

УНИВЕРЗИТЕТ „СВ. КИРИЛ И МЕТОДИЈ“
СТОМАТОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ - СКОПЈЕ
Република Македонија

Д-р Лицијата Веќева - Веѓети

ДИФЕРЕНЦИЈА И ТИПИЗАЦИЈА НА ХУМАНИ ПАПИЛОМА ВИРУСИ (HPV)
КАЈ ОРАЛНИТЕ ПРЕКАНЦИРОСИ ДЕННИ
-докторска дисертација-

Скопје, 2017

**УНИВЕРЗИТЕТ „СВ. КИРИЛ И МЕТОДИЈ„
СТОМАТОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ- СКОПЈЕ
Република Македонија**

Д- р Линдита Зендели- Беџети

**ДЕТЕКЦИЈА И ТИПИЗАЦИЈА НА ХУМАН ПАПИЛОМА ВИРУСОТ(ХПВ)
КАЈ ОРАЛНИТЕ ПРЕКАНЦЕРОЗНИ ЛЕЗИИ
-докторска дисертација-**

Скопје, 2017

НАСЛОВ: „Детекција и типизација на хуман папилома вирусот (ХПВ) кај оралните преканцерозни лезии,,

ДОКТОРАНД: Д-р спец. Линдита Зендели-Беџети, м-р сци

МЕНТОР: Проф. д-р Мирјана Поповска

НАУЧНА ОБЛАСТ: СТОМАТОЛОГИЈА- Орална патологија и пародонтологија

ДАТА НА ЈАВНАТА ОДБРАНА: 10.05.2017

КОМИСИЈА ЗА ОДБРАНА НА ДОКТОРСКАТА ДИСЕРТАЦИЈА:

1. Проф. д-р Киро Ивановски, претседател
2. Проф. д-р Мирјана Поповска, ментор
3. Проф. д-р Анета Атанасовска- Стојановска, член
4. Проф. д-р Весна Антовска, член
5. Проф. д-р Ана Миновска, член

БЛАГОДАРНОСТ

До мојот ментор проф. д-р Мирјана Поповска, за нејзината посветеност, научниот ангажман и ентузијазам и секако за искажаната доверба.

До д-р сци. Сотерија Дувлис, за стручната соработка во молекуларната дијагностика, како и за бројните консултации и сугестии.

До вработените на Клиниката за болести на устата и пародонтолот, кои на било кој начин дадоа придонес во реализацијата на оваа докторска дисертација.

До моите родители, за поддршката, ентузијазмот и мотивацијата во текот на целото мое образование.

До сопругот Блерим и најмилите Рон и Лир, за разбирањето, љубовта и секојдневната инспирација.

СОДРЖИНА

ВОВЕД.....	12
ПРЕГЛЕД НА ЛИТЕРАТУРАТА.....	21
ЦЕЛ.....	31
МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД.....	34
РЕЗУЛТАТИ.....	47
ДИСКУСИЈА.....	106
ЗАКЛУЧОЦИ.....	132
ЛИТЕРАТУРА.....	136

КРАТКА СОДРЖИНА

Вовед: Оралните преканцерозни лезии (ОПЛ) се последица на низа молекуларни и клеточни промени кои претходат на клинички видливите алтерации на оралната лигавица. Во последните децении инфективниот агенс, особено ХПВ, се почесто се поврзува со етиологијата на овие лезии како ризик фактор односно се смета дека дел од овие лезии се поврзани и со инфекцијата со ХПВ.

Цел: Одредување на ХПВ статусот кај оралните преканцерозни лезии како и генотипизација на детектираните типови на ХПВ, проследување на најчестите цитоморфолошки промени асоцирани со ХПВ статусот, одредување на индексот на матурација на клетките во однос на ХПВ инфекцијата, одредување на онкогената активност на детектираните типови на ХПВ (E6/E7- mRNA), како и одредување на влијанието на демографските фактори (возраст, пол), навики, главни тегоби, системски болести, пародонтолошкиот статус и оралното здравје во однос на оралната ХПВ инфекција.

Материјал и метод: Спроведено е клиничко, молекуларно и цитоморфолошко испитување на Клиниката за болести на устата и пародонтот при Универзитетскиот стоматолошки клинички центар „Св. Пантелејмон,- Скопје, Република Македонија, Институтот за јавно здравје при Медицинскиот факултет во Скопје, Клиниката за гинекологија и акушерство при Медицинскиот факултет во Скопје како и во цитолошката лабораторија при ПЗУ “Св. Мина”- Скопје.

