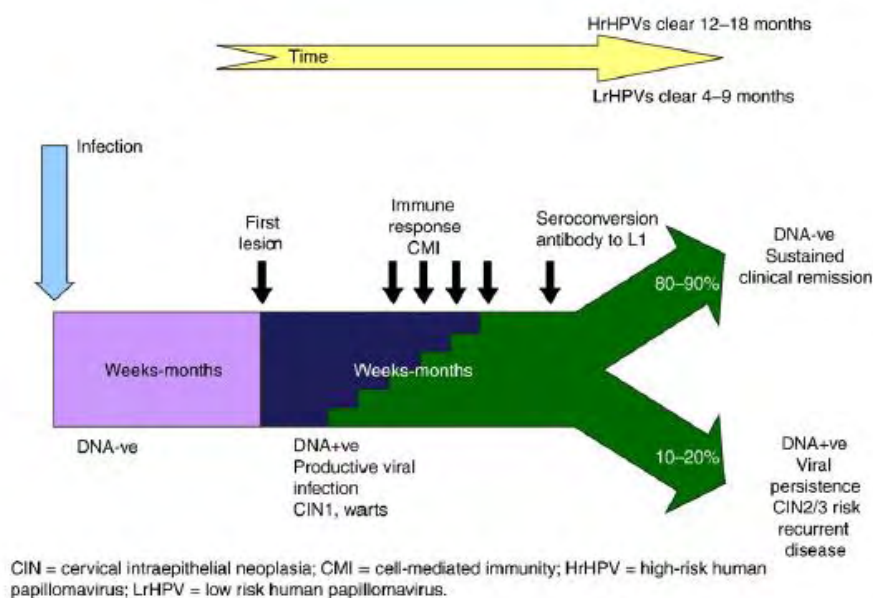
Οι παράγοντες κινδύνου που στο παρελθόν ενοχοποιήθηκαν για την εμφάνιση του KTM είναι το κάπνισμα, η λήψη αντισυλληπτικών φαρμάκων για πάνω από 5 χρόνια, η λοίμωξη από τον ιό της Ανθρώπινης Ανοσοανεπάρκειας (HIV) και η νόσος του AIDS, η μεταμόσχευση οργάνων και η ύπαρξη ενός συγγενή πρώτου βαθμού. Ωστόσο σήμερα ένας βασικός αιτιολογικός παράγοντας στην ανάπτυξη του KTM θεωρείται η επίμονη μόλυνση από ορισμένους τύπους του ανθρώπινου ιού των θηλωμάτων (HPV). (63)

Ο HPV ανήκει στην οικογένεια των ιών των θηλωμάτων και η ταξινόμηση των HPV είναι ιδιαίτερα σημαντική για τους εξής λόγους: Αρχικά, μόνο ένα συγκεκριμένο είδος του HPV σχετίζεται με KTM και έπειτα η παθογένεια του HPV ποικίλλει ανάλογα με τον γονότυπο. Ο HPV κατηγοριοποιείται σε 5 γένη (alpha, beta, gamma, mu, και nu) και το γένος Alpha papillomavirus περιλαμβάνει τους γονότυπους του HPV που προσβάλλουν τόσο την γεννητική όσο και την στοματική περιοχή.

Επιπρόσθετα, ο HPV μπορεί να κατηγοριοποιηθεί σε δύο κατηγορίες, στον τύπο υψηλού κινδύνου (HrHPV) και στον τύπο χαμηλού κινδύνου (LrHPV), με βάση την ογκογενετική του ικανότητα. Ανάμεσα στους 14 HrHPV γονότυπους, οι δύο πιο κοινοί (HPV 16 και 18) αποτελούν αιτιολογικούς παράγοντες για το 71% των ΚΤΜ. Δύο LrHPV (HPV 6 και 11) συμβάλλουν στην δημιουργία των κονδυλωμάτων στην γεννητική περιοχή. (66)

Η μόλυνση από τον ιό HPV οδηγεί σε τρία πιθανά αποτελέσματα. Είτε οδηγεί στην ανάπτυξη κονδυλωμάτων (σχετίζονται με τον HPV6 και 11), είτε παραμένει ως λανθάνουσα λοίμωξη που λίγα άτομα γνωρίζουν ότι μολύνθηκαν, είτε δημιουργείται ενεργή λοίμωξη (σχετίζεται με τον HPV υψηλού κινδύνου).

Μια συνολική παρουσίαση του ιστορικού μόλυνσης της γεννητικής περιοχής από τον HPV παρουσιάζεται στην εικόνα 2. Ο HPV είναι υψηλής μολυσματικότητας ιός, με μια περίοδο επώασης 3 εβδομάδες-8 μήνες ή περισσότερο. Περίπου 2-3 μήνες μετά τη μόλυνση είναι η περίοδος που τα περισσότερα άτομα αναπτύσσουν κονδυλώματα στα γεννητικά τους όργανα. Αυτόματη υποχώρηση των κονδυλωμάτων συμβαίνει στο 10-30% των ασθενών μέσα σε 3 μήνες και οφείλεται στην ανοσιακή αντίδραση του ξενιστή. Μετά την παρέλευση των κονδυλωμάτων, η λοίμωξη παραμένει σε υποκλινική κατάσταση. Η μόλυνση με υψηλού κινδύνου HPV (HrHPV), όπως είναι οι τύποι 16 και 18, ακολουθεί την ίδια πορεία με την μόλυνση από χαμηλού κινδύνου HPV (LrHPV), όπως είναι οι τύποι 6 και 11, με διαφορά στον χρόνο υποχώρησης των κλινικών συμπτωμάτων, που είναι 12-18 μήνες για τους HrHPV και 4-9 για τους LrHPV. Δυστυχώς οι βλάβες που παραμένουν (επίμονες λοιμώξεις) είναι αυτές που σχετίζονται με την ανάπτυξη τραχηλικής ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας (CIN – Cervical Intraepithelial Neoplasia) και επιθετικούς καρκίνους. (66)



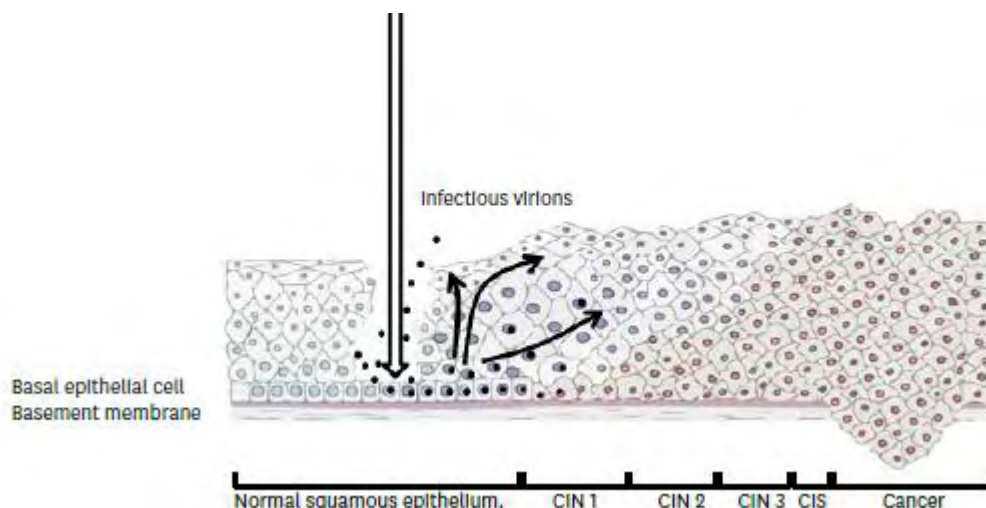
**Εικόνα 11:** Ιστορικό μόλυνσης από τον HPV. (66)

Παρόλο που οι σεξουαλικά ενεργές γυναίκες προσβάλλονται κατά μέσο όρο μια φορά στην ζωή τους από το ιό HPV, λιγότερο από το 10% των γυναικών προσβάλλεται μόνιμα, και ουσιαστικά η ‘μόνιμη’ προσβολή (επίμονη λοίμωξη) από υψηλού κινδύνου γονότυπο HPV (HrHPV), είναι που συμβάλει στην ανάπτυξη του ΚΤΜ. (67, 68)



Οι HPV προσβάλλουν τα επιθηλιακά κύτταρα της βασικής στιβάδας του δέρματος και των βλεννογόνων και διακρίνονται σε δερματικούς και βλεννογόνους. Ο βλεννογόνιος HPV για να μολύνει τα βασικά επιθηλιακά κύτταρα του βλεννογόνου του τραχήλου της μήτρας, συνήθως απαιτείται ένα ήπιο τραύμα που θα επιτρέψει την εισβολή του στον οργανισμό. Με την εισβολή του στα κύτταρα ο ιός αντιγράφει το γονιδίωμα του και αυτό προωθείται στις ανώτερες στιβάδες του επιθηλίου καθώς τα κύτταρα διαφοροποιούνται. Στις ανώτερες στιβάδες του επιθηλίου ο ιός αντιγράφεται με πιο έντονο ρυθμό από ότι στα κύτταρα της βασικής στιβάδας και δημιουργεί ένα μεγάλο αριθμό αντιγράφων. Ο ιός HPV είναι απαραίτητο να χρησιμοποιήσει τις πρωτεΐνες του κυττάρου ξενιστή προκειμένου να μεταγραφεί και αναδιπλασιαστεί το γονιδίωμα του.

Αφού αναδιπλασιαστεί το DNA του ιού, στα βασικά κύτταρα μεταγράφονται τα πρώιμα γονίδια E6 και E7 και εκφράζονται οι ογκοπρωτεΐνες E6 και E7. Οι E6 και E7 πρωτεΐνες του ιού έχουν ονομαστεί και ογκογονίδια, καθώς δεσμεύουν και απενεργοποιούν την p53 και την p105. Συγκεκριμένα, το E6 ογκογονίδιο δεσμεύει την p53 και οδηγεί στην αποδόμηση, ενώ το E7 δεσμεύει και οδηγεί στην απενεργοποίηση της p105. Η ογκογενετική αυτή δράση γίνεται κατανοητή καθώς οι πρωτεΐνες αυτές (p53 και p105) είναι σταθεροποιητικοί παράγοντες της κυτταρικής ανάπτυξης και χωρίς αυτές το κύτταρο είναι ευάλωτο σε μεταλλάξεις, χρωμοσωματικές ανωμαλίες, αυξάνεται η αντίσταση του κυττάρου στην απόπτωση και η χρωμοσωμική αστάθεια. Επομένως το κύτταρο είναι περισσότερο ευαίσθητο στην μετατροπή του σε καρκινικό. Τα όψιμα γονίδια L του ιού εκφράζονται στις ανώτερες στιβάδες του επιθηλίου και παράγονται οι πρωτεΐνες L1 και L2, που είναι οι δομικές πρωτεΐνες του καψιδίου του ιού. (69)



**Εικόνα 12:** Σχηματική αναπαράσταση της ανάπτυξης καρκινώματος στον τράχηλο της μήτρας. Ο ιός HPV προσβάλλει τα κύτταρα της βασικής στιβάδας του επιθηλίου του τραχήλου και συμβάλλει στην ανάπτυξη τραχηλικού καρκινώματος.

