مرور کلی بر پاپیلوما ویروس ها به عنوان اصلی ترین عامل سرطان دهانه رحم

دکتر امیر سهرابی[1*]، دکتر مرجان رهنمای فرزامی[2]، دکتر سیامک میراب سمیعی[3و4]، دکتر محمد حسین مدرسی[5]

۱. استادیار گروه بیولوژی مولکولی، مرکز تحقیقات آزمایشگاه رفرانس، آزمایشگاه مرجع سلامت وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، تهران، ایران.
۲. استادیار مرکز تحقیقات آزمایشگاه رفرانس، آزمایشگاه مرجع سلامت وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، تهران، ایران.
۳. استادیار آزمایشگاه مرجع سلامت وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، تهران، ایران.
۴. استادیار مرکز تحقیقات آزمایشگاه غذا و دارو، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، تهران، ایران.
۵. استاد گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۲/۲ **تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۴/۲/۲۰

خلاصه

مقدمه: سرطان دهانه رحم مرتبط با پاپیلوما ویروس ها به عنوان شایع ترین سرطان زنان به صورت یک معضل بهداشتی در سراسر دنیا خصوصاً در کشورهای در حال توسعه مطرح می باشد. ژنوتیپ های مختلف پاپیلوما ویروس های انسانی خصوصاً ژنوتیپ های پرخطر به عنوان عامل اصلی این سرطان و دیگر سرطان های انسانی نظیر: دستگاه تناسلی، پوست، سر و گردن و غیره مطرح هستند. مطالعه حاضر با هدف افزایش آگاهی در مورد ساختار، بیماری زایی و تشخیص پاپیلوما ویروس ها انجام شد.

روش کار: مرور مستندات در مطالعه مروری حاضر با جستجو در پایگاه های علمی معتبر خارجی و داخلی و با استفاده از کلمات کلیدی مرتبط صورت گرفت. در این مطالعه سعی شده است با استفاده از مقالات منتشر شده در این پایگاه های علمی به بررسی نقش ژنوتیپ های مختلف پاپیلوما ویروس ها در ایجاد عفونت های مختلف از جمله سرطان دهانه رحم و روش های تشخیصی موجود در جهت ژنوتایپینگ این دسته از ویروس ها پرداخته شود.

یافته ها: افزایش دانش روز افزون درباره نقش مهم و اساسی پاپیلوما ویروس ها در سرطان زایی آن ها منجر به بهبود روش های نوین تشخیصی مولکولی همراه با بیومارکرهای مولکولی در ژنوتایپینگ پاپیلوما ویروس ها خواهد شد.

نتیجه گیری: گسترش روز افزون عفونت های تناسلی، بیماری های مقاربتی و سرطان های ناشی از میکروارگانیسم ها به خصوص پاپیلوما ویروس، همکاری جوامع جهانی در انجام مطالعات جامع تر به خصوص در کشورهای در حال توسعه را می طلبد. آموزش همگانی، توسعه غربالگری کلاسیک همراه با روش های نوین تشخیصی، بهترین ابزار در تعیین خط مشی در استراتژی های درمانی و پیشگیری کننده چون واکسن بر علیه سرطان های مرتبط با پاپیلوما ویروس ها در کشورهای در حال توسعه خواهد بود.

کلمات کلیدی: پاپیلوما ویروس، سرطان دهانه رحم، ایران

* **نویسنده مسئول مکاتبات:** : دکتر امیر سهرابی؛ مرکز تحقیقات آزمایشگاه رفرانس، آزمایشگاه مرجع سلامت وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، تهران، ایران. **تلفن:** ۰۹۱۲۳۹۰۲۵۴۱؛ **پست الکترونیک:**sohrabi58@gmail.com

مقدمه

پاپیلوما ویروس های انسانی (HPVs)[1] با بیش از ۱۰۰ ژنوتیپ با انتشار جهانی در خانواده پاپیلوما ویریده[2] با ساختمان پروتئینی و ژنوم ds-DNA حلقوی و بدون پوشش قرار دارند. پاپیلوما ویروس ها عامل ایجاد کننده انواع تومورهای بدخیم و خوش خیم در پوست و مخاطات انسان می باشند. از جمله بیماری ها و سرطان های مرتبط با HPV در انسان می توان به سرطان دهانه رحم، پوست، حنجره، نواحی سر و گردن، سینه، زگیل های تناسلی، بیماری های ملتحمه چشم و مخاطات اشاره کرد. امروزه ژنوتیپ های پاپیلوما ویروس ها از نظر ایجاد سرطان به سه دسته High Risk، Low Risk و Intermediate Risk تقسیم می شوند (۱-۶). از بین عفونت ها و سرطان های مرتبط با پاپیلوما ویروس ها، HPV در ۹۹٪ موارد سرطان دهانه رحم مشاهده شده است که از میان ژنوتیپ های مختلف پاپیلوما ویروس ها، HPV 16 و HPV 18 به عنوان شایع ترین ژنوتیپ های HPV در بیش از ۷۰٪ نمونه های سرطان دهانه رحم در سراسر دنیا مشاهده شده است. سرطان دهانه رحم دومین بیماری بدخیم زنان در دنیا بوده و سالیانه حدود ۵۰۰۰۰۰ مورد بیماری جدید در جوامع مختلف گزارش شده است. بیش از ۸۰٪ مرگ های ناشی از سرطان دهانه رحم در کشورهای در حال توسعه اتفاق می افتد. علی رغم اینکه ایران نیز به عنوان یک کشور در حال توسعه در معرض گسترش این سرطان و مرگ ناشی از آن می باشد، ولی متأسفانه آمار جامعی در مورد توزیع تایپ های HPV مرتبط با سرطان دهانه رحم و مرگ و میر ناشی از آن در کشور منتشر نشده است. مطالعات اپیدمیولوژی مولکولی اخیر در برخی کشورهای دنیا نشان می دهند برخی تفاوت های ژنتیکی به صورت پلی مورفیسم ژنی، افزایش یا کاهش بیان ژن های سرکوب کننده سرطان، ژن های دخیل در سیگنال های سلولی و متیلاسیون برخی از ژن ها در جوامع مختلف به عنوان عوامل مؤثر در پیشرفت و ایجاد سرطان دهانه رحم همراه با ژنوتیپ های پاپیلوما ویروس های انسانی نقش دارند که به احتمال فراوان در آینده نه چندان دور به عنوان مارکرهای اصلی تشخیصی سرطان دهانه رحم مرتبط با ژنوتیپ های پاپیلوما ویروس های انسانی و نیز درمان استفاده خواهد شد (۷-۱۱). به نظر می رسد بهترین راه برای جلوگیری از گسترش و بروز سرطان دهانه رحم در زنان، ایجاد برنامه های غربالگری با استفاده از مارکرهای ژنتیکی، روش های تشخیصی مولکولی معتبر با حساسیت و ویژگی بالا و در نهایت پیشگیری (تهیه واکسن کارآمد با توجه به ژنوتیپ های غالب منطقه) و درمان باشد. با استناد بر اینکه پاپیلوما ویروس انسانی به راحتی در کشت سلول رشد و تکثیر نمی یابد و آنتی بادی اختصاصی بر علیه تایپ های ویروس حاوی واکنش های متقاطع است، لذا در تشخیص پاپیلوما ویروس و ژنوتایپینگ آن روش تشخیص مبتنی بر DNA و افزایش ژنوم در تشخیص مولکولی نوین مد نظر است. تشخیص، پایه و اساس درمان کارآمد است و نیاز کشور در جهت توسعه، بکارگیری و راه اندازی روش های تشخیصی نوین با حساسیت و ویژگی بالا، سریع و مقرون به صرفه برای شناسایی ژنوتیپ های شایع پرخطر در بدخیمی ها به خصوص سرطان دهانه رحم ضروری به نظر می رسد. قطعاً شناسایی و بررسی پلی مورفیسم های ژنتیکی به عنوان مارکرهای پیشگویی کننده سرطان در زنان مبتلا به سرطان دهانه رحم در برنامه ریزی، تعیین خط مشی استراتژی های درمانی و ارتقاء سطح و توسعه بهداشت و درمان کشور نقش بسزایی دارند، از این رو مطالعه حاضر با هدف بررسی و شناسایی هرچه بیشتر پاپیلوما ویروس ها به عنوان اصلی ترین عامل سرطان دهانه رحم و دیگر کارسینوماهای انسانی انجام شد.