Во студијата учествуваа 80 испитаници ($n=80$), од двата пола. Кај 40 пациенти, средна вредност 51.87 ($SD \pm 6.08$), констатирано е присуство на орални премалигни лезии, и тие ја сочинија групата со орални премалигни лезии (со ОПЛ). Контролната група е составена од пациенти, одбрани по случаен избор ($n=40$), средна возраст 53.02 ($SD \pm 4.9$), и без видливи промени на оралната лигавица (без ОПЛ).

Сите пациенти одговорија на структуриран прашалник кој содржеше прашања за демографските карактеристики (возраст, пол, степен на образование, навики,

социјални услови, пушење, алкохол, системски заболувања, фамилијарна и социјална анамнеза, брачен статус), одредени се и клиничките пародонтолошки параметри и орално- хигиенскиот статус.

За детекција и типизација на ХПВ- ДНК како и за цитолошката анализа земен е брис од оралната лигавица со техника на ексфолијативна „браш“, цитологија. Анализите се реализирани со полимеразна верижна реакција (PCR). Одредено е присуството на вирусните Е6/Е7 онкогени протеини во испитуваниот материјал.

Цитолошкото испитување опфати детекција и класификација на мајорни и минорни цитоморфолошки промени патогномични за ХПВ инфекцијата.

Статистичката анализа на податоците од истражувањето е реализирана со примена на дескриптивно- статистички и аналитички статистички методи на компјутерските софтвери Statistika 7.1 и SPSS 19.0 (Statistical Package for Social Sciences, 19.0)

Резултати: Во испитуваниот примерок се вклучени вкупно 80 (100.0%) пациенти на возраст од 39- 61 година, со просечна возраст 52.45 (SD± 5,56). Кај 40 пациенти (50.0%) се евидентирани следниве орални преканцерозни лезии: лихен планус 77.5% (31/40), леукоплакија 10% (4/40), актинична кератоза 10% (4/40) и еритроплакија 2.5% (1/40).

ХПВ- ДНК е детектиран кај 30.0% од пациентите од испитуваната група со орални лезии (12/40) и кај 2.5% пациенти од групата без орални лезии (1/40). Разликата помеѓу ХПВ позитивните и негативните пациенти кај групата со орални лезии е статистички сигнификантна ($\chi^2 = 6.4$ и $p = 0.0114$).

Разликата помеѓу ХПВ позитивните примероци во однос на топографијата е статистички сигнификантна ($\chi^2 = 11.33$ и $p = 0.0101$), со најголема застапеност на ХПВ позитивните лезии на образната лигавица со билатерална локализација на промените.

Генотипизацијата ги детектира следните генотипови на ХПВ: ХПВ 16, ХПВ 18, ХПВ 56 и ХПВ 31. Констатирано е присуство на ХПВ 16 кај 6(15%) пациенти (6/40), HPV

56 кај 4(10.0%) пациенти (4/40), и HPV 18 кај 2(5.0%) пациенти (2/40), додека 28 (70.0%) (28/40) пациенти резултираа ХПВ негативни.

E6/E7 mRNA активност не е регистрирана кај ниеден испитаник, независно во која група припаѓа (со или без ОПЛ), односно независно од клиничкиот наод или возрасната и полова дистрибуција.

Цитолошкиот наод евидентира застапеност на мајорната алтерација коилоцитозата кај 12.5% примероци, дискератоза кај 15.0%, хиперкератоза кај 20.0%, бинуклеација кај 5.0% и кератохијалински гранули се евидентирани кај 15.0% од примероците.

Разликата за матурациониот индекс помеѓу ХПВ позитивните и ХПВ негативните примероци кај парабазалните, суперфицијалните и кај интермедиерните не е статистички сигнификантна ($p > 0.05$).

Заклучоци: Оралните преканцерозни лезии асоцираат со ХПВ. Детектираните ХПВ типови, вклучувајќи го и тој од здрава орална лигавица, припаѓаат на високоризичните ХПВ.

Позитивниот ХПВ статус не асоцира со абнормалната цитологија типична за ХПВ инфекцијата. Оралните преканцерозни лезии не се клиничка манифестација на ХПВ инфекцијата, но долгата перзистенција на високоризичните ХПВ може да влијае на клиничкиот тек на лезијата.

Клучни зборови: Хуман папилома вирус, орални преканцерозни лезии, полимеразна верижна реакција, генотипизација, цитоморфолошки промени

Detection and typisation of Human papillomavirus (HPV) in oral precancerous lesions

Abstract

Introduction: Oral precancerous lesions (OPL) and numerous alterations of the oral mucosa are a consequence of numerous of molecular and cytological alterations. Infective agent's especially oncogenic types of Human papillomaviruses (HPVs), in particular, have been directly associated with the malignant transformation of oral lesions thus have been reported as possible risk factors or cofactors in the etiology of oral lesions.

