

دراسة تعبيرية الفيروس الحليمي البشري وعلاقته بالمعطيات السريرية و الدرجة النسيجية لدى عينة من المجتمع السوري مصابين بالسرطان الأنفي البلعومي

رشا علي محمد *

أ. د أحمد المنديلي **

(تاريخ الإيداع ١١ / ٣ / ٢٠٢٠ . قُبل للنشر في ١١ / ٨ / ٢٠٢٠)

□ ملخّص □

يشكل السرطان الأنفي البلعومي 0.6% من مجمل السرطانات حول العالم بمعدل حدوث هو الأعلى في جنوب شرق آسيا، والصين الجنوبية، إلا أنه غير موثق جيداً في المنطقة العربية، وقد بينت دراسات حديثة الدور المحرّض على التسرطن للفيروس الحليمي البشري لدى فئة من المصابين بالسرطان الأنفي البلعومي. هدفت الدراسة إلى تحري وجود الفيروس الحليمي البشري لدى عينة من مرضى السرطان الأنفي البلعومي وربط المعطيات السريرية لديهم مع إصابتهم بالسرطان المذكور

الطرائق: تم جمع عينة مؤلفة من ٩٤ مصاب بالسرطان الأنفي البلعومي بين عامي ٢٠١٠-٢٠١٧ وإعادة تقييم التشخيص النسيجي وإجراء التلوين المناعي النسيجي للفيروس الحليمي البشري HPV لربط وجوده بالمعطيات السريرية لكل مريض.

النتائج: نسبة الإصابة بالفيروس الحليمي البشري بلغت 13.5% في العينة المدروسة، دون وجود ارتباط للعمر أو الجنس أو المنطقة الجغرافية مع الإصابة بالفيروس الحليمي البشري، والنمط غير المتقرن المتميز هو النمط النسيجي الأعلى نسبة من حيث ارتباطه بوجود الفيروس الحليمي البشري.

كلمات مفتاحية: السرطان الأنفي البلعومي- الفيروس الحليمي البشري - العمر - الجنس - المنطقة الجغرافية-الدرجة النسيجية

*طالبة دكتوراه ،حاصلة على ماجستير نسيج وتشريح مرضي فموي، جامعة دمشق- كلية طب الأسنان -قسم النسيج و التشريح المرضي

الفموي

**أستاذ حاصل على الدكتوراه في علم النسيج و التشريح المرضي الفموي، رئيس قسم النسيج و التشريح المرضي الفموي

جامعة دمشق-كلية طب الأسنان - قسم النسيج و التشريح المرضي الفموي.

Studying The Expression of Human Papilloma Virus and its Correlation with Clinical Data and Histological Grade in a Group of Syrian Patients Affected with Nasopharyngeal Carcinoma

Rasha Ali Mohammad *
Ahmad Manadili **

(Received 11 /3 /2020. Accepted 11 /8/2020)

□ ABSTRACT □

Nasopharyngeal carcinoma (NPC) accounts for 0.6% of all cancers worldwide with the highest prevalence in South East Asia and Southern China, but it is not well documented in Arabian Region. Recent reports have implicated oncogenic Human papillomavirus(HPV) in a subgroup of NPC. The aim of this study was to detect the existence of human papilloma virus in a group of NPC patients, and to correlate their clinical data with the incidence of the cancer mentioned

Methods: a sample of 94 NPC patients had been collected between the years 2010-2017, we re-evaluated the histological diagnosis and applied the immunohistochemical staining to detect HPV virus and correlate its existent with the other clinical data related to each patient.

Results: the ratio of HPV in the studied sample was 13.5% with no correlation between age, sex or geographic region with the incidence of HPV, the nonkeratinizing un differentiated NPC histological type was most correlated with the presence of HPV virus.

Keywords: nasopharyngeal carcinoma-human papilloma virus-age-sex-geographic region-histological grade

*pathology ,Department of Oral histology and pathology ,Faculty of Dentistry, Damascus University

**professor of oral histology and pathology ,PHD in oral histology and pathology ,Head of department of oral histology and pathology ,Faculty of dentistry, Damascus University

المقدمة:

السرطان الأنفي البلعومي: Nasopharyngeal carcinoma NPC

ينشأ السرطان الأنفي البلعومي من الخلايا البشروية المبطنة للبلعوم الأنفي. ويعتبر خباثة فريدة من نوعها تصيب منطقة الرأس و العنق، و تفردا يعود إلى الاختلافات المميزة السكانية والسريرية والجغرافية المرتبطة بها والتي تميزها عن غيرها من السرطانات البشروية للرأس و العنق. [١]

يمكن أن يتطور السرطان الأنفي البلعومي، كغيره من السرطانات البشروية، بدءاً من سوء تصنع إلى سرطان موضع [٢، ٣]. تتوافق الآفات قبيل الغازية مع خسارة صبغية على الصبغين 9p و 3p والتي بدورها تعطل المورثات الكابحة للورم مثل p14 و p15 و p16 ، [4-7]. غير أنه، لوحظ خسارة كل من الصبغين السابقين 3p و 9p في البشرات الطبيعية لدى سكان الصين الشرقية.

يتوطن السرطان الأنفي البلعومي في مناطق جغرافية معينة من العالم، ومرتبطة بالإصابة بفيروس الإبتستين بار الذي وجدت مادته الوراثية في 80% من الحالات حول العالم [٨]. عموماً هناك العديد من الإبتستات العرقية التي تصاب بهذا السرطان، لكن مع اختلافات كبيرة [٩]. يعد السرطان الأنفي البلعومي نادر الوجود في معظم المناطق، خصوصاً في أوروبا و شمال أميركا، حيث وثقت الدراسات أن معدل حدوثه أقل من 1/100000 [١٠] [١١]. وعلى خلاف ذلك يعتبر معدل حدوثه هو الأعلى في بعض المناطق من العالم مثل جنوب الصين خاصة، حيث سجلت خمس و عشرون إصابة لكل مئة شخص هناك [١٢]، وتعتبر تايوان و فيتنام و الفلبين مناطق ذات معدل إصابات عالية. كما سجل معدل إصابة متوسط لدى العرب ممن يعيشون في شمال أفريقيا و السعودية ، بالإضافة لمقيمي الكاريبي و الاسكيمو في ألاسكا و غرينلاند [١٣] [١٤].

اقترح العالم HO عام ١٩٧٢ وجود مجموعة عوامل تساهم بالآلية الإمراضية للسرطان الأنفي البلعومي غير المتقرن مثل، التغيرات المورثية، الإصابة بفيروس الإبتستين بار والتناول المديد للسّمك المملح [١٥]. وبينما لم يحدّد العامل الممرض المسبب لهذا السرطان بدقة بعد، إلا أنّ إدمان التدخين وشرب الكحول، الذي يعتبر من العوامل المساهمة بنشوء غيره من السرطانات شائكة الخلايا في الطريق الهضمي العلوي، عاملاً مسبباً للسرطان الأنفي البلعومي المتقرن، بينما يعتبر تناول الطعام المملح (المحفوظ) والمخمّر مع محتوى عالي من النتروز أمينات من عوامل الخطورة المؤهبة للسرطانات الأنفية البلعومية غير المتقرنة والمنشرة في الأماكن التي يعتبر فيها هذا السرطان متوطناً، كما تتشكل حالة الجهاز المناعي لدى الشخص عاملاً مهماً في تطور السرطان الأنفي البلعومي. يزخر الأدب الطبي بالمعلومات الغنية والمعقدة حول الشذوذات المتعلقة بالتكاثر وسبل الإشارة في السرطان الأنفي البلعومي، وهناك أدلة متزايدة حول تورط الفيروس الحليمي البشري عالي الخطورة في حدوث السرطان الأنفي البلعومي، وخصوصاً في المناطق غير المتوطن فيها. [١٦]