روش کار

مرور مستندات حدود ۱۰۰ مقاله در مطالعه مروری حاضر با جستجو در پایگاه های علمی نظیر ISI, PubMed, Scopus و موتور جستجوی گوگل با استفاده از کلمات کلیدی پاپیلوماویروس، سرطان دهانه

[1] Human Papillomaviruses
[2] Papillomaviridae

رحم، بدخیمی های تناسلی و روش های تشخیص مولکولی انجام شد. حدود ۶۰ مقاله با توجه گستردگی مطالب، تکرای بودن نتایج و بحث مقالات، میزان ارتباط و شاخص های کیفی حذف گردید. با استفاده از مقالات منتشر شده سال های اخیر در پایگاه های علمی، به بررسی نقش ژنوتیپ های مختلف پاپیلوما ویروس ها در ایجاد عفونت های مختلف از جمله سرطان دهانه رحم و به خصوص روش های تشخیصی موجود در جهت ژنوتایپینگ این دسته از ویروس ها پرداخته شد.

یافته ها

HPV ها با بیش از ۱۰۰ ژنوتیپ، ویروس های بدون پوشش با DNA دو رشته ای حلقوی، باعث عفونت در سلول های اپی تلیال پوست و سطوح مخاطی می شوند. ژنوم حلقوی با اندازه تقریبی ۸ کیلو باز (Kbp) در یک پوشش پروتئینی کپسیدی متشکل از پروتئین اصلی تاخیری[1] به نام L1 و پروتئین فرعی به نـام L2 ساختار اصلی ویریون با قطر تقـریبی ۵۵ نانومتر را تشکیل می دهند (۱-۴). چندین پروتئین شناخته شده ویروسی از هفت چارچوب خواندن باز (ORF)[2] کدگذاری می شوند. پروتئین های اولیه[3] ویروسی شامل E1, E2, E4, E5, E6 and E7 می باشند. رونوشـت های نسـخه برداری شده پروتئین های اولیه ویروس در بازال و سـلول های اپی تلیال سوپرابازال در مراحل اولیه سیکل تکثیر ویروسی و کد کردن پروتئین هایی که با سلول های میزبان در جهت تکثیر و نسخه برداری ژنـوم ویروسی واکنش می دهند، یافت می شوند. در سیکل طبیعی تکثیری ویروس پروتئین های E6 و E7 به عنوان اصلی ترین ژن های سرطان زای ویروسی شناخته می شوند که نقش مهمی در ترانسفورماسیون و نامیرا کردن سلول بازی می کنند. چارچوب خواندن باز پروتئین L1، پروتئین اصلی کپسید ویروس به وزن مولکولی ۵۵ کیلو دالتون را رمزدهی می کند که مهم ترین بخش پوسته و سطح ویروس می باشد. چارچوب خواندن باز پروتئین L2، پروتئین فرعی کپسید ویروس به وزن مولکولی ۷۷ کیلو دالتون را رمزدهی می کند که درصد کمتری در توده کپسیدی دارد، ولی نقش مهمی در جای دادن ژنوم ویروسی در کپسید ویروسی را مهیا می سازد. بیـان ژن های سـاختـاری ثانـویه L1 و L2 محـدود به سـلول های اپی تلیال تمایـز یافـته ای می شود که تجمع و مونتـاژ ویروس در آنجا صورت می گیرد. ذرات شبه ویروسی (VLPs)[4] از خاصـیت تجمع خودبخودی پروتئیـن L1 تولیـد شـده است (۱-۷). ایزوله های جدا شده از پاپیلوما ویروس ها به طور معمول تیپ نامیده می شوند که این وجه تمایز بر اساس توالی ژنـوم و شمـاره ای با ترتیب اولویت کشف می باشد و اختـلافات بیش از ۱۰٪ به عنوان تیـپ و کمتر از آن را تحت ساب تایپ نامگذاری می کنند. ژن L1 حاوی ناحیه ای با توالی یکسـان در بین تایپ های مختلف HPV می باشد که از آن به عنوان آنالیز فیـلوژنتیـک و طبقه بندی استفاده می شود (۶، ۸).

آخرین آنالیز فیلوژنتیـک و طبقه بندیHPV منتشر شـده بر اساس ناحیه L1 پاپیـلوما ویـروس ها حاکی از شناسایی حدوداً ۱۷۰ ژنوتیـپ از HPV دارد (۸).

ساختار ژنوم و عملکرد پروتئین های ویروسی

پاپیلوما ویروس های انسانی با ژنوم DNA دو رشته ای با اتصال از دو انتها به صورت حلقوی که همراه با هیسـتون های سـلولی به صورت مینی کرومـوزوم در می آیند. تمام اطلاعات مربوط به رمزگذاری و ORF ها بر روی یکی از دو رشته DNA قرار دارند. ORF های پاپیلوما ویروس ها بر اساس موقعیتی که بر روی ژنوم ویروس دارند به دو گروه اولیه (E) و تأخیری (L) تقسیم می شوند. یک ناحیه در ژنوم پاپیلوما ویروس ها وجود دارد که فاقد توانایی کد کننـدگی است و به ناحیه کنترل کننده طولانی (LCR)[5] معروف است و از آن به عنوان منشأ همانندسازی ویروس یاد می شود. ناحیه LCR از نظر موقعیت نوکلئوتیدی در تیپ های مختلف پاپیلوما ویروس ها متفاوت است و دارای عناصر

[1] Late Protein
[2] Open Reading Frame
[3] Early Protein
[4] Virus-Like Particles
[5] Long Control Region

