



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
Τμήμα ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Θέμα: Συχνότητα των διαφόρων υποτύπων του ιού του ανθρώπινου
θηλώματος (HPV) σε ασυμπτωματικές μη-HPV εμβολιασμένες γυναίκες
αναπαραγωγικής ηλικίας στην περιοχή της Θεσσαλίας**

Κλεονίκη Ε. Παντελίδη

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Αναστάσιος Γερμενής, Καθηγητής, Επιβλέπων
- Αγγελική-Βικτωρία Ρουσσάκη-Σούλτσε, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια
- Κωνσταντίνος Νταφόπουλος, Καθηγητής

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ως μέρος των απαιτήσεων για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στις «Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής»

Λάρισα, Οκτώβριος, 2017



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCE
FACULTY OF MEDICINE

MASTER PROGRAM IN
“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”

MASTER THESIS

**TITLE: Frequency of various HPV-subtypes in asymptomatic, non-
vaccinated for HPV women of reproductive age in the region of
Thessaly**

By

Kleoniki E. Pantelidi

Three-member Selection Board:

- Anastasios Germenis, Professor, Supervisor
- Aggeliki-Viktoria Roussaki-Schulze, Associate Professor
- Konstantinos Dafopoulos, Professor

Master Thesis submitted to the Faculty of Medicine of the University of Thessaly in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Clinical Applications of Molecular Medicine

Larissa, October, 2017

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Επιβλέπων Καθηγητής: **Αναστάσιος Γερμενής**, Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και Διευθυντής του Εργαστηρίου Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας

Αγγελική-Βικτωρία Ρουσσάκη-Σούλτσε, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Δερματολογίας και Αφροδισιολογίας, Διευθύντρια Δερματολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας

Κωνσταντίνος Νταφόπουλος, Καθηγητής Μαιευτικής & Γυναικολογίας Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και Υπεύθυνος Μονάδας Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον **Καθηγητή Ανοσολογίας κ Αναστάσιο Γερμενή**, η καθοδήγηση του οποίου, καθώς και οι συμβουλές του υπήρξαν καθοριστικές και συνετέλεσαν τα μέγιστα προς την επιτυχή ολοκλήρωση της παρούσας Διπλωματικής εργασίας. Η υποστήριξή του ήταν διαρκής καθ' όλη τη διάρκεια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος, ενώ με την πολύτιμη αρωγή του κατάφερα να παρακολουθήσω και να ολοκληρώσω επιτυχώς το Μεταπτυχιακό.

Ευχαριστώ ολόψυχα και τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής:

Καθηγήτρια κα Αγγελική-Βικτωρία Ρουσσάκη , για το ενδιαφέρον που επέδειξε προς εμένα ως προς τη διαρκή παροχή γνώσεων και επίλυση αποριών καθώς και για τις πολύτιμες συμβουλές της όσον αφορά στην εκπόνηση της παρούσας εργασίας.

Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Νταφόπουλο, για την πολύτιμη αρωγή του κατά τη διάρκεια φοίτησής μου στο εν λόγω Μεταπτυχιακό.

Επιπλέον, ευχαριστώ θερμά την **Καθηγήτρια Μικροβιολογίας κα Ευθυμία Πετεινάκη**, η υποστήριξη της οποίας, υπήρξε καθοριστική σε όλη τη διάρκεια της φοίτησής μου στο εν λόγω Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών, την **κα Ζωή Φλώρου**, Υποψήφια Διδάκτορα του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας, καθώς και **όλο το Προσωπικό του Εργαστηρίου** για την σημαντική συμβολή τους στην εκπόνηση της Διπλωματικής μου Εργασίας.

Τέλος, ευχαριστώ τη Γραμματέα του Μεταπτυχιακού Προγράμματος κα. **Νούτσου Βασιλική** για το αδιάλειπτο ενδιαφέρον της καθ'όλη τη διάρκεια του προγράμματος και της εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας.

«Ὠφελῆειν ἢ μὴ βλάπτειν».

Ἱπποκράτης, 460-377 π.Χ.,

«Πατέρας της Ιατρικής»

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | |
|---|-------|
| ΠΕΡΙΛΗΨΗ - ABSTRACT | 13-15 |
| 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ – ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ | 17 |
| 1.1. Βιολογία του ιού HPV (Human Papilloma Virus)..... | 19 |
| 1.2. Ταξινόμηση του ιού HPV (Human Papilloma Virus)..... | 21 |
| 1.2.1. Γένη του ιού HPV (Human Papilloma Virus)..... | 22 |
| 1.3. Δομή του ιού HPV (Human Papilloma Virus) | 23 |
| 1.3.1. Δομή του καπιδίου..... | 23 |
| 1.3.2. Οργάνωση του γενώματος..... | 24 |
| 1.3.2.1. Πρωτεΐνες του ιού HPV E1-E5..... | 26 |
| 1.3.2.2. Ίικές ογκοπρωτεΐνες E6, E7..... | 30 |
| 1.3.2.3. Πρωτεΐνες του ιού HPV L1, L2..... | 33 |
| 1.3.3. Μορφή του γενώματος..... | 35 |
| 1.4. Κύκλος ζωής του ιού HPV (Human Papilloma Virus)..... | 36 |
| 1.4.1. Είσοδος του ιού στο κύτταρο..... | 36 |
| 1.4.2. Αντιγραφή, μεταγραφή του ιϊκού γενώματος..... | 37 |
| 1.4.3. Σύνθεση του ιϊκού γενώματος..... | 39 |
| 1.4.4. Έξοδος του ιού από το κύτταρο..... | 39 |
| 1.4.5. Ιστολογικές αλλοιώσεις – Ονοματολογία..... | 40 |
| 1.4.6. Real-Time PCR..... | 41 |
| 1.5. ΣΚΟΠΟΣ..... | 45 |
| 2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ - ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ | 46 |
| 2.1. Συλλογή και προέλευση των δειγμάτων..... | 46 |
| 2.2. Στατιστική ανάλυση..... | 47 |
| 2.3. Γενετική ανάλυση..... | 47 |
| 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ | 57 |
| 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ | 61 |
| 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ | 65 |

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο ιός των ανθρωπίνων θηλωμάτων (Human Papilloma Virus, HPV) ανήκει στους ιούς, οι οποίοι μεταδίδονται κυρίως με τη σεξουαλική οδό. Ο ιός έχει πάνω από 100 υπότυπους εκ των οποίων κάποιοι έχουν συσχετιστεί με κακοήθεια, τόσο του τραχήλου της μήτρας, όσο και της κεφαλής-τραχήλου.

Ο πιο αξιόπιστος τρόπος διάγνωσης του ιού HPV είναι η ανίχνευση του ιού των ανθρωπίνων θηλωμάτων με μοριακή μέθοδο και κυρίως με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Η PCR έχει την δυνατότητα, όχι μόνο να ανιχνεύει τον ιό, αλλά ταυτόχρονα να χαρακτηρίζει και τους υποτύπους του ιού (τυποποίηση), και έχει ευρέως χρησιμοποιηθεί στην κλινική πράξη.

Σημειώνεται, ότι στην πρόληψη του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας σημαντική υπήρξε η συμβολή του τετραδύναμου εμβολίου (HPV4) που περιείχε τους υποτύπους HPV 6,11,16,18 και φαίνεται ότι σε χώρες όπου ο εμβολιασμός ήταν υποχρεωτικός μειώθηκαν τα ποσοστά του καρκίνου. Σήμερα κυκλοφορεί το νέο εννεαδύναμο εμβόλιο (HPV9) το οποίο περιέχει τους υπότυπους 6,11,16,18,31,33,45,52 και 58.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να προσδιοριστεί το ποσοστό της παρουσίας (φορέας) του HPV και των επιμέρους υποτύπων του, σε τραχηλικά επιχρίσματα που ελήφθησαν από σεξουαλικά ενεργείς γυναίκες ελληνικής καταγωγής, κυρίως αναπαραγωγικής ηλικίας, χωρίς κλινική συμπτωματολογία, μη-εμβολιασμένες έναντι του ιού HPV και οι οποίες είχαν αρνητικό κυτταρολογικό έλεγχο κατά Παπανικολάου (αρνητικές για τραχηλικές ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις). Οι γυναίκες αυτές, προσήλθαν στα εξωτερικά ιατρεία της Γυναικολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας από την περιοχή της Θεσσαλίας σε περίοδο ενός οκταμήνου, Ιούνιος 2015 – Φεβρουάριος 2016.

Στόχος της μελέτης, η οποία είναι κατά βάση εστιασμένη στην τυποποίηση των υποτύπων που αποικίζουν υγιείς γυναίκες, είναι να βοηθήσει στην εκτίμηση κατά πόσο το νέο HPV9 εμβόλιο θα μπορούσε να επηρεάσει ουσιαστικά τη μείωση της φορέας στον υγιή πληθυσμό της περιοχής μας.

ABSTRACT

The Human Papilloma Virus (HPV) belongs to the sexually transmitted agents (STAs). The virus consists of more than 100 subtypes, many of which have been associated not only with cervical cancer, but also with head and neck-cancer.

Polymerase Chain Reaction (PCR) is the most reliable method in order to identify HPV. Real-Time PCR has the ability not only to identify the virus itself, but also various HPV-subtypes (HPV-Typing). PCR has proved important in clinical practice.

The role of HPV4-vaccine (6,11,16,18 subtypes) in the prevention of cervical cancer has been proved vital, reducing dramatically the risk of cervical cancer. Nowadays, a new vaccine has been introduced (Gardasil 9) against additional HPV subtypes (6,11,16,18,31,33,45,52 and 58).

From June 2015 to February 2016, a total number of 94 Greek women, negative for cervical lesion or inflammation according to cytological test, non-vaccinated for HPV and aged between (19-59) years old -namely of reproductive age- were examined. Collection of endocervical brushes was made by medical doctors at the Department of Gynecology of the University Hospital of Larissa.

Aim of the study was to determine the prevalence of various HPV-subtypes in asymptomatic sexually active women in Thessaly. Another aim of our study was to estimate the importance of the new HPV9 Vaccine (Gardasil 9) in the possibility of further reduction of HPV prevalence in asymptomatic women.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο ιός των ανθρωπίνων θηλωμάτων (Human Papilloma Virus, HPV) ανήκει στους ιούς, οι οποίοι μεταδίδονται κυρίως με τη σεξουαλική οδό. Ο ιός έχει πάνω από 100 υπότυπους εκ των οποίων κάποιοι έχουν συσχετιστεί με κακοήθεια, τόσο του τραχήλου της μήτρας, όσο και της κεφαλής-τραχήλου.

Με βάση τη συχνότητα ανίχνευσης των υποτύπων HPV από διάφορους βαθμούς Τραχηλικής Ενδοεπιθηλιακής Νεοπλασίας (CIN Βαθμοί I-III), οι υπότυποι HPV υποδιαιρούνται σε υψηλού κινδύνου υπότυπους HPV (16, 18, 31 και 45), ενδιάμεσου κινδύνου υπότυπους (33, 35, 39, 51, 52, 56, 58, 59 και 68) και χαμηλού κινδύνου υπότυπους (6, 11, 42-44). Μεγάλος αριθμός κλινικών μελετών, έδειξε αιτιολογική συσχέτιση μεταξύ ορισμένων υποτύπων HPV, (16,18) και νεοπλασίας του γεννητικού συστήματος. Τα κονδυλώματα των γεννητικών οργάνων (συχνά αναφέρονται ως οξυτενή κονδυλώματα) συνδέονται πιο συχνά με δύο τύπους HPV, τους HPV 6 και HPV 11.

Ο πιο αξιόπιστος τρόπος διάγνωσης του ιού HPV είναι η ανίχνευση του ιού των ανθρωπίνων θηλωμάτων με μοριακή μέθοδο και κυρίως με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Η PCR έχει την δυνατότητα, όχι μόνο να ανιχνεύει τον ιό, αλλά ταυτόχρονα να χαρακτηρίζει και τους υποτύπους του ιού (τυποποίηση), και έχει ευρέως χρησιμοποιηθεί στην κλινική πράξη.

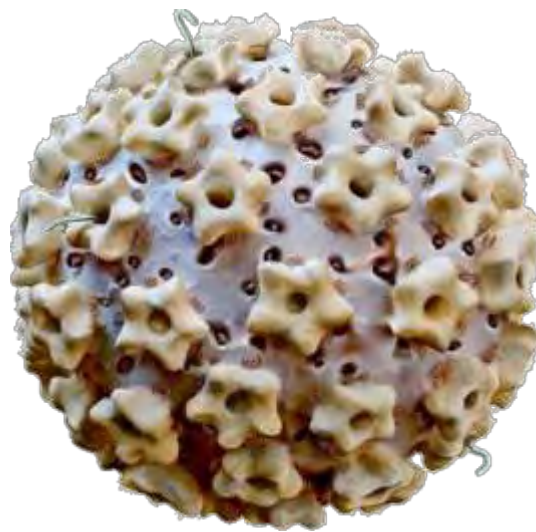
Σημειώνεται, ότι στην πρόληψη του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας σημαντική υπήρξε η συμβολή του τετραδύναμου εμβολίου (HPV4) που περιείχε τους υποτύπους HPV 6,11,16,18 και φαίνεται ότι σε χώρες όπου ο εμβολιασμός ήταν υποχρεωτικός μειώθηκαν τα ποσοστά του καρκίνου. Σήμερα κυκλοφορεί το νέο εννεαδύναμο εμβόλιο (HPV9) το οποίο περιέχει τους υπότυπους 6,11,16,18,31,33,45,52 και 58. Στη χώρα μας η Εθνική Επιτροπή Εμβολιασμού προτείνει τον εμβολιασμό HPV4 σε κορίτσια στην ηλικία των 11-12 ετών (δύο δόσεις με μεσοδιάστημα 6 μηνών), ενώ σε περίπτωση που υπάρχει καθυστέρηση στον εμβολιασμό προτείνεται να γίνουν τρεις δόσεις σε ηλικία 16-18 ετών (0, 1-2, 6). Από 1-7-2017 το HPV4 θα αντικατασταθεί από το HPV9.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να προσδιοριστεί το ποσοστό της παρουσίας (φορίας) του HPV και των επιμέρους υποτύπων του, σε τραχηλικά επιχρίσματα που ελήφθησαν από σεξουαλικά ενεργείς γυναίκες ελληνικής καταγωγής, κυρίως αναπαραγωγικής ηλικίας, χωρίς κλινική συμπτωματολογία, μη-εμβολιασμένες έναντι του ιού HPV και οι οποίες είχαν αρνητικό κυτταρολογικό έλεγχο κατά Παπανικολάου (αρνητικές για τραχηλικές ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις). Οι γυναίκες αυτές, προσήλθαν στα εξωτερικά ιατρεία της Γυναικολογικής

Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας από την περιοχή της Θεσσαλίας σε περίοδο ενός οκταμήνου, Ιούνιος 2015 – Φεβρουάριος 2016.

Στόχος της μελέτης, η οποία είναι κατά βάση εστιασμένη στην τυποποίηση των υποτύπων που αποικίζουν υγιείς γυναίκες, είναι να βοηθήσει στην εκτίμηση κατά πόσο το νέο HPV9 εμβόλιο θα μπορούσε να επηρεάσει ουσιαστικά τη μείωση της φορέας στον υγιή πληθυσμό της περιοχής μας.

Η μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ανοσολογίας του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Ανοσολογίας κ. Αναστάσιου Γερμενή. Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε βασίστηκε στην μοριακή ανίχνευση και ταυτοποίηση των υποτύπων του ιού HPV άμεσα στο κλινικό δείγμα των γυναικών της μελέτης.



ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1. Βιολογία του ιού HPV (Human Papilloma Virus)

Ο ιός των ανθρώπινων θηλωμάτων (Human Papilloma Virus, HPV) ανήκει στην οικογένεια Papilloma viridae. Το όνομα Παρονα είναι ακρωνύμιο και προέρχεται από τη σύνθεση των δυο πρώτων γραμμμάτων των ιών, που πρώτοι δημιούργησαν την οικογένεια. 1. Papilloma virus, ιός του θηλώματος 2. Ρο: polyoma virus, ιός πολυώματος των ποντικών 3. Va: simian vacuolating virus SV40, ιός κεντοπιώδους εκφύλισης νεφρικών κυττάρων πιθήκων. Είναι μικροί σε μέγεθος DNA με διάμετρο 52-55 nm. Δίκλωνοι κυκλικοί DNA ιοί, με μέγεθος 7900 bp, χωρίς εξωτερικό περίβλημα. Η μόλυνση από τον ιό των ανθρώπινων θηλωμάτων (Human Papilloma Virus) αποτελεί αναγκαία συνθήκη για την ανάπτυξη της τραχηλικής ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας (Cervical Intraepithelial Neoplasia, CIN) και του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας [1].

Ο HPV μεταδίδεται με τη σεξουαλική επαφή και αποτελεί σήμερα το πιο συχνό σεξουαλικά μεταδιδόμενο λοιμογόνο παράγοντα σε παγκόσμιο επίπεδο. Προσβάλλει κυρίως τη βασική στιβάδα του επιθηλίου, ενώ σχετίζεται με την ανάπτυξη ενδοεπιθηλιακών αλλοιώσεων. Θεωρείται λοιπόν υπεύθυνος για την πρόκληση μίας σειράς βλαβών, οι οποίες εκτείνονται από κοινά θηλώματα μέχρι και καρκίνο του τραχήλου της μήτρας ή καρκίνο του πέους [2]. Η αρχική νόσος του τραχηλικού επιθηλίου σε ποσοστό ως 80 % υποχωρεί αυτομάτως (αυτοϊάται), ενώ στις υπόλοιπες περιπτώσεις αναπτύσσεται ενδοεπιθηλιακή βλάβη άλλοτε άλλης βαρύτητας, η οποία εάν αφεθεί χωρίς θεραπεία, δύναται να εξελιχθεί σε καρκίνο του τράχηλου της μήτρας.

Ανακαλύφθηκε στις αρχές του 20^{ου} αιώνα, αφότου αποδείχθηκε ότι τα δερματικά θηλώματα μεταδίδονταν μεταξύ ατόμων, μέσω ενός διηθητού παράγοντα [1]. Το 1935 ο Francis Peyton Rous συσχέτισε πρώτος τους ιούς Papilloma με τον καρκίνο του δέρματος, παρατηρώντας μολυσμένα κουνέλια του γένους *sylvilagus* που εμφάνιζαν θηλώματα, τα οποία μετά από μικρό χρονικό διάστημα μετατρέπονταν σε κακοήγη όγκο. Το συμβάν αυτό αποτέλεσε μία πρώτη ένδειξη, η οποία και τελικά ενοχοποίησε τους ιούς για την πρόκληση καρκίνου. Από τότε κι έπειτα, εντοπίστηκαν διάφοροι τύποι αυτής της ομάδας ιών και συνδέθηκαν με τη δημιουργία όγκων σε διάφορα είδη οργανισμών μεταξύ των οποίων και ο άνθρωπος. Ωστόσο, οι ιοί Papilloma έγιναν ευρέως γνωστοί στις αρχές της δεκαετίας του '80, όταν το 1983 ο Harald zur Hausen απομόνωσε τον πρώτο HPV 16 από μία γυναίκα που έπασχε από καρκίνο του τραχήλου της μήτρας [2]. Αργότερα, διαπιστώθηκε ότι συγκεκριμένα στελέχη του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων συσχετίζονται με τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, μία από τις πλέον διαδεδομένες μορφές καρκίνου στον κόσμο. Συγκεκριμένα, ο καρκίνος του τραχήλου της

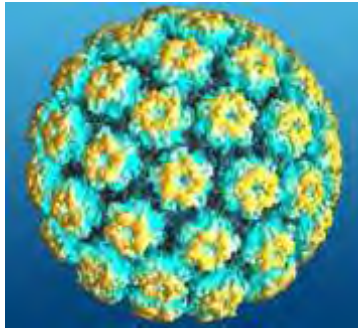
μήτρας αποτελεί τη δεύτερη πιο συχνή μορφή καρκίνου μεταξύ των γυναικών παγκοσμίως [3,4]. Στη συνέχεια, ταυτοποιήθηκαν και αλληλουχήθηκαν πλήρως περισσότεροι από 100 διαφορετικοί υπότυποι HPV [1,5].

Ο ιός των ανθρώπινων θηλωμάτων είναι ένας ιός που βασίζεται στο DNA (dsDNA) και μολύνει το δέρμα και τους βλεννογόνους των ανθρώπων και ορισμένων ζώων. Σύμφωνα με τους Bernard και συνεργάτες [5] μέχρι στιγμής έχουν αναγνωρισθεί 189 υπότυποι του ιού των θηλωμάτων, από τους οποίους οι 120 υπότυποι προσβάλλουν τον άνθρωπο και περίπου οι 40 μεταδίδονται διά της σεξουαλικής οδού. Όλοι οι υπότυποι μεταδίδονται μέσω δερματικής επαφής, ως εκ τούτου δεν απαιτείται πλήρης σεξουαλική επαφή για τη μετάδοση. Ο Gillison και συνεργάτες αναφέρουν 40 μορφές του ιού που μεταδίδονται μέσω σεξουαλικής επαφής και μολύνουν τη περιοχή των γεννητικών οργάνων [6].

Οι ιοί HPV διαχωρίζονται σε δερματικούς ιούς και σε ιούς που προσβάλλουν το επιθήλιο του βλεννογόνου. Οι δερματικοί τύποι HPV προκαλούν καλοήγη δερματικά θηλώματα όπως το κοινό θήλωμα, το ακροχορδώδες θήλωμα και το επίπεδο θήλωμα [7]. Οι τύποι HPV που προσβάλλουν τον βλεννογόνο προκαλούν αλλοιώσεις στον τράχηλο της μήτρας, στον ανώτερο αναπνευστικό σωλήνα, στον οισοφάγο και αποτελούν τον αναγκαίο αιτιολογικό παράγοντα για την ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία και τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, ενώ ανάλογα με την έκταση και τη σοβαρότητα της βλάβης κατηγοριοποιούνται σε τρεις χαρακτηριστικές ομάδες:

- ομάδα **υψηλού κινδύνου**, τα μέλη της οποίας είναι συνδεδεμένα με την πρόκληση επεκτατικού καρκίνου του ουρογεννητικού συστήματος
- ομάδα **ενδιάμεσου κινδύνου**, τα μέλη της οποίας συχνά ανευρίσκονται σε δυσπλασίες
- ομάδα **χαμηλού κινδύνου**, τα μέλη της οποίας είναι στενά συνδεδεμένα με την πρόκληση θηλωμάτων, ενώ εντοπίζονται σπανίως στον καρκίνο [5,8].