Aim: To determine the association of different HPV types with oral premalignant lesions and genotyping of the detected types of HPV, to identify the most frequent cytomorphologic alterations common for HPV infection, to determine the oncogene activity through detection of E6/E7- mRNA, as well as the role of demographic features (age, gender, habits, systemic diseases) as well as periodontal status and oral health in relation to HPV infection.

Material and methods: Clinical, molecular and cytomorphologic study was conducted at the Department of oral pathology and periodontology, University Dental Clinical Centre „St. Panteleimon“- Skopje, Institute of Public Health- Faculty of Medicine- Skopje, Obstetrics and Gynecologic Clinic-Faculty of Medicine- Skopje and Cytological laboratory of PHO “St. Mina”- Skopje.

In total eighty patients (mean age 52.45, SD± 5. 56), of both genders, 19 males (23.75%) and 61 females (76.25%) enrolled the study. Patients diagnosed with oral premalignant lesions (leukoplakia, erythroplakia, actinic keratosis and lichen planus) comprised the study group with OPL (n=40) thus another group of 40 patients with healthy oral mucosa comprised the control group without OLP. All the patients answered a structured questionnaire considering demographic features as well as habits (age, gender, educational level, social conditions, alcohol, and smoking). Clinical periodontal parameters were registered as well.

Sampling was performed with the method of "cyto-brush" technique, by taking two smears, one from the lesion and another one from healthy mucosa of the same patient, as a control. Detection and genotyping of the detected HPV types was performed by qualitative real-time HPV typing PCR-test. Detection of viral E6/E7 proteins was performed as well.

Cytological examination included detection of major and minor cytomorphological alterations pathognomic for the HPV infection.

Data were statistically analyzed by descriptive and analytical methods with softwares Statistika 7.1 and SPSS 19.0 (Statistical Package for Social Sciences, 19.0)

Results: In total 80 patients (100.0%) aged 39-61, mean age 52.45, $SD \pm 5.56$, of both genders, enrolled the study. Among 40 patients (50.0%) were detected oral premalignant lesions: lichen planus 77.5% (31/40), leukoplakia 10% (4/40), actinic keratosis 10% (4/40) and erythroplakia 2.5% (1/40).

The HPV- DNA was detected among 30% of cases from the study group (12/40) and 2.5% (1/40) in the control group. The difference between HPV positive and negative cases in the group with oral lesions was statistically significant ($\chi^2 = 6.4$ и $p = 0.0114$).

The difference for topography between the HPV positive and negative cases was statistically significant ($\chi^2 = 11.33$ и $p = 0.0101$), with dominance of HPV positive samples from the buccal mucosa with bilateral distribution of the lesions.

The results revealed the presence of HPV 16 in 15% (6/40), HPV 56 in 10% (4/40), and HPV 18 in 5% (2/40) of cases, and HPV 31 in 1 case (2.5%) from the control group. E6/E7 mRNA activity resulted negative in all the of the cases.

Cytological examination revealed the presence of the following alterations koilocytosis (12.5%) of the samples, dyskeratosis (15%), hyperkeratosis (20%), binucleation (5%) and keratohyalin granules in 15% of the samples. The difference for the epithelial maturation index between HPV positive and negative cases wasn't statistically significant for all the layers (parabasal, intermedier and superfitial) ($p > 0.05$).

Conclusion: Oral premalignant lesions associate with the HPV infection. The detected HPV belong to high-risk types, including the one from healthy mucosa as well. HPV positivity doesn't associate with abnormal cytological findings.

Although HPVs don't play a role in initiating development of premalignant lesions, long persistence of the high-risk HPV types might influence the clinical course of the oral lesions.

Key words: Human papillomavirus, oral premalignant lesion, polymerase chain reaction, genotyping, cytomorphologic alterations

ВОВЕД

1. ВОВЕД

Оралните преканцерозни лезии (ОПЛ) се последица на низа молекуларни и клеточни промени кои претходат на клинички видливите алтерации на оралната лигавица. Трансформацијата на нормалната мукоза во орален сквамозен карцином се поврзува со појавата на преканцерозна лезија, оттука оралните преканцерозни лезии се сметаат за прекурсор лезии кои имаат висок потенцијал за малигна алтерација.^{1,2}