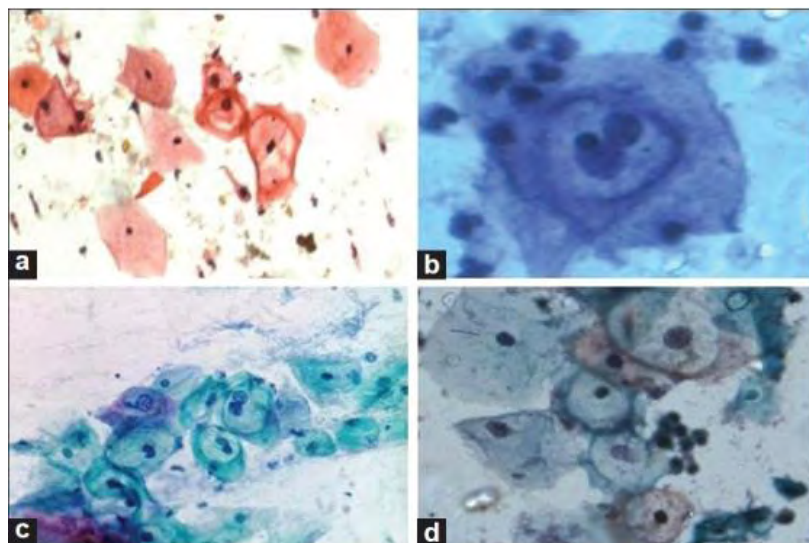
CIN: ενδοεπιθηλιακή τραχηλική νεοπλασία,

CIS (Carcinoma in Situ): καρκίνωμα in situ. (70)

Ο ΚΤΜ θεωρείται ότι οφείλεται σε πρώιμες ενδοεπιθηλιακές δυσπλασίες (CIN) ή πλακώδεις επιθηλιακές βλάβες (SIL – Squamous Intraepithelial Lesion). Όλες οι βλάβες CIN δεν εξελίσσονται σε καρκινώματα, μπορεί να παραμείνουν ως έχουν ή να υποχωρήσουν. Ωστόσο μπορούν να εξελιχθούν και σε υψηλότερου βαθμού. Αυτό εξαρτάται από τον τύπο του HPV και την εντόπιση του. Οι προκαρκινικές αλλοιώσεις αυτές, με βάση την ιστολογική τους εικόνα ταξινομούνται σε CIN1 (ήπια δυσπλασία), CIN2 (μέτρια δυσπλασία) και CIN3 (σοβαρή δυσπλασία και καρκίνωμα in situ). (71) Είναι σημαντικό να επισημανθεί ότι η μόλυνση από τον ιό HPV δεν οδηγεί απαραίτητα σε ΚΤΜ, όμως για την ανάπτυξη ΚΤΜ είναι απαραίτητη η προηγούμενη μόλυνση από τον HPV.

Από όλα τα παραπάνω αποφαίνεται η σπουδαιότητα της πρώιμης ανίχνευσης του ιού ή των βλαβών που έχει προκαλέσει με σκοπό να αναχαιτιστεί η περαιτέρω εξέλιξη της νόσου. Δείγματα από τον τράχηλο της μήτρας χρησιμοποιούνται για να καθορίζουν την μόλυνση από τον ιό HPV και πολλές HPV δοκιμασίες είναι σήμερα διαθέσιμες και έχουν εγκριθεί από τον FDA. (72) Το Τεστ Παπανικολάου (pap test) είναι το πρώτο που εφαρμόστηκε, πριν από 50 χρόνια. Με το τεστ Παπανικολάου γίνεται προσπάθεια να ανιχνευθούν τα κύτταρα που έχουν μολυνθεί από τον ιό (κοιλοκύτταρα, διπύρηνα,).

Στην εικόνα, παρακάτω, παρουσιάζονται τα κοιλοκύτταρα, που είναι χαρακτηριστικά κύτταρα της λοίμωξης προσβεβλημένα από το HPV. Τα κύτταρα αυτά είναι μεγάλα κερατινοκύτταρα, τα οποία έχουν συμπυκνωμένους πυρήνες και γύρω διανυγή άλω.



**Εικόνα 13:** Pap Test. Κοιλοκύτταρα. (73)

Το 2012, οι οδηγίες της American Cancer Society για την πρόωρη ανίχνευση του τραχηλικού καρκίνου συμπεριλαμβάνουν δοκιμασίες που αναγνωρίζουν το DNA του ιού σε συνδυασμό με την κυτταρολογική εξέταση προκειμένου να μελετηθούν περαιτέρω τα μη φυσιολογικά ευρήματα των κυττάρων. Αυτή η προτεινόμενη χρήση του γονιδιώματος του ιού έχει ενσωματωθεί στην τρέχουσα κλινική πρακτική. Σύμφωνα με τις οδηγίες του National Comprehensive Cancer Network, ο συνδυασμός αυτών των δύο δοκιμασιών, δηλαδή της κυτταρολογικής εξέτασης με το τεστ Παπανικολάου και της ανίχνευσης του DNA γονιδιώματος του ιού αποτελεί τη μέθοδο

πρώτης γραμμής ελέγχου και απεικόνισης του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, και προτείνεται να εφαρμόζεται σε γυναίκες ηλικίας 30-65 ετών κάθε 5 χρόνια.

Το κύριο πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι αναγνωρίζονται με μεγάλη ευαισθησία οι περιοχές CIN. Ωστόσο, υπάρχουν πολλές αντιπαραθέσεις όσον αφορά τη μέθοδο που πρέπει να επιλέγεται σε γυναίκες με φυσιολογικά κυτταρολογικά ευρήματα, που όμως είναι θετικές στον ιό HPV. Προτείνεται είτε το τεστ Παπανικολάου ύστερα από 12 μήνες για επανέλεγχο, είτε η προσπάθεια εύρεσης του γονιδιώματος των HPV16 και 18. Εάν δεν ανιχνευτούν αυτοί οι ιοί προτείνεται εκ νέου επανέλεγχος ύστερα από 12 μήνες, ενώ αν ανιχνευτούν προτείνεται περαιτέρω εξέταση με κολποσκόπηση. (74, 75)

Με τις παραπάνω μεθόδους στόχος είναι να ανιχνευτεί ο ιός σε πρώιμο στάδιο και προληφθεί η περαιτέρω εξέλιξη της λοίμωξης σε καρκίνωμα. Σπουδαίο επίτευγμα αποτελεί ο εμβολιασμός ενάντια του ιού HPV όπου για πρώτη φορά είναι εφικτή η πρωτογενής πρόληψη της νόσου. Τα προφυλακτικά εμβόλια στοχεύουν την πρωτεΐνη L1 για την πρόληψη της μόλυνσης, ενώ τα θεραπευτικά εμβόλια τις E6 και E7 για την πρόληψη της νόσου. Η ανίχνευση του γονιδιώματος του HPV είναι σημαντική για την επιλογή των ατόμων που μπορούν να εμβολιαστούν με ασφάλεια και αποτελεσματικότητα. (76) Και αυτό γιατί τα εμβόλια που προλαμβάνουν την μόλυνση από τον HPV δεν είναι αρκετά αποτελεσματικά στις γυναίκες που ήδη έχουν προσβληθεί από τον ιό, για αυτό και ο εμβολιασμός των ήδη προσβεβλημένων ατόμων είναι υπό περαιτέρω μελέτη. (77) Τα θεραπευτικά εμβόλια θα πρέπει να είναι ικανά να δημιουργούν ανοσολογική μνήμη (ανοσοποίηση έναντι των πρωτεϊνών E6 και E7 του ιού) ώστε να βοηθήσουν στην πρόληψη της υποτροπής της νόσου. (78) Πολλά από τα εμβόλια που μελετώνται επί του παρόντος περιέχουν τα ογκογονίδια E6 / E7 συγκεκριμένων γονότυπων HPV υψηλού κινδύνου (ιδιαίτερα HPV 16 και 18) και προκαλούν μια ισχυρή κυτταρική ανοσιακή απάντηση που εξαλείφει τις σχετιζόμενες με HPV αλλοιώσεις. (76) Για αυτό και είναι απαραίτητο να διεξάγεται έλεγχος του DNA του ιού για να εντοπιστούν άτομα με τύπους HPV υψηλού κινδύνου (ιδιαίτερα HPV 16 και 18) που θα επωφεληθούν από τη λήψη ενός θεραπευτικού εμβολίου.

### 3.2 HPV και καρκίνος της κεφαλής



**Εικόνα 14:** HPV – Head and Neck Cancer (125)

Η συχνότητα εμφάνισης πλακωδών καρκινωμάτων της στοματικής κοιλότητας και του στοματοφάρυγγα έχει αυξηθεί τις τελευταίες δεκαετίες στον δυτικό κόσμο. (79) Πιο συγκεκριμένα, η συχνότητα εμφάνισης καρκινωμάτων της υπερώιας αμυγδαλής και της βάσης της γλώσσας έχει αυξηθεί, ενώ στις άλλες περιοχές της στοματικής κοιλότητας και του στοματοφάρυγγα παραμένει ίδια ή έχει μειωθεί. (80)

Ο ιός των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV) που θεωρείται υπεύθυνος για την αυξανόμενη αυτή τάση, έχει προταθεί ως ένας σημαντικός παράγοντας κινδύνου ειδικά για την ανάπτυξη των καρκινωμάτων της υπερώιας σταφυλής και της βάσης της γλώσσας. Παρόλο που η συχνότητα εμφάνισης πλακωδών καρκινωμάτων του στοματοφάρυγγα έχει αυξηθεί, έχει παρατηρηθεί ευνοϊκότερη πρόγνωση σε αυτά σε σύγκριση με παρόμοιες, αλλά μη σχετιζόμενες με τον HPV βλάβες. (81) Ένας από τους λόγους που οι HPV θετικοί όγκοι ανταποκρίνονται καλύτερα στη θεραπεία είναι ότι έχουν μεγαλύτερη ακτινοευαισθησία. (82) Επειδή οι όγκοι είναι ικανοί να διαταράξουν το ανοσοποιητικό σύστημα, οι λειτουργίες του ανοσοποιητικού συστήματος υπό την επίδραση νεοπλασμάτων βρίσκονται σε συνεχή έρευνα. Έχει προταθεί ότι μεταβολές στην έκφραση των υποδοχέων TLR που προκαλούνται από την μόλυνση από τον HPV, μπορούν να διαδραματίσουν έναν σημαντικό ρόλο στην ανοσολογική απάντηση στο προκαρκινικό περιβάλλον. (83)

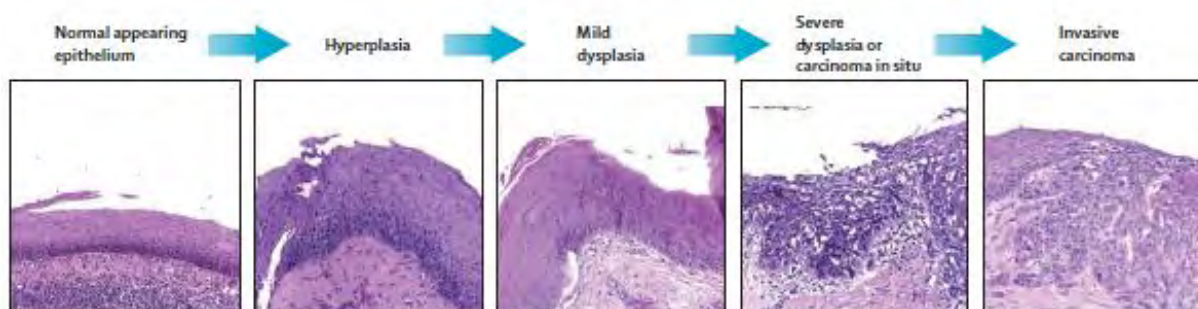
Ο καρκίνος της κεφαλής και του τραχήλου είναι μια ετερογενής ομάδα κακοηθειών της ανώτερης πεπτικής και αναπνευστικής οδού και αποτελεί τον έβδομο σε σειρά εμφάνισης παγκοσμίως. (84) Τα καρκινώματα της κεφαλής (ΚΚ) περιλαμβάνουν όγκους της στοματικής κοιλότητας (π.χ. των χειλέων, των ούλων, της σκληρής υπερώας, του εδάφους του στόματος, του οπισθογόμφιου τριγώνου) και του στοματοφάρυγγα. (85) Στην πλειοψηφία τους είναι καρκινώματα που αφορούν τα πλακώδη κύτταρα του επιθηλίου. (86)

