

Καρκίνος του λάρυγγα

Καρκινογένεση και νεότεροι προγνωστικοί δείκτες

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΒΛΑΧΤΣΗΣ

Επιστημονικός Συνεργάτης Α΄ Πανεπιστημιακής ΩΡΛ Κλινικής Νοσοκομείου ΑΧΕΠΑ

Πολλοί παράγοντες επηρεάζουν την πρόγνωση στον εξαιρεσίμο χειρουργικά καρκίνο του λάρυγγα από πλακώδες επιθήλιο. Διάφορα κλινικά στοιχεία έχουν ενοχοποιηθεί για την εμφάνιση υποτροπής του όγκου και τη μειωμένη επιβίωση των ασθενών. Επιπρόσθετα, η ανάπτυξη της μοριακής βιολογίας και η γνώση που αποκτάται σχετικά με τη διαδικασία της καρκινογένεσης προσέθεσαν νέες παραμέτρους στη διερεύνηση προγνωστικών δεικτών.

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να διερευνήσει τα δημογραφικά, κλινικά και ιστολογικά χαρακτηριστικά ως προγνωστικούς παράγοντες. Επιπλέον, σκοπός είναι και η διερεύνηση των νεότερων μοριακών δεικτών ως προγνωστικών δεικτών στον καρκίνο του λάρυγγα.

Εκατό ασθενείς με εξαιρεσίμο χειρουργικά καρκίνωμα του λάρυγγα από πλακώδες επιθήλιο υποβλήθηκαν σε χειρουργική επέμβαση ως πρώτη θεραπεία μεταξύ Απριλίου 1999 και Απριλίου 2002. Ενενήντα τέσσερις από τους ασθενείς ήταν άνδρες και 6 ήταν γυναίκες με διάμεση ηλικία τα 62 έτη (39-77). Έγινε καταγραφή των δημογραφικών στοιχείων των ασθενών. Η σταδιοποίηση των νεοπλασμάτων έδειξε 20 περιπτώσεις με όγκο σταδίου T2, 46 σταδίου T3 και 34 σταδίου T4, ενώ η ταξινόμηση κατά N έδειξε 91 ασθενείς σταδίου N0, 3 σταδίου N1 και 6 σταδίου N2. Ανάλογα με την εντόπιση του όγκου στους 100 ασθενείς, καταγράφηκαν 47 γλωττιδικά νεοπλάσματα, 46 υπεργλωττιδικά και 7 διαγλωττιδικά. Σύμφωνα με την ιστολογική διαφοροποίηση του καρκινώματος καταγράφηκαν 35 περιπτώσεις βαθμού G1, 50 G2 και 15 G3. Μετεχειρητικά, όλοι οι ασθενείς εξετάστηκαν σε τακτά χρονικά διαστήματα για την πιθανότητα εμφάνισης υποτροπής του όγκου και για τη συνολική τους επιβίωση, με μέσο χρόνο παρακολούθησης 40,2 μήνες (4,8-58,4 μήνες). Κατά τη διάρκεια της επέμβασης εξαιρέθηκε και διατηρήθηκε

σε βαθιά κατάψυξη ένα ιστοτεμάχιο από κάθε νεόπλασμα με σκοπό την εξαγωγή DNA και RNA. Το RNA χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση της έκφρασης των γονιδίων wt-p53, bcl-2, EGFR και VEGF σε όλους τους ιστούς με τη μέθοδο RT-PCR. Το DNA χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση του γονιδιώματος των ιών HPV (υπότυποι 16/18) και EBV σε 90 ιστούς, με τη μέθοδο PCR και χρήση κατάλληλων εκκινητών. Όλα τα στοιχεία αναλύθηκαν στατιστικά με τα στατιστικά πακέτα SPSS και STATA. Εξετάστηκαν ως προγνωστικοί δείκτες όλα τα δημογραφικά, κλινικά και ιστολογικά στοιχεία καθώς και οι μοριακοί δείκτες και οι συνδυασμοί τους.

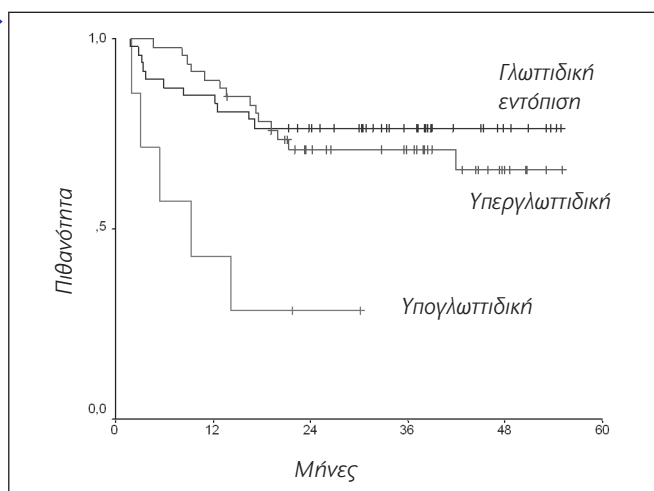
Υποτροπή του όγκου εμφανίστηκε στο 31% των ασθενών, ενώ το 30% των ασθενών απεβίωσε (27% απεβίωσαν λόγω του νεοπλάσματος). Η μονοπαραγοντική ανάλυση για τη συνολική επιβίωση έδειξε σημαντικότητα για το στάδιο T, το στάδιο TNM και την εντόπιση του όγκου. Για την εμφάνιση υποτροπής η μονοπαραγοντική ανάλυση έδειξε σημαντικότητα, εκτός από τους παραπάνω παράγοντες, για το στάδιο N και για την ταυτόχρονη θετική ανίχνευση των EGFR και VEGF, ενώ ο παράγοντας EGFR ήταν οριακά μη σημαντικός. Η πολυπαραγοντική ανάλυση για τη συνολική επιβίωση έδειξε σημαντικότητα μόνο για το στάδιο TNM του όγκου, ενώ για την εμφάνιση υποτροπής σημαντικότητα είχαν, εκτός του σταδίου TNM, η εντόπιση του όγκου και η θετική έκφραση του EGFR.

Εκτός από τους γνωστούς δυσμενείς προγνωστικούς κλινικούς παράγοντες όπως το στάδιο και η εντόπιση του νεοπλάσματος, συμπεραίνεται ότι και οι μοριακοί δείκτες EGFR και VEGF έχουν προγνωστική σημασία στο καρκίνωμα του λάρυγγα. Οι ογκοπρωτεΐνες αυτές φαίνεται ότι εκτός από το ρόλο τους στην καρκινογένεση, επηρεάζουν και την πρόγνωση των ασθενών.

