

**ΕΘΝΙΚΟΝ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟΝ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΝ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΟΔΟΝΤΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΣΤΗΝ ΟΔΟΝΤΙΑΤΡΙΚΗ ΕΠΙΣΤΗΜΗ**

**Η TLR-4 ΚΑΙ TLR-9-ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΗ ΑΝΟΣΙΑΚΗ ΑΠΑΝΤΗΣΗ
ΣΤΟ ΑΚΑΝΘΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΓΛΩΣΣΑΣ**



**ΑΡΓΥΡΓΙΟΣ Γ. ΔΑΣΚΑΛΟΠΟΥΛΟΣ
ΧΕΙΡΟΥΡΓΟΣ ΟΔΟΝΤΙΑΤΡΟΣ**

ΑΘΗΝΑ 2020

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπουσα : Σκλαβούνου Αλεξάνδρα, Καθηγήτρια Οδοντιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

Μέλη: Νικητάκης Γ. Νικόλαος, Καθηγητής Οδοντιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ
Λάζαρης Χ. Ανδρέας, Καθηγητής Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπουσα: Σκλαβούνου Αλεξάνδρα, Καθηγήτρια Οδοντιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

Μέλη: Νικητάκης Γ. Νικόλαος, Καθηγητής Οδοντιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ
Λάζαρης Χ. Ανδρέας, Καθηγητής Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ
Καβατζάς Νικόλαος, Καθηγητής Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ
Περισανίδης Χρήστος, Καθηγητής Οδοντιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ
Τσιχλάκης Κωνσταντίνος, Καθηγητής Οδοντιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ
Τόσιος Κωνσταντίνος, Αναπλ. Καθηγητής Οδοντιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

Η έγκριση της Διδακτορικής Διατριβής από το Τμήμα Οδοντιατρικής του Ε.Κ.Π.Α.,
δεν υποδηλώνει ότι αποδέχεται τη γνώμη του συγγραφέα.

Οργανισμός Πανεπιστημίου Αθηνών, Άρθρο 202, παρ. 2, Ν.5343/1932.

*Στην μητέρα μου
Στην Αγγελική και στην Άννα Μαρία*

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	7
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	13
Ι.ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	17
1.ΤΟ ΑΚΑΝΘΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΤΟΥ ΣΤΟΜΑΤΟΣ	19
1.1 ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΓΙΑ ΤΟ ΑΚΑΝΘΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΤΟΥ ΣΤΟΜΑΤΟΣ ...	21
1.1.1 Εισαγωγή.....	21
1.1.2 Επιδημιολογικά δεδομένα.....	22
1.1.3 Αιτιολογικοί παράγοντες	23
1.1.4 Κλινική εικόνα.....	25
1.1.5 Ιστοπαθολογική εικόνα	26
1.1.6 Ιστολογική διαφοροποίηση του ΑΚΣ κατά WHO.....	28
1.1.7 Ιστοπαθολογική αξιολόγηση του ΑΚΣ με βάση το τροποποιημένο σύστημα Anneroth (κατά Bryne)	28
1.1.8 Το μικροπεριβάλλον του ΑΚΣ	31
1.1.9 Σταδιοποίηση του ΑΚΣ με το σύστημα TNM και η πιλοτική εφαρμογή του συστήματος Immunoscore	34
1.1.10 Διάγνωση	38
1.1.11 Θεραπευτική αντιμετώπιση	39
1.1.12 Πρόγνωση	40

1.2 ΜΟΡΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΣΤΟ ΑΚΑΝΘΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΤΟΥ ΣΤΟΜΑΤΟΣ	42
1.2.1 Εισαγωγή.....	42
1.2.2 Θεωρία της καρκινοποίησης του πεδίου	42
1.2.3 Ογκογονίδια, ογκοκατασταλτικά γονίδια και miRNAs	43
1.2.4 Γενετική αστάθεια	44
1.2.5 Διαταραχές του κυτταρικού κύκλου, του πολλαπλασιαστικού δυναμικού και της απόπτωσης των κυττάρων.....	45
1.2.6 Μοριακές οδοί της καρκινογένεσης του στόματος.....	46
1.2.7 Η οικογένεια των πρωτεϊνών του NF-κΒ	47
1.3 HPV ΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΗ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ	50
1.3.1 Γενικά στοιχεία για τον ιό HPV	50
1.3.2 Γονιδιωματική οργάνωση του ιού HPV	50
1.3.3 Φυσική ιστορία της HPV λοίμωξης.....	52
1.3.4 Μηχανισμοί της HPV καρκινογένεσης.....	54
1.3.5 Συμμετοχή του ιού HPV στην καρκινογένεση κεφαλής και τραχήλου	56
1.3.6 Συμμετοχή του ιού HPV στην καρκινογένεση του στόματος.....	58
2. ΑΝΟΣΙΑΚΗ ΑΠΑΝΤΗΣΗ ΣΤΟ ΑΚΑΝΘΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΤΟΥ ΣΤΟΜΑΤΟΣ	61
2.1 Εισαγωγή.....	63
2.2 Γενικά χαρακτηριστικά της Φυσικής Ανοσίας.....	63
2.3 Ο ρόλος της Φυσικής Ανοσίας στο καρκίνο	65
2.4 Θεωρία του κινδύνου	67
2.5 Οι υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων-Pattern Recognition Receptors (PRRs) ...	68
2.6 Οι υποδοχείς Toll-Like Receptors (TLRs).....	68
2.7 Η μοριακή οδός των TLRs	70
2.8 Ο υποδοχέας TLR4	71

2.9 Ο υποδοχέας TLR9	73
2.10 Δομή και λειτουργία των ιντερφερονών.....	75
2.11 Δομή και λειτουργία της ιντερφερόνης-β.....	76
II. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	79
III. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	83
1.ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	85
1.1 ΥΛΙΚΟ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	85
1.2 ΜΕΘΟΔΟΙ.....	86
1.2.1 Ανοσοϊστοχημεία.....	86
1.2.2 Αξιολόγηση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης.....	92
1.2.3 Ανίχνευση στελεχών HPV με τη μέθοδο της Αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase chain reaction-PCR)	96
1.2.4 Αξιολόγηση των HPV θετικών δειγμάτων με συνδυασμό PCR και ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του μορίου p16 ^{INK4a}	98
1.2.5 Στατιστική ανάλυση	98
2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	100
2.1 ΚΑΤΗΓΟΡΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΜΕ ΒΑΣΗ ΚΛΙΝΙΚΑ ΚΑΙ ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ.....	100
2.2 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΤΟΥ ΙΟΥ HPV.....	107
2.2.1 Αρχικά αποτελέσματα ανίχνευσης στελεχών με τη μέθοδο της PCR	107
2.2.2 Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του δείκτη p16 ^{INK4a}	109

2.2.3 Τελική αξιολόγηση των HPV θετικών δειγμάτων από το συνδυασμό PCR και p16 ^{INKAa}	109
2.2.4 Συσχέτιση της HPV θετικότητας με τα δημογραφικά στοιχεία των ασθενών, τις ιστοπαθολογικές κατηγορίες και τις ιστοπαθολογικές παραμέτρους του τροποποιημένου συστήματος Anneroth (κατά Bryne)	111
2.3 ΑΝΟΣΟΙΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΩΝ TLR4, TLR9, NF-κΒ ΚΑΙ IFN-β ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΤΙΣ ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΚΑΙ ΤΙΣ ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ ΤΟΥ ΤΡΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ANNEROTH (ΚΑΤΑ BRYNE).	113
2.3.1.1 Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του μορίου TLR4.....	113
2.3.1.2 Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του μορίου TLR4	118
2.3.2.1 Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του μορίου TLR9.....	129
2.3.2.2 Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του μορίου TLR9	133
2.3.3.1 Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του μορίου NF-κΒ (p65)	144
2.3.3.2 Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του μορίου NF-κΒ(p65).....	149
2.3.4.1 Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του μορίου IFN-β.....	163
2.3.4.2 Στατιστική ανάλυση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του μορίου IFN-β..	167
2.4 Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των μελετώμενων μορίων με την HPV θετικότητα	178
2.5 Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης μεταξύ των μελετώμενων μορίων.	181
3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	185
3.1 Εισαγωγικά στοιχεία.....	185
3.2 Έκφραση του TLR4 στο ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα της γλώσσας	186

3.3 Έκφραση του TLR9 στο ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα της γλώσσας	188
3.4 Έκφραση του NF-κB στο ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα της γλώσσας	189
3.5 Έκφραση του IFN-β στο ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα της γλώσσας	190
3.6 Σχέση των TLRs με το μικροβίωμα και τον ιό HPV	191
4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	193
IV ΠΕΡΙΛΗΨΗ	195
SUMMARY	199
V ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	205

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Ο ρόλος του μικροπεριβάλλοντος στον καρκίνο έχει μελετηθεί επισταμένα και θεωρείται κομβικός για την ανάπτυξη και επέκταση ενός όγκου. Το μικροπεριβάλλον αποτελείται από στρώμα και κυτταρικά συστατικά, τα οποία αλληλεπιδρούν με τα νεοπλασματικά κύτταρα είτε εμποδίζοντας την ανάπτυξή τους είτε βοηθώντας τα να επιβιώσουν και να επεκταθούν, προς όφελος του όγκου. Σημαντικά συστατικά του μικροπεριβάλλοντος ενός καρκίνου αποτελούν οι δομές της φυσικής ή μη ειδικής ανοσίας (innate immunity), οι οποίες συγκροτούνται κυρίως από κύτταρα και υποδοχείς, που λειτουργούν συνεπικουρικά στη διήθηση και τη μετάσταση.

Οι Toll-Like Receptors-TLRs αποτελούν υποδοχείς της φυσικής ανοσίας και εκφράζονται κυρίως σε φυσιολογικά κερατινοκύτταρα του δέρματος και των βλεννογόνων καθώς και σε φλεγμονώδη κύτταρα. Στον άνθρωπο έχουν ταυτοποιηθεί 10 TLRs, οι οποίοι λειτουργούν ως «αισθητήρες» που αναγνωρίζουν παθογόνους εισβολείς (βακτήρια, ιούς, μύκητες, πρωτόζωα), ενεργοποιώντας αρχικά το σκέλος της φυσικής ανοσίας και μετέπειτα την ειδική ανοσία, για την αναχαίτισή τους. Παράλληλα, οι TLRs ενεργοποιούνται από ενδογενή μόρια του οργανισμού, προερχόμενα από κατεστραμμένα κύτταρα και ιστούς ή κύτταρα που βρίσκονται σε διαδικασία νεοπλασματικής εκτροπής. Το γεγονός αυτό πυροδότησε το ερευνητικό ενδιαφέρον για την διερεύνηση της πιθανής συμμετοχής των TLRs στην πολύπλοκη διαδικασία της καρκινογένεσης.

Διάφορες μελέτες σε πολλά είδη καρκίνου έχουν συσχετίσει τους TLRs τόσο με ογκογενετικές διαδικασίες όσο και με αντιογκογόνο δραστηριότητα. Έχει αποδειχθεί ότι η ενεργοποίηση των υποδοχέων αυτών στα νεοπλασματικά κύτταρα οδηγεί στην απελευθέρωση κυτταροκινών και χημειοκινών που ενεργοποιούν το μοριακό μονοπάτι του NF-κΒ, με επακόλουθο την απελευθέρωση πρόσθετων κυτταροκινών, προ-αγγειογόνων μεσολαβητών, αυξητικών παραγόντων και αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών, που προάγουν την επιβίωση και εξέλιξη του καρκινικών κυττάρων. Άλλες μελέτες έχουν αποδείξει ότι η ενεργοποίηση των TLRs σε φλεγμονώδη κύτταρα οδηγεί σε παραγωγή ιντερφερονών τύπου I (Interferons type I-IFNs-I) στις οποίες έχουν αποδοθεί αντιογκογόνες ιδιότητες. Από τα παραπάνω διαφαίνεται ότι ο ρόλος των TLRs στην καρκινογένεση είναι δισυπόστατος και αντικρουόμενος.

Ο Καρκίνος του Στόματος (ΚΣ) (όταν συμπεριλαμβάνεται και ο καρκίνος του στοματοφάρυγγα) είναι ο 6^{ος} πιο συχνός καρκίνος παγκοσμίως. Εκτός από το κάπνισμα σε συνδυασμό με το αλκοόλ, τα υψηλού κινδύνου στελέχη του ιού HPV εμπλέκονται στην παθογένεση μιας υποκατηγορίας όγκων. Παρόλη όμως την πρόοδο που έχει παρατηρηθεί στον τομέα της διάγνωσης και τις πολλαπλές ερευνητικές προσπάθειες για την εφαρμογή στοχευμένων θεραπειών, ο καρκίνος του στόματος εξακολουθεί να παρουσιάζει χαμηλά ποσοστά πενταετούς επιβίωσης.

Το Ακανθοκυτταρικό Καρκίνωμα του Στόματος (ΑΚΣ) αποτελεί το 90% των κακοηθειών της στοματικής κοιλότητας και αναπτύσσεται σε ένα πολύπλοκο μικροπεριβάλλον όπου τα φλεγμονώδη κύτταρα εκκρίνουν προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες αντιστρατεύοντας την επέκτασή του. Σε αντιδιαστολή αυτής της προσπάθειας, τα καρκινικά κύτταρα αναπτύσσουν μηχανισμούς για την καταστολή της αντιογκογόνας αυτής δραστηριότητας, στοχεύοντας κυρίως στην αδρανοποίηση των ρυθμιστικών Τ λεμφοκυττάρων (Tregs). Το Ακανθοκυτταρικό Καρκίνωμα Γλώσσας (ΑΚΓ) αποτελεί το συχνότερο, επιθετικότερο ΑΚΣ με ιδιαίτερα πτωχή πρόγνωση. Η μελέτη των μοριακών μηχανισμών ανάπτυξής του, καθώς και η αλληλεπίδρασή του με τα μόρια του μικροπεριβάλλοντος παρουσιάζει ιδιαίτερο επιστημονικό ενδιαφέρον.

Μελέτες έχουν δείξει ότι ο υποδοχέας TLR4, ένα μέλος της οικογένειας των TLRs, εκφράζεται σε κυτταρικές σειρές ΑΚΓ και η έκφρασή του αυξάνεται με την πρόοδο της νεοπλασίας. Επίσης, από άλλες μελέτες διαφαίνεται ότι η ενεργοποίηση ενός άλλου TLR, του TLR9, συσχετίζεται με αυξημένη διήθηση στο ΑΚΓ. Οι υποδοχείς αυτοί φαίνεται ότι επηρεάζονται και από την παρουσία του ιού HPV αφού ένας από τους πρωταρχικούς τους ρόλους είναι η αναγνώριση της ιικής εισβολής.

Στην παρούσα μελέτη επιχειρούμε να διερευνήσουμε την ανοσοϊστοχημική έκφραση των μορίων TLR4 και TLR9 και των κατιόντων προϊόντων των σηματοδοτικών τους οδών NF-κΒ και IFN-β σε περιπτώσεις βιοπτικού υλικού γλώσσας, που περιλαμβάνουν διηθητικά ΑΚΓ διαφόρων σταδίων διαφοροποίησης καθώς και *in situ* και επιφανειακά διηθητικά καρκινώματα. Η έκφραση των μορίων αυτών συσχετίζεται με διάφορες ιστοπαθολογικές παραμέτρους όπως και με την παρουσία του ιού HPV, συγκρίνοντας HPV θετικούς όγκους με HPV αρνητικούς.

Η κατανόηση των ογκογενετικών μηχανισμών και οι θεραπευτικές παρεμβάσεις στα μοριακά μονοπάτια των TLRs, έχουν δώσει νέες ελπιδοφόρες προοπτικές στην αντιμετώπιση της νόσου. Μελέτες έχουν δείξει η χρήση ανταγωνιστών των TLRs οδηγούν σε απελευθέρωση της δράσης των Tregs στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Επίσης, το ακετυλοσαλυκυλικό οξύ και άλλοι μη στεροειδείς αντιφλεγμονώδεις παράγοντες, αναστέλλουν τη δράση του NF-κΒ και διαμέσω αυτού την ανάπτυξη του ΑΚΣ. Θεραπεία με INFs χρησιμοποιείται (σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία και ακτινοβολία) σε ασθενείς με υποτροπιάζον μελάνωμα. Αν και απέχουμε αρκετά για την αποσαφήνιση των ακριβών μηχανισμών της TLR σηματοδότησης και της εμπλοκής της στην πολυσταδιακή διαδικασία της καρκινογένεσης, τα δεδομένα που παρέχουν στο πεδίο της θεραπευτικής αντιμετώπισης του ΑΚΣ αφήνουν περιθώρια αισιοδοξίας.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εκπόνηση μιας διδακτορικής διατριβής είναι μια πολυσταδιακή διαδικασία κατά την οποία η μελέτη, η μεθοδικότητα, η υπομονή και η επιμονή αποτελούν τους τέσσερις πυλώνες της όλης προσπάθειας. Μιας προσπάθειας την οποία ανεξάρτητα από τις διαχρονικές δυσκολίες της Ελληνικής πραγματικότητας οφείλει κάποιος να τη φτάσει μέχρι τέλους στοχεύοντας στο βέλτιστο δυνατό αποτέλεσμα. «Ό,τι δεν συνέβη ποτέ, είναι ό,τι δεν ποθήσαμε αρκετά» είχε πει ο πάνσοφος Νίκος Καζαντζάκης.

Σ' αυτές τις λίγες γραμμές οφείλω να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στους Καθηγητές και μέλη της Τριμελούς μου Επιτροπής, που με βοήθησαν στην πορεία και ολοκλήρωση της διαδικασίας: Στην Καθηγήτρια Στοματολογίας της Οδοντιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ κ. Αλεξάνδρα Σκλαβούνου, Επιβλέπουσα της Διδακτορικής Διατριβής, για την εν γένει συμβολή της, ιδιαίτερα δε στην πραγματοποίηση των πειραμάτων ανίχνευσης του ιού HPV και την διόρθωση των κειμένων της διατριβής. Στον Καθηγητή και Διευθυντή του Α' Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής της Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ κ. Ανδρέα Χ. Λάζαρη για την ουσιαστική συμβολή του στην αξιολόγηση των ιστολογικών παρασκευασμάτων, την ερμηνεία των αποτελεσμάτων, τις συμβουλές και την ενθάρρυνση. Στον Καθηγητή και Διευθυντή του Εργαστηρίου Στοματολογίας της Οδοντιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ κ. Νικόλαο Γ. Νικητάκη για την άοκνη προσπάθεια και την καθοριστική συμβολή του σε όλα τα στάδια της ερευνητικής διαδικασίας και ιδιαίτερα στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων και τη συγγραφή της ερευνητικής δημοσίευσης.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς όλους τους αφανείς ήρωες αυτής της προσπάθειας: το Βασίλη, το Στέφανο, το Θοδωρή, τη Μαρία, τη Λία και το Νίκο... Η φιλία, η αγάπη και η αδιάλειπτη υποστήριξή τους, μου ανατροφοδοτούσαν την έμπνευση, τη θέληση και τη δύναμη να φτάσω στην προσωπική μου Ιθάκη.

Αργύρης Γ. Δασκαλόπουλος

I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΤΟ ΑΚΑΝΘΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΤΟΥ ΣΤΟΜΑΤΟΣ

1.2 ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΓΙΑ ΤΟ ΑΚΑΝΘΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΤΟΥ ΣΤΟΜΑΤΟΣ

1.1.1 Εισαγωγή

Η στοματική κοιλότητα αποτελεί την αρχή του γαστρεντερικού συστήματος του ανθρώπου και διακρίνεται στο προστόμιο και την ιδίως στοματική κοιλότητα. Το προστόμιο περιλαμβάνει τα χείλη, τις παρειές, τα δόντια και τα προστομιακά ούλα. Η ιδίως στοματική κοιλότητα απαρτίζεται από τα δύο πρόσθια τριτημόρια της γλώσσας (κινητό μέρος της γλώσσας), το έδαφος του στόματος και την υπερώα. Ο στοματοφάρυγγας συνιστά την προς τα κάτω συνέχεια του εντερικού σωλήνα και αποτελείται από το οπίσθιο τριτημόριο της γλώσσας (βάση/ρίζα της γλώσσας), τις παρίσθμιες καμάρες με τη σταφυλή, και το μέσο τριτημόριο του φάρυγγα. Οι διάκριση των ανατομικών αυτών περιοχών πρέπει να είναι σαφής λόγω των διαφορών που παρουσιάζουν α. στην εμβρυολογική τους καταγωγή (το στοματικό επιθήλιο προέρχεται από το έξω βλαστικό δέρμα ενώ το επιθήλιο του στοματοφάρυγγα από το έσω βλαστικό δέρμα), β. στους διαφορετικούς παθογενετικούς μηχανισμούς ανάπτυξης των νεοπλασμάτων και γ. στην ετερόκλητη πρόγνωση και ανταπόκριση των διαφόρων περιπτώσεων στη θεραπεία (Αγγελόπουλος ΑΠ και συν. 2000).

Το Ακανθοκυτταρικό Καρκίνωμα του Στόματος (ΑΚΣ), ICD-O code 8070/3 (World Health Organization-WHO-2017), είναι ένα κακόηθες νεόπλασμα που μιμείται τα κύτταρα της ακανθώτης στιβάδας του πολύστιβου πλακώδους επιθηλίου (El-Naggar AK et al 2017). Είναι ιδιαίτερα επιθετικός όγκος, ο οποίος διηθεί τους υποκείμενους ιστούς, δίνοντας μεταστάσεις μέσω της λεμφικής ή/και της αιματικής οδού (Scully C 2011).

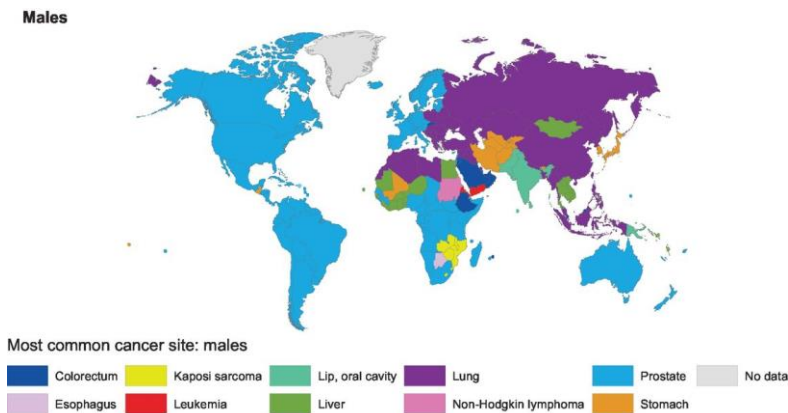
Στο κεφάλαιο που ακολουθεί θα περιγραφούν συνοπτικά τα κυριότερα κλινικά και ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά του ΑΚΣ, η βαθμονόμηση της ιστολογικής του διαφοροποίησης σύμφωνα με τα κριτήρια του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (World Health Organization-WHO 2017), η ιστοπαθολογική αξιολόγηση με βάση το τροποποιημένο σύστημα Anneroth (κατά Bryne), η σταδιοποίησή του σύμφωνα με τα συστήματα TNM και Immunoscore και οι βασικές αρχές της διαγνωστικής προσέγγισης, θεραπευτικής του αντιμετώπισης και πρόγνωσης. Τέλος θα γίνει ιδιαίτερη αναφορά στα επιδημιολογικά και κλινικά χαρακτηριστικά του Ακανθοκυτταρικού Καρκινώματος της Γλώσσας (ΑΚΓ), την πρόγνωση της πενταετούς επιβίωσης των ασθενών καθώς στα νεότερα δεδομένα που αφορούν τη θεραπευτική του αντιμετώπιση.

1.1.2 Επιδημιολογικά δεδομένα

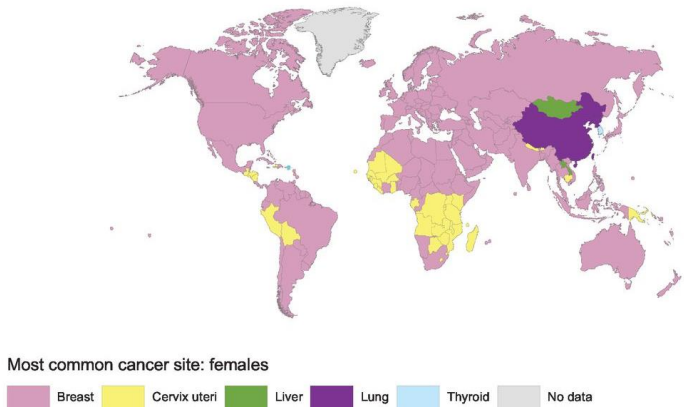
Ο Καρκίνος του Στόματος (ΚΣ), όταν συμπεριλαμβάνεται και ο καρκίνος του στοματοφάρυγγα, αποτελεί τον 6^ο συχνότερο καρκίνο παγκοσμίως (Torre LA et al 2016) αντιστοιχώντας στο 3% του συνόλου των κακοηθειών που εμφανίζονται στον άνθρωπο και το 30% των κακοηθειών της κεφαλής και του τραχήλου. Εξ αυτών το 90% αφορά σε ΑΚΣ (Genden et al 2010). Υπολογίζεται ότι το 2014 στις ΗΠΑ διαγνώστηκαν 42,440 νέες περιπτώσεις καρκίνων της στοματικής κοιλότητας και του φάρυγγα ενώ περίπου 8,390 ασθενείς κατέληξαν από τη νόσο (Siegel R et al 2014). Σύμφωνα με το WHO Globocan παγκοσμίως αναφέρονται 354,864 νέες περιπτώσεις καρκίνου του χείλους και της στοματικής κοιλότητας, και 177,384 νέοι θάνατοι το 2018 (Bray F et al 2018).

Το ΑΚΣ προσβάλλει συχνά άτομα στην 5^η και 6^η δεκαετία της ζωής ενώ τα τελευταία χρόνια έχει αυξηθεί η επίπτωσή του σε νεαρότερους ηλικιακά ασθενείς. Από άποψη φύλου προσβάλλει συχνότερα τους άνδρες σε σχέση με τις γυναίκες σε αναλογία 2:1 (Εικόνα 1) με το λόγο αυτό να τείνει μέσα στην τελευταία πεντηκονταετία να ανατραπεί, λόγω της μεγαλύτερης έκθεσης των γυναικών στους αιτιολογικούς παράγοντες κινδύνου (Warnakulasuriya S 2009, Lewellyn CD et al 2004).

Γεωγραφικά ο ΚΣ είναι πιο συχνός στην Ινδία, Πακιστάν, Σρι Λάνκα, Ταιβάν και Κίνα με 10 νέες περιπτώσεις ανά 100.000 άτομα ανά έτος (El Nagar AK et al 2017). Στη Δυτική και Ανατολική Ευρώπη, στη Λατινική Αμερική και στην Καραϊβική η επίπτωση παρουσιάζει αύξηση. Σαφή δεδομένα για τον ΚΣ στην Ελλάδα δεν υπάρχουν. Στο WHO Globocan του 2012, στον Ελλαδικό χώρο, αναφέρονται 381 περιπτώσεις ανά έτος.



Females



Εικόνα 1: Επιπολασμός των συχνότερων ειδών καρκίνου παγκοσμίως ανά φύλο (Torre LA et al 2016)

Το ΑΚΓ αποτελεί μια από της επιθετικότερες μορφές καρκίνου αντιπροσωπεύοντας περίπου το 50% των ΑΚΣ στόματος (Chen SW et al 2018). Αν και ο επιπολασμός και τα ποσοστά θνησιμότητας από το ΑΚΣ τείνουν να μειωθούν την τελευταία πενταετία, κυρίως λόγω του περιορισμού των καπνιστικών συνηθειών και της χρήσης αλκοόλ στις αναπτυσσόμενες χώρες, εντούτοις ο επιπολασμός και η θνησιμότητα από το ΑΚΓ παρουσιάζει αύξηση (Siegel RL et al 2016, Ng J et al 2017). Επιπλέον, παρ όλη τη βελτίωση των διαγνωστικών μεθόδων και τη διεύρυνση των θεραπευτικών επιλογών τις τελευταίες δεκαετίες, περίπου το 30-40% των ασθενών με ΑΚΓ θα καταλήξει από τη νόσο μέσα στην πενταετία (Mäkinen LK et al 2016).

1.1.3 Αιτιολογικοί παράγοντες

Το κάπνισμα θεωρείται ως ο κυριότερος αιτιολογικός παράγοντας για την ανάπτυξη του ΑΚΣ σε δοσοεξαρτώμενη σχέση. Σε μελέτη των Santos HB και συν. 2016 αναφέρεται ότι το 70% των ασθενών με ΑΚΣ ήταν ενήλικες καπνιστές. Ανάλογα ποσοστά βρέθηκαν σε πρόσφατη μετα-ανάλυση των Mohideen και συν. 2019, όπου διαπιστώθηκε ότι ο κίνδυνος ανάπτυξης ΑΚΓ λόγω του καπνίσματος είναι εξαιρετικά υψηλός (70%) σε μεγάλους σε ηλικία καπνιστές και αυξάνεται αναλογικά με την αύξηση των τσιγάρων ημερησίως. Ο δείκτης pack-year υπολογίζει τον αριθμό των τσιγάρων που καταναλώνονται καθημερινά επί των ανθρωποετών που κάποιος είναι καπνιστής και σχετίζεται άμεσα με τον σχετικό κίνδυνο ανάπτυξης ΑΚΣ. Το παθητικό κάπνισμα, η χρήση μαριχουάνας, η μάζηση ή/και τοποθέτηση φύλων καπνού στη στοματική κοιλότητα έχουν επίσης ενοχοποιηθεί ως παράγοντες κινδύνου. Έχει παρατηρηθεί ότι η διακοπή κάθε μορφής χρήσης του καπνού μειώνει σημαντικά τους

κινδύνους ανάπτυξης της νόσου αναλογικά και με την ηλικία (Warnakulasuriya S, 2010).

Η κατανάλωση αλκοόλ εμποδίζει την επιδιόρθωση των βλαβών του DNA λόγω της έκθεσης σε νιτροζαμίνες και συγκαταλέγεται στους αιτιολογικούς παράγοντες για την ανάπτυξη του ΑΚΣ (Santos HB et al 2016). Ο συνεργικός ρόλος καπνίσματος και αλκοόλ έχει μελετηθεί διεξοδικά και έχει βρεθεί ότι ο κίνδυνος αυξάνεται κατά 100 φορές σε καπνιστές και συστηματικούς πότες σε σχέση με τους απλούς πότες όπου ο κίνδυνος είναι αρκετά μικρότερος αλλά σαφώς υπαρκτός (Maserejian N et al 2006).

Το 1983 η Syrjänen K και συν. πρότειναν την αιτιολογική συσχέτιση του καρκίνου του στοματοφάρυγγα με τα υψηλού κινδύνου στελέχη των ιών HPV 16 και 18. Στις μέρες μας ο καρκίνος του στοματοφάρυγγα θεωρείται ότι σχετίζεται σε ποσοστό έως και 70% με τα υψηλού κινδύνου (High Risk-HR) στελέχη του ιού HPV (Chaturvedi AK et al 2011) ενώ για το ΑΚΣ το ποσοστό αυτό ανέρχεται σε ποσοστό 3% των όγκων (El-Naggar AK et al 2017). Το στέλεχος HPV 16 ανιχνεύεται στην πλειονότητα των περιπτώσεων. Τα τελευταία χρόνια, καθώς στις ΗΠΑ τα ποσοστά των καπνιστών μειώνονται και οι σεξουαλικές πρακτικές αλλάζουν, ο HPV θεωρείται σημαντικός παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη του καρκίνου του στοματοφάρυγγα καθώς και υποσυνόλου των ΑΚΣ (D'Souza G and Dempsey A 2011, D'Souza G et al 2017, Windon MJ et al 2018).

Άλλοι παράγοντες όπως: ηλικία μεγαλύτερη των 40 ετών, η φτωχή στοματική υγιεινή, το μικροβίωμα, διαιτητικές συνήθειες διατροφής πτωχής σε φρούτα και λαχανικά, ο χρόνιος μηχανικός ερεθισμός, η διαβρωτική μορφή του Ομαλού Λειχήνα, η ανοσοκαταστολή σε μεταμοσχευμένους ασθενείς και σε ασθενείς με HIV/AIDS, η ατροφική γλωσσίτιδα στην τριτογόνο σύφιλη, κληρονομικές ασθένειες όπως η αναιμία Falconi, τα σύνδρομα Plummer Vinson, Paterson Kelly και Li Fraumeni, η συγγενής δυσκεράτωση και η υποβλεννογόνια ίνωση που προκαλεί η μάσηση φύλλων betel-quid και areca nut, θεωρούνται ότι δρουν συνεπικουρικά στην ανάπτυξη ΑΚΣ και μελετώνται διεξοδικά για να τεκμηριωθεί η ακριβής αιτιολογική τους συσχέτιση (Kademani D 2007).

Το κάπνισμα και ιδιαίτερα σε συνδυασμό με το αλκοόλ αποτελούν τους κύριους αιτιολογικούς παράγοντες για τον καρκίνο της γλώσσας (Mäkinen et al 2016). Στους αιτιολογικούς παράγοντες του καρκίνου της βάσης της γλώσσας προστίθενται και τα ογκογόνα στελέχη του ιού HPV καθ ότι η περιοχή αυτή ανήκει ανατομικά στον στοματοφάρυγγα. Ο ιός HPV ευθύνεται για μικρή υποομάδα των καρκίνων του κινητού μέρους της γλώσσας (Lee S et al 2010, Bello IO et al 2010).

1.1.4 Κλινική εικόνα

Η κλινική εικόνα του ΑΚΣ μεταβάλλεται με την εξέλιξη στην νεοπλασία. Στα αρχικά στάδια του πρώιμου διηθητικού καρκινώματος εμφανίζεται συνήθως με τη μορφή ανομοιογενούς λευκοπλακίας ή ερυθροπλακίας ή/και συνδυασμού τους (Bouquot JE 1994, Reichart PA and Philipsen HP 2005, van der Waal I 2009). Καθώς η νόσος εξελίσσεται και ο όγκος αρχίζει να διηθεί τους ιστούς, αποκτά την κλινική εικόνα θηλωματώδους/κοκκώδους ή ακανονίστου σχήματος εξωφυτικής μάζας, είτε αναπτύσσεται ενδοφυτικά ως ελκωτική βλάβη με επηρμένα και σκληρά κατά της ψηλάφηση χείλη και ρυπαρό πυθμένα (Εικόνα 2). Ο βαθμός σκληρίας των βλαβών εξαρτάται από το βαθμό διήθησής τους από νεοπλασματικά κύτταρα και την παραγωγή κερατίνης. Όγκοι μεγάλων διαστάσεων υφίστανται νέκρωση της εξωτερικής τους επιφάνειας λόγω μη επαρκούς αιμάτωσης και θρέψης ή και τραυματισμού τους. Σε περιπτώσεις ενδοτικής διήθησης ή de novo ενδοτικής ανάπτυξης, το ΑΚΣ παρουσιάζει ακτινογραφική εικόνα ανώμαλης διαγνωστικής περιοχής με ασαφή όρια ενώ μπορεί να παρατηρηθεί ανώμαλη απορρόφηση των ριζών των δοντιών καθώς και εικόνα δοντιών που επιπλέουν μέσα στις αλλοιώσεις. Πόνος και υπαισθησία λόγω διήθησης νευρικών στελεχών, δυσκινησία των μαλακών μορίων και δυσκαταποσία εμφανίζονται σε προχωρημένες καταστάσεις ενώ σε αρχικά στάδια οι βλάβες είναι ως επί το πλείστον συμπτωματικές (Kadmani D et al 2007, Neville BW et al 2016).

Στο ΑΚΓ αποτελεί τη συχνότερη και επιθετικότερη μορφή ΑΚΣ, σε ποσοστό περίπου 50% επί του συνόλου τους (Σκλαβούβου Α 2018, Chen SW et al 2018). Δεύτερο σε συχνότητα και επιθετικότητα αποτελεί το Ακανθοκυτταρικό Καρκίνωμα (ΑΚ) στο έδαφος του στόματος, σε ποσοστό 35% και παρουσιάζει αυξημένη τάση μετάστασης στους επιχώριους λεμφαδένες. Το ΑΚ του χείλους εντοπίζεται συχνότερα στο κάτω χείλος σε ποσοστό 90%, συχνά σε έδαφος ακτινικής χειλίτιδας. Συναντάται συχνότερα σε λευκά άτομα που εκτίθενται επί μακρόν στην ηλιακή ακτινοβολία, ως έλκος με σκληρά χείλη που καλύπτεται από εφελκίδα. Η κλινική εικόνα ΑΚ στα ούλα και το φατνιακό βλεννογόνο συνήθως μιμείται έντονη περιοδοντική καταστροφή, ή όγκο που εμποδίζει την έδραση Οδοντοστοιχιών και οδηγεί σε εκτεταμένες οστεολυτικές βλάβες. Εξαγωγή σε έδαφος ΑΚΣ καταλείπει μετεξακτικό φατνίο το οποίο δεν επουλώνεται. Τέλος όγκοι που αναπτύσσονται στις παρειές και στην υπερώα προξενούν σταδιακά δυσφαγία και δυσκαταποσία και πόνο με αντανakλαστικές εντοπίσεις (Greene FL et al 2002, Neville BW et al 2016).

Το ΑΚΓ εμφανίζει τη συνήθη κλινική εικόνα του ΑΚΣ ενώ οι όγκοι εντοπίζονται συχνά στο μέσο προς οπίσθιο τριτημόριο του πλαγίου χείλους και της κοιλιακής επιφάνειας (Εικόνα 2) (Gorsky M et al 2004, Naderpour M et al 2013 Σκλαβούβου Α 2018). Το ΑΚΓ εμφανίζει ιδιαίτερα τοπική διηθητική ικανότητα με το 25% των ασθενών να εμφανίζουν τραχηλικές λεμφαδενικές μεταστάσεις (Mäkinen LK, Hagström J, Mäkitie A et al 2016). Η ιστοπαθολογική διαφοροποίηση κατά WHO και η

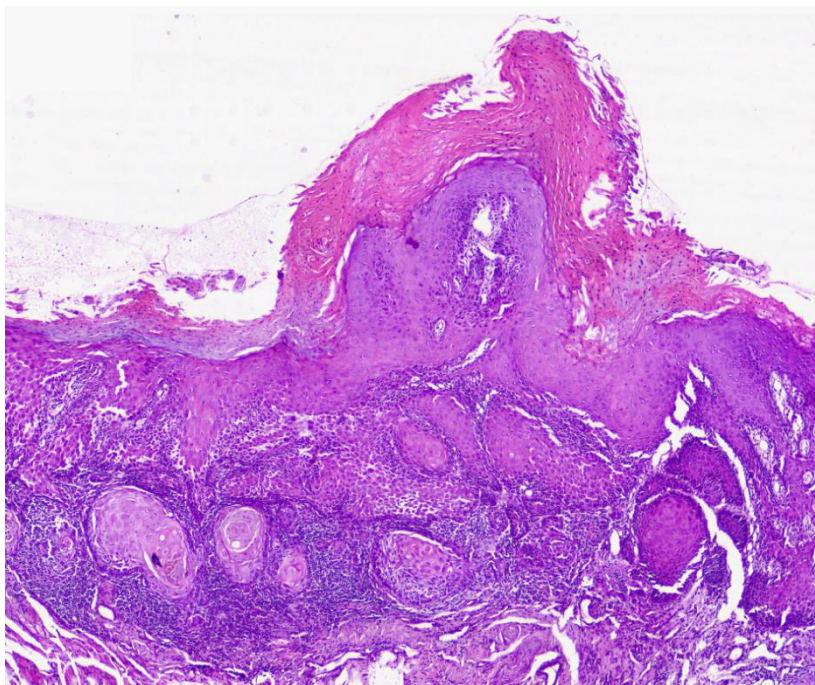
σταδιοποίηση σύμφωνα με το σύστημα TNM εφαρμόζονται καθολικά για την εκτίμηση ενός ΑΚΓ και για τον κατάλληλο σχεδιασμό της θεραπείας. Επιπρόσθετα αρκετοί βιοδείκτες με προγνωστική χρησιμότητα μελετώνται στο ΑΚΓ χωρίς αυτό να έχει αλλάξει προς το παρόν το σχεδιασμό της θεραπείας του η οποία παραμένει η χειρουργική σε συνδυασμό με την χημειο/ακτινοθεραπεία ή/και την ανοσοθεραπεία ανάλογα με το στάδιο της αρχικής νόσου ή την αναγκαιότητα αντιμετώπισης υποτροπής (Bello IO et al 2010).



Εικόνα 2: Αρχόμενο διηθητικό ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα στο μέσο τριτημόριο του πλαγίου χείλους γλώσσας αριστερά. Στο οπίσθιο τριτημόριο της γλώσσας διακρίνεται λευκοπλακία (Από το προσωπικό αρχείο)

1.1.5 Ιστοπαθολογική εικόνα

Το ΑΚΣ συνηθέστερα αναπτύσσεται σε έδαφος δυσπλαστικού επιθηλίου όπου σταδιακά παρατηρείται διάσπαση της βασικής μεμβράνης και διήθηση του υποκείμενου συνδετικού ιστού από ποικίλου μεγέθους νησίδια ή χορδές ή/και μεμονωμένα κακοήθη νεοπλασματικά κύτταρα τα οποία προσομοιάζουν με τα κύτταρα της ακανθώτης στιβάδας. Τα νεοπλασματικά κύτταρα παρουσιάζουν «ατυπία», η οποία χαρακτηρίζεται από απώλεια του αξονικού τους προσανατολισμού, διάφορου βαθμού πυρηνική και κυτταρική πλειομορφία, αυξημένη σχέση αναλογία πυρήνα-κυτταροπλάσματος, ευμεγέθεις βαθυχρωματικούς ή φυσαλιδώδεις πυρήνες με πολλαπλά και εμφανή πυρήνια και άφθονο ηωσινόφιλο κυτταρόπλασμα. Επίσης παρατηρούνται, διάσπαρτες άτυπες μιτωτικές διαιρέσεις, ατομική κερατινοποίηση και σχηματισμός μαργαριταροειδών σφαιρών κερατίνης (Gnepp DR 2009) (Εικόνα 3).



Εικόνα 3: Ιστολογική εικόνα ΑΚΓ. Διακρίνονται τα νεοπλασματικά κύτταρα με την χαρακτηριστική ατυπία καθώς και εκτεταμένος σχηματισμός σφαιρών κερατίνης (Από το αρχείο του Εργαστηρίου Στοματολογίας, Οδοντιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ)

Τα νεοπλασματικά κύτταρα διηθούν την θηλώδη και δικτυωτή μοίρα του χορίου και τον υποβλεννογόνο χιτώνα επεκτεινόμενα στον υποκείμενο λιπώδη, μυϊκό ή οστίτη ιστό, καταστρέφοντας τα μαλακά μέρη του στόματος και τα οστά των γνάθων. Περιβάλλουν και τελικά εισέρχονται μέσα στον αυλό αιμοφόρων αγγείων και λεμφαγγείων (intravascular invasion) καταστρέφοντας τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Επίσης εμφανίζουν περινευρικές διηθήσεις (perineural invasion) εισερχόμενα εντός του περινεύριου διαστήματος ή του επινευρίου προκαλώντας μερική ή πλήρη περίσφιξη του νεύρου. Το υπόστρωμα του όγκου παρουσιάζει διαφόρου βαθμού φλεγμονώδη διήθηση από λεμφοκύτταρα και πλασματοκύτταρα ενώ παρατηρείται και σχηματισμός νεόπλαστων αγγείων, τα οποία θρέφουν τον όγκο, συμβάλλοντας στην επέκτασή του (νεοαγγειογένεση). Ως υπότυποι του ΑΚΣ έχουν αναγνωρισθεί το βασικοειδές, το ατρακτοκυτταρικό, το αδενοακανθοκυτταρικό, το σωληνώδες (carcinoma cuniculatum), το μηρμηκίωδες, το λεμφοεπιθηλιακό, το θηλώδες και το ακανθολυτικό (El-Naggar AK et al 2017).

Ως βάθος διήθησης (tumor thickness ή depth of invasion) ορίζεται η διάσταση του όγκου που μετράται από την επιφάνειά του σε εξωφυτικές βλάβες ή τον πυθμένα της έλκωσης μέχρι το βαθύτερο σημείο διήθησης του όγκου. Ως όριο διήθησης του όγκου (deep invasive tumor front) ορίζεται η περιοχή εισβολής των νεοπλασματικών κυττάρων στους ιστούς του ξενιστή (Gnepp DR 2009).

1.1.6 Ιστολογική διαφοροποίηση του ΑΚΣ κατά WHO (World Health Organization)

Το ΑΚΣ (ICD-O code 8070/3) κατηγοριοποιείται ιστοπαθολογικά, σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας- World Health Organization-WHO (2017) σε 3 βαθμούς διαφοροποίησης ανάλογα με την ομοιότητα των κυττάρων με τους ιστούς από τους οποίους προέρχεται.

A. ΑΚΣ καλής διαφοροποίησης (Well differentiated SCC) όταν τα νεοπλασματικά κύτταρα ομοιάζουν αρκετά με τα φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα.

B. ΑΚΣ μέτριας διαφοροποίησης (Moderately differentiated SCC) όταν στα νεοπλασματικά παρατηρείται μέτριου βαθμού πυρηνική και κυτταρική πλειομορφία και μικρή παραγωγή κερατίνης.

Γ. ΑΚΣ χαμηλής διαφοροποίησης (Poorly differentiated SCC) όταν παρατηρείται έντονου βαθμού κυτταρική και πυρηνική πλειομορφία (αναπλασία), όπου είναι δύσκολο να προσδιοριστεί η προέλευση των κυττάρων του όγκου.

Με βάση τα ίδια κριτήρια, άλλοι ιστοπαθολόγοι βαθμολογούν την ιστοπαθολογική διαφοροποίηση ενός ΑΚΣ (Tumor Grading) σε 3 ή 4 βαθμίδες (grade I-IV). Καλής διαφοροποίησης καρκινώματα βαθμολογούνται με grade I και καθώς ο βαθμός αναπλασίας εξελίσσεται βαθμολογούνται με grade II και III μέχρι τα χαμηλής διαφοροποίησης καρκινώματα όπου ο βαθμός αναπλασίας είναι μέγιστος και οι όγκοι βαθμολογούνται με grade IV. Για τη βαθμονόμηση της διαφοροποίησης ενός ΑΚΣ λαμβάνονται υπόψη αρκετά δεδομένα όπως το μέγεθος του όγκου, το βάθος και το όριο διήθησης, η ύπαρξη ενδοαγγειακών ή περινευρικών διηθήσεων και η ανοσολογική αντίδραση του οργανισμού. Ως βάθος διήθησης (tumor thickness ή depth of invasion) ορίζεται η διάσταση του όγκου που μετράται από την επιφάνειά του σε εξωφυτικές βλάβες ή τον πυθμένα της έλκωσης μέχρι το βαθύτερο σημείο διήθησης του όγκου. Ως όριο διήθησης του όγκου (deep invasive tumor front) ορίζεται η περιοχή εισβολής των νεοπλασματικών κυττάρων στους ιστούς του ξενιστή. Η βαθμονόμηση έχει όμως πάντα έναν υποκειμενικό χαρακτήρα, που αφορά στην εμπειρία και την υποκειμενική εκτίμηση του ιστοπαθολόγου (Barnes L et al 2005, Pereira MC et al 2007, Gnepp DR 2009).

1.1.7 Ιστοπαθολογική αξιολόγηση του ΑΚΣ με βάση το τροποποιημένο σύστημα Anneroth (κατά Bryne)

Ο Anneroth και συν. το 1987 πρότειναν ένα σύστημα ιστοπαθολογικής αξιολόγησης του ΑΚΣ, με απώτερο σκοπό την πρόβλεψη της βιολογικής του συμπεριφοράς. Το σύστημα αυτό περιελάμβανε τρεις περιγραφικές παραμέτρους (Α,Β,Γ) των νεοπλασματικών κυττάρων. Οι Bryne και συν. 1989 προσέθεσαν και άλλες δύο παραμέτρους που αφορούσαν τη σχέση των νεοπλασματικών κυττάρων με το

υποκείμενο υπόστρωμα του συνδετικού ιστού (Δ,Ε). Το τροποποιημένο σύστημα αξιολόγησης Anneroth (κατά Bryne) αξιολογεί τις παρακάτω παραμέτρους:

A. Το βαθμό κερατινοποίησης των νεοπλασματικών κυττάρων

B. Το βαθμό της πυρηνικής πλειομορφίας των νεοπλασματικών κυττάρων

Γ. Των αριθμό των μιτώσεων ανά οπτικό πεδίο υψηλής μεγέθυνσης (High Power Field-HPF)

Δ. Τον τύπο διήθησης του όγκου στα όρια διήθησης

E. Τη φλεγμονώδη αντίδραση του ξενιστή

Κάθε ιστοπαθολογική παράμετρος λαμβάνει τιμές 1-4 και υπολογίζεται ένα τελικό άθροισμα που λαμβάνει τιμές 5-20 (από την άθροιση των επιμέρους παραμέτρων). Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι για την αξιολόγηση της διαφοροποίησης ενός ΑΚΣ λαμβάνεται υπόψη η χειρότερη ιστομορφολογικά περιοχή του όγκου και το όριο διήθησης (Πίνακας 1). Διάφορες μελέτες στη βιβλιογραφία χρησιμοποιούν το σύστημα Anneroth για την αξιολόγηση των όγκων. Οι πολλαπλές παράμετροι του συστήματος δίνουν αρκετές πληροφορίες για τη μορφολογία του όγκου, τον τρόπο διήθησης και την αντίδραση του ξενιστή, καθιστώντας το πολύτιμο προγνωστικό και προβλεπτικό δείκτη της βιολογικής συμπεριφοράς ΑΚΣ (Akhter M et al 2011, Ur Rahaman SM and Ahmed Mujib B 2014, Migueláñez-Medrán BC et al 2019).

Πίνακας 1: Ιστοπαθολογική αξιολόγηση του ΑΚΣ σύμφωνα με το σύστημα Anneroth τροποποιημένο κατά Bryne

ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ/ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗ	1	2	3	4
ΒΑΘΜΟΣ ΚΕΡΑΤΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ	ΥΨΗΛΟΣ >50% των νεοπλασματικών κυττάρων	ΜΕΤΡΙΟΣ 20-50% των νεοπλασματικών κυττάρων	ΜΙΚΡΟΣ 5-20% των νεοπλασματικών κυττάρων	ΜΗΔΑΜΙΝΟΣ 0-5% των νεοπλασματικών κυττάρων
ΠΥΡΗΝΙΚΗ ΠΛΕΙΟΜΟΡΦΙΑ	ΜΙΚΡΗ 75% ώριμα κύτταρα	ΜΕΤΡΙΑ 50-75% ώριμα κύτταρα	ΜΕΓΑΛΗ 25-50% ώριμα κύτταρα	ΔΙΑΧΥΤΗ 0-26% ώριμα κύτταρα
ΜΙΤΩΣΕΙΣ ΑΝΑ ΗΡΦ	0-1	2-3	4-5	>5
ΤΥΠΟΣ ΔΙΗΘΗΣΗΣ	Απωθούντα και καλά περιγεγραμμένα διηθητικά όρια	Διήθηση με τη μορφή ευρέων χορδών και νησίδων	Διήθηση με τη μορφή λεπτών χορδών και μικρών ομάδων κυττάρων (n<15)	Διήθηση με μεμονωμένα κύτταρα ή με μικρές ομάδες κυττάρων (n<15)
ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ	ΕΝΤΟΝΗ	ΜΕΤΡΙΑ	ΜΙΚΡΗ	ΜΗΔΑΜΙΝΗ

1.1.8 Το μικροπεριβάλλον του ΑΚΣ

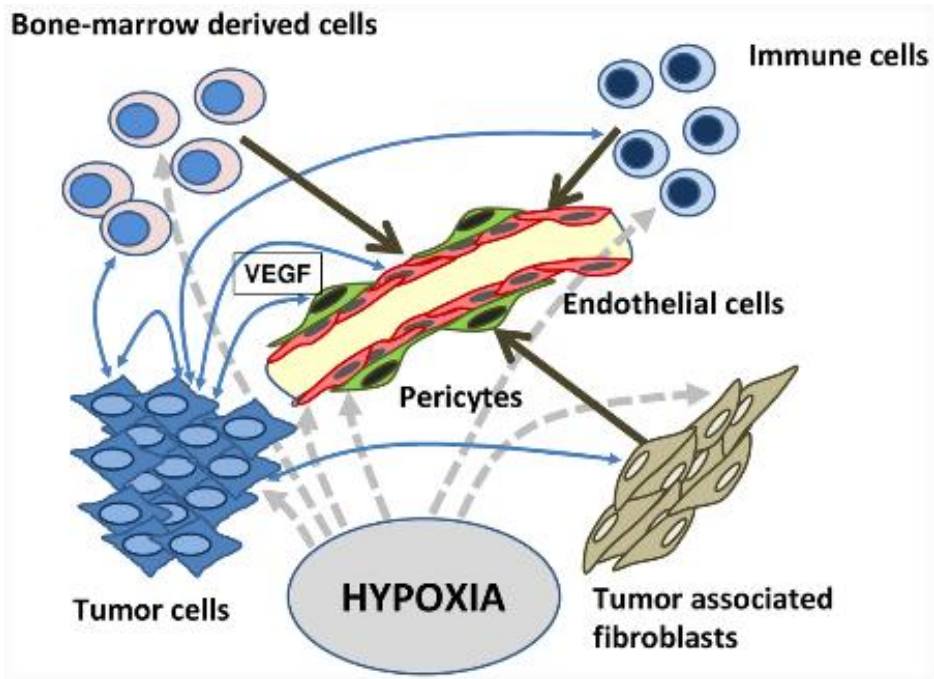
Το μικροπεριβάλλον ενός κακοήθους νεοπλασματος είναι ένα πολυδύναμο σύστημα αποτελούμενο κυρίως από αγγεία, πληθώρα κυτταρικών πληθυσμών και εξωκυττάρια ουσία (Extra Cellular Matrix-ECM), μέσα στο οποίο ο όγκος επιζεί, αναπτύσσεται και επεκτείνεται. Κυτταρογόνος, ορμόνες και αυξητικοί παράγοντες που εκκρίνονται από το στρώμα και τα καρκινικά κύτταρα έχουν ως αποτέλεσμα ο όγκος να αλληλεπιδρά με το μικροπεριβάλλον του προάγοντας την νεοαγγειογένεση και την ανοσοδιαφυγή ενώ παράλληλα τα κυτταρικά συστατικά του μικροπεριβάλλοντος να διευκολύνουν την ανάπτυξη και εξάπλωσή των νεοπλασματικών κυττάρων (Spill F et al 2016, Wang M et al 2017).

Η εξωκυττάρια ουσία θεμέλια ουσία του μικροπεριβάλλοντος ενός όγκου περιέχει κολλαγόνο, λαμίνινες, φμπρονεκτίνες, πρωτεογλυκάνες και υαλουράνες και συμμετέχει στην ανάπτυξη και μετάσταση ενός όγκου με ποικίλους τρόπους: α. κατευθύνει τη διαφοροποίηση των καρκινικών κυττάρων β. αλλάζει τον φαινότυπο των στρωματικών ή/και καρκινικών κυττάρων γ. εξασφαλίζει τη διαφυγή του όγκου από την ανοσολογική επιτήρηση δ. δημιουργεί ένα όξινο ή υποξικό περιβάλλον που είναι ευνοϊκότερο για την επιβίωση των καρκινικών σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα (Wang M et al 2017).

Το φυσιολογικό πολύστιβο πλακώδες επιθήλιο δεν διαθέτει αγγείωση και τα επιθηλιακά κύτταρα τρέφονται με διάχυση από το υποθηλώδες αρτηριοφλεβώδες πλέγμα του χορίου. Ένας όγκος που προέρχεται από το πλακώδες επιθήλιο του στοματικού βλεννογόνου δεν θα μπορούσε να αναπτυχθεί σε έκταση μεγαλύτερη των 2mm, χωρίς να υπήρχε κάποιος μηχανισμός δημιουργίας νέων αγγείων που θα εξασφάλιζαν τη σίτισή του. Η διαδικασία δημιουργίας των νέων αγγείων ονομάζεται νεοαγγειογένεση και ο σημαντικότερος παράγοντας που την προκαλεί είναι η υποξία που αναπτύσσεται στο μικροπεριβάλλον του όγκου (Pircher A et al 2011) (Εικόνα 4).

Το υποξικό περιβάλλον προκαλεί γενετική αστάθεια, προάγοντας την καρκινογένεση και ενεργοποιεί αγγειογενετικούς παράγοντες όπως τον επαγόμενο παράγοντα από την υποξία-Hypoxia-inducible factor 1-alpha (HIF1- α) που με τη σειρά του ενεργοποιεί τον αυξητικό παράγοντα του ενδοθηλίου των αγγείων-Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) ο οποίος ασκεί μιτογόνο δράση στα ενδοθηλιακά κύτταρα, αυξάνοντας παράλληλα και τη διαπερατότητα των αγγείων. Επίσης, ο VEGF εμφανίζει αντι-αποπτωτικές ιδιότητες και προκαλεί αναστολή της ανοσολογικής απόκρισης του ξενιστή (Hasina R and Linggen MW 2001). Η αγγειογένεση επηρεάζεται και από αντιαγγειογενετικούς παράγοντες όπως τον αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου-Plasminogen Activator Inhibitor (PAI) και τον αυξητικό παράγοντα μετασχηματισμού β - Transforming Growth Factor- β (TGF- β), οι οποίοι ασκούν αρνητική παλίνδρομη ρύθμιση. Η ισορροπία μεταξύ αγγειογενετικών και αντιαγγειογενετικών παραγόντων στο μικροπεριβάλλον είναι εξαιρετικά πολύπλοκη,

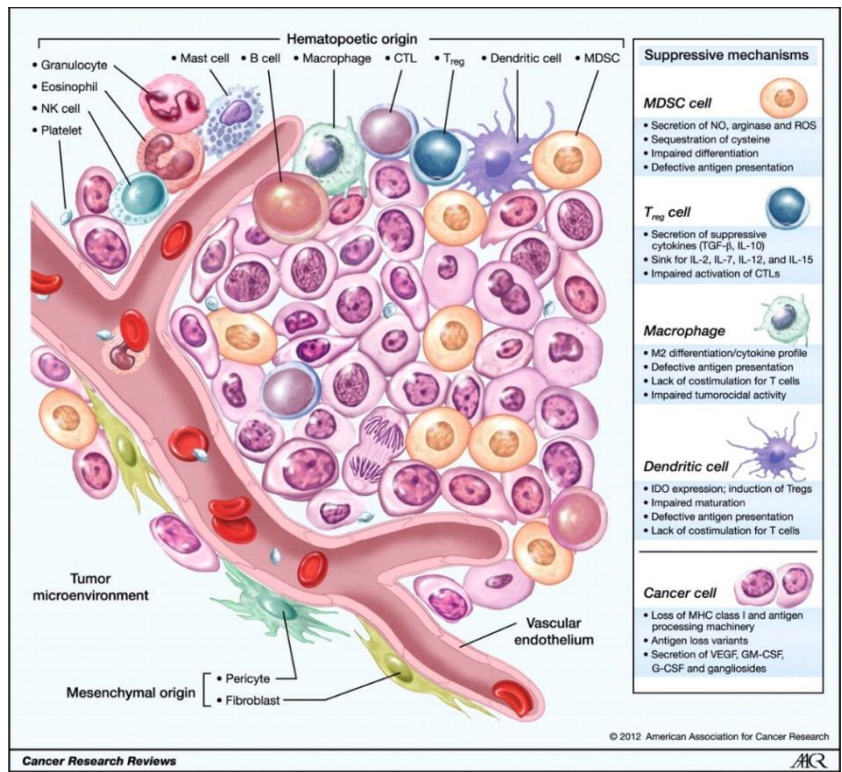
καθορίζοντας την εξέλιξη της διαδικασίας (Nishida N 2006). Νεότερες έρευνες έχουν οδηγήσει στην ανακάλυψη αντιαγγειογενετικών φαρμάκων που αναστέλλουν τη νεοαγγειογένεση και οδηγούν στην συρρίκνωση του όγκου (Tampellini M et al 2016, Gong X and Qin S 2018).



Εικόνα 4: Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των νεοπλασματικών κυττάρων και του ενδοθηλιακού συστήματος και ο ρόλος της υποξίας στην νεοαγγειογένεση (Pircher A et al 2011)

Τα στρωματικά κύτταρα του μικροπεριβάλλοντος του ΑΚΣ αναπτύσσονται μέσα στην εξωκυττάρια θεμέλια, η οποία μέσω παραγόμενων ενζύμων, αυξητικών παραγόντων, χημειοκινών και κυτταροκινών τροποποιεί τη δράση των καρκινικών κυττάρων αναλόγως των μεταβολικών τους απαιτήσεων. Ιδιαίτερα σημαντικά στρωματικά κύτταρα του μικροπεριβάλλοντος είναι τα μακροφάγα και οι ινοβλάστες του όγκου, τα λιπώδη και νευροενδοκρινικά κύτταρα και τα φλεγμονώδη κύτταρα του όγκου {carcinoma associated inflammatory (CAI) cells} (Salo T et al 2014). Ο φλεγμονώδης πληθυσμός του όγκου περιλαμβάνει κύτταρα της ειδικής ανοσίας: Τ βοηθητικά λεμφοκύτταρα (CD4+ T - helper T cells, Th), Τ κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα (CD8+ T-cytotoxic T cells, Tc) και Β λεμφοκύτταρα καθώς και κύτταρα της φυσικής ανοσίας: δενδριτικά κύτταρα (Dendritic cells- DC), κύτταρα φυσικοί

φονείς (Natural Killer cells-NK cells), μακροφάγα (macrophages), κοκκιοκύτταρα (granulocytes) και μαστοκύτταρα (mast cells) (Wang M et al 2017) (Εικόνα 5).



Εικόνα 5: Κυτταρικοί πληθυσμοί του μικροπεριβάλλοντος ενός κακοήθους όγκου (Kerkar SP and Restifo NP 2012)

Τα μακροφάγα που σχετίζονται με τον όγκο (Tumor Associated Macrophages-TAMs) σε αντίθεση με τα φυσιολογικά μακροφάγα στερούνται κυτταροτοξικής δράσης. Τα TAMs από λειτουργικής άποψης εμφανίζουν δύο τύπους φαινοτυπικής πώλωσης τον M1 και M2 και βρίσκονται σε νεκρωτικές περιοχές των όγκων “αποκρύπτοντας” τα καρκινικά κύτταρα, από το ανοσοποιητικό σύστημα (Qian BZ and Pollard JW 2010). Συμβάλλουν στην επέκταση των καρκινικών κυττάρων με την ενεργοποίηση σ αυτά του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (Epidermal Growth Factor Receptor-EGFR) και μεταστρέφουν τον ρόλο της φλεγμονής από αμυντικό σε προ-ογκογόνο μέσω της ενεργοποίησης του NF- κ B. Επίσης ενισχύουν την νεοαγγειογένεση μέσω της έκκρισης του VEGF και της συνθάσης νιτρικού οξειδίου (Nitric Oxide Synthase-NOS). Η αυξημένη παρουσία των TAMs έχει συσχετιστεί με χειρότερη πρόγνωση των όγκων (Solinas G et al 2009. Σε μελέτη καρκινωμάτων στόματος τα CD68 θετικά μακροφάγα συσχετίστηκαν με το αυξημένο μεταστατικό

δυναμικό των όγκων (Wolf GT et al 2015) ενώ μακροφάγα με τον πολωμένο φαινότυπο M2 φαίνεται να αναπτύσσουν στενή αλληλεπίδραση με τα νεοπλασματικά κύτταρα σε ΑΚΣ (Petruzzi MN et al 2017).

Οι ινοβλάστες που σχετίζονται με τον όγκο (Carcinoma Associated Fibroblasts-CAFs) είναι κατηγορία ειδικών ινοβλαστών, στρατευμένων στην προαγωγή της καρκινογένεσης. Οι CAFs προέρχεται από περικύτταρα, από φυσιολογικούς ινοβλάστες, ή αρχέγονα μεσεγχυματικά κύτταρα. Επιτελούν διάφορες λειτουργίες, οι οποίες ευνοούν την ανάπτυξη του κακοήθους νεοπλάσματος. Προάγουν την νεοαγγειογένεση συμβάλλοντας στην έκκριση του VEGF, των αυξητικών παραγόντων των ινοβλαστών (Fibroblast Growth Factors-FGFs) και του αυξητικού παράγοντα των αιμοπεταλίων (Platelet-Derived Growth Factor-PDGF). Επίσης εκκρίνουν τον αυξητικό παράγοντα TGF- β , ο οποίος υποστηρίζει την μετάσταση των καρκινικών κυττάρων και την αναστολή των κυτταροτοξικών Τ λεμφοκυττάρων και των NK κύτταρων (Räsänen K and Vaheri A 2010, Marsh T et al 2012).

Ειδική κατηγορία λεμφοκυττάρων που ονομάζονται Tumor Infiltrating Lymphocytes-TILs, φτάνουν στην περιοχή του όγκου διαμέσου του περιφερικού κυκλοφορικού συστήματος και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της καρκινογένεσης. Στα TILs ανήκουν κυρίως τα CD4, CD8, FoxP3 (Tregs), CD68 και τα NK κύτταρα και εμφανίζουν είτε προ-ογκογόνα είτε αντιογκογόνα δράση (Wolf GT et al 2015, Lei Y et al 2016). Τα υπόλοιπα κύτταρα του μικροπεριβάλλοντος CAFs και TAMs, το αγγειακό δίκτυο και η παραγωγή κυτταροκινών και χημειοκινών από την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία, επηρεάζουν την είσοδο στο μικροπεριβάλλον, τον πληθυσμό και τη δράση των TILs ενισχύοντας τη διαδικασία της εξέλιξης της καρκινογένεσης (Salo T et al 2014).

1.1.9 Σταδιοποίηση του ΑΚΣ με το σύστημα TNM και η πιλοτική εφαρμογή του συστήματος Immunoscore

Μια σημαντική παράμετρος για τον καθορισμό της θεραπευτικής αντιμετώπισης και την εκτίμηση της πρόγνωσης στο ΑΚΣ αποτελεί η σταδιοποίησή του. Διάφορα συστήματα σταδιοποίησης έχουν προταθεί κατά καιρούς, που συνεκτιμούν το μέγεθος του όγκου, το βάθος διήθησης, το μέγεθος και το βαθμό καθήλωσης των επιχώριων λεμφαδένων και την ύπαρξη απομακρυσμένων μεταστάσεων. Το σύστημα σταδιοποίησης που έχει επικρατήσει στην πάροδο του χρόνου είναι το σύστημα TNM από τα αρχικά T (primary Tumor) που αντιστοιχεί στο μέγεθος του όγκου, N (Nodal involvement) που αντιστοιχεί στην ύπαρξη προσβεβλημένων επιχώριων λεμφαδένων και M (distant Metastasis) που αφορά στην ύπαρξη απομακρυσμένων μεταστάσεων. Το σύστημα TNM διακρίνεται σε δύο επιμέρους υποσυστήματα: το Κλινικό σύστημα TNM, το οποίο αξιολογεί τις

παραπάνω 3 παραμέτρους με βάση την κλινική εικόνα του όγκου και το ιστοπαθολογικό σύστημα TNM, το οποίο αξιολογεί τις παραμέτρους στο τελικό χειρουργικό παρασκεύασμα και από το σύνολο των εργαστηριακών εξετάσεων που πραγματοποιούνται στον ασθενή. Επειδή το κλινικό σύστημα TNM παρουσιάζει αρκετές δυσκολίες στον προσδιορισμό του και ο υποκειμενικός παράγοντας για τον προσδιορισμό των παραμέτρων είναι αρκετά έντονος, έχει σχεδόν εγκαταλειφθεί. (Nagtegaal D et al 2011).