Υπάρχουν οι εξής κύριοι αιτιολογικοί παράγοντες για την εμφάνιση των ΚΚ: η χρήση του καπνού και η υπέρμετρη κατανάλωση αλκοόλ, καθώς και ο ιός HPV. Στο παρελθόν οι περισσότεροι ΚΚ οφείλονταν στην χρήση του καπνού και του αλκοόλ, αλλά την τελευταία δεκαετία ο HPV έχει αναγνωριστεί ως μια πρωταρχική αιτία. Τα ΚΚ, είτε είναι θετικά είτε αρνητικά στον HPV, εμφανίζονται συχνότερα στους άντρες και παρατηρείται αύξηση της εμφάνισης τους με την πάροδο της ηλικίας. (87)

Στον φυσιολογικό στοματικό βλεννογόνο έχουν ανιχνευτεί οι ακόλουθοι τύποι του HPV: HPV 2, 6, 7, 11, 13, 16, 18, 31, 33 και 35. Η σημασία της παρουσίας του HPV στον φαινομενικά φυσιολογικό στοματικό βλεννογόνο δεν έχει διευκρινιστεί ακόμα. Ως τώρα, σε καλοήθεις και κακοήθεις στοματικές βλάβες έχουν ανιχνευτεί 24 τύποι: HPV 1, 2, 3, 4, 6, 7, 10, 11, 13, 16, 18, 31, 32, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 55, 56, 57, 58, 59, 66, 69, 72, και 73 και ως κυρίαρχος ογκογενετικός τύπος θεωρείται ο HPV 16. (88)

Τα στοματοφαρυγγικά καρκινώματα που σχετίζονται με τον HPV έχουν γενικά ευνοϊκή πρόγνωση, ωστόσο η προγνωστική σημασία της ύπαρξης του ιού παραμένει άγνωστη, καθώς η καλύτερη αυτή πρόγνωση μπορεί να σχετίζεται με το νεαρό της ηλικίας, το γεγονός ότι το ΚΚ ήταν σε αρχικό στάδιο όταν διαγνώστηκε κ.ά. Πράγματι υπάρχουν δεδομένα που υποστηρίζουν ότι τα ΚΚ που είναι θετικά στον HPV είναι λιγότερο επιθετικά από τα αρνητικά στον HPV ΚΚ. Παρόλα αυτά ο HPV δεν χρησιμοποιείται στην σταδιοποίηση των ΚΚ. (89)

Μια πληθώρα γενετικών μεταβολών, που οδηγεί στην απενεργοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων ή στην ενεργοποίηση των πρωτο-ογκογονιδίων, ή και τα δύο σε συνδυασμό, ευθύνονται για την ανάπτυξη ΚΚ.



**Εικόνα 15:** Απεικόνιση της φαινοτυπικής αλληλουχίας κατά την καρκινογένεση ΚΚ. (90)

Ήδη από το 1983, υπάρχει μια αρχική παρατήρηση και υπόθεση κατά την οποία ο HPV αποτελεί παράγοντα κινδύνου για ένα σύνολο καρκίνων του στόματος. (91) Από τότε, αρκετές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στην ανίχνευση του HPV σε στοματικές καρκινικές βλάβες, αλλά τα αποτελέσματα ήταν αντιφατικά.



Ο καπνός, η μεγάλη κατανάλωση αλκοόλ και η μόλυνση από τον HPV16 (ίσως και από τον HPV18), είναι οι κύριοι παράγοντες κινδύνου για τον καρκίνο της κεφαλής και του τραχήλου στις Η.Π.Α. Ωστόσο, η συσχέτιση των παραγόντων αυτών με τον καρκίνο επηρεάζεται από τις διάφορες ανατομικές περιοχές. (92)

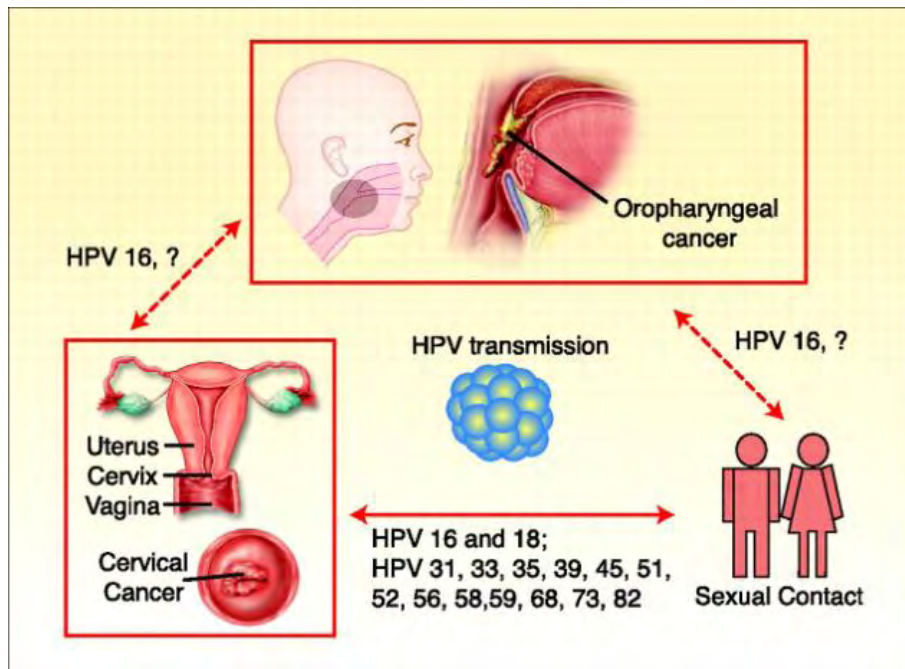
Οι HPV σχετιζόμενοι καρκίνοι της κεφαλής εμφανίζονται συχνότερα στον στοματοφάρυγγα, στην παρωτίδα και στην βάση της γλώσσας. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι υπάρχουν σημαντικές αυξήσεις των HPV σχετιζόμενων καρκίνων της κεφαλής, κυρίως ανάμεσα στους μη ισπανόφωνους λευκούς και μαύρους άρρενες. Οι Peterson et. al (2017), (93) στα αποτελέσματα τους υποστηρίζουν ότι ο κίνδυνος για την ανάπτυξη πλακώδους καρκινώματος της κεφαλής είναι μεγαλύτερος για τους μη ισπανόφωνους λευκούς άντρες σε σχέση με τους μαύρους, και ειδικά όταν η διάγνωση γίνεται σε νεαρή ηλικία. Αυτές οι μεταβολές στην συχνότητα εμφάνισης σχετίζονται με τις σεξουαλικές συμπεριφορές των ατόμων που ευνοούν τη στοματική HPV μόλυνση. (94) Η μόλυνση της στοματικής κοιλότητας από τον HPV είναι ισχυρά συνδεδεμένη με ένα πλήθος σεξουαλικών συμπεριφορών, και κυρίως σχετίζεται με τον αριθμό των συνολικών συντρόφων που έχει πραγματοποιηθεί στοματική σεξουαλική επαφή κατά τη διάρκεια της ζωής του ατόμου. (95)

Πράγματι, σε πολλές μελέτες, ο μεγάλος αριθμός των πρόσφατων ή συνολικών συντρόφων με τους οποίους πραγματοποιήθηκε στοματική σεξουαλική επαφή σχετίστηκε με αυξημένα ποσοστά εμφάνισης HPV στη στοματική κοιλότητα. (96, 97) Ωστόσο, επειδή το θέμα των σεξουαλικών συμπεριφορών αποτελεί γενικά ταμπού, είναι δύσκολο να διευκρινιστεί με ποιον τρόπο γίνεται η μετάδοση από την γεννητική περιοχή στο στόμα. (98)

Οι D'Souza et. al (2014) υποστηρίζουν ότι η ανίχνευση του ογκογενετικού DNA του ιού είναι συχνή στους ασθενείς με HPV σχετιζόμενο στοματοφαρυγγικό καρκίνωμα, αλλά όχι στους συντρόφους τους. Οι σύντροφοι μπορεί επανειλημμένα να έχουν εκτεθεί στον HPV, ωστόσο δεν εμφάνισαν στοματοφαρυγγικό καρκίνωμα. Αυτό το μικρό ποσοστό ανίχνευσης του HPV στους συντρόφους είναι αξιοσημείωτο καθώς προτείνεται ότι οι περισσότεροι σύντροφοι έχουν αυτοϊαθεί από τις στοματικές HPV μολύνσεις που μπορεί να έχουν αποκτήσει.

Και αυτά τα αποτελέσματα έρχονται σε συνάφεια με άλλες μελέτες που υποστηρίζουν ότι τα περισσότερα άτομα είναι ικανά να αυτοϊαθούν από τις στοματικές HPV λοιμώξεις μέσα σε ένα με δύο χρόνια. (99, 100)

Παρόλο που η HPV μόλυνση έχει συσχετισθεί με την ανάπτυξη ΚΚ, τα κυτταρικά και μοριακά δεδομένα που θα επιβεβαιώσουν αυτή την αιτιολογική σχέση δεν έχουν ολοκληρωθεί ακόμα. Παρά την έλλειψη αυτών των δεδομένων, τα πλακώδη ΚΚ στα οποία ανιχνεύεται το DNA του ιού έχουν ορισμένα ιδιαίτερα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά τα οποία δεν είναι ευδιάκριτα στα HPV-αρνητικά ΚΚ. Τα HPV-θετικά ΚΚ, ειδικά αυτά που σχετίζονται με τον HPV 16 ή άλλους υψηλού κινδύνου γονότυπους του ιού ανευρίσκονται κυρίως στον στοματοφάρυγγα και έχουν ευκρινή και ξεχωριστά επιδημιολογικά, κλινικά, ιστοπαθολογικά και προγνωστικά χαρακτηριστικά. (101)



**Εικόνα 16:** Σχηματική απεικόνιση της μετάδοσης HPV. Τα βέλη αναπαριστούν πιθανές οδούς μετάδοσης στους διάφορους τύπους HPV. Το βέλος αναπαριστά την μετάδοση που είναι κατανοητή από τις υπάρχουσες έρευνες, ενώ τα διακεκομμένα βέλη τις πιθανές οδούς που βρίσκονται ακόμα υπό διερεύνηση. (102)

Οι HPV ογκοπρωτεΐνες E6 και E7 του ιού, που έχουν αναφερθεί στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας και είναι υπεύθυνες για την αδρανοποίηση ενός αριθμού κατασταλτικών γονιδίων και την προώθηση και ενίσχυση του κυτταρικού κύκλου, έχουν επίσης ανευρεθεί και στα πλακώδη ΚΚ. Επομένως, η συσχέτιση της στοματικής λοίμωξης από τον ιό HPV και του καρκίνου της κεφαλής και του τραχήλου είναι μεγάλης σημασίας, γιατί διευκολύνει την έγκαιρη ανίχνευση των ΚΚ και τον προσδιορισμό των ατόμων που διατρέχουν υψηλό κίνδυνο για την εμφάνιση ΚΚ. Γιατί η ανίχνευση του HPV στο στόμα είναι μια απλή, εύκολη, ευαίσθητη και μη επεμβατική διαδικασία που γίνεται διαμέσου του σάλιου. (102)

