

Larinksin Yassı Epitel Hücreli Karsinomlarında P16 Ekspresyonu ve İnsan Papillomavirüs ile İlişkisi

P16 Expression in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma and its Relationship with Human Papillomavirus

Melahat DÖNMEZ,^a
Gülben ERDEM HUQ,^b
Noyan Can AKDUR,^c
Serap GÖZEL,^a
Erol Rüştü BOZKURT^b

^aPatoloji Kliniği,
Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi,
Ankara

^bPatoloji Kliniği,
İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi,
İstanbul

^cPatoloji Kliniği,
Bursa Şevket Yılmaz
Eğitim ve Araştırma Hastanesi,
Bursa

Geliş Tarihi/Received: 14.10.2011
Kabul Tarihi/Accepted: 31.08.2012

*Olgu sunumunun bir özeti,
21. Ulusal Patoloji Kongresi
(16-20 Kasım 2011, İzmir)'nde sunulmuştur.*

Yazışma Adresi/Correspondence:

Melahat DÖNMEZ
Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi,
Patoloji Kliniği, Ankara,
TÜRKİYE/TURKEY
mujganhandan@gmail.com

ÖZET Amaç: Laringeal yassı hücreli karsinomlarda p16 ekspresyonunu ortaya koymak, İnsan Papilloma Virüs (HPV)'ün etken olduğu karsinomlarda p16-HPV ilişkisini açıklamak, p16 proteininin prognostik parametrelerle ilişkisini saptamaktır. **Gereç ve Yöntemler:** Elli altı adet larinksin yassı epitel hücreli karsinom olgusu; mikroskopik tip, grade, lenf nodu metastazi, vasküler-perinöral invazyon, multisentrisite, mononükleer inflammatuar yanıt, prekanse-röz lezyon açısından da değerlendirilerek yeniden incelendi. Olgulara immünohistokimyasal olarak p16INK4a ve HPV antikörleri uygulandı. Pozitif kontrol olarak; servikal yassı epitel hücreli karsinomu kullanıldı. Kesitler iki patoloj tarafından ışık mikroskopisiyle incelendi. **Bulgular:** Elli altı olgu çoğunluk sırasıyla glottik (%57,1), supraglottik (%39,3) ve transglottik (%3,6) yerleşimliydi. Otuz bir (%56,4) olguda p16 ekspresyonu negatif, 24 (%43,6)'ünde pozitif saptandı. Olguların 21 (%37,5)'inde HPV antijeni mevcutken, 35 (%62,5)'inde saptanmadı. P16 ekspresyonunun HPV varlığıyla ilişkisi değerlendirildiğinde; HPV-negatif ve pozitif vakalar arasında, p16 ekspresyonu açısından anlamlı bir fark bulunmadı (p=0,329). Prognostik parametrelerle p16 ekspresyonu arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptanmadı. **Sonuç:** Larinksin yassı epitel hücreli karsinomları; "HPV-ilişkili", "sigara-alkolle ilişkili" gibi farklı alt tiplere sahip olup etiyoloji, lokalizasyon, histomorfoloji ve prognoz açısından farklı davranışlar sergilerler. HPV-ilişkili karsinomlarda p16 ekspresyonunda artış, buna karşılık sigara-alkolle bağlı karsinomlarda p16 ekspresyon kaybı söz konusudur. Ayrıca immünohistokimyasal yöntemle kullandığımız kokteyl HPV antikoru tüm HPV tiplerini içermektedir ve teknik olarak güçlüğüyle boyanma elde edilebilmektedir. Geçici HPV enfeksiyonları nedeniyle yalnızca negatiflikler olabileceği gibi düşük riskli virüsler de yalnızca pozitiflik sağlamış olabilir. Geniş klinik ve moleküler çalışmalarla HPV-pozitif karsinomlar daha iyi tanımlanırsa, tıpkı serviks karsinomlarında olduğu gibi p16 pozitivitesi ve HPV-p16 ilişkisi daha iyi gösterilecektir. İleride bu tip karsinomlarda HPV işaretleyici moleküler yöntemlerin yanı sıra, p16 işaretleyici immünohistokimya yöntemi de kullanılabilir gibi görünmektedir.

Anahtar Kelimeler: Larinks; siklin bağımlı kinaz inhibitörü p16; karsinom; skuamöz hücre; insan papillomavirüsü 16; insan papillomavirüsü 18

ABSTRACT Objective: To determine the expression of p16 protein in the laryngeal squamous cell carcinoma, to investigate the relationship between p16 expression and Human Papilloma Virus (HPV) and to find out the relationship between p16 expression and prognostic parameters. **Material and Methods:** Fifty six laryngeal squamous cell carcinoma cases were re-examined for the microscopic types, histological grades, lymph node metastasis, vascular-perineural invasions, multicentricities, mononuclear inflammations and precancerous lesions. p16INK4a and HPV antibodies were applied for immunohistochemistry. Cervical carcinoma tissue was used as the positive control. The sections were examined by two pathologists under the light microscopy. **Results:** Among 56 laryngeal carcinoma cases, 57.1% were glottic, 39.3% were supraglottic, and 3.6% were transglottic. P16 was detected in 24 (43.6%) cases, whereas 31 (56.4%) cases showed a negative reaction. HPV antibody was positivity in 21 (37.5%) cases while it was negative in 35 (62.5%) cases. There was no significant difference in the expression of p16 between HPV-positive and negative cases (p=0.3299). There was no significant relationship of p16 with prognostic parameters. **Conclusion:** Laryngeal squamous cell carcinomas have different subtypes, such as; "HPV-related" and "associated with tobacco-alcohol". Due to etiology, localization and histomorphology; laryngeal squamous cell carcinomas exhibit different biological behaviors. In the HPV-related carcinomas, there is an increased expression of p16, whereas there is a loss of p16 protein expression in tobacco and alcohol-related cancers. The cocktail-HPV includes all types of HPV antibodies and staining can not be achieved easily. In addition due to temporary HPV infections, false negatives might occur, on the other hand, low-risk viruses provide false positives. If HPV-related carcinomas were defined better with broad clinical and molecular studies, like cervical carcinomas, the relationship between HPV-p16 and p16 positivity could be shown better. In this type of carcinomas, besides using expensive molecular methods to detect HPV, it may be possible for immunohistochemical methods to detect p16 in the future.