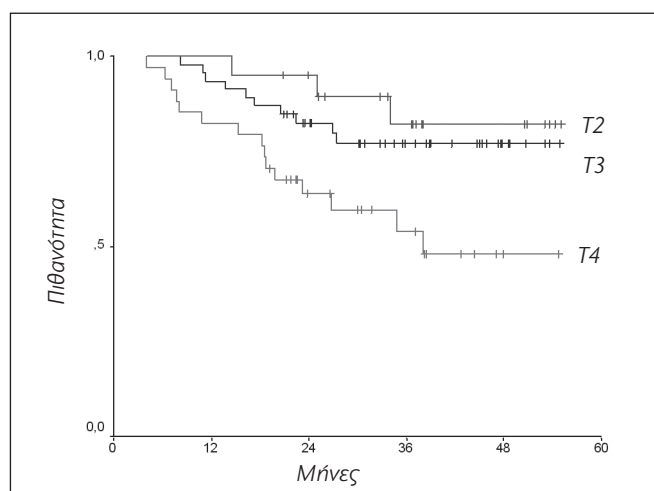
Λέξεις κλειδιά: καρκίνος λάρυγγα, προγνωστικοί παράγοντες, καρκινογένεση, ογκογονίδια, ογκογόνοι ιοί, p-53, bcl-2, EGFR, VEGF, HPV, EBV.

Εισαγωγή

Ο καρκίνος του λάρυγγα αποτελεί το 4% των κακοήθων όγκων του ανθρώπου συνολικά, ενώ σε σχέση με τους όγκους της περιοχής κεφαλής και τραχήλου το ποσοστό του ξεπερνά το 50%. Το συχνότερο κακόηθες νεόπλασμα του λάρυγγα είναι το καρκίνωμα από πλακώδες επιθήλιο, σε ποσοστό που υπερβαίνει το 95%. Η εμφάνιση του καρκινώματος του λάρυγγα είναι αυξημένη στους άνδρες, με συχνότητα περίπου 1:5 στις χώρες της Δυτικής Ευρώπης και την Αμερική. Η αναλογία αυξάνεται υπέρ των γυναικών τα τελευταία χρόνια λόγω της αυξανόμενης συχνότητας του καπνίσματος στις γυναίκες, ενώ στις χώρες που η συνήθεια αυτή δεν είναι διαδεδομένη στις γυναίκες η αναλογία είναι 1:15 υπέρ των ανδρών. Στη χώρα μας εξακολουθεί να αποτελεί σχεδόν αποκλειστικά ανδρική πάθηση, ▶



Εικόνα 1. Kaplan-Meier curve. Επίδραση της εστίας του πρωτοπαθούς όγκου στη συνολική επιβίωση των ασθενών.



Εικόνα 2. Kaplan-Meier curve. Επίδραση του σταδίου T του όγκου στη συνολική επιβίωση των ασθενών.

με αυξανόμενη όμως συχνότητα εμφάνισης τα τελευταία χρόνια και στις γυναίκες. Εμφανίζεται συνήθως την 6η και 7η δεκαετία της ζωής, ενώ είναι σπάνια η ανάπτυξη καρκίνου του λάρυγγα πριν την ηλικία των 35 ετών.

Ο καρκίνος του λάρυγγα αντιμετωπίζεται κυρίως με χειρουργική επέμβαση, ακτινοθεραπεία, χημειοθεραπεία και συνδυασμό των μεθόδων αυτών. Η χημειοθεραπεία μέχρι πρόσφατα είχε ένδειξη στις προχωρημένες στάδια της νόσου, πάντοτε σε συνδυασμό με τη χειρουργική θεραπεία και την ακτινοθεραπεία. Τελευταία όμως βλέπουν το φως της δημοσιότητας μελέτες αντιμετώπισης νεοπλασμάτων T3 και T4 με διατήρηση του λάρυγγα και συνδυασμό ακτινοθεραπείας και χημειοθεραπείας με πολύ καλά αποτελέσματα. Άλλα όπλα στην αντιμετώπιση του καρκίνου του λάρυγγα είναι η χημειοπροφύλαξη με ρετινοειδή για τη μείωση της εμφάνισης υποτροπών, η φωτοδυναμική θεραπεία, καθώς και πρόσφατες επικουρικές μέθοδοι όπως η χρήση αναστολέων της αγγειογένεσης (αναστολείς της κυκλοξυγενάσης, Cox inhibitors, μονοκλωνικά αντισώματα) και η χρήση αναστολέων έναντι του EGFR (αναστολείς κινάσης της τυροσίνης, μονοκλωνικά αντισώματα έναντι του EGFR).

Τα τελευταία χρόνια γίνεται εντατική έρευνα για την αποκωδικοποίηση των μηχανισμών της καρκινογένεσης και της

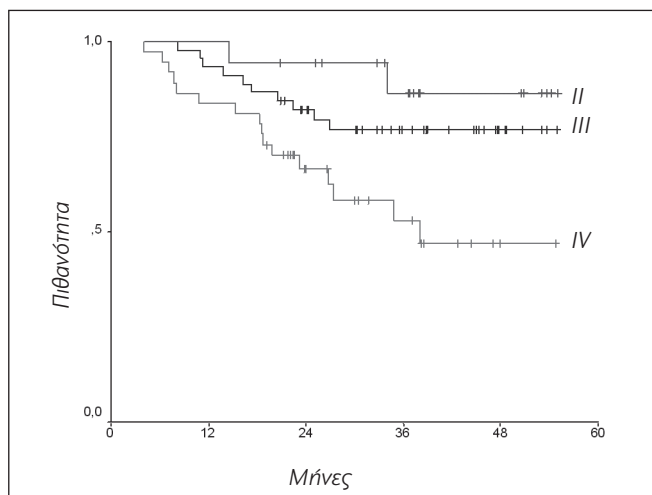
διαλεύκανσης της βιολογίας του καρκίνου. Η έρευνα έχει αποφέρει πλήθος πολύτιμων πληροφοριών πάνω σε διάφορες μορφές ανθρώπινου καρκίνου. Στα πλαίσια αυτά ο καρκίνος του λάρυγγα και γενικότερα τα νεοπλάσματα της περιοχής κεφαλής και τραχήλου αποτέλεσαν αντικείμενο πολλών ερευνητικών μελετών. Κάθε ερευνητική εργασία προσφέρει ένα κομμάτι στο πολυσύνθετο μωσαϊκό της καρκινογένεσης. Η κατανόηση των μηχανισμών και η γνώση που αποκτάται βοηθούν στην καλύτερη αντιμετώπιση της νόσου, στη δημιουργία νέων θεραπευτικών σχημάτων και σε πιο αποτελεσματικές στρατηγικές κατά του καρκίνου. Ήδη την τελευταία δεκαετία άρχισαν να εφαρμόζονται καινούριες μέθοδοι στην καταπολέμηση των νεοπλασμάτων κεφαλής και τραχήλου, λαμβάνοντας υπόψη ότι οι χειρουργικές τεχνικές έχουν παραμείνει σχεδόν αναλλοίωτες τα τελευταία 20 χρόνια.

