

Rola wirusa brodawczaka (HPV) w nowotworach głowy i szyi

Involvement of human papilloma virus in head and neck cancer

Krzysztof Szyfter^{1,2}, Małgorzata Wierzbicka¹

¹Zakład Mutagenety Środowiskowej Instytutu Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu

²Katedra Otolaryngologii i Onkologii Laryngologicznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Streszczenie

Ludzki wirus brodawczaka (ang. human papilloma virus – HPV) długo wiązano sprawczo z nowotworami anogenitalnymi. Badania z ostatnich lat dowodzą, że odgrywa on analogiczną rolę w zachorowaniach na nowotwory głowy i szyi. Potencjał kancerogeny wykazują niemal wyłącznie tzw. warianty dużego ryzyka – HPV 16 i HPV 18. Nowotwory głowy i szyi zależne od HPV mogą występować u osób niepalących tytoniu, niepijących alkoholu, ale prowadzących aktywne życie seksualne, a wiek chorych jest niższy niż typowych pacjentów. Rokowania łącznie z czasem przeżycia są lepsze niż u typowych pacjentów. Najczęstsze miejsca anatomiczne w obrębie głowy i szyi, w których rozwija się nowotwór HPV-zależny, to gardło górne (zwłaszcza migdałki podniebienne) i jama ustna. Metodami biologii molekularnej wykazano całkowicie odrębny mechanizm kancerogenezy niż powodowany kancerogenami obecnymi np. w dymie tytoniowym. Z tego powodu zaczęto ostatnio odróżniać w grupie nowotworów głowy i szyi nowotwory zależne od HPV. Zaproponowano stosowne działania prewencyjne, natomiast próba wprowadzenia właściwej strategii terapeutycznej jest dopiero na etapie badań laboratoryjnych i klinicznych.

Słowa kluczowe: ludzki wirus brodawczaka (HPV), mechanizm kancerogenezy, epidemiologia nowotworów głowy i szyi.

Abstract

Human papilloma virus (HPV) has been recognized as an aetiological factor for anogenital cancers. Recent studies provide evidence for its involvement in morbidity for head and neck cancer as well. A carcinogenic potential is associated almost exclusively with its high risk variants HPV-16 and HPV-18. HPV-derived cancers of head and neck can be found in non-smoking, non-drinking individuals but having an intensive sexual life. The prognosis and survival time are better than in case of typical patients. Oral cavity and oropharynx including palatine tonsils are predominantly affected by HPV-derived cancers. Molecular biology studies have shown a distinct mechanism of oncogenic transformation different than that induced by tobacco smoke carcinogens, and HPV-derived tumours have been found as a separate entity subgroup. Relevant prophylactic procedures have already been suggested. The attempts to introduce HPV-related treatment are only at the preliminary step of laboratory and clinical studies.

Key words: human papilloma virus (HPV), mechanism of carcinogenesis, epidemiology of HNC cancers.

(*Postępy w chirurgii głowy i szyi* 2008; 2: 41–50)





Ryc. 1. Profesor Harald zur Hausen, Niemiecki Instytut Badań nad Rakiem, Heidelberg, laureat Nagrody Nobla w dziedzinie fizjologii i medycyny 2008

Komitet Nagrody Nobla – 2008

Importance of the HPV discovery:

The global public health burden attributable to human papilloma viruses is considerable. More than 5% of all cancers worldwide are caused by persistent infection with this virus. Infection by the human papilloma virus is the most common sexually transmitted agent, afflicting 50-80% of the population. Of the more than 100 HPV types known, about 40 infect the genital tract, and 15 of these put women at high risk for cervical cancer. In addition, HPV is found in some vulval, penile, oral and other cancers. Human papilloma virus can be detected in 99.7% of women with histologically confirmed cervical cancer, affecting some 500,000 women per year.

Harald zur Hausen demonstrated novel properties of HPV that have led to an understanding of mechanisms for papilloma virus-induced carcinogenesis and the predisposing factors for viral persistence and cellular transformation. He made HPV-16 and HPV-18 available to the scientific community. Vaccines were ultimately developed that provide ≥95% protection from infection by the high risk HPV-16 and HPV-18 types. The vaccines may also reduce the need for surgery and the global burden of cervical cancer.

Raki głowy i szyi (ang. *head and neck carcinoma* – HNC) reprezentują piątą co do częstości zachorowania grupę nowotworów złośliwych. Terminem tym określa się heterogenną grupę nowotworów rozwijających się w różnych lokalizacjach pierwotnych, ale powodowanych wspólnymi czynnikami ryzyka i wykazujących podobne cechy patologiczne. Są to raki płaskonabłonkowe (ang. *squamous cell carcinoma antygen* – SCC) wywodzące się z nabłonka płaskiego wyściełającego górne drogi oddechowe i górny odcinek drogi pokarmowej. Ich etiopatogeneza jest wieloczynnikowa, a rozwój obejmuje wielostopniową kancerogenezę poprzedzoną zmianami dysplastycznymi błony śluzowej. Wśród czynników sprawczych na pierwszym miejscu wymienia się ekspozycję na dym tytoniowy i nadużywanie mocnych napojów alkoholowych [1, 2].

Taki związek przyczynowy najsilniej jest postrzegany w odniesieniu do raków krtani [3].

Tymczasem w ostatnich dekadach dane epidemiologiczne i ustalenia molekularne wskazały na rolę wirusów brodawczaka ludzkiego (ang. *human papilloma virus* – HPV) w rozwoju pewnych grup nowotworów głowy i szyi. Badania podjęte w latach 70. XX w. z głównym udziałem Haralda zur Hausena (ryc. 1.) zostały uhonorowane Nagrodą Nobla w dziedzinie fizjologii i medycyny w 2008 r. Początkowo wskazywały one na powiązanie HPV z zapadalnością na nowotwory dróg rodnych [4]. Rozpoznany jednak później wysoki tropizm cząstek wirusa nakierowany na komórki epitelialne spowodował podjęcie badań dotyczących udziału wirusa HPV w kancerogenezie raków jamy ustnej i ustnej części gardła. Według obecnego stanu wiedzy podsumowanej w monografii wydanej przez *International Agency for Research on Cancer* (Lyon, Francja) HPV uznaje się za czynnik kancerogeny wobec człowieka [5].

Budowa i typologia HPV

Wirusy brodawczaka ludzkiego [6] tworzą heterogenną grupę wirusów DNA, należących do rodziny *Papillomaviridae*, liczącą ok. 120 wariantów strukturalnych. Genom stanowi kolistą dwuniciową cząsteczkę liczącą 7,2–8 tys. par zasad, co odpowiada ciężarowi cząsteczkowemu 5,2 kDa. Sferyczny kapsyd wiralny ma średnicę rzędu 55 μm.

Pełne sekwencjonowanie wiralnego DNA pozwoliło na ujawnienie wariantów strukturalnych. Istnienie wariantów strukturalnych najprawdopodobniej wiąże się z naturalną historią HPV kolonizujących różne obszary anatomiczne. Różnice strukturalne mogły decydować o lepszej adaptacyjności do lokalnego otoczenia, przewadze wzrostu i w konsekwencji utrwaleniu się zmian. Z patogennego punktu widzenia wirusy dzieli się na grupę dużego ryzyka (np. HPV 16, HPV 18, HPV 31, HPV 33, HPV 35), których obecność prowadzi do rozwoju nowotworów złośliwych, oraz grupę małego ryzyka (np. HPV 6, HPV 11, HPV 13, HPV 32), odpowiedzialnych za powstawanie schorzeń niezłośliwych (zwłaszcza brodawek) [4, 6, 7].