Key Words: Larynx; cyclin-dependent kinase inhibitor p16; carcinoma; squamous cell; human papillomavirus 16; human papillomavirus 18

doi: 10.5336/medsci.2011-26920

Copyright © 2012 by Türkiye Klinikleri

Türkiye Klinikleri J Med Sci 2012;32(6):1576-85

Insan Papilloma Virüs (HPV)'ün genital bölge ve baş boyun bölgesi kanserlerinin gelişiminde rol aldığı daha önce birçok çalışmada gösterilmiştir.¹⁻⁸ Çift sarmallı bir DNA'ya sahip HPV'nin 100'den fazla farklı tipi bulunduğu ve tiplerine göre değişik bölgelere tropizm gösterdiği bilinmektedir.⁹⁻¹¹ Genetik olarak birbirinden farklı bu HPV tiplerinden kanser gelişimi ile ilişkili olduğu düşünülenleri, malign lezyonlarda saptanma sıklığına göre yüksek-riskli (HPV tip 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56 ve 58) ve düşük riskli (6, 11, 13, 40, 42, 43, 44, 54, 59, 61, 70, 72, 81 ve CP108) olmak üzere iki grup altında ele alınmaktadır.^{12,13} Bazı HPV tiplerinin genital bölge ve baş boyun bölgesi tümörleri ile bu yakın ilişkisi; gerek viral onkogenin mekanizmalarını çözmek, gerekse kanserin erken tanısında verimli tarama yöntemleri geliştirmek bakımından yoğun ilgi toplamaktadır. Son yıllarda özellikle serviks kanserlerinde bu başlıklarda önemli yol katedilmiş durumdadır. Walboomers ve ark., dünya genelinde 932 servikal kanserden oluşan serilerde (International Biological Study on Cervical Cancer) moleküler tekniklerle %99,7 oranında HPV DNA varlığını göstermişlerdir.²

Bu yüksek oranda beraberlik HPV'yi serviks kanserinin birinci derecede sorumlusu yapmakla birlikte karsinogenezin çok basamaklı bir süreç olduğu bilinmektedir. Dolayısıyla HPV'nin karsinogenez basamaklarında nerede yer aldığı ilgi konusudur. Bu konunun açığa kavuşturulması, spesifik tedavi ajanlarının geliştirilmesinde yol gösterici olabilir. Son yıllarda yapılan bazı çalışmalar p16 proteinine işaret etmektedir.^{6,9,14-25}

HPV; karsinojenik etkisini viral genomun konak genoma entegrasyonu ile gerçekleştirir. Entegrasyon E6 ve E7 onkogenlerin artmış ekspresyonuna neden olur. E7 gen ürünü ise retinoblastom proteinini (RB) inaktive ederek bir tümör supresör gen olan p16^{INK4a} geninin (CDKN2A) ürünü olan p16 proteininin üretimini artırır.^{6,9,26-29} Bu bilgiden yola çıkarak, p16 proteininin, serviks kanseri ve öncü lezyonlarında bir tanı-tarama belirteci olarak kullanılabilirliğini araştıran birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalarda temel prensip HPV tarafından karsinojenik yola sokulmuş epitel hücrelerinde p16 proteininin ekspresyon artışının smear veya

doku örneklerinde immünohistokimyasal yöntemlerle tespit edilebilmesi (normal serviks epitelinin aksine) üzerine oturmaktadır. Öyle ki, kuvvetli p16 ekspresyonunun servikojenital yaymalarda HPV enfeksiyonunun bulgusu olarak rutinde kullanılması önerilmektedir.^{14,15}

Tıpkı serviks karsinomlarında olduğu gibi, baş boyun kanserlerinin etyolojisinde de HPV suçlanan ajanlardan biridir. Epidemiyolojik çalışmalar göstermiştir ki HPV-ilişkili tümörler daha çok tonsil ve orofaringeal bölgede, daha genç hastalarda, yüksek sosyoekonomik gruplarda görülmektedir. Son yıllarda HPV-ilişkili baş-boyun bölgesi kanserlerinin oranı giderek artmakta, bu nedenle alkol ve sigara ile ilişkili kanserlerin oranı düşmektedir.^{5,30} Ancak laringeal kanserlerdeki pozisyonu henüz yeterince değerlendirilememiştir. Yapılan çalışmalarda çok değişen oranlarda HPV varlığı bildirilmektedir.^{7,31-34}

Laringeal yassı hücreli karsinomlar ve öncü lezyonlarında p16 proteininin rolünü ortaya koymak için yapılan literatürdeki az sayıda çalışmada farklı sonuçlara ulaşılmıştır.³⁵⁻³⁸

Bizim bu çalışmadaki amacımız, larinks karsinomları ile HPV'nin birlikteliğini göstermek, larinks karsinomlarında p16 protein ekspresyonunu tespit etmek, p16-HPV ilişkisini ve p16'nın prognostik parametrelerle olan ilişkisini araştırmaktır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Hastanemizde 3 yıl boyunca rapor edilen 56 adet total larinjektomi materyalindeki larinksin yassı epitel hücreli karsinom olgusunun hematoksil-eozin boyalı kesitleri, ışık mikroskopik olarak yeniden incelendi. Elli altı adet olgu; mikroskopik tip, histolojik grade, lenf nodu metastazı varlığı, vasküler invazyon, perinöral invazyon, multisentrisite, mononükleer inflamatuvar yanıt ve prekanseröz lezyon varlığı açısından tekrar değerlendirildi.

Olguların tümöre ait parafin bloklarından poly-L-lysin'li lamlara 4 µ kalınlığında kesitler hazırlandı. Kesitler bir gece 37°C'de ve ardından bir saat 60 °C etüvde deparafinize edildi. Üç kez 5 dakika ksilen, 3 kez 5 dakika dereceli alkollerden ve distile sudan geçirildikten sonra antigen retrieval

(10mM citrat buffer, pH 6,0) içine alındı. Mikrodalga fırında 750 Watt eşdeğerinde ısıda 5 dakika aralıklarla distile su eklenerek toplam 20 dakika kaynatıldı. Oda ısısında 20 dakika bekletildikten sonra phosphate buffer saline (PBS) içine alındı. PBS ile iki kez yıkandı. Kesitler kurularak nemlendirilmiş 25 °C oda ısısı ortamında endojen peroksidaz aktivitesini engellemek için %3'lük hidrojen peroksit damlatılarak 15 dakika bekletildi. 10 dakika protein blocking uygulandı. Yıkandıktan primer antikora alındı. Kesitlerden birine 1/30 oranında dilüe edilen p16INK4a, klon: 16P04 (JC2) (Lab-vision, Fremont, CA), diğerine HPV (6, 11, 16, 18, 31, 33, 42, 51, 52, 56, 58) klon: K1H8, (Labvision, Fremont, CA) monoklonal antikorları uygulandı. Kesitler primer antikor ile 1 saat inkübe edildi. Daha sonra 2 kez 3 dakika PBS ile yıkandı. 15 dakika sekonder antikordan sonra PBS ile yıkanarak 15 dakika streptavidin uygulandı. Tekrar PBS ile yıkanarak 10 dakika AEC kromojene alındı. Distile su ile yıkanan kesitlere Mayer hematoksilen ile karşıt boyama yapıp su bazlı kapatma vasatı ile kapatıldı.³⁹

Pozitif kontrol olarak servikal yassı epitel hücreli karsinom dokusu kullanıldı. Boyanan kesitler iki patolog tarafından ışık mikroskopunda (Olympus, BX51) incelendi.