Η έρευνα έχει εστιαστεί στην ανεύρεση διαφόρων παραγόντων σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο οι οποίοι εμπλέκονται στο μηχανισμό της καρκινογένεσης του λάρυγγα και επηρεάζουν την πρόγνωση τόσο σε αρχικό στάδιο όσο και μετά την πρώτη θεραπεία. Οι παράγοντες αυτοί είναι είτε ογκογονίδια τα οποία ενεργοποιούνται είτε ογκοπροστατευτικά γονίδια τα οποία καταστέλλονται μετά τη δράση καρκινογόνων. Τέτοια γονίδια είναι το p-53, το bcl-2, το EGFR, το VEGF και άλλα. Αυτά τα γονίδια είναι βα-

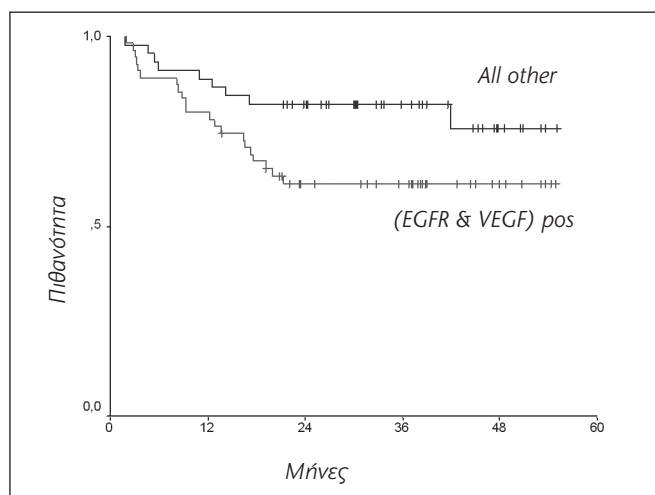
σικοί ρυθμιστές των κυτταρικών ομοιοστατικών και αυξητικών μηχανισμών όπως η απόπτωση και η αγγειογένεση. Επίσης διάφοροι ιοί όπως ο ιός HPV και ο ιός EBV έχουν αποτελέσει αντικείμενο της έρευνας όσον αφορά την ογκογόνο δράση τους και το ρόλο τους στην καρκινογένεση στα καρκινώματα κεφαλής και τραχήλου.

Ασθενείς και μέθοδος

Στην Α΄ Πανεπιστημιακή Ωτορινολαρυγγολογική Κλινική του Νοσοκομείου ΑΧΕΠΑ διεξήχθη ένα ερευνητικό πρωτόκολλο με σκοπό τη διερεύνηση ογκοπρωτεϊνών και ογκογόνων ιών σε ιστοτεμάχια καρκινώματος λάρυγγα. Διερευνηθήκε επίσης η προγνωστική σημασία των μοριακών αυτών παραγόντων. Εκατό ασθενείς με εξαιρεσιμο χειρουργικά καρκίνωμα του λάρυγγα από πλακώδες επιθήλιο υποβλήθηκαν σε χειρουργική επέμβαση ως πρώτη θεραπεία μεταξύ Απριλίου 1999 και Απριλίου 2002. Ενεννίη τέσσερις από τους ασθενείς ήταν άνδρες και 6 ήταν γυναίκες με διάμεση ηλικία τα 62 έτη (39-77). Έγινε καταγραφή των δημογραφικών στοιχείων των ασθενών. Η σταδιοποίηση των νεοπλασμάτων έδειξε 20 περιπτώσεις με όγκο σταδίου T2, 46 σταδίου T3 και 34 σταδίου T4, ενώ η ταξινόμηση κατά N έδειξε 91 ασθενείς σταδίου N0, 3 σταδίου N1 και 6 N2. Ανάλογα με την εντόπιση του όγκου στους 100 ασθενείς, καταγράφηκαν 47 γλωττιδικά νεοπλάσματα, 46 υπεργλωττιδικά και 7



Εικόνα 3. Kaplan-Meier curve. Επίδραση του συνολικού σταδίου κατά TNM στη συνολική επιβίωση των ασθενών.



Εικόνα 4. Kaplan-Meier curve. Επίδραση της ταυτόχρονης έκφρασης των (EGFR & VEGF) στην εμφάνιση υποτροπής του όγκου.

διαγλυπτιδικά. Σύμφωνα με την ιστολογική διαφοροποίηση του καρκινώματος καταγράφηκαν 35 περιπτώσεις βαθμού G1, 50 G2 και 15 G3. Μετεγχειρητικά, όλοι οι ασθενείς εξετάστηκαν σε τακτά χρονικά διαστήματα για την πιθανότητα εμφάνισης υποτροπής του όγκου και για τη συνολική τους επιβίωση, με μέσο χρόνο παρακολούθησης 40,2 μήνες (4,8-58,4 μήνες). Κατά τη διάρκεια της επέμβασης εξαιρέθηκε και διατηρήθηκε σε βαθιά κατάψυξη ένα ιστοτεμάχιο από κάθε νεόπλασμα με σκοπό την εξαγωγή DNA και RNA. Το RNA χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση της έκφρασης των γονιδίων wt-p53, bcl-2, EGFR και VEGF σε όλους τους ιστούς με τη μέθοδο RT-PCR. Το DNA χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση του γονιδιώματος των ιών HPV (υπότυποι 16/18) και EBV σε 90 ιστούς, με τη μέθοδο PCR και τη χρήση κατάλληλων εκκινητών. Όλα τα στοιχεία αναλύθηκαν στατιστικά με τα στατιστικά πακέτα SPSS και STATA. Εξετάστηκαν ως προγνωστικοί δείκτες όλα τα δημογραφικά, κλινικά και ιστολογικά στοιχεία καθώς και οι μοριακοί δείκτες και οι πιθανοί συνδυασμοί τους.

Αποτελέσματα

Τα αποτελέσματα ανίχνευσης των μοριακών δεικτών έδειξαν 14 ιστοτεμάχια θετικά για το wt-p53 (14%), 62 θετικά για το bcl-2 (62%), 92 θετικά για το VEGF (92%) και 62 θετικά για τον παράγοντα EGFR (62%). Το γονι-

δίωμα του ιού EBV ανιχνεύθηκε σε 39 ιστοτεμάχια (43,3%), ενώ του ιού HPV 16/18 σε 36 (40%). Όλα τα νεοπλασματα που ήταν θετικά για τον ιό HPV δεν εξέφραζαν το γονίδιο wt-p53, ενώ το 21,8% των HPV θετικών ιστών εξέφραζε το wt-p53 (πίνακας 1).

