ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΜΜΑΝΟΥΕΛΑ ΣΑΡΧΙΑΝΑΚΗ

ΙΑΤΡΟΣ ΒΙΟΠΑΘΟΛΟΓΟΣ

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΟΥ ΙΟΥ HUMAN PAPILLOMAVIRUS (HPV) ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2014

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Ονοματεπώνυμο: ΕΜΜΑΝΟΥΕΛΑ Ι. ΣΑΡΧΙΑΝΑΚΗ
Ημερομηνία Γέννησης: 09/02/1981

Διεύθυνση: ΚΡΙΤΟΒΟΥΛΙΔΟΥ 4, ΧΑΝΙΑ, ΤΚ 73134
Τηλέφωνα: 6942 445 161

e-mail: mansar81@yahoo.gr

ΤΙΤΛΟΙ ΣΠΟΥΔΩΝ

09/2008 - 03/2013 Ειδίκευση στην Ιατρική Βιοπαθολογία

10/1999 - 07/2005 Πτυχίο Ιατρικής Σχολής
Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Βαθμός 'Λίαν Καλώς' (8,20 / 10)
Υπότροφος Ιδρύματος Κρατικών Υποτροφιών (Ι.Κ.Υ)
Κληροδότημα Αντ.Φ.Παπαδάκη (1999-2005)
Υπότροφος Ιδρύματος Κρατικών Υποτροφιών (Ι.Κ.Υ.) – Αριστείο προόδου ακαδημαϊκού έτους 2003-2004 ($5^{ο}$ έτος σπουδών)

09/1995 - 06/1998 $3^{ο}$ Γενικό Λύκειο Ηρακλείου, Βαθμός 'Άριστα' (19 1/11)

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

07/2013 – σήμερα Επιστημονικά υπεύθυνη ιατρός στα Διαγνωστικά Εργαστήρια Βιοέρευνα , Χανιά

09/2008 - 06/2013 Ειδίκευση στην Ιατρική Βιοπαθολογία
Β' Εργαστηριακός Τομέας Πα.ΓΝ. Ηρακλείου

11/2006 - 08/2008 Άσκηση Υπηρεσίας Υπαίθρου, Περιφερειακό Αγροτικό Ιατρείο Σίβας , Κ.Υ. Μοιρών

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

1. Ragin C, Obikoya-Malomo M, Kim S, Chen Z, Flores-Obando R, Gibbs D, Koriyama C, Aguayo F, Koshiol J, Caporaso NE, Carpagnano GE, Ciotti M, Dosaka-Akita H, Fukayama M, Goto A, Spandidos DA, Gorgoulis V, Heideman DA, van Boerdonk RA, Hiroshima K, Iwakawa R, Kastrinakis NG, Kinoshita I, Akiba S, Landi MT, Eugene Liu H, Wang JL, Mehra R, Khuri FR, Lim WT, Owonikoko TK, Ramalingam S, **Sarchianaki E**, Syrjanen K, Tsao MS, Sykes J, Hee SW, Yokota J, Zaravinos A, Taioli E. HPV-associated lung cancers: an international pooled analysis. Carcinogenesis. 2014 Jun;35(6):1267-75
2. **Sarchianaki E**, Derdas SP, Ntaoukakis M, Vakonaki E, Lagoudaki ED, Lasithiotaki I, Sarchianaki A, Koutsopoulos A, Symvoulakis EK, Spandidos DA, Antoniou KM, Sourvinos G. Detection and genotype analysis of human papillomavirus in non-small cell lung cancer patients. Tumour Biol. 2014 Apr;35(4):3203-9
3. Lasithiotaki I, Antoniou KM, Derdas SP, **Sarchianaki E**, Symvoulakis EK, Psaraki A, Spandidos DA, Stathopoulos EN, Siafakas NM, Sourvinos G. The presence of Merkel cell polyomavirus is associated with deregulated expression of BRAF and Bcl-2 genes in non-small cell lung cancer.
   Int J Cancer. 2013 Aug 1;133(3):604-11
4. Maraki S, **Sarchianaki E**, Barbagadakis S. Myroides odoratimimus soft tissue infection in an immunocompetent child following a pig bite: case report and literature review.
   Braz J Infect Dis. 2012 Jul-Aug;16(4):390-2
5. Samonis G, Galanakis E, Ntaoukakis M, **Sarchianaki E**, Spathopoulou T, Dimopoulou D, Kofteridis DP, Maraki S. Effects of carbapenems and their combination with amikacin on murine gut colonisation by Candida albicans.Mycoses. 2013 Mar;56(2):105-9

ΒΡΑΒΕΙΑ

1. 22° Πανελλήνιο Πνευμονολογικό Συνέδριο : 3° βραβείο καλύτερης δημοσιευμένης εργασίας σε διεθνή περιοδικά για την εργασία με τίτλο The presence of Merkel cell polyomavirus is associated with deregulated expression of BRAF and Bcl-2 genes in non-small cell lung cancer.
2. 7° Παμπελοποννησιακό Ιατρικό Συνέδριο: Βραβείο 7ου Παμπελοννησιακού συνεδρίου και ιατρικού συλλόγου Μεσσηνίας για την εργασία με τίτλο ΄΄Ιστοπαθολογικά ευρήματα σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες με μητρορραγία.΄΄

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. 17th World Congress on Advances in Oncology and 15th International Symposium on Molecular Medicine : poster με τίτλο 'Detection of Human papillomavirus (HPV) in Non Small Cell Lung Cancer'

2. 20° Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο : poster με τίτλο ' Μέτρηση του παράγοντα RSf των ΔΕΚ σε ενήλικες με φυσιολογική αιματολογική εικόνα.'

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

Αγγλικά : Άριστο επίπεδο (First Certificate in English, University of Cambridge)

Γαλλικά : Καλό επίπεδο (Delf B2)

ΓΝΩΣΗ ΧΕΙΡΙΣΜΟΥ Η/Υ

Κάτοχος πιστοποιητικού γνώσης χειρισμού Η/Υ University of Cambridge (05/2008)

Γνωστικά αντικείμενα:

- Υπολογιστικά φύλλα: Microsoft Excel 2002 (ελληνική έκδοση)
- Παρουσιάσεις: Microsoft Power Point 2002 (ελληνική έκδοση)
- Επεξεργασία Κειμένου: Microsoft Word 2002 (ελληνική έκδοση)
- Υπηρεσίες Διαδικτύου:MS Internet Explorer 6.0, Microsoft Outlook 2002 (ελληνικές εκδόσεις)

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους βοήθησαν να ολοκληρώσω τη διδακτορική μου διατριβή και κυρίως τον επιβλέποντα Καθηγητή μου κο Γ. Σουρβίνο για την καθοδήγησή του και τις πολύτιμες συμβουλές που μου παρείχε καθόλη τη διάρκεια της πορείας μου.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής αυτής της διατριβής, τον Καθηγητή κο Δ.Α Σπαντίδο για την τεράστια αυτή ευκαιρία που μου παρείχε και τον Καθηγητή κο Ε. Σταθόπουλο για την υλική και ηθική του συμπαράσταση, χωρίς την οποία αυτή η διατριβή δεν θα μπορούσε να γίνει πραγματικότητα. Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω θερμά και τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς επιτροπής, τον Αναπληρωτή Καθηγητή κο Ν.Τζανάκη, τον Επίκουρο Καθηγητή κο Α.Κουτσόπουλο, την Επίκουρη Καθηγήτρια κα Α.Αντωνίου και τον Επίκουρο Καθηγητή κο Α.Ζαφειρόπουλο για την προθυμία τους να συμμετάσχουν στην αξιολόγηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Επίσης ευχαριστώ τα μέλη του εργαστηρίου της Κλινικής Ιολογίας του Τμήματος της Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης για τη συνεργασία τους και ειδικά τη διδάκτωρα του Πανεπιστημίου Κρήτης Έλενα Βακωνάκη για την υλική και ηθική βοήθεια που μου παρείχε προκειμένου να φέρω εις πέρας αυτή τη διατριβή.

Πάνω από όλα, ένα μεγάλο ευχαριστώ στο σύζυγό μου, στους γονείς μου και στις αδελφές μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη

Abstract

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

1.1.1 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

1.1.2 ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΟΙ ΤΥΠΟΙ

1.1.3 ΜΟΡΙΑΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

1.1.4 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ

1.1.5 ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΗΜΕΙΑ

1.1.6 ΔΙΑΓΝΩΣΗ

1.1.7 SCREENING

1.1.8 ΠΡΟΓΝΩΣΗ

1.1.9 ΘΕΡΑΠΕΙΑ

1.2 ΙΟΙ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ

1.3 Ο ΙΟΣ HUMAN PAPILLOMAVIRUS (HPV)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΡΟΤΕΙΝΟΜΕΝΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 ΑΣΘΕΝΕΙΣ

3.2 ΔΕΙΓΜΑΤΑ

3.3 ΕΚΧΥΛΙΣΗ DNA

3.4 REAL-TIME PCR

3.5 ΓΟΝΟΤΥΠΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΙΟΥ HPV

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1 : ΕΝΗΜΕΡΩΤΙΚΟ ΕΝΤΥΠΟ ΣΥΜΜΕΤΟΧΗΣ – ΣΥΓΚΑΤΑΘΕΣΗΣ ΣΕ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2 : ΕΓΚΡΙΣΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ ΑΠΟ ΤΟ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟ

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3 : ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ ΣΤΟ ΠΕΡΙΟΔΙΚΟ TUMOR BIOLOGY

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Παρά το ότι ο ρόλος του ιού των ανθρωπίνων θηλωμάτων (Human Papilloma virus, HPV) στην εμφάνιση του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας είναι καλά τεκμηριωμένος, ο ρόλος του HPV στην καρκινογένεση του πνεύμονα παραμένει αμφιλεγόμενος. Η συχνότητα ανίχνευσης του HPV DNA υπόκεινται σε ευρεία διακύμανση, από 0 έως 100 %. Αυτό εν μέρει οφείλεται στην τεχνική ανίχνευσης που χρησιμοποιήθηκε. Για να διευκρινίσουμε την επίδραση της HPV λοίμωξης στο πνευμονικό παρέγχυμα, αναλύσαμε 100 δείγματα από μη-μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα (39 πλακώδη καρκινώματα, 50 αδενοκαρκινώματα, 5 αδενοπλακώδη, 5 αδιαφοροποίητα και 1 μεγαλοκυτταρικό) από την περιοχή της Κρήτης στην Ελλάδα. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν 16 δείγματα υγειούς πνευμονικού ιστού. Έγινε εκχύλιση DNA από 100 τομές μονιμοποιημένες σε παραφίνη που πάρθηκαν από ασθενείς με μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα. Τα δείγματα εξετάσθηκαν για την παρουσία του HPV DNA με την τεχνική της Real Time PCR χρησιμοποιώντας τους γενικούς εκκινητές GP5+/GP6+. Επιπλέον, τα HPV θετικά δείγματα υπεβλήθησαν σε γονοτυπική ανάλυση. Σε αντιδιαστολή με την απουσία του ιϊκού γονιδιώματος στα δείγματα ελέγχου, HPV DNA ανιχνεύθηκε σε 19 από τα 100 εξετασθέντα δείγματα (19%). Συγκεκριμένα, 4 πλακώδη καρκινώματα, 12 αδενοκαρκινώματα, 1 αδενοπλακώδες και 2 αδιαφοροποίητα ήταν HPV θετικά. Η κατανομή των γονοτύπων του HPV ήταν η ακόλουθη : HPV 16 : 8 περιστατικά (42,1 %) , HPV 11 : 3 περιστατικά (15,8 %) , HPV 6 : 1 περιστατικό (5,2 %) , HPV 33 : 2 περιστατικά (10,5 %) , HPV 31 : 2 περιστατικά (10,5 %) και HPV 18 : 2 περιστατικά (10,5 %) . Η παρουσία του HPV στα δείγματα από καρκίνο παρέχει στοιχεία για τον πιθανό ρόλο του στο μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα και υποδεικνύει την ανάγκη για περαιτέρω έρευνα στο συγκεκριμένο πεδίο.

ABSTRACT

Although the role of human papillomavirus (HPV) in the development of uterine cervical cancer is well established, the role of HPV in lung carcinogenesis remains controversial. The detection rates of HPV DNA are subject to a wide variation from 0 to 100 %. This is partly influenced by the detection techniques employed. To elucidate the impact of HPV infection on lung parenchyma, we analyzed 100 non small cell lung cancer (NSCLC) specimen (39 squamous cell carcinoma, 50 adenocarcinomas, 5 samples with characteristics of both squamous cell and adenocarcinoma, 5 undifferentiated and 1 large cell carcinoma) from the region of Crete, Greece. Sixteen non cancerous samples served as the negative controls. DNA was extracted from 100 paraffin embedded tissue sections obtained from NSCLC patients. The specimens were examined for the detection of HPV DNA by Real Time PCR using GP5+/GP6+ primers. Furthermore, the HPV positive samples were subjected to genotyping. In contrast to the absence of viral genomes in the control samples, HPV DNA was detected in 19 NSCLC specimens (19%). In particular, 4 squamous cell carcinomas, 12 adenocarcinomas, 1 sample with characteristics of both squamous cell and adenocarcinoma and 2 undifferentiated samples were HPV positive. The distribution of HPV genotypes was as follows: HPV 16:8 cases (42.1 %), HPV 11: 3 cases (15.8 %), HPV 6 : 1 case (5.2 %), HPV 33 : 2 cases (10.5 %), HPV 31 : 2 cases (10.5 %) and HPV 18 : 2 cases (10.5 %). The presence of HPV in the tumor samples provides evidence of the potential role of HPV in NSCLC and strongly argues for additional research on this issue.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1ο

1.Εισαγωγή

1.1 Καρκίνος του πνεύμονα

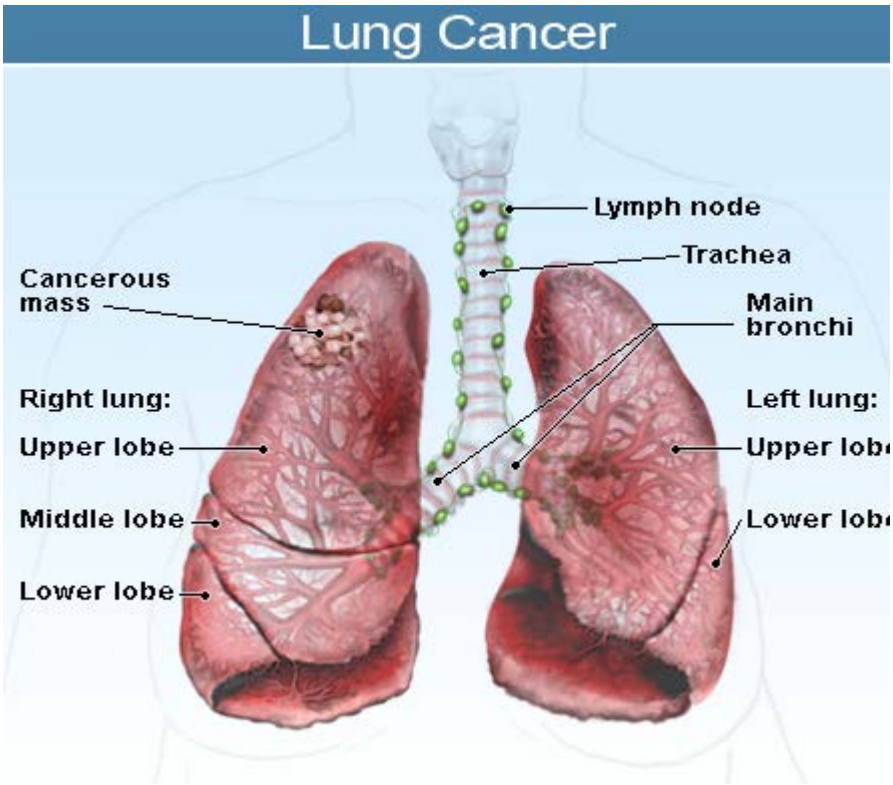
1.1.1 Επιδημιολογικά στοιχεία

Ο καρκίνος είναι πρωταρχική αιτία ασθενείας παγκοσμίως. Το 2012 εκτιμάται ότι εμφανίστηκαν 14.1 εκατομμύρια νέα περιστατικά καρκίνου ενώ 8.2 εκατομμύρια θάνατοι οφείλονταν σε αυτόν σε όλο τον κόσμο (1). Ο πιο συχνός καρκίνος είναι εκείνος του πνεύμονα με επίπτωση 13% και θνησιμότητα 19% σε παγκόσμιο επίπεδο για το έτος 2012 (1). Στις Η.Π.Α διαγνώσθηκαν 228.190 νέα περιστατικά καρκίνου πνεύμονα και καταγράφηκαν 159.480 θάνατοι από αυτόν για το 2013 (2). Στη Μεγάλη Βρετανία 43.463 ήταν οι νέες διαγνώσεις και 35.184 οι θάνατοι από αυτόν τον τύπο καρκίνου για το έτος 2011 (3). Πριν από το 1930 ο καρκίνος του πνεύμονα ήταν ελάχιστα διαδεδομένος, όμως στις δεκαετίες που ακολούθησαν εμφάνισε δραματική αύξηση. Παρόλο που σε αρκετές αναπτυσσόμενες χώρες η επίπτωσή του αρχίζει να ελαττώνεται, ο καρκίνος του πνεύμονα συνεχίζει να αποτελεί τη συχνότερη αιτία θανάτου από καρκίνο παγκοσμίως και στα δυο φύλα (4).

Ο καρκίνος του πνεύμονα αφορά κυρίως ηλικιωμένους. Στο 67% του συνόλου αφορά σε άτομα ηλικίας από 65 και πάνω , ενώ λιγότερο από 2% αφορά σε άτομα κάτω των 45 χρόνων. Ο μέσος όρος ηλικίας τη στιγμή της διάγνωσης είναι περίπου τα 70 έτη (5).

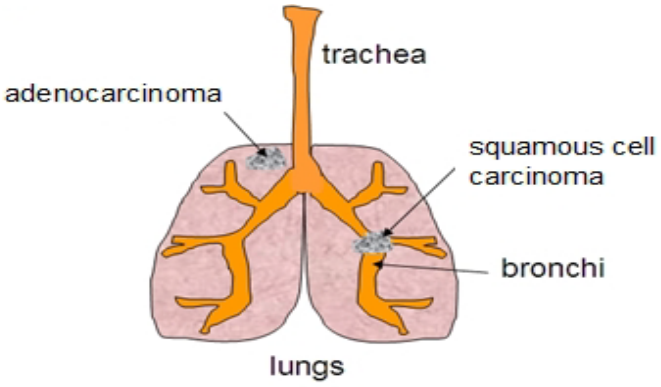
1.1.2 Ιστολογικοί τύποι

Οι περισσότεροι πρωτοπαθείς καρκίνοι του πνεύμονα προέρχονται από τα επιθηλιακά κύτταρα των αεροφόρων οδών και γι' αυτό ονομάζονται βρογχογενή καρκινώματα (εικόνα 1.1). Με βάση τον ιστολογικό τους τύπο ταξινομούνται σε δυο μεγάλες κατηγορίες: το μη μικροκυτταρικό, που αντιστοιχεί στο 85-90% όλων των καρκίνων πνεύμονα, και το μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα , που αντιστοιχεί στο 10-15% των περιπτώσεων και παρουσιάζει διαφορετική ανταπόκριση στις διάφορες θεραπείες και διαφορετική πρόγνωση.



Εικόνα 1.1 Ο καρκίνος του πνεύμονα

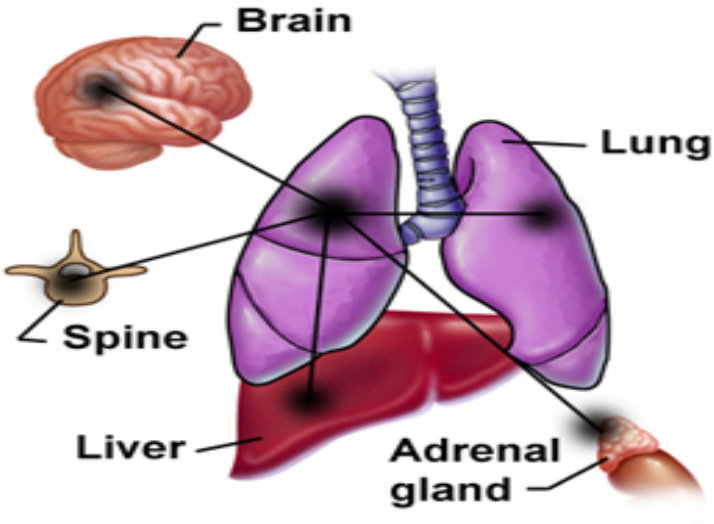
Ο μη μικροκυτταρικός καρκίνος υποδιαιρείται σε τρεις κύριες κατηγορίες με βάση το είδος των κυττάρων που εξορμούν από τον όγκο: αδενοκαρκίνωμα, πλακώδες καρκίνωμα και καρκίνο από μεγάλα κύτταρα (εικόνα 1.2). Το αδενοκαρκίνωμα αντιστοιχεί στο 40% των μη μικροκυτταρικών όγκων και προέρχεται από την περιφέρεια του πνεύμονα με τάση να εξαπλώνεται στους περιφερικούς λεμφαδένες και σε πιο απομακρυσμένα σημεία. Ένας υπότυπος του αδενοκαρκινώματος είναι το βρογχοκυψελιδικό καρκίνωμα, περισσότερο κοινό σε γυναίκες μη καπνίστριες και στους Ασιάτες, με διαφορετική ανταπόκριση στις διάφορες θεραπείες.Το πλακώδες καρκίνωμα ή αλλιώς επιδερμοειδές αποτελεί το 25% των μη μικροκυτταρικών όγκων και εξορμά από τους κεντρικούς βρόγχους κοντά στις πνευμονικές πύλες όπου συνήθως παραμένει, σχηματίζοντας μεγάλες κοιλότητες με κεντρική νέκρωση που αντιστοιχεί στο κέντρο του όγκου.Ο καρκίνος από μεγάλα κύτταρα αποτελεί το λιγότερο συχνό τύπο μη μικροκυτταρικού όγκου αποτελώντας το 10-15% όλων των καρκίνων του πνεύμονα. Αρκετά συχνά δίνει λεμφαδενικές και απομακρυσμένες μεταστάσεις.



Εικόνα 1.2 Οι ιστολογικοί τύποι του καρκίνου του πνεύμονα

Ο μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα είναι ο πιο επιθετικός και ο πιο ταχέως αναπτυσσόμενος όγκος από όλους τους τύπους καρκίνου του πνεύμονα. Αναπτύσσεται στους μεγάλους αεραγωγούς (πρωτογενείς και δευτερογενείς βρόγχοι). Σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις τη στιγμή της διάγνωσης υπάρχουν ήδη απομακρυσμένες μεταστάσεις. Σε αρκετούς καρκίνους του πνεύμονα ανευρίσκονται συνδυασμοί των κύριων ιστολογικών τύπων. Άλλοι σπάνιοι τύποι καρκίνου του πνεύμονα περιλαμβάνουν τα καρκινοειδή, τα σαρκώματα και τα αδιαφοροποίητα νεοπλάσματα που αντιστοιχούν στο 5-10% του συνόλου των καρκίνων. Ο πνεύμονας αποτελεί συνήθη θέση μετάστασης των όγκων από άλλα σημεία του σώματος. Καρκινικά κύτταρα μπορούν να φτάσουν στον πνεύμονα μέσω της συστηματικής ή λεμφικής κυκλοφορίας ή κατά συνέχεια ιστού από τον πρωτοπαθή όγκο.

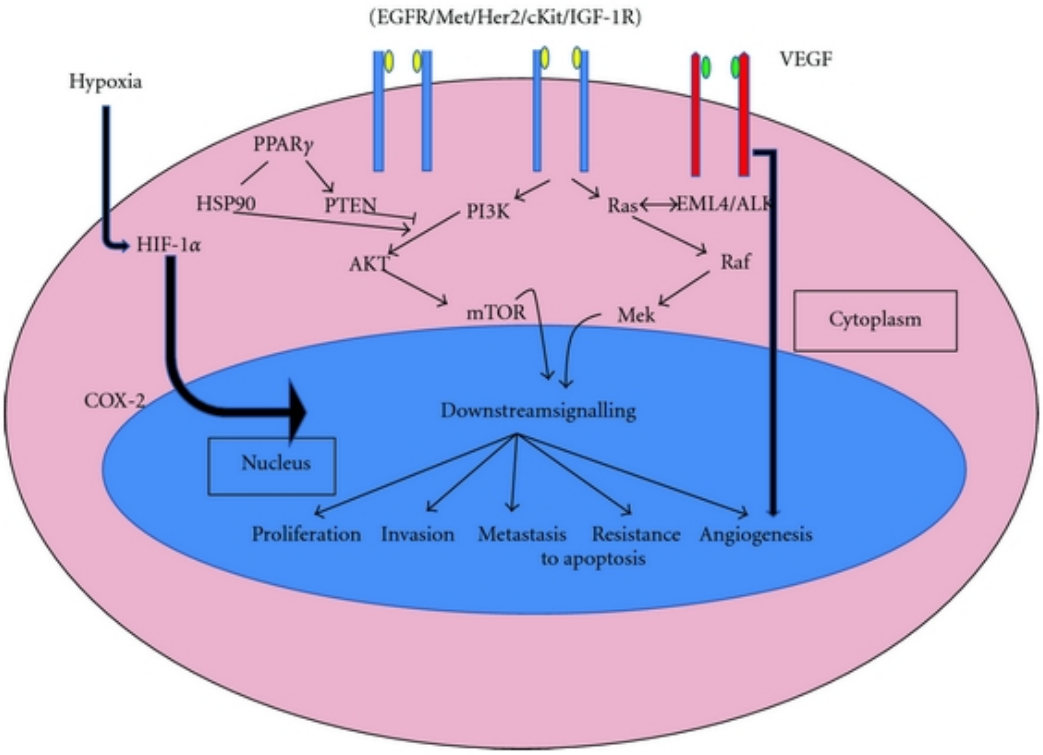
Οι ίδιοι οι πρωτοπαθείς όγκοι του πνεύμονα προκαλούν μεταστάσεις σε διάφορα όργανα, κυρίως στον εγκέφαλο, τα οστά, το ήπαρ και τα επινεφρίδια (Εικόνα 1.3).