Οι ιστοπαθολογικό σύστημα σταδιοποίησης σύμφωνα με τον WHO 2017 παρατίθενται στους πίνακες που ακολουθούν (Πίνακες 2-3):

Πίνακας 2: Σταδιοποίηση με το σύστημα TNM των καρκινωμάτων χείλους και στοματικής κοιλότητας-WHO (2017)

ΒΑΘΜΟΣ	T (Πρωτοπαθής όγκος)
Tx	Ο πρωτοπαθής όγκος δεν μπορεί να αξιολογηθεί
T0	Καμία ένδειξη πρωτοπαθούς όγκου
Tis	Καρκίνωμα in situ
T1	Όγκος < 2cm στη μεγαλύτερή του διάμετρο
T2	Όγκος > 2cm αλλά μικρότερος από 4 <cm στη μεγαλύτερή του διάμετρο
T3	Όγκος > 4cm στη μεγαλύτερή του διάμετρο
T4a (Χείλος)	Ο όγκος διηθεί το φλοιώδες πέταλο του οστού, το κάτω φατνιακό νεύρο, το έδαφος του στόματος και το δέρμα του προσώπου (του πώγωνα ή της ρινός)
T4a (Στοματική κοιλότητα)	Ο όγκος διηθεί το φλοιώδες πέταλο, τους εν τω βάθει μύες της γλώσσας (πχ. τον γενειογλωσσικό, υογλωσσικό), το ιγμόρειο άντρο ή το δέρμα του προσώπου
Tb (Χείλος και στοματική κοιλότητα)	Ο όγκος εμπλέκεται με το μασητήριο διάστημα, τον πτερυγοειδή μυ, τη βάση του κρανίου και τον διχασμό της καρωτίδας
	N (Επιχώριοι λεμφαδένες)
Nx	Μη αξιολογήσιμοι επιχώριοι λεμφαδένες
N0	Απουσία μετάστασης στους επιχώριους λεμφαδένες
N1	Μετάσταση σε μεμονωμένο ομόπλευρο λεμφαδένα ≤ 3cm στη μεγαλύτερή του διάσταση
N2	Μετάσταση όπως προσδιορίζεται στα στάδια N2a,N2b ή N2c
N2a	Μετάσταση σε μεμονωμένο ομόπλευρο λεμφαδένα > 3cm και 6cm στη μεγαλύτερή του διάσταση
N2b	Μετάσταση σε πολλαπλούς ομόπλευρους λεμφαδένες, όλοι ≤ 6cm στη μεγαλύτερή τους διάσταση
N2c	Μετάσταση σε ετερόπλευρους λεμφαδένες, όλοι ≤ 6cm στη μεγαλύτερή τους διάσταση

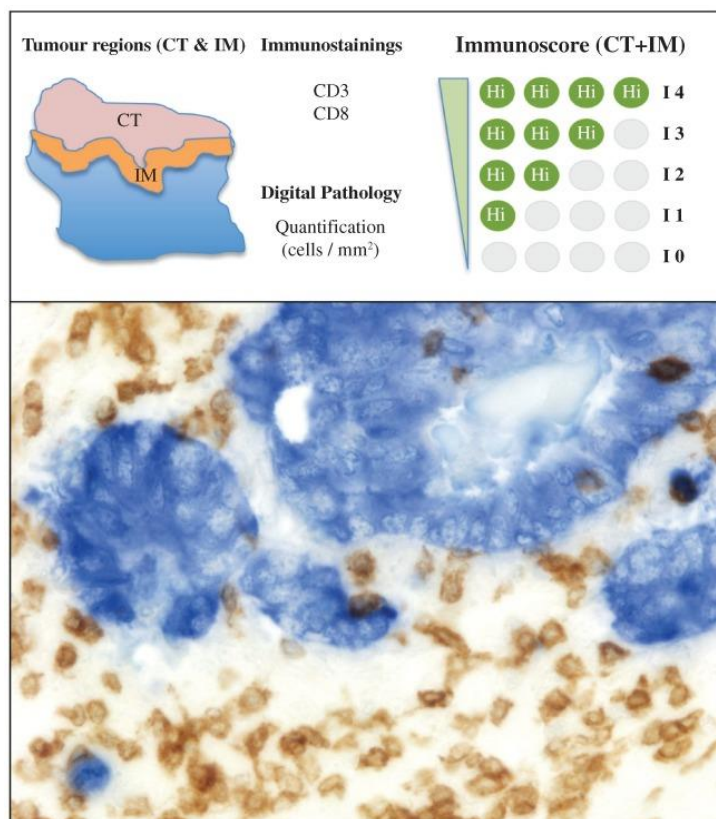
N3	Μετάσταση σε λεμφαδένα > 6cm στη μέγιστη του διάσταση
	M (Απομακρυσμένες μεταστάσεις)
M0	Απουσία απομακρυσμένης μετάστασης
M1	Απομακρυσμένη μετάσταση

Πίνακας 3: Στάδια ομαδοποίησης των καρκινωμάτων χείλους και στοματικής κοιλότητας-WHO (2017)

Στάδιο 0	Tis	N0	M0
Στάδιο I	T1	N0	M0
Στάδιο II	T2	N0	M0
Στάδιο III	T1-2	N1	M0
	T3	N0-1	M0
Στάδιο IVA	T1-3	N2	M0
	T4a	N0-2	M0
Στάδιο IVB	Οποιοδήποτε T	N3	M0
	T4b	Οποιοδήποτε N	M0
Στάδιο IVC	Οποιοδήποτε T	Οποιοδήποτε N	M1

Σημαντικές ερευνητικές μελέτες στον καρκίνο του παχέος εντέρου που αποτελεί το πρότυπο μελέτης της καρκινογένεσης καταδεικνύουν ότι η εντόπιση φλεγμονωδών κυττάρων στο πυρήνα ή το διηθητικό όριο ενός όγκου διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην πρόγνωση του. Μια σημαντική μετα-ανάλυση 120 επιμέρους μελετών των Fridman και συν. 2012 έδειξε ότι τα CD3, CD8 και τα CD45RO λεμφοκύτταρα έχουν σημαντικές αντιογκογόνες ιδιότητες και η παρουσία τους βελτιώνει την πρόγνωση, σε διάφορα είδη καρκίνου όπως στον καρκίνο του παχέος εντέρου, στο μελάνωμα, στον καρκίνο του πνεύμονα, της κεφαλής και του τραχήλου και σε πολλά άλλα επιθετικά κακοήγη νεοπλασμάτα. Ερευνητικά δεδομένα απέδειξαν ότι, οι νέες στοχευμένες ανοσοθεραπείες με τους παράγοντες anti-CTLA4, anti-PD-1 και anti-PD-L1 ξεμπλοκάρουν και ενισχύουν τη δράση των CD3, CD8 και CD45RO T λεμφοκυττάρων, με ενθαρρυντικά αποτελέσματα στον περιορισμό της εξάπλωσης των νεοπλασματικών κυττάρων. Ο ρόλος των υπολοίπων κύτταρων του φλεγμονώδους διηθήματος όπως τα B λεμφοκύτταρα, NK κύτταρα, μακροφάγα και οι υπόλοιπες υποκατηγορίες των T λεμφοκυττάρων (TH2, TH17, TREG cells), διαφέρει σημαντικά ανάλογα με το είδος του καρκίνου και το επιμέρους στάδιο (Fridman et al 2012).

Τα παραπάνω ερευνητικά δεδομένα οδήγησαν στην επινόηση ενός συστήματος σταδιοποίησης που ονομάζεται IMMUNOSCORE, το οποίο συμπεριλαμβάνει την ανοσιακή απάντηση του οργανισμού, στην σταδιοποίηση του καρκίνου. Το Immunoscore λαμβάνει τελικές τιμές από 0-4, όταν η πυκνότητα και των κυττάρων είναι έως 10% και στον πυρήνα και στο όριο του όγκου, 1 για ποσοστά 10-25%, 2 για ποσοστά 25-70%, 3 για ποσοστά 70-95% και 4 για ποσοστά 95-100% και στις δύο περιοχές (Εικόνα 6). Πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν την άποψη ότι μόνο η καταμέτρηση των CD3 ή CD8 T λεμφοκυττάρων επαρκεί για να μας δώσει μια αξιόπιστη τιμή για το Immunoscore. Η καταμέτρηση των κυττάρων γίνεται με τη χρήση ψηφιακών συστημάτων ανάλυσης εικόνας. Λαμβάνοντας υπόψη τον πολύ πιθανό καθολικό χαρακτήρα του ανοσολογικού ελέγχου των όγκων, το Immunoscore θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί και σε άλλους καρκίνους όπως αυτούς της κεφαλής και του τραχήλου και σε συνδυασμό με το TNM score να μας δώσουν ακριβέστερες πληροφορίες σταδιοποίησης (Galon et al 2014).



Εικόνα 6: Μεθοδολογία υπολογισμού Immunoscore και ανοσοϊστοχημική ανίχνευση των CD3 T κυττάρων σε καρκίνο του παχέος εντέρου (Galon et al 2014)

1.1.10 Διάγνωση

Η προσεκτική και εμπειριστατωμένη λήψη του ιατρικού ιστορικού του ασθενούς είναι το πρώτο βήμα για της διαγνωστικής διαδικασίας που πρέπει να ακολουθηθεί σε περιπτώσεις που εγείρουν υποψία ανάπτυξης ΑΚΣ. Η συνεκτίμηση των καπνιστικών συνηθειών και της κατανάλωσης αλκοόλ, του οικογενειακού ιστορικού, των διατροφικών επιλογών και των σεξουαλικών πρακτικών θα βοηθήσουν στο σχηματισμό μιας πληρέστερης εικόνας για τους παράγοντες κινδύνου στους οποίους πιθανά εκτίθεται ο ασθενής.

Η κλινική εξέταση εξωστοματική και ενδοστοματική και η άμεση επισκόπηση όλων των περιοχών της στοματικής κοιλότητας με επαρκή φωτισμό, θα αποκαλύψει την έκταση και το μέγεθος του όγκου, καθώς και την συνύπαρξη άλλων πιθανών πρωτοπαθών εστιών ή/και παθολογικών καταστάσεων. Η φωτογραφική τεκμηρίωση της βλάβης θα συμπληρώσει τον φάκελο του ασθενούς και θα δημιουργήσει ένα πολύτιμο αρχείο, το οποίο θα βοηθήσει τους χειρουργούς, τους ογκολόγους και τους ακτινοθεραπευτές, στο σχεδιασμό της θεραπευτικής αντιμετώπισης ενώ παράλληλα θα αποτελέσει σημείο αναφοράς για την εκτίμηση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας.

Η διενέργεια μερικής βιοψίας και η ιστοπαθολογική εξέταση του ιστοτεμαχίου είναι το σημαντικότερο στάδιο για τη διάγνωση του ΑΚΣ. Με τη χρώση της ηωσίνης/αιματοξυλίνης σε μεγάλο αριθμό περιπτώσεων, μπορεί να αποκαλυφτεί ο βαθμός αναπλασίας των κυττάρων και να προσδιοριστεί ο βαθμός διαφοροποίησης σύμφωνα με τα κριτήρια του WHO. Σε ορισμένες μόνο περιπτώσεις όπου υπάρχει πολύ υψηλός βαθμός αναπλασίας των κυττάρων η χρήση ανοσοϊστοχημικών δεικτών όπως οι ΑΕ1/ΑΕ3, CAM 5.2(CK8), CK5/6, CK7, CK19, CK Pan και του EMA (Epithelial Membrane Antigen) είναι απαραίτητη για τον προσδιορισμό της επιθηλιακής προέλευσης των κυττάρων και την τεκμηρίωση της βλάβης ως χαμηλής διαφοροποίησης ΑΚΣ (Lewellyn CD et al 2003).

Ακολούθως της ιστοπαθολογικής τεκμηρίωσης ενός ΑΚΣ θα πρέπει να πραγματοποιηθεί ενδελεχής έλεγχος για την παρουσία διηθημένων επιχώριων λεμφαδένων στην περιοχή της κεφαλής και του τραχήλου καθώς και την πιθανότητα ύπαρξης απομακρυσμένων μεταστάσεων. Η πανοραμική ακτινογραφία, η αξονική τομογραφία κωνικής δέσμης (Cone-beam CT - CBCT), η αξονική τομογραφία CT (με σκιαγραφικό), η μαγνητική τομογραφία MRI και η τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων με φθοριδεοξυγλυκόζη (FDG-PET) είναι οι κυριότερες ακτινοδιαγνωστικές εξετάσεις που χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση των μαλακών μορίων της στοματικής κοιλότητας, των γνάθων, της υπόλοιπης κεφαλής και του τραχήλου, ενώ η το PET μπορεί να αποκαλύψει καρκινικές εστίες στις υπόλοιπες περιοχές του σώματος. Η FNA (βιοψία με λεπτή βελόνα) συχνά καθοδηγούμενη με υπερήχους παρέχει σημαντικές πληροφορίες σε κυτταρολογικό επίπεδο για την αξιολόγηση

μεταστατικών εστιών σε λεμφαδένες του τραχήλου. Η χρήση όμως της FNA για την εκτίμηση της φύσης του πρωτοπαθούς όγκου αντενδείκνυται και σε καμία περίπτωση δεν μπορεί να υποκαταστήσει την βιοψία και ιστοπαθολογική εξέταση (Biglioli F 2009).

1.1.11 Θεραπευτική αντιμετώπιση

Η θεραπευτική αντιμετώπιση του ΑΚΣ είναι αποτέλεσμα σχεδιασμού της ομάδας των ιατρών που αποτελούν το Ογκολογικό συμβούλιο, στο οποίο συμμετέχουν Στοματικοί και Γναθοπροσωπικοί Χειρουργοί, Στοματολόγοι, Ακτινοθεραπευτές, Ογκολόγοι, Πλαστικοί Χειρουργοί, Γναθοπροσωπικοί Προσθετολόγοι, Λογοθεραπευτές, Διατροφολόγοι, Ψυχολόγοι και όποια άλλη ειδικότητα κριθεί σκόπιμο αναλόγως της συνοσηρότητας του ασθενούς. Στο συμβούλιο συνεκτιμώνται η διαφοροποίηση, η σταδιοποίηση του όγκου, η γενική κατάσταση της υγείας του ασθενούς και με βάση αυτά επιλέγεται το κατάλληλο θεραπευτικό πρωτόκολλο σύμφωνα με τις διεθνείς πρακτικές.

Το ΑΚΣ αντιμετωπίζεται με χειρουργική θεραπεία σε συνδυασμό με ακτινοθεραπεία και χημειοθεραπεία είτε μετεγχειρητική είτε και προεγχειρητική. Σε όγκους πρώιμου σταδίου (Στάδιο I και II) επιλέγεται χειρουργική θεραπεία με αφαίρεση του πρωτοπαθούς όγκου εντός υγιών ορίων και τραχηλικό λεμφαδενικό καθαρισμό (σε όγκους με βάθος διήθησης > 4 χιλιοστών) (Biglioli F, 2009, Carote A et al 2007). Σε όγκους προχωρημένου σταδίου (Στάδια III και IV) εφαρμόζεται σχεδόν πάντα συνδυασμένη θεραπεία. Στην Ακτινοθεραπεία χορηγούνται δόση 60 Gy ακτινοβολίας, διαιρεμένες σε 30 συνήθως συνεδρίες ενώ τα συχνότερα χρησιμοποιούμενα χημειοθεραπευτικά φάρμακα είναι η σισπλατίνη (CDDP) και η 5-φθοριουρακίλη (5-FU). Άλλα χημειοθεραπευτικά σκευάσματα είναι η καρβοπλατίνη, η πακλιταξέλη, η δοσεταξέλη και η μεθοτρεξάτη (Furness S et al 2010, Chi AC et al 2015). Σε όγκους Σταδίου IV, η προεγχειρητική χημειοθεραπεία μπορεί να συμβάλλει στη μείωση των αρχικών διαστάσεων του όγκου και να τον καταστήσει χειρουργικά εξαιρέσιμο όμως λόγω των επιπλοκών που προκαλεί (βλεννογονίτιδα, οστεοακτινονεκρώσεις, ξηροστομία, λοιμώξεις), δυσχεραίνει την περαιτέρω χειρουργική αντιμετώπιση, με αποτέλεσμα να προτιμάται η χρήση της μετεγχειρητικά. Σε όγκους με εκτεταμένη πρωτοπαθή ανάπτυξη, που λόγω ανατομικών περιορισμών κρίνεται αναποτελεσματική και ιδιαίτερα ακρωτηριαστική η χειρουργική αντιμετώπιση, προτείνεται παρηγορητικά η εφαρμογή ακτινοθεραπείας σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία (Biglioli F 2009, De Sanctis V et al 2016).

Ιδιαίτερα ελπιδοφόρα αποτελέσματα παρουσιάζει στις μέρες μας η Ανοσοθεραπεία, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις υποτροπιάζοντων καρκίνων κεφαλής και τραχήλου (Vermorken JB and Specenier P 2010, Ferris RL et al 2016, Chow LQ et al

2016, Tosoni A et al 2017). Η Ανοσοθεραπεία στηρίζεται στη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων όπως του cetuximab, μιας ανοσοσφαιρίνης IgG1, η οποία στοχεύει στον υποδοχέα EGFR (Mehra R et al 2008). Επίσης ιδιαίτερα αποτελεσματική αποδεικνύεται η εφαρμογή αναστολέων σημείων ελέγχου (immune checkpoint inhibitors). Το ipilimumab στοχεύει στον υποδοχέα της πρωτεΐνης Cytotoxic T-lymphocytes Associated protein 4 (CTLA-4) των κυτταροτοξικών Τ λεμφοκυττάρων. Τα pembrolizumab και nivolumab στοχεύουν τον υποδοχέα της πρωτεΐνης του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου 1 (Programmed Cell Death Protein 1-PD-1) και διασπούν τη σύνδεση με το PD-L1 των καρκινικών κυττάρων, οδηγώντας στην επανενεργοποίηση των Τ κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων (Pai SI et al 2016).

Ιδιαίτερο κλινικό ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα θεραπευτικά εμβόλια για τον HPV σχετιζόμενο καρκίνο κεφαλής και τραχήλου. Τα εμβόλια αυτά περιέχουν ανενεργά αντιγόνα κατά του ιού HPV, ικανά να επάγουν την ανοσιακή απάντηση από τα κυτταροτοξικά Τ-λεμφοκύτταρα, τα Τ_H λεμφοκύτταρα και τα Β-λεμφοκύτταρα. Τα εμβόλια πεπτιδίων συνδέονται με αντιγόνα του HLA τάξεως I στα κύτταρα ενός HPV θετικού όγκου, οδηγώντας σε ανοσιακή απόκριση (Sewell DA et al 2008, Voskens CJ et al 2012). Υπό αξιολόγηση για τη θεραπευτική αποτελεσματικότητα τους σε ασθενείς με HPV θετικούς και HPV αρνητικούς καρκίνους είναι και οι στρατηγικές εμβολιασμού με συμμετοχή των δενδριτικών κυττάρων, διαμέσου των οποίων επάγεται η ανοσοαπόκριση καθώς και η παθητική μεταφορά Τ-λεμφοκυττάρων (adoptive cell transfer), η οποία φαίνεται να ενισχύει και να βελτιώνει την ανοσιακή απάντηση (June CH 2007).

1.1.12 Πρόγνωση

Για την εκτίμηση της πρόγνωσης ενός ασθενούς με ΑΚΣ βασικές πληροφορίες μπορεί να δώσει το ιστοπαθολογικό σύστημα TNM. Το συνδυασμένο σύστημα TNM-Immunoscore μελετάται επίσης για την προγνωστική του αξία. Είναι πλέον ευρέως αποδεκτό ότι το βάθος διήθησης ενός όγκου, η παρουσία θετικών λεμφαδένων, η ύπαρξη απομακρυσμένων μεταστάσεων και πρόσφατα το φλεγμονώδες διήθημα που περιβάλλει τις βλάστες των νεοπλασματικών κυττάρων αποτελούν τους τέσσερις προγνωστικούς και προβλεπτικούς παράγοντες που καθορίζουν τον αρχικό σχεδιασμό και το βαθμό αποτελεσματικότητας της εφαρμοζόμενης θεραπείας. Παράλληλα η περινευρική διήθηση, η παρουσία ενδοαγγειακών εμβόλων νεοπλασματικών κυττάρων και η συνοσηρότητα του ασθενούς αναλογικά με την ηλικία αποτελούν επιπλέον αρνητικούς προγνωστικούς παράγοντες (Massano J et al 2006).

Παρά την πρόοδο των διαγνωστικών μεθόδων, των χειρουργικών τεχνικών με τη χρήση μικροαγγειακών αναστομούμενων κρημνών, τη βελτίωση των χημειοθεραπευτικών/ανοσοθεραπευτικών σκευασμάτων και των τεχνικών

προδιαγραφών της ακτινοθεραπείας, η πρόγνωση του ΑΚΣ εξακολουθεί να παραμένει πτωχή και η πενταετής επιβίωση να κυμαίνεται γύρω στο 50%. Καλύτερη πρόγνωση παρουσιάζει το καρκίνωμα του κάτω χείλους με πενταετή επιβίωση σε ποσοστό 95%. Χειρότερη πρόγνωση ως προς την πενταετή επιβίωση έχουν τα ΑΚΓ (ποσοστό 27-47%) και του εδάφους του στόματος (ποσοστά 33-52%). Δεύτερη πρωτοπαθής εστία στην ανώτερη αναπνευστική – πεπτική οδό αναπτύσσεται σε ποσοστό 9-25% (Sciubba JJ, 2001).

1.2 ΜΟΡΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΣΤΟ ΑΚΑΝΘΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΤΟΥ ΣΤΟΜΑΤΟΣ

1.2.1 Εισαγωγή

Τα θεμελιώδη βιολογικά χαρακτηριστικά του καρκίνου (Hallmarks of cancer) περιγράφηκαν αρχικά το 2000 και συμπληρώθηκαν μετεγενέστερα το 2011 από τους Hanahan και Weinberg. Από τη συστηματική διερεύνηση των μοριακών μηχανισμών της καρκινογένεσης προκύπτει ότι πρόκειται για μια πολυσταδιακή διαδικασία (multistep carcinogenesis), με πλήθος προοδευτικά αθροιζόμενων γενετικών και επιγενετικών αλλοιώσεων που επισυμβαίνουν στο φυσιολογικό κύτταρο, οι οποίες το μετατρέπουν σταδιακά σε νεοπλασματικό. Μεταλλάξεις που οδηγούν σε ενεργοποίηση ογκογονιδίων και αδρανοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων καθώς και η δράση των microRNAs επιφέρουν μεταβολές στον κυτταρικό κύκλο και το πολλαπλασιαστικό δυναμικό, την ωρίμανση και διαφοροποίηση, τη γήρανση και την απόπτωση των κυττάρων καθώς και στο μικροπεριβάλλον του όγκου, οδηγώντας σε ένα καταρράκτη φαινομένων που προκαλούν τη μετάπτωση από τον φυσιολογικό ιστό στα διάφορα προκαρκινικά στάδια και τελικά στην ανάπτυξη διηθητικού και εν συνεχεία μεταστατικού καρκινώματος (Hanahan D and Weinberg RA, 2000, 2011).

Η θεωρία της μονοκλωνικότητας στην καρκινογένεση υποστηρίζει ότι η προέλευση όλων των κυττάρων ενός κακοήθους όγκου προέρχεται από ένα πρόδρομο κύτταρο με μεγάλης έκτασης βλάβη του γενετικού του υλικού, το οποίο (λόγω ανεπάρκειας επιτήρησης) πολλαπλασιαζόμενο, δίδει γένεση σε έναν κυτταρικό κλώνο, που προοδευτικά αυξανόμενος οδηγεί στην ανάπτυξη του νεοπλάσματος. Επίσης τις τελευταίες δεκαετίες, ιδιαίτερη έμφαση έχει δοθεί στο ρόλο των αρχέγονων βλαστικών κυττάρων (stem cells) τα οποία θεωρείται ότι αποτελούν τα πρόδρομα κύτταρα ενός καρκινικού κλώνου ενώ έχουν ενοχοποιηθεί για τη μετάσταση, την αντοχή στη θεραπεία και τη εμφάνιση υποτροπών (Hanahan D and Weinberg RA, 2000, Shin KH and Kim RH, 2018).

1.2.2 Θεωρία της καρκινοποίησης του πεδίου

Η καρκινογένεση στο στοματικό βλεννογόνο ξεκινά από τη βασική στιβάδα του επιθηλίου, όπου η συσσώρευση γονιδιακών μεταλλάξεων σε ένα αρχέγονο βλαστικό κύτταρο (stem cell) σχηματίζει κλώνο ταυτόσημων γενετικά κυττάρων, τα οποία απωθούν τα φυσιολογικά κύτταρα, εξασφαλίζοντας την εγκατάσταση του κλώνου στις όμορες και ανώτερες στιβάδες του επιθηλίου (Tabor MP et al 2001). Με τον τρόπο αυτό δημιουργείται ένα πεδίο αρκετών εκατοστών στον παρακείμενο της βλάβης - κλινικά και ιστολογικά- υγιή βλεννογόνο όπου παρατηρείται αυξημένη πιθανότητα ανάπτυξης προκαρκινικών και καρκινικών βλαβών. Το φαινόμενο είναι

γνωστό ως καρκινοποίηση πεδίου και εξηγεί την οριζόντια επέκταση του αρχικού κλώνου, την αυξημένη πιθανότητα ανάπτυξης δεύτερης πρωτοπαθούς εστίας και την υποτροπή μετά την αφαίρεση της αρχικής βλάβης επί υγιών-κλινικά και ιστολογικά-ορίων (Angadi PV et al 2012).

1.2.3 Ογκογονίδια, ογκοκατασταλτικά γονίδια και miRNAs

Τα ογκογονίδια είναι μεταλλαγμένες μορφές γονιδίων του κυττάρου που ονομάζονται πρωτο-ογκογονίδια, οι οποίες οδηγούν τα φυσιολογικά κύτταρα σε κλωνικό πολλαπλασιασμό και τα μετατρέπουν σε νεοπλασματικά. Τα πρωτο-ογκογονίδια φυσιολογικά ελέγχουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και ωρίμανση του κυττάρου. Η ενεργοποίηση των ογκογονιδίων οδηγεί το κύτταρο σε κατάσταση συνεχούς διαίρεσης, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη και επέκταση του καρκινικού όγκου (Shen L et al 2018). Παραδείγματα δράσης ογκογονιδίων συναντάμε στην υπερέκφραση του γονιδίου HER-2, το οποίο ανευρίσκεται στο 20-30% των περιπτώσεων του καρκινώματος του μαστού και συσχετίζεται με τη δυσμενή του πρόγνωση καθώς και οι αλλοιώσεις των γονιδίων BRCA1 και BRCA2 που συναντώνται στον καρκίνο του μαστού και των ωθηκών (Croce CM 2008).

Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια φυσιολογικά καταστέλλουν την κυτταρική διαίρεση (πχ. το γονίδιο του ρετινοβλαστώματος-Rb), συμμετέχουν στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης των βλαβών του DNA (πχ. τα γονίδια που κωδικοποιούν τον οικογενή μη πολυποειδή καρκίνο του παχέος εντέρου) και επάγουν την απόπτωση των κυττάρων όταν αυτό απαιτείται (πχ. το γονίδιο p53). Η απενεργοποίηση της δράσης των ογκοκατασταλτικών γονιδίων έχει ως αποτέλεσμα τα κύτταρα να πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα και να αναπτύσσεται ο όγκος (Naik VG et al 2015, Krishna A et al 2015).

Τα microRNAs-(miRNAs) είναι μια οικογένεια μικρών μη κωδικοποιητικών μορίων RNA που δρουν ως ρυθμιστές της έκφρασης των γονιδίων, συμμετέχοντας σε ποικίλες κυτταρικές λειτουργίες. Πρόσφατα δεδομένα συσχετίζουν την υπερέκφραση πολλαπλών miRNAs σε διάφορους καρκίνους. Παράδειγμα αποτελούν τα miRNA 21 και 7 στο ΑΚΣ (Tsai SC et al 2017, Irimie-Aghiorghiese AI et al 2019). Το γεγονός αυτό καθιστά τα miRNAs πιθανά ογκογόνους ή ογκοκατασταλτικούς παράγοντες και η αποκρυπτογράφηση του ρόλου τους θεωρείται πως θα δώσει σημαντικές πληροφορίες για την πρόγνωση και θεραπεία του καρκίνου (Garzon R et al 2009).

Στη συνέχεια θα αναπτυχθούν συνοπτικά οι κυριότερες μοριακές μεταβολές κατά τη διαδικασία μετατροπής ενός φυσιολογικού κερατινοκυττάρου σε καρκινικό για την καλύτερη κατανόηση των μοριακών μηχανισμών ανάπτυξης του ΑΚΣ. Η HPV σχετιζόμενη καρκινογένεση και οι μεταβολές του μικροπεριβάλλοντος του όγκου και

ο ρόλος της φλεγμονής θα περιγραφούν αναλυτικά στα αμέσως επόμενα κεφάλαια του Γενικού μέρους.

1.2.4 Γενετική αστάθεια

Με τις τεχνικές του *in situ* υβριδισμού και την μελέτη του καρυοτύπου των νεοπλασματικών κυττάρων έχει διαπιστωθεί ποικιλία χρωμοσωμικών μεταβολών που συνδέονται με καρκινογένεση του στόματος. Απώλεια της ετεροζυγωτικής σχέσης των γονιδίων (Loss of Heterozygosity-LOH), χρωμοσωμικές αλλοιώσεις σε συγκεκριμένες γονδιακές περιοχές και μεταβολές στον αριθμό των χρωμοσωμάτων (ανευπλοειδία-πολυπλοειδία) προκαλούν σοβαρή γενετική αστάθεια, που οδηγεί σε γονδιακές και φαινοτυπικές μεταβολές, οι οποίες επηρεάζουν τον κυτταρικό κύκλο και την απόπτωση των κυττάρων και ευνοούν την διήθηση και την νεοαγγειογένεση (Zhang L et al 2012).

Κατά τη μετάβαση από το φυσιολογικό στο υπερπλαστικό επιθήλιο έχουν παρατηρηθεί: μεταλλάξεις του γονιδίου που κωδικοποιεί τον EGFR, αλλοιώσεις στην χρωμοσωμική περιοχή 9p21del και των γονιδίων p16/p14, τρισωμία του χρωμοσώματος 7 και απώλεια του λειτουργικού ρόλου του ενζύμου τελομεράση. Κατά τη μετάβαση από το υπερπλαστικό στο δυσπλαστικό επιθήλιο παρατηρούνται μεταβολές στις χρωμοσωμικές περιοχές 3pdel, 17p13, μεταλλάξεις στο γονίδιο p53, και τετραπλοϊδία. Κατά την εξέλιξη της δυσπλασίας σε καρκίνωμα *in situ* διαπιστώνονται χρωμοσωμικές αλλοιώσεις στις περιοχές 11q13, 13q21 και 8pdel, μεταλλάξεις του γονιδίου της κυκλίνης D1 και ανευπλοϊδία. Σε ένα πλήρως αναπτυγμένο διηθητικό καρκίνωμα διαπιστώνονται χρωμοσωμικές μεταβολές στις περιοχές 18qdel, 10q23, 3p26 και μεταλλάξεις στο γονίδιο pTEN (Califano J et al 2000, Zhang L et al 2012).

Σημαντική γενετική αστάθεια μπορεί επίσης να προκληθεί λόγω του φαινομένου της υπομεθυλίωσης ή υπερμεθυλίωσης των βάσεων του DNA (ιδιαίτερα κυτοσινών και γουανινών στα ογκοκατασταλτικά γονίδια), βλαβών των ιστονών και εμπλοκής της μετα-μεταγραφικής επεξεργασίας του mRNA. Οι μεταβολές αυτές ονομάζονται επιγενετικές, παρατηρούνται σε πρώιμα στάδια της διαδικασίας της καρκινογένεσης και εκτός από την περιοχή του όγκου ανευρίσκονται και στο γειτονικό μορφολογικά υγιή βλεννογόνο. Πρόσφατα η δράση συγκεκριμένων miRNAs έχει συσχετιστεί με τον επιγενετικό μηχανισμό (HatziaPOSTOLOU M and Iliopoulos D 2011, Nikitakis NG et al 2018).

1.2.5 Διαταραχές του κυτταρικού κύκλου, του πολλαπλασιαστικού δυναμικού και της απόπτωσης των κυττάρων

Κομβικό σημείο στην πορεία της καρκινογένεσης του στόματος αποτελεί η διαταραχή του ελέγχου του κυτταρικού κύκλου. Θετικοί και αρνητικοί ρυθμιστές επεμβαίνουν σε συγκεκριμένα σημεία ελέγχου του (checkpoints), προάγοντας είτε ανακόπτοντας τη μετάβαση, από τη μία φάση στην επόμενη. Στους θετικούς ρυθμιστές συγκαταλέγονται οι κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες, οι κυκλίνες και κάποιοι μεταγραφικοί παράγοντες, όπως ο E2F και ο c-myc. Ως αρνητικοί ρυθμιστές θεωρούνται οι ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες p53 και Rb και οι αναστολείς των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών, όπως το p16 (Vermeulen K et al 2003).

Όταν οι ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου υποστούν μεταλλάξεις, ο έλεγχος του διαταράσσεται. Έχει βρεθεί ότι κατά την εξέλιξη μιας επιθηλιακής δυσπλασίας, παρατηρείται προοδευτική αύξηση των επιπέδων της κυκλίνης D1 απορρυθμίζοντας τη ρυθμιστική διαδικασία (Ishida K et al 2007). Η απενεργοποίηση του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη p53 (λόγω μετάλλαξης του, απώλειας ετεροζυγωτίας, αποδόμησής του μέσω της δράσης του MDM2 ή αδρανοποίησής του από την πρωτεΐνη E6 των ογκογόνων στελεχών του ιού HPV) έχει συσχετιστεί θετικά με την πιθανότητα κακοήθους εξαλλαγής (Shah SN et al 2007, Smith J et al 2009). Η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος (Rb), από το σύμπλεγμα κυκλίνης D/κυκλινοεξαρτώμενης κινάσης (CDK) απενεργοποιεί το μόριο και ενεργοποιεί τον παράγοντα E2F, επιτρέποντας έτσι την μετάβαση στη φάση S, αντίθετα με τις ανάγκες ομοιοστασίας του ιστού. Στον καρκίνο του στόματος το συνεχές πολλαπλασιαστικό δυναμικό βασίζεται κυρίως στη γενετική και επιγενετική απενεργοποίηση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p16, ταυτόχρονα με τη μετάλλαξη του γονιδίου p53 και την ενισχυμένη δραστηριότητα της τελομεράσης, η οποία οδηγεί σε αθανατοποίηση των κυττάρων (Molinolo AA et al 2009, Shay JW, and Wright WE 2010).

Η απώλεια ελέγχου του κυτταρικού κύκλου και του πολλαπλασιαστικού δυναμικού προκαλούν τελικά διαταραχές των διαδικασιών διαφοροποίησης, γήρανσης και επιβίωσης των κυττάρων. Επιπρόσθετα, οι βλάβες στους μηχανισμούς της απόπτωσης, οι οποίες οφείλονται σε μεταλλάξεις των γονιδίων που ρυθμίζουν την ισορροπία προ-αποπτωτικών και αντι-αποπτωτικών παραγόντων (όπως των μορίων της οικογένειας πρωτεϊνών Bcl-2 και της επιβιωτίνης) έχουν σαν αποτέλεσμα τη μη αντιστάθμιση του αυξημένου κυτταρικού πολλαπλασιασμού, την προοδευτική αύξηση του αριθμού των κυττάρων και την επέκταση του νεοπλασματικού κλώνου (Nikitakis NG et al 2004).

1.2.6 Μοριακές οδοί της καρκινογένεσης του στόματος

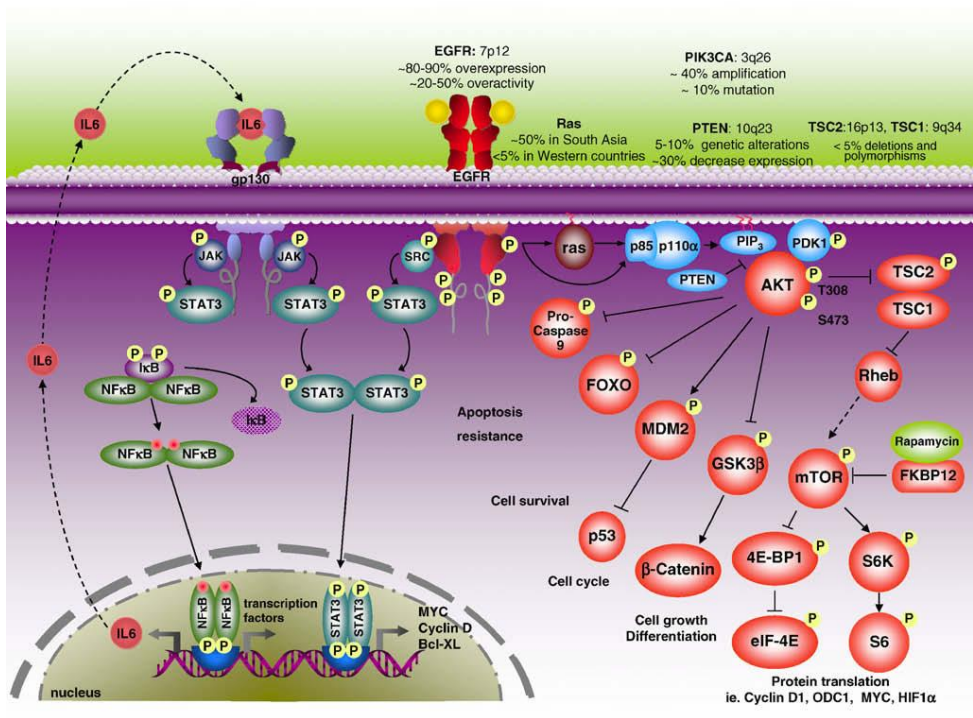
Η μελέτη των μηχανισμών καρκινογένεσης του στοματικού βλεννογόνου, εστιάζει στα μοριακά μονοπάτια που ενεργοποιούνται κατά τη διάρκεια της πολύπλοκης αυτής διαδικασίας. Η υπερενεργοποίηση των μοριακών οδών των υποδοχέων τυροσινικών κινασών (λόγω μεταβολών στα κατιόντα σηματοδοτικά μόρια της οδού, υπερέκφρασης ή μετάλλαξης των υποδοχέων και υπερπαραγωγής των προσδετών τους) αποτελεί κομβικό σημείο στην καρκινογένεση του στόματος. Παρακάτω θα αναλυθούν τρεις σημαντικές μοριακές οδοί: α. του υποδοχέα επιδερμικού αυξητικού παράγοντα-Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR), β. του PI3K/Akt/m-tor και γ. του JAK/Stat3, η ενεργοποίηση των οποίων αποτελούν σημεία κλειδιά στην καρκινογένεση του στόματος (Hanahan D and Weinberg RA 2011, Molinolo AA et al 2009) (Εικόνα 7).

Ο υποδοχέας EGFR ελέγχει ένα από τα βασικότερα μονοπάτια του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης των επιθηλιακών κυττάρων στον στοματικό βλεννογόνο (Εικόνα 7) (Lingen MW et al 2011). Ενεργοποιείται από την πρόσδεση του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα-Epidermal Growth Factor (EGF) ή του αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού α - Transforming Growth Factor-α (TGFα) και η ενεργοποίησή του, του προσδίδει ενδοκυτταρική δραστικότητα κινάσης-τυροσίνης. Συνεπακόλουθα ενεργοποιούνται αρκετές οδοί μεταγωγής σήματος, κυρίως οι οδοί MAPK, Akt και JNK, οδηγώντας σε σύνθεση DNA και πολλαπλασιασμό κυττάρων. Οι μεταλλάξεις που επηρεάζουν την έκφραση ή τη δραστικότητα του EGFR και η αύξηση των γονιδιακών του αντιγράφων οδηγούν σε γενετική αστάθεια και έχουν συσχετιστεί με τη μετάπτωση των προκαρκινικών βλαβών σε καρκίνο του στόματος. Επίσης ο EGFR συνδέεται με την ενεργοποίηση ογκογονιδίων της οικογένειας ras (Oda K et al 2005).

Μεταλλάξεις του μονοπατιού PI3K/Akt/mTOR (Εικόνα 7) έχουν ανευρεθεί στο 30% των περιπτώσεων ΑΚΣ και έχουν συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο καρκινικής εξαλλαγής. Το Akt ενεργοποιείται από το PI3K και επηρεάζει τη δράση ποικίλων μορίων όπως το MDM2, την προκασπάση 9 και το mTOR. Το p53 αναστέλλεται από το MDM2 και μαζί με την αναστολή της προκασπάσης 9 από το Akt εμποδίζει τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου. Αντίθετα, το mTOR φωσφορυλιώνει μεταγραφικούς παράγοντες καθοριστικούς για τον έλεγχο της κυτταρικής ανάπτυξης (Freudlsperger C et al 2011).

Η σηματοδοτική οδός JAK/Stat3 (Εικόνα 7) υπερλειτουργεί από τα αρχικά στάδια της καρκινογένεσης. Το μόριο Stat3 ενεργοποιείται είτε από τον EGFR είτε από τον υποδοχέα JAK και δρα ως μεταγραφικός παράγοντας σημαντικών μορίων ελέγχου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης, όπως του ογκογονιδίου c-myc, της επιβιωτίνης (survivin), κυκλινών και της οικογένειας του bcl. Η οδός JAK/Stat3

διαπλέκεται και με άλλα μονοπάτια της καρκινογένεσης, όπως με την οδό του NF-κΒ μέσω της ιντερλευκίνης-6 (IL-6) (Nikitakis NG et al 2004, Thomas SJ et al 2015).



Εικόνα 7: Οι κυριότερες μοριακές σηματοδοτικές οδοί που διαταράσσονται στον καρκίνο κεφαλής και τραχήλου (Molinolo AA et al 2009)

1.2.7 Η οικογένεια των πρωτεϊνών του NF-κΒ

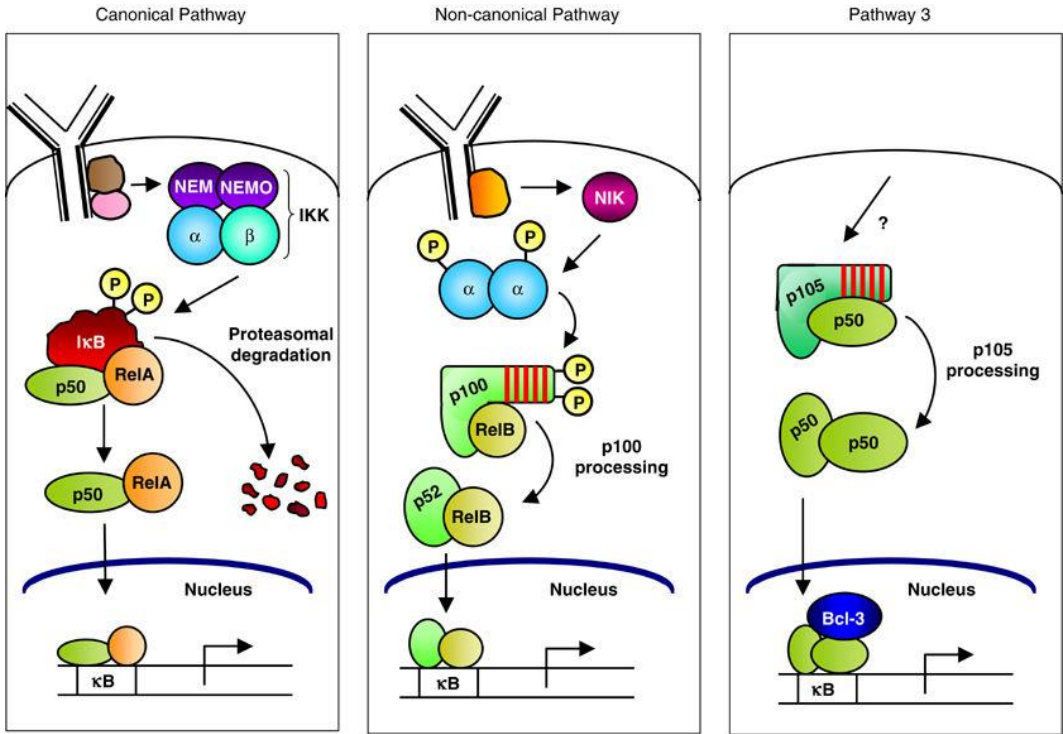
Ο Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF-κΒ) είναι ένα πρωτεϊνικό σύμπλεγμα που ελέγχει την αντιγραφή του DNA, την παραγωγή κυτταροκινών και την επιβίωση του κυττάρου. Διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ανοσιακής απάντησης στις λοιμώξεις και στην εκδήλωση αυτοάνοσων νοσημάτων. Σημαντικός είναι επίσης ο ογκογενετικός του ρόλος διότι προάγει την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου, την αγγειογένεση και τη διήθηση, ενώ ταυτόχρονα αναστέλλει και την απόπτωση (Gilmore TD, 2006). Όλες οι πρωτεΐνες της οικογένειας του NF-κΒ διαθέτουν ένα REL ομόλογο τμήμα με την ογκοπρωτεΐνη v-Rel στο N τελικό άκρο τους. Η οικογένεια απαριθμεί 5 μέλη διαχωριζόμενα σε δύο ομάδες. Στην ομάδα I ανήκουν οι πρωτεΐνες NF-κΒ1 και NF-κΒ2 και στην ομάδα II οι πρωτεΐνες RelA, RelB και c-Rel (Nabel GJ and Verma M 1993).

Ο NF-κΒ στην ανενεργή του μορφή βρίσκεται ως διμερές στο κυτταρόπλασμα υπό την ανασταλτική δράση των μορίων ΙκΒs (Jacobs Md and Harrison SC 1998).

Βακτήρια, ιοί κυτταροκίνες, αυξητικοί παράγοντες, οξειδωτικό ή φυσικό στρες, βλάβες DNA μέσω των υποδοχέων Toll Like Receptors-TLRs ενεργοποιούν την έκφραση του NF-κB (Doyle SL and O'Neill LA 2006, Liu T et al 2017). Η ενεργοποίηση των παραπάνω υποδοχέων οδηγεί σε αποικοδόμηση των αναστολέων IκBs από την IκB κινάση (IKK). Με την αποικοδόμηση των IκBs, το σύμπλεγμα NF-κB «απελευθερώνεται» και στη συνέχεια εισέρχεται στον πυρήνα, όπου επάγει την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων που έχουν θέσεις σύνδεσης με αυτό. Η ενεργοποίηση αυτών των γονιδίων από τον NF-κB οδηγεί τελικά στη φλεγμονώδη αντίδραση για την αντιμετώπιση της λοίμωξης (Nelson DE et al 2004, Liu T et al 2017) (Εικόνα 8).

Η ογκογόνος δράση του NF-κB οφείλεται στην επέμβαση του μορίου σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες. Έχει βρεθεί ότι ο NF-κB τροποποιεί την έκφραση πολλών αντι-αποπτωτικών μορίων όπως Bcl-2, Bcl-xL και επιβιωτικής αναστέλλοντας τους μηχανισμούς της απόπτωσης, με αποτέλεσμα να παρατείνεται η επιβίωση των καρκινικών κυττάρων. Επίσης τροποποιεί την έκφραση ορισμένων αυξητικών παραγόντων (όπως οι TNF, IL-6, IL-1β και EGF) και της κυκλίνης D1 ρυθμίζοντας τη σύνθεση της κυκλοξυγενάσης 2 (COX-2) και της προσταγλανδίνης E2. Με αυτόν τον τρόπο ο NF-κB παρεμβαίνει σε κομβικά σημεία του κυτταρικού κύκλου, θέτοντας τα κύτταρα σε διαρκή πολλαπλασιασμό (Vlahopoulos SA et al 2015).

Το μόριο NF-κB δρα ποικιλοτρόπως στο μικροπεριβάλλον ενός κακοήθους όγκου. Επιδρά στις μεταλλοπρωτεϊνάσες του υποστρώματος (MMPs) με τη βοήθεια των οποίων πραγματοποιείται αποδόμηση των στοιχείων του εξωκυττάρου χώρου διευκολύνοντας τη διηθητική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων. Επίσης διευκολύνει, με τη βοήθεια κάποιων μορίων που εκφράζονται στο ενδοθήλιο, την είσοδο των καρκινικών κυττάρων στα αγγεία, προάγοντας τη μετάσταση. Τα μόρια αυτά είναι τα ICAM-1, ELAM-1 και VCAM-1. Παράλληλα, μέσω ρύθμισης της παραγωγής αγγειογενετικών παραγόντων, όπως ο VEGF προάγει την αγγειογένεση (Escárcega RO et al 2007).



Εικόνα 8: Σύνοψη των μοριακών μονοπατιών που επηρεάζουν την έκφραση του μορίου NF-κB (Gilmore TD, 2006)

1.3 HPV ΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΗ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ

1.3.1 Γενικά στοιχεία για τον ιό HPV

Ο ιός των ανθρωπίνων θηλωμάτων (Human Papillomavirus-HPV) ανήκει στην ευρύτερη οικογένεια των Παροναϊρίδων, οι οποίοι ευθύνονται για την πρόκληση υπερπλαστικών αλλοιώσεων σε διάφορα είδη θηλαστικών. Στον άνθρωπο ο ιός HPV προκαλεί θηλώματα, μυρμηκίες και κονδυλώματα στο δέρμα, το βλεννογόνο της γενετικής περιοχής, της στοματοφαρυγγικής κοιλότητας και της ανώτερης αναπνευστικής οδού. Ιδιαίτερο όμως ενδιαφέρον παρουσιάζει η αιτιολογική του συσχέτιση με την καρκινογένεση του τραχήλου της μήτρας, του στοματοφάρυγγα, του λάρυγγα και της στοματικής κοιλότητας (Syrjänen K et al 1983, Thierry F 2009, Rautava J and Syrjänen S 2011). Τα κύρια δομικά συστατικά του ιού αποτελούν μια κυκλική διπλή έλικα DNA, η οποία περιβάλλεται από εικοσαεδρικό πρωτεϊνικό καψίδιο διαμέτρου 52-55nm, χωρίς εξωτερικό λιποπρωτεϊνικό περίβλημα (φάκελο). Το πρωτεϊνικό καψίδιο συγκροτείται από 72 καψομερίδια και κάθε καψομερίδιο από δύο ιϊκές πρωτεΐνες την L1 και L2 (Asiatic A et al 2014).

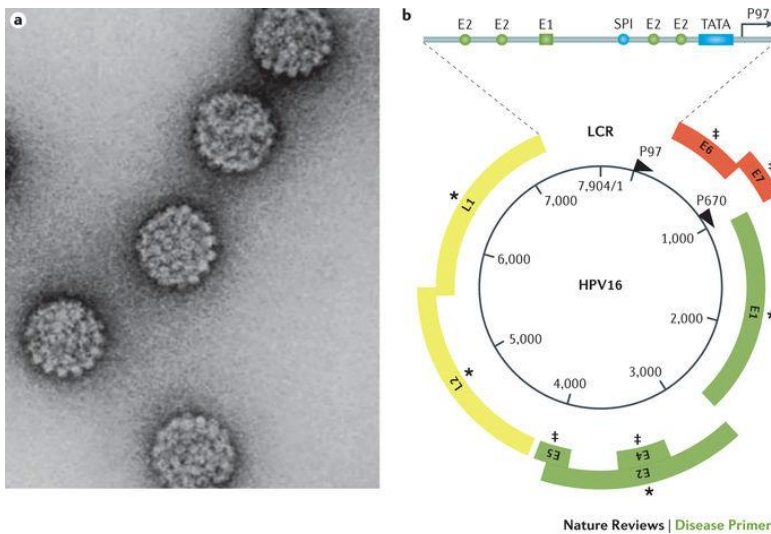
Στις μέρες μας περισσότεροι από 170 διαφορετικοί HPV γονότυποι έχουν απομονωθεί και ταυτοποιηθεί. Η διάκριση μεταξύ των διαφορετικών γονοτύπων στηρίζεται στις διαφορές της αλληλουχίας της πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης του γονιδίου L1 του ιού. Ως νέοι γονότυποι ορίζονται εκείνοι που η διαφορά τους στο γονίδιο L1 είναι μεγαλύτερη από 10%. Όταν υπάρχει διαφορά 2-10% τότε κάνουμε λόγο για υπότυπους, ενώ όταν η διαφορά είναι μικρότερη του 2% ουσιαστικά έχουμε διαφορετικά στελέχη του ίδιου τύπου. Οι τύποι HPV διακρίνονται επίσης με βάση τον κυτταρικό τροπισμό τους σε βλεννογόνιους και δερματικούς. Με κριτήριο την ογκογενετική τους ικανότητα, οι HPV γονότυποι διακρίνονται σε χαμηλού κινδύνου-Low Risk (LR-HPVs) και υψηλού κινδύνου-High Risk (HR-HPVs). Οι χαμηλού κινδύνου τύποι του HPV όπως ο 6, 11, 42, 43, 44 απομονώνονται συνήθως από θηλώματα, μυρμηκίες, οξυτενή κονδυλώματα και από χαμηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις του πλακώδους επιθηλίου, τα οποία δεν εξελίσσονται σε κακοήθειες. Αντίθετα, οι υψηλού κινδύνου τύποι του HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 50, 51, 55, 58, 59, 64, 68 ανευρίσκονται σε υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις και στις περισσότερες περιπτώσεις κακοήθων νεοπλασμάτων του τραχήλου της μήτρας και του στοματοφάρυγγα. Θα πρέπει να αναφερθεί ότι υπάρχει μια ενδιάμεση ομάδα, μετρίου πιθανώς κινδύνου, που αποτελείται από τους στελέχη 26, 53, 66, των οποίων ο ακριβής ρόλος στην ογκογένεση δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί (de Villiers EM 2013).

1.3.2 Γονιδιωματική οργάνωση του ιού HPV

Το γενετικό του υλικό του ιού HPV είναι ένα κυκλικό δίκλωνο υπερελικωμένο μόριο DNA, το οποίο συγκροτείται από 8000 ζεύγη βάσεων συνδεδεμένων με ιστόνες και διαθέτει δέκα ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης (Open Reading Frames-ORF). Η

οργάνωση του γονιδιώματος του ιού γίνεται σε τρεις λειτουργικές περιοχές: την πρώιμη περιοχή (Early Region-E), την όψιμη περιοχή (Late Region-L) και τη μακρά περιοχή ελέγχου (Upstream Regulatory Region-URR/Long Control Region-LCR) (Asiaf A et al 2014).

Η πρώιμη περιοχή E αποτελείται από επτά ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης που περιέχουν τα γονίδια E1 έως E7, τα οποία κωδικοποιούν ένζυμα που συμμετέχουν στον αναδιπλασιασμό του ιϊκού DNA και ελέγχουν την έκφραση των ογκοπρωτεϊνών του ιού (E6, E7). Η όψιμη περιοχή L αποτελείται από δύο πλαίσια ανάγνωσης, τα πλαίσια L1, L2. Όλοι οι τύποι του ιού HPV διαθέτουν καψίδιο που περιέχει 360 αντίγραφα της -εξαιρετικά αντιγονικής- πρωτεΐνης L1 και 12 αντίγραφα της πρωτεΐνης L2, τα οποία συγκροτούν τα 72 καψομερίδια. Η περιοχή URR ή LCR ελέγχει το ρυθμό αντιγραφής και μεταγραφής των περιοχών E και L (Εικόνα 9) (Schiffman M et al 2016).



Εικόνα 9 : Το γονιδίωμα του ιού HPV (Schiffman M et al 2016)

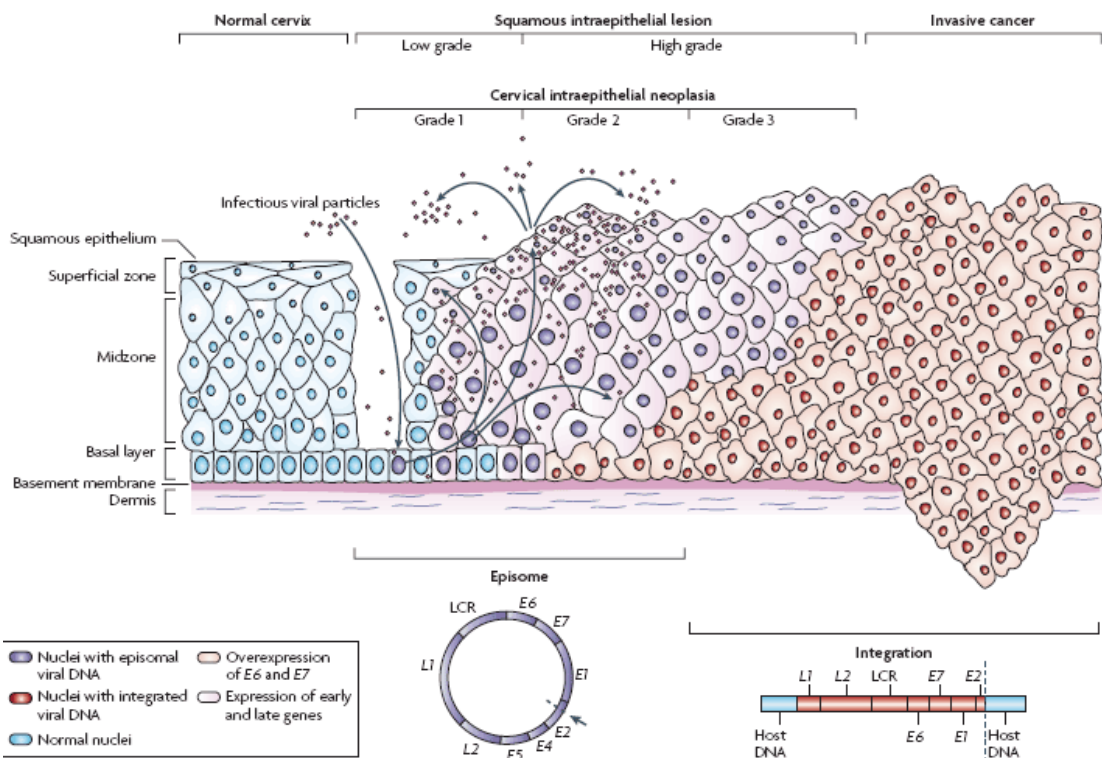
Συνοπτικά οι ιϊκές πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από την πρώιμη περιοχή E του γονιδιώματος του ιού και οι κύριες λειτουργίες τους αναφέρονται στον πίνακα 4 (Doorbar J et al 2012, Rautava J and Syrjänen S 2012)

Πίνακας 4: Οι κυριότερες πρωτεΐνες της πρώιμης E περιοχής του ιού HPV και οι λειτουργίες τους

ΠΡΩΤΕΙΝΗ	ΚΥΡΙΑ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ
E1	Κατέχει σημαντικό ρόλο στην αντιγραφή του DNA
E2	Ρυθμίζει τη μεταγραφή, ελέγχει την έκφραση των ογκογονιδίων E6 και E7
E3	Άγνωστη λειτουργία
E4	Ρυθμίζει την ωρίμανση και απελευθέρωση των ιικών σωματιδίων και συνδέεται με το φαινόμενο της κολοκυττάρωσης μαζί με τις E1 και E2
E5	Συμμετέχει στη διατήρηση καρκινικού μετασχηματισμού
E6	Προκαλεί τον καρκινικό μετασχηματισμό μέσω της αποδόμησης του p53
E7	Προκαλεί τον καρκινικό μετασχηματισμό μπλοκάροντας τη δράση του γονιδίου του ρετινοβλαστώματος-Rb

1.3.3 Φυσική ιστορία της HPV λοίμωξης

Ο ιός HPV χαρακτηρίζεται ως «επιθηλιότροπος» διότι η αναπαραγωγή του γίνεται στη βασική στιβάδα του επιθηλίου με τη βοήθεια των μηχανισμών αντιγραφής, μεταγραφής και μετάφρασης του ξενιστή. Κατά τη φάση της παραγωγικής λοίμωξης πραγματοποιείται είσοδος του ιού στα κύτταρα της βασικής στιβάδας από κάποια λύση της συνέχειας του επιθηλίου, παράγονται οι πρώιμες λειτουργικές πρωτεΐνες και αναδιπλασιάζεται το κυκλικό μόριο του DNA, οδηγώντας στη δημιουργία 50-100 αντιγράφων του ιού ανά κύτταρο. Το κυκλικό μόριο του ιικού DNA παραμένει στην περιοχή του κυτταροπλάσματος του κυττάρου της βασικής στιβάδας σε επισωματική μορφή (ανάλογη του πλασμιδίου των βακτηρίων) πολλαπλασιαζόμενο μια φορά σε κάθε κυτταρικό κύκλο. Καθώς τα μολυσμένα κύτταρα της βασικής στιβάδας ολοκληρώνουν τη φάση ωρίμανσης τους και ανέρχονται επιθηλιακές στιβάδες εξελισσόμενα σε ώριμα κερατινοκύτταρα πραγματοποιείται ένας εντατικός αναδιπλασιασμός του ιικού γονιδιώματος με παράλληλη έκφραση των δομικών πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα την συναρμολόγηση χιλιάδων ιικών σωματιδίων ανά κύτταρο (Εικόνα 10) (Rautava J and Syrjänen S 2012).



Εικόνα 10: Σχηματική παράσταση του τρόπου εισόδου και της αναπαραγωγής του ιού HPV στο επιθήλιο του τραχήλου της μήτρας (Woodman CB et al 2007)

Αναλυτικότερα ο κύκλος ζωής του ιού κατά την παραγωγική λοίμωξη διακρίνεται στα παρακάτω στάδια:

A) Προσήλωση: Κατά το στάδιο αυτό πραγματοποιείται προσκόλληση του ιού σε ειδικούς υποδοχείς της επιφάνειας της κυτταροπλασματικής μεμβράνης των κυττάρων της βασικής στιβάδας του επιθηλίου του ξενιστή. Έχει βρεθεί ότι το στέλεχος HPV 6 προσκολλάται μέσω της συμμετοχής της α6- ιντεγκρίνης ενώ για τα στέλεχη HPV 16, 31, 33 η προσκόλληση πραγματοποιείται πιθανότατα μέσω της HPV-L1 πρωτεΐνης στον επιφανειακό υποδοχέα της θειϊκής ηπαρίνης.

B) Διείσδυση: Γίνεται διείσδυση του ιού από τη κυτταρική μεμβράνη στο κυτταρόπλασμα με εγκόλπωση ολόκληρου του ιϊκού σωματιδίου.

Γ) Απέκδυση: Γίνεται λύση του καψιδίου του ιού από τη δράση των κυτταρικών λυτικών ενζύμων με ταυτόχρονη απελευθέρωση του ιϊκού DNA.

Δ) Πρώιμη μεταγραφή: Ακολουθεί η μεταγραφή του mRNA της πρώιμης περιοχής του DNA του ιού.

Ε) Πρώιμη μετάφραση: Πραγματοποιείται η παραγωγή των πρώιμων πρωτεϊνών, οι οποίες είναι αναγκαίες για τον αναδιπλασιασμό του ιϊκού γονιδιώματος.

ΣΤ) Αναδιπλασιασμός: Γίνεται αναπαραγωγή του ιϊκού DNA με τη χρήση πρώιμων πρωτεϊνών.

Ζ) Όψιμη μεταγραφή: Παράγεται το mRNA της όψιμης περιοχής του ιϊκού γονιδιώματος.

Η) Όψιμη μετάφραση: Γίνεται παραγωγή των δομικών πρωτεϊνών από τη περιοχή L, οι οποίες χρησιμοποιούνται για τη κατασκευή του ιϊκού καψιδίου.

Θ) Συναρμολόγηση: Σχηματίζονται νέα ιϊκά σωματίδια από τα νέα αντίγραφα του ιϊκού DNA και τις καψιδιακές πρωτεΐνες.

Ι) Απελευθέρωση: Με τη λύση της κυτταροπλασματικής μεμβράνης του ξενιστή απελευθερώνονται τα νέα ιϊκά σωματίδια.

Κατά τη φάση της μη παραγωγικής λοίμωξης, το ιϊκό DNA χάνει την κυκλική του μορφή και ενσωματώνεται στο DNA του κυττάρου ξενιστή. Η ενσωμάτωση αυτή στις περιπτώσεις των στελεχών υψηλού κινδύνου οδηγεί στην έναρξη των ογκογενετικής δράσης των ιϊκών πρωτεϊνών E6 και E7 και της μετατροπής του φυσιολογικού κερατινοκυττάρου σε νεοπλασματικό, όπως αναλυτικά θα περιγραφεί στο επόμενο υποκεφάλαιο (Εικόνα 10) (Doorbar J 2005).

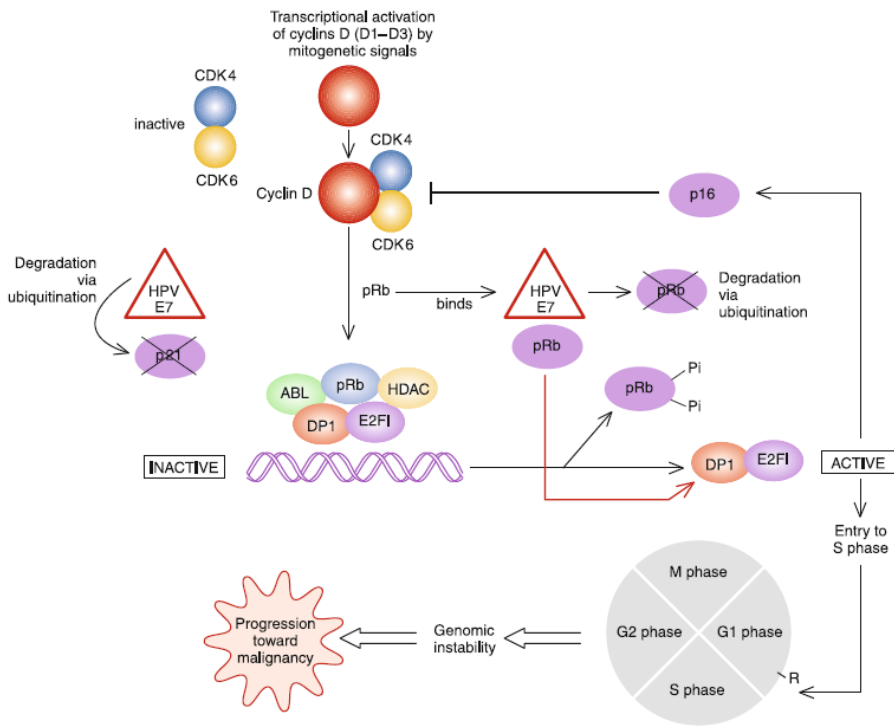
1.3.4 Μηχανισμοί της HPV καρκινογένεσης

Η ογκογόνος δράση των HR-HPVs οφείλεται στην ενσωμάτωση του ιϊκού DNA σ αυτό του κυττάρου ξενιστή και στη δράση των ογκοπρωτεϊνών E6 και E7, οι οποίες παρεμβαίνουν και τροποποιούν τους μηχανισμούς ελέγχου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Το γονιδίωμα των HR-HPVs ενσωματώνεται στο κυτταρικό DNA, με ανασυνδυασμό της E1/E2 περιοχής, η οποία και διασπάται. Με τη διάσπαση του ιϊκού DNA στην περιοχή E2, αναστέλλεται ο έλεγχος της έκφρασης των γονιδίων E6 και E7 και οι παραγόμενες ιϊκές πρωτεΐνες E6 και E7 προσδένονται στις ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες p53 και pRb και να τις αδρανοποιούν (Doorbar J et al 2012).

Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο ρετινοβλαστώματος (Retinoblastoma-Rb) φυσιολογικά κωδικοποιεί την αντίστοιχη πρωτεΐνη (pRb), ο ρόλος της οποίας είναι ο έλεγχος του ρυθμού του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, μέσω του παράγοντα E2F. Η pRb στο φυσιολογικό επιθήλιο εμποδίζει την κυτταρική διαίρεση με αναστολή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1, ελέγχοντας τη μετάβαση στη φάση S. Όταν απαιτείται αναστολή της κυτταρικής διαίρεσης, το γονίδιο Rb μεταγράφεται και συνθέτει την πρωτεΐνη pRb, η οποία συνδεόμενη με τον παράγοντα E2F τον αδρανοποιεί, οδηγώντας το κύτταρο στη φάση G1. Για την εισαγωγή του κυτταρικού κύκλου στην S φάση, η pRb φωσφορυλιώνεται από το σύμπλοκο κυκλίνης/κινάσης (E/CDK2), απελευθερώνεται, ο μεταγραφικός παράγοντας E2F και ακολουθεί η κυτταρική διαίρεση (Chan HM et al 2001).

Η ογκοπρωτεΐνη E7 του ιού HPV δεσμεύει και αδρανοποιεί την pRb και ο παράγοντας E2F απελευθερώνεται και καθίσταται συνεχώς ενεργός με άμεσο επακόλουθο το κύτταρο να διαιρείται συνεχώς (κατάσταση «αθανатоποίησης») γεγονός που προκαλεί τη δημιουργία όγκων (Εικόνα 11) (West T et al 2002). Ένας επιπλέον μηχανισμός αναστολής της λειτουργίας της pRb είναι η αυξημένη παραγωγή

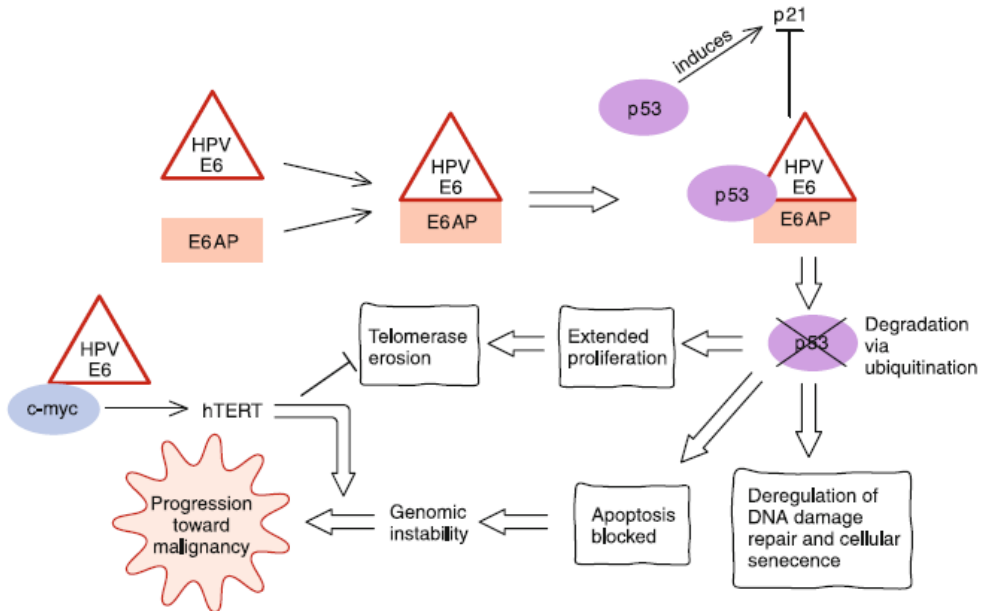
του ενζύμου θυμιδίνης κινάσης από την E περιοχή του ιικού γονιδιώματος, που οδηγεί στη δέσμευση και φωσφορυλίωση της pRb και συνεπώς στην αδρανοποίηση της. Επίσης, η E7 μπορεί να αναστείλει τη λειτουργία των πρωτεϊνών p21 και p27, αναστολέων των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών, οι οποίες βοηθούν στην διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη μέση και στο τέλος της G1 φάσης, ως απάντηση σε αντιμυτωτικά σήματα (Horpe-Seyley K et al 2018).



Εικόνα 11: Μοριακοί μηχανισμοί δράσης ογκοπρωτεΐνης E7 των HR-HPVs (Rautava J and Syrjänen S 2012)

Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 κωδικοποιεί την αντίστοιχη πρωτεΐνη, της οποίας κύριος ρόλος είναι η επιδιόρθωση των βλαβών στο DNA, η διατήρηση της γενετικής σταθερότητας του κυττάρου και η διασφάλιση της ποιότητας του γενετικού υλικού στα θυγατρικά κύτταρα, μέσω της παρεμπόδισης του πολλαπλασιασμού μη φυσιολογικών κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, η p53 επάγει την έκφραση των γονιδίων p21, GADD45 και bax. Η p21 ελέγχει τον πολλαπλασιασμό του κυττάρου μέσω της αναστολής της δραστηριότητας των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών και η GADD45 συμμετέχει στην επιδιόρθωση του DNA διακόπτοντας τον κυτταρικό κύκλο στη φάση G1, μέχρι να ολοκληρωθεί η επιδιόρθωση των βλαβών. Στη περίπτωση που η επιδιόρθωση δεν είναι εφικτή, ενεργοποιείται το γονίδιο bax, το οποίο επάγει διαδικασίες θανάτωσης των προβληματικών κυττάρων, φαινόμενο γνωστό ως απόπτωση (Chumakov PM 2007).