Οι σεξουαλικά μεταδιδόμενοι –υψηλής επικινδυνότητας υπότυποι - 16,18,31,33,35,39,45,51,52,53,56,58,59,66,68,70,73,82,85, προκαλούν εμμένουσα λοίμωξη και μπορεί να οδηγήσουν σε καρκίνο του τράχηλου της μήτρας, καρκίνο του πέους, καρκίνο του αιδοίου, καρκίνο του πρωκτού. Ακόμη, ο καρκίνος στο λάρυγγα, στον οισοφάγο και στον πνεύμονα μοιάζει ιστολογικά με τον καρκίνο στον τράχηλο της μήτρας, γεγονός που εμπλέκει τους ιούς Papilloma με επιπλέον καρκινικές μορφές.



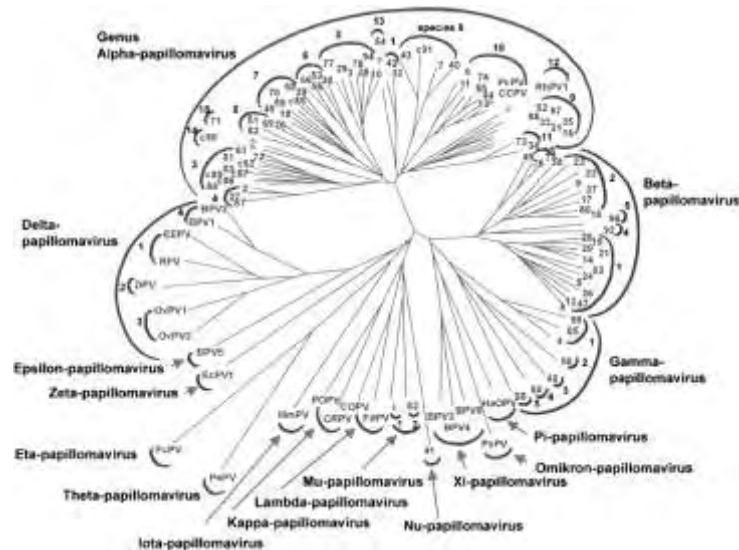
Εικόνα 1: Απεικόνιση του καψιδίου του HPV Virus

1.2. Ταξινόμηση του ιού HPV (Human Papilloma Virus)

Οι Papillomaviruses ταξινομήθηκαν πρωτίστως μαζί με τους Polyomaviruses και τον SV 40 στην οικογένεια των Papovaviridae. Αυτή η ομαδοποίηση βασίστηκε κατά κύριο λόγο στην ομοιότητα του καψιδίου τους, στην έλλειψη περιβλήματος, καθώς και στην ύπαρξη δίκλωνου κυκλικού μορίου DNA [9]. Μεταγενέστερα ωστόσο, η διεθνής επιτροπή ταξινόμησης των ιών (ICTV) ενέκρινε τη σύσταση μίας ξεχωριστής ταξινομικής οικογένειας ιών, αυτής των Papillomaviridae, που περιλάμβανε τους ιούς Papilloma χωρίς τους ιούς Polyoma και SV 40. Ο διαχωρισμός αυτός έγινε κυρίως βάσει διαφορών στην οργάνωση, στο μέγεθος και στη νουκλεοτιδική αλληλουχία μεταξύ των Papillomaviruses και των Polyomaviruses και SV 40 ιών, μελών της οικογένειας Papovaviridae [10,11].

Η ταξινόμηση των ιικών τύπων έγινε με βάση την προέλευση του στελέχους και το βαθμό συγγένειας των ιικών γενωμάτων [12]. Οι ιοί Papilloma δεν κατηγοριοποιήθηκαν σε ορότυπους, αλλά ομαδοποιήθηκαν σε γένη, τα ονόματα των οποίων προέρχονται από ένα γράμμα της ελληνικής αλφαβήτου (Alphapapillomavirus, Betapapillomavirus, Gammapapillomavirus, Deltapapillomavirus, Epsilonpapillomavirus, Zetapapillomavirus, Etapapillomavirus, Thetapapillomavirus, Iotapapillomavirus, Kappapapillomavirus, Lamdapapillomavirus, Mupapillomavirus, Nupapillomavirus, Xipapillomavirus, Omicronpapillomavirus, Pīpapillomavirus). Ακόμη, κάθε γένος διαχωρίστηκε περαιτέρω σε τύπους, υπότυπους και παραλλαγές (variants). Η συγκεκριμένη διάκριση στηρίχθηκε στην ομοιότητα της αλληλουχίας του καψιδιακού γονιδίου L1. Η αλληλουχία του γονιδίου L1 διαφέρει μεταξύ των διαφορετικών τύπων τουλάχιστον κατά 10%, μεταξύ των υπότυπων κατά 2%-10%, ενώ μεταξύ των παραλλαγών κατά 2% [5,11]. Τα γένη Alphapapillomavirus, Betapapillomavirus, Gammapapillomavirus, Mupapillomavirus, Nupapillomavirus περιέχουν στελέχη των Papilloma ιών που απομονώθηκαν από τον άνθρωπο, ενώ τα γένη Deltapapillomavirus,

Epsilonpapillomavirus, Zetapapillomavirus, Etapapillomavirus, Thetapapillomavirus, Iotapapillomavirus, Kappapapillomavirus, Lambdapapillomavirus, Xipapillomavirus, Omicronpapillomavirus, Pιpapillomavirus περιέχουν στελέχη των ιών Papilloma που εντοπίστηκαν κυρίως σε πτηνά και θηλαστικά [13,14].



Εικόνα 2: Σχηματική ταξινόμηση των Papilloma Viruses (PVs) μέσω φυλογενετικού δένδρου.

1.2.1. Γένη του ιού HPV (Human Papilloma Virus)

Τα γένη Alphapapillomavirus, Betapapillomavirus, Gammapapillomavirus, Mυpapillomavirus και Nυrapapillomavirus περιέχουν στελέχη των ιών Papilloma που απομονώθηκαν από τον άνθρωπο. Το γένος Alpha Papillomavirus συμπεριλαμβάνει τους ιούς που προσβάλλουν το επιθήλιο του βλεννογόνου και κάποιους από τους ιούς που προσβάλλουν το επιθήλιο του δέρματος [5].

Οι τύποι HPV που συγκαταλέγονται στην ομάδα υψηλής επικινδυνότητας επιδρούν στο επιθήλιο του τραχήλου της μήτρας και προκαλούν καρκίνο [15,16]. Σε αυτή την ομάδα περιλαμβάνονται οι HPV 16 και HPV 18, οι κύριοι παράγοντες πρόκλησης καρκινικών τραχηλικών αλλοιώσεων. Είναι πλέον γεγονός, πως στο 90% των περιπτώσεων καρκίνου του τραχήλου της μήτρας ανευρίσκεται DNA από HPVs και σε ποσοστό της τάξης του 50% αυτών των περιπτώσεων, ανιχνεύεται το DNA του HPV 16 [17,18,19]. Οι υπόλοιποι τύποι αυτού του γένους ταξινομούνται στην ομάδα ενδιάμεσης επικινδυνότητας και στην ομάδα χαμηλής επικινδυνότητας, βάσει της συχνότητας με την οποία εντοπίζονται σε καρκινικές αλλοιώσεις. Οι τύποι της ομάδας χαμηλής επικινδυνότητας δεν εμπλέκονται σχεδόν ποτέ στην πρόκληση

καρκίνου, ωστόσο παρουσιάζουν ενδιαφέρον τόσο ερευνητικά, όσο και διαγνωστικά, καθώς προκαλούν θηλώματα του ουρογεννητικού συστήματος [20,21].

Οι τύποι HPV που προσβάλλουν το επιθήλιο του δέρματος ομαδοποιούνται σε τέσσερα διαφορετικά γένη, Beta, Gamma, Mu και Nu Papillomaviruses. Οι συγκεκριμένοι ιοί εντοπίζονται συχνά σε δείγματα υγιούς δέρματος, αποδεικνύοντας ότι προκαλούν ασυμπτωματικές μολύνσεις.

Το γένος Beta Papillomavirus διαιρείται σε τέσσερα διαφορετικά στελέχη HPV. Τα μέλη της οικογένειας αυτής προσβάλλουν το επιθήλιο του δέρματος, χωρίς όμως να προκαλούν αλλοιώσεις. Παρόλα αυτά, η μόλυνση ανοσοκατεσταλμένων ασθενών από στελέχη του συγκεκριμένου γένους μπορεί να προκαλέσει μη-μελανωματικό καρκίνο του δέρματος [7]. Τα στελέχη HPV 5 και HPV 8 ανευρίσκονται στο 90% αυτών των όγκων [22].

Τα γένη Gamma, Mu και Nu Papillomaviruses περιέχουν τα υπόλοιπα στελέχη HPV και προκαλούν δερματικά θηλώματα, τα οποία δεν εξελίσσονται ποτέ σε καρκίνο [20]. Το γένος Gamma σχετίζεται με τα στελέχη HPV 101, HPV 103, το Mu με τα στελέχη HPV 1, HPV 63, ενώ το Nu με το στέλεχος HPV 41.

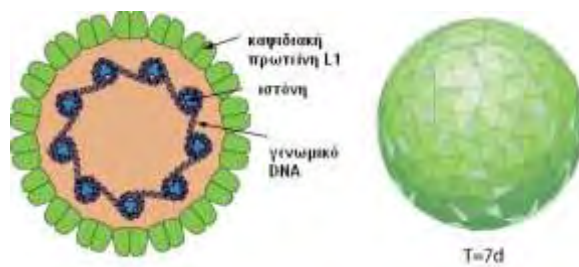
1.3. Δομή του ιού HPV (Human Papilloma Virus)

1.3.1. Δομή του καψιδίου

Οι ιοί Papilloma είναι μία ομάδα μικρών δίκλωνων DNA ιών, μεγέθους 7900 bp και διαμέτρου 50-60 nm, χωρίς εξωτερικό περίβλημα [23].

Το ιϊκό σωματίο περικλείεται στην εξωτερική του επιφάνεια από 72 πενταμερή της πρωτεΐνης L1 [24]. Η καψιδιακή πρωτεΐνη L1 είναι ο παράγοντας που συμβάλλει στην αναγνώριση των ιϊκών σωματίων από το ανοσολογικό σύστημα του προσβεβλημένου ατόμου [25,26]. Η καψιδιακή πρωτεΐνη L2 τοποθετείται εσωτερικά του σκελετού της πρωτεΐνης L1 και έχει άγνωστο δομικό ρόλο [27,28]. Ωστόσο, η πρωτεΐνη L2 συνδέεται μέσω μίας υδρόφοβης περιοχής κοντά στο C-τελικό άκρο της με την πρωτεΐνη L1. Μέσω αυτής της περιοχής η L2 εισέρχεται στο κέντρο του πενταμερούς L1 [30]. Η βασική της λειτουργία είναι η συμμετοχή στο πακετάρισμα του ιϊκού DNA στα νεοσχηματιζόμενα ιϊκά καψίδια [31,32,33,34]. Ακόμη, οι κυτταρικές ιστόνες συμπυκνώνουν το γένωμα του ιού σε ένα δίκλωνο κυκλικό DNA χρωμόσωμα εντός του καψιδίου L1/L2 [35]. Το πενταμερές L1 περιέχει πέντε θηλιές που μοιάζουν με πλαϊνές προεξοχές και αποτελούνται από 100 C-τελικά άκρα. Κάθε προεξέχουσα

θηλιά αποτελείται από μία α-έλικα, αγκιστρωμένη στον πυρήνα του πενταμερούς L1 διαμέσου δύο ελίκων, της έλικας 2 και της έλικας 3. Τα πενταμερή είναι συνδεδεμένα με ισχυρούς υδρόφοβους δεσμούς μέσω της έλικας 4 του ενός πενταμερούς και των ελίκων 2 και 3 του γειτονικού πενταμερούς. Τα υπόλοιπα C-τελικά άκρα επιστρέφουν στον πυρήνα της L1 για να σχηματίσουν την έλικα 5 [35].



Εικόνα 3: Παρουσίαση της δομής του καψιδίου των Human Papilloma Viruses (HPVs).

1.3.2. Οργάνωση του γενόματος

Το γένωμα των ιών Papilloma είναι ένα δίκλωνο κυκλικό μόριο DNA. Στα ιϊκά σωματίδια το DNA εντοπίζεται συνδεδεμένο με κυτταρικές ιστόνες σχηματίζοντας μία μορφή που μοιάζει με τη χρωματίνη [34]. Περιλαμβάνει έξι μη-δομικά ιϊκά γονίδια, τα E1, E2, E4, E5, E6, E7 και δύο δομικά γονίδια, τα L1, L2 [23]. Ακόμη, περιέχει οκτώ ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (ORFs, open reading frames).

Το ιϊκό γονιδίωμα διαιρείται σε τρεις περιοχές:

α) πρόωμη περιοχή (E, early region), περιλαμβάνει 8 γονίδια E1-E8. Κωδικοποιούν πρωτεΐνες απαραίτητες για την αντιγραφή του ιϊκού DNA και εκφράζονται αμέσως μετά την είσοδο του HPV στα κύτταρα .

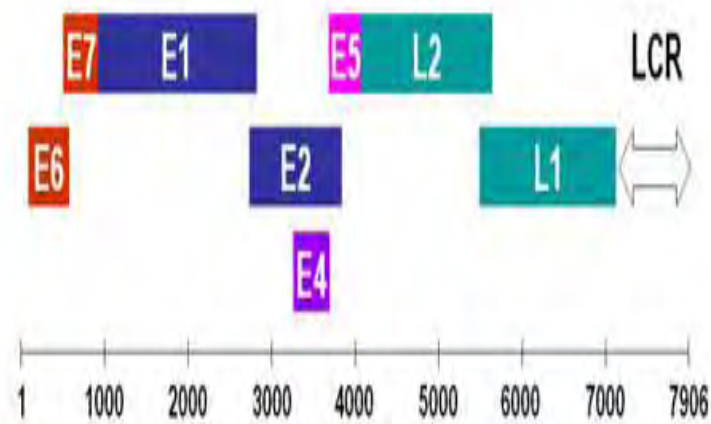
β) όψιμη περιοχή (L, late region), περιλαμβάνει δύο γονίδια L1 και L2. Κωδικοποιούν δομικές πρωτεΐνες του καψιδίου και εκφράζονται στα τελικά στάδια του κύκλου του ιού .

γ) μη-κωδική ρυθμιστική περιοχή URR ή NCR (Upstream Regulatory Region ή Non coding Region). Ρυθμίζει τη μεταγραφή και την έναρξη της αντιγραφής του DNA και βρίσκεται αναμεσα στην E και L περιοχή. Οι γονιδιακές περιοχές του DNA του ιού που κωδικοποιούν πρωτεΐνες ονομάζονται Ανοιχτά Πλαίσια Αναγνώρισης –ΑΠΑ (Open Reading Frames-ORF) και περιορίζονται στη μία αλυσίδα.

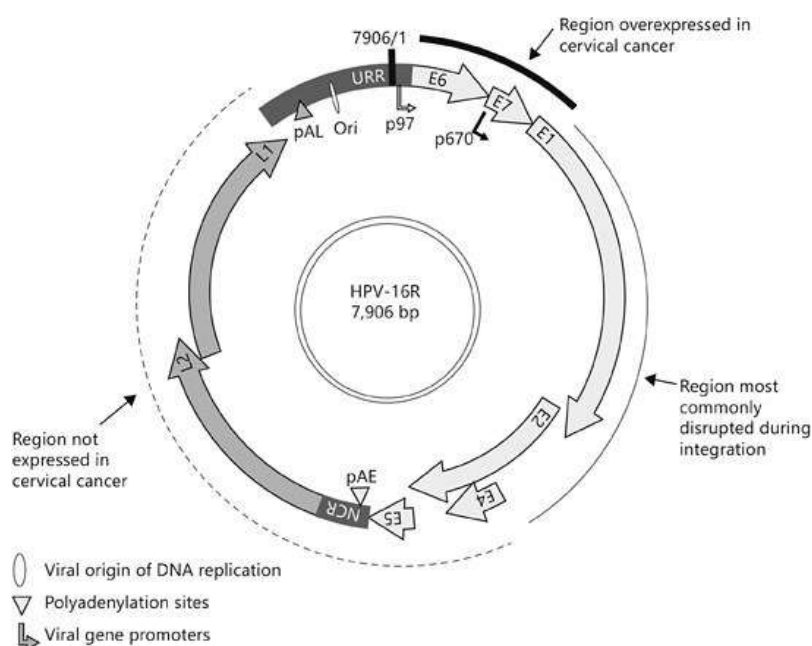
Η πρωτεΐνη L1 αποτελεί την κυρία πρωτεΐνη του καψιδίου (αποτελεί 80% του συνόλου) με μοριακό βάρος 55 Kd. Η πρωτεΐνη L2 έχει μοριακό βάρος 70 και συμμετέχει σε μικρότερο βαθμό στη δημιουργία του καψιδίου. Και οι δύο πρωτεΐνες συντίθενται στο κυτταρόπλασμα του

ξενιστή κατά την όψιμη παραγωγική φάση του ιϊκού κύκλου και στη συνέχεια μεταφέρονται στο πυρήνα του κυττάρου ξενιστή όπου και συμμετέχουν στη συγκρότηση ιϊκού σωματίου .

Η όψιμη περιοχή κωδικοποιεί για τις όψιμες δομικές πρωτεΐνες L1 και L2, που σχηματίζουν το ιϊκό καψίδιο. Η ρυθμιστική περιοχή LCR έχει μέγεθος 850 bp και δεν περιέχει στην αλληλουχία της ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης. Η περιοχή αυτή εντοπίζεται μεταξύ του τέλους του γονιδίου L1 και της αρχής του γονιδίου E6. Ακόμη, η LCR περιλαμβάνει τη θέση έναρξης της αντιγραφής και αρκετές ρυθμιστικές αλληλουχίες για την έκφραση του ιϊκού DNA [36,37]. Η έκφραση του γενόματος του HPV 16 ρυθμίζεται από δύο βασικούς υποκινητές, τον υποκινητή p97, που είναι υπεύθυνος για την έκφραση των πρώιμων γονιδίων [38] και τον υποκινητή p670, που είναι υπεύθυνος για την έκφραση των όψιμων γονιδίων [39,40].



Εικόνα 4: Παρουσίαση της οργάνωσης του γενόματος των Human Papilloma Viruses (HPVs).

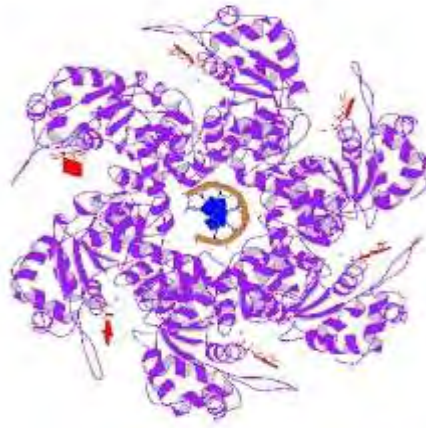


Εικόνα 5: Σχηματική αναπαράσταση του γενόματος των Human Papilloma Viruses (HPVs).

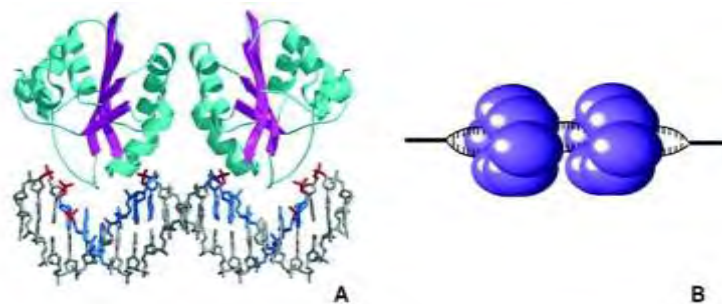
1.3.2.1. Πρωτεΐνες του ιού HPV E1, E2, E3, E4, E5

Η **ϊική πρωτεΐνη E1**, είναι υπεύθυνη για τον αναδιπλασιασμό του DNA του ιού, αποτελεί μία πολυλειτουργική πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη με χαμηλό επίπεδο έκφρασης και μέγεθος 70-80 kDa. Η E1 με τη δράση της σαν ελικάση, προσδένεται σε ειδική περιοχή έναρξης της αντιγραφής του DNA, με τη βοήθεια της E2 πρωτεΐνης, με την οποία σχηματίζει ένα σύμπλοκο. Η παρουσία της είναι απαραίτητη για την αντιγραφή του ιικού γενόματος [41], ενώ παρουσιάζει εκτεταμένη αμινοξική και λειτουργική ομολογία με το μεγάλο T-αντιγόνο του SV 40 και του ιού Polyoma [42,43]. Η πρωτεΐνη E1 προσδένεται σε ειδικές περιοχές του DNA, ενώ διαθέτει δραστηριότητα ελικάσης και ATP-άσης. Ακόμη, έχει τη δυνατότητα να σχηματίζει σύμπλοκα με την πρωτεΐνη E2 και τη μεγάλη υπομονάδα της DNA πολυμεράσης α . Η δραστηριότητα της ATP-άσης τοποθετείται στη C-τελική περιοχή της πρωτεΐνης. Το C-τελικό άκρο της E1 συμβάλλει στον ολιγομερισμό της σε ένα εξαμερές [44]. Αυτός ο τομέας είναι επίσης υπεύθυνος για την αλληλεπίδραση με την πολυμεράση α του ξενιστή [45]. Παρουσία ATP η E1 προσδένεται σε μία πλούσια σε AT περιοχή της LCR προκαλώντας δομικές αλλαγές [46].

Ως πρωτεΐνη έναρξης της αντιγραφής, η E1 κατέχει δύο βασικούς ρόλους, δρα ως πρωτεΐνη πρόσδεσης αναγνωρίζοντας το σημείο έναρξης της αντιγραφής, ενώ δρα και ως ελικάση ξεδιπλώνοντας τη θέση έναρξης της αντιγραφής ώστε να προχωρά η αντιγραφική διχάλα [47]. Η E1 προσδένεται σε μία επαναλαμβανόμενη αλληλουχία 18 bp εντός της περιοχής έναρξης της αντιγραφής με τη βοήθεια της πρωτεΐνης E2, η οποία λειτουργεί ως διμερής αντιγραφικός παράγοντας [48]. Το σύμπλοκο E1-E2 αποτελείται από ένα διμερές E2 και δύο μόρια E1. Το σύμπλοκο δρα σαν δομική μονάδα για τη συγκρότηση ενός μεγαλύτερου εξαμερούς συμπλόκου E1, που έχει την ιδιότητα να ξετυλίγει το DNA [49]. Η E2 επομένως, λειτουργεί ως παράγοντας που κατευθύνει την E1 στην περιοχή πρόσδεσής της και επιπρόσθετα ως παράγοντας που συναρμολογεί τα μονομερή E1 [49,50]. Η πρωτεΐνη E1 αποτελεί επιπλέον έναν εξαιρετικά ελκυστικό στόχο σε ό,τι αφορά την ανάπτυξη αντί-HPV φαρμάκων, εφόσον είναι απαραίτητη για την **ϊική αντιγραφή και παθογένεια** [51,52].