التصنيف النسيجي للسرطان الأنفي البلعومي: صدر عام 1991 تصنيف منظمة الصحة العالمية لتصنيف الأورام بتحديثه الثاني، و قد تضمن مجموعتين رئيسيتين اعتماداً على وجود دليل واضح على تمايز شائك أو عدمه تحت المجهر الضوئي، هما السرطان شائك الخلايا (keratinizing Squamous cell carcinoma) و Squamous cell carcinoma و الآخر السرطان غير المتقرن non-keratinizing carcinoma، والذي قُسم إلى متمايز و غير متمايز [١٧]. وتمّ عام ٢٠٠٥ تحديث التصنيف النسيجي للسرطان الأنفي البلعومي فأضيف السرطان شائك الخلايا ذو النمط المشبه بالقاعدي (Basaloid Squamous cell carcinoma) [١٨]

١- النَّمط شائك الخلايا المتقرن: Keratinizing Squamous cell carcinoma

يعتبر هذا النَّمط من السرطان الأنفي البلعومي غازٍ، ويظهر تمايز شائك بوضوح تحت المجهر الضوئي، ويتجلى ذلك بجسور الوصل بين الخلايا و/أو التقرّن في معظم أجزائه. يشابه شكلياً السرطان شائك الخلايا الذي ينشأ في المناطق المخاطية من الرأس والعنق. يمكن تقسيم درجات التّمايز إلى جيّد التّمايز ومتوسّط التّمايز وقليل التّمايز. وتكون حدود الورم واضحة، أما الأنوية تبدي غالباً فرط اصطبغ بالكروماتين ولكن لا تبدي شكل حويصلي ودرجات توصيف تعدّد الأشكال، تتراوح بين الخفيفة إلى الملحوظة. [١٩]

٢- النَّمط غير المتقرن: Non-keratinizing carcinoma

يشكّل هذا النمط حوالي ٩٥% من السرطان الأنفي البلعومي في المناطق ذات نسب الإصابة العالية و حوالي 75%-87% من حالات هذا السرطان في المناطق الأقل عرضة للإصابة [٢٠-٢٢]

يتميز النَّمط غير المتمايز بمظهر نسيجي خلويّ يحوي خلايا ورمية كبيرة ذات حواف غير واضحة ونواة بيضوية إلى حويصلية ونوية كبيرة مركزية التوضع. ويشكّل النَّمط غير المتمايز حوالي ٩٠% من كل أنماطه من السرطان الأنفي البلعومي و هو النمط الأكثر شيوعاً في الأعمار الصغيرة [٢٣]

يختلف النَّمط المتمايز عن غير المتمايز بوجود تطبّق خلوي وارتصاف مع نمط ضفيري، ويذكرنا مظهره بالسرطان ذو الخلايا الانتقالية في المثانة. تظهر الخلايا الورمية حدود واضحة وأحياناً نلاحظ جسور بين خلوية مبهمه أحياناً وبشكل استثنائي قد تشاهد خلايا متقرنة. وبالمقارنة مع النَّمط غير المتمايز، تكون الخلايا أصغر ونسبة نواة / هيولى منخفضة (النوى ليست ضخمة) والنواة تكون مفرطة الاصطبغ، ولا تكون النوية بذلك الوضوح كما في النَّمط الغير متمايز. يعتبر هذا النَّمط أقل شيوعاً، يشكل 7-12% من كل أنماط السرطان الأنفي البلعومي في الصين الجنوبية. [١٨]

٣- السرطان شائك الخلايا المشبه بالقاعدي: Basaloid Squamous cell carcinoma

تم وصف حالات قليلة من هذا النَّمط في الأدب الطبيّ، [٢٤] [٢٥] [٢٦] [٢٧] ويشكّل 0.2% من كل أنماط هذا السرطان في الصين الجنوبية. الملامح الشكلية لهذا النَّمط تتشابه مع الورم الناشئ في مناطق أخرى من الرأس والعنق. تكون الخلايا المشبهه بالقاعدية صغيرة بنواة مفرطة الاصطبغ، بدون نوية واضحة، وهيولى قليلة. وتكون الخلايا متقاربة من بعضها بشكل مكّس وتنمو ضمن نموذج متماسك وصلد بشكل يشابه النمو الفصيصي. وفي بعض الأحيان هناك إحاطة سياجية واضحة. . يكون النهج السريري لهذا الورم أقلّ اجتياحية من السرطان شائك الخلايا ذو النَّمط المشبه بالقاعدي، الناشئ في مناطق أخرى من الرأس والعنق. [١٩]

الفيروس الحلبي البشري و علاقته بالسرطان الأنفي البلعومي:

تمّ التعرّف على 200 نوع من الفيروسات الحلبيّة البشريّة، وتمّ التعرّف على التسلسل المورثي لها بشكل كامل. تقسم الأنماط البشريّة إلى خمسة تختلف فيما بينها بتسلسل المادة الوراثية DNA، مع وجود أنماط بعينها لها تتابع نكليوتيدي معين، (ترمز بدءاً من 11) نسبتها على الأقل 10% تختلف عن غيرها من أنماط الفيروس الحلبيّ البشريّ [٢٨]

ييدي تخطيط البنية الدقيقة للفيروس [٢٩] أنّ الغلاف الفيروسي يتكوّن من 360 جزيء من بروتين L1، مرتبة بشكل 72 جزء مغلف (capsomere)، يتألّف كل منها من خمسة جزيئات L1 ، والتي تحتوي على قلب هلامي ملفف-بيتا beta-jellyroll core مثل غيره من الفيروسات مضلعة الأوجه [٣٠]

تحتاج التآثرات بين القسيمات (capsomeres) إلى الذيل المنته بالنهاية C-terminal tail C من البروتين L1، والذي يمتدّ خارجاً باتجاه الأجزاء المغلفة المجاورة ويربطها عند القاعدة عبر روابط ثنائية الكبريت [٣٠-٣٣]. تحتوي جزيئات الفيروس الحليمي البشريّ على عدد من جزيئات L2، والتي لا تكون مكشوفة بشكل كامل على سطح الفيرون، بعيداً عن النهاية N 120 أو غيرها من الحموض الأمينية [٣٤]

تمّ التّوصّل في السّنوات الأخيرة إلى العديد من طرائق التّحرّي الحساسة والتي سمحت بالتعرّف على العديد من الأنماط الجديدة للفيروس HPV (النمطين Beta، Gamma على وجه الخصوص). ليست كل الأبحاث المسببة بالفيروس الحليمي البشريّ تسبب السرطان، ولذا صنف الفيروس الحليمي البشريّ إلى عالي الخطورة و منخفض الخطورة تبعاً لقدرته على توليد السرطان. [٣٥].

الأنماط منخفضة الخطورة تسبب تآليل سليمة بالمناطق التّناسلية، بينما تتورّط الأنماط عالية الخطورة في معظم الحالات تقريباً بسرطانات عنق الرحم، وغيرها في المنطقة التّناسلية لدى الإناث ومع عدد متزايد من السرطانات البلعومية الفموية. [٣٦]

ويعتبر التّمطان الفيروسيّان HPV18، HPV16 على وجه الخصوص من الفيروسات الخطيرة إذ تسبب معظم السرطانات العنقية و الشرجية وكذلك السرطانات الفموية [٣٧-٣٩].

تحرّرت العديد من الدراسات الوجود الحيوي النشط للفيروس الحليمي البشريّ [٤٠] [٤١]. وقد لوحظ أن وجود السرطان الأنفيّ البلعوميّ المرتبط بالفيروس الحليمي البشريّ متنوع جدا و مرتبط بشدة بالعوامل العرقية للمرضى المصابين و بالمرحلة السريرية للمرض، وبرغم اعتبار فيروس ابشتاين بار عامل حيوي رئيسي لدى دراسة العديد من الإصابات بالسرطان الأنفيّ البلعوميّ غير المتقرن، إلا أنه لم يوجد في كل الحالات، وبشكل أكثر تحديداً، وجد الارتباط المثبت لدى المرضى الآسيويين وليس القوقازيين، حيث أثبتت الدراسات التي تناولت عدد كبير من المرضى المنتمين للعرق القوقازي في شمال أمريكا و جود نسبة لا بأس بها من الأورام مرتبط بالفيروس الحليمي البشريّ وليس ابشتاين بار [٤٠] [٤١].