Η ογκοπρωτεΐνη E6 των HR-HPVs εμφανίζει υψηλή χημική συγγένεια και συνδέεται με την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53. Αρχικά, η E6 συνδέεται με τη κυτταρική πρωτεΐνη E6-AP, γνωστή ως UBE3A, με ρόλο λιγάσης. Το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία συμπλόκου E6/E6-AP το οποίο εν συνεχεία συνδέεται με την p53, με τη βοήθεια των ενζύμων ουβικουϊτίνης (UbcH5, UbcH7, UbcH8). Η ουβικουϊτινοποιημένη p53 οδηγείται στο πρωτεόσωμα, όπου αποδομείται με πρωτεόλυση. Η αποδόμηση της p53 οδηγεί σε απορρύθμιση των μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA και αναστολή των μηχανισμών της απόπτωσης των κύτταρων γεγονός που προάγει τη δημιουργία όγκων (Εικόνα 12) (Thierry F 2009, Horpe-Seyley K et al 2018).



Εικόνα 12: Μοριακοί μηχανισμοί δράσης ογκοπρωτεΐνης E6 των HR-HPVs (Rautava J and Syrjänen S 2012)

1.3.5 Συμμετοχή του ιού HPV στην καρκινογένεση κεφαλής και τραχήλου

Στις μέρες μας η αιτιολογική συσχέτιση του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας με τα υψηλού κινδύνου στελέχη του ιού HPV στο 99% των περιπτώσεων είναι επαρκώς τεκμηριωμένος (de Martel et al 2012). Το 1983 οι Syrjänen K και συν. πρότειναν την πιθανή αιτιολογική συσχέτιση του ιού HPV με το Ακανθοκυτταρικό Καρκίνωμα Κεφαλής και Τραχήλου λόγω των ιστολογικών ομοιοτήτων μεταξύ του βλεννογόνου του στοματοφάρυγγα και του έξω γενετικού συστήματος, της επιθηλιοτρόπου φύσης του ιού, της ευρείας διάδοσης νέων σεξουαλικών πρακτικών και της συσχέτισης του ιού HPV με τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας (Syrjänen K et al 1983).

Έκτοτε, πλήθος ερευνητικών μελετών έχουν επιχειρούν να ανιχνεύσουν ιικό DNA σε φυσιολογικό στοματικό βλεννογόνο. Σε συστηματική ανασκόπηση της βιβλιογραφίας των Kreimer AR και συν. 2010, σε δείγμα φυσιολογικού στοματικού βλεννογόνου, ποσοστό 4,5% ήταν θετικό για HPV DNA (σε σύνολο δείγματος 4070 περιπτώσεων), 3.5% για HR-HPVs DNA (σε σύνολο δείγματος 4441 περιπτώσεων) ενώ το κυρίαρχο στέλεχος ήταν το HPV 16, που ανευρέθηκε σε ποσοστό 1,3% (σε σύνολο δείγματος 3977 περιπτώσεων). Σε μελέτη των Sanders AE και συν. 2012 στις ΗΠΑ με πληθυσμιακό δείγμα 4846 ατόμων, το ποσοστό ανίχνευσης του ιού HPV (HR και LR στελεχών) σε κλινικά υγιή βλεννογόνο βρέθηκε 7,3%, των HR-HPvs 3.07%, ενώ το συχνότερα απαντώμενο στέλεχος ήταν ο HPV16 σε ποσοστό 1,06% (στο σύνολο του δείγματος). Ανάλογα αποτελέσματα βρέθηκαν σε μετα-ανάλυση 66 μελετών των Tam S και συν. 2018 σε πληθυσμιακό δείγμα 56600 ατόμων με κλινικά υγιή βλεννογόνο. Το συνολικό ποσοστό ανίχνευσης του ιού HPV (HR και LR στελεχών) βρέθηκε 7,7%, των HR-HPvs 3.5%, ενώ του συχνότερα απαντώμενου στελέχους HPV16 1,4% (στο σύνολο του δείγματος).

Ο ακριβής προσδιορισμός των κακοηθών νεοπλασμάτων κεφαλής και τραχήλου που οφείλονται στο ιό HPV δεν απόλυτα είναι εφικτός, διότι το κάπνισμα και η κατανάλωση αλκοόλ αποτελούν ισχυρούς αιτιολογικούς παράγοντες και μπορεί να συνυπάρχουν (Syrjänen S 2005). Παράλληλα, τα διαφορετικά ποσοστά ανίχνευσης του ιού HPV στις διάφορες μελέτες οφείλονται κατά βάση στις διαφορετικές τεχνικές ανίχνευσης.

Ο in situ DNA υβριδισμός είναι σε θέση να αποκαλύψει την παρουσία και μεταβολική ενεργότητα του ιού (Witt BL et al 2015). Ωστόσο παρά την υψηλή ειδικότητα διαπιστώνεται χαμηλή ευαισθησία, ενώ η υποκειμενικότητα του εξεταστή αποτελεί μειονέκτημα της μεθόδου (Singhi AD and Westra WH 2001). Η PCR φαίνεται να είναι αρκετά ευαίσθητη τεχνική ανίχνευσης, αλλά δεν μπορεί ξεχωρίσει αν το DNA του ιού βρίσκεται σε επισωματική μορφή (λανθάνουσα λοίμωξη) από το ιικό DNA που είναι ενσωματωμένο στο γενετικό υλικό του ξενιστή (ενεργή λοίμωξη) (Bishop JA et al 2015). Η ανίχνευση του m-RNA των πρωτεϊνών E6 και E7 θεωρείται η πιο ασφαλής μέθοδος ανίχνευσης της ενεργού μορφής του ιού ("gold standar") και μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε με την εφαρμογή της τεχνικής της PCR (Bishop JA et al 2015) είτε με την πιο σύγχρονη τεχνική του RNA in situ υβριδισμού (Ukro OC et al 2011, Bishop JA et al 2012).

Η ανοσοϊστοχημική ανίχνευση του μορίου p16^{INKA} στον καρκίνο του στοματοφάρυγγα θεωρείται επαρκής βιοδείκτης της παρουσίας και ενεργότητας του ιού (Rischin D et al 2010, El-Naggar AK and Westra WH 2012) σε αντίθεση με τη στοματική κοιλότητα όπου η μεμονωμένη χρήση του μας δίνει αντικρουόμενα αποτελέσματα (Lingen MW et al 2013) και ο συνδυασμός περισσότερων εκ των ανωτέρω τεχνικών (πχ. ταυτόχρονη ανίχνευση με την τεχνική PCR και

ανοσοϊστοχημική ανίχνευση του μορίου p^{16INKA}) μπορεί να μας δώσει εγκυρότερα αποτελέσματα (Pannone G et al 2012).

Η συσχέτιση του ιού HPV με τον καρκίνο κεφαλής και τραχήλου περιγράφηκε ποσοτικά στη μελέτη του Gillison ML και συν. 2000. Στη μελέτη αναφέρεται ότι ο HPV σχετιζόμενος καρκίνος κεφαλής και τραχήλου αντιστοιχεί στο 25% των περιπτώσεων ενώ με βάση την ανατομική περιοχή, τα ποσοστά κυμαίνονται σε αμυγδαλές και βάση γλώσσας (62%), λάρυγγα (19%), στοματική κοιλότητα (12%) και υποφάρυγγα (10%). Τα συχνότερα απαντώμενα στελέχη είναι το HPV16 (90%) ακολουθούμενο από το HPV33 (5%), HPV18 (2%) και HPV31 (2%). Έκτοτε παρατηρείται αυξητική τάση ανάπτυξης HPV σχετιζόμενων καρκινωμάτων κεφαλής και τραχήλου με το ποσοστό να αγγίζει το 50% (Majchrzak E et al 2014) και ειδικότερα του στοματοφάρυγγα (έως και 70%) (Jung AC et al 2010, Chaturvedi AK et al 2011, Mirghani H et al 2014).

1.3.6 Συμμετοχή του ιού HPV στην καρκινογένεση του στόματος

Οι διαφορετικές μέθοδοι ανίχνευσης του ιού, το είδος των δειγμάτων (π.χ. φρέσκος ή μονιμοποιημένος ιστός, κυτταρολογικά δείγματα), οι μέθοδοι διατήρησης του βιοπτικού υλικού, ο υψηλός βαθμός κερατινοποίησης των κυττάρων του στοματικού επιθηλίου, η γεωγραφική κατανομή των πληθυσμών κτλ είχαν δημιουργήσει, τις προηγούμενες δεκαετίες, σύγχυση ως προς την ακριβή επίπτωση της HPV λοίμωξης στην καρκινογένεση του στόματος. Στις μέρες μας πιστεύεται ότι το ποσοστό του καρκίνου του στόματος που οφείλεται στον ιό HPV, είναι 4-7 φορές μικρότερος από αυτό του καρκίνου του στοματοφάρυγγα (Termine N et al, 2008, Hubbers CU and Akgul B 2015, Mirghani H et al 2015). Στην τελευταία έκδοση του WHO 2017 το ποσοστό ανίχνευσης του ιού HPV στο καρκίνο του στόματος προσδιορίζεται στο 3% (El Nagar AK et al 2017).

Οι μηχανισμοί της HPV σχετιζόμενης καρκινογένεσης φαίνεται να είναι παραπλήσιοι με εκείνους του στοματοφάρυγγα και του τραχήλου της μήτρας, με τις ογκοπρωτεΐνες E6 και E7 να διαδραματίζουν τον κυρίαρχο ρόλο, ωστόσο λόγω του ιδιαίτερα μικρού ποσοστού των HPV θετικών καρκίνων του στόματος επαρκή δεδομένα για την μοριακή βάση της HPV σχετιζόμενης καρκινογένεσης του στόματος δεν υπάρχουν *in vitro* και *in vivo* (Markopoulos AK 2012, Chen X and Zhao Y 2017). Σε μελέτη των Rodolico και συν. 2011 διαφαίνεται θετική συσχέτιση μεταξύ του παράγοντα HIF-1α και της πρωτεΐνης E7 σε HPV16 θετικά ΑΚΣ υποδηλώνοντας την εμπλοκή του ιού HPV16 σε πρόδρομα στάδια της καρκινογένεσης του στόματος. Επίσης ερευνητικό ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι μελέτες των miRNAs στην HPV σχετιζόμενη καρκινογένεση του στόματος στις οποίες φαίνεται ότι ο ιός επηρεάζει την ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό, τη διήθηση και μετάσταση των καρκινικών κυττάρων του ΑΚΣ μέσω της ρύθμισης της έκφρασης των miR-181 και miR-20a (Lee SH et al

2015, Hu J 2016). Η ακριβής συμμετοχή του ιού HPV στην καρκινογένεση του στόματος χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

2. ΑΝΟΣΙΑΚΗ ΑΠΑΝΤΗΣΗ ΣΤΟ ΑΚΑΝΘΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΤΟΥ ΣΤΟΜΑΤΟΣ

2.1 Εισαγωγή

Η κυριότερη λειτουργική αποστολή του ανοσοποιητικού συστήματος είναι η άμυνα εναντίων βλαπτικών παραγόντων, οι οποίοι ονομάζονται αντιγόνα, με στόχο τη διατήρηση της ομοιοστασίας του οργανισμού (Abbas AK et al 2016). Η ανοσολογική απόκριση στους εξωγενείς ή ενδογενείς βλαπτικούς παράγοντες, μεσολαβείται από την πρώιμη δράση της «μη ειδικής ή φυσικής ανοσίας» (innate/non specific immunity) και την όψιμη δράση της «ειδικής ή επίκτητης ανοσίας» (adaptive/specific immunity) (Cui J et al 2014).

Η φυσική ανοσία αποτελεί την «πρώτη γραμμή άμυνας» του οργανισμού, διαδραματίζοντας κομβικό ρόλο στην έγκαιρη αναγνώριση των αντιγόνων με επακόλουθο την ενεργοποίηση προφλεγμονωδών αποκρίσεων. Η επίκτητη ανοσία είναι υπεύθυνη για την τελική εξάλειψη των παθογόνων και την παραγωγή ανοσολογικής μνήμης. Η φυσική ανοσιακή απάντηση δεν χαρακτηρίζεται από ειδικότητα, δεν απαιτεί την προηγούμενη έκθεση στο αντιγόνο και διαμεσολαβείται από διάφορα κύτταρα όπως μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα, ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα, μαστοκύτταρα και κύτταρα φυσικούς φονείς (NK-cells), τα οποία καταστρέφουν τα αντιγόνα κυρίως με φαγοκυττάρωση, συνεπικουρούμενα από την δράση του συμπληρώματος. Η επίκτητη ανοσολογική απάντηση οφείλει τη αποτελεσματικότητά της, στην ειδικότητα αντιγόνου-αντισώματος, η οποία οδηγεί στην διαδικασία της οψωνοποίησης και καταστροφής του αντιγόνου (Abbas AK et al 2016). Ιδιαίτερη σημαντική είναι η λειτουργική διασύνδεση μεταξύ της φυσικής και ειδικής ανοσίας, η οποία κινητοποιεί την επίκτητη ανοσολογική απάντηση κάθε φορά που χρειάζεται να προσαρμοστεί η ειδικότητά της με το αντίστοιχο αντιγόνο (Jain A and Pasare C 2017).

2.2 Γενικά χαρακτηριστικά της Φυσικής Ανοσίας

Η φυσική ανοσία αποτελεί σημαντικό υποσύνολο του ανθρώπινου ανοσοποιητικού συστήματος με κύρια λειτουργική αποστολή την αντιμετώπιση της μόλυνσης από τα παθογόνα. Σε αντίθεση με την ειδική ανοσία, η φυσική ανοσία αντιμετωπίζει άμεσα τους παθογόνους εισβολείς με μαζικό και μη ειδικό τρόπο, χωρίς να εξασφαλίσει μακροχρόνια ανοσία. Εξελικτικά, αποτελεί αρχέγονο αμυντικό σύστημα και συναντάται επίσης στα φυτά, στα έντομα, στους μύκητες και στους κατώτερους πολυκύτταρους οργανισμούς. Η φυσική ανοσία λειτουργεί ως φυσικός και χημικός φραγμός σε μολυσματικούς παράγοντες, προσελκύει τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος στην περιοχή της μόλυνσης μέσω της έκκρισης κυτταροκινών και ενεργοποιεί το σύστημα του συμπληρώματος για την αναγνώριση και την καταστροφή των βακτηρίων. Επίσης ευθύνεται για την απομάκρυνση των νεκρών κυττάρων, την αναγνώριση και απομάκρυνση των ξένων σωμάτων μέσω

ειδικών λεμφοκυττάρων και την παρουσίαση του αντιγόνου στην ειδική ανοσία, όταν χρειάζεται περαιτέρω εξειδικευμένη αντίδραση ή όταν υπάρχουν αντισώματα μνήμης (Cohen B and Parkin J 2001).

Οι αμυντικοί μηχανισμοί της φυσικής ανοσίας περιλαμβάνουν αρχικά τους φυσικούς και χημικούς φραγμούς στην είσοδο των παθογόνων. Η ακεραιότητα του επιθηλίου του δέρματος και των βλεννογόνων αποτελεί έναν αδιαπέραστο φυσικό φραγμό για τα μικρόβια ενώ η απόπτωση των νεκρών επιθηλιακών κυττάρων απομακρύνει τα παθογόνα που έχουν αποικίσει τις επιφάνειες. Η έλλειψη επιφανειακών αιμοφόρων αγγείων, η ξηρότητα της επιδερμίδας και το έκκριμα των σημηματογόνων αδένων του χορίου δημιουργούν ένα δυσμενές περιβάλλον ακατάλληλο για την επιβίωση των μικροβίων. Η έκπλυση των δακρύων και το σάλιο βοηθούν στην πρόληψη της μόλυνσης των οφθαλμών και του στόματος. Οι κινήσεις των κροσσών στον γαστρεντερικό και αναπνευστικό σωλήνα συντελούν στην απομάκρυνση των μολυσματικών παραγόντων και των ξένων σωμάτων. Η βλέννα παγιδεύει μολυσματικούς παράγοντες. Η χλωρίδα του εντέρου αποτρέπει τον αποικισμό των παθογόνων βακτηρίων είτε με την έκκριση τοξικών γι αυτά ουσιών είτε λόγω ανταγωνισμού για τα θρεπτικά συστατικά ή την προσκόλληση στις κυτταρικές επιφάνειες (Γερμενής ΑΕ 2000).

Η φλεγμονώδης αντίδραση είναι η σημαντικότερη λειτουργία της φυσικής ανοσίας. Η φλεγμονή ενεργοποιείται από χημικούς παράγοντες που απελευθερώνονται από τα τραυματισμένα κύτταρα και η λειτουργική της αποστολή είναι να εμποδίσει την εξάπλωση της λοίμωξης, να απομακρύνει τα παθογόνα και κινητοποιήσει τους μηχανισμούς επούλωσης των κατεστραμμένων ιστών. Στην οξεία φάση της φλεγμονής τα μακροφάγα, τα δενδριτικά κύτταρα, τα ιστιοκύτταρα και τα μαστοκύτταρα αναλαμβάνουν να «παρουσιάσουν» τον παθογόνο εισβολέα στο ανοσοποιητικό σύστημα. Τα κύτταρα διαθέτουν υποδοχείς, οι οποίοι ονομάζονται υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων-Pattern Recognition Receptors (PRRs), που αναγνωρίζουν τα εξωτερικά παθογόνα-Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMPs) και στη συνέχεια απελευθερώνονται φλεγμονώδεις μεσολαβητές, οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την εκδήλωση των κλινικών σημείων της φλεγμονής. Οι χημικοί αυτοί διαμεσολαβητές (ισταμίνη, βραδυκινίνη, σεροτονίνη, λευκοτριένια και προσταγλανδίνες) ευαισθητοποιούν τους υποδοχείς του πόνου, προκαλούν τοπική αγγειοδιαστολή των αιμοφόρων αγγείων και προσελκύουν φαγοκύτταρα, κυρίως τα ουδετερόφιλα. Τα ουδετερόφιλα ενεργοποιούν στη συνέχεια άλλα μέρη του ανοσοποιητικού συστήματος και προσελκύουν και τις υπόλοιπες κατηγορίες λευκοκυττάρων όπως τα λεμφοκύτταρα. Συνοψίζοντας, τα κλινικά σημεία της φλεγμονής, που πρώτος είχε περιγράψει ο Virchow είναι η ερυθρότητα λόγω τοπικής αύξησης της κυκλοφορίας του αίματος, η θερμότητα, είτε ως αυξημένη τοπική θερμοκρασία είτε ως πυρετός, το οίδημα των προσβεβλημένων ιστών, ο πόνος και η πιθανή δυσλειτουργία των εμπλεκόμενων ιστών ή οργάνων (Kumar R et al 2004).

Το σύστημα του συμπληρώματος είναι σύστημα πρωτεϊνών του πλάσματος, το οποίο διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στα πλαίσια της φυσικής ανοσίας, δρώντας επικουρικά στην ικανότητα των αντισωμάτων να καταστρέφουν τα παθογόνα. Περιλαμβάνει πάνω από 30 πρωτεΐνες (πεπτίδια) που αντιστοιχούν στο 5% των σφαιρινών του αίματος. Από τις πρωτεΐνες του συμπληρώματος σημαντικότερες είναι 9, οι οποίες συμβολίζονται με το γράμμα C και αριθμούνται από C1 ως C9 (Varela JC and Tomlinson S 2015). Τα συστατικά του συμπληρώματος κυκλοφορούν στον ορό ως ανενεργά προένζυμα (ζυμογόνα), μέχρι την ενεργοποίησή τους. Τα βακτήρια διαθέτουν στην επιφάνειά τους μόρια τα οποία ενεργοποιούν το σύστημα συμπληρώματος, οδηγώντας σε ένα «καταρράκτη» χημικών αντιδράσεων και αλληλεπιδράσεων, οι οποίες δύνανται να επιτελέσουν σημαντικές λειτουργίες μεταξύ των οποίων: 1. Άμεση καταστροφή κυρίως Gram(-) βακτηρίων, μέσω της δημιουργίας πόρων στην κυτταρική τους μεμβράνη 2. Οψωνοποίηση και φαγοκυττάρωση βακτηρίων 3. Ενεργοποίηση φλεγμονής 4. Αδρανοποίηση μολυσματικότητας ιών 5. Κάθαρση των ανοσοσυμπλεγμάτων (Sarma JV and Ward PA 2011). Το σύστημα του συμπληρώματος διαθέτει τρεις οδούς δράσης την κύρια, την εναλλακτική και την οδό της λεκτίνης (Γερμενής ΑΕ 2000).

Τα φλεγμονώδη κύτταρα της φυσικής ανοσίας προέρχονται από τα πολυδύναμα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα του μυελού των οστών. Τα σημαντικότερα κύτταρα που εμπλέκονται στους μηχανισμούς της φυσικής ανοσίας είναι τα κύτταρα φυσικοί φονιάδες-Natural Killer cells-(NK-cells), τα δενδριτικά κύτταρα, τα μαστοκύτταρα, ηωσινόφιλα, βασεόφιλα και τα φαγοκύτταρα (μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα). Τα κύτταρα αυτά συμβάλλουν στην εμφάνιση των φαινομένων της φλεγμονής, συμμετέχουν στις επουλωτικές διαδικασίες των ιστών, εμπλέκονται στα φαινόμενα της αλλεργίας και τις αναφυλλακτικές αντιδράσεις. Τα μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα μαζί με τα Β λεμφοκύτταρα ανήκουν στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα-Antigen-Presenting Cells (APCs) διότι αναγνωρίζουν τα ξένα σώματα, τα κατεστραμμένα κύτταρα ή τους παθογόνους μικροοργανισμούς και με διάφορους τρόπους (όπως έκκριση ουσιών, φαγοκυττάρωση, παρουσίαση στην ειδική ανοσία για την σύνθεση αντισωμάτων) φροντίζουν για την εξουδετέρωσή τους (Abbas AK et al 2016).

2.3 Ο ρόλος της φυσικής ανοσίας στον καρκίνο

Η σύγχρονη έρευνα των μοριακών μηχανισμών της καρκινογένεσης έχει αναγνωρίσει την αλληλεπίδραση μεταξύ των καρκινικών κυττάρων και των συστατικών του υποστρώματος ενός όγκου. Σε πρόδρομα στάδια της καρκινογένεσης τα NK κύτταρα, τα πολυμορφοπύρρηνα και τα μακροφάγα ενεργοποιούνται για την αναχαίτιση της νεοπλασίας (Thomas JA and Badini M 2011). Επίσης τα κύτταρα του όγκου φαίνεται ότι ενεργοποιούν το σύστημα του συμπληρώματος με ενδείξεις

θανάτωσης των νεοπλασματικών κυττάρων μέσω κυτταροτοξικότητας από τη δράση του συμπληρώματος (Mamidi S et al 2017).

Σε μεταγενέστερα στάδια η χρόνια φλεγμονή και το σύστημα του συμπληρώματος, που αποτελούν τα σημαντικότερα σκέλη της φυσικής ανοσίας, θεωρείται ότι δημιουργούν ευνοϊκές συνθήκες για την επιβίωση των νεοπλασματικών κυττάρων, ενισχύοντας τη διαδικασία της καρκινογένεσης και μετάστασης (Balkwill F et al 2005, Hanna E et al 2009, Mamidi S et al, 2017). Το επιχείρημα αυτό ενισχύεται και από τις κλινικές μελέτες όπου οι χορήγηση αναστολέων της κυκλοοξυγενάσης-2 (COX-2), οι οποίοι καταστέλλουν τη φλεγμονώδη αντίδραση, συσχετίζεται με καλύτερη πρόγνωση σε καρκίνους του εντέρου (Chan AT et al 2007) και του καρκίνου του στόματος (Wang Z 2005).

Η φλεγμονώδης αντίδραση χρόνιου τύπου εμπλέκεται σε αρκετά είδη καρκίνου κυρίως σε αυτούς που έχουν σχετίζονται με λοιμογόνους παράγοντες, αυτοάνοσες παθήσεις ή φυσικά και χημικά αίτια. Στο καρκίνο του παχέος εντέρου το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού (*Helicobacter pylori*), στο καρκίνο του ήπατος ο ιός της ηπατίτιδας C, στο καρκίνο της μήτρας και του στοματοφάρυγγα ο ιός HPV ενεργοποιούν το σκέλος της φυσικής ανοσίας και εγείρουν φλεγμονώδη αντίδραση για την αναχαίτιση του λοιμογόνου παράγοντα, η οποία όμως συνεπικουρεί στην ανάπτυξη των κακοήθων νεοπλασμάτων (Thomas JA and Badini M 2011, Hagerling C et al 2015). Τα νεοπλασματικά κύτταρα εκκρίνουν φλεγμονώδεις κυτταροκίνες όπως τον παράγοντα νέκρωσης των όγκων-Tumor necrosis factor (TNF) και την ιντερλευκίνη -1 - Interleukin-1 (IL-1), που τροποποιούν το μικροπεριβάλλον του όγκου, διευκολύνοντας τη διήθηση και τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων, όπως έχει αποδειχτεί στον καρκίνο κεφαλής και του τραχήλου (Chen Z et al 1999).

Η χρόνια φλεγμονώδης αντίδραση, η οποία παρατηρείται στα αυτοάνοσες αιτιολογίας νοσήματα όπως στην ελκώδη κολίτιδα οδηγεί στην έκκριση κυτταροκινών που σχετίζονται περισσότερο με την ανάπτυξη των νεοπλασμάτων σε σχέση με αυτές που εκκρίνονται στην οξεία φλεγμονή (Arnott CH et al 2002, Hagerling C et al 2015). Επίσης στο σύνδρομο Sjögren μια αυτοάνοσες αιτιολογίας νόσο, όπου η χρόνια φλεγμονή καταστρέφει το παρέγχυμα των σιελογόνων αδένων, αναπτύσσεται το λέμφωμα τύπου MALT αναδεικνύοντας τον ογκογενετικό της ρόλο (Mandovani A et al 2008).

Έχει παρατηρηθεί ότι τα CD8+ T λεμφοκύτταρα στρέφονται εναντίων των αντιγόνων που σχετίζονται με όγκους, δημιουργώντας νέες θεραπευτικές διεξόδους στην αντιμετώπιση του καρκίνου, μέσω της ενεργοποίησης των μηχανισμών της φυσικής ανοσίας. Η χρήση ανοσοθεραπευτικών φαρμάκων τα οποία αναστέλλουν τη σύνδεση της PD-1 / PD-L1 παρουσιάζει εντυπωσιακά κλινικά αποτελέσματα (Pai SI et al 2016). Η μελέτη των μηχανισμών της φυσικής ανοσίας που πυροδοτούν την ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων θα συμβάλει αποφασιστικά στην

βελτιστοποίηση των εφαρμοζόμενων θεραπευτικών τεχνικών. Η αναγνώριση από κύτταρα της φυσικής ανοσίας (όπως NK κύτταρα, δενδριτικά κύτταρα και μακροφάγα) των Damage Associated Molecular Patterns-DAMPs τα οποία προέρχονται από το DNA των νεοπλασματικών κυττάρων, οδηγεί σε ενεργοποίηση του μονοπατιού STING και μέσω αυτού την παραγωγή ιντερφερονών-Interferons (IFNs) με αντιογκογόνα δράση (Cui J et al 2014, Woo SR et al 2015).

2.4 Η θεωρία του κινδύνου

Η λειτουργική αποστολή του ανοσοποιητικού συστήματος είναι πολυδιάστατη στα πλαίσια της αναγκαιότητας ανταπόκρισής του στους ποικίλους εξωγενείς και ενδογενείς παράγοντες κινδύνου, που διαταράσσουν την ομοιοστασία του οργανισμού. Το ανοσοποιητικό σύστημα διαθέτει ποικίλους μηχανισμούς ανοσοαπόκρισης και η αντίδρασή του στα διάφορα βλαπτικά ερεθίσματα δεν είναι ενιαία. Με σκοπό να εξηγηθούν οι διαφορετικές αντιδράσεις του ανοσοποιητικού συστήματος σε καταστάσεις όπως λοιμώξεις, νεοπλασίες, φαινόμενα υπερευαισθησίας, αυτοάνοσα νοσήματα, απόρριψη μοσχευμάτων και πρόωρη απόρριψη εμβρύων και ως μετεξέλιξη των προηγούμενων θεωριών, το 1994 η Matzinger P διατύπωσε τη «Θεωρία του Κινδύνου».

Με βάση τη «Θεωρία του Κινδύνου», το ανοσοποιητικό σύστημα ενεργοποιείται αρχικά με το σκέλος της φυσικής ανοσίας, τόσο από εξωγενή όσο και από ενδογενή «σήματα κινδύνου», τα οποία δεν παρουσιάζουν καμία ειδικότητα, όπως οι συνδέτες των αντισωμάτων. Τα εξωγενή σήματα κινδύνου ονομάζονται Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMPs) και αποτελούν μοριακές δομές, κοινές, σε αρκετές ομάδες μικροοργανισμών. Τα PAMPs αντιπροσωπεύουν οντογενετικά διατηρημένα μοριακά πρότυπα της επιφάνειας των μικροβίων ή προϊόντα του μεταβολισμού τους, χωρίς αντιγονική μεταβλητότητα, τα οποία είναι απαραίτητα για την επιβίωση ή τη λοιμογόνο δράση τους. Παράλληλα, το ανοσοποιητικό σύστημα δέχεται και ενδογενή, ιστικά σήματα κινδύνου, τα οποία ονομάζονται Damage Associated Molecular Patterns (DAMPs), προερχόμενα από κύτταρα των ιστών που βρίσκονται σε συνθήκες στρες, έχουν υποστεί τραυματισμό ή βρίσκονται σε κατάσταση νεοπλασματικής εκτροπής. Παραδείγματα DAMPs είναι οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ όπως η HMGB1 και πρωτεΐνες που προέρχονται από το εξωκυττάριο στρώμα και εκκρίνονται στις περιπτώσεις ιστικής καταστροφής, όπως θραύσματα υαλουρονικού οξέως. Επίσης ως DAMPs, μπορούν να λειτουργήσουν θραύσματα DNA ή RNA, η πρωτεΐνη S100 και μεταβολίτες πουρινών (Matzinger P 1994).

2.5 Οι υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων-Pattern Recognition Receptors (PRRs)

Η ανίχνευση των PAMPs και DAMPs πραγματοποιείται μέσω των υποδοχέων αναγνώρισης προτύπων-Pattern Recognition Receptors (PRRs), οι οποίοι αποτελούν τους «αισθητήρες» της φυσικής ανοσίας και είναι απαραίτητοι για την επικοινωνία με το εξωτερικό περιβάλλον και το εσωτερικού του οργανισμού (Thompson MR et al 2011). Οι PRRs εκφράζονται στην επιφάνεια ή σε ενδοκυττάρια διαμερίσματα των κυττάρων της φυσικής ανοσίας (κυτταρικοί PRRs) ή εκκρίνονται στο αίμα και τα υγρά των ιστών (διαλυτοί PRRs). Οι διαλυτοί PRRs παράγονται στο ήπαρ, ανήκουν στις πρωτεΐνες οξείας φάσεως και περιλαμβάνουν τις κολλεξίνες (πχ. λεκτίνη), τις πενταξίνες (πχ. C-αντιδρώσα πρωτεΐνη-CRP), παράγοντες του συμπληρώματος (πχ. C3), την πρωτεΐνη LBP που συνδέεται με τον λιποπολυσακχαρίτη (LPS) και τον διαλυτό υποδοχέα CD14 (Σκένδρος Π 2008, Takeuchi O and Akira S 2010).

Η αλληλεπίδραση των διαφόρων συνδετών με τους PRRs έχει σαν αποτέλεσμα: α) την ενεργοποίηση μηχανισμών πήξης μέσω της παραγωγής των ενδοθηλιακών μορίων προσκόλλησης (όπως τα ICAM-1, VCAM-1 και σελεκτίνη E), β) την κινητοποίηση των μηχανισμών της φλεγμονής μέσω της σύνθεσης κυτταροκινών (όπως TNF-α, IL-1 και IL-12) και χημειοκινών (όπως RANTES, MIP-1, CCL2, CCL3, CCL4 και CXCL8), γ) την οργάνωση της πρώιμης ανοσιακής απάντησης μέσω της ενεργοποίησης των οδών του συμπληρώματος, της οψωνοποίησης και της φαγοκυττάρωσης δ) την παραγωγή ιντερφερονών τύπου I (IFN-α και IFN-β) και ε) την ενεργοποίηση των τύπων Th1 και Th2 της ειδικής ανοσιακής απάντησης μέσω της παραγωγής των IL-12 και IL-10 (Σκένδρος Π 2008).

Οι PRRs ταξινομούνται σε αυτούς που επάγουν σηματοδότηση (signaling PRRs) και αυτούς που σχετίζονται με την ενδοκυττάρωση (endocytic PRRs). Στους PRRs ενδοκυττάρωσης, οι οποίοι συμμετέχουν στην αναγνώριση και καταστροφή των παθογόνων μικροοργανισμών από τα φαγοκύτταρα και στην κάθαρση των αποπτωτικών κυττάρων, ανήκουν οι υποδοχείς τύπου C λεκτινών (C-type Lectin Receptors-CLRs) και οι υποδοχείς καθαριστές (Scavenger Receptors-SRs). Στους σηματοδοτικούς PRRs ανήκουν οι NOD (Nucleotide-binding Oligomerization Domain) υποδοχείς, οι NOD τύπου υποδοχείς (NOD like receptors-NLRs), οι RIG (Retinoid acid-Inducible Gene) υποδοχείς, οι RIG τύπου υποδοχείς (RIG like receptors, RLRs), οι τύπου RIG ελικάσες και η οικογένεια των Toll τύπου υποδοχέων (Toll Like Receptors-TLRs) η οποία έχει μελετηθεί πιο επισταμένα (Thompson MR et al 2011, Takeuchi O and Akira S 2010).

2.6 Οι υποδοχείς Toll-Like Receptors (TLRs)

Οι υποδοχείς Toll-Like Receptors-TLRs είναι διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες τύπου I και ανήκουν στην υπεροικογένεια των PRRs. Ανακαλύφθηκαν για πρώτη φορά

στη *Drosophila melanogaster* και ονομάστηκαν Toll υποδοχείς. Με βάση την ομολογία των γονιδίων διαπιστώθηκε η παρουσία τους και στο ανθρώπινο γονιδίωμα όπου ονομάστηκαν Toll-Like-Receptors (TLRs) (Medzhitov R et al 1997). Στον άνθρωπο έχουν αναγνωριστεί δέκα διαφορετικοί TLRs (TLR1-10), ενώ στα ποντίκια δώδεκα (TLR1-9 και TLR11-13). Οι TLRs διαθέτουν μια εξωκυττάρια περιοχή, υπεύθυνη για την αναγνώριση των PAMPs και DAMPs, η οποία φέρει επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες πλούσιες σε λευκίνη (Leukine Rich Repeat- LRR). Το διαμεμβρανικό τμήμα είναι βραχύ ενώ η κυτταροπλασματική περιοχή είναι γνωστή ως «Toll/IL-1 Receptor» (TIR) καθώς παρουσιάζει μεγάλη ομολογία με την οικογένεια του υποδοχέα της ιντερλευκίνης IL-1. Η αλληλεπίδραση του συνδέτη με τον αντίστοιχο TLR προκαλεί ολιγομερισμό του υποδοχέα και οδηγεί στην ενεργοποίηση των ενδοκυτταρικών οδών μεταγωγής σημάτων (O'Neill LA et al 2013, De Nardo D 2015).

Οι πιο σημαντικοί τύποι κυττάρων που εκφράζουν τους TLRs είναι τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (Antigen Presenting Cells-APCs) και ειδικότερα τα δενδριτικά κύτταρα, τα μακροφάγα και τα B λεμφοκύτταρα. Επίσης οι TLRs εκφράζονται σε επιθηλιακά και ενδοθηλιακά κύτταρα καθώς και σε ινοβλάστες. Οι TLR1, 2, 4, 5, 6 και 10 εκφράζονται ως υποδοχείς στην επιφάνεια των κυττάρων ενώ οι TLR7, 8 και 9 εκφράζονται σχεδόν αποκλειστικά στα ενδοκυτταρικά διαμερίσματα, όπως τα ενδοσώματα και τα λυσοσώματα. Ο TLR3 ανευρίσκεται είτε στην επιφάνεια είτε ενδοκυττάρια ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου (Εικόνα 13). Η αναγνώριση των συνδετών γίνεται είτε με άμεση αλληλεπίδραση με αυτούς είτε με τη μεσολάβηση εξωκυττάρια πρωτεϊνών. Για παράδειγμα οι TLR1/2, 3 και 9 δεσμεύουν άμεσα δίκλωνο RNA (dsRNA) και DNA ενώ ο TLR4 αναγνωρίζει τον λιποπολυσακχαρίτη (LPS) μέσω της εξωκυττάριας βοηθητικής πρωτεΐνης MD-2 (Thompson MR et al 2011, O'Neill LA et al 2013).

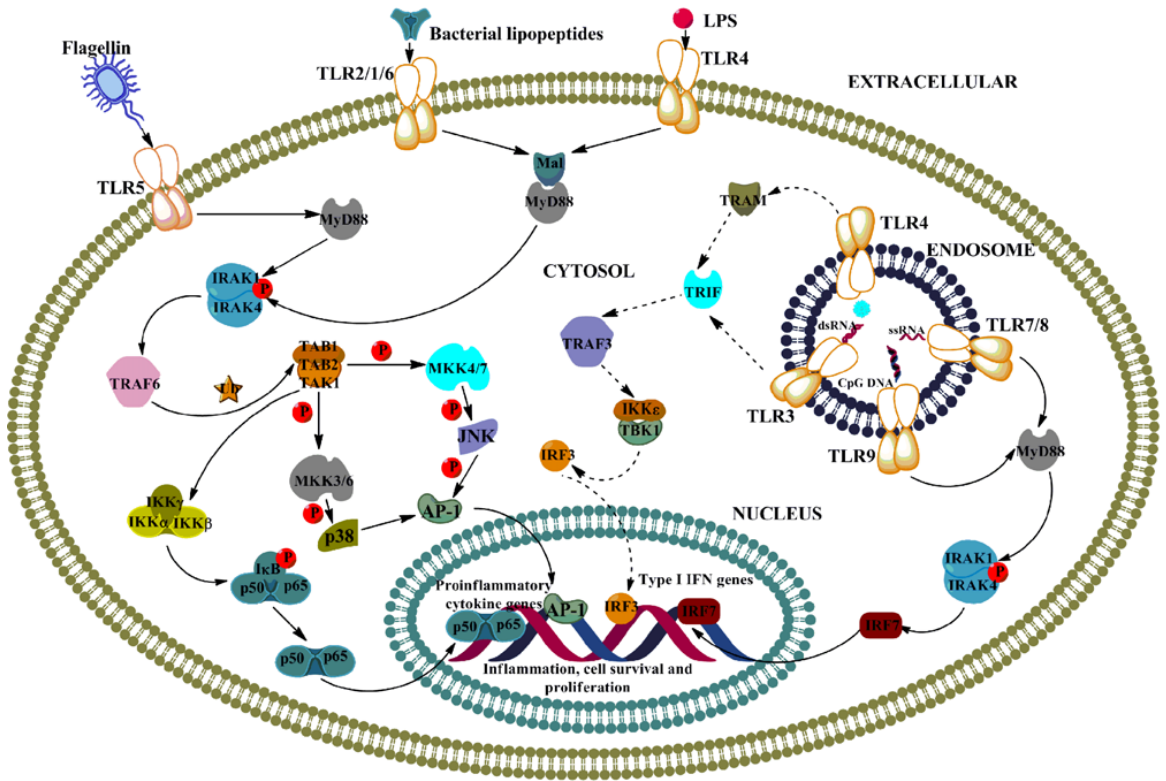
Οι TLRs αναγνωρίζουν διαφορετικά είδη PAMPs προκαλώντας φλεγμονώδη αντίδραση. Ο TLR4 αναγνωρίζει κυρίως Gram-αρνητικά βακτήρια μέσω του λιπιδίου A του λιποπολυσακχαρίτη (LPS), ο TLR2 λιποτεichoϊκά οξέα, λιποπρωτεΐνες και την πεπτιδογλυκάνη των Gram θετικών βακτηρίων. Ωστόσο, τα περισσότερα Gram θετικά και αρνητικά βακτήρια μπορούν να ενεργοποιήσουν και άλλους TLRs μέσω εναλλακτικών PAMPs που απαντώνται επιφανειακά ή ενδοκυττάρια. Ο TLR5 είναι υπεύθυνος για την αναγνώριση της πρωτεΐνης μαστιγίνης, η οποία είναι συστατικό των νηματίων των μαστιγίων των βακτηρίων. Ο TLR3 αναγνωρίζει κυρίως ιούς μέσω της δέσμησης του δίκλωνου RNA (dsRNA), το οποίο είναι είτε παραπροϊόν της μεταγραφής των DNA ιικών γονιδιωμάτων, είτε ενδιάμεσο στην ιική σύνθεση του RNA. Οι TLR7 και 8 ενεργοποιούνται από μονόκλωνο RNA (ssRNA). Τέλος, ο TLR9 είναι υπεύθυνος για την ανίχνευση του ιικού και βακτηριακού DNA που φέρει μη μεθυλιωμένες CpG αλληλουχίες (Ioannou S and Voulgarelis M 2010, De Nardo D, 2015).

2.7 Η μοριακή οδός των TLRs

Όλοι οι TLRs εκτός από τον TLR3, μετά τη σύνδεσή τους με τα PAMPs ή DAMPs αλληλεπιδρούν αρχικά με την πρωτεΐνη MyD88 (Myeloid Differentiation Factor 88) και η μοριακή οδός που ενεργοποιείται ονομάζεται **MyD88-εξαρτώμενη οδός**. Η MyD88 στη συνέχεια αλληλεπιδρά με την TIR ενδοκυττάρια περιοχή του TLR ενεργοποιώντας κινάσες σερίνης-θρεονίνης που ονομάζονται IRAKs (IL-1 Receptor-Associated Kinases). Αρχικά, η IRAK4 φωσφορυλιώνει την κινάση IRAK1 και από κοινού ενεργοποιείται ο TRAF6 (Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor 6), ο οποίος σχηματίζει σύμπλοκο με τα ένζυμα UEV1A και UBC13 και εν συνεχεία ενεργοποιεί άλλες κινάσες τις IKKs (inhibitory kappa B kinases). Η φωσφορυλίωση του IKK συμπλόκου προκαλεί τη φωσφορυλίωση της IκB κινάσης, η οποία αποικοδομείται και απελευθερώνει τον μεταγραφικό παράγοντα NF-κB. Ο NF-κB μετατοπίζεται από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα, όπου επάγει την έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, όπως οι TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-8 και IL-12. Άλλη σημαντική οδός που ενεργοποιείται μέσω της παραπάνω διαδικασίας είναι το μονοπάτι MAPKs (Mitogen Activated Protein Kinases). Παράλληλα η ενεργοποίηση των TLR7, 8 και 9 μέσω του MyD88-εξαρτώμενου μονοπατιού οδηγεί στην παραγωγή των μεταγραφικών παραγόντων IRF3 και IRF7 (Interferon Regulatory Factors 3 and 7), που επάγουν την σύνθεση των ιντερφερονών τύπου I (IFN-α και IFN-β) (Εικόνα 13) (O'Neill LA et al 2013, De Nardo D 2015).

Ο TLR3 αποκλειστικά αλλά και ο TLR4 σε ορισμένες περιπτώσεις, ενεργοποιούνται μέσω μιας άλλης οδού γνωστής ως **MyD88-ανεξάρτητης οδού**, η οποία χρησιμοποιεί μόνο το μόριο TRIF (TIR domain-containing Adapter Protein inducing IFN-β) για τη σύνθεση της IFN-β μέσω του μεταγραφικού παράγοντα IRF3. Από την ίδια οδό σε μικρό βαθμό μπορεί να ενεργοποιηθεί και ο NF-κB (Εικόνα 13). Άλλη οδός που διασταυρώνεται με το μονοπάτι των TLRs είναι η οδός των κινασών JNK (Jun N-terminal Kinase). Επίσης τα μόρια TIRAP (TIR domain-containing Adapter Protein) ή MAL (MyD88 Adapter Like), TRIF, TRAM (TRIF-related Adapter Molecule) και SARM εμπλέκονται με διαφορετικό τρόπο στις διάφορες οδούς των TLRs αναλόγως των μεταβολικών απαιτήσεων του κυττάρου. Για παράδειγμα το μόριο MAL συμμετέχει στην ενεργοποίηση του NF-κB μέσω των υποδοχέων TLR2 και 4 (Akira S et al 2003). Συνεπώς, κάθε υποδοχέας TLR επιστρατεύει ένα συγκεκριμένο συνδυασμό μεταγραφικών παραγόντων ώστε να παραχθούν οι απαιτούμενες ανοσολογικές αντιδράσεις (Zhang Z et al 2017).

Στα πλαίσια της διατήρησης της ομοιοστασίας διάφοροι παράγοντες όπως οι SIGIRR, RP105, STL2 κα. αλλά και οι αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες TGFβ και IL-10 καταστέλλουν την ενεργοποίηση των TLRs (αρνητική ρύθμιση) για να αποφευχθούν υπέρμετρες σε μέγεθος και διάρκεια ανοσολογικές αντιδράσεις. Σε περιπτώσεις σήψης, αθηροσκλήρωσης ή του συστηματικού ερυθρηματώδη λύκου παρατηρείται καταστολή των μηχανισμών αρνητικής ρύθμισης (Hodgkinson CP 2011).



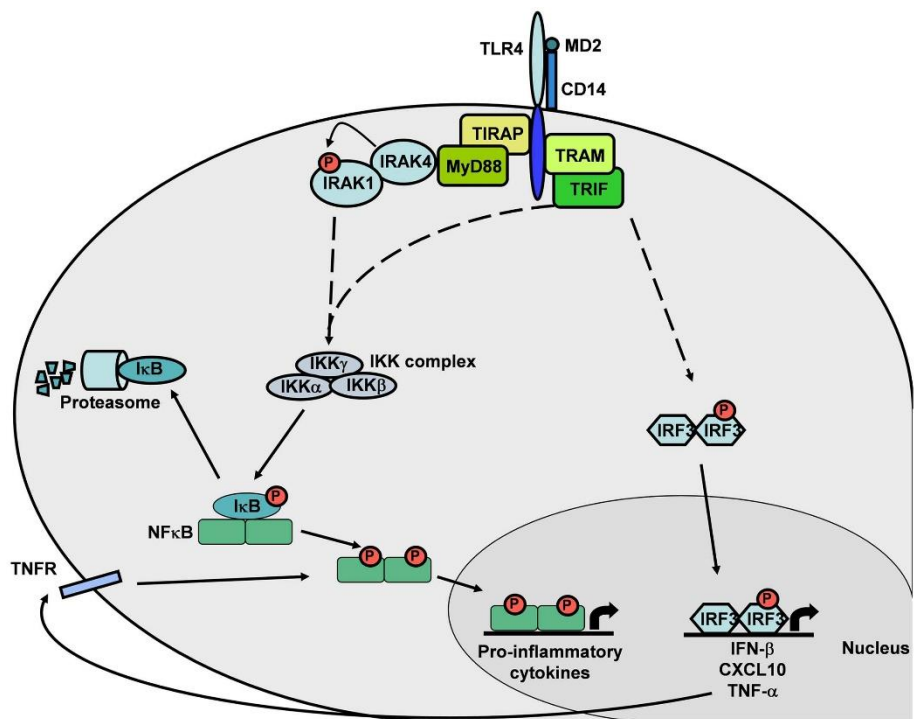
Εικόνα 13: Η μοριακή οδός των TLRs. Διακρίνονται οι τοπογραφική κατανομή των διαφόρων υποδοχών, τα είδη των συνδετών τους και τα κατιόντα προϊόντα της οδού (Basith S et al 2012)

2.8 Ο υποδοχέας TLR4

Ο υποδοχέας TLR4 είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη, η οποία στον άνθρωπο κωδικοποιείται από γονίδιο που εδράζεται στο χρωμόσωμα 9 και έχει μοριακό βάρος 95kDa. Ανήκει στην οικογένεια των TLRs και στην ευρύτερη υπερ-οικογένεια των PRRs. Ο TLR4 αναγνωρίζει PAMPs όπως τους λιποπολυσακχαρίτες (LPS) των Gram-αρνητικών βακτηρίων, αλλά και ανάλογες δομές σε Gram-θετικά βακτήρια καθώς και ιϊκές πρωτεΐνες. Έχει βρεθεί ότι σε ιογενείς λοιμώξεις οφειλόμενες στον ιό HPV, ο υποδοχέας TLR4 αναγνωρίζει τα ιϊκά σωματίδια των HPV 6,11,16 μέσω του υποδοχέα της θειικής ηπαρίνης και οδηγεί στην ενεργοποίηση του NF-κB (Zhou Q et al 2013). Επίσης ο TLR4 αναγνωρίζει και DAMPs στα οποία ανήκουν ενδογενείς πρωτεΐνες όπως λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας και πρωτεΐνες θερμικού σοκ. Μετά την

ενεργοποίηση του υποδοχέα κινητοποιούνται οι μηχανισμοί της φυσικής ανοσίας που οδηγούν στην εξουδετέρωση των παθογόνων και στην προσπάθεια επιδιόρθωσης των ιστικών βλαβών (Vaure C and Liu Y 2014).

Ο TLR4 διαθέτει ένα εξωκυττάριο τμήμα πλούσιο σε λευκίνη (Leucine-Rich Repeat domain-LRR) και μια ενδοκυττάρια περιοχή που παρουσιάζει ομολογία με τον υποδοχέα της ιντελευκίνης - IL1 (TIR). Η δέσμευση ενός εξωκυττάριου σήματος PAMP ή DAMP γίνεται με τη βοήθεια συμπλόκου που σχηματίζει ο TLR4 με την πρωτεΐνη MD2. Στη συνέχεια οι μεταβολές στη στεροδιαμόρφωση του υποδοχέα έχουν σαν αποτέλεσμα τη ενεργοποίηση του ενδοκυττάριου TIR τμήματος με τη βοήθεια πρωτεϊνικών μορίων προσαρμογών και την εκκίνηση δύο διαφορετικών μοριακών μονοπατιών στο εσωτερικό του κυττάρου, της MyD88-εξαρτώμενης οδού ή της MyD88-ανεξάρτητης οδού (Lu YC et al 2008) (Εικόνα 14).



Εικόνα 14: Η μοριακή οδός του TLR4. Διακρίνονται η MyD88-εξαρτώμενη οδός που οδηγεί στην ενεργοποίηση του NF-κΒ και η MyD88-ανεξάρτητη οδός που οδηγεί στην ενεργοποίηση του NF-κΒ ή της IFN-β (Vaure C and Liu Y 2014)

Η MyD88-εξαρτώμενη οδός ρυθμίζεται από το σύμπλοκο δύο πρωτεϊνών των MyD88 και TIR Domain-Containing Adaptor Protein (TIRAP). Το σύμπλοκο TIRAP-MyD88 αλληλεπιδρά με το TIR τμήμα του TLR4 και οδηγεί την πρώιμη ενεργοποίηση του NF-κΒ και την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών (Vaure C and Liu Y

2014). Ειδικότερα ο ενεργοποιημένος TIR προκαλεί την ενεργοποίηση των IRAKs και του μορίου TRAF6. Ο TRAF6 επάγει την ενεργοποίηση του μορίου TAK1 (Transforming growth factor- β -Activated Kinase 1), το οποίο οδηγεί στην ενεργοποίηση του μονοπατιού MAPK και τη φωσφορυλίωση της κινάσης I κ B. Η φωσφορυλίωση της κινάσης I κ B «ξεμπλοκάρει» την ανενεργή μορφή του NF- κ B και τον οδηγεί από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα, ενώ η ενεργοποίηση του μονοπατιού MAPK ενεργοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα AP-1. Τελικό αποτέλεσμα είναι η επαγωγή της έκφρασης των προφλεγμονωδών κυτταροκινών όπως η IL-12 (Lu YC et al 2008). Η MyD88-ανεξάρτητη οδός ενεργοποιείται από το μόριο TRIF και το σχετιζόμενο με το TRIF μόριο TRAM. Τα δύο αυτά μόρια συνδέονται με τον TIR και ενεργοποιούν τον παράγοντα μεταγραφής IRF3 μέσω του TRAF3. Η ενεργοποίηση του IRF3 επάγει την παραγωγή ιντερφερονών τύπου I (IFN- α και IFN- β) (Vaure C and Liu Y 2014).

Αρνητικός ρυθμιστής της έκφρασης του υποδοχέα TLR4 αποτελεί η πρωτεΐνη προσαρμογέας SARM. Η ενεργοποίηση του SARM μετά από σύνδεση με το TIR αναστέλλει την MyD88-ανεξάρτητη οδό και αποτρέπει την υπερβολική ενεργοποίηση του TLR4 σε σήματα PAMPs και DAMPs, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε βλάβες φλεγμονώδους αιτιολογίας, όπως η σηψαιμία (Lu YC et al 2008).

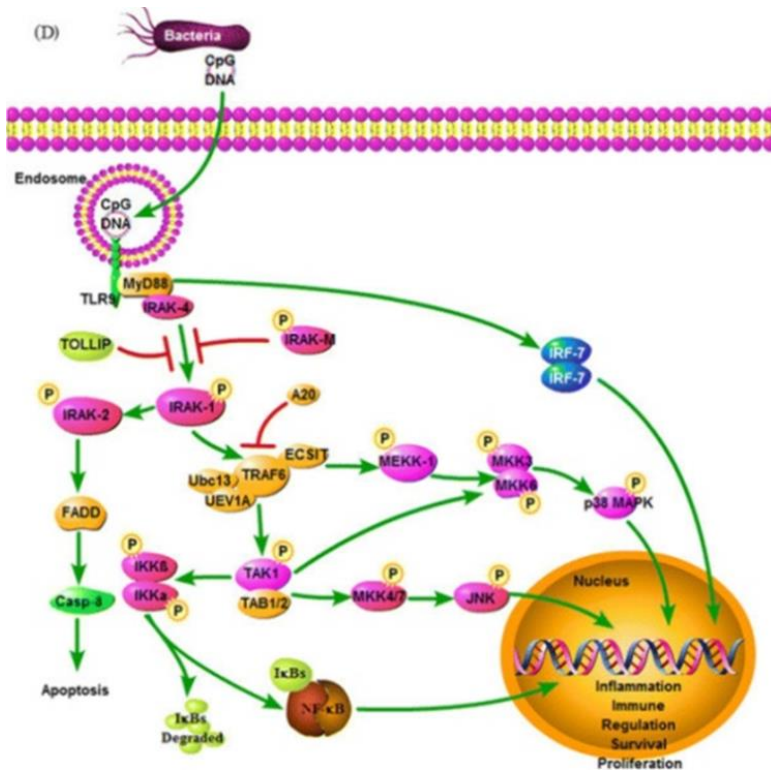
Η έκφραση TLR4 έχει ανιχνευθεί σε πολλά είδη καρκίνων όπως του μαστού, του πνεύμονα, του γαστρεντερικού, του ήπατος και της κεφαλής και τραχήλου. Η ενεργοποίηση των μονοπατιών MAPK και NF- κ B προάγει την καρκινογένεση μέσω της αύξησης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της αναστολής της απόπτωσης και της μετάστασης. Σε αντιδιαστολή, η έκφραση του TLR4 στα φλεγμονώδη κύτταρα του μικροπεριβάλλοντος του όγκου μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή IFN τύπου I, προφλεγμονωδών κυτταροκινών (όπως TNF, IL-1 β , IL-6, IL-18 κ.λπ.) και ανοσοκατασταλτικών κυτταροκινών όπως η IL-10, ενεργοποιώντας αντιογκογόνες διαδικασίες (Korneev KV et al 2017). Στο AKS η έκφραση του TLR4 και του MyD88 έχει συσχετιστεί με την πρόοδο της καρκινογένεσης (Mäkinen LK et al 2016).

2.9 Ο υποδοχέας TLR9

Ο υποδοχέας TLR 9 είναι μέλος της οικογένειας υποδοχέων TLRs και της ευρύτερης υπερ-οικογένειας των PRRs. Κωδικοποιείται από γονίδιο που εδράζεται στο χρωμόσωμα 3. Εκφράζεται κυρίως στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (δενδριτικά κύτταρα, μακροφάγα, και NK κύτταρα) και σε φλεγμονώδη κύτταρα, στα ενδοκυττάρια οργανίδια τους όπως λυσοσώματα και ενδοσώματα. Το TLR9 αναγνωρίζει κυρίως μη μεθυλιωμένα CpG τμήματα βακτηριακού και ιϊκού DNA καθώς και συνθετικά CpG ολιγονουκλεοτίδια (Hemmi H et al 2000). Επίσης ο TLR9 ενεργοποιείται από DAMPs που προέρχονται από ιστικές βλάβες ή καρκινικά κύτταρα (Wagner H 2004, Martínez-Campos C et al 2017).

Ο TLR9 ενεργοποιείται διαμέσω της MyD88-εξαρτώμενης οδού και με τη διαμεσολάβηση των παραγόντων IRF7 και IRF3 οδηγεί κυρίως στην παραγωγή IFNs. IRF7 φωσφωρυλιώνεται από τα μόρια IRAK1, IRAK4 ή IKKα, και μεταναστεύει στον πυρήνα όπου κατευθύνει την παραγωγή IFN-α. Το μόριο IRF3 ενεργοποιείται όταν είναι απαραίτητη η παραγωγή IFN-β (Εικόνα 15) (Kawai Tα et al 2004, Hacker H et al 2006).

Ο υποδοχής TLR9 ενεργοποιείται σε πολλές ιογενείς λοιμώξεις, οδηγώντας στην παραγωγή IFNs τύπου I και συνακόλουθα IL-6, TNF, IFNα και IL-12 με σκοπό την αναχαίτισή τους (Janeway CA and Medzhiton 2002). Σε EBV λοιμώξεις η ενεργοποίηση του TLR9 έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή IFN τύπου I, IL-6 και IL-8 από δενδριτικά κύτταρα-plasmacytoid dendritic cells (pDCs)(Fiola S al 2010). Σε λοιμώξεις από ιούς HSV-1 και HSV-2 έχει παρατηρηθεί παραγωγή IFN-α από pDCs εξαρτώμενη από την ενεργοποίηση του υποδοχέα (Lund J et al 2003, Krug A et al 2004). Σε λοιμώξεις από τον ιό HPV έχει βρεθεί ότι το CpG-DNA τμήμα του HPV16 μπορεί να ενεργοποιήσει τον TLR9 (Zhou Q et al 2013).



Εικόνα 15: Η μοριακή οδός του TLR9 στο εσωτερικό του κυττάρου (Chen Z et al 2015)

Ο υποδοχής TLR9 ενεργοποιείται σε διάφορους τύπους καρκίνου, συχνά από το μικροβίωμα που αποικίζει τους όγκους, με αρχικό στόχο την εξουδετέρωση των παθογόνων. Στην πορεία όμως, η εμπλοκή του TLR9 έχει σαν αποτέλεσμα την προαγωγή της καρκινογένεσης. Για παράδειγμα η διέγερση του TLR9 από ολιγονουκλεοτίδια που περιέχουν CpG ή από βακτηριακό DNA προάγει τη διήθηση νεοπλασματικών κυττάρων που εκφράζουν τον TLR9 (Chang YJ et al 2005, Merrell MA et al 2006). Επιπλέον διάφοροι τύποι καρκίνου όπως ο καρκίνος του πνεύμονα χρησιμοποιούν τη μοριακή οδό του TLR9 για να επιτύχουν τη μετάστασή τους (Ren T et al 2007). Ειδικότερα μελέτες έχουν δείξει ότι υψηλά επίπεδα έκφρασης TLR9 σε ασθενείς με καρκίνο του προστάτη, του μαστού, του πνεύμονα και του γαστρεντερικού σχετίζονται με χειρότερη η πρόγνωση (Ilvesaro JM et al 2007, Jukkola-Vuorinen A et al 2005, Droemann D et al 2005, Schmausser B et al 2005). Σε HPV σχετιζόμενους καρκίνους όπως του τραχήλου της μήτρας, ο ιός καταστέλλει την έκφραση του TLR9 και μέσω αυτής, την έκφραση της IL8 (Martínez-Campos C et al 2017).

Στο AKΣ έχει βρεθεί ότι η αύξηση της έκφρασης του TLR9 που επάγεται από τη σύνδεση με τον προσδέτη CpG-ODN, σχετίζεται με αυξημένο πολλαπλασιασμό των κυττάρων του όγκου προάγοντας τη διήθηση μέσω μεταλλοπρωτεϊνών (MMPs) κυρίως της MMP-2, και του μορίου AP-1 (Ruan M et al 2014). Επίσης σε κυτταρικές σειρές AKΓ έχει βρεθεί ότι η ενεργοποίηση του TLR9 μέσω του προσδέτη του CpG-ODN, προάγει τη διήθηση μέσω της MMP-13 (Kaupilla JH et al 2015).

2.10 Δομή και λειτουργία των ιντερφερονών

Οι ιντερφερόνες (Interferons-IFNs) αποτελούν μια οικογένεια κυτταροκινών, που εκκρίνονται από διάφορα κύτταρα όπως ινοβλάστες, κύτταρα φυσικοί φονείς, λευκά αιμοσφαίρια και επιθηλιακά κύτταρα, ως απάντηση σε βακτήρια, ιούς, παράσιτα και καρκινικά κύτταρα (De Andrea M et al 2002). Διακρίνονται τρεις κύριες ομάδες, ανάλογα με τον υποδοχέα από τον οποίο δεσμεύονται: οι IFNs τύπου I, II και III (Pestka S et al 2014). Οι ιντερφερόνες τύπου I δεσμεύονται από το σύμπλοκο του υποδοχέα IFN- α / β (IFNAR). Παράγονται κυρίως από ινοβλάστες και μονοκύτταρα και στον άνθρωπο διαχωρίζονται στους παρακάτω τύπους: IFN- α , IFN- β , IFN- ϵ , IFN- κ και IFN- ω . Διαθέτουν κυρίως αντιϊκή δράση. Η απελευθέρωσή τους οδηγεί στη ενεργοποίηση μορίων που εμποδίζουν τον ιό να αναπαράγει το DNA ή το RNA του (De Weerd NA et al 2006). Στις ιντερφερόνες τύπου II στον άνθρωπο ανήκει η IFN- γ , η οποία δεσμεύεται στον υποδοχέα IFNGR. Η δράση της ενεργοποιείται από την ιντερλευκίνη IL-10. Εκκρίνεται από τα βοηθητικά T κύτταρα τύπου 1 και αναστέλλει τη δράση των T-helper τύπου 2, επάγοντας τη δράση της Th1 ανοσοαπόκρισης (Cohen B and Parkin J 2001). Οι ιντερφερόνες τύπου III δεσμεύονται σε ένα σύμπλοκο υποδοχέα που αποτελείται από τα διμερή CRF2-4 και CRF2-12. Θεωρείται ότι έχουν αντιϊκές

ιδιότητες και ενεργοποιούν τα μακροφάγα και τα NK κύτταρα (De Andrea M et al 2002).

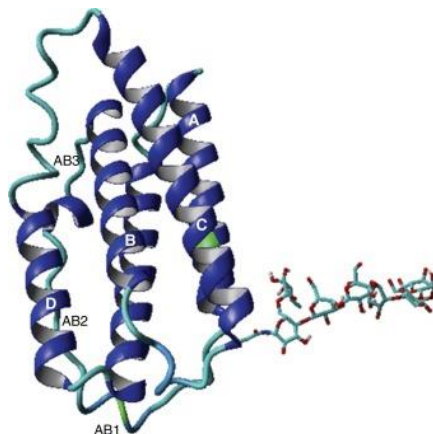
Τα τελευταία χρόνια έχει προταθεί ότι DNA που προέρχεται από κατεστραμμένα ή κύτταρα που βρίσκονται σε πορεία κυτταρικού θανάτου, μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή IFN τύπου I. Επιπλέον η χορήγηση της IFN τύπου I έχει αποδειχθεί πειραματικά ότι επιδρά στο γονίδιο p53 και αναστέλλει την ανάπτυξη όγκων σε πειραματόζωα, ασκώντας προστατευτικό ρόλο έναντι ορισμένων τύπων καρκίνων (Takaoka A et al 2003). Έτσι παράλληλα με τον αντι-ιικό έχει αναγνωριστεί και ο αντι-ογκογόνος ρόλος των IFNs (Fuertes MB et al 2013).

Η παραγωγή των IFN πραγματοποιείται μέσω της ενεργοποίησης των υποδοχέων PRRs και ιδιαίτερα των TLRs, από τα PAMPs ή DAMPs (Hoshino K et al 2002). Οι ιντελευκίνες IL-1, IL-2 και IL-12 καθώς και ο παράγοντας TGF-β αυξάνουν την παραγωγή τους. Οι IFNs με τη σειρά τους ενεργοποιούν σηματοδοτικές οδούς όπως οι JAK-STAT, C3G/Rap1, MAP kinase και PI3K και μέσω αυτών ασκούν την αντιϊκή και αντιογκογόνο δράση τους (Platanias LC 2005).

Από τη μελέτη των παραπάνω μοριακών οδών έχουν αναπτυχθεί οι πολλαπλές θεραπευτικές δράσεις των IFNs. Ασθενείς με ηπατίτιδα Β και C υποβάλλονται σε θεραπεία με IFN-α, σε συνδυασμό με άλλα αντιϊκά φάρμακα, με θεαματικά αποτελέσματα στη μείωση της ηπατικής βλάβης, της κίρρωσης και του κινδύνου ανάπτυξης ηπατοκυτταρικού καρκινώματος (Shepherd J et al 2000, Cooksley WG 2004). Οι IFN-β (1a και 1b) χρησιμοποιούνται για τη μείωση των υποτροπών και την επιβράδυνση της εξέλιξης του αυτοάνοσου νοσήματος της σκλήρυνσης κατά πλάκας (Paolicelli D et al 2009). Επίσης, θεραπεία με IFNs χρησιμοποιείται (σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία και ακτινοβολία) σε λευχαιμίες, λεμφώματα, στον καρκίνο των νεφρών και σε ασθενείς με υποτροπιάζοντα μελανώματα (Gajewski TF and Corrales L 2015).

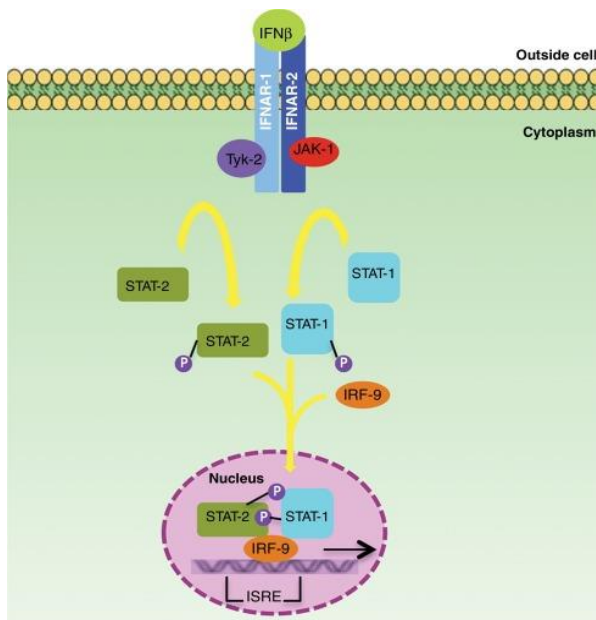
2.11 Δομή και λειτουργία της ιντερφερόνης-β

Η ιντερφερόνη β (IFN-β) είναι μια κυτταροκίνη που ανήκει στην ευρύτερη κατηγορία των ιντεφερονών τύπου I. Διαθέτει δύο μορφές την IFN-β-1a, η οποία παράγεται από τα κύτταρα των θηλαστικών και την IFN-β-1b, η οποία παράγεται από τροποποιημένη μορφή του *E. Coli*. Η κρυσταλλική δομή της IFN-β καταδεικνύει ότι αποτελεί μόριο που συγκροτείται από 5 α-έλικες (Εικόνα 16).



Εικόνα 16: Η κρυσταλλική δομή της IFN-β-1a περιλαμβάνει 5 α-έλικες (Karpusas M et al 1997)

Η IFN-β δύναται να παραχθεί από την ενεργοποίηση των TLRs είτε μέσω της MyD88-ανεξάρτητης οδού (όπως στην περίπτωση του TLR4) είτε μέσω της MyD88-εξαρτώμενης οδού (όπως στην περίπτωση του TLR9) (Vaure C and Liu Y 2014, Chen Z et al 2015). Στη συνέχεια η IFN-β δεσμεύεται στον υποδοχέα των IFNs-I ο οποίος εδράζεται στην επιφάνεια των κυττάρων και αποτελείται δομικά από τις αλυσίδες IFNAR-1 και IFNAR-2. Η δέσμευση της IFN-β ενεργοποιεί τη μοριακή σηματοδοτική οδό JAK-STAT και συνακόλουθα διάφορα κυτταρικά γονίδια όπως φαίνεται στην Εικόνα 17 (Haji Abdolvahab M et al 2016).



Εικόνα 17: Η μοριακή οδός της IFN-β (Haji Abdolvahab M et al 2016)

Η IFN-β εμφανίζει σημαντικές ανοσορυθμιστικές, αντιϊκές, αντιογκογόνες και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Η IFN-β κυρίως επιδρά στα T λεμφοκύτταρα (CD4+, CD8+, CD25+, FOXP3+ και FoxA1+ T ρυθμιστικά κύτταρα (Treg κύτταρα) τροποποιώντας τη δράση τους, ενώ παρεμβαίνει και στην παρουσίαση του αντιγόνου από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (Dhib-Jalbut S and Marks S 2010, McKay FC et al 2013). Κύτταρα μολυσμένα από ιούς μπορούν επίσης να εκκρίνουν IFN-β στα πλαίσια της αντιϊκής δραστηριότητας των IFN τύπου I (Fensterl V and Sen GC 2009). Η αντινεοπλασματική δράση της IFN-β οφείλεται στην επίδραση του μορίου στον κυτταρικό κύκλο, τον πολλαπλασιασμό ή την απόπτωση των κυττάρων και θεωρείται ότι παρουσιάζει μεγαλύτερα αντιπολλαπλασιαστικά αποτελέσματα σε σύγκριση με άλλες IFNs (Reang P et al 2006). Επίσης η IFN-β έχει τη δυνατότητα να περιορίζει την υπερδραστηριότητα των φλεγμονωδών κυττάρων για αυτό και χρησιμοποιείται ευρέως για την αντιμετώπιση της σκλήρυνσης κατά πλάκας, επιβραδύνοντας την εξέλιξη της νόσου μέσω της μείωσης της φλεγμονής των νευρώνων. Υπερδραστηριότητα της IFN-β έχει συσχετιστεί με αυτοάνοσα νοσήματα (Kieseier BC, 2011).

II. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σύμφωνα με τα όσα αναφέρθηκαν στο γενικό μέρος, η φυσική ανοσία ενδέχεται να συμμετέχει στην καρκινογένεση του στοματικού βλεννογόνου μέσω της ενεργοποίησης των υποδοχέων TLR4 και TLR9, και της επακόλουθης έκφρασης κατιόντων προϊόντων των σηματοδοτικών οδών όπου συμμετέχουν, δηλαδή των NF-κΒ που συμβάλει θετικά στην καρκινογένεση, και IFN-β που αντανάκλα την αντιογκογόνο δραστηριότητα του ανοσιακού συστήματος. Η συμμετοχή της φυσικής ανοσίας μπορεί να σχετίζεται με την λοίμωξη από τον ιό HPV.

Σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας είναι η διερεύνηση των μηχανισμών με τους οποίους η φυσική ανοσία συμμετέχει στη νεοπλασματική εκτροπή σε ΑΚΓ, ειδικότερα σε σχέση με την HPV λοίμωξη.

Στόχοι είναι η αξιολόγηση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των μορίων TLR4, TLR9 και κατιόντων προϊόντων των σηματοδοτικών οδών του NF-κΒ και της IFN-β σε 63 ΑΚΓ (α) σε σχέση με δημογραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών, (β) σε σχέση με ιστολογικές παραμέτρους των ΑΚΓ, ειδικότερα τον βαθμό διαφοροποίησης κατά WHO και παραμέτρους του τροποποιημένου συστήματος Anneroth (κατά Bryne) (βαθμός κερατινοποίησης, πυρηνική πλειομορφία, πρότυπο διήθησης, μιτωτική δραστηριότητα και φλεγμονώδης αντίδραση), (γ) συγκριτικά στον καρκινικό βλεννογόνο και στον παρακείμενο μορφολογικά υγιή βλεννογόνο, και (δ) συγκριτικά μεταξύ HPV θετικών και HPV αρνητικών ΑΚΓ.

Η μηδενική υπόθεση είναι πως η ανοσοϊστοχημική έκφραση των μορίων TLR4, TLR9 και κατιόντων προϊόντων των σηματοδοτικών οδών NF-κΒ και IFN-β (α) δεν σχετίζεται με δημογραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών με ΑΚΓ, (β) δεν σχετίζεται με ιστολογικές παραμέτρους των ΑΚΓ, ειδικότερα τον βαθμό διαφοροποίησης κατά WHO και παραμέτρους του τροποποιημένου συστήματος Anneroth (κατά Bryne) (βαθμός κερατινοποίησης, πυρηνική πλειομορφία, πρότυπο διήθησης, μιτωτική δραστηριότητα και φλεγμονώδης αντίδραση), (γ) δεν παρουσιάζει διαφορές στον καρκινικό βλεννογόνο συγκριτικά με τον παρακείμενο φαινοτυπικά υγιή βλεννογόνο, και (δ) δεν παρουσιάζει διαφορές μεταξύ HPV θετικών και HPV αρνητικών ΑΚΓ.

III. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1.1 ΥΛΙΚΟ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Υλικό της μελέτης αποτέλεσαν 63 περιπτώσεις βιοπτικού υλικού γλώσσας από μερικές βιοψίες, με ιστολογικές διαγνώσεις διηθητικών καρκινωμάτων και in situ καρκινωμάτων, προερχόμενες από το αρχείο του Εργαστηρίου της Στοματολογίας της Οδοντιατρικής σχολής Αθηνών, οι οποίες διαγνώστηκαν κατά τα έτη 1993-2011. Όλοι οι ιστοί ήταν εγκιβωτισμένοι σε παραφίνη και περιελάμβαναν επαρκή έκταση καρκινικών ιστών καθώς και παρακείμενου των κυρίως βλαβών μορφολογικά υγιούς βλεννογόνου, σε έκταση τουλάχιστον 3 χιλ. στο ένα περιφερικό όριο.

Από τα παραπεμπτικά των ιστολογικών εκθέσεων καταγράφηκαν τα επιδημιολογικά (ηλικία, φύλο ασθενών) και τα κλινικά δεδομένα των περιπτώσεων της μελέτης. Το σύνολο των βλαβών εντοπιζονταν στο κινητό μέρος (δύο πρόσθια τριτημόρια), στα πλάγια χείλη, στην κοιλιακή και ραχιαία επιφάνεια και την κορυφή της γλώσσας αντίστοιχα. Στο υλικό της μελέτης δεν συμπεριελήφθησαν βλάβες στη βάση της γλώσσας περιοχή που ανήκει ανατομικά στον στοματοφάρυγγα.

Αντιπροσωπευτικές τομές αιματοξυλίνης-ηωσίνης επαναξιολογήθηκαν ανεξάρτητα από δύο ερευνητές (NN,ΑΛ), οι οποίοι έθεσαν την τελική ιστοπαθολογική διάγνωση. Ο βαθμός διαφοροποίησης των καρκινωμάτων προσδιορίστηκε με βάση τα κριτήρια του WHO 2017 (El-Naggar AK et al 2017). Επιπλέον τα διηθητικά καρκινώματα βαθμολογήθηκαν σύμφωνα με το τροποποιημένο σύστημα Anneroth (κατά Bryne), το οποίο αξιολογεί πέντε ανεξάρτητες παραμέτρους (κερατινοποίηση, πυρηνική πλειομορφία, αριθμός μιτώσεων, τύπος διήθησης, φλεγμονή): κάθε παράμετρος έλαβε τιμές από 1-4 και από την άθροιση των τιμών των επιμέρους παραμέτρων προέκυψε ένα συνολικό τελικό άθροισμα (Anneroth et al 1987, Bryne et al 1989).

Το υλικό της μελέτης συμπεριέλαβε:

α. 5 καρκινώματα in situ (Carcinoma in Situ- CIS)

β. 9 πρώιμα διηθητικά καρκινώματα (Superficial invasive carcinoma- SI carcinoma)

γ. 20 υψηλής διαφοροποίησης καρκινώματα (Well differentiated carcinoma-WD carcinoma)

δ. 23 μέτριας διαφοροποίησης καρκινώματα (Moderately differentiated carcinoma-MD carcinoma)

στ. 6 χαμηλής διαφοροποίησης καρκινώματα (Poorly differentiated carcinoma-PD carcinoma)

1.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

1.2.1 Ανοσοϊστοχημεία

Το πρωτόκολλο της ανοσοϊστοχημείας που ακολουθήθηκε περιελάμβανε αρχικά την επίστρωση τομών παραφίνης με βιοπτικό υλικό γλώσσας, πάχους 4 μm, σε αντικειμενοφόρες πλάκες καλυμμένες με poly-Lysine, οι οποίες στη συνέχεια αποπαραφινώθηκαν, εμβαπτίστηκαν σε αιθανόλη 100% και 95% και θερμάνθηκαν για ανάκτηση αντιγόνου σε 0,01 M κιτρικό ρυθμιστικό διάλυμα (C2488, Sigma-Aldrich, St.Louis , MO, Η.Π.Α.) σε φούρνο μικροκυμάτων για 25 λεπτά. Ακολούθως, οι τομές επώαστηκαν σε διάλυμα 0,3% υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) για να παρεμποδιστεί η δράση της ενδογενούς υπεροξειδάσης. Μετά από πλύσεις σε διάλυμα TBS/ Tween 20 pH 7,4 (Sigma) οι τομές επώαστηκαν με τα αντίστοιχα πρωτογενή αντισώματα στις αραιώσεις που φαίνονται στον Πίνακα 5 και σε θερμοκρασία 4°C για μία νύχτα.

Πίνακας 5: Τα πρωτογενή αντισώματα της μελέτης

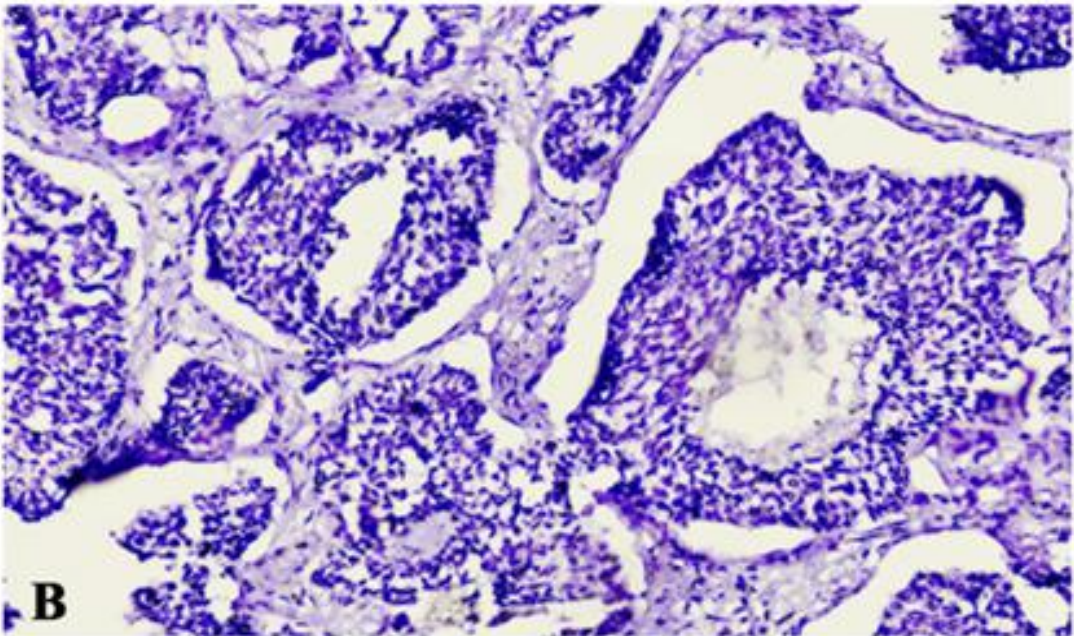
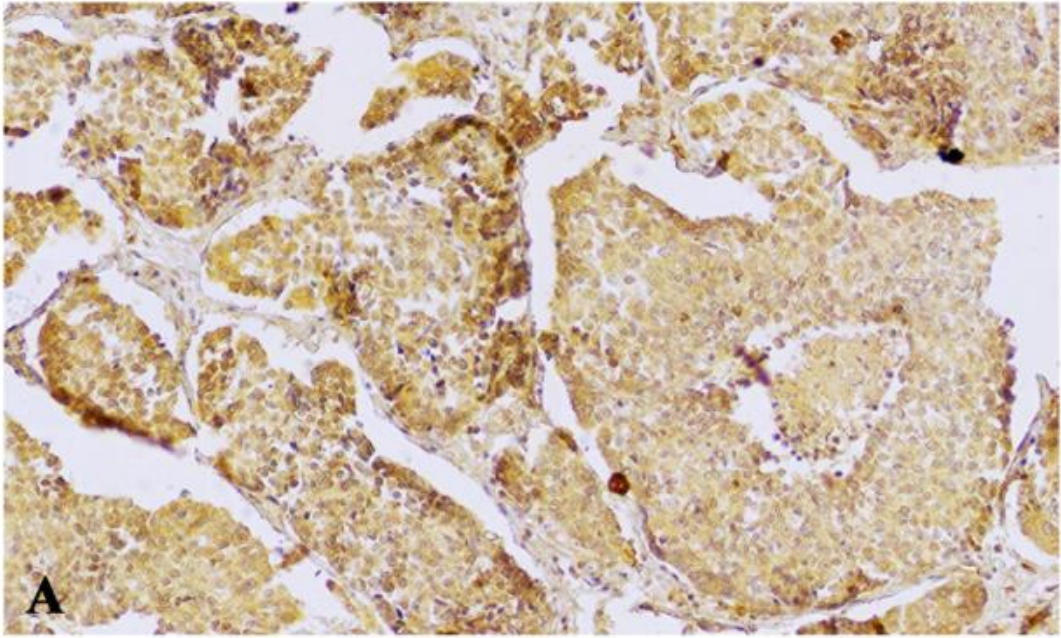
ΑΝΤΙΣΩΜΑ	ΕΤΑΙΡΕΙΑ/ΚΩΔΙΚΟΣ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
p16 ^{INK4a}	Santa Cruz Biotechnology.Inc Minneapolis, MN, USA (50.1) (sc-9968)	Mouse monoclonal anti- human	1:100
TLR4 (H-80)	Santa Cruz Biotechnology Inc. Minneapolis, MN, USA (sc-10741)	Rabbit polyclonal	1:200
TLR9 (H-100)	Santa Cruz Biotechnology Inc. Minneapolis, MN, USA (sc-25468)	Rabbit polyclonal	1:200
NFκB/p65	Thermo Scientific Astmoor Runcorn, Cheshire WA7 1PR, UK (Ab-1 RB-1638-PO)	Rabbit polyclonal	1:200
IFN-β	Abcam Cambridge, UK (ab140211)	Rabbit polyclonal	1:200

Ακολούθως, οι τομές επώαστηκαν με τα δευτερογενή αντισώματα για τη δέσμευση των πρωτογενών αντισωμάτων για 30 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (RT). Τα δευτερογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον Πίνακα 6. Ο Μετά από πλύσεις των πλακιδίων με TBS/ Tween 20 pH 7,4 (Sigma) ακολούθησε επώασή τους με το σύμπλεγμα στρεπταβιδίνης-υπεροξειδάσης (DAKO, Denmark) για 20 λεπτά. Ως χρωμογόνο χρησιμοποιήθηκε 3,3'-διαμινοβενζιδίνη τετραϋδροχλωρίδιο (DAB) (Kirkegaard and Perry Laboratories Gaithersburg, MD, USA) και αιματοξυλίνη για τη χρώση των πυρήνων.

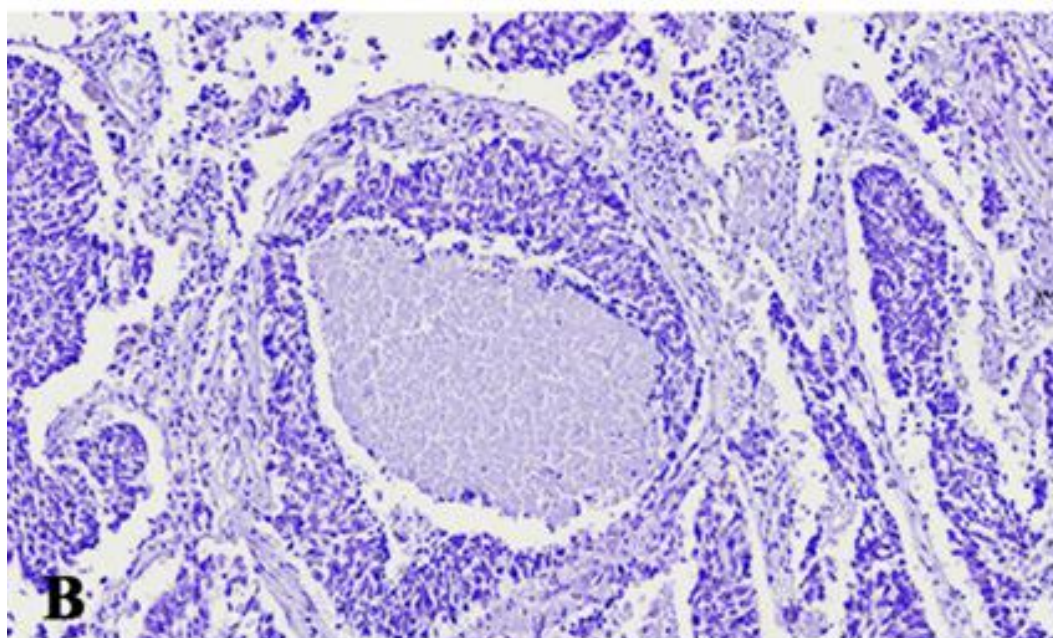
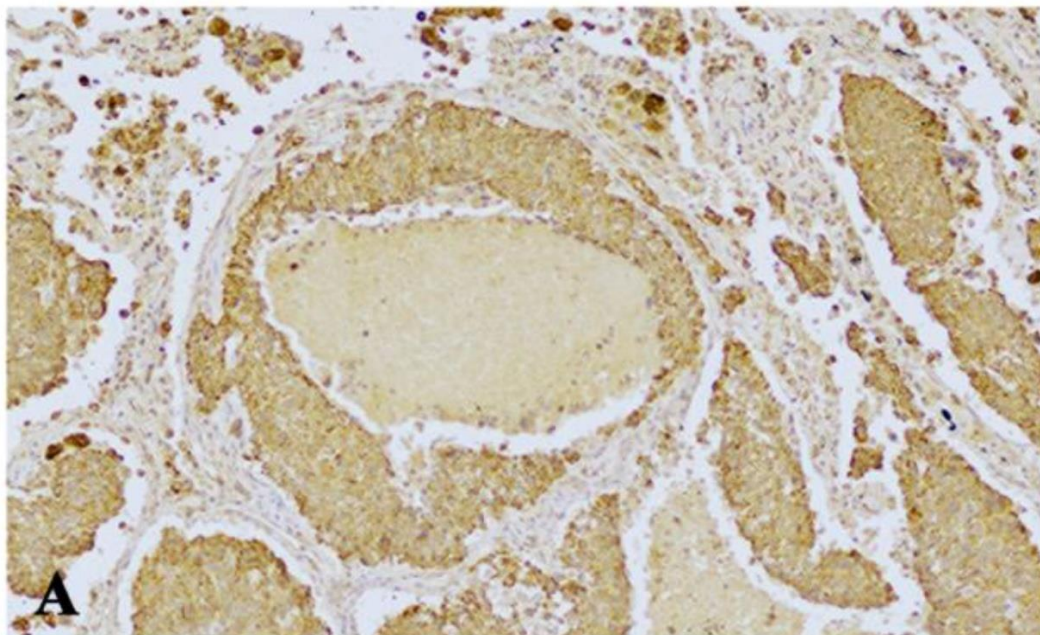
Πίνακας 6: Τα δευτερογενή αντισώματα της μελέτης

ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΕΣ ΑΝΤΙΣΩΜΑ	ΕΤΑΙΡΕΙΑ/ΚΩΔΙΚΟΣ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
Για τη δέσμευση με το πρωτογενές αντίσωμα p16 ^{INK4a}	Abcam Cambridge, UK (ab6789)	Goat anti-mouse IgG	1:2000
Για τη δέσμευση με τα πρωτογενή αντισώματα TLR4, TLR9, NF-κB(p65), IFN-β	Abcam Cambridge, UK (ab205718)	Goat anti-rabbit IgG	1:2000

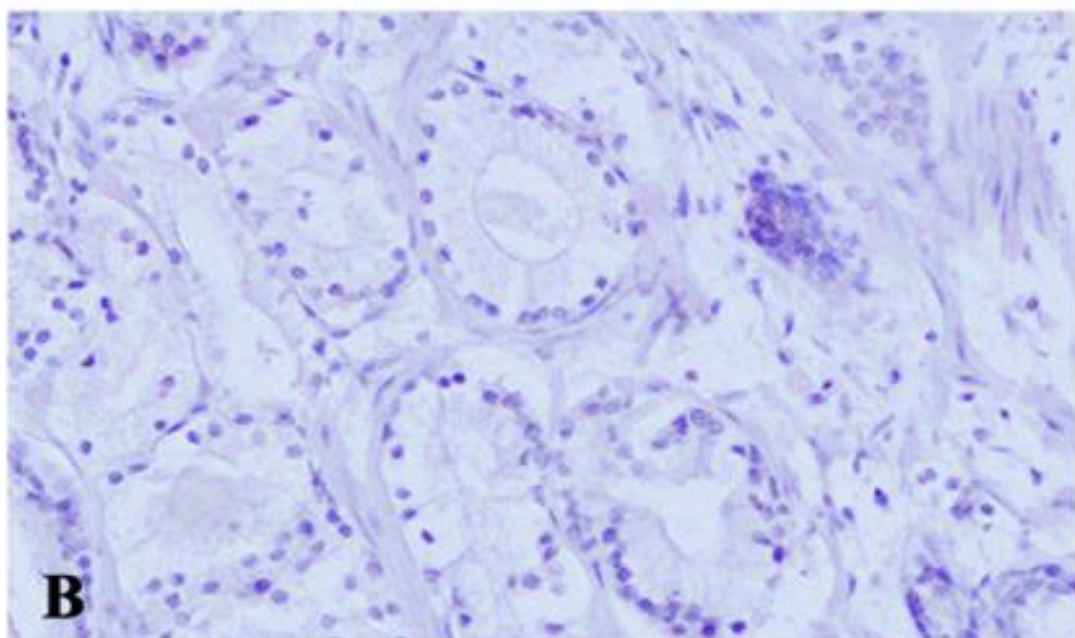
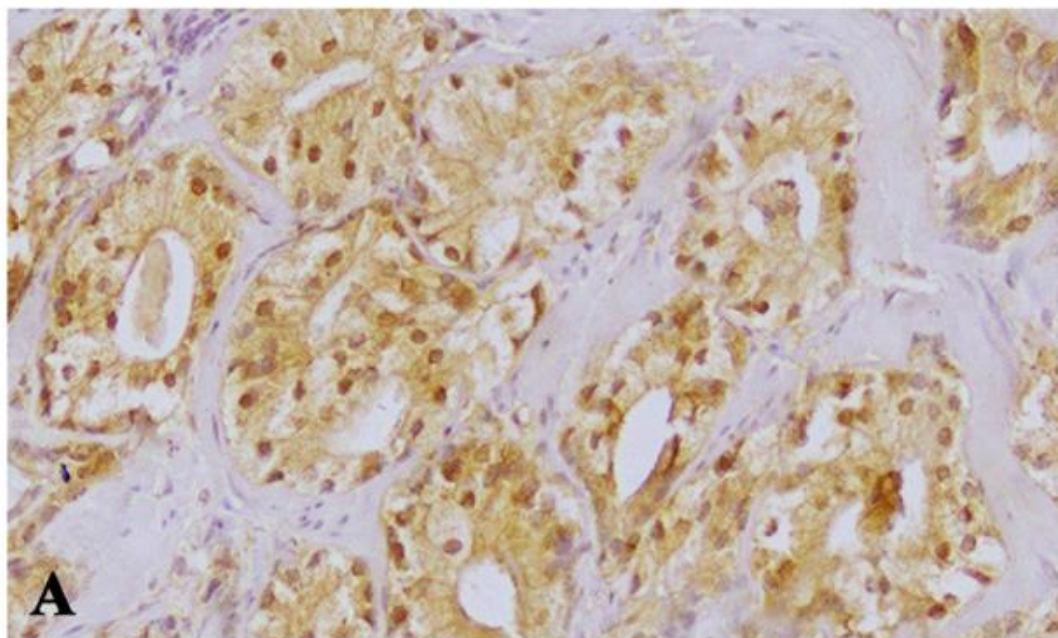
Για τον έλεγχο της ακρίβειας την ανοσοϊστοχημικής χρώσης χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες κακοήθεις όγκοι γνωστής από τη βιβλιογραφία θετικότητας: για τα αντισώματα TLR4 και TLR9 καρκίνος πνεύμονα (Εικόνες 18, 19 αντίστοιχα), για τα αντισώματα NFκB/p65 και IFN-β καρκινώματα προστάτη (Εικόνες 20, 21 αντίστοιχα), και για το αντίσωμα p16^{INK4a} ΑΚΣ (Εικόνα 22). Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τομές από τους παραπάνω όγκους, επεξεργασμένες με PBS και παράλειψη του πρωτογενούς αντισώματος.



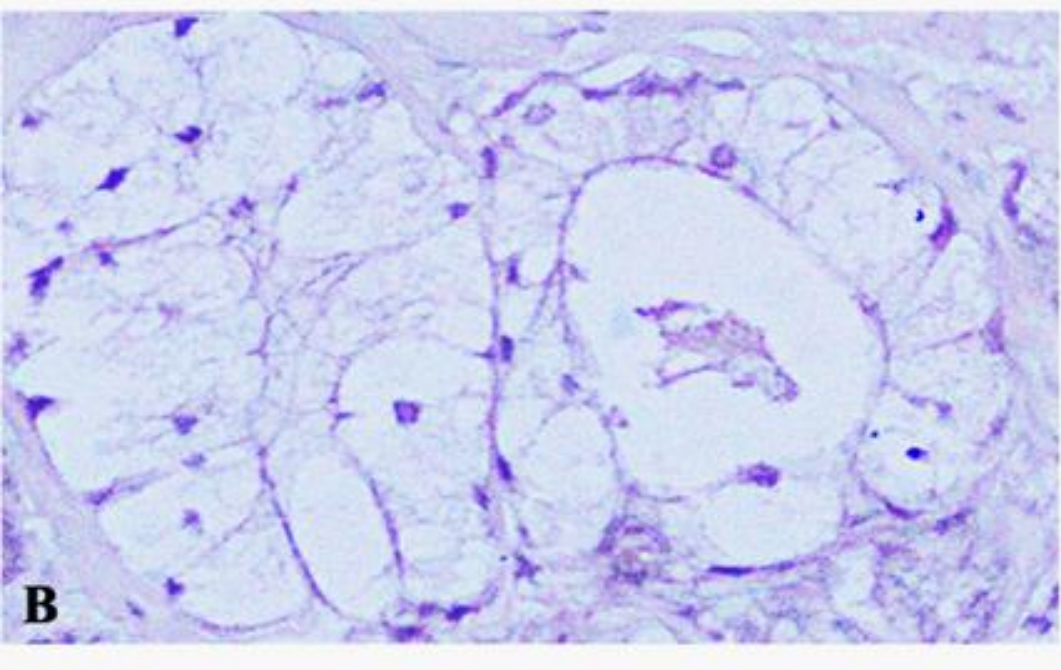
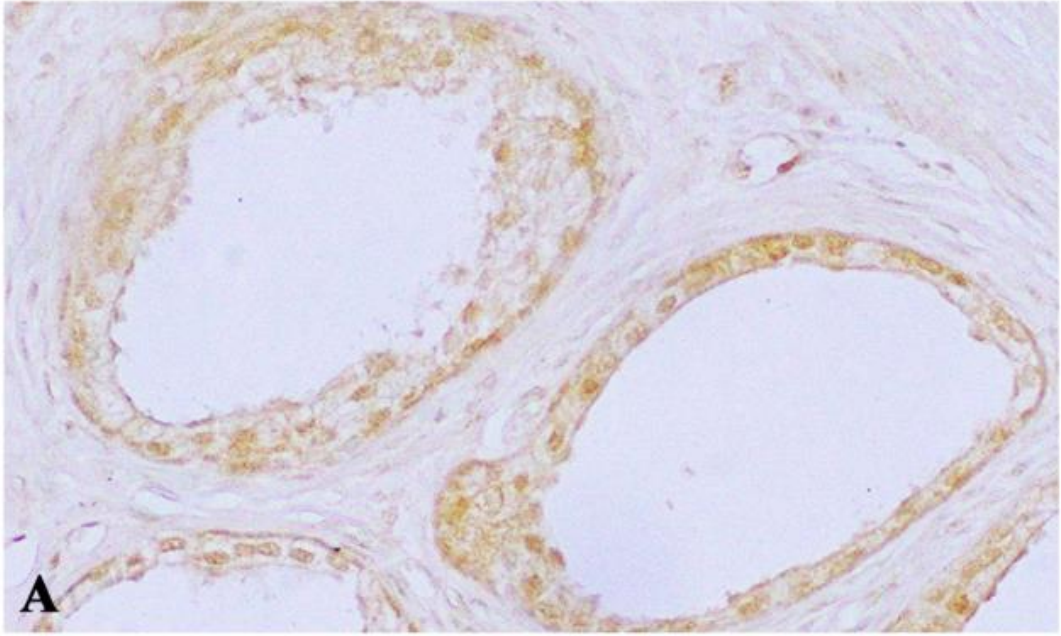
Εικόνα 18: Ιστολογικές μικροφωτογραφίες TLR4 θετικού καρκίνου πνεύμονα (A: Θετικός μάρτυρας, μέτρια ένταση κυτταροπλασματικής ή/και πυρηνικής ανοσοϊστοχημικής χρώσης, B: Αρνητικός μάρτυρας με παράληψη του πρωτογενούς αντισώματος, 200X)



Εικόνα 19: Ιστολογικές μικροφωτογραφίες TLR9 θετικού καρκίνου πνεύμονα (A: Θετικός μάρτυρας, μέτρια ένταση κυτταροπλασματικής ανοσοϊστοχημικής χρώσης, B: Αρνητικός μάρτυρας με παράλειψη του πρωτογενούς αντισώματος, 200X)



Εικόνα 20: Ιστολογικές μικροφωτογραφίες NF-κB θετικού καρκίνου προστάτη (A: Θετικός μάρτυρας, μέτρια ένταση κυτταροπλασματικής ή/και πυρηνικής ανοσοϊστοχημικής χρώσης, B: Αρνητικός μάρτυρας με παράλειψη του πρωτογενούς αντισώματος, 200X)

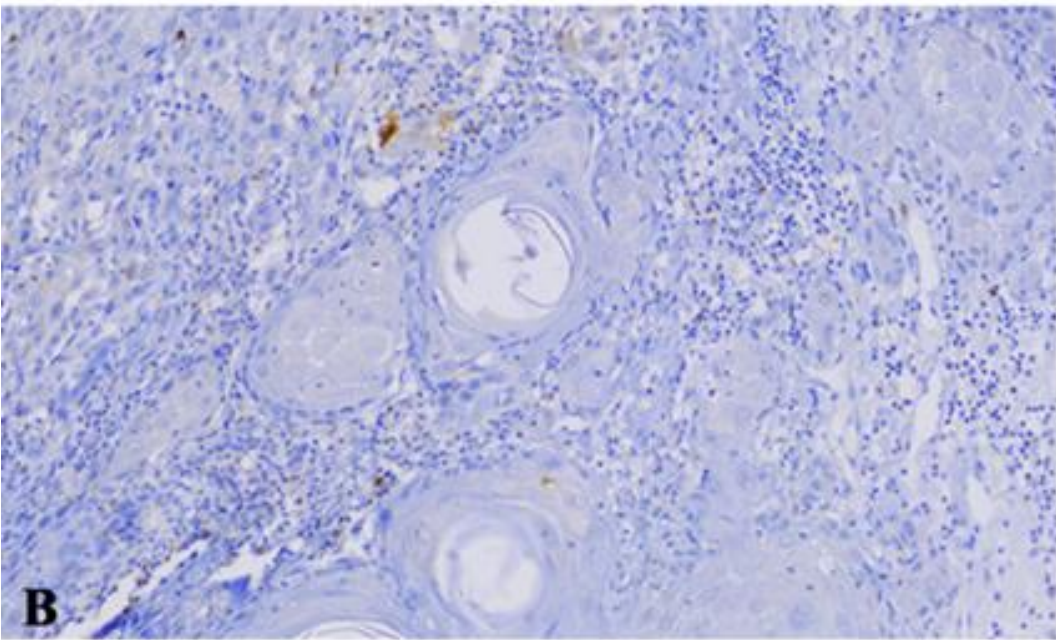
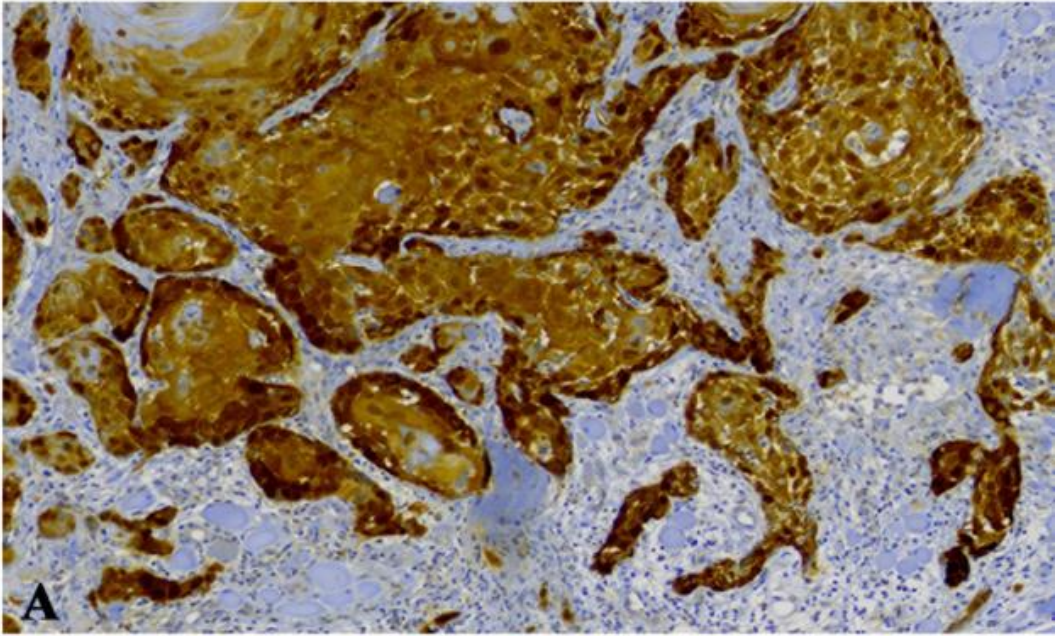


Εικόνα 21: Ιστολογικές μικροφωτογραφίες IFN-β θετικού καρκίνου προστάτη (A: Θετικός μάρτυρας, μέτρια ένταση κυτταροπλασματικής ή/και πυρηνικής ανοσοϊστοχημικής χρώσης, B: Αρνητικός μάρτυρας με παράλειψη του πρωτογενούς αντισώματος, 200X)

1.2.2 Αξιολόγηση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης

Η ημι-ποσοτική αξιολόγηση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης έγινε ανεξάρτητα από 3 ερευνητές (ΝΝ,ΑΛ,ΑΔ) με μικροσκόπηση τουλάχιστον 10 αντιπροσωπευτικών πεδίων των όγκων (με τουλάχιστον 100 κύτταρα ανά πεδίο) καθώς και των παρακείμενων μορφολογικά υγιών ιστών, χρησιμοποιώντας φακούς μεγέθυνσης 200x και 400x σε οπτικό μικροσκόπιο. Σε κάθε τομή εκτιμήθηκε το ποσοστό (%) των κυττάρων της βλάβης που ήταν θετικά για την ανοσοϊστοχημική χρώση και η ένταση του καφέ χρώματος (DAB/υπεροξειδάση). Για τη λήψη φωτογραφιών χρησιμοποιήθηκε το μικροσκόπιο BX51 Olympus και η DP12 Olympus ψηφιακή κάμερα με φακούς universal semi-apochromat UPlan FL lens (40x/0.75 NA, Melville US).

Σχετικά με το μόριο p16^{INK4a} ως θετικά θεωρήθηκαν τα δείγματα που εξέφραζαν έντονη πυρηνική και κυτταροπλασματική χρώση σε ποσοστό > ή ίσο του 70% των νεοπλασματικών κυττάρων (Duncan LD et al 2013).



Εικόνα 22: Ιστολογικές μικροφωτογραφίες που δείχνουν την ανοσοϊστοχημική έκφραση του μορίου $p16^{INK4a}$ σε κύτταρα ΑΚΣ (Α: Θετική περίπτωση: ισχυρή και διάχυτη πυρηνική και κυτταροπλασματική χρώση σε τουλάχιστον 70% των καρκινικών κυττάρων, Β: Αρνητική περίπτωση, 200X).

Για τα μόρια TLR4, TLR9, NF-κB and INF-β η βαθμολόγηση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης έγινε ως εξής:

Κατανομή (ποσοστό χρώσης): Εκτιμήθηκε το ποσοστό των κυττάρων της βλάβης που ήταν θετικά για τη χρώση και βαθμολογήθηκε με 0, 1, 2, 3 σύμφωνα με τα δεδομένα του Πίνακα 7.

Πίνακας 7: Βαθμολόγηση του ποσοστού των θετικών κυττάρων

ΠΟΣΟΣΤΟ ΧΡΩΣΗΣ	
Ποσοστό θετικών κυττάρων	Βαθμολογία
0%	0
<20%	1
20-50%	2
> 50%	3

Ένταση: Αξιολογήθηκε ως αρνητική, ασθενής, μέτρια, και ισχυρή συγκρινόμενη με τους ιστούς που θεωρήθηκαν ως μάρτυρες, με βάσει τα δεδομένα του Πίνακα 8. Η ένταση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης των θετικών μαρτύρων θεωρήθηκε ως μέτρια για τα μόρια TLR4, TLR9, NF-κB and INF-β και ισχυρή για το μόριο p16^{INK4a}.

Πίνακας 8: Βαθμολόγηση της έντασης της ανοσοϊστοχημικής χρώσης

ΕΝΤΑΣΗ ΧΡΩΣΗΣ	
Χαρακτηρισμός	Βαθμολογία
Αρνητική	0
Ασθενής	1
Μέτρια	2
Ισχυρή	3

Συνδυάζοντας τις δύο αυτές παραμέτρους, ένταση και ποσοστό χρώσης, προέκυψε το τελικό άθροισμα τους (total score), το οποίο έλαβε τις τιμές 0 και 2 – 6 (Gkouveris I et al 2017).

Η ανοσοϊστοχημική έκφραση των μορίων TLR4,TLR9,NF-κB and INF-β αξιολογήθηκε με τον οσάνω αναφερόμενο τρόπο και στο γειτονικό μορφολογικά υγιές επιθήλιο σε όλες τις περιπτώσεις. Επιπλέον, η ανοσοϊστοχημική χρώση αξιολογήθηκε στο φλεγμονώδες διήθημα: α) της περιοχής του όγκου (το διήθημα που περιβάλλει τα καρκινικά κύτταρα ή βρίσκεται σε υποεπιθηλιακή εντόπιση σε περιπτώσεις CIS) και β) του γειτονικού μορφολογικά υγιούς βλεννογόνου που βρίσκεται σε υποεπιθηλιακή εντόπιση.

1.2.3 Ανίχνευση στελεχών HPV με τη μέθοδο της Αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase chain reaction-PCR).

Για την ανίχνευση των HPV θετικών ΑΚΓ εφαρμόστηκε αρχικά η τεχνική της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (Polymerase chain reaction-PCR) με ανάστροφο υβριδισμό σε μικροσυστοιχίες. Για την πραγματοποίηση της PCR χρησιμοποιήθηκε το διαγνωστικό kit CLART HPV2 της εταιρείας Genomica (Madrid, Spain). Το συγκεκριμένο σύστημα ανίχνευσης HPV βασίζεται στην ανάγνωση μέσω υπολογιστή μικροσυστοιχιών που προέρχονται από την PCR ενίσχυση του θραύσματος 450bp της L1 περιοχής, 35 HPV γονότυπων με τη μεγαλύτερη κλινική σημασία, οι οποίοι παρατίθενται στον Πίνακα 9.

Τομές κύβων παραφίνης 30μm υποβλήθηκαν σε συγκεκριμένη μικροεπεξεργασία για την απομόνωση του DNA του ιού (DNA extraction) ως εξής: Οι τομές αναμείχθηκαν με 1 ml αραιωμένου διαλύματος Sure Path και φυγοκεντρήθηκαν σε 14,000 περιστροφές ανά λεπτό για 5 λεπτά. Το κυτταρικό ίζημα επαναφυγοκεντρήθηκε με μείγμα 180 μl PBS (10x πυκνότητα, pH 7,4) και 20 μl πρωτεϊνάσης K (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Στη συνέχεια τα δείγματα επώαστηκαν για 1 ώρα στους 56°C και 1 ώρα στους 90°C. Το HPV DNA καθαρίστηκε χρησιμοποιώντας MagNaPureLC 96 και MagNaPureLC 32 του kit απομόνωσης της MagNaPureLC (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany).

Μετά την απομόνωση του ιικού DNA με τη χρήση ειδικών ολιγοδεοξυριβονουκλεοτιδίων (εκκινητές, primers) ανιχνεύτηκαν οι συμπληρωματικές αλυσίδες του ιικού DNA και οι αλληλουχίες αυτές ενισχύθηκαν με την τεχνική της PCR έως και εκατομμύρια φορές δημιουργώντας πολυάριθμα αντίγραφα τους. Για τη γονιδιακή ενίσχυση χρησιμοποιήθηκαν 5μl καθαρού ιικού DNA ενώ τα προϊόντα της PCR σημάνθηκαν με βιοτίνη. Παράλληλα τα σεσημασμένα προϊόντα της PCR μετουσιώθηκαν στους 95°C για 10 λεπτά. Με την προσθήκη συμπλόκου στρεπταβιδίνης σε 10μl των μετουσιωμένων προϊόντων πραγματοποιήθηκε υβριδισμός μεταξύ των αμπλικονίων και των ειδικών ανιχνευτών της CLART και σχηματισμός αδιάλυτου ιζήματος υπεροξειδάσης. Η υβριδοποιημένη κατακρήμνιση τοποθετήθηκε στη μικροσυστοιχία του CLART, η οποία περιείχε πολλαπλά διαμερίσματα, επιτρέποντας τη γονοτυπική ανάλυση πολλαπλών δειγμάτων. Τα δείγματα αναλύθηκαν στο Clinical Array Reader της Genomica δείχνοντας στην οθόνη υπολογιστή τα αποτελέσματα της τυποποίησης του HPV.

Πίνακας 9: Ανιχνευόμενα στελέχη του ιού HPV με τη μέθοδο Clart-2 (Genomica) και ταξινόμηση με βάση το ογκογόνο τους δυναμικό

ΤΥΠΟΣ	ΟΓΚΟΓΟΝΟ ΔΥΝΑΜΙΚΟ	ΤΥΠΟΣ	ΟΓΚΟΓΟΝΟ ΔΥΝΑΜΙΚΟ
HPV 6	LR	HPV 56	HR
HPV 11	LR	HPV 58	HR
HPV 16	HR	HPV 59	HR
HPV 18	HR	HPV 61	LR
HPV 26	HR	HPV 62	LR
HPV 31	HR	HPV 66	HR
HPV 33	HR	HPV 68	HR
HPV 35	HR	HPV 70	HR
HPV 39	HR	HPV 71	LR
HPV 40	LR	HPV 72	LR
HPV42	LR	HPV 73	HR
HPV 43	LR	HPV 81	LR
HPV 44	LR	HPV 82	HR
HPV 45	HR	HPV 83	LR
HPV 51	HR	HPV 84	LR

HPV 52	HR	HPV 85	HR
HPV 53	HR	HPV 89	LR
HPV 54	LR		

1.2.4 Αξιολόγηση των HPV θετικών δειγμάτων με συνδυασμό PCR και ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του μορίου p16^{INK4a}

Η HPV θετικότητα προσδιορίστηκε με συνδυασμένη αξιολόγηση των δύο προαναφερθέντων μεθόδων: της μοριακής ανίχνευσης του HPV DNA με την PCR και της ανοσοϊστοχημικής ανάλυσης της έκφρασης της πρωτεΐνης p16^{INK4a}. Μόνο περιπτώσεις που παρουσιάζουν ταυτόχρονα ανίχνευση HPV με PCR και p16^{INK4a} ανοσοϊστοχημικής θετικότητα (σε $\geq 70\%$ των καρκινικών κυττάρων) ορίστηκαν ως HPV θετικά (Εικόνα 22).

1.2.5 Στατιστική ανάλυση

Η δοκιμασία Student's t-test χρησιμοποιήθηκε για τη σύγκριση των ηλικιακών διαφορών μεταξύ ανδρών και γυναικών. Η δοκιμασία two-tailed Fisher's exact test χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση των πιθανών διαφορών στην κατανομή συχνοτήτων μεταξύ ανδρών και γυναικών σε σχέση με την ιστολογική κατηγορία και την HPV θετικότητα.

Οι ανοσοϊστοχημικές βαθμολογίες (ποσοστό θετικών κυττάρων, ένταση και ολική βαθμολογία) για τα μόρια TLR4, TLR9, NF- κ B και INF- β συγκρίθηκαν α) μεταξύ των κυττάρων των όγκων και των γειτονικών μορφολογικά φυσιολογικών επιθηλιακών κυττάρων και β) μεταξύ των φλεγμονωδών κυττάρων της περιοχής του όγκου και των υποεπιθηλιακών φλεγμονωδών κυττάρων στο παρακείμενο μορφολογικά υγιή βλεννογόνο πρ με την εφαρμογή της δοκιμασίας Wilcoxon Signed Ranks test (σε ολόκληρη την ομάδα ασθενών καθώς και σε κάθε ιστοπαθολογική κατηγορία).

Συγκριτική ανάλυση των προαναφερθέντων ανοσοϊστοχημικών αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκαν επίσης μεταξύ των διαφορετικών ιστοπαθολογικών κατηγοριών (ομάδες Α, Β και Γ) ξεχωριστά για τα καρκινικά και τα φλεγμονώδη κύτταρα. Αυτές οι συγκρίσεις, που αντιπροσωπεύουν κανονικά δεδομένα, πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του Kruskal-Wallis test. Παράλληλα διεξήχθησαν post-hoc συγκρίσεις ανά ζεύγη με την εφαρμογή του Dunn's test.

Ο συντελεστής συσχέτισης Spearman (ρ) υπολογίστηκε για να αναδείξει τις πιθανές συσχετίσεις ανάμεσα στην ανοσοϊστοχημική έκφραση των μορίων σε σχέση α. με τις ιστοπαθολογικές παραμέτρους του τροποποιημένου συστήματος Anneroth (κατά Bryne) β. με την HPV θετικότητα γ. με τα επίπεδα έκφρασης μεταξύ των διαφορετικών μελετώμενων μορίων (στο σύνολο του δείγματος καθώς και σε κάθε ιστοπαθολογική κατηγορία).

Οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας την εφαρμογή λογισμικού SPSS (έκδοση 21.0: SPSS, Chicago, IL, USA.) με $P < 0,05$ ως επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας.

2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

2.1 ΚΑΤΗΓΟΡΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΜΕ ΒΑΣΗ ΚΛΙΝΙΚΑ ΚΑΙ ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Το σύνολο των περιπτώσεων που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη με τα επιδημιολογικά και κλινικά δεδομένα της κάθε περίπτωσης παρουσιάζονται στον Πίνακα 10.

Πίνακας 10: Αναλυτικά επιδημιολογικά και κλινικά στοιχεία των περιπτώσεων της μελέτης

ΑΡΙΘΜΟΣ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗΣ	ΦΥΛΟ	ΗΛΙΚΙΑ	ΕΝΤΟΠΙΣΗ
ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ in situ (n=5)			
1	Θήλυ	69	Ραχιαία επιφάνεια
2	Άρρεν	63	Πλάγιο χείλος αριστερά
3	Άρρεν	51	Κουλιακή επιφάνεια, κορυφή αριστερά
4	Θήλυ	73	Μέσο τριτημόριο πλαγίου χείλους αριστερά
5	Άρρεν	68	Μέσο τριτημόριο πλαγίου χείλους δεξιά
ΠΡΩΙΜΑ ΔΙΗΘΗΤΙΚΑ ΑΚΑΝΘΟΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ (n=9)			
6	Άρρεν	67	Κορυφή δεξιά
7	Θήλυ	26	Μέσο τριτημόριο πλαγίου χείλους δεξιά
8	Θήλυ	-	Κουλιακή επιφάνεια δεξιά
9	Θήλυ	48	Μέσο τριτημόριο πλαγίου χείλους αριστερά
10	Θήλυ	40	Κουλιακή επιφάνεια δεξιά
11	Θήλυ	70	Πλάγιο χείλος αριστερά
12	Θήλυ	65	Κουλιακή επιφάνεια δεξιά
13	Θήλυ	34	Ραχιαία επιφάνεια
14	Θήλυ	73	Μέσο τριτημόριο πλαγίου χείλους αριστερά
ΑΚΑΝΘΟΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ ΚΑΛΗΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ (n=20)			
15	Θήλυ	69	Μέσο τριτημόριο πλαγίου χείλους δεξιά
16	Άρρεν	54	Μέσο τριτημόριο πλαγίου χείλους δεξιά
17	Θήλυ	51	Μέσο τριτημόριο πλαγίου χείλους αριστερά

18	Άρρεν	-	Μέσο τριτημόριο πλαγίου χείλους αριστερά
19	Θήλυ	70	Μέσο τριτημόριο πλαγίου χείλους αριστερά
20	Θήλυ	68	Μέσο τριτημόριο πλαγίου χείλους δεξιά
21	Θήλυ	82	Μέσο τριτημόριο πλαγίου χείλους δεξιά
22	Άρρεν	51	Κοιλιακή επιφάνεια αριστερά
23	Θήλυ	63	Μέσο τριτημόριο πλαγίου χείλους δεξιά
24	Θήλυ	72	Μέσο τριτημόριο πλαγίου χείλους δεξιά
25	Θήλυ	55	Μέσο τριτημόριο πλαγίου χείλους αριστερά
26	Άρρεν	54	Μέσο τριτημόριο πλαγίου χείλους δεξιά
27	Άρρεν	52	Μέσο τριτημόριο πλαγίου χείλους αριστερά
28	Άρρεν	63	Μέσο τριτημόριο πλαγίου χείλους αριστερά
29	Θήλυ	65	Μέσο τριτημόριο πλαγίου χείλους δεξιά
30	Άρρεν	68	Μέσο τριτημόριο πλαγίου χείλους δεξιά
31	Άρρεν	77	Μέσο τριτημόριο πλαγίου χείλους δεξιά
32	Άρρεν	47	Μέσο τριτημόριο πλαγίου χείλους δεξιά
33	Θήλυ	73	Μέσο τριτημόριο πλαγίου χείλους δεξιά
34	Άρρεν	50	Μέσο τριτημόριο πλαγίου χείλους αριστερά
ΑΚΑΝΘΟΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ ΜΕΤΡΙΑΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ (n=23)			
35	Άρρεν	58	Μέσο τριτημόριο πλαγίου χείλους αριστερά
36	Άρρεν	72	Μέσο τριτημόριο πλαγίου χείλους αριστερά
37	Άρρεν	43	Μέσο τριτημόριο πλαγίου χείλους αριστερά
38	Θήλυ	-	Μέσο τριτημόριο πλαγίου χείλους δεξιά

39	Θήλυ	50	Μέσο τριτημόριο πλαγίου χείλους δεξιά
40	Θήλυ	73	Ραχιαία επιφάνεια αριστερά
41	Άρρεν	-	Ραχιαία επιφάνεια αριστερά
42	Άρρεν	41	Κοιλιακή επιφάνεια αριστερά
43	Θήλυ	83	Κοιλιακή επιφάνεια αριστερά
44	Άρρεν	42	Μέσο τριτημόριο πλαγίου χείλους δεξιά
45	Θήλυ	29	Κοιλιακή επιφάνεια δεξιά
46	Άρρεν	27	Μέσο τριτημόριο πλαγίου χείλους δεξιά
47	Άρρεν	67	Μέσο τριτημόριο πλαγίου χείλους δεξιά
48	Άρρεν	70	Μέσο τριτημόριο πλαγίου χείλους δεξιά
49	Θήλυ	77	Μέσο τριτημόριο πλαγίου χείλους δεξιά
50	Θήλυ	65	Κοιλιακή επιφάνεια αριστερά
51	Άρρεν	58	Μέσο τριτημόριο πλαγίου χείλους αριστερά
52	Άρρεν	49	Μέσο τριτημόριο πλαγίου χείλους αριστερά
53	Θήλυ	55	Μέσο τριτημόριο πλαγίου χείλους αριστερά
54	Άρρεν	47	Μέσο τριτημόριο πλαγίου χείλους αριστερά
55	Θήλυ	83	Κοιλιακή επιφάνεια γλώσσας δεξιά
56	Θήλυ	53	Μέσο τριτημόριο πλαγίου χείλους αριστερά
57	Άρρεν	48	Μέσο τριτημόριο πλαγίου χείλους αριστερά
ΑΚΑΝΘΟΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ ΧΑΜΗΛΗΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ (n=6)			
58	Θήλυ	83	Μέσο τριτημόριο πλαγίου χείλους δεξιά
59	Θήλυ	48	Μέσο τριτημόριο πλαγίου χείλους δεξιά
60	Άρρεν	49	Μέσο τριτημόριο πλαγίου χείλους αριστερά

61	Άρρεν	63	Κοιλιακή επιφάνεια αριστερά
62	Θήλυ	83	Μέσο τριτημόριο πλαγίου χείλους αριστερά
63	Θήλυ	49	Πλάγιο χείλος αριστερά

Σε σύνολο 63 περιπτώσεων βιοπτικού υλικού γλώσσας, 29 ασθενείς (46%) ήταν άνδρες και 34 (54%) ήταν γυναίκες. Σχετικά με τις ηλικίες, διαθέσιμα στοιχεία υπήρχαν για 59 περιπτώσεις. Έτσι, ο μέσος όρος ηλικίας του δείγματος ήταν 59,3 έτη και η διακύμανση των τιμών 26-83 έτη. Στους άνδρες, ο μέσος όρος ηλικίας ήταν 55,6 έτη και το ηλικιακό εύρος 22-77 έτη. Στις γυναίκες, ο μέσος όρος ηλικίας ήταν 62,4 έτη με ηλικιακό εύρος 26-83 έτη. Μεταξύ ανδρών και γυναικών πραγματοποιήθηκε σύγκριση με Student's test και δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p=0,700$) (Πίνακας 11).

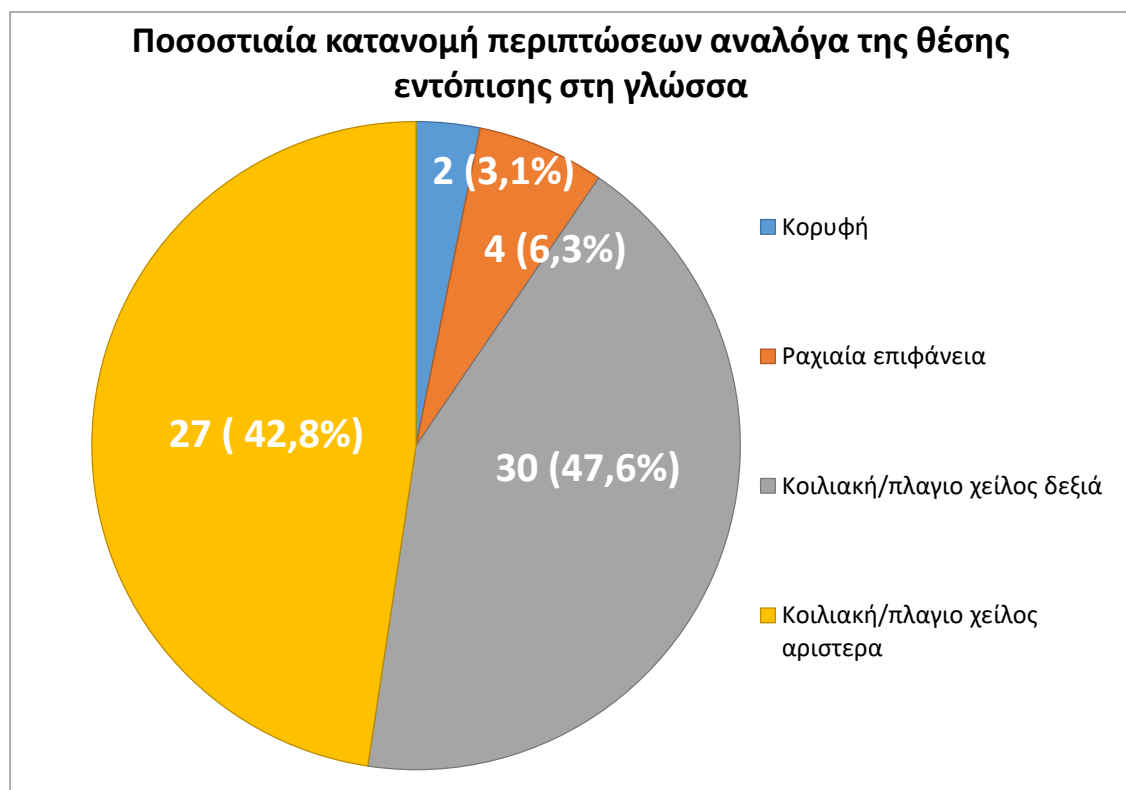
Πίνακας 11: Κατανομή των περιπτώσεων της μελέτης ανάλογα με την ηλικία, την ιστοπαθολογική εικόνα και την HPV θετικότητα

Χαρακτηριστικά	Άνδρες	Γυναίκες	P	Σύνολο
n (%)	29 (46%)	34 (54%)		63 (100%)
Ηλικία (έτη)				
Μέση τιμή (± SD)	55,6 (± 11,5)	62,4 (± 16,0)	0,700*	59,3 (± 14,4)
Διακύμανση	27 – 77	26 - 83		26 - 83
Ιστολογική κατηγορία				
Ομάδα Α (Καρκινώματα in situ και Επιφανειακά διηθητικά ΑΚΓ)	4 (6,3%)	10 (15,9%)	0,371**	14 (22,2%)
Ομάδα Β (Υψηλής διαφοροποίησης ΑΚΓ)	10 (15,9%)	10 (15,9%)		20 (31,7%)
Ομάδα Γ (Μέτριας και Χαμηλής διαφοροποίησης ΑΚΓ)	15 (23,8%)	14 (22,2%)		29 (46%)
HPV θετικότητα (θετικότητα για PCR & p16^{INK4a})				
HPV+	5 (7,9%)	5 (7,9%)	1,000**	10 (15,9%)
HPV-	24 (38,1%)	29 (46%)		53 (84,1%)

*Student's t-test. **Two-tailed Fisher's Exact test* ΑΚΓ: Ακανθοκυτταρικά καρκινώματα γλώσσας

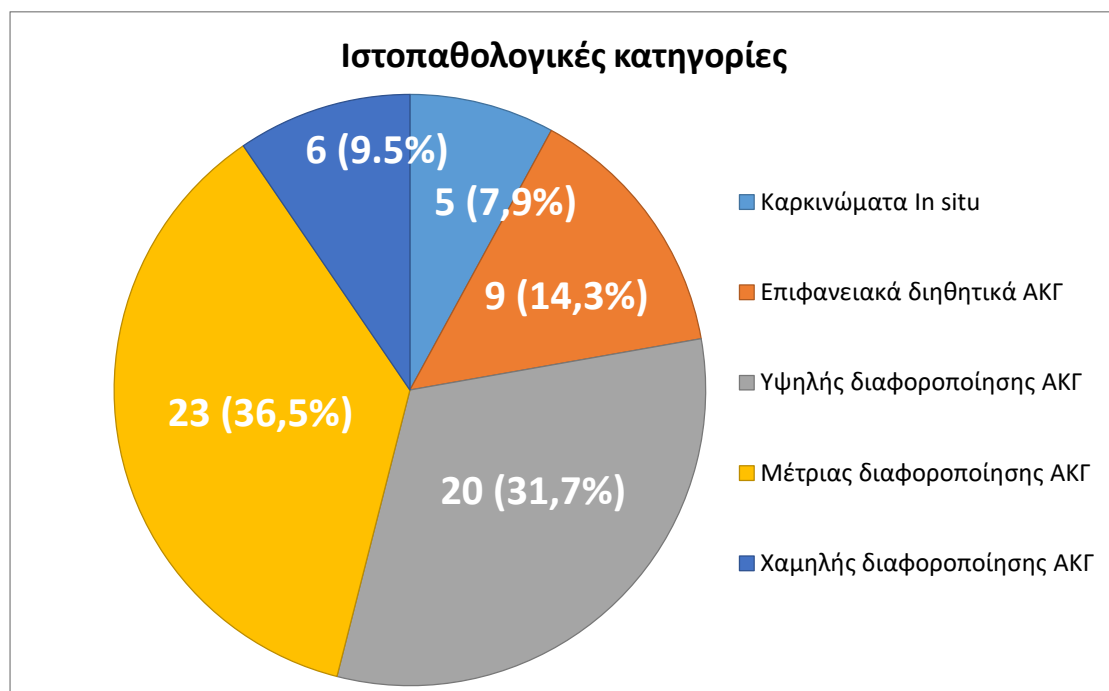
Όλα οι βλάβες εντοπίζονταν στην γλώσσα. Ως προς την ακριβή εντόπιση των βλαβών 27/63 περιπτώσεις (42,8%) αφορούσαν ανάπτυξη των όγκων στην κοιλιακή επιφάνεια ή/και στο πλάγιο χείλος της γλώσσας δεξιά, 30/63 περιπτώσεις (47,6%) αφορούσαν εντόπιση στην κοιλιακή επιφάνεια ή/και στο πλάγιο χείλος αριστερά, 4/63 (6,3%) στη ραχιαία επιφάνεια ενώ 2/63 (3,1%) στην κορυφή γλώσσας (Γράφημα 1).

Γράφημα 1: Ποσοστιαία κατανομή των περιπτώσεων της μελέτης ανάλογα με την ακριβή περιοχή εντόπισης στη γλώσσα.



Οι 63 περιπτώσεις της μελέτης ταξινομήθηκαν ιστοπαθολογικά στις ακόλουθες κατηγορίες σύμφωνα με τα κριτήρια του WHO 2017 (El-Naggar AK et al 2017) : 5 καρκινώματα in situ (7,9%), 9 επιφανειακά διηθητικά καρκινώματα (14,3%), 20 ΑΚΓ υψηλής διαφοροποίησης (31,7%), 23 ΑΚΓ μέτριας διαφοροποίησης (36,5%) και 6 ΑΚΓ χαμηλής διαφοροποίησης (9,5%) (Γράφημα 2).

Γράφημα 2: Ιστοπαθολογικές κατηγορίες των περιπτώσεων μελέτης



Για λόγους περεταίρω στατιστικής επεξεργασίας των αποτελεσμάτων το υλικό της μελέτης κατηγοριοποιήθηκε σε τρεις ομάδες:

- α. Ομάδα Α: Συμπεριέλαβε 5 καρκινώματα in situ και 9 πρώιμα διηθητικά καρκινώματα.
- β. Ομάδα Β: Συμπεριέλαβε 20 υψηλής διαφοροποίησης ακανθοκυτταρικά καρκινώματα.
- γ. Ομάδα Γ: Συμπεριέλαβε 23 μέτριας και 6 χαμηλής διαφοροποίησης ακανθοκυτταρικά καρκινώματα (Πίνακας 11).

Όλα τα αμιγώς διηθητικά καρκινώματα (υψηλής, μέτριας και χαμηλής διαφοροποίησης, των ομάδων Β και Γ) αναλύθηκαν σύμφωνα με το τροποποιημένο σύστημα Anneroth (κατά Bryne) (Anneroth et al 1987, Bryne et al 1989). Το συνολικό άθροισμα των βαθμολογιών των παραμέτρων του τροποποιημένου συστήματος Anneroth για τα υψηλής διαφοροποίησης καρκινώματα έλαβε τιμές από 6-9 (μέση τιμή: 7,5), για τα μέτριας διαφοροποίησης καρκινώματα τιμές από 10-11 (μέση τιμή: 10,5) και για τα χαμηλής διαφοροποίησης καρκινώματα τιμές από 14-18 (μέση τιμή:

16), παρουσιάζοντας πλήρη συσχέτιση με το σύστημα σταδιοποίησης κατά WHO του 2017 (Πίνακας 12).

Πίνακας 12: Αξιολόγηση των περιπτώσεων της μελέτης με το τροποποιημένο σύστημα Anneroth (κατά Bryne)

ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ	ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ ΒΑΘΜΟΛΟΓΙΑΣ	ΕΥΡΟΣ ΤΙΜΩΝ
Υψηλής διαφοροποίησης	7,5	6-9
Μέτριας διαφοροποίησης	10,5	10-11
Χαμηλής διαφοροποίησης	16	14-18

2.2 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΙΟΥ HPV

Η ανίχνευση των HPV θετικών περιπτώσεων της μελέτης και ο προσδιορισμός των εμπλεκόμενων τύπων του ιού πραγματοποιήθηκε με τον συνδυασμό της τεχνικής της PCR και της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του δείκτη p16^{INK4a}.

2.2.1 Αρχικά αποτελέσματα ανίχνευσης στελεχών HPV με τη μέθοδο PCR

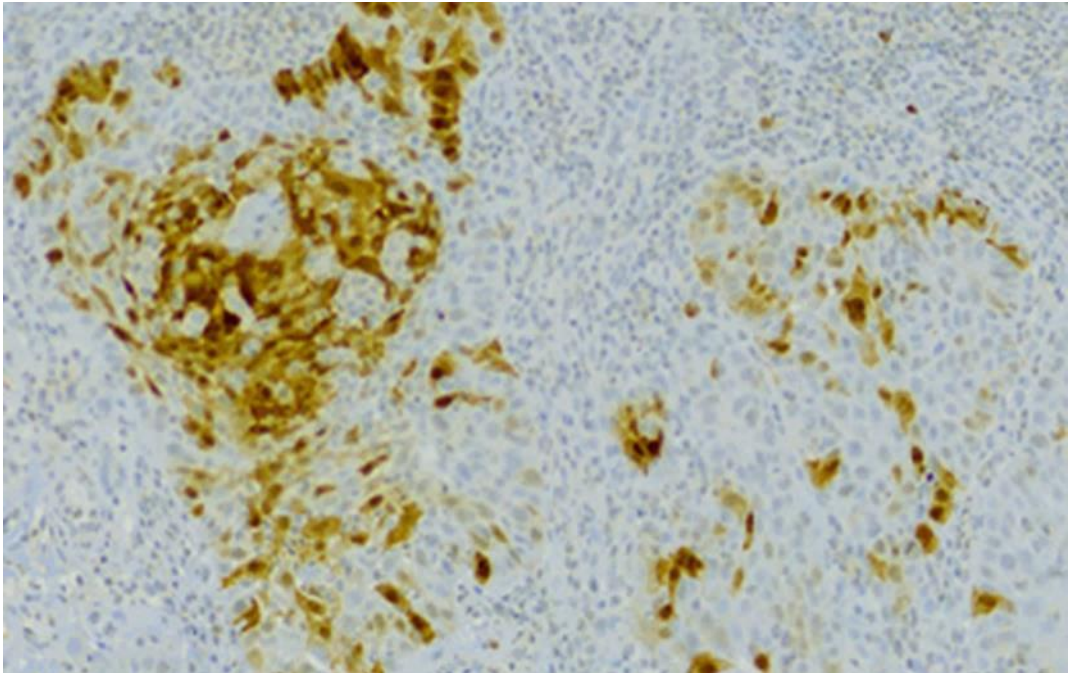
Με τη χρήση της μεθόδου PCR ανιχνεύτηκαν 47/63 (74,6%) θετικά για HPV DNA δείγματα. Ταυτοποιήθηκαν 12 διαφορετικά στελέχη HPV εκ των οποίων 10 άνηκαν στην ομάδα υψηλού κινδύνου (High Risk-HPVs) και 2 στελέχη στην ομάδα χαμηλού κινδύνου (Low Risk-HPVs). Από τα στελέχη υψηλού κινδύνου το συχνότερο απαντώμενο στέλεχος ήταν το HPV 70 (20 περιπτώσεις-31,7%), ακολουθούμενα από τα στελέχη HPV 31 (16 περιπτώσεις-25,4%), HPV 35 (11 περιπτώσεις-17,5%), HPV 16 (10 περιπτώσεις-15,9%), HPV 68 (3 περιπτώσεις-4,8%), HPV 40,58,66 (2 περιπτώσεις, για κάθε τύπο-3,2%) και HPV 7 και 51 (1 περίπτωση, για κάθε τύπο-1,6%). Τα χαμηλού κινδύνου στελέχη HPV που ανιχνεύτηκαν ήταν το στέλεχος HPV42 (2 περιπτώσεις-3,2%) και το στέλεχος HPV43 (1 περίπτωση-1,6%) (Πίνακας 13). Σε 20 περιπτώσεις ανιχνεύτηκε 1 στέλεχος του ιού HPV. Σε 27 περιπτώσεις ανιχνεύτηκαν ταυτόχρονα 2 ή 3 στελέχη. Οι συνδυασμοί των στελεχών ήταν : 35-70 (σε 2 περιπτώσεις), 31-40 (σε 2 περιπτώσεις), 31-45 (σε 2 περιπτώσεις), 58-70, 16-35 (σε 3 περιπτώσεις), 16-70 (σε 2 περιπτώσεις), 16-51, 16-43, 31-35 (σε 2 περιπτώσεις), 31-68, 31-70, 45-70 (σε 2 περιπτώσεις), 31-58, 45-68, 7-45, 31-35-70 (σε 3 περιπτώσεις), 16-31-45.

Πίνακας 13: Ανίχνευση στελεχών HPV με PCR

HPV τύπος	ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ HPV με PCR	
	n(%)	
7	1	(1,6%)
16	10	(15,9%)
31	16	(25,4%)
35	11	(17,5%)
40	2	(3,2%)
42	2	(3,2%)
43	1	(1,6%)
51	1	(1,6%)
58	2	(3,2%)
66	2	(3,2%)
68	3	(4,8%)
70	20	(31,7%)

2.2.2 Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του δείκτη p16^{INK4a}

Η ανοσοϊστοχημική έκφραση του δείκτη p16^{INK4a} κατέδειξε έντονη και διάχυτη πυρηνική και κυτταροπλασματική ανοσοϊστοχημική θετικότητα (σε ποσοστό $\geq 70\%$ των νεοπλασματικών κυττάρων) σε 18/63 (28,6%) περιπτώσεις (Εικόνα 23).