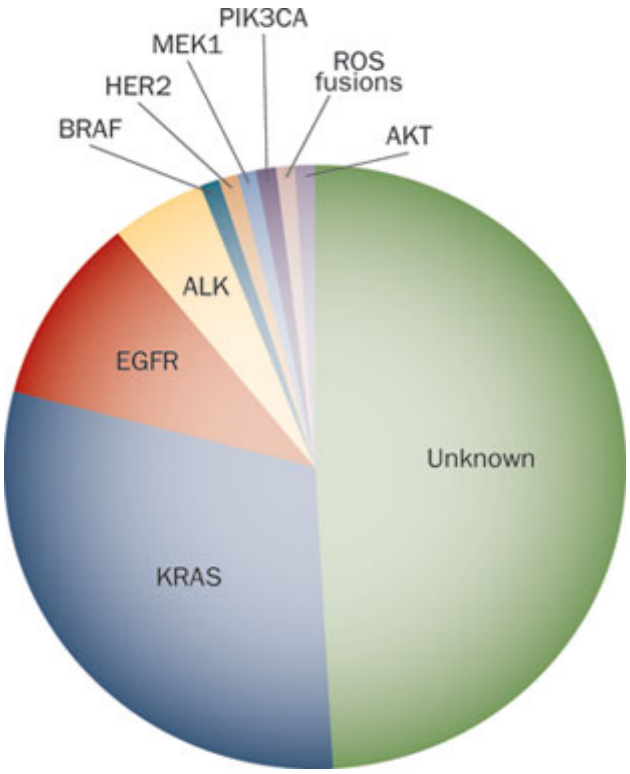
Εικόνα 1.3 Θέση των μεταστάσεων του καρκίνου του πνεύμονα

1.1.3 Μοριακά στοιχεία

Σύγχρονες μελέτες έχουν περιγράψει ποικίλες ανωμαλίες σε μοριακό επίπεδο που έχουν παρατηρηθεί στον καρκίνο του πνεύμονα και ειδικά στον μη μικροκυτταρικό, που περιλαμβάνουν χρωμοσωμικές ανωμαλίες, υπερέκφραση ογκογονιδίων, διαγραφή ή/και μεταλλάξεις σε ογκοκατασταλτικά γονίδια. Οι μεταβολές αυτές οδηγούν σε απορρύθμιση σημαντικών οδών σηματοδότησης που έχουν σημαντικό ρόλο στην κυτταρική αύξηση και απόπτωση. Με τον τρόπο αυτό εξηγείται η συνεισφορά τους στην καρκινογένεση σε μοριακό επίπεδο (Εικόνα 1.4). Τα πιο σημαντικά γονίδια που εμπλέκονται στον καρκίνο του πνεύμονα είναι τα πρωτο-ογκογονίδια και τα ογκοκατασταλτικά γονίδια (Εικόνα 1.5).



Εικόνα 1.4 Κύρια μονοπάτια σηματοδότησης που επηρεάζονται από τα μεταλλαγμένα γονίδια στον καρκίνο του πνεύμονα.



Εικόνα 1.5 Γονίδια που εμπλέκονται στον καρκίνο του πνεύμονα

Στον καρκίνο του πνεύμονα έχουν περιγραφεί χρωμοσωμικές ανωμαλίες για το 3p, 8p, 9p, 11p, 15p και 17p, καθώς και διαγραφή των χρωμοσωμάτων 3p, 7, 11, 13 και 19 (6). Μια από τις πιο συχνές ανωμαλίες είναι η απώλεια του βραχέους σκέλους του χρωμοσώματος 3, που απαντά σε περισσότερο από το 90% των ασθενών με μικροκυτταρικό και περίπου στο 50% των ασθενών με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (7,8). Η βλάβη του DNA που προκαλεί το κάπνισμα και η έναρξή του σε μικρή ηλικία φαίνεται ότι επάγουν την απώλεια του 3p (9).

Η συγχώνευση του γονιδίου EML4 με την περιοχή σηματοδότησης του υποδοχέα της τυροσινικής κινάσης του γονιδίου ALK μπορεί να ευθύνεται για την ογκογένεση σε μια μειονότητα των ασθενών με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (10).

Στις περισσότερες έρευνες οι μεταλλάξεις στο K-ras γονίδιο συναντώνται στο αδενοκαρκίνωμα και σχετίζονται με δυσμενή πρόγνωση (11), ενώ σωματικές μεταλλάξεις στο γονίδιο BRAF είναι παρούσες στο 3% των ασθενών με μη μικροκυτταρικό καρκίνο και περίπου οι μισές από αυτές είναι V600E (12). Υπάρχουν στοιχεία που υποδεικνύουν ότι η πρόγνωση στους ασθενείς με προχωρημένο μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα και μετάλλαξη στο γονίδιο BRAF είναι περισσότερο ευνοϊκή σε σχέση με εκείνους που παρουσιάζουν μετάλλαξη στο K-ras γονίδιο.

Ο EGFR υπερεκφράζεται στον καρκίνο του πνεύμονα και ειδικά στο μη μικροκυτταρικό σχετίζεται με προχωρημένη νόσο και πτωχή πρόγνωση στις περισσότερες μελέτες (13, 14, 15), αλλά όχι σε όλες (16, 17, 18).

Όσον αφορά στα ογκοκατασταλτικά γονίδια, οι σημειακές μεταλλάξεις στο γονίδιο p53 αποτελούν ένα σημαντικό γενετικό σύμβαμα για τον καρκίνο του πνεύμονα. Η συχνότητα των μεταλλάξεων του γονιδίου αυτού στο μη μικροκυτταρικό καρκίνο ποικίλουν από 30-50% των περιστατικών και συναθροίζονται στα κωδικόνια 157, 158, 248, 249, 273 και μεταξύ των εξονίων 5 και 8 (19, 20, 21). Αυτές οι μεταλλάξεις είναι συνήθεις τόσο στους καπνιστές όσο και στους μη καπνιστές.

1.1.4 Παράγοντες κινδύνου

Όσον αφορά στους παράγοντες που μπορεί να οδηγήσουν στην εμφάνιση του καρκίνου του πνεύμονα πρωτεύοντα, ρόλο διαδραματίζει το κάπνισμα κυρίως τσιγάρων (22). Το 90% των περιπτώσεων σχετίζεται με τη χρήση καπνού. Ο κίνδυνος αυξάνει όσο αυξάνεται ο αριθμός των τσιγάρων που καταναλώνονται την ημέρα. Για να γίνει αυτό καλύτερα κατανοητό, εισήχθη ο όρος 'πακέτα τσιγάρων ανά έτος' και αντιστοιχεί στα πακέτα των τσιγάρων που καταναλώνονται από ένα άτομο την ημέρα, επί τα έτη που διήρκεσε η κατανάλωση καπνού. Παρόλο που ο κίνδυνος είναι αυξημένος ακόμα και για τα άτομα που καταναλώνουν λιγότερο από 10 πακέτα ανά έτος, μεγαλύτερο κίνδυνο εμφανίζουν όσοι έχουν καταναλώνουν περισσότερο από 30 πακέτα ανά έτος. Αν και δεν υπάρχει ασφαλές επίπεδο έκθεσης στον καπνό, ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα μειώνεται κάθε χρόνο που περνάει μετά τη διακοπή του καπνίσματος, καθώς φυσιολογικά κύτταρα αναπτύσσονται στον πνεύμονα και αντικαθιστούν τα κατεστραμμένα. Για τους πρώην καπνιστές, ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα πλησιάζει εκείνον των μη καπνιστών 15 χρόνια μετά που θα διακόψουν το κάπνισμα.

Η χρήση πίπας και πούρων επίσης μπορούν να οδηγήσουν σε καρκίνο του πνεύμονα, αν και ο κίνδυνος είναι πιο μικρός σε σχέση με την κατανάλωση τσιγάρων. Έτσι, ενώ όποιος καπνίζει ένα πακέτο τσιγάρα την ημέρα κινδυνεύει 25 φορές περισσότερο να αναπτύξει καρκίνο του πνεύμονα σε σχέση με ένα μη καπνιστή, όσοι χρησιμοποιούν πίπα ή πούρα έχουν πενταπλάσιο κίνδυνο σε σχέση με τους μη καπνιστές. Ο καπνός των τσιγάρων περιέχει πάνω από 4.000 χημικές ουσίες, πολλές από τις οποίες θεωρούνται καρκινογόνες (23). Οι κυριότερες από αυτές είναι οι νιτροζαμίνες και το βενζοπυρένιο, που είναι ραδιοϊσότοπα από τη σειρά διάσπασης του ραδονίου. Επιπλέον, φαίνεται ότι η νικοτίνη καταστέλλει την ανοσολογική απάντηση στις κακοήθεις νεοπλασίες του εκτειθέμενου ιστού (24). Στον ανεπτυγμένο κόσμο, το 90% των θανάτων από καρκίνο του πνεύμονα στους άνδρες κατά τη διάρκεια του έτους 2000 αποδόθηκε στο κάπνισμα ενώ το ποσοστό αυτό είναι στο 70% για τις γυναίκες (25). Ο βαθμός της συσχέτισης με το κάπνισμα διαφέρει ανάλογα με τον ιστολογικό τύπο του καρκίνου. Ο μικροκυτταρικός και ο καρκίνος από πλακώδη κύτταρα φαίνεται να σχετίζονται με το κάπνισμα περισσότερο από οποιοδήποτε άλλο ιστολογικό τύπο (26, 27).

Μία από τις αιτίες καρκίνου του πνεύμονα σε μη καπνιστές είναι το παθητικό κάπνισμα, η εισπνοή δηλαδή καπνού από τον καπνό κάποιου άλλου ατόμου. Ως παθητικός καπνιστής μπορεί να χαρακτηριστεί κάποιος που ζει ή εργάζεται με έναν καπνιστή. Μελέτες από τις ΗΠΑ (28, 29) την Ευρώπη (30), το Ηνωμένο Βασίλειο (31) και την Αυστραλία (32) έδειξαν ένα σημαντικά αυξημένο κίνδυνο μεταξύ εκείνων που εκτίθενται σε παθητικό κάπνισμα σε σχέση με όσους δεν έχουν καπνιστές στο περιβάλλον τους (33). Μάλιστα, όσοι ζουν με κάποιον που καπνίζει παρουσιάζουν αύξηση του κινδύνου της τάξης του 20-30%, ενώ εκείνοι που εργάζονται σε περιβάλλον με καπνό παρουσιάζουν αύξηση του κινδύνου της τάξης του 16-19% (34). Οι έρευνες δείχνουν ότι ο καπνός από το φλεγόμενο τσιγάρο είναι περισσότερο επικίνδυνος από τον καπνό που εκπνέει ένας καπνιστής (35). Το παθητικό κάπνισμα προκαλεί περίπου 3.400 θανάτους από καρκίνο του πνεύμονα κάθε χρόνο στις ΗΠΑ (29). Δεν υπάρχει ασφαλές επίπεδο έκθεσης στο παθητικό κάπνισμα, διότι ακόμα και η ελάχιστη έκθεση μπορεί να είναι επιβλαβής.

Είναι λιγότερο ξεκάθαρο κατά πόσο η παθητική έκθεση των παιδιών στο τσιγάρο σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο για εμφάνιση καρκίνου του πνεύμονα στην ενήλικο ζωή. Έρευνες που δημοσιεύτηκαν πριν το 1998 δεν έδειξαν ότι υπάρχει συσχέτιση, όμως μία μετα-ανάλυση επεσήμανε μικρή αύξηση του κινδύνου για ανάπτυξη νεοπλασιών διαφόρων τύπων στην παιδική ηλικία που σχετίζεται με το κάπνισμα της μητέρας κατά τη διάρκεια της κύησης (36). Ωστόσο μια μελέτη cohort απέδειξε ότι η παθητική έκθεση των παιδιών στο τσιγάρο μπορεί να μην είναι μείζονας παράγοντας κινδύνου για τις πιο συχνές μορφές καρκίνου στην ενήλικο ζωή (37).

Άλλος παράγοντας κινδύνου είναι η έκθεση στο ραδόνιο.Το ραδόνιο είναι ένα άχρωμο και άοσμο αέριο που παράγεται από την αποδιέγερση του ραδιενεργού ραδίου-226, το οποίο με τη σειρά του είναι προϊόν της διάσπασης του ουρανίου, που βρίσκεται στο έδαφος και τα πετρώματα. Έτσι, ραδόνιο υπάρχει παντού στον ατμοσφαιρικό αέρα σε χαμηλά επίπεδα, ενώ σε μεγαλύτερη συγκέντρωση απαντάται σε ιαματικά λουτρά, σπήλαια, ορυχεία και υπόγειους χώρους. Μια άλλη σημαντική πηγή ραδονίου είναι τα οικοδομικά υλικά. Τα κοινά οικοδομικά υλικά όπως το ξύλο, τα τούβλα και το τσιμέντο εκλύουν σχετικά μικρές ποσότητες ραδονίου. Υπάρχουν, ωστόσο, υλικά όπως ο γρανίτης και ορισμένα είδη πέτρας και γύψου που είναι

ιδιαίτερα ραδιενεργά. Μέσα στις οικίες αθροίζεται σε κλειστούς και μη αεριζόμενους χώρους από τις ρωγμές στα πατώματα, τους τοίχους και τα θεμέλια. Τα ραδιενεργά ισότοπα που παράγονται κατά την αποδιέγερση του ραδονίου προσκολλώνται σε σωματίδια σκόνης και, εισπνεόμενα, επικάθονται στις πνευμονικές κυψελίδες, όπου παραμένουν για μεγάλο χρονικό διάστημα ακτινοβολώντας ραδιενέργεια, με συνέπεια να ιονίζουν το γενετικό υλικό προκαλώντας μεταλλάξεις στα κύτταρα που μερικές φορές μετατρέπονται σε καρκινικά.

Το ραδόνιο είναι η δεύτερη πιο συχνή αιτία του καρκίνου του πνεύμονα στις ΗΠΑ μετά το κάπνισμα (29). Ο κίνδυνος αυξάνεται 8-16% για κάθε αύξηση 100 Bq/m³στη συγκέντρωση του ραδονίου(38). Τα επίπεδα του αερίου ραδονίου διαφέρουν ανάλογα με τον τόπο και τη σύνθεση του υποκείμενου εδάφους και των βράχων. Για παράδειγμα, σε περιοχές όπως η Κορνουάλη στο Ηνωμένο Βασίλειο (η οποία έχει ως υπέδαφος γρανίτη) το αέριο ραδόνιο είναι ένα σημαντικό πρόβλημα και τα κτίρια πρέπει να εξαερίζονται με ανεμιστήρες για να μειώσουν τις συγκεντρώσεις του ραδονίου. Η Υπηρεσία Προστασίας του Περιβάλλοντος των Ηνωμένων Πολιτειών εκτιμά ότι ένα στα 15 σπίτια στις ΗΠΑ έχει επίπεδα ραδονίου πάνω από τη συνιστώμενη κατευθυντήρια γραμμή των 4 pCi/L (148 Bq/m³) και γι' αυτό άλλωστε το ραδόνιο θεωρείται η κύρια αιτία καρκίνου του πνεύμονα στους μη καπνιστές στις Η.Π.Α (39).

Ο αμίαντος θεωρείται μείζων παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη καρκίνου του πνεύμονα , αν και είναι η κύρια αιτία ανάπτυξης μεσοθηλιώματος. Έρευνες απέδειξαν ότι οι εργαζόμενοι σε χώρους με αμίαντο , όπως ορυχεία και μηχανοστάσια πλοίων, κινδυνεύουν περισσότερο να αναπτύξουν καρκίνο του πνεύμονα. Μάλιστα ο αμίαντος δρα συνεργικά με το κάπνισμα στην ανάπτυξη καρκίνου του πνεύμονα (40-42) και έτσι αν ένας καπνιστής έχει 15 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο να πεθάνει από αυτόν τον τύπο καρκίνου από έναν μη καπνιστή (40), ο κίνδυνος αυξάνει σε 19 με 26 φορές για καπνιστές που εκτίθενται στον αμίαντο σε σχέση με μη καπνιστές που επίσης εκτίθενται στον αμίαντο, όπως έδειξε μια μεγάλη μελέτη (43).

Κι άλλοι καρκινογόνοι παράγοντες που απομονώνονται σε εργασιακούς χώρους φαίνεται να εμπλέκονται στην εμφάνιση καρκίνου του πνεύμονα. Τέτοιοι είναι ραδιενεργά αέρια όπως το ουράνιο, εισπνεόμενα χημικά ή μεταλλικά στοιχεία όπως το αρσενικό, το κάδμιο, η σιλικόνη. Επιπλέον, η μόλυνση του ατμοσφαιρικού αέρα

ευθύνεται για τον καρκίνο του πνεύμονα, ιδίως σε αστικές περιοχές πλησίον των αυτοκινητόδρομων με μεγάλη κίνηση. Ο κίνδυνος αυτός είναι πολύ μικρότερος από τον κίνδυνο που προκαλεί ο καπνός. Εντούτοις, κάποιοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι το 5% όλων των θανάτων από καρκίνο του πνεύμονα παγκοσμίως αποδίδεται στην μόλυνση του ατμοσφαιρικού αέρα (44).

Αν και η πλειονότητα των περιπτώσεων του καρκίνου του πνεύμονα σχετίζεται με το κάπνισμα, το γεγονός ότι δεν προσβάλλονται όλοι οι καπνιστές από αυτόν τον τύπο καρκίνου υποδεικνύει την παρουσία και άλλων παραγόντων όπως η γενετική προδιάθεση του κάθε ανθρώπου. Αρκετές έρευνες έχουν δείξει ότι οι πρώτου βαθμού συγγενείς ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα, ανεξάρτητα αν καπνίζουν ή όχι, διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο να αναπτύξουν καρκίνο απ' ότι ο γενικός πληθυσμός και σε αρκετές μάλιστα μελέτες ο κίνδυνος επιμένει και μετά τη διόρθωση που προκύπτει αν ληφθούν υπόψιν η ηλικία, το φύλο και οι καπνιστικές συνήθειες.

Μία μετα-ανάλυση που περιελάμβανε 28 case – control και 17 cohort μελέτες αποκάλυψε αυξημένο κίνδυνο για τον καρκίνο του πνεύμονα που σχετίζεται με την ύπαρξη κάποιου μέλους της οικογενείας που είχε προσβληθεί από τη νόσο (σχετικός κίνδυνος 1,8, 95% CI 1.6-2.0) (45). Ο κίνδυνος ήταν μεγαλύτερος για συγγενείς ασθενών που διαγνώσθηκαν σε νεαρή ηλικία και σε εκείνους που έχουν πολλαπλά μέλη της οικογένειας προσβεβλημένα. Άλλες έρευνες βρήκαν μικρότερο αλλά πάλι σημαντικό κίνδυνο για τους συγγενείς δευτέρου και τρίτου βαθμού (46).

Με την πρόοδο της μοριακής βιολογίας έχουν αρχίσει να ταυτοποιούνται ειδικοί πολυμορφισμοί μονονουκλεοτιδίων (SNPs) ή μεταλλάξεις που επηρεάζουν τον κίνδυνο για την εμφάνιση καρκίνου του πνεύμονα. Πρόσφατες έρευνες έχουν αποκαλύψει την ύπαρξη μίας περιοχής στο μακρύ σκέλος του 6ου χρωμοσώματος που περιλαμβάνει ένα γονίδιο που αυξάνει την προδιάθεση του ατόμου στην ανάπτυξη του καρκίνου του πνεύμονα (47).

Επιπλέον, οι επιζήσαντες από καρκίνο του πνεύμονα έχουν μεγαλύτερο κίνδυνο να ξαναπροσβληθούν από αυτή τη μορφή καρκίνου και συγκεκριμένα όσοι επιβίωσαν από μη μικροκυτταρικό καρκίνο έχουν επιπλέον κίνδυνο κατά 1-2% να αναπτύξουν αυτόν τον τύπο καρκίνου για δεύτερη φορά σε σχέση με το γενικό πληθυσμό (48).

Επίσης, καλοήθεις πνευμονικές παθήσεις και κυρίως η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο (2-6 φορές μεγαλύτερο) σε σχέση με τους μη καπνιστές, ειδικά όσον αφορά στους άνδρες (49). Ασθενείς με διάχυτη πνευμονική ίνωση έχουν 8-14 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο για καρκίνο του πνεύμονα, ακόμα και αν ληφθεί υπόψιν η ηλικία, το φύλο και οι καπνιστικές συνήθειες (50). Σε μια έρευνα case-control φορείς ενός αλλήλιου για την ανεπάρκεια της α1-αντιθρυψίνης (συνήθως το S ή το Z αλλήλιο) είχαν διπλάσιο κίνδυνο για τον καρκίνο του πνεύμονα (51). Εξαιτίας του επιπολασμού αυτών των αλληλίων σ΄αυτόν τον πληθυσμό, η φορεία του γονιδίου της α1-αντιθρυψίνης θεωρείται ότι συνεισφέρει στο 11-12 % αυτών των περιστατικών καρκίνου του πνεύμονα.

Έχει παρατηρηθεί επίσης ότι η πνευμονική φυματίωση μπορεί να είναι ένας ακόμη παράγοντας κινδύνου για τον καρκίνο του πνεύμονα (52). Ενώ είναι πιθανό ότι η φλεγμονή και η ουλοποίηση που συνδέονται με τη φυματίωση να συνεισφέρουν στην παθογένεση του καρκίνου του πνεύμονα, είναι επίσης πιθανό η πνευμονική φυματίωση να είναι απλώς ένας δείκτης των επιβλαβών συνεπειών του καπνίσματος.

Λιγότερο μελετημένοι και αποδεδειγμένοι παράγοντες που φαίνεται να εμπλέκονται στην καρκινογένεση του πνεύμονα είναι η χρήση μαριχουάνας και πούδρας τάλκ.

1.1.5 Συμπτώματα και σημεία

Στις περισσότερες περιπτώσεις καρκίνου του πνεύμονα η διάγνωση γίνεται σε προχωρημένα στάδια ή τυχαία μετά από απεικόνιση του πνεύμονα για άλλους λόγους. Κι αυτό οφείλεται εν μέρει στο γεγονός ότι δεν υπάρχουν ειδικά για τη νόσο συμπτώματα και έτσι πολλά από αυτά αποδίδονται σε άλλες παθήσεις με αποτέλεσμα την καθυστέρηση της διάγνωσης. Τα συμπτώματα και τα σημεία μπορεί να οφείλονται στην θέση ανάπτυξη της πρωτοπαθούς μάζας, στην πίεση των παρακείμενων δομών, σε απομακρυσμένες μεταστάσεις ή σε παρανεοπλασματικά σύνδρομα.

Τα πιο συνήθη συμπτώματα, που εμφανίζονται στον καρκίνο του πνεύμονα είναι ο επιδεινούμενος βήχας ή το θωρακικό άλγος. Άλλα είναι η αιμόπτυση, η δύσπνοια, η εύκολη κόπωση και η απώλεια σωματικού βάρους. Συμπτώματα που οφείλονται στην

πίεση παρακείμενων θωρακικών δομών περιλαμβάνουν τη δυσφαγία από πίεση του οισοφάγου, το βράγχο φωνής από πίεση των λαρυγγικών νεύρων και σύνδρομο άνω κοίλης φλέβας με οίδημα προσώπου και διάταση των τραχηλικών φλεβών. Συμπτώματα και σημεία από μεταστάσεις περιλαμβάνουν νευρολογικά ελλείματα ή αλλαγές στη συμπεριφορά που παρατηρούνται σε εγκεφαλικές μεταστάσεις, οστικά άλγη από μεταστάσεις σε οστά. Λιγότερο συχνά εμφανίζονται ασθενείς με συμπτώματα και σημεία ενδεικτικά παρανεοπλασματικής συνδρομής όπως είναι η υπερτροφική οστεοαρθροπάθεια με πληκτροδακτυλία και η υπερασβεστιαιμία που οφείλεται στην έκκριση μιας ορμόνης που μιμείται τη δράση της παραθορμόνης.

Η αντικειμενική εξέταση μπορεί να αποκαλύψει την παρουσία διογκωμένων υπερκλείδιων λεμφαδένων, πλευριτικής συλλογής, ατελεκτασίας, ατελώς θεραπευθείσας πνευμονίας ή σημεία σχετιζόμενης με τον καρκίνο πάθησης όπως χρόνιας βρογχίτιδας.

1.1.6 Διάγνωση

Στη διάγνωση της νόσου λαμβάνεται υπόψιν το ιστορικό και η αντικειμενική εξέταση και κατόπιν τα στοιχεία συσχετίζονται με τις συνήθεις εργαστηριακές εξετάσεις, την ακτινογραφία θώρακος, την αξονική τομογραφία θώρακος με σκιαγραφικό, τη βρογχοσκόπηση και οπωσδήποτε με τη βιοψία, με την οποία μπαίνει και η διάγνωση.

1.1.7 Screening

Στους ασθενείς με υψηλό κίνδυνο η μοναδική μέθοδος που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για έλεγχο πληθυσμού για την έγκυρη ανακάλυψη του καρκίνου σε πρώιμο στάδιο είναι η ελικοειδής αξονική τομογραφία χαμηλής δόσης, που έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να παρέμβει στην θνητότητα (53). Έρευνες που χρησιμοποιούσαν άλλες τεχνικές όπως την απλή ακτινογραφία θώρακος και την κυτταρολογική εξέταση των πτυέλων δεν κατάφεραν να αποδείξουν ότι ο έλεγχος πληθυσμού μειώνει τους δείκτες θνητότητας από αυτόν τον τύπο καρκίνου.