Genom wirusa zawiera sekwencje kodujące obecne wyłącznie w jednej, transkrypcyjnie aktywnej nici odczytywanej w tym samym kierunku w jednej, otwartej ramce odczytu. Program genetyczny zawarty w sekwencji DNA wirusa dzieli się na trzy regiony – 6 (w niektórych wariantach HPV więcej) wcześniej replikujących genów E (ang. *early*), 2 geny replikujące późno oznaczone L (ang. *late*) i region kontrolny LCR (ang. *long control region*) stanowiący ok. 10% całego genomu. Schemat mapy genetycznej wirusa dwóch wariantów dużego ryzyka HPV 16 i HPV 18 przedstawiono na przykładzie wariantu dużego ryzyka HPV 18 (ryc. 2.).

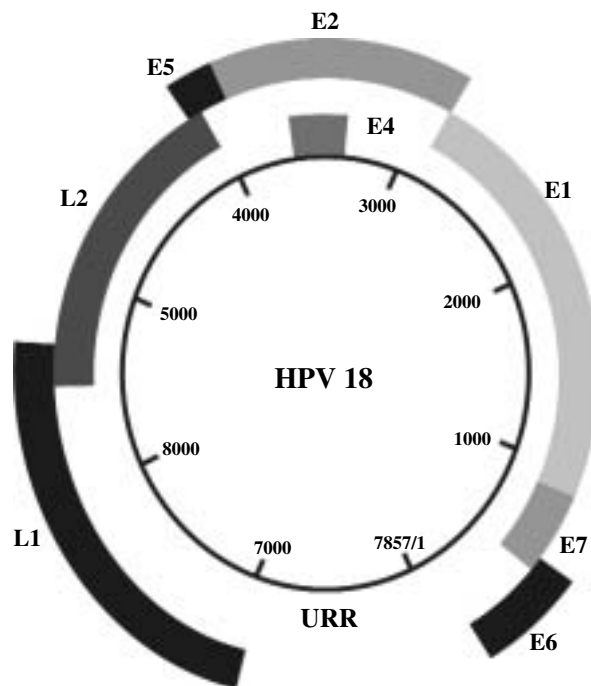


Funkcja białek kodowanych przez geny HPV została stosunkowo dobrze poznana. Białka kodowane przez wczesny region transkrypcyjny pełnią funkcje związane z replikacją i transkrypcją wiralnego DNA i uczestniczą w transformacji nowotworowej komórek gospodarza. Bezpośrednią aktywność transformacyjną przypisuje się wyłącznie białkom E6 i E7. Białka E3 i E8 występują tylko w niektórych wariantach HPV. Białka późne L1 i L2 stanowią jedyne białka strukturalne i współtworzą strukturę kapsydu. Więcej informacji o funkcji białek HPV podano w tab. 1.

Cykl życiowy i aktywność kancerogenna HPV

Wszechobecność HPV pociąga za sobą łatwość zakażenia. Wśród możliwości nowego zakażenia na pierwszym miejscu wymienia się aktywność seksualną, podczas której dochodzi do bezpośredniego kontaktu komórek nabłonkowych [3]. Obejmuje to również przekazywanie HPV za pośrednictwem śliny, co w większym stopniu dotyczy nowotworów głowy i szyi [8]. Dalej zakażenie HPV łączy się z niewystarczającą higieną oraz zabiegami szpitalnymi i kosmetycznymi torującymi drogę do infekcji [3, 8, 9].

Penetracja cząstek HPV jest nakierowana na komórki nabłonka, przy czym w pierwszej fazie wirus kolonizuje komórki podstawne nabłonka. W celu podjęcia cyklu życiowego wiralny DNA musi ulec integracji z genomem gospodarza, jednak we wstępnej fazie infekcji obserwuje się episomalną replikację HPV [7]. Etap ten odpowiada infekcji przetrwalnikowej lub poronnej. Do produktywnej infekcji konieczna jest jednak integracja z genomowym DNA gospodarza. Dalej przebiega ekspresja zintegrowanego DNA wirusa, od genów wczesnych po późne. Wraz z postępowaniem ekspresji można obserwować zmiany struktury nabłonka. W mikrośrodkowisku czynnego wirusa pod wpływem antygenów wirusa zmienia się aktywność układu immunologicznego. Niewiele wiadomo o miejscach integracji HPV z DNA gospodarza. Z jednej strony mówi się o braku preferencji sekwencyjnej miejsc integracji, ale z drugiej – technikami cytogenetycznymi (fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*, ang. *fluorescent in situ hybridization* – FISH) wykazano, że DNA wirusa preferencyjnie wbudowuje się w miejscach łamliwych chromosomów [10]. Taką preferencję stwierdzono wobec HPV 16 na materiale pochodzącym z raków szyjki macicy, ale nie ma powodu przypuszczać, by nie obowiązywało ono także nowotworów głowy i szyi. Do tego zagadnienia nawiązano ponownie, badając ekspresję genów zlokalizowanych w miejscach łamliwych u chorych na raka języka i gardła górnego. Odnotowano znaczne różnice, które wytłumaczono przewagą HPV (+) w rakach gardła górnego w przeciwieństwie do nieobecności



Ryc. 2. Mapa genetyczna wariantów wirusa brodawczaka HPV 16 i HPV 18

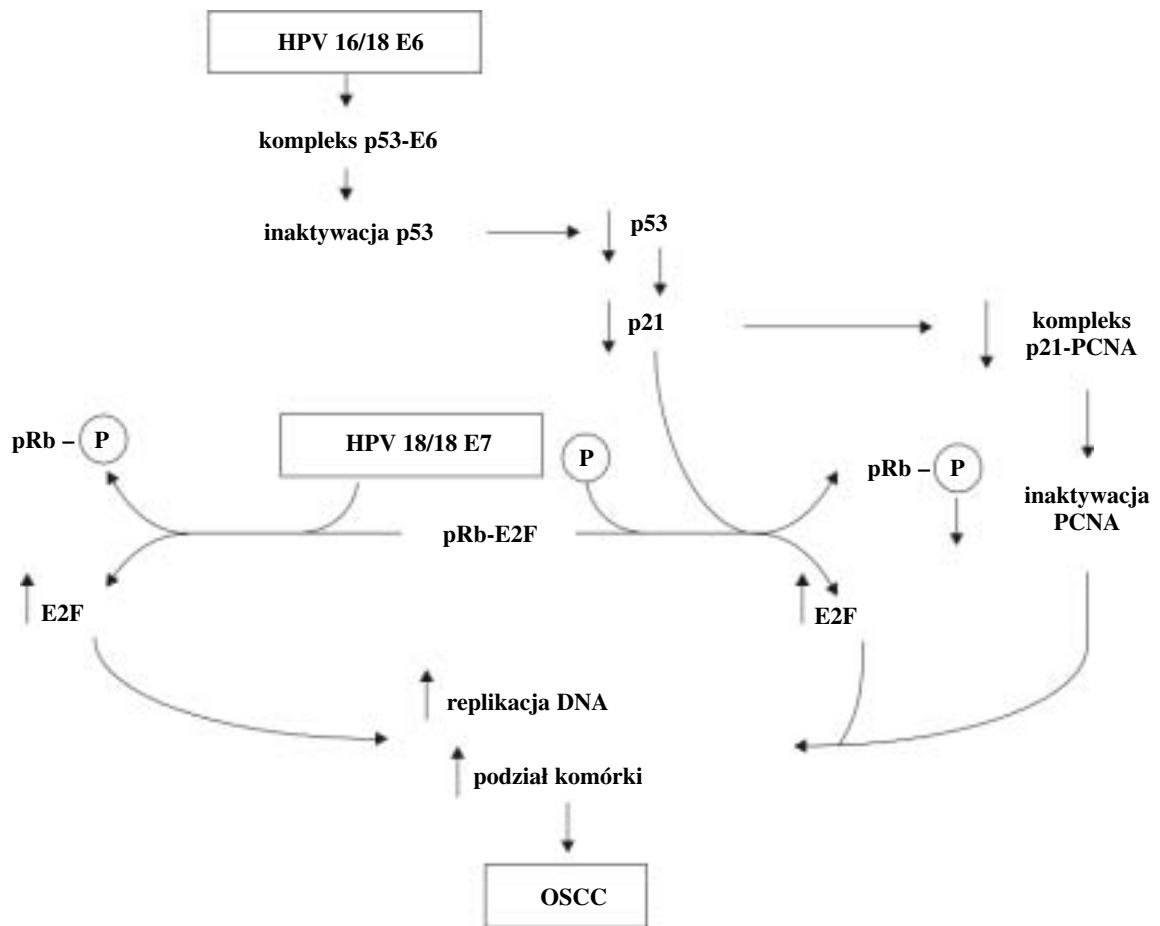
Tabela 1. Funkcja białek kodowanych przez DNA HPV