Υποτροπή του όγκου εμφανίστηκε στο 31% των ασθενών, ενώ το 30% των ασθενών απεβίωσε (27% απεβίωσαν λόγω του νεοπλασματος). Η μονοπαραγοντική ανάλυση για τη συνολική επιβίωση έδειξε σημαντικότητα για το στάδιο T, το στάδιο TNM και την εντόπιση του όγκου. Για την εμφάνιση υποτροπής η μονοπαραγοντική ανάλυση έδειξε σημαντικότητα, εκτός από τους παραπάνω παράγοντες, για το στάδιο N και για την ταυτόχρονη θετική ανίχνευση των EGFR και VEGF, ενώ ο παράγοντας EGFR ήταν οριακά μη σημαντικός. Η πολυπαραγοντική ανάλυση για τη συνολική επιβίωση έδειξε σημαντικότητα μόνο για το στάδιο TNM του όγκου, ενώ για την εμφάνιση υποτροπής σημαντικότητα είχαν, εκτός του σταδίου TNM, η εντόπιση του όγκου και η θετική έκφραση του EGFR (εικόνες 1, 2, 3, 4, 5). Τα αποτελέσματα αναλύονται περαιτέρω στη συζήτηση.

Συζήτηση

Καρκινογένεση

Η φυσιολογική ανάπτυξη των ιστών και οργανισμών βασίζεται σε ένα πολύ-

πλοκο και ακριβές σύστημα ελέγχου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης. Σύμφωνα με ένα ορισμό από τον Bishop το 1987, η καρκινογένεση δηλαδή η μετατροπή ενός φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό αποτελεί μια γενετική ασθένεια η οποία προέρχεται από γενετική βλάβη που προκαλεί διαταραχή της έκφρασης σημαντικών γονιδίων για την ομαλή αύξηση του κυττάρου. Έτσι, ένα καρκινικό κύτταρο χαρακτηρίζεται από απώλεια των φυσιολογικών μηχανισμών ρύθμισης της αύξησης και πολλαπλασιάζεται συνέχεια με αποτέλεσμα την εμφάνιση όγκου.

Η καρκινογένεση αποτελεί μία πολυσταδιακή διαδικασία και όχι ένα μεμονωμένο γεγονός. Για να μετατραπεί ένα φυσιολογικό κύτταρο σε καρκινικό απαιτούνται μια σειρά από γεγονότα. Η καρκινογένεση επιτελείται σε διαδοχικά στάδια μέχρι την ανάπτυξη του κλινικού καρκίνου ο οποίος μπορεί να εμφανιστεί μετά από δεκαετίες έκθεσης στα καρκινογόνα. Η εμφάνιση και ανάπτυξη ενός κακοήθους όγκου είναι το αποτέλεσμα της αρχικής επίδρασης διαφόρων ενδογενών και εξωγενών καρκινογόνων στο φυσιολογικό κύτταρο. Αποτελεί μια πολυσταδιακή διαδικασία με φάσεις κατά τις οποίες επιδρούν τα ογκογονίδια και τα ογκοκατασταλτικά γονίδια. Επίσης, σε όλες τις φάσεις έως την ανάπτυξη του όγκου, υπάρχουν και προστατευτικοί μηχανισμοί που στις περισσότερες περιπτώσεις επιδιορθώνουν τη γενετική



► βλάβη ή εξολοθρεύουν το νεοπλασματικό κύτταρο. Η διαταραχή αυτής της συνεχούς ισορροπίας ή η ανεπάρκεια των προστατευτικών μηχανισμών οδηγεί στην εμφάνιση του όγκου η οποία μπορεί να εκδηλωθεί μετά από αρκετά χρόνια έκθεσης στα καρκινογόνα.

Εξωγενή καρκινογόνα (χημικά, ιοί)

Στη κατηγορία των χημικών καρκινογόνων, οι σημαντικότεροι παράγοντες που έχουν συσχετιστεί με την εμφάνιση του καρκίνου του λάρυγγα είναι το κάπνισμα και το αλκοόλ και ο ρόλος τους είναι αδιαμφισβήτητος. Για την περιοχή κεφαλής και τραχήλου ιδιαίτερη σημασία στην καρκινογένεση έχουν οι ιοί HPV και EBV και για τους δύο αυτούς ιούς θα γίνει ιδιαίτερη αναφορά.

Ο ιός HPV (Human Papillomavirus ή ιός των θηλωμάτων του ανθρώπου) είναι ένας DNA ιός. Υπάρχουν πολλοί ορότυποι του ιού σε αριθμό που υπερβαίνει τους 50. Οι μη ογκογόνοι ορότυποι του ιού προκαλούν τα οξυτενή κονδυλώματα στην πρωκτογεννητική περιοχή, θηλωμάτωση και τις κοινές μυρμηκίες. Επίσης άλλοι ογκογόνοι ορότυποι έχουν ενοχοποιηθεί για τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας και για καρκινώματα της πρωκτογεννητικής περιοχής. Η δράση του ιού αυτού έχει ενοχοποιηθεί και για καρκινώματα κεφαλής και τραχήλου και μάλιστα κυρίως οι ογκογόνοι ορότυποι 16 και 18. Μετά τη λοίμωξη με τον ιό, το γονιδίωμα του ιού ενσωματώνεται στο κύτταρο ξενιστή και χρησιμοποιώντας τους μεταγραφικούς και πρωτεϊνοσυνθετικούς μηχανισμούς του κυττάρου προκαλεί την παραγωγή δύο βασικών πρωτεϊνών: την E6 και την E7. Οι πρωτεΐνες αυτές εμπλέκονται στο μηχανισμό της απόπτωσης μέσω των ογκοκατασταλτικών γονιδίων p-53, pRb, p-21 waf και έτσι καταστέλλουν τον προστατευτικό αυτό μηχανισμό. Επίσης ενεργοποιούν την τελομεράση, ένα ένζυμο το οποίο μετά την ενεργοποίησή του προκαλεί αθανατοποίηση του κυττάρου μέσω επαναλαμβανόμενης σύνθεσης τελομερών των χρωματοσωμάτων.

Στο καρκίνο του λάρυγγα το ποσοστό ανίχνευσης του ιού (ορότυποι 16 και 18) σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες κυμαίνεται από 22 έως 54%. Ανιχνεύεται επίσης και σε προκαρκινωματώδεις βλά-

βες (ποσοστό 18-42%), καθώς και σε υγιή βλεννογόνο του λάρυγγα (ποσοστό 8-20%). Ενώ αρχικά είχε διατυπωθεί η άποψη ότι ο ιός από μόνος του μπορεί να σχετίζεται με την εμφάνιση καρκινώματος του λάρυγγα, σήμερα υπάρχει και άλλη μία υπόθεση. Η υπόθεση αυτή υποστηρίζει ότι υπάρχει συνεργική δράση του ιού HPV μαζί με το κάπνισμα και το αλκοόλ στην καρκινογένεση.