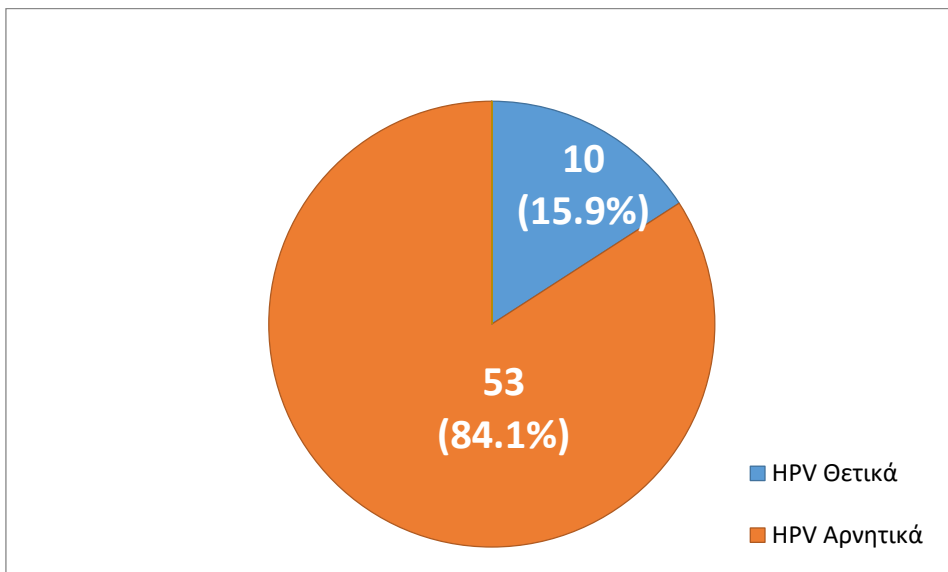


Εικόνα 23: Ανοσοϊστοχημική έκφραση του δείκτη p16^{INK4a}. Παρατηρείται έντονη και διάχυτη θετικότητα σε πυρήνα και κυτταρόπλασμα των νεοπλασματικών κυττάρων

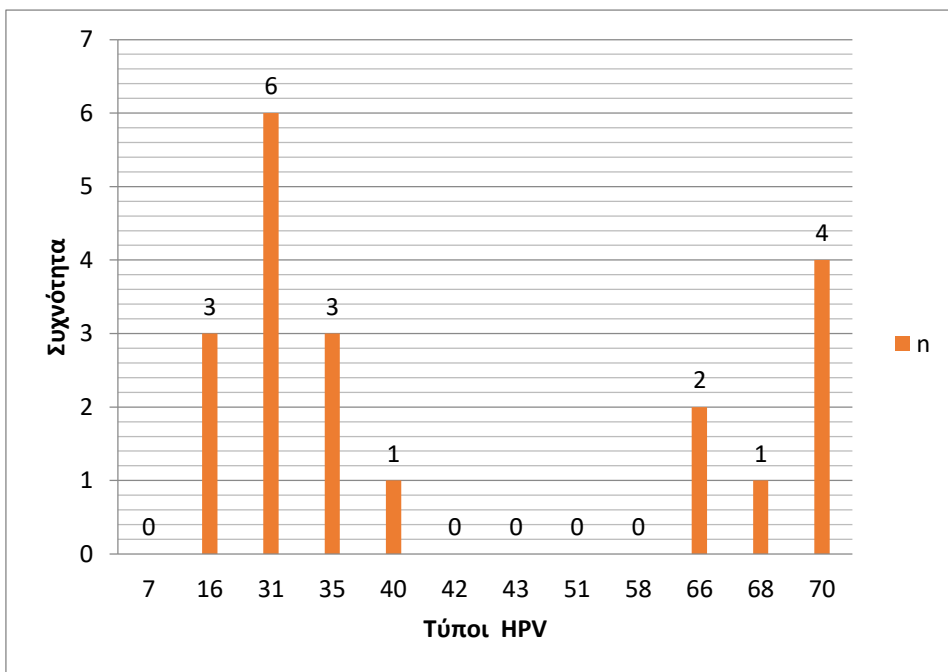
2.2.3 Τελική αξιολόγηση των HPV θετικών δειγμάτων από το συνδυασμό PCR και p16^{INK4a}

Τα δείγματα που ανιχνεύθηκαν ταυτόχρονα θετικά για HPV DNA με την τεχνική της PRC και για τον ανοσοϊστοχημικό δείκτη p16^{INK4a} ήταν συνολικά 10/63 (15,9%) (Γράφημα 3). Σ όλες τις HPV θετικές περιπτώσεις ανιχνεύθηκαν στελέχη υψηλού κινδύνου. Ειδικότερα σε 2 περιπτώσεις ανιχνεύθηκαν 1 (20%) στέλεχος HR-HPV, σε 6 (60%) 2 στελέχη HR-HPVs και σε 2 (20%) περιπτώσεις 3 στελέχη HR-HPVs. Με το συνδυασμό της PRC και p16^{INK4a} ανιχνεύτηκαν 7 διαφορετικά στελέχη υψηλού κινδύνου: το συχνότερα απαντώμενο στέλεχος ήταν το HPV31 (σε 6 περιπτώσεις, 60%), ακολουθούμενο από το στέλεχος HPV70 (4 περιπτώσεις, 40%), το HPV16 (3 περιπτώσεις, 30%), το HPV35 (3 περιπτώσεις, 30%), HPV66 (2 περιπτώσεις, 20%), HPV40 (1 περίπτωση, 10%) και το στέλεχος HPV68 (1 περίπτωση, 10%) (Γράφημα 4).

Γράφημα 3: Ποσοστά ανίχνευσης HPV θετικών δειγμάτων με το συνδυασμό της PCR και p16^{INK4a}



Γράφημα 4: Κατανομή των HR-HPVs στα θετικά δείγματα



2.2.4 Συσχέτιση της HPV θετικότητας με τα δημογραφικά στοιχεία των ασθενών, τις ιστοπαθολογικές κατηγορίες και τις ιστοπαθολογικές παραμέτρους του τροποποιημένου συστήματος Anneroth (κατά Bryne)

Η στατιστική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε μεταξύ ανδρών και γυναικών ως προς την HPV θετικότητα δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά ($p=1,000$) (Πίνακας 11). HPV θετικότητα βρέθηκε στην ομάδα Α, σε 2/14 περιπτώσεις (ποσοστό 14,2%) (και οι δύο αφορούσαν πρώιμα διηθητικά καρκινώματα), στην ομάδα Β σε 3/20 περιπτώσεις (ποσοστό 15%) και στην ομάδα Γ σε 5/29 περιπτώσεις (ποσοστό 17,2%) (3 μέτριας και 2 χαμηλής διαφοροποίησης ΑΚΓ). Με τη χρήση της στατιστικής δοκιμασίας Two-tailed Fisher's exact test δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς την HPV θετικότητα μεταξύ των τριών ομάδων ($p=0,95$) (Πίνακας 14).

Πίνακας 14: Συσχέτιση μεταξύ της HPV θετικότητας και των ιστοπαθολογικών κατηγοριών

	ΟΜΑΔΑ Α (n=14)	ΟΜΑΔΑ Β (n=20)	ΟΜΑΔΑ Γ (n=29)	p*
HPV +	2	3	5	0,950
HPV -	12	17	24	

*Two-tailed Fisher's exact test

Παράλληλα με τη χρήση της στατιστικής δοκιμασίας Spearman's rho test μελετήθηκε η συσχέτιση μεταξύ της HPV θετικότητας και των ιστοπαθολογικών παραμέτρων του τροποποιημένου συστήματος Anneroth (κατά Bryne). Η παρουσία του ιού HPV βρέθηκε να συσχετίζεται θετικά με την αύξηση της πλειομορφίας των νεοπλασματικών κυττάρων (RHO 0,453, $p= 0,14$) στην ομάδα Γ (μέτριας και χαμηλής διαφοροποίησης καρκινώματα) (Πίνακας 15).

Πίνακας 15: Συσχέτιση μεταξύ της HPV θετικότητας και των ιστοπαθολογικών παραμέτρων του τροποποιημένου συστήματος Anneroth (κατά Bryne) στα 49 αμιγώς διηθητικά ΑΚΓ

Ιστοπαθολογικές παράμετροι του τροποποιημένου συστήματος Anneroth	HPV θετικότητα								
	Ομάδες Β και Γ			Ομάδα Β			Ομάδα Γ		
	N	r*	P	N	r*	P	N	r*	P
Βαθμός Κερατινοποίησης	49	0,070	0,635	20	0,000	1,000	29	0,143	0,458
Πυρηνική Πλειομορφία	49	0,105	0,472	20	-0,343	0,139	29	0,453	0,014
Τύπος Διήθησης	49	0,018	0,905	20	-0,279	0,234	29	0,153	0,427
Φλεγμονώδης αντίδραση	49	-0,250	0,083	20	-0,251	0,285	29	-0,263	0,168
Μιτώσεις	49	0,112	0,445	20	-0,096	0,686	29	0,169	0,382

**Spearman's rho test*

2.3 ΑΝΟΣΟΙΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΩΝ TLR4, TLR9, NF-κΒ ΚΑΙ IFN-β ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΤΙΣ ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΚΑΙ ΤΙΣ ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ ΤΟΥ ΤΡΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ANNEROTH (ΚΑΤΑ BRYNE)

2.3.1.1 Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του μορίου TLR4

Καρκινικά κύτταρα

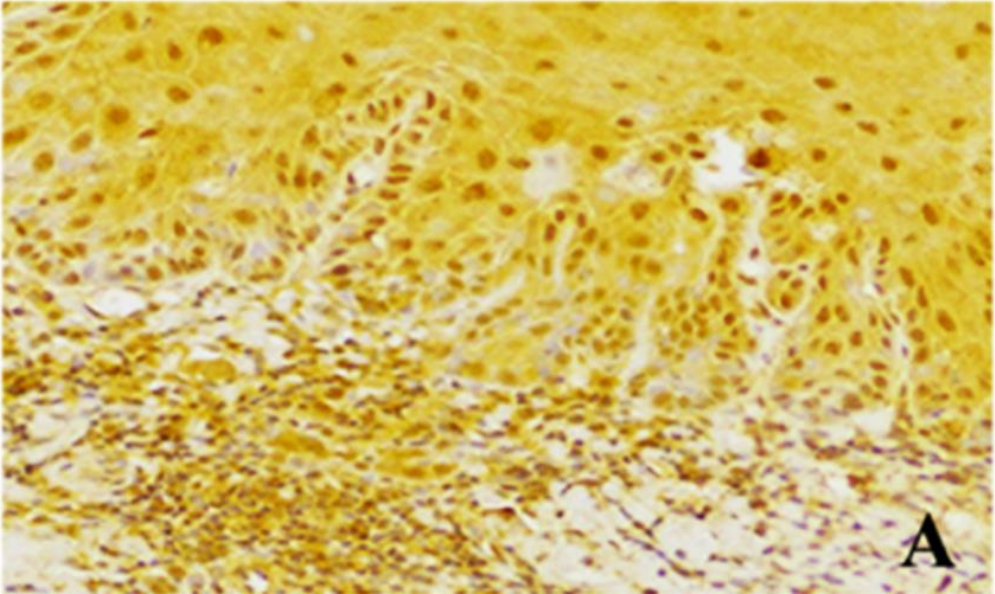
Το μόριο TLR4 εμφάνισε ανοσοϊστοχημική θετικότητα σε 63/63 περιπτώσεις (ποσοστό 100%) παρουσιάζοντας διακυμάνσεις στο ποσοστό των θετικών κυττάρων και την ένταση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης. Στο σύνολο του δείγματος, η μέση τιμή του ποσοστού των θετικών κυττάρων ήταν 1,9, η μέση τιμή της έντασης της ανοσοϊστοχημικής χρώσης ήταν 1,39 και η μέση τιμή του τελικού αθροίσματος (ποσοστό και έντασης χρώσης) ήταν 3,3 (Πίνακας 16). Στο σύνολο του δείγματος, το μόριο TLR4 εμφάνισε κυτταροπλασματική χρώση στα κύτταρα των όγκων σε 37/63 περιπτώσεις (ποσοστό 58,7%), πυρηνική χρώση σε 15/63 περιπτώσεις (ποσοστό 23,8%) και συνδυασμό πυρηνικής και κυτταροπλασματικής χρώσης σε 11/63 περιπτώσεις (ποσοστό 17,5%)(Πίνακας 16) (Εικόνες 24 Α-Γ).

Φλεγμονώδη κύτταρα των όγκων

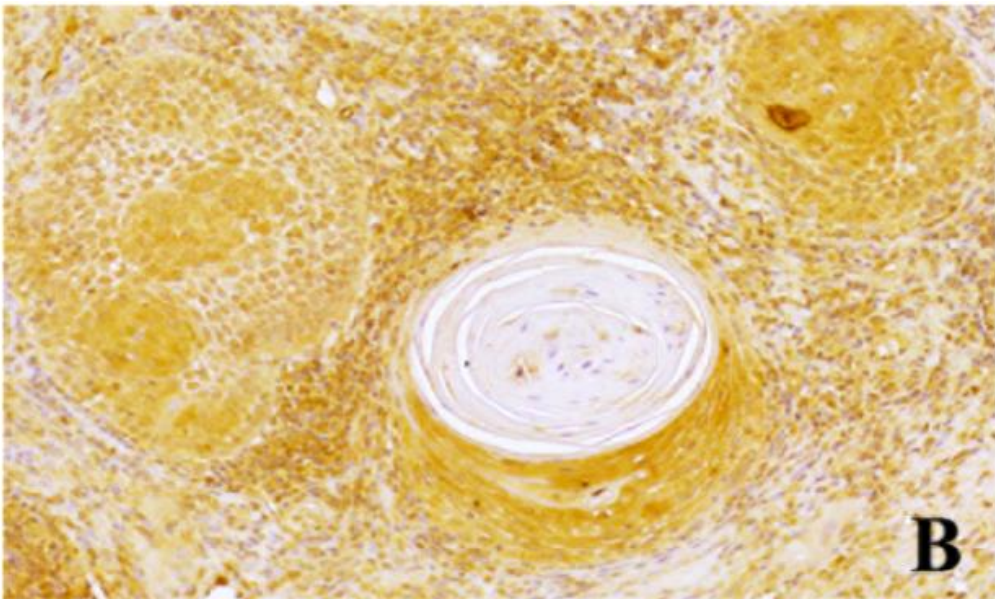
Στα φλεγμονώδη κύτταρα των όγκων, έκφραση του μορίου TLR4 παρατηρήθηκε σε 56/63 περιπτώσεις (ποσοστό 88%). Η μέσες τιμές το ποσοστού των θετικών κυττάρων, της έντασης της ανοσοϊστοχημικής χρώσης και του συνολικού αθροίσματος (ποσοστού και έντασης χρώσης) ήταν 1,51, 1,16 και 2,65 αντίστοιχα (Πίνακας 16) (Εικόνα 24 Α-Γ).

Πίνακας 16: Συνοπτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του μορίου TLR4

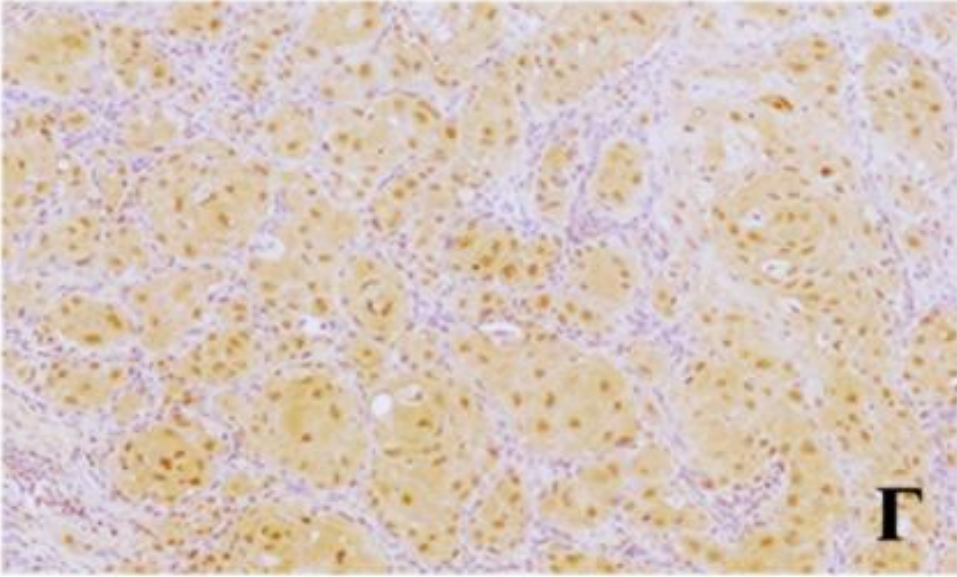
	ΟΜΑΔΑ Α (n=14)	ΟΜΑΔΑ Β (n=20)	ΟΜΑΔΑ Γ (n=29)	ΣΥΝΟΛΟ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ (n=63)
ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ				
Ποσοστό θετικών περιπτώσεων (%)	14/14 (100%)	20/20 (100%)	29/29 (100%)	63/63 (100%)
Κυτταροπλασματική χρώση	8/14 (57,1%)	13/20 (65%)	16/29 (55,2%)	37/63 (58,7%)
Πυρηνική χρώση	6/14 (42,9%)	3/20 (15%)	6/29 (20,7%)	15/63 (23,8%)
Συνδυασμός πυρηνικής και κυτταροπλασματικής χρώσης	0/14 (0%)	4/20 (20%)	7/29 (24,1%)	11/63 (17,5%)
Ποσοστό θετικών κυττάρων (μέση τιμή και εύρος)	1,42 (1-3)	2,25 (1-3)	2,2 (1-3)	1,9 (1-3)
Ένταση χρώσης (μέση τιμή και εύρος)	1,21 (1-2)	1,45 (1-2)	1,51 (1-3)	1,39 (1-3)
Συνολικό άθροισμα (μέση τιμή και εύρος)	2,64 (2-5)	3,7 (2-5)	3,7 (2-6)	3,3 (2-6)
ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΩΝ ΟΓΚΩΝ				
Ποσοστό θετικών περιπτώσεων (%)	10/14 (71,4%)	20/20 (100%)	26/29 (89,6%)	56/63 (88,8%)
Ποσοστό θετικών κυττάρων (μέση τιμή και εύρος)	0,92 (0-3)	2,15 (1-2)	1,48 (0-2)	1,51 (0-3)
Ένταση χρώσης (μέση τιμή και εύρος)	1,0 (0-2)	1,4 (1-2)	1,1 (0-2)	1,16 (0-2)
Συνολικό άθροισμα (μέση τιμή και εύρος)	1,92 (0-5)	3,45 (2-5)	2,6 (0-4)	2,65 (0-5)



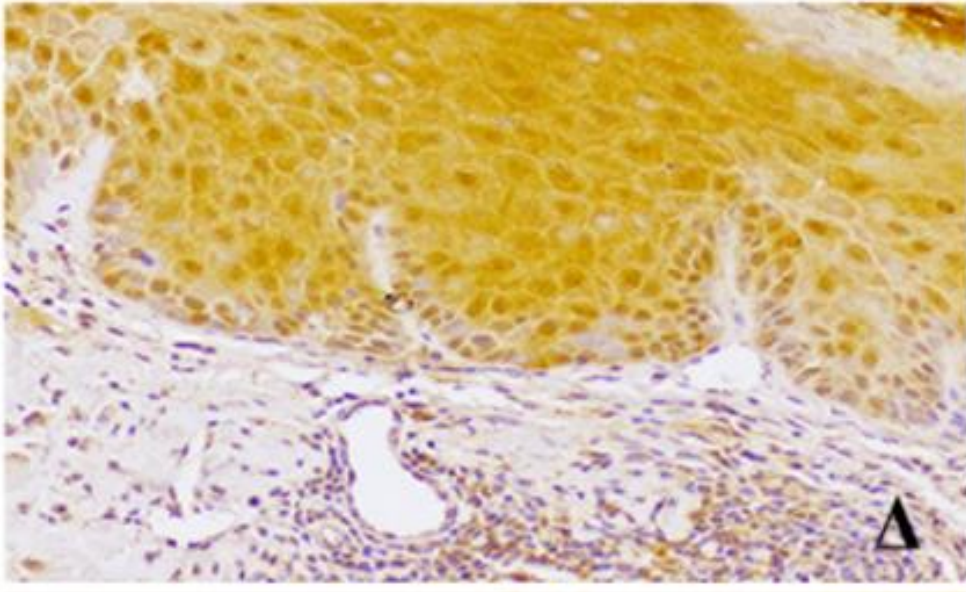
Εικόνα 24A: Ιστολογική φωτογραφία που απεικονίζει την κυτταροπλασματική και/ή πυρηνική ανοσοϊστοχημική έκφραση του μορίου TLR4 στα καρκινικά κύτταρα και την ανοσοϊστοχημική έκφραση στα φλεγμονώδη κύτταρα σε HPV (-) επιφανειακά διηθητικό ΑΚΓ της ομάδας Α (400X)



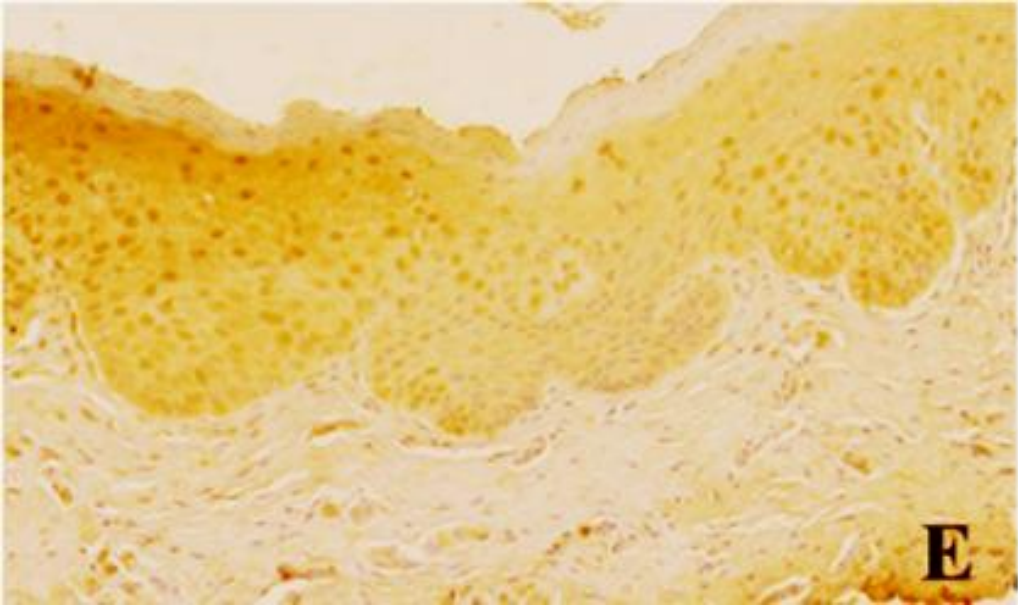
Εικόνα 24B: Ιστολογική φωτογραφία που απεικονίζει την κυτταροπλασματική και/ή πυρηνική ανοσοϊστοχημική έκφραση του μορίου TLR4 στα καρκινικά κύτταρα και την ανοσοϊστοχημική έκφραση στα φλεγμονώδη κύτταρα σε HPV (+) υψηλής διαφοροποίησης ΑΚΓ της ομάδας Β (200X)



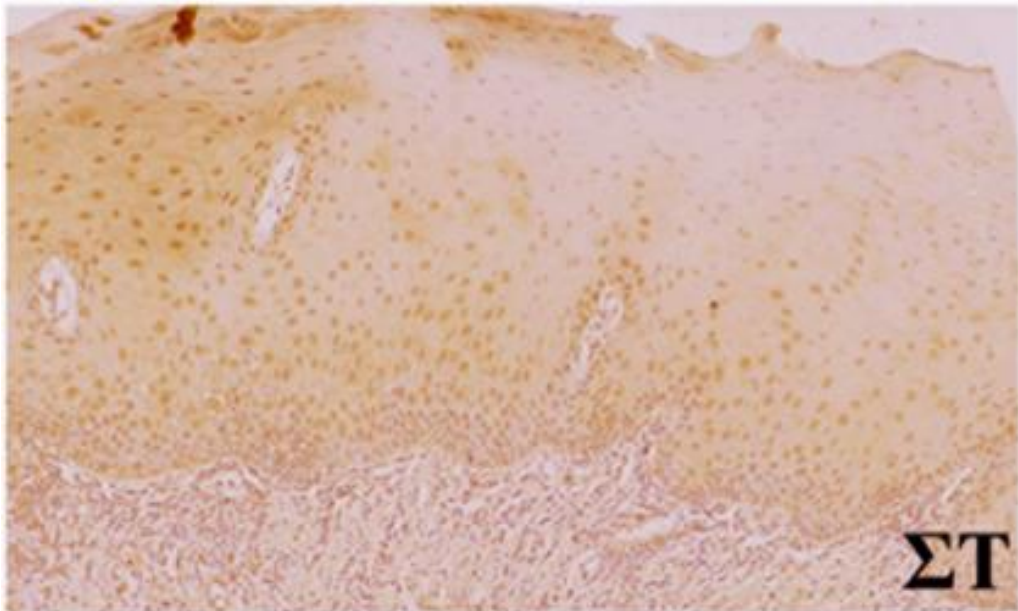
Εικόνα 24Γ: Ιστολογική φωτογραφία που απεικονίζει την κυτταροπλασματική και/ή πυρηνική ανοσοϊστοχημική έκφραση του μορίου TLR4 στα καρκινικά κύτταρα καθώς και την ανοσοϊστοχημική έκφραση στα φλεγμονώδη κύτταρα σε HPV (-) μέτριας διαφοροποίησης ΑΚΓ της ομάδας Γ (200X)



Εικόνα 24Δ: Ιστολογική φωτογραφία που απεικονίζει την κυτταροπλασματική και/ή πυρηνική ανοσοϊστοχημική έκφραση του μορίου TLR4 στα επιθηλιακά κύτταρα καθώς και την ανοσοϊστοχημική έκφραση στα υποεπιθηλιακά φλεγμονώδη κύτταρα του παρακείμενου μορφολογικά υγιούς επιθηλίου στο HPV (-) επιφανειακά διηθητικό ΑΚΓ της εικόνας 24Α (400X)



Εικόνα 24E: Ιστολογική φωτογραφία που απεικονίζει την κυτταροπλασματική και/ή πυρηνική ανοσοϊστοχημική έκφραση του μορίου TLR4 στα επιθηλιακά κύτταρα του παρακείμενου μορφολογικά υγιούς επιθηλίου στο HPV (+) υψηλής διαφοροποίησης ΑΚΓ της εικόνας 24B (200X)



Εικόνα 24ΣΤ: Ιστολογική φωτογραφία που απεικονίζει την κυτταροπλασματική και/ή πυρηνική ανοσοϊστοχημική έκφραση του μορίου TLR4 στα επιθηλιακά κύτταρα καθώς και την ανοσοϊστοχημική έκφραση στα υποεπιθηλιακά φλεγμονώδη κύτταρα του παρακείμενου μορφολογικά υγιούς επιθηλίου στο HPV (-) μέτριας διαφοροποίησης ΑΚΓ της εικόνας 24Γ (200X)

2.3.1.2 Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του μορίου TLR4

Σύγκριση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του μορίου TLR4 μεταξύ καρκινικού και παρακεείμενου μορφολογικά υγιή βλεννογόνου

Το μόριο TLR4 εκφράστηκε στο παρακεείμενο των όγκων μορφολογικά υγιές επιθήλιο καθώς και στο υποεπιθηλιακό φλεγμονώδες διήθημα σε όλες τις ομάδες (Εικόνες 24 Δ-ΣΤ). Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς την έκφραση του μορίου μεταξύ των διαφόρων ιστοπαθολογικών κατηγοριών είτε στο μορφολογικά υγιές επιθήλιο είτε στα υποεπιθηλιακά φλεγμονώδη κύτταρα (Πίνακας 17).

Χρησιμοποιώντας τη στατιστική δοκιμασία Wilcoxon Signed Ranks Test, η έκφραση του μορίου TLR4 εμφανίστηκε σημαντικά υψηλότερη στα καρκινικά κύτταρα και τα φλεγμονώδη κύτταρα των όγκων σε σύγκριση με τα επιθηλιακά κύτταρα και το υποεπιθηλιακό φλεγμονώδες διήθημα του παρακεείμενου μορφολογικά υγιούς βλεννογόνου σε κάθε ομάδα και στο σύνολο του δείγματος ($p < 0,001$) (Πίνακες 18Α και 18Β, Γράφημα 5)

Πίνακας 17: Ανοσοϊστοχημική έκφραση του μορίου TLR4 στα επιθηλιακά και φλεγμονώδη κύτταρα στον παρακείμενο των όγκων μορφολογικά υγιή βλεννογόνο και συσχέτιση με τις ιστοπαθολογικές κατηγορίες

		Ιστοπαθολογικές κατηγορίες				Σύνολο δείγματος (n = 63)
		Ομάδα Α (n = 14)	Ομάδα Β (n = 20)	Ομάδα Γ (n = 29)	P*	
Ανοσοϊστοχημικές παράμετροι στον παρακείμενο μορφολογικά υγιή βλεννογόνο						
TLR4						
Επιθηλιακά κύτταρα						
Ποσοστό θετικών κυττάρων	ΔM (Min - Max)	1,00 (0 - 1)	1,00 (0 - 2)	1,00 (0 - 2)	0,192	1,00 (0 - 2)
Ένταση χρώσης	ΔM (Min - Max)	1,00 (0 - 1)	1,00 (0 - 2)	1,00 (0 - 2)	0,246	1,00 (0 - 2)
Συνολικό άθροισμα	ΔM (Min - Max)	2,00 (0 - 2)	2,00 (0 - 4)	2,00 (0 - 3)	0,191	2,00 (0 - 4)
Υποεπιθηλιακά φλεγμονώδη κύτταρα						
Ποσοστό θετικών κυττάρων	ΔM (Min - Max)	0,00 (0 - 1)	0,00 (0 - 1)	1,00 (0 - 1)	0,075	0,00 (0 - 1)
Ένταση χρώσης	ΔM (Min - Max)	0,00 (0 - 1)	0,00 (0 - 1)	1,00 (0 - 1)	0,075	0,00 (0 - 1)
Συνολικό άθροισμα	ΔM (Min - Max)	0,00 (0 - 2)	0,00 (0 - 2)	2,00 (0 - 2)	0,075	0,00 (0 - 2)

*Kruskal - Wallis Test: Διάμεση τιμή

Πίνακας 18Α: Σύγκριση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του μορίου TLR4 σε επιθηλιακά και φλεγμονώδη κύτταρα μεταξύ καρκινικού και παρακείμενου μορφολογικά υγιούς βλεννογόνου

Ανοσοϊστοχημικές παράμετροι στον παρακείμενο μορφολογικά υγιή βλεννογόνο	Ιστοπαθολογικές κατηγορίες											
	Ομάδα Α						Ομάδα Β					
	(n = 14)						(n = 20)					
	Παρακείμενος μορφολογικά υγιής βλεννογόνος		Καρκινικός βλεννογόνος				Παρακείμενος μορφολογικά υγιής βλεννογόνος		Καρκινικός βλεννογόνος			
	ΔΜ	ΕΤ	ΔΜ	ΕΤ	Ρ*	ΔΜ	ΕΤ	ΔΜ	ΕΤ	Ρ*		
TLR4												
Επιθηλιακά κύτταρα												
Ποσοστό θετικών κυττάρων	1,00	(0 - 1)	1,00	(1 - 3)	0,004	1,00	(0 - 2)	2,50	(1 - 3)	0,001		
Ένταση χρώσης	1,00	(0 - 1)	1,00	(1 - 2)	0,008	1,00	(0 - 2)	1,00	(1 - 2)	0,021		
Συνολικό άθροισμα	2,00	(0 - 2)	2,00	(2 - 5)	0,006	2,00	(0 - 4)	4,00	(2 - 5)	0,001		
Φλεγμονώδη κύτταρα												
Ποσοστό θετικών κυττάρων	0,00	(0 - 1)	1,00	(0 - 3)	0,014	0,00	(0 - 1)	2,00	(1 - 3)	<0,001		
Ένταση χρώσης	0,00	(0 - 1)	1,00	(0 - 2)	0,015	0,00	(0 - 1)	1,00	(1 - 2)	<0,001		
Συνολικό άθροισμα	0,00	(0 - 2)	2,00	(0 - 5)	0,017	0,00	(0 - 2)	3,00	(2 - 5)	<0,001		

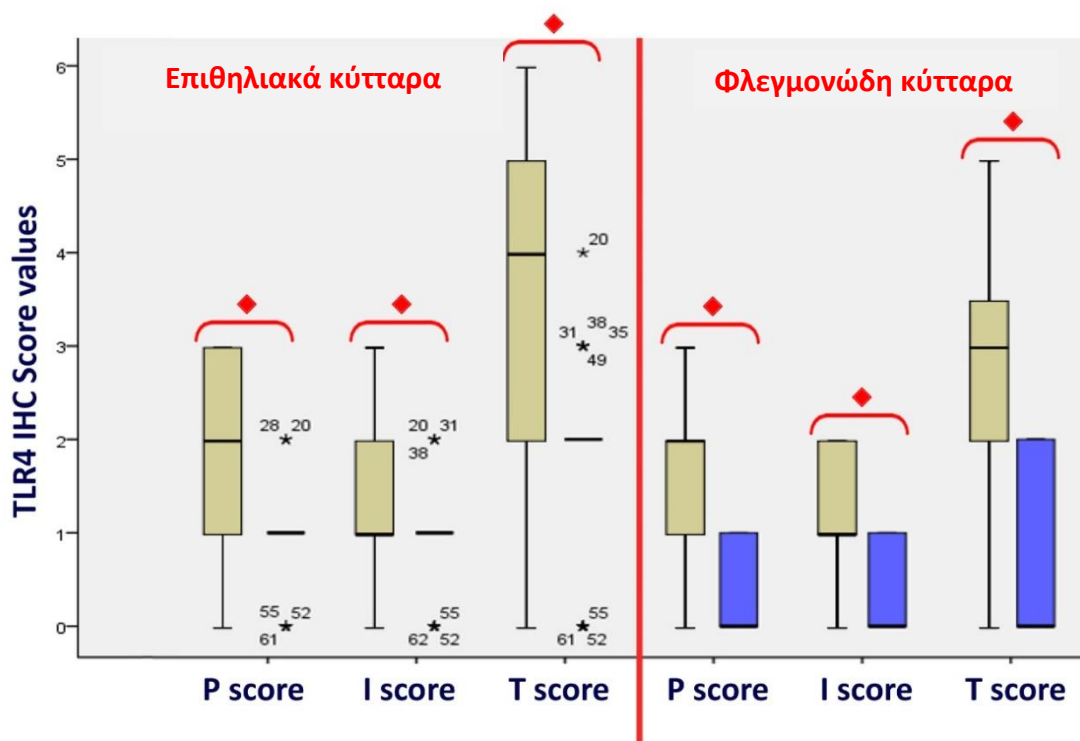
*Wilcoxon Signed Ranks Test ΔΜ: Διάμεση τιμή ΕΤ: Εύρος τιμών

Πίνακας 18B: Σύγκριση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του μορίου TLR4 σε επιθηλιακά και φλεγμονώδη κύτταρα μεταξύ καρκινικού και παρακείμενου μορφολογικά υγιούς βλεννογόνου

Ανοσοϊστοχημικές παράμετροι στον παρακείμενο μορφολογικά υγιή βλεννογόνο	Ιστοπαθολογικές κατηγορίες									
	Ομάδα Γ					Σύνολο δείγματος				
	(n = 29)					(n = 63)				
	Παρακείμενος μορφολογικά υγιής βλεννογόνος		Καρκινικός βλεννογόνος			Παρακείμενος μορφολογικά υγιής βλεννογόνος		Καρκινικός βλεννογόνος		
	ΔΜ	ΕΤ	ΔΜ	ΕΤ	ρ*	ΔΜ	ΕΤ	ΔΜ	ΕΤ	ρ*
TLR4										
Επιθηλιακά κύτταρα										
Ποσοστό θετικών κυττάρων	1,00	(0 - 2)	2,00	(0 - 3)	<0,001	1,00	(0 - 2)	2,00	(0 - 3)	<0,001
Ένταση χρώσης	1,00	(0 - 2)	1,00	(0 - 3)	<0,001	1,00	(0 - 2)	1,00	(0 - 3)	<0,001
Συνολικό άθροισμα	2,00	(0 - 3)	4,00	(0 - 6)	<0,001	2,00	(0 - 4)	4,00	(0 - 6)	<0,001
Φλεγμονώδη κύτταρα										
Ποσοστό θετικών κυττάρων	1,00	(0 - 1)	2,00	(0 - 2)	<0,001	0,00	(0 - 1)	2,00	(0 - 3)	<0,001
Ένταση χρώσης	1,00	(0 - 1)	1,00	(0 - 2)	<0,001	0,00	(0 - 1)	1,00	(0 - 2)	<0,001
Συνολικό άθροισμα	2,00	(0 - 2)	3,00	(0 - 4)	<0,001	0,00	(0 - 2)	3,00	(0 - 5)	<0,001

*Wilcoxon Signed Ranks Test ΔΜ: Διάμεση τιμή ΕΤ: Εύρος τιμών

Γράφημα 5: Διάγραμμα Box-Plot (θηκόγραμμα) που παρουσιάζει την κατανομή της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του μορίου TLR4 στα επιθηλιακά και φλεγμονώδη κύτταρα του καρκινικού (καφέ χρώμα) και του παρακείμενου μορφολογικά υγιούς βλεννογόνου (μπλε χρώμα) στο σύνολο του δείγματος {P:Percentage (ποσοστό θετικών κυττάρων), I: Intensity (ένταση χρώσης), T: Total score (συνολικό άθροισμα ποσοστού και έντασης χρώσης) \diamond $p < 0,001$ }



*Wilcoxon Signed Ranks Test

Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του μορίου TLR4 με τις ιστοπαθολογικές κατηγορίες

Καρκινικά κύτταρα

Με τη χρήση της στατιστικής δοκιμασίας Kruskal Wallis test πραγματοποιήθηκε σύγκριση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του μορίου TLR4 στα καρκινικά κύτταρα μεταξύ των διαφορετικών ιστοπαθολογικών κατηγοριών και διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τριών ομάδων (Α, Β και Γ) όσον αφορά στο ποσοστό των θετικών κυττάρων ($p=0,010$) και στο συνολικό άθροισμα (ποσοστού και έντασης χρώσης, $p=0,018$) αλλά όχι όσον αφορά στην ένταση της χρώσης ($p=0,262$) (Πίνακας 19, Γράφημα 6). Οι συγκρίσεις ανά ζεύγη που πραγματοποιήθηκαν με τη δοκιμασία Dunn's test αποκάλυψαν ότι σε σύγκριση με την ομάδα Α, οι ομάδες Β και Γ εμφάνισαν αύξηση ως προς το ποσοστό των θετικών κυττάρων ($p=0,007$ και $0,005$, αντίστοιχα) και το συνολικό άθροισμα (ποσοστού και έντασης χρώσης) ($p=0,018$ και $0,007$, αντίστοιχα) (Πίνακας 19).

Φλεγμονώδη κύτταρα των όγκων

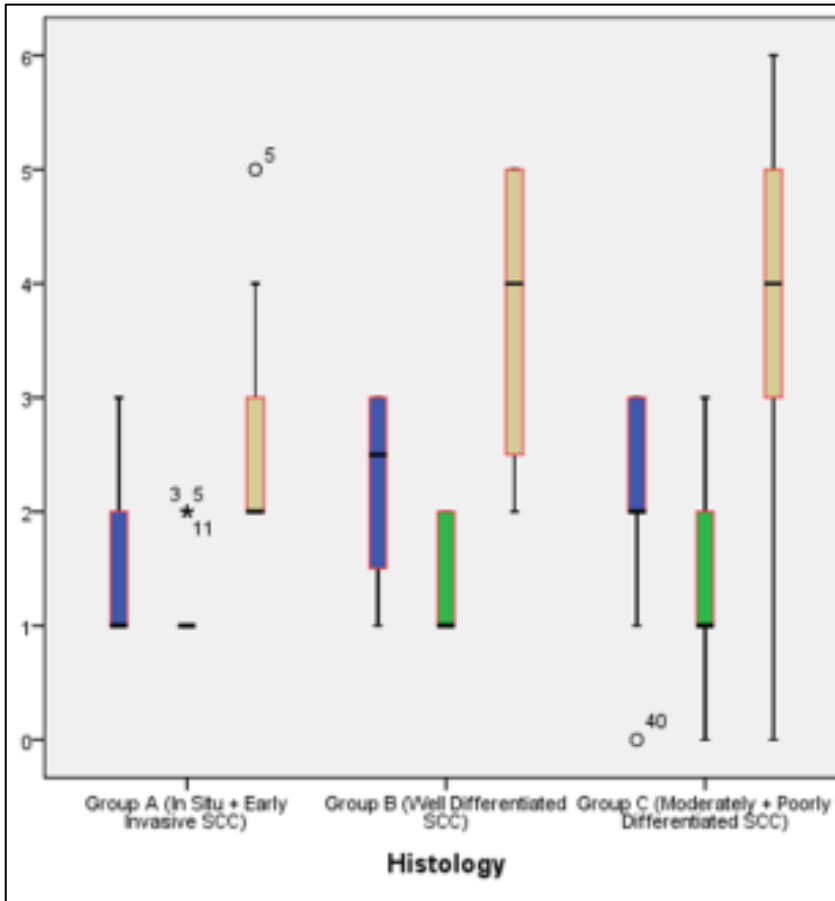
Σε ότι αφορά τα φλεγμονώδη κύτταρα των όγκων, στατιστικά σημαντική διαφορά παρατηρήθηκε μεταξύ των τριών ομάδων ως προς το ποσοστό των θετικών κυττάρων ($p<0,001$) και το συνολικό άθροισμά (ποσοστού και έντασης χρώσης) ($p=0,014$) (Πίνακας 19, Γράφημα 7). Η δοκιμασία Dunn's test αποκάλυψε στατιστικά σημαντική αύξηση του ποσοστού των θετικών κυττάρων από την ομάδα Α στην ομάδα Β ($p < 0,001$) και από την ομάδα Α στη ομάδα Γ ($p = 0,035$), ενώ παρατηρήθηκε μείωση από την ομάδα Β στη ομάδα Γ ($p=0,016$). Επίσης το συνολικό άθροισμα (ποσοστού και έντασης χρώσης) ήταν υψηλότερο στην ομάδα Β σε σχέση με την ομάδα Α ($p = 0,004$) (Πίνακας 19).

Πίνακας 19: Ανοσοϊστοχημική έκφραση του μορίου TLR4 στα καρκινικά και φλεγμονώδη κύτταρα και συσχέτιση με τις ιστοπαθολογικές κατηγορίες

		Ιστοπαθολογικές κατηγορίες											
		Ομάδα Α (n = 14)		Ομάδα Β (n = 20)		Ομάδα Γ (n = 29)		P*	Σύνολο δείγματος (n = 63)				
TLR4													
Καρκινικά κύτταρα											POST HOC ANALYSIS (DUNN'S TEST)		
Ποσοστό θετικών κυττάρων	ΔM (Min - Max)	1,00	(1 - 3)	2,50	(1 - 3)	2,00	(0 - 3)	0,010	2,00	(0 - 3)	A vs B: 0,007	A vs Γ: 0,005	B vs Γ: 0,910
Ένταση χρώσης	ΔM (Min - Max)	1,00	(1 - 2)	1,00	(1 - 2)	1,00	(0 - 3)	0,262	1,00	(0 - 3)			
Συνολικό άθροισμα	ΔM (Min - Max)	2,00	(2 - 5)	4,00	(2 - 5)	4,00	(0 - 6)	0,018	4,00	(0 - 6)	A vs B: 0,018	A vs Γ: 0,007	B vs Γ: 0,852
Φλεγμονώδη κύτταρα των όγκων													
Ποσοστό θετικών κυττάρων	ΔM (Min - Max)	1,00	(0 - 3)	2,00	(1 - 3)	2,00	(0 - 2)	<0,001	2,00	(0 - 3)	A vs B: <0,001	A vs Γ: 0,035	B vs Γ: 0,016
Ένταση χρώσης	ΔM (Min - Max)	1,00	(0 - 2)	1,00	(1 - 2)	1,00	(0 - 2)	0,144	1,00	(0 - 2)			
Συνολικό άθροισμα	ΔM (Min - Max)	2,00	(0 - 5)	3,00	(2 - 5)	3,00	(0 - 4)	0,014	3,00	(0 - 5)	A vs B: 0,004	A vs Γ: 0,099	B vs Γ: 0,099

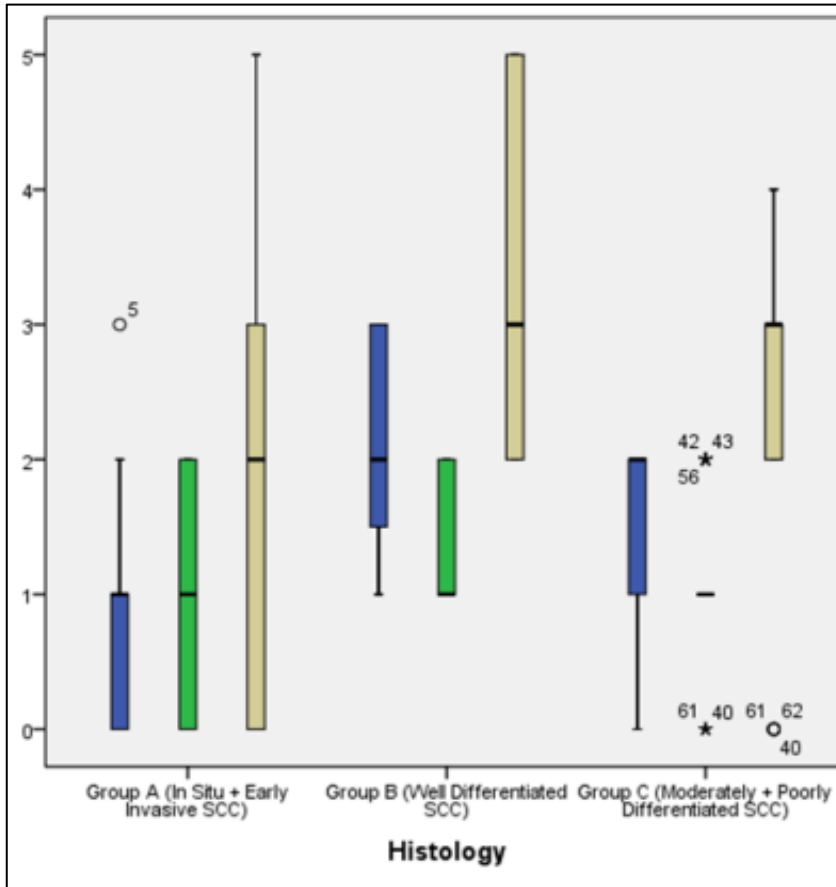
*Kruskal - Wallis Test, Post hoc analysis performed with the application of Dunn's test ΔM: Διάμεση τιμή

Γράφημα 6: Διάγραμμα Box-Plot (θηκόγραμμα) που παρουσιάζει την κατανομή της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του μορίου TLR4 στα καρκινικά κύτταρα των τριών ιστοπαθολογικών κατηγοριών {Ποσοστό θετικών κυττάρων (μπλε θηκόγραμμα) $P= 0,010$, Ένταση χρώσης (πράσινο θηκόγραμμα) $P=0,262$, Συνολικό άθροισμα ποσοστού και έντασης χρώσης (καφέ θηκόγραμμα) $P=0,018$ }



*Kruskal - Wallis Test

Γράφημα 7: Διάγραμμα Box-Plot (θηκόγραμμα) που παρουσιάζει την κατανομή της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του μορίου TLR4 στα φλεγμονώδη κύτταρα των τριών ιστοπαθολογικών κατηγοριών {Ποσοστό θετικών κυττάρων (μπλε θηκόγραμμα) $P < 0,001$, Ένταση χρώσης (πράσινο θηκόγραμμα) $P = 0,144$, Συνολικό άθροισμα ποσοστού και έντασης χρώσης (καφέ θηκόγραμμα) $P = 0,014$ }



*Kruskal - Wallis Test

Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του μορίου TLR4 με τις παραμέτρους του τροποποιημένου συστήματος Anneroth

Καρκινικά κύτταρα

Η ανοσοϊστοχημική θετικότητα του μορίου TLR4 μελετήθηκε σε σχέση με τις παραμέτρους του τροποποιημένου συστήματος Anneroth στα διηθητικά καρκινώματα (ομάδες Β και Γ). Θετική συσχέτιση βρέθηκε μεταξύ της έντασης της ανοσοϊστοχημικής χρώσης του TLR4 στα καρκινικά κύτταρα και του τύπου διήθησης ($RHO=0,378$, $p=0,007$) (Πίνακας 20).

Φλεγμονώδη κύτταρα των όγκων

Η ανοσοϊστοχημική έκφραση του μορίου TLR4 στα φλεγμονώδη κύτταρα των όγκων στις ομάδες Β και Γ, εμφάνισε αρνητική συσχέτιση του ποσοστού των θετικών φλεγμονωδών κυττάρων ($RHO = -0,419$, $p=0,003$), της έντασης χρώσης ($RHO=-0,375$, $p=0,008$) και του συνολικού αθροίσματος (ποσοστού και έντασης χρώσης) ($RHO=-0,393$, $p=0,005$) με τον αριθμό των μιώσεων των καρκινικών κυττάρων (Πίνακας 20).

Πίνακας 20: Συσχέτιση μεταξύ της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του μορίου TLR4 και των ιστοπαθολογικών παραμέτρων του τροποποιημένου συστήματος Anneroth

Ανοσοϊστοχημικές παραμέτροι	Παράμετροι τροποποιημένου συστήματος Anneroth – Ομάδες Β και Γ														
	Κερατινοποίηση			Πλειομορφία			Τύπος διήθησης			Φλεγμονή			Μιτώσεις		
	n	r*	p	N	r*	p	n	r*	p	n	r*	p	n	r*	P
TLR-4															
Καρκινικά κύτταρα															
Ποσοστό θετικών κυττάρων	49	0,096	0,512	49	0,107	0,462	49	0,108	0,462	49	0,189	0,192	49	-0,067	0,646
Ένταση χρώσης	49	0,114	0,435	49	0,148	0,310	49	0,378	0,007	49	0,101	0,490	49	0,054	0,715
Συνολικό άθροισμα	49	0,021	0,889	49	0,185	0,204	49	0,251	0,083	49	0,160	0,271	49	0,015	0,921
Φλεγμονώδη κύτταρα των όγκων															
Ποσοστό θετικών κυττάρων	49	0,242	0,094	49	0,202	0,165	49	0,229	0,113	49	0,042	0,776	49	-0,419	0,003
Ένταση χρώσης	49	0,235	0,104	49	0,126	0,387	49	0,208	0,151	49	0,066	0,654	49	-0,375	0,008
Συνολικό άθροισμα	49	0,165	0,257	49	0,148	0,311	49	0,209	0,149	49	0,022	0,878	49	-0,393	0,005

*Spearman's rho test

2.3.2.1 Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης του μορίου TLR9

Καρκινικά κύτταρα

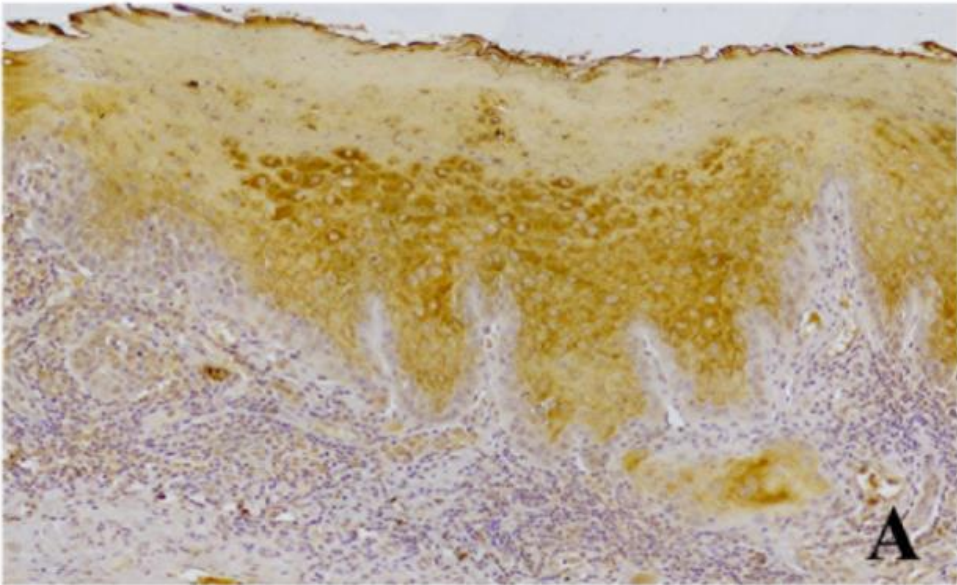
Το μόριο TLR9 εμφάνισε κυτταροπλασματική χρώση στα καρκινικά κύτταρα στο σύνολο των περιπτώσεων της μελέτης 63/63 (ποσοστό 100%), διαφορετικού ποσοστού θετικότητας κυττάρων και έντασης ανοσοϊστοχημικής χρώσης. Οι μέσες τιμές του ποσοστού των θετικών κυττάρων, της έντασης χρώσης και του συνολικού άθροισματος (ποσοστού και έντασης χρώσης) ήταν 2,03, 2,14, και 3,86, αντίστοιχα (Πίνακας 21) (Εικόνες 25 Α-Γ).

Φλεγμονώδη κύτταρα των όγκων

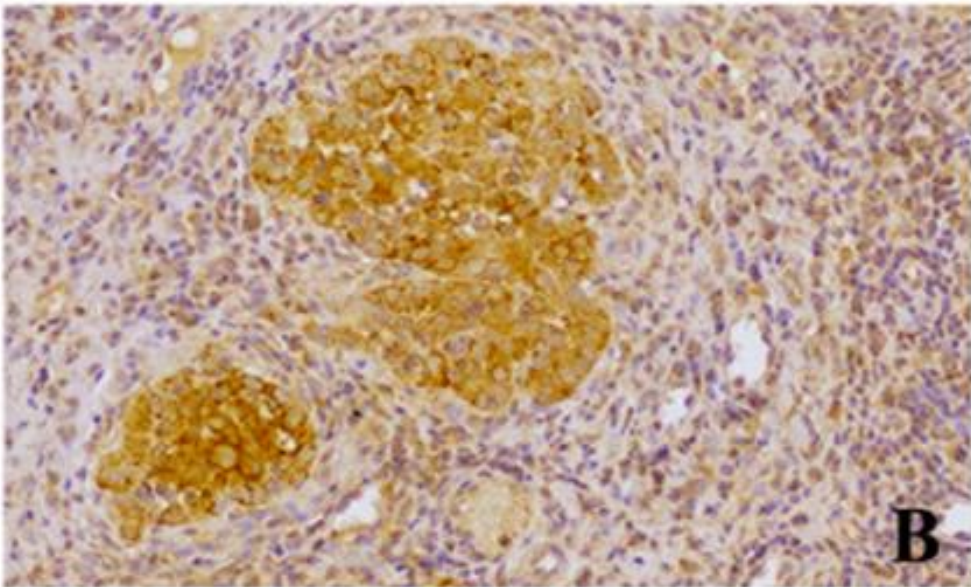
Στα φλεγμονώδη κύτταρα των όγκων το μόριο TLR9 εκφράστηκε σε 58/63 περιπτώσεις (ποσοστό 92%). Οι μέσες τιμές του ποσοστού των θετικών κυττάρων, της έντασης της χρώσης και του συνολικού άθροισματος (ποσοστού και έντασης χρώσης) ήταν 1,33, 1,03, και 2,32, αντίστοιχα (Πίνακας 21) (Εικόνες 25 Α-Γ).

Πίνακας 21: Συνοπτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του μορίου TLR9

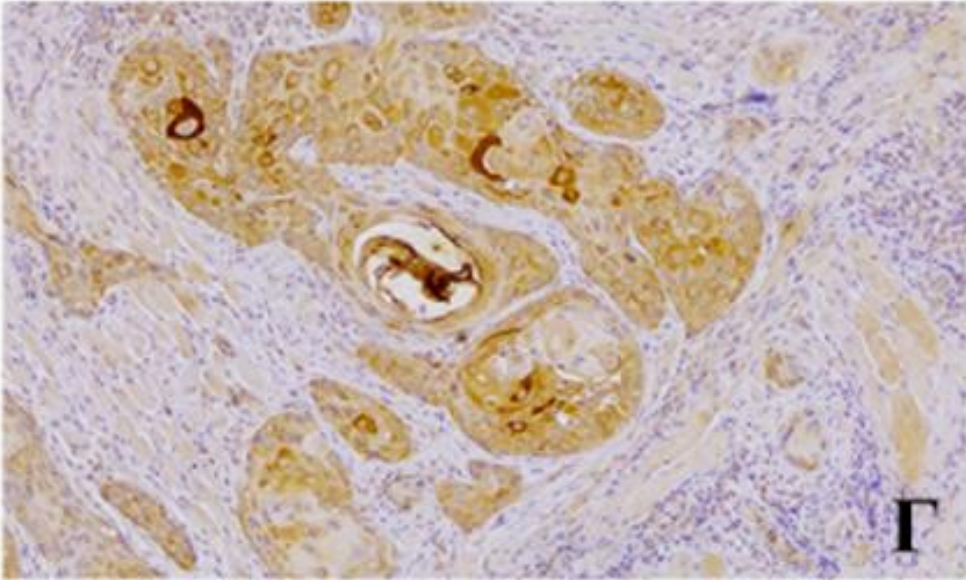
	ΟΜΑΔΑ Α (n=14)	ΟΜΑΔΑ Β (n=20)	ΟΜΑΔΑ Γ (n=29)	ΣΥΝΟΛΟ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ (n=63)
ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ				
Ποσοστό θετικών περιπτώσεων (%)	14/14(100%)	20/20(100%)	29/29(100%)	63/63(100%)
Ποσοστό θετικών κυττάρων (μέση τιμή και εύρος)	1,71 (1-3)	2,10 (1-3)	2,30 (1-3)	2,03 (1-3)
Ένταση χρώσης (μέση τιμή και εύρος)	1,57 (1-3)	2,80 (1-3)	2,06 (1-3)	2,14 (1-3)
Συνολικό άθροισμα (μέση τιμή και εύρος)	3,28 (2-6)	4,00 (2-6)	4,30 (2-6)	3,86 (2-6)
ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΩΝ ΟΓΚΩΝ				
Ποσοστό θετικών περιπτώσεων(%)	11/14 (78,5%)	19/20 (95%)	28/29 (96,5%)	58/63 (92%)
Ποσοστό θετικών κυττάρων (μέση τιμή και εύρος)	1,14 (0-3)	1,65 (0-3)	1,20 (0-2)	1,33 (0-3)
Ένταση χρώσης (μέση τιμή και εύρος)	0,92 (0-2)	1,15 (0-2)	1,03 (0-2)	1,03 (0-2)
Συνολικό άθροισμα (μέση τιμή και εύρος)	2,07 (0-5)	2,70 (0-5)	2,20 (0-4)	2,32 (0-5)



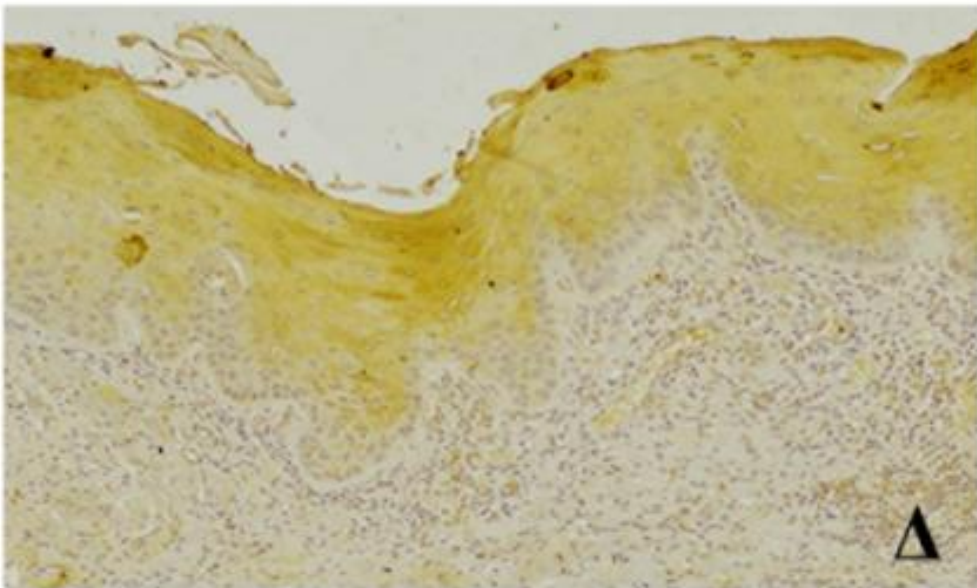
Εικόνα 25A: Ιστολογική φωτογραφία που απεικονίζει την κυτταροπλασματική ανοσοϊστοχημική έκφραση του μορίου TLR9 στα καρκινικά κύτταρα καθώς και την ανοσοϊστοχημική έκφραση στα φλεγμονώδη κύτταρα σε HPV (-) επιφανειακά διηθητικό ΑΚΓ της ομάδας Α (200X)



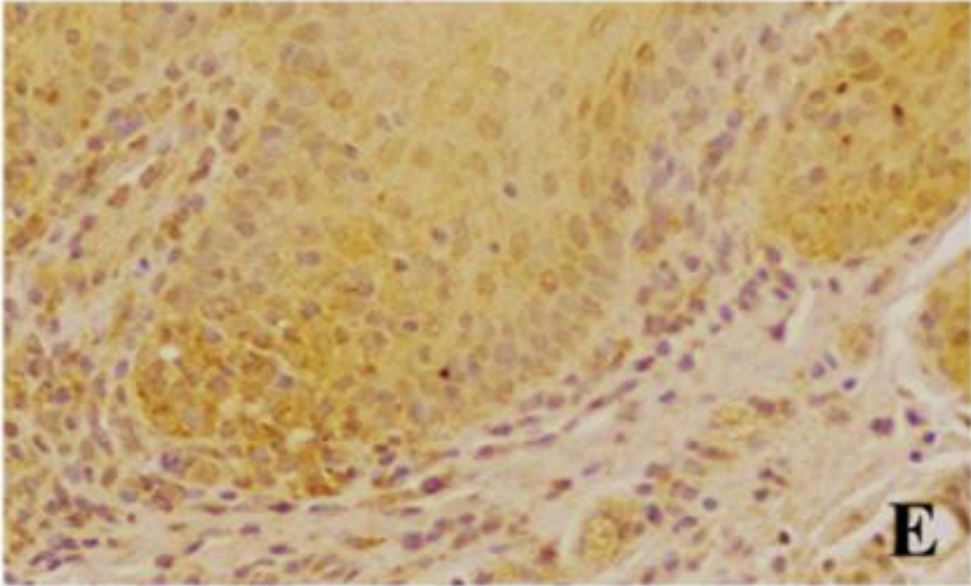
Εικόνα 25B: Ιστολογική φωτογραφία που απεικονίζει την κυτταροπλασματική ανοσοϊστοχημική έκφραση του μορίου TLR9 στα καρκινικά κύτταρα και την ανοσοϊστοχημική έκφραση στα φλεγμονώδη κύτταρα σε HPV (+) υψηλής διαφοροποίησης ΑΚΓ της ομάδας Β (400X)



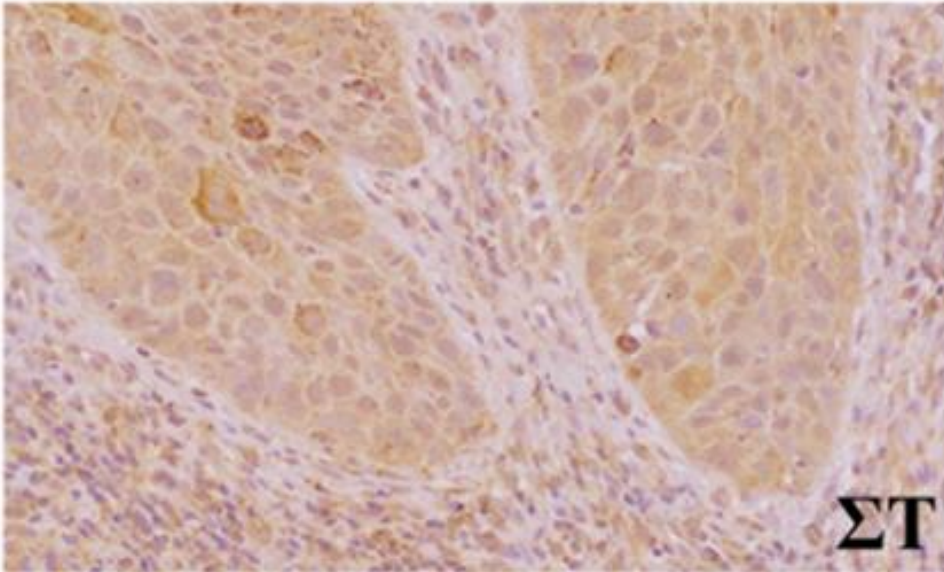
Εικόνα 25Γ: Ιστολογική φωτογραφία που απεικονίζει την κυτταροπλασματική ανοσοϊστοχημική έκφραση του μορίου TLR9 στα καρκινικά κύτταρα καθώς και την ανοσοϊστοχημική έκφραση στα φλεγμονώδη κύτταρα σε HPV (-) μέτριας διαφοροποίησης ΑΚΓ της ομάδας Γ (400X)



Εικόνα 25Δ: Ιστολογική φωτογραφία που απεικονίζει την κυτταροπλασματική ανοσοϊστοχημική έκφραση του μορίου TLR9 στο παρακείμενο μορφολογικά υγιές επιθήλιο και τα υποεπιθηλιακά φλεγμονώδη κύτταρα στο HPV (-) επιφανειακά διηθητικό ΑΚΓ της εικόνας 25Α (200X)



Εικόνα 25Ε: Ιστολογική φωτογραφία που απεικονίζει την κυτταροπλασματική ανοσοϊστοχημική έκφραση του μορίου TLR9 στο παρακείμενο μορφολογικά υγιές επιθήλιο και τα υποεπιθηλιακά φλεγμονώδη κύτταρα στο HPV (+) υψηλής διαφοροποίησης ΑΚΓ της Εικόνας 25Β (400X)



Εικόνα 25ΣΤ: Ιστολογική φωτογραφία που απεικονίζει την κυτταροπλασματική ανοσοϊστοχημική έκφραση του μορίου TLR9 στο παρακείμενο μορφολογικά υγιές επιθήλιο και τα υποεπιθηλιακά φλεγμονώδη κύτταρα στο HPV (-) μέτριας διαφοροποίησης ΑΚΓ της Εικόνας 25Γ (400X)

2.3.2.2 Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του μορίου TLR9

Σύγκριση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του μορίου TLR9 μεταξύ καρκινικού και παρακαείμενου μορφολογικά υγιή βλεννογόνου

Στον παρακαείμενο μορφολογικά υγιή βλεννογόνο, το μόριο TLR9 εκφράστηκε στα επιθηλιακά κύτταρα και το υποεπιθηλιακό φλεγμονώδες διήθημα σε όλες τις ομάδες, χωρίς στατιστικές σημαντικές διαφορές ανάμεσά τους (Πίνακας 22) (Εικόνα 25 Δ-ΣΤ). Στο σύνολο του δείγματος, όπως και σε κάθε ομάδα, η ανοσοϊστοχημική έκφραση του μορίου TLR9 ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερη στα καρκινικά και φλεγμονώδη κύτταρα των όγκων σε σχέση με τα επιθηλιακά και υποεπιθηλιακά φλεγμονώδη κύτταρα του παρακαείμενου μορφολογικά υγιούς βλεννογόνου (Πίνακες 23Α και 23Β)(Γράφημα 8).