Białko	Funkcja
E1	inicjacja replikacji i transkrypcji wirusowego DNA
E2	kontrola replikacji i transkrypcji wirusowego DNA
E3 i E8	nieznana
E4	rozrywanie cytoszkieletu
E5	interakcja z białkami komórkowymi (m.in. EGFR)
E6	przyłączanie i degradacja białka p53
E7	przyłączanie i inaktywacja białka Rb
L1	główne białko strukturalne kapsydu
L2	mniejsze białko strukturalne kapsydu

(poza jednym przypadkiem) w rakach języka [11]. Szkoda, że w tych badaniach nie podjęto próby zlokalizowania HPV w genomie gospodarza.

Aktywność onkogeną wariantów HPV 16 i HPV 18 wykazują białka E6 i E7. Białka te włączają się w szlaki kontroli cyklu komórkowego z udziałem białek p16, p53 i Rb. Tworzenie kompleksów z tymi białkami prowadzi do ich inaktywacji i zaprzestania wykonywania funkcji supresorowej. W ten sposób komórka traci kontrolę nad cyklem komórkowym i podejmuje niekontrolowaną proliferację (ryc. 3.). Ciekawe jest to, że indukowanymi kancerogenami chemicznymi mechanizm onkogenezy zaczyna się mutacjami DNA, a w tym przypadku proces transformacji nowotworowej zaczyna się od razu na poziomie białkowym z pominięciem DNA.





Ryc. 3. Utrata kontroli nad cyklem komórkowym pod wpływem białek HPV E6 i E7

Powyższe ogólne ustalenia na temat onkogennej aktywności HPV zostały uzupełnione wieloma ustaleniami szczegółowymi. Określono poziom mutacji genu kontrolnego *LCR* w liniach komórkowych wyprowadzonych z nowotworów jamy ustnej, gdzie stwierdzono obecność wirusów dużego ryzyka HPV 16 lub HPV 18. Zaobserwowano, że w przypadku zmutowanego genu *LCR* aktywność ekspresji onkogennych białek HPV była wyższa niż przy niezmutowanej sekwencji DNA. Autorzy pozostawiają otwartą kwestię pochodzenia mutacji genu *LCR*, ale zwracają uwagę na wysoki poziom narażenia komórek nabłonka jamy ustnej na mutageny [12].

Odwrócone podejście badawcze wybrano w celu określenia podatności na infekcję HPV w zależności od polimorfizmu genu *p53* gospodarza. Miejsce polimorficzne znajduje się w kodonie 72, gdzie punktowa mutacja powoduje zamianę argininy w prolinę w białku *p53*. Stwierdzono, że zmiana homozygotyczna (prolina-prolina) zwiększa ryzyko wystąpienia nowotworów *oropharynx*, zwłaszcza w przypadku infekcji HPV 16 [13]. Takie ustalenia potwierdzono ostatnio dodatkowo, wprowadzając analizę palenia papierosów przez chorych. Zaobserwowano zwiększenie ryzyka

wystąpienia raka gardła górnego u osób niepalących, jeżeli są nosicielami wariantu prolina-prolina genu *p53* [14]. Badania przeprowadzono w grupie 188 chorych w odniesieniu do 342 osób z grupy kontrolnej. Bardzo podobne założenia i podejście doświadczalne zastosowano w przypadku analizy 326 chorych z rakiem jamy ustnej (grupa kontrolna, n=349), dochodząc do identycznych wyników [15]. Wynik ten różni się nieznacznie od wyników wcześniejszego badania, które donosi o przewadze formy *dzikiej p53* w nowotworach głowy i szyi, w których wykryto HPV [13]. Lepiej udokumentowane wydaje się jednak badanie zespołu H. Biera (Düsseldorf, Niemcy) przeprowadzone na znacznie większej liczbie przypadków. W cytowanej pracy [16] przebadano niemal cały gen *p53*, znajdując mutacje w 95% badanych przypadków (117 z 125), niezależnie od statusu HPV. Prawie 1/4 wszystkich wykrytych mutacji pozostawała poza typowo badanym regionem obejmującym eksony 5–9. Autorzy wnioskuje, że obecność mutacji genu *p53* jest konieczna do przebycia szlaku wieloetapowego, bez względu na to, czy mamy do czynienia z przypadkami HPV-pozytywnymi czy HPV-negatywnymi.



Zgodnie z postulatem blokowania szlaku regulacji proliferacji z udziałem genów/białek p16, p21 i p53 doświadczalnie wykazano korelację między infekcją HPV, ekspresją wymienionych białek a wskaźnikami klinicznymi [17, 18]. Stwierdzono także użyteczność pomiaru ekspresji białka p16 jako markera długości przeżycia [18].

W przypadkach HPV-pozytywnych rzadko obserwowano ponadto amplifikację regionu chromosomowego 11q13, częstą w przypadkach HPV-negatywnych [19]. Należy dodać, że w amplifikowanym regionie znajduje się kilka onkogenów, łącznie z *CCND1*, których nadmierna ekspresja skraca czas przeżycia chorych, co przedstawiono w badaniach własnych [20]. Wykazanie braku amplifikacji regionu 11q13 w nowotworach głowy i szyi HPV-pozytywnych stwierdzono również w doniesieniu dotyczącym braku wpływu wirusa HPV na powstawanie ploidii DNA [21]. Omówione ustalenia pozwalają na zrozumienie łagodniejszego przebiegu i dłuższego czasu przeżycia chorych na nowotwory głowy i szyi HPV-pozytywnych w porównaniu z analogiczną grupą HPV-negatywnych. Zagadnienie to zostanie przedstawione w dalszej części artykułu.

Warto także odnotować badanie wykonane na modelu mysim, w którym udowodniono, że onkogen E5 nie tylko wpływa na wzrost i różnicowanie nabłonka wielowarstwowego, lecz także silnie aktywuje ekspresję receptora nabłonkowego czynnika wzrostu (ang. *epidermal growth factor receptor* – EGFR) [22].

Ciekawe rozróżnienie profilu zmian genetycznych widocznych w nowotworach głowy i szyi HPV-pozytywnych i HPV-negatywnych opisali Braakhuis i wsp. [23]. Ponieważ w nowotworach głowy i szyi stwierdzano wiele kompleksowych aberracji chromosomowych, obejmujących m.in. utratę ramion chromosomów 3p, 6q, 8p, 13q, 17p i 18q, przeprowadzono ponowną analizę cytogenetyczną i molekularną, ale z podziałem na HPV-pozytywne i HPV-negatywne. Zaobserwowano występowanie dużych aberracji chromosomowych niemal wyłącznie w przypadkach HPV-negatywnych. W drugiej serii doświadczeń wykazano brak mutacji genu *p53* w HPV-pozytywnych i występowanie tych mutacji w 75% przypadków HPV-negatywnych. Wyniki tego studium przeprowadzonego przy użyciu wielu uzupełniających się technik badawczych można uznać za przekonujący dowód na przebieg onkogenezy z udziałem lub bez infekcji HPV wg zupełnie różnych mechanizmów.