1.1.8 Πρόγνωση

Πολλές έρευνες έχουν προσπαθήσει να αναγνωρίσουν τη σημασία που παίζουν κλινικά και παθολογοανατομικά στοιχεία στην πρόγνωση του καρκίνου του πνεύμονα. Κυριότεροι παράγοντες είναι το στάδιο της νόσου, η φυσική κατάσταση του ασθενούς, η απώλεια σωματικού βάρους, η παρουσία ή απουσία συμπτωμάτων τη στιγμή της διάγνωσης , όπως και παθολογοανατομικά στοιχεία όπως είναι το μέγεθος του όγκου, ο βαθμός διαφοροποίησης και ο ιστολογικός τύπος αυτού. Παράγοντες που σχετίζονται με δυσμενή πρόγνωση είναι η παρουσία συμπτωμάτων από το αναπνευστικό σύστημα, μέγεθος όγκου πάνω από 3 cm, ιστολογικός τύπος πλην του πλακώδους, προσβολή των αγγείων και μεταστάσεις σε πολλαπλούς λεμφαδένες.

Επιπλέον, μοριακοί δείκτες παίζουν ρόλο στην πρόγνωση του καρκίνου του πνεύμονα, όπως π.χ το p53, που είναι ένας ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης επιβίωσης. Η μεταλλαγμένη έκφραση του γονιδίου είναι ένας αρνητικός προγνωστικός παράγοντας για τη συνολική επιβίωση των ασθενών με αδενοκαρκίνωμα (54).

Παρόλη την πρόοδο στη θεραπεία που έχει συντελεστεί τις τελευταίες δεκαετίες, η πενταετής επιβίωση των ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα ποικίλει ανάλογα με το στάδιο της νόσου τη στιγμή της διάγνωσης και δεν ξεπερνά το 49% σε ασθενείς με εντοπισμένη νόσο. Σε ασθενείς με απομακρυσμένες μεταστάσεις πέφτει στο 2% ενώ γενικά κατά μέσο όρο η 5ετής επιβίωση των ασθενών δεν ξεπερνά το 16% .

1.1.9 Θεραπεία

Το είδος της θεραπείας που θα χρησιμοποιηθεί εξαρτάται από τον ιστολογικό τύπο του καρκίνου του πνεύμονα, το στάδιο της νόσου, τη γενική κατάσταση υγείας του ασθενή και άλλους παράγοντες νοσηρότητας. Για τον μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα η σταδιοποίηση γίνεται με βάση το σύστημα TNM που λαμβάνει υπόψιν το μέγεθος του πρωτοπαθούς όγκου (T), την παρουσία λεμφαδενικών (N) και απομακρυσμένων μεταστάσεων (M). Για το μικροκυτταρικό καρκίνο ο διαχωρισμός γίνεται σύμφωνα με το σύστημα VALSG σε περιορισμένη νόσο, όταν εντοπίζεται μόνο στο ένα ημιθωράκιο, και σε εκτεταμένη νόσο όταν επεκτείνεται πέραν του ενός

ημιθωρακίου, διαχωρισμός που είναι απαραίτητος δεδομένου ότι οι ασθενείς με περιορισμένη νόσο μπορεί να επωφεληθούν από την ακτινοθεραπεία του θώρακος σε συνδυασμό με τη χημειοθεραπεία που είναι εξάλλου και η θεραπεία εκλογής. Αντίθετα, στο μη μικροκυτταρικό καρκίνο η χειρουργική εξαίρεση του όγκου είναι το κύριο είδος θεραπείας που δυνητικά μπορεί να οδηγήσει σε μακρόχρονη επιβίωση και στην πλήρη ίαση. Χημειοθεραπεία και ακτινοθεραπεία μπορούν να χρησιμοποιηθούν επικουρικά πριν ή μετά το χειρουργείο.

Τα τελευταία χρόνια η αναγνώριση συγκεκριμένων μεταλλάξεων που εμπλέκονται στον καρκίνο του πνεύμονα έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη μοριακά στοχευμένων θεραπειών που περιλαμβάνουν και ειδικούς αναστολείς μεταλλάξεων προκειμένου να βελτιωθεί η επιβίωση ασθενών με μεταστατική νόσο όπως π.χ έχει διαπιστωθεί ότι η έκφραση του p53 προβλέπει ευαισθησία στη σισπλατίνη, ενώ η μετάλλαξή του έχει βρεθεί ότι σχετίζεται με αντίσταση στη σισπλατίνη. Συμπερασματικά, στοχευμένη χημειοθεραπεία βασιζόμενη στο μοριακό προφίλ του κάθε ασθενούς είναι πολλά υποσχόμενη για τη θεραπεία του καρκίνου του πνεύμονα.

1.2 Ιοί και καρκίνος

Ο Π.Ο.Υ. υπολόγισε ότι το 17,8% των ανθρώπινων καρκίνων παγκοσμίως οφείλονται σε λοιμώδη αίτια για το έτος 2002, με το 11,9 % να οφείλονται σε έναν από τους επτά διαφορετικούς ιούς (55). Το σημαντικό με αυτήν τη διαπίστωση είναι ότι πρόκειται για ιούς που είναι εύκολο να προληφθούν με τον εμβολιασμό, μπορούν να ανιχνευθούν με απλές εξετάσεις αίματος και να θεραπευτούν με λιγότερο τοξικές αντιϊκές θεραπείες. Τόσο οι DNA όσο και RNA ιοί είναι ικανοί να προκαλέσουν καρκίνο στον άνθρωπο. Ο ιός Epstein-Barr (EBV), ο ανθρώπινος ερπητοϊός τύπου 8 (HHV-8), ο ιός των ανθρωπίνων θηλωμάτων (HPV), ο ιός της ηπατίτιδας B (HBV) και ο πρόσφατα ανακαλυφθείς πολιόμα ιός των κυττάρων Merkel (MCV ή MCPyV) ανήκουν στους DNA ιούς που μπορούν να προκαλέσουν καρκίνο στον άνθρωπο, ενώ στους RNA ιούς ανήκουν ο ιός της ηπατίτιδας C (HCV) και ο ανθρώπινος T-λεμφοτρόπος ιός τύπου1(HTLV-1) (Πίνακας 1.1).

ΙΟΣ	ΠΟΣΟΣΤΟ ΚΑΡΚΙΝΟΥ	ΤΥΠΟΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ
Ηπατοτρόποι ιοί , περιλαμβανομένου τους ιούς της ηπατίτιδας Β και C	4.9	Ηπατοκυτταρικός καρκίνος [56,57]
Ανθρώπινος Τ-λεμφοτρόπος ιός τύπου1(HTLV-1)	0.03	Τ-λευχαιμία/λέμφωμα των ενηλίκων (ATLL) [58]
Ιός ανθρωπίνων θηλωμάτων (HPV)	5.2	Καρκίνος του τραχήλου της μήτρας [59] , του πρωκτού [59] , του πέους [59] , του αιδοίου [55] , του κόλπου [55] και του στοματοφάρυγγος [55]
Ανθρώπινος ερπητοιός τύπου 8 (HHV-8)	0.9	Σάρκωμα Kaposi, πολυκεντρική νόσο Castleman's και κάποια Β-λεμφώματα
Merkel cell polyomavirus (MCV ή MCPyV)	ΔΔ	Καρκίνωμα από κύτταρα του Merkel
Ιός Epstein–Barr (EBV)	ΔΔ	Λέμφωμα Burkitt's , Λέμφωμα Hodgkin's , στοματοφαρυγγικό καρκίνωμα και λεμφοϋπερπλαστική νόσος μετά από μεταμόσχευση

Πίνακας 1.1 Εκτιμώμενο ποσοστό νέων καρκίνων που οφείλονται σε ιούς παγκοσμίως για το 2002 (55).Δ.Δ σημαίνει ότι δεν υπάρχουν δεδομένα.

Η θεωρία ότι ένας ιός μπορεί να προκαλέσει καρκίνο στον άνθρωπο ξεκίνησε από τα πειράματα των Oluf Bang και Vilhelm Ellerman, που πρώτοι το 1908 απέδειξαν ότι η γριππώδης ερυθροβλάστωση (μια μορφή λευχαιμίας των πτηνών) μπορούσε να μεταδοθεί από εκχύλισμα ελεύθερο κυττάρων (60). Αυτό επιβεβαιώθηκε μεταγενέστερα όσον αφορά στους συμπαγείς όγκους στα πτηνά το 1910-1911 από τον Peyton Rous (61, 62). Ένας κτηνοτρόφος του είχε φέρει ένα κοτόπουλο με μια τεράστια μάζα που εξορμούσε από το στήθος του. Ο Rous ήταν παθολόγος και διέγνωσε ότι η μάζα δεν ήταν άλλο από σάρκωμα. Στην αρχή προσπάθησε να δει αν μπορούσε ο όγκος να μεταφερθεί σε κοτόπουλα που βρίσκονταν πλησίον του. Μόλις το επιβεβαίωσε διαπίστωσε ακόμα ότι κάθε φορά που μεταδιδόταν σε κάποιο άλλο κοτόπουλο, ο καρκίνος γινόταν περισσότερο επιθετικός απ'ότι πριν. Για να διαπιστώσει αν κάποιος λοιμώδης παράγοντας προκαλούσε τον καρκίνο, ο Rous ετοίμασε ένα εκχύλισμα: πολτοποίησε ένα κομμάτι του όγκου μέσα σε λίγο ορό και το διάλυμα το πέρασε μέσα από ένα φίλτρο ώστε να συγκρατηθούν τα βακτήρια και τα καρκινικά κύτταρα. Κατόπιν έκανε ένεση αυτού του εκχυλίσματος σε υγιή κοτόπουλα. Κόντρα στις προσδοκίες του, νέοι όγκοι παρήχθησαν.

Περιγράφοντας αυτά τα πειράματα, ο Rous υπέθεσε ότι ο παράγοντας που προκαλούσε τον καρκίνο ήταν ένας μικροσκοπικός παρασιτικός οργανισμός, ένας ιός.

Την περίοδο που ο Rous έκανε την έρευνα του, ο κόσμος δεν γνώριζε πολλά για τους ιούς ούτε για τις αιτίες που προκαλούσαν καρκίνο. 50 χρόνια μετά, το 1966, η τρομερή ανακάλυψη του Rous αναγνωρίστηκε από την παγκόσμια επιστημονική κοινότητα και ο ίδιος έλαβε το βραβείο Nobel.

Από την αρχή της δεκαετίας του '50 ήταν ήδη γνωστό ότι ιοί μπορούσαν να αφαιρέσουν ή να ενσωματώσουν γονίδια και γενετικό υλικό στα κύτταρα. Τότε είχε για πρώτη φορά προταθεί ότι τα γονίδια που ενσωματώνονται στα κύτταρα του ξενιστή καθιστούν τα κύτταρα αυτά καρκινογόνα. Πολλά από αυτά το ιϊκά γονίδια έχουν ταυτοποιηθεί ως ογκογονίδια, γονίδια που προκαλούν δηλαδή καρκίνο.

Επιδημιολογικά και πειραματικά δεδομένα υπαινίσσονται ότι οι ιοί έχουν αιτιολογική σχέση με τον καρκίνο και μάλιστα θεωρούνται ότι είναι ο δεύτερος πιο σημαντικός παράγοντας κινδύνου για την εμφάνιση καρκίνου στον άνθρωπο, λιγότερο σημαντικός όμως από τη χρήση καπνού (63). Ο τύπος των επαγώμενων από ιούς καρκίνο μπορεί να διαιρεθεί σε δύο κατηγορίες, στους ταχέως μετασχηματιζόμενους

και στους βραδέως μετασχηματιζόμενους. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν ιοί που έχουν γονιδίωμα που κωδικοποιεί ένα ογκογονίδιο που υπερλειτουργεί και λέγεται ιϊκό ογκογονίδιο (v-onc) και το μολυνθέν κύτταρο μετασχηματίζεται σε καρκινικό μόλις το v-onc γονίδιο εκφραστεί. Αντίθετα, στους βραδέως μετασχηματιζόμενους , ειδικά όσον αφορά στους ρετροϊούς όπου το στάδιο της ενσωμάτωσης είναι υποχρεωτικό, το ιϊκό γονιδίωμα ενσωματώνεται, στο γονιδίωμα του ξενιστή πλησίον ενός πρωτο-ογκογονιδίου. Ο εκκινητής του ιού ή κάποιος άλλος ρυθμιστής μεταγραφής με τη σειρά του προκαλεί υπερέκφραση αυτού του πρωτοογκογονιδίου, που στη συνέχεια προκαλεί ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Επειδή η ενσωμάτωση του ιϊκού γονιδιώματος δεν είναι ειδική ως προς τα πρωτο-ογκογονίδια και η πιθανότητα να γίνει ενσωμάτωση πλησίον κάποιου πρωτο-ογκογονιδίου είναι πολύ χαμηλή, οι βραδέως μετασχηματισθέντες ιοί έχουν πολύ μακρά περίοδο λανθάνουσας φάσης, σε αντιδιαστολή με τους ταχέως μετασχηματιζόμενους ιούς, που ήδη φέρουν στο γονιδίωμά τους το ογκογονίδιο.

Η διαδικασία από την ιογενή λοίμωξη μέχρι την ογκογένεση είναι οπωσδήποτε αργή και ανεπαρκής, γι'αυτό και μόνο μία μικρή μειονότητα από τους μολυσμένους ασθενείς θα αναπτύξουν καρκίνο, συνήθως μετά από χρόνια ή δεκαετίες μετά την πρωτοπαθή λοίμωξη. Εξάλλου, η ίδια η λοίμωξη από μόνη της δεν είναι αρκετή για να προκαλέσει καρκίνο, ενώ επιπρόσθετα γεγονότα και παράγοντες από τον ξενιστή, όπως ανοσοκαταστολή, σωματικές μεταλλάξεις, γενετική προδιάθεση και έκθεση σε καρκινογόνα, πρέπει επίσης να παίζουν κάποιο ρόλο.

Ο ιός της ηπατίτιδας Β είναι ένας DNA ιός, που ανήκει στην οικογένεια Hepadnaviridae και προκαλεί νόσο παρόμοια με την νόσο που προκαλεί και ο ιός της ηπατίτιδας C. Μεταδίδεται αιματογενώς και μπορεί να οδηγήσει σε οξεία και χρόνια ηπατίτιδα. Η τελευταία μπορεί να καταλήξει σε κίρρωση και ηπατική ανεπάρκεια ή ακόμα και σε ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Οι λοιμώξεις από ηπατίτιδα Β είναι μια μάστιγα για την παγκόσμια υγεία με 2 δισεκατομμύρια ανθρώπους να μολύνονται κατά προσέγγιση και 1,2 εκατομμύρια θανάτους ανά έτος να αποδίδονται σε ηπατίτιδα, κίρρωση και ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (64).

Ο ιός της ηπατίτιδας C είναι ένας RNA ιός, που ανήκει στην οικογένεια των Flavivirus. Προσβάλλει τα ηπατοκύτταρα και μπορεί να προκαλέσει οξεία και χρόνια ηπατίτιδα. Εκτιμάται ότι περίπου το 3% του πληθυσμού της γης είναι φορείς της ηπατίτιδας C (65). Η χρόνια λοίμωξη από τον ιό της ηπατίτιδας C μπορεί να οδηγήσει

σε κίρρωση και αυτή με τη σειρά της σε ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Περίπου το 1-2% των ασθενών που θα αναπτύξουν κίρρωση θα εμφανίσουν πρωτοπαθές ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα ανά έτος (66). Η μετάδοση του ιού μπορεί να γίνει αιματογενώς, διαμέσου μολυσμένων συρίγγων σε χρήστες ναρκωτικών ουσιών, κατά τη σεξουαλική επαφή και κατά τον τοκετό.

Ο ιός Epstein-Barr (EBV) και ο ανθρώπινος ερπητοϊός τύπου 8 (HHV-8) είναι και οι δύο ερπητοϊοί και έχουν την ικανότητα να παραμένουν σε λανθάνουσα φάση μέσα στα Β λεμφοκύτταρα και κάποια στιγμή να επανεργοποιούνται.Ο ιός EBV είναι ευρέως γνωστός ως το κύριο αίτιο για τη λοιμώδη μονοπυρήνωση. Μεταδίδεται με τη σίελο γι΄αυτό και η ασθένεια που προκαλεί είναι γνωστή ως νόσος του φιλιού. Πάνω από το 95 % των ενηλίκων θεωρούνται οροθετικοί και οι περισσότερες λοιμώξεις από αυτόν τον ιό διατρέχουν υποκλινικώς. Ο ιός σχετίζεται και με πολλές νεοπλασίες όπως Β και Τ λεμφώματα, νόσος του Hodgkin, στοματοφαρυγγικό καρκίνωμα και λεμφοϋπερπλαστική νόσο μετά από μεταμόσχευση. Από αυτές τις κακοήθειες το λέμφωμα Burkitt's και η λεμφοϋπερπλαστική νόσος μετά από μεταμόσχευση εμφανίζονται πιο συχνά σε ασθενείς με ανοσοανεπάρκεια, υποδεικνύοντας κάποιο ρόλο της ανοσοεπιτήρησης στην καταστολής της κακοήθους μετάπλασης.

Το 1994, το DNA του ιού HHV-8 ταυτοποιήθηκε σε βιοψίες από όγκους από ασθενείς με σάρκωμα Kaposi (67) , μια κακοήθεια που ήταν σχετικά σπάνια πριν ξεσπάσει η επιδημία του AIDS. Εκτός του ότι λειτουργεί ως συμπαράγοντας για την εμφάνιση του σαρκώματος Kaposi, πιστεύεται ότι διαδραματίζει κάποιο ρόλο στη νόσο του Castleman και σε κάποια λεμφώματα (68). Το γονιδίωμα του ιού εκφράζεται σε αυτούς τους όγκους, κωδικοποιώντας μεταφραστικές πρωτείνες και αντι-αποπτωτικούς παράγοντες. Ο ιός επίσης ενισχύει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων στα μικρά αγγεία (69). Όπως και με τον ιό EBV τα κύτταρα που κυρίως προσβάλλονται από τον ιό είναι τα Β λεμφοκύτταρα.

Ο ιός HTLV-1 είναι ένας βραδέως μετασχηματιζόμενος RNA ρετροϊός που σχετίζεται με την Τ λευχαιμία/λέμφωμα των ενηλίκων (ATLL) (70). Ο ιός έχει μια ευρεία κατανομή, με μία εκτίμηση της τάξεως των 12-25 εκατομμυρίων μολυσμένων ατόμων παγκοσμίως. Μεταδίδεται αιματογενώς, μέσω μετάγγισης αίματος, κατά τη σεξουαλική επαφή και κατά τη διάρκεια του τοκετού. Ο ιός έχει έναν ιδιαίτερο τροπισμό για τα κύτταρα CD4, που πολλαπλασιάζονται κλωνικά στην Τλευχαιμία/λέμφωμα των ενηλίκων. Αυτός ο τύπος λευχαιμίας εμφανίζεται κυρίως

στη Νότια Ιαπωνία, στην Καραϊβική, στην Κεντρική Αφρική, σε περιοχές της Νότιας Αμερικής και σε πληθυσμούς μεταναστών στη νοτιοανατολική Η.Π.Α.

Ο ιός HTLV-1 έχει μια μακρά λανθάνουσα περίοδο από 20 μέχρι 30 χρόνια, αλλά από τη στιγμή που θα ξεκινήσει ο μετασχηματισμός, η εξέλιξη είναι ραγδαία.Η πιθανότητα να αναπτύξει ATLL κάποιος που θα μολυνθεί από τον ιό είναι περίπου 5% μετά από μια μακρά περίοδο ελεύθερης συμπτωμάτων. Η χημειοθεραπεία μπορεί να προκαλέσει μια αρχική ανταπόκριση με μερική ή πλήρη ύφεση. Ωστόσο η υποτροπή είναι ο κανόνας γι΄αυτό και η μέση επιβίωση δεν ξεπερνά τους 8 μήνες.

Ο ιός MCV ανακαλύφθηκε το 2008 σε μια σπάνια αλλά αρκετά επιθετική μορφή καρκίνου του δέρματος που εξορμά από νευροενδοκρινικά κύτταρα και λέγεται καρκίνωμα από κύτταρα Merkel. Οι περισσότεροι άνθρωποι προσβάλλονται από τον ιό σε κάποια φάση της ζωής τους (συνήθως στην παιδική ηλικία) αλλά δεν εμφανίζουν συμπτώματα. Λίγοι από αυτούς όμως θα αναπτύξουν το καρκίνωμα. Το 80% των περιπτώσεων καρκινώματος από κύτταρα Merkel σχετίζεται με τη λοίμωξη από αυτόν τον ιό. Από τη στιγμή που ανακαλύφθηκε η αιτιολογική σχέση του ιού με το συγκεκριμένο τύπο καρκίνωματος έχουν γίνει πολλές έρευνες για τη σχέση του ιού με τον καρκίνο του πνεύμονα και άλλες μορφές ανθρώπινου καρκίνου. Στο μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα ο ιός MCV έχει ανευρεθεί είτε μόνος (71) είτε σε συνδυασμό με τον ιό HPV στο 33% των καρκινοπαθών (72).

Υπάρχουν και κάποιοι ιοί που η σχέση τους με τον καρκίνο στον άνθρωπο δεν έχει ακόμα αποδειχθεί ή είναι αβέβαιη. Σε αυτήν την κατηγορία ανήκει ο ιός Simian 40 (SV40). Ο ιός συνήθως μολύνει τον πίθηκο. Κάποια εμβόλια που κατασκευάστηκαν μεταξύ του 1955-1963 χρησιμοποιούσαν κύτταρα από πίθηκο που αργότερα βρέθηκαν ότι είχαν μολυνθεί από τον ιό SV40. Κάποιες παλιότερες έρευνες υπαινίσσονταν ότι ο ιός μπορεί να αυξήσει τον κίνδυνο ενός ατόμου να εμφανίσει μεσοθηλίωμα, όπως και καρκίνο στον εγκέφαλο, καρκίνο στα οστά και λεμφώματα αλλά η αξιοπιστία αυτών των ερευνών αμφισβητείται.

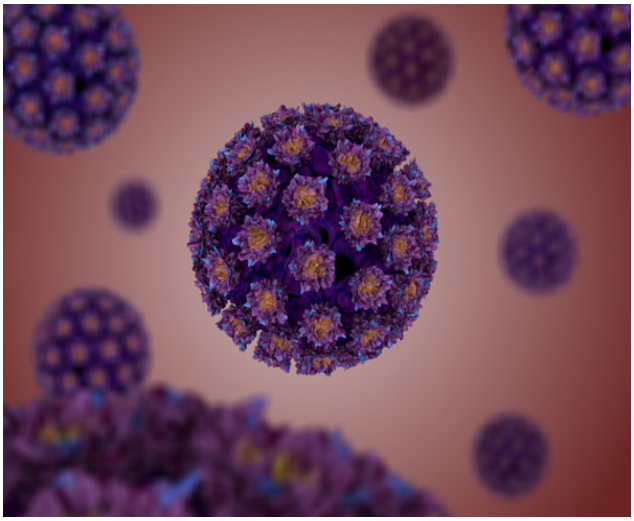
Ερευνητές έχουν παρατηρήσει ότι ο ιός SV40 μπορεί να καταστήσει τα κύτταρα πιθήκου, που καλλιεργούνται στα εργαστήρια σε καρκινωματώδη. Ωστόσο μέχρι τώρα οι μεγαλύτερες έρευνες που έχουν ασχοληθεί με αυτό το ζήτημα δεν έχουν αποδείξει αυξημένο κίνδυνο για την ανάπτυξη μεσοθηλιώματος ή άλλης μορφής καρκίνου στους ανθρώπους που εμβολιάστηκαν με τα μολυσμένα με τον ιό εμβόλια

της πολιομυελίτιδας ως παιδιά. Εν κατακλείδι αν και ο ιός προκαλεί καρκίνο σε πειραματόζωα, δεν έχει αποδειχθεί ότι προκαλεί καρκίνο στον άνθρωπο.

1.3 Ο ιός HPV

Παγκοσμίως, η λοίμωξη από HPV είναι η πιο συχνά μεταδιδόμενη σεξουαλικά νόσος. Περίπου το 50% των ενεργά σεξουαλικών γυναικών και ανδρών έχουν εκτεθεί στον ιό κάποια στιγμή στη ζωή τους. Πολλοί ειδικοί πάλι υποστηρίζουν ότι σχεδόν όλοι οι σεξουαλικά ενεργοί ενήλικες έχουν προσβληθεί από τον ιό αλλά επειδή στην πλειονότητά τους δεν προκαλούν νόσο, δεν έχουν γίνει αντιληπτοί.

Ο HPV είναι ένας μικρός DNA ιός (Εικόνα 1.6) που προσβάλλει το δέρμα και τους βλεννογόνους των ανθρώπων. Ανήκει στην μεγάλη οικογένεια των Papillomavirus που έχουν την ικανότητα να μολύνουν τα κερατινοκύτταρα. Ο ιός φέρει ένα δίκλωνο μόριο DNA μέσα σε καψίδιο και στο γονιδίωμά του έχει 8000 ζεύγη βάσεων που κωδικοποιούν 8 πρωτεΐνες περιλαμβανομένου τις δομικές πρωτείνες του καψιδίου L1 και L2.



