



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΟΓΚΟΓΟΝΩΝ
ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΤΟΥ ΙΟΥ ΗΡΝ ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΟΥΣ
ΚΕΦΑΛΗΣ ΚΑΙ ΤΡΑΧΗΛΟΥ


ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΣΠΥΡΙΔΩΝ ΠΑΝ. ΛΑΣΚΑΡΗΣ

ΑΘΗΝΑ 2016



Αφιερωμένο
στον πατέρα μου,
χωρίς την έμπνευση του
οποίου δεν θα γινόμουν ποτέ
Ωτορινολαρυγγολόγος

Ο ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΟΥΣ


 ΜΥΜΙ ΔΡΟΜΩΝΑ ΙΗΤΡΟΝ, ΚΑΙ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ, ΚΑΙ ΥΓΙ-
 ΙΑΜ ΚΑΙ ΠΑΜΑΚΕΙΔΑ, ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ ΠΑΝΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΠΑΣΑ
 ΝΗΣΤΟΡΑΣ ΠΟΙΕΥΜΕΝΟΣ, ΕΠΙΤΕΜΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΜ ΚΑΤΑ Δ
 ΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ ΟΡΚΟΝ ΤΟΜΔΕ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΝ
 ΤΗΜΔΕ' ΗΗΣΑΣΘΑΙ ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΞΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧ-
 ΗΝ ΤΑΥΤΗΝ ΙΣΑ ΓΕΜΕΤΗΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΩΣΑΣΘ
 ΑΙ ΚΑΙ ΧΡΕΔΗΝ ΧΡΗΖΟΝΤΙ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣΘΑΙ, ΚΑΙ ΓΕ-
 ΜΟΣ ΤΟ ΕΞ ΔΥΤΕΟΥ ΑΔΕΛΦΟΙΣ ΙΣΟΝ ΕΠΗΓΓΙΜΕΕΙΝ ΑΓΓΕΣ
 Ι, ΚΑΙ ΔΙΔΑΞΕΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ, ΗΜ' ΧΡΗΖΟΥΣΙ ΜΑ
 ΝΘΑΝΕΙΝ ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΣ, ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΗΣ
 ΤΕ ΚΑΙ ΑΚΡΟΣΙΩΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΛΟΙΠΗΣ ΑΡΑΣΗΣ ΜΑΘΗΣΙΩΣ
 ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣΘΑΙ, ΚΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΤΟΙ
 ΣΙ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΔΑΞΑΝΤΟΣ, ΚΑΙ ΜΑΧΗΤΑΙΣΙ ΞΥΓΓΕΓΡΑΜΜ
 ΕΝΟΙΣΙ ΤΕ ΚΑΙ ΣΥΚΚΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΩ, ΙΗΤΡΕΣ, ΑΙΩΝ, ΔΕ Ο
 ΥΔΕΝΙ ΜΑΙΤΗΜΑΧΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟ
 ΜΤΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙ ΔΗΝΗΣΕΙ
 ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΗΝ, ΕΙΡΞΕΙΝ. ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΦΑΡΜ
 ΑΚΟΝ ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙΜΟΝ, ΟΥΔΕ ΥΦΗΓΗΣ
 ΟΜΑΙ ΞΥΜΒΟΥΜΗΝ ΤΟΙΗΜΔΕ' ΟΜΟΙΩΣ ΔΕ ΟΥΔΕ ΓΥΝ
 ΑΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΙΟΝ ΔΩΣΩ. ΑΓΝΩΣ ΔΕ ΚΑΙ ΟΣΙΩΣ
 ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗ
 Ν, ΟΥ ΤΕΜΕΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΜΙΘΩΣΤΗΣ, ΕΚΧΩΡΗΣΩ
 ΔΕ ΕΡΓΑΤΗΣΙΝ ΑΝΔΡΑΣΙ ΠΡΗΞΙΩΣ ΤΗΣΔΕ. ΕΣ ΟΙΚΙΩΣ Δ
 Ε ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ ΕΣΙΩ ΕΣΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ,
 ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ ΕΚΤΟΣ ΕΩΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΣΙ
 ΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΗΣ, ΤΗΣ ΤΕ ΑΛΗΣ ΚΑΙ ΑΦΡΟΔΙΣΙΩΝ
 ΕΡΓΩΝ ΕΠΙ ΤΕ ΓΥΜΝΑΣΙΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΜΕ-
 ΡΩΩΝ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΤΕ ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ. Α Δ' ΑΝ ΕΝ
 ΘΕΡΑΠΕΙΗ, Η ΙΔΩ, Η ΑΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΔΝΕΥΘΕΡΑΠΗ
 ΤΗΣ ΚΑΤΑ ΒΙΟΝ ΑΜΟΡΩΠΩΝ, Α ΜΗ ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΛΑ
 ΡΕΣΘΑΙ ΕΞΩ, ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝ
 ΑΙ ΤΑ ΤΟ ΙΑΥΤΑ, ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΜΔΕ ΕΠΙΤΕ
 ΛΕΑ ΠΟΙΕΟΝΤΙ, ΚΑΙ ΜΗ ΞΥΓΧΕΟΝΤΙ, ΕΙΗ ΕΡΑΥΡΑΣΘ
 ΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ ΔΟΞΑ ΖΟΜΕΜΩ, ΠΑΡΑ ΠΑ
 ΣΙΝ ΑΜΟΡΩΠΟΙΣ ΕΣ ΤΟΝ ΑΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ ΠΑΡΑΒΑΙΝΟΝΤ
 Ι ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΟΥΝΤΙ, ΤΑΜΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕΩΝ

Ευχαριστίες

Η παρούσα διδακτορική διατριβή δεν θα μπορούσε να ολοκληρωθεί χωρίς την συμβολή σημαντικών ανθρώπων και συνεργατών οι οποίοι με στήριξαν και με υποστήριξαν καθ' όλη την διάρκεια της δικής μου προσπάθειας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή της παρούσας διατριβής, Καθηγητή Ωτορινολαρυγγολογίας κ. Ιωάννη Σέγγα, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω διδακτορική διατριβή υπό την επίβλεψή του.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστώ τον Ομ. Καθηγητή Ωτορινολαρυγγολογίας κ. Λεωνίδα Μανωλόπουλο, μέλος της τριμελούς μου επιτροπής, για την ενθάρρυνση, την αμέριστη συμπαράστασή του και τις επιστημονικές συμβουλές του σε θέματα αιχμής τα οποία κατά την εκπόνηση της παρούσας διατριβής υπήρξαν άκρως πολύτιμα και αναγκαία.

Ευχαριστώ από καρδιάς τον Αναπλ. Καθηγητή Ωτορινολαρυγγολογίας κ. Παύλο Μαραγκουδάκη για την αδιάλειπτη καθοδήγησή του καθόλα τα στάδια της παρούσας διατριβής, καθώς και για την επιστημονική και ηθική υποστήριξη που μου παρείχε και συνεχίζει να μου παρέχει.

Θα ήθελα ιδιαίτερος και από βάθους καρδιάς να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στη Διευθύντρια του Ιολογικού τμήματος του αντικαρκινικού - ογκολογικού νοσοκομείου Αθηνών "Άγιος Σάββας" Δρ. Ευσταθία Πανοτοπούλου όπως επίσης και στους συνεργάτες της Ελπίδα Τσιμπλάκη και Έλενα Αργύρη για την πολύτιμη βοήθεια, τις συμβουλές, την αμέριστη συμπαράστασή τους και την υποστήριξη τους ηθική και οικονομική καθώς επιτελέστηκε σε αυτό το τμήμα η διεξαγωγή της ανίχνευσης και τυποποίησης του ιού HPV όλων των δειγμάτων των ιστών αυτής της διατριβής.

Θερμότερες ευχαριστίες οφείλω στον Επικ. Καθηγητή, τ. Διευθυντή ΩΡΛ Αντικαρκινικού Νοσοκομείου Πειραιά «Μεταξά» κ. Κώστα Μπάνη η συμβολή του οποίου σε αυτή η διατριβή ήταν καθοριστική, όπως επίσης και στους Διευθυντές ΩΡΛ του Αντικαρκινικού Νοσοκομείου Πειραιά «Μεταξά» κκ. Π.

Σαρῳφ, Γ. Τασόπουλου και Ν. Πετρίδη για την παραχώρηση των ιστών με καρκίνο κεφαλής και τραχήλου.

Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω και στα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής και συγκεκριμένα τους:

1. Ομ. Καθηγητή Ωτορινολαρυγγολογίας κ. Ι. Ξενέλη
2. Καθηγητή Χειρουργικής κ. Μ. Κωνσταντουλάκη
3. Επικ. Καθηγητή Χειρουργικής κ. Ν Αλεξάκη
4. Λέκτορα Ωτορινολαρυγγολογίας κ. Ε. Κυροδήμο

για την τιμή που μου έκαναν να συμμετάσχουν στην επταμελή εξεταστική επιτροπή.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω προς τους ασθενείς και τις οικογένειές τους που δέχθηκαν με προθυμία να συμμετάσχουν στη μελέτη αυτή.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Ο ιός των ανθρωπίνων θηλωμάτων (HPV).....	1
1.1 Σύντομη ιστορική αναδρομή	1
1.2 Ταξινόμηση του ιού HPV	2
1.3 Γονιδιωματική οργάνωση και ιϊκές πρωτεΐνες	4
1.3.1 Πρωτεΐνη E1.....	7
1.3.2 Πρωτεΐνη E2.....	8
1.3.3 Πρωτεΐνη E4.....	8
1.3.4 Πρωτεΐνη E5.....	9
1.3.5 Πρωτεΐνη E6.....	10
1.3.6 Πρωτεΐνη E7.....	12
1.3.7 Πρωτεΐνες L1 και L2	14
1.4 Κύκλος ζωής του HPV	15
1.5 Κλινική εξέλιξη HPV λοίμωξης	18
1.6 Βασική ανοσοβιολογία του ιού HPV	21
1.7 HPV και καρκινογένεση.....	22
1.8 Μηχανισμοί ανοσοδιαφυγής του ιού HPV	23
2. Καρκίνος κεφαλής και τραχήλου.....	25
2.1 Επιδημιολογικά στοιχεία	25
2.2 Πρόγνωση- Θεραπεία	37
2.3 Μοριακή βιολογία ακανθοκυτταρικού καρκινώματος κεφαλής και τραχήλου.....	40
3. HPV και ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα κεφαλής και τραχήλου (ΑΚΚΤ)	49
3.1 Ο ρόλος του HPV στην παθογένεση του ΑΚΚΤ	49
3.2 Κλινικό προφίλ των HPV (+) ΑΚΚΤ	51
3.3 Μηχανισμοί βελτιωμένης ανταπόκρισης των HPV (+) ΑΚΚΤ στη θεραπεία.....	57
3.4 Θεραπευτικές προσεγγίσεις των HPV (+) ΑΚΚΤ	61
3.5 Επιδημιολογικό προφίλ των HPV (+) ΑΚΚΤ	66

3.6 Μέθοδοι ανίχνευσης HPV λοιμώξεις στα ΑΚΚΤ	67
---	----

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4. Σκοπός	74
5. Υλικά & Μέθοδοι	75
5.1 Υλικά	75
5.2. Μέθοδοι	76
5.2.1 Επιλογή ασθενών και λήψη βιολογικού υλικού	76
5.2.2 Απομόνωση νουκλεϊκών οξέων από κυτταρολογικά δείγματα	77
5.2.3 Απομόνωση νουκλεϊκών οξέων από ιστολογικά δείγματα.....	79
5.2.4 Ανίχνευση και τυποποίηση του HPV με μικροσυστοιχίες (Microarrays).....	80
5.3 Στατιστική ανάλυση.....	88
6. Αποτελέσματα	89
6.1. Ασθενείς με ακανθοκυτταρικά καρκινώματα κεφαλής και τραχήλου.....	89
6.2. Ασθενείς με ακανθοκυτταρικά καρκινώματα της στοματικής κοιλότητας .	98
6.3. Ασθενείς με ακανθοκυτταρικά καρκινώματα του λάρυγγα.....	107
6.4. Ασθενείς με ακανθοκυτταρικά καρκινώματα του στοματοφάρυγγα	117
6.5. Ασθενείς με ακανθοκυτταρικά καρκινώματα του υποφάρυγγα, του ρινοφάρυγγα και της ρινικής κοιλότητας.....	124
7. Συζήτηση	129
8. Περίληψη στην Ελληνική	139
9. Περίληψη στην Αγγλική	141
10. Λεξικό αγγλικών όρων και συντομογραφιών	143
11. Βιβλιογραφία	146
12. Δημοσιεύσεις	189

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΛΑΣΚΑΡΗΣ ΠΑΝ. ΣΠΥΡΙΔΩΝ

1. ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Όνοματεπώνυμο: Σπυρίδων Παν. Λάσκαρης
Ημερομηνία γέννησης: 18/10/1977
Τόπος γέννησης: Αθήνα Αττική
Υπηκοότητα: Ελληνική
Διεύθυνση οικίας: Κολοκοτρώνη 25, Βούλα, Τ.Κ. 16673
Τηλέφωνα οικίας: 210-9659026
Διεύθυνση ιατρείου: Λαζαράκη 8, Γλυφάδα. Τ.Κ. 16675
Τηλέφωνα εργασίας: 210-8949827
Ηλεκτρονικό ταχυδρομείο: spyroslaskaris@yahoo.com
Άλλα: Κινητό τηλέφωνο: 6947845889

2. ΠΑΡΟΥΣΑ ΘΕΣΗ:

- Ιδιωτικό Ωτορινολαρυγγολογικό ιατρείο (Γλυφάδα, Λαζαράκη 8)
- Τακτικός Ιατρός Ιατρικού Κέντρου Αθηνών (Κλινική Παλαιού Φαλήρου)
- Medical Manager στην εταιρεία Merck υπεύθυνος για το τμήμα της Ογκολογίας (Head and Neck oncology and metastatic colorectal cancer).

3. ΣΤΡΑΤΙΩΤΙΚΗ ΘΗΤΕΙΑ:

Οκτώβριος 2004 – Δεκέμβριος 2004: Ιατρός υπηρεσίας Φάρων και Φαρόπλοιου Πειραιάς.

Δεκέμβριος 2004 – Μάρτιος 2005: Ιατρός Στρατιωτικής Μονάδας Ναυτικής Διοίκησης Ιονίου Πάτρα.

4. ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΥΠΑΙΘΡΟΥ:

Από Σεπτέμβρη 2007 έως και Δεκέμβρη 2007: Υποχρεωτική υπηρεσία υπαίθρου στο Κέντρο Υγείας Μυκόνου, Νομού Κυκλάδων.

5. ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ – ΜΕΤΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ – ΔΙΠΛΩΜΑΤΑ

Εγκύκλιες σπουδές:

1989-1995: Λεόντειο Γυμνάσιο και Λύκειο Νέας Σμύρνης (Βαθμός «**Άριστα**»).

Προπτυχιακή εκπαίδευση:

1997-1999: Έπειτα από εξετάσεις εισαγωγή στην Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Μιλάνο

2000-2004: Έπειτα από εξετάσεις εισαγωγή στην Ιατρική Σχολή του Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

2004: Πτυχίο Ιατρικής Σχολής Αθηνών (Λιάν καλώς)

2004: Άδεια Ασκήσεως Ιατρικού Επαγγέλματος

Μεταπτυχιακή εκπαίδευση:

3/2006 – 4/2007: Ειδικότητα στην Α' Χειρουργική Κλινική του Ειδικού Αντικαρκινικού Νοσοκομείου Πειραιώς «Μεταξά». Εκλεγμένο μέλος επιστημονικού συμβουλίου Ειδικού Αντικαρκινικού Νοσοκομείου Πειραιώς «Μεταξά».

9/2006 – 6/2007: Παρακολούθηση υπερήχων κεφαλής και τραχήλου στο Ιδιωτικό ιατρείο του Δρ. Ιωάννη Λάσκαρη.

16/1/2008 – 16/1/2009: Ειδικότητα στην Ωτορινολαρυγγολογική κλινική του Γενικού Νοσοκομείου «Παιδων Πεντέλης»

17/1/2009 – 3/2012: Ειδικότητα στην Ωτορινολαρυγγολογική κλινική του Ειδικού Αντικαρκινικού Νοσοκομείου Πειραιώς «Μεταξά».

Εκπαίδευση στο εσωτερικό:

4/2010 – 9/2010: Παρακολούθηση Ενδοσκοπικής Χειρουργικής στο Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών «Γ.Γεννηματάς».

10/2010 – 3/2011: Εκπαίδευση στην πλαστική και επανορθωτική χειρουργική στο Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών «Γ.Γεννηματάς».

Μετεκπαίδευση στο εξωτερικό:

4/2011– 06/2011: Τρίμηνη εκπαίδευση στην Πανεπιστημιακή ΩΡΛ κλινική του Erlangen της Γερμανίας (HNO Universitätsklinikum Erlangen).

Ξένες Γλώσσες: Αγγλικά (πολύ καλά), Ιταλικά (άριστα), Γαλλικά (άριστα).

6. ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

- Υποψήφιος διδάκτορας Παν. Αθηνών με τίτλο: “HPV και Καρκίνος Κεφαλής και Τραχήλου” υπό τους Καθ. Ι. Σέγγα, Ομ. Καθ. Α. Μανωλόπουλο και Αναπλ. Καθ. Π. Μαραγκουδάκη στα νοσοκομεία ΕΑΝΠ «Μεταξά», ΠΓΝ Ιπποκράτειο και ΑΟΝΑ «Άγιος Σάββας».

7. ΚΛΙΝΙΚΟ/ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟ ΕΡΓΟ

Από την έναρξη της στρατιωτικής μου θητείας από τον 10/2004 έως και σήμερα η κλινική δραστηριότητά μου χρονολογικά έχει ως ακολούθως:

17/9/2004 – 28/9/2004: Εθελοντής ιατρός Παραολυμπιακών Αγώνων Athens 2004 και συγκεκριμένα στο άθλημα του χαντμπολ.

10/2004 - 03/2005: Ως ιατρός υπηρεσίας Φάρων και Φαρόπλοιου στον Πειραιά όπως και ιατρός Στρατιωτικής Μονάδας Ναυτικής Διοίκησης Ιονίου Πάτρα υπηρετήσα και άσκησα μαζί με τη στρατιωτική θητεία μου, τα ιατρικά καθήκοντα μου στις μονάδες τις οποίες υπηρέτησα.

3/2006 – 4/2007: Ως ιατρός στην Α' Χειρουργική Κλινική του Ειδικού Αντικαρκινικού Νοσοκομείου Πειραιώς «Μεταξά» ελάμβανα ενεργά μέρος σε όλες τις δραστηριότητες της Κλινικής και συμμετείχα στις εφημερίες της Κλινικής, τόσο στο τμήμα Επειγόντων Περιστατικών, όσο και στην Κλινική χειριζόμενος ασθενείς με προβλήματα όλου του φάσματος της Γενικής Χειρουργικής. Έλαβα μέρος σε μεγάλο αριθμό χειρουργείων όλου του φάσματος της ειδικότητας. Επίσης υπήρξα εκλεγμένο μέλος του επιστημονικού συμβουλίου του Ειδικού Αντικαρκινικού Νοσοκομείου Πειραιώς «Μεταξά». (Υπεύθυνος Διευθυντής: Δ. Κονδύλης).

10/2007– 12/2007: Άσκησα την υποχρεωτική υπηρεσία υπαίθρου στο Κέντρο Υγείας Μυκόνου, όπου ελάμβανα ενεργά μέρος σε όλες τις δραστηριότητες του Κέντρου Υγείας και συμμετείχα στις εφημερίες, όσο και στις διακομιδές ασθενών σε Νοσοκομεία. Τελείωσα πρόωρα την υπηρεσία υπαίθρου λόγω του διορισμού μου στο ΓΝΠΠ Πεντέλης στην Ωτορινολαρυγγολογική Κλινική.

16/1/2008 – 16/1/2009: Ως ιατρός στην Ωτορινολαρυγγολογική Κλινική του Γενικού Νοσοκομείου Παίδων Πεντέλης ελάμβανα ενεργά μέρος σε όλες τις δραστηριότητες της Κλινικής και συμμετείχα στις εφημερίες της, τόσο στο τμήμα Επειγόντων Περιστατικών, όσο και στην Κλινική χειριζόμενος παιδιατρικούς ασθενείς με προβλήματα όλου του φάσματος της Ωτορινολαρυγγολογίας. Χειρούργησα πάνω από 120 παιδιατρικούς ασθενείς (αμυγδαλεκτομές/αδενετομές/μυριγγοτομές).

(Υπεύθυνος Διευθυντής:Καλλής).

16/1/2009 – 16/3/2012: Ως ιατρός στην Ωτορινολαρυγγολογική Κλινική του Γενικού Νοσοκομείου Παίδων Πεντέλης ελάμβανα ενεργά μέρος σε όλες τις δραστηριότητες της Κλινικής και συμμετείχα στις εφημερίες της, τόσο στο τμήμα Επειγόντων Περιστατικών, όσο και στην Κλινική χειριζόμενος ογκολογικούς κυρίως ασθενείς με προβλήματα όλου του φάσματος της ογκολογικής αλλά και κλινικής Ωτορινολαρυγγολογίας. Πρώτος Χειρούργος πάνω από 350 θυρεοειδεκτομών όπως και μεγάλο φάσμα άλλων χειρουργικών επεμβάσεων.

(Υπεύθυνος Διευθυντής: Ν. Πετρίδης)

Κατά τη διάρκεια της ειδικότητας μου εκπαιδεύτηκα επίσης:

4/2010 – 9/2010: Παρακολούθηση Ενδοσκοπικής Χειρουργικής στο Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών «Γ.Γεννηματάς». (Υπεύθυνος Διευθυντής: Ζ. Πάππας)

10/2010 – 3/2011: Εκπαίδευση στην πλαστική και επανορθωτική χειρουργική στο Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών «Γ.Γεννηματάς». (Υπεύθυνος Διευθυντής: Τσούτσος)

4/2011 – 06/2011: Τρίμηνη εκπαίδευση στην Πανεπιστημιακή ΩΡΛ κλινική του Erlangen της Γερμανίας (HNO Universitätsklinikum Erlangen). Ελάβα ενεργά μέρος σε όλες τις δραστηριότητες της Κλινικής και συμμετείχα στις εφημερίες της, τόσο στο τμήμα Επειγόντων Περιστατικών, όσο και στην Κλινική χειριζόμενος ασθενείς ευρέος φάσματος που αφορά την Ωτορινολαρυγγολογία. Ειδικότερα συμμετείχα ενεργά στο τμήμα υπερήχων, σιελοενδοσκοπήσεων καθώς και σε αριθμό χειρουργικών επεμβάσεων. (Υπεύθυνος Διευθυντής: Prof. Dr. Dr. h. c. Heinrich Iro)

10/2012 – σήμερα: Ιδιωτικό Ιατρείο στη Γλυφάδα

10/2012 – σήμερα: Τακτικός Ιατρός Ιατρικού Κέντρου (Κλινικής Παλαιού Φαλήρου). Συνεργάτης Ιατρός Mediterraneo Hospital, Mediterraneo Hospital, Ευρωκλινική Αθηνών καθώς και Athens ORL Clinic.

11/2014 – 2/2015: Διευθυντής (Επιστημονικά Υπεύθυνος) Ωτορινολορυγγολογικής Κλινικής Ιατρικού Κέντρου (Κλινικής Παλαιού Φαλήρου).

8. ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΕΡΓΟ

Στις Ωτορινολαρυγγολογικές Κλινικές των:

α. Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο «Ιπποκράτειον»,
β. Ειδικό Αντικαρκινικό Νοσοκομείο Πειραιώς «Μεταξά»,
γ. Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών «Γ. Γεννηματάς» καθώς και στο ιολογικό τμήμα του Αντικαρκινικού - Ογκολογικού Νοσοκομείου Αθηνών «Άγιος Σάββας» πραγματοποίησα έρευνα σχετικά με τη συσχέτιση καρκίνου κεφαλής και τραχήλου σε συνδυασμό με θετικό ιό ανθρώπινων κονδυλωμάτων (HPV) στα πλαίσια της Διδακτορικής μου Διατριβής.

Ερευνήθηκαν συνολικά 137 ογκολογικοί ασθενείς από όλες τις περιοχές της κεφαλής και τραχήλου, φρέσκοι ιστοί των οποίων άμεσα μετά το χειρουργείο και χωρίς να έχει

προηγηθεί ακτινοθεραπεία απεστάλλησαν στο ιολογικό τμήμα του Αντικαρκινικού - Ογκολογικού Νοσοκομείου Αθηνών «Άγιος Σάββας» για Polymerase Chain Reaction (PCR).

Κατά τη διάρκεια αυτής της εργασίας δημοσιεύτηκε paper στο Anticancer Research με τίτλο: Human Papillomavirus infections in squamous cell carcinoma of larynx. S.Laskaris, L.Manolopoulos, I.Seggas, P.Maragoudakis, E.Panotopoulou.

Anticancer Research; October 2014 vol. 34no. 10 5749-5753

9. ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΣΥΓΓΡΑΦΙΚΟ ΕΡΓΟ

ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΕΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ/POSTERS

- Human Papillomavirus infections in squamous cell carcinoma of larynx .
S.Laskaris, L. Manolopoulos, I. Seggas, P. Maragoudakis, E. Panotopoulou
Anticancer Research; October 2014 vol. 34no. 10 5749-5753

- Study of VEGF and HER-2/NEU levels in patients suffering breast cancer.
C.Mpakogianni, S.Laskaris, N.Milonakis, Em.Haviars, St.Kouzouka, D.Kondilis,
A.Karavelis, A.Hloraki-Mpompota. “Metaxa” Oncology Hospital of Piraeus, Greece

- Surgery treatment of liver metastasis by radiofrequency ablation, resection or in combination.
14th INTERNATIONAL POSTGRADUATE COURSE OF THE INTERNATIONAL ASSOCIATION OF SURGEONS, GASTROENTEROLOGISTS AND ONCOLOGISTS 2006. C.Farfarellos, S.Laskaris, D.Sabanis, C.Chryssikopoulos, M.Farfarellou, P.Manikis, D.Magganas, D.Kondylis

- Pre-operative chemoradiotherapy improves the sphincter preservation rate in patients with rectal cancer located within 5cm of the anal verge.
14th INTERNATIONAL POSTGRADUATE COURSE OF THE INTERNATIONAL ASSOCIATION OF SURGEONS, GASTROENTEROLOGISTS AND ONCOLOGISTS 2006. C.Farfarellos, D.Sabanis, C.Chryssikopoulos, S.Laskaris, E.Efstathiou, D.Kondylis

- “Cervical Lymph node dissection of 6th level (pretracheal) in patients suffering of Papillary Thyroid Carcinoma”.
National Congress ENT – Head and Neck Surgery, 2009,
http://frei.gr/15hellasorl.gr/media/final_program.pdf 15o

- Incidence of metastatic well-differentiated thyroid cancer in cervical lymph nodes.
8o BUON Congress Sibiu Romania 2010.
http://buon2010.econgres.ro/atdoc/0/1264/finalprogramme_small.pdf

10. ΜΕΛΟΣ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΩΝ ΕΤΑΙΡΕΙΩΝ/ΣΥΛΛΟΓΩΝ

I. Ελληνικές

- Ωτορινολαρυγγολογική Εταιρεία (Μέλος)
- Ιατρικός Σύλλογος Πειραιώς (Μέλος)

II. Διεθνείς

- European Society of Medical Oncology (ESMO member)

11. ΣΥΓΓΡΑΦΗ ΒΙΒΛΙΩΝ

1. **Μεταστατικός καρκίνος Παχέος Εντέρου-Ορθού (1st edition 6 Απριλίου 2015)**
2. **Η ογκολογία στην Κεφαλή και τον Τράχηλο (υπό έκδοση).**

12. ΕΜΠΕΙΡΙΑ ΣΕ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ

5/2013 – 5/2014: Medical Manager της φαρμακευτικής εταιρείας Merck Serono υπεύθυνος για την ενδοκρινολογία και την υπογονιμότητα.

6/2015 – σήμερα: Medical Manager της φαρμακευτικής εταιρείας Merck Serono υπεύθυνος για την ογκολογία και συγκεκριμένα για τον καρκίνο κεφαλής και τραχήλου καθώς επίσης και για τον μεταστατικό καρκίνο παχέος εντέρου.

Κατά τη διάρκεια της εργασίας αυτής έχω πραγματοποιήσει:

- A. 14 Advisory Board με θεματολογία που αφορά την ογκολογία
- B. 30 Νοσοκομειακές Παρουσιάσεις
- Γ. 30 εκπαιδεύσεις του προσωπικού
- Δ. Ομιλίες σε συνέδρια

13. ΟΡΓΑΝΩΤΙΚΟ-ΔΙΟΙΚΗΤΙΚΟ ΕΡΓΟ

2006: Κατά την ειδικότητά μου στο ειδικό Αντικαρκινικό Νοσοκομείο Πειραιώς «Μεταξά» εκλέχθηκα από το ιατρικό προσωπικό του Νοσοκομείου στο Επιστημονικό Συμβούλιο του Νοσοκομείου όπου και διετέλεσα μέλος για έναν χρόνο.

2015: Κατά τη στελέχωση της Επιτροπής Επιστημονικών Θεμάτων & Regulatory Affairs του ΣΦΕΕ ανέλαβα χρέη μέλους με υπευθυνότητα την ομάδα εργασίας εμβολίων, παραγώγων αίματος, βιολογικών και ογκολογικών φαρμάκων.

14. ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ

A. Management – Leveraging yourself, Krauthammer 24/10/2013 – 17/12/2013

B. Bionian Academy – Προηγμένες βιοτεχνολογικές εφαρμογές στη Βιοϊατρική 27/11/2013 – 6/12/2013

Γ. Business Plan, Professional Team 19/3/2014 – 31/3/2014

Δ. FEED FORWARD 22-23/12/2015

Ε. Εκπαίδευση από ΕΥΡΩΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΗ ΕΠΕ με θέμα: ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ-ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ & ΝΟΜΟΘΕΤΙΚΟ ΠΛΑΙΣΙΟ – ΝΕΟΣ ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ – ΚΑΤΕΥΘΥΝΤΗΡΙΕΣ ΟΔΗΓΙΕΣ – ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ 17/2/2016 - 18/2/2016

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα κεφαλής και τραχήλου αντιπροσωπεύει μια ετερογενή ομάδα νεοπλασμάτων των ανώτερων τμημάτων της αναπνευστικής και της πεπτικής οδού, τα οποία χαρακτηρίζονται από διαφορετική βιολογική συμπεριφορά, κλινική πορεία και θεραπευτική προσέγγιση. Παρ' όλη την πρόοδο που έχει επιτευχθεί στους τομείς της Ογκολογίας και της Χειρουργικής, το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα κεφαλής και τραχήλου εξακολουθεί να συνδέεται με πτωχή πρόγνωση λόγω του προχωρημένου σταδίου της νόσου κατά τη διάγνωση, το οποίο χαρακτηρίζεται από υψηλό βαθμό διηθητικότητας και μεταστατικότητας. Τα τελευταία χρόνια, η σημαντική πρόοδος της μοριακής βιολογίας επέτρεψε την καλύτερη κατανόηση των μοριακών μηχανισμών οι οποίοι λαμβάνουν χώρα στη διαδικασία της καρκινογένεσης στην περιοχή της κεφαλής και του τραχήλου.

Η χρήση καπνού και η κατανάλωση οινοπνεύματος αποτελούν τους κύριους παράγοντες κινδύνου ανάπτυξης ακανθοκυτταρικού καρκινώματος κεφαλής και τραχήλου. Ωστόσο η αναγνώριση του αιτιολογικού ρόλου του ιού των ανθρωπίνων θηλωμάτων (HPV) στην παθογένεση του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, οδήγησε στη διερεύνηση της σχέσης του ιού HPV με την ανάπτυξη καρκινικών βλαβών σε διάφορες ανατομικές περιοχές της κεφαλής και του τραχήλου. Νεότερα μοριακά και επιδημιολογικά δεδομένα αναφέρουν μιας διακριτή ομάδα ακανθοκυτταρικών καρκινωμάτων κεφαλής και τραχήλου, κυρίως εκείνων που εντοπίζονται στο στοματοφάρυγγα, τα οποία οφείλονται σε λοίμωξη από ογκογόνα στελέχη του ιού HPV και χαρακτηρίζονται από ιδιαίτερα μοριακά και κλινικοπαθολογικά γνωρίσματα.

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής αποτελεί η ανίχνευση του ιού HPV σε ασθενείς με πρωτοπαθή νεοπλασμάτα κεφαλής και τραχήλου (στοματικής κοιλότητας, στοματοφάρυγγος, λάρυγγος, υποφάρυγγος, ρινοφάρυγγος, ρινικής κοιλότητας), καθώς και η συσχέτιση της HPV λοίμωξης με τα δημογραφικά/κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών και το κλινικό αποτέλεσμα (έλεγχος τοπικής υποτροπής νόσου).

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Ο ιός των ανθρωπίνων θηλωμάτων (HPV)

1.1 Σύντομη ιστορική αναδρομή

Τα ανθρώπινα γεννητικά θηλώματα είχαν ήδη αναγνωρισθεί ως μολυσματικοί παράγοντες από την αρχαιότητα και τους ρωμαϊκούς χρόνους (1). Ωστόσο, έως τα τέλη του 19^{ου} αιώνα δεν αποτελούσαν ξεχωριστή νοσολογική οντότητα και εθεωρούντο ως κλινική εκδήλωση της σύφιλης και της γονόρροιας (2). Η τεκμηρίωση της ιογενούς προέλευσης των γεννητικών θηλωμάτων έλαβε χώρα στις αρχές του 20^{ου} αιώνα. Συγκεκριμένα, το 1934 δημοσιεύθηκε η πρώτη πειραματική απόδειξη συσχέτισης της καρκινογένεσης και του ιού των ανθρωπίνων θηλωμάτων (Human Papillomavirus, HPV)(3). Παρ' όλο που τα συμπεράσματα αυτής της πειραματικής εργασίας ήταν περιορισμένα όσον αφορά στη μελέτη της ανθρωπίνου HPV νόσου λόγω πραγματοποίησής της σε κατοικίδιους επίμυς, ήταν ωστόσο κρίσιμα στη καθιέρωση της συσχέτισης μεταξύ ιογενούς λοίμωξης και καρκινογένεσης.

Ήδη από το 1930 ήταν γνωστές οι νόσοι σχετιζόμενες με τον ιό HPV και περιελάμβαναν τους δερματικούς ακροχορδώνες, τα πολλαπλά θηλώματα του λάρυγγος και τα πρωκτογεννητικά κονδυλώματα. Όμως, σε γενικές γραμμές εκείνα τα χρόνια η έρευνα για τον ιό HPV και τη συσχέτιση του με αυτές τις παθολογικές καταστάσεις ήταν πολύ πτωχή. Σημαντική πρόοδος παρατηρήθηκε τις δεκαετίες του '50 και του '60 όταν αναγνωρίστηκε η δομή του γονιδιώματος του ιού σε ανθρώπινα γεννητικά θηλώματα, ενώ παράλληλα απεδείχθη η συσχέτιση του ιικού πολλαπλασιασμού με τη διαδικασία της διαφοροποίησης των μολυσμένων επιθηλιακών κυττάρων (4).

Με τη χρήση των μοριακών τεχνικών κλωνοποίησης, κατέστη δυνατή η περαιτέρω έρευνα γύρω από τους ιούς των θηλωμάτων (Papillomaviruses-PVs), η οποία οδήγησε τη δεκαετία του '70 στην αναγνώριση του ιού HPV ως πιθανού αιτιολογικού παράγοντα του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Ειδικότερα, τα έτη 1976 και 1977 ο zurHausen δημοσίευσε αρκετές σημαντικές μελέτες, υποστηρίζοντας την υπόθεση του ότι ο ιός HPV διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη πρόκληση του καρκίνου του τραχήλου της

μήτρας(5,6).Αργότερα ο zurHausen μαζί με τους συνεργάτες του αναγνώρισε τα στελέχη HPV 16 και HPV 18 στο καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Έκτοτε, η εξέλιξη των μεθόδων της μοριακής βιολογίας οδήγησε τόσο στην ανάδειξη του HPV ως κύριου αιτιολογικού παράγοντα για την ανάπτυξη καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, όσο και στη ταυτοποίηση διαφορετικών στελεχών του ιού σε προκαρκινικές και καρκινικές βλάβες του τραχήλου της μήτρας (7). Οι μελέτες που ακολούθησαν όσον αφορά την επιδημιολογία και τη μοριακή βιολογία του ιού HPV επιβεβαίωσαν τον αιτιολογικό του ρόλο στην παθογένεση του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, ενώ παράλληλα συνέβαλαν και στην συσχέτισή του με τον καρκίνο της στοματικής κοιλότητας (8,9).Σήμερα, εκτός από τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, η ογκογόνος δράση του ιούHPV έχει αναγνωριστεί και σε ένα ποσοστόκαρκίνων του κατώτερου γεννητικού συστήματος καθώςκαι της περιοχής κεφαλής και τραχήλου (10,11).

1.2 Ταξινόμηση του ιού HPV

Ο ιός HPV είναι ένας μικρός DNA ιός χωρίς εξωτερικό περίβλημα, ο οποίος προσβάλλει το επιθήλιο του δέρματος και των βλεννογόνων (12). Ανήκει στη οικογένεια Papillomaviridae που περιλαμβάνει πάνω από 200διαφορετικά στελέχη του ιού, ο αριθμός των οποίων αυξάνεται σταθερά (13). Όλοι οι ιοί των θηλωμάτων χαρακτηρίζονται από κοινή γονιδιωματική δομή και ταξινομούνται με βάση τις διαφορές που εντοπίζονταιστην αλληλουχία του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης L1(L1 OpenReadingFrame, L1 ORF)σε "οικογένειες", "γένη", "είδη", "στελέχη", "υπότυπους" και "παραλλαγές" (14). Αναλυτικότερα, διαφορετικά γένη εμφανίζουν μικρότερη του 60%ομολογία της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του L1 ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης,ενώ οι θηλωματοϊοί ενός γένους χαρακτηρίζονται ως είδος με 60- 70% ομολογία της ίδιας αλληλουχίας. Μεταξύ των στελεχών ενός είδους η διαφορά στην αλληλουχία του L1 ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης είναι μεγαλύτερη του 10%, ενώ για τους υποτύπους και τις παραλλαγές ενός στελέχους η διαφορά αυτή είναι από 2- 10% και μικρότερη του 2%, αντίστοιχα. Όσον αφορά τους HPV (+) καρκίνους, το στέλεχος αποτελεί την σημαντικότερη ταξινομική ομάδα,

ωστόσο διαφορές μεταξύ των παραλλαγών που συνδέονται με το ογκογόνο δυναμικό τους είναι πιθανόν εξίσου ουσιώδεις (15,16). Συγκεκριμένα, ο HPV 16 έχει μελετηθεί εκτενώς λόγω της ιδιαίτερης κλινικής του σημασίας και έχουν ταυτοποιηθεί αρκετές παραλλαγές του στελέχους αυτού, σε αντίθεση με τους υποτύπους του οι οποίοι είναι πολύ λιγότεροι (17).

Τα στελέχη του ιού HPV κατατάσσονται στα πέντε από τα δώδεκα γένη των θηλωματοϊών (alpha, beta, gamma, mu και nu), ενώ στα υπόλοιπα γένη ανήκουν στελέχη που μολύνουν τα ζώα. Το γένος alpha περιλαμβάνει HPV στελέχη τα οποία σχετίζονται με την ανάπτυξη διηθητικών νεοπλασμάτων του τραχήλου της μήτρας, πρωκτογεννητικών καθώς και ακανθοκυτταρικών νεοπλασμάτων του στοματοφάρυγγος, χαρακτηρίζονται ως στελέχη υψηλού κινδύνου και βρίσκονται στα είδη 5, 6, 7, 9 και 11 (18,19). Τα πιο κοινά στελέχη που σχετίζονται με τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας αφορούν στον HPV 16 και στον HPV 18, οι οποίοι ανήκουν στα είδη 9 και 7 αντίστοιχα. Αντίθετα, τα στελέχη του γένους alpha που προκαλούν τα καλοήγη βλεννογονικά και πρωκτογεννητικά θηλώματα διακρίνονται ως χαμηλού κινδύνου με χαρακτηριστικό τον HPV 6 ο οποίος ανήκει στο είδος 10 (Πίνακας 1) (2).

Άλλα στελέχη του γένους alpha (HPV 2, HPV 27, HPV 57) καθώς και εκείνα από τα γένη beta, gamma, mu και nu, προσβάλλουν το δέρμα σε περιοχές εκτός γεννητικού συστήματος. Συγκεκριμένα, στελέχη του γένους beta (HPV 5, HPV 8, HPV 14, HPV 20) ανευρίσκονται συχνά σε ασθενείς με κονδυλωματώδη επιδερμοδυσπλασία (epidermodysplasiaverruciformis- EV), οι οποίοι εμφανίζουν μεγάλη ευπάθεια σε εκτεταμένη λοίμωξη από στελέχη του γένους αυτού (20). Η κλινική εικόνα της αρχόμενης νόσου κατά την παιδική ηλικία περιλαμβάνει βλάβες που μοιάζουν με τις κοινές μυρμηκίες, ενώ επέρχεται συνήθως κακοήθης εξαλλαγή την δεύτερη με τέταρτη δεκαετία της ζωής λόγω της έκθεσης στην ηλιακή ακτινοβολία (21). Στα ακανθοκυτταρικά καρκινώματα του δέρματος ασθενών με κονδυλωματώδη επιδερμοδυσπλασία, εντοπίζονται πολλαπλά αντίγραφα του γονιδιώματος συγκεκριμένων στελεχών του HPV, κυρίως του HPV 5 και του HPV 8 (20).

Πίνακας 1. Στελέχη του HPV που εντοπίζονται συχνότερα σε διάφορες αλλοιώσεις της γεννητικής χώρας

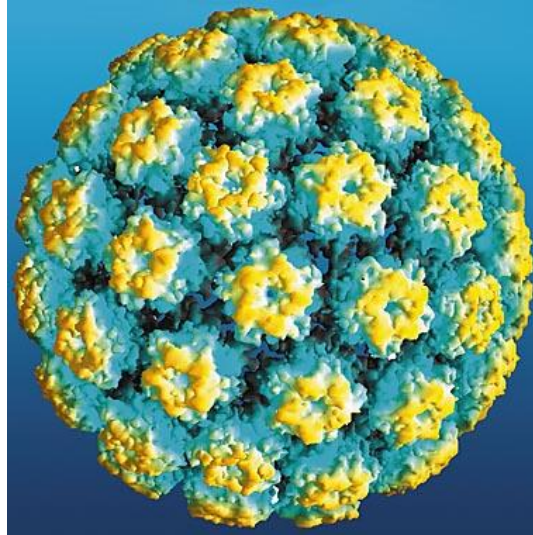
Στελέχη HPV	Αλλοίωση
6, 11	Οξυτενή κονδυλώματα
6, 11, 16, 18, 31	Επίπεδα κονδυλώματα (κυρίως στον τράχηλο) Ενδοεπιθηλιακές νεοπλασίες
16, 18, 31, 45	Καρκίνος τραχήλου μήτρας
16	Καρκίνος αιδοίου Καρκίνος πέους

1.3 Γονιδιωματική οργάνωση και ιϊκές πρωτεΐνες

Τα σωματίδια του ιού HPV έχουν διάμετρο 52- 55 nm και αποτελούνται από ένα βραχύκυκλικό μόριο διπλής έλικος DNA που περιβάλλεται από το καψίδιο του ιού, το οποίο εμφανίζει εικοσαεδρική συμμετρία συντιθέμενο από 72 πενταμερείς υπομονάδες (καψομερίδια) (22) (**Εικόνα 1**). Το γονιδίωμα του HPV έχει μέγεθος περίπου 8000 βάσεις και κωδικοποιεί έως και 8 πρωτεΐνες, η λειτουργία των οποίων κυμαίνεται από τη ρύθμιση της έκφρασης των ιϊκών γονιδίων μέχρι τις πρωτεΐνες του ιϊκού καψιδίου (capsid proteins) L1 και L2 και τις ιϊκές ογκοπρωτεΐνες E6 και E7. Αναλυτικότερα, διακρίνεται σε τρεις περιοχές (**Εικόνα 2**) (23):

- την ρυθμιστική περιοχή (Long Control Region, LCR) ή μη κωδικοποιούμενη περιοχή (Non-Coding Region, NCR)
- την πρώιμη περιοχή (Early Region, E) η οποία αποτελείται από 6 περίπου ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης (Open Reading Frames, ORFs) τα οποία κωδικοποιούν τις ρυθμιστικές πρωτεΐνες E1, E2 και E4 έως E7

- την όψιμη περιοχή (LateRegion, L), η οποία αποτελείται από 2 ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης τα οποία κωδικοποιούν τις δομικές πρωτεΐνες L1 και L2

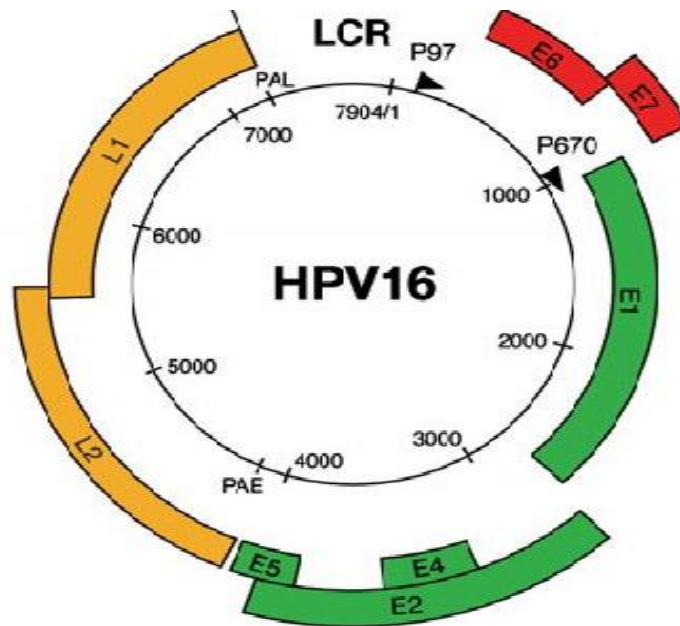


Εικόνα 1. Δομή του ιού HPV (<http://www.hhmi.org>)

Η περιοχή LCR περιέχει DNA αλληλουχίες υποκινητών (promoters) και ενισχυτών (enhancers), διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ιϊκής αντιγραφής και μεταγραφής από ιϊκά και κυτταρικά γονίδια (24). Ειδικότερα, το γονιδίωμα των στελεχών υψηλού κινδύνου του HPV περιλαμβάνει ένα πρώιμο (early promoter) και ένα όψιμο υποκινητή (late promoter) όπου ο πρώιμος υποκινητής εντοπίζεται στην LCR, με χαρακτηριστικό τον p97 του HPV 16 (25). Η ρύθμιση του πρώιμου υποκινητή πραγματοποιείται από ρυθμιστικά στοιχεία της LCR περιοχής στα οποία προσδένονται κυτταρικοί και ιϊκοί μεταγραφικοί παράγοντες, ρυθμίζοντας με αυτό τον τρόπο την έκφραση των ογκογονιδίων του ιού E6 και E7 (26). Μεταξύ των κυτταρικών μεταγραφικών παραγόντων οι οποίοι προσδένονται στα ρυθμιστικά στοιχεία της LCR συμπεριλαμβάνονται ο NF-1, AP1, Oct-1, SP-1, ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών και άλλοι (27-29). Επιπλέον, η LCR περιέχει 4 περιοχές πρόσδεσης της πρωτεΐνης E2 καθώς και μία θέση πρόσδεσης της πρωτεΐνης E1 του ιού, οι οποίες σχετίζονται με την ρύθμιση της ιϊκής αντιγραφής και της ιϊκής γονιδιακής έκφρασης (30).

Η πρώιμη ή E περιοχή περιέχει 6 ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης (E1, E2, E4, E5, E6 και E7) τα οποία είναι υπεύθυνα για τη ρύθμιση της αντιγραφής και της μεταγραφής του ιού, καθώς και για την ογκογόνο δράση του (31). Ειδικότερα, τα γονίδια E1 και E2 κωδικοποιούν εκείνες τις πρωτεΐνες οι οποίες εμπλέκονται στην έναρξη της ιϊκής αντιγραφής και της ιϊκής μεταγραφής, ενώ το γονίδιο E4 κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που συμμετέχει στην σύνθεση και ωρίμανση των νέων ιϊκών σωματιδίων. Αντίθετα, τα γονίδια E5, E6 και E7 των στελεχών υψηλού κινδύνου του ιού HPV κωδικοποιούν πρωτεΐνες οι οποίες είναι απαραίτητες για τον κακοήγη μετασχηματισμό των προσβληθέντων κυττάρων. Έχει περιγραφεί πρόσφατα σε ορισμένα στελέχη του ιού HPV η παρουσία δύο επιπλέον ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης (E3, E8), χωρίς ωστόσο να είναι γνωστές οι λειτουργίες τους (31).

Η όψιμη ή L περιοχή περιλαμβάνει δύο ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης (L1, L2) τα οποία κωδικοποιούν τις δομικές πρωτεΐνες του καψιδίου του ιού. Συγκεκριμένα, η L1 αποτελεί τη μείζονα πρωτεΐνη του καψιδίου, είναι ιδιαίτερα συντηρημένη μεταξύ των διαφόρων HPV στελεχών και είναι απαραίτητη για τη συναρμολόγηση των νέων ιϊκών σωματιδίων. Αντίστοιχα, η L2 χαρακτηρίζεται ως ελάσσονα πρωτεΐνη και ενισχύει τη σύνθεση και τη σταθερότητα του ιϊκού καψιδίου (32).



Εικόνα 2. Γονιδιωματική οργάνωση του HPV 16 (85)

1.3.1 Πρωτεΐνη E1

Το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης E1 αποτελεί μία υψηλά συντηρημένη περιοχή (highly conserved region) του ιϊκού γονιδιώματος η οποία κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη 67-76 kDa που απαιτείται για την αντιγραφή του ιϊκού γονιδιώματος (33). Η E1 πρωτεΐνη είναι μία DNA ελικάση/ATPase και εμπλέκεται στην έναρξη της αντιγραφής του DNA του ιού προσδεδεμένη σε αλληλουχίες πλούσιες σε A/T στη θέση έναρξης της αντιγραφής (30). Το αμινοτελικό άκρο (N) της E1 μήκους περίπου 200 αμινοξέων, αποτελεί μία λιγότερο καλά συντηρημένη περιοχή μεταξύ των στελεχών του HPV. Έχει βρεθεί ότι η περιοχή στο N-τελικό άκρο ενισχύει την ιϊκή αντιγραφή, ενώ συμμετέχει και στη ρύθμιση αυτής αλληλεπιδρώντας με τα σύμπλοκα κυκλικών-κυκλινοεξαρτώμενων κινασών [cyclin-CDK (Cyclin Dependent Kinase) complexes] (34). Αντίθετα, το καρβοξυτελικό άκρο (C) της πρωτεΐνης έχει δράση ελικάσης και ATPase και μεσολαβεί στην αλληλεπίδρασή της με την πρωτεΐνη E2 (35). Επιπλέον, η E1 προσδένεται μέσω της κεντρικής περιοχής της (DNA-binding domain) σε μία σχεδόν παλίνδρομη αλληλουχία στο σημείο έναρξης της αντιγραφής, η οποία περιέχει πολλαπλές θέσεις πρόσδεσης της E1 (36).

1.3.2 Πρωτεΐνη E2

Η E2 είναι μία πρωτεΐνη 50 KDa η οποία ρυθμίζει την ιϊκή μεταγραφή από τον πρώιμο υποκινητή, ενώ είναι απαραίτητη και για την αντιγραφή του ιού (23). Αποτελείται από μια περιοχή μήκους περίπου 200 αμινοξέων στο αμινοτελικό άκρο (N) η οποία συνδέεται με την περιοχή πρόσδεσης στο DNA του ιού στο καρβοξυτελικό άκρο (C) της πρωτεΐνης μήκους περίπου 100 αμινοξέων (37). Μέσω του C-τελικού άκρου της, η E2 προσδένεται και αλληλεπιδρά με συγκεκριμένες αλληλουχίες οι οποίες εντοπίζονται κυρίως στην LCR περιοχή του ιϊκού γονιδιώματος (38). Η αλληλεπίδραση (interaction) της E2 με τις αλληλουχίες αυτές σε συνεργασία με κυτταρικούς μεταγραφικούς παράγοντες, οδηγεί είτε σε ενεργοποίηση είτε σε καταστολή του πρώιμου υποκινητή. Με αυτό τον τρόπο, η E2 ρυθμίζει τη μεταγραφή των γονιδίων E6 και E7, ενώ η απώλειά της η οποία μπορεί να λάβει χώρα κατά την ενσωμάτωση του ιϊκού γονιδιώματος στο γονιδίωμα του κυττάρου, προκαλεί αυξημένα επίπεδα των ογκογόνων πρωτεϊνών E6 και E7, προωθώντας την καρκινογένεση (39).

Η περιοχή στο N-τελικό άκρο της E2 αλληλεπιδρά με την περιοχή στο C-τελικό άκρο της E1, η οποία όπως έχει ήδη αναφερθεί, περιλαμβάνει την αλληλουχία πρόσδεσης της E1 πρωτεΐνης στη θέση έναρξης της αντιγραφής, καθώς και την περιοχή της ελικάσης (40). Συνεπώς, δημιουργείται το σύμπλοκο E1/E2 στο σημείο έναρξης της αντιγραφής το οποίο προκαλεί αναδιάταξη του DNA του ιού, διευκολύνοντας την προσέλευση περισσότερων E1 μορίων και την επακόλουθη μετατόπιση της E2 από το σημείο αυτό (41). Ο σχηματισμός του E1/E2 συμπλόκου είναι απαραίτητος τόσο για την έναρξη της αντιγραφής του ιϊκού γονιδιώματος όσο και για την ενεργοποίηση των υποκινητών που βρίσκονται στη θέση έναρξης της αντιγραφής (42).

1.3.3 Πρωτεΐνη E4

Το E4ORF (OpenReadingFrame) εντοπίζεται ολόκληρο στο E2 ORF και εκφράζεται ως χιμαιρική πρωτεΐνη της οποίας τα πέντε πρώτα αμινοξέα προέρχονται από το E1 ORF, αναφερόμενη συνεπώς και ως E1^{E4} (43). Η

πρωτεΐνη E4 εμπλέκεται στο τελικό στάδιο του κύκλου ζωής του HPV, κατά τη σύνθεση και απελευθέρωση των νέων ιϊκών σωματιδίων και εκφράζεται μαζί με τις καψιδικές πρωτεΐνες στις ανώτερες στοιβάδες του επιθηλίου (23,44). Θεωρείται πως συμμετέχει στην ενίσχυση του ιϊκού πολλαπλασιασμού, στη ρύθμιση της έκφρασης των όψιμων γονιδίων καθώς και στον έλεγχο της ωρίμανσης και απελευθέρωσης των νέων ιοσωματίων. Έχει παρατηρηθεί ότι συντελεί στην αποδιοργάνωση του δικτύου κυτταροκερατίνης, προάγοντας την κατάρρευση του κυτταροσκελετού, οδηγώντας στην απελευθέρωση των ιοσωματίων από τα μολυσμένα κύτταρα της διαφοροποιημένης στοιβάδος (45).

1.3.4 Πρωτεΐνη E5

Η E5 αποτελεί μία από τις πρωτεΐνες του HPV με ικανότητα κακοήθους μετασχηματισμού των προσβεβλημένων κυττάρων (46). Πρόκειται για μικρή υδρόφοβη πρωτεΐνη 84 περίπου αμινοξέων η οποία εντοπίζεται κυρίως στις ενδοκυττάριας μεμβράνες του συστήματος Golgi και του ενδοπλασματικού δικτύου, ενώ σπανιότερα μπορεί να ανευρίσκεται στη πυρηνική μεμβράνη (47). Παρ' όλο που χαρακτηρίζεται από ικανότητα μετασχηματισμού, η E5 έχει ασθενέστερη ογκογόνο δράση σε σχέση με τις κύριες ογκοπρωτεΐνες του ιού E6 και E7 (23,48) και φαίνεται πως εμπλέκεται στα αρχικά στάδια της καρκινογένεσης και όχι στη διατήρηση του κακοήθους φαινοτύπου (46).

Η αλληλεπίδραση της E5 με τον υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EpidermalGrowthFactorReceptor- EGFR) οδηγεί σε συνεχή ενεργοποίηση του υποδοχέα και επομένως σε αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Συγκεκριμένα, η E5 προωθεί την ανακύκλωση των υποδοχέων στη κυτταρική επιφάνεια μέσω πρόσδεσής της στην ATPάση των κενοτοπίων και την επακόλουθη αναστολή της ενεργότητάς της (49). Με αυτό το τρόπο η E5 μεταβάλλει την οξειδωση των ενδοσωμάτων και την αποικοδόμηση του EGFR, καταλήγοντας σε συνεχή σηματοδότηση (46,49). Έχει αναφερθεί επίσης ότι η πρωτεΐνη E5 ελαττώνει τα επίπεδα των πρωτεϊνών του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας I (MHCI) στην

κυτταρική επιφάνεια, ώστε να αποφευχθεί η εκκαθάριση των μολυσμένων κυττάρων από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (50).

1.3.5 Πρωτεΐνη E6

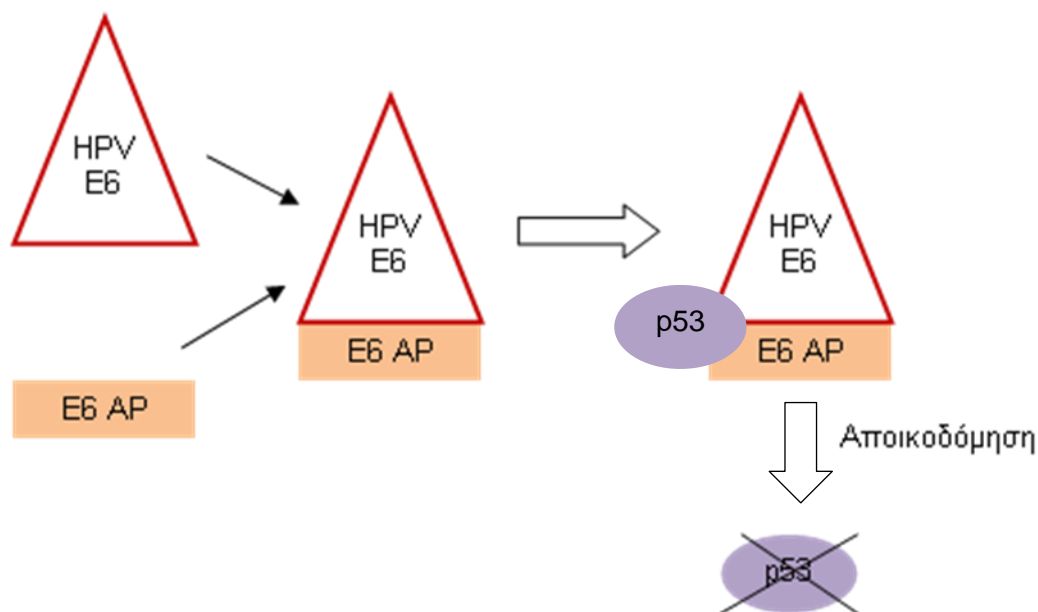
Η πρωτεΐνη E6 αποτελείται από 151 αμινοξέα και μαζί με την E7 αντιπροσωπεύουν τις κύριες ογκογόνες πρωτεΐνες των στελεχών υψηλού κινδύνου του HPV (23,51). Η E6 περιέχει δύο δομές δακτυλίων ψευδαργύρου (zinc finger domains) όπου η καθεμία φέρει δύο μοτίβα Cys-X-X-Cys (Cys-X-X-Cys motifs). Αυτές οι δομές είναι συντηρημένες μεταξύ όλων των HPV στελεχών, δείχνοντας ότι είναι απαραίτητες για τις λειτουργίες της πρωτεΐνης, οι οποίες αφορούν στην αναστολή της απόπτωσης, την αθανασία των κυττάρων και τη γενομική αστάθεια (52).

Ο καλύτερα μελετημένος μηχανισμός με τον οποίο η E6 συμβάλλει στην ογκογένεση, είναι η πρόσδεση και η αλληλεπίδρασή της ογκοπρωτεΐνης με την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη του κυττάρου p53 (53). Αναλυτικά, η E6 οδηγεί σε σημαντική αποδόμηση της p53 μέσω της προκαλούμενης από την ουβικουΐνη (ubiquitin) πρωτεόλυσης με τη συμβολή της πρωτεΐνης που συνδέεται με την E6 (E6 associated protein, E6AP) η οποία δρα ως λιγάση ουβικουΐνης. Το σύμπλεγμα E6- E6AP προσδένεται στην p53 και προσθέτει ουβικουΐνη σε λυσίνες της πρωτεΐνης, οδηγώντας με αυτό τον τρόπο σε ουβικουΐνωση και αποδόμησή της (**Εικόνα 3**) (54). Αυτή η απώλεια της λειτουργικής p53 επιδρά στους ενδογενείς κυτταρικούς μηχανισμούς της επιδιόρθωσης του DNA και της απόπτωσης, προκαλώντας γονιδιωματική αστάθεια. Εν συνεχεία, σε συνδυασμό με την αυξημένη δραστηριότητα της τελομεράσης που προκαλείται από τη δράση της E6, τα γενετικά ασταθή κύτταρα έχουν την ικανότητα να παρακάμπτουν το σημείο ελέγχου (checkpoint) στη G1 φάση και να παράγουν αντίγραφα με παρατεταμένο χρόνο ζωής (55).