Ο ιός EBV (Epstein Barr Virus) ανήκει στην ομάδα των ιών του έρπητα. Η ογκογόνος δράση του ιού έχει ανιχνευτεί από χρόνια. Έχει συσχετιστεί με το λέμφωμα του Burkitt, με τη νόσο Hodgkin και με τα καρκινώματα του ρινοφάρυγγα. Μετά τη λοίμωξη με τον ιό και την είσοδό του στο κύτταρο, το γονιδιακό υλικό του κυττάρου επηρεάζεται. Ο ιός επηρεάζει ιδιαίτερα το γενετικό υλικό των Β λεμφοκυττάρων στα οποία εισέρχεται και αλλιώνει τον προστατευτικό μηχανισμό της απόπτωσης ή αλλιώς τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Η επίδραση αυτή του ιού στον μηχανισμό της απόπτωσης πραγματοποιείται κυρίως μεταβάλλοντας τη δράση του ογκογονιδίου bcl-2 και του p-53.

Η σχέση του ιού με τα καρκινώματα κεφαλής και τραχήλου έχει αποδειχθεί αρχικά με την ενοχοποίησή του για τα καρκινώματα του ρινοφάρυγγα. Το γονιδίωμα του ιού ανιχνεύεται σε ποσοστό από 30 έως άνω του 90% των καρκινωμάτων του ρινοφάρυγγα. Στην Αμερική και τη Δυτική Ευρώπη το ποσοστό είναι χαμηλότερο, ενώ στις χώρες της Νοτιοανατολικής Ασίας πλησιάζει το 100%. Τελευταία υπάρχουν αναφορές και για ανίχνευση του ιού σε καρκινώματα οισοφάγου και υποφάρυγγα με ποσοστά που κυμαίνονται από 5 έως 86% ανάλογα με την γεωγραφική περιοχή, ενώ είναι ελάχιστες οι αναφορές σχετικά με το ρόλο του στον καρκίνο του λάρυγγα με ποσοστά ανίχνευσης του ιού από 20 έως 38%.

Οι δύο ιοί HPV και EBV αποτέλεσαν αντικείμενο της έρευνας που διεξήχθη στην Πανεπιστημιακή ΩΡΛ Κλινική του Νοσοκομείου ΑΧΕΠΑ. Οι δύο ιοί ανιχνεύτηκαν σε ποσοστά 40% ο ιός HPV και 43% ο ιός EBV, ενώ δεν υπάρχει στη διεθνή βιβλιογραφία άλλη μελέτη εκτός από αυτή που να ανιχνεύει ταυτόχρονα τους δύο ογκογόνους ιούς HPV και EBV στα καρκινώματα του λάρυγγα.

Ενδογενή καρκινογόνα

1. Ογκογονίδια

Τα ογκογονίδια προέρχονται από φυσιολογικά αυξητικά γονίδια τα οποία ονομάζονται πρωτο-ογκογονίδια, τα οποία στη συνέχεια έχουν υποστεί μετάλλαξη. Το αποτέλεσμα της μετάλλασής αυτής είναι η υπερδραστηριοποίηση του γονιδίου. Η υπερδραστηριότητα του γονιδίου εκδηλώνεται είτε με υπερπαραγωγή των αντίστοιχων πρωτεϊνών που ελέγχει είτε με αυξημένη δράση της λειτουργίας του.

Στα τα καρκινώματα κεφαλής και τραχήλου έχουν ανιχνευτεί και ενοχοποιηθεί αρκετά ογκογονίδια τα οποία εμπλέκονται στο μηχανισμό της καρκινογένεσης. Ανάλογα με το μηχανισμό δράσης τους διακρίνονται σε:

- 1) Αυξητικούς παράγοντες: Int-2, EGF, hst-1
- 2) Υποδοχείς αυξητικών παραγόντων: EGFR, erb B-2, erb B-3, TGF-alpha
- 3) Μεταβιβαστές σήματος: K-ras, H-ras
- 4) Παράγοντες προσκόλλησης στο DNA: erb A, C-myc, N-myc, L-myc.
- 5) Παράγοντες απόπτωσης: bcl-2, bax, Cyclin-D1.

Σημαντικότερα από αυτά, τα οποία έχουν μελετηθεί τα τελευταία χρόνια εκτενώς είναι το bcl-2 και το EGFR.

2. Ογκοκατασταλτικά γονίδια

Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια είναι γονίδια που εμπεριέχονται στο γενετικό υλικό του κυττάρου, τα οποία με τη δράση τους προστατεύουν από την εμφάνιση νεοπλασιών. Ο προστατευτικός τους ρόλος γίνεται με ρύθμιση διαφόρων μηχανισμών του κυτταρικού κύκλου, της κυτταρικής αύξησης και διαφοροποίησης. Έτσι μπορεί να δράσουν μέσω ενεργοποίησης και προαγωγής του μηχανισμού της απόπτωσης (ογκοκατασταλτικά γονίδια p-53 και Rb), μέσω καταστολής της διπθητικότητας (Rb), ή με ενίσχυση του κυτταρικού μηχανισμού επιδιόρθωσης του DNA (p-53). Όταν συμβούν μεταλλάξεις των γονιδίων αυτών ή σε γενετικές ελλείψεις και ελαττωμένη δραστηριότητά τους, το κύτταρο μπορεί να οδηγηθεί σε κακοήθη εξαλλαγή. Στα καρκινώματα κεφαλής και τραχήλου έχει αποδειχθεί καταστολή της δράσης των ογκοκατασταλτικών γονιδίων Rb, p-16, p-21,

p-27 και κυρίως του p-53.

Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p-53 έχει γίνει αντικείμενο μελέτης στα καρκινώματα κεφαλής και τραχήλου και ο ογκοπροστατευτικός του ρόλος έχει ερευνηθεί εκτενώς. Είναι βασικός ρυθμιστής του κυτταρικού κύκλου και του μηχανισμού της απόπτωσης. Οι πρωτεΐνες που παράγει ασκούν την προστατευτική δράση με ποικίλους τρόπους. Μεταλλάξεις του γονιδίου οδηγούν στην απώλεια της ογκοπροστατευτικής του δράσης και την εμφάνιση καρκίνου. Έχουν ανιχνευθεί μεταλλάξεις του γονιδίου σε ποσοστό άνω του 60% στα καρκινώματα κεφαλής και τραχήλου, συμπεριλαμβανομένου και του λάρυγγα, ενώ η μη μεταλλαγμένη μορφή του, wild type p-53 (wt-p53), ανιχνεύεται σε μικρό μόνο ποσοστό (μικρότερο του 40%). Διάφοροι παράγοντες μπορεί να προκαλέσουν μεταλλάξεις του γονιδίου, όπως γενετικοί παράγοντες, εξωγενή καρκινογόνα, ενώ τελευταία έχει αναφερθεί και ο μεταλλαξιογόνος ρόλος του ιού HPV στο γονίδιο p-53 στα καρκινώματα κεφα-

λής και τραχήλου.