Во клиничкиот пристап кон дијагностицирана преканцерозна лезија неопходно е проследувањето на клиничкиот тек на лезијата, односно препознавање и разграничување на лезиите кои имаат предиспозиција малигно да алтерираат.³ Во тој поглед, се смета дека добар дел од овие лезии во одреден временски период ќе се трансформираат во малигно заболување, најчесто во орален сквамозен клеточен карцином. Стапката на преживување кај овие малигни заболувања е ниска, односно помалку од 50% во период од 5 години, пред се поради ненавременото дијагностицирање.⁴

Бројот на лица заболени од карциноми на глава и врат е во пораст, наспроти податокот за значително намалување на бројот на пушачи, што најавува дека други фактори може да имаат улога во нивната карциногенеза.⁵

Мултикаузалната етиологија и комплексна генеза на оралните преканцерозни лезии се една од причините за задоцнето дијагностицирање како и адекватен тераписки приод. До неодамна ОПЛ како што се леукоплакија, еритроплакија, лихен планус како и оралните карциноми беа тесно асоцирани со употреба на алкохолот и пушењето, како "класични" ризик фактори. Како можни ризик фактори се посочуваат и радиоактивноста, траума, лоша орална хигиена, возраста и многу други.^{6,7,8}

Во последните децении инфективниот агенс, особено ХПВ, се почесто се поврзува со етиологијата на овие лезии како ризик фактор односно се смета дека дел од овие лезии се поврзани и со инфекцијата со ХПВ.⁹ Оттука бројни истражувања во последните декади поставија за цел да одговорот на прашањето дали инфекцијата со ХПВ може да има улога во овој процес.

Високоризичните ХПВ покрај тоа што се посочуваат како фактори но и кофактори на ризик за појава на преканцерозни лезии, се смета дека имаат улога и во малигната трансформација на тие лезии како последица на континуирана експресија на постоечкиот онкоген потенцијал. Асоцијација помеѓу оралните премалигни лезии и оралниот сквамозен клеточен карцином со ХПВ, како и докажувањето на присуството на ХПВ кај орофариенгалните карциноми, означува почеток на ново поле на истражување и секако го пренасочи вниманието кон значењето и улогата на ХПВ како ризик фактор.^{10,11}

Бројни студии укажаа на асоцираност и присуството на ХПВ- ДНК кај пациенти со орални лезии што придонесе Хуман папилома вирусот да биде признаен и како етиолошки фактор на овие заболувања од страна на Меѓународната агенција за испитување на карциноми, (IARC, International Agency of Research of Cancer, 2011).^{12,13}

Онкогените ХПВ типови стимулираат трансформација на епителните клетки кај афектираната генитална и респираторна мукоза што резултира во малигна алтерација на тие лезии, вклучувајќи го и оралниот малигнитет, со висока стапка на морбидитет и морталитет, што секако претставува значаен здравствен проблем во светски рамки. Рана детекција на таквите клеточни отстапувања е есенцијално во идентификација на ран стадиум на карцином.^{14,15,16,17}

Се смета дека 99% од ХПВ инфекциите кај карциноми на глава и врат припаѓаат на високоризичните ХПВ типови и тоа тип 16, 18, 31 и 33. Инфекцијата со ХПВ 33 е застапена кај 10% од позитивните тумори, додека ХПВ16 е најчест присутен тип. Кај орофарингеалните тумори ХПВ 16 е застапен со 78-100% од позитивните примероци, додека ХПВ е откриен кај 18 (1%) од случаевите.^{18,19}

Покрај констатацијата дека група на орални карциноми и орофарингеални карциноми се асоцирани со ХПВ инфекцијата, улогата на ХПВ кај оралните преканцерозни лезии бара понатамошни истражувања и интерпретации како и повисок степен на внимание.²⁰

Независно од различните дијагностички методи, истражувањата главно констатирале поврзаност помеѓу оралните преканцерозни лезии со ХПВ инфекцијата, со што се констатира ХПВ позитивитет кој во одредени случаи кај леукоплакичните лезии варира од 17.6%- 80.0%, односно ХПВ- ДНК е детектиран кај 7/8 ретикуларни форми на лихен планус и 19.7% лезии од типот на лихен планус.^{21,22}

Истражување базирано на ниво на популација покажало дека оралната ХПВ инфекција сигнификантно асоцира со машкиот пол, со 10.1% кај машки и 3.6% кај лица од женски пол.²³ Значајно помалку ХПВ- ДНК е детектиран кај пушачи²⁴, и не е констатирана поврзаност помеѓу употребата на алкохол и ХПВ позитивитетот.²⁵