رونویسی و مجموعه ای از موقعیت های اتصال به فاکتورهای نسخه برداری سلولی و پروتئین های ویروسی E1 و E2 می باشد. پاپیلوما ویروس های انسانی، ۸ پروتئین مختلف اولیه و تاخیری را کد می کنند (۶، ۹). پروتئین E1 یک فسفو پروتئین هسته ای است که همراه با پروتئین E2 با تمایل بیشتر به منشأ همانند سازی متصل می شود. E1 برای مرحله شروع و طویل سازی ویروس با واکنش با پروتئین های سلولی مانند زیر واحد DNA P180 پلی مراز α پرایماز نیز واکنش می دهد. E1 همچنین نقش بسیار مهمی در حفظ اپی زومال ژنوم ویروس دارد. پروتئین E2 نقش مهمی در تنظیم کنندگی نسخه برداری و همانند سازی ژنوم ویروس دارد. پروتئین E4 با اینکه از ناحیه Early کد می شود، ولی با پروتئین های تأخیری بیان شده و باعث فروپاشی اسکلت سلولی می شود و نقش بسزایی در رها شدن ویروس از سلول های آلوده دارد. ناحیه ای که E4 از آن کد می شود دارای بیشترین تنوع در بین ژنوتیپ های مختلف پاپیلوما ویروس هاست. پروتئین E5، هیدروفوب، کوچک (با ۴۴ اسید آمینه) و بالقوه انکوژن است. E5 به صورت پروتئین سراسری در داخل غشا سلول آلوده جایگزین می شود و گیرنده اختصاصی فاکتور رشد و فاکتور رشد مشتق از پلاکت (PDGF)[1] را فعال می کند. این فاکتور در غیاب سایر انکوژن های ویروسی سلول های فیبروبلاست را ترانسفرم می کند. پروتئین E6 با ۱۵۰ اسید آمینه، یک پروتئین هسته ای است که بعد از ساخته شدن در سیتوپلاسم به وسیله توالی (NLS)[2] به درون هسته منتقل می شود. E6 یک پروتئین ترانسفورم کننده است که با اتصال به پروتئین سرکوب کننده تومور P53، باعث از بین رفتن آن می شود. همچنین E6 به تعدادی از پروتئین های سلولی نظیر پاکسیلین، AP-1, hDLG, Bak, CBP/300 متصل می شود. پروتئین E7 با پروتئین های سلولی با عملکرد مهاری بر روی تومور و کنترل کننده های فاکتور نسخه برداری E2F که شامل pRb و پروتئین وابسته p130،p107 هستند، متصل می شوند. اتصال E7 با pRb، فاکتور E2F را از کمپلکس غیر فعال pRb-E2F رها می کند که باعث پیشروی سلول به فاز تکثیری S می شود. این پروتئین به تنهایی توانایی ترانسفورماسیون سلولی را دارد (۶، ۱۱-۹). کپسید پاپیلوما ویروس ها از دو پروتئین تأخیری به نام های L1 و L2 تشکیل شده است که ژنوم ویروسی را در برمی گیرند. پروتئین L1 به صورت خود تجمعی و به شکل ذرات شبه ویروسی با پنتامرهای ۷۲ تایی و عفونی شکل می گیرند. این ذرات شبه ویروسی (VLP) باعث القاء سیستم ایمنی و تولید آنتی بادی خنثی کننده در برابر عفونت میزبان می شود. امروزه از این ذرات به عنوان بهترین کاندید برای تهیه واکسن پیشگیری کننده یاد می شود. پروتئین دیگر کپسید L2 نام دارد که در تجمع کپسید ویروس نقش اساسی دارد و دارای اپی توپ های خنثی کننده می باشد. احتمالاً پروتئین L2 در واکسن می تواند باعث پیشگیری از ژنوتیپ های مختلف ویروس و القاء واکنش متقاطع شود (۱۲).

اتصال و تکثیر ویروس

با اتصال ویریون به گیرنده سلولی، اولین عفونت ویروسی شکل می گیرد. پاپیلوما ویروس ها به انواع مختلفی از سلول ها نظیر: سلول های اپی تلیال سنگفرشی و مزانشیمال، کراتینو سایت ها و غیره به واسطه گیرنده های سلولی اینتگرینی خصوصاً α6β4 از طریق فاگوزوم (آندوسیتوز) با واسطه گیرنده وابسته به نواحی کلاترینه و از هم گسیختگی ویریون در سیتوپلاسم با نقش محوری میکروفیلامنت ها و میکروتوبول ها به داخل سلول راه می یابند. احتمالاً پروتئین L2 در انتقال ژنوم ویروس به هسته نقش اساسی را ایفا می کند (۶، ۱۳).

نسخه برداری از ژنوم ویروس

به دلیل وجود چندین پروموتر جهت الگوهای چندگانه پیرایش برای تولید mRNA های مختلف، نسخه برداری از ژنوم پاپیلوما ویروس ها کمی پیچیده است. شش پروموتر در رونویس ژن های اولیه یا Early و

[1] Platelet Derived Growth Factor
[2] Nuclear Localization Signal

یک پروموتر مربوط به ژن های تأخیری است. در پاپیلوما ویروس ها یک پروموتر قبل از هر ORF وجود دارد و در سلول های آلوده بیش از ۲۰ گونه مختلف mRNA شناسایی شده است. در پاپیلوما ویروس ها سیگنال Poly A باعث پایان نسخه برداری از ژن های تأخیری و سیگنال AE باعث اختتام در ژن های اولیه می شود. پاپیلوما ویروس های پرخطر (HR)[1] و کم خطر (LR)[2] از لحاظ مکانیسم بیان ژن های E6 و E7 با هم تفاوت دارند. HPV های کم خطر مانند تیپ های ۶ و ۱۱ در داخل ORF ژن E6 خود اینترون ندارند و تنها یک پروتئین E6 را بیان می کنند و تفاوت دیگر اینکه E6, E7 ORF از دو پروموتر مختلف رونویسی می شوند، در حالیکه برای HPV های پرخطر از یک پروموتر رونویسی صورت می گیرد. در HPV های پرخطر مانند تیپ های ۱۶ و ۱۸ پروتئین E6 کامل و پروتئین های کوتاه شده*E6 به نام های E6*I و E6*II را با پیرایش روی E6 ORF ایجاد می کنند. همچنین وجود دومینی به نام PDZ و یک سری از موتاسیون ها در ژنوم HPV از اختلافات دیگر ژنوتیپ های HR و LR می باشد. اصولاً پروتئین های تأخیری در سلول های تمایز یافته نظیر کراتینوسایت ها بیان می شوند. تکثیر DNA ویروس، مجتمع شدن و آزاد شدن ذرات ویروس محدود به این سلول هاست (۶، ۷، ۹).

همانندسازی DNA ویروس

همانندسازی اولیه DNA در سلول بازال روی می دهد که ژنوم ویروسی حدود ۵۰ تا ۱۰۰ کپی تولید می کند. مرحله دوم همانند سازی، مرحله بقاست که در سلول های بازال در حال تقسیم در بخش های پایین تر اپیدرم رخ می دهد. در این سلول ها DNA ویروسی به شکل پلاسمید به صورت چند کپی پایدار باقی می ماند. این ژنوم های پلاسمیدی به طور متوسط در یک چرخه سلولی در فاز S همزمان با کروموزوم میزبان تکثیر می یابند. این نوع از تکثیر DNA یک عفونت پایدار یا نهفته را در سلول های بازال اپیدرم فراهم می آورند. در این نوع تکثیر همانند سازی به صورت زایا و در سلول های تمایز یافته مشاهده می شود. در این نوع سلول ها سنتز DNA به صورت موقتی و ناگهانی شروع می شود و ژنوم های ویروس در داخل کپسید بسته بندی می شوند. DNA ویروسی جهت تکثیر به منشأ همانند سازی که بر روی DNA قرار دارد نیاز دارد. پروتئین های ویروسی مانند E1 و E2 به صورت ترانس به منشأ همانند سازی متصل می شوند. این دو با تشکیل مجموعه ای باعث خمیدگی در ناحیه منشأ شده و با استفاده از خاصیت هلیکازی پروتئین E1، دو رشته DNA از هم باز می شوند و آنزیم های لازم جهت همانند سازی به محل متصل شده و همانند سازی شکل می گیرد (۱۳).