Εικόνα 6: Απεικόνιση της τριτοταγούς δομής της ιικής πρωτεΐνης E1.

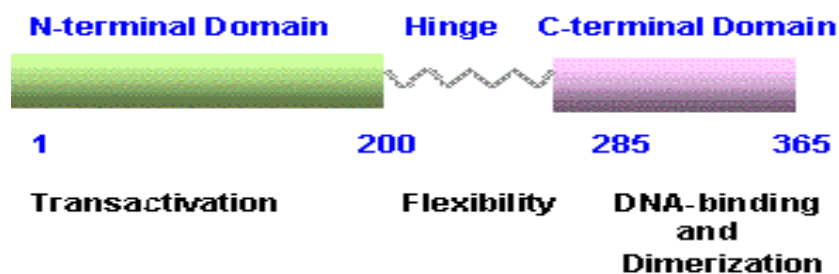


Εικόνα 7: Απεικόνιση Α) της αλληλεπίδρασης της ιικής πρωτεΐνης E1 με το DNA του κυττάρου και Β) των εξαμερών της ιικής πρωτεΐνης E1 κατά το ξετύλιγμα του DNA.

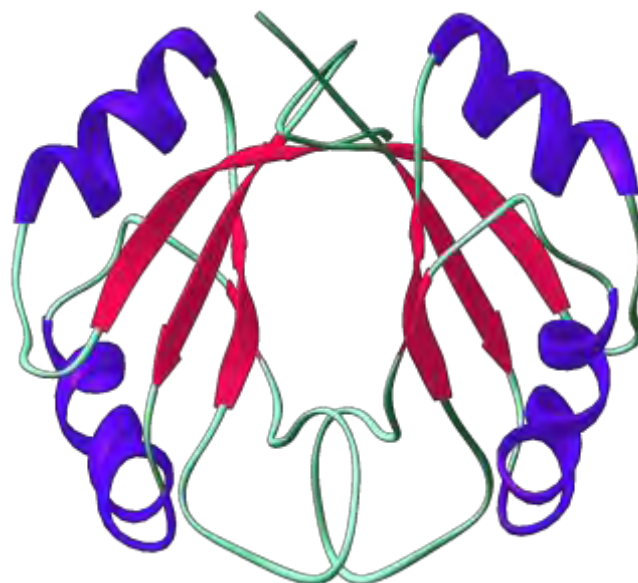
Η **ϊική πρωτεΐνη E2** είναι μία πρωτεΐνη μεγέθους 50 kDa, που δρα ως διμερές και ρυθμίζει την αντιγραφή και τη μεταγραφή του ιικού DNA [53,54,55]. Αποτελείται από τρεις περιοχές, τη C-τελική περιοχή, η οποία σχηματίζει μία διμερή δομή β-βαρελίου που προσδένεται στο DNA [56,57] την περιοχή αρμός (hinge region) και τη N-τελική περιοχή, η οποία σχηματίζει μία α-έλικα [58]. Η C-τελική περιοχή και η N-τελική περιοχή είναι αρκετά συντηρημένες μεταξύ των HPV, ενώ η περιοχή αρμός εμφανίζει ετερογένεια [59].

Η πρωτεΐνη E2 συνδέεται σε ειδικές θέσεις στο DNA βοηθώντας την πρόσδεση της E1 στη θέση έναρξης της αντιγραφής. Επιπλέον, επιδρά στη ρύθμιση της μεταγραφής δρώντας ως ενεργοποιητής ή καταστολέας [60]. Η E2 προσδένεται σε τέσσερις θέσεις της συντηρημένης αλληλουχίας ACCGN₄CGGT [61]. Οι περιοχές αυτές βρίσκονται εντός της περιοχής LCR του HPV 16 και ρυθμίζουν τη μεταγραφή των γονιδίων E6 και E7 [38]. Οι δύο από αυτές, βρίσκονται στο TATA box ανοδικά του υποκινητή p97 του γονιδίου E6 και συνορεύουν στο 5' άκρο με μία θέση πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα Sp1 και στο 3' άκρο με τον

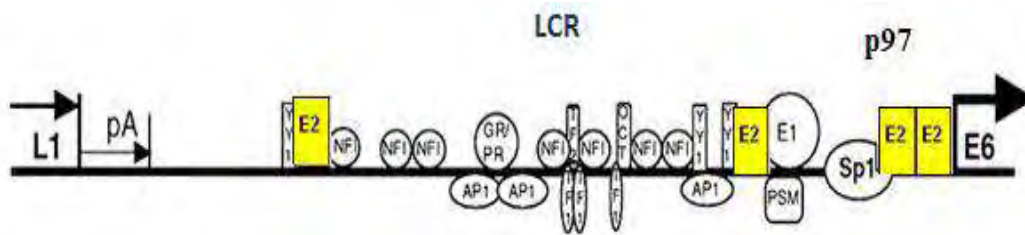
παράγοντα πρόσδεσης στο TATA box (TBP). Η σύνδεση της E2 στις περιοχές κοντά στον υποκινητή εμποδίζει την πρόσδεση του Sp1 και του TBP στις αντίστοιχες θέσεις τους και επάγει την καταστολή της μεταγραφής [37,62]. Οι άλλες δύο, εντοπίζονται ανοδικά του υποκινητή και η πρόσδεση της E2 σε αυτές οδηγεί στην ενεργοποίηση της μεταγραφής [63]. Η E2 παρουσιάζει διαφορετική συγγένεια για τις θέσεις πρόσδεσης, ενώ η κάλυψη των θέσεων εξαρτάται από τη συγκέντρωση. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις η E2 συνδέεται σε θέσεις που τοποθετούνται μακριά από τον υποκινητή του γονιδίου E6. Στην περίπτωση αυτή, οι κυτταρικοί μεταγραφικοί παράγοντες μπορούν να προσδεθούν και να ξεκινήσει η έκφραση των γονιδίων E6 και E7 [64]. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις καταλαμβάνονται και οι τέσσερις θέσεις πρόσδεσης της E2 και οι κυτταρικοί μεταγραφικοί παράγοντες όπως ο Sp1 και ο TFIIID/B εκτοπίζονται από το TATA box. Τότε, η E2 δρα ως μεταγραφικός καταστολέας και σταματά την έκφραση των γονιδίων E6 και E7 [64,65].



Εικόνα 8: Απεικόνιση της ικής πρωτεΐνης E2 και παρουσίαση των τριών βασικών περιοχών και των λειτουργιών της.



Εικόνα 9: Απεικόνιση του διμερούς της ικής πρωτεΐνης E2 και παρουσίαση των οκτώ β-βαρελιών και των τεσσάρων α-ελίκων.



Εικόνα 10: Απεικόνιση των θέσεων πρόσδεσης της πρωτεΐνης E2 στο γένωμα του ιού HPV 16.

Η **ϊική πρωτεΐνη E4** συντίθεται στην όψιμη φάση του κύκλου ζωής των HPVs και εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα, τα υψηλότερα ίσως απ' όλες τις υπόλοιπες πρωτεΐνες του ιού.

Το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης της E4 μεταφράζεται μαζί με τα πέντε πρώτα αμινοξέα του γονιδίου E1 [66,67]. Ακόμη, από το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης της E4 απουσιάζει το κωδικόνιο λήξης AUG. Σχηματίζεται έτσι τελικά η πρωτεΐνη E1^{E4} [34]. Όλοι οι ιοί Papilloma εκφράζουν την πρωτεΐνη E1^{E4} στην όψιμη φάση του κύκλου ζωής τους. Η E1^{E4} αποτελεί ουσιαστικά το σημαντικότερο παράγοντα ρύθμισης της αντιγραφής του ιικού γενώματος στην όψιμη φάση ζωής [68]. Παρόλα αυτά, η λειτουργία της δεν είναι πάντοτε απαραίτητη για την αντιγραφή όλων των τύπων των ιών Papilloma [69]. Η E1^{E4} αλληλεπιδρά με το δίκτυο ινιδίων κερατίνης στα διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα επάγοντας την καταστροφή του δικτύου και την απελευθέρωση των νεοσχηματιζόμενων ιικών σωματίων [70].

Η πρωτεΐνη E1^{E4} του HPV 16 διαχωρίζεται σε τρεις λειτουργικές περιοχές, το N-τελικό άκρο, με το πλούσιο σε λευκίνη μοτίβο (LLXLL), την κεντρική πλούσια σε προλίνη περιοχή και το C-τελικό άκρο [71]. Συγκεκριμένα, το συντηρημένο μοτίβο πλούσιο σε λευκίνη (LLXLL) στο N-τελικό άκρο της E1^{E4} είναι απαραίτητο για την αλληλεπίδραση με το δίκτυο ινιδίων κερατίνης ενώ το C-τελικό άκρο της E1^{E4} των HPV 16 και HPV 18 απαιτείται για την καταστροφή του [72]. Μία ακόμη λειτουργία της E1^{E4} των HPV 11 και HPV 16 αποτελεί η παύση του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2, γεγονός που εφαρμόζεται σε μία ποικιλία κυτταρικών σειρών [72]. Ακόμη, η E1^{E4} πρωτεΐνη του HPV 16 διαθέτει και την ικανότητα επαγωγής της απόπτωσης, ενώ μελετάται εκτενώς και η σχέση, η σύνδεση και η αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης με τα μιτοχόνδρια του κυττάρου και τους εμπλεκόμενους αποπτωτικούς μηχανισμούς.

Η **ϊική πρωτεΐνη E5** είναι μία μικρή υδρόφοβη πρωτεΐνη. Τοποθετείται στις ενδοσωμικές μεμβράνες και στη συσκευή Golgi, ενώ περιστασιακά εντοπίζεται και στις κυτταρικές μεμβράνες [73]. Η πρωτεΐνη E5 εκφράζεται τόσο στο όψιμο, όσο και στο πρώιμο στάδιο της ζωής του ιού. Στο πλαίσιο ολόκληρου του γενώματος του HPV 31 αποδείχθηκε ότι η E5 επηρεάζει τα επίπεδα φωσφορυλίωσης του EGF στα διαφοροποιημένα και στα αδιαφοροποίητα κύτταρα [74]. Πιο συγκεκριμένα, η απώλεια της E5 συμβάλλει στην αναστολή των όψιμων ιϊκών λειτουργιών στα διαφοροποιημένα κύτταρα, επιβεβαιώνοντας ότι η βασική της λειτουργία εντοπίζεται σε αυτή την κατηγορία των κυττάρων [75].

Ακόμη, η πρωτεΐνη E5 ίσως εμπλέκεται και στην ικανότητα διαφυγής του ιού από την ανοσολογική απάντηση του ξενιστή συγκρατώντας το MHC τύπου I στη συσκευή Golgi και εμποδίζοντας με αυτόν τον τρόπο τη μεταφορά του στην κυτταρική επιφάνεια [76,77].

1.3.2.2. Ιϊκές ογκοπρωτεΐνες E6, E7

Η βασική λειτουργία της ιϊκής **ογκοπρωτεΐνης E6** είναι η ικανότητα αλληλεπίδρασής της με την πρωτεΐνη TP53. Η πρωτεΐνη TP53 αποτελεί καταστολέα όγκων, καθώς ρυθμίζει την έκφραση πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Μία από αυτές τις πρωτεΐνες είναι η p21, η οποία είναι αναστολέας της κινάσης της κυκλίνης [78]. Η TP53 ενεργοποιείται σε συνθήκες stress και επάγει την έκφραση της p21, η οποία με τη σειρά της αναστέλλει τον κυτταρικό κύκλο, οδηγώντας το κύτταρο είτε να επιδιορθώσει τη βλάβη, είτε να οδηγηθεί στην απόπτωση [79].

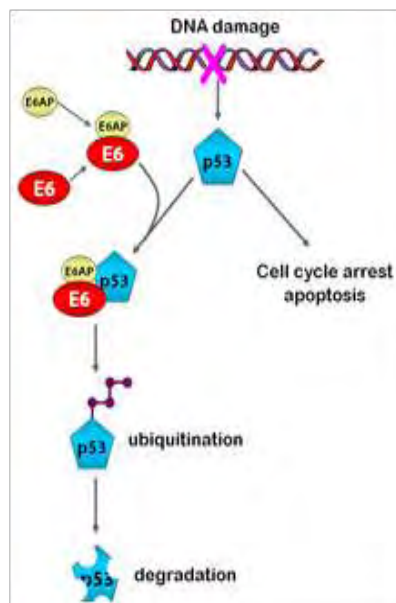
Σε ό, τι αφορά τη σύνδεση του μονοπατιού με τον HPV 16, η E6 προσδένεται στην πρωτεΐνη TP53 μαζί με την ουβικουϊνική λιγάση E6AP. Ο σχηματισμός του συμπλόκου οδηγεί στην ουβικουϊνίωση της πρωτεΐνης TP53 και στην αποδόμησή της στο 26S πρωτεάσωμα [80,81]. Ακόμη, η E6 αναστέλλει τη δράση της πρωτεΐνης TP53 συνδεόμενη στην p300/CBP, που αποτελεί συνενεργοποιητή της πρωτεΐνης TP53. Η πρωτεΐνη E6 ακόμα αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες της οικογένειας PDZ. Οι πρωτεΐνες αυτής της οικογένειας αποδομούνται μέσω της σύνδεσής τους με το C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης E6 των HPVs υψηλού κινδύνου. Η αποδόμηση οδηγεί στην ανάπτυξη επιδερμικής υπερπλασίας [82].

Ένας ακόμη ρόλος της E6 είναι να συμμετέχει στη δημιουργία αθάνατων κυττάρων, ενεργοποιώντας την καταλυτική υπομονάδα της τελομεράσης hTERT [2]. Η τελομεράση είναι ένα ένζυμο με τέσσερις υπομονάδες. Βασική δράση της τελομεράσης είναι η προσθήκη

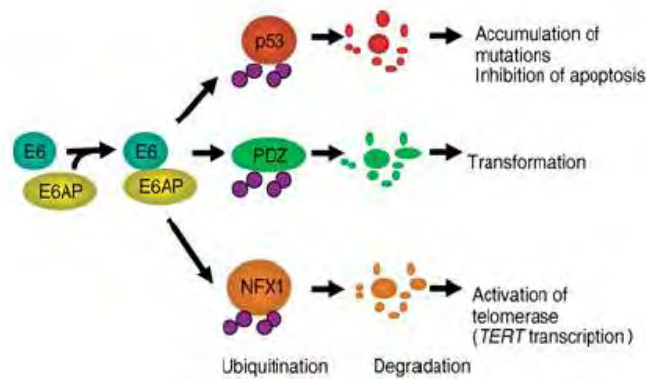
εξαμερών επαναλήψεων στο τελομερικό άκρο των χρωμοσωμάτων. Η απώλεια δράσης της τελομεράσης επιδρά στη σμίκρυνση των τελομερών κατά την κυτταρική διαίρεση, οδηγώντας σταδιακά στη γήρανση των κυττάρων και στο θάνατο [47]. Η E6 ενεργοποιεί την έκφραση της hTERT με συνδυαστική δράση διαμέσου c-myc και Sp1 [83]. Η εκτεταμένη ενεργοποίηση της hTERT οδηγεί στη διατήρηση μεγάλων τελομερών κατά την κυτταρική διαίρεση και συνεπώς στην αναστολή της κυτταρικής γήρανσης και στην αθανατοποίηση των κυττάρων [79].

Η δομή της ιικής ογκοπρωτεΐνης E6 των ιών χαμηλής και υψηλής επικινδυνότητας αποτελείται από 150 αμινοξέα και περιλαμβάνει δύο περιοχές πρόσδεσης ψευδαργύρου με το μοτίβο Cys-X-X-Cys. Αυτό είναι συντηρημένο χαρακτηριστικό μεταξύ των HPVs και επιτελεί μία σημαντική λειτουργία για τον κύκλο ζωής του ιού [84].

Ακόμα η πρωτεΐνη E6 εντοπίζεται τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στον πυρήνα των μολυσμένων με HPV, κερατινοκυττάρων και έχει τη δυνατότητα να συνδέεται με διαφορετικές πρωτεΐνες [85,86]. Μπορεί ακόμη να μετασχηματίζει κύτταρα NIH3T3 δημιουργώντας αθάνατα ανθρώπινα μαστικά κύτταρα, δεν μπορεί όμως να μετασχηματίζει κερατινοκύτταρα. Η αποτελεσματική αθανασία των ανθρώπινων κερατινοκυττάρων απαιτεί την ταυτόχρονη έκφραση των γονιδίων E6 και E7.



Εικόνα 11: Παρουσίαση της αποικοδόμησης της πρωτεΐνης TP53 μέσω της δράσης της ιικής ογκοπρωτεΐνης E6.



Εικόνα 12: Προβολή των κύριων λειτουργιών της ιικής ογκοπρωτεΐνης E6.

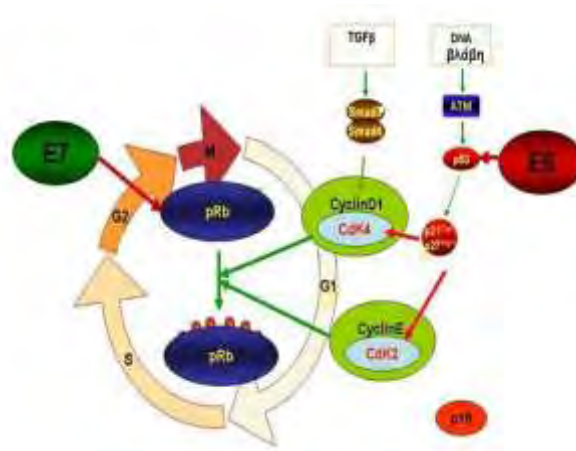
Βασική λειτουργία της **ϊικής ογκοπρωτεΐνης E7** είναι ότι αλληλοεπιδρά με την οικογένεια των πρωτεϊνών του ρετινοβλαστώματος (Rb) [87]. Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει επίσης τις πρωτεΐνες p107 και p103. Σε επίπεδο ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου η αποφωσφορυλιωμένη μορφή της Rb δημιουργεί σύμπλοκα με το μεταγραφικό παράγοντα E2F/DP1, ο οποίος αναστέλλει την έκφραση γονιδίων που συμβάλλουν στην προώθηση του κυτταρικού κύκλου στη φάση S καθώς επίσης και στην προαγωγή του κυττάρου στην απόπτωση. Κατά τη μετάβαση από τη φάση G1 στη φάση S τα σύμπλοκα κυκλίνης-κινάσης φωσφορυλιώνουν την Rb, η οποία απελευθερώνεται από το σύμπλοκο που σχηματίζει με το μεταγραφικό παράγοντα E2F και επάγει τη μεταγραφή των γονιδίων που εμπλέκονται στην αντιγραφή του DNA. Σε ό,τι αφορά τη δράση του ιού, η E7 συνδέεται με την Rb επάγοντας την αποικοδόμηση της μέσω του μονοπατιού του ουβικουϊτινικού πρωτεασώματος [88]. Η πρόσδεση της E7 στην Rb απορρυθμίζει τον κυτταρικό κύκλο, με συνέπεια τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Επιπλέον, η πρωτεΐνη E7 συνδέεται με τις κυκλίνες A και E, καθώς και με τους αναστολείς των κύκλινο-εξαρτώμενων κινασών (cdk) p21 και p27. Συγκεκριμένα, η E7 αυξάνει τα επίπεδα των κυκλινών A και E που μπλοκάρουν την δράση των p21 και p27, επάγοντας τη φωσφορυλίωση της Rb και κατ' επέκταση την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου [82].

Η E7 αλληλεπιδρά με μία ακόμη ομάδα πρωτεϊνών τις απακετυλάσες των ιστονών (HDACs). Σε φυσιολογικές συνθήκες, η πρωτεΐνη Rb συνδέεται με τις HDACs και τις στρατολογεί στους υποκινητές E2F. Οι HDACs εκφράζονται σε όλους τους ιστούς και η βασική τους λειτουργία είναι η μετακίνηση των ακετυλομάδων από τις ιστόνες, ενώ επιπρόσθετα απακετυλιώνουν τον παράγοντα E2F αναστέλλοντας τη λειτουργία του. Η πρόσδεση της E7 στις HDACs αφενός αναστέλλει τη σύνδεση της Rb-HDAC καταστρέφοντας τη λειτουργία της, αφετέρου διακόπτει

την απακετυλίωση του E2F, απορρυθμίζοντας τον έλεγχο σύνθεσης των HDACs και προκαλώντας τελικά εκτεταμένη αντιγραφή του ιού.

Η δομή της ιϊκής ογκοπρωτεΐνης E7 σχετίζεται τόσο με τη δημιουργία αθάνατων κυττάρων, όσο επίσης και με την ιϊκή παθογένεια. Η δομή της αποτελείται από 100 αμινοξέα και περιέχει τρεις περιοχές, τη CR1, τη CR2 και τη CR3. Η CR1 περιλαμβάνει το αμινοτελικό άκρο ενώ η περιοχή CR2 περιέχει ένα μοτίβο LXCXE, το οποίο συμβάλλει στη σύνδεση της E7 με το ρετινοβλάστωμα [87]. Η περιοχή CR3 αποτελείται από δύο μοτίβα δακτύλων ψευδαργύρου. Η έκφραση της E7 απουσία της E6 δημιουργεί αθάνατα κύτταρα NIH3T3 και αθάνατα κερατινοκύτταρα [89].



Εικόνα 13: Παρουσίαση της επίδρασης των ιϊκών ογκοπρωτεϊνών E6 και E7 στη διαδικασία εισόδου του κυττάρου στη φάση S του κυτταρικού κύκλου.

1.3.2.3. Πρωτεΐνες του ιού HPV L1, L2

Τα δυο όσιμα γονίδια κωδικοποιούν τις μείζονες και ελάσσονες καψιδιακές πρωτεΐνες αντίστοιχα. Αυτές είναι οι δομικές πρωτεΐνες του και εκφράζονται προς το τέλος του ιϊκού κύκλου ζωής στα υψηλά διαφοροποιημένα βασικά κύτταρα. Μετά την αντιγραφή, γίνεται πακετάρισμα των HPV-γενωμάτων σαν χρωματίνη μέσα στα καψίδια, τα οποία συντίθενται από τις L1 και L2 πρωτεΐνες. Θεωρείται, ότι εντός του HPV περίπου 12 αντίγραφα της L2 συνδέονται με τα καψομερίδια διαμέσου μιας περιοχής κοντά στο C-τελικό άκρο L2. Κατά τη διάρκεια της συναρμολόγησης του ιού, οι καψιδιακές πρωτεΐνες συντίθενται στο κυτταρόπλασμα και πρέπει να εισέλθουν στον πυρήνα, ώστε να πακετάρουν το DNA του ιού.