Η αποδόμηση της p53 επιτυγχάνεται μόνο μέσω της E6 πρωτεΐνης των υψηλού κινδύνου στελεχών του HPV. Αντίθετα, η E6 των στελεχών χαμηλού κινδύνου παρ' όλο που μπορεί να προσδένεται στην E6AP και στην p53, δεν είναι δυνατό να οδηγήσει σε αποδόμηση της p53 (56). Επιπλέον, η αποσύνθεση της p53 προϋποθέτει την πρόσδεση της E6 των στελεχών

υψηλού κινδύνου τόσο στην κεντρική περιοχή της p53 όσο και στην E6AP, καθώς η αλληλεπίδραση της E6 μόνο με την p53 δεν οδηγεί στην αποδόμηση της τελευταίας.

Η E6 μπορεί επίσης να ασκεί την αντιαποπτωτική της δράση μέσω μηχανισμών ανεξάρτητων της p53, προσδεδεμένησε προαποπτωτικές πρωτεΐνες της οικογένειας του Bcl-2 (BAK, BAX) τις οποίες αποδομεί μέσω της οδού ουβικουΐτινης- πρωτεασώματος (57). Επιπρόσθετα, η E6 μπορεί να παρεμβαίνει στη δράση διαφόρων κυτταροκινών αναστολής της κυτταρικής αύξησης, οι οποίες εκκρίνονται έπειτα από την λοίμωξη. Ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων- α (TumorNecrosisFactor-α, TNF-α) αποτελεί προφλεγμονώδη κυτταροκίνη και αναστολέα του πολλαπλασιασμού των κερατινοκυττάρων, παράγεται δε ύστερα από την είσοδο του ιού στο κύτταρο. Οι κυτταροκίνες έχουν την ικανότητα να ενεργοποιούν το αποπτωτικό μονοπάτι μέσω διαμεμβρανικών υποδοχέων της οικογένειας των TNFR στην επιφάνεια του κυττάρου, όπως ο TNF υποδοχέας 1 (TNFR1), οFAS και ο υποδοχέας TRAIL (TNF- relatedapoptosis- inducingligandreceptor). Η E6 μπλοκάρει την απόπτωση που επάγεται από τον TNF-α μέσω πρόσδεσής της στον TNFR1, εμποδίζοντας με αυτό τον τρόπο τον σχηματισμό του συμπλέγματος σηματοδότησης της απόπτωσης και τελικά την απόπτωση (58).



Εικόνα 3. Πρόσδεση της E6 ιϊκής πρωτεΐνης στην ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53

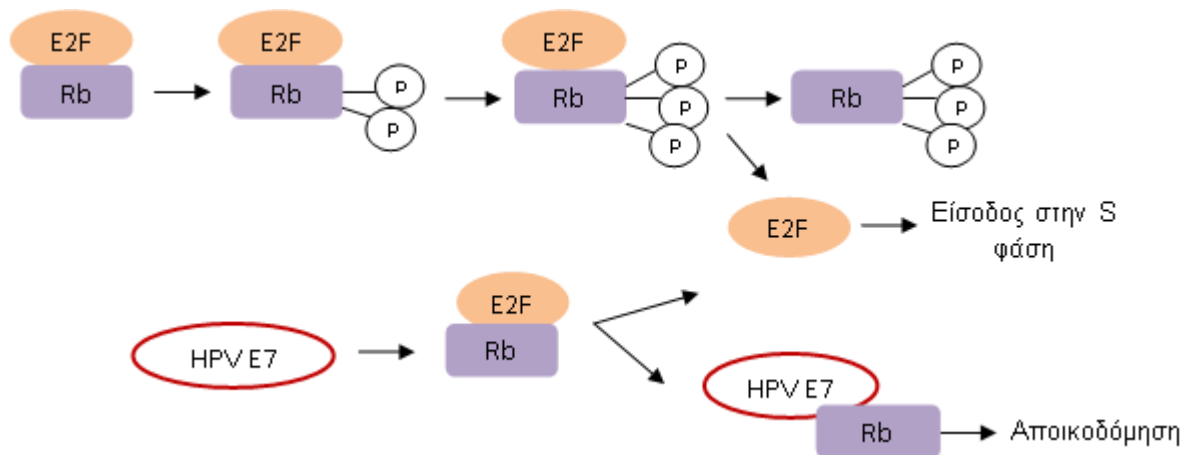
1.3.6 Πρωτεΐνη E7

Η πρωτεΐνη E7 είναι μία μικρή φωσφοπρωτεΐνη αποτελούμενη από 98 αμινοξέα και περιλαμβάνει τρεις συντηρημένες περιοχές CR1, CR2 και CR3 (Conserved Regions) (59,60). Το αμινοτελικό άκρο (N) της πρωτεΐνης περιλαμβάνει μία περιοχή η οποία είναι ομόλογη με ένα τμήμα της CR1 περιοχής και με ολόκληρη την CR2 περιοχή της E1A πρωτεΐνης του αδενοϊού, καθώς και με ανάλογες αλληλουχίες του μεγάλου T αντιγόνου του ιού SV40 (61). Οι συντηρημένες περιοχές CR1 και CR2 συμβάλλουν σημαντικά στη ογκογόνο δράση της E7 ογκοπρωτεΐνης των υψηλού κινδύνου στελεχών του HPV, όπως παρατηρείται και στην E1A πρωτεΐνη του αδενοϊού και στο μεγάλο T αντιγόνο του SV40 (62). Η CR2 περιοχή περιέχει ένα μοτίβο LXCXE (LXCXE motif) μέσω του οποίου προσδένεται η E7 στην ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος (pRB) (63), ενώ η CR3 η οποία εντοπίζεται στο καρβοξυτελικό άκρο (C) της E7, περιλαμβάνει δύο Cys-X-X-Cys μοτίβα δακτύλου ψευδαργύρου (Cys-X-X-Cys zinc finger motifs) (64).

Σε υποφωσφορυλιωμένη μορφή, η pRB προσδένεται στο μεταγραφικό παράγοντα E2F (E2F transcription factor) με στόχο την καταστολή της μεταγραφής των γονιδίων που εμπλέκονται στη σύνθεση του DNA και στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου (65). Η φωσφορυλίωση της pRB από τις κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες οδηγεί σε απελευθέρωση του E2F και σε προώθηση του κυτταρικού κύκλου στην S- φάση (66). Ωστόσο, η πρόσδεση της E7 στην υποφωσφορυλιωμένη pRB διαταράσσει το σύμπλοκο pRB- E2F και επιτρέπει την είσοδο των κυτάρων στην S- φάση (67). Εκτός από την απομάκρυνση της pRB από τον E2F, η E7 δημιουργεί σύμπλοκο με την pRB στοχεύοντάς την για αποδόμηση μέσω της οδού ουβικουΐίνης-πρωτεασώματος (**Εικόνα 4**) (68). Παρ' όλο που οι E7 πρωτεΐνες όλων των στελεχών μπορούν να προσδένονται στα μέλη της οικογένειας του ρετινοβλαστώματος, οι E7 των στελεχών υψηλού κινδύνου συνδέονται στις ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες με υψηλότερη συγγένεια σε σχέση με τις E7 των HPV στελεχών χαμηλού κινδύνου (69).

Η E7 έχει επίσης την ικανότητα να προσδένεται στις αποακετυλάσες των ιστονών (HDACs) οι οποίες είναι απαραίτητες για την μεταγραφή των γονιδίων. Ο ρόλος των HDACs είναι η απομάκρυνση ακετυλομάδων από κατάλοιπα λυσινών στις ιστόνες, με αποτέλεσμα την συμπύκνωση της χρωματίνης και τελικά την καταστολή της μεταγραφής. Έχει παρατηρηθεί ότι η pRB μπορεί να αλληλεπιδρά με την HDAC-1 και να την κατευθύνει στους υποκινητές που ενεργοποιούνται από τον E2F, ώστε να κατασταλεί ο E2F-μηχανισμός μεταγραφής και συνεπώς η μεταγραφή των γονιδίων της S-φάσης (70). Ωστόσο, στα μολυσμένα από στελέχη υψηλού κινδύνου κύτταρα, η E7 προσδένεται στην HDAC-1 μέσω της CR3 περιοχής, ανεξάρτητα από τη σύνδεσή της με την pRB. Το γεγονός αυτό οδηγεί σε ενεργοποίηση της μεταγραφής των γονιδίων που εξαρτώνται από τον E2F και στην προώθηση του κυτταρικού κύκλου στην S-φάση (71).

Μία ακόμα ομάδα πρωτεϊνών με τις οποίες αλληλεπιδρά η E7, είναι οι αναστολείς των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών (cyclin-dependent kinase inhibitors- CKIs) p21 και p27. Στα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα, η μετάβαση από την G1 στην S φάση ελέγχεται από τα σύμπλοκα κυκλινών- κυκλινοεξαρτώμενων κινασών που ρυθμίζονται αρνητικά από τους CKIs. Η E7 αναστέλλει τη δράση των CKIs p21 και p27 των οποίων κύριος στόχος αποτελεί η κυκλινοεξαρτώμενη κινάση cdk2 που αλληλεπιδρά με τις κυκλίνες A και E, προωθώντας τον κυτταρικό κύκλο στην S-φάση (72,73). Επομένως, η E7 διατηρεί υψηλά επίπεδα της cdk2, ενώ παράλληλα παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα και των κυκλινών A και E στα κύτταρα που εκφράζουν την E7 (74).



Εικόνα 4. Πρόσδεση της ιϊκής πρωτεΐνης E7 στην ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη RB

1.3.7 Πρωτεΐνες L1 και L2

Το καψίδιο των ιϊκών σωματιδίων του HPV συντίθεται από τις δομικές πρωτεΐνες του ιού L1 και L2. Η L1 αποτελεί τη μείζονα καψιδική πρωτεΐνη η οποία είναι απαραίτητη για τη σύνθεση των νέων ιοσωματίων στις ανώτερες επιθηλιακές στοιβάδες. Η πρωτεΐνη συγκροτείται από πενταμερή καψομερή όπου 72 πενταμερή συνθέτουν το ιϊκό καψίδιο, το οποίο περιέχει 360 αντίγραφα αυτής (75). Επιπλέον, η L1 συγκροτείται σε ιόμορφα σωματίδια (virus-like particles, VLPs), τα οποία μπορούν να σχηματίζονται ακόμα και επί απουσίας της L2 πρωτεΐνης ή του γονιδιώματος του ιού και χαρακτηρίζονται από υψηλή αντιγονικότητα (76).

Η L2 αποτελεί την ελάχιστη πρωτεΐνη του καψιδίου με 12 αντίγραφα ανά ιοσωμάτιο και εκφράζεται μόνο στα τελικώς διαφοροποιημένα επιθηλιακά κύτταρα (75). Θεωρείται ότι η L2 είναι απαραίτητη για τη σύνθεση λοιμογόνων και ικανών για αντιγραφή ιϊκών σωματιδίων (77), αλληλεπιδρά με την L1, επιτρέποντας έτσι τον εγκλωβισμό του ιϊκού DNA στα νέα καψίδια (DNA packaging) (78).

1.4 Κύκλος ζωής του HPV

Είσοδος του ιού στο κύτταρο- ξενιστή

Ο HPV είναι επιθηλιοτρόπος ιός και εγκαθιστά παραγωγική λοίμωξη μόνο στο πλακώδες επιθήλιο του δέρματος ή των βλεννογόνων που επενδύουν τις κοιλότητες του σώματος (**Εικόνα 5**) (43). Ο ιός εισέρχεται στο επιθήλιο έπειτα από τοπικό μικροτραυματισμό και μολύνει τα κύτταρα της βασικής στοιβάδος, μέσω πρωτεογλυκανών θειικής ηπαράνης, οι οποίες εκφράζονται στους επιφανειακούς υποδοχείς των κυττάρων (79). Ωστόσο, σε ορισμένες ανατομικές περιοχές η πρόσβαση του ιού στη βασική στοιβάδα του επιθηλίου δεν απαιτεί μικροτραυματισμό, όπως στις ζώνες μετάπλασης του τραχήλου και του πρωκτού όπου το κυλινδρικό επιθήλιο μεταπίπτει σε πλακώδες. Επιπλέον, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι αμυγδαλικές κρύπτες οι οποίες αποτελούν περιοχές μέσω των οποίων ο HPV μπορεί να προσβάλλει τα κύτταρα της βασικής στοιβάδος (80). Η προσκόλληση του ιϊκού καψιδίου στην επιφάνεια των κυττάρων οδηγεί σε αλλαγές της δομής του οι οποίες πυροδοτούν την ενδοκύττωση και προκαλούν την είσοδο του ιού στο κύτταρο (81). Στη συνέχεια, το ιϊκό γονιδίωμα μέσω διάσπασης των δισουλφιδικών δεσμών απελευθερώνεται από το καψίδιο, το οποίο τελικά αποδομείται από τα λυσοσωμάτια (82). Το γονιδίωμα του ιού καταλήγει στον πυρήνα των βασικών κυττάρων και διατηρείται εξωχρωμοσωμικά ως επίσωμα, χρησιμοποιώντας τον κυτταρικό μηχανισμό αντιγραφής του DNA για την αναπαραγωγή του.

Διατήρηση ιϊκού γονιδιώματος

Η διατήρηση του ιού σε επισωματική μορφή (εντός του πυρήνα του κυττάρου- ξενιστή) απαιτεί την ταυτόχρονη αντιγραφή του ιϊκού DNA με το DNA του κυττάρου- ξενιστή καθώς και την κατανομή των ιϊκών γονιδιωμάτων στα θυγατρικά κύτταρα. Η αρχική φάση αντιγραφής και διατήρησης του ιϊκού DNA ως επίσωμα πραγματοποιείται μέσω της έκφρασης των πρωτεϊνών του ιού E1 και E2. Η E2 προσδένεται στην παλίνδρομη αλληλουχία ACCN₆GGT στην

περιοχή LCR και συγκεντρώνει την E1 ελικάση στο σημείο έναρξης της αντιγραφής. Ακολούθως, με την απομάκρυνση της E2, η E1 προσδένεται σε πρωτεΐνες του κυττάρου οι οποίες εμπλέκονται στην αντιγραφή του DNA, ενώ η E2 δρα ως μεταγραφικός παράγοντας ο οποίος ρυθμίζει τον πρώιμο υποκινητή για τον έλεγχο της έκφρασης των ογκογονιδίων E6 και E7, του γονιδίου E1 καθώς και του E2. Σε χαμηλά επίπεδα, η E2 ενεργοποιεί τη μεταγραφή των E6 και E7, ενώ σε υψηλά επίπεδα καταστέλλει την έκφραση αυτών των ογκογονιδίων. Οι ιϊκές πρωτεΐνες εκφράζονται σε χαμηλά επίπεδα στα αδιαφοροποίητα κύτταρα και με αυτό το τρόπο επιτυγχάνεται η διαφυγή του ιού από το ανοσοποιητικό σύστημα (82).

Αντιγραφή ιϊκού γονιδιώματος

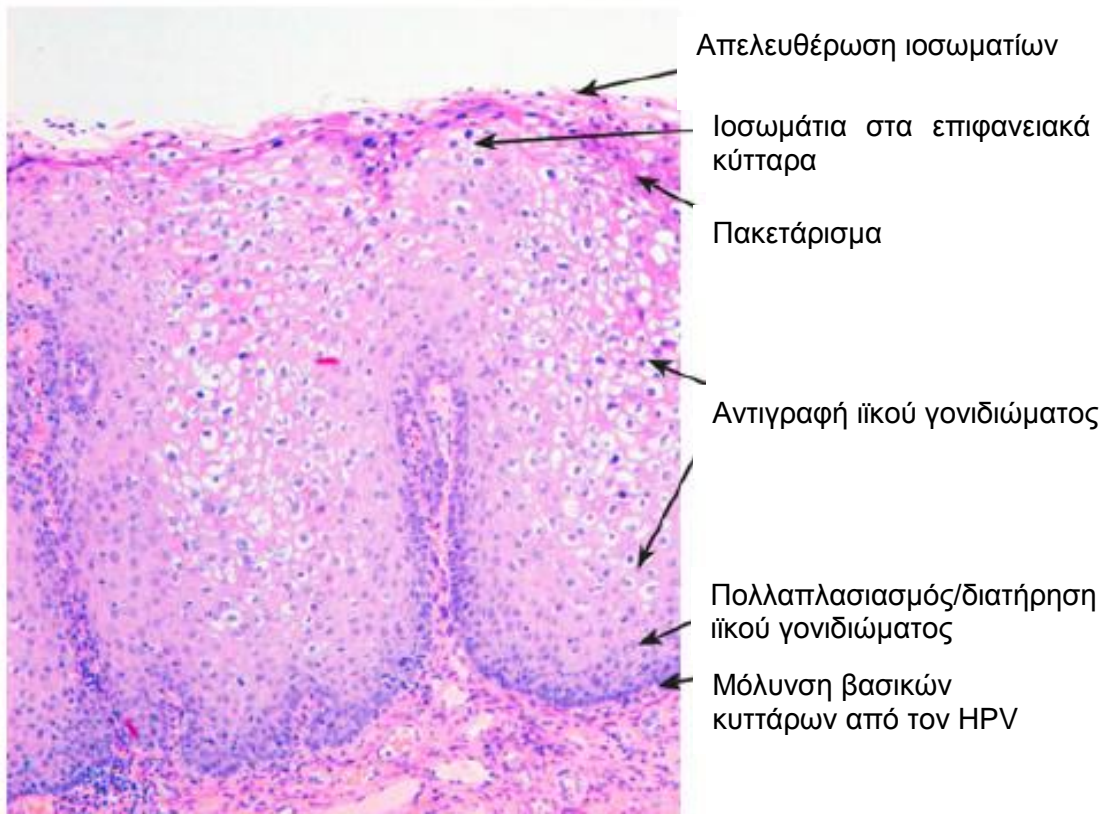
Η αντιγραφή του ιϊκού DNA εξαρτάται από την διαφοροποίηση των μολυσμένων επιθηλιακών κυττάρων, καθώς η ενεργοποίηση του όψιμου υποκινητή, ο οποίος ρυθμίζει την έκφραση των E1, E2, E4 και E5, καθώς και των καψιδικών πρωτεϊνών, λαμβάνει χώρα στα διαφοροποιημένα κύτταρα (60). Το γεγονός ότι ο κύκλος ζωής του HPV σχετίζεται άμεσα με την επιθηλιακή διαφοροποίηση, ενισχύεται από την παρατήρηση ότι η αντιγραφή του ιϊκού γονιδιώματος και η σύνθεση των καψιδικών πρωτεϊνών δεν πραγματοποιούνται ποτέ στα επιθηλιακά κύτταρα της βασικής στοιβάδας (60).

Παρ' όλο που οι ιϊκές πρωτεΐνες εκφράζονται σε χαμηλά επίπεδα στη φάση διατήρησης του ιϊκού γονιδιώματος στα αδιαφοροποίητα βασικά κύτταρα, η υψηλή έκφρασή τους στην ακανθωτή στοιβάδα (parabasallayer) προκαλεί την ενεργό παραμονή των διαφοροποιημένων κυττάρων στον κυτταρικό κύκλο (83). Η E7 αποτελεί την κύρια πρωτεΐνη η οποία είναι υπεύθυνη για την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου στις διαφοροποιημένες στοιβάδες, οδηγώντας σε αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και παράλληλα στη αύξηση του αριθμού των αντιγράφων του ιϊκού γονιδιώματος (67). Συγκεκριμένα, η ενεργοποίηση του όψιμου υποκινητή στις ανώτερες στοιβάδες του

μολυσμένου επιθηλίου έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη έκφραση των E1, E2, E4 και E5 (25,84), γεγονός που οδηγεί στην παραγωγή χιλιάδων αντιγράφων του ιϊκού DNA κατά την διαδικασία της επιθηλιακής διαφοροποίησης (22,85).

Σχηματισμός ιϊκών σωματιδίων και απελευθέρωση

Το τελικό στάδιο του κύκλου ζωής του HPV περιλαμβάνει τον εγκλωβισμό των αντιγράφων του ιϊκού DNA σε λοιμογόνα ιοσωμάτια τα οποία απελευθερώνονται από την επιφανειακή επιθηλιακή στοιβάδα. Στη φάση αυτή, εκφράζονται οι πρωτεΐνες L1 και L2 από τον όψιμο υποκινητή, οι οποίες είναι απαραίτητες για τη σύνθεση του ιϊκού καψιδίου (22). Η L2 η οποία αποτελεί την ελάσσονα καψιδική πρωτεΐνη εντοπίζεται στο πυρήνα, ενώ η πρωτεΐνη L1 συγκροτείται σε κασομερή στο κυτταρόπλασμα και στη συνέχεια κατευθύνεται στο πυρήνα για το πακετάρισμα του ιϊκού DNA στο καψίδιο (83). Η σύνδεση των L1 και L2 πραγματοποιείται μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων μεταξύ των κασομερών, γεγονός που συμβάλλει στην ωρίμανση και σταθεροποίηση των νέων ιοσωματίων (86).



Εικόνα 5. Κύκλος ζωής του HPV σύμφωνα με την επιθηλιακή διαφοροποίηση (31)

1.5 Κλινική εξέλιξη HPV λοίμωξης

Οι λοιμώξεις από τον ιό HPV και οι αλληλεπιδράσεις με το κύτταρο ξενιστή μπορούν να διακριθούν σε 4 διακριτές φάσεις (43):

I) Λανθάνουσες λοιμώξεις οι οποίες εξαρτώνται από την μακρόχρονη διατήρηση του ιϊκού γονιδιώματος ως αυτόνομα πλασμίδια. Αυτές οι λοιμώξεις είναι δυνατό να παραμένουν ασυμπτωματικές για χρόνια ή να ενεργοποιούνται κυρίως ως αποτέλεσμα της σπρωχής ανοσοαπόκρισης του ξενιστή.

II) Ενεργοποίηση της έκφρασης των ιϊκών γονιδίων, η οποία οδηγεί σε θηλωματώδεις βλάβες οι οποίες συνοδεύονται συνήθως από εκτεταμένο πολλαπλασιασμό του ιϊκού DNA και εγκλωβισμό αυτού σε λοιμογόνα

ισσωμάτια. Η πλειονότητα των HPV- καλοηθών αλλοιώσεων, κυρίως τα λαρυγγικά θηλώματα, παράγουν πολύ μικρό αριθμό ισσωμάτων όπως προκύπτει από την σποραδική παρουσία κυττάρων θετικών στο καψιδικό αντιγόνο L1.

III) Εμμένουσες λοιμώξεις από στελέχη υψηλού κινδύνου οι οποίες, σε μικρή συχνότητα, μπορούν να εξελιχθούν σε υψηλού βαθμού δυσπλασίες

και IV) Νεοπλάσματα, όπου το ιϊκό DNA βρίσκεται συχνά ενσωματωμένο στο γονιδίωμα του ξενιστή.

Λανθάνουσες λοιμώξεις

Στην πλειονότητα των περιπτώσεων, η μόλυνση των βασικών επιθηλιακών κυττάρων από τον ιό HPV παραμένει σε λανθάνουσα μορφή χωρίς την εμφάνιση μικροσκοπικών ή μακροσκοπικών αλλοιώσεων (87). Πρόκειται δηλαδή για λοιμώξεις οι οποίες είναι ασυμπτωματικές και αναγνωρίζονται μόνο με τη χρήση μοριακών μεθόδων, με τις οποίες ανιχνεύεται το DNA του ιού στα μολυσμένα επιθηλιακά κύτταρα.

Κατά την λανθάνουσα λοίμωξη, η συντριπτική πλειοψηφία των κυττάρων υφίσταται επιθηλιακή διαφοροποίηση χωρίς να συνυπάρχει ο παραγωγικός κύκλος ζωής του HPV. Το ιϊκό DNA αναδιπλασιάζεται παράλληλα με τις κυτταρικές διαιρέσεις, διατηρώντας ένα χαμηλό αριθμό επισωμάτων στα κύτταρα της βασικής στοιβάδος, εφόσον έχει υποστεί καταστολή από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή (88). Σε αυτή τη λανθάνουσα κατάσταση, η έκφραση των ιϊκών γονιδίων περιορίζεται στις E1 και E2 πρωτεΐνες οι οποίες είναι απαραίτητες για την αντιγραφή του DNA του ιού (88). Ωστόσο, έπειτα από ελάττωση των επιπέδων ανοσοεπιτήρησης, είναι δυνατή η εξέλιξη της μόλυνσης σε υποκλινική νόσο η οποία εντοπίζεται μόνο μικροσκοπικά και εν συνεχεία η καταστολή της και η μετάπτωσή της πάλι σε λανθάνουσα κατάσταση (88,89).

Παραγωγικές λοιμώξεις

Στην παραγωγική λοίμωξη το γονιδίωμα του ιού παραμένει σε επισωματική μορφή και παράγεται μεγάλος αριθμός ιϊκών αντιγράφων, καθώς τα μολυσμένα επιθηλιακά κύτταρα διαφοροποιούνται και μεταναστεύουν στις επιφανειακές στοιβάδες. Παράλληλα, λαμβάνει χώρα η μεταγραφή των όψιμων ιϊκών γονιδίων L1 και L2 η οποία οδηγεί στην παραγωγή των δομικών πρωτεϊνών του καψιδίου και ακολούθως στο σχηματισμό των νέων ιϊκών σωματιδίων. Έπειτα, τα ιοσωμάτια απελευθερώνονται από τα επιθηλιακά κύτταρα της επιφανειακής στοιβάδος, προκαλώντας επαναλοίμωξη και εξάπλωση της μόλυνσης με την εμφάνιση κλινικών ή υποκλινικών αλλοιώσεων.

Η παραγωγική λοίμωξη συνδέεται με χαρακτηριστικές κυτταροπαθολογικές αλλοιώσεις οι οποίες είναι εμφανείς στα κύτταρα της διάμεσης και επιπολής στοιβάδος του επιθηλίου (90). Τα κύτταρα αυτά που καλούνται κοιλοκύτταρα, στερούνται μιτωτικής δραστηριότητας και παρουσιάζουν κυτταροπλασματική κενотоπίωση και πυκνωτικούς υπερχρωματικούς πυρήνες. Επιπλέον, παρατηρούνται ιστοπαθολογικές αλλαγές οι οποίες περιλαμβάνουν υπερπλασία της βασικής στοιβάδος (ακάνθωση), παρουσία δυσκεράτωσης, παρακεράτωσης ή υπερκεράτωσης (91). Οι αλλοιώσεις οι οποίες εμφανίζονται είναι συνήθως χαμηλού βαθμού και αφορούν τα επίπεδα κονδυλώματα και τις ήπιες δυσπλασίες, ενώ σε περίπτωση υπερπλασίας των αγγείων του στρώματος εμφανίζονται θηλωματώδεις προσεκβολές και δημιουργούνται εξωφυτικές βλάβες (οξυτενή κονδυλώματα) (92).

Εμμένουσες–μεταμορφωτικές λοιμώξεις

Σε περιπτώσεις εμμένουσας λοίμωξης με στελέχη του HPV με υψηλό ογκογόνο δυναμικό, όπως ο HPV 16 και ο HPV 18, τα μολυσμένα κύτταρα αποτυγχάνουν να διαφοροποιηθούν, εμποδίζοντας την ολοκλήρωση του κύκλου ζωής του ιού. Παράλληλα, η εμμένουσα υπερέκφραση των ιϊκών ογκογονιδίων στα κύτταρα της βασικής στοιβάδος, μπορεί να οδηγήσει σε συνεχή είσοδο των κυττάρων αυτών στο κυτταρικό κύκλο και

στη συσσώρευση μεταλλαγών οι οποίες προάγουν τη κυτταρική αύξηση και επιβίωση. Συνεπώς, η εμμένουσα λοίμωξη με ογκογόνα στελέχη είναι δυνατό να οδηγήσει σε μετρίου και υψηλού βαθμού δυσπλασίες, στις οποίες παρατηρείται αυξημένος κυτταρικός πολλαπλασιασμός σχεδόν σε όλο ή και σε ολόκληρο το πάχος του επιθηλίου, με ελάχιστη ή και καθόλου διαφοροποίηση στην επιφανειακή στοιβάδα (43). Επιπλέον, οι κοιλοκυτταρικές αλλοιώσεις ελαττώνονται καθώς αυξάνεται ο βαθμός δυσπλασίας, ενώ παρατηρείται πυρηνική ατυπία, απώλεια της πολικότητας των κυττάρων και άτυποι μιτωτικοί χαρακτήρες (93).

Είναι πιθανό η ενσωμάτωση του ιϊκού DNA στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή να λαμβάνει χώρα συχνά σε προκαρκινικές αλλοιώσεις, συμβάλλοντας στην ταχύτερη εξέλιξή τους σε καρκίνο σε σχέση με εκείνες οι οποίες περιέχουν μόνο εξωχρωμοσωμικό HPV DNA (94). Η ενσωμάτωση οδηγεί σε υπερέκφραση των ογκογονιδίων E6 και E7 που προκαλούν αλλαγές στο ρυθμό πολλαπλασιασμού των μολυσμένων κυττάρων με αποτέλεσμα την αθανασία τους και την κακοήθη εξαλλαγή τους (95).

1.6 Βασική ανοσοβιολογία του ιού HPV

Σε αντίθεση με άλλες ιογενείς λοιμώξεις, η έκθεση στον ιό HPV σπάνια παρέχει ανοσία, καθώς ο HPV πολλαπλασιασμός δεν προκαλεί κυτταρόλυση, νέκρωση και ιαιμία (viremia). Οι ιϊκές πρωτεΐνες και τα ιοσωμάτια απελευθερώνονται σε περιοχές οι οποίες τυπικά διαφεύγουν από την ανοσολογική επιτήρηση.

Διάφορες μελέτες έχουν αποδείξει ότι ο ιός HPV αναστέλλει τη σύνθεση ιντερφερόνης (22), οδηγώντας σε πτωχή ανοσολογική απάντηση. Επιπρόσθετα, παρατηρείται ασθενής ορρομετατροπή περίπου στο 60% των γυναικών και στο 30% των ανδρών, η οποία περιορίζεται στις καψιδικές πρωτεΐνες L1 και L2 και όχι στα πρώιμα αντιγόνα που σχετίζονται με την ιϊκή αντιγραφή και ανθεκτικότητα (96). Η κυτταρική ανοσία έναντι των πρωτεϊνών του ιού εκκριζώνει τη λοίμωξη εντός 24 μηνών στην πλειονότητα των γυναικών με φλεγμονή του τραχήλου της μήτρας. Ο συνδυασμός ασθενούς

ανοσολογικής απάντησης έναντι του ιού και της επίδρασης της προκαλούμενης κυτταρικής ανοσίας, αποτελεί την αιτία της μη προστασίας σε περίπτωση επαναλοίμωξης στα περισσότερα άτομα, από τα αντισώματα που αναπτύσσονται κατά τη διάρκεια μιας φυσικής λοίμωξης (97).

1.7HPV και καρκινογένεση

Οι κύριες ογκογόνες πρωτεΐνες E6 και E7 συνεργούν στην HPV επαγόμενη ογκογένεση (23,98). Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η E7 προσδένεται και απενεργοποιεί την pRB, απελευθερώνοντας το μεταγραφικό παράγοντα E2F και προκαλώντας την είσοδο του κυττάρου στην S- φάση του κυτταρικού κύκλου. Στη περίπτωση αυτή, το κύτταρο με λειτουργική p53 οδηγείται σε απόπτωση, καθώς η κύρια δράση αυτής της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης είναι η αναστολή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1 για την επιδιόρθωση των βλαβών του DNA ή εναλλακτικά η επαγωγή απόπτωσης. Ωστόσο, η E6 έχει την ικανότητα να αποδομεί τη p53 και επομένως τα κύτταρα τα οποία εκφράζουν την E6 δεν μπορούν να αποπίπτουν μέσω της οδού της p53 και συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται.

Η ικανότητα της ογκοπρωτεΐνης E6 να αποδομεί τη p53 με συνέπεια την αναστολή της απόπτωσης καθώς και να ενεργοποιεί την τελομεράση, σε συνδυασμό με την ικανότητα της ογκοπρωτεΐνης E7 να αναστέλλει την pRB ώστε να προωθήσει την αθανασία, παρέχει ένα αποτελεσματικό μηχανισμό μέσω του οποίου ο HPV επάγει την καρκινογένεση. Η γενομική αστάθεια που προκαλείται από τη δράση των E6 και E7 διαδραματίζει καταλυτικό ρόλο στη διαδικασία του κυτταρικού μετασχηματισμού, επιτρέποντας τη συσσώρευση χρωμοσωμικών ανωμαλιών στα μολυσμένα κύτταρα (99). Η συνεργός δράση των E6 και E7 είναι δυνατό να οδηγήσει σε πολυπλοειδία και σε συσσώρευση των πολυπλοειδικών κυττάρων, μέσω αποδόμησης των πρωτεϊνών οι οποίες ελέγχουν τη μετάβαση από τη G2 φάση στη φάση της μίτωσης (100). Οι δύο ογκοπρωτεΐνες έχουν τη δυνατότητα να καταργούν τα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου που προστατεύουν το κύτταρο από το κακόηθη μετασχηματισμό.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι ιϊκές ογκοπρωτεΐνες E6 και E7 των στελεχών υψηλού κινδύνου μπορούν να καταργούν τα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, οδηγώντας σε γενομική αστάθεια η οποία αποτελεί το κύριο γεγονός για την ανάπτυξη καρκίνου. Έχει παρατηρηθεί ότι στη πλειονότητα των κακοήθων αλλοιώσεων το γονιδίωμα του HPV βρίσκεται ενσωματωμένο στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή, έπειτα από τη μετατροπή του κυκλικού ιϊκού γονιδιώματος σε γραμμικό στην περιοχή που κωδικοποιεί τις E1 και E2 πρωτεΐνες (101). Ο ανασυνδυασμός της E1/E2 περιοχής με κυτταρικές αλληλουχίες οδηγεί σε διάσπασή της και απενεργοποίηση του E2 γονιδίου, με αποτέλεσμα την απώλεια του μεταγραφικού ελέγχου των E6 και E7, την επακόλουθη υπερπαραγωγή τους και το αυξημένο ογκογόνο δυναμικό τους (102, 103). Τα παραγόμενα υβριδικά μετάγραφα (hybrid transcripts) χαρακτηρίζονται από υψηλότερη σταθερότητα σε σχέση με τα ιϊκά μετάγραφα (viral transcripts), ενισχύοντας έτσι τη δράση των ιϊκών ογκοπρωτεϊνών και προσδίδοντας παράλληλα στα κύτταρα ισχυρό αναπτυξιακό πλεονέκτημα (103, 104).

Οι θέσεις ενσωμάτωσης του ιϊκού DNA φαίνεται πως είναι κατανεμημένες σε όλο το γονιδίωμα του κυττάρου, ενώ διαφορετικές θέσεις παρατηρούνται μεταξύ διαφορετικών κλινικών δειγμάτων (105). Ωστόσο, παρ' όλο που δεν εντοπίζονται συγκεκριμένες θέσεις, περιοχές προτίμησης ενσωμάτωσης του ιϊκού γονιδιώματος αποτελούν οι κοινές εύθραυστες θέσεις (common fragile sites, CFS) (106). Το φαινόμενο της ενσωμάτωσης οδηγεί στο τερματισμό του παραγωγικού κύκλου ζωής του HPV λόγω της απώλειας πολλών περιοχών του ιϊκού γονιδιώματος, καθιστώντας με αυτό τον τρόπο τον ιό λειτουργικά ανενεργό.

1.8 Μηχανισμοί ανοσοδιαφυγής του ιού HPV

Η εγκατάσταση επίμονης λοίμωξης από τον ιό HPV αποτελεί το γεγονός κλειδί για την επαγωγή του κακοήθους μετασχηματισμού των μολυσμένων κυττάρων και επιτυγχάνεται μέσω διαφυγής του ιού από την ανοσολογική επιτήρηση του ξενιστή με τη δράση των E5, E6 και E7 ογκοπρωτεϊνών.

Τα Τ λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν τα μολυσμένα κύτταρα μέσω αλληλεπιδράσεων των υποδοχέων τους με αντιγονικά πεπτιδία τα οποία παρουσιάζονται στην επιφάνεια αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (antigen presenting cells, APCs), συνδεδεμένα με πρωτεΐνες του Μείζονος Συστήματος Ιστοσυμβατότητας (major histocompatibility complex, MHC). Ωστόσο, ο ιός HPV έχει την ικανότητα να ρυθμίζει αρνητικά την έκφραση των πρωτεϊνών του MHC τάξης I, εμποδίζοντας με αυτό τον τρόπο την αναγνώρισή του από τα Τ-βοηθητικά (T-helper lymphocytes, Th) και Τ-κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα (Cytotoxic T lymphocytes, CTLs) (107). Έχει παρατηρηθεί ότι τα νεοπλάσματα που σχετίζονται με HPV λοίμωξη, εμφανίζουν απώλεια των MHC μορίων τάξης I και συνεπώς αυτή η πτωχή αντιγονοπαρουσίαση οδηγεί στην επαγωγή Τ κυτταρικής ανεργίας (108, 109).

Επιπλέον, ο ιός HPV διαθέτει μηχανισμούς για την παρεμπόδιση των δράσεων των ιντερφερονών τύπου I, IFN-α και IFN-β οι οποίες εκκρίνονται από τα μολυσμένα κύτταρα. Πρόκειται για κυτταροκίνες οι οποίες προσδένονται σε επιφανειακούς υποδοχείς, επάγοντας τη σηματοδοτική οδό Jak-Stat η οποία μεσολαβεί στη μεταγραφή πολυάριθμων γονιδίων που σχετίζονται με την αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της αγγειογένεσης, καθώς και με αντιϊκές και ανοσοδιεγερτικές ικανότητες (110, 111). Έχει παρατηρηθεί ότι τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων MxA (myxovirus resistance protein A), OAS2 (2'-5'-oligoadenylate synthetase 2) και Stat-1 (signal transducer and activator of transcription 1) των οποίων η μεταγραφή επάγεται από τις IFN, εμφανίζονται ελαττωμένα σε κύτταρα μολυσμένα από τον HPV (112).

HE7 ογκοπρωτεΐνη αναστέλλει την οδό μεταγωγής σήματος (signal transduction) της IFN-α/β και συνεπώς την έκφραση των γονιδίων που επάγεται από αυτή, μέσω της απώλειας σχηματισμού του μεταγραφικού συμπλόκου ISGF-3 (interferon stimulated gene factor 3 complex) (31). Συγκεκριμένα, η E7 προσδένεται στον p48 ο οποίος αποτελεί υπομονάδα του συμπλόκου ISGF-3 και εμποδίζει τη μετατόπισή του στο πυρήνα, οδηγώντας σε απώλεια της μεταγωγής σήματος από τις IFN (113). Η ογκοπρωτεΐνη E6 μπορεί επίσης να διαταράσσει την οδό μεταγωγής σήματος της IFN-α/β μέσω πρόσδεσής της στον ρυθμιστικό παράγοντα 3 της ιντερφερόνης (IRF3) (110).

Με αυτό το τρόπο η E6 εμποδίζει την μεταγραφική ικανότητα του IRF3, ενώ την ίδια δράση ασκεί η E7 αλληλεπιδρώντας με τον IRF1 ο οποίος αποτελεί σημαντικό παράγοντα της μεταγωγής σήματος που μεσολαβείται από τις IFN (114,115).

2. Καρκίνος κεφαλής και τραχήλου

2.1 Επιδημιολογικά στοιχεία

Ο καρκίνος κεφαλής και τραχήλου αντιπροσωπεύει μια ετερογενή ομάδα νεοπλασμάτων με διαφορετική βιολογική και κλινική συμπεριφορά, η οποία αναπτύσσεται στα ανώτερα τμήματα της αναπνευστικής και πεπτικής οδού, εκτός του οισοφάγου. Η πλειονότητα των νεοπλασμάτων τα οποία εντοπίζονται στην περιοχή κεφαλής και τραχήλου εξορμούνται από το πλακώδες επιθήλιο και ταξινομούνται ως ακανθοκυτταρικά καρκινώματα κεφαλής και τραχήλου (ΑΚΚΤ) (116). Οι κύριες ανατομικές εντοπίσεις του ΑΚΚΤ αφορούν στη στοματική κοιλότητα, τον στοματοφάρυγγα, το ρινοφάρυγγα, τον υποφάρυγγα και το λάρυγγα. Η στοματική κοιλότητα περιλαμβάνει το βλεννογόνο της παρειάς, τις άνω και κάτω φαρυγγικές αποφύσεις, το οπισθογόμφιο τρίγωνο, το έδαφος του στόματος, τη σκληρή υπερώα και τα πρόσθια 2/3 της γλώσσας, ενώ στον στοματοφάρυγγα ανήκουν η βάση της γλώσσας, οι παρίσθμιες αμυγδαλές, το οπίσθιο φάρυγγικό τοίχωμα και η μαλακή υπερώα.

Το ΑΚΚΤ αποτελεί το έκτο πιο συχνό νεόπλασμα παγκόσμια με άνω των 600.000 νέων περιστατικών και 350.000 θανάτους ετησίως, αντιπροσωπεύοντας το 3% όλων των νεοπλασμάτων (117). Σχεδόν το 50% των περιπτώσεων ΑΚΚΤ εντοπίζονται στη στοματική κοιλότητα και συσχετίζονται με προκαρκινικές βλάβες του βλεννογόνου με πιο χαρακτηριστικές τη λευκοπλακία και την ερυθροπλακία (118,119). Οι δύο καθιερωμένοι ανεξάρτητοι παράγοντες κινδύνου οι οποίοι σχετίζονται με τον καρκίνο κεφαλής και τραχήλου είναι η χρήση καπνού και η κατανάλωση οινοπνεύματος, ενώ η συνεργική δράση τους φαίνεται ότι ευθύνεται για την πλειονότητα των ΑΚΚΤ (120). Ο ρόλος του καπνού στην καρκινογένεση της

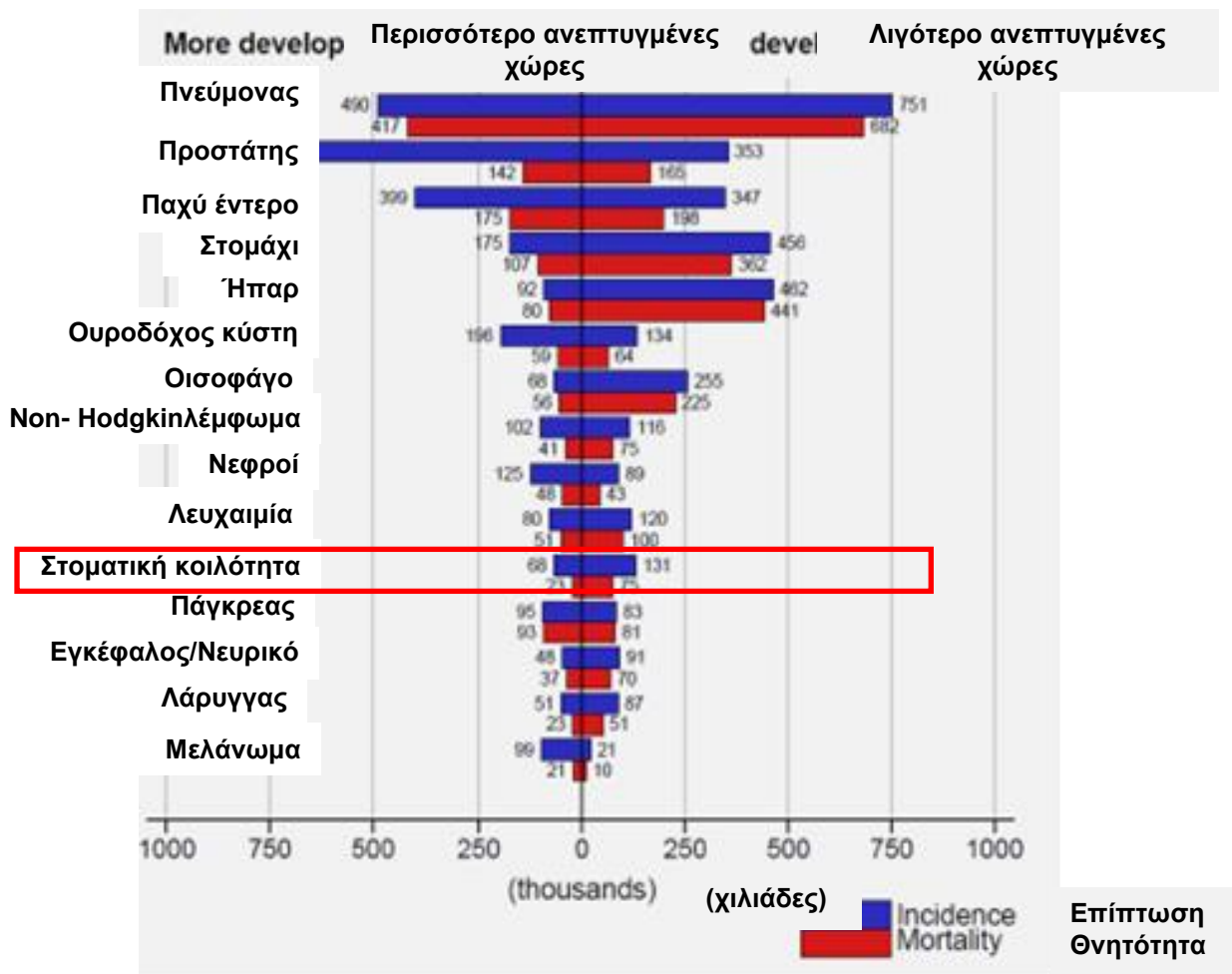
περιοχής της κεφαλής και του τραχήλου, οφείλεται στις γενοτοξικές επιδράσεις των νιτροζαμινών και των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων του. Αντίθετα, οι μεταβολίτες του οιοπνεύματος παρεμβαίνουν στη σύνθεση και επιδιόρθωση του DNA, ενώ η βαριά κατανάλωση οιοπνεύματος σχετίζεται κυρίως με την ανάπτυξη καρκίνου του υποφάρυγγα (121). Η καρκινογόνος δράση του οιοπνεύματος πιθανά αποδίδεται στην ικανότητά του να αποτελεί το χημικό υπόστρωμα για τα καρκινογόνα μόρια του καπνού, αυξάνοντας τη διαπερατότητα του βλεννογόνου (122). Μάλιστα, έχει παρατηρηθεί ότι ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου της στοματικής κοιλότητας είναι 38 φορές υψηλότερος στους χρήστες καπνού και οιοπνεύματος συγκριτικά με εκείνους οι οποίοι δεν είναι καπνιστές και πότες (123).

Η παρατηρηθείσα μείωση της επίπτωσης του ΑΚΚΤ στο δυτικό κόσμο την τελευταία δεκαετία αποτελεί συνάρτηση της ελάττωσης του επιπολασμού των κλασικών παραγόντων κινδύνου, κυρίως του καπνίσματος. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μια εκ νέου αύξηση των περιστατικών νεοπλασμάτων της στοματικής κοιλότητας που αφορούν στην περιοχή της γλώσσας καθώς και του στοματοφάρυγγος, η οποία σχετίζεται με την αύξηση της HPV λοίμωξης από ογκογόνα στελέχη του ιού, ιδιαίτερα το στέλεχος HPV 16 (124,125). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, ο διαπιστούμενος αριθμός των HPV (+) νεοπλασμάτων του στοματοφάρυγγος συνεχώς αυξάνεται, αποτελώντας >50% του συνολικού αριθμού των νεοπλασμάτων κεφαλής και τραχήλου (126). Η μόλυνση του στοματικού επιθηλίου με τον ιό HPV είναι εφικτή μέσω της στοματογεννητικής επαφής και συνδέεται με υψηλού κινδύνου σεξουαλικές πρακτικές, οι οποίες διευκολύνουν την επαναλαμβανόμενη έκθεση στον ιό. Επιδημιολογικά δεδομένα αναφέρουν την ύπαρξη ενός νεότερης ηλικίας ασθενούς με ΑΚΚΤ οφειλόμενο στον ιό HPV, ο οποίος έχει υψηλότερο ποσοστό μεταστατικής λεμφαδενικής νόσου κατά τη διάγνωση, ενώ η νόσος του είναι λιγότερο πιθανό να σχετίζεται με το κάπνισμα και την κατάχρηση αλκοόλ (127,128). Συνεπώς, οι HPV (+) και οι HPV (-) όγκοι κεφαλής και τραχήλου αντιπροσωπεύουν δύο διακριτές οντότητες με διαφορετικά κλινικοπαθολογικά και μοριακά χαρακτηριστικά (122).

Καρκίνος της στοματικής κοιλότητας

Ο καρκίνος της στοματικής κοιλότητας ανέρχεται σε 300.000 νέα περιστατικά ετησίως, αποτελώντας το 2,1% του συνόλου των νέων κακοηθειών παγκοσμίως (119). Το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα (ΑΚ) της στοματικής κοιλότητας αντιπροσωπεύει >90% των κακοήθων νεοπλασμάτων τα οποία εντοπίζονται στο στόμα, προσβάλλοντας συχνότερα τους άνδρες σε σχέση με τις γυναίκες με αναλογία 3:1 κατά μέσο όρο σε παγκόσμιο επίπεδο (119). Η πιθανότητα ανάπτυξης ΑΚ της στοματικής κοιλότητας αυξάνεται με τη διάρκεια έκθεσης σε παράγοντες κινδύνου, κυρίως στο κάπνισμα και στο οινόπνευμα, ενώ εμφανίζεται κυρίως κατά την 6^η και 7^η δεκαετία της ζωής. Σύμφωνα με επιδημιολογικά δεδομένα, παρατηρείται έντονη ετερογένεια στην επίπτωση του ΑΚ της στοματικής κοιλότητας τόσο μεταξύ των ηπείρων όσο και μεταξύ των χωρών, γεγονός το οποίο αποδίδεται στις διαφορετικές συνήθειες των πληθυσμών. Στις λιγότερο αναπτυγμένες χώρες καταγράφηκε μεγαλύτερος αριθμός νέων περιστατικών νεοπλασμάτων της στοματικής κοιλότητας σε σχέση με τις περισσότερο ανεπτυγμένες χώρες για το 2012, τόσο στους άνδρες όσο και στις γυναίκες (**Εικόνα 6**) (119). Η υψηλότερη επίπτωση για τους άνδρες παγκόσμια καταγράφεται στην ευρύτερη περιοχή της Μελανησίας στην Ωκεανία (Φίτζι, Παπούα Νέα Γουινέα, Νήσοι Σολομώντος, Βανουάτου και Νέα Καληδονία) (22.9), ενώ εξίσου υψηλή είναι και για τις γυναίκες (16.0). Τα ποσοστά επίσης είναι υψηλά στους άνδρες στην Κεντρική και Νότια Ασία (9.9), καθώς και στην Κεντρική και Ανατολική Ευρώπη (9.1). Στην Ελλάδα, υπολογίζεται ότι η επίπτωση του ΑΚ της στοματικής κοιλότητας ανέρχεται σε 2.3 για τους άνδρες και 0.9 για τις γυναίκες (119). Παγκοσμίως, καταγράφονται υψηλά ποσοστά θνησιμότητας (145,000 θάνατοι) ετησίως, αντανακλώνοντας τα χαμηλά ποσοστά πενταετούς επιβίωσης του ΑΚ της στοματικής κοιλότητας τα οποία κυμαίνονται περίπου στο 50% (119,129). Η δυσμενής πρόγνωση οφείλεται στο προχωρημένο στάδιο της νόσου κατά τη διάγνωση, το οποίο χαρακτηρίζεται από υψηλό βαθμό διηθητικότητας και μεταστατικότητας, παρ' όλο που είναι εφικτή η έγκαιρη εντόπιση προκαρκινικών και καρκινικών βλαβών.

Όσον αφορά την εντόπιση του καρκίνου της στοματικής κοιλότητας, η γλώσσα και συγκεκριμένα το πλάγιο χείλος της αποτελεί τη συνηθέστερη θέση καρκινογένεσης ακολουθούμενη από το έδαφος του στόματος. Άλλα ανατομικά στοιχεία του στόματος στα οποία μπορεί να αναπτυχθεί καρκίνος είναι τα φατνία, οι άνω και κάτω φατνιακές αποφύσεις, το οπισθογόμφιο τρίγωνο και ο βλεννογόνος των παρειών, των χειλέων και της σκληράς υπερώας (130). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι παρ' όλο που η επίπτωση του καρκίνου της στοματικής κοιλότητας φαίνεται να μειώνεται ή να παραμένει αμετάβλητη, τα ποσοστά καρκίνου της γλώσσας εμφανίζουν αυξητική τάση κυρίως σε γυναίκες ηλικίας μεταξύ 18 έως 44 ετών, οι οποίες δεν καπνίζουν και δεν πίνουν (131). Δεδομένης της έλλειψης αιτιολογικής συσχέτισης μεταξύ του καρκίνου της στοματικής κοιλότητας και της HPV λοίμωξης, είναι πιθανό ότι η έκθεση σε άλλους περιβαλλοντικούς παράγοντες, οι γενετικές ανωμαλίες και άλλες ιογενείς λοιμώξεις παίζουν σημαντικό ρόλο στην διαδικασία της καρκινογένεσης στη στοματική κοιλότητα (132). Ωστόσο, η παρατήρηση ότι η συχνότητα ανίχνευσης ιού HPV, κυρίως του ογκογόνου στελέχους HPV 16, είναι 2-3 φορές υψηλότερη σε προκαρκινικές βλάβες, συγκριτικά με το φυσιολογικό βλεννογόνο του στόματος, υποδηλώνει πιθανότατη συμμετοχή του ιού στα αρχικά στάδια της καρκινογένεσης. Επιπλέον, τις τελευταίες δεκαετίες η παρουσία HPV λοίμωξης σε ποσοστό περίπου 25% των καρκίνων στοματικής κοιλότητας, υποδεικνύει εμπλοκή του ιού και στην ανάπτυξη καρκίνου (133).



Εικόνα 6. Εκτιμώμενος αριθμός νέων περιστατικών καρκίνου και θανάτων παγκοσμίως ανάλογα με την εντόπιση για το 2012 (119)

Καρκίνος του στοματοφάρυγγος

Ο στοματοφάρυγγας αποτελεί την στοματική μούρα του φάρυγγα και το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα (ΑΚ) είναι ο συχνότερος όγκος που αναπτύσσεται στην περιοχή αυτή, αντιπροσωπεύοντας το 85- 90% των καρκίνων του στοματοφάρυγγος (134). Το ΑΚ του στοματοφάρυγγος διαγιγνώσκεται συνήθως κατά την 6^η και 7^η δεκαετία της ζωής, με αναλογία ανδρών προς γυναίκες 4:1 (119,135). Βάσει επιδημιολογικών στοιχείων, ο καρκίνος του στοματοφάρυγγος ανέρχεται σε 142,000 νέα περιστατικά σε ετήσια βάση (1% όλων των καρκίνων) (Πίνακας 3), ενώ σημειώνονται 97,000 θάνατοι, τα 3/4 των οποίων αφορούν τις λιγότερο ανεπτυγμένες χώρες (119). Στη Δυτική Ευρώπη καταγράφεται η υψηλότερη επίπτωση τόσο στους άνδρες

όσο και στις γυναίκες (7.5 ανά 100,000 και 1.6 ανά 1000,000 αντίστοιχα). Αντίθετα, τα χαμηλότερα ποσοστά, <1.0, παρατηρούνται στη Βόρεια και Δυτική Αφρική και στη Δυτική Ασία, ενώ στην Ελλάδα η επίπτωση είναι 0.5 για τους άνδρες και 0.1 για τις γυναίκες (119).

Τα νεοπλάσματα των αμυγδαλών και της βάσης της γλώσσας αντιστοιχούν στο 90% των κακοήθων όγκων του στοματοφάρυγγος και συνήθως διαγιγνώσκονται σε προχωρημένο στάδιο με πτωχή πρόγνωση (136,137). Όπως παρατηρείται σε όλα τα ΑΚΚΤ, τα ποσοστά επιβίωσης των ασθενών με προχωρημένο ΑΚ του στοματοφάρυγγος είναι χαμηλά με πενταετή συνολική επιβίωση περίπου 25% (136,137). Ακόμη και σε περιπτώσεις όπου ακολουθείται συγκεκριμένο θεραπευτικό πρωτόκολλο σε όγκους του αυτού σταδίου και ιστολογικού τύπου, η πρόβλεψη του αποτελέσματος της θεραπευτικής αντιμετώπισής τους καθίσταται δυσχερής (138). Ωστόσο, η διάγνωση του ΑΚ του στοματοφάρυγγος σε πρώιμα στάδια σχετίζεται με βελτιωμένη πενταετή επιβίωση, ενώ η διαστοματική εκτομή του πρώιμου όγκου μόνη της ή σε συνδυασμό με συμπληρωματική ακτινοθεραπεία ή χημειο- ακτινοθεραπεία (adjuvant radiotherapy or chemoradiotherapy) προσφέρει πολύ καλό ογκολογικό αποτέλεσμα (139,140). Η αποτελεσματικότητα των ανωτέρω θεραπευτικών προσεγγίσεων αντικατοπτρίζεται στα αυξημένα ποσοστά επιβίωσης και στη βελτιωμένη ποιότητα ζωής των ασθενών (141).

Τις τελευταίες δύο δεκαετίες, παρατηρήθηκε αύξηση της επίπτωσης του ΑΚ του στοματοφάρυγγος σε αρκετές χώρες συμπεριλαμβανομένων της Αυστραλίας, του Καναδά, της Δανίας, της Σουηδίας, των ΗΠΑ και του Ηνωμένου Βασιλείου, παράλληλα με τη μείωση της χρήσης καπνού (142-144). Η διαπίστωση αυτή οδήγησε στην υπόθεση ότι η λοίμωξη με τον ιό HPV ήταν πιθανά υπεύθυνη για την συνεχή αυξητική τάση στα περιστατικά ΑΚ του στοματοφάρυγγος. Με βάση την άποψη αυτή, περαιτέρω μοριακές επιδημιολογικές μελέτες στην Αυστραλία, τη Σουηδία και τις ΗΠΑ κατέγραψαν από την δεκαετία το '80 μια δραματική αύξηση των νεοπλασμάτων του στοματοφάρυγγος τα οποία σχετίζονται με τον ιό HPV, ιδιαίτερα σε άνδρες και σε άτομα ηλικίας < 60 ετών (145). Σήμερα, η HPV λοίμωξη με ογκογόνα στελέχη εμπλέκεται στο 36% περίπου των νεοπλασμάτων του

στοματοφάρυγγος, και κατά κύριο λόγο εκείνων που αφορούν τις αμυγδαλές και τη βάση της γλώσσας (125).

Πίνακας 2. Επίπτωση καρκίνου στοματοφάρυγγος με βάση το φύλο, 2012 (119)

	Επίπτωση	
	Σ*	ASR**
Ανδρες		
Παγκόσμια	115000	3.2
Περισσότερο ανεπτυγμένες χώρες	44000	4.7
Λιγότερο ανεπτυγμένες χώρες	71000	2.8
Γυναίκες		
Παγκόσμια	27000	0.7
Περισσότερο ανεπτυγμένες χώρες	9000	0.8
Λιγότερο ανεπτυγμένες χώρες	18000	0.6

*Σ: Συνολικός αριθμός νέων περιπτώσεων ανά έτος

**ASR: Αριθμός νέων περιπτώσεων ανά 100.000 ανά έτος για όλες τις ηλικίες

Καρκίνος του λάρυγγος

Ο καρκίνος του λάρυγγος ανέρχεται σε 157,000 νέα περαστικά ετησίως, αντιπροσωπεύοντας το 1,1% όλων των νέων καρκίνων παγκοσμίως. Στους άνδρες είναι ιδιαίτερα συχνός και αντιστοιχεί στο 1,9% των κακοήθων νεοπλασμάτων που εντοπίζονται σε αυτούς. Αντίθετα, στις γυναίκες εμφανίζεται σπάνια με μόλις 19,000 νέα περιστατικά ετησίως (αναλογία φύλου 7:1) (Πίνακας 3) (119). Όμως, τα τελευταία χρόνια παρατηρείται αυξητική τάση στα περιστατικά καρκίνου του λάρυγγα στο γυναικείο φύλο, λόγω της

αυξανόμενης συχνότητας του καπνίσματος και της κατανάλωσης οινοπνεύματος στις γυναίκες (146). Το μεγαλύτερο ποσοστό των ασθενών με κακοήθεις όγκους του λάρυγγα βρίσκεται μεταξύ της 5^{ης} και 7^{ης} δεκαετίας της ζωής κατά την περίοδο εμφάνισης της νόσου (147). Το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα (ΑΚ) αποτελεί τον κύριο ιστολογικό τύπο στην συντριπτική πλειοψηφία των νεοπλασμάτων του λάρυγγος, στο 95% των περιπτώσεων (148). Σύμφωνα με επιδημιολογικά δεδομένα, η υψηλότερη επίπτωση καταγράφεται στην Καραϊβική και στην Κεντρική και Δυτική Ευρώπη (7.9 ανά 100,000), στη Νότια Ευρώπη (7.2) και στη Δυτική Ασία (6.5). Επιπλέον, 83,000 θάνατοι ετησίως οφείλονται στον καρκίνο του λάρυγγα (1.0% των θανάτων από καρκίνο), εκ των οποίων οι 73,000 αφορούν στους άνδρες (119).