Постојат сознанија дека варијациите во преваленцијата и инциденцата на оралната ХПВ инфекција се должат на различните техники за детекција, малиот број примероци, типот на испитуваните лезии и техниките на земање брис, и секако од епидемиолошките карактеристики на испитуваната популација.²⁶ Фактот е научно докажан со примероци земени од здрава лигавица со методот на дот-блот хибридизација. Наодите резултирале со позитивитет кај 3.8% од испитаниците додека со посензитивен метод како што е полимеразна верижната реакција дури 29.4% од испитаниците биле позитивни на ХПВ.^{27,28}

Во тој поглед, ХПВ асоцираните инфекции како и можната улога на овој вирус во етиопатогенезата на оралните преканцерозни лезии и нивна малигна трансформација, ја зголемува потребата од проценка на клиничките и биолошки аспекти на овој вирус како и детерминирање на ХПВ статусот кај различни орални лезии.

Хумани папилома вирусите (ХПВ) се фамилија на мали, необвиткани, мошне инфективни вируси, со дијаметар од 55nm, со единечен и циркуларенна двоверижен ДНК геном. ДНК геномот е организиран во осум рамки за „вчитување“, кои се групирани во “рани”, “early” (E), рамки за вчитување, во литературата познати и како отворени рамки за вчитување (open reading frames ORF), кои кодираат за неструктуралните регулаторни протеини E1, E2, E4, E5, E6 и E7, и “доцни”, “late” (L) рамки (ORF) кои ги

кодираат капсидните протеини L1 и L2. Покрај кодирачките рамки постои и некодирачки сегмент, „long control region” (LCR) кој содржи елементи неопходни за регулација на транскрипцијата и ДНК репликацијата.²⁹

E2 има улога на потиснување на активноста на E6/E7 промоторот. Оттука интеграција на ХПВ- ДНК во клеточниот геном што се случува кај некои ХПВ асоцирани малигни заболувања ја прекинува E2 отворената рамка за кодирање што води кон потиснување на E2 функцијата со што се овозможува слободна трансактивација на E6/E7 промоторот преку фактори на клеточна трансмисија. Тоа предизвикува потенцирана експресија на E6 и E7 онкопротеините кои имаат улога во зголемување на клеточната пролиферација како и во продолжување на клеточниот циклус кај ХПВ асоцираните малигни состојби, односно предизвикуваат деградација на p53 тумор- супресивниот протеин како и инактивација на Pб супресорните гени и други клеточни протеини поврзани со регулацијата на клеточниот циклус.³⁰

Онкогениот потенцијал на вирусните гени предизвикува промени во апоптозата и ДНК репаративните механизми и предизвикува прекумерна експресија на тумор супресорните гени.³¹

Клучно значење во развојот на малигниот фенотип кај ХПВ- позитивните карциноми на глава и врат се должи на континуирана експресија токму на E6/E7 протеините. Несомнено овие два онкопротеини имаат клучна улога во онкогеноста на високоризичните ХПВ. Кај нискоризичните ХПВ, E6/E7 протеините имаат улога во патогенезата на ХПВ асоцираните бенигни тумори и ретко се имплицираат во малигнитет. Не е познато кои се разликите помеѓу E6 и E7 на ниско и високоризичните, но се смета дека E6/E7 на високоризичните ХПВ типови имаат поназначен афинитет кон регулаторните фактори на клеточниот циклус, предизвикувајќи потенцирана дисрегулација на механизмите на клеточен раст и клеточно преживување.³²

Регистрирани се над 200 типови на ХПВ од кои 120 се целосно кодирани (типизирани). ХПВ вирусите се поделени во три родови: α - родови кои се изолирани од мукозните лезии како и β и γ - родовите кои најчесто се изолирани од кожните лезии. Во

зависност од способноста да предизвикаат сквамозно клеточен карцином на cervix uteri ХПВ вирусите се класифицираат како високоризични, најчесто асоцирани со малигни заболувања (16,18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 и 59) и нискоризични (6, 11, 30, 34, 40, 42, 43, 44, 54, 55, 57 и др.) кои претежно асоцираат со брадавиците.^{33,34}

Што се однесува до распространетоста на оваа инфекција, епидемиологијата укажува дека ХПВ инфекцијата од различни гентипови варира во различни земји.³⁵

Високоризичните ХПВ перзистираат подолго од нискоризичните и се резистентни на домаќинскиот имунолошки одговор. Нискоризичните типови се повлекуваат за кратко време и се карактеризираат со способноста да предизвикаат кратковремени промени кои спонтано регредираат. Предизвикуваат бенигна пролиферација на епителните клетки (брадавици) кои ретко прогредираат во карцином.³⁶