Tümör alanında p16 ekspresyonu 55 olguda yaygınlığına göre; negatif, sporadik, fokal pozitif ve difüz pozitif olarak değerlendirildi. Bir olgu yoğun zemin boyanması nedeniyle değerlendirme dışı tutuldu. Nükleer ve sitoplazmik boyanma dikkate alındı. Boyanma hücrelerin %1'inden azında ise "negatif", hücrelerin %5'inden azında ve izole hücrelerde ise "sporadik", %5-25 arasında ve küçük gruplar halindeki hücrelerde boyanma varsa "fokal pozitif", hücrelerin %25'inden fazlasında boyanma varsa "difüz pozitif" olarak skorlandı.¹⁸ İstatistiksel analizler için ise p16 boyanması negatif olan olgular ve sporadik olgular "p16 negatif"; p16 boyanması fokal veya difüz pozitif olgular ise "p16 pozitif" olarak skorlandı.

İstatistiksel analizde; SPSS for Windows 10.0.7 istatistik paket programı ile Ki-kare testi ve beklenen değerler 5'in altında olduğu durumlarda Fisher'in kesin Ki-kare testleri uygulandı. $p < 0,05$ anlamlılık sınırı olarak kabul edildi.

Çalışmamız için bağlı bulunduğumuz kurumdan etik kurul onayı alındı.

BULGULAR

Geriye dönük olarak incelenen 56 adet larinksin yassı epitel hücreli karsinomu olgusunun tamamı erkek olup, yaş ortalaması 54,23 yıl idi. Olguların 15 (%26,7)'i grade 1, 31 (%55,4)'i grade 2, 10 (%17,9)'u grade 3 lezyonlardı.

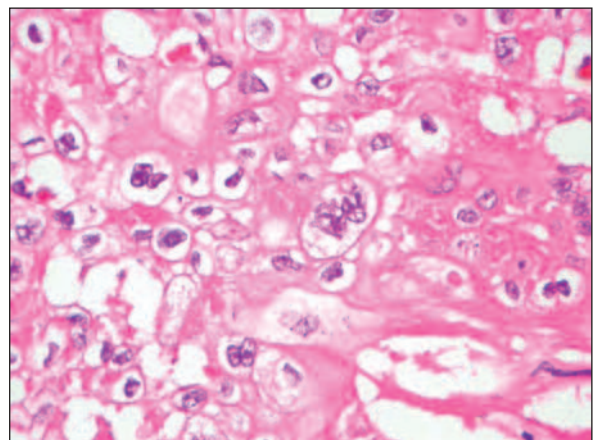
Olguların çoğunluğu glottik (%57,1) yerleşimliydi. Bunu supraglottik (%39,3) ve transglottik (%3,6) olgular izlemekteydi. İnfraglottik yerleşimli tümör kaydedilmedi (Tablo 1).

Histolojik tip olarak; en sık klasik yassı epitel hücreli karsinom olgusu mevcuttu (Resim 1). Bunu bazaloid tip yassı epitel hücreli karsinom, verrüköz ve papiller tip yassı epitel hücreli karsinom, in situ ve minimal invaziv yassı hücreli karsinom izledi (Tablo 2).

Yapılan immünohistokimyasal boyama ile 55 olguda tümöral alanların p16 ekspresyonu difüz pozitif (Resim 2), fokal pozitif (Resim 3) ve negatif

TABLO 1: Olguların lokalizasyonlarına göre dağılımı.

Lokalizasyon	Sayı	Yüzde
Glottik	32	57,1
Supraglottik	22	39,3
Transglottik	2	3,6

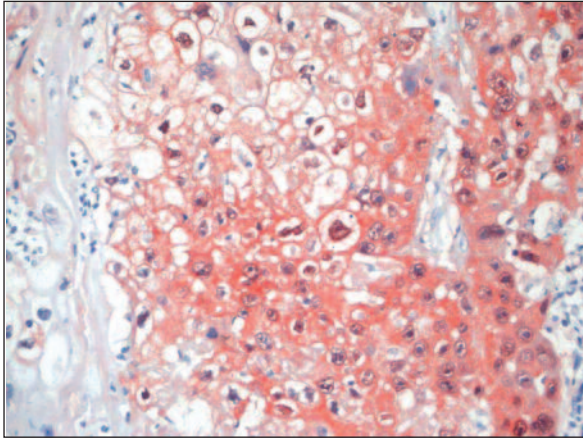
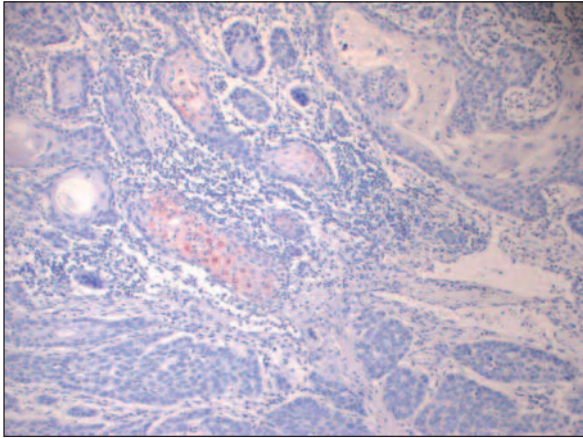


RESİM 1: Tümör içinde HPV etkisi ile uyumlu histopatolojik bulgular (HE, x400).

(Renkli hali için Bkz. <http://tipbilimleri.turkiyeklinikleri.com/>)

TABLO 2: Olguların histolojik tipe göre dağılımı.

Histolojik Tip	Sayı	Yüzde
Klasik	45	80,3
Bazaloid	5	8,9
Verrüköz	2	3,6
Papiller	2	3,6
İn situ	1	1,8
Minimal invaziv	1	1,8
Toplam	56	100

**RESİM 2:** P16 ile yapılan immünohistokimyasal boyamada HPV etkisi izlenen alanda kuvvetli ve difüz p16 ekspresyonu (x400).(Renkli hali için Bkz. <http://tipbilimleri.turkiyeklinikleri.com/>)**RESİM 3:** P16 ile yapılan immünohistokimyasal boyamada fokal olarak değerlendirilen nükleer ve sitoplazmik p16 ekspresyonu (x200).(Renkli hali için Bkz. <http://tipbilimleri.turkiyeklinikleri.com/>)

olarak değerlendirildi. Bir olgu yoğun zemin boyanması nedeniyle değerlendirme dışı tutuldu. Değerlendirme kapsamına alınan olguların 31 (%56,4)'inde tümör alanında p16 negatif, 6 (%10,9)'sında fokal

pozitif, 18 (%32,7)'inde difüz pozitif olarak saptandı. Sporadik pozitiflik izlenmedi. Toplam 24 olgu (%43,6) p16 ekspresyonu gösterdi (Tablo 3).