Πίνακας 3. Επίπτωση καρκίνου του λάρυγγος με βάση το φύλο, 2012 (119)

	Επίπτωση	
	Σ*	ASR**
Ανδρες		
Παγκόσμια	138000	3.9
Περισσότερο ανεπτυγμένες χώρες	51000	5.1
Λιγότερο ανεπτυγμένες χώρες	87000	3.5
Γυναίκες		
Παγκόσμια	19000	0.5
Περισσότερο ανεπτυγμένες χώρες	7000	0.6
Λιγότερο ανεπτυγμένες χώρες	12000	0.4

*Σ: Συνολικός αριθμός νέων περιπτώσεων ανά έτος

**ASR: Αριθμός νέων περιπτώσεων ανά 100.000 ανά έτος για όλες τις ηλικίες

Ηπλειονότητα των ΑΚ του λάρυγγος εντοπίζονται στη γλωττιδική μοίρα και συγκεκριμένα στις γνήσιες φωνητικές χορδές. Οι γλωττιδικοί όγκοι αναπτύσσονται συχνότερα στο πρόσθιο τριτημόριο των φωνητικών χορδών και αναλογούν περίπου στο 70% των λαρυγγικών καρκινωμάτων. Λιγότερο συχνά προσβάλλουν την υπεργλωττιδική μοίρα και σπανίως την υπογλωττιδική μοίρα (149). Τα υπεργλωττιδικά νεοπλάσματα ανευρίσκονται στη λαρυγγική επιφάνεια της επιγλωττίδος, τις νόθες φωνητικές χορδές και τη λαρυγγική κοιλία σε συχνότητα περίπου 25- 28%, ενώ το 1/3 των εν λόγω καρκίνων εξορμάται από την επιγλωττίδα. Αντίθετα, τα υπογλωττιδικά νεοπλάσματα απαντώνται μόλις στο 2- 4% του συνόλου των νεοπλασμάτων του λάρυγγος και μπορούν να προσβάλλουν τον υπογλωττιδικό χώρο, ενώ στα ίδια χαμηλά ποσοστά κυμαίνεται και το διαγλωττιδικό νεόπλασμα το οποίο επεκτείνεται σε δύο τουλάχιστον μοίρες του λάρυγγα (υπεργλωττιδική και γλωττιδική ή γλωττιδική και υπογλωττιδική) (150).

Βάσει επιδημιολογικών στοιχείων, η τοπογραφική εντόπιση του λαρυγγικού νεοπλάσματος σχετίζεται με τη γεωγραφική κατανομή του πληθυσμού. Ειδικότερα, το υπεργλωττιδικό νεόπλασμα παρατηρείται σε μεγαλύτερη συχνότητα στην Γαλλία, Ισπανία, Ιταλία, Φιλανδία και Ολλανδία, ενώ το γλωττιδικό νεόπλασμα είναι κυρίαρχο στις ΗΠΑ, τον Καναδά, την Αγγλία και τη Σουηδία (151). Σύμφωνα με πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα, στην Ελλάδα το ποσοστό των γλωττιδικών νεοπλασμάτων είναι σχεδόν διπλάσιο συγκριτικά με εκείνο των υπεργλωττιδικών νεοπλασμάτων (60,2% και 32,8% αντίστοιχα) (146). Λαμβάνοντας υπόψη την αιτιολογική συσχέτιση μεταξύ καπνίσματος και ανάπτυξης γλωττιδικού καρκινώματος καθώς και τη συνεργική δράση καπνού και αλκοόλ στο υπεργλωττιδικό νεόπλασμα, είναι εν μέρει δυνατή η εξήγηση του διαφορετικού επιπολασμού των τύπων του λαρυγγικού καρκίνου στις διάφορες γεωγραφικές περιοχές (146).

Άλλοι παράγοντες οι οποίοι φαίνεται να έχουν επίσης σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση του λαρυγγικού επιθηλίου, είναι η επαγγελματική έκθεση σε ποικιλία χημικών, όπως πολυκυκλικά αρωματικά μείγματα, σκόνη τσιμέντου και μετάλλων και η άσβεστος (152). Διατροφικές διαταραχές που συνοδεύονται από χαμηλή πρόσληψη καρωτινοειδών καθώς και τοπικές διατροφικές συνήθειες έχουν ενοχοποιηθεί για την πρόκληση κακοήθων νεοπλασμάτων

του λάρυγγος (153). Τα τελευταία χρόνια, η γαστροοισοφαγική παλινδρόμηση και η χρόνια λαρυγγίτιδα έχουν θεωρηθεί ως πιθανοί παράγοντες κινδύνου καρκίνου του λάρυγγα (154). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι όλο και περισσότερα επιδημιολογικά δεδομένα συνδέουν την ανάπτυξη λαρυγγικού καρκίνου με την HPV λοίμωξη, όπου ογκογόνα στελέχη του ιού ανευρίσκονται περίπου στο 24% των ΑΚ του λάρυγγα (125,155).

Ωστόσο, ένα πολύ μικρό ποσοστό νεοπλασμάτων του λάρυγγος αναπτύσσονται σε ασθενείς οι οποίοι δεν εκτίθενται στους καθιερωμένους εξωγενείς παράγοντες κινδύνου, υποδηλώνοντας ότι άλλοι ενδογενείς παράγοντες, όπως η κληρονομική προδιάθεση, εμπλέκονται στην καρκινογένεση του λάρυγγα. Ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου του λάρυγγος είναι ελαφρώς αυξημένος σε άτομα με θετικό οικογενειακό ιστορικό του εν λόγω καρκίνου ή άλλων κακοήθων όγκων κεφαλής και τραχήλου (156). Στους ασθενείς με οικογενή καρκίνο κεφαλής και τραχήλου έχουν παρατηρηθεί συγκεκριμένες χρωμοσωμικές ανωμαλίες (διπλασιασμοί, χρωμοσωμικές ελλείψεις) και μεταβολικές αλλαγές, καθώς και η παρουσία συγκεκριμένων αντιγόνων ισοσυμβατότητας, ενισχύοντας έτσι τον ρόλο της κληρονομικότητας σε αυτή την ομάδα ασθενών (156).

Το ΑΚ του λάρυγγος συνιστά μία ετερογενή ομάδα νεοπλασμάτων με διαφορετικά χαρακτηριστικά όσον αφορά την τοπική επέκταση, το μεταστατικό δυναμικό και το θεραπευτικό αποτέλεσμα. Η αντιμετώπιση των γλωττιδικών νεοπλασμάτων αρχικού σταδίου μπορεί να περιλαμβάνει είτε τη διαστοματική χειρουργική με laser ή την ακτινοθεραπεία με παρόμοια περίπου ποσοστά ελέγχου της νόσου (157,158). Πρόσφατα, η ταυτόχρονη χημειο-ακτινοθεραπεία αποτελεί θεραπευτική επιλογή για T2 σταδίου νεοπλάσματα σε μια προσπάθεια βελτίωσης του τοπικού ελέγχου της νόσου (159). Σε περιστατικά κυρίως υπεργλωττιδικών όγκων, η μερική λαρυγγεκτομή είτε με ανοικτή χειρουργική επέμβαση είτε με διαστοματική εκτομή με laser έχει αναδείξει συγκρίσιμα αποτελέσματα με εκείνα της ογκολογικής θεραπείας (157,160). Σε νόσο προχωρημένου σταδίου η θεραπευτική προσέγγιση περιλαμβάνει ολική λαρυγγεκτομή ή χημειο-ακτινοθεραπεία. Τα τελευταία χρόνια όμως η χορήγηση χημειο-ακτινοθεραπείας ως πρώτης γραμμής θεραπεία, κερδίζει όλο και περισσότερο έδαφος έναντι της ολικής

λαρυγγεκτομής έχοντας περίπου παρόμοιοθεραπευτικό αποτέλεσμα(161,162). Παρ' όλα αυτά, η αυξημένη χρήση της χημειο-ακτινοθεραπείας συνοδεύεται από αύξηση των λειτουργικών επιπλοκών και μείωση της συνολικής επιβίωσης σε ηλικιωμένους ασθενείς και σε ασθενείς με T4 σταδίου καρκίνους, αντίστοιχα (161).

Καρκίνος του ρινοφάρυγγος

Ο καρκίνος του ρινοφάρυγγος αποτελεί ένανιδιαίτερα επιθετικό όγκο στην περιοχή κεφαλής και τραχήλου, παρουσιάζει συχνά τοπική περιοχική διήθηση των παραφαρυγγικών χώρων, της βάσης του κρανίου ή της υπερώας και μεθίσταται με πολύ μεγάλη συχνότητα στους τραχηλικούς λεμφαδένες (163).Ιστολογικά διακρίνεται σε κερατινοποιημένο ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα και μη κερατινοποιημένο καρκίνωμα (διαφοροποιημένο ή αδιαφοροποίητο) (164). Ο μη κερατινοποιημένος καρκίνος του ρινοφάρυγγα και ιδιαίτερα ο αδιαφοροποίητος τύπος, εμφανίζει ισχυρότατη συσχέτιση με τον ιό EpsteinBarr (EBV), ενώ υψηλοί τίτλοι αντισωμάτων IgGκαι IgAκατά του ιού ανιχνεύονται στον ορό της πλειοψηφίας των ασθενών. Αντίθετα, ασθενείς με ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα έχουν χαμηλό τίτλο αντισωμάτων έναντι του EBV(163,164). Τα αδιαφοροποίητα νεοπλάσματα εμφανίζουν καλύτερο τοπικοπεριοχικό έλεγχο με θεραπεία καθώς και υψηλότερο ποσοστό απομεμακρυσμένων μεταστάσεων σε σχέση με τα διαφοροποιημένα καρκινώματα (165).

Η επίπτωση του καρκίνου του ρινοφάρυγγος είναι χαμηλή και ανέρχεται σε 87,000 νέα περιστατικάετησίως, αντιπροσωπεύοντας μόλις το 0,6% όλων των νεοπλασμάτων παγκόσμια. Η νόσος αφορά συνηθέστερα άνδρες (αναλογία φύλου 3:1) και σχετίζεται με διακριτές γεωγραφικές περιοχές υψηλού κινδύνου στις οποίες εμφανίζεται ως ενδημική (119). Τα μεγαλύτερα ποσοστά εμφάνισης καρκίνου του ρινοφάρυγγα παρατηρούνται στους πληθυσμούς της Νοτιοανατολικής Ασίας (6.4 ανά 100,000 στους άνδρες και 2.4 ανά 100,000 στις γυναίκες), καθώς και στην Ανατολική Ασία και Βόρεια Αφρική όπου τα

ποσοστά υπερβαίνουν το 2.0 στους άνδρες και το 1.0 στις γυναίκες. Επιπλέον, καταγράφονται 51,000 θάνατοι ετησίως από καρκίνο του ρινοφάρυγγα σε παγκόσμια κλίμακα, οι οποίοι αντιστοιχούν στο 0,6% όλων των θανάτων των προκαλούμενων από κακοήθειες (119). Στη Βόρεια Αμερική, το 25% περίπου των κακοήθων όγκων του ρινοφάρυγγος είναι ακανθοκυτταρικά καρκινώματα, το 12% διαφοροποιημένα μη κερατινοποιημένα και το 63% αδιαφοροποίητα μη κερατινοποιημένα καρκινώματα. Αντίθετα, βάσει της ιστολογικής κατανομής των ρινοφαρυγγικών καρκίνων στους ασθενείς της Νότιας Κίνας, τα αδιαφοροποίητα καρκινώματα αποτελούν την συντριπτική πλειοψηφία με ποσοστό 95% και ακολουθούν τα ακανθοκυτταρικά και διαφοροποιημένα με ποσοστά 2% και 3%, αντίστοιχα (166).

Η ανίχνευση του πυρηνικού αντιγόνου του ιού EBV (EBNA) και του ιϊκού DNA στα διαφοροποιημένα και αδιαφοροποίητα μη κερατινοποιημένα νεοπλασμάτα του ρινοφάρυγγος, δείχνει ότι ο ιός μπορεί να μολύνει και να μετασχηματίζει τα επιθηλιακά κύτταρα (167). Η παθογένεση του ρινοφαρυγγικού καρκίνου και κυρίως αυτού του ενδημικού τύπου, φαίνεται ότι ακολουθεί μία πολυσταδιακή διαδικασία στην οποία η λοίμωξη από τον ιό EBV, το εθνικό υπόβαθρο και η έκθεση σε περιβαλλοντικά καρκινογόνα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η επίπτωση του καρκίνου του ρινοφάρυγγος παραμένει υψηλότερη στα άτομα των ενδημικών περιοχών που μεταναστεύουν σε μη- ενδημικές περιοχές, σε σχέση με άλλες φυλές. Στις ΗΠΑ, τα ποσοστά ρινοφαρυγγικού καρκίνου είναι πολύ πιο αυξημένα μεταξύ των Αμερικάνων ασιατικής καταγωγής (2.5- 3.8 ανά 100,000) συγκριτικά με τους λευκούς Αμερικάνους (0.4), τους Αφροαμερικανούς (0.6) και τους Αμερικάνους ισπανικής καταγωγής (0.4) (168). Αυτή η μη ισορροπημένη γεωγραφική και εθνική κατανομή των περιστατικών ρινοφαρυγγικού καρκίνου, υποδηλώνει μία πολυπαραγοντική αιτιολογία της νόσου η οποία συμπεριλαμβάνει ιϊκούς, περιβαλλοντικούς και γενετικούς παράγοντες.

Άλλοι πιθανοί αιτιολογικοί παράγοντες για την ανάπτυξη καρκίνου του ρινοφάρυγγος στις ενδημικές περιοχές, αποτελούν η κατανάλωση τροφίμων που περιέχουν πτητικές νιτροζαμίνες, το κάπνισμα και ορισμένοι

HLAγονότυποι τάξης I (169). Αντίθετα, στις μη- ενδημικές περιοχές η έκθεση στον καπνό έχει συσχετιστεί μόνο με το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα του ρινοφάρυγγος(170),ενώ πρόσφατα δεδομένα αναφέρουν την παρουσία του HPVσε ασθενείς με καρκίνο του ρινοφάρυγγος (171). Παρ' όλο που ο ιός HPVείναι πιθανό να εμπλέκεται στην καρκινογένεση του ρινοφαρυγγικού επιθηλίου, μέχρι σήμερα δεν είναι πλήρως ξεκάθαρη η κλινική σημασία της HPVλοίμωξης στον καρκίνο του ρινοφάρυγγος (172).

Ο πρώιμος καρκίνος του ρινοφάρυγγος εμφανίζει υψηλά ποσοστά πενταετούς επιβίωσης (>90%), με εξαιρετικά ποσοστά τοπικοπεριοχικού ελέγχου της νόσου (173). Η αντιμετώπιση του ρινοφαρυγγικού καρκίνου σταδίου I περιλαμβάνει ριζική ακτινοθεραπεία, λαμβάνοντας υπ' όψιν την ακτινοευαισθησία του νεοπλάσματος και τη δυσκολία στη χειρουργική προσπέλασή του λόγω ανατομικών περιορισμών. Αντίθετα, σε ασθενείς με προχωρημένου σταδίου καρκίνο του ρινοφάρυγγος στους οποίους χορηγείται χημειο- ακτινοθεραπεία, η πρόγνωση είναι πτωχότερη, ενώ συχνά παρατηρείται υποτροπή με απομεμακρυσμένες μεταστάσεις (174).

2.2 Πρόγνωση- Θεραπεία

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η πρόγνωση των ασθενών με ΑΚΚΤ εξαρτάται κατά κύριο λόγο από το στάδιο της νόσου κατά τον χρόνο της διάγνωσης, το οποίο καθορίζεται από την ακριβή οριοθέτηση του πρωτοπαθούς όγκου, την παρουσία και έκταση των διηθημένων περιοχικών λεμφαδένων, καθώς και από την παρουσία απομεμακρυσμένων μεταστάσεων. Η σταδιοποίηση των ΑΚΚΤ στηρίζεται στον πλήρη κλινικό έλεγχο κεφαλής- τραχήλου, την απεικονιστική διάγνωση, την κυτταρολογική εξέταση δια λεπτής βελόνης τραχηλικών διογκώσεων και στην τελική ιστολογική εκτίμηση έπειτα από χειρουργική αντιμετώπιση. Το ένα τρίτο των ασθενών με ΑΚΚΤ εμφανίζουν συνήθως πρώιμου σταδίου νόσο (στάδιο I και II)η οποία μπορεί να αντιμετωπισθεί με θεραπευτικές μεθόδους διατήρησης του οργάνου (χειρουργικές και μη χειρουργικές) και συχνά με μονοθεραπεία, η οποία

αντιστοιχεί σε αφαίρεση της εξεργασίας ή ακτινοθεραπεία (175). Τα ΑΚΚΤ που διαγιγνώσκονται σε πρώιμα στάδια αντιμετωπίζονται αποτελεσματικά με μικρή νοσηρότητα και υψηλά ποσοστά πενταετούς επιβίωσης (176). Αντίθετα, το μεγαλύτερο ποσοστό των υπολοίπων ασθενών παρουσιάζουν νόσο προχωρημένου σταδίου (στάδιο III και IV) με ή χωρίς μεταστατικές εστίες στους λεμφαδένες, η οποία περιορίζει τις δυνατότητες επιλογής επιβάλλοντας επιθετικότερες θεραπευτικές μεθόδους. Για πολλά χρόνια, η θεραπευτική προσέγγιση της τοπικοπεριοχικής νόσουπροχωρημένου σταδίουπεριελάμβανε χειρουργική επέμβαση και μετεγχειρητική ακτινοθεραπεία με αυξημένη νοσηρότητα και μειωμένη επιβίωση. Τη τελευταία δεκαετία παρέχεται η δυνατότητα επιλογής πρωτοκόλλων διατήρησης του οργάνου με συνδυασμένη χημειο- ακτινοθεραπεία και διασωστική χειρουργική (salvagesurgery). Αυτά τα πρωτόκολλα εφαρμόζονται αποτελεσματικά κυρίως σε ασθενείς ηλικίας < 70 ετών με καρκίνο του λάρυγγος και του φάρυγγος μετρίως προχωρημένο και καλά προγνωστικά χαρακτηριστικά. Παρ' όλη την έλλειψη τυχαίοποιημένων μελετών, έχει παρατηρηθεί ότι κατά τη διάρκεια των τελευταίων δύο δεκαετιών έχει βελτιωθεί η ποιότητα ζωής των ασθενών με ΑΚΚΤ, ως αποτέλεσμα της χρήσης νεότερων χειρουργικών και ακτινοθεραπευτικών μεθόδων (177), καθώς και της εφαρμογής των πρωτοκόλλων διατήρησης του οργάνου (178).

Η συνεχώς αυξανόμενη κατανόηση των μοριακών χαρακτηριστικών των ΑΚΚΤ έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη νέων θεραπειών οι οποίες στοχεύουν μόρια τα οποία εμπλέκονται στη γένεση και εξέλιξη των κακοήθων νεοπλασμάτων. Ο υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EpidermalGrowthFactorReceptor, EGFR) αποτελεί ένα πολλά υποσχόμενο μοριακό θεραπευτικό στόχο στον καρκίνο κεφαλής- τραχήλου ο οποίος εκφράζεται στην πλειοψηφία των περιστατικών, ενώ η υπερέκφρασή του σχετίζεται με υψηλό ποσοστό τοπικής υποτροπής και πτωχή πρόγνωση (179). ΟEGFR είναι ένας διαμεμβρανικός υποδοχέας τυροσινικής κινάσης ο οποίος δρα ως κεντρικός μεταγωγέας πολλαπλών σηματοδοτικών οδών οι οποίες εμπλέκονται στην κυτταρική αύξηση, τη διήθηση των καρκινικών κυττάρων και τη μετανάστευσή τους, καθώς και στην αγγειογένεση (180). Μία από τις προτεινόμενες μεθόδους στοχευμένης θεραπείας του EGFR αποτελεί

η χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων, όπως το χημαιρικό μόριο κετουξιμάμπητο οποίο δεσμεύεται στον υποδοχέα με μεγαλύτερη συγγένεια από εκείνη των ενδογενών συζευκτών. Συνεπώς, παρεμποδίζεται η σύνδεσηενδογενών προσδετών στο εξωκυττάριο τμήμα του EGFR και αναστέλλονται οι οδοί σηματοδότησής του, ενώ ενισχύεται το κυτταροτοξικό αποτέλεσμα της χημειοθεραπείας ή της ακτινοθεραπείας (181,182). Επιπλέον, οι αναστολείς της τυροσινικής κινάσης, όπως η γεφιτινίμπη, είναι μικρά μόρια τα οποία αλληλεπιδρούν με το ενδοκυττάριο τμήμα του EGFR αναστέλλοντας τη φωσφορυλίωση των μορίων τυροσίνης (183).

Η χορήγηση υψηλής δόσης ακτινοθεραπείας με κετουξιμάμπη σε ασθενείς με τοπικά προχωρημένου σταδίου καρκίνο κεφαλής- τραχήλου, έχει αναδειχθεί σε αποτελεσματική θεραπεία με καλύτερο τοπικοπεριοχικό έλεγχο της νόσου και σημαντική παράταση της συνολικής επιβίωσης (184). Πρόσθετες μελέτες προτείνουν ότι η χορήγηση κετουξιμάμπης ή άλλων αναστολέων του EGFR ενισχύουν την αποτελεσματικότητα της χημειοθεραπείας με βάση την πλατίνη σε υποτροπιάζοντα ή μεταστατικό καρκίνο κεφαλής- τραχήλου (185,186). Σε μια τυχαιοποιημένη μελέτη φάσης III, ο συνδυασμός κετουξιμάμπης με σισπλατίνη ως θεραπεία πρώτης γραμμής παρουσίασε υψηλότερα ποσοστά ανταπόκρισης σε σύγκριση με τη μονοθεραπεία με σισπλατίνη ως πρώτης γραμμής θεραπεία, σε περιστατικά υποτροπιάζουσας ή μεταστατικής νόσου (181).

Ένας άλλος ελπιδοφόρος θεραπευτικός στόχος αποτελεί το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 και η αποκατάσταση της φυσιολογικής λειτουργίας του μέσω μικρών μορίων, όπως το PRIMA-1 και το CP-31398. Αυτά τα μόρια επανενεργοποιούν την πρωτεΐνη p53, οδηγώντας σε αναστολή του κυτταρικού κύκλου και στην επαγωγή της απόπτωσης σε σειρές καρκινικών κυττάρων AKKT (ROH2011). Επιπρόσθετα, η χρήση αναστολέων του ενζύμου κυκλοξυγενάση -2 (COX-2), όπως τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα, αποτελεί μία υποσχόμενη στρατηγική στην πρόληψη και τη θεραπεία των συμπαγών όγκων, βάσει της παρατηρηθείσης μείωσης του κινδύνου ανάπτυξης ορθοκολικού καρκίνου με την μακροχρόνια χρήση ασπιρίνης (187).

2.3 Μοριακή βιολογία ακανθοκυτταρικού καρκινώματος κεφαλής και τραχήλου

Η σημαντική πρόοδος της μοριακής βιολογίας επέτρεψε τα τελευταία χρόνια την καλύτερη κατανόηση των μοριακών μηχανισμών οι οποίοι λαμβάνουν χώρα στη διαδικασία της καρκινογένεσης. Η σταδιακή κακοήθης εξαλλαγή συνιστά μια σειρά μεταβολών σε επίπεδο κυττάρων οι οποίες οδηγούν σε απορρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού καθώς και της κυτταρικής διαφοροποίησης και χωροταξίας. Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία κυττάρων με ισχυρό αναπτυξιακό πλεονέκτημα και απεριόριστο αριθμό μιτώσεων, διαμέσου αλλαγών στη λειτουργία οδών μεταγωγής σήματος. Σήμερα, παρ' όλο που έχουν μελετηθεί ορισμένες μοριακές οδοί οι οποίες ενέχονται σε διάφορους τύπους καρκίνου, στους περισσότερους όγκους παραμένουν άγνωστες.

Η μετάβαση των επιθηλιακών κυττάρων από τον φυσιολογικό στον κακοήθη φαινότυπο καθοδηγείται από επιπρόσθετες γενετικές και επιγενετικές μεταβολές, όπως η ενεργοποίηση ογκογονιδίων και η απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων (188). Αυτά τα γονίδια εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, του πολλαπλασιασμού των κυττάρων και της διαφοροποίησής τους, του κυτταρικού θανάτου και του μηχανισμού επιδιόρθωσης του DNA (189). Ο κακοήθης φαινότυπος είναι το τελικό αποτέλεσμα της συσσώρευσης γενετικών βλαβών οι οποίες δεν συμβαίνουν ταυτόχρονα, αλλά ακολουθούν το πολυσταδιακό μοντέλο ογκογένεσης, έτσι ώστε κάθε μετάλλαξη να δημιουργεί έναν μεγάλο αριθμό κυττάρων που αποτελούν υπόστρωμα για μεταγενέστερες μεταλλάξεις (190).

Γενετικές μεταβολές

Το γενετικό πρότυπο καρκινογένεσης για το ΑΚΚΤ βασίζεται σε μελέτες στις οποίες παρατηρούνται διαταραχές σε γονίδια οι οποίες οδηγούν στη σταδιακή ανάπτυξη προκαρκινικών αλλοιώσεων, όπως η λευκοπλακία και η

ερυθροπλακία (191). Η συνηθέστερη γενετική μεταβολή στο ΑΚΚΤ είναι η απώλεια της χρωμοσωμικής περιοχής 9p21 η οποία παρατηρείται σε ποσοστό 70- 80% των δυσπλαστικών βλαβών της στοματικής κοιλότητας, δείχνοντας ότι αποτελεί πρώιμο γεγονός στη διαδικασία της καρκινογένεσης (192). Αυτή η περιοχή γνωστή και ως CDKN2Α γονιδιακός τόπος, κωδικοποιεί τα ογκοκατασταλτικά γονίδια p16 και p14^{ARF} τα οποία απενεργοποιούνται συχνά μέσω υπερμεθυλίωσης (193). Άλλη συνηθής γενετική μεταβολή στα αρχικά στάδια της ογκογένεσης είναι η απώλεια της χρωμοσωμικής περιοχής 3p η οποία κωδικοποιεί τα ογκοκατασταλτικά γονίδια FHIT και RASSF1A (194). Αργότερα, στο τελικό στάδιο μετάβασης από την δυσπλασία στο διηθητικό ΑΚΚΤ, παρατηρείται απώλεια της ετεροζυγωτίας (LOH) της περιοχής 17p και μετάλλαξη του γονιδίου p53 η οποία σχετίζεται με αυξημένη γενετική αστάθεια, επιταχύνοντας το ρυθμό των γενετικών μεταβολών κατά τη διαδικασία της καρκινογένεσης (195). Επιπλέον, έχει αναφερθεί ενίσχυση της περιοχής 11q13 και υπερέκφραση της κυκλίνης D1 στο 40% των περιστατικών δυσπλασίας του στοματικού βλεννογόνου, οι οποίες συνδέονται με πτωχή πρόγνωση (196).

Καρκινογένεση πεδίου

Η συνεχής έκθεση του καλυπτικού επιθηλίου της ανώτερης αναπνευστικής και ανώτερης πεπτικής οδού στις καρκινογόνες ουσίες του καπνού και του οινόπνευματος, υπογραμμίζει το γεγονός ότι ολόκληρη η περιοχή κεφαλής-τραχήλου βρίσκεται σε αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκινικών βλαβών. Η υπόθεση αυτή οδήγησε στην ανάπτυξη της θεωρίας της καρκινογένεσης πεδίου (field cancerization) η οποία βασίστηκε σε εκτεταμένη ιστολογική μελέτη των δυσπλαστικών περιοχών βλεννογόνου που γειτνιάζαν με διηθητικά καρκινώματα του στόματος (197). Αυτή η θεωρία στηρίζεται στην παρατήρηση ότι οι δυσπλαστικές περιοχές χαρακτηρίζονται από υψηλό ποσοστό ανάπτυξης δεύτερων πρωτοπαθών όγκων με δυσμενή πρόγνωση, έπειτα από επιτυχή θεραπευτική αντιμετώπιση του στοματικού καρκίνου (197). Σύμφωνα με το πρότυπο της καρκινογένεσης πεδίου, μια μεγάλη περιοχή επιθηλίου (πεδίο) που υποβάλλεται σε χρόνια έκθεση σε

καρκινογόνους παράγοντες εμφανίζει προδιάθεση στην ανάπτυξη πολλαπλών καρκινικών εστιών και προκαρκινικών βλαβών. Θεωρείται μάλιστα ότι η παρουσία τέτοιων πεδίων προηγείται των διηθητικών καρκίνων, λόγω της ομοιότητας των γονιδιακών προφίλ των καρκινωμάτων και των περιβαλλόντων αυτά ιστών (198). Επίσης, έχει παρατηρηθεί ότι οι όγκοι που αναπτύσσονται στο πεδίο καρκινογένεσης, έχουν στη πλειονότητα των περιπτώσεων κλωνική συγγένεια και προέρχονται από κοινό πρόγονο (116,192). Σύμφωνα με μια υπόθεση, αυτοί οι πολλαπλοί όγκοι προκαλούνται από τη μετανάστευση των μεταμορφωμένων κύτταρων στο γειτονικό βλεννογόνο της αναπνευστικής και πεπτικής οδού είτε ενδοεπιθηλιακά είτε με το σίελο (μικρομεταστάσεις). Τα εξαλλαγμένα κύτταρα χαρακτηρίζονται από ισχυρό αναπτυσιακό πλεονέκτημα και τελικά εκτοπίζουν ή αντικαθιστούν το περίξ βλεννογόνο με τη διαδικασία της «κλωνικής επέκτασης» (199).

Έχει αποδειχθεί ότι τουλάχιστο στο 35% των καρκίνων της στοματικής κοιλότητας και του στοματοφάρυγγος, ο όγκος περιβάλλεται από επιθήλιο που έχει υποστεί γενετικές αλλοιώσεις και το οποίο μακροσκοπικά φαίνεται φυσιολογικό (200). Ιδιαίτερα ενδιαφέρον είναι το γεγονός της παρουσίας γενετικά αλλοιωμένου επιθηλίου στα χειρουργικά όρια αφαιρεθέντων νεοπλασμάτων στο 70% των ασθενών με ΑΚΚΤ, υποδεικνύοντας ότι μπορεί να παραμένει δυσπλαστικό επιθήλιο στον ασθενή παρά τη χειρουργική αφαίρεση του όγκου. Σε αναδρομικές μελέτες, έχει βρεθεί ότι το μη εξαιρεθέν αλλοιωμένο επιθήλιο είναι δυνατό να πυροδοτήσει τοπικές υποτροπές ή στην ανάπτυξη δεύτερων πρωτοπαθών όγκων (201,202). Από τα δεδομένα αυτά διαπιστώθηκε ότι η πολυεστιακότητα της καρκινογένεσης στη στοματική κοιλότητα, είναι ένας σημαντικός παράγοντας αποτυχίας της θεραπείας του στοματικού καρκίνου. Παράλληλα, η κατανόηση του μοντέλου της καρκινογένεσης πεδίου οδήγησε στην ανάπτυξη της χημειοπροφύλαξης η οποία βασίζεται στη χορήγηση συστηματικής θεραπείας, με σκοπό την προστασία του επιθηλίου του συνόλου της ανώτερης αναπνευστικής και πεπτικής οδού από τη διαδικασία της πολυσταδιακής καρκινογένεσης (203).

Επιγενετικές αλλοιώσεις

Τα επιγενετικά φαινόμενα φαίνεται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση, επηρεάζοντας ή απενεργοποιώντας τις λειτουργίες των γονιδίων μέσω μεθυλίωσης της περιοχής του υποκινητή, χωρίς να παρατηρείται αλλαγή στη δομή ή την αλληλουχία τους (204). Κατά τη μεθυλίωση του υποκινητή προστίθενται ομάδες μεθυλίου (CH₃) σε ορισμένες κυτοσίνες του DNA (205). Στην πλειονότητα των περιπτώσεων, οι μεθυλίωσεις λαμβάνουν χώρα σε περιοχές πλούσιες σε κυτοσίνη και γουανίνη που ονομάζονται νησίδες CpG, ενώ παρατηρούνται υπό φυσιολογικές συνθήκες σε υποκινητές γονιδίων με αποτέλεσμα την αναστολή της μεταγραφής τους. Οι μεθυλιωμένες CpG νησίδες εμποδίζουν την πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων στο DNA ή δεσμεύουν πρωτεΐνες που ενεργοποιούν αποακετυλάσες ιστονών (HDAC). Το φαινόμενο αυτό αποτελεί την κύρια επιγενετική τροποποίηση στο ανθρώπινο γονιδίωμα, ενώ αλλαγές στο μοτίβο της μεθυλίωσης μπορεί να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση, καθώς σχετίζονται συχνά με απώλεια έκφρασης γονιδίων (206). Επίσης, φαίνεται ότι οι επιγενετικές αλλοιώσεις είναι απαραίτητες για την εμφάνιση πολλαπλών γενετικών μεταβολών οι οποίες απαιτούνται για την πρόοδο της διαδικασίας της ογκογένεσης, μέσω απενεργοποίησης γονιδίων τα οποία συνδέονται με την επιδιόρθωση του DNA (204). Τόσο η υπερμεθυλίωση ογκοκατασταλτικών γονιδίων η οποία οδηγεί στην απενεργοποίησή τους, όσο και η απομεθυλίωση ογκογονιδίων που έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίησή τους μπορούν να επάγουν καρκινογένεση (207).

Ο φαινομενικά φυσιολογικός ιστός ο παρακείμενος των καρκινικών και προκαρκινικών αλλοιώσεων μπορεί να παρουσιάζει υψηλά επίπεδα μεθυλίωσης ορισμένων γονιδίων, αποδεικνύοντας ότι η μεθυλίωση είναι ένα πρώιμο γεγονός στην καρκινογένεση του στοματικού επιθηλίου (208). Έχει προταθεί ότι η μελέτη της μεθυλίωσης αποτελεί πιο ευαίσθητο δείκτη για την αξιολόγηση των χειρουργικών ορίων του εξαιρεθέντος όγκου σε σχέση με την εκτίμηση των ιστολογικών μεταβολών (209).

Παρ' όλο που η έρευνα γύρω από τη μεθυλίωση γονιδίων στο ΑΚΚΤ είναι αρκετά πρόσφατη, έχουν ήδη μελετηθεί εκτενώς τα ογκοκατασταλτικά γονίδια CDKN2A/p16^{INK4α}, CDH1 (cadherin-1), MGMT και DAPK1 (205). Έχει παρατηρηθεί μεθυλίωση του υποκινητή του p16, της E- καντχερίνης, του DAPK και του APC στο 58,4%, 42,9%, 36,8% και 18,2% των καρκίνων της στοματικής κοιλότητας, αντίστοιχα (210). Επιπρόσθετα, το MGMT είναι μεθυλιωμένο στο 25- 52% των πρωτοπαθών στοματικών νεοπλασμάτων, ενώ έχει βρεθεί ότι η υπερμεθυλίωση της E- καντχερίνης σχετίζεται με πτωχή διαφοροποίηση και χαμηλά ποσοστά επιβίωσης (204,210).

Πρωτοογκογονίδια και ογκογονίδια

Τα ογκογονίδια αποτελούν παραλλαγμένες μορφές φυσιολογικών κυτταρικών γονιδίων που ονομάζονται πρωτοογκογονίδια και κωδικοποιούν πρωτεΐνες οι οποίες ρυθμίζουν θετικά τα σήματα της κυτταρικής αύξησης και επιβίωσης. Οι μεταλλάξεις και η επακόλουθη ενεργοποίηση των πρωτοογκογονιδίων σε ογκογονίδια μπορεί να προάγει τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων, οδηγώντας σε καρκινογένεση. Τα ογκογονίδια μπορούν επίσης να προέρχονται από γονίδια ογκογόνων ιών με ικανότητα κακοήθους εξαλλαγής του κυττάρου ξενιστή.

Στα ογκογονίδια ανήκουν αυξητικοί παράγοντες ή οι υποδοχείς τους (hst-1, int-2, EGFR/erbB, c-erbB-2/Her-2, sis), ενδοκυτταρικοί μεταγωγείς σήματος (ras, raf, stat-3), μεταγραφικοί παράγοντες (myc, fos, jun, c-myc), γονίδια που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο (κυκλίνη D1) και γονίδια που εμπλέκονται στην αναστολή της απόπτωσης (bcl-2, bax) (211). Η πλειονότητα αυτών των ογκογονιδίων προωθούν τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, παρακάμπτοντας τα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου G/S, G/M και M.

Πολλά είναι τα ογκογονίδια τα οποία εμπλέκονται στην ανάπτυξη ΑΚΚΤ, όπως το γονίδιο του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR/c-erb 1), ο μετατρεπτικός αυξητικός παράγοντας- β (Transforming Growth Factor-

beta,TGF-β), τα γονίδια της οικογένειας ras, το γονίδιο c-myc, η οδόςPI3K(κινάση της φωσφατιδυλινοσιτόλης-3)- PTEN-AKTκαι ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VascularEndothelialGrowthFactor, VEGF). Αναλυτικότερα, η αυξημένη έκφραση του EGFRκαι των συνδετών του TGF-α και EGFπαίζουν σημαντικό ρόλο στον καρκίνο της στοματικής κοιλότητας, μέσω ενεργοποίησης των οδώνRas-MAPK, PI3K-PTEN-AKT και φωσφολιπάσης C (198). Έτσι, το κύτταρο οδηγείται σε αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, αναστολή της απόπτωσης, μετάσταση και αγγειογένεση (198). Έχει παρατηρηθεί ότι ο EGFRυπερεκφράζεται στο 80- 100% των ΑΚΚΤ και ότι η έκφρασή του αυξάνεται προοδευτικά με την εξέλιξη των προκαρκινικών αλλοιώσεων σε διηθητικό καρκίνο (211).

Ένα επιπλέον σημαντικό σηματοδοτικό μονοπάτι που σχετίζεται με το ΑΚΚΤ είναι το μονοπάτι του TGF-β, το οποίο ελέγχει την κυτταρική αύξηση σε πολλούς τύπους καρκίνου (198). Ο TGF-β ενεργοποιεί ενδοκυττάριας αυξητικές οδούς μέσω των υποδοχέων του, οι οποίοι μεταδίδουν το σήμα φωσφορυλιώνοντας τις πρωτεΐνεςSmadπου με τη σειρά τους ρυθμίζουν τη μεταγραφή συγκεκριμένων γονιδίων (212). Πρόσφατα, παρατηρήθηκε μια σχέση μεταξύ της οδού του TGF-β και του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB (nuclearfactorkB), ο οποίος αυξάνει την επιβίωση των κυττάρων (211,212). Παρ' όλο που φαίνεται ότι ο TGF-β δρα ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο στα αρχικά στάδια της καρκινογένεσης και ως ογκογονίδιο σε προχωρημένα στάδια, ο ρόλος του δεν έχει ακόμα πλήρως αποσαφηνιστεί (212).

Εξίσου σημαντική σηματοδοτική οδός στον καρκίνο, συμπεριλαμβανομένου και του ΑΚΚΤ, είναι το μονοπάτι PI3K-PTEN-AKT. Συγκεκριμένα, σωματικές μεταλλάξεις του γονιδίου PIK3CAτο οποίο κωδικοποιεί μια υπομονάδα του IaPI3K, έχουν βρεθεί στο 10- 20% των ΑΚΚΤ και σχετίζονται με αυξημένη λειτουργία της οδού, καθώς και με αυξημένη διηθητικότητα και μετάσταση των μεταλλαγμένων κυττάρων (198). Επιπλέον, έχουν αναφερθεί μεταλλάξεις στο 10% των ΑΚΚΤ, οι οποίες συνδέονται με απώλεια της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνηςPTEN και διαρκή ενεργοποίηση της PI3K πρωτεΐνης (213). Οι δύο

παραπάνω μηχανισμοί έχουν ως αποτέλεσμα την ενίσχυση της δράσης της AKT που οδηγεί σε αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και αποφυγή της απόπτωσης (198).

Σε πολλά νεοπλάσματα στον άνθρωπο έχουν βρεθεί μεταλλάξεις στα μέλη της οικογένειας *ras* (*H-ras*, *K-ras*, *N-ras*) τα οποία εμπλέκονται στην ενεργοποίηση ενδοκυττάρων οδών οι οποίες προάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί ότι το *H-ras* είναι πολύ συχνά μεταλλαγμένο στον καρκίνο της στοματικής κοιλότητας σε πληθυσμούς της Ασίας, ενώ στο δυτικό κόσμο μεταλλάξεις του γονιδίου εντοπίζονται σπάνια (<5%) (118,214).

Ογκοκατασταλτικά γονίδια

Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια κωδικοποιούν πρωτεΐνες οι οποίες συνήθως μεταβιβάζουν αρνητικά σήματα κυτταρικής αύξησης. Αυτά τα γονίδια εμπλέκονται συχνά στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και συγκεκριμένα στην αναστολή του και την επαγωγή της απόπτωσης. Σε αντίθεση με τα ογκογονίδια, τα οποία μπορούν να ενεργοποιηθούν μέσω μετάλλαξης σε ένα μόνο από τα δύο αλληλόμορφα του γονιδίου, τα ογκοκατασταλτικά γονίδια απενεργοποιούνται μέσω μεταλλάξεων και στα δύο αλληλόμορφα (σημιακές μεταλλάξεις, απαλοιφές και ανακατατάξεις). Η αναστολή της δράσης των ογκοκατασταλτικών γονιδίων οδηγεί το κύτταρο σε ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό, ο οποίος συμβάλλει στη δημιουργία του κακοήθους φαινοτύπου (211).

Μεταξύ των πλέον μελετημένων ογκοκατασταλτικών γονιδίων είναι το *rb* και το *p53* που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες *pRB* και *p53*, αντίστοιχα. Αυτές οι ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες ελέγχουν τον κυτταρικό κύκλο και εμπλέκονται στην αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, ενώ οι μεταλλαγμένες μορφές τους προάγουν την ανεξέλεγκτη κυτταρική αύξηση. Έχει βρεθεί ότι η *p53* είναι αδρανοποιημένη στο ήμισυ περίπου των περιστατικών ΑΚΚΤ, ωστόσο δεν είναι ξεκάθαρη η χρονική φάση κατά την διάρκεια της

καρκινογένεσης κατά την οποία απενεργοποιείται (204). Επιπλέον, το 60% των καρκίνων της στοματικής κοιλότητας υπερέκφραζει την πρωτεΐνη p53, υποδηλώνοντας έτσι τον σημαντικό ρόλο που διαδραματίζει στο ΑΚΚΤ (192). Οι μεταλλάξεις λαμβάνουν χώρα κυρίως στα εξώνια 5-9 και στα κωδικώνια 157, 173 και 273 και θεωρούνται χαρακτηριστικά της έκθεσης στις καρκινογόνες ουσίες του καπνού (128). Υψηλά ποσοστά μεταλλαγμένου p53 συνδέονται με αυξημένη πιθανότητα υποτροπής της νόσου, ενώ ασθενείς με ΑΚΚΤ και υπερέκφραση της p53 εμφανίζουν πτωχότερη πρόγνωση και χαμηλή ανταπόκριση στη θεραπεία με χημειο- ακτινοθεραπεία (215).

Ένα άλλο ογκοκατασταλτικό γονίδιο είναι το *INK4-ARF* που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη p16, η οποία δρα ως ισχυρός αναστολέας των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών (CDK4, CDK6), εμποδίζοντας το κύτταρο να εισέλθει στην Sφάση του κυτταρικού κύκλου (211). Συνεπώς, η καταστολή της λειτουργίας της p16 σε συνδυασμό με την υπερέκφραση της κυκλίνης D1, αυξάνει τη δράση των CDK4/6 και επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (216). Έχει παρατηρηθεί ότι το 63% των ΑΚ της στοματικής κοιλότητας και το 59% των προκακαρκινικών βλαβών εμφανίζουν απώλεια της έκφρασης της p16, υποδηλώνοντας ότι πρόκειται για ένα γεγονός που λαμβάνει χώρα στα αρχικά στάδια της καρκινογένεσης (204). Επιπρόσθετα, έχει αναφερθεί ότι η απώλεια της έκφρασης της p16 σχετίζεται με πτωχότερη πρόγνωση (211). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι σε καρκίνους του στοματοφάρυγγος που σχετίζονται με HPV λοίμωξη, η απενεργοποίηση της οδού του *rb* από την ογκοπρωτεΐνη E7, οδηγεί σε υπερέκφραση της p16. Ως εκ τούτου, η p16 μπορεί να θεωρηθεί ως διαγνωστικός μοριακός δείκτης στον καρκίνο του στοματοφάρυγγος (127).

Κυτταρική αθανασία

Τα φυσιολογικά κύτταρα διαθέτουν περιορισμένη ικανότητα διπλασιασμού και έπειτα από συγκεκριμένο αριθμό μιτώσεων, παύουν να πολλαπλασιάζονται και τελικά οδηγούνται στη γήρανση (217). Αντίθετα, τα καρκινικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από απεριόριστο δυναμικό πολλαπλασιασμού χωρίς να

αποπίπτουν, καθώς διατηρούν το μήκος των τελομερών στα άκρα των χρωμοσωμάτων, μέσω της έκφρασης της τελομεράσης (218).

Σε αρκετές μελέτες έχει παρατηρηθεί αυξημένη έκφραση της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης (hTERT) σε καρκίνους της στοματικής κοιλότητας, η οποία είναι πιθανό να αποτελεί πρώιμο γεγονός στην ογκογένεση του στοματικού επιθηλίου και σχετίζεται με πτωχή πρόγνωση (219).

Διήθηση και μετάσταση

Η ικανότητα των καρκινικών κυττάρων να διηθούν παρακείμενους ιστούς και να μεθίστανται σε άλλα σημεία, αποτελεί ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά που τα διακρίνει από τα φυσιολογικά κύτταρα. Η διήθηση και η μετάσταση αντιπροσωπεύουν μία πολύπλοκη και πολυσταδιακή διαδικασία, όπου το πρώτο βήμα χαρακτηρίζεται από αυξημένη κινητικότητα και διηθητικότητα των κυττάρων και έχει συσχετισθεί με μεταβολή σε μεσεγχυματική φαινοτυπική μορφή (220). Το φαινόμενο της επιθηλιακής προς μεσεγχυματική μεταβολή αποτελεί μία διεργασία κατά την οποία παρατηρείται μετατροπή των επιθηλιακών μορφολογικών και ανοσοφαινοτυπικών κυτταρικών χαρακτηριστικών σε μεσεγχυματικά. Το γεγονός αυτό οδηγεί σε αποδόμηση του εξωκυττάρου στρώματος, αυξημένη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων, τοπική διήθηση και τελικά σε μετάσταση. Η απώλεια της πολικότητας και η διέγερση της κινητικότητας των κυττάρων απαιτούν απώλεια διακυτταρικών συνδέσεων, αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού και αλλαγές στο προφίλ της γονιδιακής έκφρασης των καρκινικών κυττάρων (220,221). Αρκετές ομάδες πρωτεϊνών εμπλέκονται στο διηθητικό και μεταστατικό φαινότυπο του κυττάρου, όπως μόρια προσκόλλησης (ιντεγκρίνες, καντχερίνες, λαμινίνη), στρωματικές μεταλλοπρωτεΐνες και διάφοροι αυξητικοί παράγοντες.

Οι καντχερίνες είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες οι οποίες αποτελούν τους κύριους μεσολαβητές της διακυτταρικής προσκόλλησης και διαδραματίζουν πρωτεύοντα ρόλο στη διατήρηση της αρχιτεκτονικής και της φυσιολογικής

ανάπτυξης των ιστών. ΗΕ- καντχερίνη έχει αποδειχθεί ότι λειτουργεί ως κατασταλτικός παράγοντας της κινητικότητας των καρκινικών κυττάρων, της διήθησης και της μετάστασης (222). Έχει βρεθεί ότι η μείωση ή η απώλεια της έκφρασης της Ε- καντχερίνης σχετίζεται με μεταστάσεις στους επιχώριους λεμφαδένες και πτωχή πρόγνωση στους καρκίνους της στοματικής κοιλότητας (210,211,218)

Οι στρωματικές μεταλλοπρωτεΐνάσες είναι πρωτεολυτικά ένζυμα που αποδομούν το εξωκυττάριο στρώμα, συμβάλλοντας στη δημιουργία μικροπεριβάλλοντος ευνοϊκού για τη διήθηση και τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων (183). Η έκφραση των μεταλλοπρωτεϊνών είναι αυξημένη σε πολλές κακοήθεις νεοπλασίες και έχει συσχετιστεί με επιθετικούς καρκίνους και πτωχή πρόγνωση (223). Σε αρκετές μελέτες έχει προταθεί η αυξημένη έκφραση της μεταλλοπρωτεΐνάσης- 2 ως προγνωστικός δείκτης μετάστασης, ενώ οι μεταλλοπρωτεΐνάσες -3, -10 και -11 φαίνεται επίσης ότι εμπλέκονται στην εξέλιξη του καρκίνου της στοματικής κοιλότητας (224,225). Ωστόσο, παρ' όλο που η υπερέκφραση των μεταλλοπρωτεϊνών -10 και -11 έχει βρεθεί ότι συνδέεται με την τοπική διήθηση, η συσχέτισή τους με την λεμφαδενική μετάσταση δεν είναι ξεκάθαρη (225).

3. HPV και ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα κεφαλής και τραχήλου (ΑΚΚΤ)

3.1 Ο ρόλος του HPV στην παθογένεση του ΑΚΚΤ

Ο ιός HPV αναγνωρίζεται σήμερα ως αιτιολογικός παράγοντας ορισμένων τύπων ΑΚΚΤ, ενώ το ενδιαφέρον για την εμπλοκή των ογκογόνων στελεχών του στην ανάπτυξη των ΑΚΚΤ είχε ήδη αρχίσει από την δεκαετία του '80 (124). Συγκεκριμένα, για πρώτη φορά το 1983 παρατηρήθηκε ότι οι κυτταροπαθολογικές αλλοιώσεις στον στοματικό βλεννογόνο ήταν παρόμοιες με εκείνες της γεννητικής χώρας (226). Αργότερα, έγινε δυνατή η μοριακή ανίχνευση του DNA του ιού σε ιστοτεμάχια βιοψιών ή σε επιχρίσματα προερχόμενα από στοματικές καλοήθειες και προκαρκινικές βλάβες, αλλά και

στον καρκίνο του στοματικής κοιλότητας (227). Επιπλέον, πειράματα *in vitro* κατέδειξαν την ογκογόνο δράση των HPV 16 και HPV 18 σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα, καθώς και την δυνατότητα των ογκοπρωτεϊνών E6 και E7 να προκαλούν αθανασία σε κερατινοκύτταρα της στοματικής κοιλότητας (228,229).

Διάφορα στελέχη του HPV έχουν ανιχνευθεί σε φαινομενικά φυσιολογικό επιθήλιο, καθώς και σε αρκετές καλοήθειες, δυνητικά κακοήθειες και καρκινικές βλάβες των διαφόρων ανατομικών περιοχών της κεφαλής και του τραχήλου. Έχει παρατηρηθεί ότι η πιθανότητα εμπλοκής του ιού HPV είναι 2 έως 3 φορές μεγαλύτερη σε προκαρκινικές βλάβες της στοματικής κοιλότητας και 4 έως 5 φορές μεγαλύτερη σε διηθητικό στοματικό καρκίνο, απ' ό,τι στο φυσιολογικό βλεννογόνο (204). Στο κλινικά και ιστολογικά φυσιολογικό επιθήλιο του στόματος, ο HPV βρίσκεται σε λανθάνουσα κατάσταση με τη μορφή μικρού αριθμού επισωμάτων στα κύτταρα της βασικής στοιβάδος. Αντίθετα, στις αλλοιώσεις που σχετίζονται με τον HPV παρατηρείται αύξηση του αριθμού των αντιγράφων του ιικού DNA (230).

Η αναπνευστική θηλωμάτωση η οποία συνδέεται με HPV λοίμωξη αποτελεί την πιο συχνή καλοήγη νεοπλασία του λάρυγγα και προκαλείται από τα στελέχη χαμηλού κινδύνου HPV 6 και HPV 11 (231). Χαρακτηρίζεται από εξωφυτικές και υψηλά υποτροπιάζουσες αλλοιώσεις του συνδετικού ιστού που καλύπτονται από επιθήλιο και προσβάλλει το αναπνευστικό επιθήλιο, κυρίως τον λάρυγγα (232). Επιπλέον, αρκετά HPV στελέχη χαμηλού κινδύνου, και σπανίως υψηλού κινδύνου, έχουν βρεθεί σε καλοήθειες βλάβες της στοματικής κοιλότητας, όπως το θήλωμα, οι κοινές μυρμηκίες, τα οξυτενή κονδυλώματα και η εστιακή επιθηλιακή υπερπλασία (230,233). Συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί η παρουσία των HPV 6 και HPV 11 στο φυσιολογικό επιθήλιο του στοματικού βλεννογόνου, στο θήλωμα και στα οξυτενή κονδυλώματα, ενώ οι HPV 2 και HPV 57 ήταν περισσότερο συχνοί στις κοινές μυρμηκίες (234).

Τα αναφερόμενα ποσοστά ανίχνευσης του ιού HPV σε δυνητικά κακοήθειες αλλοιώσεις (λευκοπλακία, ερυθροπλακία) και στον καρκίνο της στοματικής κοιλότητας, κυμαίνονται από 0- 100% και εξαρτώνται από τον πληθυσμό της μελέτης, τον αριθμό και το είδος του δείγματος, καθώς και από τη μέθοδο

ανίχνευσης (235). Οι HPV 16 και HPV 18 αποτελούν τα πιο συχνά στελέχη υψηλού κινδύνου στο ΑΚ της στοματικής κοιλότητας, ενώ ο HPV 16 είναι το κυρίαρχο στέλεχος στην λευκοπλακία του στόματος (236,237). Παρ' όλα αυτά, έχει αναφερθεί ότι τα HPV στελέχη χαμηλού κινδύνου είναι περισσότερο συχνά στην λευκοπλακία σε σχέση με τα στελέχη υψηλού κινδύνου, ενώ δεν είναι σπάνια και η ταυτόχρονη λοίμωξη με πολλαπλά στελέχη (133,237,238).

Σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα, η πιθανότητα ανίχνευσης του ιού HPV στο φυσιολογικό επιθήλιο του στοματικού βλεννογόνου, στη μη δυσπλαστική λευκοπλακία, στη δυσπλαστική λευκοπλακία και σε άλλες προκαρκινικές αλλοιώσεις καθώς και στο ΑΚ της στοματικής κοιλότητας, βρέθηκε περίπου στο 10%, 20%, 26% και 47%, αντίστοιχα. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι ο ιός HPV μπορεί να αποτελεί καρκινογόνο ή συν-καρκινογόνο παράγοντα σε ορισμένα δυνητικά καλοήθη και κακοήθη νεοπλάσματα του στόματος που φέρουν κυτταροπαθολογικές αλλοιώσεις χαρακτηριστικές της HPV λοίμωξης (133).

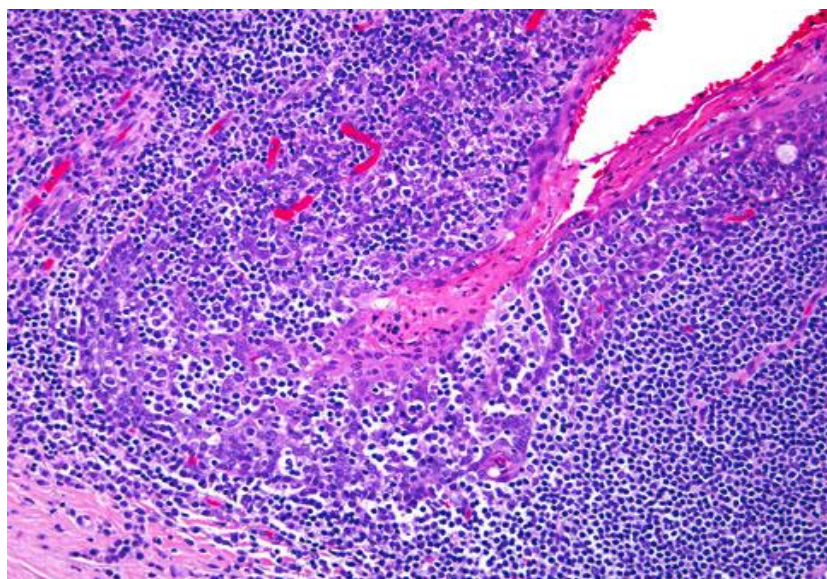
3.2 Κλινικό προφίλ των HPV (+) ΑΚΚΤ

Εντόπιση

Η πλειονότητα των ΑΚΚΤ που οφείλονται σε HPV λοίμωξη εξορμούνται από τον βλεννογόνο του στοματοφάρυγγος και κυρίως από τις παρίσθμιες αμυγδαλές και τη βάση της γλώσσας (κυρίως από τη γλωσσική αμυγδαλή) (239,240). Συγκεκριμένα, τα περισσότερα HPV (+) νεοπλάσματα των αμυγδαλών εντοπίζονται στις αμυγδαλικές κρύπτες, οι οποίες φαίνεται πως είναι ευάλωτες στην HPV λοίμωξη (124, 239, 241). Αντίθετα, τα HPV (-) νεοπλάσματα ή τα νεοπλάσματα τα οποία οφείλονται στο κάπνισμα δημιουργούνται στο επιφανειακό επιθήλιο (239).

Οι κρύπτες αποτελούν καταδύσεις του πλακώδους επιθηλίου στο λεμφικό ιστό της αμυγδαλής και μπορούν να φιλοξενούν μη παθογόνους αλλά και παθογόνους μικροοργανισμούς (**Εικόνα 7**). Το δικτυωτό πλακώδες επιθήλιο που καλύπτει τις αμυγδαλικές κρύπτες είναι δομημένο με τέτοιο τρόπο ώστε

επιτρέπει την άμεση επαφή με τον λεμφικό ιστό και τη μεταφορά εξωγενών αντιγόνων από το εξωτερικό περιβάλλον του στοματοφάρυγγος στο λεμφικό ιστό των αμυγδαλών (242). Επιπλέον, η βασική μεμβράνη είναι εν μέρει διαπερατή επιτρέποντας την διόδο των λεμφοκυττάρων και των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων στη βασική στοιβάδα του επιθηλίου (122).



Εικόνα 7. Δικτυωτό πλακώδες επιθήλιο των αμυγδαλικών κρυπτών (255)

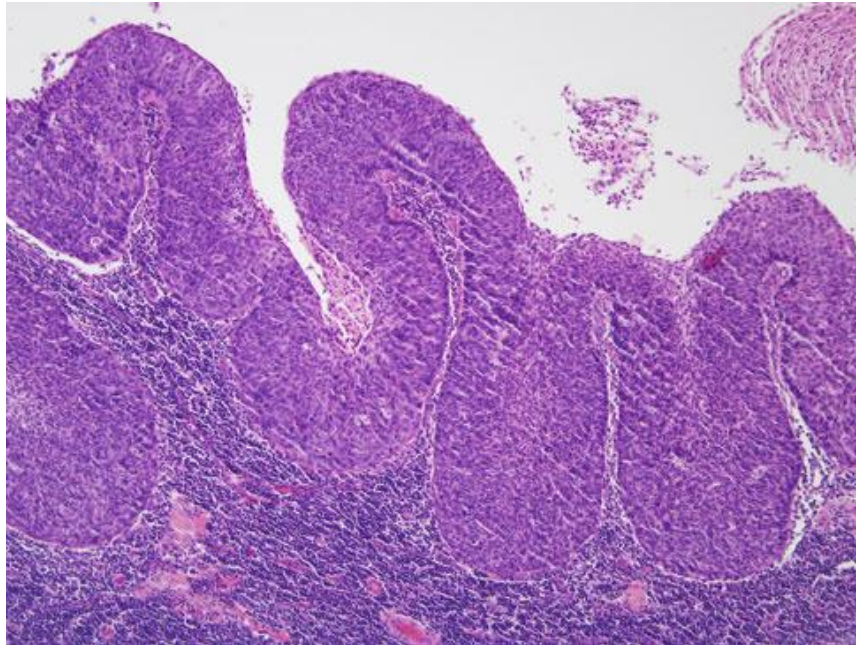
Στη ζώνη μετάπτωσης του τραχήλου της μήτρας, η μόλυνση από τον ιό HPV απαιτεί λύση της συνέχειας του πλακώδους επιθηλίου, για την είσοδο των ιϊκών σωματιδίων στην εκτεθειμένη βασική μεμβράνη (243). Αντίθετα, η δικτυωτή διαμόρφωση του επιθηλίου των αμυγδαλικών κρυπτών συμβάλλει στην έκθεση της βασικής μεμβράνης σε ιογενείς παθογόνους παράγοντες, χωρίς να είναι απαραίτητος ο μικροτραυματισμός του βλεννογόνου (122). Τα επακόλουθα στάδια που οδηγούν στον κακοήγη μετασχηματισμό των προσβεβλημένων βασικών κυττάρων δεν είναι πλήρως κατανοητά. Ωστόσο, η μικροανατομία του επιθηλίου των αμυγδαλικών κρυπτών είναι πιθανό να συμβάλλει σε ορισμένα κλινικά χαρακτηριστικά των HPV (+) αμυγδαλικών καρκίνων, όπως η τάση ακόμα και των μικρών καρκινωμάτων να εμφανίζονται ως τοπικά προχωρημένες μεταστάσεις (244). Οι προκαρκινικές και καρκινικές

αλλοιώσεις προερχόμενες από τις αμυγδαλικές κρύπτες, είναι δυνατό να μην εντοπίζονται κατά την ιστοπαθολογική εκτίμηση, ενώ η ασυνέχεια της βασικής μεμβράνης μπορεί να διευκολύνει την πρώιμη διήθηση και μετάσταση των καρκινωμάτων αγνώστου πρωτοπαθούς εστίας (245, 246). Επίσης, έχει αναφερθεί αξιοσημείωτη μείωση της έκφρασης της E- καντχερίνης στους πρωτοπαθείς όγκους των ΑΚΚΤ που σχετίζονται με τον HPV, ενώ απώλειά της έχει παρατηρηθεί μόνο σε λεμφαδενικές μεταστάσεις στα ΑΚΚΤτα οποία δεν συνδέονται με τον ιό HPV, χωρίς να αφορά τους αντίστοιχους πρωτοπαθείς όγκους (247).