Εικόνα 1.6 Ο ιός HPV

Ο επιπολασμός της λοίμωξης από τον ιό εμφανίζει δύο κορυφώσεις. Μία την πρώτη δεκαετία της έναρξης της σεξουαλικής ζωής περίπου μεταξύ 15-25 χρόνων στις

δυτικές κοινωνίες και μια δεύτερη κορύφωση μετά την εμμηνόπαυση αν και ούτε οι αιτίες (επανανεργοποίηση ή επαναμόλυνση) ούτε η κλινική της σημασία (κίνδυνος καρκινογένεσης) έχουν κατανοηθεί πλήρως (73).Παγκοσμίως το 2002, 561.200 νέα περιστατικά καρκίνου (5,2% των νέων περιστατικών καρκίνου συνολικά) οφείλονταν στον ιό HPV καθιστώντας τον ιό τον πιο σημαντικό λοιμώδη παράγοντα σαν αίτιο καρκίνου (74). Οι υψηλού κινδύνου γονότυποι του HPV ευθύνονται για το 99,7% όλων των καρκίνων του τραχήλου της μήτρας (75). Ο πίνακας που ακολουθεί δείχνει την επίπτωση των καρκίνων που σχετίζονται με τον ιό την περίοδο 2004-2008 στις Η.Π.Α (Πίνακας 1.2).

Περιοχή εντόπισης καρκίνου	**Μέσος όρος περιστατικών Ανά έτος**	**Αριθμός περιστατικών που αποδίδονται στον HPV (Κατ'εκτίμηση)**	**Αριθμός περιστατικών που αποδίδονται στους HPV 16 και 18 (Κατ'εκτίμηση)**
Τράχηλος μήτρας	11.967	11.500	9.100
Αιδοίο	3.136	1.600	1.400
Κόλπος	729	500	400
Πέος	1.046	400	300
Πρωκτός (θήλεα)	3.089	2.900	2.700
Πρωκτός (άρρενα)	1.678	1.600	1.500
Στοματοφάρυγγας (θήλεα)	2.370	1.500	1.400
Στοματοφάρυγγας (άρρενα)	9.356	5.900	5.600
Σύνολο (θήλεα)	21.291	18.000	15.000
Σύνολο (άρρενα)	12.080	7.900	7.600

Πίνακας 1.2 Επίπτωση των καρκίνων που σχετίζονται με τον ιό HPV την περίοδο 2004-2008 στις Η.Π.Α

Πάνω από 30-40 τύποι HPV μπορούν να μεταδοθούν σεξουαλικά και να προκαλέσουν βλάβες στην πρωκτογεννητική περιοχή. Κάποιοι από αυτούς προκαλούν τα κονδυλώματα (Πίνακας 1.3).

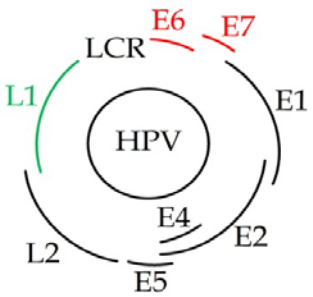
ΑΣΘΕΝΕΙΑ	ΓΟΝΟΤΥΠΟΣ HPV
Κονδυλώματα	2,7,22
Πελματιαία κονδυλώματα	1,2,4,63
Επίπεδα κονδυλώματα	3,8,10
Κονδυλώματα πρωκτογεννητικής περιοχής	6, 11, 42, 44 και άλλα
Δυσπλαστικές βλάβες του πρωκτού	6, 16, 18, 31, 53, 58
Καρκίνος Γεννητικού συστήματος	• Πολύ υψηλού κινδύνου: 16, 18, 31, 45 • Άλλοι υψηλού κινδύνου: 33, 35, 39, 51, 52, 56, 58, 59 • Πιθανόν υψηλού κινδύνου: 26, 53, 66, 68, 73, 82
Ακροχορδονοειδής επιδερμοδυσπλασία	Πάνω από 15 τύποι
Εστιακή επιθηλιακή υπερπλασία (στοματικής κοιλότητας)	13,32
Θηλώματα στοματικής κοιλότητας	6, 7, 11, 16, 32
Καρκίνος στοματοφάρυγγα	16
Κύστη Verrucous	60
Θηλώματα λάρυγγος	6, 11

Πίνακας 1.3 Οι διάφοροι τύποι HPV και οι ασθένειες που προκαλούν

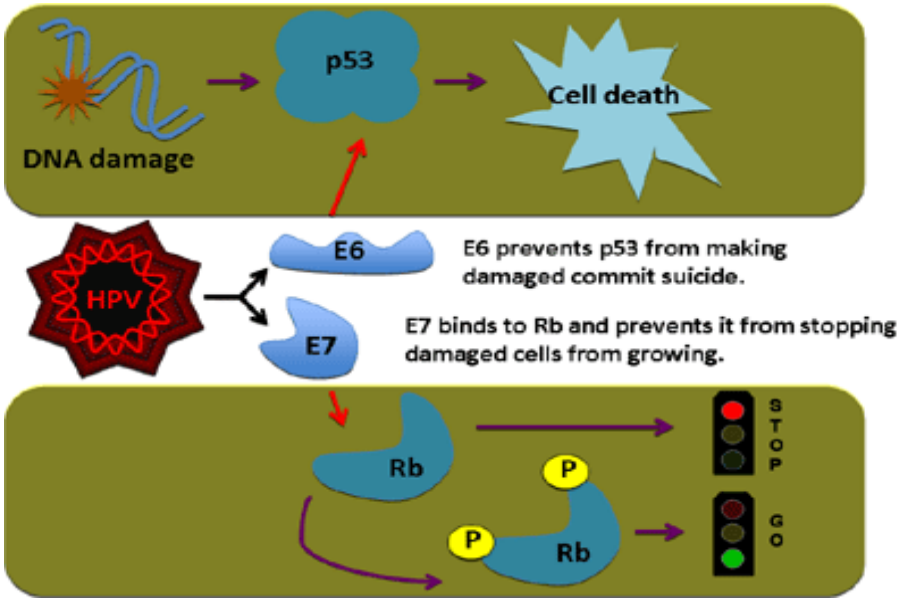
Μέχρι σήμερα έχουν απομονωθεί πάνω από 100 γονότυποι HPV, 15 από τους οποίους έχουν ταξινομηθεί ως υψηλού κινδύνου (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82) (76), διότι εμπλέκονται στην εμφάνιση ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας τραχήλου της μήτρας υψηλού βαθμού και καρκίνου στο ίδιο όργανο (77), ενώ οι γονότυποι 16 και 18 μόνοι τους ευθύνονται για το 70 % των

περιπτώσεων καρκίνου τραχήλου της μήτρας. Ωστόσο στις περισσότερες περιπτώσεις η μόλυνση δεν οδηγεί σε νόσο, πιθανώς διότι ο ιός καθαιρείται από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή (78). Το 70% των μολύνσεων από HPV σε νεαρούς άνδρες και γυναίκες θα υποχωρήσει αυτόματα τον πρώτο χρόνο και το 90% το δεύτερο χρόνο. Ωστόσο στο 5-10% των περιπτώσεων που η μόλυνση θα επιμείνει υπάρχει αυξημένος κίνδυνος να προκληθούν προκαρκινοματώδεις βλάβες στον τράχηλο και να οδηγήσουν σε επιθετικό καρκίνο. Αυτή η μετάβαση συνήθως διαρκεί χρόνια δίνοντας την ευκαιρία για έγκαιρη ανίχνευση και θεραπεία στα αρχικά στάδια της νόσου.

Είναι πλέον αποδεδειγμένο ότι η μόλυνση και η παραμονή του ιού είναι απαραίτητη συνθήκη για την εκδήλωση του καρκίνου τραχήλου της μήτρας (59). Οι πιο κοινοί ογκογόνοι τύποι HPV για τον καρκίνο τραχήλου της μήτρας είναι ο HPV16 και ο HPV18 προκαλώντας περίπου το 70% όλων των περιστατικών (79). Η επίμονη μόλυνση από υψηλού κινδύνου στελέχη HPV και η ενσωμάτωση του ιϊκού γονιδιώματος στο γονιδίωμα του ξενιστή αποτελούν τα γεγονότα κλειδιά για την εκδήλωση του καρκίνου. Αυτή η ενσωμάτωση προκαλεί διακοπή της λειτουργίας του γονιδίου E2 του ιού, που είναι ένας αρνητικός ρυθμιστής του εκκινητή των E6 και E7 γονιδίων (80) (Εικόνα 1.7). Όλα αυτά έχουν σαν αποτέλεσμα την υπερέκφραση των E6 και E7 ογκογονιδίων που στοχεύουν στα P53 και Rb ογκοκατασταλτικά γονίδια αντίστοιχα με αποτέλεσμα την απώλεια ελέγχου του κυτταρικού κύκλου και τον απρόσκοπτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Εικόνα 1.8).



Εικόνα 1.7 Το γονιδίωμα του ιού HPV



Εικόνα 1.8 Η επίδραση των πρωτεινών Ε6 και Ε7 του ιού HPV στον κυτταρικό κύκλο του ξενιστή

Ο ιός μεταδίδεται με την άμεση επαφή με το δέρμα και τους βλεννογόνους του πάσχοντα ατόμου και κυρίως με τη σεξουαλική επαφή. Αυτοενοφθαλμισμός μπορεί να γίνει και στον ίδιο τον πάσχοντα. Η μετάδοση από τη μητέρα στο νεογνό κατά τη διάρκεια του φυσιολογικού τοκετού είναι πιθανή αλλά πολύ σπάνια μπορεί να οδηγήσει στην εκδήλωση αναπνευστικής θηλωμάτωσης στα παιδιά σε εφηβική ηλικία. Αν και παλιότερα δεν θεωρείτο ότι ο ιός μεταδίδεται με τη μετάγγιση αίματος, η αποκάλυψη ότι DNA του ιού έχει απομονωθεί από την κυκλοφορία γυναικών με καρκίνο τραχήλου της μήτρας (81) οδήγησε στην αμφισβήτηση αυτής της δοξασίας.

Στα μέτρα για την πρόληψη της λοίμωξης από τον ιό περιλαμβάνεται η σεξουαλική αποχή, ο εμβολιασμός και η χρήση προφυλακτικών. Δύο τύποι εμβολίων είναι διαθέσιμοι στο εμπόριο. Και τα δύο προστατεύουν από του ιούς HPV16 και 18 που ευθύνονται για την πλειονότητα των καρκίνων, ενώ το ένα από αυτά παρέχει προστασία έναντι των τύπων 6 και 11 που προκαλούν το 90% των γεννητικών κονδυλωμάτων. Τα εμβόλια είναι λιγότερο αποτελεσματικά σε γυναίκες που έχουν ήδη μολυνθεί από τους τύπους 16 και 18 δηλαδή στις περισσότερες σεξουαλικά ενεργές γυναίκες. Γι΄αυτό το εμβόλιο συστήνεται να γίνεται σε κορίτσια πριν την έναρξη της σεξουαλικής τους ζωής.

Από την άλλη πλευρά το προφυλακτικό φαίνεται ότι δεν προσφέρει τόση αποτελεσματική προστασία απέναντι στον ιό όπως στα άλλα σεξουαλικά μεταδιδόμενα νοσήματα. Κι αυτό γιατί περιοχές που μπορεί να έχουν βλάβες από τον ιό δεν μπορούν να καλυφθούν ή να προστατευτούν από το προφυλακτικό.

Εξέταση με μοριακές τεχνικές για τον ιό σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες γίνονται μόνο σε γυναίκες που υπάρχει ισχυρή υποψία όπως π.χ ανωμαλίες στο τεστ Παπανικολάου. Σε περίπτωση που υπάρχει λοίμωξη από υψηλού κινδύνου στέλεχος HPV συστήνονται και πιο επιθετικές τεχνικές και πιο συχνή παρακολούθηση με κολποσκόπηση ακόμα και με βιοψία. Ασθενείς με βλάβες από χαμηλού κινδύνου στελέχη δεν χρήζουν εξέτασης για τον ιό. Κι αυτό γιατί η επιβεβαίωση της διάγνωσης δεν θα οδηγήσει σε θεραπεία και συνεπώς το αποτέλεσμα από το τέστ δεν αλλάζει την ιατρική φροντίδα του ασθενή (82).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2ο

2. Σκοπός της προτεινόμενης διδακτορικής διατριβής

Το 1979 πρώτη η Syrjanen υπέθεσε ότι συγκεκριμένοι τύποι HPV ευθύνονται για τον καρκίνο του πνεύμονα, παρατηρώντας ότι οι επιθηλιακές βλάβες στα βρογχογενή καρκινώματα έμοιαζαν αρκετά με τα εξωφυτικά και τα επίπεδα κονδυλώματα που προκαλούσε ο ιός στο γεννητικό σύστημα (83). Τα τελευταία τριάντα χρόνια έχουν γίνει πολυάριθμες επιστημονικές δημοσιεύσεις που υποδεικνύουν την πιθανή αιτιολογική συσχέτιση του ιού HPV με τον καρκίνο του πνεύμονα. Διαπιστώθηκε όμως μεγάλη ποικιλία ως προς τον επιπολασμό της λοίμωξης από τον ιό HPV στις διάφορες μελέτες που εκπονήθηκαν σε διάφορες χώρες, με μεγάλη φυλετική και γεωγραφική ποικιλομορφία. Εξαιτίας αυτής της μεγάλης διαφοράς στον επιπολασμό, ο ρόλος του ιού στον μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα παραμένει υπό διερεύνηση (84-89).

Η παρουσία του ιού HPV στο αναπνευστικό σύστημα ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα έχει διερευνηθεί από τη δική μας ερευνητική ομάδα και από άλλες μέσω της αναζήτησης του ιού σε βρογχικά εκπλύματα, φρέσκα δείγματα από πνευμονικό ιστό και τομές παραφίνης από πνευμονικό ιστό (85-88). Ωστόσο τα αποτελέσματα από τις παραπάνω μελέτες είναι ασαφή, εξαιτίας της ετερογένειας ως προς τις γεωγραφικές περιοχές που συμμετείχαν και τις μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν. Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται αύξηση στη συχνότητα ανεύρεσης διάφορων ιών κυρίως εξαιτίας της μεγάλης προόδου που έχει συντελεσθεί στις μεθόδους ανίχνευσής τους. Το πρώτο άρθρο ανασκόπησης για τη συμμετοχή του ιού HPV στον καρκίνο του πνεύμονα περιλάμβανε 2.468 περιπτώσεις ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα (90). Στην πρώτη μετα-ανάλυση συμπεριλήφθησαν 100 έρευνες με 7,381 περιστατικά καρκίνου του πνεύμονα από διάφορα μέρη ανά την υφήλιο (87). Συνολικά 1.653 (22,4%) δείγματα ανευρέθησαν θετικά για τον ιό HPV, γεγονός που συμφωνεί με τα προηγούμενα reviews το 2002 (90) και το 2008 (με λίγο υψηλότερο επιπολασμό, στο 24,5%) (87).

Η διευκρίνιση της σχέσης μεταξύ του καρκίνου του πνεύμονα και λοιμωδών παραγόντων όπως είναι οι ιοί, μπορεί να οδηγήσει σε καλύτερη κατανόηση της επίπτωσης του καρκίνου στους μη-καπνιστές. Αν και το κάπνισμα ευθύνεται για την

πλειονότητα των περιστατικών του καρκίνου του πνεύμονα, το γεγονός ότι μία μειονότητα μόνο των καπνιστών αναπτύσσει τελικά καρκίνο καθιστά αυτή τη νόσο ένα σημαντικό μοντέλο για την εκτίμηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ γονιδιακού και φυσικού περιβάλλοντος.

Όσον αφορά στην Ευρώπη, η αιτιολογική σχέση μεταξύ του ιού HPV και του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα δεν έχει διερευνηθεί πλήρως. Γι΄αυτό στην παρούσα διατριβή αναζητήσαμε την παρουσία του ιού ανάμεσα σε 100 ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα ανιχνεύοντας το DNA του ιού με Real-Time PCR, προκειμένου να ανευρεθεί σε τι ποσοστό του καρκίνου του πνεύμονα ανευρίσκεται ο ιός και ποιοι είναι οι γονότυποι του ιού που απαντώνται. Τα παραπάνω αποτελέσματα συσχετίστηκαν με τα κλινικά - παθολογικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων, με σκοπό να βρεθεί κατά πόσο οι συγκεκριμένοι γονότυποι μπορούν να αποτελέσουν προγνωστικούς δείκτες της ανάπτυξης και εξέλιξης του καρκίνου του πνεύμονα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^{ο}

3.Υλικά και μέθοδοι

3.1 Ασθενείς

Στη μελέτη συμπεριλήφθησαν 91 άνδρες και 9 γυναίκες που έπασχαν από μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα που επελέγησαν τυχαία στην Κρήτη μεταξύ 1996-2009. Τα κριτήρια με βάση τα οποία επελέγησαν οι ασθενείς ήταν τα εξής: 1) όλοι έπασχαν από πρωτοπαθή μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα ανεξαρτήτως σταδίου και ιστολογικού τύπου, 2) κανείς από αυτούς δεν είχε λάβει χημειοθεραπεία ή ακτινοθεραπεία προεγχειρητικά, 3) οι βιοψίες εξετάσθηκαν από έμπειρους παθολογοανατόμους του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου.

Όσον αφορά στις καπνιστικές συνήθειες των ασθενών, 7 (15,5%) ήταν μη καπνιστές, 9 (20%) κάπνιζαν λιγότερο από 30 πακέτα/έτος (p/y), 15 ασθενείς (33.3%) κάπνιζαν μεταξύ 31 και 60 p/y , και 14 (31.1 %) κάπνιζαν περισσότερα από 61 p/y , ενώ για 55 ασθενείς δεν υπάρχουν δεδομένα. Η μέση ηλικία των ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα ήταν 62,8 έτη (SD 11,1).

Όσον αφορά στις λειτουργικές δοκιμασίες του πνεύμονα, ο λόγος του βίαια εκπνεόμενου όγκου στο 1 δευτερόλεπτο (FEV1) προς τη βίαιη ζωτική χωρητικότητα (FVC) ήταν 0,76 (SD 11.37) και η FEV1% ήταν 82,3% (SD 18.9). Η κατανομή ήταν η εξής σύμφωνα με τη σοβαρότητα της πάθησης: 3,0% είχαν FEV1 λιγότερο από 50% (1 περιστατικό), 35,3% είχαν μεταξύ 50 και 80% (12 περιστατικά), και 61,7 % είχαν FEV1 ίση ή μεγαλύτερη από 80% (21 περιστατικά). Για τα υπόλοιπα περιστατικά δεν ανευρέθησαν δεδομένα.

Ασθενείς που είχαν λάβει θεραπεία πριν το χειρουργείο, με απομακρυσμένες μεταστάσεις ή με συνυπάρχουσες άλλες νεοπλασίες τη στιγμή της διάγνωσης αποκλείστηκαν από τη μελέτη. Οι ιστολογικοί τύποι που συμπεριλήφθησαν ήταν 39 πλακώδους καρκινώματος, 50 αδενοκαρκινώματα και 5 δείγματα με μεικτούς χαρακτήρες από πλακώδες και αδενοκαρκίνωμα, 5 αδιαφοροποίητα μη μικροκυτταρικά καρκινώματα και 1 καρκίνωμα από μεγάλα κύτταρα. Οι λειτουργικές

δοκιμασίες του πνεύμονα έγιναν 1-3 μήνες πριν από τη βιοψία και εκφράστηκαν ως ποσοστό από τις αναμενόμενες φυσιολογικές τιμές.

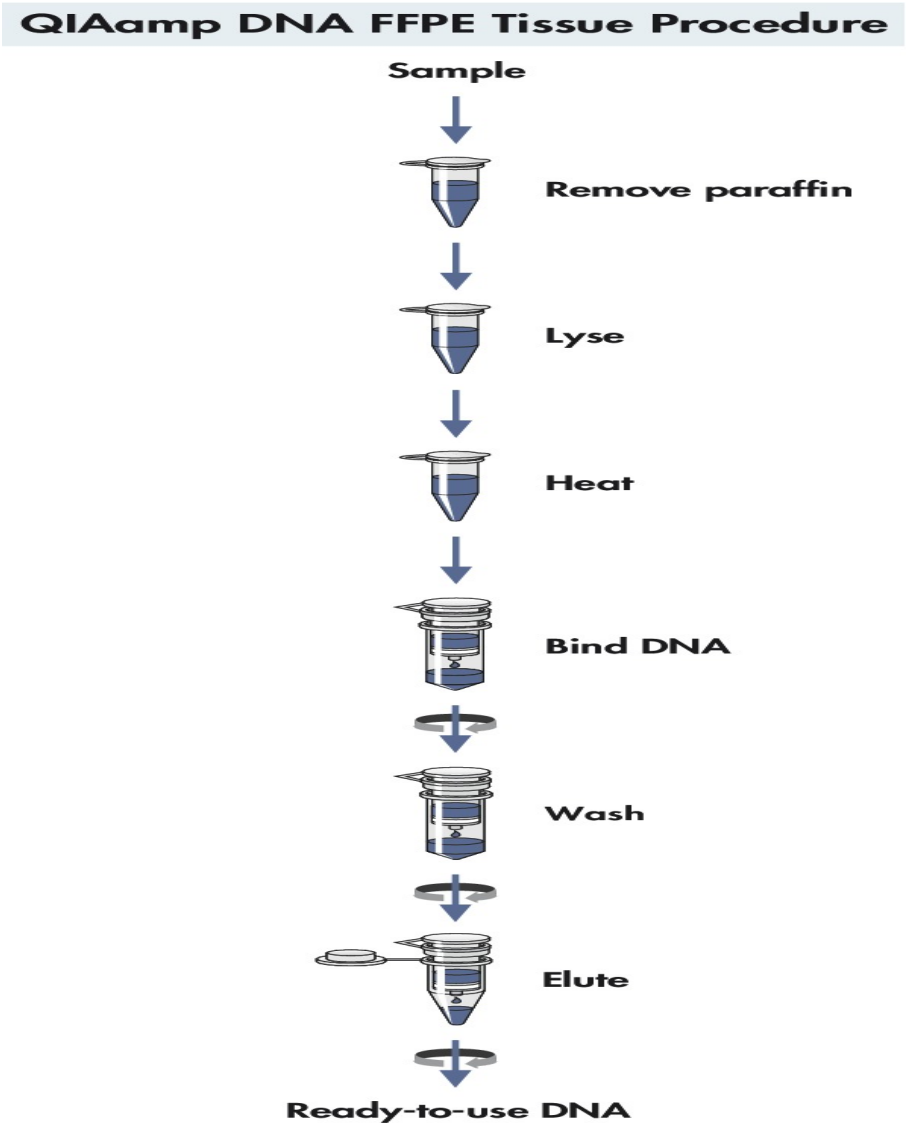
Για τη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν 16 δείγματα ως αρνητικοί μάρτυρες. Τέσσερα από αυτά προήλθαν από υγιείς ιστούς πλησίον του καρκίνου και τα υπόλοιπα δώδεκα ελήφθησαν από ασθενείς με ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση. Όλοι οι ασθενείς και οι μάρτυρες που συμπεριλήφθησαν στην έρευνα είχαν δώσει γραπτή συγκατάθεση για τη συμμετοχή τους στην έρευνα (παράρτημα 1). Η μελέτη εγκρίθηκε από το Επιστημονικό Συμβούλιο του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου (παράρτημα 2).

3.2 Δείγματα

Βιοψίες από πνευμονικό παρέγχυμα ελήφθησαν από τους ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα και από τους μάρτυρες. Χρησιμοποιώντας ένα αποστειρωμένο νυστέρι πάρθησαν τρεις με πέντε τομές πάχους 5 μm από τα τεμάχια της βιοψίας του κάθε ασθενούς μονιμοποιημένα με παραφίνη και μεταφέρθηκαν σε σωληνάρια eppendorf στο τμήμα Παθολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου. Κατά τη διάρκεια της παραπάνω διαδικασίας ελήφθησαν όλα τα μέτρα προκειμένου να αποφευχθούν τυχόν επιμολύνσεις μεταξύ των δειγμάτων.

3.3 Εκχύλιση DNA

Για να αφαιρεθεί η παραφίνη και για να γίνει η εκχύλιση του DNA από τα δείγματα χρησιμοποιήθηκε το κιτ της QIAamp DNAFFPE Tissue Kit (Cat. No 56404 QIAGEN) και ακολουθήθηκε η διαδικασία του κατασκευαστή. Η διαδικασία μπορεί να συνοψιστεί σε 6 στάδια: (1) απομάκρυνση της παραφίνης και διάλυση αυτής με ξυλόλη, (2) το δείγμα λύεται μετά από αποδόμηση που υπέστη κατά την επεξεργασία με πρωτεινάση Κ, (3) επώαση στους 90° C ούτως ώστε να καταστραφούν οι διασταυρούμενοι δεσμοί της φορμαλίνης, (4) το DNA δεσμεύεται από τη μεμβράνη και οι επιμολυντικοί παράγοντες ανέρχονται στην επιφάνεια, (5) οι επιμολυντικοί παράγοντες με διαδοχικά πλυσίματα απομακρύνονται, (6) καθαρό και συμπυκνωμένο DNA εκχυλίζεται από τη μεμβράνη (Εικόνα 3.1).



Εικόνα 3.1 Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας εκχύλισης DNA

Συγκεκριμένα, μέσα στο σωληνάριο eppendorf που περιέχει το δείγμα μας προσθέσαμε 1 ml ξυλόλη. Κλείσαμε το καπάκι και αναδεύσαμε στο vortex για 10 sec. Κατόπιν φυγοκεντρήσαμε σε πλήρεις στροφές για 2 min σε θερμοκρασία δωματίου. Αφαιρέσαμε με τη βοήθεια πιπέττας το υπερκείμενο με προσοχή ώστε να μην παρασύρουμε καθόλου ίζημα. Στη συνέχεια προσθέσαμε στο σωληνάριο 1 ml αιθανόλης (97%) και αναδεύσαμε με vortex. Η αιθανόλη εκχυλίζει τυχόν υπολλείματα ξυλόλης από το δείγμα. Κατόπιν φυγοκεντρήσαμε σε πλήρεις στροφές για 2 min σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια αφαιρέσαμε το υπερκείμενο με τη βοήθεια πιπέττας. Χρησιμοποιώντας λεπτό ρύγχος απομακρύναμε οποιοδήποτε κατάλοιπο αιθανόλης. Ανοίξαμε το καπάκι από το σωληνάριο και αφήσαμε το δείγμα να επωαστεί στους 37° C μέχρι που εξατμίστηκε όλη η αιθανόλη, που είχε απομείνει.