Πίνακας 22: Ανοσοϊστοχημική έκφραση του μορίου TLR9 σε επιθηλιακά και φλεγμονώδη κύτταρα στο παρακείμενο των όγκων μορφολογικά υγιή βλεννογόνο και συσχέτιση με τις ιστοπαθολογικές κατηγορίες

		Ιστοπαθολογικές κατηγορίες				Σύνολο δείγματος (n = 63)
		Ομάδα Α (n = 14)	Ομάδα Β (n = 20)	Ομάδα Γ (n = 29)	P*	
Ανοσοϊστοχημικές παράμετροι στον παρακείμενο μορφολογικά υγιή βλεννογόνο						
TLR9						
Επιθηλιακά κύτταρα						
Ποσοστό θετικών κυττάρων	ΔΜ (Min - Max)	1,00 (0 - 2)	1,00 (0 - 2)	1,00 (0 - 2)	0,826	1,00 (0 - 2)
Ένταση χρώσης	ΔΜ (Min - Max)	1,00 (0 - 2)	1,00 (0 - 2)	1,00 (0 - 2)	0,925	1,00 (0 - 2)
Συνολικό άθροισμα	ΔΜ (Min - Max)	2,00 (0 - 4)	2,00 (0 - 4)	2,00 (0 - 4)	0,895	2,00 (0 - 4)
Υποεπιθηλιακά φλεγμονώδη κύτταρα						
Ποσοστό θετικών κυττάρων	ΔΜ (Min - Max)	0,00 (0 - 2)	0,00 (0 - 1)	1,00 (0 - 1)	0,183	0,00 (0 - 2)
Ένταση χρώσης	ΔΜ (Min - Max)	0,00 (0 - 1)	0,00 (0 - 1)	1,00 (0 - 1)	0,166	0,00 (0 - 1)
Συνολικό άθροισμα	ΔΜ (Min - Max)	0,00 (0 - 2)	0,00 (0 - 2)	2,00 (0 - 2)	0,166	0,00 (0 - 2)

*Kruskal - Wallis Test

ΔΜ: Διάμεση τιμή

Πίνακας 23A: Σύγκριση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του μορίου TLR9 σε επιθηλιακά και φλεγμονώδη κύτταρα μεταξύ καρκινικού και παρακείμενου μορφολογικά υγιούς βλεννογόνου

Ανοσοϊστοχημικές παράμετροι στον παρακείμενο μορφολογικά υγιή βλεννογόνο	Ιστοπαθολογικές κατηγορίες										
	Ομάδα Α						Ομάδα Β				
	(n = 14)						(n = 20)				
	Παρακείμενος μορφολογικά υγιής βλεννογόνος		Καρκινικός βλεννογόνος				Παρακείμενος μορφολογικά υγιής βλεννογόνος		Καρκινικός βλεννογόνος		
	ΔΜ	ΕΤ	ΔΜ	ΕΤ	p*	ΔΜ	ΕΤ	ΔΜ	ΕΤ	p*	
TLR9											
Επιθηλιακά κύτταρα											
Ποσοστό θετικών κυττάρων	1.00	(0 - 2)	1.00	(1 - 3)	0.008	1.00	(0 - 2)	2.00	(1 - 3)	0.001	
Ένταση χρώσης	1.00	(0 - 2)	1.50	(1 - 3)	0.029	1.00	(0 - 2)	1.50	(1 - 3)	0.003	
Συνολικό άθροισμα	2.00	(0 - 4)	2.50	(2 - 6)	0.013	2.00	(0 - 4)	4.00	(2 - 6)	0.001	
Φλεγμονώδη κύτταρα											
Ποσοστό θετικών κυττάρων	0.00	(0 - 2)	1.00	(0 - 3)	0.021	0.00	(0 - 1)	2.00	(0 - 3)	<0.001	
Ένταση χρώσης	0.00	(0 - 1)	1.00	(0 - 2)	0.011	0.00	(0 - 1)	1.00	(0 - 2)	<0.001	
Συνολικό άθροισμα	0.00	(0 - 2)	2.00	(0 - 5)	0.006	0.00	(0 - 2)	2.50	(0 - 5)	<0.001	

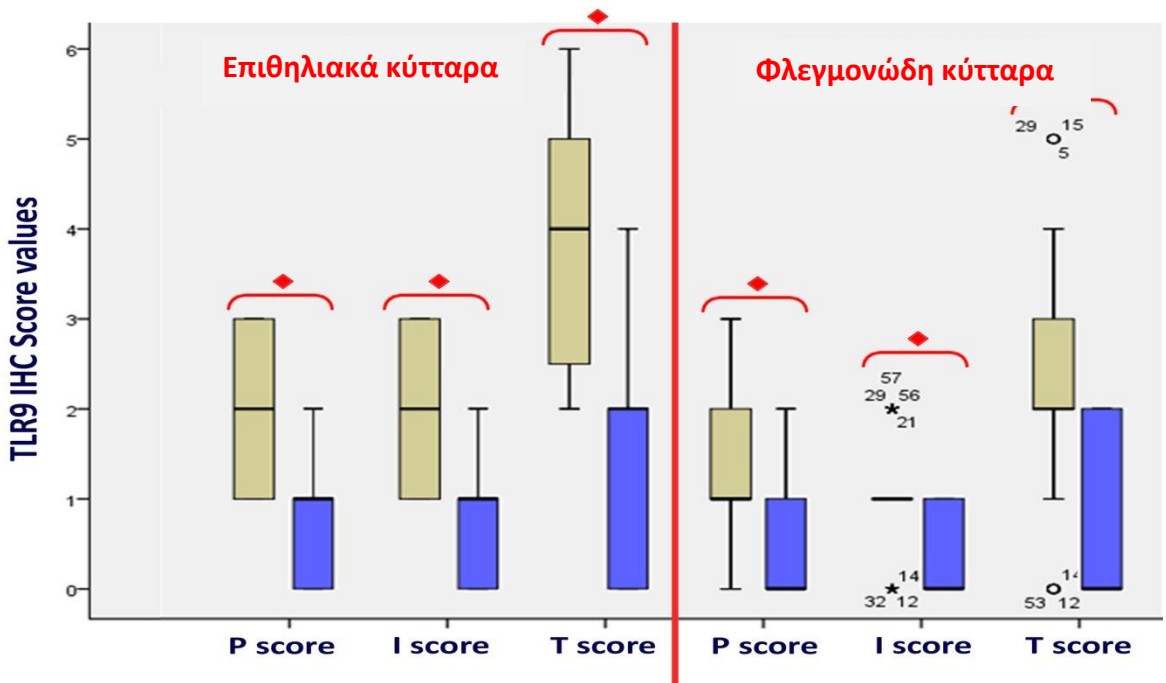
*Wilcoxon Signed Ranks Test. ΔΜ: Διάμεση τιμή ΕΤ: Εύρος τιμών

Πίνακας 23B: Σύγκριση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του μορίου TLR9 σε επιθηλιακά και φλεγμονώδη κύτταρα μεταξύ καρκινικού και παρακαίμενου μορφολογικά υγιούς βλεννογόνου

Ανοσοϊστοχημικές παράμετροι στον παρακαίμενο μορφολογικά υγιή βλεννογόνο	Ιστοπαθολογικές κατηγορίες										
	Ομάδα Γ						Σύνολο δείγματος				
	(n = 29)						(n = 63)				
	Παρακαίμενος μορφολογικά υγιής βλεννογόνος		Καρκινικός βλεννογόνος		p*	Παρακαίμενος μορφολογικά υγιής βλεννογόνος		Καρκινικός βλεννογόνος		p*	
ΔΜ	ΕΤ	ΔΜ	ΕΤ	ΔΜ		ΕΤ	ΔΜ	ΕΤ			
TLR9											
Επιθηλιακά κύτταρα											
Ποσοστό θετικών κυττάρων	1.00	(0 - 2)	3.00	(1 - 3)	<0.001	1.00	(0 - 2)	2.00	(1 - 3)	<0.001	
Ένταση χρώσης	1.00	(0 - 2)	2.00	(1 - 3)	<0.001	1.00	(0 - 2)	2.00	(1 - 3)	<0.001	
Συνολικό άθροισμα	2.00	(0 - 4)	5.00	(2 - 6)	<0.001	2.00	(0 - 4)	4.00	(2 - 6)	<0.001	
Φλεγμονώδη κύτταρα											
Ποσοστό θετικών κυττάρων	1.00	(0 - 1)	1.00	(0 - 2)	0.001	0.00	(0 - 2)	1.00	(0 - 3)	<0.001	
Ένταση χρώσης	1.00	(0 - 1)	1.00	(0 - 2)	0.001	0.00	(0 - 1)	1.00	(0 - 2)	<0.001	
Συνολικό άθροισμα	2.00	(0 - 2)	2.00	(0 - 4)	0.001	0.00	(0 - 2)	2.00	(0 - 5)	<0.001	

*Wilcoxon Signed Ranks Test. ΔΜ: Διάμεση τιμή ΕΤ: Εύρος τιμών

Γράφημα 8: Διάγραμμα Box-Plot (θηκόγραμμα) που παρουσιάζει την κατανομή της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του μορίου TLR9 στα επιθηλιακά και φλεγμονώδη κύτταρα του καρκινικού (καφέ χρώμα) και του παρακείμενου μορφολογικά υγιούς βλεννογόνου (μπλε χρώμα) στο σύνολο του δείγματος {P:Percentage (ποσοστό θετικών κυττάρων), I: Intensity (ένταση χρώσης), T: Total score (συνολικό άθροισμα ποσοστού και έντασης χρώσης) $\diamond p < 0,001$ }



*Wilcoxon Signed Ranks Test

Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του μορίου TLR9 με τις ιστοπαθολογικές κατηγορίες

Καρκινικά κύτταρα

Παρά το γεγονός ότι οι μέσες τιμές της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του μορίου TLR9 στα καρκινικά κύτταρα ήταν υψηλότερες στην ομάδα Β (μέση τιμή συνολικού αθροίσματος ποσοστού και έντασης χρώσης: 4,00) και στην ομάδα Γ (μέση τιμή συνολικού αθροίσματος ποσοστού και έντασης χρώσης: 4,30) σε σύγκριση με την ομάδα Α (μέση τιμή συνολικού αθροίσματος ποσοστού και έντασης χρώσης: 3,28) (Πίνακας 21), κατά την εφαρμογή του Kruskal Wallis test, δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τριών ομάδων (Πίνακας 24)(Γράφημα 9).

Φλεγμονώδη κύτταρα των όγκων

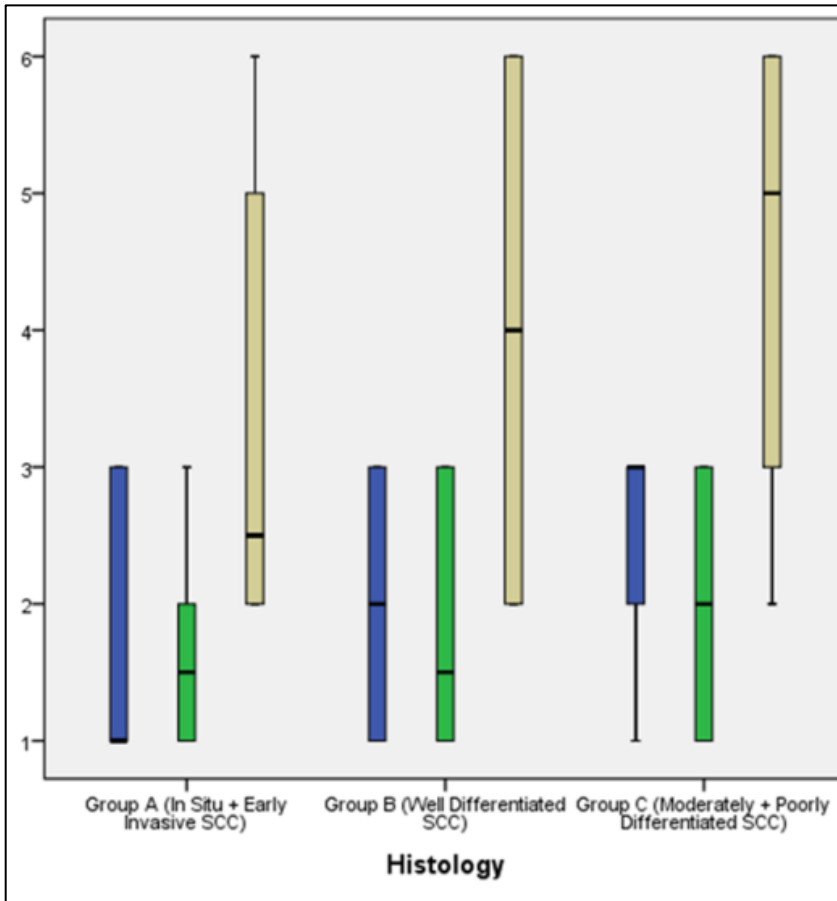
Στα φλεγμονώδη κύτταρα των όγκων στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τριών ομάδων βρέθηκε μόνο στο ποσοστό των θετικών κυττάρων ($p=0,039$) (Πίνακας 24)(Γράφημα 10). Με την εφαρμογή του Dunn's test διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντικά υψηλότερα ποσοστά θετικών κυττάρων στην ομάδα Β συγκριτικά με την ομάδα Α ($p=0,032$) και στην ομάδα Γ συγκριτικά με την ομάδα Β ($p=0,024$) (Πίνακας 24).

Πίνακας 24: Ανοσοϊστοχημική έκφραση του μορίου TLR9 στα καρκινικά και φλεγμονώδη κύτταρα και συσχέτιση με τις ιστοπαθολογικές κατηγορίες

		Ιστοπαθολογικές κατηγορίες									
		Ομάδα Α (n = 14)		Ομάδα Β (n = 20)		Ομάδα Γ (n = 29)		P*		Σύνολο δείγματος (n = 63)	
TLR9											
Καρκινικά κύτταρα											
Ποσοστό θετικών κυττάρων	ΔΜ (Min - Max)	1,00	(1 - 3)	2,00	(1 - 3)	3,00	(1 - 3)	0,117	2,00	(1 - 3)	
Ένταση χρώσης	ΔΜ (Min - Max)	1,50	(1 - 3)	1,50	(1 - 3)	2,00	(1 - 3)	0,194	2,00	(1 - 3)	
Συνολικό άθροισμα	ΔΜ (Min - Max)	2,50	(2 - 6)	4,00	(2 - 6)	5,00	(2 - 6)	0,078	4,00	(2 - 6)	
Φλεγμονώδη κύτταρα των όγκων											
POST HOC ANALYSIS (DUNN'S TEST)											
Ποσοστό θετικών κυττάρων	ΔΜ (Min - Max)	1,00	(0 - 3)	2,00	(0 - 3)	1,00	(0 - 2)	0,039	1,00	(0 - 3)	A vs B: 0,032
Ένταση χρώσης	ΔΜ (Min - Max)	1,00	(0 - 2)	1,00	(0 - 2)	1,00	(0 - 2)	0,233	1,00	(0 - 2)	A vs Γ: 0,770
Συνολικό άθροισμα	ΔΜ (Min - Max)	2,00	(0 - 5)	2,50	(0 - 5)	2,00	(0 - 4)	0,253	2,00	(0 - 5)	B vs Γ: 0,024

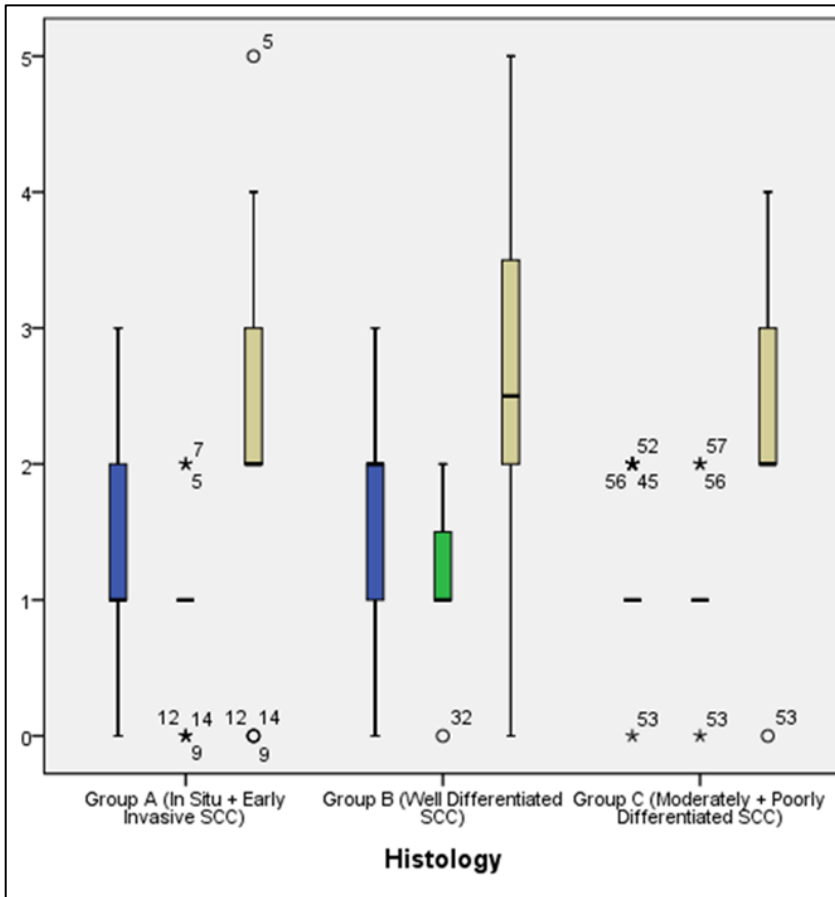
*Kruskal - Wallis test. Post hoc analysis was performed with the application of Dunn's test ΔΜ: Διάμεση τιμή

Γράφημα 9: Διάγραμμα Box-Plot (θηκόγραμμα) που παρουσιάζει την κατανομή της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του μορίου TLR9 στα καρκινικά κύτταρα των τριών ιστοπαθολογικών κατηγοριών {Ποσοστό θετικών κυττάρων (μπλε θηκόγραμμα) $P= 0,117$, Ένταση χρώσης (πράσινο θηκόγραμμα) $P=0,194$, Συνολικό άθροισμα ποσοστού και έντασης χρώσης (καφέ θηκόγραμμα) $P=0,078$ }



*Kruskal - Wallis Test

Γράφημα 10: Διάγραμμα Box-Plot (θηκόγραμμα) που παρουσιάζει την κατανομή της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του μορίου TLR9 στα φλεγμονώδη κύτταρα των τριών ιστοπαθολογικών κατηγοριών {Ποσοστό θετικών κυττάρων (μπλε θηκόγραμμα) $P= 0,039$, Ένταση χρώσης (πράσινο θηκόγραμμα) $P=0,233$, Συνολικό άθροισμα ποσοστού και έντασης χρώσης (καφέ θηκόγραμμα) $P=0,253$ }



*Kruskal - Wallis Test

Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του μορίου TLR9 με τις παραμέτρους του τροποποιημένου συστήματος Anneroth

Καρκινικά κύτταρα

Η ανοσοϊστοχημική έκφραση του μορίου TLR9 στα καρκινικά κύτταρα δεν εμφάνισε καμία συσχέτιση με τις παραμέτρους του τροποποιημένου συστήματος Anneroth στα διηθητικά ΑΚΓ της μελέτης (ομάδες Β και Γ) (Πίνακας 25).

Φλεγμονώδη κύτταρα των όγκων

Το ποσοστό των θετικών φλεγμονωδών κυττάρων των όγκων με ανοσοϊστοχημική έκφραση του μορίου TLR9 εμφάνισε αρνητική συσχέτιση με τις παραμέτρους της κερατινοποίησης ($RHO=-0,298$, $p=0,037$), του τύπου διήθησης ($RHO=-0,309$, $p=0,031$) και του αριθμού μιτώσεων ($RHO=-0,344$, $p=0,015$) (Πίνακας 25).

Πίνακας 25: Συσχέτιση μεταξύ της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του μορίου TLR9 και των ανοσοϊστοχημικών παραμέτρων του τροποποιημένου συστήματος Anperoth

Ανοσοϊστοχημικές παραμέτροι	Παράμετροι τροποποιημένου συστήματος Anperoth – Ομάδες Β και Γ																			
	Κερατινοποίηση			Πλειομορφία			Τύπος Διήθησης			Φλεγμονή			Μιτώσεις							
	n	r*	P	n	r*	p	n	r*	p	n	r*	P	n	r*	P					
TLR-9																				
Καρκινικά κύτταρα																				
Ποσοστό θετικών κυττάρων	49	-	0,085	0,563	49	-	0,204	0,159	49	-	0,068	0,642	49	-	0,101	0,491	49	-	0,124	0,396
Ένταση χρώσης	49	-	0,074	0,613	49	-	0,160	0,273	49	-	0,063	0,666	49	-	0,167	0,250	49	-	0,162	0,265
Συνολικό άθροισμα	49	-	0,109	0,458	49	-	0,192	0,187	49	-	0,066	0,654	49	-	0,142	0,329	49	-	0,145	0,321
Φλεγμονώδη κύτταρα των όγκων																				
Ποσοστό θετικών κυττάρων	49	-	0,298	0,037	49	-	0,190	0,190	49	-	0,309	0,031	49	-	0,011	0,939	49	-	0,344	0,015
Ένταση χρώσης	49	-	0,148	0,309	49	-	0,007	0,963	49	-	0,124	0,395	49	-	0,275	0,056	49	-	0,188	0,195
Συνολικό άθροισμα	49	-	0,166	0,255	49	-	0,128	0,382	49	-	0,181	0,212	49	-	0,151	0,300	49	-	0,221	0,127

*Spearman's rho test

2.3.3.1 Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης του μορίου NF-κΒ(ρ65)

Καρκινικά κύτταρα

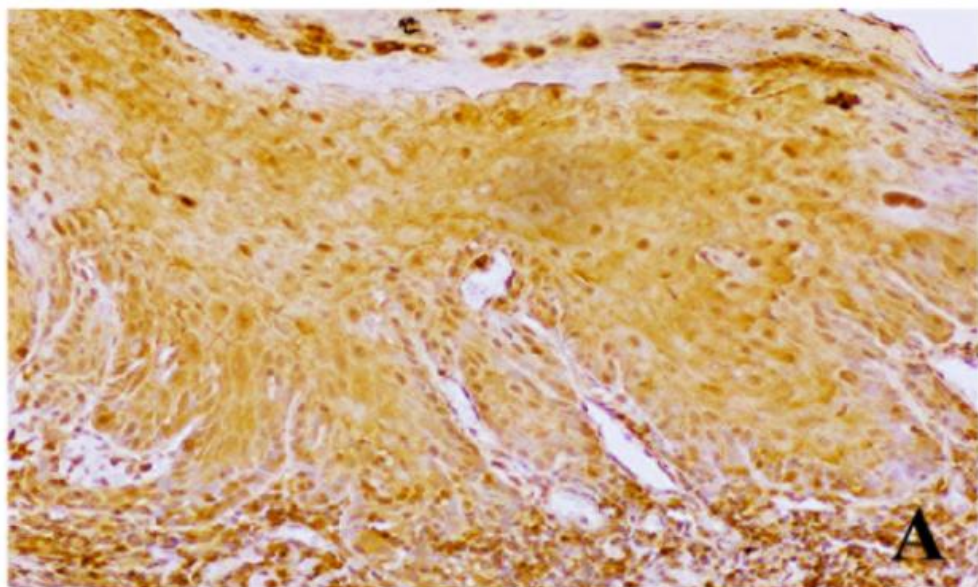
Ανοσοϊστοχημική θετικότητα του μορίου NF-κΒ(ρ65) διαπιστώθηκε στον πυρήνα και/ή στο κυτταρόπλασμα των καρκινικών κυττάρων και αξιολογήθηκε ξεχωριστά στα δύο αυτά κυτταρικά διαμερίσματα. Πυρηνική έκφραση του μορίου διαπιστώθηκε σε 42/63 περιπτώσεις (ποσοστό 66,6%) με μέση τιμή ποσοστού θετικών κυττάρων 1,03, μέση τιμή έντασης χρώσης 0,94 και μέση τιμή τελικού αθροίσματος (ποσοστού και έντασης χρώσης) 2,40. Κυτταροπλασματική έκφραση του μορίου παρατηρήθηκε σε 38/63 περιπτώσεις (ποσοστό 60,3%) και οι μέσες τιμές του ποσοστού των θετικών κυττάρων, της έντασης χρώσης και του συνολικού αθροίσματος (ποσοστού και έντασης χρώσης) ήταν 1,25, 0,97 και 2,46 αντίστοιχα (Πίνακας 26, Εικόνα 26Α-Γ).

Φλεγμονώδη κύτταρα των όγκων

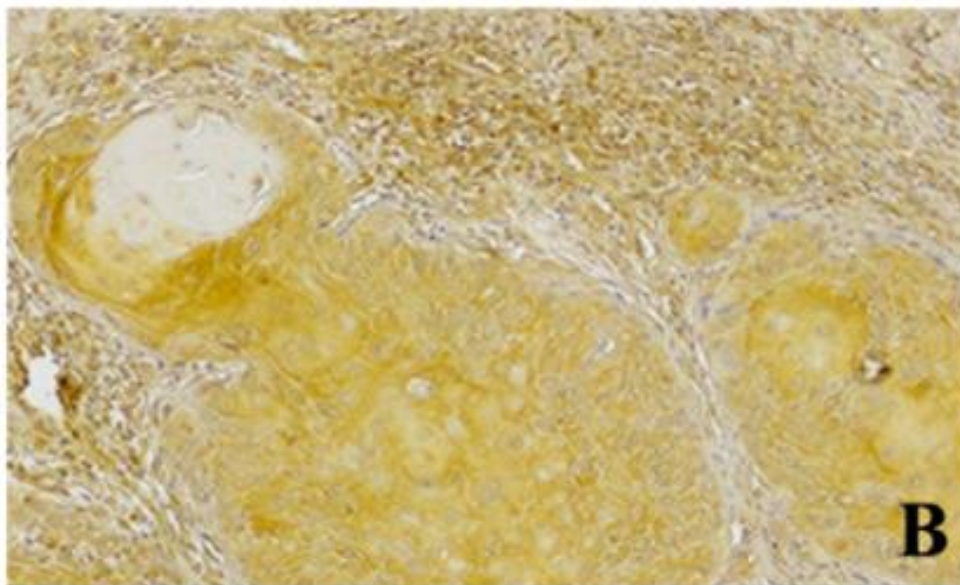
Στα φλεγμονώδη κύτταρα των όγκων ανοσοϊστοχημική έκφραση του μορίου NF-κΒ(ρ65) παρατηρήθηκε σε 54/63 περιπτώσεις (ποσοστό 85,7%). Οι μέσες τιμές του ποσοστού των θετικών κυττάρων, της έντασης χρώσης και του τελικού αθροίσματος (ποσοστού και έντασης χρώσης) ήταν 1,12, 1,01 και 2,10 αντίστοιχα (Πίνακας 26, Εικόνα 26 Α-Γ).

Πίνακας 26: Συνοπτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του μορίου NF-κΒ(ρ65)

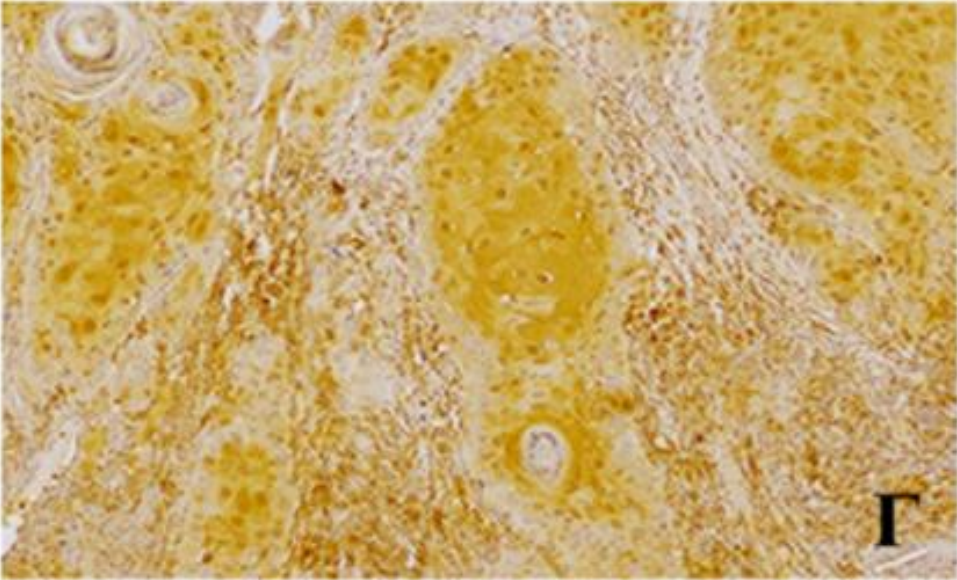
	ΟΜΑΔΑ Α (n=14)	ΟΜΑΔΑ Β (n=20)	ΟΜΑΔΑ Γ (n=29)	ΣΥΝΟΛΟ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ (n=63)
ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ – ΠΥΡΗΝΙΚΗ ΧΡΩΣΗ				
Ποσοστό θετικών περιπτώσεων (%)	5/14(35,7%)	11/20 (55%)	26/29(89,6%)	42/63(66,6%)
Ποσοστό θετικών κυττάρων (μέση τιμή και εύρος)	0,42 (0-2)	1,1 (0-2)	1,58 (0-3)	1,03 (0-3)
Ένταση χρώσης (μέση τιμή και εύρος)	0,42 (0-2)	0,9 (0-2)	1,51 (0-3)	0,94 (0-3)
Συνολικό άθροισμα (μέση τιμή και εύρος)	0,85 (0-3)	1,45 (0-3)	4,90 (0-5)	2,40 (0-5)
ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ – ΚΥΤΤΑΡΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ ΧΡΩΣΗ				
Ποσοστό θετικών περιπτώσεων (%)	3/14 (21,4%)	15/20 (75%)	20/29 (68,9%)	38/63 (60,3%)
Ποσοστό θετικών κυττάρων (μέση τιμή και εύρος)	0,35 (0-2)	1,70 (0-3)	1,72 (0-3)	1,25 (0-3)
Ένταση χρώσης (μέση τιμή και εύρος)	0,35 (0-2)	1,40 (0-3)	1,17 (0-2)	0,97 (0-3)
Συνολικό άθροισμα (μέση τιμή και εύρος)	0,71 (0-4)	3,10 (0-6)	3,58 (0-5)	2,46 (0-6)
ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΩΝ ΟΓΚΩΝ				
Ποσοστό θετικών περιπτώσεων (%)	11/14(78,5%)	17/20(85%)	26/29 (89,6%)	54/63 (85,7)
Ποσοστό θετικών κυττάρων (μέση τιμή και εύρος)	0,85 (0-2)	1,10 (0-2)	1,41 (0-2)	1,12 (0-2)
Ένταση χρώσης (μέση τιμή και εύρος)	0,85 (0-2)	0,95 (0-2)	1,24 (0-2)	1,01 (0-2)
Συνολικό άθροισμα (μέση τιμή και εύρος)	1,57 (0-4)	2,05 (0-4)	2,68 (0-4)	2,10 (0-4)



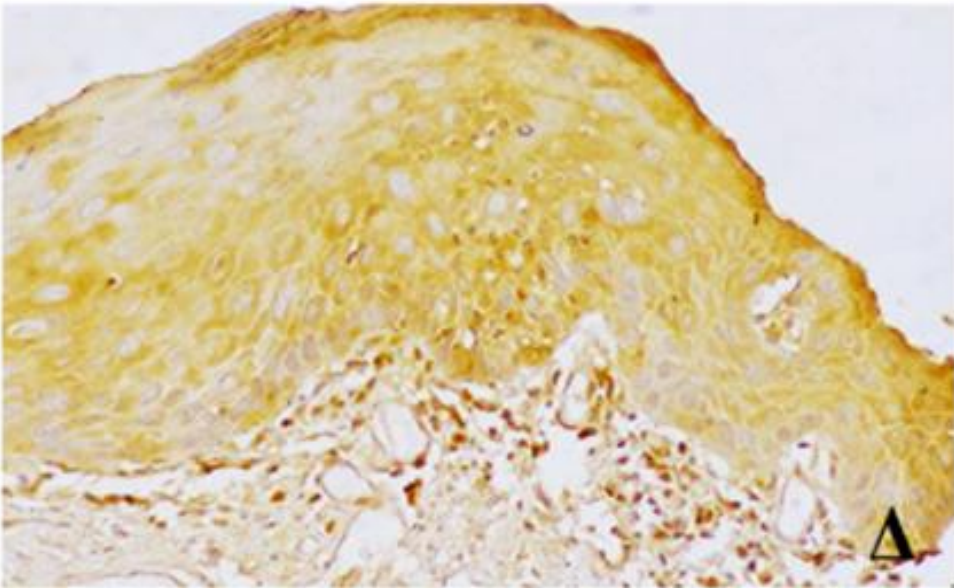
Εικόνα 26A: Ιστολογική φωτογραφία που απεικονίζει την κυτταροπλασματική και/ή πυρηνική ανοσοϊστοχημική έκφραση του μορίου NF-κB(p65) στα καρκινικά κύτταρα και την ανοσοϊστοχημική έκφραση στα φλεγμονώδη κύτταρα σε HPV (-) καρκίνωμα in situ της ομάδας A (400X)



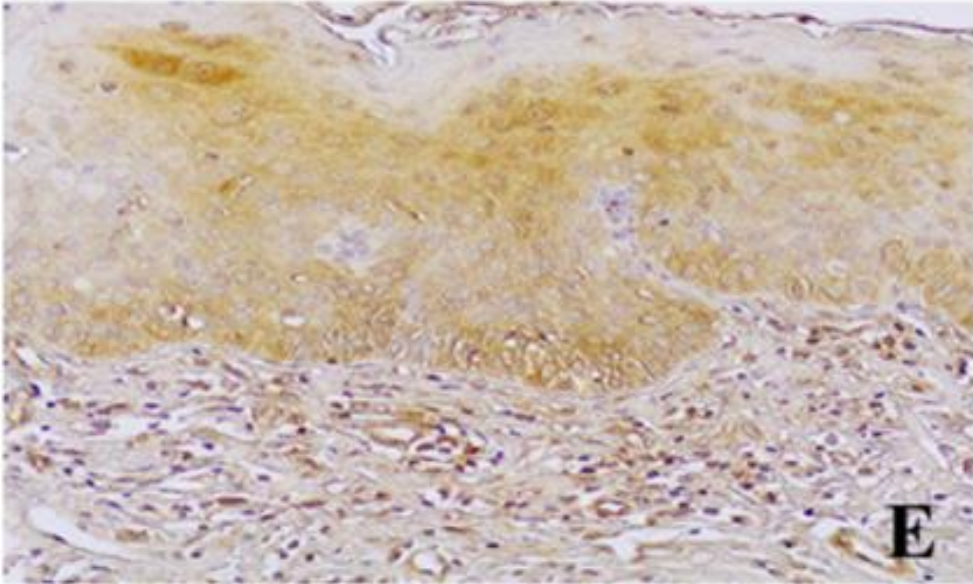
Εικόνα 26B: Ιστολογική φωτογραφία που απεικονίζει την κυτταροπλασματική ανοσοϊστοχημική έκφραση του μορίου NF-κB(p65) στα καρκινικά κύτταρα και την ανοσοϊστοχημική έκφραση στα φλεγμονώδη κύτταρα σε HPV (-) υψηλής διαφοροποίησης ΑΚΓ της ομάδας Β (400X)



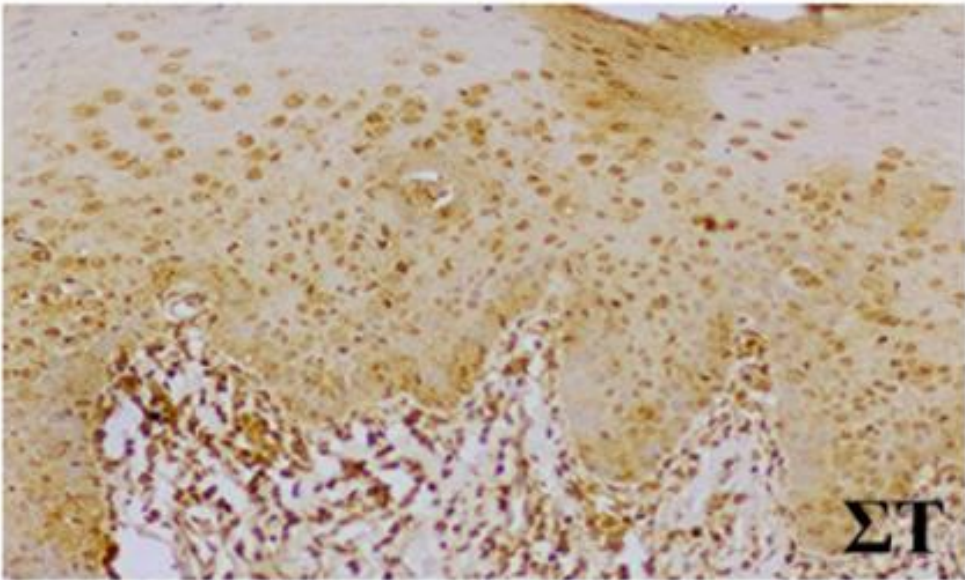
Εικόνα 26Γ: Ιστολογική φωτογραφία που απεικονίζει την κυτταροπλασματική και/ή πυρηνική ανοσοϊστοχημική έκφραση του μορίου NF-κB(p65) στα καρκινικά κύτταρα καθώς και την ανοσοϊστοχημική έκφραση στα φλεγμονώδη κύτταρα σε HPV (+) μέτριας διαφοροποίησης ΑΚΓ της ομάδας Γ (400X)



Εικόνα 26Δ: Ιστολογική φωτογραφία που απεικονίζει την κυτταροπλασματική και/ή πυρηνική ανοσοϊστοχημική έκφραση του μορίου NF-κB(p65) στα επιθηλιακά κύτταρα και την ανοσοϊστοχημική έκφραση στα υποεπιθηλιακά φλεγμονώδη κύτταρα του παρακείμενου μορφολογικά υγιούς επιθηλίου στο HPV (-) καρκίνωμα in situ της Εικόνας 26A (400X)



Εικόνα 26E: Ιστολογική φωτογραφία που απεικονίζει την κυτταροπλασματική ανοσοϊστοχημική έκφραση του μορίου NF-κB(p65) στα επιθηλιακά κύτταρα και την ανοσοϊστοχημική έκφραση στα υποεπιθηλιακά φλεγμονώδη κύτταρα του παρακείμενου μορφολογικά υγιούς επιθηλίου στο HPV (-) υψηλής διαφοροποίησης ΑΚΓ της Εικόνας 24B (400X)



Εικόνα 26ΣΤ: Ιστολογική φωτογραφία που απεικονίζει την κυτταροπλασματική ή/και πυρηνική ανοσοϊστοχημική έκφραση του μορίου NF-κB(p65) στα επιθηλιακά κύτταρα και την ανοσοϊστοχημική έκφραση στα υποεπιθηλιακά φλεγμονώδη κύτταρα του παρακείμενου μορφολογικά υγιούς επιθηλίου στο HPV (+) μέτριας διαφοροποίησης ΑΚΓ της Εικόνας 24Γ (400X)

2.3.3.2 Στατιστική ανάλυση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του μορίου NF-κΒ(p65)

Σύγκριση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του μορίου NF-κΒ(p65) μεταξύ καρκινικού και παρακείμενου μορφολογικά υγιούς βλεννογόνου

Στον παρακείμενο μορφολογικά υγιή βλεννογόνο ανοσοϊστοχημική έκφραση του μορίου NF-κΒ(p65) παρατηρήθηκε στα επιθηλιακά κύτταρα (στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα) και στο υποεπιθηλιακό φλεγμονώδες διήθημα σε όλες τις ομάδες (Εικόνα 26 Δ-ΣΤ) παρουσιάζοντας στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τριών ομάδων ως προς την πυρηνική έκφραση της χρώσης στα επιθηλιακά κύτταρα καθώς και την έκφραση της χρώσης στο υποεπιθηλιακό φλεγμονώδες διήθημα. Υψηλότερα επίπεδα έκφρασης διαπιστώθηκαν στην ομάδα Γ (τόσο όσον αφορά την πυρηνική χρώση των επιθηλιακών κυττάρων όσο και τη χρώση των φλεγμονωδών κυττάρων), συγκριτικά με τις ομάδες Α και Β (Πίνακας 27)

Με τη χρήση της στατιστικής δοκιμασίας Wilcoxon Signed Ranks Test, οι τιμές πυρηνικής και κυτταροπλασματικής ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του μορίου NF-κΒ(p65) βρέθηκαν στατιστικά σημαντικά υψηλότερες στα καρκινικά κύτταρα συγκριτικά με τα επιθηλιακά κύτταρα του παρακείμενου μορφολογικά υγιούς βλεννογόνου στο σύνολο του δείγματος όπως και στις ομάδες Β και Γ όσον αφορά την κυτταροπλασματική έκφραση και στο σύνολο του δείγματος και στην ομάδα Γ όσον αφορά την πυρηνική έκφραση (Πίνακες 28Α και 28Β)(Γράφημα 11). Ομοίως η ανοσοϊστοχημική έκφραση του μορίου NF-κΒ(p65) ήταν ως επί το πλείστον υψηλότερη στα φλεγμονώδη κύτταρα των όγκων σε σύγκριση με τα υποεπιθηλιακά φλεγμονώδη κύτταρα του παρακείμενου μορφολογικά υγιούς βλεννογόνου σε κάθε ομάδα και στο σύνολο του δείγματος (Πίνακες 28Α και 28Β)(Γράφημα 11).

Πίνακας 27: Ανοσοϊστοχημική έκφραση του μορίου NFκB(p65) στα επιθηλιακά και φλεγμονώδη κύτταρα του παρακείμενου μορφολογικά υγιή βλεννογόνου και συσχέτιση με τις ιστοπαθολογικές κατηγορίες

		Ιστοπαθολογικές κατηγορίες						Σύνολο δείγματος (n = 63)		
		Ομάδα Α (n = 14)		Ομάδα Β (n = 20)		Ομάδα Γ (n = 29)			P*	
Ανοσοϊστοχημικές παράμετροι στο παρακείμενο μορφολογικά υγιή βλεννογόνο										
NF-κB										
Επιθηλιακά κύτταρα (Πυρήνας)										
Ποσοστό θετικών κυττάρων	ΔM (Min - Max)	0,00	(0 - 1)	0,00	(0 - 2)	1,00	(0 - 1)	0,021	1,00	(0 - 2)
Ένταση χρώσης	ΔM (Min - Max)	0,00	(0 - 1)	0,00	(0 - 2)	1,00	(0 - 2)	0,030	1,00	(0 - 2)
Συνολικό άθροισμα	ΔM (Min - Max)	0,00	(0 - 2)	0,00	(0 - 4)	2,00	(0 - 3)	0,030	2,00	(0 - 4)
Επιθηλιακά κύτταρα (Κυτταρόπλασμα)										
Ποσοστό θετικών κυττάρων	ΔM (Min - Max)	0,00	(0 - 2)	0,00	(0 - 2)	0,00	(0 - 1)	0,711	0,00	(0 - 2)
Ένταση χρώσης	ΔM (Min - Max)	0,00	(0 - 2)	0,00	(0 - 2)	0,00	(0 - 2)	0,702	0,00	(0 - 2)
Συνολικό άθροισμα	ΔM (Min - Max)	0,00	(0 - 4)	0,00	(0 - 4)	0,00	(0 - 3)	0,700	0,00	(0 - 4)
Υποεπιθηλιακά φλεγμονώδη κύτταρα										
Ποσοστό θετικών κυττάρων	ΔM (Min - Max)	0,00	(0 - 1)	0,00	(0 - 1)	1,00	(0 - 1)	0,003	0,00	(0 - 1)
Ένταση χρώσης	ΔM (Min - Max)	0,00	(0 - 1)	0,00	(0 - 1)	1,00	(0 - 1)	0,003	0,00	(0 - 1)
Συνολικό άθροισμα	ΔM (Min - Max)	0,00	(0 - 2)	0,00	(0 - 2)	2,00	(0 - 2)	0,003	0,00	(0 - 2)

*Kruskal - Wallis Test ΔM: Διάμεση τιμή

Πίνακας 28Α: Σύγκριση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του μορίου NF-κΒ(ρ65) σε επιθηλιακά και φλεγμονώδη κύτταρα μεταξύ καρκινικού και παρακείμενου μορφολογικά υγιή βλεννογόνου

Ανοσοϊστοχημικές παράμετροι	Ιστοπαθολογικές κατηγορίες										
	Ομάδα Α (n = 14)						Ομάδα Β (n = 20)				
	Παρακείμενος μορφολογικά υγιής βλεννογόνος		Καρκινικός βλεννογόνος				Παρακείμενος μορφολογικά υγιής βλεννογόνος		Καρκινικός βλεννογόνος		
	ΔΜ	ΕΤ	ΔΜ	ΕΤ	Ρ*	ΔΜ	ΕΤ	ΔΜ	ΕΤ	Ρ*	
NF-κΒ											
Επιθηλιακά κύτταρα (πυρήνας)											
Ποσοστό θετικών κυττάρων	0.00	(0 - 1)	0.00	(0 - 2)	1.000	0.00	(0 - 2)	1.00	(0 - 2)	0.248	
Ένταση χρώσης	0.00	(0 - 1)	0.00	(0 - 2)	1.000	0.00	(0 - 2)	1.00	(0 - 2)	0.087	
Συνολικό άθροισμα	0.00	(0 - 2)	0.00	(0 - 3)	1.000	0.00	(0 - 4)	2.00	(0 - 3)	0.093	
Επιθηλιακά κύτταρα (Κυτταρόπλασμα)											
Ποσοστό θετικών κυττάρων	0.00	(0 - 2)	0.00	(0 - 2)	0.564	0.00	(0 - 2)	2.00	(0 - 3)	0.001	
Ένταση χρώσης	0.00	(0 - 2)	0.00	(0 - 2)	0.564	0.00	(0 - 2)	2.00	(0 - 3)	0.010	
Συνολικό άθροισμα	0.00	(0 - 4)	0.00	(0 - 4)	0.564	0.00	(0 - 4)	4.00	(0 - 6)	0.002	
Φλεγμονώδη κύτταρα											
Ποσοστό θετικών κυττάρων	0.00	(0 - 1)	1.00	(0 - 2)	0.013	0.00	(0 - 1)	1.00	(0 - 2)	<0.001	
Ένταση χρώσης	0.00	(0 - 1)	1.00	(0 - 2)	0.013	0.00	(0 - 1)	1.00	(0 - 2)	<0.001	
Συνολικό άθροισμα	0.00	(0 - 2)	2.00	(0 - 4)	0.023	0.00	(0 - 2)	2.00	(0 - 4)	<0.001	

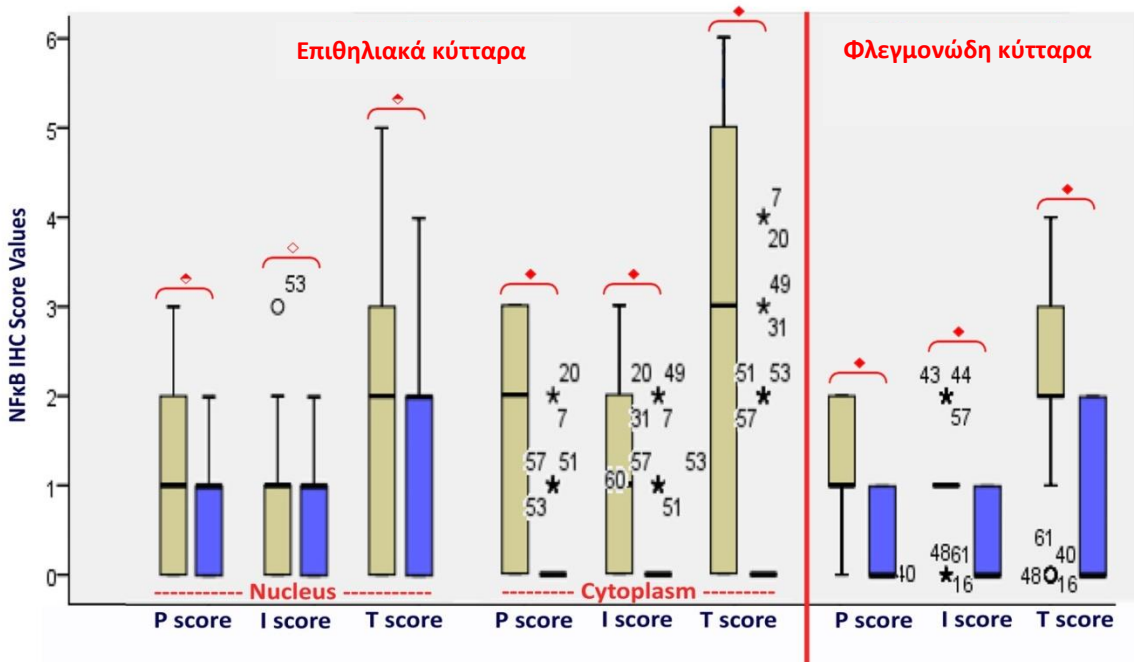
*Wilcoxon Signed Ranks Test ΔΜ: Διάμεση τιμή ΕΤ: Εύρος τιμών

Πίνακας 28B: Σύγκριση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του μορίου NF-κΒ(p65) σε επιθηλιακά και φλεγμονώδη κύτταρα μεταξύ καρκινικού και παρακείμενου μορφολογικά υγιή βλεννογόνου

Ανοσοϊστοχημικές παράμετροι	Ιστοπαθολογικές κατηγορίες									
	Ομάδα Γ (n = 29)					Σύνολο δείγματος (n = 63)				
	Παρακείμενος μορφολογικά υγιής βλεννογόνος		Καρκινικός βλεννογόνος			Παρακείμενος μορφολογικά υγιής βλεννογόνος		Καρκινικός βλεννογόνος		
	ΔΜ	ΕΤ	ΔΜ	ΕΤ	p*	ΔΜ	ΕΤ	ΔΜ	ΕΤ	p*
NF-κΒ										
Επιθηλιακά κύτταρα (πυρήνας)										
Ποσοστό θετικών κυττάρων	1.00	(0 - 1)	2.00	(0 - 3)	0.001	1.00	(0 - 2)	1.00	(0 - 3)	0.001
Ένταση χρώσης	1.00	(0 - 2)	1.00	(0 - 3)	0.014	1.00	(0 - 2)	1.00	(0 - 3)	0.006
Συνολικό άθροισμα	2.00	(0 - 3)	3.00	(0 - 5)	0.002	2.00	(0 - 4)	2.00	(0 - 5)	0.001
Επιθηλιακά κύτταρα (Κυτταρόπλασμα)										
Ποσοστό θετικών κυττάρων	0.00	(0 - 1)	2.00	(0 - 3)	<0.001	0.00	(0 - 2)	2.00	(0 - 3)	<0.001
Ένταση χρώσης	0.00	(0 - 2)	1.00	(0 - 2)	<0.001	0.00	(0 - 2)	1.00	(0 - 3)	<0.001
Συνολικό άθροισμα	0.00	(0 - 3)	3.00	(0 - 5)	<0.001	0.00	(0 - 4)	3.00	(0 - 6)	<0.001
Φλεγμονώδη κύτταρα										
Ποσοστό θετικών κυττάρων	1.00	(0 - 1)	2.00	(0 - 2)	0.001	0.00	(0 - 1)	1.00	(0 - 2)	<0.001
Ένταση χρώσης	1.00	(0 - 1)	1.00	(0 - 2)	0.003	0.00	(0 - 1)	1.00	(0 - 2)	<0.001
Συνολικό άθροισμα	2.00	(0 - 2)	3.00	(0 - 4)	0.001	0.00	(0 - 2)	2.00	(0 - 4)	<0.001

*Wilcoxon Signed Ranks Test ΔΜ: Διάμεση τιμή ΕΤ: Εύρος τιμών

Γράφημα 11: Διάγραμμα Box-Plot (θηκόγραμμα) που παρουσιάζει την κατανομή της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του μορίου NF-κΒ στα επιθηλιακά και φλεγμονώδη κύτταρα του καρκινικού (καφέ χρώμα) και του παρακείμενου μορφολογικά υγιούς βλεννογόνου (μπλε χρώμα) στο σύνολο του δείγματος {P:Percentage (ποσοστό θετικών κυττάρων), I: Intensity (ένταση χρώσης), T: Total score (συνολικό άθροισμα ποσοστού και έντασης χρώσης) κόκκινος ρόμβος ◊: $p < 0,001$, μισός ρόμβος ◊: $p = 0,001$, λευκός ρόμβος ◊: $p = 0,006$ }



*Wilcoxon Signed Ranks Test

Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του μορίου NF-κB(p65) με τις ιστοπαθολογικές κατηγορίες

Καρκινικά κύτταρα

Πυρηνική ανοσοϊστοχημική έκφραση του μορίου NF-κB(p65) παρατηρήθηκε συχνότερα στις περιπτώσεις της ομάδας Γ (26/29, ποσοστό 89,6%) , ακολουθούμενη από την ομάδα Β (11/20, ποσοστό 55%) και την ομάδα Α(5/14, ποσοστό 37,7%) (Πίνακας 26). Η στατιστική δοκιμασία Kruskal Wallis test κατέδειξε ότι υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά της πυρηνικής έκφρασης του μορίου NF-κB(p65) στα καρκινικά κύτταρα μεταξύ των τριών ομάδων όσον αφορά το ποσοστό των θετικών κυττάρων ($p < 0,001$), την ένταση της χρώσης ($p = 0,007$) και του συνολικού άθροισματος (ποσοστού και έντασης χρώσης) ($p = 0,001$). Η εφαρμογή του Dunn's test έδειξε ότι το ποσοστό των θετικών κυττάρων και το συνολικό άθροισμα (ποσοστού και έντασης χρώσης) ήταν υψηλότερα στην ομάδα Γ σε σύγκριση με την ομάδα Α ($p < 0,001$ και για τα δύο) και την ομάδα Β ($p < 0,001$ και $p = 0,018$, αντίστοιχα). Υψηλότερες τιμές έντασης χρώσης παρατηρήθηκαν επίσης στην ομάδα Γ σε σύγκριση με την ομάδα Α ($p = 0,002$)(Πίνακας 29).

Κυτταροπλασματική ανοσοϊστοχημική έκφραση του μορίου NF-κB(p65) παρατηρήθηκε συχνότερα στις περιπτώσεις της ομάδας Β (15/20, ποσοστό 75%) και στην ομάδα Γ (20/29, ποσοστό 68,9%) σε σχέση με την ομάδα Α (3/4, ποσοστό 21,4%) όπου παρατηρήθηκαν χαμηλότερες τιμές (Πίνακας 26). Στατιστικά σημαντική διαφορά παρατηρήθηκε μεταξύ των τριών ομάδων ως προς το ποσοστό των θετικών κυττάρων ($p = 0,002$), την ένταση της χρώσης ($p = 0,004$) και το συνολικό άθροισμα (ποσοστού και έντασης χρώσης)($p = 0,003$)(Kruskal-Wallis test). Η δοκιμασία Dunn's test έδειξε ότι το ποσοστό των θετικών κυττάρων, η ένταση της χρώσης και το συνολικό άθροισμα (ποσοστού και έντασης χρώσης) ήταν υψηλότερα στην ομάδα Β σε σύγκριση με την ομάδα Α ($p = 0,002$, $p = 0,001$ και $p = 0,002$, αντίστοιχα) και στην ομάδα Γ συγκριτικά με την ομάδα Α ($p = 0,001$, $p = 0,009$ και $p = 0,002$, αντίστοιχα) (Πίνακας 29).

Φλεγμονώδη κύτταρα των όγκων

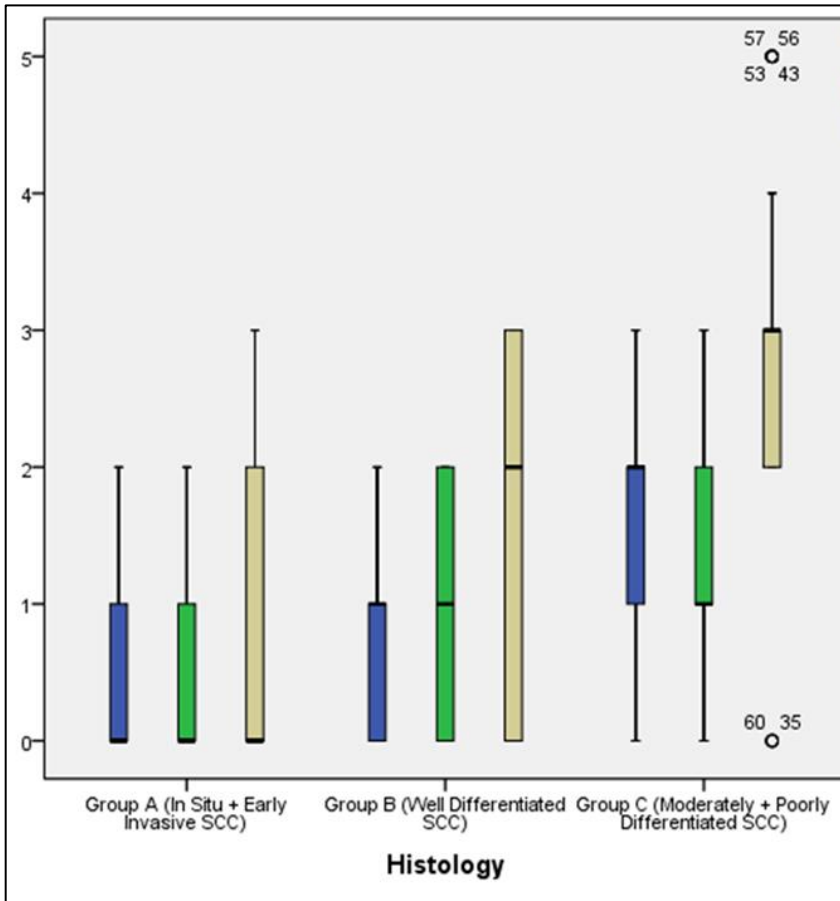
Με την εφαρμογή της στατιστικής δοκιμασίας Kruskal Wallis test, στατιστικά σημαντική διαφορά παρατηρήθηκε στα φλεγμονώδη κύτταρα μεταξύ των τριών ομάδων ως προς το ποσοστό των θετικών κυττάρων ($p = 0,022$) και το συνολικό άθροισμα (ποσοστού και έντασης χρώσης) ($p = 0,007$) της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του μορίου NF-κB(p65). Και οι δύο ομάδες τιμών ήταν υψηλότερες στην ομάδα Γ σε σχέση με την ομάδα Α ($p = 0,007$ και $p = 0,002$, αντίστοιχα) (Dunn's test) (Πίνακας 29).

Πίνακας 29: Ανοσοϊστοχημική έκφραση του μορίου NF-κΒ(p65) σε καρκινικά και φλεγμονώδη κύτταρα των όγκων και συσχέτιση με τις ιστοπαθολογικές κατηγορίες

Ιστοπαθολογικές κατηγορίες													
		Ομάδα Α (n = 14)		Ομάδα Β (n = 20)		Ομάδα Γ (n = 29)		P*	Σύνολο δείγματος (n = 63)	POST HOC ANALYSIS (DUNN'S TEST)			
NF-κΒ													
Καρκινικά κύτταρα (Πυρήνας)													
Ποσοστά θετικών κυττάρων	ΔΜ (Min - Max)	0,00	(0 - 2)	1,00	(0 - 2)	2,00	(0 - 3)	<0,001	1,00	(0 - 3)	A vs B: 0,503	A vs Γ: <0,001	B vs Γ: <0,001
Ένταση χρώσης	ΔΜ (Min - Max)	0,00	(0 - 2)	1,00	(0 - 2)	1,00	(0 - 3)	0,007	1,00	(0 - 3)	A vs B: 0,085	A vs Γ: 0,002	B vs Γ: 0,165
Συνολικό άθροισμα	ΔΜ (Min - Max)	0,00	(0 - 3)	2,00	(0 - 3)	3,00	(0 - 5)	0,001	2,00	(0 - 5)	A vs B: 0,187	A vs Γ: <0,001	B vs Γ: 0,018
Καρκινικά κύτταρα (Κυτταρόπλασμα)													
Ποσοστά θετικών κυττάρων	ΔΜ (Min - Max)	0,00	(0 - 2)	2,00	(0 - 3)	2,00	(0 - 3)	0,002	2,00	(0 - 3)	A vs B: 0,002	A vs Γ: 0,001	B vs Γ: 0,920
Ένταση χρώσης	ΔΜ (Min - Max)	0,00	(0 - 2)	2,00	(0 - 3)	1,00	(0 - 2)	0,004	1,00	(0 - 3)	A vs B: 0,001	A vs Γ: 0,009	B vs Γ: 0,357
Συνολικό άθροισμα	ΔΜ (Min - Max)	0,00	(0 - 4)	4,00	(0 - 6)	3,00	(0 - 5)	0,003	3,00	(0 - 6)	A vs B: 0,002	A vs Γ: 0,002	B vs Γ: 0,821
Φλεγμονώδη κύτταρα των όγκων													
Ποσοστά θετικών κυττάρων	ΔΜ (Min - Max)	1,00	(0 - 2)	1,00	(0 - 2)	2,00	(0 - 2)	0,022	1,00	(0 - 2)	A vs B: 0,195	A vs Γ: 0,007	B vs Γ: 0,150
Ένταση χρώσης	ΔΜ (Min - Max)	1,00	(0 - 2)	1,00	(0 - 2)	1,00	(0 - 2)	0,089	1,00	(0 - 2)			
Συνολικό άθροισμα	ΔΜ (Min - Max)	2,00	(0 - 4)	2,00	(0 - 4)	3,00	(0 - 4)	0,007	2,00	(0 - 4)	A vs B: 0,127	A vs Γ: 0,002	B vs Γ: 0,105

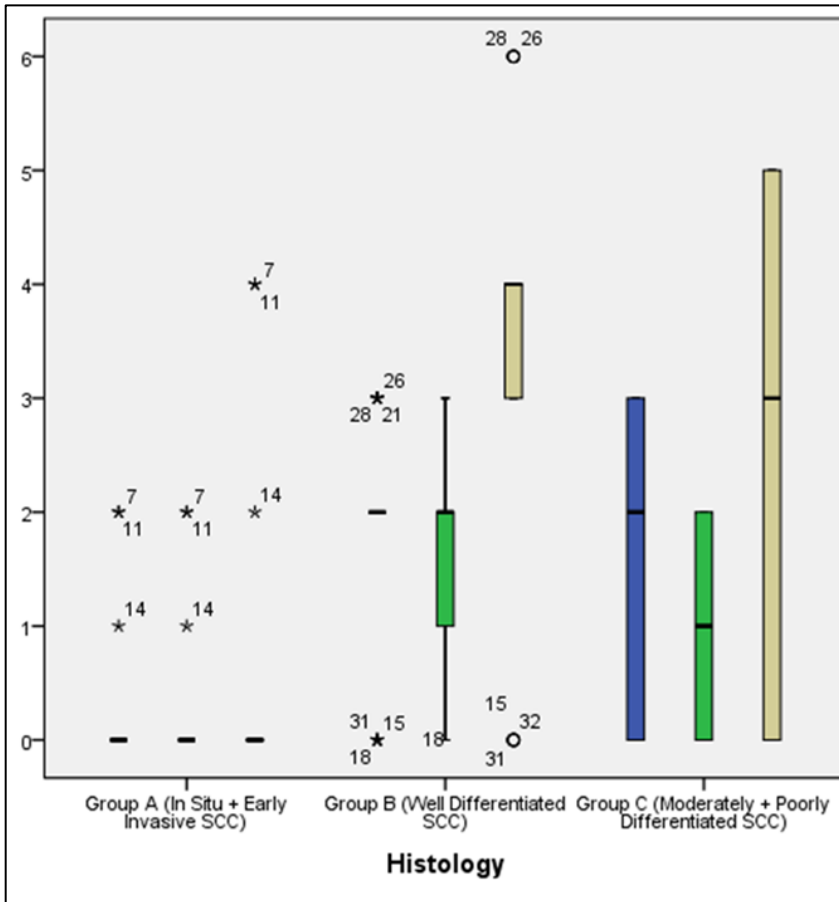
*Kruskal - Wallis Test. Post hoc analysis performed with the application of Dunn's test ΔΜ: Διάμεση τιμή

Γράφημα 12: Διάγραμμα Box-Plot (θηκόγραμμα) που παρουσιάζει την κατανομή της πυρηνικής ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του μορίου NF-κΒ στα καρκινικά κύτταρα των τριών ιστοπαθολογικών κατηγοριών {Ποσοστό θετικών κυττάρων (μπλε θηκόγραμμα) $P < 0,001$, Ένταση χρώσης (πράσινο θηκόγραμμα) $P=0,007$, Συνολικό άθροισμα ποσοστού και έντασης χρώσης (καφέ θηκόγραμμα) $P=0,001$ }



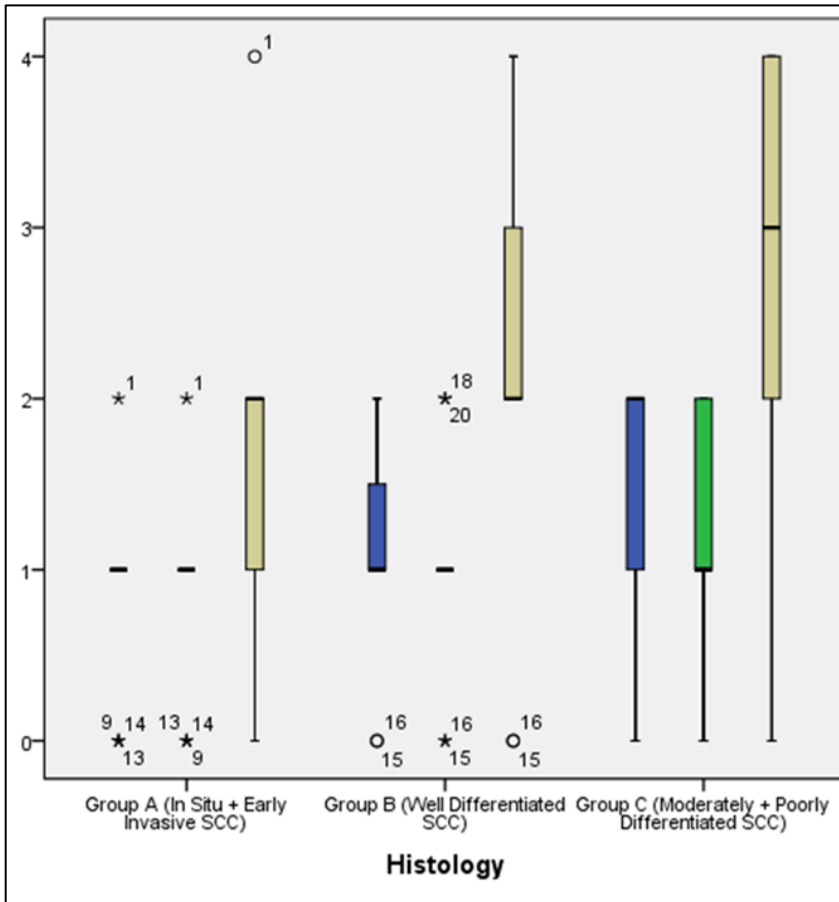
*Kruskal - Wallis Test

Γράφημα 13: Διάγραμμα Box-Plot (θηκόγραμμα) που παρουσιάζει την κατανομή της κυτταροπλασματικής ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του μορίου NF-κΒ στα καρκινικά κύτταρα των τριών ιστοπαθολογικών κατηγοριών {Ποσοστό θετικών κυττάρων (μπλε θηκόγραμμα) P=0,002, Ένταση χρώσης (πράσινο θηκόγραμμα) P=0,004, Συνολικό άθροισμα ποσοστού και έντασης χρώσης (καφέ θηκόγραμμα) P=0,003}



*Kruskal - Wallis Test

Γράφημα 14: Διάγραμμα Box-Plot (θηκόγραμμα) που παρουσιάζει την κατανομή της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του μορίου NF-κΒ στα φλεγμονώδη κύτταρα των τριών ιστοπαθολογικών κατηγοριών {Ποσοστό θετικών κυττάρων (μπλε θηκόγραμμα) P=0,022, Ένταση χρώσης (πράσινο θηκόγραμμα) P=0,089, Συνολικό άθροισμα ποσοστού και έντασης χρώσης (καφέ θηκόγραμμα) P=0,007}



*Kruskal - Wallis Test

Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του μορίου NF-κB(p65) με τις παραμέτρους του τροποποιημένου συστήματος Anneroth

Καρκινικά κύτταρα

Με την εφαρμογή της στατιστικής δοκιμασίας Spearman's rho test, στις ομάδες Β και Γ, το ποσοστό των θετικών καρκινικών κυττάρων που εμφάνισαν πυρηνική ανοσοϊστοχημική χρώση για το μόριο NF-κB(p65), παρουσίασε θετική συσχέτιση με τις παραμέτρους της κερατινοποίησης ($RHO=0,300$, $p=0,037$) και του τύπου διήθησης ($RHO=0,336$, $p=0,018$), όπως αξιολογήθηκαν με το τροποποιημένο σύστημα Anneroth. Δεν παρατηρήθηκαν συσχετίσεις της κυτταροπλασματικής έκφρασης του μορίου (Πίνακας 30).

Φλεγμονώδη κύτταρα των όγκων

Σε αντίθεση με τα καρκινικά κύτταρα δεν παρατηρήθηκαν στα φλεγμονώδη κύτταρα των διηθητικών όγκων σημαντικές συσχετίσεις της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του μορίου NF-κB(p65) με τις παραμέτρους του τροποποιημένου συστήματος Anneroth (Πίνακας 30). Η ένταση της χρώσης του μορίου NF-κB(p65) στα φλεγμονώδη κύτταρα των όγκων εμφάνισε αρνητική συσχέτιση με την πλειομορφία ($RHO=-0,476$, $p=0,040$) και τη μιτωτική δραστηριότητα των καρκινικών κυττάρων ($RHO=-0,514$, $p=0,024$) στην ομάδα Β (Πίνακας 31). Επιπλέον όλες οι τιμές (ποσοστό θετικών κυττάρων, ένταση χρώσης και συνολικό άθροισμα) του μορίου NF-κB(p65) στα φλεγμονώδη κύτταρα των όγκων της ομάδας Β κατέδειξαν αρνητική συσχέτιση με τον τύπο της διήθησης ($RHO=-0,548$, $p=0,015$, $RHO=-0,476$, $p=0,04$, και $RHO=-0,651$, $p=0,03$, αντίστοιχα) και στην ομάδα Γ με τη μιτωτική δραστηριότητα των καρκινικών κυττάρων ($RHO=-0,428$, $p=0,021$, $RHO=-0,454$, $p=0,013$, και $RHO=-0,447$, $p=0,015$, αντίστοιχα) (Πίνακας 32).