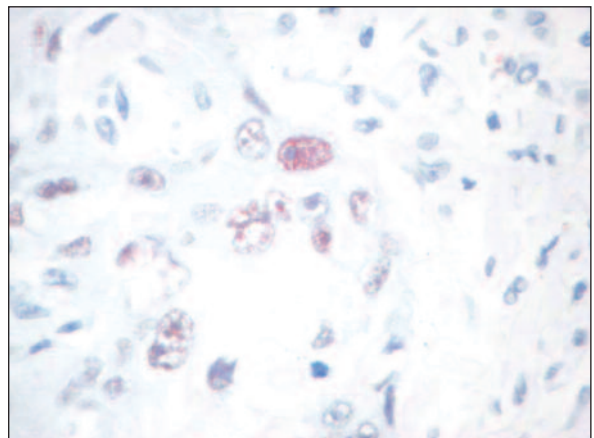
Olguların 21 (%37,5)'inde HPV antijeni mevcut iken (Resim 4), 35 (%62,5)'inde saptanmadı (Tablo 4).

Tümöral p16 ekspresyonunun HPV varlığı ile ilişkisi değerlendirilirken; yoğun zemin boyanması gösteren (yukarıda bahsedilen) 1 olgu değerlendirme dışı tutuldu. Değerlendirme kapsamına alınan olguların 31 (%56,4)'inde tümör alanında p16 negatif olarak saptandı. Altısında (%10,9) fokal pozitif, 18 (%32,7)'inde difüz pozitif saptanan olguların hepsi "p16 pozitif" olarak değerlendirmeye alındı. Böylece toplamda olguların 24 (%43,6)'ünde pozitif olarak saptandı (Tablo 5).

Tümöral p16 ekspresyonunun HPV varlığı ile ilişkisi değerlendirildiğinde; HPV negatif vakalarla pozitif vakalar arasında, tümör dokusunda p16 ekspresyonu açısından anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0,329$).

TABLO 3: Tümördeki p16 ekspresyon oranı.

P16 Ekspresyonu	Sayı	Yüzde
Negatif	31	56,4
Pozitif	24	43,6
Toplam	55	100,0

**RESİM 4:** HPV ile yapılan immünohistokimyasal boyamada difüz p16 ekspresyonu gösteren olguda nükleer HPV pozitifliği (x400).(Renkli hali için Bkz. <http://tipbilimleri.turkiyeklinikleri.com/>)

TABLO 4: Olgularda HPV varlığı oranı.

HPV	Sayı	Yüzde
Negatif	35	62,5
Pozitif	21	37,5
Toplam	56	100,0

HPV: İnsan Papilloma Virüs.

TABLO 5: Tümördeki p16 ekspresyonunun HPV durumuna göre dağılımı.

HPV	p16 ekspresyonu		p değeri
	Negatif (n) (%)	Pozitif (n) (%)	
HPV (-)	18 (%51,4)	17 (%48,6)	0,329
HPV (+)	13 (%65,0)	7 (%35,0)	

HPV: İnsan Papilloma Virüs.

Elli altı adet larinksin yassı epitel hücreli karsinomu olgusunun çoğunda (23 olgu, %41,1) tümöre reaktif mononükleer inflamatuvar yanıt orta derecedeydi. Olguların 18 (%32,1)'inde inflamatuvar yanıt hafif, 8 (%14,3)'inde belirgin derecede izlendi. Yedi (%12,5) olguda inflamatuvar yanıt mevcut değildi. İstatistiksel analiz için inflamatuvar yanıt pozitif ve negatif olarak skorlandı.

Olguların 20 (%36,4)'sinde bölgesel lenf nodu metastazı, 12 (%21,9)'sinde vasküler invazyon, 8 (%14,6)'inde perinöral invazyon, 5 (%9,1)'inde multisentrisite, 30 (%53,6)'unda prekanseröz değişiklikler gözlemlendi.

Çalışmamızda; prognostik parametrelerden lenf nodu metastazı, vasküler invazyon, perinöral invazyon, multisentrisite, inflamatuvar yanıt parametreleri ile p16 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki olup olmadığına bakıldı ancak p16 ekspresyonu ile bahsedilen prognostik parametreler arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmadı (Tablo 6).

TARTIŞMA

p16 proteini, 9. kromozomun kısa kolunun 21. bölgesinde yer alan CDKN2A'nın (MTS-1, INK4A) kodladığı tümör baskılayıcı bir gen ürünüdür. Pek çok insan kanserinde mutasyon, delesyon veya hipermetilasyon yoluyla inaktivasyonu yaygın olarak görülmektedir. p16, Rb sinyal yolağının önemli bir üyesidir ve Rb, p16 tarafından aktive edilir.^{14,19,21,31,34}

Pankreas adenokarsinomları, malign melanomlar, özofagusun yassı epitel hücreli karsinomları, astrositomlar, over karsinomları, akciğer karsinomları, bazı lösemi ve lenfomalarda CDKN2A geninde delesyon, mutasyon ya da hipermetilasyon ile birlikte p16 ekspresyonunun anlamlı olarak azaldığı ya da tamamen kaybolduğu bildirilmektedir.^{18,34,40-47}

Baş-boyun bölgesi karsinomlarında diğer alanlara göre p16 ekspresyonunda heterojenite izlenmektedir. Gerek larinks, gerek orofarinks ve nazofarinks karsinomlarında yapılan çalışmalar incelendiğinde p16 ekspresyonunun azaldığı olgula-

TABLO 6: Prognostik parametrelerle p16 ekspresyonunun karşılaştırılması.

Prognostik parametre		p16 ekspresyonu		p değeri
		Negatif (n) (%)	Pozitif (n) (%)	
Lenf nodu metastazı	Var	8 (%14,6)	12 (%21,8)	0,064
	Yok	23 (%41,8)	12 (%21,8)	
Damar invazyonu	Var	4 (%7,3)	8 (%14,6)	0,101*
	Yok	27 (%49,1)	16 (%29,1)	
Perinöral invazyon	Var	5 (%9,1)	3 (%5,5)	1,000*
	Yok	26 (%47,2)	21 (%38,2)	
Multisentrisite	Var	2 (%3,6)	3 (%5,5)	0,643*
	Yok	29 (%52,7)	21 (%38,2)	
Tümöre karşı inflamatuvar yanıt	Var	26 (%47,2)	22 (%40,1)	0,451*
	Yok	5 (%9,1)	2 (%3,6)	

* Fisher'in kesin ki-kare testine göre hesaplanmıştır.

rın yanında bazı olgularda ekspresyon artışı gözlenmektedir.^{48,49} Tüm baş-boyun bölgesi karsinomlarında HPV varlığı ortalama %20 oranında (örneğin dil %18, farinks %13) bildirilmekte olup, bu oran tonsil karsinomlarında %29-60 civarındadır.^{39,50} Wittekindt ve ark. Klausmann ve ark., servikal yassı epitel hücreli karsinomlardaki bu durumdan yola çıkarak yaptıkları ayrı ayrı çalışmalarda, tonsiller karsinomların %56'sında p16 ekspresyonunun arttığını saptamışlardır.^{39,51} Aynı çalışmalarda olguların %53'ünde HPV varlığı söz konusu olup, HPV-pozitif olguların %89'unda difüz p16 ekspresyonu izlenmiştir. Larinks karsinomlarında ise HPV varlığı için %22-83 arasında değişen oranlar verilmektedir.^{7,29,31-33} Larinks karsinomlarında serviks ve tonsil karsinomlarında saptanan HPV-p16 ilişkisi mevcut mudur?