كما وجد ارتباط الفيروس الحليمي البشريّ في السرطانات الأنفية البلعومية ذات الدّرجات السريرية الأعلى والتي كانت تحتوي على مناطق من البلعوم الفموي [٤٢]، ووفقاً لهذه الدّراسة فقد افترضت أنّ معظم الحالات السرطانية للبلعوم الأنفيّ التي أبدت إيجابية للفيروس الحليمي البشريّ هي حقيقة نشأت في البلعوم الفمويّ، ثمّ انتقلت لمنطقة البلعوم الأنفيّ من خلال قدرة الخلايا السرطانية على الهجرة عبر حلقة فالداير [٤٢].

وقد قدّمت الهجرة النسيلية للخلايا السرطانية عبر هذا السبيل للمفاوي البشريّ (حلقة فالداير) على أنها إحدى الآليات التي قد تنتهجها الأورام متعددة البؤر لدى المرضى المصابين بسرطان شائك خلايا مرتبط بالفيروس الحليمي البشريّ بمنطقة حلقة فالداير وشاملة لمنطقتين تشريحيّتين هما البلعوم الفمويّ والبلعوم الأنفيّ [٤٣، ٤٤]

وعلى الرغم من توقّع وجود الفيروس الذي يقدّم الاختبار الروتينيّ إلا أنّه حالياً لا يوجد طريقة معيارية محدّدة. وعلى العكس فإنّ طرق تحرّي الفيروس في المخابّر المختلفة تتنوّع بشكل كبير، مما يعكس التوجّهات والنزعات الفرديّة لدى المتحرّيين عن الموضوع وتتوّع الكلفة التقديرية لكل تقنية مستخدمة. [٤٥] [٤٦]

الهدف من البحث:

تحري وجود الفيروس الحلبي البشري عالي الخطورة النمط (١٦) لدى عينة من المرضى المصابين بالسرطان الأنفي البلعومي.

١- دراسة ارتباط الوجود الفيروسي بالمعطيات السريرية للمرضى المصابين بالسرطان الأنفي البلعومي (العمر - الجنس - المنطقة الجغرافية).

٢- دراسة ارتباط الوجود الفيروسي بالدرجة النسيجية للسرطان الأنفي البلعومي لدى عينة الدراسة.

مواد وطرائق البحث:

١- **عينة البحث:** شملت العينة ٩٤ مريض ومريضة بالسرطان الأنفي البلعومي بين عامي ٢٠١٠ و ٢٠١٧، وقد تناولت الدراسة بعض المعلومات الديموغرافية المتعلقة بالمرضى وهي: (الجنس، العمر، المنطقة الجغرافية)، وبينت البيانات أن ٥ مرضى لم يتم التوصل إلى معلوماتهم النسيجية المتعلقة بتعبيرية الفيروس HPV المستخدم، لذلك سيتم التعامل مع عينة مؤلفة من ٨٩ مريض ومريضة وعرض النتائج النسيجية المتعلقة بهم.

تم تسجيل البيانات الخاصة بكل مريض وفق الجدول (١)

وقد تراوح جنس المصابين بين (٧٢) حالة من الذكور و (٢٢) من الإناث، وتبين أنه تم استئصال الأورام جميعها جراحياً بعد الإصابة الأولية، بينما لم تتوفر لدينا معلومات عما إذا خضع المريض لمعالجة شعاعية أو كيميائية، أو عن وجود انتقالات بعيدة للعقد اللمفية أو أعضاء أخرى، أو عن إنذار السرطان لدى المرضى المستهدفين بالدراسة تراوحت أعمار المرضى بين ١٩ وال ٨٩، و العمر الأكثر تسجيلاً للإصابة السرطانية المدروسة كان العقد السادس، أما أخفض نسبة فتعود لأعمار المرضى دون ال ١٩ سنة. كما و تمت الإشارة إلى الحالات التي ضمت معلوماتها السريرية، ولكن افتقرت إلى مكعبات الشمع لاستكمال الدراسة النسيجية التقليدية والمناعية، لذا أدخلناها في الدراسة الإحصائية للمعلومات السريرية، لكن لم تتم عليها أي دراسة مناعية نسيجية.

تمت مراجعة الشرائح الزجاجية الملونة بالتلوين التقليدي H&E لتأكيد التشخيص، و استكمال ما يلزم من الشرائح غير المتوفرة لتأكيد تشخيصها كذلك.

تم تقسيم الحالات إلى ثلاث درجات نسيجية بناء على توصيات منظمة الصحة العالمية WHO على النحو التالي:

١ النمط المتقرن شائك الخلايا Keratinizing squamous cell carcinoma
وأعطيناه الرمز (A)

٢ النمط غير المتقرن Non keratinizing ويقسم إلى متمايز Differentiated رمزناه ب (B) وغير متمايز Undifferentiated و رمزناه ب (C)

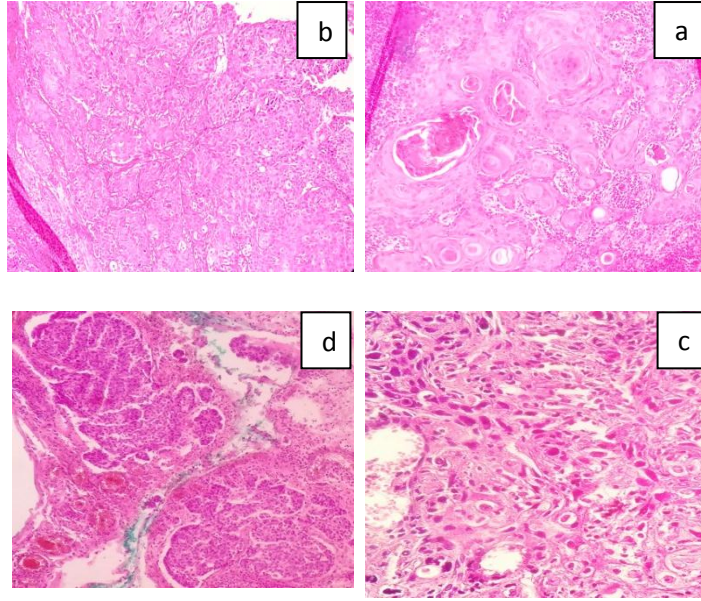
٣ النمط المشبه بالقاعدي و رمزناه ب (D) Basaloid SCC [٤٧] الشكل (١)

يبين الجدول التالي (١) التكرارات والنسب المئوية للمتغيرات الديموغرافية المتعلقة بعينة البحث المصابين بـ NPC

| الجدول (١) وصف المتغيرات الديموغرافية لأفراد العينة (n=94) | | | |
|--|--------------|---------|----------------|
| المتغير | الفئة | التكرار | النسبة المئوية |
| الجنس | ذكر | 72 | 76.6% |
| | أنثى | 22 | 23.4% |
| العمر | أقل من ١٩ | 0 | 0% |
| | من ١٩ إلى ٣٧ | 11 | 11.7% |
| | من ٣٨ إلى ٥٦ | 27 | 28.7% |
| | من ٥٧ إلى ٧٥ | 47 | 50.0% |
| | من ٧٦ إلى ٩٥ | 9 | 9.6% |
| المنطقة الجغرافية | دمشق | 3 | 3.2% |
| | ريف دمشق | 17 | 18.1% |
| | حلب | 16 | 17% |
| | حمص | 8 | 8.5% |
| | حماة | 13 | 13.8% |
| | درعا | 7 | 7.4% |
| | القيطية | 1 | 1.1% |
| | اللاذقية | 4 | 4.3% |
| | طرطوس | 2 | 2.1% |
| | دير الزور | 8 | 8.5% |
| | القامشلي | 2 | 2.1% |
| | الرقبة | 1 | 1.1% |
| | ادلب | 9 | 9.6% |
| | الحسكة | 3 | 3.2% |