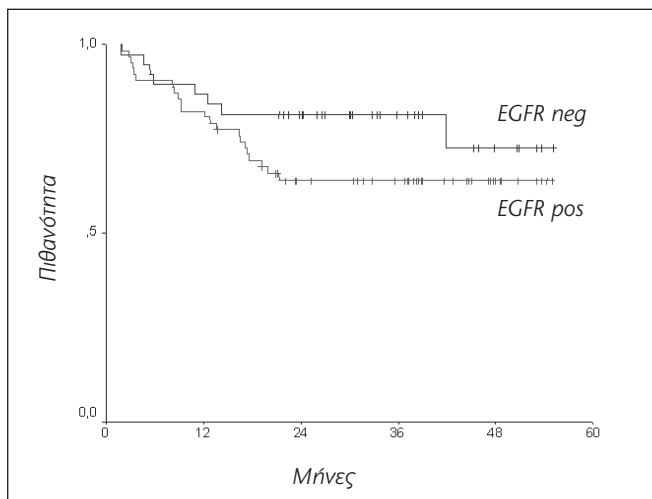
Κληρονομικότητα, χρωμοσωμικοί παράγοντες

Εκτός από τα εξωγενή καρκινογόνα υπάρχουν και ενδογενείς παράγοντες οι οποίοι μπορεί να οδηγήσουν σε καρκινογένεση. Οι ενδογενείς αυτοί παράγοντες αποτελούν αλλοιώσεις του γενετικού υλικού των χρωμοσωμάτων. Μπορεί να είναι απώλεια της ετεροζυγωτίας, χρωμοσωμικές ανευλοειδίες, εξαλείψεις τμημάτων, επαναλήψεις (ενισχύσεις) τμημάτων και αλλοιώσεις αλληλουχιών του γενετικού κώδικα. Οι γενετικές αυτές διαφοροποιήσεις κληρονομούνται με διάφορους τρόπους κληρονομικότητας και μπορεί να προκαλέσουν: ενεργοποίηση ογκογονιδίων, απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων, ανεπάρκεια ενζύμων απαραίτητων για την επιδιόρθωση του DNA ή ευαισθησία στην εμφάνιση μεταλλάξεων μετά την επίδραση των εξωγενών καρκινογόνων. Στα καρκινώματα κεφαλής και τραχήλου έχουν ανιχνευθεί αρκετές γενετικές αλλοιώσεις. Οι

σημαντικότερες από αυτές είναι απώλειες ετεροζυγωτίας και εξαλείψεις τμημάτων των χρωμοσωμάτων. Κάθε αλλοίωση μπορεί να επιδράσει σε διάφορα στάδια της καρκινογένεσης.

Απόπτωση

Η απόπτωση είναι ένας φυσιολογικός κυτταρικός μηχανισμός σύμφωνα με τον οποίο ένα κύτταρο όταν γηράσκει ή εκτρέπεται της φυσιολογικής λειτουργίας, πεθαίνει. Αποτελεί δηλαδή τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο ή τη γενετικώς προκαθορισμένη κυτταρική αυτοκτονία. Ο μηχανισμός αυτός ελέγχεται από διάφορα γονίδια. Τα σημαντικότερα γονίδια που σχετίζονται με την απόπτωση στα καρκινώματα κεφαλής και τραχήλου είναι: 1) αυτά που προάγουν την απόπτωση: p-53, Rb, bax, p21-waf, κασπάσες, 2) αυτά που αναστέλλουν την απόπτωση: bcl-2. Επίσης, μεταλλάξεις των γονιδίων τα οποία προάγουν την απόπτωση, όπως οι μεταλλάξεις του γονιδίου p-53 έχουν το αντίθετο αποτέλεσμα, δηλαδή την αναστολή του μη- ➤



Εικόνα 5. Kaplan-Meier curve. Επίδραση της έκφρασης του EGFR στην εμφάνιση υποτροπής του όγκου.

Όλοι αυτοί οι ανωτέρω παράγοντες έχουν μελετηθεί εκτενώς και είναι γνωστοί από πολλά έτη. Υπάρχει σήμερα ανάγκη καθορισμού νέων προγνωστικών δεικτών οι οποίοι θα προσφέρουν στην καλύτερη πρόληψη τόσο της πρωτοπαθούς νόσου όσο και της υποτροπής. Επιπρόσθετα οι νεότεροι μοριακοί-γονιδιακοί προγνωστικοί δείκτες αποτελούν το αντικείμενο της μοντέρνας και πολλά υποσχόμενης στοχευμένης θεραπείας.

Η πρόοδος της μοριακής βιολογίας τα τελευταία χρόνια και η χαρτογράφηση του γονιδιώματος του κυττάρου (DNA) έφερε στο φως αρκετούς από τους κυτταρικούς μηχανισμούς αύξησης, διαφοροποίησης, πολλαπλασιασμού και θανάτου. Διάφορα γονίδια έγιναν αντικείμενο μελέτης σχετικά με το ρόλο τους στις κυτταρικές λειτουργίες. Παράλληλα, μελετήθηκε η δράση τους και στην καρκινογένεση, καθώς και η ρόλος τους ως προγνωστικός δείκτης στους ασθενείς με καρκίνο. Έτσι, τα τελευταία χρόνια εμφανίστηκαν μελέτες στη διεθνή βιβλιογραφία σχετικά με το ρόλο διαφόρων μοριακών δεικτών στην πρόγνωση των καρκινωμάτων από πλακώδες επιθήλιο κεφαλής και τραχήλου και ιδιαίτερα στην πρόγνωση των ασθενών με καρκίνο του λάρυγγα. Οι μοριακοί αυτοί δείκτες είναι παράγοντες της απόπτωσης, της αγγειογένεσης, άλλων μηχανισμών που εμπλέκονται στην καρκινογένεση, καθώς και γονιδιακό υλικό ογκογόνων ιών. Πολλές ογκοπρωτεΐνες και γονίδια μελετώνται τα τελευταία χρόνια ως προς τον προγνωστικό τους ρόλο.

Τα συγκεντρωτικά στοιχεία από πληθώρα αναφορών σχετικά με τον προγνωστικό ρόλο του p-53 και καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι η δράση του γονιδίου αυτού δεν έχει ακόμα αποδειχθεί να αποτελεί αξιόπιστο δείκτη της πρόγνωσης στους ασθενείς με καρκίνωμα του λάρυγγα και τα στοιχεία μέχρι σήμερα είναι αμφιλεγόμενα. Επίσης, ο ρόλος του bcl-2 γενικά στην πρόγνωση του καρκίνου του λάρυγγα, παραμένει ακόμη αμφιλεγόμενος, παρά τη σαφή και αποδεδειγμένη επίδραση του γονιδίου στην κυτταρική απόπτωση. Ο σημαντικότερος μοριακός δείκτης της αγγειογένεσης, ο παράγοντας VEGF, έχει βρεθεί να έχει προγνωστική σημασία

χανισμού. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αθανатоποίηση των κυττάρων που φέρουν τις μεταλλάξεις αυτές και πολλές φορές έχουν απώτερο αποτέλεσμα την ογκογένεση.