Το καψίδιο των HPV αποτελείται από τις όψιμες ιϊκές πρωτεΐνες L1 και L2 [2,58]. Η κύρια πρωτεΐνη του καψιδίου είναι η L1, η οποία έχει μέγεθος 55 kDa και οργανώνεται σε ένα σχηματισμό 72 πενταμερών με εικοσαεδρική δομή. Η ιϊκή πρωτεΐνη L1 παραμένει καλά συντηρημένη μεταξύ των διαφόρων τύπων HPVs και όταν εκφράζεται ως ευκαρυωτική ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη έχει την ικανότητα να αυτοοργανώνεται σε ψευδοϊοσωμάτια (VLPs, virus-like particles) [38]. Τα VLPs εμφανίζουν τους ίδιους επίτοπους με τους πραγματικούς ιούς, και είναι ειδικά για κάθε ξεχωριστό τύπο ιού [90]. Το αμινοξύ 202 είναι ιδιαίτερα σημαντικό για την οργάνωση των VLPs της πρωτεΐνης L1, καθορίζοντας τόσο τη διαμόρφωση της πρωτεΐνης, όσο και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών [90].

Μετά τη σύνθεσή της στο κυτταρόπλασμα, η **πρωτεΐνη L1** κατευθύνεται στον πυρήνα, μέσω σημάτων πυρηνικού εντοπισμού (NLSs, nuclear localization signals) του καρβοξυτελικού άκρου της [89]. Τα NLSs είναι μικρές αλληλουχίες 8-10 αμινοξέων που περιέχουν μεγάλη αναλογία θετικά φορτισμένων αμινοξέων, κυρίως λυσίνης και αργινίνης. Η πρωτεΐνη L1 περιέχει δύο NLSs αλληλουχίες στο καρβοξυτελικό άκρο της [90]. Η συναρμολόγηση των ιϊκών σωματίων λαμβάνει χώρα στον πυρήνα των επιμολυσμένων κυττάρων, ενώ η έναρξη μεταγραφής του γονιδίου L1 και η δημιουργία του ιού συνδέεται στενά με το στάδιο διαφοροποίησης των επιμολυσμένων κυττάρων. Η πρωτεΐνη L1 ανιχνεύεται κυρίως σε τελικά διαφοροποιημένα κύτταρα στις ανώτερες στοιβάδες του επιθηλίου.

Η σχέση μεταξύ της έκφρασης των όψιμων γονιδίων και της επιθηλιακής κυτταρικής διαφοροποίησης ρυθμίζεται από περιοχές του ιϊκού mRNA με ρυθμιστική δράση και από ιϊκούς μεταγραφικούς παράγοντες που συντίθενται στα προσβεβλημένα κύτταρα, ενώ πιθανώς εμπλέκονται και παράγοντες που σχετίζονται με την αυτορρύθμιση του ιού. Το mRNA που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη L1 του καψιδίου περιέχει αλληλουχίες που αναστέλλουν την έκφραση της L1 μεταμεταγραφικά [37], ενώ ένα ανασταλτικό στοιχείο στην όψιμη 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή (UTR, untranslated region) του HPV 16 δρα ανεξάρτητα. Έτσι εξηγείται και το ότι η έκφραση των καψιδιακών πρωτεϊνών του ιού περιορίζεται στα τελικά διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα. Τέτοιες ανασταλτικές αλληλουχίες βρίσκονται σε όψιμες 3' UTR γονιδιακές περιοχές και άλλων στελεχών, όπως στον HPV 1, καταδεικνύοντας πως οι αλληλουχίες αυτές είναι συντηρημένες και παίζουν σημαντικό ρόλο στον κύκλο ζωής του ιού [37].

Η **ιϊκή πρωτεΐνη L2** έχει μέγεθος 50 kDa και βρίσκεται σε μικρότερη συγκέντρωση συγκριτικά με την πρωτεΐνη L1, σε αναλογία 1/10 [67], ενώ περιέχει σήματα πυρηνικής εντόπισης για τη μεταφορά της στον πυρήνα μετά τη σύνθεσή της στο κυτταρόπλασμα. Η λειτουργία αυτής της πρωτεΐνης δεν είναι σαφής. Ενδέχεται πως παρόλο που δεν απαιτείται για

τη σύνδεση υποδοχέων, η πρωτεΐνη L2 είναι απαραίτητη για τη λοιμογόνο δράση του ιού [67,89].

Η ανασυνδυασμένη L1 πρωτεΐνη αυτοοργανώνεται σε σωμάτια που μοιάζουν με ιοσωμάτια. Η οργάνωση αυτή, ενισχύεται από την παρουσία της πρωτεΐνης L2, η οποία απαιτείται τόσο για τη συνάθροιση των λοιμογόνων σωματίων του ιού όσο και για τη σύνδεση στο DNA [67,89]. Συγκεκριμένα, όταν τα σήματα πυρηνικού εντοπισμού αποκόπτονται από την πρωτεΐνη L1, οι ακρωτηριασμένες L1 πρωτεΐνες διασπείρονται σε ολόκληρο το κύτταρο, λόγω όμως της συνέκφρασης της πρωτεΐνης L2 κατευθύνονται εκ νέου στον πυρήνα. Η πρωτεΐνη L2 συνδέεται στο DNA του ιού ενώ η L1 δεν συνδέεται. Το αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης L2 και ιδιαίτερα τα πρώτα δώδεκα αμινοξέα λυσίνης ή αργινίνης θεωρούνται σημαντικά για τη συναρμολόγηση του καψιδίου, εισάγοντας το DNA του ιού στα ιϊκά σωμάτια που δημιουργούνται από την πρωτεΐνη L1. Επομένως, η πρωτεΐνη L2 κατευθύνει ουσιαστικά την L1 σε συγκεκριμένη θέση στον πυρήνα. Όταν οι πρωτεΐνες L1 και L2 συνεκφράζονται, η L1 εμφανίζει διάστικτη εντόπιση σε κάποια κύτταρα, παρόμοια με αυτήν της πρωτεΐνης L2 στα ίδια κύτταρα.

1.3.3. Μορφή του γένωματος

Το γένωμα του ιού εντοπίζεται υπό μορφή επισώματος, ενσωματωμένο στο DNA του κυττάρου ξενιστή ή ταυτόχρονα και στις δύο μορφές. Σε μολυσμένα κύτταρα, στα οποία ο ιός έχει ήδη εγκατασταθεί, διατηρεί το γένωμα του υπό μορφή πλασμιδίου. Το γένωμα του ιού αντιγράφεται με συχνότητα μία φορά ανά κυτταρικό κύκλο στη φάση S και ο ιός εξασφαλίζει τη διατήρηση της μόλυνσης στα κύτταρα της βασικής στοιβάδας [19,91].

Η ενσωμάτωση του DNA των HPVs μέσω μη ομόλογου ανασυνδυασμού στο γένωμα του κυττάρου ξενιστή σταθεροποιεί την έκφραση των ογκογονιδίων E6 και E7 σε υψηλά επίπεδα και συνδέεται με σοβαρές αλλοιώσεις [92]. Κατά προσέγγιση, ο ιός βρίσκεται σε επισωματική μορφή σε αλλοιώσεις τύπου CIN1 και συνδέεται με χαμηλά επίπεδα έκφρασης των E6 και E7, ενώ εμφανίζεται σε ενσωματωμένη μορφή στο 5% των αλλοιώσεων CIN2, στο 16% των αλλοιώσεων CIN3 και στο 87% των περιπτώσεων διηθητικού καρκίνου [92]. Η ενσωμάτωση του ιϊκού DNA γίνεται μέσω ρήξης της συνέχειας του γονιδίου E2, κυρίως στη θέση μεταξύ των νουκλεοτιδίων 3243 και 3539. Ωστόσο, σε ορισμένες σπάνιες περιπτώσεις η ενσωμάτωση του ιϊκού DNA γίνεται μέσω διάσπασης της συνέχειας της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας σε θέσεις κοντά στο γονίδιο E1 και σπανιότερα σε θέσεις πλάι στο γονίδιο E4 [91,92,93]. Η διάσπαση του γονιδίου E2 είναι ένα γεγονός που συμβαίνει σχετικά νωρίς μετά τη μόλυνση του κυττάρου από τον ιό. Επιπλέον αποτελεί ένα κρίσιμο σημείο ως προς την έναρξη της τραχηλικής νεοπλασίας

και ένα πιθανό μοριακό δείκτη της εξέλιξης της νόσου. Η θραύση των γονιδίων E2 και E1 απορρυθμίζει τον έλεγχο της μεταγραφής των ογκογονιδίων E6 και E7 με αποτέλεσμα να μεταγράφονται σε υψηλότερα επίπεδα. Ακόμη, τα μετάγραφα των ενσωματωμένων ογκογονιδίων είναι πλέον πιο σταθερά καθώς περιλαμβάνουν επιπλέον κυτταρικές αλληλουχίες [91,92,93]. Επομένως, τα τραχηλικά κύτταρα που φέρουν ενσωματωμένα ιϊκά ογκογονίδια διαθέτουν ένα ισχυρό εξελικτικό πλεονέκτημα έναντι των υπολοίπων, μα και μεγαλύτερη πιθανότητα να μετατραπούν σε καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα [93].

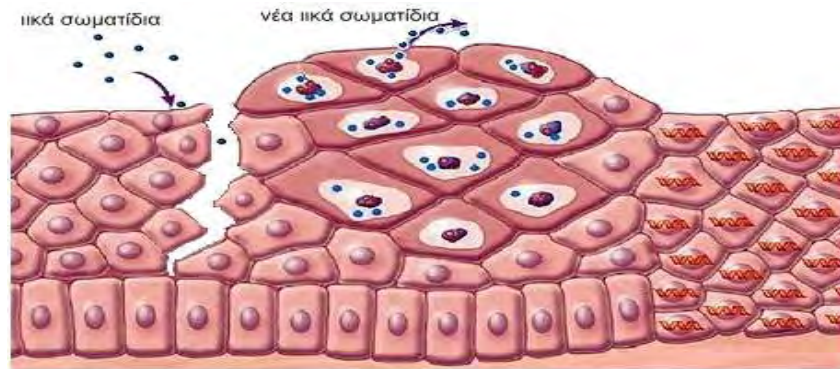
Σε καρκινικά κύτταρα παρατηρούνται ποικίλες κυτταρογενετικές αλλαγές, οι οποίες περιλαμβάνουν απώλεια ή κέρδος λειτουργίας κυτταρικών γονιδίων. Τέτοιες αλλαγές συμβαίνουν κατά την ενσωμάτωση του ιού με αποτέλεσμα να επηρεάζεται ένας αριθμός κυτταρικών γονιδίων. Κάποια γονίδια, γνωστά για την επίδραση που ασκούν στην ανάπτυξη καρκίνου, διαρρηγνύονται λόγω της ενσωμάτωσης [93]. Ειδικότερα, η ενσωμάτωση του HPV 16 κοντά στο πρωτοογκογονίδιο c-myc συναντάται στο 10% των περιπτώσεων καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, ενώ σχετίζεται και με την αυξημένη έκφραση του ογκογονιδίου [89,93]. Η θέση ενσωμάτωσης του ιού στο κυτταρικό χρωμόσωμα, εκτός από την εκτεταμένη ενεργοποίηση των ογκογονιδίων E6 και E7, παίζει σημαντικό ρόλο και στην ανάπτυξη καρκινικών αλλοιώσεων.

1.4. Κύκλος ζωής του ιού HPV (Human Papilloma Virus)

1.4.1. Είσοδος του ιού στο κύτταρο

Ο κύκλος ζωής των ιών Papilloma ακολουθεί το πρόγραμμα διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων του ξενιστή. Πρωτίστως, τα σωματίδια του ιού προσβάλλουν τους επιθηλιακούς ιστούς μέσω μικροτραυματισμών και με αυτόν τον τρόπο ο ιός καταφέρνει να εισβάλλει στα κύτταρα της βασικής στιβάδας. Συγκεκριμένα, ο ιός εισέρχεται στα βασικά επιθηλιακά κύτταρα μέσω της σύνδεσής του με τη θειϊκή ηπαρίνη, η οποία αποτελεί βασικό συστατικό των πρωτεογλυκανών που αλληλεπιδρούν με την κυτταρική μεμβράνη [93,94]. Ωστόσο, ο HPV απαιτεί την παρουσία και ενός δεύτερου υποδοχέα για την αποτελεσματική είσοδό του στο κύτταρο ξενιστή. Χαρακτηριστική περίπτωση αποτελούν οι α6 ιντεγκρίνες [95]. Πρόσφατα, αποδείχθηκε ότι η λαμινίνη 5 είναι ένας ακόμη παράγοντας, ικανός να λειτουργεί ως υποδοχέας του HPV στην επιφάνεια των κερατινοκυττάρων [95]. Μετά την πρόσδεση στον υποδοχέα του, ο ιός εισέρχεται στο κύτταρο με ενδοκυττάρωση σε κυστίδια κλαθρίνης ή

καβεολίνης, γεγονός που εξαρτάται από τον τύπο του ιού. Οι HPV 16 και HPV 58 συνδέονται σε κυστίδια κλαθρίνης, ενώ ο HPV 31 σε κυστίδια καβεολίνης. Στη συνέχεια, τα ιικά σωματίδια αποσυναρμολογούνται στα ενδοσώματα ή/και στα λυσοσώματα και το ιικό DNA μεταφέρεται στον πυρήνα με τη βοήθεια της καψιδιακής πρωτεΐνης L2 [94,95].



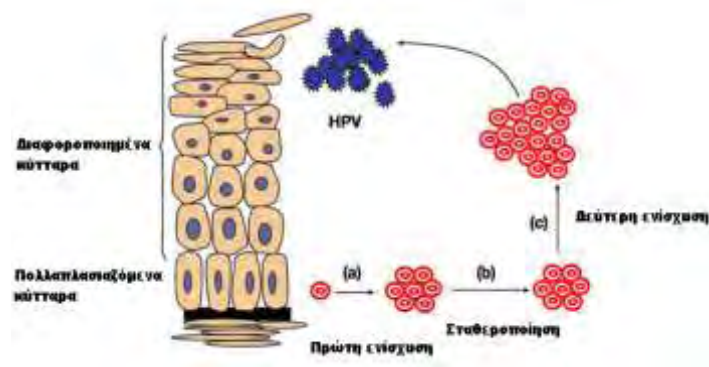
Εικόνα 14: Είσοδος του ιού στο κύτταρο.

1.4.2. Αντιγραφή, μεταγραφή του ιικού γενώματος

Οι ιοί Papilloma αντιγράφουν το γένωμά τους σε διάφορες περιόδους κατά τη διάρκεια του κύκλου ζωής τους και μάλιστα με διαφορετική συχνότητα. Σε πρώτη φάση, τα κύτταρα της βασικής στοιβάδας μολύνονται από τον ιό και παρατηρείται εκτεταμένη ενίσχυση του ιικού γενώματος μεταξύ 50-400 αντιγράφων σε κάθε κύτταρο [89,93]. Σε αυτό το στάδιο, το ιικό γένωμα παραμένει εντός του πυρήνα ως επίσωμα. Η επόμενη φάση του πολλαπλασιασμού του ιικού γενώματος πραγματοποιείται κατά τη διαίρεση των κυττάρων της βασικής στοιβάδας στη φάση S. Σε αυτό το στάδιο, το ιικό DNA αντιγράφεται μαζί με το DNA του κυττάρου ξενιστή δημιουργώντας δυο αντίγραφα, ένα σε κάθε θυγατρικό κύτταρο. Η τελευταία φάση αντιγραφής του ιικού γενώματος λαμβάνει χώρα στα μολυσμένα κύτταρα των ανώτερων στοιβάδων. Σε αυτά τα κύτταρα υφίσταται έξαρση της αντιγραφής με συνέπεια τη σύνθεση του ιικού DNA που τελικά εισέρχεται στα νεοσχηματιζόμενα ιικά σωματίδια [93].

Τα πρώτα γονίδια που εκφράζονται μετά τη μόλυνση είναι τα E1 και E2, που επάγουν την αντιγραφή του DNA, ενώ η πρωτεΐνη E2 δρα ως μεταγραφικός ενεργοποιητής ή καταστολέας, ρυθμίζοντας τη δράση των γονιδίων E6 και E7. Οι γενετικές αλλαγές, όπως η ενσωμάτωση του ιικού γενώματος στο χρωμόσωμα του κυττάρου ξενιστή με παράλληλη ρήξη και απενεργοποίηση του γονιδίου E2. Επίσης, οι μεταλλάξεις στο ίδιο το γονίδιο E2, οδηγούν σε αυξημένη έκφραση των ογκοπρωτεϊνών E6 και E7. Οι ιικές αυτές πρωτεΐνες με τη σειρά τους,

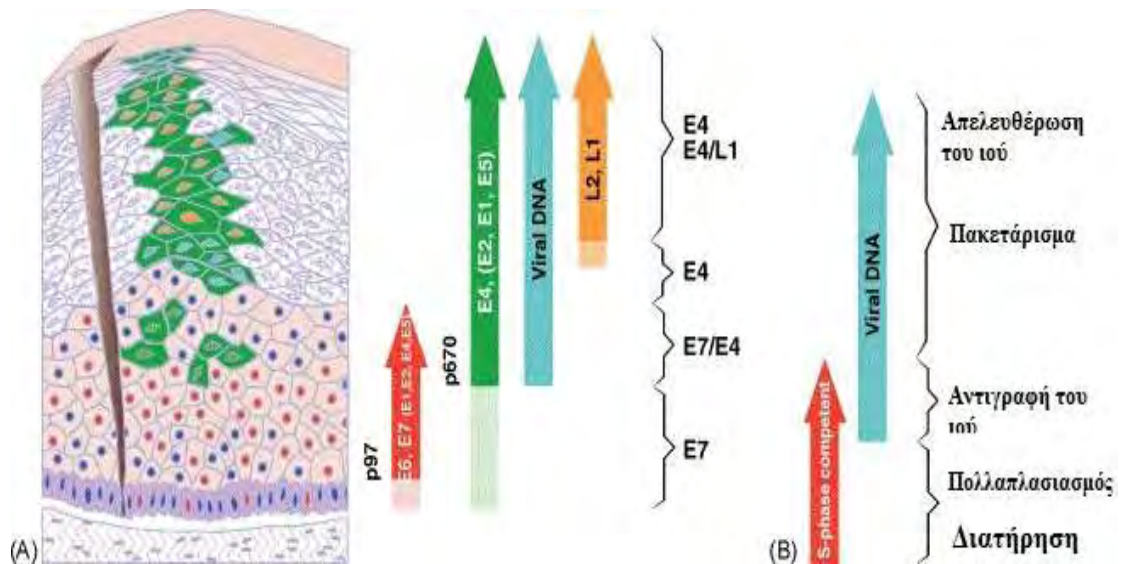
επάγουν τον κυτταρικό μετασχηματισμό προκαλώντας αποσταθεροποίηση του DNA του κυττάρου και οδηγώντας τελικά στην ανάπτυξη καρκίνου.



Εικόνα 15: Αντιγραφή του ιικού γενώματος

Οι ιοί Papilloma προσβάλλουν τα κύτταρα της βασικής στοιβάδας του επιθηλίου. Η αντιγραφή και η έκφραση των γονιδίων του ιού εξαρτάται βέβαια από το πρόγραμμα διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων, όμως ο μηχανισμός με τον οποίο η διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων του ιού δεν είναι πλήρως κατανοητός.

Όσον αφορά στην μεταγραφή του ιικού γενώματος, στα αδιαφοροποίητα ή ενδιάμεσα διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα εκφράζονται από την πρόωμη περιοχή του ιικού γενώματος 6 μη-δομικές ρυθμιστικές πρωτεΐνες E1, E2, E4, E5, E6 και E7. Τα έξι πρώιμα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης των γονιδίων E1, E2, E4, E5, E6 και E7 βρίσκονται υπό τον έλεγχο του πρώιμου μεταγραφικού ενεργοποιητή p97 για τον HPV 16 και HPV 31 και p105 για τον HPV 18. Ο παράγοντας p97 εντοπίζεται ανοδικά του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης του E6 και είναι υπεύθυνος για την ενεργοποίηση όλων των πρώιμων γονιδίων. Στα διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα εκφράζονται από την όψιμη περιοχή του ιικού γενώματος, οι καμινδιακές πρωτεΐνες L1 και L2, οι οποίες είναι απαραίτητες για το σχηματισμό του ιικού καμινιδίου και το πακετάρισμα του ιικού γενώματος στα νεοσχηματιζόμενα ιικά σωματίδια, όπως έχει ήδη προαναφερθεί [67]. Τα όψιμα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης των γονιδίων L1 και L2 βρίσκονται υπό τον έλεγχο του πρώιμου μεταγραφικού ενεργοποιητή p670. Ο παράγοντας αυτός βρίσκεται εντός του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης του γονιδίου E7 και είναι υπεύθυνος για την έκφραση όλων των όψιμων ιικών γονιδίων [87,88].



Εικόνα 16: Μεταγραφή του ιϊκού γενώματος.

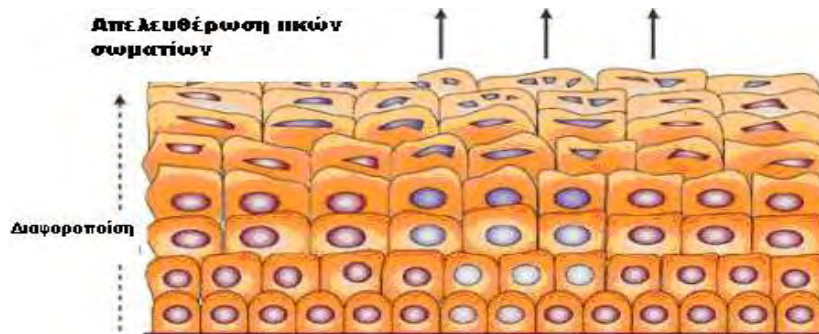
1.4.3. Σύνθεση του ιϊκού γενώματος

Αυτό το στάδιο του κύκλου ζωής των ιών Papilloma περιλαμβάνει την τοποθέτηση πολλαπλών αντιγράφων του ιϊκού γενώματος εντός των νεοσχηματιζόμενων καψιδίων και τη σύνθεση των ιϊκών σωματίων. Η συναρμολόγηση των νέων μολυσματικών ιϊκών σωματίων στην ανώτερη επιθηλιακή στοιβάδα, απαιτεί εκτός από τις καψιδιακές πρωτεΐνες L1 και L2 και την παρουσία της πρωτεΐνης E2 [89], η οποία συμβάλλει στην τοποθέτηση του ιϊκού γενώματος εντός των νεοσχηματιζόμενων καψιδίων. Η πρωτεΐνη L2 εντοπίζεται στον πυρήνα, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις συνδέεται άμεσα με το DNA και επάγει το πακετάρισμα του ιϊκού γενώματος εντός του καψιδίου. Η καψιδιακή πρωτεΐνη L1 εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και είναι υπεύθυνη για το σχηματισμό των L1 πενταμερών, που αποτελούν βασικές δομικές μονάδες του καψιδίου του ιού. Η ωρίμανση των ιϊκών σωματίων πραγματοποιείται όταν τα μολυσμένα από τον ιό κύτταρα ανέλθουν στην επιθηλιακή στοιβάδα [92,93].