Epidemiologia HPV-zależnych nowotworów głowy i szyi

Udział wirusów w inicjacji nowotworów głowy i szyi w sposób analogiczny do występowania nowotworów dróg rodnych wydaje się nie budzić wątpliwości. Za zur Hausenem [4] przytoczono następujące argumenty popierające tę tezę:

1) morfologiczne podobieństwo nabłonka jamy ustnej i gardła oraz nabłonka układu moczowo-płciowego przy jednoczesnym tropizmie wirusa HPV do komórek nabłonkowych,

2) wykrywanie DNA HPV w znacznym procencie analizowanych preparatów pochodzących ze stanów przedrakowych i nowotworów głowy i szyi,

3) wykazywanie ekspresji onkogenów wirusowych E6 i E7 w materiale nowotworowym,

4) wymóg ekspresji białek E6 i E7 do podtrzymania fenotypu nowotworowego w liniach komórkowych wyprowadzonych z nowotworów,

5) interakcja wiralnych białek onkogennych z czynnika wzrostu gospodarza (np. EGFR),

6) dane epidemiologiczne.

O ile pierwszy punkt nie budzi żadnych wątpliwości, to wszystkie pozostałe są obarczone rozrzutem wyników liczbowych. Mimo że sekwencje genomu HPV są izolowane z HNSCC (ang. *head and neck squamous cell carcinoma*), nie została chociaż w przybliżeniu zdefiniowana częstość ich występowania, a rozbieżności w piśmiennictwie wynoszą od 0 do 100%, co nie pozwala na ostateczne wyjaśnienie stopnia zależności między zakażeniem HPV a kancerogenezą raków głowy i szyi. Ten ogromny rozrzut wyników spowodowany jest nie tylko różnicami etniczno-geograficznymi, ale także zróżnicowaniem pobieranego materiału (biopsja, zeszkrobiny, wymazy, wymazy szczoteczkowe, wycinki), przechowywaniem i obróbką materiału (świeży, mrożony, skrawki parafinowe po obróbce w formalinie). Biopsja pozostaje najczęstszą metodą pobierania materiału z jamy ustnej. Zapewnia zarówno możliwość wykonania pełnego badania histologicznego, jak i badania w kierunku HPV. Wycinki stanowią ponadto materiał bardziej reprezentatywny niż cytologia złuszczeniowa ze względu na grubość, obecność błony podstawnej i podścieliska, w którym wirusy mogą być obecne w nieaktywnej formie przetrwalnikowej. Zasadnicze znaczenie ma także miejsce pobrania materiału – największą wrażliwość na HPV wykazują komórki na styku nabłonka płaskiego i walcowatego na poziomie krypt migdałowych ze względu na eksponowaną pozycję komórek podstawnych. W przypadku pobierania materiału do analizy trudno oczekiwać standaryzacji i różnorodność należy wkalkulować w razie porównywania wyników.

Współczesne laboratoria dysponują szerokim zestawem technik diagnostycznych o zróżnicowanej czułości do wykrywania HPV, pracochłonności i wysokości kosztów. Obszerne omówienie metod dostępnych w 2003 r. prezentuje publikacja Hubbarda [24]. Wydzielić można grupę metod o niskiej czułości – ISH (ang. *in situ hybridization*), SBH (ang. *southern blot hybridization*), DBH (ang. *dot blot hybridization*) – i o wysokiej czułości opartych na łańcuchowej reakcji polimerazy (ang. *polymerase chain reaction* – PCR). Przytaczana praca zawiera także obszerną charakterystykę technik korzystających



z gotowych *kitów* przygotowywanych komercyjnie. Najczęściej są one nakierowane na wybrane warianty HPV, zwłaszcza HPV 16 i HPV 18. Opisano także komercyjny zestaw produkcji tajwańskiej, umożliwiający jednocześnie wykrywanie 39 wariantów strukturalnych [25]. Inną propozycją zmierzającą do odróżnienia ludzkich nowotworów HPV-pozytywnych i HPV-negatywnych jest immunohistochemiczne oznaczanie białek p16 i MCM7 za pomocą specyficznych przeciwciał [26]. Autorzy wykazali użyteczność tej propozycji na modelu mysim. Poza wykrywaniem HPV w tkankach litych, włączając w to materiał nowotworowy, ważnym zadaniem pozostaje oznaczanie HPV w osoczu, ponieważ materiał ten jest względnie łatwo osiągalny. Jednocześnie wykazano w dużej grupie (204 przypadki nowotworów głowy i szyi vs 326 kontroli) dobrą korelację między obecnością HPV w guzach a reakcją na przeciwciała wobec białek E6 i E7 w osoczu [27]. Z tego powodu należy odnotowywać propozycje technik analitycznych przydatnych do oznaczania HPV w osoczu. Przykładem jest oznaczanie HPV w osoczu techniką blottingu Southerna, opracowaną w zespole Sidransky'ego (Baltimore, USA) [28].

Jak wspomniano wcześniej, większość raków płaskonabłonkowych rozwija się na podłożu stanów przedrakowych, a kancerogeneza jest procesem wieloetapowym i rozciągniętym w czasie. Stąd zainteresowanie potencjalnym kancerogenem – wirusem HPV – w odniesieniu do patologicznych zmian w obrębie błony śluzowej jamy ustnej [7]. Występowanie DNA wirusa HPV w zmianach przedrakowych jamy ustnej i gardła ocenia się w szerokich granicach 0–85%, z przewagą genotypów HPV 16 i HPV 18. Leukoplakia, kliniczny objaw dysplazji, białe plamy lub zmętnienie nabłonka w obrębie błony śluzowej związane z nałogiem palenia lub idiopatyczne, o większym ryzyku rozwoju nowotworu wydają się powiązane z etiologią HPV. Rolę zakażenia wirusowego sugerowano już w latach 70. ubiegłego stulecia na podstawie obrazu mikroskopu świetlnego [29]. Miller i White [30] identyfikowali HPV w 43% preparatów świeżych lub mrożonych i 12% parafinowych pochodzących ze zmian klinicznie ocenionych jako leukoplakia, natomiast niezawierających dysplazji w badaniu patologicznym. Zdecydowanie silniejszą zależność z występowaniem HPV ma leukoplakia brodawkowata, rzadka i agresywna forma proliferującej leukoplakii o dużym (90%) ryzyku przemiany złośliwej, oporna na leczenie, występująca głównie u kobiet w podeszłym wieku. Jej etiologia nie łączy się z paleniem papierosów czy infekcją grzybiczą, a HPV 16 potwierdzono w odsetku sięgającym 80% [31]. W badaniach Campisi i wsp. [32] wykazano natomiast podobne ryzyko infekcji HPV w przypadku leukoplakii i leukoplakii brodawkowej, na poziomie odpowiednio 24 i 25,5%. W przypadku *lichen planus* nie potwierdzono z kolei jednoznacznie udziału zakażenia wirusem, z wyjątkiem przypadków klinicznie przebiegających z owrzodzeniem, które powiązano z genotypem HPV 18 [32].

Badania z 2005 r. porównujące obecność DNA HPV w prawidłowej błonie śluzowej, w stanach przedrakowych i rakach inwazyjnych prowadzili Kreimer i wsp. [33] i Syrjänen [34]. Jednoznacznie wykazali 3-krotnie wyższą częstość występowania HPV w stanach przedrakowych jamy ustnej i 5-krotnie wyższą w tkance nowotworu w porównaniu z prawidłową błoną śluzową. Mimo dowodów, że HPV może brać udział w transformacji nowotworowej prawidłowej błony śluzowej, potwierdzona, stosunkowo niska częstość występowania genomu wirusowego w stanach przedrakowych w połączeniu z faktem, że HPV jest obecny tylko w pewnej subpopulacji raków jamy ustnej, skłaniała do przypuszczeń, że nie jest on pierwotnym czynnikiem etiologicznym inicjującym kancerogenezę raków jamy ustnej, a raczej kokancerogenem i modulatorem ostatecznego fenotypu nowotworu [35].