Τα θεραπευτικά εμβόλια κατά του HPV θα μπορούσαν να εξαλείψουν τις προϋπάρχουσες αλλοιώσεις και τα μολυσμένα κύτταρα. Πριν τη χρησιμοποίηση ενός εμβολίου κατά τον HPV σε έναν συγκεκριμένο ασθενή, πρέπει πρώτα να είναι γνωστός τύπος του HPV και να γίνει ιστολογικός έλεγχος. Τα περισσότερα θεραπευτικά εμβόλια έχουν αναπτυχθεί κατά του HPV16, κυρίως ενάντια στις ογκοπρωτεΐνες του E6 και E7. Οι στόχοι της θεραπευτικής αυτής παρέμβασης είναι οι ογκοπρωτεΐνες E6 και E7 επειδή εκφράζονται σε κάθε μολυσμένο από το HPV επιθήλιο και συντελούν στην πρόκληση και τη διατήρηση του HPV-σχετιζόμενου καρκίνου. Σε εξέλιξη είναι δοκιμές για εμβόλια με διάφορους μοριακούς στόχους. Σε μια μελέτη των Lescaille et. al (2013) που έγινε σε ποντίκια, εφαρμόστηκαν ενδοδερμικά DNA εμβόλια με ανασυνδυασμένη E7 και θεράπευσαν τα ποντίκια στα οποία είχαν ήδη αναπτυχθεί όγκοι όταν συνδυάστηκαν με αγωνιστές των TLRs 7 και 9. (103)

### 3.3 TLRs και καρκίνος του τραχήλου της μήτρας και της κεφαλής

#### 3.3.1 Ο ρόλος των TLRs στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας

Ο HPV προσβάλλει τα κερατινοκύτταρα της βασικής στιβάδας του επιθηλίου του τραχήλου της μήτρας και πιθανόν και τα βλαστοκύτταρα. (104) Ως ο κύριος στόχος του HPV, το κερατινοκύτταρο διαδραματίζει ένα σημαντικό ρόλο κατά τη διάρκεια της έναρξης της μόλυνσης από τον ιό HPV και επομένως γίνεται ο σύνδεσμος για μια αποτελεσματική επίκτητη ανοσιακή απάντηση. Τα κερατινοκύτταρα είναι μέρος του συγγενούς ανοσιακού συστήματος, αλλά μπορούν να λειτουργήσουν και ως ανοσολογικοί δείκτες. Μπορούν να λειτουργήσουν ως αντιγόνο-παρουσιαστικά κύτταρα, είναι ικανά να προκαλέσουν την παραγωγή των κυτοκινών  $T_H1$  και  $T_H2$  και την κυτταρολογική απάντηση των  $CD4+$  και  $CD8+$  T κυττάρων μνήμης. (105)

Τα κερατινοκύτταρα στα γυναικεία γεννητικά όργανα εκφράζουν τους υποδοχείς Toll-like receptors (TLRs), οι οποίοι εντοπίζονται στην επιφάνεια του κυττάρου (TLR-1, TLR-2, TLR-4, TLR-5 και TLR-6) ή στις ενδοσωμικές μεμβράνες (endosomes) (TLR-3 και TLR-9) (106) Οι υποδοχείς TLRs είναι μια οικογένεια υποδοχέων που αναγνωρίζει παθογόνο μοριακά pattern (PAMPs), και η ενεργοποίησή τους οδηγεί στην έναρξη σηματοδοτικών διαδικασιών που καταλήγουν στην συγγενή και επίκτητη ανοσιακή απάντηση. Οι TLRs που εντοπίζονται στα ενδοσωμικές μεμβράνες έχουν σημαντικό ρόλο στην καταπολέμηση των ιογενών λοιμώξεων και στην αναγνώριση των νουκλεϊκών οξέων του ιού: Ο TLR-3 αναγνωρίζει το δίκλωνο RNA (dsRNA), ο TLR-7 και ο TLR-8 το μονόκλωνο RNA (ssRNA), ο TLR-9 το δίκλωνο DNA. Η ενεργοποίηση αυτών των υποδοχέων προάγει την παραγωγή των κυτοκινών και δημιουργεί μια ισχυρή προφλεγμονώδη απάντηση, συγκεκριμένα η ενεργοποίηση του TLR-9 στα κερατινοκύτταρα οδηγεί στην παραγωγή των  $TNF-\alpha$ , IL-8, CCL2, CCL20, CXCL9 και IFN-1. (107) Ο HPV είναι ικανός να τροποποιεί τα επίπεδα των κυτοκινών, και ο μηχανισμός αυτός τον βοηθά να αποφεύγει την ανοσιακή απάντηση. (108)

Σε νεαρές γυναίκες με σεξουαλική εμπειρία τουλάχιστον 5 ετών, με την τεχνική αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), μελετήθηκε η συσχέτιση μεταξύ των μεταβολών που συμβαίνουν στην έκφραση των TLR στον τραχηλικό βλεννογόνο έπειτα από μόλυνση από τους ογκογόνους ιούς HPV16 και 51 σε παρερχόμενες και επίμονες λοιμώξεις αντίστοιχα. Σε αυτή την *in vivo* μελέτη παρατηρήθηκε ότι στις παρερχόμενες λοιμώξεις η έκφραση των TLR ήταν αυξημένη, ενώ η αύξηση αυτή της έκφρασης των TLR δεν παρατηρήθηκε στις επίμονες λοιμώξεις. Μάλιστα κατά τον επανέλεγχο, ανάμεσα στις γυναίκες που είχε υποχωρήσει η λοίμωξη και σε αυτές που ήταν επίμονη, αυτές οι διαφορές στην έκφραση ήταν μεγάλες τόσο για τον TLR9, όσο και για τους TLR 2, TLR 3, TLR 7, TLR 8. Αξιοσημείωτο είναι ότι με εξαίρεση των TLR2 που εντοπίζεται στην κυτταρική μεμβράνη, η έκφραση των υπόλοιπων υποδοχέων ήταν μεγάλη καθώς ανευρίσκονται ενδοσωμικές μεμβράνες, εκεί δηλαδή που αναγνωρίζεται το ιϊκό γονιδίωμα. Πιθανότατα οι όποιες αλλαγές που παρατηρήθηκαν στην έκφραση μεταξύ των υπόλοιπων υποδοχέων να σχετίζονται στην συνεργική δράση μεταξύ των TLR3 και TLR7, καθώς και TLR3 και TLR9. Από τα αποτελέσματα αυτά συμπεραίνεται ότι η αύξηση στην έκφραση των υποδοχέων TLR είναι απαραίτητη για την εξάλειψη του ιού HPV16, και ότι σε αντίθετη περίπτωση η λοίμωξη δεν παρέρχεται και είναι επίμονη. (109)



Ο κύριος υποδοχέας TLR που σχετίζεται με τη λοίμωξη από δίκλωνο-DNA ιό είναι ο TLR-9. Σε δείγματα καρκινικών κερατινοκυττάρων, από τράχηλο της μήτρας, προσβαλλόμενα από τον HPV – 16, βρέθηκε η έκφραση του TLR-9 να είναι περιορισμένη. Ο HtHPV-16 παράγει τις ογκοπρωτεΐνες E6 και E7. Οι ογκοπρωτεΐνες, αυτές, προσβάλλουν τα κερατινοκύτταρα και εμποδίζουν με αυτόν τον τρόπο την έκφραση και παραγωγή του TLR-9, και επομένως όλες τις ανοσιακές αντιδράσεις που ενεργοποιούνται από την έκφραση του TLR-9. Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι ο LrHPV-6 δεν περιορίζει την έκφραση αυτού του υποδοχέα.

Επιπλέον, οι ογκοπρωτεΐνες E6 και E7 του HtHPV18 είναι λιγότερο αποτελεσματικές στην μείωση της έκφρασης του υποδοχέα TLR-9. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι, ένα μοτίβο CpG που επαναλαμβάνεται στην αλληλουχία DNA του HPV16 είναι υπεύθυνο για την ενεργοποίηση του TLR-9, υποδεικνύοντας ότι αυτός ο ιός είναι ικανός να ενεργοποιήσει ανοσιακές απαντήσεις διαμέσου του υποδοχέα, του οποίου στην συνέχεια μειώνει την έκφραση μπλοκάροντας την ανοσιακή απάντηση. Η κατάργηση των ανοσιακών απαντήσεων παίζει σπουδαίο ρόλο στην καρκινογένεση. Έτσι, τα HPV16 E6 και E7 αναστέλλουν απευθείας τα διαμεσολαβούμενα από TLR9 μονοπάτια της ανοσιακής απάντησης, καθώς περιορίζουν τη μεταγραφή του γονιδίου TLR9. Το γεγονός ότι τα επίπεδα TLR9 μειώθηκαν στις κυτταρικές σειρές που προέρχονται από καρκίνο του τραχήλου της μήτρας και στους τραχηλικούς όγκους που είναι θετικοί για τον HPV16 παρέχει σημαντικές αποδείξεις για την *in vivo* συνάφεια αυτού του φαινομένου. (110)

### 3.3.2 Ο ρόλος των TLRs στον καρκίνο της κεφαλής

Το πλακώδες ΚΚ είναι ένα επιθετικό κακοήθες νεόπλασμα στο οποίο η πενταετής επιβίωση των ασθενών είναι κάτω από το 50% και παρά την ανάπτυξη των διαγνωστικών διαδικασιών και των θεραπευτικών μεθόδων, αυτό δεν έχει αλλάξει τα τελευταία 30 χρόνια. Παρόλο που τα καρκινώματα αυτά σχετίζονται σε ένα μεγάλο βαθμό με τους περιβαλλοντικούς καρκινογόνους παράγοντες (πχ. καπνός και αλκοόλ), η ανάπτυξη τους επηρεάζεται από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή και οδηγεί στην ανάπτυξη ενός όγκου ανθεκτικού στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. (90)

Είναι πλέον κατανοητό ότι οι υποδοχείς TLRs διαδραματίζουν ένα σπουδαίο ρόλο στην ανάπτυξη της φλεγμονώδους διαδικασίας, καθώς ενεργοποιούν τον εγγενή ανοσιακό μηχανισμό αυξάνοντας την έκφραση αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών, κυτοκινών και αντιβακτηριακών παραγόντων. Επιπλέον, συμβάλλουν στην ανάπτυξη της επίκτητης ανοσιακής απάντησης, καθώς παίζουν ρόλο στην ανάπτυξη και ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων, λειτουργούν ως αντιγονοπαρουσιαστικά μόρια και συμβάλλουν στην διαφοροποίηση των Τ-βοηθητικών κυττάρων. (111)

Οι TLR υποδοχείς μοιράζονται ένα κοινό σηματοδοτικό μονοπάτι που περιλαμβάνει στην διαφοροποίηση της μυελοειδούς πρωτεΐνης p88, τον πυρηνικό παράγοντα ενίσχυσης των ενεργοποιημένων Β κυττάρων (NF-κΒ) και την μιτωτική πρωτεϊνική κίνηση, οδηγώντας τελικά στην παραγωγή της ιντερφερόνης τύπου 1 (IFN - 1) και στην ανάπτυξη ανοσολογικής απάντησης. Η έκφραση των TLRs, προάγει και ενεργοποιεί το μονοπάτι των κυτοκινών, ενεργοποιεί καταρράκτες μεταγωγής σήματος, αυξάνει τη φαγοκυτταρική δραστηριότητα, σχετίζεται με την ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων και ενεργοποιεί αποπτωτικές οδούς.