يبين الجدول (٢) التصنيفات النسيجية الأربع لعينة المصابين بالسرطان الأنفي البلعومي:

| الجدول (٢) وصف المتغيرات النسيجية لأفراد العينة (n=89) | | | |
|--|-------|---------|----------------|
| المتغير | الفئة | التكرار | النسبة المئوية |
| التصنيف النسيجي | A | 21 | 23.6% |
| | B | 29 | 32.6% |
| | C | 37 | 41.6% |
| | D | 2 | 2.2% |



الشكل (١) يوضح الدرجات النسيجية للسرطان الأنفي البلعومي وفق تصنيف منظمة الصحة العالمية (a) النمط المتقرن شائك الخلايا، (b) النمط غير المتقرن المتميز، (c) النمط غير المتقرن و غير المتميز، (d) النمط المشبه بالقاعدي

٢-المواد المستخدمة في البحث:

مواد التلوين التقليدي H&E الهيماتوكسيلين والأيوزين: فورمول - كزيلول- كحول - ماء مقطر -
شمع البارافين -شرائح زجاجية عادية.

مواد التلوين المناعي: نظام التلوين المناعي المفرد - سائل استرجاع المستضد - مسحوق السائل
الداري.

شرائح خاصة بالتلوين المناعي.

الملونات النسيجية التقليدية: الهيماتوكسيلين والإيوزين

الواسمات المناعية: اسم الواسم HPV16 Human Papilloma Virus

Isotype: igG2a, Localization: Nuclear, Control:HPV16 infected Tissues

ينتمي هذا الفيروس لعائلة الفيروسات غير مغلفة الحمض النووي DNA، وتعرف باسم الفيروسات الحليمية. تتراوح الإصابة بمعظم أنماط الفيروس الحليمي البشري تبعاً لكون الإصابة به لا عرضية، (مثل معظم الأنماط Beta) أو لقدرته على إحداث أورام سليمة تعرف بالأورام الحليمومية أو الثآليل مثل الأنماط (Hpv11، Hpv6،Hpv1)، أو الأنماط التي تحمل خطورة المشاركة بالإصابة السرطانية مثل Hpv16، Hpv18.

٣- الطرائق المستخدمة:

أ- التلوين النسيجي التقليدي للعينات:

يثبت المكعب الشمعي على المباشرة النسيجية Microtome، و تحدد سماكة المقطع بحوالي ٥ ميكرون، تفرش هذه المقاطع الشمعية في محم مائي يحتوي ماء دافئ ليتم فرد المقاطع بشكل جيد على الشرائح الزجاجية، و لتجفيفها من الماء يتم معاملتها إما بالهواء أو عبر وضعها في مجففة بحرارة ٣٧ درجة مئوية وتترك ليتم تجهيزها للتلوين . لنزع الشمع وبقيائه توضع الشرائح الزجاجية المحملة بالمقاطع النسيجية في ثلاثة حمامات من الكزيلول لمدة ٣-٥ دقائق لكل حمام. ولترطيب الشرائح الزجاجية تنتقل لمرحلة Hydration، حيث توضع بعد ذلك في الكحول المطلق ثم الكحول بتركيز أخفض بدءاً من الكحول بتركيز ٩٥% يليه بتركيز ٧٠%، ثم ٥٠%، وذلك لمدة ٥ دقائق لكل حمام، فتم إزالة الكزيلول. تغسل بعدها الشرائح بالماء و توضع في الهيماتوكسيلين مدة تتراوح بين ٥-٧ دقائق حسب الدرجة اللونية المطلوبة بعد الفحص المجهرى، ثم تغسل بالماء عدة مرات بشكل جيد إلى أن يأخذ المحضر اللون الأزرق، ثم توضع في الأيوزين بتركيز ١% لمدة دقيقة واحدة. تتم بعدها مرحلة التجفيف Dehydration عبر محاليل متتالية من الكحول بتركيز تبدأ بـ ٥٠% لمدة ١٠ ثانية، يليها ٧٠% لمدة ١٠ ثوان، يليها محلول كحولي بتركيز ٩٠% لمدة ٣٠ ثانية و أخيراً محلول من الكحول المطلق يتم استبداله مرتين، لمدة ٥ دقائق. أخيراً يتم وضع الشرائح الزجاجية في ثلاثة أحواض متدرجة النقاوة من الكزيلول لمدة ١٠ دقائق لكل منها، ثم تترك المحضرات لتجف. تستر المحضرات بوضع قطرة من بلسم كندا قرب المقطع النسيجي، ثم توضع الساترة و يضغط عليها بلطف لإزالة الفقاعات المتشكلة.

ب- التلوين المناعي Immunohistochemical staining :

تم التلوين المناعي النسيجي بناء على تعليمات الشركة المصنعة:

١- تم تقطيع المكعبات الشمعية بواسطة الميكروتوم (المباشرة النسيجية) بسماكة ٣-٤ ميكرون و تحميل المقاطع النسيجية على شرائح زجاجية خاصة بالتلوين المناعي (positive charged slides)، ثم التجفيف بالهواء لساعتين بحرارة ٥٨ C.

٢- لنزع الشمع عن الشرائح الزجاجية و التجفيف و الترطيب تباعا Dehydrated, Deparaffinization, Rehydrated. تسخن السلايدات في فرن بدرجة حرارة ٦٠ C لمدة ١٥ دقيقة و توضع بعدها في سلسلة من الحمامات تتضمن حمامين من الكزيلول (٣-٥ دقائق لكل منها) تتبع بثلاث حمامات من الكحول (٣ دقائق لكل حمام) بعدها تغسل السلايدات بالماء الجاري بلطف.

٣- عملية إرجاع المستضد Antigen Retrieval، حيث تم تحضير محلول المستضد وفق تعليمات الشركة المصنعة BioSB يليها الكبح Blocking عبر الغمر بـ Poly Detector Peroxidase Blocker لمدة عشر دقائق. ثم تنقل المحضرات إلى (TBS wash buffer) و تغمر لمدة خمس دقائق مع تغييره ثلاث مرات.

٤- إضافة الضد الأولي (HPV16) مباشرة إذا كان جاهز للاستعمال كما هو الحال لدينا بالملون الخاص بـ

(HPV16). ثم الحضان بين ٣٠-٦٠ دقيقة بحرارة الغرفة حسب تعليمات الشركة المصنعة والغسل باستخدام TBS Tris-buffered saline والغمر لمدة ١٠-١٥ دقيقة

٥- إضافة الضد الثاني PolyDetector HRP Label موجود ضمن مجموعة التلوين المناعي المستخدمة، يليه الحضان من ٣٠-٦٠ دقيقة و الغسل باستخدام TBS مدة ١٥ دقيقة مع تغييره ثلاث مرات.

٦- تطبيق DAB : بداية يتم تحضير محلول DAB+، ثم يتم تطبيق محلول العمل بعد أن يزال المحلول الدّارئ الزائد عن العينة ويمسح حول العينة باتباع ما يلي: يضاف 200 ميكرون من المحلول حتى تغطّي العينة تماماً، ويحضان لمدة 5-15 دقيقة. هذا الكاشف بنّي اللّون لذلك تأخذ العينات إيجابية التلوّن لهذا الضد لونها بنياً، ثم تغسل العينة بلطف بالماء المقطّر مدة ١٥ دقيقة.

٧- التلوين المعاكس ب الهيماتوكسيلين: تغمر العينات بالهيماتوكسيلين مايرز لمدة دقيقة واحدة وتختلف المدّة حسب قوّة الهيماتوكسيلين المستخدم والفترة المنقضية منذ تحضيره ، ثم تغسل العينات جيداً بالماء المقطّر، ثم التجفيف بالكحول يليه الكزبول تماماً، كما أوردنا الطريقة في نهاية التلوين التقليدي وصولاً إلى الستر باستخدام بلسم كندا.