Jest wiele czynników ryzyka rozwoju SCC w obrębie jamy ustnej – palenie tytoniu, alkohol, promieniowanie UV, urazy, zła higiena jamy ustnej, niedobory witamin A, B lub C, lecz w pewnych przypadkach żadnego z powyższych nie można zidentyfikować [7]. Miller i Johnstone [36] na podstawie metaanalizy chorych z lat 1982–1997 zaobserwowali, że HPV może być niezależnym, izolowanym czynnikiem ryzyka rozwoju raka jamy ustnej. Ze względu na różnorodność badanych populacji i odmienne metody badawcze odsetki wirusów HPV izolowanych z tkanki guza w przypadku nowotworów jamy ustnej i ustnej części gardła wahają się w literaturze przedmiotu. Wczesne doniesienia Millera i White'a [30] z 1996 r. wskazują na etiologię HPV w ok. 20% przypadków raków, doniesienia późniejsze, m.in. grup Perronsa [37] i Gillson [38], podają obecność fragmentów genomu wirusa aż w 50%. W monografii IARC z 2007 r. podaje się, że występowanie infekcji HPV w rakach jamy ustnej sięga 25%, a wirus HPV 16 jest stwierdzany w 70% przypadków HPV-pozytywnych; w rakach ustnej części gardła odsetki te są wyższe i wynoszą odpowiednio 35 i 80% [39].

Szczególne miejsce w epidemiologii nowotworów związanych z HPV zajmują migdałki podniebienne – jako organ pełniący funkcję ochronną przed zakażeniem dróg oddechowych. W grupie 52 losowo dobranych chorych (Mayo Clinic, USA) leczonych z powodu raka migdałka potwierdzono obecność HPV w 46% przypadków. U 16 z 21 nosicieli HPV był to wariant dużego ryzyka HPV 16. Ponieważ u większości chorych będących HPV-pozytywnymi nie występowały typowe czynniki ryzyka, a ich wiek był niższy niż chorych HPV-negatywnych, HPV uznano za niezależny czynnik rozwoju raka migdałka podniebiennego [40]. Wyniki te zostały potwierdzone również w 52-osobowej grupie francuskiej z rakiem migdałka podniebiennego. Nosiicielstwo HPV było wyższe (62%), również ze znaczną przewagą HPV 16 (27/32). Zarówno grupa HPV (+), jak i HPV (–) była w większości eksponowana wcześniej



na dym tytoniowy i alkohol, ale 10 nieekspozowanych w całości mieściło się w grupie HPV-pozytywnych. Współczynnik 5-letniego przeżycia był wyższy w grupie chorych HPV-pozytywnych [41]. Choć ocena występowania raka migdałka podniebiennego w nawiązaniu do HPV nie jest przedmiotem wielu prac, to jednak pozostałe dowody, że jest to organ szczególnie predestynowany do rozwoju nowotworu na bazie infekcji HPV.

W rakach płaskonabłonkowych krtani oczekiwano trudności w wykazaniu znaczenia zakażenia HPV, ponieważ w tej grupie jest najwyższy procent osób palących tytoń i nadużywających mocnych napojów alkoholowych. Istotnie w badaniach przeprowadzonych w grupie 44 chorych na raka krtani i 10 chorych z leukoplakią DNA HPV wykryto, odpowiednio, w 18,2 i 20% przypadków, ale nie można było wykluczyć działania sprawnego typowych czynników związanych z rakiem krtani [42]. W polskim materiale badawczym DNA HPV wykryto w 6 z 40 (15%) przypadków płaskonabłonkowego raka krtani. Autorom nie udało się jednak osiągnąć założonego celu badania ukierunkowanego na wskazanie obrazu histologicznego i klinicznego charakterystycznego dla przypadków HPV-pozytywnych [43]. Z powodu względnie częstego występowania raka krtani związane z zakażeniem HPV na Tajwanie Lee i wsp. [44] uzyskali stosunkowo spójny pogląd na chorych HPV-pozytywnych. Lżejszy i lepiej rokujący przebieg choroby nowotworowej krtani autorzy tłumaczą aktywną antywirusową komórkową odpowiedzią immunologiczną.

Oczekiwany niższy udział zakażenia HPV w zapadalności na raka krtani znalazł potwierdzenie w obszernych badaniach porównawczych przeprowadzonych przez Kreimera i wsp. z IARC (Lyon, Francja) [33]. Analiza 5046 przypadków nowotworów głowy i szyi opisanych w 60 publikacjach potwierdziła udział HPV w 25,9% przypadków. Porównanie trzech głównych lokalizacji nowotworów w obrębie głowy i szyi dało następujący wynik odnośnie do obecności HPV: gardło górne – 35,6%, jama ustna – 23,5%, krtani – 24%, co zgadzało się z oczekiwaniami i wstępnymi badaniami przeprowadzonymi w mniej licznych grupach chorych. Wykazano ponadto, że z wariantów HPV w większości uczestniczyły HPV 16 i HPV 18 przy marginalnym uczestnictwie innych wariantów.

Obecne poglądy na HPV-zależne raki głowy i szyi

Pogląd o dwóch subtypach nowotworów głowy i szyi rozwijających się w następstwie ekspozycji na kancerogeny chemiczne lub powodowane zakażeniem HPV wydaje się już dobrze udokumentowany i ugruntowany w nauce. Z tego powodu warto jeszcze raz zestawić dane epidemiologiczne i kliniczne (tab. 2.).

Po analizie HPV-pozytywnych przypadków osób z rakami jamy ustnej i gardła stwierdzono, że wiek cho-

Tabela 2. Podstawowe elementy charakterystyki nowotworów głowy i szyi HPV-zależnych i HPV-niezależnych

HPV-niezależne (typowe)	HPV-zależne
liczne mutacje DNA	nieliczne mutacje DNA
liczne i duże aberracje chromosomowe	pojedyncze niewielkie aberracje chromosomowe
długa promocja (kumulacja mutacji, fenotyp mutatorowy)	długa promocja (okres utajenia – przetrwalnikowa forma ekspresji)
cięższy przebieg choroby	lżejszy przebieg choroby
krótki czas przeżycia	dłuższy czas przeżycia

rych jest statystycznie niższy [38, 45]. Podobne spostrzeżenia epidemiologiczne i kliniczne opublikowały kolejne grupy badawcze. Liang i wsp. [46] potwierdziła wzrost zachorowań na raki trzonu języka w populacji młodziej, tj. w grupie poniżej 45. roku życia, przy czym przeważali chorzy bez ekspozycji na tradycyjne czynniki ryzyka. Niemniej autorzy nie wykazali zależności między wzrostem zapadalności na raki trzonu języka a infekcją HPV obecną u ok. 12% chorych, w przeciwieństwie do silnego powiązania tego czynnika z rakami nasady języka, w których genom HPV był obecny aż w 51% przypadków. Nie można pominąć publikacji Herrero i wsp. [47] opartej na analizie 1670 przypadków nowotworów jamy ustnej, gdzie nie stwierdzono znaczącego obniżenia wieku chorych w porównaniu z typowymi chorymi.