Σύμφωνα με πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα, παρ' όλο που ο επιπολασμός του ιού HPV στα ΑΚ του στοματοφάρυγγος υπολογίζεται τουλάχιστον στο 60- 70% και βαίνει συνεχώς αυξανόμενος, στις υπόλοιπες ανατομικές περιοχές κεφαλής και του τραχήλου φαίνεται πως είναι αρκετά χαμηλότερος (248). Ο εκτιμώμενος επιπολασμός του HPV στα ΑΚ της στοματικής κοιλότητας είναι 6- 20%, του λάρυγγα 24% και του ρινοφάρυγγα 31% (249). Επιπλέον, παρ' όλο που η HPV λοίμωξη στα ΑΚ του στοματοφάρυγγος αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό δείκτη, δεν είναι γνωστή η επίδρασή της στους καρκίνους μη- στοματοφάρυγγικών περιοχών (249).

Σταδιοποίηση και ιστολογία

Τα HPV (+) ΑΚΚΤ φαίνεται ότι αποτελούν πρωτοπαθείς όγκους πρώιμου σταδίου αλλά με προχωρημένο λεμφαδενικό στάδιο (250, 251). Οι κυστικές λεμφαδενικές μεταστάσεις στον τράχηλο, χωρίς ανίχνευση πρωτοπαθούς εστίας, έχουν συσχετιστεί με το ΑΚ της αμυγδαλής που οφείλεται σε HPV λοίμωξη (**Εικόνα 8**) και αποτελούν συνήθη απεικονιστικά ευρήματα, τα οποία μπορούν να οδηγήσουν σε εσφαλμένη διάγνωση εξαλλαχθείσης βραγχιογενούς κύστης (252, 253). Επιπλέον, όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα HPV (+) ΑΚΚΤ είναι περισσότερο πιθανό να εμφανίζονται ως λεμφαδενική μεταστατική νόσος αγνώστου πρωτοπαθούς εστίας εν συγκρίσει με τα HPV- αρνητικά ΑΚΚΤ (254).



Εικόνα 8. Οι κυστικές λεμφαδενικές μεταστάσεις στον τράχηλο και η μη-κερατινοποιημένη μορφολογία υποδεικνύει HPV(+) ΑΚΚΤ εξορμώμενο από τη βάση της γλώσσας ή τις παρίσθμιες αμυγδαλές

Η ιστολογική εικόνα των HPV (+)ΑΚΚΤ αφορά σε μη κερατινοποιημένους όγκους με βασικοκυτταροειδή χαρακτηριστικά οι οποίοι δεν συνδέονται με επιφανειακή δυσπλασία, ενώ παρουσιάζουν λοβιώδη αύξηση και διαπερατότητα από διηθητικά λεμφοκύτταρα (124, 251). Επιπλέον, τα HPV (+) ΑΚ του στοματοφάρυγγος θεωρούνται ευρέως ως πτωχής διαφοροποίησης ή αδιαφοροποίητα καρκινώματα, άποψη η οποία βασίζεται στη σημαντική φαινοτυπική απόκλιση των ανώριμων καρκινικών κυττάρων από το πλακώδες επιθήλιο που καλύπτει την επιφάνεια των αμυγδαλών. Ωστόσο, περαιτέρω ανάλυση έδειξε ότι τα καρκινώματα του στοματοφάρυγγος έχουν παρόμοια μορφολογία με το δικτυωτό επιθήλιο των αμυγδαλικών κρυπτών από το οποίο εξορμούνται και επομένως μπορούν να περιγράφονται καταλληλότερα ως καλώς διαφοροποιημένοι όγκοι (255). Η αναγνώριση μάλιστα των HPV (+) ΑΚΚΤ ως καλώς διαφοροποιημένοι όγκοι, είναι σκόπιμη καθώς αντικατοπτρίζει με μεγαλύτερη ακρίβεια την ιστολογική τους προέλευση και συσχετίζει τον βαθμό κακοήθειας με την αναμενόμενη

κλινική συμπεριφορά (255).

Πρόγνωση

Η περιοχή εντοπισμού των ΑΚΚΤ και η σταδιοποίηση που βασίζεται στον όγκο, την λεμφαδενική κατάσταση της νόσου και τις απομεμακρυσμένες μεταστάσεις, αποτελούν τους καθιερωμένους προγνωστικούς παράγοντες της πορείας της νόσου και καθορίζουν την επιλογή της θεραπείας. Άλλοι σημαντικοί παράγοντες που επηρεάζουν την πρόγνωση των ΑΚΚΤ είναι η συννοσηρότητα, η χρήση καπνού και η κατανάλωση οινοπνεύματος (256).

Παρ' όλο που οι ασθενείς με HPV (+) ΑΚΚΤ διαγιγνώσκονται με προχωρημένη νόσο(257), εμφανίζουν υψηλότερα ποσοστά ανταπόκρισης στη θεραπεία, συνολικής επιβίωσης και επιβίωσης ελεύθερης προόδου νόσου σε σχέση με τους HPV- αρνητικούς ασθενείς (124, 250, 251). Αυτή η βελτιωμένη πρόγνωση έχει παρατηρηθεί σε πολλαπλές αναδρομικές μελέτες σε ασθενείς οι οποίοι αντιμετωπίστηκαν με ακτινοθεραπεία, χειρουργική, χημειο-ακτινοθεραπεία και σε διαδοχικά θεραπευτικά σχήματα. Στις μεγαλύτερες κλινικές μελέτες στις οποίες εφαρμόζονται συνδυαστικές θεραπευτικές μέθοδοι, έχειδειχθεί ότι η βελτίωση της πρόγνωσης οφείλεται σε ποικίλους πρόσθετους παράγοντες. Σε αυτούς συμπεριλαμβάνονται η ανάπτυξη λιγότερων δεύτερων πρωτοπαθών όγκων στους ασθενείς με HPV (+) νεοπλάσματα, ο καλύτερος τοπικοπεριοχικός έλεγχος και η μη κατάληξη των ασθενών από άλλα παθολογικά αίτια συγκριτικά με τους ασθενείς με HPV (-) νεοπλάσματα του στοματοφάρυγγος. Σε διάφορες κλινικές δοκιμές με προχωρημένου σταδίου νεοπλάσματα του στοματοφάρυγγος, η βελτίωση της επιβίωσης είναι δύο με τρεις φορές μεγαλύτερη στα HPV (+) σε σχέση με τα HPV (-) νεοπλάσματα, με το 75% περίπου αυτής της βελτίωσης να αποδίδεται στη βιολογική συμπεριφορά των HPV (+) καρκίνων και το 25% στη καλή φυσική κατάσταση των ασθενών (258).

Σε μια προοπτική μελέτη η οποία περιελάμβανε ασθενείς με τοπικά προχωρημένο ΑΚ του στοματοφάρυγγος ή του λάρυγγα, χορηγήθηκε εισαγωγική χημειοθεραπεία(inductionchemotherapy) με δύο κύκλους πακλιταξέλης/καρβοπλατίνης, ακολουθούμενη από χημειο- ακτινοθεραπεία με το ίδιο θεραπευτικό σχήμα. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι οι

ασθενείς με HPV + όγκους εμφάνιζαν υψηλότερα ποσοστά ανταπόκρισης στην εισαγωγική χημειοθεραπεία και τη χημειο- ακτινοθεραπεία. Έπειτα από παρακολούθηση, οι ασθενείς με ΑΚΚΤ θετικά στον HPV είχαν κατά 72% και 79% χαμηλότερο κίνδυνο προόδου νόσου και θανάτου αντίστοιχα σε σχέση με τους HPV- αρνητικούς ασθενείς (126). Μια πρόσφατη μετα- ανάλυση έδειξε βελτιωμένη συνολική επιβίωση για τα HPV (+) ΑΚ του στοματοφάρυγγος εν συγκρίσει με τους αρνητικούς για τον ιό καρκίνους (259). Συνεπώς, η HPV θετικότητα έχει αναγνωρισθεί ως ο ισχυρότερος ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για τα ΑΚ του στοματοφάρυγγος (260).

Παρ' όλο που τα HPV (+) νεοπλάσματα χαρακτηρίζονται από υψηλή συχνότητα εμφάνισης τραχηλικής λεμφαδενικής νόσου προχωρημένου σταδίου, παρουσιάζουν βελτιωμένη επιβίωση. Έχει παρατηρηθεί τραχηλική λεμφαδενική νόσος στο 35% των ασθενών που υποβλήθηκαν σε χειρουργική εκτομή των HPV (+) νεοπλασμάτων του στοματοφάρυγγος, έναντι ποσοστού 11% των ασθενών με HPV (-) νεοπλάσματα (261). Ωστόσο, παρά την πιο επιθετική τραχηλική λεμφαδενική νόσο, υπάρχουν πρώιμες ενδείξεις ότι η HPV κατάσταση μειώνει τη συνολική προγνωστική σημασία της νόσου. Ειδικότερα, στους HPV (+) ασθενείς, η τραχηλική λεμφαδενική νόσος δεν αποτελεί ισχυρό προγνωστικό παράγοντα για υποτροπή και επιβίωση, όπως ισχύει στους HPV (-) ασθενείς. Επιπρόσθετα, φαίνεται ότι μειώνεται και η προγνωστική αξία της εξωκαψικής επέκτασης στους ασθενείς με p16 (+) καρκίνους του στοματοφάρυγγος οι οποίοι αντιμετωπίζονται χειρουργικά. Έπειτα από την ταξινόμηση ασθενών με ή χωρίς εξωκαψική επέκταση της νόσου, το στάδιο T, τα χειρουργικά όρια εκτομής και τη χορήγηση συμπληρωματικής ακτινοθεραπείας, δε βρέθηκε σημαντική μείωση του χρόνου επιβίωσης ελεύθερου νόσου μεταξύ των ασθενών με ή χωρίς παρουσία εξωκαψικής επέκτασης. Το ίδιο παρατηρήθηκε και μεταξύ των ασθενών με εξωκαψική επέκταση οι οποίοι αντιμετωπίστηκαν μόνο με ενισχυτική ακτινοθεραπεία και εκείνων με εξωκαψική επέκταση στους οποίους χορηγήθηκε χημειο-ακτινοθεραπεία (262).

Οι διαπιστώσεις αυτές οδηγούν στο συμπέρασμα πως θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η αποκλιμάκωση της ενισχυτικής θεραπείας στους

ασθενείς με p16 (+) νεοπλάσματα του στοματοφάρυγγος, οι οποίοι αντιμετωπίζονται χειρουργικά. Επιπλέον, η παρουσία εξωκαπικής επέκτασης δεν δικαιολογεί τη συνδυαστική χορήγηση χημειοθεραπείας και μετεγχειρητικής ακτινοθεραπείας (262).

3.3 Μηχανισμοί βελτιωμένης ανταπόκρισης των HPV (+) ΑΚΚΤ στη θεραπεία

Η καλή πρόγνωση των HPV(+) καρκίνων του στοματοφάρυγγος μπορεί εν μέρει να αποδοθεί στα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του πληθυσμού των ασθενών που προσβάλλει συνηθέστερα, οι οποίοι σχετίζονται με λιγότερες συννοσηρότητες, μικρότερη ηλικία και μειωμένη έκθεση στον καπνό. Ωστόσο, πολυπαραγοντικές αναλύσεις έχουν δείξει ότι οι παραπάνω παράγοντες συμβάλλουν μόλις στο 9% στις διαφορές που παρατηρούνται στην συνολική επιβίωση και την επιβίωση ελεύθερη προόδου νόσου, μεταξύ των HPV(+) και HPV(-) όγκων. Συνεπώς, η διαφορά στην επιβίωση φαίνεται ότι οφείλεται κατά κύριο λόγο στην HPVκατάσταση των καρκίνων του στοματοφάρυγγα (259). Είναι εμφανές ότι η βελτιωμένη ανταπόκριση των HPV(+) ΑΚΚΤ σε οποιαδήποτε αντινεοπλασματική θεραπεία, καταδεικνύει μια θεμελιώδη διαφορά στη βιολογική συμπεριφορά των όγκων που σχετίζονται με τον HPVέναντι εκείνων που δεν οφείλονται σε αυτόν. Ωστόσο, ο ακριβής μηχανισμός βάσει του οποίου οι HPV(+) καρκίνοι παρουσιάζουν ευνοϊκό κλινικό αποτέλεσμα, μένει να διευκρινιστεί.

HPV-επαγόμενη ογκογένεση (HPV- induced oncogenesis)

Επιδημιολογικά και μοριακά δεδομένα έχουν επιβεβαιώσει τον αιτιολογικό ρόλο του HPVστην κακοήγη εξαλλαγή του στοματοφαρυγγικού επιθηλίου, καθώς και την εμπλοκή του HPV 16 στο 90% τουλάχιστον των HPV(+) ΑΚΚΤ (263). Ωστόσο, η φυσική ιστορία, η εκκρίζωση και η επιμονή της HPVλοίμωξης με την επακόλουθη καρκινογένεση, βρίσκονται ακόμα υπό διερεύνηση. Είναι προφανές ότι η HPVλοίμωξη της στοματικής κοιλότητας εκκαθαρίζεται συχνά και δεν οδηγεί αναπόφευκτα σε ογκογένεση, ενώ

παράλληλα η ανίχνευση του DNA του ιού στον καρκινικό ιστό δεν συνηγορεί απαραίτητα υπέρ της εμπλοκής της ιϊκής λοίμωξης στην ανάπτυξη του όγκου (263). Όμως, τα μονοπάτια μετασχηματισμού στην HPV-επαγόμενη ογκογένεση που οδηγούν από τη λοίμωξη στον καρκίνο, έχουν μελετηθεί λεπτομερώς και περιλαμβάνουν την έκφραση των ιϊκών ογκοπρωτεϊνών E6 και E7 οι οποίες προκαλούν την αποδόμηση της p53 και της pRb, αντίστοιχα (264). Έχει βρεθεί ότι η HPVεπαγόμενη ογκογένεση στη περιοχή της κεφαλής και του τραχήλου, περιλαμβάνει σημαντικά μικρότερο αριθμό γενετικών μεταβολών σε σχέση με εκείνη που δεν συνδέεται με τον ιό HPV. Συγκεκριμένα, τα HPV(+) ΑΚΚΤ είναι λιγότερο πιθανό να έχουν τον μεταλλαγμένο τύπο της p53, υψηλή έκφραση του EGFR και χρωμοσωμικές μεταβολές των περιοχών 3p, 9p και 17p (124, 265).

Πρόσφατες μοριακές μελέτες επιβεβαίωσαν το διαφορετικό γενετικό προφίλ των HPV (+) ΑΚΚΤ και διαπίστωναν περισσότερες μεταλλάξεις στα HPV αρνητικά ΑΚΚΤ σε σχέση με τα θετικά για HPV νεοπλασμάτα, ανεξάρτητα από το ιστορικό καπνίσματος (266). Επιπλέον, δεν παρατηρήθηκαν μεταλλάξεις στο γονίδιο TP53 στα HPV (+) ΑΚΚΤ, σε αντίθεση με τα HPV αρνητικά ΑΚΚΤ στα οποία το TP53 βρέθηκε μεταλλαγμένο σε ποσοστό 78% (266). Τα ευρήματα αυτά δείχνουν ότι η HPVεπαγόμενη ογκογένεση σχετίζεται με μικρότερου βαθμού απορρύθμιση των κυττάρων, γεγονός που συνεπικουρεί στην καλύτερη ανταπόκριση στη θεραπεία δεδομένης της ευκολότερης οδού αποκατάστασης των μηχανισμών φυσιολογικής ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου (267).

Ανταπόκριση στις θεραπευτικές επιλογές

Έχει αποδειχθεί ότι η θετικότητα των ΑΚ του στοματοφάρυγγος στον HPV παρέχει σημαντικό προγνωστικό πλεονέκτημα ανεξάρτητα από την θεραπευτική προσέγγιση της νόσου (268). Παρ' όλο που τα δεδομένα για τους ασθενείς που αντιμετωπίζονται μόνο χειρουργικά είναι περιορισμένα, έχει παρατηρηθεί ότι ακόμα και χωρίς την χορήγηση χημειοθεραπείας ή ακτινοθεραπείας, η θετικότητα στην HPV λοίμωξη σχετίζεται σημαντικά με

ευνοϊκή πρόγνωση (269).

Οι HPV(+) όγκοι του στοματοφάρυγγος ανταποκρίνονται καλύτερα στην εισαγωγική χημειοθεραπεία βασισμένη στη πλατίνη σε σχέση με τους HPVαρνητικούς όγκους (258). Επίσης, έχει παρατηρηθεί ότι οι HPV (+) καρκίνοι του στοματοφάρυγγος εμφανίζουν βελτιωμένη ανταπόκριση στην ακτινοθεραπεία ανεξαρτήτως ακτινοθεραπευτικού σχήματος, ακτινοευαισθητοποιού ουσίας (270) ή προσθήκης χημειοθεραπείας (271). Τα στοιχεία από τη βάση δεδομένων SEER (Surveillance, Epidemiology and End Results) έδειξαν ότι η διαφορά στην επιβίωση μεταξύ HPV(+) και HPV(-) ΑΚ του στοματοφάρυγγος ήταν υψηλότερη για τους ασθενείς που αντιμετωπίστηκαν με ακτινοθεραπεία (145).

In vitro πειράματα σε κυτταρικές σειρές παρέχουν αντικρουόμενα αποτελέσματα σχετικά με την εγγενώς αυξημένη ακτινοευαισθησία των HPV (+) ΑΚΚΤ. Έχει αποδειχθεί ότι καρκινικές κυτταρικές σειρές που είναι θετικές στον HPV εμφανίζουν αυξημένη απόπτωση και μειωμένη επιβίωση μετά από ακτινοβολήση (270). Μια πρόσφατη μελέτη ανέδειξε αυξημένη ακτινοευαισθησία των HPV (+) σε σχέση με τις HPV (-) κυτταρικές σειρές, γεγονός που δεν αποδόθηκε στην αυξημένη απόπτωση αλλά στη μειωμένη ικανότητα επιδιόρθωσης του DNA (272). Όμως, άλλες μελέτες αναφέρουν αυξημένη επιβίωση των HPV(+) έναντι των HPV(-) κυτταρικών σειρών ΑΚΚΤ έπειτα από ακτινοβολήση (273). Όσον αφορά την in vitro χημειοευαισθησία των HPV(+) έναντι των HPV(-) κυτταρικών σειρών, τα δεδομένα είναι ανεπαρκή και οι μέχρι σήμερα μελέτες απέτυχαν να αποδείξουν βελτίωση της ανταπόκρισης στην χημειοθεραπεία βασισμένη στην πλατίνη ή σε άλλους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες (273, 274).

Ανοσολογική επιτήρηση

Είναι γνωστό ότι το ανοσοποιητικό σύστημα διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ιϊκή καρκινογένεση, ενώ παρατηρείται αυξημένο ποσοστό κακοηθειών σχετιζόμενων με ιούς σε ανοκατεσταλμένους ασθενείς (275). Συνεπώς, είναι αναμενόμενη η εμπλοκή της ανοσοεπιτήρησης στην εκκαθάριση της

προκαλούμενης από τον ιόHPVνόσου.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι σε μία μελέτη οι HPV θετικές κυτταρικές σειρές ΑΚ της αμυγδαλής έδειξαν ανθεκτικότητα τόσο στην ακτινοβολήση όσο και στην εφαρμογή σισπλατίνης. Ωστόσο, έπειτα από τη μεταφορά των καρκινικών κυττάρων σε ινίνομοντέλα ποντικών, οι HPV (+) όγκοι ανέδειξαν σημαντικά βελτιωμένη ανταπόκριση τόσο στην ακτινοβολήση όσο και στη σισπλατίνη σε σχέση με τους HPVαρνητικούς όγκους. Η ευνοϊκή ανταπόκριση αναιρείτο στα ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια, αλλά ενισχύετο έπειτα από την ενεργό ανοσοποίηση των ποντικών με εμβόλιο με φορέα αδενοϊό στοχεύοντας τις ογκοπρωτεΐνες E6 και E7 (276). Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν σε μία ακόμα μελέτη στην οποία βρέθηκε ότι τα πειραματικά φυσιολογικά ποντίκια με HPV(+)**ΑΚ** αμυγδαλής, έδειξαν αυξημένη επιβίωση και αυξημένη πιθανότητα υποστροφής του όγκου εν συγκρίσει με τα αντίστοιχα HPVαρνητικάνεοπλάσματα. Αντίθετα, η επιβίωση ήταν η ίδια μεταξύ των ανοσοκατεσταλμένων ποντικών με HPVθετικούς και HPVαρνητικούς όγκους αμυγδαλής,οι οποίοι απέτυχαν να εκκαθαρίσουν τις καρκινικές βλάβες. Επομένως, τα βελτιωμένα κλινικά αποτελέσματα που σχετίστηκαν με τηνHPVθετική νόσο, παρατηρήθηκαν μόνο στα ποντίκια με CD4 και CD8 θετικά T λεμφοκύτταρα (276). Αυτές οι μελέτες σε μοντέλα ποντικών αναδεικνύουν τον ρόλο της ανοσολογικής επιτήρησης στην εκκαθάριση των HPV(+) καρκινικών κυττάρων, η οποία ενισχύεται έπειτα από προσθήκη χημειο- ακτινοβολίας και επιδεινούται με την ανοσοκαταστολή.

Άλλες μελέτες επιβεβαιώνουν τον ρόλο της ανοσοεπιτήρησης σε ασθενείς με HPV(+) ΑΚΚΤ στους οποίους παρατηρείται HPV 16- ειδική T κυτταρική ανοσία (277), καθώς και υψηλότερη συχνότητα ανεύρεσης E7- ειδικών κυκλοφορούντων T λεμφοκυττάρων σε σχέση με εκείνους που έχουν HPVαρνητικά ΑΚΚΤ (278). Επιπλέον, θεωρείται ότι είναι πιθανό το ιϊκό φορτίο να σχετίζεται με την πρόγνωση, γεγονός που υποδηλώνει ότι η αποτυχημένη ανοσολογική ρύθμιση της ιϊκής αντιγραφής αποτελεί παράγοντα κινδύνου για πτωχό κλινικό αποτέλεσμα (279).

Τα μέχρι σήμερα δεδομένα δείχνουν ότι η βελτιωμένη πρόγνωση των HPV(+) ΑΚ του στοματοφάρυγγος, αποδίδεται στην ανάκτηση της φυσιολογικής

λειτουργίας του απορυθμισθέντος κυτταρικού κύκλου από τις E6 και E7 ογκοπρωτεΐνες, έπειτα από έκθεση σε χημειο- ακτινοθεραπεία. Ωστόσο, απαιτούνται περαιτέρω επιδημιολογικές και μοριακές μελέτες για την αποσαφήνιση των μηχανισμών μέσω των οποίων τα HPV(+) ΑΚ του στοματοφάρυγγος εμφανίζουν καλύτερη πρόγνωση έναντι των αντίστοιχων HPVαρνητικών καρκίνων. Ο καθορισμός αυτών των μηχανισμών θα συμβάλει στη στοχευμένη, αποτελεσματική και εξατομικευμένη θεραπεία των ασθενών με HPV (+) ΑΚΚΤ η οποία θα συνοδεύεται από μειωμένη τοξικότητα.

3.4 Θεραπευτικές προσεγγίσεις των HPV(+) ΑΚΚΤ

Η διαπιστούμενη βελτιωμένη επιβίωση στους ασθενείς με HPV (+) ΑΚΚΤ φαίνεται πως αφορά τόσο τη χειρουργική όσο και τις μη χειρουργικές θεραπευτικές μεθόδους (269, 280). Η μεγαλύτερη πιθανότητα επιβίωσης των HPV (+) ασθενών κατέστησε επιτακτική την επιλογή της καταλληλότερης θεραπευτικής μεθόδου, με στόχο την αποφυγή εμφάνισης των μακρόχρονων θεραπευτικών επιπλοκών οι οποίες έχουν αντίκτυπο στην ποιότητα ζωής. Παρά τα ικανοποιητικά ποσοστά θεραπευτικής και ογκολογικής ανταπόκρισης της ακτινοθεραπείας και της συνοδού χημειοθεραπείας, η μέθοδος αυτή συνοδεύεται από υψηλή νοσηρότητα η οποία περιλαμβάνει δυσφαγία, βλεννογονίτιδα, ουδετεροπενία, νευροτοξικότητα, νεφροτοξικότητα, ωτοτοξικότητα, ξηροστομία, ίωση, τρισμό και ακτινονέκρωση (281). Με δεδομένα τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των HPV (+) ΑΚ του στοματοφάρυγγος, όπως η καλύτερη ανταπόκριση στη θεραπεία, η μακρότερη επιβίωση και ο νεότερος σε ηλικία πληθυσμός των ασθενών, βρίσκονται σήμερα υπό μελέτη εναλλακτικές θεραπευτικές μέθοδοι οι οποίες θα παρουσιάζουν λιγότερες νοσηρές καταστάσεις, προσφέροντας παράλληλα συγκρίσιμα κλινικά αποτελέσματα.

Αποκλιμάκωσηθεραπείας

Με βάση τη μέχρι σήμερα συσσωρευθείσα γνώση, οι στρατηγικές αποκλιμάκωσης της θεραπείας θα πρέπει να περιορίζονται αποκλειστικά σε ασθενείς μη καπνιστές με HPV (+) νεοπλάσματα του στοματοφάρυγγος και μόνο κατά τη διεξαγωγή κλινικών δοκιμών.

Η αποκλιμάκωση της θεραπείας αξιολογείται σε αρκετές μονοκεντρικές και πολυκεντρικές μελέτες φάσης II και III στο προχωρημένου σταδίου ΑΚ του στοματοφάρυγγος. Η μελέτη φάσης II ECOG 1308 (EuropeanCooperationOncologyGroup) διερευνά την αποκλιμάκωση της ακτινοθεραπείας για χειρουργικά εξαιρέσιμα HPV (+) ΑΚ του στοματοφάρυγγος σταδίου III/IV. Οι ασθενείς έλαβαν 3 κύκλους χημειοθεραπείας εφόδου ακολουθούμενη από μια μειωμένη δοσολογία χημειο- ακτινοθεραπείας. Το σκέλος της χημειοθεραπείας περιελάμβανε εβδομαδιαία χορήγηση πακλιταξέλης (paclitaxel- 90 mg/m²) και κετουξιμάμπης (cetuximab- 250mg/m²) και σισπλατίνης (cisplatin- 75mg/m²) κάθε 3^η εβδομάδα. Οι ασθενείς που παρουσίασαν πλήρη απάντηση στη χημειοθεραπεία, έλαβαν μειωμένης δόσης ακτινοβολία (IMRT- 54 Gy σε 27 κλάσματα) με εβδομαδιαία συγχορήγηση κετουξιμάμπης. Αντίθετα, στους ασθενείς με μη πλήρη απάντηση στη χημειοθεραπεία χορηγήθηκε δοσολογία ακτινοθεραπείας 69.3 Gy σε 33 κλάσματα με εβδομαδιαία συγχορήγηση κετουξιμάμπης (250mg/m²) (258). Τα πρώιμα αποτελέσματα αυτής της μελέτης έδειξαν εξαιρετικά υψηλά ποσοστά επιβίωσης ελεύθερης προόδου νόσου για το πρώτο έτος σε ασθενείς στους οποίους η μειωμένη δόση ακτινοβολίας βασίστηκε στην πλήρη ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία.

Η μελέτη φάσης III RTOG 1016 (RadiotherapeuticOncologicalGroup), περιλαμβάνει την χορήγηση είτε σισπλατίνης είτε κετουξιμάμπης με ταυτόχρονη χορήγηση IMRT, με σκοπό να αναδείξει τη «μη- κατωτερότητα» (non- inferiority) της λιγότερο τοξικής κετουξιμάμπης σε σύγκριση με την σισπλατίνη. Ειδικότερα, η μελέτη διακρίνεται σε δύο σκέλη όπου το πρώτο περιλαμβάνει τη χορήγηση επιταχυνόμενης IMRT (70 Gy σε 6 εβδομάδες) και τη συνοδό χορήγηση σισπλατίνης (100mg/m² την 1^η και την 22^η ημέρα) σε ασθενείς με p16 (+) ΑΚ του στοματοφάρυγγος προχωρημένου σταδίου. Το δεύτερο σκέλος περιλαμβάνει την δοσολογία ακτινοθεραπείας ακολουθούμενη

από εβδομαδιαία χορήγηση κετουξιμάμπης (με έναρξη 1 εβδομάδα πριν τη χορήγηση ακτινοθεραπείας) (258).

Η IMRT τεχνική με την οποία επιτυγχάνεται η μείωση του ακτινοβολούμενου πεδίου, είναι δυνατό να οδηγήσει σε συνολική βελτίωση της ποιότητας ζωής των ασθενών, μειώνοντας την προκαλούμενη από τη συμβατική ενισχυτική ακτινοθεραπεία ιστική βλάβη. Τα αναφερόμενα ποσοστά επιβίωσης για τα πρώιμου Τσταδίου νεοπλάσματα του στοματοφάρυγγος που αντιμετωπίστηκαν με την IMRT είναι πολύ υψηλά. Συγκεκριμένα, το ποσοστό διετούς επιβίωσης ελεύθερης νόσου κυμαίνεται μεταξύ 82% - 90%, ενώ σε πρόσφατη συστηματική ανασκόπηση η διετής συνολική επιβίωση κυμαίνεται μεταξύ 84%- 95,5% (282). Όσον αφορά τις ανεπιθύμητες ενέργειες της IMRT τεχνικής, έχει αναφερθεί οστική ακτινονέκρωση της κάτω γνάθου σε ποσοστό 2,6%, στένωση του οισοφάγου σε ποσοστό 5%, ενώ γαστροστομία απαιτείται περίπου στο 40% των ασθενών κάποια χρονική στιγμή κατά τη διάρκεια της ακτινοθεραπείας (283, 284).

Διαστοματική ενδοσκοπική χειρουργική (TES)

Παρ' όλο που οι μη χειρουργικές δοκιμές αποκλιμάκωσης της θεραπείας δείχνουν ενθαρρυντικά αποτελέσματα, η πρόσφατη ανάπτυξη της διαστοματικής ενδοσκοπικής χειρουργικής (TES- Transoral Endoscopic Surgery) εμφανίζεται ως μια βιώσιμη θεραπευτική επιλογή για τα πρώιμου σταδίου ΑΚ του στοματοφάρυγγος.

Ιστορικά, η ανοικτή χειρουργική των νεοπλασμάτων του στοματοφάρυγγα παρουσίαζε σε ένα σημαντικό ποσοστό ασθενών διεγχειρητική νοσηρότητα, η οποία συνίστατο στη τραχειοστομία και τη σίτιση μέσω ρινογαστρικού καθετήρα ή μέσω γαστροστομίας. Αντίθετα, η εφαρμογή της διαστοματικής χειρουργικής συνοδεύεται από λιγότερες νοσηρές καταστάσεις σε σύγκριση με τις ανοικτές χειρουργικές επεμβάσεις. Η ελάχιστη επεμβατική προσπέλαση του στοματοφάρυγγα μέσω της στοματικής κοιλότητας, επιτρέπει τον περιορισμό του μεγέθους της ιστικής εκτομής, αποφεύγοντας τη διάσπαση του μυϊκού υποστρώματος, ελαχιστοποιώντας την απώλεια αίματος και

περιορίζοντας τον τραυματισμό των φυσιολογικών ιστικών δομών. Οι διαστοματικές ενδοσκοπικές προσπελάσεις περιλαμβάνουν τη διαστοματική ρομποτική χειρουργική (TORS- Transoral Robotic Surgery) και τη διαστοματική laser μικροχειρουργική (TLM- Transoral Laser Microsurgery), οι οποίες αποτελούν εναλλακτικές των κλασσικών επεμβατικών χειρουργικών προσεγγίσεων των όγκων της αμυγδαλής και της βάσης της γλώσσας.

Η αρχική εφαρμογή της διαστοματικής laser μικροχειρουργικής ανέδειξε εξαιρετικά λειτουργικά και ογκολογικά αποτελέσματα όσον αφορά τα νεοπλάσματα του λάρυγγος πρώιμου σταδίου. Αυτή η χειρουργική τεχνική επεκτάθηκε στο φάρυγγα και τη στοματική κοιλότητα και κατέστη μία καταξιωμένη τεχνική για την αντιμετώπιση των όγκων του στοματοφάρυγγος (285). Αντίθετα, η ασφάλεια και η εφαρμοσιμότητα της διαστοματικής ρομποτικής χειρουργικής στην κλινική πράξη απεδείχθη σχετικά πρόσφατα και σήμερα είναι εγκεκριμένη η χρήση της τόσο για καλοήθεις όσο και για κακοήθεις βλάβες του στοματοφάρυγγος σταδίου T1 και T2.

Θεωρείται ότι διαστοματική ρομποτική χειρουργική έχει αρκετά πλεονεκτήματα σε σχέση με την χορήγηση μόνο χημειοθεραπείας ή ακτινοθεραπείας, ωστόσο τα μακροπρόθεσμα αποτελέσματα πολυκεντρικών μελετών δεν είναι ακόμα διαθέσιμα. Η χειρουργική διερεύνηση του πρωτοπαθούς όγκου και των λεμφαδενικών αλύσων μπορεί να παρέχει αντικειμενικά κριτήρια μέσω των οποίων είναι δυνατό να καθοριστεί η ένδειξη ενισχυτικής θεραπείας ή και η ένταση αυτής. Στην διαστοματική αφαίρεση της πρωτοπαθούς βλάβης για τη θεραπεία του ΑΚ του στοματοφάρυγγος, η χορήγηση ενισχυτικής χημειοθεραπείας και ακτινοθεραπείας καθορίζεται από το στάδιο του όγκου, τα χειρουργικά όρια εκτομής και την εξωκαψική επέκταση στους λεμφαδένες (286). Σε μία μελέτη η οποία περιελάμβανε ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο του στοματοφάρυγγος οι οποίοι αντιμετωπίστηκαν με διαστοματική ρομποτική χειρουργική, παρατηρήθηκε ότι το 38% αυτών των ασθενών απέφυγε τη χημειοθεραπεία, ενώ το 11% αυτών την ενισχυτική ακτινοθεραπεία με ταυτόχρονη χημειοθεραπεία (287). Επιπλέον, σε πρόσφατες σειρές ασθενών με επιλεγμένα περιστατικά καρκίνου του στοματοφάρυγγος, το 50% των ασθενών που υποβλήθηκε σε διαστοματική ρομποτική χειρουργική δεν χρειάστηκε μετεγχειρητική ενισχυτική θεραπεία (288). Είναι δυνατό σε

περιπτώσεις στις οποίες εφαρμόζεται η χειρουργική ως μονοθεραπεία πρώτης γραμμής, η ακτινοθεραπεία και η χημειο- ακτινοθεραπεία να αποτελούν θεραπευτική επιλογή δεύτερης γραμμής.

Έως σήμερα, λίγες κλινικές μελέτες έχουν διερευνήσει το ρόλο του ιού HPV στα νεοπλάσματα του στοματοφάρυγγος που αντιμετωπίστηκαν με διαστοματική χειρουργική. Ο Cohen και συν. μελέτησαν αναδρομικά τις διαφορές των ογκολογικών αποτελεσμάτων σε ασθενείς HPV (+) και HPV (-), οι οποίοι αντιμετωπίστηκαν με τη διαστοματική ρομποτική χειρουργική ακολουθούμενη από ενισχυτική ακτινοθεραπεία (280). Οι ερευνητές δεν παρατήρησαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην συνολική επιβίωση και τον τοπικοπεριοχικό έλεγχο της νόσου, καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι η διαστοματική ρομποτική χειρουργική είναι κατάλληλη τόσο για τα HPV (+) όσο και για τα HPV (-) νεοπλάσματα του στοματοφάρυγγος.

Παρόμοια αποτελέσματα κατεγράφησαν και στη μελέτη του Moore και συν. με HPV (+) και HPV (-) νεοπλάσματα του στοματοφάρυγγος, τα οποία αντιμετωπίστηκαν με διαστοματική ρομποτική χειρουργική με ενισχυτική ακτινοθεραπεία (289). Για τους HPV (+) όγκους η τριετής επιβίωση και η ελεύθερη υποτροπής νόσου επιβίωση υπολογίστηκαν στο 97,8% και 96,0% αντίστοιχα, ενώ για τους HPV (-) όγκους στο 88,9% και 83,3% αντίστοιχα.

Σε μια άλλη μελέτη των Haughey και Sinha με p16 (+) νεοπλάσματα του στοματοφάρυγγος τα οποία αντιμετωπίστηκαν με διαστοματική laser μικροχειρουργική, η τριετής και η πενταετής επιβίωση ελεύθερη νόσου βρέθηκε στο 91% και 88% αντίστοιχα (290). Επιπλέον, σημαντικό εύρημα της μελέτης αυτής αποτελεί το γεγονός ότι η εξωκαψική επέκταση και τα θετικά χειρουργικά όρια εκτομής των όγκων, δεν εσχετίζοντο με χειρότερα ογκολογικά αποτελέσματα όσον αφορά την ελεύθερη νόσου επιβίωση και τη συνολική επιβίωση.

Έλεγχος απομεμακρυσμένης μεταστατικής νόσου

Παρ' όλο που τα HPV(+) ΑΚΚΤ χαρακτηρίζονται από καλύτερο τοπικό-περιοχικό έλεγχο, η συχνότητα των απομεμακρυσμένων μεταστάσεων δεν εμφανίζεται σημαντικά μειωμένη(251, 291).Ο μακροχρόνιος έλεγχος της μεταστατικής νόσου δεν φαίνεται να διαφέρει μεταξύ των HPV(+) και HPV (-) όγκων. Ωστόσο, στα HPV (-)ΑΚ του στοματοφάρυγγος το ποσοστό ελέγχου των απομεμακρυσμένων μεταστάσεων μειώνεται απότομα και σταθεροποιείται στα 2 χρόνια, ενώ στα αντίστοιχα HPV (+)νεοπλάσματα συνεχίζει να μειώνεται έως και 5 χρόνια μετά τη θεραπεία προτού να σταθεροποιηθεί (292). Σε μια μελέτη με 318 ΑΚ του στοματοφάρυγγος στα οποία αντιμετωπίστηκαν με ριζική ακτινοθεραπεία, δεν παρατηρήθηκε διαφορά στα ποσοστά των απομεμακρυσμένων μεταστάσεων μεταξύ των HPV(+) και HPV (-) όγκων. Όμως, οι μεταστατικές βλάβες των HPV (+) ΑΚ του στοματοφάρυγγος ήταν περισσότερο πιθανό να περιλαμβάνουν πολλαπλά όργανα, όπως το δέρμα, οι ενδοκοιλιακοί λεμφαδένες και ο εγκέφαλος, καθώς και να εμφανίζονται αργότερα σε σχέση με εκείνες των HPV(-) ΑΚ του στοματοφάρυγγος (293).

3.5 Επιδημιολογικό προφίλ των HPV(+) ΑΚΚΤ

Η σημαντική αύξηση των HPV(+) ΑΚ του στοματοφάρυγγος την τελευταία δεκαετία σε μη καπνίζοντες και νέους σε ηλικία ασθενείς (145), αντανάκλα τον αυξανόμενο επιπολασμό της HPV λοίμωξης στη στοματική κοιλότητα ως αιτιολογικό παράγοντα, πιθανόν λόγω των αλλαγών στην σεξουαλική συμπεριφορά (254).Μελέτες αναφέρουν διαφορές στον επιπολασμό της HPV λοίμωξης στους πληθυσμούς διαφορετικών γεωγραφικών περιοχών, όπως στην Ιαπωνία όπου ο HPV καταγράφεται σε ποσοστό 0,6% (294), στις ΗΠΑ σε 6,9% (295), στην Σουηδία σε 9,3% (296) και στην Αυστραλία σε ποσοστό 2,3% (297).

Η παρατηρηθείσα μείωση της χρήσης καπνού στις ΗΠΑ, ο οποίος αποτελεί καθιερωμένο παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη ΑΚΚΤ, οδήγησε σε παράλληλη μείωση της επίπτωσης των HPV (-)καρκίνων κατά 50% (268).Αντίθετα, η επίπτωση των HPV(+) ΑΚ του στοματοφάρυγγος αυξήθηκε

κατά 225% τη χρονική περίοδο 1988 έως 2004 (268) με παρόμοια τάση να καταγράφεται τόσο στην Ευρώπη όσο και την Αυστραλία (142, 144). Σε μια μελέτη από τη Σουηδία βρέθηκε ότι το ποσοστό των HPV(+) καρκίνων της αμυγδαλής αυξήθηκε δραματικά από το 23% τη δεκαετία του '70, στο 57% όλων των νεοπλασμάτων του στοματοφάρυγγος τη δεκαετία του '90 (298). Την προηγούμενη δεκαετία παρατηρήθηκε συνέχιση της αυξανόμενης τάσης των HPV(+) καρκίνων της αμυγδαλής στη Σουηδία με ποσοστά 68%, 77% και 93% κατά τις χρονικές περιόδους 2000- 2002, 2003- 2005, 2006- 2007 αντίστοιχα, ενώ παρόμοια αύξηση καταγράφηκε και στους καρκίνους της βάσης της γλώσσας (298, 299).

Υπολογίζεται ότι 25,6% των ΑΚ του στοματοφάρυγγος παγκοσμίως σχετίζονται με την HPV λοίμωξη, ωστόσο παρατηρείται διακύμανση στα ποσοστά θετικότητας στον ιό ανάλογα με την γεωγραφική περιοχή (300). Συγκεκριμένα, στη Βόρεια Αμερική τα HPV(+) ΑΚ του στοματοφάρυγγος κυμαίνονται σε ποσοστό 56%, στην Ιαπωνία σε 52%, στην Αυστραλία σε 45%, στην Νότια και Δυτική Ευρώπη σε 39%, στην Ανατολική Ευρώπη σε 38%, στην Βόρεια Ευρώπη σε 17% και στον υπόλοιπο κόσμο σε ποσοστό 13% (300).

Η επίπτωση των HPV(+) ΑΚ του στοματοφάρυγγος είναι υψηλότερη μεταξύ μεσηλικών ανδρών (40- 59 ετών), μη καπνιστών με υψηλότερη κοινωνικό-οικονομική κατάσταση και πολλαπλούς συντρόφους. Ειδικότερα, οι ασθενείς με HPV(+) ΑΚ του στοματοφάρυγγος είναι λιγότερο πιθανό να είναι καπνιστές (301, 302), ενώ παράλληλα έχουν κατά μέσο όρο περισσότερους από 8 έως 10 σεξουαλικούς συντρόφους σε σχέση με εκείνους που διαγιγνώσκονται με HPV αρνητικά νεοπλασμάτα (240).

3.6 Μέθοδοι ανίχνευσης HPV λοίμωξης στα ΑΚΚΤ

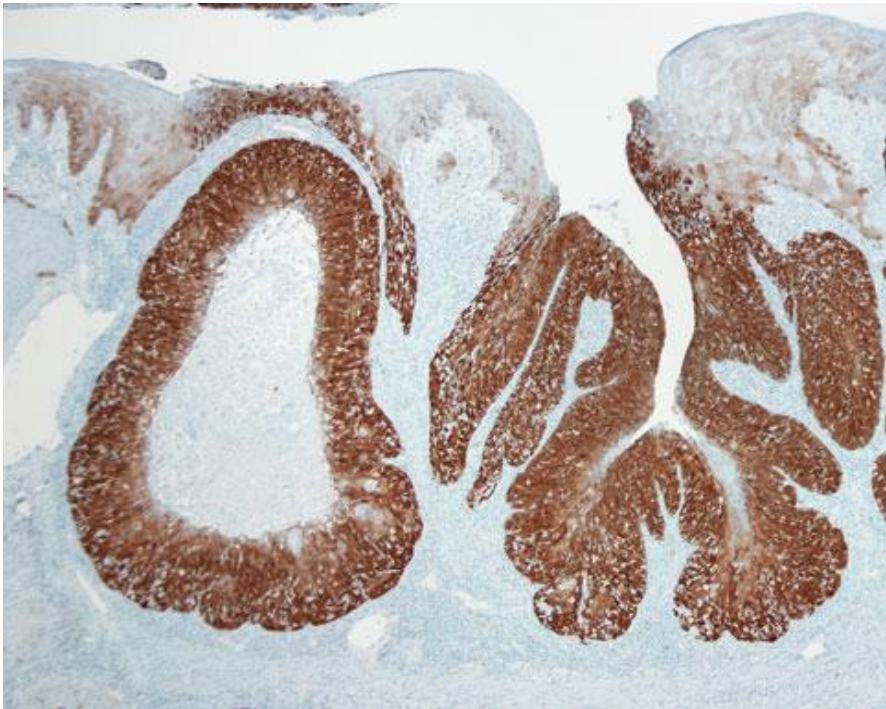
Μέχρι σήμερα δεν έχει καθιερωθεί συγκεκριμένη διαγνωστική προσέγγιση των HPV(+) ΑΚΚΤ και η διάκρισή τους από τα HPV (-) νεοπλασμάτα στηρίζεται στη χρήση πολλών διαφορετικών μεθόδων. Αυτές οι μεθοδολογίες περιλαμβάνουν την ανοσοϊστοχημική ανίχνευση της πρωτεΐνης p16, την

ανίχνευση του γονιδιώματος του HPV με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) ή in-situ υβριδισμό σε βιοψίες όγκων, καθώς και νεότερες τεχνικές η διαγνωστική αξία των οποίων είναι υπό διερεύνηση. Επιπλέον, η παρουσία HPV- ειδικών αντισωμάτων στον ορό έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο για την ανάπτυξη ΑΚ του στοματοφάρυγγος (240).

Ανοσοϊστοχημική χρώση της p16

Κατά την διαδικασία αθανασίας των μολυσμένων επιθηλιακών κυττάρων, η ογκοπρωτεΐνη E7 προσδένεται στην pRb πρωτεΐνη οδηγώντας στην αντισταθμιστική υπερέκφραση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p16 (303). Επομένως, η ευαισθησία της θετικής ανοσοϊστοχημικής χρώσης της p16 αγγίζει το 100% για τον προσδιορισμό των HPV(+) ΑΚΚΤ και η ανίχνευση της p16 αποτελεί συχνά δείκτη της HPV λοίμωξης (**Εικόνα 9**) (304). Ωστόσο, η p16 είναι δυνατό να υπερεκφράζεται σε ορισμένους όγκους οι οποίοι είναι προφανές ότι στερούνται ενδείξεων για την παρουσία του DNA του ιού. Σε μια μελέτη με 239 περιστατικά ΑΚ του στοματοφάρυγγος, παρατηρήθηκε ότι το 78% αυτών ήταν θετικά στην ανοσοϊστοχημική χρώση της p16, εκ των οποίων το 13,9% ήταν αρνητικά στον HPV έπειτα από PCR ή in-situ υβριδισμό (305). Αντίθετα, σε πιο πρόσφατη μελέτη βρέθηκε ότι μόλις το 1,4% των p16 (+) ΑΚ της αμυγδαλής ήταν αρνητικό στην HPV λοίμωξη με τη χρήση PCR και in-situ υβριδισμού (306). Οι διαφορές στα ποσοστά των p16 (+) / HPV (-) ΑΚΚΤ μεταξύ των μελετών είτε αντιπροσωπεύουν διαφορές στην ευαισθησία μεταξύ των χρησιμοποιούμενων HPV δοκιμασιών είτε αντικατοπτρίζουν τις διαπιστωθείσες διαφορές στον επιπολασμό του ιού στους διαφορετικούς πληθυσμούς. Θεωρείται ότι είναι πιθανό ορισμένα HPV (-) ΑΚΚΤ να φέρουν παρόμοια ιστολογικά, μοριακά και προγνωστικά χαρακτηριστικά με τους αντίστοιχους HPV θετικούς καρκίνους. Συγκεκριμένα, μια μελέτη ανέδειξε συσχέτιση της υπερέκφρασης της p16, χωρίς την παρουσία του ιού HPV, με τη βελτίωση του κλινικού αποτελέσματος σε νέους ασθενείς με ΑΚ της γλώσσας, διαπιστώνοντας ότι η p16 αποτελεί έναν ευαίσθητο δείκτη για τα μη-κερατινοποιημένα, πτωχώς διαφοροποιημένα και με ευνοϊκή πρόγνωση ΑΚ (307). Συνεπώς, παρ' όλο που η p16 δεν αποτελεί ειδικό δείκτη για την

HPV λοίμωξη, είναι δυνατό να παρέχει σημαντικές προγνωστικές πληροφορίες, ενώ μελλοντικές στοχευμένες θεραπείες έναντι των οδών στις οποίες εμπλέκεται η HPV λοίμωξη μπορεί να είναι αποτελεσματικές στην αντιμετώπιση των p16 (+)/ HPV (-) ΑΚ.



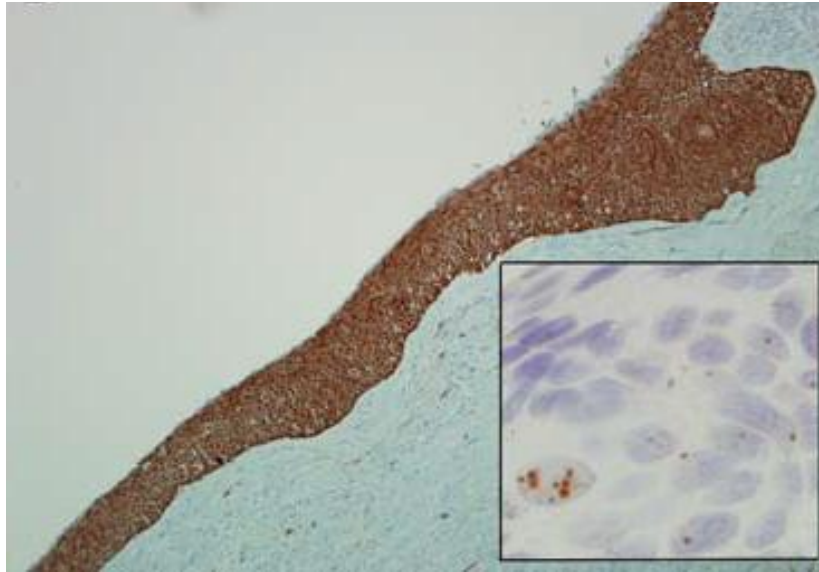
Εικόνα 9. Θετική ανοσοϊστοχημική χρώση της p16 η οποία δείχνει την κατανομή του όγκου στις αμυγδαλές (255)

Ανίχνευση HPV DNA

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) αποτελεί μέθοδο με υψηλή ευαισθησία για την ανίχνευση του HPV, η οποία εφαρμόζεται με τη χρήση εκκινητών (primers) του συντηρημένου L1 ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης, όπως οι MY09/MY11 και οι GP5/GP6 (308). Ωστόσο, με τους εκκινητές της L1 περιοχής δεν καθίσταται δυνατή η τυποποίηση του ιού, ενώ παράλληλα η ευαισθησία της ανίχνευσής του μπορεί να μειωθεί λόγω απώλειας της L1 περιοχής κατά την ενσωμάτωση του ιϊκού DNA στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή.

Η εφαρμογή της PCR με την χρήση εκκινητών που στοχεύουν στην αλληλουχία του E6 ή και του E7 ογκογονιδίου οποία διατηρείται κατά την ενσωμάτωση του ιϊκού γονιδιώματος, φαίνεται περισσότερο ευαίσθητη για την ανίχνευση του ιού HPV. Με τον κατάλληλο σχεδιασμό εκκινητών για τις περιοχές E6 και E7 είναι δυνατή τόσο η ανίχνευση του ιού όσο και η διάκριση μεταξύ των στελεχών υψηλού και χαμηλού κινδύνου (16). Ωστόσο, οι τεχνικές της PCR δεν μπορούν να διακρίνουν το επισωματικό από το ενσωματωμένο HPV DNA, με αποτέλεσμα να μειώνεται η ικανότητα τους στην ανίχνευση κλινικά σημαντικών λοιμώξεων. Μέχρι σήμερα δεν είναι δυνατή η εφαρμογή στην κλινική πράξη συγκεκριμένων τεχνικών βασιζόμενων στη PCR, γεγονός που οδηγεί σε διαφορετική αναλυτική ευαισθησία και ειδικότητα της μεθόδου μεταξύ των μελετών. Παρ' όλα ταύτα, έχουν παρατηρηθεί υψηλά ποσοστά συμφωνίας μεταξύ των τεχνικών που βασίζονται στη PCR όταν αυτές συνδυάζονται με ένα συγκεκριμένο πρωτόκολλο και με ποιοτικώς ελεγμένα αντιδραστήρια (309).

Μια ακόμη μέθοδος ανίχνευσης του DNA του ιού HPV σε βιοψίες όγκων είναι ο in-situ υβριδισμός, ο οποίος χαρακτηρίζεται από υψηλή ειδικότητα λόγω της αξιόπιστης ανίχνευσης και ταυτοποίησης του ιού σε συνάρτηση με την τοπογραφία των καρκινικών βλαβών. Το αποτέλεσμα του in-situ υβριδισμού μπορεί να αξιολογηθεί μικροσκοπικά και η παρουσία σήματος εντός του πυρήνα των επιθηλιακών κυττάρων είναι ενδεικτική της παρουσίας του ιού HPV (**Εικόνα 10**). Παράλληλα είναι δυνατή η διάκριση του ενσωματωμένου από το επισωματικό ιϊκό DNA όπου το σήμα του υβριδισμού έχει την εικόνα μικρών ενδοπυρηνικών κηλίδων ή καταλαμβάνει όλο τον πυρήνα, αντίστοιχα (304). Ωστόσο, παρ' όλη την υψηλή ειδικότητα της μεθόδου η οποία εγγίζει σε ποσοστό το 100%, η ευαισθησία της είναι χαμηλή με ένα εκτιμώμενο ποσοστό 13- 41% ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων στα AKKT (306).



Εικόνα 10. HPV 16 in-situ υβριδισμός (κηλίδες εντός των πυρήνων των καρκινικών κυττάρων) στον καρκίνο του στοματοφάρυγγος (127)

Ανίχνευση HPV RNA

Η έκφραση του mRNA από το επισωματικό και ενσωματωμένο HPV DNA δείχνει ότι ιϊκά ογκογόνα μεταγράφα (transcripts) παίζουν σημαντικό ρόλο στην έναρξη και εξέλιξη των καρκινικών αλλοιώσεων (310). Επομένως, οι τεχνικές της PCR οι οποίες στοχεύουν το mRNA του ιού παρέχουν καλύτερη προσέγγιση των κλινικά σημαντικών HPV λοιμώξεων σε σχέση με εκείνες που ανιχνεύουν το ιϊκό DNA. Διάφορες μελέτες αναφέρουν την ανίχνευση των E6/E7 μεταγραφών μόνο στο 27,5% ή στο 50% των ΑΚ του στοματοφάρυγγος τα οποία είναι θετικά στο DNA του HPV, ενώ παράλληλα παρατηρείται σημαντική συσχέτιση μεταξύ του υψηλού ιϊκού φορτίου και της έκφρασης του mRNA (311). Επίσης, έχει βρεθεί ότι το E6/E7 mRNA εμφανίζει υψηλότερη έκφραση στα HPV(+) ΑΚ της αμυγδαλής σε σύγκριση με τις υπόλοιπες περιοχές του στοματοφάρυγγος (311). Ωστόσο, το ασταθές RNA και οι μονιμοποιημένες και εγκλεισμένες σε παραφίνη βιοψίες (formalin-fixed paraffin-embedded) επιτρέπουν την ανίχνευση των E6/E7 μεταγραφών μόνο σε φρέσκους-κατεψυγμένους ιστούς (fresh-frozen) σε

ερευνητικό επίπεδο και όχι στην καθ' ημέρα κλινική διαγνωστική.

Με την ανάπτυξη του RNAin- situυβριδισμού κατέστη δυνατή η ανίχνευση του E6/E7 mRNAτων HPVστελεχών υψηλού κινδύνου σε ιστούς εγκλεισμένους σε παραφίνη. Σε μια μελέτη με 196 ΑΚ του στοματοφάρυγγος, ο RNAin- situυβριδισμός έδειξε θετικό αποτέλεσμα στο 99,3% των p16 (+) όγκων καθώς και υψηλότερη ευαισθησία στην ανίχνευση του HPVσε σχέση με τον DNAin- situυβριδισμό (312). Αντίστοιχα, άλλα δεδομένα αναφέρουν ευαισθησία 97% και ειδικότητα 93% του RNAin- situυβριδισμού στην ανίχνευση HPVστελεχών υψηλού κινδύνου σε βιοψίες καρκινωμάτων του στοματοφάρυγγος εγκλεισμένες σε παραφίνη (313).

Σε μια συγκριτική μελέτη αξιολόγησης διαφόρων μεθόδων σε 108 περιστατικά καρκίνου του στοματοφάρυγγος, η PCR ανέδειξε την υψηλότερη ευαισθησία σε σύγκριση με την ανοσοϊστοχημική χρώση της p16 και τον in-situ υβριδισμό (97% έναντι 94% και 88% αντίστοιχα) (314). Ωστόσο, ο in- situ υβριδισμός παρουσίασε την υψηλότερη ειδικότητα συγκριτικά με την ανοσοϊστοχημική χρώση της p16 και την PCR (88% έναντι 82% και 87% αντίστοιχα). Συνεπώς, οι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα πως η ειδικότητα του DNAin- situ υβριδισμού για την ανίχνευση του HPV στον καρκινικό ιστό, σε συνδυασμό με την υψηλή ευαισθησία της ανοσοϊστοχημικής χρώσης της p16 ή της PCR, μπορεί να αποτελέσει αποτελεσματική διαγνωστική στρατηγική για τα HPV(+)
ΑΚΚΤ. Έχει προταθεί η αρχική εφαρμογή ανοσοϊστοχημικής χρώσης τηςp16 στους υπό εξέταση όγκους, ακολουθούμενη από ειδική δοκιμασία για τον ιό HPV, όπωςin- situυβριδισμός ή PCRεπί θετικού αποτελέσματος (314).Ένα τέτοιο πρωτόκολλο θα μπορούσε να αποδείξει την παρουσία του ιού HPVκαθώς και τη μεταγραφική του δραστηριότητα μέσω της υπερέκφρασης της πρωτεΐνηςp16 και των επιπέδων του E6/E7 mRNA (315).

Η ανάπτυξη μιας τυποποιημένης διαγνωστικής δοκιμής είναι απαραίτητη κυρίως για τη συμμετοχή ασθενών σε κλινικές μελέτες καθώς και για τον καθορισμό της πρόγνωσης των HPV (+) ασθενών. Παράλληλα, είναι σημαντική η εφαρμογή εργαστηριακών εξετάσεων για τον ιό HPV σε περιπτώσεις τραχηλικών λεμφαδενικών μεταστάσεων αγνώστου πρωτοπαθούς εστίας έπειτα από κλινικό και απεικονιστικό έλεγχο. Καθώς η

κύρια ανατομική εντόπιση ενός νεοπλασματος αγνώστου πρωτοπαθούς εστίας είναι ο στοματοφάρυγγας, υποστηρίζεται σθεναρά η διαγνωστική αξία της FNA (fineneedleaspiration) των τραχηλικών λεμφαδένων στους ασθενείς με αγνώστου πρωτοπαθούς εστίας νεοπλασματα για τη πιθανή παρουσία του HPV. Σε αυτούς τους ασθενείς, η HPV θετικότητα αποτελεί ισχυρό προγνωστικό δείκτη για την ύπαρξη νεοπλασματος στον αμυγδαλικό βόθρο και στη βάση της γλώσσας. Ο in-situ υβριδισμός για τον HPV 16 και ο καθορισμός της έκφρασης της p16 σε αναρροφήσεις FNA έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για το σκοπό αυτό (316).