2011 yılında yayınlanan bir literatür inceleminde; geçmişte yapılan çalışmaların sonuçlarında yaklaşık olarak ortalama %25 oranında HPV pozitifliği saptanmıştır.³² Güncel iki makalede ise larinkeste p16 ekspresyonu araştırılmıştır.^{52,53} İlk çalışmada 24 adet laringeal karsinom vakasının %58'inde p16 ekspresyonu saptanmış, bu vakalarda HPV varlığı kromojen in situ hibridizasyon ile %100 korelasyon göstermiştir. Baumann ve ark.nın 2009'da yaptığı çalışmada 38 erken laringeal karsinom (T1 veya karsinoma in situ) olgusunun 6 (%16)'sında tümör alanında polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tekniği HPV pozitifliği saptanmış, 6 tümörün 5'inde immünohistokimyasal olarak p16 çalışılabilmiş ve %100 p16 ekspresyonu saptanmıştır.

Biz çalışmamızda larinks karsinomlarında p16 ekspresyonunu ve HPV'nin birlikteliğini araştırdık. Çalışmamızda 56 olgunun 24 (%43,6)'ünde p16 pozitifliği, 21 (%37,5)'inde HPV pozitifliği saptanmış olup, HPV varlığı ile p16 ekspresyonu arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (p=0,329).

Çalışmamızda immünohistokimyasal yöntem ile kokteyl HPV antikoru ve yüksek riskli grupta HPV16/18 uygulanmış ancak HPV16/18 ile nonspesifik boyanma elde edildiğinden bu sonuçlar değerlendirmeye alınmamıştır. Kokteyl antikor tüm HPV tiplerini içermektedir ve immünohistokimyasal yöntem ile teknik olarak güçlüklerle boyanma

elde edilebilmektedir. Bu nedenle; gerçekte pozitif olan bir kısım olguda teknik olarak boyanma elde edilememesi bir neden olabilir. Ayrıca çoğu HPV enfeksiyonu geçicidir ve HPV DNA'sının yokluğu dahi, daha önceden HPV enfeksiyonunun var olmadığını kesin olarak göstermez. Zıt olarak, HPV 6 ve 11 gibi larinks lezyonlarında yüksek oranda saptanan ancak E7 proteini içermediğinden bahsedilen mekanizmalar ile p16 aşırı ekspresyonuna neden olmayan düşük riskli virüslerin varlığı anlamlı sonuç elde edilmesini engellemiş olabilir.

Baş-boyun kanserlerinde anatomik lokalizasyona göre p16 ekspresyonu ile ilgili 2011 yılında yapılan bir çalışmada Tamas ve ark. farklı anatomik lokalizasyonlarda ortaya çıkan baş-boyunun yassı epitel hücreli karsinomlarında p16 ekspresyonunu araştırdılar.⁵⁴ Sonuçta supraglottik, tonsiller, tonsillolinguall yassı epitel hücreli karsinomlarında p16 ekspresyonunu, oral kavite, tonsil harici orofarinks, supraglottis harici larinks ve hipofarinkse göre belirgin artmış olarak gözlediler. p16 pozitivitesi oral kavitede %42,9; orofarinkste %50; hipofarinkste %53,8; larinkste ise %48,1 olarak izlendi. Larinkste bu pozitivitenin büyük bölümünü supraglottik kanserler oluşturmaktaydı.

Tamas ve ark.nın yaptığı çalışmada larinksin kendi içinde anatomik lokalizasyonuna göre p16 ekspresyonuna bakıldığında, supraglottik karsinomların %72'sinde, glottik karsinomların %39'unda, transglottiklerin ise %31'inde pozitivite saptanmıştır.

Tamas ve ark.nın yaptığı çalışmada 79 olgudan 38'inde p16 ekspresyonu mevcut olup pozitiflik oranı %48'dir. Bizim çalışmamızda 55 olgudan 24'ünde pozitiflik mevcut olup bu oran %43,6'dır.

Bahsedilen çalışmada 79 olgudan 25'i supraglottik olup oranı %32'dir. Çalışmada larinksteki pozitivitenin büyük kısmını supraglottik karsinomlar oluşturmaktadır. p16 pozitivitesinin %47,3'sini supraglottik lokalizasyon oluşturmaktadır. Bizim çalışmamızda 55 olgunun 22'si supraglottik olup oranı %39,3'tür.

Bulgularımızın benzerliği nedeniyle biz de çalışmamızdaki p16 pozitifliğinin kaynağının esas olarak supraglottik bölge karsinomları olduğu şeklinde değerlendirdik.

Yapılan bu çalışma baş-boyunda yapılan birçok çalışmadaki farklı sonuçların çıkmasını anlamamıza yardımcı oldu. Buna karşılık p16 protein ekspresyonunun kaybı, sigara ve alkole bağlı baş-boyun kanserlerinde en sık ve erken görülen bulgudur.^{49,55,56} Sigara ve alkole ilişkili baş-boyun kanserlerinde p16 proteininde azalma ve p53 gen mutasyonu söz konusudur. Oysa HPV ile ilişkili kanserlerde p16 proteininde artış söz konusudur.

Bizim çalışmamızda ve benzer çalışmalarda p16 ile boyanmayan yani p16 ekspresyon kaybı olan olguların çoğu glottik ve transglottik yerleşimli olan tümörlerdir. Çalışmamızda p16 ekspresyon kaybı gösteren bu vakalarımızın karsinogenezin HPV-ilişkili yolağında değil sigara-alkole ilişkili yolağında geliştiği düşünülmektedir.