W rakach HPV-zależnych udział nałogów uznawanych za klasyczne czynniki ryzyka (palenie papierosów i picie alkoholu) jest znacząco mniejszy [38, 47]. Podobnie grupę chorych z HPV-zależnymi rakami jamy ustnej i gardła deklarujących brak nałogów przedstawił Lee i wsp. [44]. Zarówno w badaniach Gillson i wsp. [38], jak i Lee i wsp. [44] dominowała lokalizacja pierwotna HPV-zależnych nowotworów w części ustnej gardła, przede wszystkim w migdałku podniebiennym oraz innych punktach anatomicznych pierścienia Waldeyera, a nie jak u pozostałych chorych w okolicy bocznej powierzchni trzonu języka czy dna jamy ustnej. Migdałek jest miejscem predylnym także w świetle innych doniesień [48]. Nabłonek głębokich krypt migdałowych, w bezpośrednim sąsiedztwie tkanki chłonnej, okazuje się szczególnie wrażliwy na zasiedlenie przez wirusy HPV i związaną z powyższym transformację nowotworową; w tym miejscu DNA HPV znajdowano 6 razy częściej niż w innych lokalizacjach raków jamy ustnej [38].

Ważnym, odrębnym elementem wywiadu w rakach HPV-zależnych był seks oralny oraz duża liczba partnerów i ściśle z tym związana droga zakażenia wirusem HPV [33, 38, 48, 49]. Ciekawe, że jeszcze 10 lat wcześniej zastanawiano się nad możliwością przenoszenia raków związanych z HPV [50], a dziś na to pytanie daje się twierdzącą odpowiedź. Udowodniono bezpośrednią zależność między zakażeniem wirusowym narządów



plciowych a obecnością infekcji HPV jamy ustnej [49]. Ważnym czynnikiem jest niski wiek inicjacji seksualnej [51]. Niemniej wysokie nosicielstwo podtypów dużego ryzyka HPV w okolicach narządów płciowych zarówno u mężczyzn, jak i u kobiet nie jest związane z wiekiem [52].

W grupie raków powiązanych z zakażeniem HPV stwierdzono także nieco inne utkanie histologiczne – *basaloid cell carcinoma*. Potwierdzają to badania Reddouta i wsp. [36], którzy wysunęli hipotezę, że szczepki dużego ryzyka HPV 16 i HPV 18 samodzielnie lub łącznie indukują znaczące, wymierne zmiany fenotypowe raków jamy ustnej, zwłaszcza w zakresie morfologii komórek guzów i ich zdolności proliferacyjnych.

Propozycje terapeutyczne

Niezwykle ważne jest przełożenie wyników badań podstawowych na zastosowanie kliniczne (ang. *translation research*). Pracę taką przedstawili Gillison i wsp. [53] na podstawie obserwacji 43 936 przypadków raków jamy ustnej i gardła w latach 2000–2003 w Stanach Zjednoczonych. Przeanalizowała ona szczegółowe dane epidemiologiczne i parametry kliniczne (wywiad rodzinny, stan uzębienia, poziom spożycia alkoholu i liczbę wypalanych papierosów, zachowania seksualne – seks oralny i liczbę partnerów). Na podstawie wieloczynnikowej analizy danych stwierdzono znaczący wzrost liczby zakażeń HPV i zaobserwowano, że tylko u 40% chorych HPV-pozytywnych był dodatni wywiad odnośnie do nałogów palenia tytoniu i picia alkoholu. Jednocześnie przeżycia dla raka jamy ustnej w latach 2000–2003 w porównaniu z wcześniejszymi okresami uległy znaczącej poprawie z 35–45 do 60%, mimo że stosowano jednolite schematy leczenia. Kolejna obserwacja to znamienna korelacja między poprawą wyników leczenia nowotworów a wzrostem liczby chorych z rakami jamy ustnej i wykładnikami zakażenia HPV.

Gillison i wsp. [54] odnotowali także różnice terapeutyczne – nowotwory u chorych z HPV nieporównanie lepiej odpowiadają na indukcyjną chemioterapię w schemacie paklitaksel + karboplatyna (odpowiedź rzędu 84%) w porównaniu z pozostałymi nowotworami jamy ustnej i ustnej części gardła (odpowiedź na poziomie 50%). Potwierdzają to badania Kłozara i wsp. [55], którzy podkreślają, że obecność DNA wirusa HPV w utkaniu nowotworu jest niezależnym czynnikiem prognostycznym wpływającym na poprawę zarówno całkowitego 5-letniego przeżycia, jak i przeżycia zależnego od choroby. Znaczenie prognostyczne zakażenia wirusem HPV i jego rola w rokowaniu pozostają nieznane. Wielu autorów podkreśla lepsze wyniki leczenia raków HPV-zależnych w porównaniu z pozostałymi nowotworami jamy ustnej i ustnej części gardła [49, 55, 56].

Łączy się je z cechami morfologicznymi nowotworu, tj. jego wyższą wrażliwością na radioterapię lub też z zupełnie innym mechanizmem, zależnym od gospodarza, a mianowicie aktywną komórkową odpowiedzią immunologiczną wystymulowaną przez zakażenie wirusowe [44]. Kolejnym spostrzeżeniem klinicznym jest mniejszy potencjał tej grupy raków do szerzenia się drogami chłonnymi i niższy odsetek przerzutów w układzie chłonnym szyi dla danej cechy T i grubości nacieku nowotworowego niż w pozostałych rakach [48]. Jednocześnie obecność wirusowego DNA HPV 16 w próbkach śliny podczas monitorowania chorych po zakończeniu leczenia stanowi bardzo niekorzystny czynnik rokowniczy i świadczy o dużym ryzyku wystąpienia wznowy miejscowej lub przerzutów odległych [8], dlatego podjęto próbę rutynowego wykorzystania ilościowej oceny HPV 16 PCR oznaczanej w ślinie osób wyleczonych jako biomarkera służącego do wczesnego wykrywania wznowy.

Na podstawie powyższych obserwacji stwierdzono, że osoby HPV-pozytywne rozwijają zupełnie inne raki jamy ustnej i ustnej części gardła. Niezwykle ważne są tu implikacje praktyczne dotyczące terapii, rokowania, możliwości prewencji czy badań przesiewowych dla grup ryzyka.

Zapobieganie infekcjom HPV obejmuje dwie strategie – aktywację i adaptację odpowiedzi ze strony układu immunologicznego lub eliminację zakażonych wirusem HPV keratynocytów [57]. Obecnie dopuszczone są dwie szczepionki – dwuwalentna, zawierająca HPV 16 i HPV 18, oraz czterowalentna, złożona z HPV 16 i HPV 18 oraz HPV 6 i HPV 11. Są szeroko stosowane w masowych szczepieniach młodych kobiet przed okresem inicjacji seksualnej. Udowodniono ich przydatność w obniżeniu odsetków występowania zakażeń wirusa brodawczaka w przypadkach CIN 2/3. Zastosowanie tych szczepionek jako potencjalnej metody zapobiegania rozwojowi raków jamy ustnej i ustnej części gardła pozostaje przedmiotem kontrowersji [58]. Doświadczalne prace Maedy i wsp. [59] na modelu zwierzęcym dowiodły, że immunizacja szczepionką zawierającą plazmidowy DNA, kodującą gen *L1*, efektywnie zapobiegała rozwojowi raka języka wywołanego wirusem brodawczaka jamy ustnej chomika (HOP). Smith i wsp. [60] na podstawie badań bezobjawowej grupy 1235 osób w wieku 2–20 lat stwierdzili wzrost odsetka zakażeń wirusem od 0,8 w wieku 1–4 lat do 3,3 w wieku 16–20 lat, średnio 1,9%. Wysunęli wniosek, że zakażenie wirusem brodawczaka nabywane jest stopniowo w młodości, co w połączeniu z udowodnioną etiopatogenezą infekcji orogenitalnych potwierdza przydatność szczepień w okresie okołopokwitaniowym. Rutynowe wprowadzenie szerokich szczepień powinno w przyszłości zaowocować zmniejszeniem liczby HPV-zależnych raków jamy ustnej i ustnej części gardła [61, 62]. Profilaktyka taka mogłaby odwrócić trendy epidemiologiczne przedstawiane przez Schantzta i wsp. [63].