Најчест начин на пренесување на овој вирус е контактно, односно од човек на човек, преку оро - генитален контакт, уста - уста, со автоинокулација преку лезии на кожата и слузокожата, мајка - фетус, но се претпоставува дека е можно пренесување и преку мајчиното млеко како и преку користење заедничка четка за заби.^{37,38,39}

Пациенти со имunosупресивна терапија, ХИВ, и намален имунитет се високо ризична група за добивање ХПВ инфекција, која кај оваа популација има поагресивен тек во однос на имунокомпетентни лица.⁴⁰

Периодот на инкубација е различен кај различни типови ХПВ што резултира во латентна инфекција (при мал број на вирусни транскрипти во клетката домаќин), субклиничка инфекција, но без клинички видливи знаци и клинички манифестна инфекција која резултира во бенигни, потенцијално малигни како и малигни заболувања. ХПВ покажува афинитет кон кожата и мукозните површини и се единствени вируси кои во човековиот организам можат да предизвикаат неконтролирана ткивна пролиферација, односно доведуваат до туморозен раст на ткивото преку ДНК мутација.⁴¹

Оралната празнина меѓу другото се смета за резервоар на ХПВ вирусот со можност високата преваленција да влијае врз динамиката на ХПВ трансмисијата во популацијата. Најчести заболувања предизвикани од овој вирус во оралната празнина се: *verruca vulgaris*, сквамозен папилом, *condyloma acuminum*. Тие се сметаат за најчести бенигни орални инфекции предизвикани со нискоризични ХПВ. ХПВ инфекцијата е докажана и на привидно здрава мукоза со 10%.⁴²

Ларингеалната папиломатоза е асоцирана со ХПВ тип 6 и 11 (лезиите се протегаат кон орална лигавица, нос и бели дробови). За разлика од неа, фокалната епителна хиперплазија - (Нек-ова болест) е ХПВ асоцирано заболување кое се карактеризира со мултипли напилони на усните и букалната лигавица.^{43,44,45}

Најчеста кожна клиничка манифестација предизвикана од инфекција со ХПВ се брадавиците, цврсти и безболни папули на дланките и стопалата (*verrucae palmares*, *verrucae plantares*), најчесто предизвикани од ХПВ тип 1, 2 и 4, *verrucae planae* (рамни брадавици на лицето, рацете и надлактиците) кои се предизвикани од ХПВ тип 3 и 7. Промените се бенигни и се предизвикани од нискоризични ХПВ типови. Најновите истражувања покажуваат асимптоматско присуство на ХПВ инфекција и на здрава кожа со подолга перзистенција на истата. Дијагнозата се поставува клинички бидејќи се смета дека типизацијата на ХПВ кај овие промени не е клинички оправдана, и се спроведува исклучително за епидемиолошки или истражувачки потреби.⁴⁶

ХПВ продира преку микроабрази на мукозните површини до клетките од базалниот слој со помош на рецепторите $\alpha 5 \beta 4$ - интегрини и протеогликан- хепарин сулфат (*syndecan-1*, присутен во базални и парабазални клетки после траума) кои овозможуваат навлегување на вирусот во клетката домаќин.^{47,48}

Дел од вирусите кои пристигнуваат до јадрата на епителните базални клетки подлежат на репликација која е ограничена на мал број инфицирани клетки и со овој процес всушност започнува ХПВ инфекцијата. Сепак, останува нејасно зошто токму базалните епителни клетки се таргет за ХПВ. Во тој контекст се смета дека при нарушување на интегритетот на епителот, нивото на мембранските рецептори

неопходни за инокулација на вирусот е највисок токму на мембраната на базалните клетки.³⁷

ХПВ циклусот продолжува да се одвива паралелно со процесот на клеточна матурација, но продукцијата на зрели вириони е ограничена само на зрелите супрабазални епителни клетки во напреден стадиум на матурација. Инфицираните клетки со ХПВ пролиферираат побрзо од останатите неинфицирани клетки и се шират латерално и супрабазално. Формираните комплетни ХПВ партикули во супрабазалните епителни слоеви, зрели вириони, се ослободуваат на површината и претставуваат извор на инфекција.⁴⁹

Соодносот помеѓу степенот на диференцијација на епителните слоеви изразен во проценти, во литературата познат како индекс на епителна матурација, може да има дијагностичко значење при цитолошките испитувања на епителот за препознавање на промените на оралната лигавица.⁵⁰