عند تلوين HPV تم اعتبار كل خلية اصطبغت نواتها باللون البني بشكل خفيف أو شديد أنها إيجابية التلون للفيروس الحليمي البشري المستخدم. الشكل (٢)

✓ التحاليل الإحصائية المستخدمة:

بالاعتماد على الحزمة الإحصائية للعلوم الاجتماعية (SPSS) النسخة ٢٥ لتحليل البيانات:

• الإحصاء الوصفي: لوصف العينة وخصائصها ومعرفة النسب المئوية والتكرارات للمتغيرات الديموغرافية والمتغيرات النسيجية.

• الاستقلال: عن طريق اختبار Chi-Square Independence Tests ويستخدم لتقييم

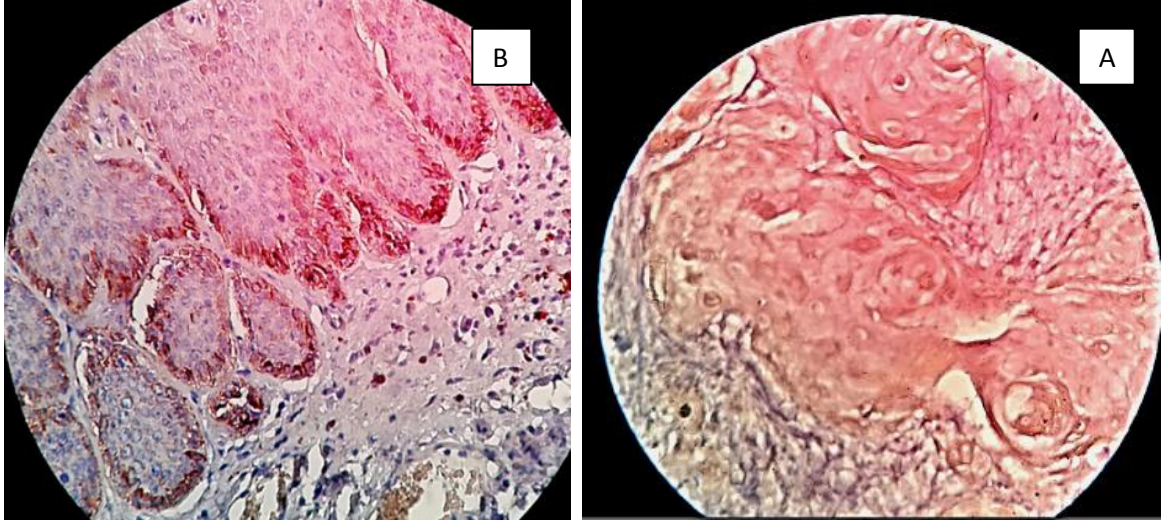
العلاقة بين متغيرين يؤثران في ظاهرة ما، حيث يمكن أن يكون المتغيران مستقلين أو مرتبطين.

النتائج والمناقشة: Results and Discussion

١- بلغت التعبيرية الإيجابية للفيروس 13.5% في العينة المؤلفة من ٨٩ مصاب بالسرطان الأنفي البلعومي وفق الجدول (٣)، وكان وجود الفيروس مستقل عن الإصابة بالسرطان الأنفي البلعومي

طالما أنّ الفيروس الحليمي البشري متورط في أمراضات العديد من سرطانات الرأس و العنق، فقد وجد أن النمط ١٦ بشكل خاص متهم بكونه العامل الأساسي في السرطانات شائكة الخلايا في منطقة الرأس و العنق، وقد أظهروا

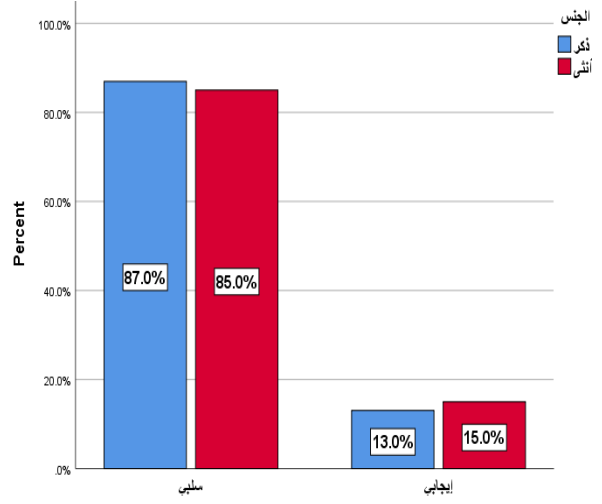
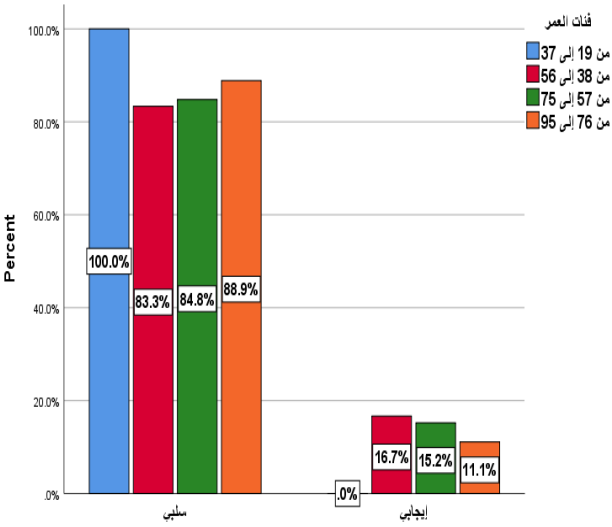
إنذاراً أفضل مقارنة بالمرضى المصابين بهذه السرطانات مع تعبيرية سلبية لهذا الفيروس [48, 49] ولذا تم اختيار هذا النمط عالي الخطورة للفيروس HPV لتحريره في السرطان الأنفي البلعومي، وطالما لم توجد لآن معايير موحدة عالمياً لتقييم الوجود الفيروسي في الخزعات المدمجة بالبارافين، اخترنا استخدام معايير التلوين المناعي النسيجي المتبعة في دراسات سابقة [٥٠]



الشكل (٢): تظهر الصورة (A) التلون المناعي النسيجي لكامل الجزر البشرية السرطانية بالملون الخاص بالفيروس الحليمي البشري، بينما تظهر الصورة (B) اقتصار التلون النووي على الطبقات القاعدية للبشرة .

جدول (٣) يبين تعبيرية الفيروس الحليمي البشري لأفراد العينة (٨٩) المصابين بالسرطان الانفي البلعومي

| المتغير | الفئة | التكرار | النسبة المئوية |
|---------------------|--------|---------|----------------|
| تعبيرية الفيروس HPV | إيجابي | 12 | 13.5% |
| | سلبي | 77 | 86.5% |

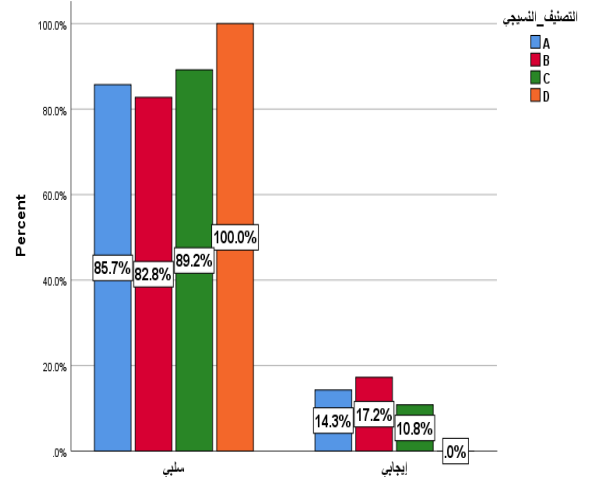
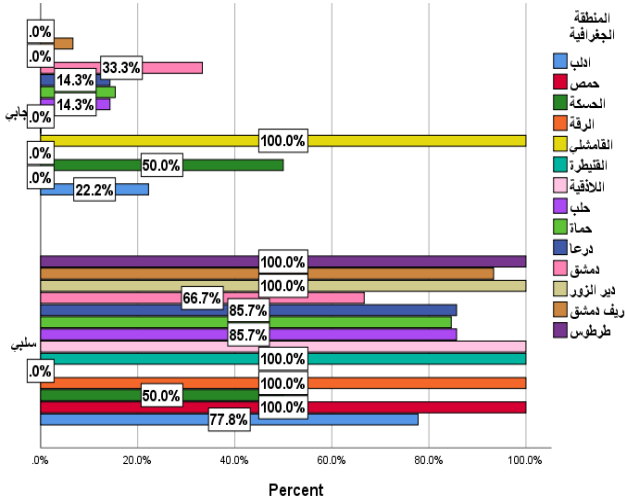