Wirusy brodawczaka mogą być także potencjalnie celem terapii genowych. Udowodniono, że progresja raków HPV-zależnych jest uwarunkowana ekspresją genów *E6* i *E7* wirusa. W badaniach *in vitro* wykazano, że ekspresja tych genów jest hamowana poprzez zastosowanie w doświadczalnych próbach terapii genowej *antisense* RNA lub siRNA. Działanie tych inhibitorów powoduje, że komórki tracą fenotyp agresywnego guza [64]. Badania doświadczalne wymagają badań transkrypcyjnych pozwalających na zastosowanie terapii genowej w badaniach przedklinicznych.

Teza o dwóch różnych czynnikach odpowiedzialnych za występowanie nowotworów głowy i szyi jest już uznawana, zatem założenie istnienia alternatywnych mechanizmów indukowanych ekspozycją na dym tytoniowy lub zakażeniem HPV z tylko częściowo nakładającymi się następstwami molekularnymi i komórkowymi prowadzi do rozważenia wprowadzenia odpowiednio dostosowanych różnych strategii. Przyjęcie alternatywnych procedur terapeutycznych wymaga jeszcze szerokich badań [65].

Podsumowanie

Metaanalizy prowadzone w piśmiennictwie bezsprzecznie dowodzą roli HPV w rozwoju HNSCC, zwłaszcza raków jamy ustnej i ustnej części gardła [4, 6, 27, 33, 34, 38, 40, 45, 47, 49, 52]. Jednocześnie dostrzegany jest wzrost zapadalności na nowotwory jamy ustnej i gardła górnego [38, 66], przy jednoczesnym zmniejszaniu się liczby wypalanych papierosów w krajach rozwiniętych. Zagadnienie to stanowi przedmiot dobrze udokumentowanej pracy pochodzącej z M.D. Anderson Cancer Center (Houston, Teksas). Sturgis i Cinciripinio prześledzili dane na temat palenia papierosów w Stanach Zjednoczonych w ostatnich 50 latach i odnotowali spadek od połowy lat 70. XX w. W ślad za redukcją palenia papierosów z ok. 10-letnim opóźnieniem następuje zmniejszenie zapadalności na nowotwory krtani. Zapadalność na nowotwory jamy ustnej i gardła górnego po niewielkim spadku utrzymuje się jednak na stabilnie wysokim poziomie. Autorzy tłumaczą to właśnie zależnością od infekcji HPV [67].

Konieczny jest dalszy rozwój bardziej czułych i specyficznych metod wykrywania zakażenia wirusem HPV dla poszczególnych lokalizacji pierwotnych.

Dotychczas zgromadzone w piśmiennictwie światowym informacje są przydatne do dalszego prowadzenia badań nad zastosowaniem szczepień przeciwko HPV zarówno zapobiegających rozwojowi HNSCC, jak i o działaniu terapeutycznym [68, 69].

Znaczenie zagadnienia HPV w nowotworach podkreśla dodatkowo decyzja Komitetu Fundacji im. A. Nobla honorująca profesora zur Hausena (Heidelberg, Niemcy) nagrodą za rok 2008 w dziedzinie fizjologii i medycyny.

Piśmiennictwo

1. International Agency for Research on Cancer. Tobacco smoking. IARC monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. Vol. 38. IARC, Lyon 1986.
2. Vineis P, Alavanja M, Buffler P, et al. Tobacco and cancer: recent epidemiological evidence. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 99-106.
3. Zatoński W, Zatoński T. Epidemiologia nowotworów złośliwych krtani. W: Rak krtani i gardła dolnego. Janczewski G, Osuch-Wójcikiewicz W. (red.). *α-medica press*, Bielsko-Biała 2002; 15-29.
4. zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: Evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 690-8.
5. IARC monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. Human Papillomaviruses. Vol. 64. IARC, Lyon 1995.
6. zur Hausen H. Papillomaviruses infections – a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1288: F55-78.
7. Campisi G, Panzarella V, Giuliani M, et al. HPV: Its identikit and controversial role in oral oncogenesis, premalignant and malignant lesions. *Int J Oncol* 2007; 30: 813-23.
8. Chuang AY, Chuang TC, Chang S, et al. Presence of HPV DNA in convalescent salivary rinses is an adverse prognostic marker in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2008; 44: 915-9.
9. Fakhry C, Gillison ML. Clinical implications of HPV in head and neck cancers. *J Clin Oncol* 2006; 24: 2606-11.
10. Thorland EC, Myers SL, Persing DH, et al. Human papillomavirus type 16 integrations in cervical tumors frequently occur in common fragile sites. *Cancer Res* 2000; 60: 5916-21.
11. Soderberg C, Perez DS, Ukpo OC, et al. Differential loss of expression of common fragile site genes between oral tongue and oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Cytogenet Genome Res* 2008; 121: 201-10.
12. Chen Z, Storthz KA, Shillitoe EJ. Mutations in the long control region of HPV DNA in oral cancer cells and their functional consequences. *Cancer Res* 1997; 57: 1614-9.
13. Perrone F, Mariani L, Pastore E, et al. p53 codon 72 polymorphisms in HPV-negative and HPV-positive squamous cell carcinomas of the oropharynx. *Cancer* 2007; 109: 2461-5.
14. Ji X, Neumann AS, Sturgis EM, et al. p53 codon 72 polymorphism associated with risk of HPV-associated squamous cell carcinoma of the oropharynx in never-smokers. *Carcinogenesis* 2008; 29: 875-9.
15. Chen X, Sturgis EM, El-Naggar A, et al. Combined effects of the p53 codon 72 and p73 G4C14-to-A4T14 polymorphisms on the risk of HPV16-associated oral cancer in never-smokers. *Carcinogenesis* 2008; 29: 2120-5.
16. Balz V, Scheckenbach K, Götte K, et al. Is the p53 inactivation frequency in squamous cell carcinomas of the head and neck underestimated? Analysis of p53 exons 2-11 and human papillomavirus 16/18 E6 transcripts in 123 unselected tumor specimens. *Cancer Res* 2003; 63: 1188-91.
17. Katori H, Nozawat A, Tsukuda M. Relationship between p21 and p53 expression, HPV infection and malignant transformation in sinonasal-inverted papilloma. *Clin Oncol* 2006; 18: 300-5.
18. Smith EM, Wang D, Kim Y, et al. P16 INK4a expression, HPV, and survival in head and neck cancer. *Oral Oncol* 2008; 44: 133-42.
19. Ragin CCR, Taioli E, Weissfeld JL, et al. 11q13 amplification status and HPV in relation to p16 expression defines two distinct etiologies of HNC tumors. *Br J Cancer* 2006; 95: 1432-8.
20. Jarmuż M, Grenman R, Golusinski W, Szyfter K. Aberrations connected with 11q13 chromosome region in laryngeal squamous cell carcinoma and their prognostic significance. *Cancer Genet Cytogen* 2005; 160: 82-8.
21. Rodrigo JP, Alvarez I, Martinez JA, et al. Relationship of HPV to ploidy in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1999; 121: 318-22.
22. Genter Williams SM, Disbrow GL, Schlegel R, et al. Requirement of epidermal growth factor receptor for hyperplasia induced by E5, a high-risk HPV oncogene. *Cancer Res* 2005; 65: 6534-42.
23. Braakhuis BJ, Snijders PJ, Keune WJ, et al. Genetic patterns in head and neck cancers that contain or lack transcriptionally active HPV. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 998-1006.