Αγγειογένεση

Ένας δεύτερος πολύ σημαντικός μηχανισμός της κυτταρικής ανάπτυξης σε επίπεδο κυττάρων και ιστών είναι η αγγειογένεση. Πρόκειται για τη διαδικασία κατά την οποία ένας αναπτυσσόμενος ιστός δημιουργεί νεόπλαστα αγγεία με σκοπό την αιμάτωση και ανάπτυξή του. Η αγγειογένεση είναι ένας φυσιολογικός μηχανισμός που παρατηρείται στα έμβρυα κατά την ανάπτυξή τους, στην επούλωση τραύματος, αλλά και σε φλεγμονή, στις νόσους του συνδετικού ιστού και στον καρκίνο. Ο μηχανισμός ενεργοποιείται σε κάθε κατάσταση κατά την οποία υπάρχουν αυξημένες ανάγκες για αιμάτωση των ιστών. Έτσι, ενεργοποιείται όταν υπάρχει αυξημένος κυτταρικός πολλαπλασιασμός και ιστική αύξηση. Κατά την ενεργοποίηση του μηχανισμού της αγγειογένεσης υπάρχει υπερέκφραση συγκεκριμένων γονιδίων από τα κύτταρα, τα οποία προκαλούν την παραγωγή πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες αυτές, οι οποίες είναι μεσολαβτικές και υποδοχείς, διεγείρουν τους ινοβλάστες και έτσι σχηματίζονται νεόπλαστα τριχοειδή αγγεία στο σημείο που έχει ενεργοποιηθεί.

Η νεοπλασματική κυτταρική αύξηση έχει και αυτή αυξημένες ανάγκες για αιμάτωση, προς θρέψη των νέων ταχέως αυξανόμενων κυττάρων. Για το σκο-

πό αυτό στα νεοπλασματικά κύτταρα υπάρχει υπερέκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με την αγγειογένεση. Σε όλους σχεδόν τους συμπαγείς όγκους, μεταξύ των οποίων και τα καρκινώματα κεφαλής και τραχήλου υπάρχει ενεργοποίηση της αγγειογένεσης. Οι σημαντικότεροι γονιδιακοί παράγοντες που σχετίζονται με την αγγειογένεση είναι ο VEGF (ομάδα γονιδίων), ο VEGFR-1, ο VEGFR-2, ο PDGF και ο bFGF. Εκτός από την αγγειογένεση, στην εμφάνιση λεμφαδενικών τραχηλικών μεταστάσεων ιδιαίτερη σημασία έχει και η λεμφαγγειογένεση. Η λεμφαγγειογένεση φαίνεται να ελέγχεται κυρίως από συγκεκριμένες υποομάδες του VEGF.

Προγνωστικοί παράγοντες στον καρκίνο του λάρυγγα

Υπάρχει πληθώρα αναφορών σχετικά με τους κλινικούς και ιστολογικούς προγνωστικούς παράγοντες στον καρκίνο του λάρυγγα. Οι κλινικοί παράγοντες που έχουν σημαντική προγνωστική σημασία σύμφωνα με τις περισσότερες διεθνείς βιβλιογραφικές αναφορές είναι το στάδιο T και N του όγκου, το μέγεθος του όγκου, η υπεργλωττιδική ή υπογλωττιδική του εντόπιση και η προηγηθείσα τραχειοτομή. Οι ιστολογικοί χαρακτήρες του νεοπλασματος μπορεί επίσης να επηρεάσουν την πρόγνωση των ασθενών με καρκίνο του λάρυγγα. Ένας σημαντικός τέτοιος παράγοντας είναι ο βαθμός διαφοροποίησης του καρκινώματος από πλακώδες επιθήλιο.

στα καρκινώματα του λάρυγγα. Η υπερέκφραση του ογκογονιδίου EGFR έχει συνδεθεί με αυξημένο ποσοστό υποτροπών στον καρκίνο του λάρυγγα, με μειωμένο χρόνο ελεύθερο νόσου και με μειωμένο συνολικό χρόνο επιβίωσης. Σε παρόμοια αποτελέσματα ως προς τους παραπάνω δείκτες κατέληξε και η μελέτη που έγινε στην ΩΡΛ Κλινική του Νοσοκομείου ΑΧΕΠΑ. Άλλοι μοριακοί δείκτες οι οποίοι έχουν ερευνηθεί και έχει αποδοθεί προγνωστική σημασία είναι: Cyclin D1, Rb protein, bax, p21-waf, p-27, Cerb-B-2, E-Cadherin, Cathepsin-D, μεταλλοπρωτεάσες, κύτταρα Natural Killers, DNA-ploidy, διάφορες χρωμοσωμικές αλλοιώσεις.

Καμία προγνωστική σημασία δεν αποδίδεται στην ανίχνευση του γονιδιωματός του ιού HPV σε ασθενείς με καρκίνωμα από πλακώδες επιθήλιο κεφαλής και τραχήλου, σύμφωνα με διεθνείς μελέτες, ενώ η δράση και η προγνωστική σημασία της παρουσίας του ιού παραμένει ακόμη υπό έρευνα. Η μελέτη που διεξήχθη στην ΩΡΛ Κλινική του Νοσοκομείου ΑΧΕΠΑ δεν κατέδειξε προγνωστική σημασία στον ιό αυτό, παρόλο που ανιχνεύθηκε στο 40% των ιστοτεμαχίων από καρκίνωμα του λάρυγγα. Επίσης, σύμφωνα με την ίδια μελέτη, δεν αποδείχθηκε προγνωστική σημασία για τον ιό EBV (παρόλο που ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 43%) και αποτελεί την πρώτη διεθνή μελέτη που ερεύνησε τον προγνωστικό ρόλο του ιού EBV στον καρκίνο του λάρυγγα.

Σχόλια, συμπεράσματα

Έχει σημασία να τονιστεί ότι η καρκινογένεση δεν αποτελεί ένα μεμονωμένο γεγονός και δεν αρκεί η επίδραση ενός μόνο παράγοντα. Αποτελεί μια πολυσταδιακή διαδικασία στην οποία επιδρούν πολλοί παράγοντες ενδογενείς και εξωγενείς. Τα διάφορα εξωγενή και ενδογενή καρκινογόνα προκαλούν συνεχώς μεταλλάξεις, ενώ παράλληλα οι κυτταρικοί και άλλοι προστατευτικοί μηχανισμοί διορθώνουν τις προσκληθείσες βλάβες. Η διαταραχή αυτής της ισορροπίας υπέρ των πρώτων έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση του καρκίνου.