جایگزینی ژنوم پاپیلوما ویروس در کروموزوم انسان

در ضایعات تناسلی اولیه، DNA پاپیلوما ویروس ها بیشتر به شکل اپی زومال وجود دارند، در حالی که در سلول های سرطانی و تومورهای بدخیم، DNA ویروسی اینتگره شده به صورت نوترکیبی غیر همولوگ باعث شروع ترانسفورماسیون سلول و پیشرفت به سمت بدخیمی می شود. اینتگره شدن باعث پایداری و بیان بیشتر پروتئین های ویروسی E6 و E7 شده و باعث حذف ORF های E1 و E2 به عنوان حذف اثر مهاری آن ها می شود (۱۴).

اپی ژنتیک

وراژنتیک[3] دگرگونی های وراثتی در فنوتیپ یاخته که علت پیدایش آن ها چیزی غیر از دگرگونی های پدید آمده در DNA است، را بررسی می‌کند. فراژنتیک به آرایش و پیرایش ژنوم، نه به چیدمان نوکلئوتیدها ربط دارد. متیله شدن و پیرایش هیستون نمونه هایی از این دگرگونی های فراژنتیکی هستند که هر دوی آن ها در تنظیم بیان ژن، بی آنکه در چیدمان ژن تغییر پدید آورند، نقش دارند. متیلاسیون DNA یک فرآیند بیوشیمیایی است که در رشد و نمو عادی موجودات دارای اهمیت می‌باشد. در این فرآیند، یک

[1] High-Risk
[2] Low-Rik
[3] Epigenetics

گروه متیل به موقعیت ′۵ حلقه پیریمیدین سیتوزین یا به نیتروژن شماره ۶ حلقه پورین آدنین در نواحیCpG اضافه می‌شود. این تغییرات می‌تواند از طریق تقسیمات سلولی به ارث برسند و به نسل بعد منتقل شوند. متیلاسیون DNA به وسیله DNA متیل ترانسفرازهای DNMT1, DNMT3A and DNMT3B کاتالیز می شوند. ویروس های سرطان زا نظیر HCV، HBV، EBV و HHV8 منجر به فعال سازی و سرکوب سازی ژن های ویروسی و سلولی می شوند. انکو پروتئین های E6 و E7 پاپیلوما ویروس ۱۶ باعث افزایش بیان و فعالیت DNMT1 می شود. این در حالی است که انکوپروتئین های مذکور با خاصیت سرکوب کنندگی p53 و تخریب مسیر pRB/E2F باعث تنظیم پروموتر DNMT1 می شوند. البته مکانیسم اثر پاپیلوما ویروس های سرطان زا در ایجاد متیلاسیون هنوز به طور واضح مشخص نیست. همچنین تا به امروز بیومارکرهای قطعی و اختصاصی در سرطان های مرتبط با پاپیلوما ویروس ها به دست نیامده است و فقط از چند ژن متیلاسیون یافته آن هم در چند مطالعه، از آن ها به عنوان بیومارکر احتمالی یاد شده است (۲، ۱۵، ۱۶). با گسترش روزافزون روش های نوین تشخیص مولکولی، استفاده از ژن های متیله شده و موتاسیون یافته و شناسایی آن ها در مراحل اولیه عفونت و سرطان، از آن ها به عنوان بیومارکرهای تشخیصی و پیشگویی کننده یاد می شود و مطالعات وسیعی در سراسر دنیا در حال انجام است (۲، ۱۷-۱۹).

بیماری زایی

انسان به عنوان میزبان طبیعی HPV شناخته شده است و انتقال عفونت اغلب از طریق تماس پوستی و حتی وسایل شخصی آلوده نیز رخ می دهد. عفونت پس از تلقیح ذرات ویروسی به پوست و مخاط حاصل می شود که در پوست به آن زگیل[1] و در مخاط به آن کوندیلوما[2] گویند. دوره کمون بیماری بین ۳ تا ۱۸ ماه متغیر است. ابتدا ویروس سلول های اپی تلیومی را آلوده می کنند و سپس سلول های بازال اپیدرم، هدف دیگر ویروس برای ایجاد عفونت هستند. ویروس از طریق خراش ها خود را به سلول های بازال رسانده و پس از حفظ ژنوم ویروس به شکل اپی زومال، ژن های ویروس بیان می شوند. سپس ویروس همزمان با تمایز سلولی به لایه های بالایی می رسد و در سلول های کراتینوسایت آزاد می شود. حضور ویروس در لایه های اپیدرم ضایعاتی مانند پاراکراتوز[3]، کویلوسیتوز[4] و پاپیلوماتوز[5] را ایجاد می کند. پاپیلوما ویروس ها طیف وسیعی از تظاهرات بالینی را در پوست، مجاری تناسلی، مخاط دهان، حلق و حنجره، نای، مجاری بینی، نواحی سر و گردن، مری به صورت ضایعات و عفونت های خود محدود شونده و مخاطره انگیز ایجاد می کنند (۶، ۱۴، ۲۰).

ضایعات خوش خیم

عفونت های پوستی غیر تناسلی

امروزه با بکارگیری روش های تشخیصی با حساسیت بالا، وجود HPV در پوست سالم به صورت شایع و ماندگار به اثبات رسیده است. به نظر می رسد ماندگاری عفونت HPV در نواحی پوستی غیر تناسلی به سن، جنس، درمان با سرکوب کننده های سیستم ایمنی و یا سابقه زگیل مربوط نمی شود. تظاهرات بالینی این ضایعات مشخص و واضح هستند و در بیشتر موارد بدون انجام تست آزمایشگاهی و صرفاً با معاینه قابل تشخیص هستند و غالباً انجام تست های تشخیصی HPV در اینگونه ضایعات در جهت انجام مطالعات اپیدمیولوژیک و دیگر اهداف تحقیقاتی صورت می پذیرد. HPV عامل زگیل های خوش خیم به صورت مسطح، سفت بدون خارش روی پوست می شود.HPV های ۱، ۲ و ۴ اغلب باعث عفونت در دست ها و پاها می شوند. زگیل های پوستی به استثنا آن هایی که رشد زیادی دارند، دردناک نیستند. پاپیلوما ویروس ۳ و ۷ باعث verrucae planae مسطح و به رنگ پوست در صورت، دست ها و ساعد می شوند.

[1] Wart
[2] Condyloma
[3] Parakeratosis
[4] Koilocytosis
[5] Papillomatosis

زگیل های Periungal بر روی ناخن دردناک هستند. HPV 7 معمولاً باعث زگیل های شغلی خصوصاً در قصاب ها به نام Butchers Wart می شوند (۱۴، ۲۰).