1.4.4. Έξοδος του ιού από το κύτταρο

Τελικά, ο ιός απελευθερώνεται από το κερατινοποιημένο κάλυμμα που σχηματίζεται στην κυτταρική επιφάνεια. Ο συγκεκριμένος ιός δεν προκαλεί λύση των μολυσμένων κερατινοκυττάρων, ενώ ο ακριβής μηχανισμός απελευθέρωσης από το κύτταρο δεν είναι γνωστός. Στη διαδικασία αυτή πιθανώς εμπλέκεται η πρωτεΐνη E1^{E4}. Η πρωτεΐνη καταστρέφει

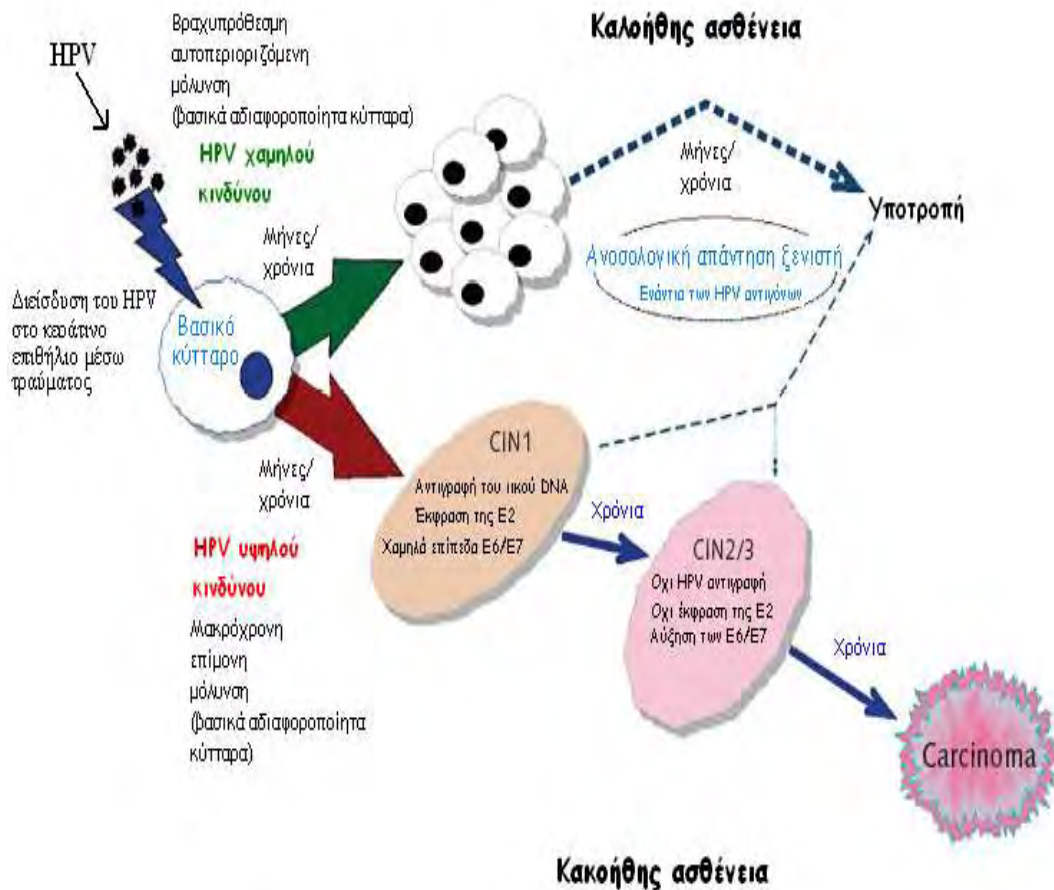
το δίκτυο ινιδίων κερατίνης που αναπτύσσεται στην επιφάνεια των μολυσμένων κερατινοκυττάρων, αποδεσμεύοντας και απελευθερώνοντας έτσι τα νεοσχηματιζόμενα ιϊκά σωματίδια από το κύτταρο [69,70].



Εικόνα 17: Έξοδος του ιού από το κύτταρο.

1.4.5. Ιστολογικές αλλοιώσεις – Ονοματολογία

Σε μοριακό επίπεδο, οι αρχικές αλλοιώσεις στο επιθήλιο, που ιστολογικά ταξινομούνται ως CIN1, συνδέονται με συνεχή αναπαραγωγή και διείσδυση του ιού [96]. Η μετάπτωση σε υψηλότερου βαθμού δυσπλασίες CIN2,3 και τελικά σε καρκίνο σχετίζεται συνήθως με τη μετατροπή του ιϊκού γενώματος από επισωματική σε ενσωματωμένη μορφή. Η ενσωμάτωση ωστόσο, του γενετικού υλικού του ιού στο γένωμα του κυττάρου ξενιστή δεν είναι από μόνη της ικανή να προκαλέσει κακοήγη εξαλλαγή. Η συγκεκριμένη μετατροπή αποτελεί εξαιρετικά πολύπλοκη διαδικασία, στην οποία συμβάλλουν μάλιστα ποικίλοι παράγοντες, όπως η έκφραση κυτταροκερατινών, η συμμετοχή ογκοπρωτεϊνών, οι γενετικές μεταλλάξεις καθώς και τα ανοσολογικά στοιχεία του ξενιστή. Η λοίμωξη λοιπόν από τον HPV αποτελεί το εναρκτήριο γεγονός, το οποίο μέσω μίας πολύπλοκης διαδικασίας είναι πιθανό να έχει ως εξέλιξη την πρόκληση καρκίνου [2,76,97].



Εικόνα 18: Συνοπτική απεικόνιση της συνολικής πορείας των HPV και η εξέλιξη της ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας σε καρκίνωμα.

1.4.6. Real-Time PCR

Η τεχνική Real Time PCR βασίζεται στην επαναστατική μεθοδολογία της ποσοτικής PCR. Περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1993 από τον Higuchi και τους συνεργάτες του και αναφέρεται στην ενίσχυση του DNA με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, η οποία ελέγχεται ενώ εξελίσσεται. Το πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η δυνατότητα που προσφέρει στον ερευνητή να καθορίζει το ποσό του αρχικού DNA στο δείγμα πριν την ενίσχυση με PCR. Τα τελευταία χρόνια η χρήση της γίνεται ολοένα και πιο ευρεία, εξαιτίας του αυξανόμενου αριθμού θερμοκυκλοποιητών Real Time PCR στην αγορά και της επακόλουθης πτώσης του κόστους τους όπως επίσης και των τιμών των αντιδραστηρίων.

Η Real Time PCR εφαρμόζεται τόσο σε παραδοσιακές όσο και σε νέες εφαρμογές με σημαντική αποτελεσματικότητα σε σχέση με την απλή PCR. Το γεγονός ότι η μέθοδος συλλέγει

στοιχεία κατά την εκθετική φάση πολλαπλασιασμού του DNA δημιούργησε νέες προοπτικές για ποικίλες εφαρμογές, όπως ποσοτικό προσδιορισμό μικροοργανισμών, μέτρηση της έκφρασης γονιδίων, επαλήθευση του πολλαπλασιασμού γονιδίων, εκτίμηση της αποτελεσματικότητας θεραπευτικής αγωγής, ποσοτικό προσδιορισμό βλάβης στο DNA, ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών και προσδιορισμό γονοτύπου.

Με τη Real Time PCR, εκτός από την ποσοτική ανάλυση του προϊόντος της PCR, διεξάγεται και ποιοτική ανάλυση με βάση τη μελέτη της καμπύλης τήξης του προϊόντος (melting curve analysis), κατά την οποία οι ενισχυμένες αλληλουχίες χαρακτηρίζονται με βάση το σημείο τήξης τους (T_m). Το σημείο τήξης αποτελεί συνάρτηση του μήκους και της σύνθεσης των βάσεων του προϊόντος, είναι μοναδικό για κάθε αλληλουχία και χαρακτηριστικό για αυτήν.

Η Real Time PCR αποτελεί ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, κατά την οποία η μεγέθυνση του DNA στόχου και η ανίχνευση του προϊόντος γίνονται ταυτόχρονα στο ίδιο σωληνάριο, καθώς το προϊόν που παράγεται συνδέεται με μία φθορίζουσα χρωστική ουσία, η οποία ανιχνεύεται από το οπτικό σύστημα του ειδικού κυκλοποιητή της Real-Time PCR. Μέσω του συγκεκριμένου οργάνου, καταγράφεται η κινητική της μεγέθυνσης του DNA από την ένταση του σήματος του φθορισμού, που αντανακλά το ποσό του συντιθέμενου νέου DNA. Έτσι, καθίσταται δυνατή η επακριβής μέτρησή του. Η Real-Time PCR μετρά τα προϊόντα PCR καθώς συσσωρεύονται ή μετρά σε πραγματικό χρόνο το ποσό των προϊόντων PCR σε σημείο όπου η αντίδραση βρίσκεται ακόμη στην εκθετική φάση χρησιμοποιώντας την τεχνολογία των φθορίζουσών χρωστικών ουσιών. Συγκεκριμένα, κατά τη διάρκεια της αντίδρασης PCR, ένα σήμα φθορίζουσας χρωστικής καθορίζει το σημείο στο οποίο μπορούν να συγκριθούν όλα τα δείγματα συνολικά. Το κατώφλι υπολογίζεται ως συνάρτηση του ποσού του υποβάθρου της φθορίζουσας χρωστικής. Τελικά, ο κλασματικός αριθμός των κύκλων PCR που απαιτούνται, ώστε να παράγουν αρκετό σήμα φθορίζουσας χρωστικής ικανό να φθάσει σε αυτό το κατώφλι, χαρακτηρίζεται ως κατώφλι κύκλου (cycle threshold, C_t). Οι τιμές του C_t εξαρτώνται απόλυτα από το αρχικό ποσό του δείγματος και αποτελούν τη βάση για τον υπολογισμό των αντιγράφων DNA ή των επιπέδων έκφρασης του mRNA.

Η γραφική παράσταση πολλαπλασιασμού αποτελεί στην ουσία τη συνάρτηση του φθορισμού σε σχέση με τον αριθμό των κύκλων. Ως γραμμή βάσης ορίζονται οι κύκλοι PCR κατά τους οποίους το σήμα συσσωρεύεται μεν, αλλά βρίσκεται κάτω από τα όρια ανίχνευσης του μηχανήματος. Το συγκεκριμένο σήμα χρησιμοποιείται για τη χάραξη του κατωφλιού. Το κατώφλι υπολογίζεται πολλαπλασιαζόμενο 10 φορές σε σχέση με την κανονική παρέκκλιση από το μέσο σήμα της χρωστικής της βασικής γραμμής. Σήμα χρωστικής το οποίο ανιχνεύεται πάνω από το κατώφλι θεωρείται πραγματικό και χρησιμοποιείται για τον καθορισμό του κατωφλιού

κύκλου (Ct) για ένα δείγμα. Οι τιμές του Ct καθορίζονται από τον κλασματικό αριθμό των κύκλων PCR, κατά τους οποίους το σήμα της χρωστικής είναι μεγαλύτερο από ένα ελάχιστο επίπεδο ανίχνευσης. Στη συνέχεια, οι τιμές του Ct των διαφόρων δειγμάτων χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό της σχετικής ποσότητας του κάθε δείγματος. Ο δεδομένος υπολογισμός χρησιμοποιείται κατά τη σχετική ποσοτική αναλυτική μέθοδο.

Η ικανότητα ελέγχου της προόδου του πολλαπλασιασμού του DNA σε πραγματικό χρόνο, η οποία επιτυγχάνεται κατά τη μεθοδολογία της Real-Time PCR, πραγματοποιείται με τη βοήθεια ειδικών χημικών αντιδράσεων. Σε γενικές γραμμές, χρησιμοποιούνται σημασμένοι ανιχνευτές διαφόρων τύπων. Καθένας διαθέτει μοναδικά χαρακτηριστικά, με τη βασική στρατηγική να παραμένει κοινή και απλή για όλους και να αφορά στην ουσία την πρόκληση μιας ανιχνεύσιμης αλλαγής κατά τον πολλαπλασιασμό του DNA. Σήμερα, οι πιο κοινές χημικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται στη Real-Time PCR αφορούν: α) τη SYBR green I χρωστική, β) τους ανιχνευτές υδρόλυσης και γ) τους ανιχνευτές υβριδοποίησης.

Η χρήση ολιγονουκλεοτιδικών ανιχνευτών στη Real Time PCR οδηγεί στην επίτευξη μεγαλύτερης ειδικότητας. Οι ανιχνευτές είναι σημασμένοι με φθοριοχρώματα, ένα μόριο δότη και ένα μόριο αποσβέστη, ενώ υβριδίζονται στο πρότυπο DNA. Οι μέθοδοι ολιγονουκλεοτιδικών ανιχνευτών είναι: οι taqman probes, molecular beacons και scorpion primers. Συνηθέστερη τεχνική χρήσης αποτελούν οι ανιχνευτές taqman. Η ένταση του φθορισμού είναι ανάλογη του παραγόμενου προϊόντος της PCR. Η εφαρμογή της Real Time PCR απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή στην ποιότητα του δείγματος, στο χειρισμό του οργάνου, στην επιλογή της χημικής μεθόδου, στα αντιδραστήρια (Taq πολυμεράση) και στην αντικειμενικότητα ανάλυσης των αποτελεσμάτων.

Τα **πλεονεκτήματα της Real-Time PCR**, έναντι της απλής PCR, αλλά και άλλων μοριακών μεθόδων, είναι ποικίλα. Το πλέον σημαντικό είναι η δυνατότητα υπολογισμού νουκλεϊνικών οξέων με απίστευτα δυναμικό εύρος (το λιγότερο 5 λογαριθμικές μονάδες). Η ικανότητα αυτή σχετίζεται με την ιδιαίτερα υψηλή ευαισθησία της μεθόδου, στην οποία οφείλεται η ικανότητα ανίχνευσης λιγότερων από πέντε αντιγράφων νουκλεϊνικών αλληλουχιών (ίσως και μόνο ενός σε μερικές περιπτώσεις). Προτερήματα αποτελούν επίσης, ο μικρός απαιτούμενος χρόνος αντίδρασης με παράλληλη ανάλυση του αποτελέσματος, η ακρίβεια και η επαναληψιμότητα, λόγω αυτοματισμού της αντίδρασης και της ανάλυσης και η δυνατότητα ποσοτικοποίησης. Ιδιαίτερο πλεονέκτημα αποτελεί και η αποφυγή ή ελαχιστοποίηση επιμολύνσεων, με δεδομένη την εκτέλεση της αντίδρασης σε υψηλής τεχνολογίας κλειστό σύστημα, χωρίς την απαίτηση εξωτερικών χειρισμών ανάλυσης του προϊόντος.

1.5. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να προσδιοριστεί το ποσοστό της παρουσίας (φορέας) του HPV και των επιμέρους υποτύπων του, σε τραχηλικά επιχρίσματα που ελήφθησαν από σεξουαλικά ενεργείς γυναίκες κυρίως αναπαραγωγικής ηλικίας και ελληνικής καταγωγής, χωρίς κλινική συμπτωματολογία. Οι γυναίκες αυτές, προσήλθαν στα εξωτερικά ιατρεία της Γυναικολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας από την περιοχή της Θεσσαλίας σε περίοδο ενός οκταμήνου, Ιούνιος 2015 – Φεβρουάριος 2016. Απαραίτητη προϋπόθεση συμμετοχής στη μελέτη ήταν οι συμμετέχουσες, πέρα από την απουσία κλινικής συμπτωματολογίας, να μην έχουν εμβολιαστεί έναντι του ιού HPV και να έχουν αρνητικό κυτταρολογικό έλεγχο κατά Παπανικολάου (αρνητικές για τραχηλικές ενδο-επιθηλιακές αλλοιώσεις).

Η μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ανοσολογίας του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη του **Καθηγητή Εργαστηριακής Ανοσολογίας κ. Αναστάσιου Γερμενή**. Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε βασίστηκε στην μοριακή ανίχνευση και τυποποίηση των υποτύπων του ιού HPV, άμεσα στο κλινικό δείγμα των γυναικών της μελέτης. Συγκεκριμένα, στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η Real-Time PCR, η οποία όπως ήδη έχει αναφερθεί εμφανίζει την υψηλότερη ευαισθησία και ειδικότητα σε σύγκριση με τις άλλες μεθόδους.

Ερωτήματα της που τέθηκαν προς απάντηση ήταν:

1. Ποιό είναι το ποσοστό HPV φορέας ελληνίδων υγιών γυναικών στην Θεσσαλία;
2. Ποιοί υπότυποι αποικίζουν και σε ποιά συχνότητα;
3. Εμπεριέχονται οι υπότυποι αυτοί στο HPV9;

2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ - ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Συλλογή και προέλευση των δειγμάτων

Το υλικό της μελέτης αποτέλεσαν 94 κλινικά δείγματα που προήλθαν από γυναίκες ασθενείς, οι οποίες προσήλθαν στα εξωτερικά ιατρεία της Γυναικολογικής κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας, χωρίς συμπτωματολογία από το ουρογεννητικό σύστημα. Οι γυναίκες αυτές ήταν σεξουαλικά ενεργές, στην πλειοψηφία τους αναπαραγωγικής ηλικίας (19-59 ετών) και δεν ήταν εμβολιασμένες έναντι του ιού HPV. Επίσης, το τεστ ΠΑΠ ήταν αρνητικό, δεν εμφάνιζαν δηλαδή ενδοεπιθηλιακές κυτταρολογικές αλλοιώσεις ή φλεγμονή στον τράχηλό τους, με βάση το ιστορικό τους. Οι γυναίκες προσήλθαν στα εξωτερικά ιατρεία της γυναικολογικής κλινικής κατά το χρονικό διάστημα Ιούνιος 2015 - Φεβρουάριος 2016, δηλαδή σε μία περίοδο 8 μηνών και αφού ενημερώθηκαν για τη μελέτη, συμπλήρωσαν ένα ερωτηματολόγιο.

Ο αποκλεισμός γυναικών με εικόνα φλεγμονής στο ΠΑΠ έγινε στα πλαίσια ότι, επί εδάφους λοίμωξης από κάποιο άλλο παθογόνο ευνοείται ο αποικισμός από τον ιό. Ακόμη αναγκαία προϋπόθεση συμμετοχής ήταν, οι γυναίκες της μελέτης να μην έχουν εμβολιαστεί έναντι του HPV, γιατί είναι γνωστό ότι ο εμβολιασμός μειώνει την φορεία από υπότυπους που περιέχονται στο εμβόλιο.

Αρχικά ελήφθη το ιστορικό των γυναικών της μελέτης βάσει ερωτηματολογίου που περιελάμβανε τα ακόλουθα στοιχεία: αιτία προσέλευσης στα εξωτερικά ιατρεία, δημογραφικά στοιχεία, ηλικία, ηλικία έναρξης σεξουαλικών επαφών, συνολικός αριθμός σεξουαλικών συντρόφων, ιστορικό γνωστού σεξουαλικώς μεταδιδόμενου νοσήματος στο παρελθόν, φαρμακευτική αγωγή (αντιβιοτική αγωγή). Ελήφθη ΠΑΠ, ακολούθησε επιβεβαίωση του αρνητικού κυτταρολογικού ελέγχου κατά Παπανικολάου και εν συνεχεία έγινε η λήψη των τραχηλικών επιχρισμάτων για ανίχνευση των εν λόγω μικροοργανισμών.

Τα δείγματα ελήφθησαν διακολπικά, με τη βοήθεια κολποδιαστολέα και αφορούσαν σε λήψη ενδοτραχηλικού εκκρίματος με χρήση στυλεών (endocervical brush), με σκοπό την μοριακή ανίχνευση των υπότυπων-HPV υψηλού κινδύνου (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59). Αμέσως μετά τη λήψη, έγινε κατάλληλη επεξεργασία των στυλεών προκειμένου να γίνει εκχύλιση DNA το οποίο στη συνέχεια φυλάχτηκε στους -80 °C.

2.2. Στατιστική ανάλυση

Εκτιμήθηκε η επίπτωση των παθογόνων μικροοργανισμών που μελετήσαμε. Πιθανές συσχετίσεις ταυτόχρονης συνύπαρξης των παθογόνων στα κλινικά δείγματα, καθώς και πιθανή συσχέτιση της παρουσίας τους με τον αριθμό των σεξουαλικών συντρόφων εκτιμήθηκαν με χρήση Spearman's correlation coefficient. Επιπλέον, το δείγμα των ασυμπτωματικών γυναικών που μελετήθηκαν διαχωρίστηκε σε τέσσερις επιμέρους ηλικιακές ομάδες (19-29, 30-39, 40-49 και 50-59 ετών). Η επίπτωση των παθογόνων μεταξύ των ηλικιακών αυτών ομάδων, διερευνήθηκε με τη χρήση Anova .

Το στατιστικό πακέτο που χρησιμοποιήθηκε για την στατιστική ανάλυση ήταν το SPSS 20 statistical package (IBM, Chicago, IL, USA). Τιμές (P values) μικρότερες από 0.05 θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές ($P < 0.05$).

2.3 Γενετική ανάλυση

Εκχύλιση

Το γενωμικό DNA εκχυλίστηκε από αποθηκευμένα δείγματα στους -80°C χρησιμοποιώντας το εμπορικό κιτ Quick-gDNATM MiniPrep (Zymo Research).

Μέθοδος Απομόνωσης Στυλεού: Ξεπλύνετε το βουρτσάκι σε ένα σωληνάριο μικροφυγοκέντρησης χρησιμοποιώντας 500 μl Γενωμικού Ρυθμιστικού Διαλύματος Λύσης, αναδεύστε για 4-6 δευτερόλεπτα, και στη συνέχεια αφήστε το σε θερμοκρασία δωματίου για 5-10 λεπτά.

Μεταφέρετε το μείγμα σε μια Στήλη Φυγοκέντρησης Zymo σε ένα Σωληνάριο Συλλογής. Φυγοκεντρήστε σε 11,900 rpm για ένα λεπτό. Απορρίψτε το Σωληνάριο Συλλογής.

Μεταφέρετε τη Στήλη Φυγοκέντρησης Zymo σε ένα νέο Σωληνάριο Συλλογής. Προσθέστε 200 μl DNA Ρυθμιστικού Διαλύματος Προ-πλύσης στη στήλη φυγοκέντρησης. Φυγοκεντρήστε σε 11,900 rpm για ένα λεπτό.

Προσθέστε 500 μl g-DNA Ρυθμιστικού Διαλύματος Πλύσης στη στήλη φυγοκέντρησης. Φυγοκεντρήστε σε 11,900 rpm για ένα λεπτό.