Τα καρκινώματα της κεφαλής και του τραχήλου, όπως και άλλα καρκινώματα, αναπτύσσονται σε ένα περιβάλλον πλούσιο σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, όπου αναπτύσσεται μια ανοσολογική απάντηση εναντίον του όγκου, καθώς εκκρίνονται προφλεγμονώδεις κυτοκίνες. Από την άλλη πλευρά, τα καρκινικά κύτταρα διαθέτουν μηχανισμούς που καταστέλλουν αυτή την ανοσολογική προστασία, καθώς ρυθμίζουν και αναστέλλουν την έκφραση και την λειτουργία των κυτοκινών και των Τ κατασταλτικών κυττάρων.

Τα καρκινικά κερατινοκύτταρα έχουν υποστεί μεταλλάξεις και τροποποιήσεις ως προς την παραγωγή πρωτεϊνών και τη χρωμοσωματική δομή, και επομένως αναγνωρίζονται ως ξένα από το ανοσοποιητικό σύστημα. Αυτό πιθανότατα οδηγεί στην αυξημένη έκφραση του TLR2 τόσο από τα υγιή κερατινοκύτταρα της περιοχής όσο και από τα καρκινικά κερατινοκύτταρα. Η αυξημένη έκφραση του TLR2 από τα υγιή κύτταρα υποδηλώνει ότι ενεργοποιήθηκε ο ανοσολογικός μηχανισμός εναντίον των καρκινικών κυττάρων, ενώ η αυξημένη έκφραση του TLR2 στα καρκινικά υποδηλώνει ότι αυτά μπορεί να είναι ανθεκτικά στην απόπτωση και ότι ευνοείται η επιβίωση τους. Τα καρκινικά κύτταρα αυτά φαίνεται ότι έχουν την δυνατότητα να τροποποιούν το μικρο-περιβάλλον γύρω τους και να επηρεάζουν τα παρόντα ανοσολογικά κύτταρα προς όφελος τους. (112)

Σε ΚΚ κυτταρικές σειρές βρέθηκε αυξημένη έκφραση του TLR3, και η σπουδαιότητα αυτού του γεγονότος ανευρίσκεται στο γεγονός ότι η αυξημένη έκφραση του TLR3 σχετίζεται με αυξημένη έκφραση και λειτουργία του NF-κΒ. (113, 114) Για να γίνει αντιληπτή η σπουδαιότητα αυτού του φαινομένου, αρκεί να γίνει κατανοητό ότι το σηματοδοτικό μονοπάτι του NF-κΒ παίζει σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση.

Μεταλλάξεις στα σηματοδοτικά μόρια του παράγοντα αυτού έχουν συσχετιστεί με καρκινώματα. Και αυτό γιατί με την ενεργοποίηση αυτού του μονοπατιού παράγονται προφλεγμονώδεις κυτοκίνες, MMPs και δημιουργείται ένα μικρο-περιβάλλον ευνοϊκό για την επιβίωση καρκινικών κυττάρων. Περιορισμός του TLR3 με τη χρήση ενός siRNA οδήγησε σε μειωμένη έκφραση του ογκογονιδίου c-myc που σχετίζεται με τον NF-kB και οδήγησε σε μειωμένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Αντιθέτως, η ενεργοποίηση του TLR3 σχετίστηκε με μεταστατικά και χαμηλής διαφοροποίησης καρκινώματα. (113) Επιπρόσθετα, η ενεργοποίηση του TLR3 επέφερε απόπτωση των καρκινικών ΚΚ κυττάρων, πιθανότατα λόγω της ενεργοποίησης του μονοπατιού IRF/IFN-b. (114)

Ο TLR4 που εκφράζεται στα καρκινικά ΚΚ κύτταρα συσχετίζεται με υψηλής διαφοροποίησης καρκινώματα και πιθανολογείται ότι παίζει ρόλο στην διαφοροποίηση των κυττάρων. Παρατηρήθηκε ότι η έκφραση του TLR4 αυξάνεται καθώς αυξάνεται τα επίπεδα της στοματικής επιθηλιακής δυσπλασίας. (115)

Η έκφραση του TLR5, παρατηρήθηκε αυξημένη σε καρκινικά κύτταρα στην περιοχή της γλώσσας σε σύγκριση με φυσιολογικά κερατινοκύτταρα και αυτή η υψηλή έκφραση του TLR5 σχετίστηκε με ΚΚ που έχουν φτωχότερη πρόγνωση. (116) Ενώ για τον υποδοχέα TLR9, παρόλου που η έκφραση του παρουσιάστηκε αυξημένη στον δυσπλαστικό στοματικό ιστό σε σύγκριση με τον φυσιολογικό στοματικό βλεννογόνο, η διαφορά αυτή ήταν μικρή. Ωστόσο έχει συσχετιστεί με τον αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων και με τις μεταστάσεις. (117)

Οι Wild et al. (2010), μελέτησαν τον ρόλο που παίζουν οι υποδοχείς TLRs στην σηματοδότηση και στην ενεργοποίηση των Τ-κυττάρων σε ασθενείς με πλακώδες ΚΚ. Σε ασθενείς με ΚΚ, παρατηρήθηκε ότι στα Τ-κύτταρα, παραδόξως εκφράζεται ο TLR4. Καθώς ο υποδοχέας TLR4 συνδέεται με το εξωγενές συνδετικό του μόριο LPS και το ενδογενές HSP60 αντίστοιχα, ασκείται κατασταλτική δράση στα Τ-κύτταρα. Επομένως, παρά των προστατευτικό ρόλο των TLR εναντίων των παθογόνων παραγόντων, η μελέτη αυτή υποστηρίζει ότι οι υποδοχείς TLR διαδραματίζουν αντίθετο ρόλο στην ανάπτυξη των ΚΚ. (118)

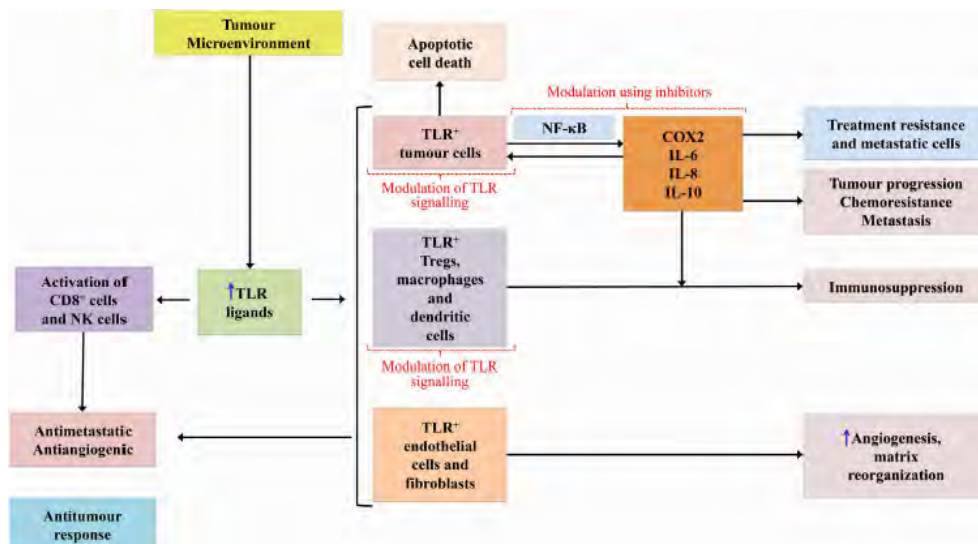
### 3.4 Ο ρόλος των TLRs στην ανοσοαπάντηση σε HPV λοίμωξη

Μια ικανοποιητική εγγενής ανοσιακή απάντηση εξαρτάται από την ικανότητα του οργανισμού να αναγνωρίζει τον παθογόνο παράγοντα που έχει εισβάλλει σε αυτόν. Οι υποδοχείς TLRs είναι μια οικογένεια πρωτεϊνών-υποδοχέων που αναγνωρίζουν συγκεκριμένα παθογόνα pattern και συμμετέχουν στην ανοσολογική άμυνα εναντίον τους. Οι υποδοχείς TLRs είναι παρόντες σε πολυάριθμα κύτταρα και καθώς έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν και να δεσμεύουν παθογόνα αντιγόνα, σηματοδοτούν την παρουσία ενός εισβαλλόμενου μικροβίου στον οργανισμό, προκαλώντας και κατευθύνοντας την ανοσολογική απάντηση εναντίον του. (109)

Ο σπουδαιότερος όμως ρόλος των TLRs στην άμυνα του οργανισμού είναι η ρύθμιση του εγγενούς και του επίκτητου ανοσολογικού μηχανισμού στα επιθηλιακά κύτταρα, κάτι το οποίο αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας στις διάφορες βλεννογόνιες περιοχές, όπως στον αναπνευστικό, ουρογεννητικό και γαστρεντερικό βλεννογόνο. Επιπρόσθετα οι υποδοχείς αυτοί διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο στην στρατολόγηση των λευκοκυττάρων και στην πρόσληψη των παθογόνων από τα φαγοκύτταρα. Η δράση των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων, όπως είναι τα δενδριτικά κύτταρα (DCs), και η διαμεσολαβούμενη ενεργοποίηση των T- και B ανοσολογικών απαντήσεων επίσης εξαρτάται από την σύνδεση των TLR υποδοχέων. (119)

Η βασική λειτουργία επομένως των TLRs είναι να αναγνωρίζουν ιικές και βακτηριακές δομές (PAMPs) και να προάγουν μια ανοσολογική απάντηση εναντίον τους. Μη μολυσματικές δομές (DAMPs) μπορούν επίσης να ενεργοποιήσουν τους υποδοχείς TLRs και να προάγουν την φλεγμονή. Επιπρόσθετα με τη συμμετοχή τους στην άμυνα του ξενιστή, αυτοί οι υποδοχείς σχετίζονται και με την κυτταρική επιβίωση και τον κυτταρικό θάνατο. Με την ενεργοποίησή τους, ενεργοποιούνται αντίστοιχα μοριακά μονοπάτια που ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση, τη μίτωση, τον κυτταρικό κύκλο και την απόπτωση. Διάφορες μελέτες έχουν δείξει μια υπερέκφραση των TLR τόσο σε χρόνια φλεγμονώδη κύτταρα όσο και σε καρκινικά, πιθανολογώντας ότι έχουν κάποια επίδραση στην βιολογία του καρκίνου. Μη ελεγχόμενες διαμεσολαβούμενες TLR ενέργειες μπορεί να οδηγήσουν σε ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και σε διακοπή των ανοσολογικών μηχανισμών. Αλλά από την άλλη πλευρά, η ενεργοποίηση των TLRs μπορεί να προκαλέσει αντι-καρκινική δράση και έτσι να αποτρέπεται η περαιτέρω ανάπτυξη του όγκου. (119)

Η διακοπή της λειτουργίας των TLR και των συνδετικών τους μορίων έχει συσχετιστεί με την ανάπτυξη καρκίνου στα ποντίκια. (120) Οι υποδοχείς TLR, φαίνεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο τόσο στην ανάπτυξη της φλεγμονής όσο και στην ανάπτυξη του καρκίνου. Καθώς διαμεσολαβούν στην ανάπτυξη τόσο προ-ογκογενετικών όσο και αντι-ογκογενετικών μονοπατιών, η λειτουργία τους αυτή αποκαλείται 'διπλής κόψης σπαθί' και απεικονίζεται στην εικόνα παρακάτω. (119)