Αντισώματα στον ορό

Η ανίχνευση HPV- ειδικών IgG αντισωμάτων στον ορό αποτελεί χρήσιμο δείκτη για τον καθορισμό παρελθούσης ή παρούσης HPV λοίμωξης. Ωστόσο, οι ορολογικοί βιοδείκτες (biomarkers) δεν είναι ειδικοί των διαφόρων ανατομικών περιοχών και επομένως θεωρείται ότι οι HPV λοιμώξεις εκτός των ανατομικών δομών της κεφαλής και του τραχήλου θα μπορούσαν να επηρεάσουν την ειδικότητα των ορολογικών δοκιμασιών. Όμως, σε μελέτες έχει παρατηρηθεί ισχυρή συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας αντισωμάτων για ογκογόνα στελέχη του HPV και αυξημένου κινδύνου για ΑΚΚΤ, καθώς και η παρουσία HPV- ειδικών IgG στον ορό και τη σίελο HIV (+) ατόμων με αυξημένο κίνδυνο HPV λοιμώξεων (317). Επίσης, ορολογικές δοκιμασίες έχουν διαπιστώσει απαντήσεις σε πρώιμα αντιγόνα του ιού σε ασθενείς με λοίμωξη της στοματικής κοιλότητας. Μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι ασθενείς με ΑΚ του στοματοφάρυγγος είχαν σημαντικά αυξημένο τίτλο αντισωμάτων για τις E1, E2 και E7 πρωτεΐνες του HPV 16 σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες (318).

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπό της παρούσας διδακτορικής διατριβής αποτελεί η ανίχνευση του ιού HPV σε ασθενείς με πρωτοπαθή νεοπλάσματα κεφαλής και τραχήλου (στοματική κοιλότητα, στοματοφάρυγγας, λάρυγγας, υποφάρυγγας, ρινοφάρυγγας, ρινική κοιλότητα) και ο προσδιορισμός των ιικών στελεχών χαμηλού και υψηλού κινδύνου. Επιπλέον, στόχο της μελέτης αυτής αποτελεί η συσχέτιση μεταξύ της HPV λοίμωξης και των δημογραφικών/ κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών των ασθενών με νεοπλάσματα κεφαλής και τραχήλου, καθώς και του κλινικού αποτελέσματος (έλεγχος τοπικής υποτροπής νόσου).

5. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

5.1 ΥΛΙΚΑ

Βιολογικό υλικό

- Ιστολογικά και κυτταρολογικά δείγματα από την περιοχή της κεφαλής και του τραχήλου συντηρημένα σε Thin- Prep

Χημικά αντιδραστήρια

- **Αντιδραστήρια για απομόνωση νουκλεϊκών οξέων από τα κυτταρολογικά δείγματα**

Αυτόματος αναλυτής *NucliSENSEasyMAG* (bioMérieux)

- NucliSENSLysisBuffer (Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης, περιέχει θειοκυανική γουανιδίνη)
- NucliSENSeasyMAGMagneticSilica (Μαγνητικά σωματίδια πυριτίου)
- NucliSENS Premix Diluent (Αραιωτικό προμίγματος)

- **Kit για απομόνωση νουκλεϊκών οξέων από ιστολογικά δείγματα**

QIAamp DNA mini kit (Qiagen, cat no. 51306)

- BufferATL (Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης ιστών)
- BufferAL (Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης)
- BufferAW1 (Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης)
- BufferAW2 (Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης)
- BufferAE (Ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης)
- Proteinase K (Πρωτεΐνάση K)

➤ **Kit για ανίχνευση και τυποποίηση του HPV με τη μέθοδο των μικροσυστοιχιών (Microarrays)**

PapilloCheck kit (Greiner Bio-One GmbH, cat. No 465 060)

- PapilloCheckchips (Πλακίδια μικροσυστοιχιών με 12 κελιά- A1έως A6, B1 έως B6)
- PapilloCheckMasterMix (Περιέχει τα συστατικά που είναι απαραίτητα για την PCR, όπως εκκινητές με φθορίζουσα χρωστική, νουκλεοτίδια, buffer, MgCl₂, PCRcontrolDNA, εκτός της DNA πολυμεράσης)
- PapilloCheck Hybridization buffer (Διάλυμα υβριδισμού)
- PapilloCheck Buffer A
- PapilloCheck Buffer B
- HotStarTaq DNA Polymerase 5u/μl (Qiagen, cat. no 203205) (Δεν παρέχεται στο PapilloCheck kit)

5.2. ΜΕΘΟΔΟΙ

5.2.1 Επιλογή ασθενών και λήψη βιολογικού υλικού

Το υλικό της παρούσας μελέτης προήλθε από την Ωτορινολαρυγγολογική Κλινική του Αντικαρκινικού Νοσοκομείου «Μεταξά» και το Ακτινοθεραπευτικό Τμήμα του Αντικαρκινικού Νοσοκομείου «Ο Άγιος Σάββας». Μελετήθηκαν συνολικά 137 ιστολογικά και κυτταρολογικά δείγματα από ασθενείς με καρκίνο κεφαλής και τραχήλου, τα οποία ελήφθησαν είτε κατά τη διενέργεια της πρώτης διαγνωστικής εξέτασης είτε κατά τη διάρκεια της χειρουργικής επέμβασης ή πριν την υποβολή των ασθενών σε ακτινοθεραπεία. Οι ασθενείς δεν είχαν υποβληθεί σε προηγούμενη ακτινοθεραπεία ή χημειοθεραπεία. Συγκεκριμένα, 58 περιστατικά αφορούσαν σε καρκίνο του στόματος, 54 του λάρυγγα, 12 του στοματοφάρυγγα, 5 του υποφάρυγγα, 5 του ρινοφάρυγγα και

μόλις 3 περιστατικά σε καρκίνο της ρινικής κοιλότητας. Τα δείγματα διατηρήθηκαν σε υγρό μέσο μονιμοποίησης (Thin-Prep) στους 4°C και εστάλησαν στο Εργαστήριο Ιολογίας του Αντικαρκινικού Νοσοκομείου «Ο Άγιος Σάββας» για ανίχνευση και τυποποίηση του ιού HPV. Η σταδιοποίηση των καρκίνων πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το σύστημα σταδιοποίησης της Αμερικάνικης Κοινής Επιτροπής Καρκίνου (AJCC), ενώ με βάση την ιστολογική τους διαβάθμιση χωρίστηκαν σε καλά, μέτρια και πτωχά διαφοροποιημένα καρκινώματα. Όλοι οι ασθενείς διεγνώσθησαν με μη μεταστατικά πλακώδη καρκινώματα κεφαλής και τραχήλου.

Ακολούθησε η θεραπευτική προσέγγιση και όλοι οι ασθενείς τέθηκαν σε παρακολούθηση (follow-up) διάρκειας 2 ετών για τον έλεγχο τοπικής υποτροπής της νόσου.

Για την ανίχνευση του DNA του HPV και την τυποποίηση των στελεχών του ακολουθήθηκαν τα στάδια που περιγράφονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 4)

Πίνακας 4. Στάδια για την ανίχνευση και τυποποίηση HPV στελεχών

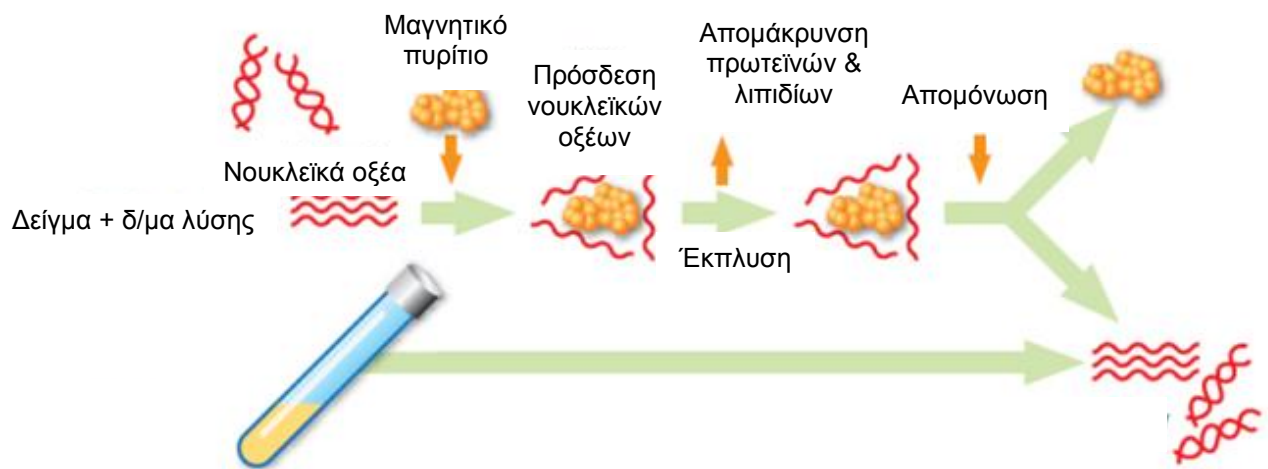
Στάδιο 1:	Απομόνωση νουκλεϊκών οξέων από κυτταρολογικά και ιστολογικά δείγματα
Στάδιο 2:	Διενέργεια PCR με τη χρήση εκκινητών της περιοχής του E1 γονιδίου
Στάδιο 3:	Υβριδοποίηση του προϊόντος της PCR σε ακινητοποιημένες μικροσυστοιχίες DNA (Microarrays) χαρακτηριστικές για το κάθε HPV στέλεχος και χρήση ειδικού scanner για την ανίχνευση του υβριδισμού μέσω του εκπεμπόμενου φθορισμού
Στάδιο 4:	Ερμηνεία αποτελεσμάτων με τη βοήθεια κατάλληλου λογισμικού

5.2.2 Απομόνωση νουκλεϊκών οξέων από κυτταρολογικά δείγματα

Αρχικά τα δείγματα τοποθετήθηκαν στο ρυθμιστικό διάλυμα λύσης των 2 ml (NucliSENSLysisBuffer), αναδεύτηκαν καλά και επωάστηκαν για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η απομόνωση των νουκλεϊκών οξέων από τα κυτταρολογικά δείγματα πραγματοποιήθηκε στον αυτόματο αναλυτή *NucliSENSEasyMAG*, η τεχνολογία του οποίου βασίζεται στην τεχνολογία Boom. Σύμφωνα με αυτή, τα νουκλεϊκά οξέα δεσμεύονται στα σωματίδια του πυριτίου υπό την παρουσία υψηλής συγκέντρωσης χαστροπικών παραγόντων, όπως η θειοκυανική γουανιδίνη (GuSCN). Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας απομόνωσης στον αυτόματο αναλυτή, επιτελούνται αρκετά στάδια έκπλυσης των μαγνητικών σωματιδίων πυριτίου με τα δεσμευμένα νουκλεϊκά οξέα με τα τελευταία να απομονώνονται τελικά από τη στερεά φάση σε διάλυμα απομόνωσης(**Εικόνα 11**).

Αναλυτικότερα, σύμφωνα με τις οδηγίες του πρωτοκόλλου της αυτοματοποιημένης απομόνωσης ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα:

- α) Προσθήκη του προϊόντος της λύσης σε ειδικές θέσεις του αυτόματου αναλυτή (vesselstrips) με τη χρήση πιπετών pasteur
- β) Προετοιμασία του προμίγματος με την προσθήκη:
 - 550 μl αραιωτικού προμίγματος (NucliSENSPremixDiluent)
 - 550 μl μαγνητικών σωματιδίων πυριτίου (NucliSENSeasyMAGMagneticSilica)
- γ) Καλή ανάδευση του προμίγματος
- δ) Μεταφορά 100 μl προμίγματος σε κάθε vesselstrip όπου περιέχονται τα προϊόντα της λύσης
- ε) Εκκίνηση αναλυτή
- ζ) Απομόνωση των νουκλεϊκών οξέων σε όγκο 55μl και μεταφορά τους σε αποστειρωμένα σωληνάρια των 0.2 ml



Εικόνα 11. Τεχνολογία Boom (Ανατύπωση από Biomerieux <http://www.Boom.com>)

5.2.3 Απομόνωση νουκλεϊκών οξέων από ιστολογικά δείγματα

Η απομόνωση των νουκλεϊκών οξέων από τα ιστολογικά δείγματα, πραγματοποιήθηκε με το QIAampDNAminikit. Οι οδηγίες του κατασκευαστή για την απομόνωση των νουκλεϊκών οξέων από τους ιστούς, περιελάμβαναν τα παρακάτω βήματα:

- α) Τεμαχισμός των ήδη μικρών ιστοτεμαχίων σε πολύ μικρά κομμάτια και μεταφορά τους σε αποστειρωμένο σωληνάριο των 1.5 ml
- β) Προσθήκη 180 μl ρυθμιστικού διαλύματος λύσης ιστών (bufferATL) και 20 μl πρωτεϊνάσης K (ProteinaseK), καλή ανάδευση και επώαση των ιστών στους 56°C σε θερμαινόμενη πλάκα (heatblock) για 2 ώρες ή έως ότου λυθούν πλήρως οι ιστοί
- δ) Σύντομη φυγοκέντριση των προϊόντων λύσης για την απομάκρυνση τυχόν σταγόνων από το εσωτερικό του πώματος των σωληναρίων

- ε) Προσθήκη 200 μl ρυθμιστικού διαλύματος λύσης (bufferAL), καλή ανάδευση για 15 δευτερόλεπτα και επώαση στους 70°C για 10 λεπτά σε heatblock
- ζ) Επανάληψη του σταδίου δ
- η) Προσθήκη 200 μl αιθανόλης 100%, καλή ανάδευση για 15 δευτερόλεπτα
- θ) Μεταφορά του μίγματος στη στήλη QIAampMinispin που εμπεριέχεται στο kit και φυγοκέντριση για 1 λεπτό στις 8000 στροφές
- η) Απόρριψη του σωληναρίου που περιέχει το διήθημα και τοποθέτηση της στήλης σε καθαρό σωληνάριο έκπλυσης
- ι) Προσθήκη 500 μl ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης (BufferAW1) και φυγοκέντριση για 1 λεπτό στις 8000 στροφές
- κ) Επανάληψη του σταδίου η
- λ) Προσθήκη 500 μl ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης (BufferAW2) και φυγοκέντριση για 3 λεπτά στη μέγιστη ταχύτητα (14000 στροφές)
- μ) Απόρριψη του σωληναρίου που περιέχει το διήθημα και τοποθέτηση της στήλης σε αποστειρωμένο σωληνάριο των 1.5 ml
- ν) Προσθήκη 100 μl ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης (BufferAE), επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντριση για 1 λεπτό στις 8000 στροφές για την έκλουση των νουκλεϊκών οξέων

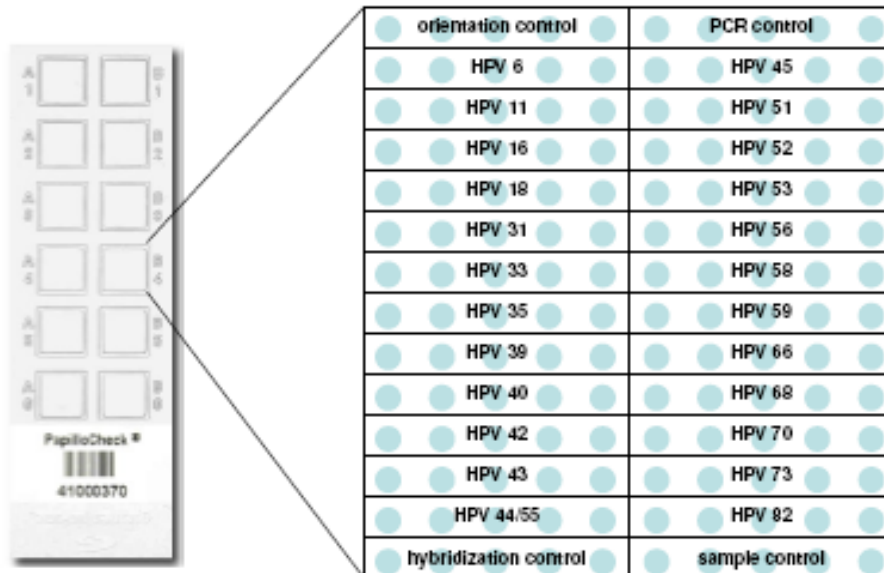
5.2.4 Ανίχνευση και τυποποίηση του HPV με μικροσυστοιχίες (Microarrays)

Το PapilloCheck HPV- Screening Test είναι ένα σύστημα DNA μικροσυστοιχιών (Microarrays) βασισμένο στη μέθοδο PCR για την ανίχνευση και τυποποίηση 24 στελεχών του HPV, συμπεριλαμβανομένων 15 στελεχών υψηλού κινδύνου (HPV 16, -18, -31, -33, -35, -39, -45, -51, -52, -56, -58, -59, -68, -73, -82), 2 πιθανόν υψηλού κινδύνου (HPV -53, -66) και 7 χαμηλού κινδύνου (HPV 6, -11, -40, -42, -43, -44, -70). Κάθε πλακίδιο μικροσυστοιχιών περιλαμβάνει 12 υπερυψωμένα κελιά με υπερυψωμένο όπου το καθένα περιέχει 28 διαφορετικούς ανιχνευτές (HPV- ειδικοί και μάρτυρες), οι οποίοι εναποτίθενται σε κηλίδες σε πέντε αντίγραφα (**Εικόνα 12**). Οι κηλίδες των μαρτύρων χρησιμεύουν στον έλεγχο των κρίσιμων σταδίων της δοκιμασίας και της επεξεργασίας του πλακιδίου που αφορούν στην ποιότητα του δείγματος

(μάρτυρας δείγματος), στην απόδοση της PCR αντίδρασης (μάρτυρας PCR) και του υβριδισμού (μάρτυρας υβριδισμού), στον σωστό εντοπισμό των spots και στην ποιότητα εκτύπωσης (μάρτυρας προσανατολισμού, μάρτυρας εκτύπωσης). Ένα επιτυχές PapilloCheck τεστ χαρακτηρίζεται από σήματα φθορισμού στις κηλίδες όλων των μαρτύρων, τα οποία σαρώνονται σε μήκος κύματος διέγερσης 635 nm- κόκκινος φθορισμός (μάρτυρας δείγματος και PCR) ή 532 nm- πράσινος φθορισμός (μάρτυρας υβριδισμού, προσανατολισμού και εκτύπωσης) **(Εικόνα 13)**

Αρχικά, η δοκιμασία περιλαμβάνει ένα στάδιο ενίσχυσης μιας περιοχής του γονιδίου E1 του HPV. Συγκεκριμένα, έπειτα από την απομόνωση ιϊκού και γενωμικού DNA, ένα τμήμα DNA 350 bp του ιϊκού γονιδίου E1 πολλαπλασιάζεται με τη χρήση ειδικών εκκινητών με τη μέθοδο PCR. Επιπλέον, στην ίδια αντίδραση πολλαπλασιάζεται ένα τμήμα από το ανθρώπινο γονίδιο ADAT1 (ανθρώπινη tRNA-ειδική αδενosίνη δεαμινάση1) και ένας εσωτερικός μάρτυρας που περιέχονται στο PapilloCheckMasterMix. Η ενίσχυση του ADAT1 χρησιμεύει για τον έλεγχο της παρουσίας ανθρώπινου DNA στα δείγματα των ιστών (μάρτυρας δείγματος), ενώ η ενίσχυση του εσωτερικού μάρτυρα για την παρακολούθηση της απόδοσης της PCR.

Εν συνεχεία, τα προϊόντα της PCR υβριδοποιούνται με συμπληρωματικούς ανιχνευτές DNA, οι οποίοι είναι ακινητοποιημένοι στην επιφάνεια του πλακιδίου των μικροσυστοιχιών (PapilloCheckchip). Κατά τον υβριδισμό, το προσδεδεμένο DNA επισημαίνεται με φθορισμό, ενώ το αδέςμευτο DNA απομακρύνεται στα επακόλουθα στάδια έκπλυσης. Τέλος, PapilloCheckchip σαρώνεται με το CheckScanner σε μήκη κύματος 532 nm και 635 nm, επιτρέποντας την ανίχνευση του σήματος φθορισμού από τα προσδεδεμένα και σημασμένα προϊόντα ύστερα από διέγερση με μονοχρωματικό φως. Με το λογισμικό ανάλυσης CheckReport πραγματοποιείται η ανάλυση και η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων, τα οποία δείχνουν την απουσία ή την παρουσία ενός τουλάχιστον από τα 24 HPV στελέχη καθώς και η αξιοπιστία της δοκιμασίας.



Εικόνα 12. Διάταξη του πλακιδίου (PapilloCheck chip) (Ανατύπωση από greiner bio- one <http://www.greinerbioone.com>)

Σημεία ελέγχου στο πλακίδιο

Σήματα σε μήκος κύματος 532nm (πράσινο)

➤ Έλεγχος εκτύπωσης

Κάθε κηλίδα της μικροσυστοιχίας εκπέμπει ένα σήμα στα 532nm. Ένας Cy3-σημασμένος ανιχνευτής στο διάλυμα του υβριδισμού αντιδρά με κάθε σημείο μέτρησης, επομένως ελέγχει την παρουσία και την ομοιογένεια όλων των DNA σημείων ελέγχου.

➤ Έλεγχος υβριδισμού

Ο Cy3-σημασμένος ανιχνευτής στο διάλυμα υβριδισμού αντιδρά με μια συμπληρωματική αλυσίδα DNA, η οποία βρίσκεται σε 5 από τα DNA σημεία μέτρησης, ελέγχοντας την απόδοση της αντίδρασης του υβριδισμού.

➤ *Έλεγχος προσανατολισμού*

5 DNA σημεία ελέγχου εκπέμπουν ένα σήμα στα 532 nm ανεξάρτητα από την απόδοση του υβριδισμού, ελέγχοντας τον προσανατολισμό των πλεγμάτων ανάλυσης στη συστοιχία.

Σήματα σε μήκος κύματος 635nm (κόκκινο)

➤ *Έλεγχος δειγμάτων (ανιχνευτής για το ανθρώπινο γονίδιο ADAT1)*

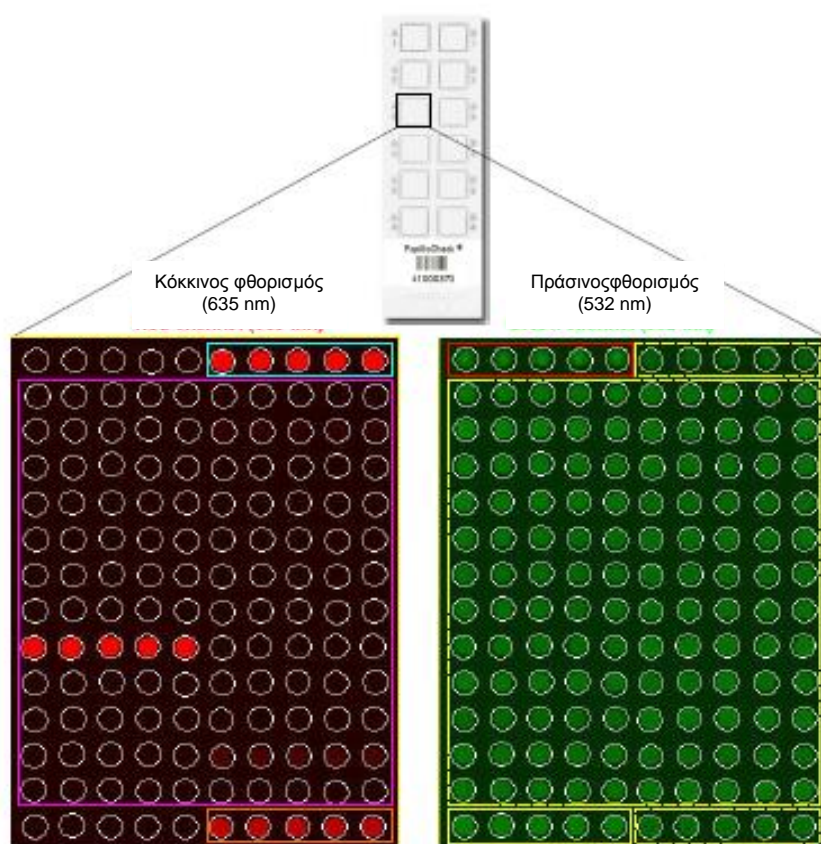
Ο εκκινητής για το θραύσμα του γονιδίου ADAT1 στο PapilloCheckMasterMix οδηγεί στην παραγωγή ενός προϊόντος PCR το οποίο στη συνέχεια εκπέμπει ένα σήμα στις κηλίδες ελέγχου δείγματος, σε περίπτωση υπάρξεως ανθρώπινου DNA στο δείγμα. Σε περιπτώσεις όπου υπάρχει περίσσεια HPV DNA στο δείγμα, η ισχύς του σήματος από τα σημεία ελέγχου δείγματος μπορεί να μειωθεί. Αυτό αποτελεί άμεσο αποτέλεσμα του ανταγωνισμού κατά τη διάρκεια της PCR. Σε αυτή την περίπτωση, τουλάχιστον ένας συγκεκριμένος HPV ανιχνευτής πρέπει να υπερβεί ένα ορισμένο κατώφλι για να είναι η δοκιμασία έγκυρη.

➤ *Έλεγχος PCR*

Κατά τη διάρκεια της PCR ένα επίσης θραύσμα μάρτυρα που υπάρχει στο MasterMix αντιγράφεται. Η ποιότητα της αντίδρασης πολυμεράσης εκτιμάται από το σήμα των 5 μικροσκοπικών σημείων ελέγχου PCR στη συστοιχία. Η πρόσδεση του προϊόντος της PCR σε αυτές τις κηλίδες εξασφαλίζει την αξιολόγηση της ποιότητας της PCR. Σε περιπτώσεις όπου υπάρχει περίσσεια HPV DNA στο δείγμα, η ισχύς του σήματος από τα σημεία ελέγχου PCR μπορεί να μειωθεί ή και να εξαφανιστεί. Αυτό είναι άμεσο αποτέλεσμα του ανταγωνισμού των εκκινητών κατά τη διάρκεια της PCR. Σε αυτή την περίπτωση, τουλάχιστον ένας συγκεκριμένος HPV ανιχνευτής πρέπει να υπερβεί ένα ορισμένο κατώφλι για να είναι η δοκιμασία έγκυρη.

➤ *Ανίχνευση HPV*

Το DNA του HPV ανιχνεύεται με τον υβριδισμό των ενισχυμένων PCR προϊόντων με ανιχνευτές ακινητοποιημένους στη μικροσυστοιχία. Κάθε DNA ανιχνευτής βρίσκεται σε 5 κηλίδες. Συγκεκριμένοι ανιχνευτές για τα 24 στελέχη του HPV επιτρέπουν την ανίχνευση αυτών. Η διάκριση μεταξύ των στελεχών HPV 44 και HPV 55 δεν είναι δυνατή λόγω αλληλεπίδρασης των ολιγομερών τους, συνεπώς το αποτέλεσμα παρουσιάζεται ως HPV44/55.



Εικόνα 13. Σημεία ελέγχου στο πλακίδιο (PapilloCheckchip) (Ανατύπωση από greinerbio- onehttp://www.greinerbioone.com)

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR) αποτελεί μέθοδο πολλαπλασιασμού μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας στόχου

με αποτέλεσμα την παραγωγή πολλαπλών αντιγράφων της αλληλουχίας αυτής. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στις ιδιότητες της θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης η οποία χρησιμοποιεί μονόκλωνο DNA ως μήτρα για τη δημιουργία ενός συμπληρωματικού κλώνου. Για την επίτευξη της μεθόδου PCR είναι απαραίτητη η χρήση δύο συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων (εκκινητές- primers), των οποίων οι αλληλουχίες είναι συμπληρωματικές προς τη μία από τις δύο αλυσίδες του αρχικού δίκλωνου DNA. Επίσης, η αντίδραση απαιτεί την προσθήκη τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (deoxyriboNucleotideTriphosphates- dNTPs) και χλωριούχου μαγνησίου ($MgCl_2$) και πραγματοποιείται σε θερμικό κυκλοποιητή και περιλαμβάνει 3 στάδια:

- Αποδιάταξη του DNA (Denaturation): Το αρχικό δίκλωνο DNA αποδιάσσεται σε υψηλή θερμοκρασία ($\sim 95^{\circ}C$) ώστε να είναι προσβάσιμες στους εκκινητές οι δύο αλυσίδες του DNA
- Υβριδισμός των εκκινητών (Annealing): Πρόσδεση των εκκινητών με μείωση της θερμοκρασίας ($50^{\circ}C - 64^{\circ}C$) στη μία αλυσίδα του DNA που χρησιμοποιείται ως μήτρα, ενώ παράλληλα αρχίζει η σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας με τη δράση της DNA πολυμεράσης.
- Επιμήκυνση (Extension): Σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας με την προσθήκη νουκλεοτιδίων από την DNA πολυμεράση στο 3' άκρο του εκκινητή. Η ιδανική θερμοκρασία στο στάδιο αυτό εξαρτάται από τη DNA πολυμεράση που χρησιμοποιείται, ωστόσο για την συχνότερα χρησιμοποιούμενη *Taq* DNA πολυμεράση η θερμοκρασία μέγιστης απόδοσης κυμαίνεται συνήθως μεταξύ $70^{\circ}C$ και $74^{\circ}C$.

Έπειτα από την απομόνωση των νουκλεϊκών οξέων πραγματοποιήθηκε PCR για την ενίσχυση τμήματος του E1 γονιδίου, σύμφωνα με τις οδηγίες του kit δοκιμασίας PapilloCheck. Αναλυτικότερα, η PCR διεξήχθη σε συνολικό όγκο 25 μ l ανά αντίδραση, προσθέτοντας σε σωληνάρια των 0.2 ml συγκεκριμένες ποσότητες αντιδραστηρίων, όπως απεικονίζονται στον **Πίνακα 5**. Σε κάθε αντίδραση PCR υπολογίστηκαν οι ποσότητες για 11 υπό εξέταση δείγματα,

έναν αρνητικό μάρτυρα (νερό χωρίς RNάσες/DNάσες) και ένα επιπλέον δείγμα. Το πρόγραμμα των κύκλων της PCR που εφαρμόστηκε στον θερμικό κυκλοποιητή συνοψίζεται στον παρακάτω πίνακα (**Πίνακας 6**).

Χρόνος	Θερμοκρασία	Αριθμός κύκλων
Πίνακας 5. Προετοιμασία PCR αντίδρασης		
15min	95°C	1
30sec	95°C	40
25sec	55°C	
45sec	72°C	
30sec	95°C	15
45sec	72°C	
Συντήρηση	4°C	

Πίνακας 6. Πρόγραμμα κύκλων PCR αντίδρασης

	1 αντίδραση	13 αντιδράσεις (1 πλακίδιο)
PapilloCheck MasterMix	19.8 μl	257.4 μl
Πολυμεράση HotStar Taq (5U/μl)	0.2 μl	2.6 μl
Συνολικός όγκος πριν την προσθήκη του δείγματος	20 μl	260 μl
DNA από δείγματα κυττάρων/ ιστών	5 μl	
Συνολικός όγκος ανά αντίδραση	25μl	

Υβριδισμός και έκπλυση

Παρασκευή των διαλυμάτων έκπλυσης 1, 2, 3

Για την παρασκευή των διαλυμάτων έκπλυσης 1, 2 και 3 αναμείχθηκαν σε δοκιμαστικό σωλήνα, 140 ml απεσταγμένο νερό, 14 ml PapilloCheckbuffer A και 1,75 ml PapilloCheckbuffer B. Ακολούθησε καλή ανάδευση και διαχωρισμός του μίγματος σε 3 ίσα μέρη των 50ml σε σωληνάρια (falcontubes), τα οποία σημάνθηκαν ως διάλυμα 1, 2 και 3. Το διάλυμα 2 προθερμάνθηκε στους 50°C πριν τη χρήση για τουλάχιστον 20 λεπτά.

Υβριδισμός

Το στάδιο του υβριδισμού περιελάμβανε την ανάμιξη 30 μl από το διάλυμα υβριδισμού (PapilloCheckHybridizationbuffer) και 5 μl από το προϊόν της PCR σε σωληνάρια των 0.2 ml που αντιστοιχούσαν σε κάθε δείγμα. Ακολούθησε σύντομη φυγοκέντρηση και μεταφορά 25 μl από το παραπάνω μίγμα υβριδισμού σε κάθε πηγαδάκι του chip, αποφεύγοντας τη δημιουργία φυσαλίδων αέρα. Τέλος, το chip επωάστηκε σε θερμοκρασία δωματίου (20-25°C) και σε συνθήκες υγρασίας σε ειδική κλειστή συσκευή υβριδισμού ακριβώς για 15 λεπτά.

Αναμειγνύουμε 30μl από το PapilloCheck διάλυμα υβριδισμού σε ένα σωληνάκι αντίδρασης με 5μl από το προϊόν της PCR σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί μια γρήγορη φυγοκέντρηση, και κατόπιν μεταφέρονται 25μl από το μείγμα υβριδισμού σε κάθε πηγαδάκι στο πλακάκι.

Επωάζουμε το πλακάκι για ακριβώς 15 min σε θερμοκρασία δωματίου (20-25°C) και σε υγρή ατμόσφαιρα. Ο υβριδισμός σε άλλες θερμοκρασίες μπορεί να προκαλέσει μια απώλεια στην ένταση του σήματος ή αύξηση του μη ειδικού φθορισμού. Επιπλέον, εφόσον ο όγκος του μείγματος υβριδισμού (διάλυμα υβριδισμού και προϊόν PCR), είναι πολύ μικρός και το στέγνωμα του στο chip πρέπει οπωσδήποτε να αποφεύγεται, είναι απαραίτητο να γίνεται ο υβριδισμός σε υγρή ατμόσφαιρα.

Έκπλυση του chip

Με τη χρήση λαβίδας, το chip των συστοιχιών τοποθετήθηκε στο διάλυμα I και εκπλύθηκε εμβαπτίζοντας το με ανάδευση για 10 δευτερόλεπτα, με τρόπο ώστε οι συστοιχίες να παραμένουν συνέχεια εντός του διαλύματος. Ακολούθησε έκπλυση του chip στο διάλυμα II στους 50°C για 1 λεπτό και στο διάλυμα III για 10 δευτερόλεπτα. Εν συνεχεία, το chip τοποθετήθηκε σε falcontube και φυγοκεντρήθηκε για 3 λεπτά στις 5000 στροφές, για την απομάκρυνση της υγρασίας από την επιφάνειά του. Τέλος, το PapilloCheckchip σαρώθηκε με τη χρήση του CheckScanner.

Έλεγχος αποτελεσμάτων

Το PapilloCheckchip σαρώθηκε με τη χρήση του CheckScanner. Τα δείγματα θεωρήθηκαν κατάλληλα για αξιολόγηση, μόνο όταν όλα τα spots των μαρτύρων παρήγαγαν σήμα παράλληλα με την απουσία επιμόλυνσης του αρνητικού μάρτυρα από ανθρώπινο ή ιϊκό DNA.

5.3 Στατιστική ανάλυση

Υπολογίστηκε ο επιπολασμός του DNA του ιού HPV και στη συνέχεια διεξήχθη μονοπαραγοντική ανάλυση για τη διερεύνηση των σχέσεων μεταξύ της θετικότητας στο HPV DNA και διαφόρων μεταβλητών (κλινικοπαθολογικά και δημογραφικά χαρακτηριστικά) με τους ελέγχους χ^2 και t-τεστ. Για τις μεταβλητές που κατά τη μονοπαραγοντική ανάλυση ήταν στατιστικά σημαντικές πραγματοποιήθηκε πολυπαραγοντική ανάλυση προκειμένου να διερευνηθούν οι σχέσεις που σχετίζονται ανεξάρτητα με την θετικότητα στην HPV λοίμωξη. Κατά την πολυπαραγοντική ανάλυση, υπολογίστηκαν οι σχετικές συχνότητες -OddsRatio- με το αντίστοιχο 95% διάστημα εμπιστοσύνης (95% CI). Σε όλους τους στατιστικούς ελέγχους χρησιμοποιήθηκε επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας 5%.

6. Αποτελέσματα

6.1. Ασθενείς με ακανθοκυτταρικά καρκινώματα κεφαλής και τραχήλου

Χαρακτηριστικά ασθενών

Στη μελέτη συμπεριελήφθησαν συνολικά 137 ασθενείς, 96 άνδρες (70.1%) και 41 γυναίκες (29.9%) μεταξύ 19 και 88 ετών (μέση ηλικία 58 έτη). Η πλειονότητα των ασθενών ήταν χρήστες καπνού (67.9%, 93/137) και με ιστορικό χρήσης αλκοόλ (71.5%, 98/137). Επιπλέον, το 71.5% των ασθενών (98/137) εκτίθεντο σε παράγοντες κινδύνου (κάπνισμα ή/ και κατανάλωση αλκοόλ). Σύμφωνα με τη σταδιοποίηση κατά TNM, 43 ασθενείς είχαν νόσο σταδίου I (31.4%), 53 ασθενείς σταδίου II (38.7%), 29 ασθενείς σταδίου III (21.2%) και οι υπόλοιποι 12 ασθενείς σταδίου IV (8.7%). Ως προς την ιστολογική διαφοροποίηση, 38 καρκίνοι ήταν καλής (27.7%), 65 μέτριας (47.5%) και 34 πτωχής διαφοροποίησης (24.8%). Η πλειοψηφία των ασθενών διεγνώσθη με ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα της στοματικής κοιλότητας (42.3%, 58/137) ή του λάρυγγα (39.4%, 54/137).

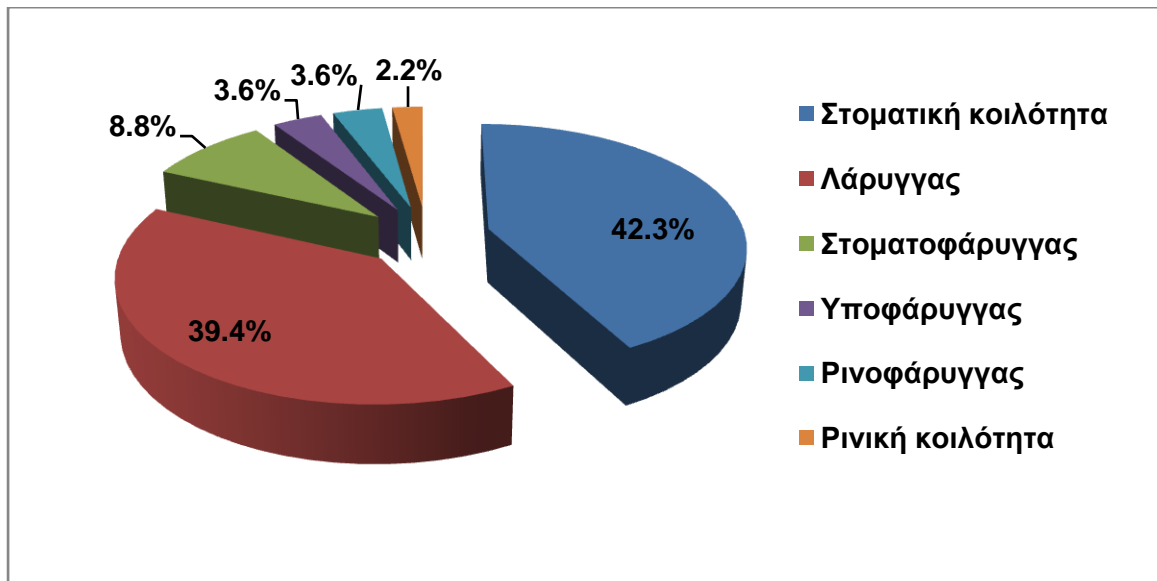
77 ασθενείς υπεβλήθησαν σε χειρουργική επέμβαση (56.2%), 35 σε χειρουργική επέμβαση και συνδυασμένη χημειο- ακτινοθεραπεία (25.5%), 5 σε συνδυασμένη χημειο- ακτινοθεραπεία (3.6%) και 20 σε ακτινοθεραπεία (14.6%). Έπειτα από παρακολούθηση 2 ετών, 41 ασθενείς ευρέθησαν με τοπική υποτροπή (29.9%) και 96 ασθενείς χωρίς κλινικοεργαστηριακά ευρήματα τοπικής υποτροπής (70.1%) (**Πίνακας 7, Σχήματα 1 και 2**).

Πίνακας 7. Κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά ασθενών με ακανθοκυτταρικά καρκινώματα κεφαλής και τραχήλου

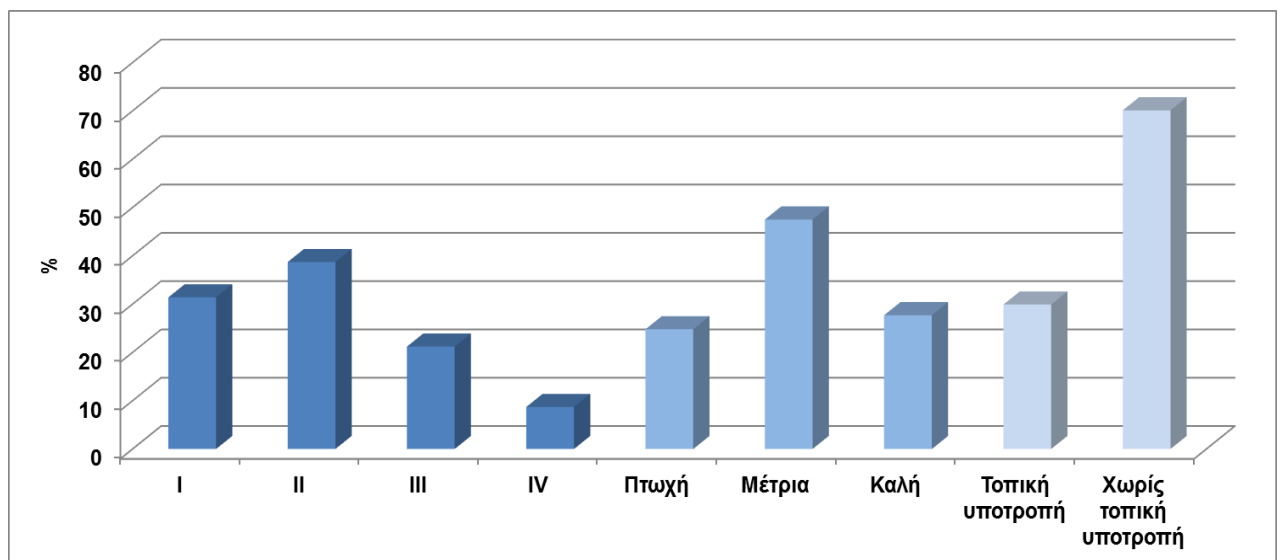
Χαρακτηριστικά	N (%)
Αριθμός ασθενών	137
Ηλικία	
Μέση	58 ± 14.1
Διάμεσος	61
Εύρος	19-88
Φύλο	
Άνδρες	96 (70.1)
Γυναίκες	41 (29.9)
Χρήση καπνού	
Καπνιστές	93 (67.9)
Μη καπνιστές	44 (32.1)
Χρήση αλκοόλ	
Πότες	39 (28.5)
Μη πότες	98 (71.5)
Χρήση καπνού/Χρήση αλκοόλ	
Καπνιστές ή/και πότες	98 (71.5)
Μη καπνιστές/ Μη πότες	39 (28.5)
Στάδιο νόσου	
I	43 (31.4)
II	53 (38.7)
III	29 (21.2)
IV	12 (8.7)
Ιστολογική διαφοροποίηση	
Πτωχή	34 (24.8)
Μέτρια	65 (47.5)
Καλή	38 (27.7)

Ανατομική εντόπιση	
Στοματική κοιλότητα	58 (42.3)
Λάρυγγας	54 (39.4)
Στοματοφάρυγγας	12 (8.8)
Ρινοφάρυγγας	5 (3.6)
Ρινική κοιλότητα	3 (2.2)
Θεραπεία	
Χειρουργική	77 (56.2)
Χειρουργική + α/θ + χ/θ	35 (25.5)
α/θ + χ/θ	5 (3.6)
α/θ	20 (14.6)
Τοπική υποτροπή	
Ναι	41 (29.9)
Όχι	96 (70.1)

Σχήμα 1. Κατανομή των ακανθοκυτταρικών καρκινωμάτων κεφαλής και τραχήλου με βάση την εντόπισή τους



Σχήμα 2. Κατανομή των ακανθοκυτταρικών καρκινωμάτων κεφαλής και τραχήλου με βάση το στάδιο κατά TNM, την ιστολογική διαφοροποίηση και την ανάπτυξη ή όχι τοπικής υποτροπής

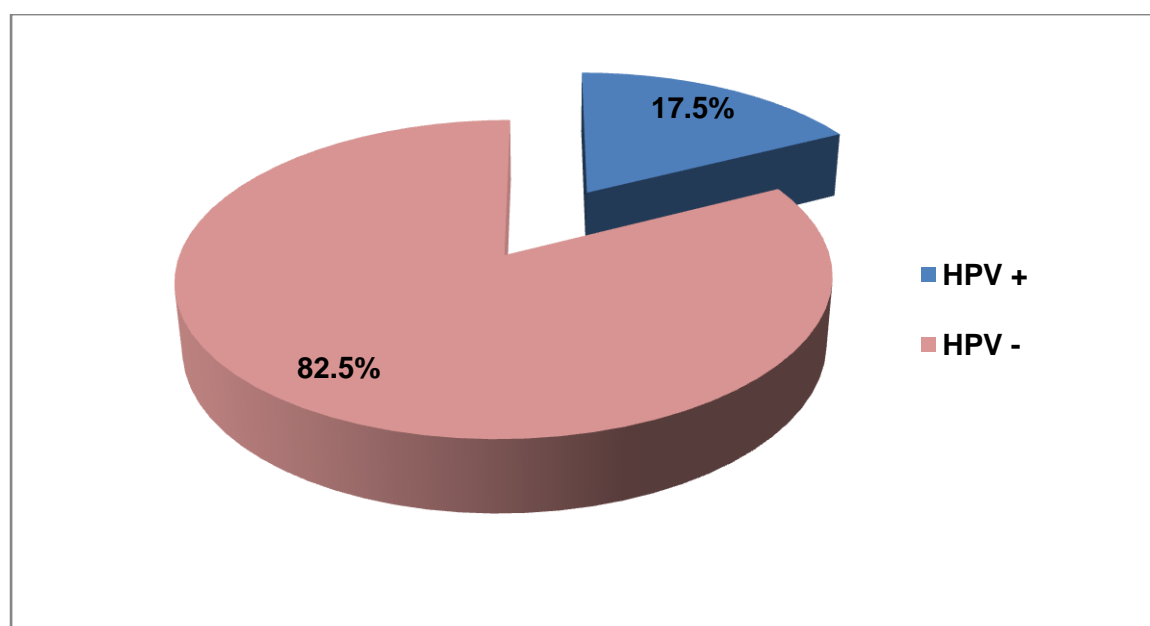


Ανίχνευση και τυποποίηση των στελεχών του HPV στα ακανθοκυτταρικά καρκινώματα κεφαλής και τραχήλου

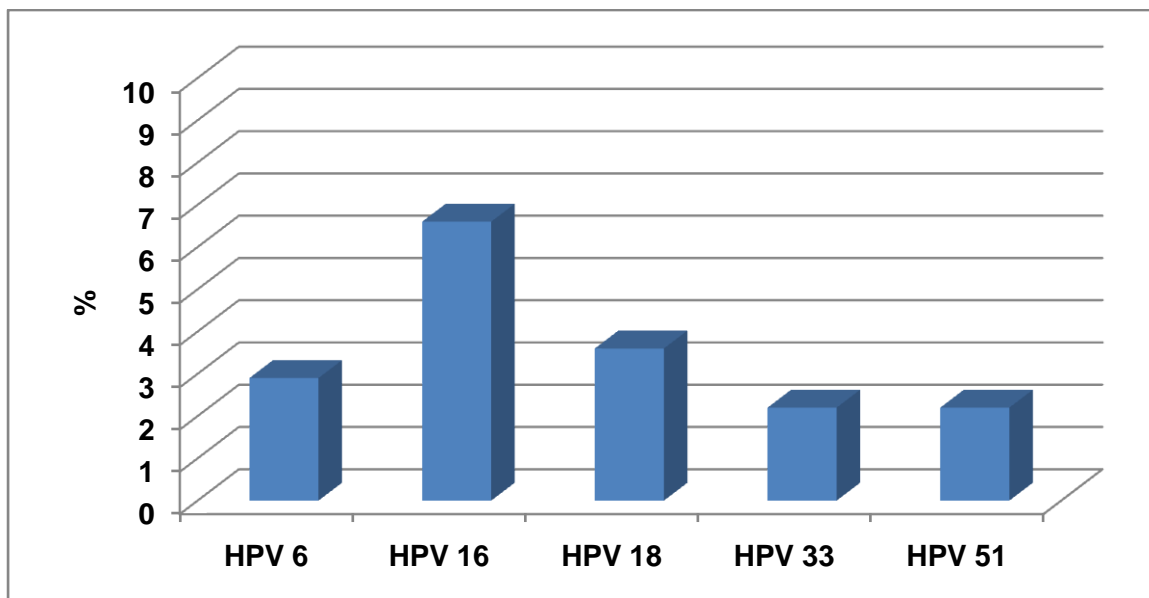
Από τους 137 ασθενείς με ακανθοκυτταρικά καρκινώματα κεφαλής και τραχήλου οι 24 βρέθηκαν θετικοί στον HPV (17.5%), ενώ η τυποποίηση του ιού με τη μέθοδο των μικροσυστοιχιών ανέδειξε τον HPV 16 ως το επικρατέστερο στέλεχος με ποσοστό 6.6% (9/137), ακολουθούμενο από τα στελέχη HPV 18 με ποσοστό 3.6% (5/137), HPV 6 με ποσοστό 2.9% (4/137) και HPV 33 και HPV 51 με ποσοστό 2.2% (3/137) έκαστο (**Σχήματα 3 και 4**).

Ανάλογα με την ανατομική εντόπιση των καρκίνων, HPV λοίμωξη ανιχνεύτηκε στο 12.1% των ακανθοκυτταρικών καρκινωμάτων της στοματικής κοιλότητας (7/58) στο 18.5% του λάρυγγα (10/54), στο 33.3% του στοματοφάρυγγα (4/12) στο 20% του υποφάρυγγα (1/5) και στο 40% του ρινοφάρυγγα (2/5), ενώ σε κανένα από τα 3 ακανθοκυτταρικά καρκινώματα της ρινικής κοιλότητας δεν βρέθηκε λοίμωξη από τον HPV(**Πίνακας 8**).

Σχήμα 3. Συχνότητα ανίχνευσης του HPV στο σύνολο των ακανθοκυτταρικών καρκινωμάτων κεφαλής και τραχήλου



Σχήμα 4. Κατανομή των στελεχών του HPV στο σύνολο των ακανθοκυτταρικών καρκινωμάτων κεφαλής και τραχήλου



Πίνακας 8. Συχνότητα ανίχνευσης του HPV με βάση την εντόπιση των ακανθοκυτταρικών καρκινωμάτων κεφαλής και τραχήλου

Εντόπιση	N	HPV + (%)
Στόμα	58	12,1
Λάρυγγας	54	18,5
Στοματοφάρυγγας	12	33,3
Υποφάρυγγας	5	20
Ρινοφάρυγγας	5	40
Ρινική κοιλότητα	3	0

Μονοπαραγοντική ανάλυση

Σύμφωνα με την μονοπαραγοντική ανάλυση, παρατηρήθηκε υψηλότερο ποσοστό θετικότητας στον HPV στους ασθενείς που δεν έκαναν χρήση καπνού (31,8% vs. 10,8%, $p= 0.002$), και αλκοόλ (22.4% vs. 5,1%, $p= 0.016$). Επίσης, η HPV λοίμωξη συσχετίστηκε με τη μη έκθεση στους παράγοντες κινδύνου (καπνός και αλκοόλ) (33.3% vs. 11.2%, $p= 0.002$) και με τους πτωχά διαφοροποιημένους όγκους (38.2% vs. 10.7%, $p= 0.001$). Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές σχέσεις μεταξύ της ανίχνευσης του HPV και της ηλικίας, του φύλου, του σταδίου της νόσου, της ανατομικής εντόπισης των όγκων και της τοπικής υποτροπής (**Πίνακας 9**).

Πολυπαραγοντική ανάλυση

Οι μεταβλητές που βρέθηκαν να είναι στατιστικά σημαντικές (μη χρήση καπνού, μη χρήση αλκοόλ, μη έκθεση στους παράγοντες κινδύνου και πτωχή διαφοροποίηση) μελετήθηκαν περαιτέρω με πολυπαραγοντική ανάλυση προκειμένου να ταυτοποιηθούν οι πιθανές ανεξάρτητες σχέσεις μεταξύ της ανίχνευσης του HPV και των παραπάνω μεταβλητών. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του πολυπαραγοντικού μοντέλου ανάλυσης, φάνηκε ότι η πτωχή διαφοροποίηση σχετιζόταν ανεξάρτητα με την HPV λοίμωξη (OR, 4.00; 95% CI, 1.43 - 11.4, $p= 0.006$)(**Πίνακας 10**). Δεν επιβεβαιώθηκε στην πολυπαραγοντική ανάλυση η σχέση μεταξύ της HPV λοίμωξης και της μη χρήσης καπνού, μη χρήσης αλκοόλ και μη έκθεσης στους παράγοντες κινδύνου ($p= 0.550, 0.165, 0.419$, αντίστοιχα)

Πίνακας 9. Συσχέτιση HPV λοίμωξης με κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά στο σύνολο των ασθενών με ακανθοκυτταρικά καρκινώματα κεφαλής και τραχήλου (Μονοπαραγοντική ανάλυση)

Χαρακτηριστικά/ παράγοντες κινδύνου	N	HPV + N (%)	p value
Ηλικία			0.122
≤60 [§]	66	15 (22.7)	
>60	71	9 (12.7)	
Φύλο			0.462
Άνδρες [§]	96	15 (15.6)	
Γυναίκες	41	9 (21.9)	
Χρήση καπνού			0.002
Μη καπνιστές [§]	44	14 (31.8)	
Καπνιστές	93	10 (10.8)	
Χρήση αλκοόλ			0.016
Μη πότες [§]	98	22 (22.4)	
Πότες	39	2 (5.1)	
Χρήση καπνού/Χρήση αλκοόλ			0.002
Μη καπνιστές/ Μη πότες [§]	39	13 (33.3)	
Καπνιστές ή/και πότες	98	11 (11.2)	
Στάδιο νόσου			0.632
I-II [§]	96	18 (18.8)	
III-IV	41	6 (14.6)	
Ιστολογική διαφοροποίηση			0.001
Μέτρια/ Καλή [§]	103	11 (10.7)	
Πτωχή	34	13 (38.2)	
Ανατομική εντόπιση			1.000
Στόμα [§]	58	7 (12.1)	
Λάρυγγας	54	10 (18.5)	
Στοματοφάρυγγας	12	4 (33.3)	
Υποφάρυγγας	5	1 (20.0)	

Ρινοφάρυγγας	5	2 (40.0)
Ρινική κοιλότητα	3	0 (0.0)
Τοπική υποτροπή		0.335
Ναι	41	5 (12.2)
Όχι	96	19 (19.8)

§Κατηγορία αναφοράς

Πίνακας 10. Πολυπαραγοντική ανάλυση: παράγοντες θετικότητας στην HPV λοίμωξη στο σύνολο των ασθενών με ακανθοκυτταρικά καρκινώματα κεφαλής και τραχήλου

Μεταβλητές	Σχετική συχνότητα (OddsRatio, OR)	95% CI [§]	p value
Ιστολογική διαφοροποίηση			0.006
Μέτρια/ Καλή	1		
Πτωχή	4.00	1.43 – 11.4	

§Όρια αξιοπιστίας

6.2. Ασθενείς με ακανθοκυτταρικά καρκινώματα της στοματικής κοιλότητας

Χαρακτηριστικά ασθενών

Η ομάδα των 58 ασθενών με ακανθοκυτταρικά καρκινώματα της στοματικής κοιλότητας αποτελείται από 39 άνδρες (67.2%) και 19 γυναίκες (32.8%) μεταξύ 19 και 82 ετών (μέση ηλικία 53.7 έτη). Ένα σημαντικό ποσοστό του υπό μελέτη πληθυσμού ήταν χρήστες καπνού (60.3%, 35/58) και το 25.9% είχε ιστορικό χρήσης αλκοόλ (15/58). Επιπλέον, το 62.1% των ασθενών (36/58) εκτίθεντο σε παράγοντες κινδύνου (κάπνισμα ή/ και κατανάλωση αλκοόλ). Σύμφωνα με τη σταδιοποίηση κατά TNM, 28 ασθενείς είχαν νόσο σταδίου I (48.3%), 18 ασθενείς σταδίου II (31.1%), 10 ασθενείς σταδίου III (17.2%), ενώ μόλις 2 ασθενείς σταδίου IV (3.4%). Ως προς την ιστολογική διαφοροποίηση, 18 καρκίνοι ήταν καλής (31,1%), 27 μέτριας (46.5%) και 13 πτωχής διαφοροποίησης (22.4%). Η πλειονότητα των ακανθοκυτταρικών καρκινωμάτων της στοματικής κοιλότητας αφορούσε στη γλώσσα (60.3%, 35/58), ενώ τα υπόλοιπα εντοπίστηκαν στο έδαφος του στόματος (15.5%, 9/58), την παρειά (6.9%, 4/58), το οπισθογόμφιο τρίγωνο (5.2%, 3/58), το χείλος (5.2%, 3/58), την άνω γνάθο (3.4%, 2/58) και την φατνιακή απόφυση (3.4%, 2/58).