HPV ile ilişkili baş-boyun kanserlerinde p16 ekspresyonunda artış söz konusudur. Bu artış onkogenik HPV enfeksiyonunun göstergesidir ve daha iyi prognoza sahiptir.^{39,57-60} HPV-pozitif baş-boyun kanserlerinin histolojisi çoğunlukla az diferansiyedir, bazaloid morfolojiye sahiptir.^{50,61} HPV-negatif tümörlere göre HPV-pozitif tümörlerde sigara ve alkol tüketimi daha azdır.^{30,58,62} Radyoterapiye cevap daha iyidir.^{49,60,63-65}

Lindel ve ark. orofarinksin HPV-pozitif yassı hücreli karsinomlarının diğerlerine göre radyoterapiye daha duyarlı ve dolayısıyla daha iyi prognozlu olduklarını bildirmişlerdir.⁶⁶ Wittekindt ve ark.nın çalışması da tonsiller karsinomlarda benzer bulguları sunmaktadır.⁵¹ Tüm bunlar HPV-pozitif tümörlerin heterojen bir grup olan baş-boyun kanserlerinde ayrı bir antite olduğuna işaret etmektedir.

Farshadpour ve ark. yaptıkları bir çalışmada iki farklı grupta yaş, cinsiyet, tümör lokalizasyonu, tümör evresini eşit tutarak sigara-alkol tüketen 16 hasta ile hiç tüketmeyen 16 hastayı karşılaştırdı.⁶⁷ Sigara ve alkol tüketmeyen hasta grubunda HPV-DNA pozitivitesi baskın şekilde (%86'sında) mevcuttu. Aynı çalışmada HPV-pozitif tümörler daha önce yapılan çalışmalara paralel olarak bazaloid özellikte olup non-keratinize idi.^{30,62} Yine yapılan diğer çalışmaların sonuçlarıyla paralel olarak sağ-kalım süresi daha iyi idi.^{38,50,64,65}

HPV ile ilişkili baş-boyun kanserleri kemoterapi ve radyoterapiye de daha iyi yanıt vermektedir.⁶⁸ Bu nedenle HPV-pozitif baş-boyun kanserlerinin tespiti bu açıdan da önemlidir. Sonuç olarak orofaringeal tümörlerde özellikle sigara-alkol öyküsü olmayan lezyonlarda güçlü bir HPV birlikteliği vardır. HPV ile ilişkili baş-boyun kanserleri heterojen baş-boyun kanserleri içinde ayrı bir antitedir. Bu grubun tanınması tedavi açısından da önemlidir.

Baş-boyun bölgesi karsinomlarında p16 ekspresyonunun prognoz ile ilişkisi hakkında Wittekindt ve ark.nın çalışmasında p16 ekspresyon artışı ile hastalıksız yaşam arasında önemli derecede korelasyon olduğuna dikkat çekilmektedir.⁵¹ Geisler ve ark.nın 190 baş-boyun bölgesi karsinomu dahil ettikleri çalışmalarında ise, p53 kötü prognoz ile korelasyon göstermekte iken, p16 ekspresyonunun prognoz ile ilişkisi olmadığı bildirilmektedir.⁶⁹

Çalışmamızda; prognostik parametrelerden lenf nodu metastazı, vasküler invazyon, perinöral invazyon, multisentrisite, inflamatuvar yanıt gibi parametreler ile p16 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır.

HPV-ilişkili baş-boyun kanserlerinin ayrı bir klinik ve biyolojik antite olduğu yapılan çalışmalarla tespit edildi.^{5,30,50} Bu tümörlerin kemoterapi ve radyoterapiye daha iyi yanıt vermesi, tespit edilebilmelerinin olağanüstü önemini ortaya koymuştur. HPV-ilişkili tümörlerin tespitinde rutin patoloji laboratuvarlarında kolaylıkla kullanılacak bir belirteç bulunursa, servikal karsinomları önleyici olarak kullanılan HPV aşılara benzer şekilde baş-boyun kanserleri için de bağışıklık sistemine yönelik tedaviler denenebilir.

HPV-ilişkili tümörler için HPV belirteci olarak PCR ve HPV DNA ve E6/E7 messenger RNA (mRNA) belirleyici olarak in situ hybridization (ISH) kullanılan metodlardır. Sensitivitesi en yüksek metod PCR olmakla birlikte rutin patoloji laboratuvarlarında uygulanması zordur. Viral DNA veya mRNA'nın PCR ile tespiti; tümör hücrelerinde olduğunu göstermez. Pahalıdır ve çok fazla sensitif olduğu için kolayca kontamine olup yanlış

pozitif sonuç verebilmektedir. HPV; ISH tekniğinde tümör nükleusunda gösterilir, rutin patoloji laboratuvarlarında uygulanması nispeten daha kolaydır ancak sensitivitesi daha düşüktür ve pahalıdır.

HPV-ilişkili tümörler için immünohistokimyasal olarak p16 proteininin gösterilmesi, rutin patoloji laboratuvarlarında kolayca uygulanabilen, tümörlü dokuda çalışılabilen, değerlendirmesi daha kolay, daha ucuz bir metod olacaktır.

Larinksin yassı epitel hücreli karsinomları, embriyolojik, etyolojik ve benzeri açılardan yeniden ele alınmalı, ayrı bir antite olduğu düşünülen HPV ile ilişkili karsinomlar iyi tanımlanmalıdır. Böylece serviksın yassı epitel hücreli karsinomlarında olduğu gibi, p16 işaretleyicisi ve teknik olarak basit olan immünohistokimyasal yöntem, uygulaması zor ve pahalı olan yüksek riskli HPV tespit yöntemlerinin (ISH, PCR) yanında daha çok yerini alabilecek gibi görünmektedir.