Πίνακας 30: Συσχέτιση μεταξύ της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του μορίου NF-κB(p65) και των παραμέτρων του τροποποιημένου συστήματος Anneroth

Ανοσοϊστοχημικές παράμετροι	Παράμετροι του τροποποιημένου συστήματος Anneroth – Ομάδες Β και Γ														
	Κερατινοποίηση			Πλειομορφία			Τύπος διήθησης			Φλεγμονή			Μιτώσεις		
	n	r*	p	n	r*	p	n	r*	p	n	r*	p	n	r*	p
NF-κB															
Καρκινικά κύτταρα (Πυρήνας)															
Ποσοστό θετικών κυττάρων	49	0,300	0,037	49	0,236	0,102	49	0,336	0,018	49	0,127	0,386	49	0,083	0,569
Ένταση χρώσης	48	0,091	0,539	48	-0,093	0,528	48	0,127	0,392	48	-0,019	0,899	48	-0,075	0,611
Συνολικό άθροισμα	48	0,161	0,273	48	0,046	0,756	48	0,214	0,144	48	0,070	0,636	48	0,008	0,959
Καρκινικά κύτταρα (Κυτταρόπλασμα)															
Ποσοστό θετικών κυττάρων	48	0,012	0,936	48	0,121	0,414	48	-0,134	0,364	48	0,185	0,207	48	-0,094	0,524
Ένταση χρώσης	48	-0,048	0,747	48	0,035	0,812	48	-0,214	0,144	48	0,067	0,649	48	-0,094	0,527
Συνολικό άθροισμα	48	0,011	0,941	48	0,099	0,504	48	-0,166	0,260	48	0,130	0,379	48	-0,089	0,548
Φλεγμονώδη κύτταρα των όγκων															
Ποσοστό θετικών κυττάρων	48	0,031	0,834	48	0,129	0,382	48	-0,084	0,571	48	0,174	0,236	48	-0,217	0,138
Ένταση χρώσης	48	0,138	0,348	48	0,033	0,826	48	-0,069	0,642	48	0,220	0,133	48	-0,257	0,078
Συνολικό άθροισμα	48	0,065	0,659	48	0,120	0,418	48	-0,086	0,559	48	0,204	0,164	48	-0,203	0,167

*Spearman's rho test

Πίνακας 31: Συσχέτιση μεταξύ της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του μορίου NF-κB(p65) και των παραμέτρων του τροποποιημένου συστήματος Anneroth στην ομάδα Β

Ανοσοϊστοχημικές παράμετροι	Παράμετροι του τροποποιημένου συστήματος Anneroth – Ομάδα Β														
	Κερατινοποίηση			Πλειομορφία			Τύπος διήθησης			Φλεγμονή			Μιτώσεις		
	n	r*	p	n	r*	p	n	r*	p	n	r*	p	n	r*	p
NF-κB															
Καρκινικά κύτταρα (Πυρήνας)															
Ποσοστό θετικών κυττάρων	20	0,085	0,721	20	-0,200	0,399	20	-0,297	0,203	20	-0,263	0,263	20	-0,247	0,294
Ένταση χρώσης	19	0,088	0,719	19	-0,404	0,086	19	-0,223	0,358	19	-0,253	0,296	19	-0,253	0,297
Συνολικό άθροισμα	19	0,044	0,856	19	-0,321	0,181	19	-0,289	0,231	19	-0,308	0,200	19	-0,254	0,294
Καρκινικά κύτταρα (Κυτταρόπλασμα)															
Ποσοστό θετικών κυττάρων	19	0,278	0,249	19	-0,168	0,491	19	0,168	0,491	19	-0,032	0,896	19	0,000	1,000
Ένταση χρώσης	19	0,366	0,124	19	-0,021	0,933	19	0,145	0,553	19	-0,165	0,499	19	0,135	0,583
Συνολικό άθροισμα	19	0,356	0,135	19	-0,063	0,798	19	0,188	0,440	19	-0,068	0,781	19	0,113	0,645
Φλεγμονώδη κύτταρα των όγκων															
Ποσοστό θετικών κυττάρων	19	-0,189	0,438	19	0,023	0,925	19	-0,548	0,015	19	-0,063	0,799	19	-0,428	0,068
Ένταση χρώσης	19	0,000	1,000	19	-0,476	0,040	19	-0,476	0,040	19	0,137	0,576	19	-0,514	0,024
Συνολικό άθροισμα	19	-0,243	0,316	19	-0,067	0,784	19	-0,651	0,003	19	0,030	0,903	19	-0,412	0,080

*Spearman's rho test

Πίνακας 32: Συσχέτιση μεταξύ της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του μορίου NF-κΒ(p65) και των παραμέτρων του τροποποιημένου συστήματος Anneroth στην ομάδα Γ

Ανοσοϊστοχημικές παράμετροι	Παράμετροι του τροποποιημένου συστήματος Anneroth – Ομάδα Γ														
	Κερατινοποίηση			Πλειομορφία			Τύπος διήθησης			Φλεγμονή			Μιτώσεις		
	n	r*	p	n	r*	p	n	r*	p	n	r*	p	n	r*	p
NF-κΒ															
Καρκινικά κύτταρα (Πυρήνας)															
Ποσοστό θετικών κυττάρων	29	-0,126	0,515	29	-0,231	0,227	29	0,116	0,549	29	0,166	0,389	29	-0,328	0,082
Ένταση χρώσης	29	-0,158	0,414	29	-0,224	0,242	29	0,159	0,409	29	0,076	0,695	29	-0,255	0,182
Συνολικό άθροισμα	29	-0,187	0,332	29	-0,269	0,159	29	0,122	0,528	29	0,158	0,414	29	-0,250	0,190
Καρκινικά κύτταρα (Κυτταρόπλασμα)															
Ποσοστό θετικών κυττάρων	29	-0,098	0,612	29	0,294	0,122	29	-0,332	0,079	29	0,282	0,138	29	-0,160	0,408
Ένταση χρώσης	29	-0,060	0,757	29	0,363	0,053	29	-0,335	0,076	29	0,255	0,182	29	-0,077	0,690
Συνολικό άθροισμα	29	-0,094	0,629	29	0,307	0,105	29	-0,335	0,075	29	0,275	0,149	29	-0,147	0,447
Φλεγμονώδη κύτταρα των όγκων															
Ποσοστό θετικών κυττάρων	29	-0,145	0,454	29	-0,104	0,592	29	-0,210	0,274	29	0,215	0,262	29	-0,428	0,021
Ένταση χρώσης	29	-0,014	0,944	29	-0,030	0,877	29	-0,224	0,243	29	0,176	0,361	29	-0,454	0,013
Συνολικό άθροισμα	29	-0,121	0,531	29	-0,099	0,608	29	-0,265	0,166	29	0,180	0,350	29	-0,447	0,015

*Spearman's rho tes

2.3.4.1 Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του μορίου IFN-β

Καρκινικά κύτταρα

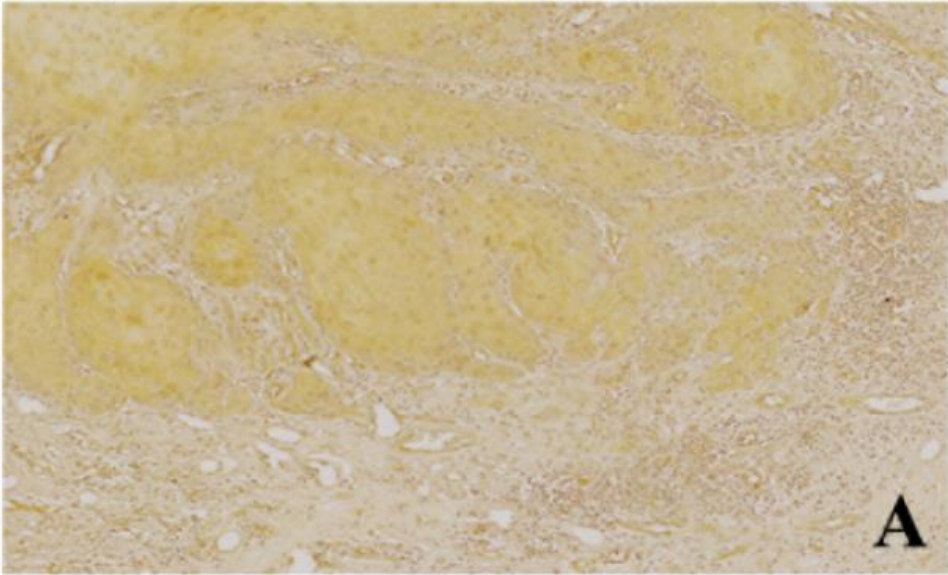
Το μόριο IFN-β εμφάνισε ως επί το πλείστον κυτταροπλασματική θετικότητα σε 50/63 περιπτώσεις (ποσοστό 79,3%). Η μέση τιμή του ποσοστού των θετικών κυττάρων ήταν 1,25, η μέση τιμή της έντασης της ανοσοϊστοχημικής χρώσης 1,17 και η μέση τιμή του συνολικού άθροισματος (ποσοστού και έντασης χρώσης) ήταν 2,20 (Πίνακας 33)(Εικόνα 27 Α-Γ).

Φλεγμονώδη κύτταρα των όγκων

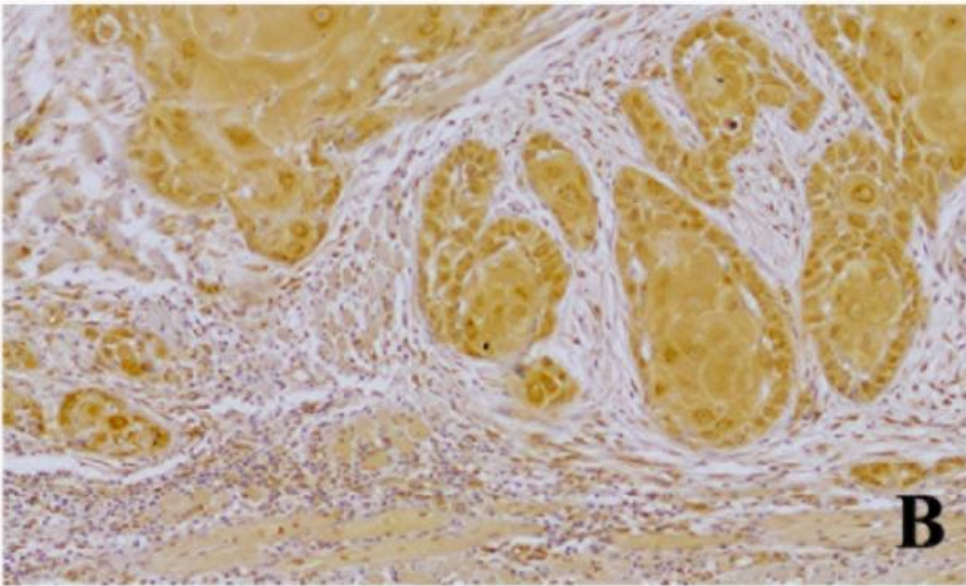
Η IFN-β εκφράστηκε επίσης στα φλεγμονώδη κύτταρα των όγκων σε 49/63 περιπτώσεις (ποσοστό 77,7%). Οι μέσες τιμές του ποσοστού των θετικών κυττάρων, της έντασης της ανοσοϊστοχημικής χρώσης και του συνολικού άθροισματος (ποσοστού και έντασης χρώσης) ήταν 0,91, 0,94 και 1,72 αντίστοιχα (Πίνακας 33)(Εικόνα 27 Α-Γ).

Πίνακας 33: Συνοπτική παρουσίαση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του μορίου IFN-β

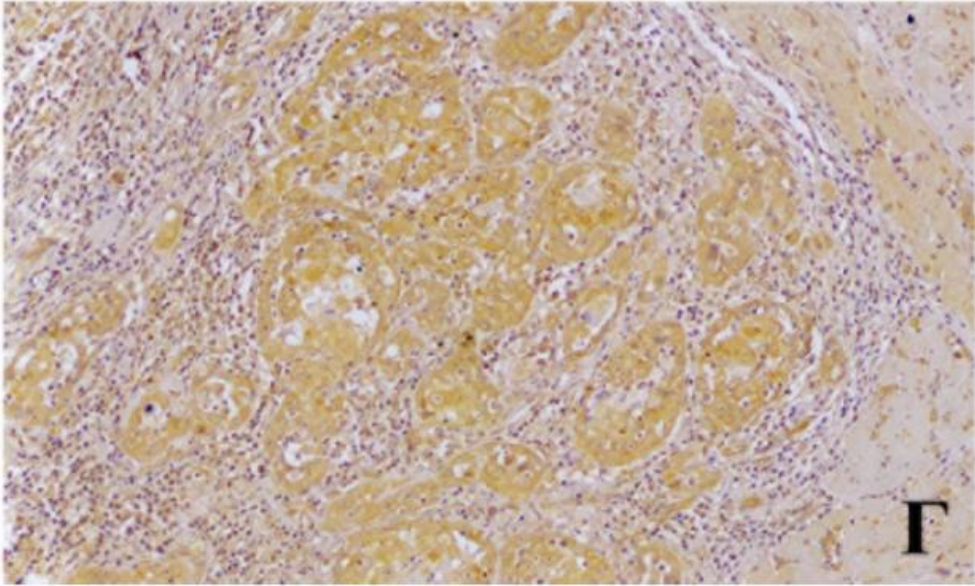
	ΟΜΑΔΑ Α (n=14)	ΟΜΑΔΑ Β (n=20)	ΟΜΑΔΑ Γ (n=29)	ΣΥΝΟΛΟ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ (n=63)
ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ				
Ποσοστό θετικών περιπτώσεων (%)	5/14 (35,7%)	19/20 (95%)	26/29 (89,6%)	50/63 (79,3%)
Ποσοστό θετικών κυττάρων (μέση τιμή και εύρος)	0,50 (0-2)	1,50 (1-2)	1,75 (0-3)	1,25 (0-3)
Ένταση χρώσης (μέση τιμή και εύρος)	0,42 (0-2)	1,55 (1-2)	1,55 (0-2)	1,17 (0-2)
Συνολικό άθροισμα (μέση τιμή και εύρος)	0,92 (0-4)	2,90 (2-4)	3,00 (0-5)	2,20 (0-5)
ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΩΝ ΟΓΚΩΝ				
Ποσοστό θετικών περιπτώσεων (%)	6/14 (42,8%)	16/20 (80%)	27/29 (93,1%)	49/63 (77,7%)
Ποσοστό θετικών κυττάρων (μέση τιμή και εύρος)	0,64 (0-1)	0,85 (0-2)	1,24 (0-2)	0,91 (0-2)
Ένταση χρώσης (μέση τιμή και εύρος)	0,64 (0-1)	0,95 (0-2)	1,24 (0-2)	0,94 (0-2)
Συνολικό άθροισμα (μέση τιμή και εύρος)	0,85 (0-2)	1,85 (0-3)	2,48 (0-4)	1,72 (0-4)



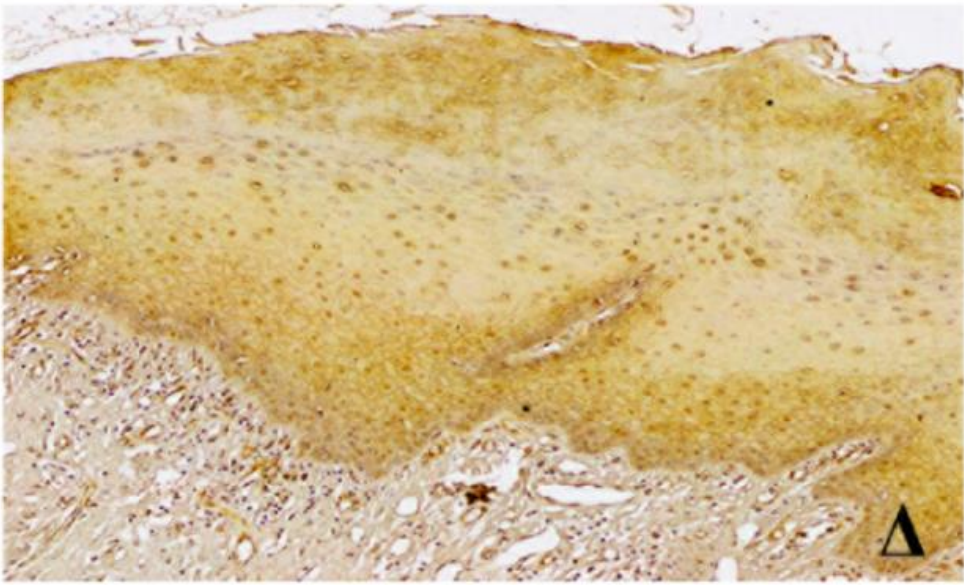
Εικόνα 27A: Ιστολογική φωτογραφία που απεικονίζει την κυτταροπλασματική ή/και πυρηνική έκφραση του μορίου IFN-β στα καρκινικά κύτταρα καθώς και την ανοσοϊστοχημική έκφραση στα φλεγμονώδη κύτταρα σε HPV (-) επιφανειακά διηθητικό ΑΚΓ στις ομάδας Α (200X)



Εικόνα 27B: Ιστολογική φωτογραφία που απεικονίζει την κυτταροπλασματική ή/και πυρηνική έκφραση του μορίου IFN-β στα καρκινικά κύτταρα καθώς και την ανοσοϊστοχημική έκφραση στα φλεγμονώδη κύτταρα σε HPV (-) υψηλής διαφοροποίησης ΑΚΓ της ομάδας Β (400X)



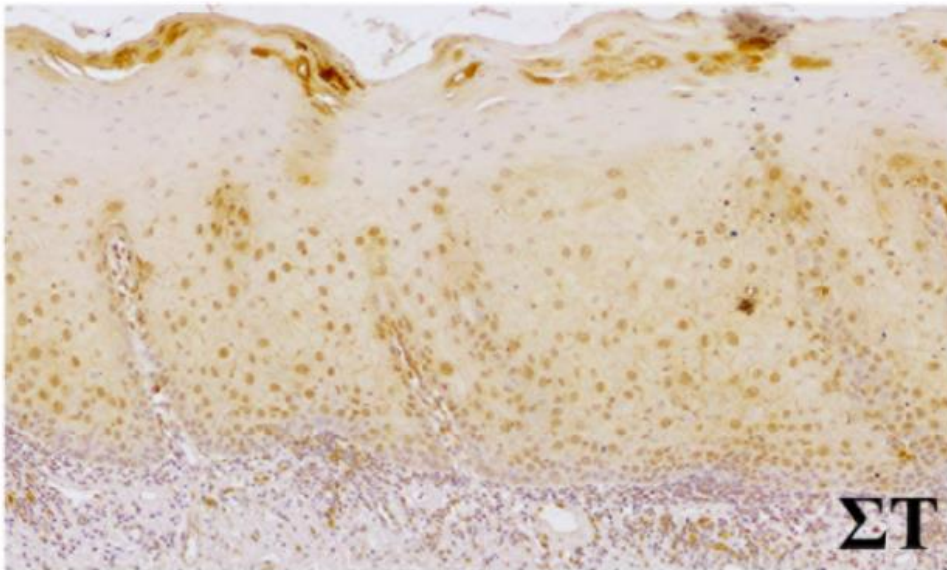
Εικόνα 27Γ: Ιστολογική φωτογραφία που απεικονίζει την κυτταροπλασματική έκφραση του μορίου IFN-β στα καρκινικά κύτταρα καθώς και την ανοσοϊστοχημική έκφραση στα φλεγμονώδη κύτταρα σε HPV (+) χαμηλής διαφοροποίησης ΑΚΓ της ομάδας Γ (200X)



Εικόνα 27Δ: Ιστολογική φωτογραφία που απεικονίζει την κυτταροπλασματική ή/και πυρηνική ανοσοϊστοχημική έκφραση του μορίου IFN-β στα επιθηλιακά κύτταρα και την ανοσοϊστοχημική έκφραση στα υποεπιθηλιακά φλεγμονώδη κύτταρα του παρακείμενου μορφολογικά υγιούς επιθηλίου στο HPV (-) επιφανειακά διηθητικό ΑΚΓ της Εικόνας 27Α (200X)



Εικόνα 27E: Ιστολογική φωτογραφία που απεικονίζει κυτταροπλασματική ανοσοϊστοχημική έκφραση του μορίου IFN-β στα επιθηλιακά κύτταρα και την ανοσοϊστοχημική έκφραση στα υποεπιθηλιακά φλεγμονώδη κύτταρα του παρακείμενου μορφολογικά υγιούς επιθηλίου στο HPV (-) υψηλής διαφοροποίησης ΑΚΓ της Εικόνας 27B (400X)



Εικόνα 27ΣΤ: Ιστολογική φωτογραφία που απεικονίζει κυτταροπλασματική ή/και πυρηνική ανοσοϊστοχημική έκφραση του μορίου IFN-β στα επιθηλιακά κύτταρα και την ανοσοϊστοχημική έκφραση στα υποεπιθηλιακά φλεγμονώδη κύτταρα του παρακείμενου μορφολογικά υγιούς επιθηλίου στο HPV (+) χαμηλής διαφοροποίησης ΑΚΓ της Εικόνας 27G (200X)

2.3.4.2 Στατιστική ανάλυση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του μορίου IFN-β

Σύγκριση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του μορίου IFN-β μεταξύ καρκινικού και παρακείμενου μορφολογικά υγιή βλεννογόνου

Ανοσοϊστοχημική έκφραση της IFN-β παρατηρήθηκε στο παρακείμενο των όγκων μορφολογικά υγιές επιθήλιο και στα υποεπιθηλιακά του φλεγμονώδη κύτταρα σε όλες τις ομάδες. Δεν διαπιστώθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές της έκφρασης μεταξύ των τριών ομάδων (Πίνακας 34).

Η στατιστική δοκιμασία Wilcoxon Signed Ranks test κατέδειξε ότι οι τιμές του ποσοστού των θετικών κυττάρων, της έντασης της ανοσοϊστοχημικής χρώσης και του συνολικού αθροίσματος (ποσοστού και έντασης χρώσης) της IFN-β στα καρκινικά κύτταρα και τα φλεγμονώδη κύτταρα των όγκων ήταν σημαντικά υψηλότερες σε σύγκριση με τον παρακείμενο μορφολογικά υγιή βλεννογόνο, τόσο στο σύνολο του δείγματος όσο και στις ομάδες Β και Γ, ενώ στην ομάδα Α μόνο οι τιμές του ποσοστού των θετικών κυττάρων και της έντασης της χρώσης εμφάνισαν στατιστική σημαντικότητα (Πίνακες 35Α και 35Β)(Γράφημα 15).

Πίνακας 34: Ανοσοϊστοχημική έκφραση του μορίου IFN-β στα επιθηλιακά και φλεγμονώδη κύτταρα του παρακείμενου μορφολογικά υγιή βλεννογόνου και συσχέτιση με τις ιστοπαθολογικές κατηγορίες

		Ιστοπαθολογικές κατηγορίες						Σύνολο δείγματος (n = 63)		
		Ομάδα Α (n = 14)		Ομάδα Β (n = 20)		Ομάδα Γ (n = 29)			P*	
Ανοσοϊστοχημικές παράμετροι στον παρακείμενο μορφολογικά υγιή βλεννογόνο										
IFN-β										
Επιθηλιακά κύτταρα										
Ποσοστό θετικών κυττάρων	ΔM(Min - Max)	1,00	(0 - 2)	1,00	(0 - 2)	1,00	(0 - 2)	0,986	1,00	(0 - 2)
Ένταση χρώσης	ΔM(Min - Max)	1,00	(0 - 2)	1,00	(0 - 1)	1,00	(0 - 1)	0,775	1,00	(0 - 2)
Συνολικό άθροισμα	ΔM(Min - Max)	2,00	(0 - 4)	2,00	(0 - 3)	2,00	(0 - 3)	0,991	2,00	(0 - 4)
Υποεπιθηλιακά φλεγμονώδη κύτταρα										
Ποσοστό θετικών κυττάρων	ΔM(Min - Max)	0,00	(0 - 1)	0,00	(0 - 1)	0,00	(0 - 1)	0,090	0,00	(0 - 1)
Ένταση χρώσης	ΔM(Min - Max)	0,00	(0 - 1)	0,00	(0 - 1)	0,00	(0 - 1)	0,090	0,00	(0 - 1)
Συνολικό άθροισμα	ΔM(Min - Max)	0,00	(0 - 2)	0,00	(0 - 2)	0,00	(0 - 2)	0,090	0,00	(0 - 2)

*Kruskal - Wallis Test

ΔM:Διάμεση τιμή

Πίνακας 35A: Σύγκριση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της IFN-β σε επιθηλιακά και φλεγμονώδη κύτταρα μεταξύ καρκινικού και παρακείμενου μορφολογικά υγιή βλεννογόνου

Ανοσοϊστοχημικές παράμετροι	Ιστοπαθολογικές κατηγορίες										
	Ομάδα Α (n = 14)						Ομάδα Β (n = 20)				
	Παρακείμενος μορφολογικά υγιής βλεννογόνος		Καρκινικός βλεννογόνος				Παρακείμενος μορφολογικά υγιής βλεννογόνος		Καρκινικός βλεννογόνος		
	ΔΜ	ΕΤ	ΔΜ	ΕΤ	ρ*	ΔΜ	ΕΤ	ΔΜ	ΕΤ	ρ*	
IFN-β											
Επιθηλιακά κύτταρα											
Ποσοστό θετικών κυττάρων	1,00	(0 - 2)	0,00	(0 - 2)	0,366	1,00	(0 - 2)	2,00	(0 - 2)	0,002	
Ένταση χρώσης	1,00	(0 - 2)	0,00	(0 - 2)	0,317	1,00	(0 - 1)	2,00	(1 - 2)	<0,001	
Συνολικό άθροισμα	2,00	(0 - 4)	0,00	(0 - 4)	0,349	2,00	(0 - 3)	3,00	(2 - 4)	<0,001	
Φλεγμονώδη κύτταρα											
Ποσοστό θετικών κυττάρων	0,00	(0 - 1)	1,00	(0 - 1)	0,008	0,00	(0 - 1)	1,00	(0 - 2)	0,021	
Ένταση χρώσης	0,00	(0 - 1)	1,00	(0 - 1)	0,008	0,00	(0 - 1)	1,00	(0 - 2)	0,017	
Συνολικό άθροισμα	0,00	(0 - 2)	0,00	(0 - 2)	0,102	0,00	(0 - 2)	2,00	(0 - 3)	0,020	

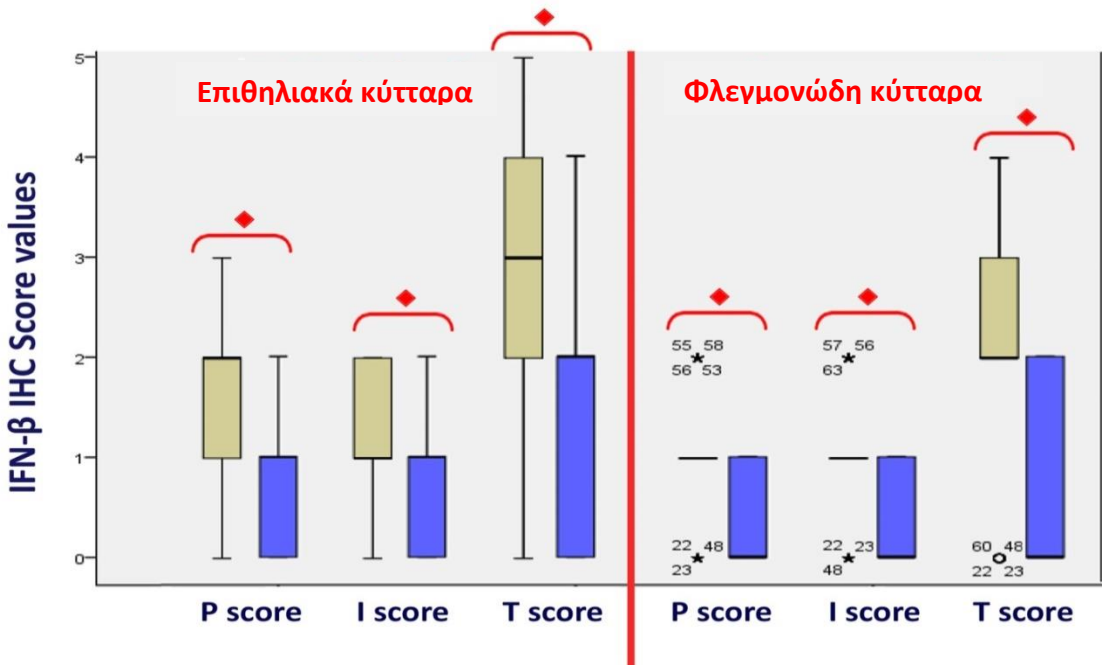
*Wilcoxon Signed Ranks Test. ΔΜ: Διάμεση τιμή ΕΤ: Εύρος τιμών

Πίνακας 35B: Σύγκριση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της IFN-β σε επιθηλιακά και φλεγμονώδη κύτταρα μεταξύ καρκινικού και παρακείμενου μορφολογικά υγιή βλεννογόνου

Ανοσοϊστοχημικές παράμετροι	Ιστοπαθολογικές κατηγορίες											
	Ομάδα Γ (n = 29)					Σύνολο δείγματος (n = 63)						
	Παρακείμενος μορφολογικά υγιής βλεννογόνος		Καρκινικός βλεννογόνος			p*	Παρακείμενος μορφολογικά υγιής βλεννογόνος		Καρκινικός βλεννογόνος			p*
	ΔΜ	ΕΤ	ΔΜ	ΕΤ	ΔΜ		ΕΤ	ΔΜ	ΕΤ			
IFN-β												
Επιθηλιακά κύτταρα												
Ποσοστό θετικών κυττάρων	1,00	(0 - 2)	2,00	(0 - 3)	<0,001	1,00	(0 - 2)	2,00	(0 - 3)	<0,001		
Ένταση χρώσης	1,00	(0 - 1)	1,00	(0 - 2)	<0,001	1,00	(0 - 2)	1,00	(0 - 2)	<0,001		
Συνολικό άθροισμα	2,00	(0 - 3)	3,00	(0 - 5)	<0,001	2,00	(0 - 4)	3,00	(0 - 5)	<0,001		
Φλεγμονώδη κύτταρα												
Ποσοστό θετικών κυττάρων	0,00	(0 - 1)	1,00	(0 - 2)	<0,001	0,00	(0 - 1)	1,00	(0 - 2)	<0,001		
Ένταση χρώσης	0,00	(0 - 1)	1,00	(0 - 2)	<0,001	0,00	(0 - 1)	1,00	(0 - 2)	<0,001		
Συνολικό άθροισμα	0,00	(0 - 2)	2,00	(0 - 4)	<0,001	0,00	(0 - 2)	2,00	(0 - 4)	<0,001		

*Wilcoxon Signed Ranks Test. ΔΜ: Διάμεση τιμή ΕΤ: Εύρος τιμών

Γράφημα 15: Διάγραμμα Box-Plot (θηκόγραμμα) που παρουσιάζει την κατανομή της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του μορίου IFN-βτα επιθηλιακά και φλεγμονώδη κύτταρα του καρκινικού (καφέ χρώμα) και του παρακείμενου μορφολογικά υγιούς βλεννογόνου (μπλε χρώμα) στο σύνολο του δείγματος {P:Percentage (ποσοστό θετικών κυττάρων), I: Intensity (ένταση χρώσης), T: Total score (συνολικό άθροισμα ποσοστού και έντασης χρώσης) \diamond $p < 0,001$ }



*Wilcoxon Signed Ranks Test

Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του μορίου IFN-β με τις ιστοπαθολογικές κατηγορίες

Καρκινικά κύτταρα

Η IFN-β εκφράστηκε κυρίως στα καρκινικά κύτταρα των ομάδων Β και Γ (19/20, ποσοστό 95% και 26/29, ποσοστό 89,6%, αντίστοιχα), και λιγότερο στην ομάδα Α (5/14, ποσοστό 35,7%) (Πίνακας 33). Σύμφωνα με το Kruskal Wallis test, στατιστικά σημαντική διαφορά παρατηρήθηκε σε ότι αφορά το ποσοστό των θετικών κυττάρων, την ένταση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης και το συνολικό άθροισμα (ποσοστού και έντασης χρώσης) ανάμεσα στις τρεις ομάδες ($p < 0,001$) (Πίνακας 36, Γράφημα 16). Οι συγκρίσεις ανά ζεύγη της δοκιμασίας Dunn's test κατέδειξαν ότι οι τιμές του ποσοστού των θετικών κυττάρων, της έντασης χρώσης και του συνολικού άθροισματος (ποσοστού και έντασης χρώσης) ήταν υψηλότερες στην ομάδα Β σε σχέση με την ομάδα Α ($p = 0,002$, $p < 0,001$ και $p < 0,001$, αντίστοιχα), όπως και της ομάδας Γ σε σχέση με την ομάδα Α ($p < 0,001$, $p = 0,001$ και $p < 0,001$, για το ποσοστό, την ένταση και το συνολικό άθροισμα, αντίστοιχα) (Πίνακας 36).

Φλεγμονώδη κύτταρα των όγκων

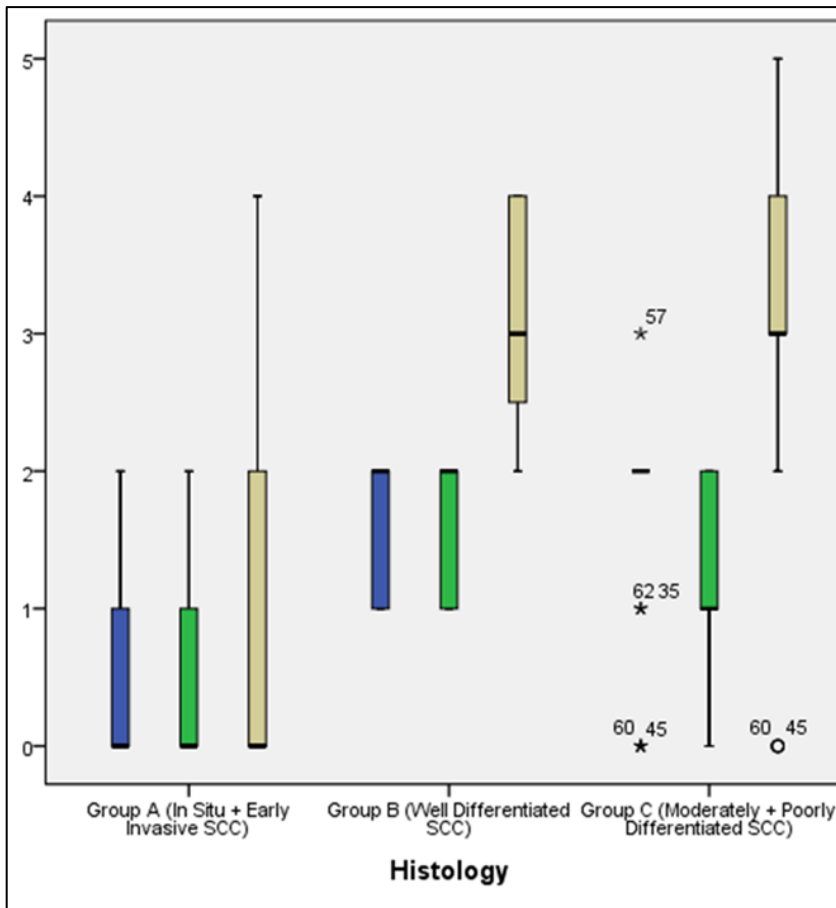
Στα φλεγμονώδη κύτταρα των όγκων, η ανοσοϊστοχημική έκφραση της IFN-β παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τριών ομάδων όσον αφορά το ποσοστό των θετικών κυττάρων ($p = 0,004$), την ένταση της χρώσης ($p = 0,011$) και το συνολικό άθροισμα (ποσοστού και έντασης χρώσης) ($p < 0,001$) (Kruskal Wallis test) (Πίνακας 36, Γράφημα 17). Σύμφωνα με το Dunn's test, το ποσοστό των θετικών κυττάρων ήταν υψηλότερο στην ομάδα Γ σε σχέση με την ομάδα Α ($p = 0,001$) και Β ($p = 0,040$), η ένταση της χρώσης ήταν υψηλότερη στην ομάδα Γ σε σχέση με την ομάδα Α ($p = 0,003$) και το συνολικό άθροισμα (ποσοστού και έντασης χρώσης) ήταν υψηλότερο στις ομάδες Γ και Β σε σχέση με την ομάδα Α ($p < 0,001$ και $p = 0,010$ αντίστοιχα) (Πίνακας 36).

Πίνακας 36: Ανοσοϊστοχημική έκφραση του μορίου IFN-β σε καρκινικά και φλεγμονώδη κύτταρα των όγκων και συσχέτιση με τις ιστοπαθολογικές κατηγορίες

		Ιστοπαθολογικές κατηγορίες															
		Ομάδα Α (n = 14)		Ομάδα Β (n = 20)		Ομάδα Γ (n = 29)		P*	Σύνολο δείγματος (n = 63)								
IFN-β												POST HOC ANALYSIS (DUNN'S TEST)					
Καρκινικά κύτταρα																	
Ποσοστό θετικών κυττάρων	ΔM(Min - Max)	0,00	(0 - 2)	2,00	(0 - 2)	2,00	(0 - 3)	<0,001	2,00	(0 - 3)	A vs B:	0,002	A vs Γ:	<0,001	B vs Γ:	0,156	
Ένταση χρώσης	ΔM(Min - Max)	0,00	(0 - 2)	2,00	(1 - 2)	1,00	(0 - 2)	<0,001	1,00	(0 - 2)	A vs B:	<0,001	A vs Γ:	0,001	B vs Γ:	0,063	
Συνολικό άθροισμα	ΔM(Min - Max)	0,00	(0 - 4)	3,00	(2 - 4)	3,00	(0 - 5)	<0,001	3,00	(0 - 5)	A vs B:	<0,001	A vs Γ:	<0,001	B vs Γ:	0,683	
Φλεγμονώδη κύτταρα των όγκων																	
Ποσοστό θετικών κυττάρων	ΔM(Min - Max)	1,00	(0 - 1)	1,00	(0 - 2)	1,00	(0 - 2)	0,004	1,00	(0 - 2)	A vs B:	0,212	A vs Γ:	0,001	B vs Γ:	0,040	
Ένταση χρώσης	ΔM(Min - Max)	1,00	(0 - 1)	1,00	(0 - 2)	1,00	(0 - 2)	0,011	1,00	(0 - 2)	A vs B:	0,058	A vs Γ:	0,003	B vs Γ:	0,297	
Συνολικό άθροισμα	ΔM(Min - Max)	0,00	(0 - 2)	2,00	(0 - 3)	2,00	(0 - 4)	<0,001	2,00	(0 - 4)	A vs B:	0,010	A vs Γ:	<0,001	B vs Γ:	0,188	

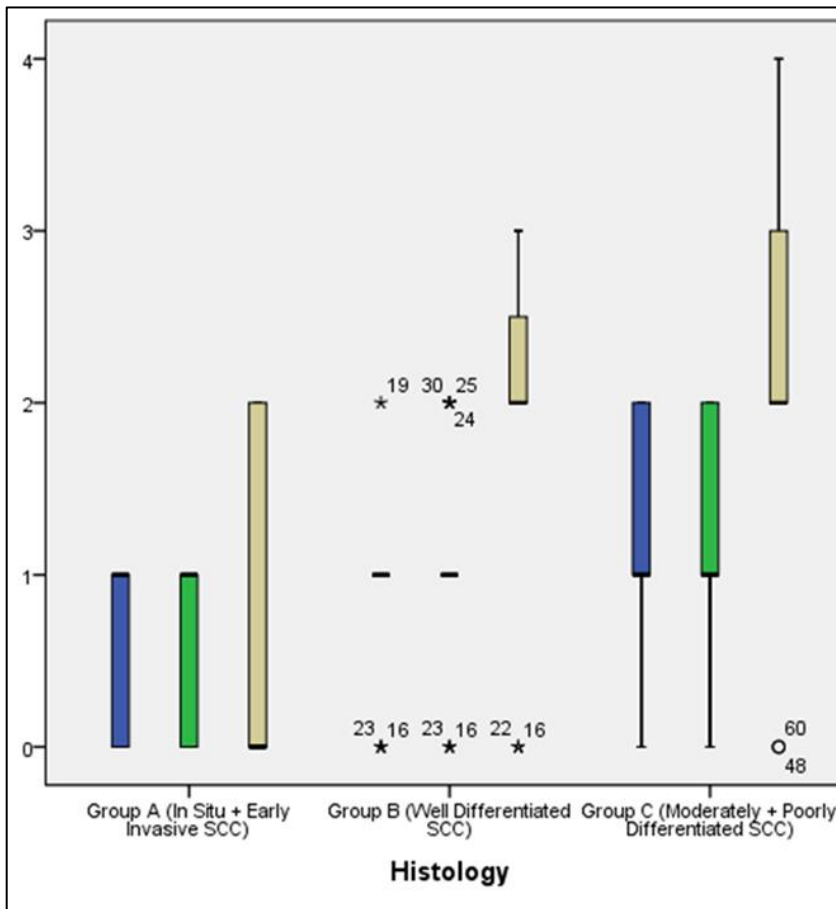
*Kruskal - Wallis Test. Post hoc analysis performed with the application of Dunn's test. ΔM: Διάμεση τιμή

Γράφημα 16: Διάγραμμα Box-Plot (θηκόγραμμα) που παρουσιάζει την κατανομή της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του μορίου IFN-β στα καρκινικά κύτταρα των τριών ιστοπαθολογικών κατηγοριών {Ποσοστό θετικών κυττάρων (μπλε θηκόγραμμα) $P < 0,001$, Ένταση χρώσης (πράσινο θηκόγραμμα) $P < 0,001$, Συνολικό άθροισμα ποσοστού και έντασης χρώσης (καφέ θηκόγραμμα) $P < 0,001$ }



*Kruskal - Wallis Test

Γράφημα 17: Διάγραμμα Box-Plot (θηκόγραμμα) που παρουσιάζει την κατανομή της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του μορίου IFN-β στα φλεγμονώδη κύτταρα των τριών ιστοπαθολογικών κατηγοριών {Ποσοστό θετικών κυττάρων (μπλε θηκόγραμμα) P=0,004, Ένταση χρώσης (πράσινο θηκόγραμμα) P=0,011, Συνολικό άθροισμα ποσοστού και έντασης χρώσης (καφέ θηκόγραμμα) P<0,001}



*Kruskal - Wallis Test

Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του μορίου IFN-β με τις παραμέτρους του τροποποιημένου συστήματος Anneroth

Η ανοσοϊστοχημική έκφραση του μορίου IFN-β παρουσίασε αρνητική συσχέτιση μεταξύ του ποσοστού των θετικών φλεγμονωδών κυττάρων των όγκων, της έντασης χρώσης και του συνολικού αθροίσματος (ποσοστού και έντασης χρώσης) με τον αριθμό των μιτώσεων στην ομάδα Γ ($RHO=-0,436$, $p=0,018$, $RHO=-0,436$, $p=0,018$, και $RHO=-0,413$, $p=0,026$, αντίστοιχα) (Spearman's rho test) (Πίνακας 37).

Πίνακας 37: Συσχέτιση μεταξύ της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της IFN-β και των παραμέτρων του τροποποιημένου συστήματος Anneroth στην ομάδα Γ

Ανοσοϊστοχημικές παράμετροι	Παράμετροι του τροποποιημένου συστήματος Anneroth – Ομάδα Γ														
	Κερατινοποίηση			Πλειομορφία			Τύπος διήθησης			Φλεγμονή			Μιτώσεις		
	n	r*	ρ	n	r*	ρ	n	r*	ρ	n	r*	ρ	n	r*	ρ
IFN-β															
Καρκινικά κύτταρα															
Ποσοστό θετικών κυττάρων	29	0,042	0,827	29	0,020	0,917	29	0,163	0,398	29	0,045	0,819	29	0,356	0,058
Ένταση χρώσης Συνολικό άθροισμα	29	0,048	0,806	29	0,190	0,322	29	0,030	0,876	29	0,097	0,615	29	0,159	0,410
	29	0,064	0,740	29	0,145	0,452	29	0,043	0,826	29	0,006	0,976	29	0,227	0,236
Φλεγμονώδη κύτταρα των όγκων															
Ποσοστό θετικών κυττάρων	29	0,078	0,689	29	0,053	0,784	29	0,014	0,942	29	0,024	0,903	29	0,436	0,018
Ένταση χρώσης Συνολικό άθροισμα	29	0,018	0,926	29	0,053	0,784	29	0,104	0,592	29	0,244	0,203	29	0,436	0,018
	29	0,028	0,884	29	0,027	0,890	29	0,065	0,737	29	0,134	0,490	29	0,413	0,026

*Spearman's rho test

2.4 Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των μελετώμενων μορίων με την HPV θετικότητα

Η πιθανή συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των τεσσάρων υπό εξέταση μορίων με την HPV θετικότητα μελετήθηκε στο σύνολο του δείγματος και στις επιμέρους ομάδες Α, Β και Γ.

Καρκινικά κύτταρα

Στην ομάδα Α, η HPV θετικότητα εμφάνισε θετική συσχέτιση με την ανοσοϊστοχημική έκφραση του μορίου TLR9 στα καρκινικά κύτταρα, σε ότι αφορούσε το ποσοστό των θετικών κυττάρων ($RHO=0,569$, $p=0,034$), την ένταση της χρώσης ($RHO=0,538$, $p=0,047$) και το συνολικό άθροισμα (ποσοστού και έντασης χρώσης) ($RHO=0,599$, $p=0,024$) (Πίνακας 38).

Όσον αφορά στο μόριο NF-κΒ, η HPV θετικότητα επίσης βρέθηκε να συσχετίζεται θετικά με το ποσοστό των θετικών κυττάρων, την ένταση χρώσης και το συνολικό άθροισμα (ποσοστού και έντασης χρώσης) της κυτταροπλασματικής ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του μορίου NF-κΒ(p65) στα καρκινικά κύτταρα της ομάδας Α ($RHO=0,847$, $p=0,00$, και για τις τρεις κατηγορίες τιμών) (Πίνακας 39).

Δεν παρατηρήθηκαν συσχετίσεις μεταξύ της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των μορίων TLR4 και IFN-β και της HPV θετικότητας είτε στο σύνολο του δείγματος είτε στις επιμέρους ομάδες.

Φλεγμονώδη κύτταρα των όγκων

Με την εφαρμογή της στατιστικής δοκιμασίας Spearman's rho test, η HPV θετικότητα βρέθηκε να σχετίζεται θετικά με το ποσοστό των θετικών κυττάρων με ανοσοϊστοχημική έκφραση για το μόριο TLR9 στα φλεγμονώδη κύτταρα των όγκων στο σύνολο του δείγματος ($RHO=0,274$, $p=0,030$) (Πίνακας 38).

Πίνακας 38: Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του μορίου TLR9 με την HPV θετικότητα

Ανοσοϊστοχημική έκφραση TLR9	HPV θετικότητα											
	Σύνολο δείγματος						Ομάδα Α					
	Καρκινικά κύτταρα			Φλεγμονώδη κύτταρα			Καρκινικά κύτταρα			Φλεγμονώδη κύτταρα		
	N	r*	P	N	r*	P	N	r*	P	N	r*	P
Ποσοστό θετικών κυττάρων	63	0,148	0,246	63	0,274	0,030	14	0,569	0,034	14	0,074	
Ένταση χρώσης	63	0,053	0,678	63	0,125	0,328	14	0,538	0,047	14	0,172	
Συνολικό άθροισμα	63	0,104	0,417	63	0,219	0,084	14	0,599	0,024	14	0,058	

*Spearman's rho test

Πίνακας 39: Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του μορίου NF-κΒ(ρ65) με την HPV θετικότητα στην ομάδα Α

Ανοσοϊστοχημική έκφραση NF-κΒ(ρ65)	HPV θετικότητα								
	Ομάδα Α								
	Καρκινικά κύτταρα (Πυρήνας)			Καρκινικά κύτταρα (Κυτταρόπλασμα)			Φλεγμονώδη κύτταρα		
	n	r*	p	n	r*	p	n	r*	p
Ποσοστό θετικών κυττάρων	14	0,090	0,760	14	0,847	0,000	14	0,128	0,663
Ένταση χρώσης	14	0,090	0,760	14	0,847	0,000	14	0,128	0,663
Συνολικό άθροισμα	14	0,059	0,840	14	0,847	0,000	14	0,226	0,438

*Spearman's rho test

2.5 Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης μεταξύ των μελετώμενων μορίων

Οι πιθανές συσχετίσεις της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης μεταξύ των τεσσάρων μορίων μελετήθηκαν στο σύνολο του δείγματος και στις επιμέρους ομάδες

Καρκινικά κύτταρα

Στα καρκινικά κύτταρα, παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ του συνολικού άθροισματος (ποσοστού και έντασης χρώσης) του μορίου TLR9 και αυτό της κυτταροπλασματικής έκφρασης του μορίου NF-κΒ(p65) ($RHO=0,422, p=0,001$) (Πίνακας 40)

Φλεγμονώδη κύτταρα των όγκων

Στα φλεγμονώδη κύτταρα των όγκων το Spearman's rho test κατέδειξε ότι στο σύνολο του δείγματος όπως και στις ομάδες Α και Γ, το συνολικό άθροισμα (ποσοστού και έντασης χρώσης) του μορίου TLR4 συσχετίστηκαν θετικά με το συνολικό άθροισμα (ποσοστού και έντασης χρώσης) του μορίου NF-κΒ(p65) ($RHO=0,422, p=0,001, RHO=0,711, p=0,004$ και $RHO=0,620, p=0,000$, αντίστοιχα) Στην ομάδα Α, διαπιστώθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ του συνολικού άθροισματος (ποσοστού και έντασης χρώσης) του μορίου TLR9 με αυτό του μορίου NF-κΒ(p65) ($RHO=0,707, p=0,005$) (Πίνακας 41). Επιπλέον, το συνολικό άθροισμα (ποσοστού και έντασης χρώσης) του μορίου TLR4 συσχετίστηκε θετικά με αυτό της IFN-β στο σύνολο του δείγματος και στην ομάδα Γ ($RHO=0,239, p=0,061$ και $RHO=0,577, p=0,001$, αντίστοιχα) (Πίνακας 42).

Πίνακας 40: Συσχέτιση μεταξύ της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του μορίου TLR9 με το NF-κΒ(p65) στα καρκινικά κύτταρα

Καρκινικά κύτταρα	Συνολικό άθροισμα (ποσοστού και έντασης χρώσης)* κυτταροπλασματικής έκφρασης του NF-κΒ(p65)											
	Ομάδα Α			Ομάδα Β			Ομάδα Γ			Σύνολο δείγματος		
	n	r**	p	n	r**	p	n	r**	p	n	r**	p
TLR9 Συνολικό άθροισμα*	14	0,405	0,151	20	0,201	0,409	29	0,159	0,409	63	0,422	0,001

Πίνακας 41: Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των μορίων TLR4 και TLR9 με το μόριο NF-κΒ (p65) στα φλεγμονώδη κύτταρα των όγκων

Φλεγμονώδη κύτταρα των όγκων	Συνολικό άθροισμα (ποσοστού και έντασης χρώσης)* NF-κΒ(p65)											
	Ομάδα Α			Ομάδα Β			Ομάδα Γ			Σύνολο δείγματος		
	n	r**	p	n	r**	p	n	r**	p	n	r**	p
TLR4 Συνολικό άθροισμα*	14	0,711	0,004	20	0,059	0,810	29	0,620	0,000	63	0,422	0,001
TLR9 Συνολικό άθροισμα*	14	0,707	0,005	20	-0,031	0,901	29	0,315	0,096	63	0,251	0,05

Πίνακας 42: Συσχέτιση μεταξύ της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του μορίου TRL4 με την IFN-β στα φλεγμονώδη κύτταρα των όγκων

Φλεγμονώδη κύτταρα των όγκων	Συνολικό άθροισμα (ποσοστού και έντασης χρώσης) * IFN-β											
	Ομάδα Α			Ομάδα Β			Ομάδα Γ			Σύνολο δείγματος		
	n	r**	p	n	r**	p	n	r**	p	n	r**	p
TLR4 Συνολικό άθροισμα*	14	-0,132	0,652	20	-0,219	0,367	29	0,577	0,001	63	0,239	0,061

**Spearman's rho test

3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 Εισαγωγικά στοιχεία

Οι υποδοχείς Toll-Like Receptors-TLRs εμπλέκονται στην πολυσταδιακή διαδικασία της καρκινογένεσης με διπλό ρόλο, είτε προάγοντας ογκογόνες διαδικασίες είτε παρουσιάζοντας αντιογκογόνο δραστηριότητα. Ποιος από τους δύο ρόλους θα επικρατήσει εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, μεταξύ των οποίων το είδος του καρκίνου, τον συγκεκριμένο τύπο TLR καθώς και το είδος των κατιόντων μονοπατιών που θα ενεργοποιηθούν κατά τη διάρκεια της νεοπλασματικής διαδικασίας (Huang B et al 2005, Yu L et al 2013). Έχει αποδειχθεί ότι η δέσμευση του TLR-DAMP οδηγεί στην απελευθέρωση κυτταροκινών και χημειοκινών ενεργοποιώντας το μοριακό μονοπάτι του NF-κΒ, το οποίο εμπλέκεται στον νεοπλασματικό μετασχηματισμό και στην προαγωγή των όγκων (Baud V and Karin M 2009, Yu L et al 2013, Pradere JP et al 2014, Zhang Q et al 2017). Σε αντιδιαστολή, η αλληλεπίδραση TLR-DAMP έχει συσχετιστεί με σημαντική αντιογκογόνο δραστηριότητα μέσω της παραγωγής ιντερφερονών-IFNs τύπου I (Yu L et al 2013, Fuertes MB et al 2013, Pradere JP et al 2014, Perkins DJ and Vogel SN 2015). Οι υποδοχείς TLRs φαίνεται επίσης ότι εμπλέκονται στην πολυσταδιακή διαδικασία της καρκινογένεσης του στόματος (Kotrashetti VS et al 2013, Rich AM et al 2014, Mäkinen LK et al 2015, Mäkinen LK et al 2016, Yang J et al 2016, Pannone G et al 2016, Pisani LP et al 2017). Ωστόσο, ο ακριβής ρόλος των TLRs σε συνδυασμό με συγκεκριμένες μοριακές οδούς, καθώς και η πιθανότητα η λοίμωξη από τον ιό HPV να επηρεάζει την ενεργοποίησή τους στον καρκίνο του στόματος, απαιτούν περαιτέρω διερεύνηση.

Με σκοπό να διαλευκανθεί ο ρόλος δύο συγκεκριμένων TLRs, του TLR4 και του TLR9 και των κατιόντων μορίων των σηματοδοτικών τους οδών NF-κΒ και IFN-β, μελετήθηκε η ανοσοϊστοχημική έκφραση των τεσσάρων παραπάνω μορίων στο παρακείμενο των όγκων μορφολογικά υγιή βλεννογόνο και σε σχέση με τις ιστοπαθολογικές παραμέτρους 49 διηθητικών ακανθοκυτταρικών καρκινωμάτων γλώσσας (ΑΚΓ) διάφορου βαθμού διαφοροποίησης (Ομάδα Β: υψηλής διαφοροποίησης και ομάδα Γ: μέτριας και χαμηλής διαφοροποίησης). Επίσης η ανοσοϊστοχημική έκφραση όλων των μορίων συσχετίστηκε μεταξύ τους και με τις παραμέτρους του τροποποιημένου συστήματος Anneroth. Παράλληλα στο υλικό της μελέτης συμπεριελήφθηκε μία επιπλέον ομάδα 14 συνολικά επιφανειακά διηθητικών (SI-SCCs) και in situ καρκινωμάτων (CIS) γλώσσας (ομάδα Α), η οποία συγκρίθηκε με τα πλήρως διηθητικά καρκινώματα των ομάδων Β και Γ. Τέλος, η έκφραση των τεσσάρων μορίων συσχετίστηκε με την HPV θετικότητα, με σκοπό να διερευνηθεί η υπόθεση ότι τα μόρια TLR4 και TLR9 καθώς και τα κατιόντα προϊόντα τους, εμφανίζουν διαφορετική ανοσοϊστοχημική έκφραση σε HPV (+) έναντι HPV (-) όγκους.

3.2 Έκφραση του TLR4 στο ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα της γλώσσας

Ο υποδοχέας TLR4 είναι μέλος της οικογένειας των Pattern Recognition Receptors-PRRs, εδράζεται στην επιφάνεια του κυττάρου και αναγνωρίζει κυρίως λιποπολυσακχαρίτες (LPS), οι οποίοι είναι συστατικό της μεμβράνης των Gram αρνητικών βακτηριδίων (Lu YC et al 2008, Vaure C and Liu Y 2014). Ο υποδοχέας TLR4 εκφράζεται στα νεοπλασματικά κύτταρα διαφόρων τύπων καρκίνου, όπως του καρκίνου των ωοθηκών, του παχέος εντέρου, του προστάτη, των πνευμόνων και του τραχήλου της μήτρας και η έκφρασή του συνδέεται με την ανάπτυξη και μετάσταση του όγκου (Kelly MG et al 2006, Rychahou PG et al 2008, Gatti G et al 2009, Zhang YB et al 2009, Wang Y et al 2014).

Ο ακριβής ρόλος του TLR4 στην καρκινογένεση παραμένει αμφιλεγόμενος. Ο Szczeranski MJ και συν. 2009 έδειξαν ότι η ενεργοποίηση του TLR4 από βακτηριακά προϊόντα, όπως τους λιποπολυσακχαρίτες (LPS), τα οποία βρίσκονται συχνά σε καρκίνους της κεφαλής και του τραχήλου, θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως «δίκωπο μαχαίρι»: οδηγεί στην καταστροφή των βακτηρίων, αλλά παράλληλα προάγει τη διήθηση του όγκου. Έχει προταθεί ότι στον καρκίνο του μαστού, η ενεργοποίηση του TLR4 στα φλεγμονώδη κύτταρα του όγκου δρα συνεπικουρικά με την ακτινοθεραπεία και χημειοθεραπεία στην αναχαίτιση της ανάπτυξης του όγκου (Apetoh L et al 2007). Σε άλλη μελέτη στον καρκίνο του παχέος εντέρου φαίνεται ότι η έκφραση του TLR4 στα καρκινικά κύτταρα προάγει την καρκινογένεση αναστέλλοντας τη δραστηριότητα κυττάρων «φυσικών φονέων» natural killer cells-(NK) και των T-λεμφοκυττάρων με αποτέλεσμα την εξασθένηση της ανοσολογικής επιτήρησης (Huang B et al 2005) Η έκφραση του TLR4 στα καρκινικά κύτταρα μπορεί επίσης να προκαλέσει χρόνια φλεγμονώδη αντίδραση στο μικροπεριβάλλον του όγκου, η οποία προάγει την ανάπτυξή του και την αντοχή στην χημειοθεραπεία (Chen R et al 2007).

Στη παρούσα μελέτη το μόριο TLR4 εκφράστηκε στην πλειονότητα των περιπτώσεων στο κυτταρόπλασμα των νεοπλασματικών κυττάρων ΑΚΓ εύρημα που συμφωνεί με προηγούμενες μελέτες (Szczeranski MJ et al 2009, Sun Z et al 2012, Mäkinen LK et al 2015, Mäkinen LK et al 2016). Παράλληλα, τα επίπεδα της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του μορίου TLR4 παρουσίασαν αύξηση στα καρκινικά κύτταρα σε σχέση με το παρακείμενο των όγκων μορφολογικά υγιές επιθήλιο. Παρόμοια αποτελέσματα ασθενούς ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του μορίου στο παρακείμενο μορφολογικά υγιές επιθήλιο σε σχέση με τους όγκους παρατηρήθηκαν επίσης στις μελέτες των Szczeranski MJ και συν. 2009 και Sun Z και συν. 2012. Επιπλέον, υψηλότερα επίπεδα ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του TLR4 παρατηρήθηκαν στη μελέτη μας στα νεοπλασματικά κύτταρα των πλήρως διηθητικών καρκινωμάτων σε σύγκριση με τα *in situ* και επιφανειακά διηθητικά καρκινώματα. Ο Kotrashetti και συν. 2013 ανέφεραν υψηλά επίπεδα ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του TLR4 σε επιθηλιακή δυσπλασία του στοματικού βλεννογόνου και ΑΚΣ, με στατιστικά σημαντική αύξηση από την ήπια προς την μέτρια δυσπλασία σε σύγκριση με ιστούς-μάρτυρες. Τα αποτελέσματα της μελέτης μας σε συνδυασμό με τα βιβλιογραφικά

δεδομένα υποστηρίζουν την άποψη ότι η έκφραση του TLR4 αυξάνεται σταδιακά από τον παρακείμενο μορφολογικά υγρή στο καρκινικό βλεννογόνο καθώς και κατά την εξέλιξη της διαδικασίας της καρκινογένεσης του στόματος θέτοντας τελικά την υπόνοια ότι αυξημένα επίπεδα TLR4 σχετίζονται με την πρόοδο του όγκου.

Παλαιότερη μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε κυτταρικές σειρές καρκινωμάτων κεφαλής και τραχήλου έδειξε ότι η αυξημένη έκφραση του TLR4 συσχετίζεται με χαμηλότερη διαφοροποίηση (Szczeranski MJ et al 2009). Παρόμοια συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του TLR4 και χαμηλού βαθμού διαφοροποίησης παρατηρήθηκαν επίσης σε ΑΚΣ (Sun Z et al 2012) και σε ΑΚΓ σταδίου I και II (Mäkinen LK et al 2015). Στην παρούσα μελέτη, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στην ανοσοϊστοχημική έκφραση του TLR4 στα καρκινικά κύτταρα μεταξύ υψηλής και μέτριας-χαμηλής διαφοροποίησης καρκινωμάτων. Ωστόσο, παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ της έντασης της χρώσης του TLR4 στα καρκινικά κύτταρα και της επιθετικότερης διηθητικής ανάπτυξης (όπως αξιολογήθηκε με βάση το τροποποιημένο σύστημα Anneroth). Παρόμοια ευρήματα διαπίστωσαν ο Mäkinen και 2015, οι οποίοι απέδειξαν ότι η έκφραση του TLR4 σχετίζεται με μεγαλύτερο βάθος διήθησης σε ΑΚΓ σταδίου I και II. Τα ευρήματα επομένως της μελέτης μας συμφωνούν με τα βιβλιογραφικά δεδομένα ότι η αύξηση των επιπέδων του TLR4 σε καρκινικά κύτταρα συσχετίζεται με την προαγωγή της καρκινογένεσης του στόματος μέσω επιθετικότερου προτύπου διήθησης του όγκου.

Στη μελέτη μας η έκφραση του TLR4 στα φλεγμονώδη κύτταρα των όγκων ήταν αυξημένη στο μικροπεριβάλλον των όγκων σε σύγκριση με υποεπιθηλιακά φλεγμονώδη κύτταρα του παρακείμενου μορφολογικά υγιούς βλεννογόνου. Το μόριο TLR4 εκφράστηκε στα φλεγμονώδη κύτταρα των όγκων σε ποσοστό 70% στα *in situ* και διηθητικά καρκινώματα της ομάδας Α και σε ποσοστό μεγαλύτερο του 90% στα καλής, μέτριας και χαμηλής διαφοροποίησης καρκινώματα των ομάδων Β και Γ. Επίσης, η ανοσοϊστοχημική έκφραση του TLR4 στα φλεγμονώδη κύτταρα των όγκων συσχετίστηκε αρνητικά με τον αριθμό των μιτώσεων των καρκινικών κυττάρων. Τα ευρήματα αυτά στοιχειοθετούν την υπόθεση της ενεργοποίησης της ανοσολογικής επιτήρησης κατά την διάρκεια της καρκινογένεσης του στόματος (Ng LK et al 2011).

Γενικότερα η έκφραση TLR4 σε φλεγμονώδη κύτταρα φαίνεται ότι αναστέλλει την ανάπτυξη ενός όγκου (Apetoh L et al 2007) ενώ αντιθέτως, η έκφραση του TLR4 σε καρκινικά κύτταρα φαίνεται ότι προάγει την καρκινογένεση όπως διαφαίνεται από πρόσφατη μετα-ανάλυση των Wang Q και συν. 2018 η οποία συμπεριέλαβε 24 μελέτες με 2812 ασθενείς με διαφορετικούς τύπους καρκίνου και αναφέρει ότι αυξημένα επίπεδα έκφρασης των TLR4 και TLR7 σε καρκινικά κύτταρα σχετίζονται με μικρότερα ποσοστά επιβίωσης των ασθενών.

3.3 Έκφραση του TLR9 στο ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα της γλώσσας

Ο υποδοχέας TLR9 είναι μέλος της οικογένειας των Pattern Recognition Receptors-PRRs, εδράζεται στα ενδοσώματα ή τα λυσοσώματα και αναγνωρίζει κυρίως DNA και RNA παθογόνων μικροοργανισμών καθώς, DNA που προέρχεται από τους ξενιστές ή μεθυλιωμένο DNA, διαδραματίζοντας κομβικό ρόλο στην ανοσιακή απάντηση (Kumagai Y et al 2008, Kauppi JH et al 2015). Έκφραση του μορίου TLR9 έχει παρατηρηθεί σε πολλά είδη καρκίνου, όπως στον καρκίνο του προστάτη, του μαστού, του πνεύμονα και του γαστρεντερικού (Ilvesaro JM et al 2007, Jukkola-Vuorinen A et al 2005, Droemann D et al 2005, Schmausser B et al 2005). Η ενεργοποίηση του TLR9 από τους συνδέτες του μπορεί να προάγει την ανάπτυξη του όγκου, όπως έχει παρατηρηθεί στον καρκίνο του μαστού (Merrell MA et al 2006). Παράλληλα, έχει αποδειχθεί ότι η ενεργοποίηση του TLR9 προάγει τη διήθηση και μετάσταση στον καρκίνο του στόματος, μέσω της ενεργοποίησης συγκεκριμένων μεταλλοπρωτεϊνών (MMP-2 και -13) (Ruan M et al 2014, Kauppi JH et al 2015).

Στη μελέτη μας, το μόριο TLR9 εκφράστηκε στο κυτταρόπλασμα των καρκινικών κυττάρων όλων των διηθητικών καρκινωμάτων των ομάδων Β και Γ σε υψηλότερα επίπεδα συγκριτικά με το παρακείμενο μορφολογικά υγιές επιθήλιο. Τα ευρήματα αυτά υποστηρίζουν παρατηρήσεις άλλων μελετών σύμφωνα με τις οποίες η έκφραση του TLR9 συνδέεται με τη διηθητική ανάπτυξη του ΑΚΓ (Ruan M et al 2014, Mäkinen LK et al 2015). Παράλληλα, η κυτταροπλασματική έκφραση του TLR9 ήταν επίσης αυξημένη σε σχέση με τον παρακείμενο μορφολογικά υγιή βλεννογόνο, στα νεοπλασματικά κύτταρα των *in situ* και επιφανειακά διηθητικών καρκινωμάτων της ομάδας Α, υπογραμμίζοντας τη σημασία της ενεργοποίησης του μορίου στα πρώιμα στάδια της καρκινογένεσης (Mäkinen LK et al 2015). Αντιθέτως, δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά στην έκφραση του TLR9 στα καρκινικά κύτταρα μεταξύ των τριών ομάδων, αν και στις ομάδες Β και Γ παρατηρήθηκαν υψηλότερες μέσες τιμές σε σύγκριση με την ομάδα Α. Επιπλέον, δεν παρατηρήθηκαν συσχετίσεις με τις επιμέρους ιστοπαθολογικές παραμέτρους του συστήματος Anneroth στις περιπτώσεις των διηθητικών καρκινωμάτων. Αντιθέτως, οι Min R και συν. 2011 συσχέτισαν την αυξημένη έκφραση του TLR9 με αυξημένο μέγεθος όγκου, προχωρημένο κλινικό στάδιο και αυξημένο δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Ki-67) σε περιπτώσεις ΑΚΣ.

Στη μελέτη μας, το μόριο TLR9 εκφράστηκε στα φλεγμονώδη κύτταρα των όγκων παρουσιάζοντας αυξημένα επίπεδα τιμών σε σύγκριση με τον παρακείμενο μορφολογικά υγιή βλεννογόνο. Είναι αξιοσημείωτο, ότι στα διηθητικά καρκινώματα ομάδων Β και Γ, το ποσοστό των θετικών για το TLR9 φλεγμονωδών κυττάρων των όγκων παρουσίασε αρνητική συσχέτιση με το βαθμό κερατινοποίησης των καρκινικών κυττάρων, το πρότυπο διήθησης και τον αριθμό των μιτώσεων των καρκινικών κυττάρων. Επιπλέον, τα φλεγμονώδη κύτταρα στα υψηλής διαφοροποίησης ΑΚΓ εμφάνισαν υψηλότερο ποσοστό θετικών κυττάρων για το TLR9 σε σύγκριση με τα μέτριας και χαμηλής διαφοροποίησης καρκινώματα. Με βάση τα αποτελέσματα

αυτά, μπορεί να προταθεί η υπόθεση ότι η έκφραση του μορίου TLR9 στα φλεγμονώδη κύτταρα των όγκων έχει αντιογκογόνο δράση σε αντιδιαστολή με την έκφρασή του στα καρκινικά κύτταρα, όπου επιφέρει τα αντίθετα αποτελέσματα, καταδुकνεύοντας τον αμφίρροπο ρόλο του TLR9 στην καρκινογένεση στόματος.

3.4 Έκφραση του NFκB στο ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα της γλώσσας

Ο ρυθμιστικός ρόλος του μορίου NF-κB στη φυσική ανοσιακή απάντηση και ειδικότερα στο σκέλος φλεγμονής έχει μελετηθεί επισταμένα στην καρκινογένεση. Μελέτες σε κυτταρικές σειρές AKΣ έχουν δείξει ότι τα καρκινικά κύτταρα παράγουν φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, που επηρεάζουν το μικροπεριβάλλον του όγκου, οδηγώντας σε κακοήγη μετασχηματισμό και προάγοντας την επέκτασή του. Ο «ενορχηστρωτής» των φλεγμονωδών αυτών αποκρίσεων είναι το μόριο του NF-κB (Balkwill F et al 2005, Chen Z et al 1999). Το μόριο NF-κB(ρ65) παραμένει αδρανές στο κυτταρόπλασμα υπό τη δράση των αναστολέων KB-IκBs. Η αποδέσμευση των αναστολέων οδηγεί το NF-κB(ρ65) στον πυρήνα, όπου ενεργοποιεί ειδικά γονίδια-στόχους, ελέγχοντας τη φλεγμονώδη διαδικασία και προωθώντας τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων των όγκων (Baud V and Karin M 2009).

Στη μελέτη μας, η πυρηνική και/ή κυτταροπλασματική έκφραση του NF-κB (ρ65) ανιχνεύθηκε σε υψηλό ποσοστό περιπτώσεων και στις τρεις ομάδες και ήταν αυξημένη στα καρκινικά κύτταρα σε σύγκριση με το παρακείμενο μορφολογικά υγιές επιθήλιο. Τα επίπεδα έκφρασης του NF-κB(ρ65) στα καρκινικά κύτταρα παρουσιάστηκαν αυξημένα σε όγκους χαμηλής διαφοροποίησης. Τα παραπάνω αποτελέσματα ενισχύθηκαν από τη θετική συσχέτιση που παρατηρήθηκε μεταξύ της πυρηνικής έκφρασης του μορίου στα καρκινικά κύτταρα με το χαμηλό βαθμό κερατινοποίησης και την αυξημένη διηθητική ανάπτυξη. Τα δεδομένα υποστηρίζουν την άποψη ότι η ενεργοποίηση του μορίου NF-κB(ρ65) σε καρκινικά κύτταρα συσχετίζεται με τη νεοπλασματική εκτροπή και με όγκους χαμηλού βαθμού διαφοροποίησης.

Στη μελέτη μας, η ανοσοϊστοχημική έκφραση του NF-κB(ρ65) στα φλεγμονώδη κύτταρα των όγκων ήταν αυξημένη σε σύγκριση με το παρακείμενο μορφολογικά υγιή βλεννογόνο. Επιπλέον, υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του μορίου παρατηρήθηκαν στα φλεγμονώδη κύτταρα των διηθητικών καρκινωμάτων μέτριας και χαμηλής διαφοροποίησης της ομάδας Γ σε σύγκριση με τα επιφανειακά διηθητικά και *in situ* καρκινώματα της ομάδας Α. Παράλληλα, η αυξημένη έκφραση του NF-κB στα φλεγμονώδη κύτταρα των όγκων παρουσίασε αρνητική συσχέτιση με διαφορετικές παραμέτρους του συστήματος Anneroth, όπως την πλειομορφία των καρκινικών κυττάρων, τη μιτωτική δραστηριότητα και την εντονότερη διηθητική ανάπτυξη, στις διηθητικές περιπτώσεις των ομάδων Β και Γ. Τα ευρήματα αυτά πιθανότατα ερμηνεύονται στα πλαίσια μιας ανοσολογικής επιτήρησης που ασκείται κατά την πρόοδο και εξέλιξη της νεοπλασίας, η οποία εκδηλώνεται με τη δράση των φλεγμονωδών κυττάρων των όγκων λόγω της ενεργοποίησης του μορίου NF-κB.