Μεταφέρετε τη στήλη φυγοκέντρωσης σε ένα καθαρό σωληνάριο μικροφυγοκέντρωσης. Προσθέστε ≥ 50 μl DNA Ρυθμιστικού Διαλύματος Έκλουσης ή νερού στη στήλη φυγοκέντρωσης. Επώαστε για 2-5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια φυγοκεντρώστε σε μέγιστη ταχύτητα για 30 δευτερόλεπτα για να εκλουθεί το DNA. Το εκλουθέν DNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί αμέσως ή να αποθηκευθεί στους -20 °C για μελλοντική χρήση.

Ανίχνευση του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων και των διαφόρων υποτύπων

Οι υπότυποι HPV προσδιορίστηκαν εφαρμόζοντας τη μέθοδο της Real - Time PCR.

PCR (Polymerase Chain Reaction)

Για την ποιοτική ανίχνευση του Ιού των Ανθρώπινων Θηλωμάτων 6 και 11 χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό κιτ HPV 6/11 Real-TM (Sacace Biotechnologies) και για την ποιοτική ανίχνευση και τη γονοτύπωση του Ιού των Ανθρώπινων Θηλωμάτων (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59) χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό κιτ HPV High Risk Typing Real-TM (Sacace Biotechnologies).

HPV 6/11 Real-TM

Προβλεπόμενη Χρήση

Το κιτ HPV 6/11 Real-TM είναι μια *in vitro* δοκιμή ενίσχυσης Πραγματικού Χρόνου για την ποιοτική ανίχνευση του Ιού των Ανθρώπινων Θηλωμάτων 6 και 11 σε ουρογεννητικά επιχρίσματα.

Αρχή Δοκιμής

Το κιτ HPV 6/11 Real-TM βασίζεται σε δύο σημαντικές διαδικασίες: την απομόνωση του DNA από δείγματα και την ενίσχυση Πραγματικού Χρόνου. Το σωληνάριο PCR-mix-1 περιέχει εκκινητές κατευθυνόμενους απέναντι σε περιοχές των τύπων HPV 6,11 και του γονιδίου β -σφαιρίνης που χρησιμοποιείται ως Εσωτερικός Μάρτυρας. Αν το επίχρισμα δεν είναι σωστά προετοιμασμένο (υψηλή ποσότητα βλέννας ή ανεπαρκής ποσότητα επιθηλιακών κυττάρων) ο Εσωτερικός Μάρτυρας δεν θα ανιχνευθεί ή θα είναι χαμηλός (η ποσότητα των επιθηλιακών

κυττάρων χαμηλότερη από 10^3 κύτταρα/αντίδραση). Ο HPV 6 ανιχνεύεται στο FAM (Πράσινο) κανάλι, ο HPV 11 στο JOE (Κίτρινο)/Cy3/HEX κανάλι και το Ανθρώπινο γονίδιο β-σφαιρίνης στο ROX (Πορτοκαλί)/Texas Red κανάλι.

Υλικά

PCR-mix-1-FRT, 0,6 ml

PCR-Buffer-FRT, 0,3 ml

TaqF Polymerase, 0,03 ml

Pos Control Complex C⁺ (HPV 6, 11, ανθρώπινο DNA), 0,2 ml

Negative Control C⁻, 1,2 ml

Πρωτόκολλο

Προετοιμάστε την απαιτούμενη ποσότητα σωληναρίων αντίδρασης για τα δείγματα (N) και τους μάρτυρες (N+2).

Προετοιμάστε το Μείγμα για 60 δείγματα: προσθέσετε στο σωληνάριο με το ρυθμιστικό διάλυμα PCR-buffer-FRT 30 μl από την πολυμεράση TaqF DNA Polymerase. Ανακινείτε προσεκτικά το σωληνάριο. Αυτό το μείγμα είναι σταθερό για 3 μήνες στους +4 °C.

Προετοιμάστε το Μείγμα Αντίδρασης προσθέτοντας για κάθε δείγμα στο νέο στειρό σωληνάριο 10 μl από το μείγμα PCR-mix-1-FRT και 5 μl από το μείγμα PCR-buffer-FRT/TaqF DNA Polymerase.

Προσθέστε σε κάθε σωληνάριο αντίδρασης 15 μl από το Μείγμα Αντίδρασης και 10 μl από το εκχυλισμένο DNA. Αναμείξτε πιπετάρωντας.

Προσθέστε 10 μl από το θετικό μάρτυρα Positive Control Complex C⁺ στο επισημασμένο σωληνάριο Amplification Positive Control.

Εισάγετε τα σωληνάρια στο θερμοκυκλοποιητή.

Η PCR πραγματοποιήθηκε στο θερμοκυκλοποιητή 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems).

Ενίσχυση

| Βήμα | Θερμοκρασία, °C | Χρόνος | Επαναλήψεις |
|------|-----------------|---|-------------|
| 1 | 95 | 15 λεπτά | 1 |
| 2 | 95 | 5 δευτερόλεπτα | 5 |
| | 60 | 20 δευτερόλεπτα | |
| | 72 | 15 δευτερόλεπτα | |
| 3 | 95 | 5 δευτερόλεπτα | 40 |
| | 60 | 30 δευτερόλεπτα ανίχνευση σημάτων φθορισμού* | |
| | 72 | 15 δευτερόλεπτα | |

Ρυθμίσεις Οργάνου

Η γραμμή ορίου θα πρέπει να διασχίζει μόνο σιγμοειδείς καμπύλες συσσώρευσης σήματος θετικών δειγμάτων και δεν θα πρέπει να διασχίζει τη γραμμή βάσης: αλλιώς, το επίπεδο ορίου θα πρέπει να αυξηθεί. Ρυθμίστε το όριο σε ένα επίπεδο όπου οι καμπύλες φθορισμού είναι γραμμικές και δεν διασχίζουν τις καμπύλες των αρνητικών δειγμάτων.

Ανάλυση Δεδομένων

Τα αποτελέσματα ερμηνεύονται με το λογισμικό του οργάνου Real Time PCR μέσω της παρουσίας της καμπύλης φθορισμού και της γραμμής ορίου. Ο HPV 6 εντοπίζεται στο FAM/Πράσινο κανάλι, ο HPV 11 στο JOE/Κίτρινο/HEX και το DNA IC στο Rox/Πορτοκαλί κανάλι.

Το αποτέλεσμα θεωρείται έγκυρο, αν το σήμα είναι απόν σε όλα τα κανάλια (FAM/Πράσινο, JOE/Κίτρινο, ROX/Πορτοκαλί) για τους αρνητικούς μάρτυρες και τα σήματα είναι παρόντα σε όλα τα κανάλια (FAM/Πράσινο, JOE/Κίτρινο, ROX/Πορτοκαλί) για το θετικό μάρτυρα.

Το αποτέλεσμα της ανίχνευσης DNA HPV θεωρείται ότι είναι:

αρνητικό, αν το σήμα φθορισμού είναι καταχωρημένο μόνο στο ROX/Πορτοκαλί κανάλι και η τιμή του κύκλου ορίου δεν υπερβαίνει το 30,

θετικό, αν το σήμα είναι καταχωρημένο στο FAM/Πράσινο κανάλι (θετικό για τον τύπο HPV 6), το σήμα είναι καταχωρημένο στο JOE/HEX/Κίτρινο κανάλι (θετικό για τον τύπο HPV 11),

μη έγκυρο, αν τα θετικά σήματα δεν είναι καταχωρημένα στα FAM/Πράσινα και JOE/HEX/Κίτρινα κανάλια (τύποι HPV 6 και 11) και το σήμα IC (ROX/Πορτοκαλί) δεν είναι καταχωρημένο ή η τιμή του κύκλου ορίου υπερβαίνει το 30 και αν, το επισφαλές σήμα είναι καταχωρημένο στα FAM/Πράσινα και JOE/HEX/Κίτρινα κανάλια (τύποι HPV 6 και 11) και το σήμα IC (ROX/Πορτοκαλί) δεν είναι καταχωρημένο ή η τιμή του κύκλου ορίου υπερβαίνει το 30.

Χαρακτηριστικά Απόδοσης

Αναλυτική ειδικότητα

Η αναλυτική ειδικότητα των εκκινητών και των ανιχνευτών ελέγχθηκε με αρνητικά δείγματα. Δεν παρήγαγαν κανένα σήμα με τους ειδικούς εκκινητές και ανιχνευτές HPV 6/11. Η ειδικότητα του κιτ HPV 6/11 Real-TM ήταν 100%. Η πιθανή διασταυρούμενη αντιδραστικότητα του κιτ HPV 6/11 Real-TM ελέγχθηκε έναντι της ομάδας ελέγχου. Δεν παρατηρήθηκε καμία διασταυρούμενη αντιδραστικότητα με άλλα παθογόνα.

Αναλυτική ευαισθησία

Το κιτ HPV 6/11 Real-TM επιτρέπει την ανίχνευση DNA του HPV 6 & 11 στο 100% των δοκιμών με ευαισθησία όχι μικρότερη από 500 αντίγραφα/ml. Η ανίχνευση διεξήχθη στο πρότυπο ελέγχου και τις αραιώσεις του από αρνητικό δείγμα.

Περιοχή στόχος: γονίδιο L1

HPV High Risk Typing Real-TM

Προβλεπόμενη Χρήση

Το κιτ HPV High Risk Typing Real-TM είναι μια in vitro δοκιμή ενίσχυσης Πραγματικού Χρόνου για την ποιοτική ανίχνευση και τη γονοτύπιση του Ιού των Ανθρώπινων Θηλωμάτων (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59) σε ουρογεννητικά επιχρίσματα και βιοψίες.

Αρχή Δοκιμής

Το κιτ HPV High Risk Typing Real-TM βασίζεται σε δύο σημαντικές διαδικασίες: την απομόνωση του DNA από δείγματα και την πολλαπλή ενίσχυση Πραγματικού Χρόνου 4 σωληναρίων για κάθε δείγμα. Κάθε σωληνάριο περιέχει εκκινητές κατευθυνόμενους απέναντι σε περιοχές τριών τύπων HPV και του γονιδίου β-σφαιρίνης που χρησιμοποιείται ως Εσωτερικός Μάρτυρας. Αν το επίχρισμα δεν είναι σωστά προετοιμασμένο (υψηλή ποσότητα βλέννας ή ανεπαρκής ποσότητα επιθηλιακών κυττάρων) ο Εσωτερικός Μάρτυρας δεν θα ανιχνευθεί.

Υλικά

PCR-mix-1 “16-18-31”, 0,08 ml

PCR-mix-1 “39-45-59”, 0,08 ml

PCR-mix-1 “33-35-56”, 0,08 ml

PCR-mix-1 “51-52-58”, 0,08 ml

PCR-buffer-FRT, 1,1 ml

Hot Start DNA Polymerase, 0,06 ml

Negative Control, 1,2 ml

HPV C⁺ “16-18-31”, 0,06 ml (αναμείξτε HPV DNA C⁺ 16, 18, 31 και ανθρώπινο DNA)

HPV C⁺ “39-45-59”, 0,06 ml (αναμειξτε HPV DNA C⁺ 39, 45, 59 και ανθρώπινο DNA)

HPV C⁺ “33-35-56”, 0,06 ml (αναμειξτε HPV DNA C⁺ 33, 35, 56 και ανθρώπινο DNA)

HPV C⁺ “51-52-58”, 0,06 ml (αναμειξτε HPV DNA C⁺ 51, 52, 58 και ανθρώπινο DNA)

Πρωτόκολλο

Προετοιμάστε την απαιτούμενη ποσότητα σωληναρίων (0,1 ml).

Προετοιμάστε το Μείγμα για 54 δείγματα (216 αντιδράσεις): προσθέσετε στο σωληνάριο με το ρυθμιστικό διάλυμα PCR-buffer-FRT 60 μl από την πολυμεράση Hot Start DNA Polymerase. Ανακινείτε προσεκτικά το σωληνάριο. Αυτό το μείγμα είναι σταθερό για 3 μήνες στους +4 °C.

Προσθέστε 90 μl από το Μείγμα σε καθένα από τα τέσσερα σωληνάκια μείγματος PCR-mix-1 και ανακινήστε.

Προετοιμάστε για κάθε μείγμα PCR-mix-1 ένα νέο σωληνάριο και προσθέστε για κάθε δείγμα 3,5 * (N + 2) μl από το μείγμα PCR-mix-1, 4,5 * (N + 2) από το Μείγμα (ρυθμιστικό διάλυμα PCR-mix-2 buffer με πολυμεράση Hot Start DNA Polymerase).

Προσθέστε 8,0 μl από το Μείγμα Αντίδρασης σε κάθε σωληνάριο (0,1 ml). Μοιράστε τα Αντιδραστήρια και τα Δείγματα (κάθε δείγμα πρέπει να ελεγχθεί σε 4 σωληνάκια): προσθέστε στην πρώτη γραμμή των σωληναρίων 8,0 μl από το μείγμα “16,18,31”, στη δεύτερη γραμμή 8,0 μl από το μείγμα “39,45,59”, στην τρίτη 8,0 μl από το μείγμα “33,35,56”, στην τέταρτη 8,0 μl από το μείγμα “51,52,58”.

Προσθέστε 5 μl από το δείγμα εκχυλισμένου DNA στο κατάλληλο σωληνάριο.

Προσθέστε 5 μl από τους θετικούς μάρτυρες Positive Controls C⁺ στα σωληνάκια.

Η PCR πραγματοποιήθηκε στο θερμοκυκλοποιητή 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems).

Ενίσχυση

| Βήμα | Θερμοκρασία, °C | Χρόνος | Επαναλήψεις |
|------|-----------------|------------------------------------|-------------|
| 1 | 95 | 15 λεπτά | 1 |
| 2 | 95 | 5 δευτερόλεπτα | 5 |
| | 60 | 20 δευτερόλεπτα | |
| | 72 | 15 δευτερόλεπτα | |
| 3 | 95 | 5 δευτερόλεπτα | 40 |
| | 60 | 30 δευτερόλεπτα | |
| | | ανίχνευση σημάτων φθορισμού* | |
| | 72 | 15 δευτερόλεπτα | |

*ανίχνευση σε Fam (Πράσινο), Joe (Κίτρινο)/Hex, Rox (Πορτοκαλί) και Cy5 (Κόκκινο)

| Βήμα | Θερμοκρασία, °C | Χρόνος | Ανίχνευση Φθορισμού | Επαναλήψεις |
|---------|-----------------|------------------|---------------------|-------------|
| Τμήμα 1 | 95 | 15 λεπτά | - | 1 |
| Τμήμα 2 | 95 | 20 δευτερόλεπτα | - | 45 |
| | 60 | 60 δευτερόλεπτα* | Cy5, FAM, HEX, ROX | |

*ανίχνευση σε Fam, Joe/Hex, Rox και Cy5

Ρυθμίσεις Οργάνου

Η γραμμή ορίου θα πρέπει να διασχίζει μόνο σιγμοειδείς καμπύλες συσσώρευσης σήματος θετικών δειγμάτων και δεν θα πρέπει να διασχίζει τη γραμμή βάσης: αλλιώς, το επίπεδο ορίου

θα πρέπει να αυξηθεί. Ρυθμίστε το όριο σε ένα επίπεδο όπου οι καμπύλες φθορισμού είναι γραμμικές και δεν διασχίζουν τις καμπύλες των αρνητικών δειγμάτων.

Ανάλυση Δεδομένων

Το πείραμα θεωρείται έγκυρο εάν οι Αρνητικοί Μάρτυρες Ενίσχυσης δεν έχουν κανένα θετικό σήμα φθορισμού και σε κάθε έναν από τους Θετικούς Μάρτυρες προσδιορίζονται 3 τύποι HPV.

Το αποτέλεσμα του δείγματος θεωρείται μη έγκυρο, σε περίπτωση απουσίας οποιουδήποτε σήματος φθορισμού (θετικού ή εσωτερικού). Το δείγμα είναι επίσης μη έγκυρο αν το IC είναι θετικό με Ct>30.

Το δείγμα είναι αρνητικό αν όλα τα σωληνάρια περιέχουν μόνο το θετικό σήμα στο Cy5 (Κόκκινο) κανάλι και θετικό αν περιέχει το θετικό σήμα στο Fam (Πράσινο) ή Joe (Κίτρινο) ή Rox (Πορτοκαλί) κανάλι ανεξάρτητα από το αποτέλεσμα του καναλιού Cy5 (Κόκκινο).

Χαρακτηριστικά Απόδοσης

Αναλυτική ειδικότητα

Η αναλυτική ειδικότητα των εκκινητών και των ανιχνευτών ελέγχθηκε με αρνητικά δείγματα. Δεν παρήγαγαν κανένα σήμα με τους ειδικούς εκκινητές και ανιχνευτές Human Papillomavirus. Η ειδικότητα του κιτ HPV High Risk Typing Real-TM ήταν 100%. Η πιθανή διασταυρούμενη αντιδραστικότητα του κιτ HPV High Risk Typing Real-TM ελέγχθηκε έναντι της ομάδας ελέγχου. Δεν παρατηρήθηκε καμία διασταυρούμενη αντιδραστικότητα με άλλα παθογόνα.

Αναλυτική ευαισθησία

Το κιτ HPV High Risk Typing Real-TM επιτρέπει την ανίχνευση DNA του Human Papillomavirus στο 100% των δοκιμών με ευαισθησία όχι μικρότερη από 1000 αντίγραφα/ml. Η ανίχνευση διεξήχθη στο πρότυπο ελέγχου και τις αραιώσεις του από αρνητικό δείγμα.

Περιοχή στόχος: E7

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Με βάση τα κριτήρια επιλογής, που ήταν η έλλειψη κλινικής συμπτωματολογίας, ο μη-εμβολιασμός έναντι του ιού HPV και το αρνητικό ΠΑΠ τεστ επιλέχθηκαν για τη μελέτη συνολικά 94 γυναίκες. Καμία γυναίκα δεν ανέφερε ιστορικό με προηγούμενο σεξουαλικά μεταδιδόμενο νόσημα.

Ο Πίνακας 1 περιλαμβάνει διάφορες πληροφορίες: ηλικία, μορφωτικό επίπεδο, ηλικία έναρξης σεξουαλικών επαφών, συνολικός αριθμός σεξουαλικών συντρόφων κλπ. Όλες οι γυναίκες ήταν Ελληνικής καταγωγής.

Πίνακας 1. Στοιχεία ερωτηματολογίου στις γυναίκες που εξετάστηκαν

| | |
|--|-----------------------------|
| Ηλικία (σε έτη) | Μέσος όρος: 34 ετών (19-59) |
| Μορφωτικό επίπεδο | n% - n (total)=94 |
| Δημοτικό-Γυμνάσιο | 7 (7,4%) |
| Λύκειο | 58 (61,7%) |
| Πανεπιστήμιο | 29 (30,8%) |
| Ηλικία έναρξης σεξουαλικών επαφών | Μέσος όρος: 22 ετών (16-32) |
| Αριθμός σεξουαλικών συντρόφων | n% |
| <3 | 46 (49%) |
| >=3 | 48 (51%) |
| | Μέσος όρος: 3 (0-6) |
| Κυήσεις | n% |
| Ναι | 49 (52%) |
| Όχι | 45 (48%) |

Ελήφθησαν 94 δείγματα (τραχηλικά επιχρίσματα) από γυναίκες-ασθενείς που προσήλθαν στα εξωτερικά ιατρεία της Γυναικολογικής κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας, χωρίς κλινική υποψία λοίμωξης από τον ιό HPV. Όλες οι γυναίκες που συμμετείχαν στη μελέτη (N=94) είχαν αρνητικό κυτταρολογικό έλεγχο κατά Παπανικολάου (αρνητικές για τραχηλικές ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις). Τα δείγματα αναλύθηκαν με την μέθοδο Real-Time PCR, ως η πλέον ευαίσθητη και ειδική μέθοδος.

Παρά το γεγονός ότι όλες οι γυναίκες που συμμετείχαν στη μελέτη βρέθηκαν αρνητικές ως προς τις ενδοεπιθηλιακές τραχηλικές αλλοιώσεις, 22 από αυτές (23,4%) βρέθηκαν θετικές για κάποιον HPV-υπότυπο υψηλού κινδύνου. Οι πιο συχνοί HPV υπότυποι υψηλού κινδύνου που ανευρέθησαν ήταν ο 52 και ο 39 (6/22 και 6/22 αντίστοιχα), ακολουθούμενοι από τον 59 (5/22), τον 16 (4/22), τον 31 (4/22), τον 33 (3/22), τον 56 (3/22), τον 18 (2/22), τον 51 (2/22), τον 58 (1/22) και τέλος, τον 35 (1/22). Μάλιστα, 13 από τις 22 γυναίκες που εξετάστηκαν, ποσοστό 59%, ήταν αποικισμένες από έναν και μοναδικό υπότυπο HPV-high risk, ενώ 9 από τις 22, ποσοστό 41% ευρέθησαν θετικές σε περισσότερους του ενός HPV-high risk υπότυπους.

Συγκεκριμένα οι 9 γυναίκες είχαν τους ακόλουθους συνδυασμούς:

1. 59+16
2. 51+58+18
3. 31+33
4. 39+59
5. 52+59
6. 56+18
7. 58+35
8. 18+51
9. 33+56.

Μελέτη της επίπτωσης του HPV στις 4 ηλικιακές ομάδες

Ο Πίνακας 2 δείχνει την επίπτωση του HPV στις 4 διαφορετικές ηλικιακές ομάδες των γυναικών της μελέτης. Η χρήση Απονα δεν ανέδειξε στατιστικώς σημαντικές διαφορές ως τον βαθμό επικράτησης του HPV μεταξύ των εν λόγω ηλικιακών ομάδων ($p > 0.05$).