Έπειτα διαλύσαμε το ίζημα σε 180 μL από το ρυθμιστικό διάλυμα ATL και προσθέσαμε 20μL πρωτεινάσης K και αναδεύσαμε με vortex. Στη συνέχεια επωάσαμε στους 56° C μέχρι να διαλυθούν πλήρως οι κυτταρικοί δεσμοί και έπειτα επωάσαμε στους 90° C για 1 ώρα. Η επώαση στους 90° C με το ρυθμιστικό διάλυμα ATL αντιστρέφει μερικώς την αλλαγή που προκαλεί στο νουκλεικό οξύ η φορμαλδεύδη. Μετά φυγοκεντρήσαμε για λίγο το σωληνάριο προκειμένου να απομακρυνθούν τυχόν σταγονίδια από το εσωτερικό του πώματος. Έπειτα προσθέσαμε 200 μL από το ρυθμιστικό διάλυμα AL και αναδεύσαμε με vortex. Στη συνέχεια προσθέσαμε 200 μL αιθανόλης (97%) και αναδεύσαμε με vortex. Φυγοκεντρήσαμε για λίγο για να απομακρυνθούν τυχόν σταγονίδα από την εσωτερική πλευρά του πώματος. Προσεκτικά μεταφέραμε ολόκληρο το προϊόν της επεξεργασίας σε μια στήλη QIAmp MinElute (μέσα σε ένα σωληνάριο συλλογής των 2 ml) χωρίς να ακουμπήσουμε το χείλος, κλείσαμε το καπάκι και φυγοκεντρήσαμε στις 8000 στροφές για 1 λεπτό. Στη συνέχεια μεταφέραμε τη στήλη QIAmp MinElute σε ένα καθαρό σωληνάριο συλλογής των 2 ml και απορρίψαμε το προηγούμενο σωληνάριο συλλογής που περιείχε το διάλυμα που είχε υπερχειλιστεί. Ανοίξαμε τη στήλη QIAmp MinElute και προσθέσαμε 500 μl από το ρυθμιστικό διάλυμα AW1 χωρίς να ακουμπήσουμε το χείλος. Κλείσαμε το καπάκι και φυγοκεντρήσαμε στις 8000 στροφές για 1 λεπτό. Στη συνέχεια μεταφέραμε τη στήλη QIAmp MinElute σε ένα καθαρό σωληνάριο συλλογής των 2 ml και απορρίψαμε το προηγούμενο σωληνάριο συλλογής που περιείχε το διάλυμα που είχε υπερχειλιστεί. Δόθηκε ιδιαίτερη προσοχή ώστε να μην έρθουν σε επαφή η στήλη QIAmp MinElute με το σωληνάριο συλλογής των 2 ml μετά την απομάκρυνσή τους από τη φυγόκεντρο. Κατόπιν φυγοκεντρήσαμε στις 14.000 στροφές για 3 λεπτά για να φύγει οποιαδήποτε υγρασία από τη μεμβράνη, διότι διαφορετικά η αιθανόλη που μπορεί να είχε απομείνει πιθανόν να είχε παρέμβει στις διαδικασίες που ακολούθησαν. Έπειτα τοποθετήσαμε τη στήλη QIAmp MinElute σε ένα καθαρό σωληνάριο eppendorf και απορρίψαμε το προηγούμενο σωληνάριο συλλογής που περιείχε το διάλυμα που είχε υπερχειλιστεί. Προσεκτικά ανοίξαμε το καπάκι της στήλης QIAmp MinElute και τοποθετήσαμε 50μl από το ρυθμιστικό διάλυμα ATE στο κέντρο της μεμβράνης. Κλείσαμε το καπάκι και επωάσαμε σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά και μετά φυγοκεντρήσαμε στις 14.000 στροφές για 1 λεπτό.

Σε όλα τα δείγματα προσδιορίστηκε η καθαρότητα και η συγκέντρωση του DNA με φωτομέτρηση σε φωτόμετρο NanoDrop™ ND1000 στα 260 και 280 nm. Συγκεκριμένα, η ποσότητα του DNA προσδιορίζεται στα 260nm, στηριζόμενοι στο γεγονός ότι διάλυμα DNA που είναι 50μg/ml έχει απορρόφηση 1 a.u. (absorbance units). Το πηλίκο της απορρόφησης 260nm/280nm, αποτελεί μέτρο της καθαρότητας των νουκλεινικών οξέων που θέλουμε να μετρήσουμε. Ο εσωτερικός ποιοτικός έλεγχος των δειγμάτων έγινε με τον επιτυχή πολλαπλασιασμό του γονιδίου της ακτίνης με PCR . Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -20° C στο εργαστήριο Κλινικής Ιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου της Κρήτης μέχρι την ημέρα που έγιναν τα πειράματα με τη RT-PCR. Η απομόνωση του DNA έγινε σε διαφορετικό χώρο εργαστηρίου από ότι τα πειράματα της PCR και δόθηκε ιδιαίτερη προσοχή προκειμένου να αποφευχθούν τυχόν επιμολύνσεις μεταξύ των δειγμάτων.

3.4 REAL TIME - PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-time PCR) είναι μια μέθοδος όπου κατά τον πολλαπλασιασμό της επιθυμητής αλληλουχίας, μπορεί να γίνει ποσοτικοποίηση των προϊόντων της αντίδρασης. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση μιας ειδικής χρωστικής, η οποία όταν προσδένεται σε δίκλωνο μόριο DNA, έχει την ικανότητα να φθορίζει. Έτσι, η ποσοτικοποίηση γίνεται με βάση την ένταση φθορισμού του κάθε δείγματος.

Για την ενίσχυση της συγκεκριμένης αλληλουχίας που μας ενδιαφέρει χρησιμοποιήθηκαν οι γενικοί εκκινητές GP5+ (5’-TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC-3’) και GP6+ (3’-CTT ATA CTA AAT GTC AAA TAA AAA G-5’) που στοχεύουν στην περιοχή του γονιδιώματος του ιού HPV που κωδικοποιεί την πρωτείνη L1 με τη χρήση της χρωστικής SYBR®Green I. Για τη Real-time PCR χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο KAPA SYBR FAST qPCR kit (Kapa Biosystems, BO). Το DNA πολλαπλασιάστηκε με μια αντίδραση PCR σε τελικό όγκο 20μl που περιείχε 2× Kapa Master Mix, 0.4μl από τη χρωστική ROX, 0.4 μl από κάθε εκκινητή και 2μl DNA . Μετά από την αρχική αποδιάταξη στους 94° C για 3 λεπτά, τα δείγματα υποβλήθηκαν σε 40 κύκλους πολλαπλασιασμού, που περιλάμβαναν αποδιάταξη στους 94° C για 30 δευτερόλεπτα, υβριδισμό στους 44° C για 1 λεπτό και επιμήκυνση στους 72° C για 90 δευτερόλεπτα, ακολουθούμενα από melt - curve

ανάλυση, στην οποία η θερμοκρασία αυξήθηκε από 44° C σε 94° C με μια γραμμικότητα της τάξης των 0,2^{o} C/δευτερόλεπτο (9) . Δεδομένα συλλέχθησαν κατά τη διάρκεια του υβριδισμού (δύο μετρήσεις) και καθ΄όλη τη διάρκεια της melt - curve ανάλυσης. Όλα τα πειράματα έλαβαν χώρα σε Mx3000P real-time PCR θερμοκυκλοποιητή χρησιμοποιώντας έκδοση λογισμικού 4.1 (Stratagene, La Jolla, CA).

Τα προϊόντα της RT- PCR φορτώθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2 (w/v), με την προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου σε συγκέντρωση 10ng/μl για να γίνει η επαλήθευση της αντίδρασης. Με τη βοήθεια συσκευής ηλεκτροφόρησης σταθερής τάσης 150 Volt, για περίπου 20 λεπτά, οι ζώνες του DNA απομακρύνθηκαν από τη θέση φόρτωσής τους με βάση το μοριακό τους βάρος και κατ΄επέκταση το μέγεθος του προϊόντος. Χρησιμοποιήθηκε μάρτυρας 50bp, ώστε να γίνει δυνατή η μέτρηση του προϊόντος. Οι ζώνες του DNA γίνονται ορατές με έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV) και φωτογραφήθηκαν με το AlphaImager^{TM} UV transilluminator (Alpha Innotech, Santa Clara, CA) .

Σε κάθε αντίδραση PCR ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε DNA του ιού HPV που απομονώθηκε από δείγματα με καρκίνο τραχήλου της μήτρας, ενώ ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε αποστειρωμένο νερό. Για να αποφευχθεί τυχόν επιμόλυνση μεταξύ των δειγμάτων, κάθε αντίδραση PCR έγινε σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής, αλλάζοντας τα γάντια σε κάθε αντίδραση, χρησιμοποιώντας αποστειρωμένα ρύγχη μίας χρήσης με ενσωματωμένο φίλτρο και απολυμαίνοντας την επιφάνεια εργασίας ανά τακτά διαστήματα.

3.5 Γονοτυπική ανάλυση του HPV

Όλα τα θετικά για τον ιό δείγματα υποβλήθηκαν σε γονοτυπική ανάλυση. Το τεστ που χρησιμοποιήθηκε για το σκοπό αυτό είναι το LINEAR ARRAY HPV Genotyping (Roche), που είναι ένα ποιοτικό τεστ που ανιχνεύει 37 γονότυπους HPV υψηλού και χαμηλού κινδύνου και ακολουθήθηκαν οι οδηγίες του κατασκευαστή. Το κιτ αυτό επελέγη για την υψηλή ευαισθησία του, ειδικότητά του και την αξιοπιστία του (92).

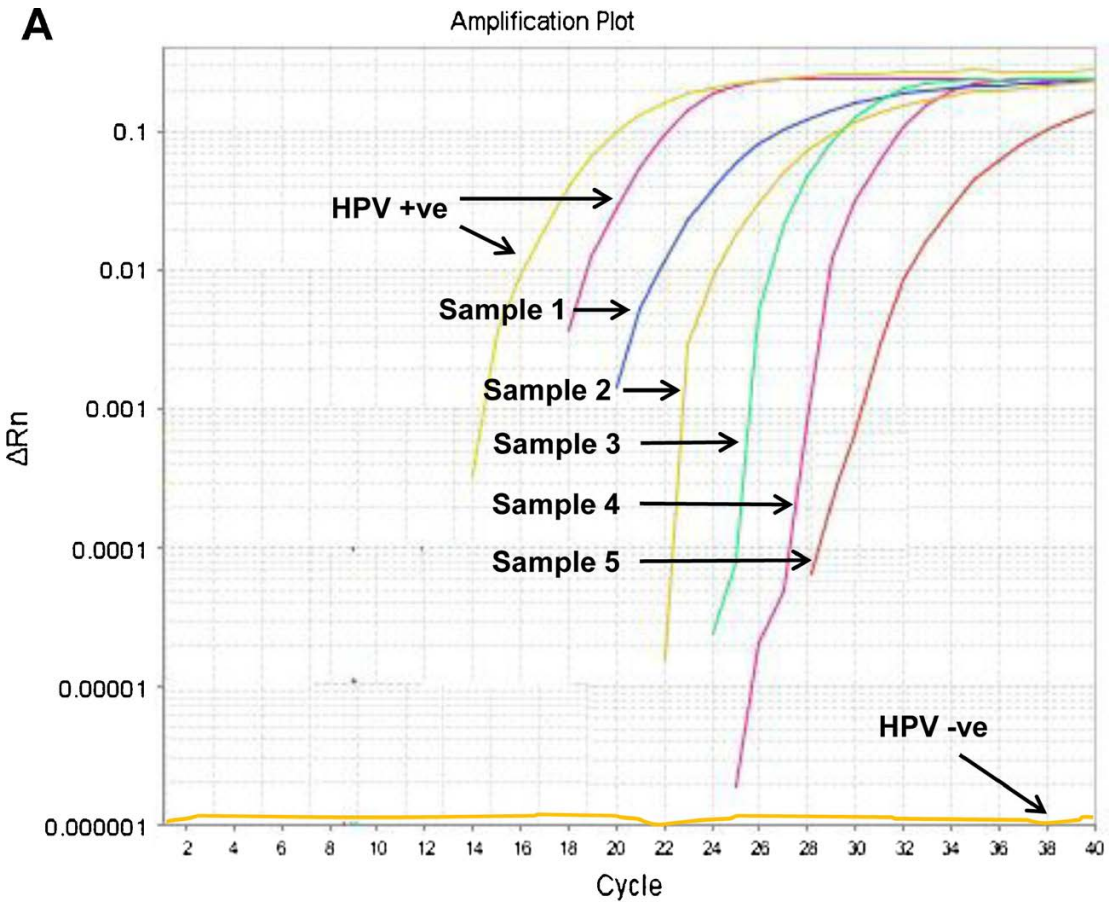
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4ο

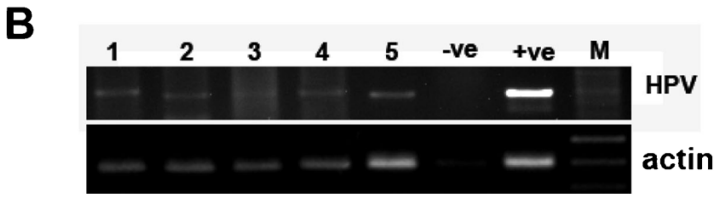
4. Αποτελέσματα

Εκατό βιοψίες από από μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα που πάρθηκαν από ισάριθμους ασθενείς, εννέα γυναίκες και ενενήντα άνδρες, μαζί με δώδεκα βιοψίες από ασθενείς με ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση και τέσσερις υγιείς ιστούς πλησίον του καρκίνου του πνεύμονα, εξετάσθηκαν για την παρουσία του ιού HPV.

Όλα τα δείγματα βρέθηκαν θετικά για το γονίδιο της ακτίνης που χρησιμοποιήθηκε για τον εσωτερικό ποιοτικό έλεγχο των δειγμάτων μας (Εικόνα 4.1).

Δεκαεννιά από τους εκατό ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (19%) ανευρέθησαν θετικοί για την παρουσία DNA του ιού HPV με Real-Time PCR χρησιμοποιώντας τους γενικούς εκκινητές GP5+/GP6+ (Εικόνα 4.1). Από τα θετικά δείγματα δύο ανήκαν σε γυναίκες και δεκαεπτά σε άνδρες, ενώ όσον αφορά στους ιστολογικούς τύπους, δώδεκα ήταν αδενοκαρκινώματα, τέσσερα πλακώδη, δύο αδιαφοροποίητα και ένα με μεικτά χαρακτηριστικά αδενοκαρκινώματος και πλακώδους (Πίνακας 4.1). Όλα τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για μάρτυρες ανευρέθηκαν αρνητικά.





Εικόνα 4.1 Αποτελέσματα της Real-Time PCR (A) και ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης (B) για την ανίχνευση του ιού HPV σε δείγματα από NSCLC.
(A) καμπύλες ενίσχυσης από πέντε θετικά για τον HPV δείγματα (δείγματα 1-5) χρησιμοποιώντας τους γενικούς εκκινητές HPV GP5+/GP6+. (B): Φωτογραφίες από τα προιόντα της Real-Time PCR σε γέλη αγαρόζης 2 % . Ακτίνη χρησιμοποιήθηκε για τον εσωτερικό ποιοτικό έλεγχο των δειγμάτων.M δείκτης Μοριακού Βάρους, +ve: θετικός μάρτυρας, -ve: αρνητικός μάρτυρας

	ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΣΘΕΝΩΝ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΘΕΤΙΚΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ HPV
Φύλο		
Άρρενα	91	17
Θήλεα	9	2
Ιστολογικός τύπος		
Αδενοκαρκίνωμα	50	12
Πλακώδες καρκίνωμα	39	4
Μεγαλοκυτταρικό	1	-
Αδιαφοροποίητο	5	2
Μεικτό	5	1
Καπνιστικές συνήθειες		
Μη καπνιστής	7	-
≤30 p/y	9	3
31-60 p/y	15	3
≥61 p/y	14	2
Δεν βρέθηκαν δεδομενα	55	11
FEV1		
≤50 %	1	-
50-79 %	12	3
≥80 %	21	4
Δεν βρέθηκαν δεδομένα	66	12

Πίνακας 4.1 Δημογραφικά και ιστολογικά δεδομένα και καπνιστικές συνήθειες των 100 ασθενών με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα

Στα θετικά δείγματα ανιχνεύτηκαν τόσο υψηλού όσο και χαμηλού κινδύνου τύποι του ιού, με αριθμητική υπεροχή όμως εκείνων υψηλού κινδύνου. Συγκεκριμένα, σε οχτώ περιστατικά ανιχνεύθηκε ο ιός HPV 16 (42.1 %), σε δύο ο HPV 18 (10.5 %), σε δύο ο HPV 33 (10.5 %), σε άλλα δύο ο HPV 31 (10,5 %), σε τρία ανιχνεύθηκε ο ιός HPV 11 (15.8 %), σε ένα ο HPV 6 (5,2 %) και σε ένα δείγμα ο HPV 59 (5.2 %) (Πίνακας 4.2).

Γονότυπος του ιού HPV	Αριθμός δειγμάτων θετικών για τον HPV
Υψηλού κινδύνου	
16	8
18	2
31	2
33	2
59	1
Χαμηλού κινδύνου	
6	1
11	3

Πίνακας 4.2 Διαχωρισμός σε υψηλού και χαμηλού κινδύνου γονότυπους του HPV στα θετικά για τον ιό δείγματα των ασθενών με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα.

Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των HPV θετικών και HPV αρνητικών περιστατικών σε σχέση με τα δημογραφικά, τα ιστολογικά, τις καπνιστικές συνήθειες ή τις λειτουργικές δοκιμασίες του αναπνευστικού συστήματος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^{ο}

5. Συζήτηση

Στη μελέτη μας εξετάσθηκαν 100 δείγματα από πνευμονικό παρέγχυμα μονιμοποιημένα με παραφίνη από ισάριθμους ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο με την τεχνικής της RT-PCR για την ανίχνευση της παρουσίας του γονιδιώματος του ιού HPV. Το DNA του ιού ανιχνεύθηκε στο 19% (σε 19 από 100) των ασθενών αλλά σε κανένα από τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για έλεγχο.

Ο καρκίνος του πνεύμονα είναι η πρωταρχική αιτία θανάτου από καρκίνο παγκοσμίως και στη χώρα μας, μετρώντας 574 θανάτους ανά εκατομμύριο ανθρώπους το χρόνο (93). Το κάπνισμα τσιγάρων είναι ο κύριος παράγοντας κινδύνου. Ωστόσο μόλις το 20% των καπνιστών εμφανίζουν καρκίνο του πνεύμονα υποδεικνύοντας τη συμμετοχή κι άλλων παραγόντων κινδύνου (93, 94, 95).

Η αναγνώριση μοριακών συμβάντων ήδη από νωρίς στην καρκινογένεση του πνεύμονα , όπως είναι η μετάλλαξη στο γονίδιο K-*ras* ή η αδρανοποίηση του γονίδιου p53, μπορεί να συμβάλλουν στην έγκαιρη ανίχνευση της νόσου (95).Ο μηχανισμός κλειδί στον οποίο οφείλεται η ογκογόνος δράση του HPV είναι η ικανότητά του να παρεμβαίνει στον κυτταρικό κύκλο και στη λειτουργία ογκοκατασταλτικών πρωτεινών του κυττάρου μέσω των ογκοπρωτεινών του E6 και E7 που αδρανοποιούν τις πρωτείνες p53 και Rb αντίστοιχα (77, 96, 97). Ειδικότερα, αυτό το γεγονός οδηγεί σε υπερέκφραση των ογκοπρωτεινών E6 και E7 (96). Η πρωτείνη E6 συνδέεται με το γονίδιο p53, του οποίου η λειτουργία είναι να διατηρεί την ακεραιότητα του DNA, προκαλώντας απόπτωση ή διακοπή του κυτταρικού κύκλου (97). Επιπλέον η E7 στοχεύει στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο Rb με αποτέλεσμα τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την ανάπτυξη όγκου (97).

Ανάμεσα στους νεοανακαλυφθέντες ιούς, ο Merkel Cell Polyomavirus (MCPyV ή MCV) έχει κερδίσει την περισσότερη προσοχή εξαιτίας της σχέσης που έχει με έναν σπάνιο καρκίνο του ανθρώπου. Η ερευνητική μας ομάδα έχει ανιχνεύσει επιπολασμό του ιού MCPyV της τάξης του 10% στους άνδρες με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα σε συνδυασμό με απορρύθμιση της έκφραση των γονιδίων BRAF και Bcl-

2, υπονοώντας ότι αυτά τα γεγονότα πιθανόν να συμβάλλουν στην παθογένεση του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (98, 99).

Σ΄αυτό το σημείο πρέπει να τονιστεί ότι υπάρχει μεγάλη ετερογένεια μεταξύ των ερευνών (87). Συμπερασματικά μπορεί να ειπωθεί ότι οι αναφερόμενες συχνότητες στην ανίχνευση του ιού στον καρκίνο του πνεύμονα οφείλονται σε διαφορές ως προς την γεωγραφική προέλευση της έρευνας και στους ιστολογικούς τύπους του καρκίνου παρά στις διαφορές στις μεθόδους ανίχνευσης (87). Στην Ευρώπη και τις Η.Π.Α η μέση συχνότητα ήταν 17% και 15% αντίστοιχα, ενώ στην Ασία έφτανε το 35.7% (87). Συγκεκριμένα ιδιαιτέρως υψηλές συχνότητες που φτάνουν το 80% έχουν καταγραφεί στην Οκινάβα (Ιαπωνία) και Ταιχούν (Ταιβάν), ενώ αντιθέτως πολύ χαμηλός επιπολασμός έχει ανευρεθεί σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα στη Νότια Ευρώπη (89). Εντούτοις, κατά τη μετα-ανάλυση, η μέθοδος ανίχνευσης του ιού HPV, η γεωγραφική προέλευση και ο ιστολογικός τύπος δεν αποτελούσαν σημαντικές μεταβλητές των μελετών. Η συχνότητα ανίχνευσης ποικίλει από 0 μέχρι 100% , ανάλογε με το είδος των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν, τις συνθήκες κάτω από τις οποίες διενεργήθηκαν τα πειράματα και την τεχνική που εφαρμόστηκε.

Ο μέσος επιπολασμός του ιού HPV στον καρκίνο του πνεύμονα στις περιπτώσεις που μελετήθηκαν ως τώρα φτάνει το 22% και οι τύποι HPV 16 και 18 είναι οι πιο κοινοί, όπως ακριβώς συμβαίνει και στον καρκίνο τραχήλου της μήτρας (85, 87, 90), που είναι σε απόλυτη συμφωνία με τα αποτελέσματα της δικής μας έρευνας. Σημαντικό είναι να τονιστεί ότι οι ογκοπρωτεΐνες E6 και E7 των ιών HPV 16 και 18 μεσολαβούν στην έκφραση πολλών γονιδίων στόχων και πρωτεϊνών, όπως είναι το p53, pRb, VEGF, HIF-1a, cIAP-2 και hTERT και συμβάλλουν στην αγγειογένεση, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την αθανασία των κυττάρων μέσω διαφορετικών οδών σηματοδότησης στον καρκίνο του πνεύμονα (100). Πρόσφατα δεδομένα αποκάλυψαν ότι η ογκοπρωτεΐνη E6 των ιών HPV 16 και 18 πιθανόν συμβάλλει σε μεταλλάξεις του EGFR σε ασθενείς από την Ταιβάν με καρκίνο του πνεύμονα (101), ενώ ασθενείς με λοίμωξη από τον HPV και μεταλλάξεις του EGFR είχαν την καλύτερη επιβίωση- έκβαση σε μια πρόσφατη έρευνα (102), υποδεικνύοντας ότι η λοίμωξη από τους ιούς HPV 16 και 18 είναι κλινικά σημαντική μιας και προβλέπει την έκβαση και τη στοχευμένη ογκοθεραπεία (101,102).

Γενικά μπορεί να τονιστεί ότι οι οι ογκογόνοι ιοί HPV-16 και 18 θεωρούνται ως το αίτιο για το 10% όλων των καρκίνων που προσβάλλουν τον άνθρωπο και αφορούν κυρίως πλακώδη καρκινώματα της πρωκτογεννητικής και τραχηλο-προσωπικής περιοχής (103). Από μια έρευνα της πρόσφατης βιβλιογραφίας πιο συχνά ανιχνεύεται DNA από τους υψηλού κινδύνου τύπους 16, 18, 31 και 33 (85, 87, 90). Οι ιοί HPV 16 και 18 είναι εκείνοι που ανιχνεύονται πιο συχνά σε πλακώδεις ενδοεπιθηλιακές νεοπλασίες υψηλού βαθμού (104). Ωστόσο, οι χαμηλού κινδύνου τύποι 6 και 11 ανιχνεύθηκαν κυρίως σε πλακώδη καρκινώματα. Όσον αφορά στον καρκίνο του πνεύμονα αρκετοί τύποι HPV ανιχνεύθηκαν και κυρίως οι υψηλού κινδύνου 16,18,31 και 33, όπως και οι χαμηλού κινδύνου 6 και 11. Συγκεκριμένα η παρουσία του ιού δεν περιορίστηκε στο πλακώδες καρκίνωμα αλλά και στους άλλους τύπους μη μικροκυτταρικού καρκίνου, αλλά και στον μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (105, 106). Σε συμφωνία με τις προαναφερθείσες μελέτες, στη δική μας έρευνα η πλειονότητα των θετικών δειγμάτων αφορούσε στον HPV 16 (>40%), ενώ θετικά για τους ιούς HPV 18,31,33,και 11 παρατηρήθηκαν σε ποσοστό >10%.