عفونت های تناسلی

یکی از شایع ترین عفونت های منتقله از طریق تماس جنسی هستند. اغلب بدون علامت و یا به صورت ضایعات چندگانه برجسته، گوشتی و به رنگ قهوه ای مشاهده می شود. HPV های ۶ و ۱۱، شایع ترین عوامل ایجاد کننده زگیل های قابل مشاهده در نواحی مقعدی - تناسلی هستند. انواع دیگری که به طور معمول در پوست غیر نواحی تناسلی یافت می شوند، نیز قادر به ایجاد عفونت در نواحی مقعدی - تناسلی با ضایعات واضح هستند (۱۴، ۲۰).

عفونت های دهانی

موکوس دهانی یکی از نواحی حساس به عفونت پاپیلوما ویروس است. اگرچه عفونت حنجره با HPV نادر است، ولی بیماری بسیار شدیدی را ایجاد می کند. HPV های ۶ و ۱۱، شایع ترین عوامل اینگونه عفونت ها در سنین کودکی و بزرگسالی هستند. عفونت و ضایعات ممکن است به سمت لب ها، ریه ها، نای، بینی و حفرات دهانی گسترش یابد. گرفتی صدا، بیماری نادر Heck از دیگر عفونت مرتبط به عفونت های دهانی ناشی از HPV است (۱۴، ۲۰).

ضایعات بدخیم

فرضیه ایجاد سرطان دهانه رحم توسط پاپیلوما ویروس ها از میانه دهه ۱۹۷۰ میلادی شکل گرفت. امروزه با گذشت ۴۰ سال از این فرضیه، پاپیلوما ویروس ها به عنوان اصلی ترین عامل در ایجاد سرطان دهانه رحم و دیگر سرطان های مرتبط در انسان شناخته می شوند (۱۴، ۲۰).

اپیدرمو پلازی[1] وروسی فورمیس(EV)

این بیماری به عنوان یک عفونت پوستی مزمن ژنتیکی قابل توارث (موتاسیون در ژن های EVER1 و EVER2) با زگیل های مسطح منتشر بروز می کند. نیمی از بیماران که در معرض تابش اشعه نور خورشید قرار می گیرند، به سرطان سلول سنگفرشی پوست (SCC[2]) مبتلا می شوند. پاپیلوما ویروس های ۵، ۸، ۹، ۱۲، ۱۴، ۱۵، ۱۷، ۱۹، ۲۵، ۳۶، ۳۸، ۴۷ و ۵۰ در کنار موتاسیون های ژنتیکی از شایع ترین عوامل ایجاد کننده این بیماری هستند (۱۴، ۲۰).

سرطان های پوستی غیر ملانومایی

در سال های اخیر، فاکتورهای محیطی و فردی همراه با پاپیلوما ویروس های گروه بتا از شایع ترین عوامل ایجاد کننده سرطان سلول سنگفرشی و بازال پوست[3] محسوب می شوند (۱۴، ۲۰).

سرطان واژن

یکی از سرطان های غیر شایع با میزان بروز ۰/۷-۰/۳ در هر ۱۰۰ هزار زن در سراسر دنیا محسوب می شود. البته اطلاعات جامعی در مورد ارتباط مستقیم پاپیلوما ویروس ها و ایجاد این سرطان در دسترس نیست. ولی در بیشتر موارد سرطان واژن، HPV های ۱۶، ۳۱ و ۳۳ به عنوان ژنوتیپ های شایع شناسایی می شوند (۱۴، ۲۰).

سرطان مقعد

این سرطان را با توجه به بروز علائم و تومور در ناحیه حاشیه مقعد و کانال مقعدی به عنوان سرطان های پوستی دسته بندی می کنند. بنابراین با توجه به درگیری نواحی مقعد، این سرطان ها به صورت سرطان سلول سنگفرشی، آدنوکارسینوما، Basaloid و Cloacogenic Carcinoma تظاهر می یابند. سرطان مقعد ناشی از پاپیلوما ویروس ها خصوصاً HPV 16 بیشتر در مردان همجنس باز، بیماران ایدزی، سیگاری ها و مقاربت از طریق مقعد با شریک های جنسی متعدد رخ می دهد (۱۴، ۲۰).

سرطان آلت تناسلی مردانه

بروز این سرطان در مردان کمتر از ۰/۵٪ سرطان های مردان در سراسر دنیا است. HPV های ۱۶ و ۱۸ را در

[1] Epidermodysplasia verruciformis

[2] Squamous Cell Carcinoma

[3] Basal Cell & Squamous Cell Carcinoma

بیشتر از ۵۰-۴۰٪ اینگونه سرطان ها شناسایی و جداسازی کردند (۱۴، ۲۰).

سرطان اوروفارنکس

امروزه میزان شیوع و بروز افزایشی از سرطان سلول سنگفرشی اوروفارنکس مرتبط با پاپیلوما ویروس ها خصوصاً در مناطق جغرافیایی خاص و در افراد با سکس دهانی مشاهده می شود (۱۴، ۲۰).

سرطان دهانه رحم

در میان سرطان ها، سرطان دهانه رحم تقریباً با قطعیت بیشتری با پاپیلوما ویروس ها مرتبط است. در سال ۲۰۰۸، سالیانه ۵۳۰ هزار مورد جدید سرطان دهانه رحم و ۲۷۵ هزار مرگ در سراسر دنیا اتفاق افتاده است و به ترتیب بروز استاندارد شده سنی و مرگ ناشی از این سرطان ۸ و ۱۵ مورد در هر ۱۰۰ هزار جمعیت جهانی بود. سرطان دهانه رحم به عنوان سومین و در برخی منابع، دومین سرطان شایع در زنان بعد از سرطان سینه و کولورکتال شناخته شده است. بروز این سرطان با توجه به منطقه جغرافیایی و برنامه اجرایی غربالگری در کشورها متفاوت است. بیشتر سرطان ها در منطقه مستعد ترانسفورماسیون گردن رحم اتفاق می افتند که در آنجا سلول های استوانه ای سرویکس داخلی با سلول های سنگفرشی سرویکس خارجی به هم می رسند. در حدود ۸۵٪ از موارد سرطان سرویکس، سرطان سلول های سنگفرشی است. این سرطان بعد از یک دوره طولانی مدت شکل می گیرد. شدت ضایعات به وسیله درجه ای که سلول های اپی تلیوم سنگفرشی با سلول های شبه بازال جایگزین می شوند، تعریف و تعیین می شوند. در تقسیم بندی بافت شناسی به صورت CIN I, II, III & IV[1] تحت عنوان دیسپلازی[2] با درجه بندی های مختلف تا به صورت غیر تهاجمی[3] تدوین شده است. بیشتر دیسپلازی ها پیشرفت نمی کنند و به صورت خود به خود از بین می روند. اگرچه در برخی موارد دیسپلازی پیشرونده به سرعت و بدون گذشتن از مراحل اولیه به وجود می آیند. بطور کلی پایین ترین میزان بروز این بیماری در استرالیا، نیوزلند، آمریکای شمالی و اروپای غربی است، در حالی که در آفریقا، آسیای مرکزی-جنوبی و آمریکای جنوبی از بروز و شیوع بالایی برخوردار است (۲۰-۲۴).