Πίνακας 2. Επίπτωση των διαφόρων υποτύπων υψηλού κινδύνου του ιού HPV στο συνολικό δείγμα γυναικών, καθώς και στις τέσσερις επιμέρους, ηλικιακές ομάδες

| | Total positivity | 19 -29 ετών | 30 – 39 ετών | 40 - 49 ετών | 50-59 ετών |
|------------------------|-------------------------|--------------------|---------------------|---------------------|-------------------|
| | n = 94 | n = 41 | n = 23 | n = 18 | n = 12 |
| (High-risk HPV) | 22 (23.4%) | 12 (29.3%) | 6 (26.1%) | 2 (11.1%) | 2 (16.7%) |

Μελέτη πιθανής συσχέτισης του HPV με το αριθμό σεξουαλικών συντρόφων

Στη μελέτη μας αναζητήθηκε ακόμη, πιθανή συσχέτιση της παρουσίας του HPV σε σχέση με τον αριθμό των σεξουαλικών συντρόφων. Πράγματι, η παρουσία HPV-υπότυπων υψηλού κινδύνου εμφάνισε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τον αριθμό των σεξουαλικών συντρόφων, όπως αυτός είχε αναφερθεί από τις γυναίκες κατά τη συμπλήρωση του ερωτηματολογίου ($r: 0.251/ p: 0.018$) **Πίνακας 3.**

Πίνακας 3. Συσχετίσεις Spearman's του αριθμού των σεξουαλικών συντρόφων με την επίπτωση του ιού HPV.

| | Spearman's rho | P |
|------------|-----------------------|----------|
| HPV | 0.251* | 0.018* |

*. Ως επίπεδο στατιστικώς σημαντικής συσχέτισης ορίζεται η τιμή 0.05

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Είναι γνωστό ότι ο ιός των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV) σχετίζεται με τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, ενώ κάποιοι υπότυποι του έχουν ισχυρή ογκογονική δράση και κατατάσσονται στους υψηλού κινδύνου υποτύπους [98,99,100]. Συγκεκριμένα, οι υπότυποι 16 και 18 σχετίζονται με το 70% του τραχήλου της μήτρας, ενώ για το υπόλοιπο 30% ενοχοποιούνται διάφοροι άλλοι υπότυποι [101-105]. Συχνά υπάρχει συνύπαρξη περισσοτέρων του ενός υποτύπων, γεγονός που δείχνει συνέργεια μεταξύ τους. Ωστόσο δεν έχει διευκρινιστεί η συχνότερη συνύπαρξη κάποιων συγκεκριμένων υποτύπων [106,107].

Επίσης, είναι γνωστό ότι αρκετά συχνά ο τράχηλος αποικίζεται από τον ιό HPV λίγα χρόνια μετά την έναρξη των σεξουαλικών επαφών, ενώ η εμμένουσα λοίμωξη από τον ιό HPV για 10-15 έτη οδηγεί σε πρόκληση τραχηλικών ενδο-επιθηλιακών αλλοιώσεων, οι οποίες εάν αφεθούν χωρίς θεραπεία μπορεί προοδευτικά να μετατραπούν σε διηθητικό καρκίνο στον τράχηλο. Έτσι, με σκοπό πάντα την πρόληψη του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας δύο τύποι εμβολίων αρχικά είχαν αναπτυχθεί: ένα διδύναμο που εμπεριείχε τους 16, 18 υποτύπους και ένα τετραδύναμο που εμπεριείχε τους 6,11, 16, 18. Και τα δύο εμβόλια περιείχαν την καψιδική πρωτεΐνη L1 του ιού [108,109,110].

Τόσο η συχνότητα του HPV όσο και η κατανομή των διαφόρων υποτύπων του ιού ποικίλλουν από περιοχή σε περιοχή. Πέρα από τις ιδιαιτερότητες των πληθυσμιακών ομάδων που μελετώνται όσο και από την μεθοδολογία ανίχνευσης του ιού, σημαντικό ρόλο παίζει και η εφαρμογή ή όχι του εμβολιασμού έναντι του ιού [111-113]. Εντούτοις, υπάρχει πάντα ο κίνδυνος, με την καταστολή των υποτύπων του εμβολίου να προκληθεί ανάδυση άλλων υψηλού κινδύνου υποτύπων. Για το λόγο αυτό είναι σημαντική η επιδημιολογική μελέτη των HPV υποτύπων οι οποίοι κυκλοφορούν σε μια γεωγραφική περιοχή [114].

Ο σκοπός της διπλωματικής εργασίας ήταν να προσδιοριστεί στην περιοχή της Θεσσαλίας η κατανομή των υποτύπων που αποικίζουν τον τράχηλο γυναικών οι οποίες είχαν φυσιολογικό ΠΑΠ τεστ και δεν είχαν εμβολιαστεί.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης, ανιχνεύθηκε υψηλό ποσοστό υπότυπων HPV-υψηλού κινδύνου (23,4%). Συγκεκριμένα, ανιχνεύθηκαν διάφοροι υπότυποι υψηλού κινδύνου, οι 52, 39, 16, 18, 59, 31, 33, 56, 51, 58 και 35. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι στο 10% των γυναικών αυτών ανιχνεύθηκαν περισσότεροι του ενός υπότυποι. Οι γυναίκες αυτές ανήκαν στην ηλικιακή ομάδα 30-39. Το ποσοστό ανίχνευσης του ιού δεν έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά στις διάφορες ηλικιακές ομάδες. Ωστόσο, βρέθηκε θετική συσχέτιση ανάμεσα στο ποσοστό ανίχνευσης και στον αριθμό των σεξουαλικών συντρόφων.

Στην Ελλάδα, σε μια μελέτη που έγινε σε 3177 γυναίκες ηλικίας 14-70 ετών στην περιοχή της Αθήνας την περίοδο Ιανουάριος 2007-Νοέμβριος 2010 βρέθηκε ο ιός στο 15.7% σε γυναίκες με φυσιολογικό ΠΑΠ τεστ [115]. Μελέτες από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας δείχνουν ποσοστό που κυμαίνεται από 22.7-50% [116,117]. Ενδιαφέρον είναι ότι σε μελέτη που έγινε στην Θεσσαλονίκη το ποσοστό ανίχνευσης του ιού ήταν 2.5% [118].

Σε ανάλογη μελέτη στην Ιταλία, με συμμετοχή 566 γυναικών με φυσιολογική κυτταρολογική εξέταση βρέθηκε ποσοστό αποικισμού 18.2% [119]. Αναλυτικότερα βρέθηκαν αποικισμένες 48.15% των γυναικών ηλικίας 16-17 ετών, 15.4% των γυναικών ηλικίας 18-20 ετών, 21.9% των γυναικών ηλικίας 21-23 ετών και 15.5% των γυναικών ηλικίας 24-26 ετών. Περισσότεροι του ενός υπότυποι βρέθηκαν στο 10.1% των γυναικών ενώ ο HPV-16 κυριαρχούσε [119]. Το 2007, οι *de Sanjose et al* έδειξαν σε ένα μεγάλο δείγμα Ευρωπαίων γυναικών ηλικίας <25 ετών ποσοστό αποικισμού 22%, το οποίο συμφωνούσε απόλυτα με αυτό της μελέτης του *Bruni et al* στην ίδια ηλικιακή ομάδα γυναικών [120,121].

Αντίστοιχα στην Παραγουάη, σε γυναίκες ιθαγενείς οι οποίες δεν είχαν εμβολιαστεί βρέθηκε 16.1% ποσοστό αποικισμού από υψηλού κινδύνου HPV υπότυπους, ενώ 43.6 % ήταν το ποσοστό θετικότητας σε δείγμα γυναικών στο Μεξικό με φυσιολογική κυτταρολογική εξέταση και 29.9% στη Νότια Βραζιλία [122,123,124]. Σε μελέτες από την Κίνα παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στο ποσοστό ανίχνευσης ανάμεσα στο Πεκίνο (7%) και στις διάφορες επαρχίες, όπου η ανίχνευση του ιού κυμάνθηκε από 15-19% [125]. Γίνεται λοιπόν φανερό ότι οι διαφορές αυτές αντανακλούν, πέρα από άλλους παράγοντες, την σεξουαλική συμπεριφορά και την κουλτούρα της κάθε κοινωνίας. Σε μια πρόσφατη μελέτη από το Κεμπέκ, όπου συμμετείχαν 416 γυναίκες, βρέθηκε υψηλό ποσοστό αποικισμού με υψηλού κινδύνου υποτύπους.

Σχετικά με τους κυρίαρχους υπότυπους της μελέτης μας σε σύγκριση με αντίστοιχες μελέτες φαίνεται ότι πέρα από τους 16, 18, οι υπότυποι 52, 56, 31, 51 που βρέθηκαν στη μελέτη μας αναφέρονται και σε άλλες μελέτες. Το 2005, σε ευρωπαϊκή μελέτη οι *Clifford et al* αναφέρουν την ανίχνευση των υψηλού κινδύνων υποτύπων 16, 31, 18, 56, 45 και 35 [126]; οι *Bruni et al* αναφέρουν τους 16, 31, 18, 33, 52, και 51, ενώ οι *de Sanjose* αναφέρουν τους 16, 31, 18, 33, και 35 [120,121]. Επιπλέον ο *Mollers et al* σε μια μεγάλη μελέτη σε γυναίκες σεξουαλικά ενεργείς ηλικίας 16-29 ετών στην Ολλανδία έδειξε ότι οι πλέον κυρίαρχοι υπότυποι ήταν 16, 51, 52; βέβαια στη συγκεκριμένη μελέτη ο πληθυσμός των εξετασθέντων γυναικών περιλαμβάνει τόσο γυναίκες με φυσιολογική κυτταρολογική εξέταση όσο και γυναίκες με παθολογικά ευρήματα στο ΠΑΠ [127]. Στη δική μας μελέτη ο συχνότερος υπότυπος ήταν ο 52 και τα αποτελέσματά μας συμφωνούν με αυτά άλλων ευρωπαϊκών μελετών για τη μεγάλη σημασία του 52 και την παγκόσμια επικράτησή του σε όλο τον κόσμο (Βόρεια Αμερική, Αφρική και Ασία) [120,121,126].

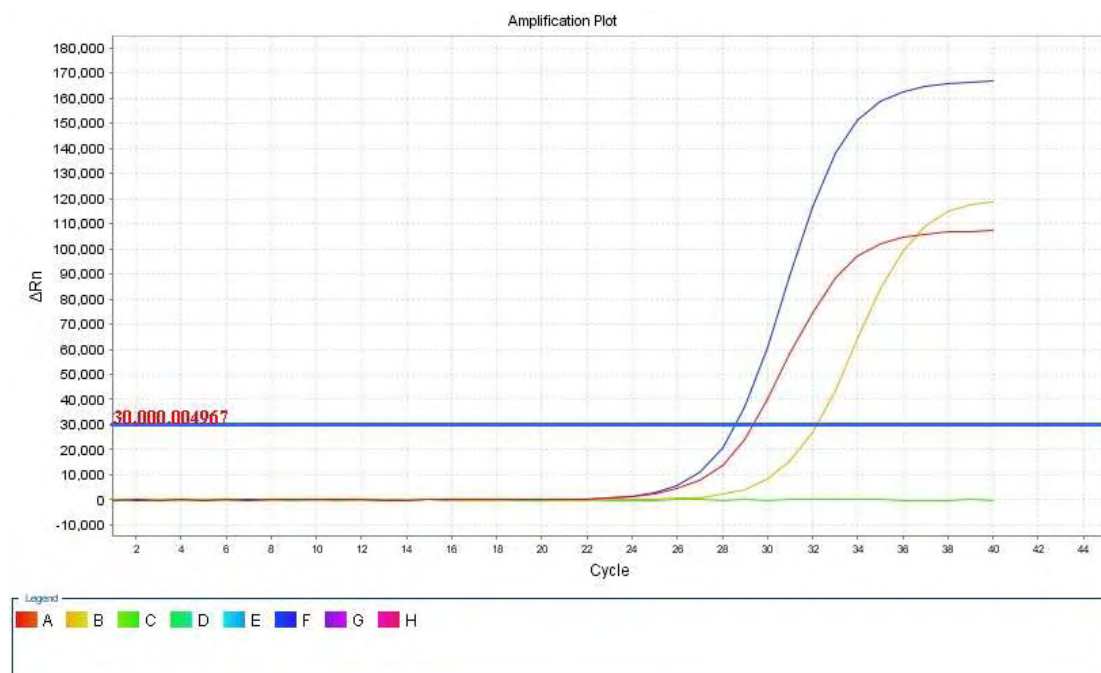
Χαρακτηριστικό είναι ότι μελέτες που αφορούσαν την περίοδο πριν την εφαρμογή του εμβολιασμού, οι πλέον συχνοί υπότυποι σε γυναίκες ηλικίας 25-64 ετών στην Αγγλία ήταν οι 16, 52, 31 και 45 [127]. Το ίδιο παρατηρήθηκε και στην Δανία, όπου σε γυναίκες ηλικίας 18-29 ετών οι κυρίαρχοι υπότυποι πριν την εισαγωγή του εμβολίου ήταν οι 16, 52, 51 και 31 [128].

Μέχρι πρότινος στη χώρα μας η Εθνική Επιτροπή Εμβολιασμού έχει εντάξει στο πρόγραμμα εμβολιασμού το εμβόλιο HPV4 σε κορίτσια στην ηλικία των 11-12 ετών (δύο δόσεις με μεσοδιάστημα 6 μηνών), ενώ σε περίπτωση που υπάρχει καθυστέρηση στον εμβολιασμό προτείνει να γίνονται τρεις δόσεις σε ηλικία 16-18 ετών (0, 1-2, 6). Από 1-7-2017 στην Ελλάδα το HPV4 θα αντικατασταθεί από το HPV9. Το HPV9 εμπεριέχει περισσότερους υποτύπους από το HPV4 (6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 και 58).

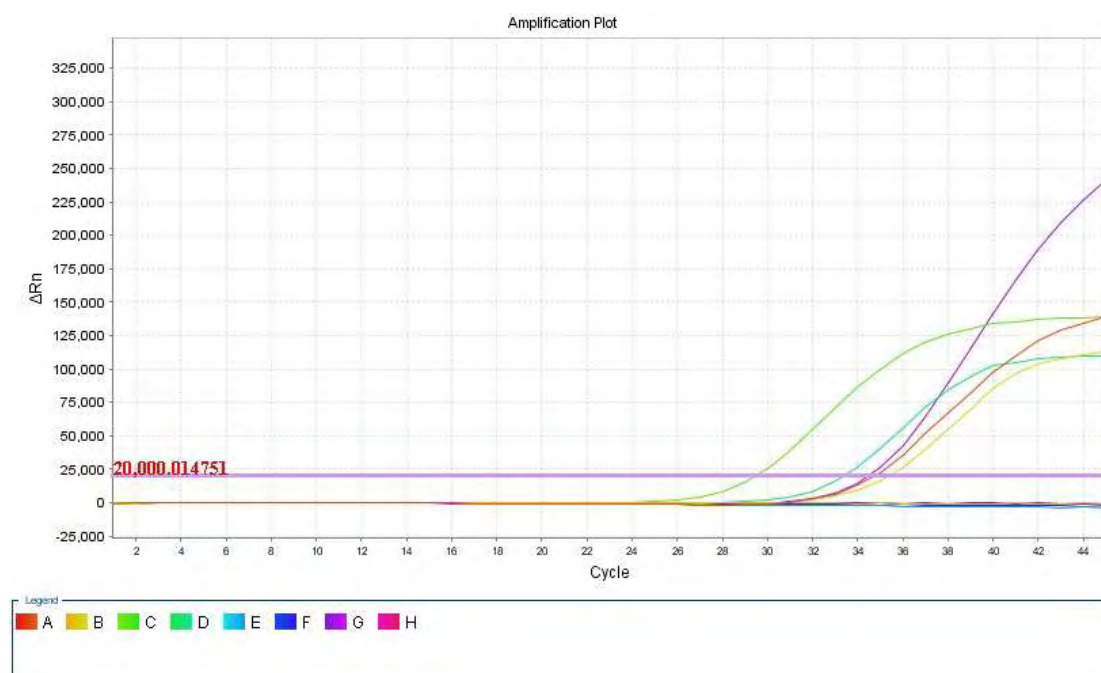
Συμπερασματικά, υψηλό ποσοστό αποικισμού από υψηλού κινδύνου HPV υποτύπους βρέθηκε σε υγιείς γυναίκες της Θεσσαλίας με φυσιολογικό ΠΑΠ. Κάποιοι από τους υποτύπους που ανιχνεύθηκαν στη μελέτη εμπεριέχονται μέσα στο νέο εμβόλιο, γεγονός που δείχνει και τη σπουδαιότητα της αντικατάστασης του HPV4.

Η συνεχής παρακολούθηση του επιπολασμού του ιού HPV επί εδάφους ασυμπτωματικών πληθυσμών είναι το κλειδί για τον περιορισμό της μετάδοσής του. Πέραν τούτου, απαιτούνται όχι μόνο η αδιάλειπτη ενημέρωση του πληθυσμού για τα screening τεστ, αλλά και η ορθή σεξουαλική διαπαιδαγώγιση από την οικογένεια και το σχολείο, καθώς και η διαρκής ενημέρωση από τους αρμόδιους κρατικούς φορείς. Η διεξαγωγή περισσότερων προοπτικών τυχαιοποιημένων μελετών κρίνεται επιβεβλημένη ώστε να περιοριστεί η εξάπλωση των σεξουαλικά μεταδιδόμενων παθογόνων γενικά, αλλά και των νοσημάτων που αυτά προκαλούν, με απώτερο σκοπό τη βελτίωση της ποιότητας ζωής των ανθρώπων.

Εικόνα 1: Η των προϊόντων της Real Time PCR ενίσχυσης των γονοτύπων HPV χαμηλού κινδύνου.



Εικόνα 2: Η των προϊόντων της Real Time PCR ενίσχυσης των γονοτύπων HPV υψηλού κινδύνου.



5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1]: Zur Hausen H, Papillomavirus infections – a major cause of human cancers, *Biochim Biophys Acta*, 1996.
- [2]: Zur Hausen H, Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account, *Virology*, 2009.
- [3]: Panatto D, Amicizia D, Tanzi E, Bianchi S, Frati ER, Zotti CM, et al. Prevalence of human papillomavirus in young Italian women with normal cytology: how should we adapt the national vaccination policy, *BMJ Infect Dis*, 2013.
- [4]: Johannsen E, Lambert PF, Epigenetics of human Papillomaviruses, *Virology*, 2011.
- [5]: Bernard HU, Calleja-Macias IE, Dunn ST, Genome variation of human papillomavirus types: phylogenetic and medical implications, *Int J Cancer*, 2006.
- [6]: Ghittoni R., Accardi R., Hasan U, Gheit T, Sylla B, Tommasino M, The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human Papillomaviruses, *Virus Genes*, 2010.
- [7]: Peitsaro P, Johansson B, Syrjanen S, Integrated human papillomavirus type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative realtime PCR technique, *J Clin Microbiol*, 2002.
- [8]: Munoz N, Castellsagué X, de González AB, Gissmann L, Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer, *Vaccine*, 2006.
- [9]: Gomousa-Michael M, Deligeorgi-Politi H, Condi-Paphiti A, Rammou-Kinia R, Ghionis J, Belca-Hari K, Human papillomavirus identification and typing of both sexual partners, 1997.
- [10]: Kadaja M, Silla T, Ustav E, Ustav M, Papillomavirus DNA replication – from initiation to genomic instability, *Virology*, 2009.
- [11]: de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, Zur Hauzen H, Classification of Papillomaviruses, *Virology*, 2004.
- [12]: Bravo IG, de Sanjosé S, Gottschling M, The clinical importance of understanding the evolution of Papillomaviruses, *Trends in microbiology*, 2010.
- [13]: Garcia-Vallve S, Alonso A, Bravo IG, Papillomaviruses: different genes have different histories, *Trends Microbiol*, 2005.

- [14]: Cubie HA, Diseases associated with human papillomavirus infection, *Virology*, 2013.
- [15]: Bosch FX, Burchell AN, Schiffman M, Giuliano AR, de Sanjose S, Bruni L, et al, Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia, *Vaccine*, 2008.
- [16]: Wangsa D, He D, Ried T, Symer DE, Gillison ML, Genome-wide analysis of HPV integration in human cancers reveals recurrent, focal genomic instability, *Genome*, 2014.
- [17]: Bosch FX, de Sanjosé S, Castellsagué X, Human papilloma virus: oncogenic risk and new opportunities for prevention, *An Sist Sanit Navar*, 2001.
- [18]: de Sanjose S, Quint WG, Alemany L, Geraets DT, Klaustermeier JE, et al, Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective crosssectional worldwide study, *Lancet Oncol*, 2010.
- [19]: Li K, Yin R, Wang D, Li Q, Human papillomavirus subtypes distribution among 2309 cervical cancer patients in West China, *Oncotarget*, 2017.
- [20]: Doorbar J, Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer, *Clin Sci (Lond)*, 2006.
- [21]: Hsueh PR, Human papillomavirus, genital warts, and vaccines, *J Microbiol Immunol Infect*, 2009.
- [22]: Kremsdorf D, Jablonska S, Favre M, Orth G, Human papillomaviruses associated with epidermodysplasia verruciformis. II. Molecular cloning and biochemical characterization of human papillomavirus 3a, 8, 10, and 12 genomes, *J Virol*, 1983.
- [23]: Zheng ZM, Baker CC, *Front Biosci*, Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation, *Front Biosci*, 2006.
- [24]: Baker TS, Newcomb WW, Olson NH, Cowser LM, Olson C, Brown JC, Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction, *Biophys J*, 1991.
- [25]: Yang HJ, Liu VW, Tsang PC, Yip AM, Tam KF, Wong LC, Ng TY, Ngan HY Quantification of human papillomavirus DNA in the plasma of patients with cervical cancer, *Int J Gynecol Cancer*, 2004.

- [26]: Johnson KM, Kines RC, Roberts JN, Lowy DR, Schiller JT, Day PM, Role of heparin sulphate in attachment to and infection of the murine female genital tract by human papillomavirus, *J Virol*, 2009.
- [27]: Sikorski M, Bobek M, Zrubek H, Marcinkiewicz J, Dynamics of selected MHC class I and II molecule expression in the course of HPV positive CIN treatment with the use of human recombinant IFN-gamma, *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2004.
- [28]: Ahn WS, Bae SM, Lee KH, Lee JM, Namkoong SE, Chun HJ, Kim CK, Kim YW, Recombinant adenovirus-p53 gene transfer and cell-specific growth suppression of human cervical cancer cells in vitro and in vivo, *Gynecol Oncol*, 2004.
- [29]: Finnen RL, Erickson KD, Chen XS, Garcea RL, Interactions between papillomavirus L1 and L2 capsid proteins, *J Virol*, 2003.
- [30]: Rollman E, Arnheim L, Collier B, Oberg D, Hall H, Klingström J, Dillner J, Pastrana DV, Buck CB, Hinkula J, Wahren B, Schwartz S, HPV-16 L1 genes with inactivated negative RNA elements induce potent immune responses, *Virology*, 2004.
- [31]: Gambhira R, Karanam B, Jagu S, Roberts JN, Buck CB, Bossis I, Alphs H, Culp T, Christensen ND, Roden RB, A protective and broadly cross-neutralizing epitope of human papillomavirus L2, *J Virol*, 2008.
- [32]: Kämper N, Day PM, Nowak T, Selinka HC, Florin L, Bolscher J, Hilbig L, Schiller JT, Sapp M, A membrane-destabilizing peptide in capsid protein L2 is required for egress of papillomavirus genomes from endosomes, *J Virol*, 2006.
- [33]: Richards JE, Pattman RS, Does the sexually transmitted infections foundation course deliver and change practice? Feedback from delegates 2002-2006, *Int J STD AIDS*, 2008.
- [34]: Hoover K, Friedman A, Montañó D, Kasprzyk D, Greek A, Hogben M, What about the partners of women with abnormal Pap or positive HPV tests, *J Virol*, 2009.
- [35]: Bishop B, Dasgupta J, Klein M, Garcea RL, Christensen ND, Zhao R, Chen XS, Crystal structures of four types of human papillomavirus L1 capsid proteins: understanding the specificity of neutralizing monoclonal antibodies, *J Bio Chem*, 2007.