الشكل (٣): النسب المئوية لتعبيرية الفيروس HPV لكل من

الشكل (٤): النسب المئوية لتعبيرية الفيروس HPV حسب الفئة

الجنسين

العمرية



الشكل (٥): النسب المئوية لتعبيرية الفيروس HPV

الشكل (٦): النسب المئوية لتعبيرية الفيروس HPV

بحسب المناطق الجغرافية

بحسب الدرجة النسيجية

تبين الرسوم البيانية السابقة النسب المئوية لتعبيرية الفيروس HPV حسب المتغيرات الديموغرافية

والنسيجية للعينة n=89

تم ملاحظة أن الفيروس أبدى إيجابية في التعبير في ١٣.٥% من أصل ٨٥ حالة مدروسة كما هو موضح في الجدول رقم (٣)، وكانت هذه النسبة أقل من دراسات مشابهة وجدت النسبة ٥٠% [٥٠]، و يمكن أن يفسر الاختلاف في النتائج إلى الطرائق المتنوعة المتبعة لتحري تعبيرية الفيروس، وتصميم الدراسة أثناء

جمع العينة السرطانية إذ قد تجمع العينة بناء على وجود احتمال كبير لوجود للفيروس من خلال الفحص بالدراسة النسيجية التقليدية بداية، أو أنه تم جمعها بطريقة عشوائية [51].

٢-المجال العمري الذي وجدت فيه أعلى نسبة إيجابية للفيروس تراوح بين ٣٨ و ٥٦ بنسبة %16.7، بينما كانت الإصابات الأعلى لدى الإناث بنسبة %١٥، وتساوت نسبة التعبير الإيجابية والسلبية للمرضى في الحسكة، وكانت النسبة التعبيرية الإيجابية للمرضى المصابين بالفيروس HPV والسرطان الأنفي البلعومي هي الأعلى في القامشلي وبلغت %100 ولم نجد ارتباط للعمر أو الجنس أو المنطقة الجغرافية مع الإصابة بالفيروس بعد إجراء اختبار كاي مربع للاستقلال، الشكل (٣ و ٤ و ٦). اتفقت هذه الدراسة مع دراسة ستينمارك و زملاؤه حول استقلال الإصابة الفيروسية عن جنس المريض و كذلك حول استهداف العقد الرابع من العمر [٥١]، ومع الدراسة التي أجريت في المركز الطبي التابع للجامعة الأميركية في لبنان حول المعدل العمري الوسطي ٤٥ والذي يتشابه مع نتيجة الدراسة لدينا، علماً أن المرضى بمعظمهم من الجنسية اللبنانية و ٤ فقط سوريين ولم تتناول دراستهم الإصابة الفيروسية [٥٢] كما توافقت كذلك مع دراسات كل من براندون و زملائه حول كون العقد الرابع هو المستهدف بالإصابة [٥٣] بينما لم تتفق هذه الدراسة معها حول ميل الذكور للإصابة مقارنة بالإناث و قد يعود الاختلاف في ذلك إلى اختلاف طبيعة المجتمع المدروس، إذ تركز الدراسة المذكورة على مناطق آسيا وشمال أفريقيا التي تختلف فيها العادات الغذائية و التعرض للعوامل المؤهبة لهذا السرطان مقارنة بمجتمعنا المحلي و طبيعة غذاؤه.

3-من بين ٨٩ حالة مدروسة وجدنا ١٢ حالة مرتبطة بالتعبيرية الإيجابية للفيروس، وكان النمط غير المتقرن المتميز هو الأعلى بنسبة %١٧، يليها النمط المتقرن بنسبة %١٤ ثم غير المتقرن و غير المتميز بنسبة %١٠. الشكل (٥) اتفقت نتائج هذه الدراسة مع دراسة روبنسون و زملاؤه من حيث ظهور التعبيرية الإيجابية الأعلى للفيروس الحلبي عال الخطورة (١٦) في النمط غير المتقرن و المتميز [٥٤] و كذلك اتفقت مع دراسة ستينمارك الذي وضع ارتباط الإصابة الأعلى بالفيروس مع الدرجة الثانية وفق تصنيف منظمة الصحة العالمية بدون تحديد أي النمطين المتميز أو عدمه [٥١] و اتفقت كذلك مع دراسة أسانت و زملاؤه [٥٥]، بينما اختلفت مع دراسة إميلي وزملائها التي وجدت التعبيرية الأعلى للفيروس مرتبط بالنمط النسيجي الأول المتقرن حسب تصنيف منظمة الصحة العالمية [٥٦] يمكن تفسير الاختلاف في النتيجة إلى اختلاف الطرائق المتبعة في التحري عن الفيروس والتي تنوعت بين اختبار PCR In situ hybridization , والتلوين المناعي النسيجي والتي قد تتأثر جميعها بمدة تخزين الخزعات و مدة تثبيتها مما يعطي نتائج متغايرة، إضافة إلى التباين في حجم العينة.

الخلاصة: Conclusion

تبين من خلال هذه الدراسة أن نسبة التعبيرية المنخفضة للفيروس الحلبي البشري ضمن العينة المدروسة، وعدم ارتباط وجود الفيروس الحلبي البشري بالإصابة بالسرطان الأنفي البلعومي أو بالعمر أو الجنس، أو المنطقة الجغرافية للمرضى المصابين بالسرطان المذكور، بينما كانت الدرجة النسيجية النمط الثاني حسب تصنيف منظمة الصحة العالمية هو الأعلى ارتباطاً بوجود الفيروس

يوصى بالمزيد من الدراسات المشابهة التي تستقيض بدراسة هذا السرطان المنتشر لدينا رغم ندرته حول العالم، مع التركيز على الإنذار والمعالجات المطبقة على المرضى ودرجة تقدم المرض سريرياً من خلال الاستعانة بالتوثيق المتكامل في المراكز الصحية و المستشفيات بكل المحافظات واستخدام تقنيات مساعدة في التحري عن الفيروس المدروس لتطبيقها عملياً في تحري نمط وشدة العلاج السرطاني لتجنيب المريض الموت المحتمل بشكل أبكر، كما

يوصى بدراسة العادات الغذائية و أنماط الغذاء المرتبطة بالمجتمع السوري مع الإصابة بهذا السرطان كون العامل الغذائي من أهم العوامل المسببة له.