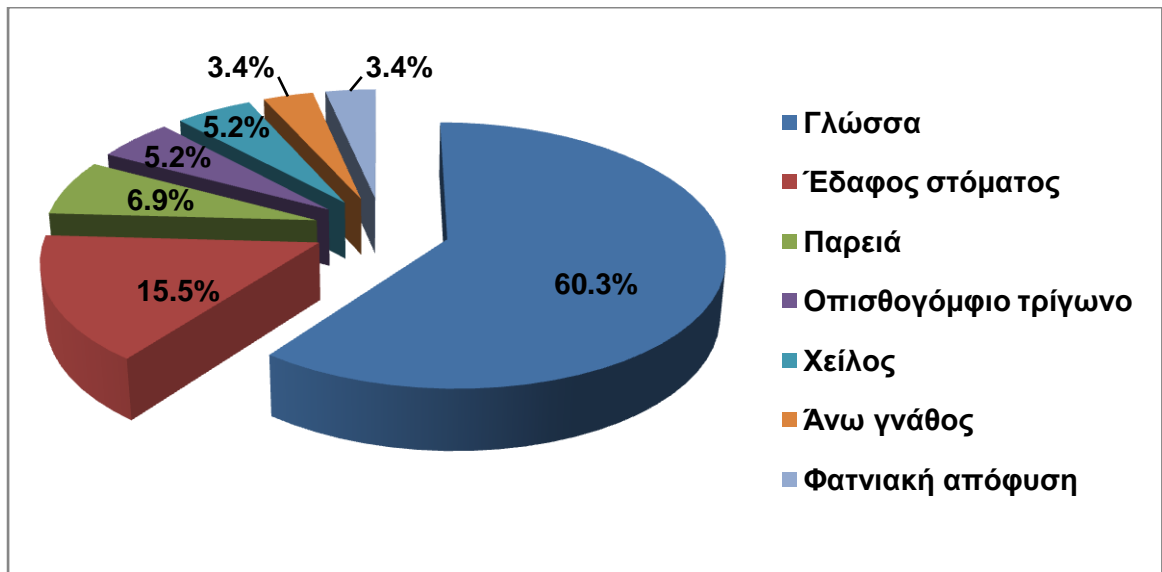
Η θεραπευτική αντιμετώπιση των καρκίνων της στοματικής κοιλότητας περιελάμβανε χειρουργική επέμβαση σε 42 ασθενείς (72.4%), χειρουργική επέμβαση και συνδυασμένη χημειο- ακτινοθεραπεία σε 11 ασθενείς (19.0%) και ακτινοθεραπεία σε 5 ασθενείς (8.6%). Έπειτα από παρακολούθηση 2 ετών, 13 ασθενείς ευρέθησαν με τοπική υποτροπή (22.4%) και 45 ασθενείς χωρίς κλινικοεργαστηριακά ευρήματα τοπικής υποτροπής (77.6%) **(Πίνακας 11, Σχήματα 5 και 6)**

Πίνακας 11. Κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά ασθενών με ακανθοκυτταρικά καρκινώματα της στοματικής κοιλότητας

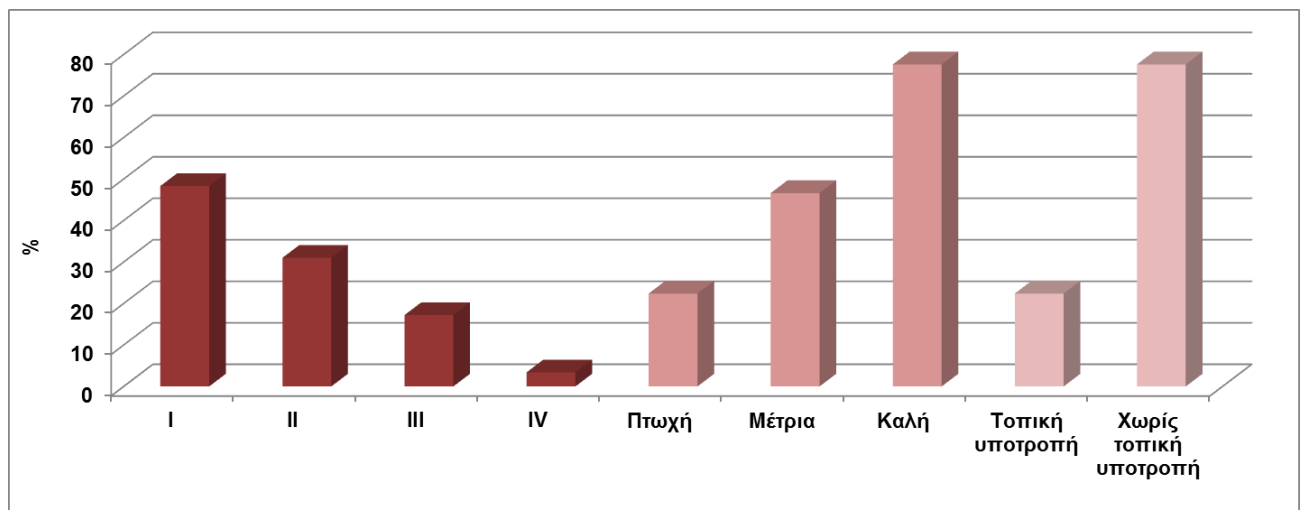
Χαρακτηριστικά	N (%)
Αριθμός ασθενών	58
Ηλικία	
Μέση	53.7 ± 15.3
Διάμεσος	58
Εύρος	19-82
Φύλο	
Άνδρες	39 (67.2)
Γυναίκες	19 (32.8)
Χρήση καπνού	
Καπνιστές	35 (60.3)
Μη καπνιστές	23 (39.7)
Χρήση αλκοόλ	
Πότες	15 (25.9)
Μη πότες	43 (74.1)
Χρήση καπνού/Χρήση αλκοόλ	
Καπνιστές ή/και πότες	36 (62.1)
Μη καπνιστές/ Μη πότες	22 (37.9)
Στάδιο νόσου	
I	28 (48.3)
II	18 (31.1)
III	10 (17.2)
IV	2 (3.4)
Ιστολογική διαφοροποίηση	
Πτωχή	13 (22.4)
Μέτρια	27 (46.5)
Καλή	18 (31.1)

Ανατομική εντόπιση	
Γλώσσα	35 (60.3)
Έδαφος στόματος	9 (15.5)
Παρειά	4 (6.9)
Οπισθογόμφιο τρίγωνο	3 (5.2)
Χείλος	3 (5.2)
Άνω γνάθος	2 (3.4)
Φατνιακή απόφυση	2 (3.4)
Θεραπεία	
Χειρουργική	42 (72.4)
Χειρουργική + α/θ + χ/θ	11 (19.0)
α/θ	5 (8.6)
Τοπική υποτροπή	
Ναι	13 (22.4)
Όχι	45 (77.6)

Σχήμα 5. Κατανομή των ακανθοκυτταρικών καρκινωμάτων της στοματικής κοιλότητας με βάση την εντόπισή τους



Σχήμα 6. Κατανομή των ακανθοκυτταρικών καρκινωμάτων της στοματικής κοιλότητας με βάση το στάδιο κατά TNM, την ιστολογική διαφοροποίηση και την ανάπτυξη ή όχι τοπικής υποτροπής



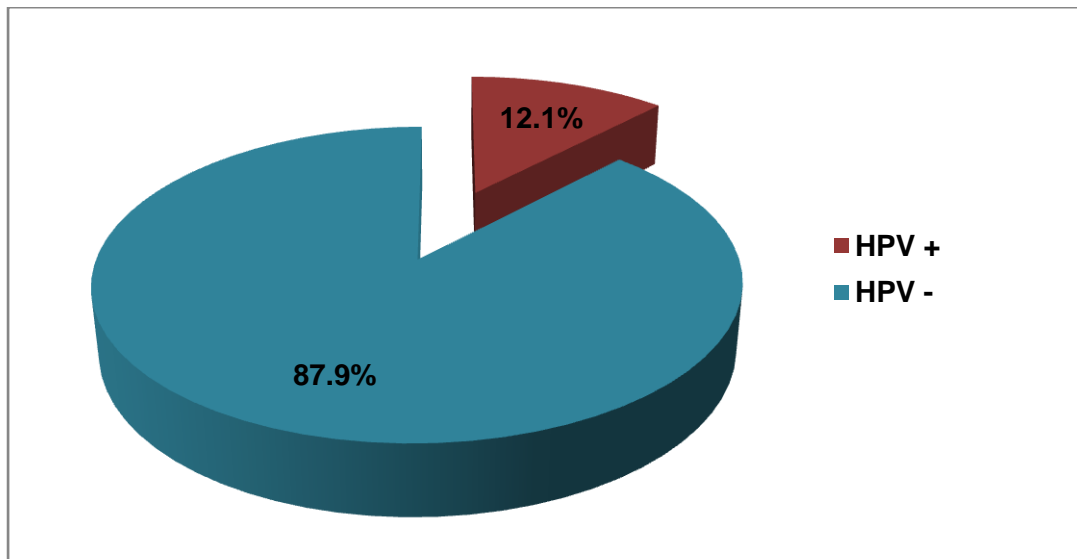
Ανίχνευση και τυποποίηση των στελεχών του HPV στα ακανθοκυτταρικά καρκινώματα της στοματικής κοιλότητας

7 από τους 58 ασθενείς με ακανθοκυτταρικά καρκινώματα της στοματικής κοιλότητας βρέθηκαν θετικοί στον HPV (12.1%) ενώ η τυποποίηση του ιού με τη μέθοδο των μικροσυστοιχιών ανέδειξε τα στελέχη HPV 6, HPV 16 και HPV 18 σε ποσοστό 3.4% (2/58) έκαστο, καθώς και τον HPV 33 σε ποσοστό 1.7% (1/58) (**Σχήματα 7 και 8**).

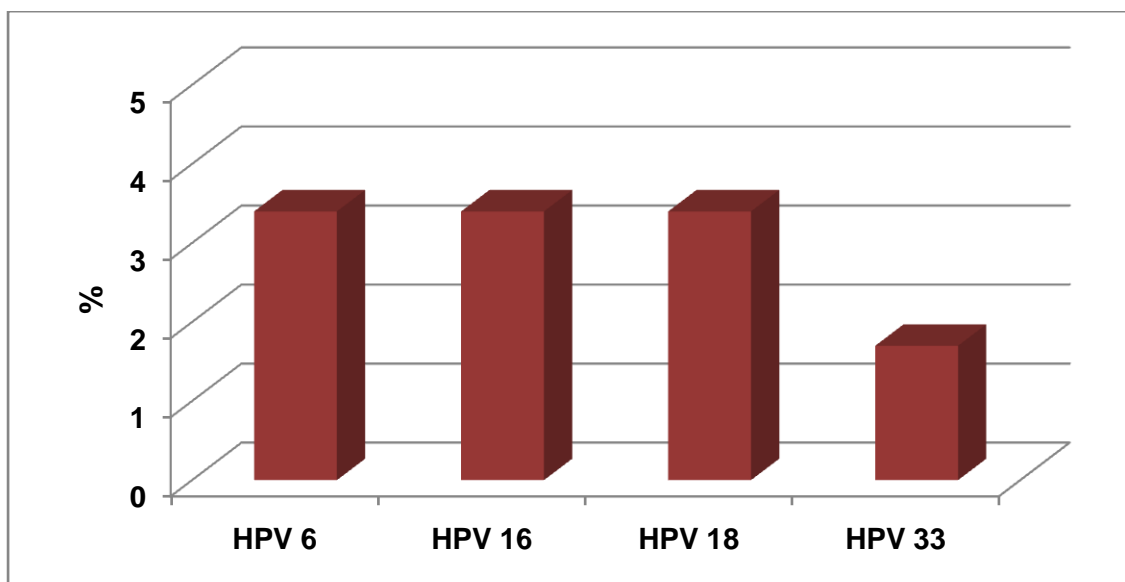
Ανάλογα με την εντόπιση των καρκίνων, HPV λοίμωξη ανιχνεύτηκε στο 17.2% των ακανθοκυτταρικών καρκινωμάτων της γλώσσας (6/35) και στο 11.1% του εδάφους στόματος (1/9), ενώ σε κανένα από τα περιστατικά των ακανθοκυτταρικών καρκινωμάτων των υπολοίπων περιοχών του στόματος δεν ανιχνεύτηκε ο HPV(**Πίνακας 12**).

Με βάση τα αποτελέσματα των μικροσυστοιχιών, στα ακανθοκυτταρικά καρκινώματα της γλώσσας ανιχνεύτηκαν οι HPV 6 και 18 σε ποσοστό 5.7% (2/35) έκαστος, καθώς και οι HPV 16 και 33 σε ποσοστό 2.9% (1/35) έκαστος. Αντίθετα, ο HPV 16 ήταν το μοναδικό στέλεχος που ανιχνεύτηκε στα ακανθοκυτταρικά καρκινώματα του εδάφους στόματος σε ποσοστό 11.1% (1/9) (**Σχήμα 9**).

Σχήμα 7. Συχνότητα ανίχνευσης του HPV στο σύνολο των ακανθοκυτταρικών καρκινωμάτων της στοματικής κοιλότητας



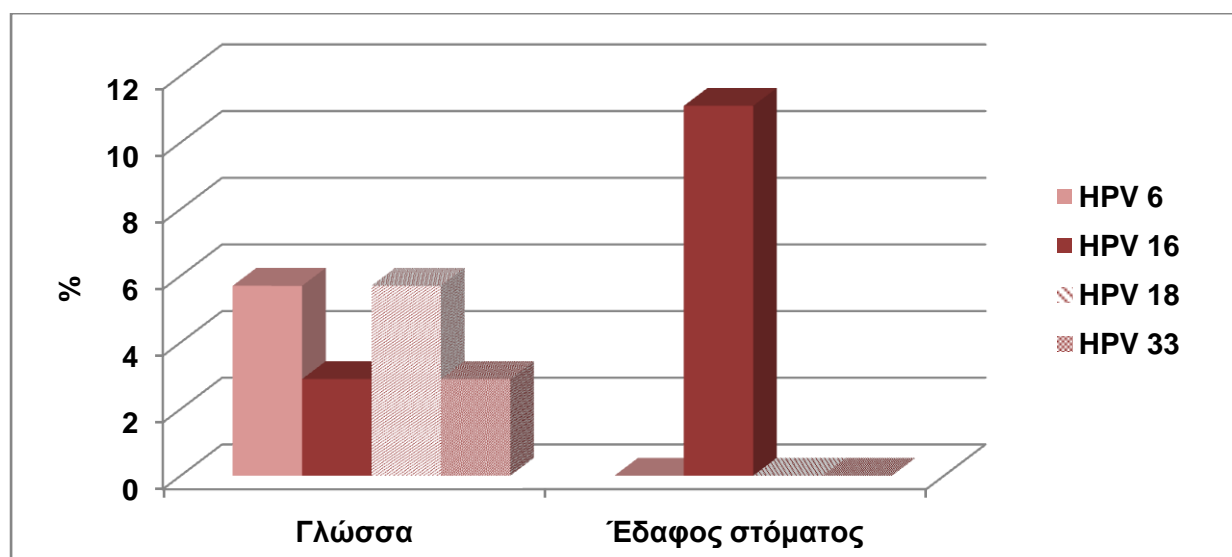
Σχήμα 8. Κατανομή των στελεχών του HPV στο σύνολο των ακανθοκυτταρικών καρκινωμάτων της στοματικής κοιλότητας



Πίνακας 12. Συχνότητα ανίχνευσης του HPV με βάση την εντόπιση των ακανθοκυτταρικών καρκινωμάτων της στοματικής κοιλότητας

Εντόπιση	N	HPV + (%)
Γλώσσα	35	17.2
Έδαφος στόματος	9	11.1
Παρειά	4	0.0
Οπισθογόμφιο τρίγωνο	3	0.0
Χείλος	3	0.0
Άνω γνάθος	2	0.0
Φατνιακή απόφυση	2	0.0

Σχήμα 9. Κατανομή των στελεχών του HPV με βάση την εντόπιση των ακανθοκυτταρικών καρκινωμάτων της στοματικής κοιλότητας



Μονοπαραγοντική ανάλυση

Σύμφωνα με την μονοπαραγοντική ανάλυση, στους ασθενείς που δεν έκαναν χρήση καπνού παρατηρήθηκε υψηλότερο ποσοστό ανίχνευσης του HPV σε σχέση με εκείνους που ήταν καπνιστές. Η σχέση αυτή ήταν οριακά στατιστικά σημαντική (21.7% vs. 5.7%, $p= 0.067$). Επίσης, παρατηρήθηκε συσχέτιση του HPV με τη μη έκθεση σε παράγοντες κινδύνου (22.7% vs. 5.6%, $p= 0.051$). Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές σχέσεις μεταξύ της ανίχνευσης του HPV και της ηλικίας, του φύλου, της χρήσης αλκοόλ, του σταδίου της νόσου, της ιστολογικής διαφοροποίησης και της τοπικής υποτροπής (**Πίνακας 13**).

Πολυπαραγοντική ανάλυση

Οι μεταβλητές που βρέθηκαν να είναι στατιστικά σημαντικές (μη χρήση καπνού, μη έκθεση στους παράγοντες κινδύνου) μελετήθηκαν περαιτέρω με πολυπαραγοντική ανάλυση προκειμένου να ταυτοποιηθούν οι πιθανές ανεξάρτητες σχέσεις μεταξύ της ανίχνευσης του HPV και των παραπάνω μεταβλητών. Η σχέση μεταξύ της μη χρήσης καπνού και της HPV λοίμωξης, καθώς και μεταξύ της μη έκθεσης σε παράγοντες κινδύνου και της HPV λοίμωξης δεν επιβεβαιώθηκαν στην πολυπαραγοντική ανάλυση ($p= 0.998$).

Πίνακας 13. Συσχέτιση HPV λοίμωξης με κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά στο σύνολο των ασθενών με ακανθοκυτταρικά καρκινώματα της στοματικής κοιλότητας (Μονοπαραγοντική ανάλυση)

Χαρακτηριστικά/παράγοντες κινδύνου	N	HPV + N (%)	p value
Ηλικία			0.688
≤60 [§]	34	5 (14.7)	
>60	24	2 (8.3)	
Φύλο			0.201
Ανδρες [§]	39	3 (7.7)	
Γυναίκες	19	4 (21.1)	
Χρήση καπνού			0.067
Μη καπνιστές [§]	23	5 (21.7)	
Καπνιστές	35	2 (5.7)	
Χρήση αλκοόλ			0.456
Μη πότες [§]	43	6 (14.0)	
Πότες	15	1 (6.7)	
Χρήση καπνού/Χρήση αλκοόλ			0.051
Μη καπνιστές/ Μη πότες [§]	22	5 (22.7)	
Καπνιστές ή/και πότες	36	2 (5.6)	
Στάδιο νόσου			1.000
I-II [§]	46	6 (13.0)	
III-IV	12	1 (8.3)	
Ιστολογική διαφοροποίηση			0.167
Μέτρια/ Καλή [§]	45	4 (8.9)	
Πτωχή	13	3 (23.1)	
Τοπική υποτροπή			0.648
Ναι	13	2 (15,4)	
Όχι	45	5 (11,1)	

§Κατηγορία αναφοράς

6.3. Ασθενείς με ακανθοκυτταρικά καρκινώματα του λάρυγγα

Χαρακτηριστικά ασθενών

Από τους 54 ασθενείς με ακανθοκυτταρικά καρκινώματα του λάρυγγα που συμπεριελήφθησαν στην μελέτη, οι 38 ήταν άνδρες (70.4%) και οι 16 γυναίκες (29.6%). Η ηλικία των ασθενών κυμάνθηκε από 21 έως 88 ετών (μέση ηλικία 62.6 έτη). Η πλειονότητα των συμμετασχόντων ανέφερε χρήση καπνού (72.2%, 39/54) και το 29.6% είχε ιστορικό χρήσης αλκοόλ (16/54). Επιπλέον, το 77.8% των ασθενών (42/54) εκτίθεντο σε παράγοντες κινδύνου (κάπνισμα ή/ και κατανάλωση αλκοόλ)

Σύμφωνα με τη σταδιοποίηση κατά TNM, 12 ασθενείς είχαν νόσο σταδίου I (22.2%), 27 ασθενείς σταδίου II (50.0%), 11 ασθενείς σταδίου III (20.4%), ενώ μόλις 4 ασθενείς σταδίου IV (7.4%). Ως προς την ιστολογική διαφοροποίηση, 11 καρκίνοι ήταν καλής (20.3%), 30 μέτριας (55.6%) και 13 πτωχής διαφοροποίησης (24.1%). Η πλειονότητα των ακανθοκυτταρικών καρκινωμάτων του λάρυγγα εντοπίστηκε στη γλωττιδική μοίρα (61.1%, 33/54) και σε μικρότερα ποσοστά στην υπεργλωττιδική (29,6%, 16/54) και διαγλωττιδική μοίρα (9.3%, 5/54).

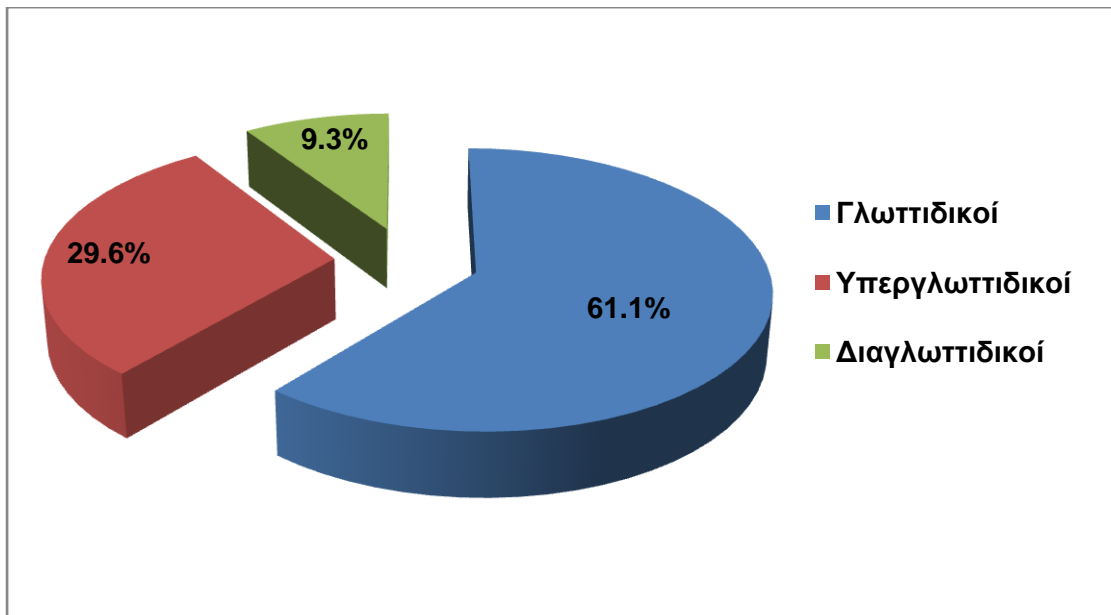
Η θεραπευτική αντιμετώπιση των καρκίνων του λάρυγγα περιελάμβανε χειρουργική επέμβαση σε 28 ασθενείς (51.9%), χειρουργική επέμβαση και συνδυασμένη χημειο- ακτινοθεραπεία σε 12 ασθενείς (22.2%), συνδυασμένη χημειο- ακτινοθεραπεία σε 5 ασθενείς (9.3%) και ακτινοθεραπεία σε 9 ασθενείς (16.7%). Έπειτα από παρακολούθηση 2 ετών, 16 ασθενείς ευρέθησαν με τοπική υποτροπή (29.6%) και 38 ασθενείς χωρίς κλινικοεργαστηριακά ευρήματα τοπικής υποτροπής (70,4%) (**Πίνακας 14, Σχήματα 10 και 11**).

Πίνακας 14. Κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά ασθενών με ακανθοκυτταρικά καρκινώματα του λάρυγγα

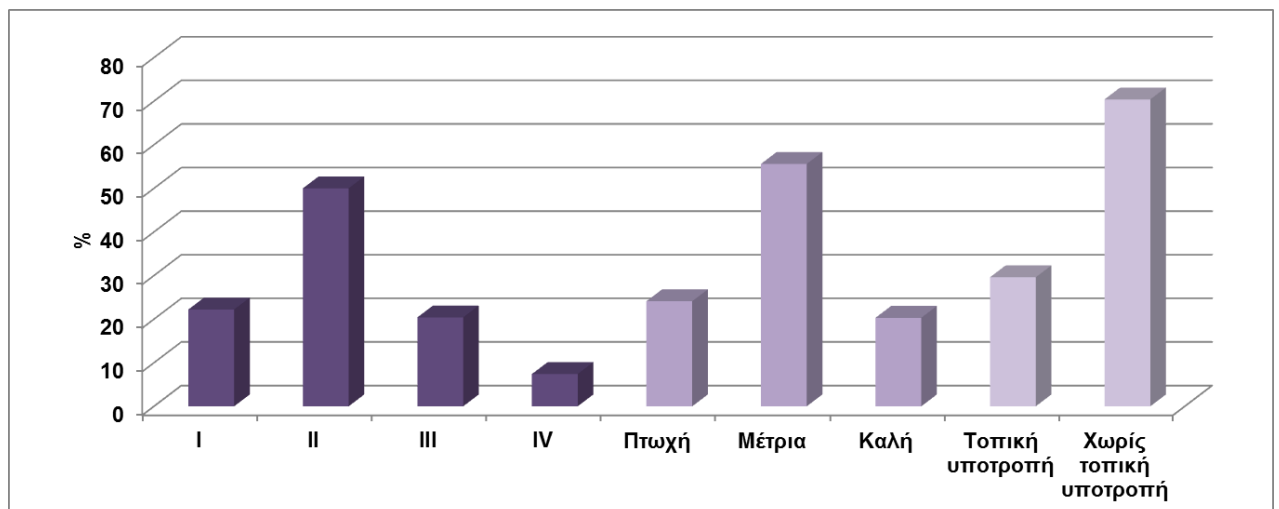
Χαρακτηριστικά	N (%)
Αριθμός ασθενών	54
Ηλικία	
Μέση	62.6 ± 11.5
Διάμεσος	63.5
Εύρος	21-88
Φύλο	
Άνδρας	38 (70.4)
Γυναίκα	16 (29.6)
Χρήση καπνού	
Καπνιστές	39 (72.2)
Μη καπνιστές	15 (27.8)
Χρήση αλκοόλ	
Πότες	16 (29.6)
Μη πότες	38 (70.4)
Χρήση καπνού/Χρήση αλκοόλ	
Καπνιστές ή/και πότες	42 (77.8)
Μη καπνιστές/ Μη πότες	12 (22.2)
Στάδιο νόσου	
I	12 (22.2)
II	27 (50.0)
III	11 (20.4)
IV	4 (7.4)
Ιστολογική διαφοροποίηση	
Πτωχή	13 (24.1)
Μέτρια	30 (55.6)
Καλή	11 (20.3)
Ανατομική εντόπιση	
Γλωττιδική	33 (61.1)
Υπεργλωττιδική	16 (29.6)

Διαγλωττιδική	5 (9.3)
<hr/>	
Θεραπεία	
<hr/>	
Χειρουργική	28 (51.9)
Χειρουργική + α/θ + χ/θ	12 (22.2)
α/θ + χ/θ	5 (9.3)
α/θ	9 (16.7)
<hr/>	
Τοπική υποτροπή	
<hr/>	
Ναι	16 (29.6)
Όχι	38 (70.4)
<hr/>	

Σχήμα 10. Κατανομή των ακανθοκυτταρικών καρκινωμάτων του λάρυγγα με βάση την εντόπισή τους



Σχήμα 11. Κατανομή των ακανθοκυτταρικών καρκινωμάτων του λάρυγγα με βάση το στάδιο κατά TNM, την ιστολογική διαφοροποίηση και την ανάπτυξη ή όχι τοπικής υποτροπής



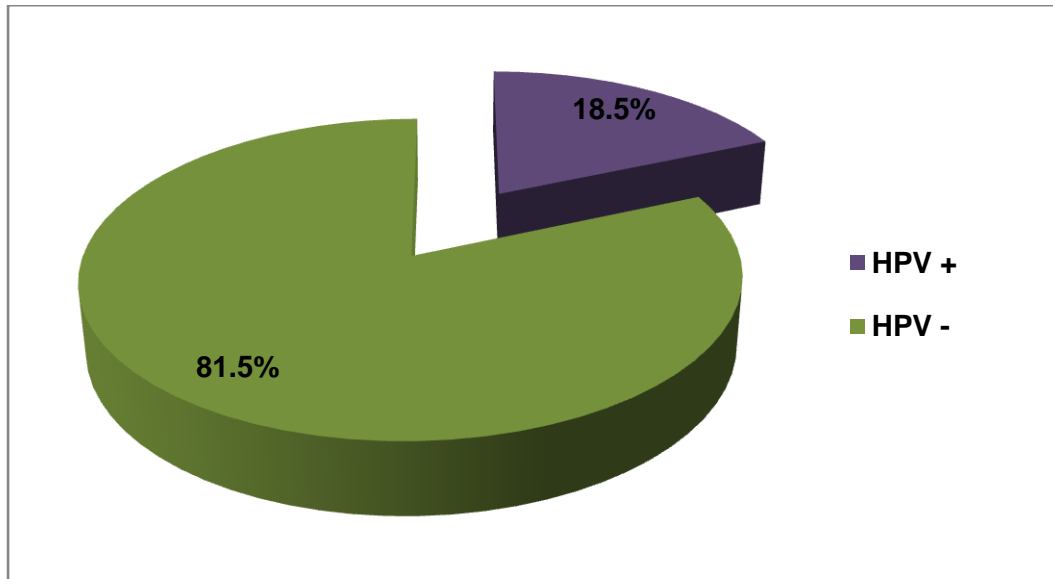
Ανίχνευση και τυποποίηση των στελεχών του HPV στα ακανθοκυτταρικά καρκινώματα του λάρυγγα

Από τους 54 ασθενείς με ακανθοκυτταρικά καρκινώματα του λάρυγγα οι 10 βρέθηκαν θετικοί στον HPV (18.5%), ενώ η τυποποίηση του ιού με τη μέθοδο των μικροσυστοιχιών ανέδειξε τον HPV 16 ως το επικρατέστερο στέλεχος με ποσοστό 7.4% (4/54), ακολουθούμενο από τα στελέχη HPV 18 και HPV 51 με ποσοστό 3.7% (2/54) έκαστο και τα HPV 6 και HPV 33 με ποσοστό 1.9% (1/54) έκαστο **(Σχήματα 12 και 13)**.

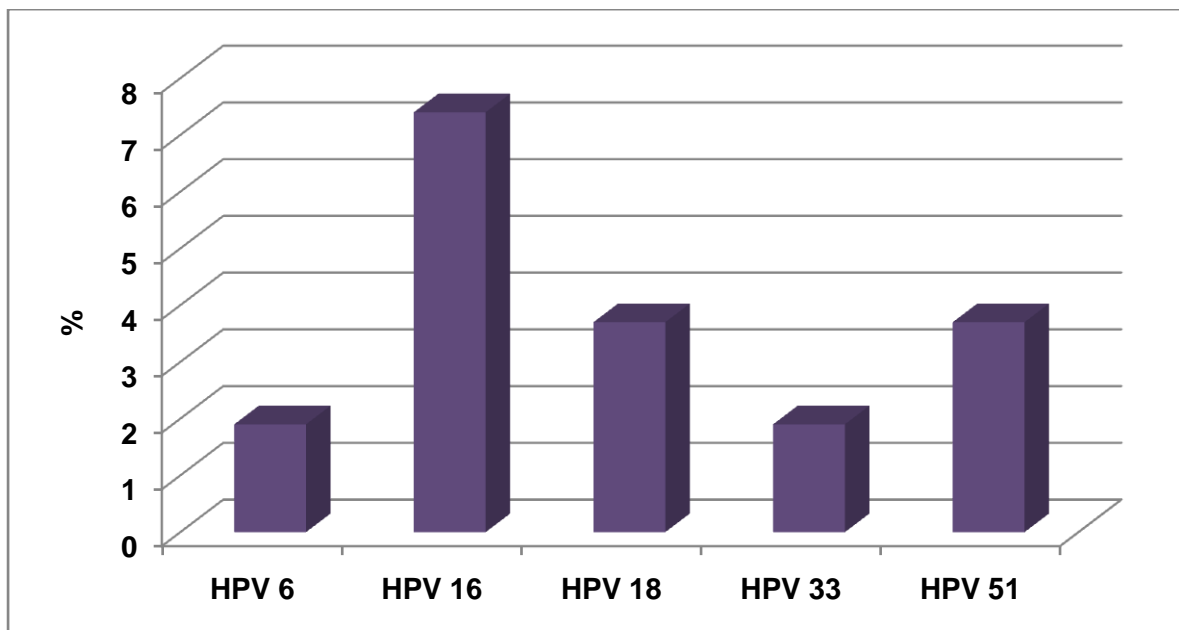
Ανάλογα με την εντόπιση των λαρυγγικών καρκίνων, HPV λοίμωξη ανιχνεύτηκε στο 18.2% των γλωττιδικών (6/33), στο 18.8% των υπεργλωττιδικών (3/16) και στο 20.0% των διαγλωττιδικών καρκινωμάτων (1/5) **(Πίνακας 15)**.

Με βάση τα αποτελέσματα των μικροσυστοιχιών, στα ακανθοκυτταρικά καρκινώματα της γλωττιδικής μοίρας ανιχνεύτηκαν οι HPV 16 και 51 σε ποσοστό 6.1% (2/33) έκαστος, καθώς και οι HPV 6 και 18 σε ποσοστό 3.0% (1/33) έκαστος. Αντίστοιχα, στα ακανθοκυτταρικά καρκινώματα της υπεργλωττιδικής μοίρας βρέθηκαν οι HPV 16 (12.5%, 2/16) και HPV 33 (6.3%, 1/16), ενώ στα ακανθοκυτταρικά διαγλωττιδικά καρκινώματα το μοναδικό στέλεχος που ανιχνεύτηκε ήταν ο HPV 18 σε ποσοστό 20% (1/5) **(Σχήμα 14)**.

Σχήμα 12. Συχνότητα ανίχνευσης του HPV στο σύνολο των ακανθοκυτταρικών καρκινωμάτων του λάρυγγα



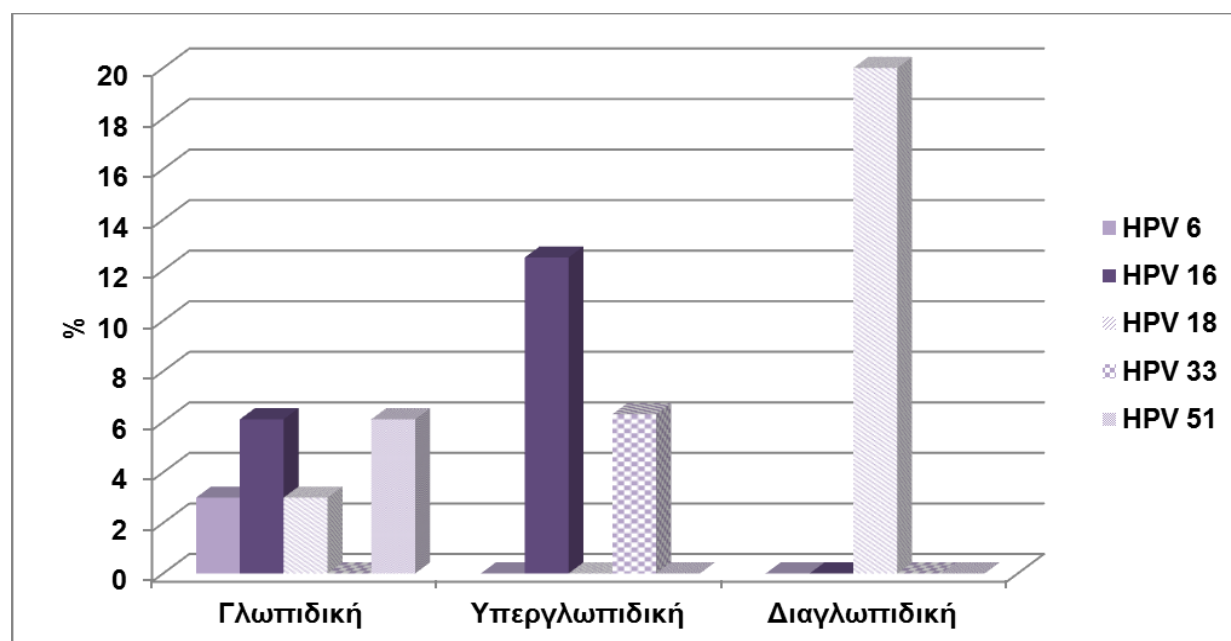
Σχήμα 13. Κατανομή των στελεχών του HPV στο σύνολο των ακανθοκυτταρικών καρκινωμάτων του λάρυγγα



Πίνακας 15. Συχνότητα ανίχνευσης του HPV με βάση την εντόπιση των ακανθοκυτταρικών καρκινωμάτων του λάρυγγα

Εντόπιση	N	HPV + (%)
Γλωττιδική	33	18.2
Υπεργλωττιδική	16	18.8
Υπογλωττιδική	5	20.0

Σχήμα 14. Κατανομή των στελεχών του HPV με βάση την εντόπιση των ακανθοκυτταρικών καρκινωμάτων του λάρυγγα



Μονοπαραγοντική ανάλυση

Οι μονοπαραγοντικές σχέσεις μεταξύ της HPV λοίμωξης και τα χαρακτηριστικά του πληθυσμού φαίνονται στον Πίνακα 13. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ της ανίχνευσης του HPV και της μη χρήσης καπνού (46.7% vs. 7.7%, $p= 0.001$). Επίσης, η ανίχνευση του HPV συσχετίστηκε με τη μη έκθεση σε παράγοντες κινδύνου (50,0% vs. 9.5%, $p= 0.001$ και τους πτωχά διαφοροποιημένους όγκους (46.2% vs. 9.8%, $p= 0.003$). Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές σχέσεις μεταξύ της ανίχνευσης του HPV και του φύλου, του ιστορικού χρήσης αλκοόλ, του σταδίου της νόσου και της τοπικής υποτροπής (**Πίνακας 16**).

Πολυπαραγοντική ανάλυση

Οι μεταβλητές που βρέθηκαν να είναι στατιστικά σημαντικές (μη χρήση καπνού, μη έκθεση σε παράγοντες κινδύνου και πτωχή διαφοροποίηση) μελετήθηκαν περαιτέρω με πολυπαραγοντική ανάλυση προκειμένου να διερευνηθούν οι μεταβλητές που σχετίζονταν ανεξάρτητα με την HPV λοίμωξη. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του πολυπαραγοντικού μοντέλου ανάλυσης, οι καρκίνοι με πτωχή διαφοροποίηση ήταν περισσότερο πιθανό να είναι θετικοί στην HPV λοίμωξη σε σχέση με εκείνους μέτριας ή καλής διαφοροποίησης. Η σχέση αυτή ήταν οριακά στατιστικά σημαντική (OR, 5.43; 95%CI, 0.87 - 33.8, $p= 0.0697$)(**Πίνακας 17**). Δεν επιβεβαιώθηκε στην πολυπαραγοντική ανάλυση η σχέση μεταξύ της HPV λοίμωξης και της μη χρήσης καπνού, καθώς μεταξύ της HPV λοίμωξης και της μη έκθεσης στους παράγοντες κινδύνου ($p= 0.998$).

Πίνακας 16. Συσχέτιση HPV λοίμωξης με κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά στο σύνολο των ασθενών με ακανθοκυτταρικά καρκινώματα του λάρυγγα (Μονοπαραγοντική ανάλυση)

Χαρακτηριστικά/παράγοντες κινδύνου	N	HPV + N (%)	p value
Ηλικία			0.386
≤60 [§]	17	2 (11.8)	
>60	37	8 (21.6)	
Φύλο			0.426
Ανδρες [§]	38	6 (15.8)	
Γυναίκες	16	4 (25.0)	
Χρήση καπνού			0.001
Μη καπνιστές [§]	15	7 (46.7)	
Καπνιστές	39	3 (7.7)	
Χρήση αλκοόλ			0.132
Μη πότες [§]	38	9 (23.7)	
Πότες	16	1 (6.3)	
Χρήση καπνού/Χρήση αλκοόλ			0.001
Μη καπνιστές/ Μη πότες [§]	12	6 (50.0)	
Καπνιστές ή/και πότες	42	4 (9.5)	
Στάδιο νόσου			0.543
I-II [§]	39	8 (20.5)	
III-IV	15	2 (13.3)	
Ιστολογική διαφοροποίηση			0.003
Μέτρια/ Καλή [§]	41	4 (9.8)	
Πτωχή	13	6 (46.2)	
Τοπική υποτροπή			0.132
Ναι	16	1 (6.3)	
Όχι	38	9 (23.7)	

[§]Κατηγορία αναφοράς

Πίνακας 17. Πολυπαραγοντική ανάλυση: παράγοντες θετικότητας στην HPV λοίμωξη στο σύνολο των ασθενών με ακανθοκυτταρικά καρκινώματα του λάρυγγα

Μεταβλητές	Σχετική συχνότητα (OddsRatio, OR)	95% CI ^s	p value
Ιστολογική διαφοροποίηση			0.0697
Μέτρια/ Καλή	1		
Πτωχή	5.43	0.87 – 33.8	

§Όρια αξιοπιστίας

6.4. Ασθενείς με ακανθοκυτταρικά καρκινώματα του στοματοφάρυγγα

Χαρακτηριστικά ασθενών

Η ομάδα των 12 ασθενών με ακανθοκυτταρικά καρκινώματα του στοματοφάρυγγα αποτελείτο από 8 άνδρες (66.7%) και 4 γυναίκες (33.3%) μεταξύ 33 και 83 ετών (μέση ηλικία 55.5 έτη). Ένα σημαντικό ποσοστό του υπό μελέτη πληθυσμού ήταν χρήστες καπνού (66.7%, 8/12) και το 50.0% είχε ιστορικό χρήσης αλκοόλ (6/12). Επιπλέον, το 83.3% των ασθενών (10/12) εκτίθεντο σε παράγοντες κινδύνου (κάπνισμα ή/ και κατανάλωση αλκοόλ). Σύμφωνα με τη σταδιοποίηση κατά TNM, 3 ασθενείς είχαν νόσο σταδίου I (25.0%), 3 ασθενείς σταδίου II (25.0%), 4 ασθενείς σταδίου III (33.3%) και 2 ασθενείς σταδίου IV (16.7%). Ως προς την ιστολογική διαφοροποίηση, 3 καρκίνοι ήταν καλής (25.0%), 3 μέτριας (25.0%) και 6 πτωχής διαφοροποίησης (50.0%). Η πλειονότητα των ακανθοκυτταρικών καρκινωμάτων του στοματοφάρυγγα αφορούσε στις αμυγδαλές (75.0%, 9/12), ενώ τα υπόλοιπα εντοπίστηκαν στο οπίσθιο τοίχωμα του στοματοφάρυγγα (25.0%, 3/12).

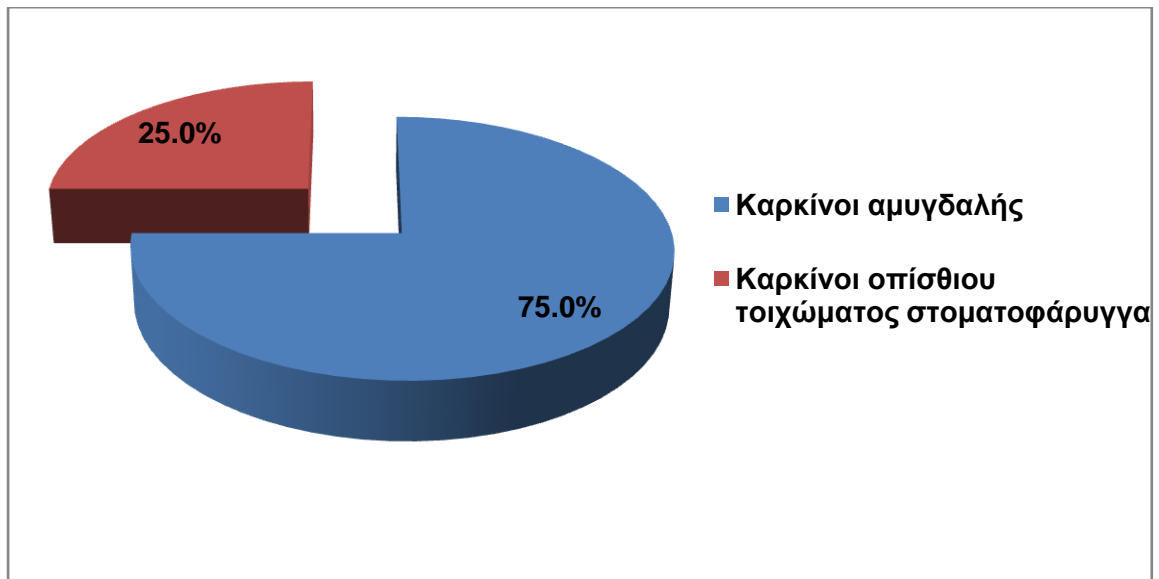
Η θεραπευτική αντιμετώπιση των καρκίνων του στοματοφάρυγγα περιελάμβανε χειρουργική επέμβαση σε 4 ασθενείς (33.3%), χειρουργική επέμβαση και συνδυασμένη χημειο- ακτινοθεραπεία σε 6 ασθενείς (50.0%) και ακτινοθεραπεία σε 2 ασθενείς (16.7%). Έπειτα από παρακολούθηση 2 ετών, 4 ασθενείς ευρέθησαν με τοπική υποτροπή (33.3%) και 8 ασθενείς χωρίς κλινικοεργαστηριακά ευρήματα τοπικής υποτροπής (66.7%) **(Πίνακας 18, Σχήματα 15 και 16)**

Πίνακας 18. Κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά ασθενών με ακανθοκυτταρικά καρκινώματα του στοματοφάρυγγα

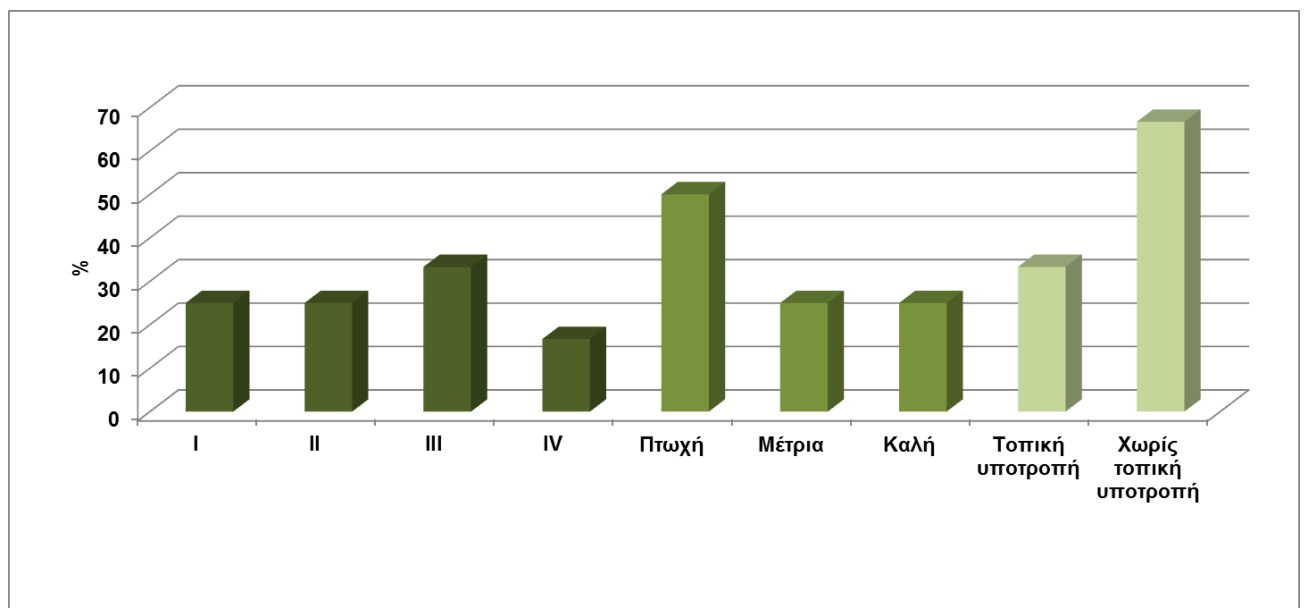
Χαρακτηριστικά	N (%)
Αριθμός ασθενών	12
Ηλικία	
Μέση	55.5 ± 13.5
Διάμεσος	53
Εύρος	33-83
Φύλο	
Άνδρες	8 (66.7)
Γυναίκες	4 (33.3)
Χρήση καπνού	
Καπνιστές	8 (66.7)
Μη καπνιστές	4 (33.3)
Χρήση αλκοόλ	
Πότες	6 (50.0)
Μη πότες	6 (50.0)
Χρήση καπνού/Χρήση αλκοόλ	
Καπνιστές ή/και πότες	10 (83.3)
Μη καπνιστές/ Μη πότες	2 (16.7)
Στάδιο νόσου	
I	3 (25.0)
II	3 (25.0)
III	4 (33.3)
IV	2 (16.7)
Ιστολογική διαφοροποίηση	
Πτωχή	6 (50.0)
Μέτρια	3 (25.0)
Καλή	3 (25.0)

Ανατομική εντόπιση	
Αμυγδαλές	9 (75.0)
Οπίσθιο τοίχωμα στοματοφάρυγγα	3 (25.0)
Θεραπεία	
Χειρουργική	4 (33.3)
Χειρουργική + α/θ + χ/θ	6 (50.0)
α/θ	2 (16.7)
Τοπική υποτροπή	
Ναι	4 (33.3)
Όχι	8 (66.7)

Σχήμα 15. Κατανομή των ακανθοκυτταρικών καρκινωμάτων του στοματοφάρυγγα με βάση την εντόπισή τους



Σχήμα 16. Κατανομή των ακανθοκυτταρικών καρκινωμάτων του στοματοφάρυγγα με βάση το στάδιο κατά TNM, την ιστολογική διαφοροποίηση και την ανάπτυξη ή όχι τοπικής υποτροπής



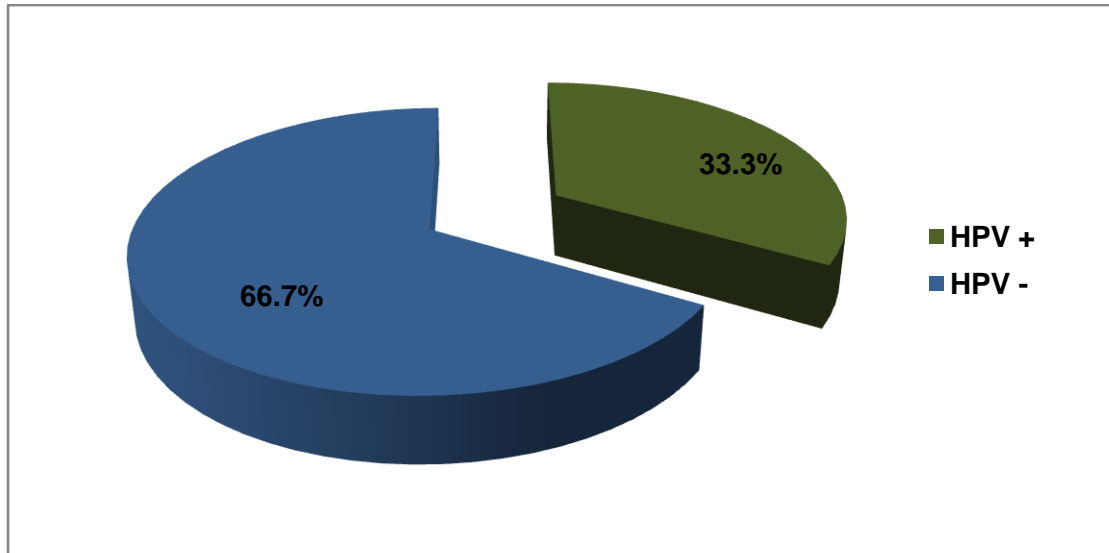
Ανίχνευση και τυποποίηση των στελεχών του HPV στα ακανθοκυτταρικά καρκινώματα του στοματοφάρυγγα

4 από τους 12 ασθενείς με ακανθοκυτταρικά καρκινώματα του στοματοφάρυγγα βρέθηκαν θετικοί στον HPV (33.3%), ενώ η τυποποίηση του ιού με τη μέθοδο των μικροσυστοιχιών ανέδειξε τον HPV 16 με ποσοστό 16.7% (2/12), ακολουθούμενο από τα στελέχη HPV 18 και HPV 33 με ποσοστό 8.3% (1/12) έκαστο **(Σχήματα 17 και 18)**.

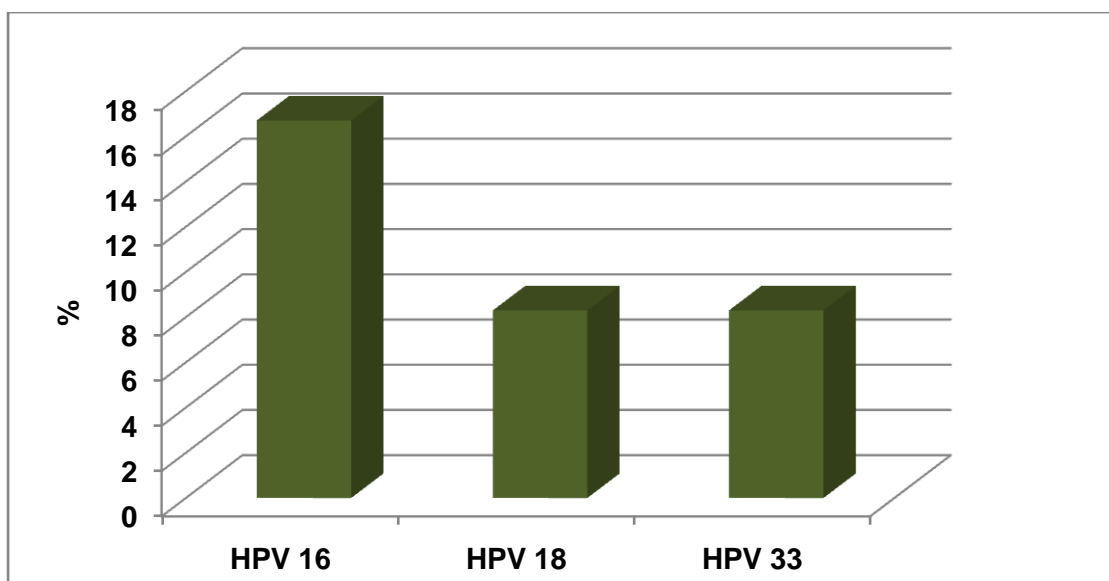
Ανάλογα με την εντόπιση των στοματικών καρκίνων, HPV λοίμωξη ανιχνεύτηκε στο 33.3% των ακανθοκυτταρικών καρκινωμάτων της αμυγδαλής (3/9) και στο 33.3% του οπίσθιου τοιχώματος του στοματοφάρυγγα (1/3). **(Πίνακας 19)**.

Με βάση τα αποτελέσματα των μικροσυστοιχιών, στα ακανθοκυτταρικά καρκινώματα της αμυγδαλής ανιχνεύτηκαν οι HPV 16 σε ποσοστό 22.2% (2/9), καθώς και ο HPV 33 σε ποσοστό 11.1% (1/9). Αντίθετα, ο HPV 18 ήταν το μοναδικό στέλεχος που ανιχνεύτηκε στα ακανθοκυτταρικά καρκινώματα του οπίσθιου τοιχώματος του στοματοφάρυγγα σε ποσοστό 33.3% (1/3) **(Σχήμα 19)**.

Σχήμα 17. Συχνότητα ανίχνευσης του HPV στο σύνολο των ακανθοκυτταρικών καρκινωμάτων του στοματοφάρυγγα



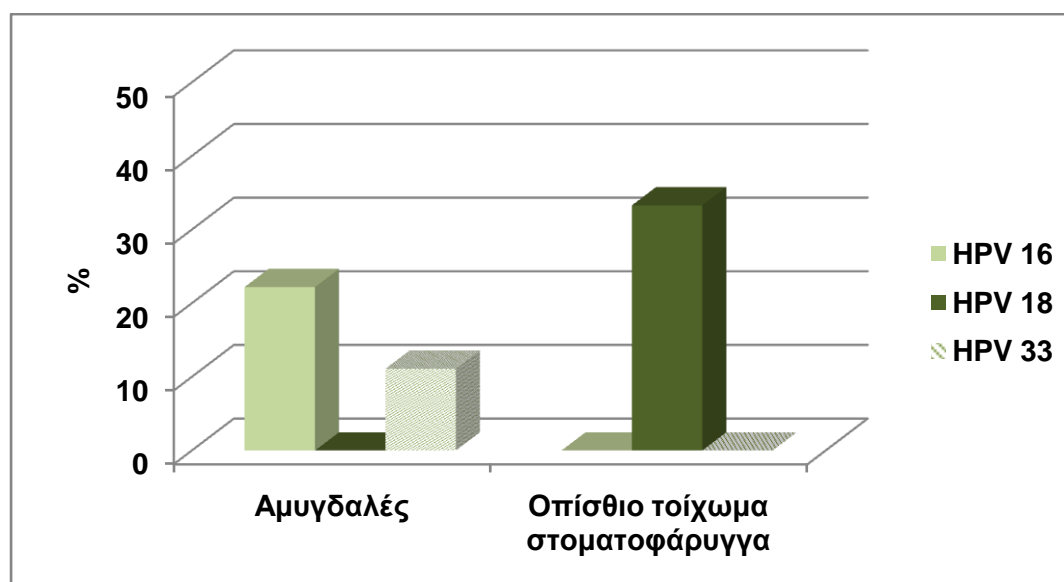
Σχήμα 18. Κατανομή των στελεχών του HPV στο σύνολο των ακανθοκυτταρικών καρκινωμάτων του στοματοφάρυγγα



Πίνακας 19. Συχνότητα ανίχνευσης του HPV με βάση την εντόπιση των ακανθοκυτταρικών καρκινωμάτων του στοματοφάρυγγα

Εντόπιση	N	HPV + (%)
Αμυγδαλές	9	33.3
Οπίσθιο τοίχωμα στοματοφάρυγγα	3	33.3

Σχήμα 19. Κατανομή των στελεχών του HPV με βάση την εντόπιση των ακανθοκυτταρικών καρκινωμάτων του στοματοφάρυγγα



6.5. Ασθενείς με ακανθοκυτταρικά καρκινώματα του υποφάρυγγα, του ρινοφάρυγγα και της ρινικής κοιλότητας

Χαρακτηριστικά ασθενών

Η ομάδα των 5 ασθενών με ακανθοκυτταρικά καρκινώματα του **υποφάρυγγα** αποτελείτο από 4 άνδρες και 1 γυναίκα μεταξύ 50 και 73 ετών (μέση ηλικία 57.2 έτη). 3 από τους 5 ασθενείς ήταν χρήστες καπνού, ενώ 1 από τους 5 είχε ιστορικό χρήσης αλκοόλ. Επιπλέον, 3 ασθενείς εκτίθεντο σε παράγοντες κινδύνου (κάπνισμα ή/ και κατανάλωση αλκοόλ). Σύμφωνα με τη σταδιοποίηση κατά TNM, 2 ασθενείς είχαν νόσο σταδίου II, 2 ασθενείς σταδίου III και 1 ασθενής σταδίου IV. Ως προς την ιστολογική διαφοροποίηση 2 καρκίνοι ήταν καλής, 2 μέτριας και 1 πτωχής διαφοροποίησης. Η θεραπευτική αντιμετώπιση των καρκίνων του υποφάρυγγα περιελάμβανε χειρουργική επέμβαση και συνδυασμένη χημειο- ακτινοθεραπεία σε 4 από τους 5 ασθενείς και ακτινοθεραπεία σε 1 ασθενή. Έπειτα από παρακολούθηση 2 ετών, 3 ασθενείς ευρέθησαν με τοπική υποτροπή και 2 ασθενείς χωρίς κλινικοεργαστηριακά ευρήματα τοπικής υποτροπής (**Πίνακας 20**).

Η ομάδα των 5 ασθενών με ακανθοκυτταρικά καρκινώματα του **ρινοφάρυγγα** αποτελείτο μόνο από άνδρες μεταξύ 30 και 72 ετών (μέση ηλικία 56.4 έτη). Όλοι οι ασθενείς ήταν χρήστες καπνού, ενώ 4 από τους 5 είχαν ιστορικό χρήσης αλκοόλ. Σύμφωνα με τη σταδιοποίηση κατά TNM, 1 ασθενής είχε νόσο σταδίου II, 2 ασθενείς σταδίου III και 2 ασθενείς σταδίου IV. Ως προς την ιστολογική διαφοροποίηση 3 καρκίνοι ήταν καλής, 1 μέτριας και 1 πτωχής διαφοροποίησης. Η θεραπευτική αντιμετώπιση των καρκίνων του ρινοφάρυγγα περιελάμβανε χειρουργική επέμβαση σε 1 από τους 5 ασθενείς, χειρουργική επέμβαση και συνδυασμένη χημειο- ακτινοθεραπεία σε 1 ασθενή και ακτινοθεραπεία σε 3 ασθενείς. Έπειτα από παρακολούθηση 2 ετών, 3 ασθενείς ευρέθησαν με τοπική υποτροπή και 2 ασθενείς χωρίς κλινικοεργαστηριακά ευρήματα τοπικής υποτροπής (**Πίνακας 21**).

Η ομάδα των 3 ασθενών με ακανθοκυτταρικά καρκινώματα της **ρινικής κοιλότητας** αποτελείτο από 2 άνδρες και 1 γυναίκα μεταξύ 67 και 74 ετών (μέση ηλικία 70.7 έτη). Όλοι οι ασθενείς ήταν χρήστες καπνού, ενώ 2 από

τους 3 είχαν ιστορικό χρήσης αλκοόλ. Σύμφωνα με τη σταδιοποίηση κατά TNM, 2 ασθενείς είχε νόσο σταδίου II και 1 ασθενής σταδίου IV. Ως προς την ιστολογική διαφοροποίηση 2 καρκίνοι ήταν μέτριας και 1 πτωχής διαφοροποίησης. Η θεραπευτική αντιμετώπιση των καρκίνων του ρινοφάρυγγα περιελάμβανε χειρουργική επέμβαση σε 2 από τους 3 ασθενείς και χειρουργική επέμβαση και συνδυασμένη χημειο- ακτινοθεραπεία σε 1 ασθενή. Έπειτα από παρακολούθηση 2 ετών όλοι οι ασθενείς ευρέθησαν με τοπική υποτροπή (Πίνακας 22).