- [36]: Demeret C, Le Moal M, Yaniv M, Thierry F, Control of HPV 18 DNA replication by cellular and viral transcription factors, *Nucleic Acids Res*, 1995.
- [37]: Chen X1, Tan Y, Li Z, Wu J, Evaluating the impact of human papilloma virus infection on prognosis of juvenile laryngeal papilloma, *Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi*, 2002.
- [38]: Smotkin D, Wettstein FO, The major human papillomavirus protein in cervical cancers is a cytoplasmic phosphoprotein, *J Virol*. 1987.
- [39]: Smotkin D, Berek JS, Fu YS, Hacker NF, Major FJ, Wettstein FO, Human papillomavirus deoxyribonucleic acid in adenocarcinoma and adenosquamous carcinoma of the uterine cervix, *Obstet Gynecol*, 1986.
- [40]: Smotkin D, Wettstein FO, Transcription of human papillomavirus type 16 early genes in a cervical cancer and a cancer-derived cell line and identification of the E7 protein, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986.
- [41]: Farthing A, Masterson P, Mason WP, Vousden KH, Human papillomavirus detection by hybrid capture and its possible clinical use, *J Clin Pathol*, 1994.
- [42]: Crook T, Fisher C, Masterson PJ, Vousden KH, Modulation of transcriptional regulatory properties of p53 by HPV E6, *Oncogene*, 1994 .
- [43]: Masterson PJ, Stanley MA, Lewis AP, Romanos MA, A C-terminal helicase domain of the human papillomavirus E1 protein binds E2 and the DNA polymerase alpha-primase p68 subunit, *J Virol*, 1998.
- [44]: Thorner LK, Lim DA, Botchan MR, DNA-binding domain of bovine papillomavirus type 1 E1 helicase: structural and functional aspects, *J Virol*, 1983.
- [45]: Andersson S, Safari H, Mints M, Lewensohn-Fuchs I, Gyllensten U, Johansson B, Type distribution, viral load and integration state of high-risk human papillomaviruses in pre-stages of cervical cancer (CIN), *Br J Cancer*, 2005.
- [46]: Swan DC, Rajeevan M, Tortolero-Luna G, Follen M, Tucker RA, Unger ER, Human papillomavirus type 16 E2 and E6/E7 variants, *Gynecol Oncol*, 2005.

- [47]: Bergvall M, Gagnon D, Titolo S, Lehoux M, D'Abramo CM, Melendy T, Archambault J, Requirement for the E1 Helicase C-Terminal Domain in Papillomavirus DNA Replication In Vivo, *J Virol*, 2016.
- [48]: Titolo S, Pelletier A, Pulichino AM, Brault K, Wardrop E, White PW, Cordingley MG, Archambault J, Identification of domains of the human papillomavirus type 11 E1 helicase involved in oligomerization and binding to the viral origin, *J Virol*, 2000.
- [49]: Sedman J, Stenlund A, The papillomavirus E1 protein forms a DNA-dependent hexameric complex with ATPase and DNA helicase activities, *J Virol*, 1998.
- [50]: Bergvall M, Melendy T, Archambault J, The E1 proteins, *Virology*, 2013.
- [51]: White PW, Pelletier A, Brault K, Titolo S, Welchner E, Thauvette L, Fazekas M, Cordingley MG, Archambault J, Characterization of recombinant HPV6 and 11 E1 helicases: effect of ATP on the interaction of E1 with E2 and mapping of a minimal helicase domain, *J Biol Chem*, 2001.
- [52]: Duensing A, Spardy N, Chatterjee P, Zheng L, Parry J, Cuevas R, et al, Centrosome overduplication, chromosomal instability, and human papillomavirus oncoproteins, *Environ Mol Mutagen*, 2009.
- [53]: Tonon SA, Picconi MA, Bos PD, Zinovich JB, Galuppo J, Alonio LV, Teyssie A, Physical status of the E2 human papilloma virus 16 viral gene in cervical preneoplastic and neoplastic lesions, *J Clin Virol*, 2001.
- [54]: Blachon S, Demeret C, The regulatory E2 proteins of human genital Papillomaviruses are pro-apoptotic, *Biochimie*, 2003.
- [55]: Schiffman M, Clifford G, Buonaguro FM, Classification of weakly carcinogenic human papillomavirus types: addressing the limits of epidemiology at the borderline, *Infect Agents Cancer*, 2009.
- [56]: Hebner CM, Laimins LA, Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity, *Rev Med Virol*, 2006.
- [57]: Hebnes JB, Olesen TB, Duun-Henriksen AK, Munk C, Norrild B, Kjaer SK, Prevalence of genital human papillomavirus among men in Europe: systematic review and meta-analysis, *J Sex Med*, 2014.

- [58]: Veress G, Szarka K, Dong XP, Gergely L, Pfister H, Functional significance of sequence variation in the E2 gene and the long control region, *J Gen Virol*, 1999.
- [59]: Finnen RL, Erickson KD, Chen XS, Garcea RL, Interactions between Papillomavirus L1 and L2 capsid proteins, *J Virol*, 2003.
- [60]: Pim D, Banks L, Interaction of viral oncoproteins with cellular target molecules: infection with high-risk vs low-risk human Papillomaviruses, *APMIS*, 2010.
- [61]: Pyeon D, Pearce SM, Lank SM, Ahlquist P, Lambert PF, Establishment of human papillomavirus infection requires cell cycle progression, *PLoS Pathog*, 2009.
- [62]: Schiffman M, Herrero R, Desalle R, Hildesheim A, Wacholder S, Rodriguez AC, et al, The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution, *Virology*, 2005.
- [63]: Sotlar K, Diemer D, Dethleffs A, Hack Y, et al, Detection and typing of human papillomavirus by E6 nested multiplex PCR, *J Clin Microbiol*, 2004.
- [64]: Kraus I, et al, Presence of E6 and E7 mRNA from Human Papillomavirus Types 16,18,31,33, and 45 in the Majority of Cervical Carcinomas, 2006.
- [65]: DeFilippis VR, Ayala FJ, Villarreal LP, Evidence of diversifying selection in human papillomavirus type 16 E6 but not E7 oncogenes, *J Mol Evol*, 2002.
- [66]: Middleton K, Peh W, Southern S, Griffin H, Sotlar K, Nakahara T, Organization of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers, *J Virol*, 2003.
- [67]: Doorbar J, The E4 protein; structure, function and patterns of expression, *Virology*, 2013.
- [68]: Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, Stanley MA, The biology and life-cycle of human Papillomaviruses, *Vaccine*, 2012.
- [69]: Wilson VG, West M, Woytek K, Rangasamy D, Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features, *Virus Genes*, 2002.
- [70]: Fang L, Budgeon LR, Doorbar J, Briggs ER, Howett MK, The human papillomavirus type 11 E1/E4 protein is not essential for viral genome amplification, *Virology*, 2006.
- [71]: Schmitz M, Driesch C, Beer-Grondke K, Jansen L, Runnebaum IB, Dürst M, Loss of gene function as a consequence of human papillomavirus DNA integration, *Int J Cancer*, 2012.

- [72]: DiMaio D, Petti LM, The E5 proteins, *Virology*, 2013.
- [73]: Wetherill LF, Holmes KK, Verow M, Müller M, Howell G, Harris M, Fishwick C, Stonehouse N, Foster R, Blair GE, Griffin S, Macdonald A, High-risk human papillomavirus E5 oncoprotein displays channel-forming activity sensitive to small-molecule inhibitors, *J Virol*. 2012.
- [74]: HPV testing for cervical cancer screening appears more cost-effective than Papanicolaou cytology in Mexico. Flores YN, Bishai DM, Lorincz A, Shah KV, Lazcano-Ponce E, Hernández M, Granados-García V, Pérez R, Salmerón J. *Cancer Causes Control*. 2011 Feb;22(2):261-72.
- [75]: Flores K, Bencomo C, Preventing cervical cancer in the Latina population, *J Womens Health (Larchmt)*, 2009.
- [76]: Fernandez ME, McCurdy SA, Arvey SR, Tyson SK, Morales-Campos D, Flores B, Useche B, Mitchell-Bennett L, Sanderson M, HPV knowledge, attitudes, and cultural beliefs among Hispanic men and women living on the Texas-Mexico border, *Ethn Health*, 2009.
- [77]: Salman NA, Davies G, Majidy F, Shakir F, Akinrinade H, Perumal D, Ashrafi GH, Association of High Risk Human Papillomavirus and Breast cancer, *Sci Rep* 2017.
- [78]: Haghshenas M, Golini-Moghaddam T, Rafiei A, Emadeian O, Shykhpour A, Ashrafi GH,]: Prevalence and type distribution of high-risk human papillomavirus in patients with cervical cancer: a population-based study, *Infect Agent Cancer*, 2013.
- [79]: Clavero O, McCloskey J, Molina VM, Quirós B, Bravo IG, de Sanjosé S, Bosch FX, Pimenoff VN, Squamous intraepithelial lesions of the anal squamocolumnar junction: Histopathological classification and HPV genotyping, *Papillomavirus Res*, 2017. Jun;3:11-17.
- [80]: Ganti K, Broniarczyk J, Manoubi W, Massimi P, Mittal S, Pim D, Szalmas A, Thatte J, Thomas M, Tomaić V, Banks L, The Human Papillomavirus E6 PDZ Binding Motif: From Life Cycle to Malignancy, *Viruses*. 2015.
- [81]: Ganti K, Massimi P, Manzo-Merino J, Tomaić V, Pim D, Playford MP, Lizano M, Roberts S, Kranjec C, Doorbar J, Banks L, Interaction of the Human Papillomavirus E6 Oncoprotein with Sorting Nexin 27 Modulates Endocytic Cargo Transport Pathways, *PLoS Pathog*, 2016.

[82]: Chan PK, Zhang C, Park JS, Smith-McCune KK, Palefsky JM, Giovannelli L, Coutlée F, Hibbitts S, Konno R, Settheetham-Ishida W, Chu TY, Ferrera A, Alejandra Picconi M, De Marco F, Woo YL, Raiol T, Piña-Sánchez P, Bae JH, Wong MC, Chirenje MZ, Magure T, Moscicki AB, Fiander AN, Capra G, Young Ki E, Tan Y, Chen Z, Burk RD, Chan MC, Cheung TH, Pim D, Banks L, Geographical distribution and oncogenic risk association of human papillomavirus type 58 E6 and E7 sequence variations, *Int J Cancer*, 2013.

[83]: Pim D, Bergant M, Boon SS, Ganti K, Kranjec C, Massimi P, Subbaiah VK, Thomas M, Tomaić V, Banks L,]: Human papillomaviruses and the specificity of PDZ domain targeting, *FEBS J*, 2012.

[84]: Johansson C, Somberg M, Li X, Backström Winquist E, Fay J, Ryan F, Pim D, Banks L, Schwartz S, HPV-16 E2 contributes to induction of HPV-16 late gene expression by inhibiting early polyadenylation, *EMBO J*, 2012.

[85]: Narechania A, Chen Z, DeSalle R, Burk RD, Phylogenetic incongruence among oncogenic genital alpha human Papillomaviruses, *J Virol*, 2005.

[86]: Nominé Y, Masson M, Charbonnier S, Zanier K, Ristriani T, Deryckere F, et al, Structural and functional analysis of E6 oncoprotein: insights in the molecular pathways of human papillomavirus-mediated pathogenesis, *Mol Cell*, 2006.

[87]: Boulet G, Horvath C, Vanden Broeck D, Sahebali S, Bogers J, Human papillomavirus: E6 and E7 oncogenes, *Int J Biochem Cell Biol*, 2007.

[88]: Daley MF, Crane LA, Markowitz LE, Black SR, Beaty BL, Barrow J, Babbel C, Gottlieb SL, Liddon N, Stokley S, Dickinson LM, Kempe A, Human papillomavirus vaccination practices: a survey of US physicians 18 months after licensure, *Pediatrics*, 2010.

[89]: Wang TY, Chen BF, Yang YC, Chen H, Wang Y, Cviko A, Quade BJ, Sun D, Yang A, McKeon FD, Crum CP, Histologic and immunophenotypic classification of cervical carcinomas by expression of the p53 homologue p63: a study of 250 cases, *Hum Pathol*, 2001.

[90]: Florin L, Becker KA, Sapp C, Lambert C, Sirma H, Muller M, Streeck RE, Sapp M, Nuclear translocation of papillomavirus minor capsid protein L2 requires Hsc70, *J Virol*, 2004.

- [91]: Munger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M, et al, Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis, *J Virol*, 2004.
- [92]: Arias-Pulido H, Peyton CL, Joste NE, Vargas H, Wheeler CM, Human papillomavirus type 16 integration in cervical carcinoma in situ and in invasive cervical cancer, *J Clin Microbiol*, 2006.
- [93]: Peterson CE, Khosla S, Jefferson GD, Davis FG, Fitzgibbon ML, Freels S, Johnson TP, Hoskins K, Joslin CE, 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.
- [94]: Casillas A, Singhal R, Tsui J, Glenn BA, Bastani R, Mangione CM, The impact of social communication on perceived HPV vaccine effectiveness in a low-income, minority population, *Ethn Dis*. 2011.
- [95]: Bonde J, Reboji M, Ejegod DM, Preisler S, Lynge E, Rygaard C. HPV prevalence and genotype distribution in a population-based split-sample study of well-screened women using CLART HPV2 human papillomavirus genotype microarray system, *BMJ Infect Dis*, 2014.
- [96]: Heise A1, The clinical significance of HPV, *Nurse Pract*, 2003.
- [97]: Magana-Contreras M, Contreras-Paredes A, Chavez-Blanco A, Lizano M, De la Cruz-Hernandez E. Prevalence of sexually transmitted pathogens associated with HPV infection in cervical samples in a Mexican population, *J Med Virol*, 2015.
- [98]: Zur Hausen H. Oncogenic DNA viruses. *Oncogene*. 2001; 20(54):7820–7823.
- [99]: Bernard HU. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *Journal of Clinical Virology*. 2005; 32:S1–S6.
- [100]: zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: From basic studies to clinical application. *Nature Reviews Cancer*. 2002;2(5):342–350.
- [101]: Munoz N, Bosch FX, Castellsague X, Diaz M, De Sanjose S, Hammouda D, Shah KV, Meijer CJLM. Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *International Journal of Cancer*. 2004;111(2):278–285

- [102]: Eiben GL, Da Silva DM, Fausch SC, Le Poole IC, Nishimura MI, Kast WM. Cervical cancer vaccines: Recent advances in HPV research. *Viral Immunology*. 2003;16(2):111–121.
- [103]: Gonzalez-Bosquet E, Esteva C, Munoz-Almagro C, Ferrer P, Perez M, Laila JM. Identification of vaccine human papillomavirus genotypes in squamous intraepithelial lesions (CIN2-3) *Gynecologic Oncology*. 2008; 111(1):9–12.
- [104]: Rousseau MC, Villa LL, Costa MC, Abrahamowicz M, Rohan TE, Franco E. Occurrence of cervical infection with multiple human papillomavirus types is associated with age and cytologic abnormalities. *Sexually Transmitted Diseases*. 2003;30(7):581–587.
- [105]: Rousseau MC, Pereira JS, Prado JCM, Villa LL, Rohan TE, Franco EL. Cervical coinfection with human papillomavirus (HPV) types as a predictor of acquisition and persistence of HPV infection. *Journal of Infectious Diseases*. 2001;184 (12):1508–1517.
- [106]: Mendez F, Munoz N, Posso H, Molano M, Moreno V, Brule AJC van den, Ronderos M, Meijer C, Munoz A, Papillomaviru INCH. Cervical coinfection with human papillomavirus (HPV) types and possible implications for the prevention of cervical cancer by HPV vaccines. *Journal of Infectious Diseases*. 2005;192(7):1158–1165.
- [107]: Thomas KK, Hughes JP, Kuypers JM, Kiviat NB, Lee SK, Adam DE, Koutsky LA. Concurrent and sequential acquisition of different genital human papillomavirus types. *J Infect Dis*. 2000;182(4):1097–1102.
- [108]: Paavonen J, Jenkins D, Bosch FX, Naud P, Salmeron J, Wheeler CM, Chow SN, Apter DL, Kitchener HC, Castellsague X. Efficacy of a prophylactic adjuvanted bivalent L1 virus-like-particle vaccine against infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: an interim analysis of a phase III double-blind, randomised controlled trial. *Lancet*. 2007; 369(9580):2161–2170.
- [109]: Villa LL, Costa RLR, Petta CA, Andrade RP, Paavonen J, Iversen OE, Olsson SE, Hoyer J, Steinwall M, Riis-Johannessen G. High sustained efficacy of a prophylactic quadrivalent human papillomavirus types 6/11/16/18 L1 virus-like particle vaccine through 5 years of follow-up. *British Journal of Cancer*. 2006;95(11):1459–1466.

[110]: Woodman CBJ, Collins SI, Young LS. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nature Reviews Cancer*. 2007;7(1):11–22.

[111]: McNamara M, Batur P, Walsh JM, Johnson KM. HPV Update: Vaccination, Screening, and Associated Disease. *J Gen Intern Med*. 2016 Nov; 31(11):1360-1366.

[112]: Turner TB, Huh WK. HPV vaccines: Translating immunogenicity into efficacy. *Hum Vaccin Immunother*. 2016 Jun 2;12(6):1403-5.

[113]: Wang CJ, Palefsky JM. Human Papillomavirus (HPV) Infections and the Importance of HPV Vaccination. *Curr Epidemiol Rep*. 2015 Jun;2(2):101-109.

[114]: Mammas IN, Vageli D, Spandidos DA. Geographic variations of human papilloma virus infection and their possible impact on the effectiveness of the vaccination programme. *Oncol Rep*. 2008 Jul;20(1):141-5.

[115]: Argyri E, Papaspyridakos S, Tsimplaki E, Michala L, Myriokefalitaki E, Papassideri I, Daskalopoulou D, Tsiaoussi I, Magiakos G, Panotopoulou E A cross sectional study of HPV type prevalence according to age and cytology. *BMC Infect Dis*. 2013 30;13:53.

[116]: Papachristou E, Sypsa V, Paraskevis D, Gkekas A, Politi E, Nicolaidou E, Anifantis I, Psychogiou M, Tsitsika A, Hadjivassiliou M, Petrikkos G, Katsambas A, Creatsas G, Hatzakis A. Prevalence of different HPV types and estimation of prognostic risk factors based on the linear array HPV genotyping test. *J Med Virol*. 2009;81(12):2059–65.

[117]: Stamataki P, Papazafiropoulou A, Elefsiniotis I, Giannakopoulou M, Brokalaki H, Apostolopoulou E, Sarafis P, Saroglou G. Prevalence of HPV infection among Greek women attending a gynecological outpatient clinic. *BMC Infect Dis*. 2010;15:10–27.

[118]: Agorastos T, Lambropoulos AF, Sotiriadis A, Mikos T, Togaridou E, Emmanouilides CJ. Prevalence and distribution of high-risk human papillomavirus in Greece. *Eur J Cancer Prev*. 2009 ;18(6):504-9.

[119]: Donatella Panatto, Daniela Amicizia, Elisabetta Tanzi, Silvia Bianchi,² Elena Rosanna Frati,² Carla Maria Zotti,³ Piero Luigi Lai,¹ Angela Bechini,⁴ Stefania Rossi,⁵ and Roberto

Gasparini¹ Prevalence of human papillomavirus in young Italian women with normal cytology: how should we adapt the national vaccination policy? *BMC Infect Dis.* 2013; 13: 575.

[120]: de Sanjosé S, Diaz M, Castellsagué X, Clifford G, Bruni L, Munoz N, Bosch FX. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2007;13:453–459.

[121]: 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;13:1789–1799.

[122]: Mongelos P, Mendoza LP, Rodriguez-Riveros I, Castro A, Gimenez G, Araujo P, Paez M, Castro W, Basiletti J, González J, Echagüe G, Diaz V, Laspina F, Ever S, Marecos R, Deluca G, Picconi MA. Distribution of human papillomavirus (HPV) genotypes and bacterial vaginosis presence in cervical samples from Paraguayan indigenous. *Int J Infect Dis.* 2015 Oct;39:44-9.

[123] Orozco-Colin A, Carrillo-Garcia A, Méndez-Tenorio A, Ponce-de-León S, Mohar A, Maldonado-Rodríguez R, Guerra-Arias R, Flores-Gil O, Sotelo-Regil R, Lizano M. Geographical variation in human papillomavirus prevalence in Mexican women with normal cytology. *Int J Infect Dis.* 2010 ; 14(12):e1082-7.

[124]: Entiauspe LG¹, Silveira M², Nunes EM³, Basgalupp SP³, Stauffert D⁴, Dellagostin OA¹, Collares T¹, Seixas FK. High incidence of oncogenic HPV genotypes found in women from Southern Brazil. *Braz J Microbiol.* 2014 29;45(2):689-94.

[125]: Zhao FH¹, Zhu FC, Chen W, Li J, Hu YM, Hong Y, Zhang YJ, Pan QJ, Zhu JH, Zhang X, Chen Y, Tang H, Zhang H, Durand C, Datta SK, Struyf F, Bi D. Baseline prevalence. and type distribution of human papillomavirus in healthy Chinese women aged 18-25 years enrolled in a clinical trial. *Int J Cancer.* 2014; 135(11):2604-11.

[126]: Franceschi S, Herrero R, Clifford GM, Snijders PJ, Arslan A, Anh PT, Bosch FX, Ferreccio C, Hieu NT, Lazcano-Ponce E, Matos E, Molano M, Qiao YL, Rajkumar R, Ronco G, de Sanjosé S, Shin HR, Sukvirach S, Thomas JO, Meijer CJ, Muñoz N. Variations in the age-specific curves of human papillomavirus prevalence in women worldwide. *Int J Cancer.* 2006;13:2677–2684.

[127]: Mollers M, Boot Hein J, Vriend Henrike J, King Audrey J, van den Broek Ingrid VF, van Bergen Jan EA, Brink Antoinette AT, Wolffs Petra FG, Hoebe Christian JP, Meijer Chris JL, van der Sande Marianne AB, de Melker Hester E. Prevalence, incidence and persistence of genital HPV infections in a large cohort of sexually active young women in the Netherlands. *Vaccine*. 2013;13:394–401.

[128]: Howell-Jones R, Bailey A, Beddows S, Sargent A, de Silva N, Wilson G, Anton J, Nichols T, Soldan K, Kitchener H. Study Group Collaborators. Multi-site study of HPV type-specific prevalence in women with cervical cancer, intraepithelial neoplasia and normal cytology, in England. *Br J Cancer*. 2010;13:209–216.