روش های تشخیصی پاپیلوما ویروس ها

با توجه به چرخه تکثیر خاص پاپیلوما ویروس ها و کامل شدن ویروس در سلول های تمایز یافته، جداسازی ویروس از نمونه های بالینی دشوار است. رشد HPV در کشت سلول به سختی انجام می پذیرد و فقط در سلول های خاص کراتینوسایت و شرایط خاص سلولی صورت می گیرد. HPV با فرار از سیستم ایمنی و انتشار ویروس بدون لیز سلولی در مراحل اولیه، در نتیجه التهاب و دیگر وقایع ایمنی به طور کامل شکل نمی گیرد. بر این اساس تشخیص پاپیلوما ویروس مبتنی بر روش های سرولوژی نیز با مشکلاتی نظیر واکنش های متقاطع همراه است. روش های کلاسیک سیتولوژی- پاتولوژی نظیر Pap Test ها به منظور بررسی تغییرات سلول های دهانه رحم ناشی از عفونت پاپیلوما ویروس ها و دیگر عوامل به کار می رود. اما امروزه به دلیل مشاهده نتایج منفی کاذب ناشی از تهیه نمونه و خطاهای میکروسکوپی به عنوان روش های تشخیصی ارجح مطرح نیستند و بهتر است از این روش ها صرفاً جهت غربالگری اولیه و درجه بندی سرطان ها استفاده شود. امروزه روش های تشخیص HPV مبتنی بر شناسایی نوکلیک اسید ویروس گسترش یافته است (۲۵، ۲۶). سازمان غذا و دارو آمریکا (FDA[4]) به عنوان معتبرترین نهاد تأیید کننده کیت های تشخیصی در دنیا معدود روش هایی را جهت تشخیص، شناسایی و ژنوتایپینگ HPV در دنیا معرفی کرده است که این فناوری های تجاری شامل Digene Hybrid Capture 2 High-Risk HPV DNA Test, Cervista™ HPV HR and Genfind™ DNA Extraction Kit, Cervista™ HPV 16/18, Cobas HPV Test and APTIMA® HPV می باشند. افتراق ما بین ژنوتیپ های پرخطر از کم خطر پاپیلوما ویروس ها در نمونه های بالینی از مهم ترین چالش های موجود در

[1] Cervical Intraepithelial Neoplasia
[2] Dysplasia
[3] In situ Carcinoma
[4] Food and Drug Administration (FDA)

آزمایشگاه های تشخیص مولکولی در دنیا و خصوصاً در کشورهای در حال توسعه می باشد. در ایران نیز به دلیل شرایط سیاسی- اقتصادی نظیر تحریم ها، در دسترس نبودن برخی تکنولوژی های برتر در این زمینه مشکلات تشخیصی وجود دارد.

روش های تشخیصی و ژنوتایپینگ HPV را می توان به سه گروه کلی ذیل تقسیم بندی کرد: ۱- روش های تکثیر ژنوم نظیر: PCR، Real Time PCR، PCR-RFLP، ۲- روش های تشخیصی هیبریدیزاسیون نظیر: Southern Blot، In Situ Hybridization، Dot Blot Hybridization و ۳- روش های Signal Amplification نظیر: HPV Cervista®، Hybrid Capture® 2 (HC2). تمامی روش های تشخیصی دارای مزایا و معایبی هستند، ولی روش های نوین مولکولی از حساسیت و اختصاصیت بالاتری در شناسایی و ژنوتایپینگ HPV برخوردارند. این کیت ها قادرند تقریباً حداقل ۳۰ کپی از میزان ویروس را در نمونه های بالینی تشخیص دهند (۱، ۲۷-۳۴).

درمـــان

واکسن های پیشـــگیری کننده

امروزه دو واکسن به نام های Gardasil® (Merck©) و Cervarix® (Glaxo Smith Kline©) در بالین عرضه شده و در بیشتر کشورهای توسعه یافته و با توجه به دستورالعمل های بین المللی در جمعیت های خاص مورد استفاده قرار می گیرد. جداول ذیل خصوصیات کلی این دو واکسن و راهنمای واکسیناسیون را به طور خلاصه نشان می دهد. البته امروزه دانشمندان در پی ساخت، تولید و عرضه واکسن های جدیدتری با پاسخ ایمنی وسیع تری نسبت به ژنوتیپ های مختلف HPV هستند (۳۵-۳۷).

Characteristics of HPV VLP vaccines.

	Gardasil®	Cervarix®
Manufacturer	Merck	GlaxoSmithKline
VLP Types	6/11/16/18	16/18
Dose of L1 Protein	20/40/40/20 µg	20/20 µg
Producer Cells	*Saccharomyces cerevisiae* (baker's yeast) expressing L1	*Trichoplusia ni* (Hi 5) insect cell line infected with L1 recombinant baculovirus
Adjuvant	225 µg aluminum hydroxyphosphate sulfate	500 µg aluminum hydroxide, 50 µg 3-O-deacylated-4′-monophosphoryl lipid A
Injection Schedule	0, 2, 6 months	0, 1, 6 months

Gardasil® (Merck & Co., Whitehouse Station, NJ USA).
Cervarix® (GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensart, Belgium).
HPV: human papillomavirus; VLP: virus-like particle.

تصـویـر ۱- خصوصیات کلی واکسن های Cervarix® و Gardasil® (۳۵).

سایر روش های درمانی

در حال حاضر داروی کاملاً مؤثر ضد پاپیلوما ویروس و ضایعات ناشی از HPV در دسترس نمی باشد، ولی داروهایی در موارد بالینی در حال مطالعه است. بیشتر درمان های موجود بر اساس برداشت، تخریب بافت های آلوده و ضایعات ناشی از پاپیلوما ویروس هاست. البته بیشتر تغییرات و تخریب ناشی از HPV در بافت و سلول های عفونت یافته، حداکثر در مدت ۳۶ ماه توسط سیستم ایمنی بهبود می یابد. البته عود نیز در بسیاری از موارد عفونت ها و زگیل های ایجاد شده منتشر و وجود ویروس های نهفته در بافت ها نیز مشاهده می شود. از کرایودرمانی، لیزردرمانی، پرتودرمانی، جراحی و استفاده از موادی همچون اسید سیالیک، پودوفیلین، بازدارنده های سنتز DNA سلول

(۵-فلورویوراسیل)[1] و DNA ویروس (سیدوفوویر)[2] و اینترفرون α[3] به عنوان درمان ناشی از عفونت های پاپیلوما ویروس ها استفاده می شود (۳۷-۴۰).