Πίνακας 20. Κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά ασθενών με ακανθοκυτταρικά καρκινώματα του υποφάρυγγα

Χαρακτηριστικά	N (%)
Αριθμός ασθενών	5
Μέση ηλικία	57.2 ± 10.5
Φύλο	
Ανδρας	4
Γυναίκα	1
Χρήση καπνού	
Καπνιστές	3
Μη καπνιστές	2
Χρήση αλκοόλ	
Πότες	1
Μη πότες	4
Χρήση καπνού/Χρήση αλκοόλ	
Καπνιστές ή/και πότες	3
Μη καπνιστές/ Μη πότες	2
Στάδιο νόσου	
II	2
III	2
IV	1

Ιστολογική διαφοροποίηση	
Πτωχή	1
Μέτρια	2
Καλή	2

Πίνακας 21. Κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά ασθενών με ακανθοκυτταρικά καρκινώματα του ρινοφάρυγγα

Χαρακτηριστικά	N (%)
Αριθμός ασθενών	5
Μέση ηλικία	56.4 ± 18.1
Φύλο	
Ανδρας	5
Γυναίκα	0
Χρήση καπνού	
Καπνιστές	5
Μη καπνιστές	0
Χρήση αλκοόλ	
Πότες	4
Μη πότες	1
Χρήση καπνού/Χρήση αλκοόλ	
Καπνιστές ή/και πότες	5
Μη καπνιστές/ Μη πότες	0
Στάδιο νόσου	
II	1
III	2
IV	2

Ιστολογική διαφοροποίηση	
Πτωχή	1
Μέτρια	1
Καλή	3

Πίνακας 22. Κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά ασθενών με ακανθοκυτταρικά καρκινώματα της ρινικής κοιλότητας

Χαρακτηριστικά	N (%)
Αριθμός ασθενών	3
Μέση ηλικία	70.7 ± 3.51
Φύλο	
Άνδρας	2
Γυναίκα	1
Χρήση καπνού	
Καπνιστές	3
Μη καπνιστές	0
Χρήση αλκοόλ	
Πότες	2
Μη πότες	1
Χρήση καπνού/Χρήση αλκοόλ	
Καπνιστές ή/και πότες	3
Μη καπνιστές/ Μη πότες	0
Στάδιο νόσου	
II	2
IV	1
Ιστολογική διαφοροποίηση	
Πτωχή	1
Μέτρια	2

Ανίχνευση και τυποποίηση των στελεχών του HPV στα ακανθοκυτταρικά καρκινώματα του υποφάρυγγα, του ρινοφάρυγγα και της ρινικής κοιλότητας

1 από τους 5 ασθενείς με ακανθοκυτταρικά καρκινώματα του **υποφάρυγγα** βρέθηκε θετικός στον HPV, ενώ η τυποποίηση του ιού με τη μέθοδο των μικροσυστοιχιών ανέδειξε τον HPV 51. Όσον αφορά τους 5 ασθενείς με ακανθοκυτταρικά καρκινώματα του **ρινοφάρυγγα**, 2 βρέθηκαν θετικοί στον HPV, ενώ η τυποποίηση του ιού με τη μέθοδο των μικροσυστοιχιών ανέδειξε τον HPV 6 και HPV 16, ενώ σε κανέναν από τους 3 ασθενείς με ακανθοκυτταρικά καρκινώματα της **ρινικής κοιλότητας** δεν ανιχνεύτηκε ο HPV(Πίνακας 23).

Πίνακας 23. Συχνότητα ανίχνευσης του HPV με βάση την εντόπιση των ακανθοκυτταρικών καρκινωμάτων του στοματοφάρυγγα

Εντόπιση	N	HPV + (N)
Υποφάρυγγας	5	1
Ρινοφάρυγγας	5	2
Ρινική κοιλότητα	3	0

7. Συζήτηση

Η διεθνής βιβλιογραφία παρουσιάζει πληθώρα αναφορών σχετικά με την επιτυχή ανίχνευση του DNA του ιού HPV σε ανθρώπινους καρκίνους, ιδιαίτερα μελέτες που αφορούν τον ρόλο του ιού στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Τα στελέχη υψηλού κινδύνου του ιού HPV έχουν την ικανότητα να επάγουν καρκινογένεση μέσω της δράσης των ογκοπρωτεϊνών τους E6 και E7. Αυτές οι ογκοπρωτεΐνες αναστέλλουν τη λειτουργία των ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών p53 και pRB, γεγονός το οποίο οδηγεί στην απορρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και την αναστολή του μηχανισμού της απόπτωσης.

Το 1983 οι Syrjanen και συν. πρότειναν μια πιθανή σχέση μεταξύ της HPV λοίμωξης και της ανάπτυξης νεοπλασμάτων στην περιοχή της κεφαλής και του τραχήλου (319). Έκτοτε ο HPV αναγνωρίστηκε ως ένας βασικός αιτιολογικός παράγοντας για τον καρκίνο της στοματικής κοιλότητας. Πρόσφατη συστηματική βιβλιογραφική ανασκόπηση κατέληξε στο συμπέρασμα πως ο HPV αποτελεί τον ισχυρότερο ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα στα ακανθοκυτταρικά καρκινώματα κεφαλής και τραχήλου (AKKT) (320). Όμως, ο επιπολασμός του HPV στα AKKT ποικίλλει μεταξύ των μελετών και εμφανίζεται συνήθως υψηλότερος στα πρωτοπαθή νεοπλάσματα του στοματοφάρυγγος (321- 323).

Τα HPV (+) AKKT διαφέρουν ως προς την αιτιολογία τους συγκριτικά με τα HPV (-) AKKT, ενώ παράλληλα χαρακτηρίζονται από ένα διαφορετικό γενετικό και μοριακό προφίλ (254, 265). Επιπλέον, οι HPV (+) ασθενείς εμφανίζουν καλύτερη ανταπόκριση στη χημειο- ακτινοθεραπεία και έχουν βελτιωμένη επιβίωση σε σχέση με τους HPV (-) ασθενείς (124, 251). Συνεπώς, η γνώση της HPV κατάστασης, κυρίως στους ασθενείς με νεοπλάσματα του στοματοφάρυγγος, θα μπορούσε να επηρεάσει τη θεραπευτική διαχείριση αυτών καθώς και την επιβίωση τους. Ο ακριβής μηχανισμός στον οποίο οφείλονται τα ευνοϊκότερα ογκολογικά και κλινικά αποτελέσματα δεν έχει αποσαφηνιστεί, ωστόσο θα μπορούσε να στηρίζεται στο γεγονός ότι: α) το γονιδίωμα των HPV (+) καρκινικών κυττάρων είναι λιγότερο ασταθές ή/και β) τα HPV (+) κύτταρα είναι επιρρεπή στην υποξία και επομένως οδηγούνται

ευκολότερα σε απόπτωση ή γ) η θεραπεία βελτιώνει την τοπική ανοσία διευκολύνοντας την εκκρίζωση του ιού HPV και την υποστροφή του όγκου (324, 325).

Η αιτιολογική συσχέτιση μεταξύ της λοίμωξης από HPV στελέχη υψηλού κινδύνου και του καρκίνου του στοματοφάρυγγος είναι αδιαμφισβήτητη. Διάφορες μελέτες έχουν επίσης αναφέρει την εμπλοκή των στελεχών υψηλού κινδύνου του ιού σε μια υποομάδα νεοπλασμάτων άλλων ανατομικών περιοχών της κεφαλής και του τραχήλου, όπως της στοματικής κοιλότητας, του λάρυγγος και του ρινοφάρυγγος (126, 182, 254). Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν ο προσδιορισμός της συχνότητας ανίχνευσης του DNA του ιού HPV και των χαμηλού και υψηλού κινδύνου στελεχών αυτού, σε περιστατικά πρωτοπαθών ΑΚΚΤ από διάφορες περιοχές (στοματική κοιλότητα, στοματοφάρυγγας, λάρυγγας, υποφάρυγγας, ρινοφάρυγγας και ρινική κοιλότητα), χρησιμοποιώντας τη μέθοδο PCR και την τεχνολογία των μικροσυστοιχιών. Επιπρόσθετο σκοπό αυτής της έρευνας αποτέλεσε η συσχέτιση μεταξύ HPV λοίμωξης και μιας σειράς δημογραφικών/κλινικοπαθολογικών παραμέτρων σε ασθενείς με ΑΚΚΤ, καθώς και του κλινικού αποτελέσματος (έλεγχος τοπικής υποτροπής νόσου).

Επιπολασμός του ιού HPV στα ΑΚΚΤ

Ο επιπολασμός του ιού HPV στο σύνολο των 137 Ελλήνων ασθενών με ΑΚΚΤ ήταν 17.5%. Τα δεδομένα από τον ελληνικό χώρο είναι αρκετά περιορισμένα με μία μόνο μελέτη να αναφέρει ότι το 13% των ΑΚΚΤ είναι θετικό στην ανίχνευση του HPV (326). Παρόμοιες τιμές επιπολασμού έχουν καταγραφεί σε άλλες μελέτες (13%- 19%) (265, 322), ενώ υψηλότερα ποσοστά έχουν παρατηρηθεί στη συστηματική ανασκόπηση του Kreimer και συν. (25.9%) (125) καθώς και στη μετα- ανάλυση του Dayyani και συν. (22%) (324). Οι αναφορές στη συχνότητα ανίχνευσης του HPV στα ΑΚΚΤ ποικίλλουν και εξαρτώνται από την ανατομική εντόπιση των νεοπλασμάτων, τον αριθμό των εξετασθέντων περιστατικών, το είδος και τη γεωγραφική προέλευση του δείγματος, καθώς και από τις μεθόδους που εφαρμόζονται για την ανίχνευση του DNA του ιού. Σε πρόσφατη συστηματική ανασκόπηση και μετα- ανάλυση

σε πληθυσμούς από την Ευρώπη ο επιπολασμός του HPV κατεγράφη στο 40% και είναι παρόμοιος με εκείνον που έχει αναφερθεί σε προηγούμενη μετα- ανάλυση σε Ευρωπαϊκούς πληθυσμούς (34.5%) (248) αλλά και σε παγκόσμια κλίμακα (39.7%) (327). Αντίθετα, σε άλλες μελέτες HPV λοίμωξη ανιχνεύεται σε υψηλότερα ποσοστά (61%- 67.6%) (328, 329).

Ανάλογα με την εντόπιση των νεοπλασμάτων, ο ρινοφάρυγγας παρουσίασε το υψηλότερο ποσοστό θετικότητας στον HPV (40%), ακολουθούμενος από τον στοματοφάρυγγα (33.3%), τον υποφάρυγγα (20%), το λάρυγγα (18.5%) και τη στοματική κοιλότητα (12.1%). Ο επιπολασμός του HPV στην παρούσα μελέτη δεν διέφερε σε επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας μεταξύ των περιοχών της κεφαλής και του τραχήλου. Είναι επίσης σκόπιμο να αναφερθεί ότι το ποσοστό ανίχνευσης HPV λοίμωξης στο ΑΚ του υποφάρυγγος εμφανίζεται υψηλότερο συγκριτικά με εκείνο που καταγράφεται σε άλλες μελέτες (124, 330). Το εύρημα αυτό είναι πιθανό να οφείλεται στο μικρό αριθμό περιστατικών νεοπλασμάτων του υποφάρυγγος και επομένως θα πρέπει να λαμβάνεται υπ' όψιν με προσοχή. Αντίστοιχα, ο εξίσου περιορισμένος αριθμός δειγμάτων από την περιοχή του ρινοφάρυγγα δεν επιτρέπει τη διεξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων όσον αφορά τον επιπολασμό του ιού HPV στα ΑΚ του ρινοφάρυγγος. Γενικότερα, η ανίχνευση του HPV παρουσιάζει ευρεία διακύμανση στα νεοπλάσματα του ρινοφάρυγγος και κυμαίνεται μεταξύ 9%- 51% (331). Υψηλότερο ποσοστό (73%) έχει παρατηρηθεί στη μελέτη της Maxwell και συν. από τη Βόρειο Αμερική (332), ενώ αντίθετα στη μελέτη του Giannoudis και συν. το 44% των Ελλήνων ασθενών με ΑΚ του ρινοφάρυγγος ήταν HPV (+) (333).

Στους ασθενείς της παρούσας μελέτης με ΑΚ του στοματοφάρυγγος, το ποσοστό ανίχνευσης της HPV λοίμωξης είναι παρόμοιο με εκείνο που αναφέρεται στη διεθνή βιβλιογραφία (36%) (125). Υψηλότερες τιμές επιπολασμού (47.7%) έχουν καταγραφεί στη συστηματική ανασκόπηση και μετα- ανάλυση του Mehanna και συν. (248), αλλά και στη μελέτη του Romanitan και συν. (43%) η οποία αφορούσε Έλληνες ασθενείς (326). Τα παραπάνω δεδομένα σε συνδυασμό με τη διαπίστωση ότι ο HPV αποτελεί θετικό προγνωστικό παράγοντα επιβίωσης μόνο για τους ασθενείς με νεοπλάσματα του στοματοφάρυγγος (325), αποδεικνύουν τον καθοριστικό

ρόλο που διαδραματίζει ο ιός στην ανάπτυξη αυτών των νεοπλασμάτων. Μία πιθανή εξήγηση για τη μεγαλύτερη σημασία του HPV στην καρκινογένεση του στοματοφάρυγγα συγκριτικά με τις υπόλοιπες περιοχές της κεφαλής και του τραχήλου, θα μπορούσε να είναι η τοπική φλεγμονώδης αντίδραση η οποία λαμβάνει χώρα τόσο στον τράχηλο της μήτρας όσο και στις αμυγδαλές. Θεωρητικά, η παραγωγή αυξητικών παραγόντων από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος κατά τη διάρκεια της ανοσολογικής απάντησης διευκολύνει την ανάπτυξη όγκου. Εναλλακτικά, η δικτυωτή διαμόρφωση του επιθηλίου των αμυγδαλικών κρυπτών βοηθάστη μόλυνση από τον HPV, γεγονός που οδηγεί στη μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης του ιού στις αμυγδαλές.

Επίσης, παρατηρήσαμε χαμηλότερες τιμές επιπολασμού της HPV λοίμωξης στα ΑΚ της στοματικής κοιλότητας και του λάρυγγος συγκριτικά με εκείνα του στοματοφάρυγγος, εύρημα το οποίο έχει παρατηρηθεί και στην πλειονότητα των μελετών της διεθνούς βιβλιογραφίας (124, 125). Επομένως, σε αντίθεση με την περιοχή του στοματοφάρυγγος, ένα μόλις μικρό ποσοστό νεοπλασμάτων της στοματικής κοιλότητας και του λάρυγγος είναι πιθανό να οφείλεται στην ογκογόνο δράση των στελεχών υψηλού κινδύνου του HPV.

Χαρακτηριστικά, η μελέτη μας ανέδειξε HPV λοίμωξη σε ασθενείς με ΑΚ της στοματικής κοιλότητας σε ακόμα χαμηλότερο ποσοστό, από τον αντίστοιχο μειωμένο επιπολασμό που αναφέρεται στη μετα- ανάλυση του Kreimer και συν. για την Ευρώπη και Βόρεια Αμερική (16%) (125). Ωστόσο, στην ίδια μελέτη ο επιπολασμός του HPV υπολογίστηκε στο 33% για την Ασία δείχνοντας ότι η ανίχνευση του ιού επηρεάζεται από τη γεωγραφική προέλευση του δείγματος. Επιπλέον, άλλες μελέτες αναφέρουν υψηλότερα ποσοστά ανίχνευσης του HPV τα οποία φτάνουν το 74% (321, 334), ενώ σε μία μελέτη από τον ελλαδικό χώρο μόλις το 3% των ΑΚ της στοματικής κοιλότητας ήταν HPV (+) (326).

Όσον αφορά τα νεοπλάσματα του λάρυγγος, το ποσοστό ανίχνευσης του HPV είναι παρόμοιο με τις τιμές επιπολασμού που αναφέρει η μετα- ανάλυση του Kreimer και συν. για τους Ευρωπαϊκούς πληθυσμούς (21%), ενώ πιο αυξημένος είναι ο επιπολασμός του ιού σε χώρες της Ασίας (48.5%) (125). Τα

δεδομένα για την HPV λοίμωξη σε Έλληνες ασθενείς με ΑΚ του λάρυγγος είναι αρκετά περιορισμένα και αντικρουόμενα μεταξύ των μελετών. Ειδικότερα, ο Souvínos και συν. έδειξαν ότι το 10% των νεοπλασμάτων του λάρυγγος ήταν HPV (+) (335) σύμφωνα και με άλλες μελέτες παγκοσμίως (125,240). Αντίθετα, στη μελέτη του Vlachtsis και συν. παρατηρήθηκε υψηλότερη συχνότητα του HPV σε ασθενείς με ΑΚ του λάρυγγος (40%) (336) η οποία είναι παρόμοια με εκείνη που κατεγράφη σε άλλες διεθνείς μελέτες (337, 338). Λαμβάνοντας υπ' όψιν τη ζώνη πρωίμου πλακώδους μεταπλασίας η οποία εντοπίζεται στο λάρυγγα και είναι παρόμοια με εκείνη στον τράχηλο της μήτρας, θα μπορούσε να αποτελεί μία περιοχή ευάλωτη στη λοίμωξη από τον HPV.

Οι διαφορές που παρατηρούνται στα ποσοστά ανίχνευσης του HPV τόσο στα νεοπλάσματα της στοματικής κοιλότητας όσο και σε εκείνα του λάρυγγος, ενδεχομένως αντικατοπτρίζουν τις διαφορές στα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των εξετασθέντων ασθενών ανά μελέτη, τη γεωγραφική προέλευση, ανατομική εντόπιση και αριθμό των δειγμάτων καθώς και τα χρησιμοποιούμενα πρωτόκολλα (327). Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι σε μία μετα- ανάλυση η οποία αφορούσε νεοπλάσματα του λάρυγγος, ο επιπολασμός του HPV βρέθηκε υψηλότερος στις μελέτες στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν μοριακές τεχνικές βασισμένες στη μέθοδο PCR συγκριτικά με εκείνον που ανέδειξαν οι μη βασισμένες στη PCR τεχνικές (339). Παράλληλα, νεότερες μοριακές τεχνικές, όπως οι DNA μικροσυστοιχίες (DNA microarrays) οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη μας, βασίζονται σε τεχνολογία υψηλής απόδοσης και αποτελούν ένα διαγνωστικό εργαλείο υψηλής ευαισθησίας και ειδικότητας (125, 340).

Κατανομή των στελεχών του ιού HPV στα ΑΚΚΤ

Λοίμωξη με ένα τουλάχιστον HPV στέλεχος υψηλού κινδύνου παρατηρήθηκε στην πλειονότητα των HPV (+) ΑΚΚΤ (83.3%). Σε συμφωνία με τη διεθνή βιβλιογραφία (125, 324), Ο HPV 16 ήταν το συχνότερα ανιχνεύσιμο στέλεχος στο σύνολο των ΑΚΚΤ της μελέτης μας, ενώ σε χαμηλότερη συχνότητα βρέθηκαν τα στελέχη υψηλού κινδύνου HPV 18, HPV 33 και HPV 51. Η

επικράτηση του ογκογόνου HPV 16 αλλά και η ανίχνευση των HPV 18 και HPV 33 στα νεοπλάσματα κεφαλής και τραχήλου σε συνδυασμό με την αναγνώρισή τους ως τα κυριότερα HPV στελέχη στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας παγκοσμίως, υποδεικνύει έναν δυνητικά ανάλογο ρόλο για τα στελέχη αυτά στην επαγωγή καρκινογένεσης στην περιοχή της κεφαλής και του τραχήλου.

Άλλα βιβλιογραφικά δεδομένα αναφέρουν την επικράτηση του HPV 18 στα ΑΚΚΤ και κυρίως στο ΑΚ της στοματικής κοιλότητας (341, 342), ενώ ιδιαίτερα ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι ανιχνεύεται σπάνια στα νεοπλάσματα του στοματοφάρυγγος, όπως παρατηρείται σε μελέτες με μεγάλο αριθμό περιστατικών. Στον τράχηλο της μήτρας, ο HPV 18 φαίνεται πως είναι λιγότερο ικανός να διαφεύγει της ανοσολογικής απάντησης του ξενιστή και επομένως είναι λιγότερο πιθανό να προκαλεί εμμένουσα λοίμωξη συγκριτικά με τον HPV 16 (343). Η ανοσολογική απάντηση μπορεί επίσης να διαφέρει μεταξύ του στοματοφάρυγγος και των υπολοίπων περιοχών της κεφαλής και του τραχήλου, επηρεάζοντας με αυτό τον τρόπο την παρουσία του HPV 18 στα νεοπλάσματα του στοματοφάρυγγος. Στη μελέτη μας ο HPV 18 ανιχνεύτηκε σε ένα ασθενή με ΑΚ του στοματοφάρυγγος, ωστόσο ο μικρός αριθμός του δείγματος από την περιοχή του στοματοφάρυγγος δεν επέτρεψε τη διεξαγωγή συμπερασμάτων για τη συχνότητα του στελέχους αυτού στα εξετασθέντα περιστατικά. Όσον αφορά το στέλεχος HPV 51 η ανίχνευσή του έχει αναφερθεί σε περιστατικά ΑΚΚΤ προηγούμενων μελετών (239, 344) και κυρίως στα νεοπλάσματα του λάρυγγος (125, 344), όπως παρατηρήθηκε και στην παρούσα μελέτη.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι στο 16.7% των HPV (+) νεοπλασμάτων κεφαλής και τραχήλου διαπιστώθηκε η παρουσία ιικών στελεχών χαμηλού κινδύνου και συγκεκριμένα του HPV 6, εύρημα το οποίο έχει παρατηρηθεί και σε άλλες μελέτες της διεθνούς βιβλιογραφίας. Ειδικότερα, έχει καταγραφεί η ανίχνευση των χαμηλού κινδύνου στελεχών HPV 6 και HPV 11 σε ένα μικρό αριθμό περιστατικών ΑΚΚΤ (335, 345, 346) υποδεικνύοντας ότι αυτά τα στελέχη δεν προκαλούν μόνο καλοήθεις βλάβες στην περιοχή της κεφαλής και του τραχήλου (347). Αξίζει να σημειωθεί ότι στην παρούσα μελέτη ο HPV 6 βρέθηκε σε ένα περιστατικό ΑΚ του λάρυγγος,

εύρημα το οποίο είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα αρκετών άλλων μελετών (155, 249, 336). Φαίνεται πως οι χαμηλού κινδύνου HPV 6 και HPV 11 εμφανίζουν προτίμηση στο επιθήλιο του λάρυγγα και είναι γνωστό ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην κακοήθη εξαλλαγή της υποτροπιάζουσας αναπνευστικής θηλωμάτωσης (346, 348). Συνεπώς, είναι πιθανό αυτά τα στελέχη του ιού να εμπλέκονται στην ανάπτυξη ΑΚ του λάρυγγος.

Επιπρόσθετα, διαπιστώθηκε η παρουσία του HPV 6 σε έναν ασθενή με ΑΚ του ρινοφάρυγγα, σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα τα οποία αναφέρουν την ανίχνευση των HPV 6 και HPV 11 σε περιστατικά ΑΚ του ρινοφάρυγγος, με ή χωρίς σύγχρονο ή προγενέστερο ανάστροφο θήλωμα των παραρρινίων (349, 350). Μάλιστα, έχει προταθεί πως ο HPV εμπλέκεται στα αρχικά στάδια της διαδικασίας της κακοήθους εξαλλαγής των ανάστροφων θηλωμάτων σε ΑΚ του ρινοφάρυγγος (351). Ωστόσο, άλλοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι η HPV λοίμωξη αντιπροσωπεύει ένα τυχαίο γεγονός στα περιστατικά των ανάστροφων θηλωμάτων παρά ένα σημαντικό αιτιολογικό παράγοντα (352). Αυτή η υπόθεση έρχεται σε συμφωνία με την ευρέως αποδεκτή άποψη, ότι η ανίχνευση στελεχών χαμηλού κινδύνου σε νεοπλάσματα κεφαλής και τραχήλου δεν αποτελεί απόδειξη της εμπλοκής τους στην διαδικασία της καρκινογένεσης. Τα στελέχη χαμηλού κινδύνου υπολείπονται ογκογόνου δυναμικού και μπορούν απλά να μολύνουν τον καρκινικό ιστό και ενδεχομένως να εντοπίζονται τυχαία σε αυτόν (125, 335, 345). Αυτή η διαπίστωση εξηγεί και την ανίχνευση του HPV 6 σε δύο ασθενείς της μελέτης μας με ΑΚ της στοματικής κοιλότητας και συγκεκριμένα της γλώσσας, όπως έχει παρατηρηθεί και σε προγενέστερες μελέτες (335, 345).

Συσχέτιση μεταξύ δημογραφικών/κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών και ανίχνευσης του ιού HPV

Στην παρούσα μελέτη, από τη συσχέτιση των κλινικοπαθολογικών γνωρισμάτων με την ανίχνευση του HPV προέκυψε πως μόνο η πτωχή διαφοροποίηση των ΑΚΚΤ σχετίζεται ανεξάρτητα με την HPV λοίμωξη (OR= 4.00; 95% CI: 1.43- 11.4, p= 0.006). Το εύρημα αυτό είναι σύμφωνο με τη

στατιστικά σημαντική σχέση η οποία έχει παρατηρηθεί στη διεθνή βιβλιογραφία μεταξύ της πτωχής διαφοροποίησης των όγκων κεφαλής και τραχήλου και της παρουσίας του HPV (124, 126, 254, 353). Επιπλέον, ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η συσχέτιση μεταξύ ιϊκής λοίμωξης και πτωχής ιστολογικής διαφοροποίησης, έχει βρεθεί σε νεοπλάσματα τα οποία αναπτύσσονται από τη δράση και άλλων ογκογόνων ιών. Συγκεκριμένα, στον καρκίνο του ρινοφάρυγγος ο κερατινοποιημένος τύπος έχει παρατηρηθεί ότι σχετίζεται λιγότερο με τον ιό EBV (Epstein-Barr Virus) (354), ενώ τα τελευταία χρόνια η σημαντική αύξηση των περιστατικών αδιαφοροποίητου καρκίνου της στοματικής κοιλότητας τα οποία δεν οφείλονται στον HPV, είναι πιθανό να αποδίδονται στη δράση άλλων ιών (355).

Ως προς την ηλικία, το φύλο, ο HPV ανιχνεύτηκε συχνότερα στις νεότερες ηλικίες ασθενών με ΑΚΚΤ (≤ 60 ετών) καθώς και στο γυναικείο φύλο, χωρίς όμως στατιστικά σημαντική διαφορά. Τα ευρήματα της διεθνούς βιβλιογραφίας αναφορικά με τη συσχέτιση της ηλικίας με την HPV λοίμωξη είναι αντικρουόμενα, καθώς υπάρχουν μελέτες που δείχνουν ότι η παρουσία του ιού σχετίζεται με νεότερους σε ηλικία ασθενείς (131, 347) σε αντίθεση με άλλες οι οποίες δεν οδηγούνται σε ανάλογο συμπέρασμα (124, 334).

Επιπρόσθετα, στην παρούσα μελέτη βρέθηκε ότι οι ασθενείς με HPV (+) ΑΚΚΤ παρουσίασαν χαμηλότερο ποσοστό τοπικής υποτροπής της νόσου συγκριτικά με τους HPV (-) ασθενείς, ωστόσο το εύρημα αυτό δεν ήταν στατιστικά σημαντικό. Αυτό το γεγονός μπορεί να οφείλεται στο μικρότερο χρονικό διάστημα παρακολούθησης των ασθενών σε σχέση με προηγούμενες μελέτες στις οποίες παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ του HPV και της απουσίας τοπικής υποτροπής σε ΑΚΚΤ (356). Εναλλακτικά, ο χαμηλότερος κίνδυνος τοπικής υποτροπής της νόσου που έχει καταγραφεί σε HPV (+) ασθενείς συγκριτικά με HPV (-) ασθενείς αφορά νεοπλάσματα του στοματοφάρυγγος (357, 358) για τα οποία ο αιτιολογικός ρόλος της HPV λοίμωξης είναι ευρέως αποδεκτός. Από την άλλη πλευρά, υπάρχουν μελέτες στις οποίες δε φάνηκε η παρουσία του HPV να σχετίζεται με την τοπική υποτροπή των νεοπλασμάτων κεφαλής και τραχήλου σε επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας (359, 360). Στο σημείο αυτό θα πρέπει να αναφερθεί ότι στη μελέτη μας η ανάλυση της σχέσης μεταξύ της ανίχνευσης του HPV και της

τοπικής υποτροπής της νόσου, δεν ήταν εφικτή για τα ΑΚ του στοματοφάρυγγος λόγω του περιορισμένου αριθμού των περιστατικών.

Επιπλέον, στη μελέτη μας η στατιστικά σημαντική σχέση που παρατηρήθηκε στο μοντέλο της μονοπαραγοντικής ανάλυσης μεταξύ των μη καπνιστών και της HPV λοίμωξης, δεν επιβεβαιώθηκε στην πολυπαραγοντική ανάλυση και ενδεχομένως να προέκυψε από την ύπαρξη συγχυτικών παραγόντων, όπως η ηλικία. Αυτή η διαπίστωση αφορά και τη σχέση μεταξύ της μη κατανάλωσης οινοπνεύματος και της HPV λοίμωξης, αλλά και εκείνης μεταξύ του ιστορικού μη χρήσης καπνού και οινοπνεύματος και της παρουσίας του ιού. Αυτές οι σχέσεις παρουσίασαν στατιστική σημαντικότητα μόνο στην μονοπαραγοντική ανάλυση, δείχνοντας έτσι ότι δεν υπήρξαν διαφορές μεταξύ των HPV (+) και HPV (-) ΑΚΚΤ ως προς το κάπνισμα ή/και την κατανάλωση οινοπνεύματος, σύμφωνα με τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών (361, 362). Επιπλέον, στη μελέτη του Gillison και συν. η οποία αφορούσε αποκλειστικά νεοπλάσματα του στοματοφάρυγγος, το ποσοστό των μη καπνιστών στα HPV (+) περιστατικά ήταν υψηλότερο συγκριτικά με εκείνο των καπνιστών, χωρίς όμως αυτή η διαφορά να είναι στατιστικά σημαντική (254).

Τα δεδομένα της διεθνούς βιβλιογραφίας όσον αφορά τη σχέση μεταξύ του HPV και των καθιερωμένων παραγόντων κινδύνου (κάπνισμα ή/και κατανάλωση οινοπνεύματος), είναι αντικρουόμενα. Αρκετές μελέτες έχουν αναδείξει την HPV λοίμωξη και τους καθιερωμένους παράγοντες κινδύνου ως δύο διακριτές αιτιολογικές ομάδες (124, 254). Αντίθετα, σε άλλες είτε έχει παρατηρηθεί αυξημένος κίνδυνος ανάπτυξης ΑΚΚΤ σε άτομα τα οποία ήταν καπνιστές/ πότες και HPV (+) λόγω συνεργούς δράσης των παραγόντων κινδύνου ή δεν έχουν βρεθεί διαφορές στον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου ανάλογα με την HPV κατάσταση και τη χρήση καπνού/ οινοπνεύματος (323, 363). Τα παραπάνω αντιφατικά συμπεράσματα παρέχουν ενδείξεις περί υπάρξεως πολλαπλών προφίλ κινδύνου για την ανάπτυξη ΑΚΚΤ, κυρίως λόγω των διαφορών στην ηλικία των πληθυσμών ανά μελέτη, της σεξουαλικής συμπεριφοράς, του επιπολασμού του HPV, της χρήσης καπνού και της κατανάλωσης οινοπνεύματος (364).

Συμπερασματικά, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτη μας το 17.5% του συνόλου των νεοπλασμάτων κεφαλής και τραχήλου ήταν θετικό στην ανίχνευση του ιού HPV, με τον HPV 16 να αποτελεί το επικρατέστερο στέλεχος. Παράλληλα, το πολυπαραγοντικό μοντέλο ανάλυσης έδειξε ότι τα πτωχά διαφοροποιημένα νεοπλάσματα εσχετίζοντο ανεξάρτητα με την ανίχνευση του HPV, αντανακλώντας ενδεχομένως μία διακριτή παθολογική οντότητα οφειλόμενη στη λοίμωξη από τον HPV. Τα παραπάνω ευρήματα παρέχουν ενδείξεις ότι πιθανότατα ο HPV εμπλέκεται στην ανάπτυξη ενός μικρού αριθμού νεοπλασμάτων κεφαλής και τραχήλου της μελέτης μας, όμως δεν επαρκούν για να τεκμηριώσουν τη συσχέτιση μεταξύ αυτών των περιστατικών και του HPV. Περαιτέρω διερεύνηση της σημασίας του HPV στα νεοπλάσματα κεφαλής και τραχήλου με τη μελέτη επιπροσθέτων μοριακών δεικτών (p16, p53, E6/E7 ιϊκές ογκοπρωτεΐνες), παρακολούθησης της νόσου σε βάθος χρόνου και συμπερίληψης ομάδων ελέγχου, θα βοηθούσε στη διευκρίνιση του ρόλου του HPV στην καρκινογένεση της περιοχής κεφαλής και τραχήλου.

8. Περίληψη στην Ελληνική

Εισαγωγή: Η αιτιολογική συσχέτιση μεταξύ της λοίμωξης που προκαλείται από τον ιό των ανθρωπίνων θηλωμάτων (HPV) και του καρκίνου του στοματοφάρυγγος είναι αδιαμφισβήτητη. Έχει επίσης αναφερθεί η πιθανή εμπλοκή των HPV στελεχών υψηλού κινδύνου σε μια υποομάδα νεοπλασμάτων άλλων ανατομικών περιοχών της κεφαλής και του τραχήλου, όπως της στοματικής κοιλότητας, του λάρυγγος και του ρινοφάρυγγος. Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν ο προσδιορισμός της συχνότητας ανίχνευσης του DNA του ιού HPV και των χαμηλού και υψηλού κινδύνου στελεχών αυτού, σε περιστατικά πρωτοπαθών ακανθοκυτταρικών καρκινωμάτων κεφαλής και τραχήλου (ΑΚΚΤ), καθώς και η διερεύνηση της συσχέτισης μεταξύ HPV λοίμωξης και μιας σειράς δημογραφικών/κλινικοπαθολογικών παραμέτρων, καθώς και του κλινικού αποτελέσματος.

Υλικά και Μέθοδοι: Μελετήθηκαν συνολικά 137 ιστολογικά και κυτταρολογικά δείγματα από ασθενείς με ΑΚΚΤ (58 στόματος, 54 λάρυγγος, 12 στοματοφάρυγγος, 5 υποφάρυγγος, 5 ρινοφάρυγγος και 3 ρινικής κοιλότητας), τα οποία ελήφθησαν είτε κατά την πρώτη διαγνωστική εξέταση είτε κατά τη διάρκεια της χειρουργικής επέμβασης ή πριν την υποβολή των ασθενών σε ακτινοθεραπεία. Για την ανίχνευση και τυποποίηση του ιού HPV χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) καθώς και η μέθοδος των μικροσυστοιχιών (Microarrays). Ακολούθησε η θεραπευτική προσέγγιση και όλοι οι ασθενείς τέθηκαν σε παρακολούθηση (follow-up) διάρκειας 2 ετών για τον έλεγχο τοπικής υποτροπής της νόσου.

Αποτελέσματα: Το 17.5% των ασθενών με ΑΚΚΤ βρέθηκαν θετικοί στο HPV DNA, ενώ η τυποποίηση του ιού ανέδειξε τον HPV 16 ως το επικρατέστερο στέλεχος με ποσοστό 6.6%, ενώ σε χαμηλότερη συχνότητα βρέθηκαν τα στελέχη HPV 18 HPV 6, HPV 33 και HPV 51. Ανάλογα με την ανατομική εντόπιση των καρκίνων, HPV λοίμωξη ανιχνεύτηκε στο 12.1% των καρκίνων της στοματικής κοιλότητας, στο 18.5% του λάρυγγα, στο 33.3% του στοματοφάρυγγα, στο 20% του υποφάρυγγα, και στο 40% του ρινοφάρυγγα, ενώ σε κανέναν από τους 3 καρκίνους της ρινικής κοιλότητας δεν βρέθηκε λοίμωξη από τον HPV. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του πολυπαραγοντικού

μοντέλου ανάλυσης, φάνηκε ότι η πτωχή διαφοροποίηση σχετιζόταν ανεξάρτητα με την HPV λοίμωξη (OR, 4.00; 95% CI, 1.43 - 11.4, $p= 0.006$), αντανακλώντας ενδεχομένως μία διακριτή παθολογική οντότητα οφειλόμενη στη λοίμωξη από τον ιό HPV.

Συμπεράσματα: Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης παρέχουν ενδείξεις ότι πιθανότατα ο HPV εμπλέκεται στην ανάπτυξη ενός μικρού αριθμού ΑΚΚΤ, όμως δεν επαρκούν για να τεκμηριώσουν τη συσχέτιση μεταξύ αυτών των περιστατικών και του HPV. Περαιτέρω διερεύνηση της σημασίας του HPV στα ΑΚΚΤ με τη μελέτη επιπροσθέτων μοριακών δεικτών (p16, p53, E6/E7 ιϊκές ογκοπρωτεΐνες), παρακολούθησης της νόσου σε βάθος χρόνου και συμπερίληψης ομάδων ελέγχου, θα βοηθούσε στη διευκρίνιση του ρόλου του HPV στην καρκινογένεση της περιοχής κεφαλής και τραχήλου.

9. Περίληψη στην Αγγλική

Introduction: The causal association between HPV infection and oropharyngeal cancer is well- established. It has also been reported that high-risk HPV genotypes may be implicated in the development of a subgroup of cancers originating from other sub-sites of head and neck region, such as the oral cavity, larynx and nasopharynx. The purpose of the current study was to determine the frequency of HPV DNA detection, as well as to identify low- risk and high- risk HPV genotypes in primary head and neck squamous cell carcinomas (HNSCCs). Furthermore, our study investigated the association of HPV infection with demographic/ clinical factors and clinical outcome.

Materials and Methods: 137 histological and cytological samples were obtained from patients with HNSCCs (58 oral cavity, 54 larynx, 12 oropharynx, 5 hypopharynx, 5 nasopharynx and 3 nasal cavity). All samples were collected during first diagnostic examination, surgery, or before the induction of radiotherapy. HPV DNA detection and genotyping were performed using PCR and microarrays. Patients were treated appropriately and were followed- up for 2 years in order to investigate the rate of local recurrence.

Results: The overall prevalence of HPV DNA positive HNSCCs was 17.5%, while HPV 16 was the commonest genotype detected in 6.6% followed by HPV 18, HPV 6, HPV 33 and HPV 51. By anatomical subsite, HPV infection was found in 12.1% of oral cancer, 18.5% of laryngeal cancer, 33.3% of oropharyngeal cancer, 20% of hypopharyngeal cancer and 40% of nasopharyngeal cancer. None of the nasal cavity cancers was positive for HPV infection. According to the results of the multivariate logistic regression analysis, HPV DNA positivity was independently associated with poorly differentiated tumors (OR, 4.00; 95% CI, 1.43 - 11.4, $p= 0.006$), possibly reflecting a distinct clinical entity attributable to HPV infection.

Conclusions: The findings of the present study suggest that HPV may be implicated in the development of a subgroup of HNSCCs. Nevertheless, further research including the evaluation of additional biomarkers (p16, p53,

E6/E7 oncoproteins) is required to better assess the possible implication of HPV in the head and neck carcinogenesis.

10. Λεξικό αγγλικών όρων και συντομογραφιών

Adjuvantradiotherapy: συμπληρωματική ακτινοθεραπεία

Antigen Presenting Cells, APCs: αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα

Biomarkers: βιοδείκτες

Capsidproteins: πρωτεΐνες καψιδίου

Checkpoint: σημείο ελέγχου

Common Fragile Sites, CFS: κοινές εύθραυστες θέσεις

Cyclin- CDK (CyclinDependentKinase) complexes: σύμπλοκα κυκλινών-κυκλινοεξαρτώμενων κινασών

Cys-X-X-Cys motifs: μοτίβα Cys-X-X-Cys

Cys-X-X-Cys zing finger motifs: Cys-X-X-Cys μοτίβα δακτύλου ψευδαργύρου

Cytotoxic T lymphocytes, CTLs: T- κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα

DNA packaging: εγκλωβισμός DNA στοκαψίδιο

E2F transcription factor: μεταγραφικός παράγοντας E2F

E6 associatedprotein, E6AP: πρωτεΐνηπουσυνδέεταιμετηνE6

Earlypromoter: πρώιμοςυποκινητής

EarlyRegion, E: πρώιμηπεριοχή

EpidermalGrowthFactorReceptor,

EGFR:υποδοχέαςτουεπιδερμικούαυξητικούπαράγοντα

Epidermodysplasiaverruciformis- EV:κονδυλωματώδηςεπιδερμοδυσπλασία

Fieldcancerization: καρκινογένεσηπεδίου

Highlyconservedregion: υψηλάσυντηρημένηπεριοχή

HPV- inducedoncogenesis: HPV- επαγόμενηογκογένεση

HumanPapillomavirus, HPV: ιός των ανθρωπίνων θηλωμάτων

Hybridtranscripts: υβριδικά μετάγραφα

Inductionchemotherapy: εισαγωγική χημειοθεραπεία

Interaction: αλληλεπίδραση

Latepromoter: όψιμος υποκινητής

LateRegion, L: όψιμη περιοχή

Long Control Region, LCR: ρυθμιστική περιοχή

LXCXE motif: μοτίβο LXCXE

Major Histocompatibility Complex, MHC: Μείζων Σύστημα Ιστοσυμβατότητας

OpenReadingFrame, ORF: ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης

Papillomaviruses- PVs: ιοί των θηλωμάτων

Parabasallayer: ακανθωτή στοιβάδα

Primers: εκκινητές

PolymeraseChainReaction, PCR: αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Salvagesurgery: διασωστική χειρουργική

Signaltransduction: μεταγωγή σήματος

T- helper lymphocytes, Th: T- βοηθητικά λεμφοκύτταρα

Transforming Growth Factor- beta, TGF-β: μετατρεπτικός αυξητικός παράγοντας- β

Transoral Endoscopic Surgery, TES: διαστοματική ενδοσκοπική χειρουργική

Transoral Laser Microsurgery, TLM: διαστοματική laser μικροχειρουργική

Transoral Robotic Surgery, TORS: διαστοματική ρομποτική χειρουργική

TumorNecrosisFactor-α, TNF-α: παράγοντας νέκρωσης των όγκων- α

Ubiquitin: ουβικουΐτίνη

VascularEndothelialGrowthFactor, VEGF: αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας

Viraltranscripts: ιϊκά μετάγραφα

Virus- likeparticles, VLPs:ιόμορφα σωματίδια

11. Βιβλιογραφία

1. Bäfverstedt B. Condylomata acuminata--past and present. Acta Derm Venereol. 1967;47(5):376-81
2. Hoory T, Monie A, Gravitt P, Wu TC. Molecular epidemiology of human papillomavirus. J Formos Med Assoc. 2008;107(3):198-217
3. Rous P, Beard JW. A virus-induced mammalian growth with the characters of a tumor (the Shope rabbit papilloma): i. the growth on implantation within favorable hosts. J Exp Med. 1934;60(6):701-22.
4. Crawford IV, Crawford EM. Virology. A comparative study of polyoma and papilloma viruses. 1963;21:258-63
5. zur Hausen H. Condylomata acuminata and human genital cancer. Cancer Res. 1976;36(2 pt 2):794
6. zur Hausen H. Human papilloma viruses and their possible role in squamous cell carcinomas. Curr. Top. Microbiol. Immunol., 1977; 78: p.1-30
7. Gissmann L, zur Hausen H. Partial characterization of viral DNA from human genital warts (Condylomata acuminata). Int J Cancer. 1980;25(5):605-9
8. Ostwald C, Müller P, Barten M, Rutsatz K, Sonnenburg M, Milde-Langosch K, Löning T. Human papillomavirus DNA in oral squamous cell carcinomas and normal mucosa. J Oral Pathol Med. 1994;23(5):220-5
9. Ha PK, Califano JA. The role of human papillomavirus in oral carcinogenesis. Crit Rev Oral Biol Med. 2004;15(4):188-96
10. Lowy DR, Schiller JT. Reducing HPV-associated cancer globally. Cancer Prev Res (Phila). 2012;5(1):18-23
11. Melbye M, Frisch M. The role of human papillomaviruses in anogenital cancers Semin Cancer Biol. 1998;8(4):307-13
12. Pang CL, Thierry F. Human papillomavirus proteins as prospective

therapeutic targets. *Microb Pathog.* 2013;58:55-65

13. 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(1):70-9

14. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology.* 2004;324(1):17-27

15. Berumen J, Ordoñez RM, Lazcano E, Salmeron J, Galvan SC, Estrada RA, Yunes E, Garcia-Carranca A, Gonzalez-Lira G, Madrigal-de la Campa A. Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study. *J Natl Cancer Inst.* 2001;93(17):1325-30

16. Bernard HU, Calleja-Macias IE, Dunn ST. Genome variation of human papillomavirus types: phylogenetic and medical implications. *Int J Cancer.* 2006;118(5):1071-6

17. Chen Z, Terai M, Fu L, Herrero R, DeSalle R, Burk RD. Diversifying selection in human papillomavirus type 16 lineages based on complete genome analyses. *J Virol.* 2005;79(11):7014-23

18. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ; 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(6):518-27

19. Schiffman M, Herrero R, Desalle R, Hildesheim A, Wacholder S, Rodriguez AC, Bratti MC, Sherman ME, Morales J, Guillen D, Alfaro M, Hutchinson M, Wright TC, Solomon D, Chen Z, Schussler J, Castle PE, Burk RD. The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution. *Virology.* 2005;337(1):76-84

20. Dell'Oste V, Azzimonti B, De Andrea M, Mondini M, Zavattaro E, Leigheb G, Weissenborn SJ, Pfister H, Michael KM, Waterboer T, Pawlita M, Amantea A, Landolfo S, Gariglio M. High beta-HPV DNA loads and strong seroreactivity

are present in epidermodysplasia verruciformis. *J Invest Dermatol.* 2009;129(4):1026-34

21. Orth G. Epidermodysplasia verruciformis: a model for understanding the oncogenicity of human papillomaviruses. *Ciba Found Symp.* 1986;120:157-74.

22. Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol.* 2005;32 Suppl 1:S7-15

23. zur Hausen H. Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta.* 1996;1288(2):F55-78

24. Chen EY, Howley PM, Levinson AD, Seeburg PH. The primary structure and genetic organization of the bovine papillomavirus type 1 genome. *Nature.* 1982;299(5883):529-34

25. Hummel M, Hudson JB, Laimins LA. Differentiation-induced and constitutive transcription of human papillomavirus type 31b in cell lines containing viral episomes *J Virol.* 1992;66(10):6070-80

26. Münger K, Phelps WC. The human papillomavirus E7 protein as a transforming and transactivating factor. *Biochim Biophys Acta.* 1993;1155(1):111-23

27. Chan WK, Klock G, Bernard HU. Progesterone and glucocorticoid response elements occur in the long control regions of several human papillomaviruses involved in anogenital neoplasia. *J Virol.* 1989;63(8):3261-9

28. Gloss B, Yeo-Gloss M, Meisterenst M, Rogge L, Winnacker EL, Bernard HU. Clusters of nuclear factor I binding sites identify enhancers of several papillomaviruses but alone are not sufficient for enhancer function. *Nucleic Acids Res.* 1989;17(9):3519-33

29. Offord EA, Beard P. A member of the activator protein 1 family found in keratinocytes but not in fibroblasts required for transcription from a human papillomavirus type 18 promoter. *J Virol.* 1990;64(10):4792-8

30. Frattini MG, Laimins LA. Binding of the human papillomavirus E1 origin-recognition protein is regulated through complex formation with the E2 enhancer-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(26):12398-402
31. Rautava J, Syrjänen S. Biology of human papillomavirus infections in head and neck carcinogenesis. *Head Neck Pathol*. 2012;6 Suppl 1:S3-15
32. Roden RB, Day PM, Bronzo BK, Yutzy WH 4th, Yang Y, Lowy DR, Schiller JT. Positively charged termini of the L2 minor capsid protein are necessary for papillomavirus infection. *J Virol*. 2001;75(21):10493-7
33. Hughes FJ, Romanos MA. E1 protein of human papillomavirus is a DNA helicase/ATPase. *Nucleic Acids Res*. 1993;21(25):5817-23
34. Deng W, Lin BY, Jin G, Wheeler CG, Ma T, Harper JW, Broker TR, Chow LT. Cyclin/CDK regulates the nucleocytoplasmic localization of the human papillomavirus E1 DNA helicase. *J Virol*. 2004;78(24):13954-65
35. Sarafi TR, McBride AA. Domains of the BPV-1 E1 replication protein required for origin-specific DNA binding and interaction with the E2 transactivator. *Virology*. 1995;211(2):385-96
36. Mendoza R, Gandhi L, Botchan MR. E1 recognition sequences in the bovine papillomavirus type 1 origin of DNA replication: interaction between half sites of the inverted repeats. *J Virol*. 1995;69(6):3789-98.
37. McBride AA. The papillomavirus E2 proteins. *Virology*. 2013;445(1-2):57-79
38. Androphy EJ, Lowy DR, Schiller JT. Bovine papillomavirus E2 transactivating gene product binds to specific sites in papillomavirus DNA. *Nature*. 1987;325(6099):70-3
39. Corden SA, Sant-Cassia LJ, Easton AJ, Morris AG. The integration of HPV-18 DNA in cervical carcinoma. *Mol Pathol*. 1999;52(5):275-82
40. Leng X, Ludes-Meyers JH, Wilson VG. Isolation of an amino-terminal region of bovine papillomavirus type 1 E1 protein that retains origin binding

and E2 interaction capacity. *J Virol.* 1997;71(1):848-52

41. Titolo S, Pelletier A, Pulichino AM, Brault K, Wardrop E, White PW, Cordingley MG, Archambault J. Identification of domains of the human papillomavirus type 11 E1 helicase involved in oligomerization and binding to the viral origin. *J Virol.* 2000;74(16):7349-61

42. Demeret C, Goyat S, Yaniv M, Thierry F. The human papillomavirus type 18 (HPV18) replication protein E1 is a transcriptional activator when interacting with HPV18 E2. *Virology.* 1998;242(2):378-86

43. Chow LT, Broker TR, Steinberg BM. The natural history of human papillomavirus infections of the mucosal epithelia. *APMIS.* 2010;118(6-7):422-49

44. Tsakogiannis D, Ruether IG, Kyriakopoulou Z, Pliaka V, Skordas V, Gartzonika C, Levidiotou-Stefanou S, Markoulatos P. Molecular and phylogenetic analysis of the HPV 16 E4 gene in cervical lesions from women in Greece. *Arch Virol.* 2012;157(9):1729-39

45. Zuckerman A, Banatvala J, Griffiths P, Schoub B. Principles and Practice of clinical virology. 5th edition. John Wiley & Sons, Ltd 2004

46. DiMaio D, Petti LM. The E5 proteins. *Virology.* 2013;445(1-2):99-114

47. DiMaio D, Mattoon D. Mechanisms of cell transformation by papillomavirus E5 proteins. *Oncogene.* 2001;20(54):7866-73

48. McLaughlin-Drubin ME, Meyers J, Munger K. Cancer associated human papillomaviruses. *Curr Opin Virol.* 2012;2(4):459-66

49. Conrad M, Bubb VJ, Schlegel R. The human papillomavirus type 6 and 16 E5 proteins are membrane-associated proteins which associate with the 16-kilodalton pore-forming protein. *J Virol.* 1993;67(10):6170-8.

50. Ashrafi GH, Haghshenas M, Marchetti B, Campo MS. E5 protein of human papillomavirus 16 downregulates HLA class I and interacts with the heavy chain via its first hydrophobic domain. *Int J Cancer.* 2006;119(9):2105-12

51. Münger, K., P.M. Howley, and D. DiMaio, Human Papillomavirus E6 and E7 oncogenes, in *The Papillomaviruses*, R.L. Garcea and D. DiMaio, Editors. 2007, Springer
52. Beerheide W, Bernard HU, Tan YJ, Ganesan A, Rice WG, Ting AE. Potential drugs against cervical cancer: zinc-ejecting inhibitors of the human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein. *J Natl Cancer Inst.* 1999;91(14):1211-20.
53. zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92(9):690-8
54. Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell.* 1993;75(3):495-505
55. Lechner MS, Laimins LA. Inhibition of p53 DNA binding by human papillomavirus E6 proteins. *J Virol.* 1994;68(7):4262-73
56. Brimer N, Lyons C, Vande Pol SB. Association of E6AP (UBE3A) with human papillomavirus type 11 E6 protein. *Virology.* 2007;358(2):303-10
57. Thomas M, Banks L. Human papillomavirus (HPV) E6 interactions with Bak are conserved amongst E6 proteins from high and low risk HPV types. *J Gen Virol.* 1999;80 (Pt 6):1513-7
58. Filippova M, Parkhurst L, Duerksen-Hughes PJ. The human papillomavirus 16 E6 protein binds to Fas-associated death domain and protects cells from Fas-triggered apoptosis. *J Biol Chem.* 2004;279(24):25729-44
59. Chakrabarti O, Krishna S. Molecular interactions of 'high risk' human papillomaviruses E6 and E7 oncoproteins: implications for tumour progression. *J Biosci.* 2003;28(3):337-48
60. McMurray HR, Nguyen D, Westbrook TF, McAnce DJ. Biology of human papillomaviruses. *Int J Exp Pathol.* 2001;82(1):15-33

61. Figge J, Webster T, Smith TF, Paucha E. Prediction of similar transforming regions in simian virus 40 large T, adenovirus E1A, and myc oncoproteins. *J Virol.* 1988;62(5):1814-8
62. Phelps WC, Yee CL, Münger K, Howley PM. The human papillomavirus type 16 E7 gene encodes transactivation and transformation functions similar to those of adenovirus E1A. *Cell.* 1988;53(4):539-47
63. Dyson N, Howley PM, Münger K, Harlow E. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science.* 1989;243(4893):934-7
64. McLaughlin-Drubin ME, Münger K. The human papillomavirus E7 oncoprotein. *Virology.* 2009;384(2):335-44
65. Dyson N. The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev.* 1998;12(15):2245-62
66. Stevaux O, Dyson NJ. A revised picture of the E2F transcriptional network and RB function. *Curr Opin Cell Biol.* 2002;14(6):684-91
67. Cheng S, Schmidt-Grimminger DC, Murrant T, Broker TR, Chow LT. Differentiation-dependent up-regulation of the human papillomavirus E7 gene reactivates cellular DNA replication in suprabasal differentiated keratinocytes. *Genes Dev.* 1995;9(19):2335-49
68. Boyer SN, Wazer DE, Band V. E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. *Cancer Res.* 1996;56(20):4620-4
69. Gage JR, Meyers C, Wettstein FO. The E7 proteins of the nononcogenic human papillomavirus type 6b (HPV-6b) and of the oncogenic HPV-16 differ in retinoblastoma protein binding and other properties. *J Virol.* 1990;64(2):723-30
70. Brehm A, Miska EA, McCance DJ, Reid JL, Bannister AJ, Kouzarides T. Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription.

Nature. 1998;391(6667):597-601

71. Brehm A, Nielsen SJ, Miska EA, McCance DJ, Reid JL, Bannister AJ, Kouzarides T. The E7 oncoprotein associates with Mi2 and histone deacetylase activity to promote cell growth. *EMBO J.* 1999;18(9):2449-58

72. Funk JO, Waga S, Harry JB, Espling E, Stillman B, Galloway DA. Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes Dev.* 1997;11(16):2090-100

73. Zerfass-Thome K, Zwerschke W, Mannhardt B, Tindle R, Botz JW, Jansen-Dürr P. Inactivation of the cdk inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Oncogene.* 1996;13(11):2323-30.

74. Zerfass K, Schulze A, Spitkovsky D, Friedman V, Henglein B, Jansen-Dürr P. Sequential activation of cyclin E and cyclin A gene expression by human papillomavirus type 16 E7 through sequences necessary for transformation. *J Virol.* 1995;69(10):6389-99

75. Stanley M. The epidemiology and burden of HPV disease. *Nurs Times.* 2008;104(36):38-40

76. Kirnbauer R, Booy F, Cheng N, Lowy DR, Schiller JT. Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(24):12180-4

77. Roden RB, Greenstone HL, Kirnbauer R, Booy FP, Jessie J, Lowy DR, Schiller JT. In vitro generation and type-specific neutralization of a human papillomavirus type 16 virion pseudotype. *J Virol.* 1996;70(9):5875-83.

78. El Mehdaoui S, Touzé A, Laurent S, Sizaret PY, Rasschaert D, Coursaget P. Gene transfer using recombinant rabbit hemorrhagic disease virus capsids with genetically modified DNA encapsidation capacity by addition of packaging sequences from the L1 or L2 protein of human papillomavirus type 16. *J Virol.* 2000;74(22):10332-40

79. Selinka HC, Florin L, Patel HD, Freitag K, Schmidtke M, Makarov VA, Sapp M. Inhibition of transfer to secondary receptors by heparan sulfate-binding drug or antibody induces noninfectious uptake of human papillomavirus. *J Virol.* 2007;81(20):10970-80
80. Syrjänen S. HPV infections and tonsillar carcinoma. *J Clin Pathol.* 2004;57(5):449-55
81. Horvath CA1, Boulet GA, Renoux VM, Delvenne PO, Bogers JP. Mechanisms of cell entry by human papillomaviruses: an overview. *Virology.* 2010;7:11.
82. Frazer IH. Interaction of human papillomaviruses with the host immune system: a well evolved relationship. *Virology.* 2009;384(2):410-4
83. Doorbar J. Papillomavirus life cycle organization and biomarker selection. *Dis Markers.* 2007;23(4):297-313
84. Ozbun MA, Meyers C. Characterization of late gene transcripts expressed during vegetative replication of human papillomavirus type 31b. *J Virol.* 1997;71(7):5161-72.
85. Bedell MA, Hudson JB, Golub TR, Turyk ME, Hosken M, Wilbanks GD, Laimins LA. Amplification of human papillomavirus genomes in vitro is dependent on epithelial differentiation. *J Virol.* 1991;65(5):2254-60.
86. Finnen RL, Erickson KD, Chen XS, Garcea RL. Interactions between papillomavirus L1 and L2 capsid proteins. *J Virol.* 2003;77(8):4818-26.
87. Ferenczy A, Jenson AB. Tissue effects and host response. The key to the rational triage of cervical neoplasia. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 1996;23(4):759-82
88. Zhang P, Nouri M, Brandsma JL, Iftner T, Steinberg BM. Induction of E6/E7 expression in cottontail rabbit papillomavirus latency following UV activation. *Virology.* 1999;263(2):388-94
89. Hildesheim A, Schiffman MH, Gravitt PE, Glass AG, Greer CE, Zhang T,

Scott DR, Rush BB, Lawler P, Sherman ME. Persistence of type-specific human papillomavirus infection among cytologically normal women. *J Infect Dis.* 1994;169(2):235-40

90. Regezi JA, Sciubba JJ, Jordan RCK. Veruccal-Papillary Lesions. In: *Oral Pathology. Clinical Pathologic correlations.* WB Saunders Co, Philadelphia 4th ed. 2003; Chap. 6: 143-145

91. Löning T, Reichart P, Staquet MJ, Becker J, Thivolet J. Occurrence of papillomavirus structural antigens in oral papillomas and leukoplakias. *J Oral Pathol.* 1984;13(2):155-65

92. Neville BW, Damm DD, Alien CM, Bouquot JE. Epithelial Pathology. In: *Oral and Maxillofacial Pathology.* WB Saunders Co, Philadelphia 2nd ed. 2002; Chap10. 315-319

93. Kalof AN, Cooper K. Our approach to squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix. *J Clin Pathol.* 2007;60(5):449-55

94. Peitsaro P, Johansson B, Syrjänen S. Integrated human papillomavirus type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative real-time PCR technique. *J Clin Microbiol* 2002;40:886–91

95. Richard C, Lanner C, Naryzhny SN, Sherman L, Lee H, Lambert PF, Zehbe I. The immortalizing and transforming ability of two common human papillomavirus 16 E6 variants with different prevalences in cervical cancer. *Oncogene.* 2010;29(23):3435-45

96. Markowitz LE, Sternberg M, Dunne EF, McQuillan G, Unger ER. Seroprevalence of human papillomavirus types 6, 11, 16, and 18 in the United States: National Health and Nutrition Examination Survey 2003-2004. *J Infect Dis.* 2009;200(7):1059-67

97. Viscidi RP1, Snyder B, Cu-Uvin S, Hogan JW, Clayman B, Klein RS, Sobel J, Shah KV. Human papillomavirus capsid antibody response to natural infection and risk of subsequent HPV infection in HIV-positive and

- HIV-negative women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14(1):283-8.
98. Münger, K., P.M. Howley, and D. DiMaio, Human Papillomavirus E6 and E7 oncogenes, in *The Papillomaviruses*, R.L. Garcea and D. DiMaio, Editors. 2007, Springer
99. zur Hausen H. Immortalization of human cells and their malignant conversion by high risk human papillomavirus genotypes. *Semin Cancer Biol.* 1999;9(6):405-11
100. Patel D, Incassati A, Wang N, McCance DJ. Human papillomavirus type 16 E6 and E7 cause polyploidy in human keratinocytes and up-regulation of G2-M-phase proteins. *Cancer Res.* 2004;64(4):1299-306
101. Wittekindt C, Wagner S, Mayer CS, Klussmann JP. Basics of tumor development and importance of human papilloma virus (HPV) for head and neck cancer. *GMS Curr Top Otorhinolaryngol Head Neck Surg.* 2012;11:Doc09
102. Romanczuk H, Howley PM. Disruption of either the E1 or the E2 regulatory gene of human papillomavirus type 16 increases viral immortalization capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(7):3159-63
103. Jeon S, Lambert PF. Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(5):1654-8
104. Jeon S, Allen-Hoffmann BL, Lambert PF. Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells. *J Virol.* 1995;69(5):2989-97
105. Wentzensen N, Ridder R, Klaes R, Vinokurova S, Schaefer U, Doeberitz Mv. Characterization of viral-cellular fusion transcripts in a large series of HPV16 and 18 positive anogenital lesions. *Oncogene.* 2002;21(3):419-26

106. Dall K, Scarpini CG, Roberts I, Winder DM, Stanley MA, Muralidhar B, Herdman MT, Pett MR, Coleman N. Characterization of naturally occurring HPV16 integration sites isolated from cervical keratinocytes under noncompetitive conditions. *Cancer Res.* 2008;68(20):8249-59
107. Gonçalves MA, Donadi EA. Immune cellular response to HPV: current concepts. *Braz J Infect Dis.* 2004;8(1):1-9
108. Jimenez-Flores R1, Mendez-Cruz R, Ojeda-Ortiz J, Muñoz-Molina R, Balderas-Carrillo O, de la Luz Diaz-Soberanes M, Lebecque S, Saeland S, Daneri-Navarro A, Garcia-Carranca A, Ullrich SE, Flores-Romo L. High-risk human papilloma virus infection decreases the frequency of dendritic Langerhans' cells in the human female genital tract. *Immunology.* 2006;117(2):220-8.
109. Bontkes HJ, Walboomers JM, Meijer CJ, Helmerhorst TJ, Stern PL. Specific HLA class I down-regulation is an early event in cervical dysplasia associated with clinical progression. *Lancet.* 1998;351(9097):187-8.
110. Kanodia S, Fahey LM, Kast M. Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response. *Curr Cancer Drug Targets.* 2007;7:79–89
111. Brierley MM, Fish EN. Review: IFN-alpha/beta receptor interactions to biologic outcomes: understanding the circuitry. *J Interferon Cytokine Res* 2002; 22: 835–845
112. Chang YE, Laimins LA. Microarray analysis identifies interferon-inducible genes and Stat-1 as major transcriptional targets of human papillomavirus type 31. *J Virol.* 2000;74(9):4174-82
113. Barnard P, McMillan NA. The human papillomavirus E7 oncoprotein abrogates signaling mediated by interferon-alpha. *Virology* 1999; 259: 305–313.
114. Ronco LV, Karpova AY, Vidal M, Howley PM. Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its

transcriptional activity. *Genes Dev.* 1998;12(13):2061-72.