KAYNAKLAR

- Muñoz N. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *J Clin Virol* 2000;19(1-2):1-5.
- Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999;189(1):12-9.
- Ries LAG, Eisner MP, Kosary CL, Hankey BF, Miller BA, Clegg L, et al. SEER Cancer Statistics Review. National Cancer Institute. Bethesda, MD: National Cancer Institute 2003. p.1975-2000.
- Haraf DJ, Nodzenski E, Brachman D, Mick R, Montag A, Graves D, et al. Human papilloma virus and p53 in head and neck cancer: clinical correlates and survival. *Clin Cancer Res* 1996;2(4):755-62.
- Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KF, Hoffman HT, Wang DH, Haugen TH, et al. Human papillomavirus in oral exfoliated cells and risk of head and neck cancer. *J Natl Cancer Inst* 2004;96(6):449-55.
- zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002;2(5):342-50.
- Duray A, Descamps G, Arafa M, Deaestecker C, Rémelink M, Sirtaine N, et al. High incidence of high-risk HPV in benign and malignant lesions of the larynx. *Int J Oncol* 2011;39(1):51-9.
- Altun Z, Yarkin F, Vardar MA, Oğuz H. [The prevalence of Human Papilloma virus infection among woman who admitted to Çukurova University Faculty of Medicine Hospital]. *Turkiye Klinikleri J Med Sci* 2011;31(2): 307-14.
- Heilmann V, Kreienberg R. Molecular biology of cervical cancer and its precursors. *Curr Womens Health Rep* 2002;2(1):27-33.
- Unger ER, Vernon SD, Thoms WW, Nisenbaum R, Spann CO, Horowitz IR, et al. Human papillomavirus and disease-free survival in FIGO stage Ib cervical cancer. *J Infect Dis* 1995;172(5):1184-90.
- Wright TC Jr, Denny L, Kuhn L, Pollack A, Lorincz A. HPV DNA testing of self-collected vaginal samples compared with cytologic screening to detect cervical cancer. *JAMA* 2000; 283(1):81-6.
- Bleul C, Müller M, Frank R, Gausepohl H, Koldovsky U, Mgaya HN, et al. Human papillomavirus type 18 E6 and E7 antibodies in human sera: increased anti-E7 prevalence in cervical cancer patients. *J Clin Microbiol* 1991;29(8):1579-88.
- Montalvo MT, Lobato I, Villanueva H, Borquez C, Navarrete D, Abarca J, et al. Prevalence of human papillomavirus in university young women. *Oncol Lett* 2011;2(4):701-6.
- Klaes R, Benner A, Friedrich T, Ridder R, Herrington S, Jenkins D, et al. p16INK4a immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2002;26(11):1389-99.
- Wong YF, Cheung TK, Chung TKH, Chan MKM, Chang AMZ. Expression of p16INK4a and Rb genes in cervical neoplasia. *J Lower Genital Tract Dis* 1997;1(1):240-4.
- Lu X, Toki T, Konishi I, Nikaido T, Fujii S. Expression of p21WAF1/CIP1 in adenocarcinoma of the uterine cervix: a possible immunohistochemical marker of a favorable prognosis. *Cancer* 1998;82(12):2409-17.
- Sano T, Oyama T, Kashiwabara K, Fukuda T, Nakajima T. Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. *Am J Pathol* 1998;153(6): 1741-8.
- Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U, et al. Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer* 2001;92(2):276-84.
- Milde-Langosch K, Riethdorf S, Kraus-Pöppinghaus A, Riethdorf L, Löning T. Expression of cyclin-dependent kinase inhibitors p16MTS1, p21WAF1, and p27KIP1 in HPV-positive and HPV-negative cervical adenocarcinomas. *Virchows Arch* 2001;439(1):55-61.
- Sano T, Masuda N, Oyama T, Nakajima T. Overexpression of p16 and p14ARF is associated with human papillomavirus infection in cervical squamous cell carcinoma and dysplasia. *Pathol Int* 2002;52(5-6):375-83.
- Saqi A, Pasha TL, McGrath CM, Yu GH, Zhang P, Gupta P. Overexpression of p16INK4A in liquid-based specimens (SurePath) as marker of cervical dysplasia and neoplasia. *Diagn Cytopathol* 2002;27(6):365-70.
- Negri G, Egarter-Vigl E, Kasal A, Romano F, Haitel A, Mian C. p16INK4a is a useful marker for the diagnosis of adenocarcinoma of the cervix uteri and its precursors: an immunohistochemical study with immunocytochemical correlations. *Am J Surg Pathol* 2003;27(2): 187-93.
- Agoff SN, Lin P, Morihara J, Mao C, Kiviat NB, Koutsky LA. p16(INK4a) expression correlates with degree of cervical neoplasia: a comparison with Ki-67 expression and detection of high-risk HPV types. *Mod Pathol* 2003;16(7): 665-73.
- Volgareva G, Zavalishina L, Andreeva Y, Frank G, Krutikova E, Golovina D, et al. Protein p16 as a marker of dysplastic and neoplastic alterations in cervical epithelial cells. *BMC Cancer* 2004;4:58.
- Murphy N, Ring M, Killalea AG, Uhlmann V, O'Donovan M, Mulcahy F, et al. p16INK4A as a marker for cervical dyskaryosis: CIN and cGIN in cervical biopsies and ThinPrep smears. *J Clin Pathol* 2003;56(1):56-63.