Πρόσφατα δημοσιεύθηκε μια ανάλυση από ευρεία βάση δεδομένων που περιλάμβανε 27 μελέτες και 3249 ασθενείς από όλο τον κόσμο και αναζητήθηκε η παρουσία του ιού στον καρκίνο του πνεύμονα και η συσχέτισή του με δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά (107). Οι τύποι HPV 16 και 18 ήταν οι πιο συχνοί με σημαντική , όμως ποικιλία στον επιπολασμό του ιού μεταξύ των διαφόρων γεωγραφικών περιοχών. Ο πιο μεγάλος επιπολασμός για τους δύο αυτούς τύπους ανιχνεύθηκε στην Νότια και Κεντρική Αμερική, και ακολουθούν Ασία, Βόρεια Αμερική και Ευρώπη (107). Ο πιο συχνά απομονωνόμενος ιός ήταν ο 16 και ακολουθούσε ο 18 εκτός από τη Βόρεια Αμερική. Κι εδώ δεν παρατηρήθηκε συσχετισμός ως προς το φύλο, την ηλικία, τις καπνιστικές συνήθειες, τον ιστολογικό τύπο και το στάδιο του καρκίνου. Εντούτοις παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ της φυλής και των τύπων HPV 16 και 18, όπου ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα που δεν ανήκαν στη λευκή φυλή ήταν πιο πιθανό να έχουν HPV 16 και 18 θετικό καρκίνο απ΄ ότι οι λευκοί καρκινοπαθείς. Μπορεί να υπάρχουν πολλοί λόγοι που θα μπορούσαν να εξηγήσουν αυτή τη διαφορά, όπως διαφορά στη σεξουαλική συμπεριφορά ή διαφορετική ευαισθησία. Απαιτούνται περισσότερες έρευνες πάνω στο πεδίο αυτό προκειμένου να αποδειχτεί ο δυνητικός ρόλος της φυλετικής διαφοράς στη μόλυνση από τους τύπους 16 και 18. Συγκρίσεις μεταξύ νεοπλασματικών και φυσιολογικών ιστών του

πνεύμονα, έδειξαν ότι ο ιός ήταν πιο πιθανόν να ανευρεθεί στον ιστό από καρκίνο (107).

Μία μεγάλη πληθυσμιακή μελέτη που διενεργήθηκε στην Ασία και χρησιμοποίησε την ίδια μέθοδο ανίχνευσης δεν ανέδειξε διαφορές ως προς τον επιπολασμό της HPV λοίμωξης στους ιστολογικούς τύπους του αδενοκαρκινώματος και πλακώδους καρκινώματος (108, 109). Ωστόσο, παρατηρήθηκε μια θετικότητα πάνω από 20% (12/50, 24%) των HPV θετικών στα δείγματα με αδενοκαρκίνωμα, ακολουθούμενη από το πλακώδες καρκίνωμα με επίπτωση 10,26% (4/39). Πρόσφατα δεδομένα υποδεικνύουν ότι επιπρόσθετοι παράγοντες του ξενιστή όπως είναι το κωδικόνιο 72 του γονιδίου p53 ή μεταλλάξεις στον υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα συμβάλλουν στην καρκινογένεση του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα σε συνδυασμό με την παρουσία της αλληλουχίας του γονιδιώματος του ιού HPV (110, 111). Επιπλέον, το κάπνισμα και η έκθεση στην ατμοσφαιρική μόλυνση έχουν θεωρηθεί ως μείζονες παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα. Η επίπτωση και η επίδραση των παραπάνω γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων ποικίλει από περιοχή σε περιοχή, γεγονός που με τη σειρά του μπορεί να ερμηνεύσει την ασυμφωνία στις συχνότητες ανίχνευσης του ιού HPV στον καρκίνο του πνεύμονα στις διάφορες μελέτες.

Καμία συσχέτιση δεν παρατηρήθηκε όσον αφορά στις λειτουργικές δοκιμασίες του πνεύμονα ή τις καπνιστικές συνήθειες. Εντούτοις πρέπει να λάβουμε υπόψιν τους περιορισμούς αυτής της αναδρομικής μελέτης σχετικά με τα ελλειπή δεδομένα που δεν ήταν διαθέσιμα προς ανάλυση. Μία πρόσφατη μετα-ανάλυση έδειξε ότι τέσσερεις μεταβλητές είχαν σημαντική συσχέτιση με τη συχνότητα ανίχνευσης του ιού , όπως είναι η προχωρημένη ηλικία, η καθυστερημένη έναρξη του καπνίσματος, τα λιγότερα χρόνια ενεργητικού καπνίσματος και τα λιγότερα πακέτα/ έτος (p/y) (87). Επιπλέον πολλές έρευνες από την Ταιβάν έχουν δείξει ότι η λοίμωξη από τον HPV σχετίζεται με τον καρκίνο του πνεύμονα σε γυναίκες μη καπνίστριες. Εντούτοις η ερμηνεία των ανωτέρω ευρημάτων δεν είναι γνωστή (112,113).

Πρόσφατες μελέτες έχουν αναφέρει συχνή ανίχνευση του γενώματος του HPV σε πρωτοπαθή καρκινώματα του πνεύμονα σε ασθενείς που υποτροπίασαν αλλά που ανταποκρίνονταν σε θεραπεία με αναστολείς της κινάσης της τυροσίνης του EGFR, υπονοώντας ότι η παρουσία του ιού στον καρκίνο του πνεύμονα μπορεί να σχετίζεται

με κάποιο γενετικό υπόβαθρο που σχετίζεται με τις μεταλλάξεις του EGFR (101). Ενδιαφέρον επίσης έχει το γεγονός ότι ασθενείς που είχαν όγκο E6 θετικό είχαν μεγαλύτερη συχνότητα μεταλλάξεων EGFR από αυτούς που είχαν όγκους E6 αρνητικούς (46% έναντι 20%), υποδεικνύοντας έναν παθογόνο ρόλο της E6 των ιών HPV 16 και 18 στη μετάλλαξη του EGFR στον καρκίνο του πνεύμονα, τουλάχιστον όσον αφορά στον πληθυσμό της Ταιβάν (101). Επιπλέον η E6 των ιών HPV 16 και 18 εμπλέκεται στην αδρανοποίηση του p53 συμβάλλοντας με αυτόν το μηχανισμό στη μεσολαβούμενη από τον ιό καρκινογένεση του πνεύμονα (101).

Ο ιός HPV σχετίζεται με πολλούς τύπους καρκίνου, όμως η κλινική του σημασία στον καρκίνο του πνεύμονα παραμένει αμφιλεγόμενη. Από τη στιγμή που ο επιπολασμός της λοίμωξης από τους τύπους 16 και 18 είναι μεγαλύτερος σε αδενοκαρκινώματα του πνεύμονα σε γυναίκες από την Ταιβάν, ο στόχος μιας πρόσφατης έρευνας ήταν η κλινική επίδραση του ιού σε αυτόν τον τύπο καρκίνου του πνεύμονα (102,114). Ο ιός HPV ανιχνεύθηκε στο 35.2 % των ασθενών και σχετιζόταν με εντοπισμένους και μικρότερου μεγέθους όγκους. Ασθενείς που είχαν λοίμωξη από HPV είχαν σημαντικά καλύτερη επιβίωση και σημαντικά πιο μειωμένη θνητότητα μετά από προσαρμογή με την ηλικία, την επέκταση του όγκου, τις μεταλλάξεις του EGFR και τις θεραπείες (102,115).

Πρόσφατες μελέτες έχουν διερευνήσει τη χρήση λιγότερο επεμβατικών μέσων στον τομέα αυτόν όπως το συμπύκνωμα εκπνεόμενου αέρα (EBC) (116). Για το σκοπό αυτό, 89 ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα και 68 μάρτυρες περιλήφθησαν σε αυτή τη μελέτη. Η παρουσία του ιού HPV αναζητήθηκε στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα τους καθώς και σε δείγματα βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος. Το αποτέλεσμα ήταν ότι ο ιός ανιχνεύθηκε στο 16,4% των ασθενών με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (116) αλλά σε κανένα από τους μάρτυρες. Μελλοντικά προγράμματα με σκοπό τον προσυμπτωματικό έλεγχο για τον καρκίνο του πνεύμονα με περισσότερη προηγμένη τεχνολογία απαιτούνται για να διερευνηθεί περαιτέρω ο πιθανός ρόλος του HPV στην καρκινογένεση του πνεύμονα (117).

Σημαντικό είναι να διερευνηθεί και ο τρόπος με τον οποίο ο ιός φτάνει στον πνεύμονα, αφού όπως είναι γνωστό ο ιός μεταδίδεται με την άμεση επαφή μεταξύ μολυσμένων κονδυλωμάτων και ευάλωτων περιοχών δέρματος ή βλεννογόνου που δεν έχουν μολυνθεί ή από επιφάνειες του περιβάλλοντος (118). Το πιο

χαρακτηριστικό παράδειγμα για την ευαισθησία των μεταπλαστικών εστιών του πνεύμονα στη λοίμωξη από τον ιό HPV είναι ο αυτοενοφθαλμισμός των ιών HPV 6 ή 11 που απομονώνονται σε τραυματισμένα θηλώματα της αναπνευστικής οδού στα μεταπλαστικά επιθήλια της τραχείας και του βρογχικού δέντρου (119). Από τη στιγμή πόυ το 25% των καρκίνων της κεφαλής και τραχήλου προκαλούνται από τον ιό, η μετάδοση των ογκογόνων τύπων του ιού στις μεταπλαστικές εστίες του βρογχικού δέντρου φαίνεται μία πιθανή εξήγηση (87).

Υπάρχουν ωστόσο κάποιοι ερευνητές που δεν κατάφεραν να βρουν το DNA του ιού σε καρκινώματα του πνεύμονα και τείνουν να αποκλείσουν οποιαδήποτε συσχέτιση μεταξύ του HPV και αυτού του τύπου καρκίνου (120, 121). Η αρνητική αυτή συσχέτιση οφείλεται πιθανώς στην λανθασμένη επιλογή εκκινητών, όπως είναι οι MY09/MY11 που έχουν κριθεί ως ανεπαρκείς, ή στην διαφορετική ευαισθησία των τεχνικών που επελέγησαν να χρησιμοποιηθούν.

Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφέρουμε κάποιους σημαντικούς περιορισμούς στην έρευνά μας. Η απουσία δεδομένων σχετικά με τις καπνιστικές συνήθειες ή δεδομένων από τη σπιρομέτρηση δεν αφήνουν περιθώρια για περαιτέρω ανάλυση. Αυτό μπορεί να αποδοθεί μερικώς στην αναδρομική φύση της παρούσας μελέτης. Για το λόγο αυτό τα ευρήματα αυτής της έρευνας μπορούν να αξιολογηθούν αποκλειστικά υπό το πρίσμα της περιγραφικής στατιστικής. Βασισμένοι στον επιπολασμό του HPV που ανιχνεύσαμε, πιστεύουμε ότι η πρόκληση για το μέλλον θα μπορούσε να είναι ο σχεδιασμός μιας προοπτικής έρευνας με μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων και περισσότερη έμφαση στα κοινωνικά-δημογραφικά και κλινικά δεδομένα, όπως είναι και το οικονομικό καθεστώς των ασθενών που θα συμπεριληφθούν μαζί με δεδομένα από τη λειτουργία του αναπνευστικού συστήματος. Συμπερασματικά, η έρευνα αυτή επισημαίνει το δυνητικά σημαντικό ρόλο που μπορεί να διαδραματίσει ο HPV ως αιτιολογικός παράγοντας και παράγοντας κινδύνου για τον μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα. Επιπλέον, το ποσοστό του 19% βρίσκεται σε πλήρη συμφωνία με μια πρόσφατη μετα-ανάλυση, που υπέδειξε ότι ο ιός HPV είναι ο δεύτερος πιο σημαντικός παράγοντας κινδύνου για το μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα μετά το κάπνισμα του τσιγάρου. Συγκεκριμένοι τύποι ιού και μάλιστα οι πρωτεΐνες τους, όπως οι E6 και E7 των HPV 16 και 18 παρεμβαίνουν στον κυτταρικό κύκλο, που είναι σημαντικός για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στην αγγειογένεση, στην αθανασία των κυττάρων και σε άλλα μονοπάτια σηματοδότησης

(77,96), οπότε θα ήταν σημαντικό να εκτιμηθούν τα επίπεδα έκφρασης των συγκεκριμένων ιϊκών πρωτεινών, καθορίζοντας έτσι τη φύση της λοίμωξης των δειγμάτων από μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα από τον ιό HPV, που μπορεί να οδηγήσει σε απορρύθμιση μονοπατιών του ξενιστή. Επιπρόσθετα πρόσφατες αποδείξεις έχουν υπογραμμίσει όχι μόνο τον αυξανόμενο επιπολασμό του ιού, αλλά και την κλινική σημασία του στην πρόγνωση και στοχευμένη θεραπεία του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (101, 102, 114, 115). Τα παραπάνω αναφερόμενα ευρήματα υποδεικνύουν τον υψηλό επιπολασμό του ιού HPV σε δείγματα από καρκίνο, αποδεικνύοντας το δυνητικό ρόλο του ιού στον μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα και υποστηρίζουν ισχυρά την ανάγκη για περαιτέρω έλεγχο σε αυτό το πεδίο.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) http://www.cancerresearchuk.org/cancer-info/cancerstats/world/ 14/04/2014

(2) http://www.webmd.com/lung-cancer/guide/lung-cancer-statistics 14/04/2014

(3)http://www.cancerresearchuk.org/cancerinfo/cancerstats/types/lung14/04/2014

(4) American Cancer Society.: Cancer Facts and Figures 2014. Atlanta, Ga: American Cancer Society, 2014. Available online Exit Disclaimer. Last accessed March 26, 2014.

(5) http://www.cancer.org/cancer/lungcancer-non-smallcell/detailedguide/non-small-cell-lung-cancer-key-statistics 15/04/2014

(6) Devereux TR, Taylor JA, Barrett JC. Molecular mechanisms of lung cancer. Interaction of environmental and genetic factors. Giles F. Filley Lecture. Chest 1996; 109:14S.

(7) Hibi K, Takahashi T, Yamakawa K, et al. Three distinct regions involved in 3p deletion in human lung cancer. Oncogene 1992; 7:445.

(8) Otterson G, Lin A, Kay F. Genetic etiology of lung cancer. Oncology (Williston Park) 1992; 6:97.

(9) Hirao T, Nelson HH, Ashok TD, et al. Tobacco smoke-induced DNA damage and an early age of smoking initiation induce chromosome loss at 3p21 in lung cancer. Cancer Res 2001; 61:612.

(10) Shaw AT, Solomon B. Targeting anaplastic lymphoma kinase in lung cancer. Clin Cancer Res 2011; 17:2081.

(11) Slebos RJ, Kibbelaar RE, Dalesio O, et al. K-ras oncogene activation as a prognostic marker in adenocarcinoma of the lung. N Engl J Med 1990; 323:561.

(12) Paik PK, Arcila ME, Fara M, et al. Clinical characteristics of patients with lung adenocarcinomas harboring BRAF mutations. J Clin Oncol 2011; 29:2046.

(13) Volm M, Rittgen W, Drings P. Prognostic value of ERBB-1, VEGF, cyclin A, FOS, JUN and MYC in patients with squamous cell lung carcinomas. Br J Cancer 1998; 77:663.

(14) Brabender J, Danenberg KD, Metzger R, et al. Epidermal growth factor receptor and HER2-neu mRNA expression in non-small cell lung cancer Is correlated with survival. Clin Cancer Res 2001; 7:1850.

(15) Hirsch FR, Varella-Garcia M, Bunn PA Jr, et al. Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. J Clin Oncol 2003; 21:3798.

(16) Rusch V, Klimstra D, Venkatraman E, et al. Overexpression of the epidermal growth factor receptor and its ligand transforming growth factor alpha is frequent in resectable non-small cell lung cancer but does not predict tumor progression. Clin Cancer Res 1997; 3:515.

(17) Pastorino U, Andreola S, Tagliabue E, et al. Immunocytochemical markers in stage I lung cancer: relevance to prognosis. J Clin Oncol 1997; 15:2858.

(18) Reissmann PT, Koga H, Figlin RA, et al. Amplification and overexpression of the cyclin D1 and epidermal growth factor receptor genes in non-small-cell lung cancer. Lung Cancer Study Group. J Cancer Res Clin Oncol 1999; 125:61.

(19) Y. Cho, S. Gorina, P. D. Jeffrey, and N. P. Pavletich, “Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations,” Science, vol. 265, no. 5170, pp. 346–355, 1994.

(20) C. Caron de Fromentel and T. Soussi, “TP53 tumor suppressor gene: a model for investigating human mutagenesis,” Genes Chromosomes and Cancer, vol. 4, no. 1, 1–15, 1992.

(21) E. Jassem, J. Nikliński, R. Rosell et al., “Types and localisation of p53 gene mutations: a report on 332 non-small cell lung cancer patients ” Lung Cancer, vol. 34, no. 2, pp. S47–S51, 2001

(22) Biesalski, HK (1998). "European Consensus Statement on Lung Cancer: risk factors and prevention. Lung Cancer Panel". CA Cancer J Clin (Smoking is the major risk factor, accounting for about 90% of lung cancer incidence.) 48 (3): 167–176.

(23) Hecht, S (October 2003). "Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer". Nature Reviews. Cancer (Nature Publishing Group) 3 (10): 733–744.

(24) Sopori, M (May 2002). "Effects of cigarette smoke on the immune system". Nature Reviews. Immunology 2 (5): 372–7.

(25) Peto, R; Lopez AD, Boreham J et al. (2006). Mortality from smoking in developed countries 1950–2000: Indirect estimates from National Vital Statistics. Oxford University Press.

(26) Khuder SA. Effect of cigarette smoking on major histological types of lung cancer: a meta-analysis. Lung Cancer 2001; 31(2-3):139-48.

(27) Pesch B, Kendzia B, Gustavsson P, et al. Cigarette smoking and lung cancer--relative risk estimates for the major histological types from a pooled analysis of case-control studies. Int J Cancer 2012; 131(5):1210-9.

(28) California Environmental Protection Agency (1997). "Health effects of exposure to environmental tobacco smoke. California Environmental Protection Agency". Tobacco Control 6 (4): 346–353.
* CDC (December 2001). "State-specific prevalence of current cigarette smoking among adults, and policies and attitudes about secondhand smoke—United States, 2000". Morbidity and Mortality Weekly Report (Atlanta, Georgia: CDC) 50 (49): 1101–1106. PMID 11794619.

(29) Alberg, AJ (September 2007). "Epidemiology of lung cancer". Chest (American College of Chest Physicians) 132 (S3): 29S–55S.

(30) Jaakkola, MS (August 2006). "Impact of smoke-free workplace legislation on exposures and health: possibilities for prevention". European Respiratory Journal 28 (2):397–408.

(31) Parkin, DM (December 2011). "Tobacco—attributable cancer burden in the UK in 2010". British Journal of Cancer 105 (Suppl. 2): S6–S13.

(32) National Health and Medical Research Council (April 1994). The health effects and regulation of passive smoking. Australian Government Publishing Service. Αρχειοθετήθηκε από το πρωτότυπο στις September 29, 2007. Ανακτήθηκε στις 2007-08-10.

(33) Taylor, R (October 2007). "Meta-analysis of studies of passive smoking and lung cancer: effects of study type and continent". International Journal of Epidemiology 36(5):1048–1059.

(34) «Frequently asked questions about second hand smoke». World Health Organization. Ανακτήθηκε στις 25 July 2012.

(35) Schick, S (December 2005). "Philip Morris toxicological experiments with fresh sidestream smoke: more toxic than mainstream smoke". Tobacco Control 14 (6): 396–404.

(36) Boffetta P, Tredaniel J, Greco A. Risk of childhood cancer and adult lung cancer after childhood exposure to passive smoke: A meta-analysis. Environ Health Persp 2000;108(1):73-82.

(37) Chuang S-C, Gallo V, Michaud D, et al. Exposure to environmental tobacco smoke in childhood and incidence of cancer in adulthood in never smokers in the European prospective investigation into cancer and nutrition. Cancer Cause Control 2011;22(3):487-94.

(38) Schmid K, Kuwert T, Drexler H (March 2010). "Radon in Indoor Spaces: An Underestimated Risk Factor for Lung Cancer in Environmental Medicine". Dtsch ArzteblInt107(11):181–6.

(39) EPA (October 2006). «Radiation information: radon». EPA.

(40) Doll R, Peto R, Boreham J, et al. Mortality from cancer in relation to smoking: 50 years observations on British doctors. Br J Cancer 2005;92(3):426-29.

(41) Erren TC, Jacobsen M, Piekarski C. Synergy between asbestos and smoking on lung cancer risks. Epidemiology 1999;10(4):405-11.

(42) Lee PN. Relation between exposure to asbestos and smoking jointly and the risk of lung cancer. Occup Environ Med 2001;58(3):145-53.

(43) Frost G, Darnton A, Harding A-H. The Effect of Smoking on the Risk of Lung Cancer Mortality for Asbestos Workers in Great Britain (1971–2005). Ann Occup Hyg 2011;55(3):239-47.

(44) IARC: Outdoor air pollution a leading environmental cause of cancer deaths. The International Agency for Research on Cancer 2013. October 17, 2013. Available at: http://www.iarc.fr/en/media-centre/pr/2013/pdfs/pr221_E.pdf.

(45) Matakidou A , Eisen T, Houlston RS.Systematic review of the relationship between family history and lung cancer risk. Br J Cancer. 2005 Oct 3;93(7):825-33.

(46) Jonsson S , Thorsteinsdottir U, Gudbjartsson DF, Jonsson HH, Kristjansson K, Arnason S, Gudnason V, Isaksson HJ, Hallgrimsson J, Gulcher JR, Amundadottir LT, Kong A, Stefansson K.Familial risk of lung carcinoma in the Icelandic population.JAMA. 2004 Dec 22;292(24):2977-83.

(47) Amos CI , Pinney SM, Li Y, Kupert E, Lee J, de Andrade MA, Yang P, Schwartz AG, Fain PR, Gazdar A, Minna J, Wiest JS, Zeng D, Rothschild H, Mandal D, You M, Coons T, Gaba C, Bailey-Wilson JE, Anderson MW. A susceptibility locus on chromosome 6q greatly increases lung cancer risk among light and never smokers. Cancer Res. 2010;70(6):2359-67.

(48) Lou F, Huang J, Sima CS, Dycoco J, Rusch V, Bach PB. Patterns of recurrence and second primary lung cancer in early-stage lung cancer survivors followed with routine computed tomography surveillance. J Thorac Cardiovasc Surg. 2013;145(1):75-81.

(49) Turner MC , Chen Y, Krewski D, Calle EE, Thun MJ. Chronic obstructive pulmonary disease is associated with lung cancer mortality in a prospective study of never smokers. Am J Respir Crit Care Med. 2007 Aug 1;176(3):285-90. Epub 2007 May 3.

(50) Hubbard R , Venn A, Lewis S, Britton J.Lung cancer and cryptogenic fibrosing alveolitis. A population-based cohort study. Am J Respir Crit Care Med. 2000 Jan;161(1):5-8.

(51) Yang P , Sun Z, Krowka MJ, Aubry MC, Bamlet WR, Wampfler JA, Thibodeau SN, Katzmann JA, Allen MS, Midthun DE, Marks RS, de Andrade M.Alpha1-

antitrypsin deficiency carriers, tobacco smoke, chronic obstructive pulmonary disease, and lung cancer risk. Arch Intern Med. 2008 May 26;168(10):1097-103

(52) Zheng W , Blot WJ, Liao ML, Wang ZX, Levin LI, Zhao JJ, Fraumeni JF Jr, Gao YT. Lung cancer and prior tuberculosis infection in Shanghai. Br J Cancer. 1987 Oct;56(4):501-4

(53) Aberle DR, Adams AM, Berg CD, et al.: Reduced lung-cancer mortality with low-dose computed tomographic screening. N Engl J Med 365 (5): 395-409, 2011

(54) D. C. Quinlan, A. G. Davidson, C. L. Summers, H. E. Warden, and H. M. Doshi, “Accumulation of p53 protein correlates with a poor prognosis in human lung cancer,” Cancer Research, vol. 52, no. 17, pp. 4828–4831, 1992

(55) Parkin, Donald Maxwell (2006). "The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002". International Journal of Cancer 118 (12): 3030–44.

(56) Koike K (June 2007). "Hepatitis C virus contributes to hepatocarcinogenesis by modulating metabolic and intracellular signaling pathways". Journal of Gastroenterology and Hepatology. 22 Suppl 1: S108–11.

(57) Hu J, Ludgate L (2007). "HIV-HBV and HIV-HCV coinfection and liver cancer development". Cancer Treatment and Research. Cancer Treatment and Research 133: 241–52.

(58) Bellon M, Nicot C (2007). "Telomerase: a crucial player in HTLV-I-induced human T-cell leukemia". Cancer Genomics & Proteomics 4 (1): 21–5.

(59) zur Hausen H. Human papillomavirus & cervical cancer. Indian J Med Res. 2009 Sep;130(3):209.

(60) Ellerman C, Bang O (1908). "Experimentelle Leukämie bei Hühnern". Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infectionskr. Hyg. Abt. Orig. 46: 595–609

(61) Rous, Peyton (1910). "A Transmissible Avian Neoplasm (Sarcoma of the Common Fowl)". Journal of Experimental Medicine 12 (5): 696–705.

(62) Rous, Peyton (1911). "A Sarcoma of the Fowl Transmissible by an Agent Separable from the Tumor Cells". Journal of Experimental Medicine 13 (4): 397–411

(63) zur Hausen H (November 1991). "Viruses in human cancers". Science 254 (5035): 1167–73.

(64) Lavanchy D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. J Viral Hepat. 2004;11(2):97–107.

(65) World Health Organization. Hepatitis C: global prevalence. Wkly Epidemiol Rec.1997;72(46):341–344.