115. Park JS, Kim EJ, Kwon HJ, Hwang ES, Namkoong SE, Um SJ. Inactivation of interferon regulatory factor-1 tumor suppressor protein by HPV E7 oncoprotein. Implication for the E7-mediated immune evasion mechanism in cervical carcinogenesis. *J Biol Chem.* 2000;275(10):6764-9

116. Braakhuis BJ, Tabor MP, Leemans CR, van der Waal I, Snow GB, Brakenhoff RH. Second primary tumors and field cancerization in oral and oropharyngeal cancer: molecular techniques provide new insights and definitions. *Head Neck.* 2002;24(2):198-206

117. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer.* 2010;127(12):2893-917

118. Reibel J. Prognosis of oral pre-malignant lesions: significance of clinical, histopathological, and molecular biological characteristics. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2003;14(1):47-62

119. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer.* 2015;136(5):E359-86

120. Talamini R, Bosetti C, La Vecchia C, Dal Maso L, Levi F, Bidoli E, Negri E, Pasche C, Vaccarella S, Barzan L, Franceschi S. Combined effect of tobacco and alcohol on laryngeal cancer risk: a case-control study. *Cancer Causes Control.* 2002;13(10):957-64

121. Brooks PJ, Theruvathu JA. DNA adducts from acetaldehyde: implications for alcohol-related carcinogenesis. *Alcohol.* 2005; 35:187–93

122. Pai SI, Westra WH. Molecular pathology of head and neck cancer: implications for diagnosis, prognosis, and treatment. *Annu Rev Pathol.* 2009;4:49-70

123. Scully C. Oral cancer aetiopathogenesis; past, present and future aspects. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2011;16(3):e306-11
124. Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92:709–20
125. Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005; 14:467–75
126. Fakhry C, Westra WH, Li S, Cmelak A, Ridge JA, Pinto H, Forastiere A, Gillison ML. Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst*. 2008;100(4):261-9
127. Westra WH. The changing face of head and neck cancer in the 21st century: the impact of HPV on the epidemiology and pathology of oral cancer. *Head Neck Pathol*. 2009;3(1):78-81
128. Cardesa A, Nadal A. Carcinoma of the head and neck in the HPV era. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat*. 2011;20(3):161-73
129. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin*. 2009;59(4):225-49
130. Chen JK, Katz RV, Krutchkoff DJ. Intraoral squamous cell carcinoma. Epidemiologic patterns in Connecticut from 1935 to 1985. *Cancer*. 1990;66(6):1288-96
131. Shiboski CH, Schmidt BL, Jordan RC. Tongue and tonsil carcinoma: increasing trends in the U.S. population ages 20-44 years. *Cancer*. 2005;103(9):1843-9
132. Majchrzak E, Szybiak B, Wegner A, Pienkowski P, Pazdrowski J, Luczewski L, Sowka M, Golusinski P, Malicki J, Golusinski W. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma in young adults: a review of the

literature. *Radiol Oncol.* 2014;48(1):1-10

133. Miller CS, Johnstone BM. Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis, 1982-1997. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001;91(6):622-35

134. Lin DT, Cohen SM, Coppit GL, Burkey BB. Squamous cell carcinoma of the oropharynx and hypopharynx. *Otolaryngol Clin North Am.* 2005;38(1):59-74, viii

135. Nguyen NP1, Ly BH, Betz M, Vinh-Hung V. Importance of age as a prognostic factor for tonsillar carcinoma. *Ann Surg Oncol.* 2010;17(10):2570-7

136. Marklund L, Näsman A, Ramqvist T, Dalianis T, Munck-Wikland E, Hammarstedt L. Prevalence of human papillomavirus and survival in oropharyngeal cancer other than tonsil or base of tongue cancer. *Cancer Med.* 2012;1(1):82-8

137. Lindquist D, Romanitan M, Hammarstedt L, Näsman A, Dahlstrand H, Lindholm J, Onelöv L, Ramqvist T, Ye W, Munck-Wikland E, Dalianis T. Human papillomavirus is a favourable prognostic factor in tonsillar cancer and its oncogenic role is supported by the expression of E6 and E7. *Mol Oncol.* 2007;1(3):350-5.

138. Ramqvist T, Grün N, Dalianis T. Human papillomavirus and tonsillar and base of tongue cancer. *Viruses.* 2015;7(3):1332-43

139. Karatzanis AD, Psychogios G, Waldfahrer F, Zenk J, Velegrakis GA, Iro H. Surgical management of T1 oropharyngeal carcinoma. *Head Neck.* 2012;34(9):1277-82

140. Psychogios G, Mantsopoulos K, Kuenzel J, Koch M, Zenk J, Harreus U, Waldfahrer F, Iro H. Primary surgical treatment of T2 oropharyngeal carcinoma. *J Surg Oncol.* 2012;105(7):719-23.

141. Denittis AS, Machtay M, Rosenthal DI, Sanfilippo NJ, Lee JH, Goldfeder S, Chalian AA, Weinstein GS, Weber RS. Advanced oropharyngeal

carcinoma treated with surgery and radiotherapy: oncologic outcome and functional assessment. *Am J Otolaryngol.* 2001;22(5):329-35

142. Hong AM, Grulich AE, Jones D, Lee CS, Garland SM, Dobbins TA, Clark JR, Harnett GB, Milross CG, O'Brien CJ, Rose BR Squamous cell carcinoma of the oropharynx in Australian males induced by human papillomavirus vaccine targets. *Vaccine.* 2010;28(19):3269-72

143. Chaturvedi AK, Engels EA, Anderson WF, Gillison ML. Incidence trends for human papillomavirus-related and -unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States. *J Clin Oncol.* 2008;26(4):612-9.

144. Blomberg M, Nielsen A, Munk C, Kjaer SK. Trends in head and neck cancer incidence in Denmark, 1978-2007: focus on human papillomavirus associated sites. *Int J Cancer.* 2011;129(3):733-41

145. Chaturvedi AK, Engels EA, Pfeiffer RM, Hernandez BY, Xiao W, Kim E, Jiang B, Goodman MT, Sibug-Saber M, Cozen W, Liu L, Lynch CF, Wentzensen N, Jordan RC, Altekruse S, Anderson WF, Rosenberg PS, Gillison ML. Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. *J Clin Oncol.* 2011;29(32):4294-301

146. Markou K, Christoforidou I, Karasmanis I, Tsiropoulos G, Triaridis S, Constantinidis I, Vital I, Nikolaou A. Laryngeal cancer: epidemiological data from Northern Greece and review of the literature. *Hippokratia.* 2013;17(4):313-8.

147. Cattaruzza MS, Maisonneuve P, Boyle P. Epidemiology of laryngeal cancer. *Eur J Cancer B Oral Oncol.* 1996;32B(5):293-305

148. Sasaki CT, Jassin B. Cancer of the pharynx and larynx. *Am J Med.* 2001;111 Suppl 8A:118S-123S.

149. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer.* 2001;94(2):153-6

150. Raitiola H, Pukander J, Laippala P Glottic and supraglottic laryngeal

carcinoma: differences in epidemiology, clinical characteristics and prognosis. *Acta Otolaryngol.* 1999;119(7):847-51.

151. Cardesa A, Gale N, Nadal A, Zidar N. World Health Organization Classification of Tumors. Head and Neck Tumors. Tumors of the Hypopharynx, Larynx and Trachea. Squamous Cell Carcinoma. IARC Press: Lyon 2005

152. Stell PM, McGill T. Asbestos and laryngeal carcinoma. *Lancet.* 1973;2(7826):416-7.

153. Estève J, Riboli E, Péquignot G, Terracini B, Merletti F, Crosignani P, Ascunce N, Zubiri L, Blanchet F, Raymond L, Repetto F, Tuyns AJ. Diet and cancers of the larynx and hypopharynx: the IARC multi-center study in southwestern Europe. *Cancer Causes Control.* 1996;7(2):240-52.

154. Hanson DG, Kamel PL, Kahrilas PJ. Outcomes of antireflux therapy for the treatment of chronic laryngitis. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1995;104(7):550-5.

155. Torrente MC, Rodrigo JP, Haigentz M Jr, Dikkers FG, Rinaldo A, Takes RP, Olofsson J, Ferlito A. Human papillomavirus infections in laryngeal cancer. *Head Neck.* 2011;33(4):581-6

156. Agudelo D, Quer M, León X, Díez S, Burgués J. Laryngeal carcinoma in patients without a history of tobacco and alcohol use. *Head Neck.* 1997;19(3):200-4

157. Peretti G, Piazza C, Cocco D, De Benedetto L, Del Bon F, Redaelli De Zinis LO, Nicolai P. Transoral CO(2) laser treatment for T(is)-T(3) glottic cancer: the University of Brescia experience on 595 patients. *Head Neck.* 2010;32(8):977-83

158. Higgins KM, Shah MD, Ogaick MJ, Enepekides D. Treatment of early-stage glottic cancer: meta-analysis comparison of laser excision versus radiotherapy. *J Otolaryngol Head Neck Surg.* 2009;38(6):603-12

159. Nishimura G, Tsukuda M, Mikami Y, Matsuda H, Horiuchi C, Taguchi T, Takahashi M, Kawakami M, Watanabe M, Niho T, Abo H, Yamamoto S. Efficacy of concurrent chemoradiotherapy for T1 and T2 laryngeal squamous cell carcinoma regarding organ preservation. *Anticancer Res.* 2009;29(2):661-6
160. Peretti G, Piazza C, Ansarin M, De Benedetto L, Cocco D, Cattaneo A, Nicolai P, Chiesa F. Transoral CO2 laser microsurgery for Tis-T3 supraglottic squamous cell carcinomas. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2010;267(11):1735-42
161. Forastiere AA, Goepfert H, Maor M, Pajak TF, Weber R, Morrison W, Glisson B, Trotti A, Ridge JA, Chao C, Peters G, Lee DJ, Leaf A, Ensley J, Cooper J. Concurrent chemotherapy and radiotherapy for organ preservation in advanced laryngeal cancer. *N Engl J Med.* 2003;349(22):2091-8
162. Soo KC, Tan EH, Wee J, Lim D, Tai BC, Khoo ML, Goh C, Leong SS, Tan T, Fong KW, Lu P, See A, Machin D. Surgery and adjuvant radiotherapy vs concurrent chemoradiotherapy in stage III/IV nonmetastatic squamous cell head and neck cancer: a randomised comparison. *Br J Cancer.* 2005;93(3):279-86
163. Brennan B. Nasopharyngeal carcinoma. *Orphanet J Rare Dis.* 2006;1:23
164. Shanmugaratnam K, Sobin LH. The World Health Organization histological classification of tumours of the upper respiratory tract and ear. A commentary on the second edition. *Cancer.* 1993;71(8):2689-97
165. Reddy SP, Raslan WF, Gooneratne S, Kathuria S, Marks JE. Prognostic significance of keratinization in nasopharyngeal carcinoma. *Am J Otolaryngol.* 1995;16(2):103-8
166. Nicholls JM. Nasopharyngeal carcinoma: classification and histological appearances. *Adv Anat Pathol* 1997;4:71-84
167. Wolf H, zur Hausen H, Becker V. EB viral genomes in epithelial nasopharyngeal carcinoma cells. *Nat New Biol.* 1973;244(138):245-7

168. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Waldron W, Altekruse SF, Kosary CL, Ruhl J, Tatalovich Z, Cho H, Mariotto A, Eisner MP, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2009 (Vintage 2009 Populations), National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2009_pops09/
169. Chang ET, Adami HO. The enigmatic epidemiology of nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006;15(10):1765-77
170. Vaughan TL, Shapiro JA, Burt RD, Swanson GM, Berwick M, Lynch CF, Lyon JL. Nasopharyngeal cancer in a low-risk population: defining risk factors by histological type. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1996;5(8):587-93
171. Lin Z, Khong B, Kwok S, Cao H, West RB, Le QT, Kong CS. Human papillomavirus 16 detected in nasopharyngeal carcinomas in white Americans but not in endemic Southern Chinese patients. *Head Neck.* 2014;36(5):709-14
172. Stenmark MH, McHugh JB, Schipper M, Walline HM, Komarck C, Feng FY, Worden FP, Wolf GT, Chepeha DB, Prince ME, Bradford CR, Mukherji SK, Eisbruch A, Carey TE. Nonendemic HPV-positive nasopharyngeal carcinoma: association with poor prognosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2014;88(3):580-8.
173. Chua D, Sham JS, Kwong DL, Au GK. Treatment outcome after radiotherapy alone for patients with Stage I-II nasopharyngeal carcinoma. *Cancer.* 2003;98(1):74-80.
174. Ma BB, Hui EP, Chan AT. Systemic approach to improving treatment outcome in nasopharyngeal carcinoma: current and future directions. *Cancer Sci.* 2008;99(7):1311-8
175. Vokes EE, Kies M, Haraf DJ, Mick R, Moran WJ, Kozloff M, Mittal B, Pelzer H, Wenig B, Panje W, et al. Induction chemotherapy followed by concomitant chemoradiotherapy for advanced head and neck cancer: impact on the natural history of the disease. *J Clin Oncol.* 1995;13(4):876-83

176. Forastiere AA, Trotti A. Radiotherapy and concurrent chemotherapy: a strategy that improves locoregional control and survival in oropharyngeal cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1999;91(24):2065-6.
177. Vergeer MR, Doornaert PA, Rietveld DH, Leemans CR, Slotman BJ, Langendijk JA. Intensity-modulated radiotherapy reduces radiation-induced morbidity and improves health-related quality of life: results of a nonrandomized prospective study using a standardized follow-up program. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2009;74(1):1-8
178. Boscolo-Rizzo P, Maronato F, Marchiori C, Gava A, Da Mosto MC. Long-term quality of life after total laryngectomy and postoperative radiotherapy versus concurrent chemoradiotherapy for laryngeal preservation. *Laryngoscope.* 2008;118(2):300-6.
179. Ang KK, Berkey BA, Tu X, Zhang HZ, Katz R, Hammond EH, Fu KK, Milas L. Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma. *Cancer Res.* 2002; 62:7350–56.
180. Kalyankrishna S, Grandis JR. Epidermal growth factor receptor biology in head and neck cancer. *J Clin Oncol.* 2006; 24:2666–72
181. Burtneess B, Goldwasser MA, Flood W, Mattar B, Forastiere AA; Eastern Cooperative Oncology Group. Phase III randomized trial of cisplatin plus placebo compared with cisplatin plus cetuximab in metastatic/recurrent head and neck cancer: an Eastern Cooperative Oncology Group study. *J Clin Oncol.* 2005;23(34):8646-54
182. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Shin DM, Cohen RB, Jones CU, Sur R, Raben D, Jassem J, Ove R, Kies MS, Baselga J, Yousoufian H, Amellal N, Rowinsky EK, Ang KK. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med.* 2006;354(6):567-78.
183. Kim MM, Califano JA. Molecular pathology of head-and-neck cancer.

Int J Cancer. 2004;112(4):545-53

184. Curran D, Giralt J, Harari PM, Ang KK, Cohen RB, Kies MS, Jassem J, Baselga J, Rowinsky EK, Amellal N, Comte S, Bonner JA. Quality of life in head and neck cancer patients after treatment with high-dose radiotherapy alone or in combination with cetuximab. *J Clin Oncol.* 2007;25(16):2191-7

185. Pfister DG, Su YB, Kraus DH, Wolden SL, Lis E, Aliff TB, Zahalsky AJ, Lake S, Needle MN, Shaha AR, Shah JP, Zelefsky MJ. Concurrent cetuximab, cisplatin, and concomitant boost radiotherapy for locoregionally advanced, squamous cell head and neck cancer: a pilot phase II study of a new combined-modality paradigm. *J Clin Oncol.* 2006;24(7):1072-8.

186. Herbst RS, Arquette M, Shin DM, Dicke K, Vokes EE, Azarnia N, Hong WK, Kies MS. Phase II multicenter study of the epidermal growth factor receptor antibody cetuximab and cisplatin for recurrent and refractory squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol.* 2005;23(24):5578-87.

187. Baron JA, Sandler RS. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cancer prevention. *Annu Rev Med.* 2000;51:511-23.

188. Bishop JM. The molecular genetics of cancer. *Science.* 1987;235(4786):305-11.

189. Lowe SW, Lin AW. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis.* 2000;21(3):485-95

190. Brinkman BM, Wong DT. Disease mechanism and biomarkers of oral squamous cell carcinoma. *Curr Opin Oncol.* 2006;18(3):228-33.

191. Ha PK, Califano JA. Promoter methylation and inactivation of tumour-suppressor genes in oral squamous-cell carcinoma. *Lancet Oncol.* 2006;7(1):77-82

192. Pérez-Sayáns M, Somoza-Martín JM, Barros-Angueira F, Reboiras-López MD, Gándara Rey JM, García-García A. Genetic and molecular

alterations associated with oral squamous cell cancer. *Oncol Rep.* 2009;22(6):1277-82.

193. Reed AL, Califano J, Cairns P, Westra WH, Jones RM, Koch W, Ahrendt S, Eby Y, Sewell D, Nawroz H, Bartek J, Sidransky D. High frequency of p16 (CDKN2/MTS-1/INK4A) inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 1996;56(16):3630-3.

194. Kisielewski AE, Xiao GH, Liu SC, Klein-Szanto AJ, Novara M, Sina J, Bleicher K, Yeung RS, Goodrow TL. Analysis of the FHIT gene and its product in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Oncogene.* 1998;17(1):83-91.

195. Field JK, Kiaris H, Howard P, Vaughan ED, Spandidos DA, Jones AS. Microsatellite instability in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Br J Cancer.* 1995;71(5):1065-9.

196. Rousseau A, Lim MS, Lin Z, Jordan RC. Frequent cyclin D1 gene amplification and protein overexpression in oral epithelial dysplasias. *Oral Oncol.* 2001;37(3):268-75.

197. Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer.* 1953;6(5):963-8.

198. Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer.* 2011;11(1):9-22

199. Bedi GC, Westra WH, Gabrielson E, Koch W, Sidransky D. Multiple head and neck tumors: evidence for a common clonal origin. *Cancer Res.* 1996;56(11):2484-7.

200. Tabor MP, Brakenhoff RH, van Houten VM, Kummer JA, Snel MH, Snijders PJ, Snow GB, Leemans CR, Braakhuis BJ. Persistence of genetically altered fields in head and neck cancer patients: biological and clinical implications. *Clin Cancer Res.* 2001;7(6):1523-32.

201. Schaaij-Visser TB, Graveland AP, Gauci S, Braakhuis BJ, Buijze M, Heck AJ, Kuik DJ, Bloemena E, Leemans CR, Slijper M, Brakenhoff RH. Differential Proteomics Identifies Protein Biomarkers That Predict Local Relapse of Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *Clin Cancer Res.* 2009;15(24):7666-7675.
202. Tabor MP, Brakenhoff RH, Ruijter-Schippers HJ, Kummer JA, Leemans CR, Braakhuis BJ. Genetically altered fields as origin of locally recurrent head and neck cancer: a retrospective study. *Clin Cancer Res.* 2004;10(11):3607-13.
203. Lippman SM, Spitz M, Trizna Z, Benner SE, Hong WK. Epidemiology, biology, and chemoprevention of aerodigestive cancer. *Cancer.* 1994;74(9 Suppl):2719-25
204. Campo-Trapero J, Cano-Sánchez J, Palacios-Sánchez B, Sánchez-Gutierrez JJ, González-Moles MA, Bascones-Martínez A. Update on molecular pathology in oral cancer and precancer. *Anticancer Res.* 2008;28(2B):1197-205.
205. Shaw R. The epigenetics of oral cancer. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2006;35(2):101-8
206. Rosas SL, Koch W, da Costa Carvalho MG, Wu L, Califano J, Westra W, Jen J, Sidransky D. Promoter hypermethylation patterns of p16, O6-methylguanine-DNA-methyltransferase, and death-associated protein kinase in tumors and saliva of head and neck cancer patients. *Cancer Res.* 2001;61(3):939-42.
207. Auerkari EI. Methylation of tumor suppressor genes p16(INK4a), p27(Kip1) and E-cadherin in carcinogenesis. *Oral Oncol.* 2006;42(1):5-13.
208. Yeh KT, Shih MC, Lin TH, Chen JC, Chang JY, Kao CF, Lin KL, Chang JG. The correlation between CpG methylation on promoter and protein expression of E-cadherin in oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res.* 2002;22(6C):3971-5.

209. von Zeidler SV, Miracca EC, Nagai MA, Birman EG. Hypermethylation of the p16 gene in normal oral mucosa of smokers. *Int J Mol Med.* 2004;14(5):807-11.
210. Supić G, Kozomara R, Branković-Magić M, Jović N, Magić Z. Gene hypermethylation in tumor tissue of advanced oral squamous cell carcinoma patients. *Oral Oncol.* 2009;45(12):1051-7.
211. Choi S, Myers JN. Molecular pathogenesis of oral squamous cell carcinoma: implications for therapy. *J Dent Res.* 2008;87(1):14-32
212. Molinolo AA, Amornphimoltham P, Squarize CH, Castilho RM, Patel V, Gutkind JS. Dysregulated molecular networks in head and neck carcinogenesis. *Oral Oncol.* 2009;45(4-5):324-34
213. Okami K, Wu L, Riggins G, Cairns P, Goggins M, Evron E, Halachmi N, Ahrendt SA, Reed AL, Hilgers W, Kern SE, Koch WM, Sidransky D, Jen J. Analysis of PTEN/MMAC1 alterations in aerodigestive tract tumors. *Cancer Res.* 1998;58(3):509-11.
214. Hardisson D. Molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2003;260(9):502-8.
215. Schumaker L, Nikitakis N, Goloubeva O, Tan M, Taylor R, Cullen KJ. Elevated expression of glutathione S-transferase pi and p53 confers poor prognosis in head and neck cancer patients treated with chemoradiotherapy but not radiotherapy alone. *Clin Cancer Res.* 2008;14(18):5877-83
216. González-Moles MA, Gil-Montoya JA, Ruiz-Avila I, Esteban F, Delgado-Rodriguez M, Bascones-Martinez A. Prognostic significance of p21WAF1/CIP1, p16INK4a and CD44s in tongue cancer. *Oncol Rep.* 2007;18(2):389-96.
217. Stewart SA, Weinberg RA. Telomerase and human tumorigenesis. *Semin Cancer Biol.* 2000;10(6):399-406.
218. Kupferman ME, Myers JN Molecular biology of oral cavity squamous

cell carcinoma. *Otolaryngol Clin North Am.* 2006;39(2):229-47.

219. Kannan S, Tahara H, Yokozaki H, Mathew B, Nalinakumari KR, Nair MK, Tahara E Telomerase activity in premalignant and malignant lesions of human oral mucosa. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1997;6(6):413-20.

220. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(6):442-54

221. Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7(2):131-42.

222. Birchmeier W. Cell adhesion and signal transduction in cancer. Conference on cadherins, catenins and cancer. *EMBO Rep.* 2005;6(5):413-7.

223. Jones AV, Lambert DW, Speight PM, Whawell SA. ADAM 10 is over expressed in oral squamous cell carcinoma and contributes to invasive behaviour through a functional association with $\alpha\beta 6$ integrin. *FEBS Lett.* 2013;587(21):3529-34

224. Kawamata H, Uchida D, Hamano H, Kimura-Yanagawa T, Nakashiro KI, Hino S, Omotehara F, Yoshida H, Sato M. Active-MMP2 in cancer cell nests of oral cancer patients: correlation with lymph node metastasis. *Int J Oncol.* 1998;13(4):699-704

225. Rosenthal EL, Matrisian LM. Matrix metalloproteases in head and neck cancer. *Head Neck.* 2006;28(7):639-48.

226. Woods KV, Shillitoe EJ, Spitz MR, Schantz SP, Adler-Storthz K. Analysis of human papillomavirus DNA in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med.* 1993;22(3):101-8.

227. de Villiers EM. Human pathogenic papillomavirus types: an update. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1994;186:1-12.

228. Ferreira MB, De Souza JA, Cohen EE. Role of molecular markers in the management of head and neck cancers. *Curr Opin Oncol.* 2011;23(3):259-64

229. Miller DL, Puricelli MD, Stack MS. Virology and molecular pathogenesis of HPV (human papillomavirus)-associated oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Biochem J.* 2012;443(2):339-53.
230. Praetorius F. HPV-associated diseases of oral mucosa. *Clin Dermatol.* 1997;15(3):399-413
231. Kovalenko S, Lukashenko P, Romanovskaya A, Soldatski IL, Bakanov SI, Pfister H, Gerein V. Distribution and density of CD1a+ and CD83+ dendritic cells in HPV-associated laryngeal papillomas. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2009;73(2):249-56.
232. Martins RH, Dias NH, Gregório EA, Marques MA, Silva MG, Candeias JM. Laryngeal papillomatosis: morphological study by light and electron microscopy of the HPV-6. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2008;74(4):539-43.
233. Völter C, He Y, Delius H, Roy-Burman A, Greenspan JS, Greenspan D, de Villiers EM. Novel HPV types present in oral papillomatous lesions from patients with HIV infection. *Int J Cancer.* 1996;66(4):453-6.
234. Castro TP, Bussoloti Filho I. Prevalence of human papillomavirus (HPV) in oral cavity and oropharynx. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2006;72(2):272-82
235. Feller L, Khammissa RA, Wood NH, Lemmer J. Epithelial maturation and molecular biology of oral HPV. *Infect Agent Cancer.* 2009;4:16.
236. Palefsky JM, Silverman S Jr, Abdel-Salaam M, Daniels TE, Greenspan JS. Association between proliferative verrucous leukoplakia and infection with human papillomavirus type 16. *J Oral Pathol Med.* 1995;24(5):193-7.
237. Ostwald C, Rutsatz K, Schweder J, Schmidt W, Gundlach K, Barten M. Human papillomavirus 6/11, 16 and 18 in oral carcinomas and benign oral lesions. *Med Microbiol Immunol.* 2003;192(3):145-8.
238. Nielsen H, Norrild B, Vedtofte P, Praetorius F, Reibel J, Holmstrup P. Human papillomavirus in oral premalignant lesions. *Eur J Cancer B Oral*

Oncol. 1996;32B(4):264-70.

239. Begum S, Cao D, Gillison M, Zahurak M, Westra WH. Tissue distribution of human papillomavirus 16 DNA integration in patients with tonsillar carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2005;11(16):5694-9.

240. D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, Pawlita M, Fakhry C, Koch WM, Westra WH, Gillison ML. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med.* 2007;356(19):1944-56.

241. Klussmann JP, Gültekin E, Weissenborn SJ, Wieland U, Dries V, Dienes HP, Eckel HE, Pfister HJ, Fuchs PG. Expression of p16 protein identifies a distinct entity of tonsillar carcinomas associated with human papillomavirus. *Am J Pathol.* 2003;162(3):747-53.

242. Perry ME. The specialised structure of crypt epithelium in the human palatine tonsil and its functional significance. *J Anat.* 1994;185 (Pt 1):111-27.

243. Roberts JN, Buck CB, Thompson CD, Kines R, Bernardo M, Choyke PL, Lowy DR, Schiller JT. Genital transmission of HPV in a mouse model is potentiated by nonoxynol-9 and inhibited by carrageenan. *Nat Med.* 2007;13(7):857-61.

244. McQuone SJ, Eisele DW, Lee DJ, Westra WH, Koch WM. Occult tonsillar carcinoma in the unknown primary. *Laryngoscope.* 1998;108(11 Pt 1):1605-10.

245. Cerezo L, Raboso E, Ballesteros AI. Unknown primary cancer of the head and neck: a multidisciplinary approach. *Clin Transl Oncol.* 2011;13(2):88-97.

246. Randall DA, Johnstone PA, Foss RD, Martin PJ. Tonsillectomy in diagnosis of the unknown primary tumor of the head and neck. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2000 ;122(1):52-5.

247. Stenner M, Yosef B, Huebbers CU, Preuss SF, Dienes HP, Speel EJ, Odenthal M, Klussmann JP Nuclear translocation of β -catenin and decreased

expression of epithelial cadherin in human papillomavirus-positive tonsillar cancer: an early event in human papillomavirus-related tumour progression? *Histopathology*. 2011;58(7):1117-26.

248. Mehanna H, Beech T, Nicholson T, El-Hariry I, McConkey C, Paleri V, Roberts S. Prevalence of human papillomavirus in oropharyngeal and nonoropharyngeal head and neck cancer--systematic review and meta-analysis of trends by time and region. *Head Neck*. 2013;35(5):747-55.

249. Isayeva T, Li Y, Maswahu D, Brandwein-Gensler M. Human papillomavirus in non-oropharyngeal head and neck cancers: a systematic literature review. *Head Neck Pathol*. 2012;6 Suppl 1:S104-20.

250. Mellin H, Friesland S, Lewensohn R, Dalianis T, Munck-Wikland E. Human papillomavirus (HPV) DNA in tonsillar cancer: clinical correlates, risk of relapse, and survival. *Int J Cancer*. 2000;89(3):300-4.

251. Weinberger PM, Yu Z, Haffty BG, Kowalski D, Harigopal M, Brandsma J, Sasaki C, Joe J, Camp RL, Rimm DL, Psyrri A. Molecular classification identifies a subset of human papillomavirus--associated oropharyngeal cancers with favorable prognosis. *J Clin Oncol*. 2006;24(5):736-47.

252. Goldenberg D, Begum S, Westra WH, Khan Z, Sciubba J, Pai SI, Califano JA, Tufano RP, Koch WM. Cystic lymph node metastasis in patients with head and neck cancer: An HPV-associated phenomenon. *Head Neck*. 2008;30(7):898-903

253. Hudgins PA, Gillison M. Second branchial cleft cyst: not!! . *AJNR Am J Neuroradiol*. 2009;30(9):1628-9.

254. Gillison ML, D'Souza G, Westra W, Sugar E, Xiao W, Begum S, Viscidi R. Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst*. 2008;100(6):407-20.

255. Westra WH. The morphologic profile of HPV-related head and neck squamous carcinoma: implications for diagnosis, prognosis, and clinical

management. *Head Neck Pathol.* 2012;6 Suppl 1:S48-54.

256. Patel SG, Shah JP. TNM staging of cancers of the head and neck: striving for uniformity among diversity. *CA Cancer J Clin.* 2005;55(4):242-58; quiz 261-2, 264.

257. Attner P, Du J, Näsman A, Hammarstedt L, Ramqvist T, Lindholm J, Marklund L, Dalianis T, Munck-Wikland E. Human papillomavirus and survival in patients with base of tongue cancer. *Int J Cancer.* 2011;128(12):2892-7.

258. Genden EM, Sambur IM, de Almeida JR, Posner M, Rinaldo A, Rodrigo JP, Strojjan P, Takes RP, Ferlito A. Human papillomavirus and oropharyngeal squamous cell carcinoma: what the clinician should know. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2013;270(2):405-16.

259. O'Rourke MA, Ellison MV, Murray LJ, Moran M, James J, Anderson LA. Human papillomavirus related head and neck cancer survival: a systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol.* 2012;48(12):1191-201.

260. Straetmans JM, Olthof N, Mooren JJ, de Jong J, Speel EJ, Kremer B. Human papillomavirus reduces the prognostic value of nodal involvement in tonsillar squamous cell carcinomas. *Laryngoscope.* 2009;119(10):1951-7.

261. Ukpo OC, Pritchett CV, Lewis JE, Weaver AL, Smith DI, Moore EJ. Human papillomavirus-associated oropharyngeal squamous cell carcinomas: primary tumor burden and survival in surgical patients. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2009;118(5):368-73.

262. Sinha P, Lewis JS Jr, Piccirillo JF, Kallogjeri D, Haughey BH. Extracapsular spread and adjuvant therapy in human papillomavirus-related, p16-positive oropharyngeal carcinoma. *Cancer.* 2012;118(14):3519-30

263. Gillison ML, Alemany L, Snijders PJ, Chaturvedi A, Steinberg BM, Schwartz S, Castellsagué X. Human papillomavirus and diseases of the upper airway: head and neck cancer and respiratory papillomatosis. *Vaccine.*

2012;30 Suppl 5:F34-54.

264. Chung CH, Gillison ML. Human papillomavirus in head and neck cancer: its role in pathogenesis and clinical implications. *Clin Cancer Res.* 2009;15(22):6758-62.

265. Braakhuis BJ, Snijders PJ, Keune WJ, Meijer CJ, Ruijter-Schippers HJ, Leemans CR, Brakenhoff RH. Genetic patterns in head and neck cancers that contain or lack transcriptionally active human papillomavirus. *J Natl Cancer Inst.* 2004;96(13):998-1006.

266. Agrawal N, Frederick MJ, Pickering CR, Bettegowda C, Chang K, Li RJ, Fakhry C, Xie TX, Zhang J, Wang J, Zhang N, El-Naggar AK, Jasser SA, Weinstein JN, Treviño L, Drummond JA, Muzny DM, Wu Y, Wood LD, Hruban RH, Westra WH, Koch WM, Califano JA, Gibbs RA, Sidransky D, Exome sequencing of head and neck squamous cell carcinoma reveals inactivating mutations in NOTCH1. *Science.* 2011;333(6046):1154-7.

267. Benson E, Li R, Eisele D, Fakhry C. The clinical impact of HPV tumor status upon head and neck squamous cell carcinomas. *Oral Oncol.* 2014;50(6):565-74..

268. Chaturvedi AK, Engels EA, Anderson WF, Gillison ML. Incidence trends for human papillomavirus-related and -unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States. *J Clin Oncol.* 2008;26(4):612-9.

269. Licitra L, Perrone F, Bossi P, Suardi S, Mariani L, Artusi R, Oggionni M, Rossini C, Cantù G, Squadrelli M, Quattrone P, Locati LD, Bergamini C, Olmi P, Pierotti MA, Pilotti S. High-risk human papillomavirus affects prognosis in patients with surgically treated oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 2006;24(36):5630-6.

270. Kimple RJ, Smith MA, Blitzer GC, Torres AD, Martin JA, Yang RZ, Peet CR, Lorenz LD, Nickel KP, Klingelhutz AJ, Lambert PF, Harari PM. Enhanced radiation sensitivity in HPV-positive head and neck cancer. *Cancer Res.* 2013;73(15):4791-800.

271. Lindel K, Beer KT, Laissue J, Greiner RH, Aebbersold DM Human papillomavirus positive squamous cell carcinoma of the oropharynx: a radiosensitive subgroup of head and neck carcinoma. *Cancer*. 2001;92(4):805-13.
272. Rieckmann T, Tribius S, Grob TJ, Meyer F, Busch CJ, Petersen C, Dikomey E, Kriegs M. HNSCC cell lines positive for HPV and p16 possess higher cellular radiosensitivity due to an impaired DSB repair capacity. *Radiother Oncol*. 2013;107(2):242-6.
273. Spanos WC, Nowicki P, Lee DW, Hoover A, Hostager B, Gupta A, Anderson ME, Lee JH. Immune response during therapy with cisplatin or radiation for human papillomavirus-related head and neck cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2009;135(11):1137-46
274. Schultz JD, Sommer JU, Hoedt S, Erben P, Hofheinz RD, Faber A, Thorn C, Hörmann K, Sauter A. Chemotherapeutic alteration of β -catenin and c-kit expression by imatinib in p16-positive squamous cell carcinoma compared to HPV-negative HNSCC cells in vitro. *Oncol Rep*. 2012;27(1):270-80.
275. Vajdic CM, McDonald SP, McCredie MR, van Leeuwen MT, Stewart JH, Law M, Chapman JR, Webster AC, Kaldor JM, Grulich AE. Cancer incidence before and after kidney transplantation. *JAMA*. 2006;296(23):2823-31.
276. Williams R, Lee DW, Elzey BD, Anderson ME, Hostager BS, Lee JH. Preclinical models of HPV+ and HPV- HNSCC in mice: an immune clearance of HPV+ HNSCC. *Head Neck*. 2009;31(7):911-8.
277. Heusinkveld M, Goedemans R, Briet RJ, Gelderblom H, Nortier JW, Gorter A, Smit VT, Langeveld AP, Jansen JC, van der Burg SH. Systemic and local human papillomavirus 16-specific T-cell immunity in patients with head and neck cancer. *Int J Cancer*. 2012;131(2):E74-85.
278. Albers A, Abe K, Hunt J, Wang J, Lopez-Albaitero A, Schaefer C,

Gooding W, Whiteside TL, Ferrone S, DeLeo A, Ferris RL Antitumor activity of human papillomavirus type 16 E7-specific T cells against virally infected squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res.* 2005;65(23):11146-55.

279. Mellin H, Dahlgren L, Munck-Wikland E, Lindholm J, Rabbani H, Kalantari M, Dalianis T. Human papillomavirus type 16 is episomal and a high viral load may be correlated to better prognosis in tonsillar cancer. *Int J Cancer.* 2002;102(2):152-8.

280. Cohen MA, Weinstein GS, O'Malley BW Jr, Feldman M, Quon H. Transoral robotic surgery and human papillomavirus status: Oncologic results. *Head Neck.* 2011;33(4):573-80.

281. Machtay M, Moughan J, Trotti A, Garden AS, Weber RS, Cooper JS, Forastiere A, Ang KK. Factors associated with severe late toxicity after concurrent chemoradiation for locally advanced head and neck cancer: an RTOG analysis. *J Clin Oncol.* 2008; 26(21):3582-9.

282. Mydlarz WK, Chan JY, Richmon JD. The role of surgery for HPV-associated head and neck cancer. *Oral Oncol.* 2015;51(4):305-13.

283. Eisbruch 1, Harris J, Garden AS, Chao CK, Straube W, Harari PM, Sanguineti G, Jones CU, Bosch WR, Ang KK. Multi-institutional trial of accelerated hypofractionated intensity-modulated radiation therapy for early-stage oropharyngeal cancer (RTOG 00-22). *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2010;76(5):1333-8.

284. Garden AS, Morrison WH, Wong PF, Tung SS, Rosenthal DI, Dong L, Mason B, Perkins GH, Ang KK. Disease-control rates following intensity-modulated radiation therapy for small primary oropharyngeal carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2007;67(2):438-44.

285. Steiner W, Fierek O, Ambrosch P, Hommerich CP, Kron M. Transoral laser microsurgery for squamous cell carcinoma of the base of the tongue. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2003;129(1):36-43.

286. Quon H, Richmon JD Treatment deintensification strategies for HPV-associated head and neck carcinomas. *Otolaryngol Clin North Am.* 2012;45(4):845-61.
287. Weinstein GS, O'Malley BW Jr, Cohen MA, Quon H. Transoral robotic surgery for advanced oropharyngeal carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2010;136(11):1079-85.
288. Hurtuk A, Agrawal A, Old M, Teknos TN, Ozer E. Outcomes of transoral robotic surgery: a preliminary clinical experience. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2011;145(2):248-53
289. Moore EJ, Olsen SM, Laborde RR, García JJ, Walsh FJ, Price DL, Janus JR, Kasperbauer JL, Olsen KD. Long-term functional and oncologic results of transoral robotic surgery for oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Mayo Clin Proc.* 2012;87(3):219-25.
290. Haughey BH, Sinha P. Prognostic factors and survival unique to surgically treated p16+ oropharyngeal cancer. *Laryngoscope.* 2012;122 Suppl 2:S13-33.
291. Sedaghat AR, Zhang Z, Begum S, Palermo R, Best S, Ulmer KM, Levine M, Zinreich E, Messing BP, Gold D, Wu AA, Niparko KJ, Kowalski J, Hirata RM, Saunders JR, Westra WH, Pai SI. Prognostic significance of human papillomavirus in oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Laryngoscope.* 2009;119(8):1542-9.
292. O'Sullivan B, Huang SH, Siu LL, Waldron J, Zhao H, Perez-Ordonez B, Weinreb I, Kim J, Ringash J, Bayley A, Dawson LA, Hope A, Cho J, Irish J, Gilbert R, Gullane P, Hui A, Liu FF, Chen E, Xu W. Deintensification candidate subgroups in human papillomavirus-related oropharyngeal cancer according to minimal risk of distant metastasis. *J Clin Oncol.* 2013;31(5):543-50.
293. Huang SH, Perez-Ordonez B, Liu FF, Waldron J, Ringash J, Irish J, Cummings B, Siu LL, Kim J, Weinreb I, Hope A, Gullane P, Brown D, Shi W,

O'Sullivan B. Atypical clinical behavior of p16-confirmed HPV-related oropharyngeal squamous cell carcinoma treated with radical radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2012 Jan 1;82(1):276-83

294. Kurose K, Terai M, Soedarsono N, Rabello D, Nakajima Y, Burk RD, Takagi M. Low prevalence of HPV infection and its natural history in normal oral mucosa among volunteers on Miyako Island, Japan. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004;98(1):91-6.

295. Gillison ML, Broutian T, Pickard RK, Tong ZY, Xiao W, Kahle L, Graubard BI, Chaturvedi AK . Prevalence of oral HPV infection in the United States, 2009-2010. *JAMA.* 2012;307(7):693-703.

296. Du J, Nordfors C, Ahrlund-Richter A, Sobkowiak M, Romanitan M, Näsman A, Andersson S, Ramqvist T, Dalianis T. Prevalence of oral human papillomavirus infection among youth, Sweden. *Emerg Infect Dis.* 2012;18(9):1468-71

297. Antonsson A, Cornford M, Perry S, Davis M, Dunne MP, Whiteman DC. Prevalence and risk factors for oral HPV infection in young Australians. *PLoS One.* 2014;9(3):e91761

298. Näsman A, Attner P, Hammarstedt L, Du J, Eriksson M, Giraud G, Ahrlund-Richter S, Marklund L, Romanitan M, Lindquist D, Ramqvist T, Lindholm J, Sparén P, Ye W, Dahlstrand H, Munck-Wikland E, Dalianis T. Incidence of human papillomavirus (HPV) positive tonsillar carcinoma in Stockholm, Sweden: an epidemic of viral-induced carcinoma? *Int J Cancer.* 2009;125(2):362-6.

299. Attner P, Du J, Näsman A, Hammarstedt L, Ramqvist T, Lindholm J, Marklund L, Dalianis T, Munck-Wikland E. The role of human papillomavirus in the increased incidence of base of tongue cancer. *Int J Cancer.* 2010;126(12):2879-84.

300. Gillison ML, Castellsagué X, Chaturvedi A, Goodman MT, Snijders P, Tommasino M, Arbyn M, Franceschi S. Eurogin Roadmap: comparative

epidemiology of HPV infection and associated cancers of the head and neck and cervix. *Int J Cancer*. 2014;134(3):497-507.

301. Hong AM, Martin A, Chatfield M, Jones D, Zhang M, Armstrong B, Lee CS, Harnett G, Milross C, Clark J, Elliott M, Smee R, Corry J, Liu C, Porceddu S, Rees G, Rose B. Human papillomavirus, smoking status and outcomes in tonsillar squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*. 2013;132(12):2748-54.

302. Heck JE, Berthiller J, Vaccarella S, Winn DM, Smith EM, Shan'gina O, Schwartz SM, Purdue MP, Pilarska A, Eluf-Neto J, Menezes A, McClean MD, Matos E, Koifman S, Kelsey KT, Herrero R, Hayes RB, Franceschi S, Wünsch-Filho V, Fernández L, Daudt AW, Curado MP, Chen C, Castellsagué X, Ferro G, Brennan P, Boffetta P, Hashibe M. Sexual behaviours and the risk of head and neck cancers: a pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology (INHANCE) consortium. *Int J Epidemiol*. 2010;39(1):166-81.

303. Zhang HS, Postigo AA, Dean DC. Active transcriptional repression by the Rb-E2F complex mediates G1 arrest triggered by p16INK4a, TGFbeta, and contact inhibition. *Cell*. 1999;97(1):53-61.

304. Venuti A, Paolini F. HPV detection methods in head and neck cancer. *Head Neck Pathol*. 2012;6 Suppl 1:S63-74.

305. Lewis JS Jr, Thorstad WL, Chernock RD, Haughey BH, Yip JH, Zhang Q, El-Mofty SK p16 positive oropharyngeal squamous cell carcinoma: an entity with a favorable prognosis regardless of tumor HPV status. *Am J Surg Pathol*. 2010;34(8):1088-96.

306. Thavaraj S, Stokes A, Guerra E, Bible J, Halligan E, Long A, Okpokam A, Sloan P, Odell E, Robinson M. Evaluation of human papillomavirus testing for squamous cell carcinoma of the tonsil in clinical practice. *J Clin Pathol*. 2011;64(4):308-12.

307. Harris SL, Thorne LB, Seaman WT, Hayes DN, Couch ME, Kimple RJ. Association of p16(INK4a) overexpression with improved outcomes in young

patients with squamous cell cancers of the oral tongue. *Head Neck*. 2011;33(11):1622-7.

308. de Roda Husman AM, Walboomers JM, van den Brule AJ, Meijer CJ, Snijders PJ. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol*. 1995;76 (Pt 4):1057-62.

309. Kornegay JR, Roger M, Davies PO, Shepard AP, Guerrero NA, Lloveras B, Evans D, Coutlée F. International proficiency study of a consensus L1 PCR assay for the detection and typing of human papillomavirus DNA: evaluation of accuracy and intralaboratory and interlaboratory agreement. *J Clin Microbiol*. 2003;41(3):1080-6

310. Rampias T, Sasaki C, Psyrris A. Molecular mechanisms of HPV induced carcinogenesis in head and neck. *Oral Oncol*. 2014;50(5):356-63.

311. Deng Z, Hasegawa M, Kiyuna A, Matayoshi S, Uehara T, Agena S, Yamashita Y, Ogawa K, Maeda H, Suzuki M. Viral load, physical status, and E6/E7 mRNA expression of human papillomavirus in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2013;35(6):800-8.

312. Ukpo OC, Flanagan JJ, Ma XJ, Luo Y, Thorstad WL, Lewis JS Jr. High-risk human papillomavirus E6/E7 mRNA detection by a novel in situ hybridization assay strongly correlates with p16 expression and patient outcomes in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2011;35(9):1343-50

313. Schache AG, Liloglou T, Risk JM, Jones TM, Ma XJ, Wang H, Bui S, Luo Y, Sloan P, Shaw RJ, Robinson M. Validation of a novel diagnostic standard in HPV-positive oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*. 2013;108(6):1332-9.

314. Schache AG, Liloglou T, Risk JM, Filia A, Jones TM, Sheard J, Woolgar JA, Helliwell TR, Triantafyllou A, Robinson M, Sloan P, Harvey-Woodworth C, Sisson D, Shaw RJ. Evaluation of human papilloma virus

diagnostic testing in oropharyngeal squamous cell carcinoma: sensitivity, specificity, and prognostic discrimination. *Clin Cancer Res.* 2011;17(19):6262-71.

315. Lewis JS Jr. p16 Immunohistochemistry as a standalone test for risk stratification in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Head Neck Pathol.* 2012;6 Suppl 1:S75-82.

316. Strojan P, Ferlito A, Medina JE, Woolgar JA, Rinaldo A, Robbins KT, Fagan JJ, Mendenhall WM, Paleri V, Silver CE, Olsen KD, Corry J, Suárez C, Rodrigo JP, Langendijk JA, Devaney KO, Kowalski LP, Hartl DM, Haigentz M Jr, Werner JA, Pellitteri PK, de Bree R, Wolf GT, Takes RP, Genden EM, Hinni ML, Mondin V, Shaha AR, Barnes L. Contemporary management of lymph node metastases from an unknown primary to the neck: I. A review of diagnostic approaches. *Head Neck.* 2013;35(1):123-32.

317. Cameron JE, Snowwhite IV, Chaturvedi AK, Hagensee ME. Human papillomavirus-specific antibody status in oral fluids modestly reflects serum status in human immunodeficiency virus-positive individuals. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003;10(3):431-8

318. Anderson KS, Wong J, D'Souza G, Riemer AB, Lorch J, Haddad R, Pai SI, Longtine J, McClean M, LaBaer J, Kelsey KT, Posner M. Serum antibodies to the HPV16 proteome as biomarkers for head and neck cancer. *Br J Cancer.* 2011;104(12):1896-905.

319. Syrjänen KJ, Syrjänen SM, Lamberg MA, Pyrhönen S. Human papillomavirus (HPV) involvement in squamous cell lesions of the oral cavity. *Proc Finn Dent Soc.* 1983;79(1):1-8.

320. Syrjänen S, Lodi G, von Bültzingslöwen I, Aliko A, Arduino P, Campisi G, Challacombe S, Ficarra G, Flaitz C, Zhou HM, Maeda H, Miller C, Jontell M. Human papillomaviruses in oral carcinoma and oral potentially malignant disorders: a systematic review. *Oral Dis.* 2011;17 Suppl 1:58-72.

321. Lee SY, Cho NH, Choi EC, Baek SJ, Kim WS, Shin DH, Kim SH.

Relevance of human papilloma virus (HPV) infection to carcinogenesis of oral tongue cancer. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2010;39(7):678-83.

322. Pintos J, Black MJ, Sadeghi N, Ghadirian P, Zeitouni AG, Viscidi RP, Herrero R, Coutlée F, Franco EL. Human papillomavirus infection and oral cancer: a case-control study in Montreal, Canada. *Oral Oncol.* 2008;44(3):242-50.

323. Herrero R, Castellsagué X, Pawlita M, Lissowska J, Kee F, Balaram P, Rajkumar T, Sridhar H, Rose B, Pintos J, Fernández L, Idris A, Sánchez MJ, Nieto A, Talamini R, Tavani A, Bosch FX, Reidel U, Snijders PJ, Meijer CJ, Viscidi R, Muñoz N, Franceschi S; IARC Multicenter Oral Cancer Study Group. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *J Natl Cancer Inst.* 2003;95(23):1772-83.

324. Dayyani F, Etzel CJ, Liu M, Ho CH, Lippman SM, Tsao AS. Meta-analysis of the impact of human papillomavirus (HPV) on cancer risk and overall survival in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC). *Head Neck Oncol.* 2010;2:15.

325. Ragin CC, Taioli E. Survival of squamous cell carcinoma of the head and neck in relation to human papillomavirus infection: review and meta-analysis. *Int J Cancer.* 2007;121(8):1813-20.

326. Romanitan M, Näsman A, Ramqvist T, Dahlstrand H, Polykretis L, Vogiatzis P, Vamvakas P, Tasopoulos G, Valavanis C, Arapantoni-Dadioti P, Banis K, Dalianis T. Human papillomavirus frequency in oral and oropharyngeal cancer in Greece. *Anticancer Res.* 2008;28(4B):2077-80.

327. Termine N, Panzarella V, Falaschini S, Russo A, Matranga D, Lo Muzio L, Campisi G. HPV in oral squamous cell carcinoma vs head and neck squamous cell carcinoma biopsies: a meta-analysis (1988-2007). *Ann Oncol.* 2008;19(10):1681-90.

328. Koskinen WJ, Brøndbo K, Mellin Dahlstrand H, Luostarinen T, Hakulinen

T, Leivo I, Molijn A, Quint WG, Røysland T, Munck-Wikland E, Mäkitie AA, Pyykkö I, Dillner J, Vaheri A, Aaltonen LM. Alcohol, smoking and human papillomavirus in laryngeal carcinoma: a Nordic prospective multicenter study. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2007;133(9):673-8.

329. Vietia D, Liuzzi J, Avila M, De Guglielmo Z, Prado Y, Correnti M. Human papillomavirus detection in head and neck squamous cell carcinoma. *Ecancermedicalscience*. 2014;8:475.

330. Hoffmann M, Kahn T, Mahnke CG, Goeroegh T, Lippert BM, Werner JA. Prevalence of human papillomavirus in squamous cell carcinoma of the head and neck determined by polymerase chain reaction and Southern blot hybridization: proposal for optimized diagnostic requirements. *Acta Otolaryngol*. 1998;118(1):138-44.

331. Singhi AD, Califano J, Westra WH. High-risk human papilloma virus in nasopharyngeal carcinoma. *Head Neck* 2012; 34: 213–8.

332. Maxwell JH, Kumar B, Feng FY, et al. HPV-positive/p16-positive/EBV-negative nasopharyngeal carcinoma in white North Americans. *Head Neck* 2010; 32: 562–7.

333. Giannoudis A, Ergazaki M, Segas J, Giotakis J, Adamopoulos G, Gorgoulis V, Spandidos DA. Detection of Epstein-Barr virus and human papillomavirus in nasopharyngeal carcinoma by the polymerase chain reaction technique. *Cancer Lett*. 1995;89(2):177-81.

334. Lingen MW, Xiao W, Schmitt A, Jiang B, Pickard R, Kreinbrink P, Perez-Ordonez B, Jordan RC and Gillison ML: Low etiologic fraction for high-risk human papillomavirus in oral cavity squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 49(1): 1-8, 2013.

335. Badaracco G, Rizzo C, Mafera B, Pichi B, Giannarelli D, Rahimi SS, Vigili MG, Venuti A. Molecular analyses and prognostic relevance of HPV in head and neck tumours. *Oncol Rep*. 2007 Apr;17(4):931-9.

336. Vlachsis K, Nikolaou A, Markou K, Fountzilas G, Daniilidis I. Clinical and

molecular prognostic factors in operable laryngeal cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2005;262(11):890-8.

337. Torrente MC, Ampuero S, Abud M, Ojeda JM. Molecular detection and typing of human papillomavirus in laryngeal carcinoma specimens. *Acta Otolaryngol.* 2005;125(8):888-93.

338. de Oliveira DE, Bacchi MM, Macarenco RS, Tagliarini JV, Cordeiro RC, Bacchi CE. Human papillomavirus and Epstein-Barr virus infection, p53 expression, and cellular proliferation in laryngeal carcinoma. *Am J Clin Pathol.* 2006;126(2):284-93.

339. Lee SY, Cho NH, Choi EC, Kim WS, Kim SH. Is human papillomavirus a causative factor of glottic cancer? *J Voice.* 2011;25(6):770-4.

340. Shen-Gunther J, Rebeles J. Genotyping human papillomaviruses: development and evaluation of a comprehensive DNA microarray. *Gynecol Oncol.* 2013;128(3):433-41.

341. Nemes JA, Deli L, Nemes Z, Márton IJ. Expression of p16(INK4A), p53, and Rb proteins are independent from the presence of human papillomavirus genes in oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006;102(3):344-52.

342. Boy S, Van Rensburg EJ, Engelbrecht S, Dreyer L, van Heerden M, van Heerden W. HPV detection in primary intra-oral squamous cell carcinomas--commensal, aetiological agent or contamination? *J Oral Pathol Med.* 2006;35(2):86-90.

343. Molano M, Van den Brule A, Plummer M, et al. Determinants of clearance of human papillomavirus infections in Colombian women with normal cytology: a population-based, 5-year follow-up study. *Am J Epidemiol* 2003;158:486 – 94.

344. Hernandez BY, Goodman MT, Lynch CF, Cozen W, Unger ER, Steinau M, Thompson T, Saber MS, Altekruse SF, Lyu C, Saraiya M; HPV Typing of Cancer Workgroup. Human papillomavirus prevalence in invasive laryngeal

cancer in the United States. PLoS One. 2014 ;9(12):e115931.

345. Luo CW, Roan CH, Liu CJ. Human papillomaviruses in oral squamous cell carcinoma and pre-cancerous lesions detected by PCR-based gene-chip array. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2007;36(2):153-8.

346. Venuti A, Manni V, Morello R, De Marco F, Marzetti F, Marcante ML. Physical state and expression of human papillomavirus in laryngeal carcinoma and surrounding normal mucosa. *J Med Virol.* 2000;60(4):396-402.

347. Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KF, et al. Age, sexual behavior and human papillomavirus infection in oral cavity and oropharyngeal cancers. *Int J Cancer* 2004;108:766 – 72.

348. Gerein V, Rastorguev E, Gerein J, Draf W, Schirren J. Incidence, age at onset, and potential reasons of malignant transformation in recurrent respiratory papillomatosis patients: 20 years experience. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2005;132(3):392-4.

349. Cheung FMF, Lau TWS, Cheung LKN, Li ASM, Chow SK, Lo AWI. Schneiderian papillomas and carcinomas: a retrospective study with special reference to p53 and p16 suppressor gene expression and association with HPV. *Ear Nose Throat J* 2010; 89: E5-12.

350. Atighechi S, Ahmadpour Baghdadabad MR, Mirvakili SA, Sheikhha MH, Baradaranfar MH, Dadgarnia MH, Behniafard N. Human papilloma virus and nasopharyngeal carcinoma: pathology, prognosis, recurrence and mortality of the disease. *Exp Oncol.* 2014;36(3):215-6.

351. Kim JY, Yoon JK, Citardi MJ, Batra PS, Roh HJ. The prevalence of human papillomavirus infection in sinonasal inverted papilloma specimens classified by histological grade. *Am J Rhinol* 2007; 21: 664-9.

352. Jenko K, Kocjan B, Zidar N, Poljak M, Strojjan P, Zargi M, Blatnik O, Gale N. In inverted papillomas HPV more likely represents incidental colonization than an etiological factor. *Virchows Arch.* 2011;459(5):529-38.

353. Lajer CB, von Buchwald C. The role of human papillomavirus in head and neck cancer. *APMIS* 2010; 118: 510–519.
354. Barnes L, Eveson JW, Reichert P, Sidransky D: *Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours*. Lyon: IARC Press; 2005.
355. Palmieri A, Carinci F, Martinelli M, Spinelli G, Lo Muzio L, Rubini C, Scapoli L: Absence of Simian virus 40, BK, and JC polyomavirus DNA in squamous cell carcinoma limited to the oral cavity. *Head Neck* 2010; 32(3):375–380.
356. Ringström E, Peters E, Hasegawa M, Posner M, Liu M, Kelsey KT. Human papillomavirus type 16 and squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res.* 2002;8(10):3187-92.
357. Li W, Thompson CH, O'Brien CJ, McNeil EB, Scolyer RA, Cossart YE, Veness MJ, Walker DM, Morgan GJ, Rose BR. Human papillomavirus positivity predicts favourable outcome for squamous carcinoma of the tonsil. *Int J Cancer* 2003;106:553–8.
358. Wittekindt C, Gultekin E, Weissenborn SJ, Dienes HP, Pfister HJ, Klussmann JP. Expression of p16 protein is associated with human papillomavirus status in tonsillar carcinomas and has implications on survival. *Adv Otorhinolaryngol* 2005;62:72–80.
359. Portugal LG, Goldenberg JD, Wenig BL, Ferrer KT, Nodzenski E, Sabnani JB, Javier C, Weichselbaum RR, Vokes EE. Human papillomavirus expression and p53 gene mutations in squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1997;123:1230–4.
360. Pintos J, Franco EL, Black MJ, Bergeron J, Arella M. Human papillomavirus and prognoses of patients with cancers of the upper aerodigestive tract. *Cancer* 1999;85:1903–9.
361. Paz IB, Cook N, OdomMaryon T, et al. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer—an association of HPV 16 with squamous cell carcinoma of Waldeyer's tonsillar ring. *Cancer* 1997;79:595-604.

362. Burger MPM, Hollema H, Gouw ASH, et al. Cigarette-smoking and human papillomavirus in patients with reported cervical cytological abnormality. *Br Med J* 1993;306:749-52.

363. Dahlstrom KR, Little JA, Zafereo ME, Lung M, Wei Q, Sturgis EM. Squamous cell carcinoma of the head and neck in never smoker-never drinkers: a descriptive epidemiologic study. *Head Neck*. 2008;30(1):75-84.

364. Smith EM, Rubenstein LM, Haugen TH, Hamsikova E, Turek LP. Tobacco and alcohol use increases the risk of both HPV-associated and HPV-independent head and neck cancers. *Cancer Causes Control*. 2010;21(9):1369-78.

<http://www.hhmi.org>