References:

١. LIU, F.F.;L. FRAPPIER;J. KIM;B. O'SULLIVAN;A. HUI; and C. BASTIANUTTO, *East-West Symposium on nasopharyngeal cancer*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2007, **67**(3): p. 703-8.
٢. K, S., Shanmugaratnam K. *Nasopharyngeal Origin and Structure in Cancer of the Nasopharynx*. 2007, p. 147-152.
٣. S, Y., *Histology of nasopharyngeal cancer.*, in *Cancer of the Nasopharynx*, 2006, p. 147-152.
٤. LO, K.W.;J. KWONG;A.B. HUI;S.Y. CHAN;K.F. TO;A.S. CHAN;L.S. CHOW;P.M. TEO;P.J. JOHNSON; and D.P. HUANG, *High frequency of promoter hypermethylation of RASSF1A in nasopharyngeal carcinoma*. Cancer Res, 2001, **61**(10): p. 3877-81.
٥. LO, K.W.;P.M. TEO;A.B. HUI;K.F. TO;Y.S. TSANG;S.Y. CHAN;K.F. MAK;J.C. LEE; and D.P. HUANG, *High resolution allelotype of microdissected primary nasopharyngeal carcinoma*. Cancer Res, 2000, **60**(13): p. 3348-53.
٦. CHAN, A.S.;K.F. TO;K.W. LO;K.F. MAK;W. PAK;B. CHIU;G.M. TSE;M. DING;X. LI;J.C. LEE; and D.P. HUANG, *High frequency of chromosome 3p deletion in histologically normal nasopharyngeal epithelia from southern Chinese*. Cancer Res, 2000, **60**(19): p. 5365-70.
٧. LO, K.W.;S.T. CHEUNG;S.F. LEUNG;A. VAN HASSELT;Y.S. TSANG;K.F. MAK;Y.F. CHUNG;J.K. WOO;J.C. LEE; and D.P. HUANG, *Hypermethylation of the p16 gene in nasopharyngeal carcinoma*. Cancer Res, 1996, **56**(12): p. ٢٧٢١-٢٧٢١.
٨. RAAB-TRAUB, N., *Epstein-Barr virus in the pathogenesis of NPC*. Semin Cancer Biol, 2002, **12**(6): p. 431-41.
٩. TAKESHITA, H.;M. FURUKAWA;S. FUJIEDA;H. SHOUJAKU;T. OOKURA;M. SAKAGUCHI;H. ITO;H. MINETA;T. HARADA;H. MATSUURA; and H. SAITO, *Epidemiological research into nasopharyngeal carcinoma in the Chubu region of Japan*. Auris Nasus Larynx, 1999, **26**(3): p. 277-86.
١٠. SUN, L.M.;M. EPPLEIN;C.I. LI;T.L. VAUGHAN; and N.S. WEISS, *Trends in the incidence rates of nasopharyngeal carcinoma among Chinese Americans living in Los Angeles County and the San Francisco metropolitan area, 1992-2002*. Am J Epidemiol, 2005, **162**(12): p. 1174-8.
١١. TURKOZ, F.P.;G. CELENKOGLU;G.G. DOGU;M.E. KALENDER;U. COSKUN;N. ALKIS;M. OZKAN;H.M. TURK; and U.Y. ARSLAN, *Risk factors of nasopharyngeal carcinoma in Turkey-an epidemiological survey of the Anatolian Society of Medical Oncology*. Asian Pac J Cancer Prev, 2011, **12**(11): p. 3017-21.
١٢. WANG, Y.;Y. ZHANG; and S. MA, *Racial differences in nasopharyngeal carcinoma in the United States*. Cancer Epidemiol, 2013, **37**(6): p. 793-802.
١٣. SPANO, J.P.;P. BUSSON;D. ATLAN;J. BOURHIS;J.P. PIGNON;C. ESTEBAN; and J.P. ARMAND, *Nasopharyngeal carcinomas: an update*. Eur J Cancer, 2003, **39**(15): p. 2121-35.

١٤. ADHAM, M.;A.N. KURNIAWAN;A.I. MUHTADI;A. ROEZIN;B. HERMANI;S. GONDHOWIARDJO;I.B. TAN; and J.M. MIDDELDORP, *Nasopharyngeal carcinoma in Indonesia: epidemiology, incidence, signs, and symptoms at presentation*. Chin J Cancer, 2012, **31**(4): p. 185-96.
١٥. HO, J.H., *Nasopharyngeal carcinoma) NPC*. Adv Cancer Res, 1972, **15**: p. 57-92.
١٦. PETERSSON, F., *Nasopharyngeal carcinoma: a review*. Semin Diagn Pathol, 2015, **32**(1): p. 54-73.
١٧. SHANMUGARATNAM K, S.L.H., BARNES L, *World Health Organization histological classification of tumours. Histological typing of tumours of the upper respiratory tract and ear, 2nd edn. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1991; pp:32-33*. 1991: p. pp:32-33.
١٨. CHAN JKC, B.F., MCCARRON P, ET AL. *Nasopharyngeal carcinoma. WHO calssification of tumours :Pathology and genetics of head and neck tumours*. Lyon: IARC press 2005; 85-97.[
١٩. ZHI LI, Y.S.Z., *Review of the histological classification of nasopharyngeal carcinoma*. J Nasopharyng Carcinoma, 2014.
٢٠. JKL,C., *Nasopharyngeal carcinoma. Who calssification of tumours:Pathology and genetic of head and neck tumours*. 2005: p. 85-97.
٢١. SUGANO, H.;G. SAKAMOTO;S. SAWAKI; and T. HIRAYAMA, *Histopathological types of nasopharyngeal carcinoma in a low-risk area: Japan*. IARC Sci Publ, 1978(20): p. 27-39.
٢٢. WEILAND, L.H., *The histopathological spectrum of nasopharyngeal carcinoma*. IARC Sci Publ, 1978(20): p. 41-50.
٢٣. PIZZO PA, P.D., *Principle and practice of pediatric oncology*. 1997.
٢٤. BANKS, E.R.;H.F. FRIERSON, JR.;S.E. MILLS;E. GEORGE;R.J. ZARBO; and P.E. SWANSON, *Basaloid squamous cell carcinoma of the head and neck. A clinicopathologic and immunohistochemical study of 40 cases*. Am J Surg Pathol, 1992, **16**(10): p. 939-46.
٢٥. MULLER, E. ;and E. BELEITES, *The basaloid squamous cell carcinoma of the nasopharynx*. Rhinology, 2000, **38**(4): p. 208-11.
٢٦. PAULINO, A.F.;B. SINGH;J.P. SHAH; and A.G. HUVOS, *Basaloid squamous cell carcinoma of the head and neck*. Laryngoscope, 2000, **110**(9): p. 1479-82.
٢٧. WAN, S.K.;J.K. CHAN;W.H. LAU; and T.T. YIP, *Basaloid-squamous carcinoma of the nasopharynx. An Epstein-Barr virus-associated neoplasm compared with morphologically identical tumors occurring in other sites*. Cancer, 1995, **76**(10): p. 1689-93.
٢٨. BERNARD, H.U.;R.D. BURK;Z. CHEN;K. VAN DOORSLAER;H. ZUR HAUSEN; and E.M. DE VILLIERS ,*Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments*. Virology, 2010, **401**(1): p. 70-9.
٢٩. SCHILLER, J.T. ;and D.R. LOWY, *Understanding and learning from the success of prophylactic human papillomavirus vaccines*. Nat Rev Microbiol, 2012, **10**(10): p. 681-92.
٣٠. CHEN, X.S.;R.L. GARCEA;I. GOLDBERG;G. CASINI; and S.C. HARRISON, *Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16*. Mol Cell, 2000, **5**(3): p. 557-67.
٣١. CHEN, X.S.;G. CASINI;S.C. HARRISON; and R.L. GARCEA, *Papillomavirus capsid protein expression in Escherichia coli: purification and assembly of HPV11 and HPV16 L1*. J Mol Biol, 2001, **307**(1): p. 173-82.