Η γνώση μας σχετικά με την αιτιοπαθογένεια και η κατανόηση των μηχανισμών της καρκινογένεσης είναι το

κλειδί στην καλύτερη πρόληψη. Ο καθορισμός προγνωστικών δεικτών είναι σημαντικός στην πρόληψη τόσο της πρωτοπαθούς νόσου όσο και της υποτροπής. Επίσης, ο καθορισμός νέων μοριακών προγνωστικών δεικτών είναι απαραίτητος για τη δημιουργία της στοχευμένης θεραπείας. Ήδη έχει αρχίσει η εφαρμογή: 1) αναστολέων της αγγειογένεσης, όπως αναστολείς της κυκλοοξυγενάσης-Cox inhibitors (κοξίμπες) και μονοκλωνικά αντισώματα έναντι του VEGF (bevacizumab) και 2) η χρήση αναστολέων της κινάσης της τυροσίνης (Iressa-gefitinib) έναντι του EGFR, μονοκλωνικά αντισώματα έναντι του EGFR (cetuximab).

Μελλοντικές προοπτικές αποτελούν: η εξατομικευμένη γονιδιακή-χρωμοσωμική ανίχνευση (gene profiling) και ακολούθως η εξατομικευμένη γονιδιακή θεραπεία (gene therapy).

Σκοπός είναι η επιδιόρθωση της γενετικής βλάβης. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί κατά περίπτωση με:

- Μπλοκάρισμα δράσης υπερλειτούργούντων ογκογονιδίων
- Αποκατάσταση δράσης ογκοκατασταλτικών γονιδίων που έχουν υποστεί βλάβη
- Καταστροφή κυττάρων που δεν επιδιορθώνεται η λειτουργία τους
- Εμπλοκή δράσης ογκογόνων ιών
- Καθορισμό νέων και αξιόπιστων προγνωστικών δεικτών

Ήδη η μοριακή γενετική θεραπεία έχει να επιδείξει αρκετά επιτεύγματα:

- Αντισώματα (anti-VEGF, anti-Her, anti-p53)
- Αναστολείς ενζύμων (tyrosine kinase - Iressa)
- Antisense ολιγονουκλεοτίδια (block p53, bcl-2)
- Ιοί κατόπιν επεξεργασίας με γενετική μηχανική (αποκατάσταση p53)
- Εμβόλια (κατά του ιού HPV)
- Αναστολείς της δράσης της τελομεράσης
- Άλλες μεθόδους σε συνδυασμό με X/Θ ή A/Θ, όπως αναστολείς της αγγειογένεσης (Cox inhibitors), αποπρωτρωτικοί παράγοντες κ.λπ.

Είναι πολύ πιθανό σε λίγες δεκαετίες ο καρκίνος του λάρυγγα αλλά και γενικότερα τα κακοήγη νεοπλασμάτα να αντιμετωπίζονται κατά κύριο λόγο με τη

γενετική μηχανική και νεότερα χημειοθεραπευτικά σκευάσματα, στοχεύοντας μόνο στο μεταλλαγμένο κύτταρο. Η χειρουργική θεραπεία, ενώ σήμερα αποτελεί τον κύριο τρόπο αντιμετώπισης του καρκίνου του λάρυγγα, ενδέχεται σε λίγες δεκαετίες να αποτελέσει επικουρική μέθοδο, συμπληρωματική της εξατομικευμένης γονιδιακής θεραπείας.

Βιβλιογραφία

1. Aaltonen LM, Rihkanen H, Vaehri A. Human papillomavirus in larynx. *Laryngoscope* 2002; 112:700-7.
2. Baselga J, Trigo JM, Bourhis J, Tortochaux J, Cortes-Funes H, Hitt R, et al. Phase II multicenter study of the antiepidermal growth factor receptor monoclonal antibody cetuximab in combination with platinum-based chemotherapy in patients with platinum-refractory metastatic and/or recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol* 2005; 23(24):5568-77.
3. Bishop JM. The molecular genetics of cancer. *Science* 1987; 235:305-11.
4. Brekken R, Overholser J, Stastny V, Waltenberger J, Minna J, Thorpe P. Selective inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor 2 (KDR/Flk-1) activity by a monoclonal anti-VEGF antibody blocks tumor growth in mice. *Cancer Res* 2000; 60:5117-24.
5. de Bree R, Leemans CR. New developments for optimal management of head and neck cancer. *Onkologie* 2004; 27:339-42.
6. Ford AC, Grandis JR. Targeting epidermal growth factor receptor in head and neck cancer. *Head Neck* 2003; 25:67-73.
7. Hardisson D. Molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2003; 260:502-8.
8. Hashitani S, Urade M, Nishimura N, Maeda T, Takaoka K, Noguchi K, Sakurai K. Apoptosis induction and enhancement of cytotoxicity of anticancer drugs by celecoxib, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, in human head and neck carcinoma cell lines. *Int J Oncol* 2003; 23:665-72.
9. Jefferies S, Foulkes WD. Genetic mechanisms in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncol* 2001; 37:115-26.
10. Licita L, Locati LD, Bossi P. Head and neck cancer. *Annals of Oncology* 2004; 15(Supplement 4):iv267-iv273.
11. McCaul JA, Gordon KE, Clark LJ, Parkinson EK. Telomerase inhibition and the future management of head-and-neck cancer. *Lancet Oncol* 2002; 3:280-8.
12. McKinnell RG, Parchment RE, Perantoni AO, Pierce GB. The biological basis of cancer. Cambridge University Press, Cambridge 1998.
13. Nadal A, Cardesa A. Molecular biology of laryngeal squamous cell carcinoma. *Virchows Arch* 2003; 442:1-7.
14. Nikolou A, Markou K, Petridis D, Vlachtsis K, Nalbantian M, Daniilidis I. Factors influencing tumor relapse after total laryngectomy. *B-ENT* 2005; 1:1-10.
15. Ross WD. Introduction to oncogenes and molecular cancer medicine. Springer-Verlag, New York 1998.
16. Sidransky D. Molecular genetics of head and neck cancer. *Curr Opin Oncol* 1995; 7:229-33.
17. Vermorken JB. Medical treatment in head and neck cancer. *Annals of Oncology* 2005; 16(Supplement 2):ii258-ii264
18. Vlachtsis K, Brieger J, Kim DW, Gieringer R, Hast J, Hengstler JG, et al. Quantitative analysis of VEGF-isoforms in head and neck squamous cell carcinoma cell lines: Relation to xenotransplantability and tumour progression in mice. *Oncol Rep* 2002; 9(5):1133-8.
19. Vlachtsis K, Nikolou A, Markou K, Fountzilias G, Daniilidis I. Clinical and molecular prognostic factors in operable laryngeal cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2005; 262(11):890-8.
20. Weber A, Tannapfel A. Prognosefaktoren bei Kopf-Halskarzinomen. *HNO* 2002; 50:35-42.
21. Weinberg R. One renegade cell. How cancer begins. Basic books, New York 1999.
22. Κ. Βλάχτος. Καρκίνος του λάρυγγα: Ογκογένεση και σύγχρονοι μοριακοί προγνωστικοί δείκτες. Εκδόσεις Copy City, Θεσσαλονίκη 2006. 