**Εικόνα 17:** Στην εικόνα αυτή απεικονίζεται ο τρόπος με τον οποίο οι υποδοχείς TLR μεσολαβούν στην ανάπτυξη προ-ογκογενετικών και αντι-ογκογενετικών μονοπατιών. (121)

Η σύνδεση του παθογόνου αντιγόνου με τους υποδοχείς TLR οδηγεί στην έκφραση μιας πληθώρας μορίων, όπως είναι η προφλεγμονώδεις κυτοκίνες. Συγκεκριμένα η ενεργοποίηση του TLR-9 στα κερατινοκύτταρα οδηγεί στην παραγωγή των TNF- $\alpha$ , IL-8, CCL2, CCL20, CXCL9 και IFN-1. Δέκα τύποι TLR έχουν εντοπιστεί στον άνθρωπο και πολλοί από αυτούς διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αναγνώριση των παθογόνων ιών. Οι TLR3, TLR7, TLR8 και TLR9 εντοπίζονται ενδοκυτταρικά και είναι υπεύθυνοι στην ανίχνευση του ιικού γονιδιώματος. Συγκεκριμένα, ο TLR-3 αναγνωρίζει το δίκλωνο RNA (dsRNA), ο TLR-7 και ο TLR-8 το μονόκλωνο RNA (ssRNA), ο TLR-9 το δίκλωνο DNA. Ο TLR2 και ο TLR6 που εντοπίζονται στην επιφάνεια του κυττάρου μπορούν να αντιδρούν με τις ιϊκές πρωτεΐνες. (107)

Δύο πρόσφατες μελέτες από την ίδια ομάδα ερευνητών έδειξαν ότι η αυξημένη παραγωγή των TLRs σχετίζεται με την εξάλειψη της λοίμωξης από τον HPV. Η πρώτη μελέτη εξέτασε γυναίκες που προσβλήθηκαν από τον HPV16. Η αυξημένη έκφραση των TLR2, -3, -7, -8, και -9 έπειτα από την μόλυνση από τον HPV16 σχετίστηκε με αυξημένη έκκριση της αντι-ιικής ιντερφερόνης  $\alpha 2$  (IFN- $\alpha 2$ ) και με την εξάλειψη της λοίμωξης εντός 4 μηνών. Τα αποτελέσματα αυτά δεν παρατηρήθηκαν σε λοιμώξεις από τον HPV51, υποδηλώνοντας ότι κάποιοι ιοί έχουν την ικανότητα να τροποποιούν την ανοσιακή απάντηση προς όφελος τους. (109) Στην δεύτερη μελέτη, εξετάστηκαν τα γεγονότα ύστερα την παρέλευση επίμονων λοιμώξεων από τον HPV16. Παρατηρήθηκε ότι η αυξημένη έκφραση του TLR3 ή TLR7 αποτελούσε δείκτη εξάλειψης του HPV16. (122) Από τις δύο αυτές μελέτες, σε συνδυασμό, οι ερευνητές ισχυρίζονται ότι η αυξημένη έκφραση των TLRs είναι σημαντική για την εξάλειψη της λοίμωξης από τον HPV16.

Η σπουδαιότητα της ενεργοποίησης της παραγωγής κυτοκινών διαμέσου των TLRs διαφαίνεται στο γεγονός ότι οι κυτοκίνες δημιουργώντας ένα προφλεγμονώδες περιβάλλον, μπορούν να καταστείλουν την έκφραση των γονιδίων του ιού και να ενεργοποιήσουν τους μηχανισμούς τόσο της εγγενούς όσο και της επίκτητης ανοσιακής απάντησης.

Σε δείγματα από τον τράχηλο υγιών νεαρών γυναικών με ανώριμο μεταπλαστικό τραχηλικό επιθήλιο παρατηρήθηκαν υψηλότερα επίπεδα ιντερλευκίνης-1α (IL-1α), IL-1β, IL-6, IL-10, IL-12, CCL3, CCL5, CXCL8, του παράγοντα TNF-α και IPN-γ σε σύγκριση των γυναικών με ώριμο επιθήλιο, ανεξάρτητα από την κατάσταση HPV. Οι νεαρές γυναίκες παρουσιάζουν το υψηλότερο ποσοστό μόλυνσης από τον ιό HPV, αλλά δεν είναι σαφές εάν η ισχυρή έκκριση κυτοκινών στην υγιή κατάσταση υποδεικνύει μεγαλύτερη ετοιμότητα του οργανισμού για την ανάπτυξη ανοσιακής απάντησης εναντίον του ιού ή μεγαλύτερη ευαισθησία στην ανάπτυξη φλεγμονής. (123) Έχει παρατηρηθεί ότι η έκφραση της IFN-γ έχει συσχετιστεί με την εξάλειψη του HPV. Η έκφραση της IFN-γ στα κύτταρα φυσικοί φονείς (NK) και στα ενεργοποιημένα CD4+ T κύτταρα μπορεί να διεγερθεί από την παραγωγή IFN-α, IL-12 και IL-18 από τα μολυσμένα κύτταρα, τα ενεργοποιημένα δένδριτικά κύτταρα (DC) ή τα μακροφάγα. (124) Αυτά τα ευρήματα σε συνδυασμό με εκείνα που παρουσιάζουν την υψηλότερη έκφραση TLR υπογραμμίζουν τη σημασία της παραγωγής κυτοκινών στην προώθηση της αποτελεσματικής ενεργοποίησης των T-κυττάρων για την εξάλειψη του ιού HPV.



## Συμπεράσματα

Ολοκληρώνοντας την ΜΔΕ, το πρώτο συμπέρασμα που κατέληξα ήταν ότι ο ιός των ανθρωπίνων θηλωμάτων, παρά τις έρευνες και τις συνεχείς ενημερώσεις του κοινού σχετικά με τα μέτρα πρόληψης αλλά και τους κινδύνους που εγκυμονούν από τον συγκεκριμένο ιό, εξακολουθεί να αποτελεί σημαντικό και επικίνδυνο παράγοντα για την προσβολή του ανθρώπινου οργανισμού και την δημιουργία, σε ορισμένες περιπτώσεις, σε μεγάλο όμως ποσοστό, καρκίνου σε διάφορα μέρη του σώματος.

Ο HPV, αποτελεί την πρώτη αιτία καρκίνου στις γυναίκες και κυρίως στην περιοχή του τράχηλου της μήτρας. Η επιλογή πολλών συντρόφων και η αποφυγή των μέτρων πρόληψης, καταλήγουν σε αυτά τα αίτια. Τα τελευταία χρόνια, έχει παρατηρηθεί αύξηση του ποσοστού ατόμων που προσβάλλονται από τον ιό στην περιοχή της στοματικής κοιλότητας και η δημιουργία καρκίνου στην κεφαλή. Στο ποσοστό, αυτό, συμπεριλαμβάνονται και οι άνδρες, λόγω των σεξουαλικών επαφών μέσω του στόματος είτε σε ετεροφυλικές είτε σε ομοφυλοφιλικές σχέσεις.

Από επιδημιολογικά δεδομένα του 2017, διαφόρων χωρών, μπορούμε να καταλήξουμε στο συμπέρασμα πως ο ιός των ανθρωπίνων θηλωμάτων θα συνεχίσει να προσβάλλει και τα δύο φύλα καθώς τα ποσοστά των πασχόντων παραμένουν υψηλά. Επίσης, στο συμπέρασμα αυτό καταλήγουμε επειδή κάθε χρόνο ολοένα και περισσότερα στελέχη του ιού αναγνωρίζονται ως νέα, τα οποία χρειάζονται περαιτέρω μελέτη για να ταυτοποιηθούν ως χαμηλού ή υψηλού κινδύνου.

Το ανοσοποιητικό σύστημα του ανθρώπου είναι αυτό που πρώτο παίρνει μέρος στην αντιμετώπιση διαφόρων λοιμώξεων και στην περίπτωση μας, οι αμυντικοί μηχανισμοί του ανθρώπινου οργανισμού είναι αυτοί που θα σπεύσουν να αντιμετωπίσουν και να αποβάλλουν τον HPV. Ο φυσικός ανοσολογικός μηχανισμός (φυσική ανοσία), που αποτελεί και την πρώτη γραμμή άμυνας, κυρίως στα επιθηλιακά κύτταρα, ενεργοποιείται και ρυθμίζεται από τους υποδοχείς τύπου Toll (TLRs). Από τις πληροφορίες που δίνονται στην παρούσα ΜΔΕ και αντλώντας πληροφορίες από την σύγχρονη βιβλιογραφία καταλήγουμε σε ένα ασφαλές συμπέρασμα ότι οι TLRs, διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο στην άμυνα του οργανισμού και γι' αυτό το λόγο θα πρέπει να διερευνηθούν και να μελετηθούν εκτενέστερα καθώς ακόμη δεν υπάρχουν αρκετές πληροφορίες για τον ρόλο τους στην αντιμετώπιση του HPV.

Κλείνοντας, θα ήθελα να προσθέσω και να πω ότι το θέμα που μου δόθηκε ήταν αρκετά ενδιαφέρον και πως θα πρέπει να γίνει μια πειραματική μελέτη σχετικά με τον ρόλο των TLRs σε λοίμωξη από HPV. Μια τέτοια πειραματική μελέτη θα μπορούσε να είναι και μια Διδακτορική εργασία καθώς χρειάζεται χρόνος για την πλήρη κατανόηση του μηχανισμού των TLRs αλλά και για τον τρόπο που λαμβάνουν μέρος στη φυσική ανοσία για την αντιμετώπιση των ιών και συγκεκριμένα του ιού των ανθρωπίνων θηλωμάτων.





## **Βιβλιογραφία**

1. Γεώργιος Κ. Κρεατσάς. «Σύγχρονη Γυναικολογία και Μαιευτική», Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, Αθήνα, 2009, ISBN: 9789603998372
2. Münger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M, Grace M, Huh K. (2004). Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *Journal of Virology*, 78: 11451-11460
3. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Muñoz N (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *Journal of Pathology*, 189(1):12-19
4. Thomas J. Kindt, Richard A. Goldsby, Barbara A. Osborne (2007). *KUBY Immunology (Sixth Edition)*. New York: W.H. Freeman and Company
5. Αριστείδης Γ. Διαμαντής (2008). Κονδυλώματα και καρκίνος του τραχήλου της μήτρας από τον Ιπποκράτη στο εμβόλιο. 15-63
6. Bafresterdt B. (1967). Condylomata acuminata. Past and Present. *Act Derm Venereal*, Stockholm, 47:376
7. Barrett T. Silbar J. and McGinley J. (1984). Genital warts a venereal diseases. *JAMA*, 154:333
8. Dunn A. and Ogilvie M. (1968). Intranuclear virus particles in human genital warts tissue: Observations on the ultrastructure of the epidermal layer. *J. Ultrasound Res.* 22:285
9. Crawford L.V. (1965). A study of human papillomavirus DNA. *J. Mol. Biol.*, 13:362
10. Gizzmann L., Pfister H. and zur Haussen H. (1977). Human papilloma viruses (HPV) Characterization of four different isolates. *Virology*, 76:569
11. Gizzmann and zur Haussen H. (1980). Partial characterization of viral DNA from human genital warts. *Int. J. Cancer*, 25:605
12. Durst M., Kleinheinz A., Hotz M., Gissman L. (1985). The physical state of human papillomavirus type 16 DNA in benign and malignant genital tumors. *J. Gen. Virol.*, 66: 1515-1522
13. Munoz N., Bosch FX, et al. (1992). The casual link between human papilloma virus and invasive cervical cancer, a population based study in Columbia and Spain. *Int. J. Cancer*, 52:743-748
14. Bosch FX et al. (1995). Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer study group. *J. Natl. Cancer Inst.*, 87:796-802
15. Αριστείδης Γ. Διαμαντής (2008). Κονδυλώματα και καρκίνος του τραχήλου της μήτρας από τον Ιπποκράτη στο εμβόλιο. 57-64
16. Καλκάνη - Μπουσιάκου Ε. «Ιολογία», ΕΛΛΗΝ, Αθήνα, 2008, ISBN: 978-960- 286-977-2
17. Παπακωνσταντίνου Χ., Ανασκόπηση της σύγχρονης πραγματικότητας στη διαδικασία πρόληψης του καρκίνου τραχήλου της μήτρας. Διπλωματική Εργασία, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Αθήνα 2012, 137 σελ.