24. Hubbard RA. Human papillomavirus testing methods. *Arch Pathol Lab Med* 2003; 940-5.
25. Luo CW, Roan CH, Liu CJ. Human papillomaviruses in oral squamous cell carcinoma and pre-cancerous lesions detected by PCR-based gene chip array. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2007; 36: 153-8.
26. Strati K, Pitot HC, Lambert PF. Identification of biomarkers that distinguish human papillomavirus (HPV)-positive vs. HPV-negative head and neck cancers in a mouse model. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 14152-7.
27. Smith ME, Ritchie JM, Pawlita M, et al. Human papillomavirus seropositivity and risks of head and neck cancer. *Int J Cancer* 2006; 120: 825-32.
28. Capone RB, Pai SI, Koch WM, et al. Detection and quantitation of human papillomavirus (HPV) DNA in the sera of patients with HPV-associated head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 4171-5.
29. Fejerskov O, Roed-Petersen B, Pindborg JJ. Clinical, histological and ultrastructural features of a possibly virus-induced oral leukoplakia. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1977; 85: 897-906.
30. Miller CS, White DK. Human papillomavirus expression in oral mucosa, premalignant conditions, and squamous cell carcinoma: a retrospective review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1997; 82: 57-68.
31. Silverman S Jr, Gorsky M. Proliferative verrucous leukoplakia: a follow-up study of 54 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1996; 84: 154-7.
32. Campisi G, Giovannelli L, Arico P, et al. HPV DNA in clinically different variants of oral leukoplakia and lichen planus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004; 98: 705-11.
33. Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. Human papillomavirus types in head and neck carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 467-75.
34. Syrjänen S. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. *J Clin Virol* 2005; 32 (Suppl. 1): 59-66.
35. Reddout N, Christensen T, Bunnell A, et al. High risk HPV types 18 and 16 are potent modulators of oral squamous cell carcinoma phenotypes in vitro. *Infect Agent Cancer* 2007; 2: 21-32.
36. Miller CS, Johnstone BM. Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis, 1982-1997. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001; 91: 622-35.
37. Perrons C, Brink N, Jalal H, et al. The impact of high risk HPV testing in an inner london colposcopy clinic. *J Med Virol* 2005; 76: 576-82.
38. Gillson ML, Koch WM, Capone RB, et al. Evidence for a casual association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 709-20.
39. Human Papillomavirus. Monographs on the evaluation carcinogenic risk to humans. Vol.90, IARC, Lyon 2007.
40. Strome SE, Savva A, Brissett AE, et al. Squamous cell carcinoma of the tonsils: A molecular analysis of HPV associations. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 1093-100.
41. Charfi L, Jouffroy TH, de Cremoux P, et al. Two types of squamous cell carcinoma of the palatine tonsil characterized by distinct etiology, molecular features and outcome. *Cancer Lett* 2008; 260: 72-8.
42. Smith EM, Summersgill KF, Allen J, et al. Human papillomavirus and risk of laryngeal cancer. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2000; 109: 1069-76.
43. Morshed K, Korobowicz E, Szymański M, et al. Immunohistochemical demonstration of multiple HPV types in laryngeal squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2005; 262: 917-20.
44. Lee LA, Cheng AJ, Fang TJ, et al. High incidence of malignant transformation of laryngeal papilloma in Taiwan. *Laryngoscope* 2008; 118: 850-5.
45. Smith EM, Richtie JM, Summersgill KF, et al. Age, sexual behaviour and HPV infection in oral cavity and oropharyngeal cancers. *Int J Cancer* 2004; 108: 766-72.
46. Liang XH, Lewis J, Foote R, et al. Prevalence and significance of HPV in oral tongue cancer: the Mayo Clinic experience. *J Oral Maxillofac Surg* 2008; 66: 1875-80.
47. Herrero R, Castellsague X, Pawlita M, et al. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 1772-83.
48. Pintos J, Black MJ, Sadeghi N, et al. Human papillomavirus infection and oral cancer: a case-control study in Montreal, Canada. *Oral Oncol* 2008; 44: 242-50.
49. Furniss CS, McClean MD, Smith JF, et al. Human papillomavirus 16 and head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2007; 120: 2386-92.
50. Gillison ML, Koch WM, Shah KV. Human papillomavirus in head and neck squamous cell carcinoma: are some head and neck cancers a sexually transmitted disease? *Curr Opin Oncol* 1999; 11: 191-9.
51. Anaya-Saavedra G, Ramirez-Amador V, Irigoyen-Camacho E, et al. High association of human papillomavirus infection with oral cancer: a case-control study. *Arch Med Res* 2008; 39: 189-97.
52. Giuliano R, Tortolero-Luna G, Ferrer E, et al. Epidemiology of human papillomavirus infection in men, cancers other than cervical and benign conditions. *Vaccine* 2008; 26 (Suppl. 10): K17-28.
53. Chaturvedi AK, Engels EA, Anderson WF, Gillison ML. Incidence trends for HPV-related and -unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States. *J Clin Oncol* 2008; 26: 612-9.
54. Gillison ML. Current topics in the epidemiology of oral cavity and oropharyngeal cancers. *Head Neck* 2007; 29: 779-92.
55. Klozar J, Kratochvil V, Salakova M, et al. HPV status and regional metastasis in the prognosis of oral and oropharyngeal cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2008; 265 (Suppl. 1): S75-82.
56. Li W, Thompson CH, O'Brien CJ, et al. Human papillomavirus positivity predicts favourable outcome for scc of the tonsil. *Int J Cancer* 2003; 106: 553-8.
57. Palefsky JM, Gillison ML, Strickler HD. Chapter 16: HPV vaccines in immunocompromized women and men. *Vaccine* 2006; 24: Suppl. 3: S140-6.
58. Laurence J. HPV-linked oral cancer: another argument for universal HPV vaccination of boys and girls. *AIDS Read* 2008; 18: 345-6.
59. Maeda H, Kubo K, Sugita Y, et al. DNA vaccine against hamster oral papillomavirus-associated oral cancer. *J Int Med Res* 2005; 33: 647-53.
60. Smith EM, Swarnavel S, Ritchie JM, et al. Prevalence of HPV in the oral cavity/oropharynx in a large population of children and adolescents. *Pediatr Infect Dis J* 2007; 26: 836-40.
61. Clossmann JJ. The human papilloma virus, the vaccines and oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: what every dentist should know. *Gen Dent* 2007; 55: 252-4.
62. Sitas F, Urban M, Stein L, et al. The relationship between anti-HPV-16 IgG seropositivity and cancer of the cervix, anogenital organs, oral cavity and pharynx, oesophagus and prostate in a black South African population. *Infect Agent Cancer* 2007; 2: 6.
63. Schantz SP, Byers RM, Goepfert H. Tobacco and cancer of the tongue in young adults. *JAMA* 1988; 259: 1943-4.
64. Shillitoe EJ. Papillomaviruses as targets for cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther* 2006; 13: 445-50.
65. McNeil C. Human papillomavirus and oral cancer: looking toward the clinic. *J Natl Cancer Inst* 2008; 100: 840-2.
66. Ernster JA, Scioto CG, O'Brien MM, et al. Rising incidence of oropharyngeal cancer and the role of oncogenic human papilloma virus. *Laryngoscope* 2007; 117: 2115-28.
67. Sturgis EM, Cinciripini PM. Trends in head and neck cancer incidence in relation to smoking prevalence. An emerging epidemic of HPV-associated cancers? *Cancer* 2007; 110: 1429-35.
68. El-Mofly SK. HPV-related carcinomas of the upper aerodigestive tract. *Head Neck Pathol* 2007; 1: 181-5.
69. Termine N, Panzarella V, Falaschini S, et al. HPV in oral squamous cell carcinoma vs. head and neck carcinoma biopsies: a metaanalysis (1998-2007). *Ann Oncol* 2008; 19: 1681-90.

Adres do korespondencji:

prof. dr hab. n. med. Krzysztof Szyfter
Instytut Genetyki Człowieka PAN
ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań
tel. +48 61 657 92 20, faks +48 61 823 32 35
e-mail: szyfkris@man.poznan.pl