بحث

بروز موارد سالیانه سرطان دهانه رحم در سراسر دنیا بیش از ۴۵۰ هزار مورد است. اگرچه میزان مرگ و میر در طی ۳۰ سال گذشته رو به کاهش بوده است، ولی تقریباً ۲۰۰ هزار مرگ ناشی از سرطان دهانه رحم در هر سال اتفاق می افتد. سالانه در آمریکا، بیش از ۱۲ هزار مورد جدید سرطان دهانه رحم تشخیص داده می شود و ۴۰۰۰ مرگ ناشی از این بیماری است. پاپیلوما ویروس انسانی قطعاً به عنوان عامل اصلی ایجاد کننده بدخیمی های رحم و سرطان پیشرونده رحم تلقی می شود (۲۱، ۴۱-۴۳). غربالگری سرطان دهانه رحم از طریق سیتولوژی و آزمایش HPV به طور مستقیم نقش بسزایی در تشخیص اولیه اختلالات دهانه رحم و کاهش مرگ و میر ناشی از آن دارد. روش های مختلف تشخیصی برای اجرای برنامه های غربالگری در دسترس است و در این راستا دستورالعمل های اجرایی تشخیصی در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه بر اساس پروتکل های تأیید شده از طرف سازمان غذا و دارو آمریکا و دیگر سازمان های مسئول برای روش های تشخیصی وجود دارند. از آنجایی که بیش از ۸۰٪ مرگ های ناشی از سرطان دهانه رحم در کشورهای در حال توسعه اتفاق می افتد (۱، ۴۱) و ایران نیز به عنوان یک کشور در حال توسعه در معرض گسترش این سرطان و مرگ و میر ناشی از آن می باشد، ولی متأسفانه مطالعات اپیدمیولوژی مولکولی هدف داری در ایران صورت نگرفته است و آمار جامعی در مورد توزیع تایپ های HPV مرتبط با سرطان دهانه رحم و مرگ و میر ناشی از آن در کشور از طرف وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی منتشر نشده است. از طرفی مطالعات اپیدمیولوژی مولکولی اخیر در کشورهای دنیا نشان می دهند برخی تفاوت های ژنتیکی به صورت پلی مورفیسم ژنی، افزایش یا کاهش بیان ژن های سرکوب کننده سرطان، ژن های دخیل در سیگنال های سلولی و متیلاسیون برخی ژن ها در جوامع مختلف به عنوان عوامل مؤثر در پیشرفت و ایجاد سرطان دهانه رحم همراه با ژنوتیپ های پاپیلوما ویروس های انسانی نقش دارند، که از این پلی مورفیسم ها و متیلاسیون ژن ها در آینده نه چندان دور می توان به عنوان مارکرهای اصلی تشخیصی سرطان دهانه رحم مرتبط با ژنوتیپ های پاپیلوما ویروس های انسانی و نیز درمان استفاده کرد (۴۴-۴۷).

نتیجه گیری

به نظر می رسد بهترین راه برای جلوگیری از گسترش و بروز سرطان دهانه رحم در زنان، ایجاد برنامه های غربالگری با استفاده از مارکرهای ژنتیکی، روش های تشخیصی مولکولی معتبر با حساسیت و ویژگی بالا و در نهایت پیشگیری (تهیه واکسن کارآمد با توجه به ژنوتیپ های غالب منطقه) و درمان باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله مروری منتج از مطالعات انجام شده مرتبط با پایان نامه دکترای تخصصی (PhD) مصوب با شماره ثبت ۲۹ در دانشکده فناوری های نوین پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران و با حمایت های مالی آزمایشگاه مرجع سلامت وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی می باشد. بدین وسیله از تمام افرادی که ما را در انجام این مطالعه یاری کردند، تشکر و قدردانی می شود.

[1] Fluorouracil
[2] Cidofovir
[3] Interferon Alfa

منابع

1. Sohrabi A, Mirab-Samiee S, Modarresi MH, Izadimood N, Azadmanesh K, Rahnamaye-Farzami M. Development of In-House Multiplex Real Time PCR for Human Papillomavirus Genotyping in Iranian Women with Cervical Cancer and Cervical Intraepithelial Neoplasia. Asian Pac J Cancer Prev 2014;15(15):6257-6261.
2. Sohrabi A, Mirab-Samiee S, Rahnamaye-Farzami M, Rafizadeh M, Akhavan S, Hashemi-Bahremani M, et al. C13orf18 And C1orf166 (MULAN) DNA Genes Methylation Are Not Associated with Cervical Cancer and Precancerous Lesions of Human Papillomavirus Genotypes In Iranian Women. Asian Pac J Cancer Prev 2014;15(16):6745-6748.
3. Keshe MM, Kaffashi A, Bagheri Gh, Shahkarami MK, Mohammadi M, Nadji SA. [Identification of Human Papillomavirus Type 16 among Thinprep Samples from 11 Provinces of Iran][Article in Persian]. IJOGI 2013; 16(72): 22-28.
4. Shayanfar N, Hosseini N, Panahi M, Azadmanesh K, Mohammadpour M, Kadivar M, et al. Detection of Mucosal Type Human Papillomavirus in Cutaneous Squamous Cell Carcinoma in Iran. Pathol Res Pract 2013; 209: 90-94.
5. Shayanfar N, Babaheidarian P, Rahmani H, Azadmanesh K, Sohrabi A, Mohammadpour M, et al. Epidermodysplasia Verruciformis Associated with Plasmablastic Lymphoma and Hepatitis B Virus Infection. Acta Dermatovenerol Croat 2012; 20(4):267-271.
6. Teimori-Azadbakht AA, Soleimanjahi H, Fotouhi F. Isolation, Cloning and Expression of Human Papillomavirus 16 L1 Protein [Doctorate Thesis]. Iran. Medical Sciences School of Tarbiat Modarres University; 2008 (Persian).
7. Miller DL, Puricelli MD, Stack MS. Virology and Molecular Pathogenesis of HPV (Human Papillomavirus)-Associated Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. Biochem J 2012; 443(2): 339-53.
8. de Villiers EM. Cross-Roads in The Classification of Papillomaviruses. Virology 2013;445: 2-10 .
9. Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, et al. The Biology and Life-Cycle Of Human Papillomaviruses. Vaccine 2012; 30S:55-70.
10. Stanley MA. Epithelial Cell Responses to Infection with Human Papillomavirus. Clin Microbiol Rev 2012; 25(2): 215-22.
11. Burd EM. Human Papillomavirus and Cervical Cancer. Clin Microbiol Rev 2003; 16(1): 1-17.
12. Arbyn M, Dillner J. Review of current knowledge on HPV vaccination: an appendix to the European Guidelines for Quality Assurance in Cervical Cancer Screening. J Clin Virol 2007; 38(3):189-97.
13. Ustav M, Ustav E, Szymanski P, Stenlund A. Identification of The Origin of Replication of Bovine Papillomavirus and Characterization of The Viral Origin Recognition Factor E1. EMBO J 1991; 10(13):4321-4329.
14. Lowey DR, Howley PM, editors. Fields Virology. Vol 2, 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins 2007.p. 2231-2264.
15. Laird PW. Cancer Epigenetics. Hum Mol Genet 2005; 14(1):65-76 .
16. Leonard SM, Wei W, Collins SI, Pereira M, Diyaf A, Constandinou-Williams C, et al. Oncogenic Human Papillomavirus Imposes An Instructive Pattern of DNA Methylation Changes Which Parallel The Natural History of Cervical HPV Infection in Young Women. Carcinogenesis 2012; 33(7):1286-1293.
17. Yang N, Eijsink JJH, Lendvai A, et al. Methylation Markers for CCNA1 and C13ORF18 Are Strongly Associated with High-Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia and Cervical Cancer in Cervical Scrapings. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2009; 18(11):3000-3007.
18. Huisman C, Wisman GB, Kazemier HG, et al. Functional validation of putative tumor suppressor gene C13ORF18 in cervical cancer by Artificial Transcription Factors. Mol Oncol 2013; 7(3):669-679.
19. Li W, Bengtson MH, Ulbrich A, et al. Genome-Wide and Functional Annotation of Human E3 Ubiquitin Ligases Identifies MULAN, a Mitochondrial E3 that Regulates the Organelle's Dynamics and Signaling. PLoS One 2008; 23; 3(1):e1487.
20. Chan PK, Picconi MA, Cheung TH, Giovannelli L, Park JS. Laboratory and Clinical Aspects of Human Papillomavirus Testing. Crit Rev Clin Lab Sci 2012; 49(4):117-136.
21. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global Cancer Statistics. CA Cancer J Clin 2011; 61(2):69-90 .
22. de Freitas AC, Gurgel AP, Chagas BS, Coimbra EC, do Amaral CM. Susceptibility to Cervical Cancer; an Overview. Gynecol Oncol 2012; 126(2):304-311 .
23. Adams HP, Carnright EL. Infection and Cervical Cancer Prevention. Clinician Rev 2013; 23(9):42-50 .
24. Woodman CB, Collins SI, Young LS. The Natural History of Cervical HPV Infection: Unresolved Issues. Nat Rev Cancer 2007; 7(1):11-22.
25. Vesco KK, Whitlock EP, Eder M, Lin J, Burda BU, Senger CA, et al. Screening for Cervical Cancer: A Systematic Evidence Review for the U.S. Preventive Services Task Force [Internet]. Rockville (MD): Agency for Healthcare Research and Quality (US) 2011; Report No. : 11-05156-EF-1.
26. Abreu AL, Souza RP, Gimenes F, Consolaro ME. A Review of Methods for Detect Human Papillomavirus Infection. Virol J 2012; 9:262.
27. Human Papillomavirus Laboratory Manual 2009. Available at: http:// www.who.int/vaccines-documents. Accessed: November 2010.