- .٣٢ MODIS, Y.;B.L. TRUS; and S.C. HARRISON, *Atomic model of the papillomavirus capsid*. EMBO J, 2002, **21**(18): p. 4754-62.
- .٣٣ WOLF, M.;R.L. GARCEA;N. GRIGORIEFF; and S.C. HARRISON, *Subunit interactions in bovine papillomavirus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, **107**(14): p. 6298-303.
- .٣٤ RUBIO, I.;H. SEITZ;E. CANALI;P. SEHR;A. BOLCHI;M. TOMMASINO;S. OTTONELLO; and M. MULLER, *The N-terminal region of the human papillomavirus L2 protein contains overlapping binding sites for neutralizing, cross-neutralizing and non-neutralizing antibodies*. Virology, 2011, **409**(2): p. ٥٩-٣٤٨ .
- .٣٥ COGLIANO, V.;R. BAAN;K. STRAIF;Y. GROSSE;B. SECRETAN; and F. EL GHISSASSI, *Carcinogenicity of human papillomaviruses*. Lancet Oncol, 2005, **6**(4): p. 204.
- .٣٦ SPURGEON, M.E. ;and P.F. LAMBERT, *Human Papillomavirus and the Stroma: Bidirectional Crosstalk during the Virus Life Cycle and Carcinogenesis*. Viruses, 2017, **9**(8).
- .٣٧ D'SOUZA, G.;A.R. KREIMER;R. VISCIDI;M. PAWLITA;C. FAKHRY;W.M. KOCH;W.H. WESTRA; and M.L. GILLISON, *Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer*. N Engl J Med, 2007, **356**(19): p. 1944-56.
- .٣٨ HOOTS, B.E.;J.M. PALEFSKY;J.M. PIMENTA; and J.S. SMITH, *Human papillomavirus type distribution in anal cancer and anal intraepithelial lesions*. Int J Cancer, 2009, **124**(10): p. 2375-83.
- .٣٩ MUNOZ, N.;F.X. BOSCH;X. CASTELLSAGUE;M. DIAZ;S. DE SANJOSE;D. HAMMOUDA;K.V. SHAH; and C.J. MEIJER, *Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective*. Int J Cancer, 2004, **111**(2): p. 278-85.
- .٤٠ MAXWELL, J.H.;B. KUMAR;F.Y. FENG;J.B. MCHUGH;K.G. CORDELL;A. EISBRUCH;F.P. WORDEN;G.T. WOLF;M.E. PRINCE;J.S. MOYER;T.N. TEKNOS;D.B. CHEPEHA;J. STOERKER;H. WALLINE;T.E. CAREY; and C.R. BRADFORD, *HPV-positive/p16-positive/EBV-negative nasopharyngeal carcinoma in white North Americans*. Head Neck, 2010, **32**(5): p. 562-7.
- .٤١ DOGAN, S.;M.L. HEDBERG;R.L. FERRIS;T.J. RATH;A.M. ASSAAD; and S.I. CHIOSEA, *Human papillomavirus and Epstein-Barr virus in nasopharyngeal carcinoma in a low-incidence population*. Head Neck, 2014, **36**(4): p. 511-6.
- .٤٢ SINGHI ,A.D.;J. CALIFANO; and W.H. WESTRA, *High-risk human papillomavirus in nasopharyngeal carcinoma*. Head Neck, 2012, **34**(2): p. 213-8.
- .٤٣ MCGOVERN, S.L.;M.D. WILLIAMS;R.S. WEBER;A. SABICHI;M.S. CHAMBERS;J.W. MARTIN; and K.S. CHAO, *Three synchronous HPV-associated squamous cell carcinomas of Waldeyer's ring: case report and comparison with Slaughter's model of field cancerization*. Head Neck, 2010, **32**(8): p. 1118-24.
- .٤٤ JOSEPH, A.W.;T. OGAWA;J.A. BISHOP;S. LYFORD-PIKE;X. CHANG;T.H. PHELPS;W.H. WESTRA; and S.I. PAI, *Molecular etiology of second primary tumors in contralateral tonsils of human papillomavirus-associated index tonsillar carcinomas*. Oral Oncol, 2013, **49**(3): p. 244-8.
- .٤٥ WESTRA, W.H., *Detection of human papillomavirus (HPV) in clinical samples: evolving methods and strategies for the accurate determination of HPV status of head and neck carcinomas*. Oral Oncol, 2014, **50**(9): p. 771-9.
- .٤٦ MIRGHANI, H.;F. AMEN;F. MOREAU;J. GUIGAY;M. FERCHIOU;A.E. MELKANE;D.M. HARTL; and J. LACAU ST GUILY, *Human papilloma virus testing in*

- oropharyngeal squamous cell carcinoma: what the clinician should know*. Oral Oncol, 2014, **50**(1): p. 1-9.
٤٧. CHAN JKC, P.B., BRAY F, ET AL. ;and *Nasopharyngeal carcinoma*. 2005: p. 85-97.
٤٨. ANG, K.K.;J. HARRIS;R. WHEELER;R. WEBER;D.I. ROSENTHAL;P.F. NGUYEN-TAN;W.H. WESTRA;C.H. CHUNG;R.C. JORDAN;C. LU;H. KIM;R. AXELROD;C.C. SILVERMAN;K.P. REDMOND; and M.L. GILLISON, *Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer*. N Engl J Med, 2010, **363**(1): p. 24-35.
٤٩. GILLISON, M.L.;W.M. KOCH;R.B. CAPONE;M. SPAFFORD;W.H. WESTRA;L. WU;M.L. ZAHURAK;R.W. DANIEL;M. VIGLIONE;D.E. SYMER;K.V. SHAH; and D. SIDRANSKY, *Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers*. J Natl Cancer Inst, 2000, **92**(9): p. 709-20.
٥٠. WALLINE, H.M.;C. KOMARCK;J.B. MCHUGH;S.A. BYRD;M.E. SPECTOR;S.J. HAUFF;M.P. GRAHAM;E. BELLILE;J.S. MOYER;M.E. PRINCE;G.T. WOLF;D.B. CHEPEHA;F.P. WORDEN;M.H. STENMARK;A. EISBRUCH;C.R. BRADFORD; and T.E. CAREY, *High-risk human papillomavirus detection in oropharyngeal, nasopharyngeal, and oral cavity cancers: comparison of multiple methods*. JAMA Otolaryngol Head Neck Surg, 2013, **139**(12): p. 1320-7.
٥١. STENMARK, M.H.;J.B. MCHUGH;M. SCHIPPER;H.M. WALLINE;C. KOMARCK;F.Y. FENG;F.P. WORDEN;G.T. WOLF;D.B. CHEPEHA;M.E. PRINCE;C.R. BRADFORD;S.K. MUKHERJI;A. EISBRUCH; and T.E. CAREY, *Nonendemic HPV-positive nasopharyngeal carcinoma: association with poor prognosis*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2014, **88**(3): p. 580-8.
٥٢. GEARA, F.B.;E. NASR;S.L. TUCKER;E. BRIHI;G. ZAYTOUN;U. HADI;Z. SALEM;N. EL SAGHIR;P. ISSA; and A. SHAMSEDDINE, *Nasopharyngeal cancer in the Middle East: experience of the American University of Beirut Medical Center*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2005, **61**(5): p. 1٠٥-٤٠٨
٥٣. PETERSON, B.R. ;and B.L. NELSON, *Nonkeratinizing undifferentiated nasopharyngeal carcinoma*. Head Neck Pathol, 2013, **7**(1): p. 73-5.
٥٤. ROBINSON, M.;Y.E. SUH;V. PALERI;D. DEVLIN;B. AYZAZ;L. PERTL; and S. THAVARAJ, *Oncogenic human papillomavirus-associated nasopharyngeal carcinoma: an observational study of correlation with ethnicity, histological subtype and outcome in a UK population*. Infect Agent Cancer, 2013, **8**(1): p. 30.
٥٥. ASANTE, D.B.;R.H. ASMAH;A.A. ADJEI;F. KYEI;D.L. SIMPONG;C.A. BROWN ;and R.K. GYASI, *Detection of Human Papillomavirus Genotypes and Epstein-Barr Virus in Nasopharyngeal Carcinomas at the Korle-Bu Teaching Hospital, Ghana*. ScientificWorldJournal, 2017, **2017**: p. 2721367.
٥٦. LO, E.J.;D. BELL;J. WOO;G. LI;E.Y. HANNA;A.K. EL-NAGGAR; and E.M. STURGIS, *Human papillomavirus & WHO type I nasopharyngeal carcinoma*. Laryngoscope, 2010, **120 Suppl 4**: p. S185.