18. Πεκτασίδης Δ. & Δημόπουλος Α. «Γυναικολογική Ογκολογία», Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, Αθήνα, 2001, ISBN: 960-8122-73-0
19. Τσότσος Α. (1992). Ιατρική Ιολογία, Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας
20. Joyce J.G., Tung J.S., Przysiecki C.T. et al. (1999). The L1 major capsid protein of human papillomavirus type II recombinant virus-like particles interacts with heparin nad cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. *J. Biol. Chem.*, 274:5810-5822
21. Andrés Castillo (2011). HPV infection and carcinogenesis in the upper aero-digestive tract. *Colomb Med.* 2011; 42: 233-42
22. <https://www.jostrust.org.uk/about-cervical-cancer/hpv/hpv-and-cervical-cancer>
23. Alberts CJ, Michel A., Bruisten S., Snijder MB, Prins M., Waterboer T., Schim van der Loeff MF. (2017). High-risk human papillomavirus seroprevalence in men and women of six different ethnicities in Amsterdam, the Netherlands: The HELIUS study. *Papillomavirus Res.*, 3:57-65
24. Mourad M., Jetmore T., Jategaonkar AA, Moubayed S., Moshier E., Urken ML. (2017). Epidemiological Trends of Head and Neck Cancer in the United States: A SEER Population Study. *J Oral Maxillofac Surg*, S0278-2391(17): 30537-2
25. Sabol I., Milutin Gašperov N., Matovina M., Božinović K. et al. (2017). Cervical HPV type-specific pre-vaccination prevalence and age distribution in Croatia. *PLoS One*, 12(7):e0180480
26. Thomas J. Kindt, Richard A. Goldsby, Barbara A. Osborne (2007). *KUBY Immunology (Sixth Edition)*. New York: W.H. Freeman and Company
27. Medzhitov Ruslan (2007). Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*, 449, 819 – 826
28. Moalli Federica, Jaillon Sebastien, Inforzato Antonio, Sironi Marina, Bottazzi Barbara, Mantovani Alberto and Garlanda Cecilia (2011). Pathogen Recognition by the Long Pentraxin PTX3. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011, 1 – 15
29. Buonaguro Luigi and Pulendran Bali (2011). Immunogenomics and systems biology of vaccines. *Immunological Reviews*, 239(1), 197 – 208
30. Jeong Eunshil and Lee Joo Young (2011). Intrinsic and Extrinsic Regulation of Innate Immune Receptors. *Yonsei Medical Journal*, 52(3), 379 – 392
31. Iwasaki A, Medzhitov R. (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunology*, 5:987-995
32. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124:783-801
33. Mogensen T. (2009). Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin Microbiology Review*, 22:240-273
34. Kawai T, Akira S. (2009). The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int. Immunology*, 21: 317- 337
35. Akira S, Takeda K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunology*, 4:499-511

36. Μ. Μαυρούλη, Β. Καψιμάλη, Α. Τσακρής (2014). Ο ρόλος των Toll Like υποδοχέων στη φυσική ανοσία. Ελληνική Μικροβιολογική Εταιρεία, 59(4): 7-30
37. Lemaitre B., Nicolas E., Michant L., Hoffmann JM. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette spatzel Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, 86(6): 973-983
38. Medzhitov R., Preston – Hurlbult P., Janeway C.A. (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 388: 394-397
39. De Arras L, Seng A., Lackford B., Keikhaee MR, Bowerman B., Freedman JH, Swartz DA, Alper S. (2013). An evolutionarily conserved innate immunity protein interaction network. *The journal of Biological Chemistry*, 288(3): 1967-1978
40. <https://en.wikipedia.org/wiki/File:Drosophila.jpg>
41. Παγκόσμιο Συνέδριο για τη μύγα "Δροσόφιλα" στην ΟΑΚ. (2014). <http://flashnews.gr/post/182700/pagosmio-sinedrio-gia-ti-miga-drosophila-stin-oak>
42. Mark D. Adams, Susan E. Celniker, Robert A. Holt et al. (2000). The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*, Vol. 287, Issue 5461, pp. 2185-2195
43. Fabrizio Mancini. (2013). How to boost your immune system and brain with exercise. <http://theresekerr.com/how-to-boost-your-immune-system-and-brain-with-exercise/>
44. Ishii Ken J., Koyama Shohei, Nakagawa Atsushi, Coban Cevayir, Akira Shizuo. (2008). Host Innate Immune Receptors and Beyond: Making Sense of Microbial Infections. *Cell Host & Microbe*, 3(6): 352–363
45. Atmaca HT, Kul O, Karakus E, Terzi O.S, Canpolat S, Anteplioğlu T. (2014). Astrocytes, microglia/macrophages, and neurons expressing Toll-like receptor 11 contribute to innate immunity against encephalitic *Toxoplasma gondii* infection. *Neuroscience*. 269: 184–191
46. Akira S., Takeda K., Kaisho T. (2001). Toll-Like Receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat. Immunology*, 2: 675-680
47. Dinarello CA. (1996). Biological basis for interleukin-1 in disease. *Blood*, 87(6): 2095-2147
48. Wolfs TG, Buurman WA, van Schadewijk A, de Vries B, Daemen MA, Hiemstra PS et al. (2002). In vivo expression of Toll-like receptor 2 and 4 by renal epithelial cells: IFN-gamma and TNF-alpha mediated up-regulation during inflammation. *Journal of Immunology*, 168:1286- 1293
49. Medzhitov R. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 1:135-145
50. Takeda K., Akira S. (2004). TLR signaling pathways. *Semin Immunology*, 16:3-9
51. Jin MS, Kim SE, Heo JY, Lee ME, Kim HM et al. (2007). Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. *Cell*, 130(6): 1071-1082

52. Matsushima N, Tanaka T, Enkhbayar P, Mikami T, et al. (2007). Comparative sequence analysis of leucine-rich repeats (LRRs) within vertebrate toll-like receptors. *BMC Genomics*, 8: 124
53. Xu Y, Tao X, Shen B, Horng T, Medzhitov R., et al. (2000). Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains. *Nature*, 408(6808): 111-115
54. Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C., et al. (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*, 282(5396): 2085-2088
55. Akira S. (2001). Toll-like receptors and innate immune system. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, 46: 562-566
56. Beutler B. (2004). Innate immunity: an overview. *Molecular Immunology*, 40: 845-859
57. Uematsu S., Akira, S. (2007). Toll-like receptors and Type I interferons. *Journal of Biological Chemistry*, 282: 15319-1523
58. Suffredini A.F., O'Grady N.P. (1999). Pathophysiological responses to endotoxin in humans, *Endotoxin in health and disease*. Editors: Brade H., Opal S. M., Vogel S. N. & Morrison D. C., 1st edition, Marcel Dekker, New York, USA, 817-830
59. Steiner T. (2007). How flagellin and Toll – Like Receptor 5 Contribute to Enteric Infection. *Infection and Immunity*, 75(2): 545-552
60. Smits EL, Ponsaerts P., Berneman ZN, Van Tendeloo VF. (2008). The use of TLR 7 and TLR 8 ligands for the enhancement of cancer immunotherapy. *Oncologist*, 13(8): 859-875
61. O'Neill LA, Bowie AG. (2007). The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 7(5): 353-364
62. Takeuchi O., Akira S. (2001). Toll-like receptors; their physiological role and signal transduction system. *International Immunopharmacology*, 1(4): 625-635
63. Hillemanns P, Soergel P, Hertel H, Jentschke M. Epidemiology and Early Detection of Cervical Cancer. *Oncol Res Treat*. 2016;39(9):501–6.
64. Bruni L, Diaz M, Castellsagué X, Ferrer E, Bosch FX, de Sanjosé S. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. *J Infect Dis*. 2010 Dec 15;202(12):1789–99.
65. Hariri S, Unger ER, Sternberg M, Dunne EF, Swan D, Patel S, et al. Prevalence of genital human papillomavirus among females in the United States, the National Health And Nutrition Examination Survey, 2003-2006. *J Infect Dis*. 2011 Aug 15;204(4):566–73.
66. Stanley M. Pathology and epidemiology of HPV infection in females. *Gynecol Oncol*. 2010 May;117(2 Suppl):S5-10.
67. Satterwhite CL, Torrone E, Meites E, Dunne EF, Mahajan R, Ocfemia MCB, et al. Sexually transmitted infections among US women and men: prevalence and incidence estimates, 2008. *Sex Transm Dis*. 2013 Mar;40(3):187–93.

68. Egawa N, Egawa K, Griffin H, Doorbar J. Human Papillomaviruses; Epithelial Tropisms, and the Development of Neoplasia. *Viruses*. 2015 Jul 16;7(7):3863–90.
69. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*. 2002 May;2(5):342–50.
70. Choi YJ, Park JS. Clinical significance of human papillomavirus genotyping. *J Gynecol Oncol*. 2016 Mar;27(2):e21.
71. He Y, Zhao Q, Geng Y-N, Yang S-L, Yin C-H, Wu Y-M. Clinical analysis of cervical intraepithelial neoplasia with vaginal intraepithelial neoplasia. *Medicine (Baltimore)*. 2017 Apr;96(17):e6700.
72. Huh WK, Ault KA, Chelmow D, Davey DD, Goulart RA, Garcia FAR, et al. Use of primary high-risk human papillomavirus testing for cervical cancer screening: interim clinical guidance. *Gynecol Oncol*. 2015 Feb;136(2):178–82.
73. Kashyap V, Hedau S, Bhambhani S. Defining the validity of classical and non-classical cellular changes indicative of low-grade squamous intraepithelial lesion encompassing human papillomavirus infection in relation to human papillomavirus deoxyribonucleic acid testing. *J Cytol Indian Acad Cytol*. 2011;28(4):159–64.
74. Saslow D, Solomon D, Lawson HW, Killackey M, Kulasingam SL, Cain J, et al. American Cancer Society, American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, and American Society for Clinical Pathology screening guidelines for the prevention and early detection of cervical cancer. *Am J Clin Pathol*. 2012 Apr;137(4):516–42.
75. Wright TC, Stoler MH, Sharma A, Zhang G, Behrens C, Wright TL, et al. Evaluation of HPV-16 and HPV-18 genotyping for the triage of women with high-risk HPV+ cytology-negative results. *Am J Clin Pathol*. 2011 Oct;136(4):578–86.
76. Kim TJ, Jin H-T, Hur S-Y, Yang HG, Seo YB, Hong SR, et al. Clearance of persistent HPV infection and cervical lesion by therapeutic DNA vaccine in CIN3 patients. *Nat Commun*. 2014 Oct 30;5:5317.
77. Muñoz N, Kjaer SK, Sigurdsson K, Iversen O-E, Hernandez-Avila M, Wheeler CM, et al. Impact of Human Papillomavirus (HPV)-6/11/16/18 Vaccine on All HPV-Associated Genital Diseases in Young Women. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 2010 Mar 3;102(5):325–39.
78. McKee SJ, Bergot A-S, Leggatt GR. Recent progress in vaccination against human papillomavirus-mediated cervical cancer. *Rev Med Virol*. 2015 Mar 1;25:54–71.
79. Chaturvedi AK, Anderson WF, Lortet-Tieulent J, Curado MP, Ferlay J, Franceschi S, et al. Worldwide trends in incidence rates for oral cavity and oropharyngeal cancers. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2013 Dec 20;31(36):4550–9.
80. Ramqvist T, Dalianis T. Oropharyngeal cancer epidemic and human papillomavirus. *Emerg Infect Dis*. 2010 Nov;16(11):1671–7.

81. Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tân PF, et al. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med*. 2010 Jul 1;363(1):24–35.
82. Chen AM, Li J, Beckett LA, Zhara T, Farwell G, Lau DH, et al. Differential response rates to irradiation among patients with human papillomavirus positive and negative oropharyngeal cancer. *The Laryngoscope*. 2013 Jan;123(1):152–7.
83. Yu L, Wang L, Li M, Zhong J, Wang Z, Chen S. Expression of toll-like receptor 4 is down-regulated during progression of cervical neoplasia. *Cancer Immunol Immunother CII*. 2010 Jul;59(7):1021–8.
84. Ferlay J, Shin H-R, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 2010 Dec 15;127(12):2893–917.
85. Castellsagué X, Mena M, Alemany L. Epidemiology of HPV-Positive Tumors in Europe and in the World. *Recent Results Cancer Res Fortschritte Krebsforsch Progres Dans Rech Sur Cancer*. 2017;206:27–35.
86. Licitra L, Locati LD, Bossi P, Cantù G. Head and neck tumors other than squamous cell carcinoma. *Curr Opin Oncol*. 2004 May;16(3):236–41.
87. Rettig EM, D’Souza G. Epidemiology of head and neck cancer. *Surg Oncol Clin N Am*. 2015 Jul;24(3):379–96.
88. Kreimer AR, Bhatia RK, Messegue AL, González P, Herrero R, Giuliano AR. Oral human papillomavirus in healthy individuals: a systematic review of the literature. *Sex Transm Dis*. 2010 Jun;37(6):386–91.
89. Bhatia A, Burtneess B. Human Papillomavirus-Associated Oropharyngeal Cancer: Defining Risk Groups and Clinical Trials. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2015 Oct 10;33(29):3243–50.
90. Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL. Head and neck cancer. *Lancet Lond Engl*. 2008 May 17;371(9625):1695–709.
91. Syrjänen K, Syrjänen S, Lamberg M, Pyrhönen S, Nuutinen J. Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis. *Int J Oral Surg*. 1983 Dec;12(6):418–24.
92. Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tân PF, et al. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med*. 2010 Jul 1;363(1):24–35.
93. Peterson CE, Khosla S, Jefferson GD, Davis FG, Fitzgibbon ML, Freels S, et al. Measures of economic advantage associated with HPV-positive head and neck cancers among non-Hispanic black and white males identified through the National Cancer Database. *Cancer Epidemiol*. 2017 Mar 7;48:1–7.
94. Chaturvedi AK, Graubard BI, Broutian T, Pickard RKL, Tong Z-Y, Xiao W, et al. NHANES 2009-2012 Findings: Association of Sexual Behaviors with Higher Prevalence of Oral Oncogenic Human Papillomavirus Infections in U.S. Men. *Cancer Res*. 2015 Jun 15;75(12):2468–77.

95. D'Souza G, Gross ND, Pai SI, Haddad R, Anderson KS, Rajan S, et al. Oral human papillomavirus (HPV) infection in HPV-positive patients with oropharyngeal cancer and their partners. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2014 Aug 10;32(23):2408–15.
96. Beachler DC, Weber KM, Margolick JB, Strickler HD, Cranston RD, Burk RD, et al. Risk factors for oral HPV infection among a high prevalence population of HIV-positive and at-risk HIV-negative adults. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol*. 2012 Jan;21(1):122–33.
97. Gillison ML, Broutian T, Pickard RKL, Tong Z, Xiao W, Kahle L, et al. Prevalence of oral HPV infection in the United States, 2009–2010. *JAMA*. 2012 Feb 15;307(7):693–703.
98. Kreimer AR, Villa A, Nyitray AG, Abrahamsen M, Papenfuss M, Smith D, et al. The epidemiology of oral HPV infection among a multinational sample of healthy men. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol*. 2011 Jan;20(1):172–82.
99. Kreimer AR, Pierce Campbell CM, Lin H-Y, Fulp W, Papenfuss MR, Abrahamsen M, et al. Incidence and clearance of oral human papillomavirus infection in men: the HIM cohort study. *Lancet Lond Engl*. 2013 Sep 7;382(9895):877–87.
100. Beachler DC, D'Souza G. Oral human papillomavirus infection and head and neck cancers in HIV-infected individuals. *Curr Opin Oncol*. 2013 Sep;25(5):503–10.
101. Fujita A, Buch K, Li B, Kawashima Y, Qureshi MM, Sakai O. Difference Between HPV-Positive and HPV-Negative Non-Oropharyngeal Head and Neck Cancer: Texture Analysis Features on CT. *J Comput Assist Tomogr*. 2016 Feb;40(1):43–7.
102. Sok JC, Grandis JR. Genetic Screening for Oral Human Papillomavirus Infections and Cancers of the Head and Neck. *Clin Cancer Res*. 2008 Nov 1;14(21):6723–4.
103. Lescaille G, Pitoiset F, Macedo R, Baillou C, Huret C, Klatzmann D, et al. Efficacy of DNA vaccines forming e7 recombinant retroviral virus-like particles for the treatment of human papillomavirus-induced cancers. *Hum Gene Ther*. 2013 May;24(5):533–44.
104. Maglennon GA, McIntosh P, Doorbar J. Persistence of viral DNA in the epithelial basal layer suggests a model for papillomavirus latency following immune regression. *Virology*. 2011 Jun 5;414(2):153–63.
105. Black APB, Ardern-Jones MR, Kasprovicz V, Bowness P, Jones L, Bailey AS, et al. Human keratinocyte induction of rapid effector function in antigen-specific memory CD4+ and CD8+ T cells. *Eur J Immunol*. 2007 Jun;37(6):1485–93.
106. Nasu K, Narahara H. Pattern recognition via the toll-like receptor system in the human female genital tract. *Mediators Inflamm*. 2010;2010:976024.
107. Miller LS, Modlin RL. Human keratinocyte Toll-like receptors promote distinct immune responses. *J Invest Dermatol*. 2007 Feb;127(2):262–3.
108. Stanley MA. Epithelial cell responses to infection with human papillomavirus. *Clin Microbiol Rev*. 2012 Apr;25(2):215–22.



109. Daud II, Scott ME, Ma Y, Shiboski S, Farhat S, Moscicki A-B. Association between Toll-like Receptors expression and Human Papillomavirus Type 16 Persistence. *Int J Cancer J Int Cancer*. 2011 Feb 15;128(4):879–86.
110. Hasan UA, Bates E, Takeshita F, Biliato A, Accardi R, Bouvard V, et al. TLR9 expression and function is abolished by the cervical cancer-associated human papillomavirus type 16. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2007 Mar 1;178(5):3186–97.
111. Shcheblyakov DV, Logunov DY, Tukhvatulin AI, Shmarov MM, Naroditsky BS, Gintsburg AL. Toll-Like Receptors (TLRs): The Role in Tumor Progression. *Acta Naturae*. 2010;2(3):21–9.
112. Ng LK, Rich AM, Hussaini HM, Thomson WM, Fisher AL, Horne LS, et al. Toll-like receptor 2 is present in the microenvironment of oral squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*. 2011 Feb 1;104(3):460–3.
113. Chuang H-C, Huang C-C, Chien C-Y, Chuang J-H. Toll-like receptor 3-mediated tumor invasion in head and neck cancer. *Oral Oncol*. 2012 Mar;48(3):226–32.
114. Luo Q, Hu S, Yan M, Sun Z, Chen W, Chen F. Activation of Toll-like receptor 3 induces apoptosis of oral squamous carcinoma cells in vitro and in vivo. *Int J Biochem Cell Biol*. 2012 Aug;44(8):1266–75.
115. Sun Z, Luo Q, Ye D, Chen W, Chen F. Role of toll-like receptor 4 on the immune escape of human oral squamous cell carcinoma and resistance of cisplatin-induced apoptosis. *Mol Cancer*. 2012 May 14;11:33.
116. Kauppila JH, Mattila AE, Karttunen TJ, Salo T. Toll-like receptor 5 (TLR5) expression is a novel predictive marker for recurrence and survival in squamous cell carcinoma of the tongue. *Br J Cancer*. 2013 Feb 19;108(3):638–43.
117. Min R, Zun Z, Siyi L, Wenjun Y, Lizheng W, Chenping Z. Increased expression of Toll-like receptor-9 has close relation with tumour cell proliferation in oral squamous cell carcinoma. *Arch Oral Biol*. 2011 Sep;56(9):877–84.
118. Wild CA, Brandau S, Lindemann M, Lotfi R, Hoffmann TK, Lang S, et al. Toll-like Receptors in Regulatory T Cells of Patients With Head and Neck Cancer. *Arch Otolaryngol Neck Surg*. 2010 Dec 20;136(12):1253–9.
119. Basith S, Manavalan B, Yoo TH, Kim SG, Choi S. Roles of toll-like receptors in cancer: a double-edged sword for defense and offense. *Arch Pharm Res*. 2012 Aug;35(8):1297–316.
120. Lowe EL, Crother TR, Rabizadeh S, Hu B, Wang H, Chen S, et al. Toll-like receptor 2 signaling protects mice from tumor development in a mouse model of colitis-induced cancer. *PloS One*. 2010 Sep 27;5(9):e13027.
121. Rich AM, Hussaini HM, Parachuru VPB, Seymour GJ. Toll-like receptors and cancer, particularly oral squamous cell carcinoma. *Front Immunol*. 2014;5:464.
122. Scott ME, Ma Y, Farhat S, Moscicki A-B. Expression of nucleic acid-sensing Toll-like receptors predicts HPV16 clearance associated with an E6-directed cell-mediated response. *Int J Cancer*. 2015 May 15;136(10):2402–8.
123. Hwang LY, Scott ME, Ma Y, Moscicki A-B. Higher levels of cervicovaginal inflammatory and regulatory cytokines and chemokines in healthy young women with immature cervical epithelium. *J Reprod Immunol*. 2011 Jan 1;88(1):66–71.

124. Song S-H, Lee J-K, Lee N-W, Saw H-S, Kang J-S, Lee K-W. Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ): A possible prognostic marker for clearance of high-risk human papillomavirus (HPV). *Gynecol Oncol*. 2008 Mar 1;108(3):543–8.
125. <http://oncologynews.com.au/prognosis-of-tumours-positive-for-human-papilloma-virus-in-head-and-neck-cancers-varies-according-to-the-site/>