28. Arney A, Bennett KM. Molecular Diagnostics of Human Papillomavirus. Lab Medicine 2010 41:523-530.
29. Nishino HT, Tambouret RH, Wilbur DC. Testing for Human Papillomavirus in Cervical Cancer Screening. Cancer Cytopathol 2011; 119(4):219-27.
30. Torres M, Fraile L, Echevarria J, Hernandez Novoa B, Ortiz M. Human Papillomavirus (HPV) Genotyping: Automation and Application in Routine Laboratory Testing. Open Virol J 2012;6:144-50.
31. Benevolo M, Vocaturo A, Caraceni D, French D, Rosini S, Zappacosta R, et al. Sensitivity, Specificity, and Clinical Value of Human Papillomavirus (HPV) E6/E7 mRNA Assay as a Triage Test for Cervical Cytology and HPV DNA Test. J Clin Microbiol 2011; 49(7): 2643-2650.
32. Chung HS, Hahm C, Lee M. Comparison of the clinical performances of The AdvanSure HPV Screening Real-Time PCR, The Abbott Real-Time High-Risk HPV Test, and The Hybrid Capture High-Risk HPV DNA Test for Cervical Cancer Screening. J Virol Methods 2014; 205C:57-60.
33. Marcuccilli F, Farchi F, Mirandola W, Ciccozzi M, Paba P, Bonanno E, Perno CF, Ciotti M. Performance Evaluation Of Anyplex™II HPV28 Detection Kit in a Routine Diagnostic Setting: Comparison with The HPV Sign® Genotyping Test. J Virol Methods 2015; 217:8-13 .
34. Phillips S, Garland SM, Tan JH, Quinn MA, Tabrizi SN. Comparison of The Roche Cobas® 4800 HPV Assay to Digene Hybrid Capture 2, Roche Linear Array and Roche Amplicor for Detection of High-Risk Human Papillomavirus Genotypes in Women Undergoing Treatment for Cervical Dysplasia. J Clin Virol 2015; 62:63-65.
35. Schiller JT, Castellsague X, Garland SM. a Review of Clinical Trials of Human Papillomavirus Prophylactic Vaccines. Vaccine 2012;30S: 23-38.
36. Jagu S, Karanam B, Gambhira R, Chivukula SV, Chaganti RJ, Lowy DR, et al. Concatenated Multitype L2 Fusion Proteins as Candidate Prophylactic Pan-Human Papillomavirus Vaccines. J Natl Cancer Inst 2009; 101(11):782-92.
37. Cutts FT, Franceschi S, Goldie S, Castellsague X, de Sanjose S, Garnett G, et al. Human Papillomavirus and HPV Vvaccines: a Review. Bull World Health Organ 2007; 85(9):719-26.
38. Deligeoroglou E, Giannouli A, Athanasopoulos N, Karountzos V, Vatopoulou A, Dimopoulos K, et al. HPV Infection: Immunological Aspects and Their Utility in Future Therapy. Infect Dis Obstet Gynecol 2013; 2013:540850.
39. Bergot AS, Kassianos A, Frazer IH, Mittal D. New Approaches to Immunotherapy for HPV Associated Cancers. Cancers (Basel) 2011; 3(3):3461-95.
40. Li X, Wang X, Gu J, Ma Y, Liu Z, Shi Y. Needle-Free Injection of 5-Aminolevulinic Acid in Photodynamic Therapy for The Treatment of Condylomata Acuminate. Exp Ther Med 2013; 6(1):236-240.
41. Laudadido, J. Human Papillomavirus Detection: Testing Methodologies and Their Clinical Utility in Cervical Cancer Screening. Adv Anat Pathol 2013; 20(3): 158-167.
42. Jemal A, Simard EP, Dorell C, Noone AM, Markowitz LE, Kohler B,et al. Annual Report to The Nation on The Status of Cancer, 1975-2009, Featuring The Burden and Trends in Human Papillomavirus(HPV)-Associated Cancers and HPV Vaccination Coverage Levels. J Natl Cancer Inst 2013;105(3):175-201.
43. Wheeler CM, Hunt WC, Joste NE, Key CR, Quint WG, Castle PE. Human Papillomavirus Genotype Distributions: Implications for Vaccination and Cancer Screening in The United States. J Natl Cancer Inst 2009; 101(7):475-487.
44. Arbyn M, Ronco G, Cuzick J, Wentzensen N, Castle PE. How to Evaluate Emerging Technologies in Cervical Cancer Screening?. Int J Cancer 2009; 125(11): 2489-2496.
45. Nunobiki O, Ueda M, Toji E, Yamamoto M, Akashi K, Sato N, Izuma S, Torii K, Tanaka I, Okamoto Y, Noda S. Genetic Polymorphism of Cancer Susceptibility Genes and HPV Infection in Cervical Carcinogenesis. Pathol Res Int 2011; 1-8.
46. Tornesello ML, Buonaguro L, Giorgi-Rossi P, Buonaguro FM. Viral and Cellular Biomarkers in The Diagnosis of Cervical Intraepithelial Neoplasia and Cancer. Biomed Res Int 2013; 2013:519619.
47. Hoste G, Vossaert K, Poppe WA. The Clinical Role of HPV Testing in Primary and Secondary Cervical Cancer Screening. Obstet Gynecol Int 2013; 2013: 610373.