26. Andl T, Kahn T, Pfuhl A, Nicola T, Erber R, Conrad C, et al. Etiological involvement of oncogenic human papillomavirus in tonsillar squamous cell carcinomas lacking retinoblastoma cell cycle control. *Cancer Res* 1998;58(1):5-13.
27. Sherr CJ, McCormick F. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* 2002;2(2):103-12.
28. Wiest T, Schwarz E, Enders C, Flechtenmacher C, Bosch FX. 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(10):1510-7.
29. Alani RM, Mürner KS. Human papillomaviruses and associated malignancies. *J Clin Oncol* 1998;16(1):330-7.
30. Gillison ML, D'Souza G, Westra W, Sugar E, Xiao W, Begum S, et al. Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* 2008;100(6):407-20.
31. Smith EM, Summersgill KF, Allen J, Hoffman HT, McCulloch T, Turek LP, et al. Human papillomavirus and risk of laryngeal cancer. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2000;109(11):1069-76.
32. Torrente MC, Rodrigo JP, Haigentz M Jr, Dikkers FG, Rinaldo A, Takes RP, et al. Human papillomavirus infections in laryngeal cancer. *Head Neck* 2011;33(4):581-6.
33. Nadal A, Cerdasa A. Molecular biology of laryngeal squamous cell carcinoma. *Virchows Arch* 2003;442(1):1-7.
34. Smigiel R, Sasiadek M, Krecicki T, Ramsey D, Jagielski J, Blin N. Inactivation of the cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2A) gene in squamous cell carcinoma of the larynx. *Mol Carcinog* 2004;39(3):147-54.
35. Rady PL, Schnadig VJ, Weiss RL, Hughes TK, Tying SK. Malignant transformation of recurrent respiratory papillomatosis associated with integrated human papillomavirus type 11 DNA and mutation of p53. *Laryngoscope* 1998;108(5):735-40.
36. Laco J, Slaninka I, Jirásek M, Celakovský P, Vosmiková H, Ryska A. High-risk human papillomavirus infection and p16INK4a protein expression in laryngeal lesions. *Pathol Res Pract* 2008;204(8):545-52.
37. Fregonesi PA, Teresa DB, Duarte RA, Neto CB, de Oliveira MR, Soares CP. p16(INK4a) immunohistochemical overexpression in premalignant and malignant oral lesions infected with human papillomavirus. *J Histochem Cytochem* 2003;51(10):1291-7.
38. Papadimitrakopoulou V, Izzo J, Lippman SM, Lee JS, Fan YH, Clayman G, et al. Frequent inactivation of p16INK4a in oral premalignant lesions. *Oncogene* 1997;14(15):1799-803.
39. Klussmann JP, Gültekin E, Weissenborn SJ, Wieland U, Dries V, Dienes HP, et al. Expression of p16 protein identifies a distinct entity of tonsillar carcinomas associated with human papillomavirus. *Am J Pathol* 2003;162(3):747-53.
40. Nielsen GP, Stemmer-Rachamimov AO, Shaw J, Roy JE, Koh J, Louis DN. Immunohistochemical survey of p16INK4A expression in normal human adult and infant tissues. *Lab Invest* 1999;79(9):1137-43.
41. Caldas C, Hahn SA, da Costa LT, Redston MS, Schutte M, Seymour AB, et al. Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 (MTS1) gene in pancreatic adenocarcinoma. *Nat Genet* 1994;8(1):27-32.
42. Hussussian CJ, Struewing JP, Goldstein AM, Higgins PA, Ally DS, Sheahan MD, et al. Germline p16 mutations in familial melanoma. *Nat Genet* 1994;8(1):15-21.
43. Mori T, Miura K, Aoki T, Nishihira T, Mori S, Nakamura Y. Frequent somatic mutation of the MTS1/CDK4I (multiple tumor suppressor/cyclin-dependent kinase 4 inhibitor) gene in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 1994;54(13):3396-7.
44. Cairns P, Polascik TJ, Eby Y, Tokino K, Califano J, Merlo A, et al. Frequency of homozygous deletion at p16/CDKN2 in primary human tumours. *Nat Genet* 1995;11(2):210-2.
45. Walker DG, Duan W, Popovic EA, Kaye AH, Tomlinson FH, Lavin M. Homozygous deletions of the multiple tumor suppressor gene 1 in the progression of human astrocytomas. *Cancer Res* 1995;55(1):20-3.
46. Kanuma T, Nishida J, Gima T, Barrett JC, Wake N. Alterations of the p16INK4A gene in human ovarian cancers. *Mol Carcinog* 1997;18(3):134-41.
47. Belinsky SA, Nikula KJ, Palmisano WA, Michels R, Saccomanno G, Gabrielson E, et al. Aberrant methylation of p16(INK4a) is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(20):11891-6.
48. Şahin F, Taşpınar M, Sunguroğlu A. [Molecular pathogenesis of pancreatic cancer: Review]. *Turkiye Klinikleri J Med Sci* 2007;27(4):560-6.
49. Reed AL, Califano J, Cairns P, Westra WH, Jones RM, Koch W, et al. High frequency of p16 (CDKN2/MTS-1/INK4A) inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 1996;56(16):3630-3.
50. Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, et al. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* 2000;92(9):709-20.
51. Wittekindt C, Gültekin E, Weissenborn SJ, Dienes HP, Pfister HJ, Klussmann JP. Expression of p16 protein is associated with human papillomavirus status in tonsillar carcinomas and has implications on survival. *Adv Otorhinolaryngol* 2005;62:72-80.
52. Laco J, Slaninka I, Jirásek M, Celakovský P, Vosmiková H, Ryska A. High-risk human papillomavirus infection and p16INK4a protein expression in laryngeal lesions. *Pathol Res Pract* 2008;204(8):545-52.
53. Baumann JL, Cohen S, Evjen AN, Law JH, Vadivelu S, Attia A, et al. Human papillomavirus in early laryngeal carcinoma. *Laryngoscope* 2009;119(8):1531-7.
54. Tamás L, Szentkúti G, Eros M, Dános K, Brauswetter D, Szende B, et al. Differential biomarker expression in head and neck cancer correlates with anatomical localization. *Pathol Oncol Res* 2011;17(3):721-7.
55. Scully C, Field JK, Tanzawa H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN): 1. Carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control. *Oral Oncol* 2000;36(3):256-63.
56. Pande P, Mathur M, Shukla NK, Ralhan R. pRb and p16 protein alterations in human oral tumorigenesis. *Oral Oncol* 1998;34(5):396-403.
57. Hafkamp HC, Speel EJ, Haesevoets A, Bot FJ, Dinjens WN, Ramaekers FC, et al. A subset of head and neck squamous cell carcinomas exhibits integration of HPV 16/18 DNA and overexpression of p16INK4A and p53 in the absence of mutations in p53 exons 5-8. *Int J Cancer* 2003;107(3):394-400.
58. Hafkamp HC, Manni JJ, Haesevoets A, Voogd AC, Schepers M, Bot FJ, et al. Marked differences in survival rate between smokers and nonsmokers with HPV 16-associated tonsillar carcinomas. *Int J Cancer* 2008;122(12):2656-64.
59. Weinberger PM, Yu Z, Haffty BG, Kowalski D, Harigopal M, Sasaki C, et al. Prognostic significance of p16 protein levels in oropharyngeal squamous cell cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10(17):5684-91.
60. Hafkamp HC, Manni JJ, Speel EJ. Role of human papillomavirus in the development of head and neck squamous cell carcinomas. *Acta Otolaryngol* 2004;124(4):520-6.
61. Gillison ML, D'Souza G, Westra W, Sugar E, Xiao W, Begum S, et al. Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* 2008;100(6):407-20.
62. Tachezy R, Klozar J, Saláková M, Smith E, Turek L, Betka J, et al. HPV and other risk factors of oral cavity/oropharyngeal cancer in the Czech Republic. *Oral Dis* 2005;11(3):181-5.
63. Fakhry C, Gillison ML. Clinical implications of human papillomavirus in head and neck cancers. *J Clin Oncol* 2006;24(17):2606-11.

64. Lassen P, Eriksen JG, Hamilton-Dutoit S, Tramm T, Alsner J, Overgaard J. Effect of HPV-associated p16INK4A expression on response to radiotherapy and survival in squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol* 2009;27(12):1992-8.
65. Ritchie JM, Smith EM, Summersgill KF, Hoffman HT, Wang D, Klusmann JP, et al. Human papillomavirus infection as a prognostic factor in carcinomas of the oral cavity and oropharynx. *Int J Cancer* 2003; 104(3):336-44.
66. Lindel K, Beer KT, Laissue J, Greiner RH, Aebbersold DM. Human papillomavirus positive squamous cell carcinoma of the oropharynx: a radiosensitive subgroup of head and neck carcinoma. *Cancer* 2001;92(4):805-13.
67. Farshadpour F, Konings S, Speel EJ, Hordijk GJ, Koole R, van Blokland M, et al. Human Papillomavirus and Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma: A Case-Control Study regarding Tobacco and Alcohol Consumption. *Patholog Res Int* 2011;2011:806345. Doi: 10.4061/2011/806345.
68. Worden FP, Kumar B, Lee JS, Wolf GT, Cordell KG, Taylor JM, et al. Chemoselection as a strategy for organ preservation in advanced oropharynx cancer: response and survival positively associated with HPV16 copy number. *J Clin Oncol* 2008;26(19):3138-46.
69. Geisler SA, Olshan AF, Weissler MC, Cai J, Funkhouser WK, Smith J, et al. p16 and p53 Protein expression as prognostic indicators of survival and disease recurrence from head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 2002;8(11): 3445-53.