(66) Fattovich G, et al. Morbidity and mortality in compensated cirrhosis type C: a retrospective follow-up study of 384 patients. Gastroenterology. 1997;112(2):463–472.

(67) Chang Y, et al. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. Science. 1994;266(5192):1865–1869.

(68) Sarid R, Olsen SJ, Moore PS. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus: epidemiology, virology, and molecular biology. Adv Virus Res. 1999;52:139–232.

(69) Flore O, et al. Transformation of primary human endothelial cells by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. Nature 199;394:588-92.

(70) Gallo RC, et al. Association of the human type C retrovirus with a subset of adult T-cell cancers.Cancer Res. 1983;43(8):3892–3899.

(71) Gheit T, Munoz, J. P., Levican, J., Gonzalez, C., Ampuero, S., Parra, B., Gaggero, A., Corvalan, A. H., Meneses, M., Tommasino, M., Aguayo, F. Merkel cell polyomavirus in non-small cell lung carcinomas from Chile. Exp Mol Pathol 2012;93:162-6.

(72) Joh J, Jenson, A. B., Moore, G. D., Rezazedeh, A., Slone, S. P., Ghim, S. J., Kloecker, G. H. Human papillomavirus (HPV) and Merkel cell polyomavirus (MCPyV) in non small cell lung cancer. Exp Mol Pathol 2010;89:222-6.

(73) Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, et al. Human papillomavirus and cervical cancer. Lancet 2007; 370:890.

(74) Parkin DM (2006). "The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002". Int. J. Cancer 118 (12): 3030–44.

(75) Ault, K. A. (2006). "Epidemiology and Natural History of Human Papillomavirus Infections in the Female Genital tract". Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology 2006: 1–5.

(76) http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa021641 27/10/2014

(77) zur Hausen H.Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. J Natl Cancer Inst. 2000 3;92(9):690-8.

(78) Plummer M, Schiffman M, Castle PE, Maucort-Boulch D, Wheeler CM; ALTS Group.A 2-year prospective study of human papillomavirus persistence among women with a cytological diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance or low-grade squamous intraepithelial lesion. J Infect Dis. 2007 Jun 1;195(11):1582-9. Epub 2007 Apr 16

(79) Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosı S et al. International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. N Engl J Med. 2003;348:518–527.

(80) Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. Clin Sci. 2006;110:525–541.

(81) Hans Krueger; Gavin Stuart; Richard Gallagher; Dan Williams, Jon Kerner (12 April 2010). HPV and Other Infectious Agents in Cancer:Opportunities for Prevention and Public Health: Opportunities for Prevention and Public Health. Oxford University Press. p. 34. ISBN 978-0-19-973291-3. Retrieved 24 December 2012.

(82) American Society for Clinical Pathology, "Five Things Physicians and Patients Should Question", Choosing Wisely: an initiative of the ABIM Foundation (American Society for Clinical Pathology), retrieved 1 August 2013.

(83) Syrjänen KJ. Condylomatous changes in neoplastic bronchial epithelium. Report of a case.Respiration. 1979;38(5):299-304.

(84) Mammas IN, Sourvinos G, Zaravinos A, Spandidos DA. Vaccination against human papilloma virus (HPV): epidemiological evidence of HPV in non-genital cancers. Pathol Oncol Res. 2011;17:103-119.

(85) Klein F, Amin Kotb WF, Petersen I. Incidence of human papilloma virus in lung cancer. Lung Cancer. 2009;65:13-18.

(86) Sourvinos G, Mammas IN, Derdas S, Spandidos DA. Human papillomaviruses (HPVs) in lung cancer: a causative trigger or just a co-incidence? Lung Cancer. 2013;79:95-96.

(87) Syrjänen K. Detection of human papillomavirus in lung cancer: systematic review and meta-analysis. Anticancer Res. 2012;32:3235-3250.

(88) Kountouri MP, Mammas IN, Spandidos DA. Human papilloma virus (HPV) in lung cancer: unanswered questions. Lung Cancer 2010;67:125020.

(89) Papadakis ED, Soulitzis N, Spandidos DA. Association of p53 codon 72 polymorphism with advanced lung cancer: the Arg allele is preferentially retained in tumours arising in Arg/Pro germline heterozygotes.Br J Cancer. 2002 ;87:1013-1018.

(90) Syrjanen KJ. HPV infections and lung cancer. J Clin Pathol. 2002;55:885-891.

(91) de Araujo MR , De Marco L, Santos CF, Rubira-Bullen IR, Ronco G, Pennini I, Vizzini L, Merletti F, Gillio-Tos A.GP5+/6+ SYBR Green methodology for simultaneous screening and quantification of human papillomavirus.J Clin Virol. 2009 Jun;45(2):90-5.

(92) Roberts CC , Swoyer R, Bryan JT, Taddeo FJ.Comparison of real-time multiplex human papillomavirus (HPV) PCR assays with the linear array HPV genotyping PCR assay and influence of DNA extraction method on HPV detection.J Clin Microbiol. 2011 May;49(5):1899-906.

(93) Bray F, Jemal A, Grey N, Ferlay J, Forman D. Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008–2030): a population-based study. Lancet Oncol.2012;13:790–801.

(94) Murray CJ, Lopez AD. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990–2020: Global Burden of Disease Study. Lancet. 1997;349:1498–504.

(95) Viallet J, Minna JD. Dominant oncogenes and tumor suppressor genes in the pathogenesis of lung cancer. Am J Respir Cell Mol Biol. 1990;2:225–32.

(96) Munger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M, et al. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. J Virol. 2004;78:11451–60.

(97) Garner-Hamrick PA, Fostel JM, Chien WM, Banerjee NS, Chow LT, Tr B, et al. Global effects of human papillomavirus type 18 E6/E7 in an organotypic keratinocyte culture system. J Virol. 2004;78:9041–50.

(98) Lasithiotaki I, Antoniou KM, Derdas SP, Sarchianaki E,Symvoulakis EK, Psaraki A, et al. The presence of Merkel cell polyomavirus is associated with deregulated expression of BRAF and Bcl-2 genes in non-small cell lung cancer. Int J Cancer. 2013;133:604–11.

(99) Antoniou KM, Lasithiotaki I, Symvoulakis E, Derdas SP, Psaraki A, Spandidos DA, et al. Molecular pathological findings of Merkel cell polyomavirus in lung cancer: a possible etiopathogenetic link? Int J Cancer. 2013;133(12):3016–7.

(100) Cheng YW,Wu MF, Wang J, Yeh KT, Goan YG, ChiouHL,etal .Humanpapillomavirus 16/18 E6 oncoprotein is expressed in lung cancer and related with p53 inactivation. Cancer Res. 2007;67: 10686–93.

(101) Tung MC, Wu HH, Cheng YW, Wang L, Chen CY, Yeh SD, et al. Association of epidermal growth factor receptor mutations with human papillomavirus 16/18 E6 oncoprotein expression in nonsmall cell lung cancer. Cancer. 2013;119(18):3367–76.

(102) Wang JL, Fang CL, Wang M, Yu MC, Bai KJ, Lu PC, et al. Human papillomavirus infections as a marker to predict overall survival in lung adenocarcinoma. Int J Cancer. 2013.

(103) Hu D, Goldie S.The economic burden of noncervical human papillomavirus disease in the United States. Am J Obstet Gynecol. 2008 May;198(5):500.e1-7.

(104) Fei Y, Yang J, Hsieh WC,Wu JY,Wu TC, Goan YG, et al. Different humanpapillomavirus 16/18 infection in Chinese non-small cell lung cancer patients living in Wuhan, China. Jpn J Clin Oncol. 2006;36:274–9.

(105) Hirayasu T, Iwamasa T, Kamada Y, Koyanagi Y, Usuda H, Genka K. Human papillomavirus DNAin squamous cell carcinoma of the lung. J Clin Pathol. 1996;49:810–7.

(106) Yu Y, Yang A, Hu S, Yan H. Correlation of HPV-16/18 infection of human papillomavirus with lung squamous cell carcinomas in Western China. Oncol Rep. 2009;21:1627–32.

(107) Ragin C, Obikoya-Malomo M, Kim S, Chen Z, Flores-Obando R, Gibbs D, Koriyama C, Aguayo F, Koshiol J, Caporaso NE, Carpagnano GE, Ciotti M, Dosaka-Akita H, Fukayama M, Goto A, Spandidos DA, Gorgoulis V, Heideman DA, van Boerdonk RA, Hiroshima K, Iwakawa R,Kastrinakis NG, Kinoshita I, Akiba S, Landi MT, Eugene Liu H, Wang JL, Mehra R, Khuri FR, Lim WT, Owonikoko TK, Ramalingam S,Sarchianaki E, Syrjanen K, Tsao MS, Sykes J, Hee SW, Yokota J, Zaravinos A, Taioli E¨HPV-associated lung cancers: an international pooled analysis. Carcinogenesis. 2014 Jun;35(6):1267-75.

(108) Wang Y, Wang A, Jiang R, Pan H, Huang B, Lu Y, et al. Human papillomavirus type 16 and 18 infection is associated with lung cancer patients from the central part of China. Oncol Rep. 2008;20:333–9.

(109) Goto A, Li CP, Ota S, Niki T, Ohtsuki Y, Kitajima S, et al. Human papillomavirus infection in lung and esophageal cancers: analysis of 485 Asian cases. J Med Virol. 2011;83:1383–90.

(110) Chen SP, Hsu NY, Wu JY, Chen CY, Chou MC, Lee H, et al. Association of p53 codon 72 genotypes and clinical outcome in human papillomavirus-infected lung cancer patients. Ann Thorac Surg. 2013;95:1196–203.

(111) Tung MC, Wu HH, Cheng YW, Wang L, Chen CY, Yeh SD, et al. Association of epidermal growth factor receptor mutations with human papillomavirus 16/18 E6 oncoprotein expression in nonsmall cell lung cancer. Cancer. 2013;119:3367–76.

(112) Cheng Y, Chiou H, Sheu GT, Hsieh LL, Chen CY, Su JM, et al. The association of human papillomavirus 16/18 infection with lung cancer among nonsmoking Taiwanese women. Cancer Res. 2001;61: 2799–803.

(113) Chiou HL,WuMF, Liaw YC, ChengYW,Wong RH, Chen CY, et al. The presence of human papillomavirus type 16/18 DNA in blood circulationmay act as a risk marker of lung cancer in Taiwan. Cancer. 2003;97:1558–63.

(114) Kato T, Koriyama C, Khan N, Samukawa T, Yanagi M, Hamada T, et al. EGFR mutations and human papillomavirus in lung cancer. Lung Cancer. 2012;78:144–7.

(115) Baba M, Castillo A, Koriyama C, Yanagi M, Matsumoto H, Natsugoe S, et al. Human papillomavirus is frequently detected in gefitinib-responsive lung adenocarcinomas. Oncol Rep. 2010;23: 1085–92.

(116) Carpagnano GE, Koutelou A, NatalicchioMI, Martinelli D, Ruggieri C, Di Taranto A, et al. HPV in exhaled breath condensate of lung cancer patients. Br J Cancer. 2011;105:1183–90.

(117) Lee SH, Vigliotti VS, Vigliotti JS, Pappu S. Routine human papillomavirus genotyping by DNA sequencing in community hospital laboratories. Infect Agent Cancer. 2007;2:1–11.

(118) Dillner J, Andersson-Ellström A, Hagmar B, Schiller J.High risk genital papillomavirus infections are not spread vertically. Rev Med Virol. 1999 Jan-Mar;9(1):23-9.

(119) Gélinas JF, Manoukian J, Côté A.Lung involvement in juvenile onset recurrent respiratory papillomatosis: a systematic review of the literature.Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 2008 Apr;72(4):433-52.

(120) Gorgoulis VG, Zacharatos P, KotsinasA, KyroudiA, RassidakisAN, Barbatis C, Ikonomopoulos JA, Herrington CS, Kittas C.Human papilloma virus (HPV) is possibly involved in laryngeal but not in lung carcinogenesis. Hum Pathol. 1999 Mar;30(3):274-83.

(121) Welt A , Hummel M, Niedobitek G, Stein H.Human papillomavirus infection is not associated with bronchial carcinoma: evaluation by in situ hybridization and the polymerase chain reaction. J Pathol. 1997 Mar;181(3):276-80.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1

ΕΝΗΜΕΡΩΤΙΚΟ ΕΝΤΥΠΟ ΣΥΜΜΕΤΟΧΗΣ

ΣΕ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ

Τα παρακάτω στοιχεία θα αξιοποιηθούν στα πλαίσια της έρευνας που διεξάγεται στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Κρήτης, με τίτλο *«Ανίχνευση του ιού των ανθρωπίνων θηλωμάτων (HPV) στον καρκίνο του πνεύμονα»*.

Θα τηρηθεί η αρχή του ιατρικού απορρήτου, εξασφαλίζοντας την ανωνυμία του συμμετέχοντος στην έρευνα, τα δε στοιχεία που θα προκύψουν δεν πρόκειται να παραχωρηθούν σε τρίτους, ξένους προς τον ερευνητικό χώρο, ούτε να διατεθούν για εμπορικούς ή άλλους σκοπούς.

Συμφωνείτε να χρησιμοποιηθούν τα στοιχεία σας στην παραπάνω μελέτη;

Συμφωνώ ☐ Διαφωνώ ☐

Παρακαλώ, συμπληρώστε τα παρακάτω πεδία (τα πεδία σημειωμένα με (*) είναι προαιρετικά).

*Όνομα..... Φύλο : Άρρεν ☐ Θήλυ ☐

Έτος γέννησης..... Τόπος διαμονής.....

Επάγγελμα.....

*Τηλ.επικοινωνίας..... *e-mail.....

Έχει κάποιος στην οικογένειά σας καρκίνο του πνεύμονα

Όχι ☐ Ναι ☐ βαθμός συγγένειας.....

Πριν την εμφάνιση της νόσου :

-καπνίζατε; ☐ Όχι, ποτέ ☐ Ναι, περιστασιακά (<1 πακέτο/εβδομάδα)

☐ Ναι, συστηματικά ☐ Ναι, είχα όμως διακόψει.....πριν

-είχατε εξετασθεί για τον ιό HPV; Όχι Ναι *Θετικό* ☐ *Αρνητικό* ☐

-είχατε εμβολιασθεί για τον ιό HPV; Όχι ☐ Ναι ☐ πριν από……

-λαμβάνατε κάποιου είδους φαρμακευτική αγωγή; Όχι ☐ Ναι ☐

Εάν ναι, παρακαλώ σημειώστε ποιά και για πόσο διάστημα…….....

…….....

.....

.....

Ημερομηνία *Υπογραφή συμμετέχοντος*

…….. …….

(τα πεδία σημειωμένα με (*) είναι προαιρετικά)

Για οποιαδήποτε περαιτέρω διευκρίνιση ή απορία, μπορείτε να επικοινωνήσετε μαζί μας στο e-mail : mansar81@yahoo.gr και στον αριθμό: 6942445161.

Σας ευχαριστούμε θερμά για τη συνεργασία σας .

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3

ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΥΓΕΙΑΣ - ΠΡΟΝΟΙΑΣ & ΚΟΙΝΩΝΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΕΓΓΥΗΣ
ΔΙΟΙΚΗΣΗ ΥΓΕΙΟΝΟΜΙΚΗΣ ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑΣ ΚΡΗΤΗΣ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟ ΓΕΝΙΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΗΡΑΚΛΕΙΟΥ
Τ.Θ 1352, ΒΟΥΤΕΣ, ΗΡΑΚΛΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟ

Ηράκλειο 6/12/2011
Αρ. πρωτ.: 15701

ΠΡΟΣ: Δ/ντή Ιατρικής Υπηρεσίας
Καθηγητή κ Γ.Βελεγράκη

ΘΕΜΑ: «Έγκριση ερευνητικού πρωτοκόλλου που θα διεξαχθεί στο Εργαστήριο Κλινικής Ιολογίας του ΠαΓΝΗ»

Το Ε.Σ στη συνεδρίασή του της 30/11/2011, αφού έλαβε υπόψη την επιστολή του Αν. Καθηγητή Κλινικής Ιολογίας κ. Γ. Σουρβίνο, με αρ.πρωτ.15701/17-11-2011, τη θετική εισήγηση της Ομάδας Εργασίας της Επιτροπής Ηθικής και Δεοντολογίας, καθώς και τα επισυναπτόμενα έγγραφα, εισηγείται θετικά στην έγκριση του ερευνητικού πρωτοκόλλου με θέμα **«Ανίχνευση του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων(HPV) στον καρκίνο του πνεύμονα»**, που θα διεξαχθεί στο Εργαστήριο Κλινικής Ιολογίας του Νοσοκομείου μας.

Για το Επιστημονικό Συμβούλιο
Καθηγητής Δημήτρης Γεωργόπουλος

ΠΡΟΕΔΡΟΣ
Δημήτρης Γεωργόπουλος
Καθηγητής
Δ/ντής ΜΕΘ Ενηλίκων

ΑΝΑΠΛ. ΠΡΟΕΔΡΟΣ
Μαργιωρής
Ανδρέας
Δ/ντής Εργαστηρίου
Κλινικής Χημείας
Βιοχημείας

ΜΕΛΗ

Βενυχάκη Μαρία
Επικ. Καθηγήτρια
Κλινικής Χημείας
Βιοχημείας

Γεώργιος Μαλτεζάκης
Δ/ντής ΕΣΥ
Πνευμονολογικής Κλινικής

Καλμπάκης
Κωνσταντίνος
Επιμελητής Α' Παθολογικής
Ογκολογικής Κλινικής

Ηλίας Αθανασάκης
Επιμελητής Β'
Γεν.Χειρουργικής Κλινικής

Πέτσας Γεώργιος
Ειδικευόμενος
Μ/Γ Κλινικής

Πρινάρη
Αγγελική
Διευθύντρια
Ν.Υ

Μανδόλας Παναγιώτης
ΤΕ Ιατρικών Εργαστηρίων

Γραμματεία
Μαρία Κλινάκη
Τηλ.: 2810392478

Tumor Biol.
DOI 10.1007/s13277-013-1419-2

RESEARCH ARTICLE

Detection and genotype analysis of human papillomavirus in non-small cell lung cancer patients

Emmanouela Sarchianaki · Stavros P. Derdas · Markos Ntaoukakis · Elena Vakonaki · Eleni D. Lagoudaki · Ismini Lasithiotaki · Anna Sarchianaki · Anastasios Koutsopoulos · Emmanouil K. Symvoulakis · Demetrios A. Spandidos · Katerina M. Antoniou · George Sourvinos

Received: 6 October 2013 / Accepted: 12 November 2013
© International Society of Oncology and BioMarkers (ISOBM) 2013

Abstract Although the role of human papillomavirus (HPV) in the development of uterine cervical cancer is well established, the role of HPV in lung carcinogenesis remains controversial. The detection rates of HPV DNA are subject to a wide variation from 0 to 100 %. This is partly influenced by the detection techniques employed. To elucidate the impact of HPV infection on lung parenchyma, we analyzed 100 non-small cell lung cancer (NSCLC) specimens (39 squamous cell carcinomas, 50 adenocarcinomas, 5 samples with characteristics of both squamous cell and adenocarcinoma, 5 undifferentiated and 1 large cell carcinoma) from the region of Crete, Greece. Sixteen non-cancerous samples served as the negative controls. DNA was extracted from 100 paraffin-embedded tissue sections obtained from NSCLC patients. The specimens were examined for the detection of HPV DNA by Real-Time PCR using GP5+/GP6+ primers. Furthermore, the HPV-positive samples were subjected to genotyping. In contrast to the absence of viral genomes in the control samples, HPV DNA was detected in 19 NSCLC specimens (19 %). In particular, 4 squamous cell carcinomas, 12 adenocarcinomas, 1 sample with characteristics of both squamous cell and adenocarcinoma, and 2 undifferentiated samples were HPV-positive. The distribution of HPV genotypes was as follows: HPV 16: eight cases (42.1 %); HPV 11: three cases (15.8 %); HPV 6: one case (5.2 %); HPV 59: one case (5.2 %); HPV 33: two cases (10.5 %); HPV 31: two cases (10.5 %) and HPV 18: two cases (10.5 %). The presence of HPV in the tumor samples provides evidence of the potential role of HPV in NSCLC and strongly argues for additional research on this issue.

Keywords HPV · Genotypes · Non-small cell lung cancer · Real-Time PCR

Katerina M. Antoniou and George Sourvinos are equally the co-last authors.

E. Sarchianaki · S. P. Derdas · M. Ntaoukakis · E. Vakonaki · A. Sarchianaki · E. K. Symvoulakis · D. A. Spandidos · G. Sourvinos (✉)
Laboratory of Clinical Virology, Medical School, University of Crete, Heraklion 71003, Crete, Greece
e-mail: sourvino@med.uoc.gr

E. D. Lagoudaki · A. Koutsopoulos
Laboratories of Pathology, School of Medicine, University of Crete, Heraklion, Crete, Greece

I. Lasithiotaki · K. M. Antoniou
Department of Thoracic Medicine and Laboratory of Molecular & Cellular Pneumonology, University Hospital, Medical School, University of Crete, Heraklion, Crete, Greece

Introduction

Lung cancer is a major health issue and the leading cause of cancer-related mortality worldwide. The pathogenesis of lung cancer is complex, and is believed to occur due to the interaction between environmental and genetic factors [1, 2]. The main risk factors that have been implicated thus far are cigarette smoking, environmental pollution, radiation, and exposure to asbestos [2]. However, not every carcinoma of the lung is associated with one of these factors. Lung cancer accounts for more deaths than any other type of cancer in both men and women [1].Tobacco smoking or cigarette smoke exposition are strongly associated with the development of lung cancer [2] since smoking is responsible for 80–90 % of such cancers [1, 2].

Human papillomaviruses (HPVs) are DNA tumor viruses that infect keratinocytes in the epithelia. More than 100 types have been identified and are classified as either low risk or high risk, depending on the associated risk of cancer development [3–6]. HPV is a double-stranded DNA virus and is an

Published online: 06 December 2013

established etiological agent for cancer of the cervix [3–6]. Cervical cancer has been linked specifically to several types of HPV, with a high preponderance of HPV 16 [3–6]. The role of these viral infections has been established by the regular presence of HPV DNA in the respective tumor biopsy specimens, by the demonstration of viral oncogene expression (E6 and E7) in tumor material and by the identification of the transforming properties of these genes [7–10]. Moreover, E6 and E7 expressions are required for maintaining the malignant phenotype of cervical carcinoma cell lines, while epidemiological studies have pointed to these HPV infections as the major risk factor for cervical cancer development [11, 12].

In addition, HPV is responsible for the majority of anal cancers, for 25 % of head and neck cancers and a subset of vaginal, vulvar, and penile cancers [10–12]. Since 1979, when Syrjanen first suggested that HPV is responsible for lung cancer [13], several studies have been carried out in order to establish the etiological association between HPV and lung cancer [13–19]. A discrepancy in the prevalence of human HPV infection in lung cancer was found among recent studies from different countries with racial and geographical variations. Due to this wide range of variability of HPV prevalence, the role of HPV in lung cancer, specifically in non-small cell lung cancer, which accounts for 80 % of lung cancer cases, remains to be elucidated [14–19].

The presence of HPV in the airways of lung cancer patients has been previously investigated by our study and other study groups through research of the virus in bronchial aspirates, fresh lung tissue, and paraffin-embedded lung tissues [13, 15, 17, 19]. However, the results of the aforementioned studies and reviews of the literature are not conclusive due to heterogeneity in different geographical research areas and methodologies. A marked escalation in the rate of discovery of new types of human virus has occurred over the last 5 years, mainly due to recent technological advances in their detection. The first review of HPV involvement in lung cancer involved the aforementioned virus in 2,468 cases of patients with lung cancer [13]. In the first meta-analysis published on the HPV genome to date, 100 studies were eligible, including 7,381 lung cancer cases from different geographical regions [17]. In total, 1,653 (22.4 %) samples tested HPV-positive and the effect size was 0.348 (95 % confidence interval (CI)=0.333–0.363; fixed-effects model), and 0.220 (95 % CI=0.18–0.259; random effects model) [17]. The aforementioned detection prevalence is in accordance with previous reviews in 2002 [13] and in 2008 (slightly higher, 24.5 %) [17].

As far as Europe is concerned, the link between HPV and lung cancer has not been extensively investigated. Therefore, in the current study, we examined the presence of oncogenic HPVs in lung cancer among 100 non-small cell lung cancer patients by detecting the DNA of these viruses using Real-Time PCR and DNA sequencing analysis.

Materials and methods

Study group

Ninety-one male and nine female non-small cell lung cancer patients were randomly selected from the region of Crete, Greece between 1996 and 2009. Patients were included into this study according to the following criteria: (1) they all had primary lung cancer regardless of stage and histological type of cancer, (2) none had received radiotherapy or chemotherapy prior to surgery, (3) all biopsies were examined and the diagnosis was confirmed by expert pathologists. As regards the smoking status, 7 patients (15.5 %) were non-smokers, 9 patients (20 %) smoked less than 30 packs/year (p/y), 15 patients (33.3 %) smoked between 31 and 60 p/y and 14 patients (31.1 %) smoked more than 61 p/y, while 55 cases were missing data. The mean age of the patients with lung carcinoma was 62.8 years (Standard deviation (SD) 11.1).

Forced expiratory volume in 1 second (FEV1) / forced vital capacity (FVC) was 0.76 (SD 11.37). FEV1 % was 82.3 % (SD 18.9). The distribution was as follows according to disease severity: 3.0 % had FEV1 less than 50 % (1 case), 35.3 % had between 50 and less than 80 % (12 cases), and 61.7 % had equal or higher than 80 % (21 cases). Totals differ due to missing values.

Patients treated before biopsy, with distant metastases or coexistent other tumors at the time of diagnosis were excluded from this study. The histological types included were 39 squamous cell carcinomas, 50 adenocarcinomas, 5 samples with characteristics of both squamous cell and adenocarcinoma, 5 undifferentiated non-small cell lung carcinomas, and 1 large cell carcinoma. Pulmonary function tests, performed within 1–3 months before biopsy, were expressed as percentages of the predicted normal values.