Кај ХПВ асоцираните бенигни и преканцерозни лезии присутна е пролиферација на сите клеточни слоеви, кое микроскопски се манифестираат како акантоза, хиперкератоza, паракератоza и коилоцитоза. Кај малигните заболувања кои претежно се предизвикани од високоризични ХПВ типови микроскопски е евидентирана атипича, зголемен број на митози и интраепителна неоплазија. Цитопатските промени во форма на коилоцитоза, анизоцитоза, дискератоza, паракератоza, хиперкератоza, кератохијалин и бинуклеација се сметаат како патогномични знаци за ХПВ инфекцијата.⁵¹

Растечката инциденца на ХПВ асоцираните орални лезии и карциноми на главата и вратот ја зголемува потребата од едноставен и ефективен метод за проценка на лезиите како и нивниот ХПВ статус. Покрај ткивен препарат, како материјал за испитување се користат и епителни примероци земени со брис како и плунка. Цитоморфолошката анализа е едноставна, семиинвазивна, ефтина метода, која обезбедува доволен број клетки за дијагностички и прогностички цели. Како една од

најупотребувани дијагностички методи, хистопатологијата овозможува детекција на цитопатски алтерации карактеристични за ХПВ инфекцијата.⁵²

Аналогно на цервикалниот скрининг, истражувањата констатирале дека цитопатските ХПВ алтерации детектирани кај оралниот сквамозен клеточен карцином се слични на тие од цервикалните лезии.⁵⁰ Оттука студиите се фокусираат на можната апликација на истата скрининг стратегија за секундарна превенција и рана детекција на абнормална цитологија кај оралните преканцерозни лезии и орофарингеалниот сквамозен клеточен карцином со еквивалентен ПАП-тест и детекција на ХПВ.⁵³

ХПВ статусот на цитолошки како и на хистолошки примероци кај пациенти со тумори на глава и врат е со 90.4% совпаѓање. Абнормалната цитологија силно е асоцирана со дијагнозата на овие тумори и особено со орофарингеалниот карцином.⁵⁴

Со оглед на тоа дека ХПВ не може да се култивира, покрај бројните методи за детекција (микроскопски, имунолошки, хистолошки), детерминирањето на ХПВ типовите се сведува на детекција на вирусните нуклеински киселини со современи молекуларни методи. Најчесто користени методи со кои може ХПВ инфекцијата да се потврди е со полимеразна верижна реакција-PCR (polymerase chain reaction) и сигнална амплификациона метода (in-situ хибридизација).⁵⁵

Ако се земе во предвид дека зголемената инокулација на вирусот во клетката домаќин не е проследена со истовремено зголемување и на вирусната репликација, ХПВ ДНК со in situ хибридизација се детектира само како точкаста дистрибуција во траги, додека со примена на посензитивни методи, како што е полимеразната верижна реакција-PCR, се детектираат дури и понизок број вирусни транскрипти.^{56,57}

ПРЕГЛЕД НА ЛИТЕРАТУРАТА

2. ПРЕГЛЕД НА ЛИТЕРАТУРАТА

Првите податоци за инфекцијата со ХПВ датираат уште од 12 век кај старите египќани, но поврзаноста помеѓу контактната ХПВ трансмисија и брадавиците е потврдена дури во 19 век.^{58,59}

Малигниот потенцијал и поврзаноста помеѓу цервикалниот карцином и ХПВ инфекцијата го привлече вниманието на научните истражувања, со што подоцна се идентификувани високоризичните ХПВ тип 16 и 18 кај цервикалниот канцер. ХПВ се сметаат за предизвикувачи на цервикалниот карцином кај 95% од случаевите, од кои над 50% се предизвикани од високоризичниот тип ХПВ 16. ХПВ е еден од најчестите причинители на карцином на грлото на матка, детектиран кај 95-98,7% пациентки, и е втора водечка причина за смртност од карцином кај жените.^{60,61,62}

И покрај тоа што студиите не утврдиле корелација меѓу гениталната и оралната ХПВ инфекција, научно е докажано дека цервикалниот и оралниот епител се структурно многу слични, односно вагиналниот епител може да се користи како супституција за оралната мукоза во *in vitro*, но и кај *in vivo*, студиите, т.е. и кај двата органи присутни се епителни клетки и рецептори таргет за ХПВ 16 и ХПВ 18. Оттука се смета дека механизмот на делување на ХПВ вирусот кај оралната мукоза е сличен како оној кај цервикалната мукоза.^{63, 64}