Σε προηγούμενες μελέτες, η έκφραση του μορίου NF-κB(p65) σε ακανθοκυτταρικά καρκινώματα κεφαλής και τραχήλου παρουσιάζει αντικρουόμενα αποτελέσματα. Η έκφρασή του έχει βρεθεί είτε αμετάβλητη, είτε ήπια, είτε υψηλή (Budunova IV et al 1999, Duffey DC et al 1999, Du J et al 2003, Nakayama H et al 2001). Παρ' όλα αυτά, τα δεδομένα μας είναι σε συμφωνία με πρόσφατη μελέτη του Kamperos G και συν. 2016 όπου αναφέρεται στατιστικά σημαντική αύξηση της κυτταροπλασματικής και πυρηνικής έκφρασης του NF-κB(p65) κατά τη μετάβαση από το φυσιολογικό βλεννογόνο στις προκαρκινικές και καρκινικές βλάβες του στοματικού βλεννογόνου.

Αξίζει επίσης να σημειωθεί η θετική συσχέτιση που παρατηρήθηκε μεταξύ της έκφρασης του μορίου TLR4 (και, σε μικρότερο βαθμό, του TLR9) και του NF-κB(p65) στα φλεγμονώδη κύτταρα των όγκων, η οποία πιθανότατα υποδηλώνει ότι η ενεργοποίηση του NF-κB(p65) μπορεί εν μέρει να προκληθεί μέσω της TLR4 (και / ή TLR9) σηματοδότησης. Από την άλλη πλευρά, η θετική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του NF-κB(p65) στα καρκινικά κύτταρα με την έκφραση του TLR9, υποδηλώνει ενδεχόμενη ενεργοποίηση του NF-κB(p65) από το μόριο TLR9, στον νεοπλασματικό κυτταρικό πληθυσμό και σηματοδοτεί ογκογόνο δραστηριότητα.

3.5 Έκφραση της IFN-β στο ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα της γλώσσας

Οι ιντερφερόνες τύπου I – Interferons type I (IFNs-I) έχουν αναγνωρισθεί ως μια ομάδα κυτταροκινών που επιδρούν σε μια ετερογενή ομάδα κυττάρων. Εδώ και πολλά χρόνια ο ρόλος τους έχει συνδεθεί με την αντιϊκή και αντιβακτηριδιακή απάντηση σε ποικίλα PAMPs διαμέσω των PRRs (Zuniga EI et al 2015, Boxx GM and Cheng G 2015). Θεωρούνται επίσης σημαντικοί συνδετικοί κρίκοι μεταξύ της φυσικής και ειδικής ανοσίας διότι με ποικίλους μηχανισμούς ρυθμίζουν τη διαφοροποίηση, ενεργοποίηση, μετανάστευση και επιβίωση των φλεγμονωδών κυττάρων (μακροφάγων, μονοκυττάρων, κυττάρων φυσικών φονέων, δενδριτικών κυττάρων καθώς και B και T κυττάρων (Carobianchi MR et al 2015). Τα τελευταία χρόνια έχει επανεκτιμηθεί το γεγονός ότι DNA που προέρχεται από κατεστραμμένα ή κύτταρα που βρίσκονται σε πορεία κυτταρικού θανάτου, μπορεί να εγείρει την παραγωγή IFNs-I. Έτσι ο αντι-ογκογόνος ρόλος των IFNs έχει επανέλθει στο προσκήνιο (Fuertes MB et al 2013).

Στη μελέτη μας, η IFN-β εκφράστηκε έντονα στα καρκινικά κύτταρα, όπως επίσης και στα φλεγμονώδη κύτταρα των όγκων, σε σύγκριση με τον παρακείμενο μορφολογικά υγιή βλεννογόνο. Ήταν αξιοσημείωτο, ότι η έκφραση και στους δύο κυτταρικούς πληθυσμούς ήταν υψηλότερη στα διηθητικά καρκινώματα (Ομάδες Β και Γ) σε σύγκριση με τα *in situ* ή επιφανειακά διηθητικά καρκινώματα (Ομάδα Α). Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι, κατά την πολυσταδιακή διαδικασία της καρκινογένεσης του στόματος, η παραγωγή της IFN-β προάγει πιθανότατα τη μετάβαση από το μορφολογικά υγιές, στη νεοπλασματική εκτροπή και στη διήθηση, υπόθεση η οποία απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση. Από την άλλη πλευρά, η αρνητική

συσχέτιση που παρατηρήθηκε στη μελέτη μας μεταξύ του ποσοστού των θετικών φλεγμονωδών κυττάρων των όγκων για την IFN-β και του αριθμού των μιώσεων των καρκινικών κυττάρων (στην ομάδα Γ) συνηγορεί υπέρ μιας πιθανής αντι-ογκογόνου δραστηριότητας της IFN-β.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασε η θετική συσχέτιση που παρατηρήθηκε μεταξύ της έκφρασης του μορίου TLR4 και της IFN-β στα φλεγμονώδη κύτταρα των όγκων. Η παραγωγή IFN-β από τα φλεγμονώδη κύτταρα των όγκων ενεργοποιείται μέσω της TLR4 MyD88- ανεξάρτητης οδού και των γονιδίων που ρυθμίζονται από το μόριο TRIF (Platanias LC 2005). Είναι γνωστό ότι οι συνδέτες που προκαλούν την ενεργοποίηση του TLR4 (όπως το μικροβίωμα των όγκων καθώς και θραύσματα DNA που προέρχονται από τα νεοπλασματικά κύτταρα που έχουν υποστεί βλάβη) πυροδοτούν μια πολύπλοκη αντιβακτηριακή, αντι-ϊική και αντι-ογκογόνο απόκριση (Perkins DJ and Vogel SN 2015). Τα ευρήματα της μελέτης μας καταδεικνύουν ότι ο φλεγμονώδης πληθυσμός των όγκων ευαισθητοποιείται από τα PAMPs και DAMPs μέσω του μορίου TLR4 προς την κατεύθυνση της παραγωγής IFN-β και υποδηλώνουν την προσπάθεια του οργανισμού για την αναχαίτιση της ανάπτυξης της νεοπλασίας.

3.6 Σχέση των TLRs με το μικροβίωμα και τον ιό HPV

Ο ρόλος των παθογόνων μικροοργανισμών στην ενεργοποίηση των TLRs και η σημασία τους καρκινογένεσης του στόματος έχει αποτελέσει αντικείμενο έντονου προβληματισμού. Το ογκογόνο δυναμικό του μικροβιώματος έχει μελετηθεί εκτενώς σε διάφορους τύπους καρκίνου όπως στον καρκίνο του γαστρεντερικού, όπου η λοίμωξη από το *Helicobacter pylori* θεωρείται κομβικής σημασίας (Meurman JH 2010). Η στοματική κοιλότητα ως αρχή του γαστρεντερικού σωλήνα αποικίζεται από παρόμοια είδη μικροβίων με τα υπόλοιπα τμήματά του και πιθανότατα το μικροβίωμα συμμετέχει με τον ίδιο τρόπο στην καρκινογένεση του στόματος. Τρία βακτήρια ο *Streptococcus mitis*, η *Prevotella melaninogenica* και η *Carnocytophaga gingivalis* έχουν ανευρεθεί επανειλημμένα σε ΑΚΣ (Mager DL et al 2005). Επομένως η πτωχή στοματική υγιεινή μπορεί να σχετίζεται με την ανάπτυξη του καρκίνου του στόματος μέσα από μηχανισμούς που περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση των TLRs. Ο Kauppi JH και συν. 2015 ισχυρίζονται ότι στο ΑΚΓ το μόριο TLR9 ενεργοποιείται από το μικροβίωμα προάγοντας τη διήθηση και τη μετάσταση.

Εκτός από την πιθανή εμπλοκή των βακτηρίων στην ενεργοποίηση των TLRs στον καρκίνο του στόματος, η λοίμωξη από τον ιό HPV, πιθανότατα διαδραματίζει παθογενετικό ρόλο. Για να μελετηθεί η υπόθεση αυτή, η HPV θετικότητα καθορίστηκε με τη συνδυασμένη χρήση δύο μεθόδων (ανίχνευση HR-HPVs με την τεχνική της PCR και ταυτόχρονη ανοσοϊστοχημική θετικότητα για το μόριο p16^{INK4α}). Με τον τρόπο περιορίζεται σημαντικά η πιθανότητα ψευδώς θετικών/αρνητικών αποτελεσμάτων που παρατηρούνται στα καρκινώματα του στόματος όταν η κάθε μια από τις δύο μεθόδους εφαρμόζεται μεμονωμένα (Lingen MW et al 2013, Abreu AL 2012). Στη μελέτη μας HPV θετικότητα ανιχνεύθηκε στο 15,9% των περιπτώσεων, σε συμφωνία

με αποτελέσματα προηγούμενων μελετών οι οποίες χρησιμοποιούν παρόμοιες μεθόδους ανίχνευσης και στις οποίες το ποσοστό ανίχνευσης HPV κυμαινόταν από 11,3% έως 12,8% σε ΑΚΓ (Paz IB et al 1997, Tsimplaki E et al 2014). Οι HPV (+) περιπτώσεις της μελέτης μας περιελάμβαναν στελέχη υψηλού κινδύνου, με πιο διαδεδομένο το στέλεχος HPV 31, ακολουθούμενο από τα στελέχη HPV 70, 16 και 35. Τα στοιχεία αυτά είναι σε μερική συμφωνία με προηγούμενες μελέτες, σύμφωνα με τις οποίες τα πιο συχνά στελέχη HPV που εμπλέκονται στην παθογένεση του ΑΚΓ είναι τα HPV 16, 18, 33 και 35 (Dahlgren L et al 2004, Liang XH et al 2008, Lee S et al 2010, Elango KJ et al 2011). Από την άλλη πλευρά υψηλότερα (22-50%) (Lee S et al 2010, Elango KJ et al 2011, Blioumi E et al 2014) ή/και χαμηλότερα ποσοστά (1,9-2,3%) ανίχνευσης HPV DNA έχουν αναφερθεί σε άλλες μελέτες (Dahlgren L et al 2004, Liang X-H et al 2008).

Θετική συσχέτιση παρατηρήθηκε μεταξύ της HPV θετικότητας και των επιπέδων του TLR9 σε αντίθεση με εκείνα του TLR4. Ειδικότερα, θετική συσχέτιση παρατηρήθηκε μεταξύ HPV θετικότητας και του ποσοστού θετικών TLR9 φλεγμονωδών κυττάρων στο σύνολο του δείγματος καθώς και του ποσοστού TLR9 θετικών κυττάρων, της έντασης χρώσης και του συνολικού αθροίσματος (ποσοστού και έντασης χρώσης) στα *in situ* και πρώιμα διηθητικά καρκινώματα της ομάδας Α. Είναι γνωστό ότι όταν ο ιός HPV εισέρχεται στον οργανισμό, τα δομικά του στοιχεία που λειτουργούν ως PAMPs δεσμεύονται από τους TLRs των κυττάρων της φυσικής ανοσίας που βρίσκονται στην περιοχή (δενδριτικά κύτταρα, μακροφάγα και κύτταρα φυσικοί φονείς -NK-cells) με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των οδών του NF-κΒ και MAPKs την έκκριση προφλεγμονωδών διαμεσολαβητών για την προαγωγή της ειδικής ανοσίας (Medzhitov R 2007, Beutler BA 2009).

Ο ιός HPV τροποποιεί στην TLR σηματοδότηση ώστε να εγκατασταθεί εμμένουσα λοίμωξη και να προάγει την καρκινογένεση (Zhou Q et al, 2013). Έχει αποδειχθεί ότι το CpG-DNA της πρωτεΐνης E6 του HPV16 μπορεί να ενεργοποιήσει τον TLR9 (Hasan UA et al 2007). Καθώς ο ιός εισέρχεται στο ενδόσωμα και απεκδύεται του καψιδίου του, το CpG-DNA του γονιδιώματός του αναγνωρίζεται από τον TLR9 ο οποίος ως γνωστόν εντοπίζεται στα λυσοσώματα και ενδοσώματα του κυττάρου (Richards RM et al 2006). Η σύνδεση του CpG-DNA της E6 ογκοπρωτεΐνης του ιού HPV16 με το TLR9 οδηγεί στην αναστολή της μεταγραφής του τελευταίου, και στην αποτυχία της παρουσίας του ιού στο ανοσοποιητικό σύστημα. Με τον τρόπο αυτό διευκολύνεται η απρόσκοπτη παραμονή του ιού και η ογκογόνος δράση του (Hasan UA et al 2007, Zhou Q et al 2013). Παρ όλα αυτά η παρατήρηση στη μελέτη μας της θετικής συσχέτισης μεταξύ της HPV θετικότητας με την κυτταροπλασματική έκφραση του NF-κΒ(ρ65) στα καρκινικά κύτταρα των *in situ* και επιφανειακά διηθητικών καρκινωμάτων της ομάδας Α ενδεχομένως είναι αποτέλεσμα της προκαλούμενης ανοσιακής απάντησης στην παρουσία του ιού. Η λειτουργική όμως δράση του μορίου NF-κΒ(ρ65) και η σημασία της κυτταροπλασματικής ή/και πυρηνικής έκφρασης του μορίου είναι ακόμα υπό διερεύνηση (Bowie AG et al 2004, Mishra A et al 2007).

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συμπερασματικά, στη μελέτη μας έγινε προσπάθεια διερεύνησης του ρόλου των TLR4 και TLR9 στην καρκινογένεση του στόματος και ιδιαίτερα στην καρκινογένεση του «κινητού» μέρους της γλώσσας.

- Αυξημένα επίπεδα έκφρασης των TLR4 και TLR9 σε καρκινικά κύτταρα συγκριτικά με το παρακείμενο, μορφολογικά υγιές επιθήλιο (ιδίως στα διηθητικά καρκινώματα σε σχέση με τα *in situ* και επιφανειακά διηθητικά, τουλάχιστον για τον TLR4), υποδηλώνει ότι τα μόρια αυτά πιθανότατα συμμετέχουν στην καρκινογένεση του στόματος.
- Είναι πιθανό ότι η αυξανόμενη έκφραση των TLRs ενεργοποιεί τον NF-κΒ σε καρκινικά κύτταρα, συμμετέχοντας στον καρκινικό μετασχηματισμό του στοματικού βλεννογόνου και προάγοντας την κυτταρική αποδιαφοροποίηση.
- Αν και η έκφραση των TLR4 και TLR9 στα φλεγμονώδη κύτταρα των όγκων είναι αυξημένη, η αρνητική συσχέτιση με το χαμηλό βαθμό διαφοροποίησης των όγκων, υποστηρίζει μια αντιογκογόνο δραστηριότητα, πιθανότατα μέσω της παραγωγής της IFN-β.
- Η λοίμωξη από τον ιό HPV μπορεί να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο μόνο σε μια μειοψηφία περιπτώσεων καρκίνου του στόματος, εντούτοις η θετική συσχέτιση της παρουσίας του ιού HPV με την έκφραση των μορίων TLR9 και NF-κΒ υποδηλώνει ότι, σε HPV σχετιζόμενα ΑΚΓ, ο ιός μπορεί να αναγνωριστεί από τον TLR9, συμμετέχοντας στην ενεργοποίηση της ανοσοαπόκρισης.
- Η TLR σηματοδότηση στον καρκίνο του στόματος και στο μικροπεριβάλλον του και η συσχέτισή της με τη μικροβιακή και ιογενή προσβολή χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης.

IV. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η TLR-4 ΚΑΙ TLR-9 ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΗ ΑΚΑΝΘΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΓΛΩΣΣΑΣ

Εισαγωγή: Οι υποδοχείς τύπου Toll (TLRs) διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε πολλούς τύπους καρκίνου, είτε προάγοντας την ανάπτυξη του όγκου μέσω της ενεργοποίησης της οδού NF-κΒ είτε αναπτύσσοντας αντινεοπλασματική δράση μέσω της παραγωγής ιντερφερονών τύπου I. Στην μελέτη, διερευνήθηκε ο λειτουργικός ρόλος των υποδοχέων TLR4 και TLR9 σε ακανθοκυτταρικά καρκινώματα γλώσσας διαφορετικού βαθμού διαφοροποίησης και HPV θετικότητας.

Υλικά και Μέθοδοι: 59 μερικές βιοψίες ΑΚΓ και πέντε in situ καρκινώματα γλώσσας, που αντιστοιχούσαν σε 29 άρρενα και 34 θήλυ άτομα (μέση ηλικία 59,3 ετη και ηλικιακό εύρος 26-83 έτη) συμπεριελήφθησαν στη μελέτη. Η ανοσοϊστοχημική έκφραση των μορίων TLR4, TLR9, NF-κΒ(ρ65) και IFN-β αξιολογήθηκε ως προς την ένταση και το ποσοστό θετικότητας της χρώσης στα κύτταρων των όγκων και στα φλεγμονώδη κύτταρα και συσχετίστηκε με ιστολογικές παραμέτρους των όγκων, την έκφραση των μορίων στον παρακείμενο των βλαβών μορφολογικά υγιή βλεννογόνο και με την παρουσία του ιού HPV (ανίχνευση HPV DNA με PCR και ανοσοϊστοχημική έκφραση του μορίου p16 INK4a σε ποσοστό > 70% των καρκινικών κυττάρων).

Αποτελέσματα: Όλα τα μόρια εκφράστηκαν σε διαφορετικό βαθμό στη συντριπτική πλειονότητα των περιπτώσεων, τόσο στα κύτταρα των όγκων όσο και στα φλεγμονώδη κύτταρα. Οι μέσες τιμές του IHC score για τα μόρια TLR4, NF-κΒ και IFN-β (όχι για το TLR9) έδειξαν αύξηση με τη μετάβαση σε χαμηλότερου βαθμού ιστολογική διαφοροποίηση ($p < 0,05$) και από το παρακείμενο στον καρκινικό βλεννογόνο ($p < 0,001$). Η παρουσία HPV ανιχνεύθηκε στο 15,9% των δειγμάτων και συσχετίστηκε θετικά με την έκφραση του TLR9 στα φλεγμονώδη κύτταρα ($RHO = 0,274, \rho = 0,030$).

Συμπέρασμα: Στατιστικά σημαντική έκφραση των μορίων TLR4 και TLR9 παρατηρήθηκε στο ΑΚΓ η οποία επηρεάζοντας την έκφραση σημαντικών κατιόντων μορίων όπως ο NF-κΒ και της IFN-β, πιθανότατα διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση του στόματος.

SUMMARY

TLR-4 AND TLR9 IMMUNE RESPONSE IN TONGUE SQUAMOUS CELL CARCINOMA

ARGYRIOS G. DASKALOPOULOS DDS MSc

Objectives: Squamous cell carcinoma (SCC) is the most common malignant neoplasm of the oral cavity, most frequently affecting the tongue. SCC is considered to be an aggressive tumor with high rate of regional metastasis and a guarded prognosis. Elucidating the molecular mechanisms implicated in oral carcinogenesis including a better understanding of the interaction of tumor cells with their microenvironment and its implications for cancer development and growth, is a major research objective. Toll-like receptors (TLRs) are arguably the best studied members of the family known as Pattern Recognition Receptors (PRRs). TLRs recognize exogenous components of a wide variety of pathogens (Pathogens Associated Molecular Patterns; PAMPs) or endogenous molecules, released from damaged tissues (Damage Associated Molecular Patterns; DAMPs) regulating the innate and adaptive immunity. Due to these functions TLRs play a pivotal role in many types of cancer, either supporting tumor progression by upregulating of the NF- κ B pathway or cancer inhibition by inducing type I interferons. Recent studies have implicated TLRs as important players in OSCC. The aim of our study was to investigate TLR4 and TLR9 functional role in Tongue Squamous Cell Carcinoma (TSCC) samples of variable tumor grade and HPV status.

Materials and Methods: Fifty-eight formalin-fixed and paraffin-embedded biopsy specimens of TSCCs samples and five in situ carcinomas, corresponding to 29 males and 34 females (mean age 59.3 years, and age range of 26-83 years), were selected from the archives of the Biopsy Service of the Department of Oral Medicine and Pathology, University of Athens, Greece. Immunohistochemical expression of TLR4, TLR9, NF- κ B(p65) and IFN- β was graded in a semi-quantitative manner, according to the intensity and percentage of positive tumor and inflammatory cells and correlated with the degree of differentiation (based on the WHO 2017 criteria), the IHC expression in the adjacent morphological normal mucosa and the HPV status (with the criteria of PCR positivity and p16^{INK4a} expression in >70% of tumor cells).

In addition, IHC expression of the molecules studied was correlated (only in invasive SCCs cases), with the five individual histopathologic parameters of modified Anneroth system (i.e. keratinization, nuclear pleomorphism, number of mitoses, pattern of invasion, and inflammation). IHC scores for TLR4, TLR9, NF- κ B and INF- β were compared among different histopathologic categories (well, moderately and poorly differentiated TSCCs), separately for tumor cells and inflammatory cells with the application of Kruskal-Wallis and Dunn's tests. Comparative analysis of the IHC scores between tumor cells and adjacent morphologically normal mucosa was performed with the application of Wilcoxon Signed Ranks test. The Spearman's correlation coefficient (ρ) was calculated to measure the association of IHC expression levels

between the different studied molecules, the HPV positivity status and the histopathologic parameters evaluated by the modified Anneroth system.

Results: Histopathologically, 5 cases (7.9%) were classified as CIS, 9 cases (14.3%) as superficially invasive SCC, and 49 cases as fully invasive SCC, including 20 (31.7%) well differentiated SCC, 23 (35.6%) moderately differentiated SCC and 6 (9.5%) poorly differentiated SCC. For further analysis, samples were also re-grouped into 3 broader histopathologic categories, as follows: Group A: CIS and superficially invasive SCC (14 cases), Group B: well differentiated SCC (20 cases), and group C: moderately and poorly differentiated SCC (29 cases).

Combining HPV DNA PCR and p16INK4a IHC results, HPV positivity was determined in 10 out of 63 samples (15.9%) and the most prevalent subtype was HPV 31 (in 6 cases, 60.0%), followed by HPV 70, 16, 35, 45, 40 and 68. A positive correlation between HPV positivity and increased pleomorphism ($RHO=0.453$, $p=0.014$) in group C (moderately and poorly differentiated carcinomas) was noticed. All molecules were expressed at different levels in both tumor and inflammatory cells in the vast majority of cases. The mean values of IHC scores for TLR4, NF- κ B and IFN- β (but not TLR9) showed a statistical significant increase with progression towards higher histological grades ($p<0.05$) and all the four of them from the adjacent to cancerous mucosa ($p<0.001$).

In the whole sample, as well as in groups A and C, the total score for TLR4 expression was positively correlated with the total scores of NF- κ B score ($RHO=0.422$, $p=0.001$, $RHO=0.711$, $p=0.004$ and $RHO=0.620$, $p=0.000$, respectively). TLR4 total score was also positively correlated with IFN- β in the whole sample and group C ($RHO=0.239$, $p=0.061$ and $RHO=0.577$, $p=0.001$, respectively). TLR4 expression in tumor inflammatory cells showed a negative correlation ($RHO = -0.419$, $p=0.003$ for percentage score; $RHO=-0.375$, $p=0.008$ for intensity score; and $RHO=-0.393$, $p=0.005$ for total score) with the number of tumor cell mitoses. The percentage score of TLR9 expression in tumor inflammatory cells showed a negative correlation with the parameters of keratinization ($RHO=-0.298$, $p=0.037$), type of invasion ($RHO=-0.309$, $p=0.031$) and number of mitoses ($RHO=-0.344$, $p=0.015$). HPV presence was positively associated with TLR9 percentage score in the inflammatory cells ($RHO=0.274$, $p=0.030$) as well as the percentage, intensity and total score of NF- κ B cytoplasmic expression in tumor cells of group A ($RHO=0.847$, $p=0.00$, for all three scores).

Discussion-Conclusions

The study attempted to shed some light on the role of TLR4 and TLR9 in oral, especially mobile tongue, cancer. Elevated levels of TLR4 and TLR9 in tumor cells, compared to the adjacent, morphologically normal epithelium (as well as in fully invasive cases compared to CIS and SI SCC), suggest that these molecules may participate in oral carcinogenesis. Our results are in accordance with previous studies suggesting that upregulation of TLRs expression possibly triggers NF- κ B activation in tumor cells,

participating in oral mucosa neoplastic transformation and loss of differentiation. On the other hand, although TLR4 and TLR9 expression in tumor inflammatory cells is also upregulated, a negative correlation with tumor grade and more aggressive histopathologic features is detected thus supporting an anti-tumor activity, possibly through IFN- β production.

Notwithstanding that HPV infection may play an important role only in a minority of oral cancer cases, the positive correlations of HPV positivity with TLR9 and NF- κ B levels suggest that, in HPV-related OTSCCs, the virus may be recognized by TLR9 participating, possibly manipulating the activation of the immune response. Obviously, the intricacies of TLR signaling in oral cancer and its microenvironment, its correlation with microbial and viral influences and its effects on tumor promotion and/or inhibition need to be further explored. Especially, the clinical significance of these molecular events awaits further confirmation through large scale studies that will specifically assess their prognostic and predictive value and will test the usefulness of their manipulation for therapeutic purposes.

V.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Basic Immunology. Functions and Disorders of the Immune System. 5th Edition. St Louis Missouri: Elsevier Inc, 2016: Introduction to the Immune System : 1-7.

Abreu AL, Souza RP, Gimenes F et al. A review of methods for detect human Papillomavirus infection. *Viol J* 2012; 9: 262.

Akhter M, Hossain S, Rahman QB et al. A study on histological grading of oral squamous cell carcinoma and its co-relationship with regional metastasis. *J Oral Maxillofac Pathol* 2011; 15: 168-76.

Akira S, Yamamoto M, Takeda K. Role of adapters in Toll-like receptor signaling. *Biochem Soc Trans* 2003; 31(Pt 3): 637–642.

Angadi PV, Savitha JK, Rao SS et al. Oral field cancerization: current evidence and future perspectives. *Oral Maxillofac Surg* 2012; 16: 171-180.

Anneroth G, Batsakis J, Luna M. Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. *Scand J Dent Res* 1987; 95: 229–249.

Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, et al. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med* 2007; 13: 1050-1059.

Arnott CH, Scott KA, Moore RJ et al. Tumor necrosis factor- α mediates tumor promotion via a PKCa-AP-1-dependent pathway. *Oncogene* 2002; 21 : 4728-4738.

Asiatic A, Ahmad ST, Mohammad SO et al. Review of the current knowledge on the epidemiology, pathogenesis, and prevention of human papillomavirus infection. *Eur J Cancer Prev* 2014; 23: 206-224.

Balkwill F, Charles KA, Mantovani A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell* 2005; 7: 211-217.

Barnes L, Eveson JW, Reichart P et al. Tumours of the oral cavity and oropharynx. In: World Health Organization classification of tumours: pathology and genetics of head and neck tumours. Lyon, France, IARC Press 2005.

Basith S, Manavalan B, Yoo TH et al. Roles of toll-like receptors in cancer: a double-edged sword for defense and offense. *Arch Pharm Res* 2012; 35: 1297–1316.

Baud V, Karin M. Is NF-kappaB a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls. *Nat Rev Drug Discov* 2009; 8: 33-40.

Bello IO, Soin, Y, Salo T. Prognostic evaluation of oral tongue cancer: means, markers and perspectives (I). *Oral Oncol* 2010; 46: 630-635.

Beutler BA. TLRs and innate immunity. *Blood* 2009; 113: 1399–1407.

Biglioli F. Surgical therapy of oral cancer. *Minerva Stomatol* 2009; 58: 157-180.

Bishop JA, Ma XJ, Wang H, et al. Detection of transcriptionally active high-risk HPV in patients with head and neck squamous cell carcinoma as visualized by a novel E6/E7 mRNA in situ hybridization method. *Am J Surg Pathol* 2012; 36: 1874-1882.

Bishop JA, Lewis JS Jr, Rocco JW et al. HPV-related squamous cell carcinoma of the head and neck: An update on testing in routine pathology practice. *Semin Diagn Pathol* 2015; 32: 344-51.

Blioumi E, Chatzidimitriou D, Pazartzi Ch et al. Detection and typing of human papillomaviruses (HPV) in malignant, dysplastic, nondysplastic and normal oral epithelium by nested polymerase chain reaction, immunohistochemistry and transitional electron microscopy in patients of northern Greece. *Oral Oncol* 2014; 50: 840-847.

Bouquot JE. Oral leukoplakia and erythroplakia: a review and update. *Pract Period Aesthet Dent* 1994; 6: 9-17.

Bowie AG, Zhan J, Marshall WL. Viral appropriation of apoptotic and NF- κ B signaling pathways. *J Cell Biochem* 2004; 91: 1099–1108.

Boxx GM, Cheng G. The Roles of Type I Interferon in Bacterial Infection. *Cell Host Microbe* 2016; 19: 760-769.

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I et al. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 2018; 68: 394–424.

Bryne M, Koppang HS, Lilleng R et al. New malignancy grading is a better prognostic indicator than Broders' grading in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med* 1989; 18: 432-437.

Budunova IV, Perez P, Vaden VR et al. Increased expression of p50-NF-kappaB and constitutive activation of NF κ B transcription factors during mouse skin carcinogenesis. *Oncogene* 1999; 18: 7423–7431.

Califano J, Westra WH, Meininger et al. Genetic progression and clonal relationship of recurrent premalignant head and neck lesions. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 347-352.

Capobianchi MR, Uleri E, Caglioti C et al. Type I IFN family members: similarity, differences and interaction. *Cytokine Growth Factor Rev* 2015; 26: 103-111.

Capote A, Escorial V, Munoz-Guerra MF et al. Elective neck dissection in early-stage oral squamous cell carcinoma-does it influence recurrence and survival? *Head Neck* 2007; 29: 3–11.

Chan AT, Ogino S, Fuchs CS. Aspirin and the risk of colorectal cancer in relation to the expression of COX-2. *N Engl J Med* 2007; 356: 2131-2141.

Chan HM, Shikama N, La Thangue NB. Control of gene expression and the cell cycle. *Essays Biochem* 2001; 37: 87-96.

Chang YJ, Wu MS, Lin JT, et al. Helicobacter pylori-Induced invasion and angiogenesis of gastric cells is mediated by cyclooxygenase-2 induction through TLR2/TLR9 and promoter regulation. *J Immunol* 2005; 175: 8242–8252.

Chaturvedi AK, Engels EA, Pfeiffer RM et al. Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. *J Clin Oncol* 2011; 29: 4294-4311.

Chen R, Alvero AB, Silasi DA et al. Inflammation, cancer and chemoresistance: taking advantage of the toll-like receptor signaling pathway. *Am J Reprod Immunol* 2007; 57: 93–107.

Chen SW, Zhang Q, Guo ZM et al. Trends in clinical features and survival of oral cavity cancer: fifty years of experience with 3,362 consecutive cases from a single institution *Cancer Manag Res* 2018; 10: 4523–453.

Chen X, Zhao Yu. Human papilloma virus infection in oral potentially malignant disorders and cancer. *Arch Oral Biol* 2017; 83: 334–339.

Chen Z, Malhotra PS, Thomas GR et al. Expression of proinflammatory and proangiogenic cytokines in patients with head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 1369-1379.

Chen Z, Wang W, Liang J et al. Association between toll-like receptors 9 (TLR9) gene polymorphism and risk of pulmonary tuberculosis: meta-analysis. *BMC Pulm Med* 2015; 8: 15:57.

Chow LQ, Haddad R, Gupta S et al. Antitumor activity of Pembrolizumab in biomarker-unselected patients with recurrent and/or metastatic Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: results from the Phase Ib KEYNOTE-012 expansion cohort. *J Clin Oncol* 2016; 34: 3838-3845.

Chi AC, Day TA, Neville BW. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma—an update. *CA Cancer J Clin* 2015; 65: 401-421.

Chumakov PM. Versatile functions of p53 protein in multicellular organisms. *Biochemistry (Mosc)* 2007; 72: 1399-1421.

Cohen B and Parkin J. An overview of the immune system. *Lancet* 2001; 357(9270): 1777–1789.

Cooksley WG. The role of interferon therapy in Hepatitis B. *Med Gen Med* 2004; 6: 16.

Croce CM. Oncogenes and cancer. *NEJM* 2008; 358: 501-511.

Cui J, Chen Y, Wang HY et al. Mechanisms and pathways of innate immune activation and regulation in health and cancer. *Hum Vaccin Immunotherapy* 2014; 10: 3270-3285.

Dahlgren L, Dahlstrand HM, Lindquist D et al. Human papillomavirus is more common in base of tongue than in mobile tongue cancer and is a favorable prognostic factor in base of tongue cancer patients. *Int J Cancer* 2004; 112: 1015-1019.

De Andrea M, Gariglio M, Gioia D et al. The interferon system: an overview. *Eur J Paediatr Neurol* 2002; 6: A41–58.

de Martel C, Ferlay J, Franscenschi S et al. Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *Lancet Oncol* 2012; 13: 607-615.

De Nardo D. Toll-like receptors. Activation, signaling and transcriptional modulation. *Cytokine* 2015; 74: 181-189.

De Sanctis V, Bossi P, Sanguineti G et al. Mucositis in head and neck cancer patients treated with radiotherapy and systemic therapies: Literature review and consensus statements. *Crit Rev in Oncol/Hematol* 2016; 100: 147–166.

de Villiers EM. Cross-roads in the classification of papillomaviruses. *Virology* 2013; 445: 2-10.

De Weerd NA, Samarajiwa SA, Hertzog PJ. Type I interferon receptors: biochemistry and biological functions. *J Biol Chem* 2007; 282 : 20053–20057.

Dhib-Jalbut S, Marks S. Interferon-beta mechanisms of action in multiple sclerosis *Neurology*. 2010; 74(Suppl 1): S17-S24.

Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol* 2005; 32: S7–15.

Doorbar J, Quint W, Banks L et al. The biology and life cycle of human papillomaviruses. *Vaccine* 2012; 20: F55-70.

Doyle SL, O'Neill LA. Toll-like receptors: from the discovery of NF-kappaB to new insights into transcriptional regulations in innate immunity. *Biochem Pharmacol* 2006; 72: 1102–1113.

Droemann D, Albrecht D, Gerdes J et al. Human lung cancer cells express functionally active Toll-like receptor 9. *Respir Res* 2005; 6: 1

D'Souza G, Dempsey A. The role of HPV in head and neck cancer and review of the HPV vaccine. *Prev Med* 2011; 1: S5-S11.

D'Souza G, McNeel TS, Fakhry C. Understanding personal risk of oropharyngeal cancer: risk-groups for oncogenic oral HPV infection and oropharyngeal cancer. *Ann Oncol* 2017; 28: 3065-3069.

Du J, Chen GG, Lantos AC et al. The nuclear localization of NFκB and p53 is positively correlated with HPV16 E7 level in laryngeal squamous cell carcinoma. *J Histochem Cytochem* 2003; 51: 533–539.

Duffey DC, Chen Z, Dong G et al. Expression of a dominant-negative mutant inhibitor-κBa of nuclear factor-κB in human head and neck squamous cell carcinoma inhibits survival, proinflammatory cytokine expression, and tumor growth in vivo. *Cancer Res* 1999; 59: 3468–3474.

Duncan LD, Winkler MDO, Carlson ER et al. p16 immunohistochemistry can be used to detect human papillomavirus in oral cavity squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg* 2013; 71: 1367-1375.

Elango KJ, Suresh A, Erode EM, et al. Role of human papilloma virus in oral tongue squamous cell carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev* 2011; 12: 889.

El-Naggar AK, Westra WH. p16 expression as a surrogate marker for HPV-related oropharyngeal carcinoma: a guide for interpretative relevance and consistency. *Head Neck* 2012; 34: 459–461.

El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, Takata T, Slootweg PJ. (Eds): *WHO Classification of Head and Neck Tumors (4th edition)*. Lyon France. IARC. Lyon 2017: 106-111.

Escárcega RO, Fuentes-Alexandro S, García-Carrasco M. et al. The transcription factor nuclear factor-kappa B and cancer. *Clin Oncol* 2007; 19: 154–161.

Fensterl V, Sen GC. Interferons and viral infections. *BioFactors* 2009; 35: 14–20.

Ferris RL, Blumenschein G Jr, Fayette J et al. Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *N Engl Med* 2016; 375: 1856-1867.

Fiola S, Gosselin D, Takada K et al. TLR9 contributes to the recognition of EBV by primary monocytes and plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* 2010; 185: 3620–3631.

Freudlsperger C, Burnett JR, Friedman JA et al. EGFR-PI3K-AKT mTOR signaling in head and neck squamous cell carcinomas: attractive targets for molecular-oriented therapy. *Expert Opin Ther Targets* 2011; 15: 63-74.

Fridman WH, Pages F, Sautes-Fridman C, et al. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Can cer* 2012; 12: 298–306.

Fuertes MB, Woo SR, Burnett B et al. Type I IFN response and innate immune sensing of cancer. *Trends Immunol.* 2013; 34: 67–73.

Furness S, Glenny AM, Worthington HV et al. Interventions for the treatment of oral cavity and oropharyngeal cancer: chemotherapy. *Cochrane Database Syst Rev* 2010; 13: p.CD006386.

Gajewski TF, Corrales L. New perspectives on type I IFNs in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 2015; 26: 175-178.

Galon J, Mlecnik B, Bindea G et al. Towards the introduction of the ‘Immunoscore’ in the classification of malignant tumors. *J Pathol* 2014; 232: 199–209.

Garzon R, Calin GA, Croce CM. MicroRNAs in Cancer *Annu Rev Med* 2009; 60: 167–179.

Gatti G, Quintar AA, Andreani V et al. Expression of Toll-like receptor 4 in the prostate gland and its association with the severity of prostate cancer. *Prostate* 2009; 69: 1387-1397.

Genden EM, Ferlito A, Silver CE et al. Contemporary management of cancer of the oral cavity. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2010; 267: 1001-1017.

Gillison ML, Koch WM, Capone RB M et al. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 709–720.

Gilmore TD. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* 2006; 25: 6680–6684.

Gkouveris I, Nikitakis N, Avgoustidis D et al. ERK1/2, JNK and STAT3 activation and correlation with tumor differentiation in oral SCC. *Histol Histopathol* 2017; 32: 1065-1076.

Gnepp DR. *Diagnostic Surgical Pathology of Head and Neck*. 2nd edition. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier, 2009: 66-74.

Gong X, Qin S. Study progression of anti-angiogenetic therapy and its combination with other agents for the treatment of advanced hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Surg Nutr* 2018; 7: 466-474.

Gorsky M, Epstein JB, Oakley C et al. Carcinoma of the tongue: a case series analysis of clinical presentation, risk factors, staging, and out-come. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004; 98: 546–552.

Greene FL, Page DL, Fleming ID et al. eds. Lip and oral cavity. In: *AJCC cancer staging manual*, 6th ed. Springer-Verlag, New York, 2002: 23-32.

Hacker H, Redecke V, Blagoev B et al. Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. *Nature* 2006; 439: 204–207.

Hagerling C, Casbon AJ, Werb Z. Balancing the innate immune system in tumor development. *Trends Cell Biol* 2015; 25 : 214-220.

Haji Abdolvahab M, Mofrad MR, Schellekens H. Interferon Beta: From Molecular Level to Therapeutic Effects. *Int Rev Cell Mol Biol* 2016; 326: 343-372.

Hanna E, Quick J, Libutti SK. The tumor microenvironment: a novel target for cancer therapy. *Oral Dis* 2009; 15 : 8-17.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144: 646–674.

Hasan UA, Bates E, Takeshita F et al TLR9 expression and function is abolished by the cervical cancer-associated human papillomavirus type 16. *J Immunol* 2007; 178: 3186–3197.

Hasina R, Lingen MW. Angiogenesis in oral cancer. *J Dent Educ* 2001; 65: 1282-1290.

Hatziapostolou M, Iliopoulos D. Epigenetic aberrations during oncogenesis. *Cell Mol Life Sci* 2011; 68: 1681-1702.

Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000; 408: 740–745.

Hodgkinson CP, Ye S. Toll-like receptors, their ligands, and atherosclerosis. *SciWorld J* 2011; 11: 437–453.

Hoppe-Seyler K, Bossler F, Braun JA et al. The HPV E6/E7 Oncogenes: Key Factors for Viral Carcinogenesis and Therapeutic Targets. *Trends Microbiol* 2018; 26: 158-168.

Hoshino K, Kaisho T, Iwabe T et al. Differential involvement of IFN-beta in Toll-like receptor-stimulated dendritic cell activation. *Int Immunol* 2002; 14: 1225-1231.

Hu J, Ge W, Xu J. HPV 16 E7 inhibits OSCC cell proliferation invasion, and metastasis by upregulating the expression of miR-20a. *Tumour Biol* 2016; 37: 9433–9440.

Huang B, Zhao J, Li H, et al. Toll-like receptors on tumor cells facilitate evasion of immune surveillance. *Cancer Res* 2005; 65: 5009–5014.

Hubbers CU, Akgul B. HPV and cancer of the oral cavity. *Virulence* 2015; 6: 244-248.

Irimie-Aghiorghiesei AI, Pop-Bica C, Pintea S et al. Prognostic Value of MiR-21: An Updated Meta-Analysis in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC). *J Clin Med* 2019; 8 (12). pii: E2041. doi: 10.3390/jcm8122041.

Ilvesaro JM, Merrell MA, Swain TM et al. Toll like receptor-9 agonists stimulate prostate cancer invasion in vitro. *Prostate* 2007; 67: 774-781.

Ioannou S, Voulgarelis M. Toll-like receptors, tissue injury, and tumorigenesis. *Mediators Inflamm* 2010; 2010. pii: 581837. doi: 10.1155/2010/581837. Epub 2010 Sep 14.

Ishida K, Ito S, Wada N et al. Nuclear localization of beta-catenin involved in precancerous change in oral leukoplakia. *Mol Cancer* 2007; 6: 62.

Jacobs MD, Harrison SC. Structure of an IkappaBalpha/NF-kappaB complex. *Cell* 1998; 95: 749–758.

Jain A, Pasare C. Innate Control of Adaptive Immunity: Beyond the Three-Signal Paradigm. *J Immunol* 2017; 198: 3791-3800.

Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 197-216.

Jukkola-Vuorinen A, Rahko E, Vuopala KS et al. Toll-like receptor 9 expression is inversely correlated with estrogen receptor status in breast cancer. *J Innate Immun* 2009; 1: 59-68.

June CH. Adoptive T cell therapy for cancer in the clinic. *J Clin Invest* 2007; 117: 1466-1476.

Jung AC, Briolat J, Millon R, et al. Biological and clinical relevance of transcriptionally active human papillomavirus (HPV) infection in oropharynx squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2010; 126: 1882–1894.

Kademani D. Oral cancer. *Mayo Clin Proc* 2007; 82: 878-887.

Kamperos G, Nikitakis N, Sfakianou A et al. Expression of NF- κ B and IL-6 in oral precancerous and cancerous lesions: An immunohistochemical study *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2016 ;21: e6-13.

Karpusas M, Nolte M, Benton CB et al. The crystal structure of human interferon beta at 2.2- \AA resolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 11813-11818.

Kauppila JH, Korvala J, Siirila K. Toll-like receptor 9 mediates invasion and predicts prognosis in squamous cell carcinoma of the mobile tongue. *J Oral Pathol Med* 2015; 44: 571–577.

Kawai T, Sato S, Ishii KJ et al. Interferon-alpha induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6. *Nat Immunol* 2004; 5: 1061–1068.

Kelly MG, Alvero AB, Chen R et al. TLR-4 signaling promotes tumor growth and paclitaxel chemoresistance in ovarian cancer. *Cancer Res* 2006; 66: 3859–3868.

Kerkar SP, Restifo NP. Cellular constituents of immune escape within the tumor microenvironment. *Cancer Res* 2012;72: 3125-3130.

Kieseier BC. The mechanism of action of interferon- β in relapsing multiple sclerosis. *CNS Drugs* 2011; 25: 491–502.

Korneev KV, Atretkhany KN, Drutskaya MS et al. TLR-signaling and proinflammatory cytokines as drivers of tumorigenesis. *Cytokine* 2017; 89: 127–135.

Kotrashetti VS, Nayak R, Bhat K et al. Immunohistochemical expression of TLR4 and TLR9 in various grades of oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma, and their roles in tumor progression: a pilot study. *Biotech Histochem* 2013; 88: 311-322.

Kreimer AR, Bhatia RK, Messeguer AL et al. Oral human papillomavirus in healthy individuals: a systematic review of the literature. *Sex Transm Dis* 2010; 37: 386-391.

Krishna A, Singh S, Kumar V et al. Molecular concept in human oral cancer. *Natl J Maxillofac Surg* 2015; 6: 9-15.

Krug A, Luker G.D, Barchet W et al. Herpes simplex virus type 1 activates murine natural interferon-producing cells through toll-like receptor 9. *Blood* 2004; 103: 1433–1437.

Kumagai Y, Takeuchi O, Akira S. TLR9 as a key receptor for the recognition of DNA. *Adv Drug Deliv Rev* 2008; 29; 60: 795-804.

Kumar R, Clermont G, Vodovotz Y et al .The dynamics of acute inflammation. *J Theor Biol* 2004 21; 230: 145-155.

Lee S, Cho N, Choi E et al. Relevance of human papilloma virus(HPV) infection to carcinogenesis of oral tongue cancer. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2010; 39: 678-683.

Lee SH, Lee CR, Rigas NK et al. Human papillomavirus 16 (HPV16) enhances tumor growth and cancer stemness of HPV-negative oral/oropharyngeal squamous cell carcinoma cells via miR-181 regulation. *Papillomavirus Res* 2015; 1: 116–125.

Lei Y, Xie Y, Tan YS et al. Telltale tumor infiltrating lymphocytes (TIL) in oral, head & neck cancer. *Oral Oncol* 2016; 61: 159-165.

Lewellyn CD, Linklater K, Bell J et al. Squamous cell carcinoma of the oral cavity in patients 45 years and under: A descriptive analysis of 116 cases diagnoses in the South East of England form 1990 to 1997. *Oral Oncol* 2003; 39: 106-114.

Lewellyn CD, Johnson NW, Warnakulasuriya KAAS. Risk factors for oral cancer in newly diagnosed patients aged 45 years and younger: a case-control study in Southern England. *J Oral Pathol Med* 2004; 33: 525–532.

Liang XH, Lewis J, Foote R et al. Prevalence and significance of human papillomavirus in oral tongue cancer: the Mayo Clinic experience. *J Oral Maxillofac Surg* 2008; 66: 1875-1880.

Lingen MW, Pinto A, Mendes RA et al. Genetics/epigenetics of oral premalignancy: current status and future research. *Oral Dis* 2011; 17: 7-22.

Lingen MW, Xiao W, Schmitt A, et al. Low etiologic fraction for high-risk human papillomavirus in oral cavity squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 2013; 49: 1–8.

Liu T, Zhang L, Joo D et al. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther* 2017; 2. pii: 17023. doi: 10.1038/sigtrans.2017.23. Epub 2017 Jul 14.

Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 2008; 42: 145–151.

Lund J, Sato A, Akira S et al. Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J. Exp. Med.* 2003; 198: 513–520.

Mager DL, Haffajee AD, Devlin PM, et al. The salivary microbiota as a diagnostic indicator of oral cancer: a descriptive, non-randomized study of cancer-free and oral squamous cell carcinoma subjects. *J Transl Med* 2005; 3: 27.

Majchrzak E, Szybiak B, Wegner A et al. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma in young adults: a review of the literature. *Radiol Oncol* 2014; 48:1-10.

Mäkinen LK, Atula T, Häyry V et al. Predictive role of Toll-like receptors 2, 4, and 9 in oral tongue squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2015; 51: 96-102.

Mäkinen LK, Ahmed A, Hagström J et al. Toll-like receptors 2, 4, and 9 in primary, metastasized, and recurrent oral tongue squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med.* 2016; 45: 338-345.

Mäkinen LK, Hagström J, Mäkitie A et al. Cancer of the tongue - early detection improves the prognosis. *Duodecim* 2016; 132: 2063-2070.

Mamidi S, Höne S, Kirschfink M. The complement system in cancer: Ambivalence between tumour destruction and promotion. *Immunobiology* 2017; 222: 45-54.

Mandovani A, Allavena P, Sica A et al. Cancer-related inflammation. *Nature* 2008; 454: 436-444.

Markopoulos AK. Role of human papillomavirus in the pathogenesis of oral squamous cell carcinoma. *World J Exp Med* 2012; 2: 65–69.

Marsh T, Pietras K, McAllister SS. Fibroblasts as architects of cancer pathogenesis. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2012; 1832: 1070–1078.

Martínez-Campos C, Burguete-García AI, Madrid-Marina V. Role of TLR9 in Oncogenic Virus-Produced Cancer. *Viral Immunol* 2017; 30: 98-105.

Maserejian NN, Joshipura KJ, Rosner BA et al. Prospective study of alcohol consumption and risk of oral premalignant lesions in men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15: 774–781.

Massano J, Regateiro FS, Januário G et al. Oral squamous cell carcinoma: review of prognostic and predictive factors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006; 102: 67-76.

Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 1994; 12: 991–1045.

McKay FC, Hoe E, Parnell G et al. IL7R α expression and upregulation by IFN- β in dendritic cell subsets is haplotype-dependent. *PLoS One* 2013; 8 : e77508.

Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway Jr CA. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997; 388(6640): 394–397.

Medzhitov R Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 2007; 449: 819–826.

Mehra R, Cohen RB, Burtness BA. The role of cetuximab for the treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clinical advances in hematology & oncology*. H&O 2008; 6: 742.

Merrell MA, Ilvesaro JM, Lehtonen N, et al. Toll-like receptor 9 agonists promote cellular invasion by increasing matrix metalloproteinase activity. *Mol Cancer Res* 2006; 4: 437–47.

Meurman JH. Oral microbiota and cancer. *J Oral Microbiol* 2010; 2. doi: 10.3402/jom.v2i0.5195.

Min R, Zun Z, Siyi Let al. Increased expression of toll-like receptor-9 has close relation with tumour cell proliferation in oral squamous cell carcinoma. *Arch Oral Biol* 2011; 56: 877–884.

Migueláñez-Medrán BC, Pozo-Kreilinger JJ, Cebrián-Carretero JL et al. Oral squamous cell carcinoma of tongue: Histological risk assessment. A pilot study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2019; 24: e603-e609.

Mirghani H, Amen F, Moreau F et al. Human papilloma virus testing in oropharyngeal squamous cell carcinoma: what the clinician should know. *Oral Oncol* 2014; 50: 1–9.

Mirghani H, Amen F., Moreau F et al. Do high-risk human papillomaviruses cause oral cavity squamous cell carcinoma? *Oral Oncol* 2015; 51: 229–236.

Mishra A, Bharti AC, Varghese P et al. Differential expression and activation of NF- κ B family proteins during oral carcinogenesis: Role of high risk human papillomavirus infection. *Int J Cancer* 2006; 119: 2840–2850.

Mohideen K, Krithika C, Jeddy N et al. Meta-analysis on risk factors of squamous cell carcinoma of the tongue in young adults. *J Oral Maxillofac Pathol* 2019; 23: 450-457.

Molinolo AA, Amornphimoltham P, Squarize CH et al. Dysregulated molecular networks in head and neck carcinogenesis. *Oral Oncol* 2009; 45: 324-334.

Nabel GJ, Verma IM. Proposed NF-kappa B/I kappa B family nomenclature. *Genes Dev* 1993; 7: 2063.

Naderpour M, Farajnia S, Bayazian G et al. Tongue carcinoma: case series and demographic analysis. *J Anal Res Clin Med* 2013; 1:50-55.

Nagtegaal ID, Quirke P, Schmoll HJ. Has the new TNM classification for colorectal cancer improved care? *Nat Rev Clin Oncol* 2011; 9: 119–123.

Naik VG, Adhyaru P, Gudigenavar A. Tumor suppressor genes in oral cancer. 2015; 4: 697-702.

Nakayama H, Ikebe T, Beppu M, Shirasuna K. High expression levels of nuclear factor κ B, I κ B kinase a and Akt kinase in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer* 2001; 92: 3037–3044.

Nelson DE, Ihekweba AE, Elliott M et al. Oscillations in NF-kappaB signaling control the dynamics of gene expression. *Science* 2004; 306: 704–708.

Neville BW, Damm DD, Allen CM, Chi AC. *Oral and Maxillofacial Pathology*. 4th Edition. St. Louis, Missouri, PA: Saunders Elsevier, 2016 : 379-382.

Ng JH, Iyer NG, Tan MH et al. Changing epidemiology of oral squamous cell carcinoma of the tongue: A global study. *Head Neck* 2017; 39: 297-304

Ng LK, Rich AM, Hussaini HM et al. Toll-like receptor 2 is present in the microenvironment of oral squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 2011; 104: 460-463.

Nikitakis NG, Sauk JJ, Papanicolaou SI. The role of apoptosis in oral disease: mechanisms; aberrations in neoplastic, autoimmune, infectious, hematologic, and developmental diseases; and therapeutic opportunities. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004; 97: 476-490.

Nikitakis NG, Pentenero M, Georgaki M et al Molecular markers associated with development and progression of potentially premalignant oral epithelial lesions: Current knowledge and future implications. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2018; 125: 650-669.

Nishida N, Yano H, Nishida T et al. Angiogenesis in cancer. *Vasc Health Risk Manag* 2006; 2: 213-219.

Oda K, Matsuoka Y, Funahashi A, et al. A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling. *Mol Syst Biol* 2005; 1: 2005.0010. Epub 2005 May 25.

O'Neill LA, Golenbock D, Bowie AG. The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nature Reviews. Immunology* 2013; 13: 453–460.

Pai SI, Zandberg DP, Strome SE. The role of antagonists of the PD-1: PD-L1/PD-L2 axis in head and neck cancer treatment. *Oral Oncol* 2016; 61: 152-158.

Pannone G, Rodolico V, Santoro A et al. Evaluation of a combined triple method to detect causative HPV in oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas: p16 Immunohistochemistry, Consensus PCR HPV-DNA, and In Situ Hybridization. *Infect Agent Cancer* 2012 29; 7:4.

Pannone G, Bufo P, Pace M et al. TLR4 down-regulation identifies high risk HPV infection and integration in head and neck squamous cell carcinomas. *Front Biosci (Elite Ed)* 2016; 1: 15-28.

Paolicelli D, Drenzo V, Trojano M. Review of interferon beta-1b in the treatment of early and relapsing multiple sclerosis. *Biologics: Targets & Therapy* 3: 369–376.

Paz IB, Cook N, Odom-Maryon T et al. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. *Cancer* 1997; 79: 595-604.

Pereira MC, Oliveira DT, Landman G et al. Histologic subtypes of oral squamous cell carcinoma: prognostic relevance. *J Can Dent Assoc* 2007; 73: 339-344.

Perkins DJ, Vogel SN. Space and time: New considerations about the relationship between Toll-like receptors (TLRs) and type I interferons (IFNs). *Cytokine* 2015; 74: 171–174.

Pestka S, Krause CD, Walter MR. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev* 2004; 202: 8–32.

Petruzzi MN, Cherubini K, Salum FG et al. Role of tumour associated macrophages in oral squamous cells carcinoma progression: an update on current knowledge. *Diagn Pathol* 2017; 12: 32.

Pircher A, Hilbe W, Heidegger I et al. Biomarkers in tumor angiogenesis and anti-angiogenic therapy. *Int J Mol Sci* 2011; 12: 7077-7099.

Pisani LP, Estadella D, Ribeiro DA. The Role of Toll Like Receptors (TLRs) in Oral Carcinogenesis. *Anticancer Res* 2017; 37: 5389-5394.

Platanias LC. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 375–386.

Pradere JP, Dapito DH, Schwabe RF. The yin and yang of toll like receptors in cancer. *Oncogene* 2014; 33: 3485–3495.

Qian BZ, Pollard JW. Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis. *Cell* 2010; 141: 39–51.

Räsänen K, Vaheri A. Activation of fibroblasts in cancer stroma. *Experimental Cell Research* 2010; 316: 2713–2722.

Rautava J, Syrjänen S. Human papillomavirus infections in the oral mucosa. *JADA* 2011; 142: 905-914.

Rautava J, Syrjänen S. Biology of Human Papillomavirus Infections in Head and Neck Carcinogenesis. *Head and Neck Pathol* 2012; 6: S3–S15.

Reang P, Gupta M, Kohl K: Biological response modifiers in cancer *Med Gen Med* 2006 ; 8 : 33.

Reichart PA, Philipsen HP. Oral erythroplakia – a review. *Oral Oncol* 2005; 41: 551–561.

Ren T, Wen ZK, Liu ZM, et al. Functional expression of TLR9 is associated to the metastatic potential of human lung cancer cell: functional active role of TLR9 on tumor metastasis. *Cancer Biol Ther* 2007; 6: 1704–1709.

Rich AM, Hussaini HM, Parachuru PBP et al. Toll-like receptors and cancer, particularly oral squamous cell carcinoma. *Front Immunol* 2014; 5 : 464.

Richards RM, Lowy DR, Schiller JT et al. Cleavage of the papillomavirus minor capsid protein, L2, at a furin consensus site is necessary for infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 1522–1527.

Rischin D, Young RJ, Fisher R, et al. Prognostic significance of p16INK4A and human papillomavirus in patients with oropharyngeal cancer treated on TROG 02.02 phase III trial. *J Clin Oncol* 2010; 28 :4142–4148.

Rodolico V, Arancio W, Amato M C et al. Hypoxia inducible factor-1 alpha expression is increased in infected positive HPV16 DNA oral squamous cell carcinoma and positively associated with HPV16 E7 oncoprotein. *Infect Agent Cancer* 2011; 6: 18.

Ruan M, Zhang Z, Li Set al. Activation of Toll-like receptor-9 promotes cellular migration via up-regulating MMP-2 expression in oral squamous cell carcinoma. *PLoS One* 2014; 9: e92748: 1-7.

Rychahou PG, Kang J, Gulhati P. Akt2 overexpression plays a critical role in the establishment of colorectal cancer metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 20315–20320.

Salo T, Vered M, Bello IO et al. Insights into the role of components of the tumor microenvironment in oral carcinoma call for new therapeutic approaches. *Exp Cell Res* 2014; 325: 58-64.

Sanders AE, Slade GD, Patton LL. National prevalence of oral HPV infection and related risk factors in the U.S. adult population. *Oral Diseases* 2012; 18: 430-441.

Santos HB, dos Santos TK, Paz AR et al. Clinical findings and risk factors oral squamous cell carcinoma in young patients: A 12-year retrospective analysis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2016; 21: e151-156.

Sarma JV, Ward PA. The complement system. *Cell Tissue Res* 2011; 343: 227-235.

Schiffman M, Doorbar J, Wentzensen N et al. Carcinogenic human papillomavirus infection. *Nat Rev Dis Primers* 2016; 2: 16086.

Schmausser B, Andrulis M, Endrich S et al. Toll-like receptors TLR4, TLR5 and TLR9 on gastric carcinoma cells: an implication for interaction with *Helicobacter pylori*. *Int J Med Microbiol* 2005; 295: 179-185.

Sciubba JJ. Oral cancer. The importance of early diagnosis and treatment. *Am J Clin Dermatol* 2001; 2: 239-251.

Scully C. Oral cancer aetiopathogenesis; past, present and future aspects. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2011; 16: 306-311.

Sewell DA, Pan ZK, Paterson Y. Listeria-based HPV-16 E7 vaccines limit autochthonous tumor growth in a transgenic mouse model for HPV-16 transformed tumors. *Vaccine* 2008; 26: 5315-5320.

Shah SN, Hile SE, Eckert KA. Defective mismatch repair, microsatellite mutation bias, and variability in clinical cancer phenotypes. *Cancer Res* 2010; 70: 431-435.

Shay JW, Wright WE. Telomeres and telomerase in normal and cancer stem cells. *FEBS Lett* 2010; 584: 3819-3825.

Shen L, Shi Q, Wang W. Double agents: genes with both oncogenic and tumor-suppressor functions. *Oncogenesis* 2018; 7: 25.

Shepherd J, Waugh N, Hewitson P. Combination therapy (interferon alfa and ribavirin) in the treatment of chronic hepatitis C: a rapid and systematic review. *Health Technol Assess* 2000; 4: 1-67.

Shin KH, Kim RH. An updated review of oral cancer stem cells and their stemness regulation. *Crit Rev Oncog* 2018; 23: 189-200.

Siegel R, Ma J, Zou Z et al. Cancer Statistics, 2014. *Ca Cancer J Clin* 2014; 64: 9-22.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin* 2016; 66: 7-30.

Singhi AD, Westra WH. Comparison of human papillomavirus in situ hybridization and p16 immunohistochemistry in the detection of human papillomavirus-associated head and neck cancer based on a prospective clinical experience. *Cancer* 2001; 116: 2166-2173.

Smith J, Rattay T, McConkey C et al. Biomarkers in dysplasia of the oral cavity: a systematic review. *Oral Oncol* 2009; 45: 647-653.

Solinas G, Germano G, Mantovani A et al. "Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation". *J Leukoc Biol* 2009; 86: 1065–1073.

Spill F, Reynolds DS, Kamm RD et al. Impact of the physical microenvironment on tumor progression and metastasis. *Curr Opin Biotechnol* 2016; 40: 41-48.

Sun Z, Luo Q, Ye D et al. Role of toll-like receptor 4 on the immune escape of human oral squamous cell carcinoma and resistance of cisplatin induced apoptosis. *Mol Cancer* 2012; 11: 33.

Syrjänen K, Syrjänen S, Lamberg M et al. Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis. *Int J Oral Surg* 1983; 12: 418-424.

Syrjänen S. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. *J Clin Virol* 2005; 32 Suppl 1: S59-66.

Szczepanski MJ, Czystowska M, Szajnik M et al. Triggering of toll-like receptor 4 expressed on human head and neck squamous cell carcinoma promotes tumor development and protects the tumor from immune attack. *Cancer Res* 2009; 69: 3105–31113.

Tabor MP, Brakenhoff RH, van Houten VM, et al. Persistence of genetically altered fields in head and neck cancer. *Clin Cancer Res*. 2001; 7: 1523-1532.

Takaoka A, Hayakawa S, Yanai H et al. Integration of interferon-alpha/beta signalling to p53 responses in tumour suppression and antiviral defense. *Nature* 2003; 424 (6948): 516–523.

Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 2010; 140: 805–820.

Tam S, Fu S, Xu L et al. The epidemiology of oral human papillomavirus infection in healthy populations: A systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol* 2018; 82: 91-99.

Tampellini M, Sonetto C, Scagliotti GV. Novel anti-angiogenic therapeutic strategies in colorectal cancer. *Expert Opin Investig Drugs* 2016; 25: 507-520.

Termine N, Panzarella V, Falaschini S et al. HPV in oral squamous cell carcinoma vs head and neck squamous cell carcinoma biopsies: a meta-analysis (1988-2007). *Ann Oncol* 2008 ;19 :1681-1690.

Thierry F. Transcriptional regulation of the papillomavirus oncogenes by cellular and viral transcription factors in cervical carcinoma. *Virology* 2009; 384: 375–379.

Thomas JA, Badini M. The role of innate immunity in spontaneous regression of cancer. *Indian J Cancer* 2011; 48 : 246-251.

Thomas SJ, Swowden JA, Zeider MP et al. The role of JAK/STAT signalling in the pathogenesis, prognosis and treatment of solid tumors. *BR J Cancer* 2015; 113: 365-371.

Thompson MR, Kaminski JJ, Kurt-Jones EA et al. Pattern recognition receptors and the innate immune system response in viral infection. *Viruses* 2011; 3: 920-940.

Torre LA, Siegel RL, Ward EM et al. Clonal cancer incidence and mortality rates and trends-An update. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2016; 25: 16-27.

Tosoni A, Franceschi E, Pasquini E et al. Immunotherapy in head and neck cancer: evidence and perspectives. *Immunotherapy* 2017; 9: 1351-1358.

Tsai SC, Huang SF, Chiang JH et al. The differential regulation of microRNAs is associated with oral cancer. *Oncol Rep* 2017; 38: 1613-1620.

Tsimplaki E, Argyris E, Xesfyngi D et al. Prevalence and expression of human papillomavirus in 53 patients with oral tongue squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 2014; 34: 1021-1025.

Ukpo OC, Flanagan JJ, Ma X et al. 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: 1343–1350.

Ur Rahaman SM, Ahmed Mujib B. Histopathological correlation of oral squamous cell carcinoma among younger and older patients. *J Oral Maxillofac Pathol* 2014; 18: 183-188.

van der Waal I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. *Oral Oncol* 2009; 45: 317–323..

Varela JC, Tomlinson S. Complement: an overview for the clinician. *Hematol Oncol Clin North Am* 2015; 29: 409-427.

Vaure C, Liu Y. A comparative review of toll-like receptor 4 expression and functionality in different animal species. *Front Immunol* 2014; 5: 1-15.

Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif* 2003; 36: 131-149.

Vermorken JB, Specenier P. Optimal treatment for recurrent/metastatic head and neck cancer. *Ann Oncol* 2010; 21: Suppl 7: vii252-261.

Vlahopoulos SA, Cen O, Hengen N et al. Dynamic aberrant NF- κ B spurs tumorigenesis: a new model encompassing the microenvironment. *Cytokine & Growth Factor Rev* 2015; 26: 389–403.

Voskens CJ, Sewell D, Hertzano R et al. Induction of mage-A3 and HPV-16 immunity by Trojan vaccines in patients with head and neck carcinoma. *Head & neck* 2012; 34: 1734-1746.

Wagner H. The immunobiology of the TLR9 subfamily. *Trends Immunol* 2004; 25: 381-386.

Wang M, Zhao J, Zhang L et al. Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. *J Cancer* 2017; 8: 761-773.

Wang Q., Zhang X., Xiao T., Pan C., Liu X., Zhao Y. Prognostic role of Toll like receptors in cancer: a meta-analysis. *Ther Clin Risk Manag* 2018; 14:1323-1330.

Wang Y, Weng Y, Shi Y et al. Expression and functional analysis of Toll-like receptor 4 in human cervical carcinoma. *J Membr Biol* 2014; 247: 591-599.

Wang Z. The role of COX-2 in oral cancer development, and chemoprevention/treatment of oral cancer by selective COX-2 inhibitors. *Curr Pharm Des* 2005; 11: 1771-1777.

Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol* 2009; 45: 309–316.

Warnakulasuriya S, Dietrich T, Bornstein MM et al. Oral health risks of tobacco use and effects of cessation. *Int Dent J* 2010; 60: 7-30.

WHO Globocan 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012 (http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx) (Accessed 1/4/2014).

West T, Schwarz E, Enders C et al . Involvement of intact HPV16 E6/E7 gene expression in head and neck cancers with unaltered p53 status and perturbed pRb cell cycle control. *Oncogene* 2002; 21: 1510–1517.

Winston MJ, D'Souza G, Rettig EM et al. Increasing prevalence of human papillomavirus-positive oropharyngeal cancers among older adults. *Cancer* 2018; 124: 2993-2999.

Witt BL, Albertson DJ, Coppin MG et al. Use of in situ hybridization for HPV in head and neck tumors: experience from a national reference laboratory. *Head Neck Pathol* 2015; 9: 60-64.

Wolf GT, Chepeha DB, Bellile E et al. Tumor infiltrating lymphocytes (TIL) and prognosis in oral cavity squamous carcinoma: a preliminary study. *Oral Oncol* 2015; 51: 90-95.

Woo SR, Corrales L, Gajewski TF. Innate immune recognition of cancer. *Annu Rev Immunol* 2015; 33: 445-474.

Woodman CB, Collins SI, Young LS. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer* 2007; 7: 11-22.

Yang J, Liu D, Khatri KS et al. Prognostic value of toll-like receptor 4 and nuclear factor- κ Bp65 in oral squamous cell carcinoma patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2016; 122: 753-764.

Yu L, Wang L, Chen S. Dual character of toll-like receptor signaling: pro-tumorigenic effects and anti-tumor functions. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1835: 144–154.

Zhang L, Poh CF, Williams M et al. Loss of heterozygosity (LOH) profiles-validated risk predictors for progression to oral cancer. *Cancer Prev Res (Phila)* 2012; 5: 1081-1089.

Zhang Q, Lenardo MJ, Baltimore D. 30 Years of NF- κ B: A Blossoming of Relevance to Human Pathobiology *Cell* 2017; 168: 37-57

Zhang YB, He FL, Fang M et al. Increased expression of Toll-like receptors 4 and 9 in human lung cancer. *Mol Biol Rep* 2009; 36: 1475-1481.

Zhang Z, Ohto U, Shimizu T. Toward a structural understanding of nucleic acid-sensing Toll-like receptors in the innate immune system. *FEBS Lett.* 2017 Jul 7. doi: 10.1002/1873-3468.12749. [Epub ahead of print]

Zhou Q, Zhu K, Cheng H. Toll-like receptors in human papillomavirus infection. Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 2013; 61: 203-215.

Zuniga EI, Macal M, Lewis GM, Harker JA. Innate and Adaptive Immune Regulation During Chronic Viral Infections. Annu Rev Virol 2015; 2: 573-597.

Αγγελόπουλος ΑΠ, Παπανικολάου Σ, Αγγελοπούλου Ε. Σύγχρονη Στοματική και Γναθοπροσωπική Παθολογία. 3η Έκδοση. Αθήνα : Εκδόσεις Λίτσας, 2000: 19-20.

Γερμενής ΑΕ. Ιατρική ανοσολογία. Αθήνα: Εκδόσεις Παπαζήση, 2000: Φυσική και Επίκτητη Ανοσία: 2-5, Τα σύστημα του συμπληρώματος: 97-107.

Σκένδρος Π. Σηματοδότηση μέσω Toll τύπου και μη- Toll τύπου υποδοχέων. Ανοσία 2008; Συμπληρωματικό τεύχος: 40-45.

Σκλαβούνου Αλεξάνδρα. Παθολογία Στόματος. Αθήνα: Βήτα Ιατρικές Εκδόσεις, 2018: 106.