For this study, 16 specimens were used as the negative controls. Four of the specimens were obtained from healthy tissue adjacent to the tumor, while 12 samples were obtained from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. The study was approved by the Ethics Committee of the University Hospital of Heraklion in Crete, Greece. All patients and control subjects provided written informed consent prior to enrollment.

Specimens

Biopsies from lung parenchyma were obtained from both the non-small cell lung cancer patients and the controls. Three to five sections (5-μm-thick) were cut from paraffin-embedded blocks using a sterile scalpel and transferred into a 1.5-ml Eppendorf tube at the Department of Pathology, University Hospital of Heraklion, Crete, Greece. Special care was taken to avoid cross-contamination among the samples during the above process.

Extraction of DNA

To deparaffinize and extract DNA from the sections, the QIAamp DNAFFPE Tissue Kit (Cat. No 56404 QIAGEN) was used and processed according to the manufacturer's recommendations. All the DNA samples were quantified spectrophotometrically and normalized aliquots were produced for each sample. The quality control of the DNA samples was accomplished by checking for the successful amplification of beta-2-microglobulin by PCR. DNA isolation was performed in a separate area of the laboratory distant from the PCR area. Meticulous care was taken to avoid cross-contamination of the DNA.

Real-time PCR

The presence of HPV was detected by Real-Time PCR using general primers [GP5+ (5′-TTTGTTACTGTGGTAGATAC TAC-3′) and GP6+ (3′-CTTATACTAAATGTCAAATAAA AAG-5′)] targeting the L1 region of the viral genome using SYBR®Green I dye. DNA was amplified in a PCR reaction in a final volume 20 μl containing 2× Maxima SYBR Green/ ROX qPCR Master Mix (Fermentas) and 300 nM of each primer. After initial denaturation at 94 °C for 3 min, samples were subjected to 40 cycles of amplification, comprised of denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 44 °C for 1 min and elongation at 72 °C for 90 s, followed by a melt curve analysis, in which the temperature was increased from 44 to 94 °C at a linear rate of 0.2 °C/s [20]. Data were collected during annealing (two measurements) and at all times during melt curve analysis. Experiments were conducted on a Mx3000P real-time PCR thermal cycler using software version 4.1 (Stratagene, La Jolla, CA).

For each PCR reaction, HPV DNA isolated from cervical cancer specimens was used as a positive control while sterile water was substituted for template DNAs serving as a negative control. To prevent specimen contamination, we processed each PCR reaction in a laminar flow hood, using small batches, changing the gloves each time and filtering the pipette tips and cleaning the equipment surface.

HPV genotyping

All HPV-positive samples were subjected to genotyping. The LINEAR ARRAY HPV Genotyping (Roche) Test which is a qualitative test that detects 37 high- and low-risk human papillomavirus genotypes was employed according to the manufacturer's instructions. This kit was selected for its high sensitivity, specificity, and reliability [21].

Results

One hundred malignant lung cancer biopsies from 100 patients, 9 females and 91 males, 4 adjacent normal lung tissues, and 12 biopsies from patients with idiopathic pulmonary fibrosis were examined for the presence of HPVs.

Nineteen out of the 100 NSCLC patients (19 %) were found positive for HPV DNA by Real-Time PCR using the general HPV primers GP5+/GP6+ (Fig. 1). Two patients were female and 17 were male. Among the HPV-positive samples, 12 were adenocarcinomas, 4 squamous cell carcinomas, 2 undifferentiated non-small cell lung carcinomas and 1 with the characteristics of both adenocarcinoma and squamous cell carcinoma (Table 1). All the control specimens tested for the presence of HPV DNA were found negative.

We subsequently determined the incidence of genotypes in the HPV-positive specimens. Both high- and low-risk HPV genotypes were detected, with the high-risk types prevailing in number and frequency over the low-risk HPV genotypes. In more detail, eight cases were HPV 16 (42.1 %), two cases HPV 18(10.5 %), two cases HPV 33 (10.5 %), two cases HPV 31 (10.5 %), three cases HPV 11 (15.8 %), one case HPV 6 (5.2 %), and one case HPV 59 (5.2 %) (Table 2).

FEV1/FVC was 0.76 (SD 11.37). FEV1 % was 82.3 % (SD 18.9). The distribution was as follows according to disease severity: 3.0 % had FEV1 less than 50 % (1 case), 35.3 % had between 50 and less than 80 % (12 cases), and 61.7 % had equal or higher than 80 % (21 cases).

HPV-positive patients had FEV1/FVC of 0.78 (SD 0.19). Their mean FEV1 % was 84.5 % (SD 18.4) and their mean age was 60.5 years (SD 10.6). HPV-negative patients had FEV1/FVC 0.75 (SD 0.8). For this group, the mean FEV1 % was 81.8 % (SD 19.4). Their mean age was 65.8 years (SD 11.2). Eight cases were HPV 16 (42.1 %), two cases HPV 18 (10.5 %), two cases HPV 33 (10.5 %), two cases HPV 31 (10.5 %), three cases HPV 11 (15.8 %), one case HPV 6 (5.2 %), and one case HPV 59 (5.2 %) (Table 2).

There was no significant correlation observed between the HPV-positive and HPV-negative cases in relation to the demographic, histology, smoking habit, or lung functional parameters.

Discussion

In our study, we examined 100 paraffin-embedded lung samples from patients with non-small cell lung cancer using Real-Time PCR to detect the presence of HPV genome. We detected HPV DNA in 19 % (19 of 100 patients) of patients with carcinomas but not in any of the control samples.

Lung cancer is the leading cause of cancer-related mortality worldwide and is the most common cause of cancer-related mortality in Greece, accounting for 574 deaths per million

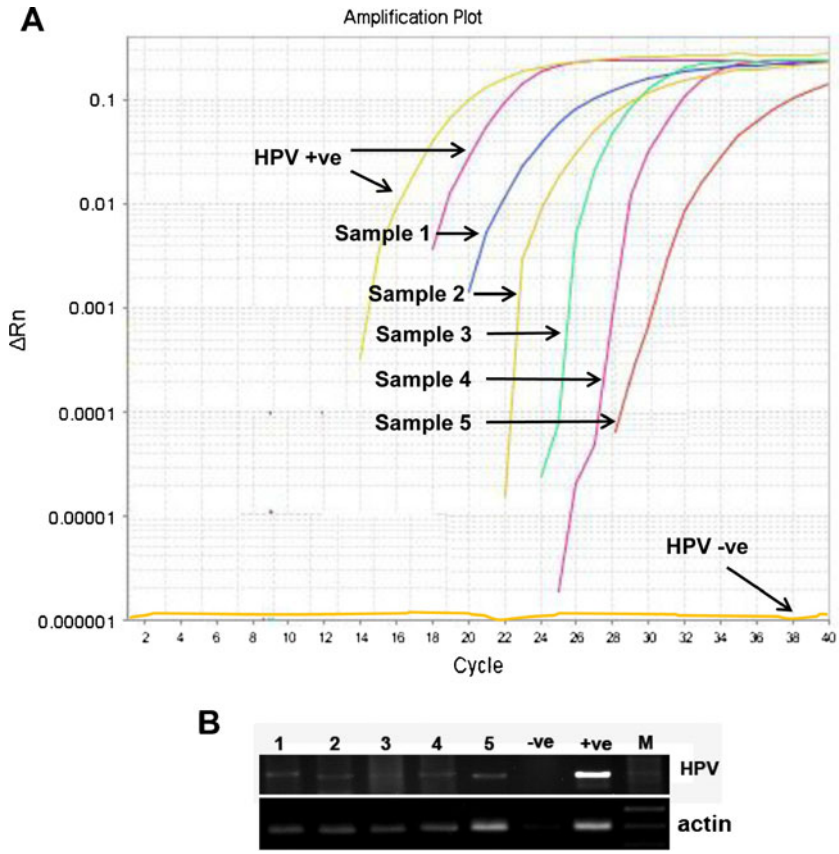


Fig. 1 Results of Real-Time qualitative PCR **(a)** and agarose gel electrophoresis **(b)** for the detection of HPV in NSCLC samples. **(a)**: Amplification plots of five HPV-positive NSCLC samples (samples 1-5) using the HPV general primers GP5+/GP6+. **(b)**: Visualization of the Real-Time PCR products on a 2 % agarose gel. Actin was used a reference gene. *M* Molecular weight marker; *+ve*: positive control; *-ve*: negative control

Table 1 Demographical and histological data and smoking status of the 100 NSCLC Patients

	No of patients	HPV positive
Gender		
Male	91	17
Female	9	2
Histological type		
Adenocarcinoma	50	12
Squamous cell carcinoma	39	4
Large cell carcinoma	1	-
Undifferentiated NSCLC	5	2
Both adenocarcinoma and squamous cell	5	1
Smoking status		
Non-smokers	7	-
≤30 p/y	9	3
31–60 p/y	15	3
≥61 p/y	14	2
No data found	55	11
FEV1		
≤50 %	1	-
50–79 %	12	3
≥80 %	21	4
No data found	66	12

individuals per year [1].Cigarette smoking is the main risk factor. However, only 20 % of smokers develop lung cancer thus indicating the involvement of additional risk factors [1, 2, 22].

The identification of early molecular events in lung carcinogenesis, such as ras gene mutations or p53 inactivation, may have a major impact on the early detection of this disease [22]. The key oncogenic mechanism of HPV is mediated by its ability to interfere with the cell cycle and tumor-suppressive function of the cell through its oncoproteins, E6 and E7, that inactivate p53 and Rb proteins, respectively [10–12]. More specifically, this event leads to the increased expression of the E6 and E7 oncoproteins [11]. E6 binds to the p53 gene, whose function is retaining the integrity of DNA, inducing apoptosis or cell cycle arrest [12]. Moreover, E7 targets the pRb tumor suppressor gene, resulting in abnormal cell proliferation and tumor growth [12]. Among the newly discovered viruses, Merkel Cell Polyomavirus (MCPyV or MCV) has gained the most attention due to its link with a rare human cancer. In further detail, our study group has detected MCPyV prevalence in approximately 10 % of men with NSCLC in combination with the deregulated expression of *BRAF* and *Bcl-2* genes, suggesting that these events likely contribute to the pathogenesis of NSCLC [23, 24].

It has to be highlighted that there was significant heterogeneity between the studies stratified by HPV detection technique, but the random effects in between-strata comparison

Table 2 Classification of high-/low-risk HPV genotypes in the HPV-positive NSCLC samples

HPV genotype	No. of HPV-positive samples
High risk	
16	8
18	2
31	2
33	2
59	1
Low risk	
6	1
11	3

were not significant [17]. It can be concluded that the reported rates in HPV detection in lung cancer may be better explained by geographical study origin and histological types of cancer than by HPV detection methodology [17]. In Europe and the US the average reported frequencies were 17 % and 15 %, respectively, the mean number of HPV in Asian lung cancer samples was 35.7 % [17]. Particularly high frequencies of up to 80 % were observed in Okinawa (Japan) and Taichung (Taiwan), while on the other hand, a low prevalence of HPV in patients with lung carcinomas has been detected in Southern Europe [19]. However, in meta-regression, the HPV detection method, geographical origin, and histological type were not significant study-level covariates. The detection rate varied from 0 to 100 %, depending on the primer set used, the conditions under the experiments were carried out and the technique employed.

The average prevalence of HPV in lung cancer cases examined to date is 22 % and HPV 16 and 18 are the most common types found, as in cervical lesions [13, 15, 17], which is in agreement with the results of the current study. Importantly, HPV 16/18 E6 and E7 oncoproteins can mediate the expression of multiple target genes and proteins, such as p53/pRb, VEGF, HIF-1α, cIAP-2, and hTERT, and contribute to cell proliferation, angiogenesis and cell immortalization through different signaling pathways in lung cancer [25–27]. Recent evidence has revealed that HPV 16/18 (HPV 16/18) E6 oncoprotein may contribute to EGFR mutations in Taiwanese patients with lung cancer [28], while patients with both HPV infections and EGFR mutations had the best survival outcome in a recent report [29], suggesting that HPV 16/18 infection has a relevant clinical significance by predicting outcome and targeted oncotherapy [28, 29].

Most frequently, HPV-DNA of the high-risk types 16, 18, 31, and 33 was found from the research of the current literature [13, 15, 17]. HPV 16/18 are the types most frequently detected in high-grade squamous intraepithelial lesions and invasive carcinomas [26]. However, the low-risk types 6 and 11 were also detected, mainly in squamous cell carcinomas. All lung cancer subtypes were detected, particularly the high-risk types 16, 18, 31, and 33; the low-risk types 6 and 11 were also found, the latter mainly in association with squamous cell carcinomas. Specifically, the presence of HPV was not restricted to squamous cell carcinomas, but was also reported in all other NSCLC subtypes, as well as SCLC [30, 31]. In our study, in accordance with the aforementioned reports, the majority of cases were found HPV 16-positive (>40 %), while HPV positivity with percentages >10 % were detected for HPV 18, 31, 33, and HPV 11.

No significant difference in histological type was observed between the histology types of squamous cell carcinomas and adenocarcinomas in the prevalence rate of HPV infection, in large Asian population-based studies, using the same detection methodology [32, 33]. However, we found a positivity of >20 % (12/50, 24 %) of HPV positive cases in adenocarcinomas samples, followed by squamous cancer with an incidence of 4/39 (10.26 %). Several recent lines of evidence suggest that additional host factors such as p53 codon 72 genotypes or epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations contribute to NSCLC carcinogenesis in addition to the presence of HPV sequences [34, 35]. Furthermore, tobacco smoking habits and exposure to environmental pollution are considered as major risk factors for NSCLC. The incidence and impact of the above genetic and non-genetic factors vary among different geographical populations which in turn may explain the discrepancy in the HPV detection rates.

No correlation was detected with functional parameters of respiratory physiology or smoking status. However, we have to take into consideration the limitation of this retrospective study, regarding some missing data unavailable for our analysis. A recent meta-analysis showed that four covariates were also significantly associated with HPV detection rate, such as older age, older age at smoking initiation, fewer years of active smoking, and fewer total pack years [17]. Moreover, many studies from Taiwan have shown that HPV infection correlates with lung cancer in non-smoking females. However, the interpretation of the aforementioned finding is not known [36–38].

Recent studies have reported a frequent detection of the HPV genome in primary lung adenocarcinomas of the recurrent patients who were responsive to EGFR-tyrosine kinase inhibitor, suggesting that HPV presence in lung cancer may be related to a genetic background related to EGFR mutations [28]. It was interesting that patients with E6-positive tumors had a greater frequency of EGFR mutations than those with E6-negative tumors (41 % vs 20 %), suggesting a pathogenetic role of HPV 16/18 E6 to EGFR mutations in lung cancer, at least in the Taiwanese population [28]. Moreover, HPV 16/18 E6 is involved in p53 inactivation contributing with this mechanism to HPV-mediated lung tumorigenesis [28].

HPV has been implicated in multiple types of cancer, but its clinical significance in lung cancer remains controversial.

Since the prevalence of HPV 16/18 infection was higher in lung adenocarcinoma among Taiwanese females, the aim of a recent study was to evaluate the clinical impact of HPV infections in lung adenocarcinoma [29, 39]. HPV infections were identified in 35.2 % of patients and associated with localized and smaller-sized tumors. Patients with HPV infections had a significantly better survival and a significantly reduced mortality risk after adjustments of age, tumor extent, EGFR mutations status and treatments [29, 40].

Recent studies have investigated the use of less invasive techniques in this field, such as the use of exhaled breath condensate (EBC) (41). For this purpose, 89 lung cancer patients and 68 controls were included in that study [41]. The presence of HPV infection was investigated in their EBC, paired bronchial brushing, and neoplastic lung tissue through genotyping, and the presence of an HPV infection was detected in 16.4 % of the subjects affected by NSCLC [41], but in none of the controls. Future programmes involving lung cancer screening with more advanced methodology are required in order to further investigate the possible role of the HPV virus in lung carcinogenesis [42].

At this point, we have to mention some major study limitations. Unfortunately, by attempting a more advanced statistical analysis, it did not come across any significant difference since HPV infection frequency follows the observed frequency of the histology sub-groups. Additionally, missing values in relation to smoking habit or spirometry readings did not allow any further analysis. Partly, this is attributable to the retrospective nature of the current study. For this reason, authors can only discuss their study findings exclusively in the light of descriptive statistics. Based on the detected HPV prevalence, we believe that it is challenging to design a prospective study with a larger sample and more emphasis on the socio-demographic, clinical, lung functional features, and economic status of the enrolled patients. In conclusion, this study highlights the potential importance of HPV as a risk factor and causal agent for NSCLC. Moreover, our percentage of 19 % is in accordance with a recent meta-analysis, suggesting that HPV is the second most common risk factor after cigarette smoking. Specific HPV types, such as HPV 16/18 E6 and E7 have been shown to interfere with the expression of several cell cycle oncoproteins, important to cell proliferation, angiogenesis, cell immortalization, and other signalling pathways [10, 11], and thus, it would be of interest to evaluate the expression levels of these two viral proteins, determining the status of HPV infection in the NSCLC specimens, lytic or latent, leading to potential deregulation of host pathways. Moreover, recent evidence has highlighted not only the increasing prevalence of HPV, but also its clinical significance in the prognosis and targeted therapy of NSCLC [28, 29, 39, 40]. The aforementioned findings indicating the high prevalence of HPV in the tumor samples provide evidence of the potential role of HPV in NSCLC and strongly support additional research in this field.

Conflicts of interest None declared.

References

1. Bray F, Jemal A, Grey N, Ferlay J, Forman D. Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008–2030): a population-based study. Lancet Oncol. 2012;13:790–801.
2. Murray CJ, Lopez AD. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990–2020: Global Burden of Disease Study. Lancet. 1997;349:1498–504.
3. de Villiers E-M, Fauquet C, Broker TR, Bernard H-U, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. Virology. 2004;324:17–27.
4. Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, zur Hausen H, de Villiers EM. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. Virology. 2010;401:70–9.
5. Muñoz N, Bosch FX, Castellsagué X, Díaz M, de Sanjose S, Hammouda D, et al. Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. Int J Cancer. 2004;111:278–85.
6. Parkin DM, Bray F. Chapter 2: The burden of HPV-related cancers. Vaccine. 2006;24:11–25.
7. Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. J Clin Pathol. 2002;55:244–65.
8. Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. Clin Sci. 2006;110:525–41.
9. Brink AA, Snijders PJ, Meijer CJ, Berkhof J, Verheijen RH. HPV testing in cervical screening. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 2006;20:253–66.
10. zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. J Natl Cancer Inst. 2000;92:690–8.
11. Munger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M, et al. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. J Virol. 2004;78:11451–60.
12. Garner-Hamrick PA, Fostel JM, Chien WM, Banerjee NS, Chow LT, Tr B, et al. Global effects of human papillomavirus type 18 E6/E7 in an organotypic keratinocyte culture system. J Virol. 2004;78:9041–50.
13. Syrjanen KJ. HPV infections and lung cancer. J Clin Pathol. 2002;55:885–91.
14. Mammas IN, Sourvinos G, Zaravinos A, Spandidos DA. Vaccination against human papilloma virus (HPV): epidemiological evidence of HPV in non-genital cancers. Pathol Oncol Res. 2011;17:103–19.
15. Klein F, Amin Kotb WF, Petersen I. Incidence of human papilloma virus in lung cancer. Lung Cancer. 2009;65:13–8.
16. Sourvinos G, Mammas IN, Derdas S, Spandidos DA. Human papillomaviruses (HPVs) in lung cancer: a causative trigger or just a coincidence? Lung Cancer. 2013;79:95–6.
17. Syrjänen K. Detection of human papillomavirus in lung cancer: systematic review and meta-analysis. Anticancer Res. 2012;32:3235–50.
18. Kountouri MP, Mammas IN, Spandidos DA. Human papilloma virus (HPV) in lung cancer: unanswered questions. Lung Cancer. 2010;67:125020.

19. Papadakis ED, Soulitzis N, Spandidos DA. Association of p53 codon 72 polymorphism with advanced lung cancer: the Arg allele is preferentially retained in tumours arising in Arg/Pro germline heterozygotes. Br J Cancer. 2002;87:1013–8.
20. de Araujo M, De Marco L, Santos C, Rubira-Bullen I, Ronco G, Pennini I, et al. GP5+/6+ SYBR Green methodology for simultaneous screening and quantification of human papillomavirus. J Clin Virol. 2009;45:90–5.
21. Roberts CC, Swoyer R, Bryan JT, Taddeo FJ. Comparison of real-time multiplex human papillomavirus (HPV) PCR assays with the linear array HPV genotyping PCR assay and influence of DNA extraction method on HPV detection. J Clin Microbiol. 2011;49: 1899–906.
22. Viallet J, Minna JD. Dominant oncogenes and tumor suppressor genes in the pathogenesis of lung cancer. Am J Respir Cell Mol Biol. 1990;2:225–32.
23. Lasithiotaki I, Antoniou KM, Derdas SP, Sarchianaki E, Symvoulakis EK, Psaraki A, et al. The presence of Merkel cell polyomavirus is associated with deregulated expression of BRAF and Bcl-2 genes in non-small cell lung cancer. Int J Cancer. 2013;133:604–11.
24. Antoniou KM, Lasithiotaki I, Symvoulakis E, Derdas SP, Psaraki A, Spandidos DA, et al. Molecular pathological findings of Merkel cell polyomavirus in lung cancer: a possible etiopathogenetic link? Int J Cancer. 2013;133(12):3016–7. doi:10.1002/ijc.28308.
25. Park MS, Chang YS, Shin JH, Kim DJ, Chung KY, Shin DH, et al. The prevalence of human papillomavirus infection in Korean non-small cell lung cancer patients. Yonsei Med J. 2007;48:69–77.
26. Fei Y, Yang J, Hsieh WC, Wu JY, Wu TC, Goan YG, et al. Different human papillomavirus 16/18 infection in Chinese non-small cell lung cancer patients living in Wuhan, China. Jpn J Clin Oncol. 2006;36: 274–9.
27. Cheng YW, Wu MF, Wang J, Yeh KT, Goan YG, Chiou HL, et al. Human papillomavirus 16/18 E6 oncoprotein is expressed in lung cancer and related with p53 inactivation. Cancer Res. 2007;67: 10686–93.
28. Tung MC, Wu HH, Cheng YW, Wang L, Chen CY, Yeh SD, et al. Association of epidermal growth factor receptor mutations with human papillomavirus 16/18 E6 oncoprotein expression in non-small cell lung cancer. Cancer. 2013;119(18):3367–76. doi:10.1002/cncr.28220.
29. Wang JL, Fang CL, Wang M, Yu MC, Bai KJ, Lu PC, et al. Human papillomavirus infections as a marker to predict overall survival in lung adenocarcinoma. Int J Cancer. 2013. doi:10.1002/ijc.28349.
30. Hirayasu T, Iwamasa T, Kamada Y, Koyanagi Y, Usuda H, Genka K. Human papillomavirus DNA in squamous cell carcinoma of the lung. J Clin Pathol. 1996;49:810–7.
31. Yu Y, Yang A, Hu S, Yan H. Correlation of HPV-16/18 infection of human papillomavirus with lung squamous cell carcinomas in Western China. Oncol Rep. 2009;21:1627–32.
32. Wang Y, Wang A, Jiang R, Pan H, Huang B, Lu Y, et al. Human papillomavirus type 16 and 18 infection is associated with lung cancer patients from the central part of China. Oncol Rep. 2008;20:333–9.
33. Goto A, Li CP, Ota S, Niki T, Ohtsuki Y, Kitajima S, et al. Human papillomavirus infection in lung and esophageal cancers: analysis of 485 Asian cases. J Med Virol. 2011;83:1383–90.
34. Chen SP, Hsu NY, Wu JY, Chen CY, Chou MC, Lee H, et al. Association of p53 codon 72 genotypes and clinical outcome in human papillomavirus-infected lung cancer patients. Ann Thorac Surg. 2013;95:1196–203.
35. Tung MC, Wu HH, Cheng YW, Wang L, Chen CY, Yeh SD, et al. Association of epidermal growth factor receptor mutations with human papillomavirus 16/18 E6 oncoprotein expression in non-small cell lung cancer. Cancer. 2013;119:3367–76.
36. Cheng Y, Chiou H, Sheu GT, Hsieh LL, Chen CY, Su JM, et al. The association of human papillomavirus 16/18 infection with lung cancer among nonsmoking Taiwanese women. Cancer Res. 2001;61: 2799–803.
37. Chiou HL, Wu MF, Liaw YC, Cheng YW, Wong RH, Chen CY, et al. The presence of human papillomavirus type 16/18 DNA in blood circulation may act as a risk marker of lung cancer in Taiwan. Cancer. 2003;97:1558–63.
38. Cheng YW, Chiou HL, Chen JT, Chou MC, Lin TS, Lai WW, et al. Gender difference in human papillomavirus infection for non-small cell lung cancer in Taiwan. Lung Cancer. 2004;46:165–70.
39. Kato T, Koriyama C, Khan N, Samukawa T, Yanagi M, Hamada T, et al. EGFR mutations and human papillomavirus in lung cancer. Lung Cancer. 2012;78:144–7.
40. Baba M, Castillo A, Koriyama C, Yanagi M, Matsumoto H, Natsugoe S, et al. Human papillomavirus is frequently detected in gefitinib-responsive lung adenocarcinomas. Oncol Rep. 2010;23: 1085–92.
41. Carpagnano GE, Koutelou A, Natalicchio MI, Martinelli D, Ruggieri C, Di Taranto A, et al. HPV in exhaled breath condensate of lung cancer patients. Br J Cancer. 2011;105:1183–90.
42. Lee SH, Vigliotti VS, Vigliotti JS, Pappu S. Routine human papillomavirus genotyping by DNA sequencing in community hospital laboratories. Infect Agent Cancer. 2007;2:1–11.