Во последните неколку декади бројни автори го пренасочуваат вниманието кон ХПВ инфекциите и на други анатомски регии. Во 1983 година Syrjänen и сор. сугерираат можна корелација помеѓу ХПВ и оралните (бенигни и малигни) лезии. Во истата година со светлосна микроскопија истиот автор се обидел да пронајде поврзаност помеѓу ХПВ инфекцијата и туморите на главата и вратот вклучувајќи го и оралниот карцином.¹⁰ Доказите се темелат на анализа на 40 биопсии, каде биле детектирани морфолошки алтерации предизвикани од ХПВ инфекција кај 16 примероци. Евидентирана е субгрупа од 20% орални карциноми асоцирани со ХПВ кои подоцна биле типизирани (ХПВ 11, 16, 18). Констатирано е дека 20% од оралните карциноми и 60-80% од

орофарингеалните карциноми се ХПВ условени. ХПВ ДНК е евидентиран кај 87% од биопсиите од орални преканцерозни лезии.⁶⁵

И покрај широкиот спектар на студии кои ја докажале и донекаде ја разјасниле улогата на високоризичните ХПВ во етиологијата на оралната карциногенеза⁶⁶, сеуште постојат несогласувања во однос на останатите орални лезии, особено на преканцерозните лезии и нивната асоцираност со ХПВ.

Разноликоста на дијагностичките процедури кои се користени за детекција и типизација на ХПВ резултирало во значителни разлики во интерпретацијата на инциденцата и улогата на ХПВ во етиологијата на оралните премалигни лезии. Во однос на разликите кои потекнуваат од различните географски подрачја и различните испитувани популации во однос на одредени ХПВ типови, интерпретацијата како и споредувањето на резултатите од различни региони претставува вистински предизвик.⁶⁷

Најчести преканцерозни лезии кои покажуваат можна асоцираност со ХПВ се леукоплакија, лихен планус и еритроплакија.

Леукоплакијата се смета за најфреквентна преканцерозна лезија со застапеност од 85%, со предилекција кон двата пола или можеби кон машкиот пол. Дефинирана е како бела плака што не може клинички или хистопатолошки да се дефинира како било која друга болест. Се јавува кај 3% од возрасните пациенти, а со тек на годините расте и тенденцијата за малигна трансформација на леукоплакијата. Етиологијата на леукоплакијата останува непозната, но пушењето е посочено како најчест ризик фактор асоциран со појавата и развојот на оралната леукоплакија.^{68,69,70,71}

Поврзаноста помеѓу ХПВ геномот и клиничко-патолошките промени кај леукоплакијата не се констатирани, но констатирано е зголемено присуство на високо-ризичниот ХПВ 16 кај оралната леукоплакија и оралниот сквамозен клеточен карцином, што е потврда дека ХПВ 16 асоцира со патогенезата на овие два ентитета.⁷²

Се смета дека детекцијата на ХПВ инфекцијата кај леукоплакијата, но и кај останатите орални преканцерозни лезии може да го реши проблемот не само со

генезата туку може да претставува и морфолошка база за превенција и третман на овие мукозни заболувања.⁷³

Еритроплакијата е црвена лезија од непозната етиологија, со висок потенцијал малигно да алтерира и најчесто се поврзува со тешка епителна дисплазија која во најголем број од случаите завршува со појава на орален карцином. Во литературата постојат податоци кои упатуваат на фактот дека еритроплакијата во моментот на биопсија, веќе претставува инвазивен карцином.⁷⁴

При истражување на ХПВ инфекцијата кај потенцијално малигните орални лезии со имунохистохемиски метод (in situ hybridisation и PCR) констатиран е ХПВ позитивитет кај 50% од испитуваните пациенти со еритроплакија, со што авторите сугерираат инволвираност на ХПВ во развојот на оралниот карцином како етиолошки ко-фактор.⁷⁵

Од 1998 само единаесет еритроплакични лезии биле испитувани за детекција на ХПВ-ДНК при што 54.5% резултирале позитивни на ХПВ16.⁷⁶

Оралниот лихен планус се смета за потенцијално малигна состојба со зголемен ризик за малигнитет.² Но и покрај оваа констатација малигниот потенцијал на овој ентитет како и неговата улога во оралната карциногенеза останува нејасен.⁷⁷

Како хронично автоимуно заболување оралниот лихен планус (ОЛП) клинички најчесто се манифестира во две форми и тоа како ретикуларна и ерозивна форма. Најафектирани површини на оралната мукоза се: букалната мукоза, латералните ивици на јазикот и лабијалната мукоза со унилатерална или билатерална прераспределба на лезиите. Хистолошката верификација укажува на епителна алтерација, задебелување со или без улцерација.⁷⁸

Покрај тоа што оралниот лихен планус има непозната етиологија, се почесто се поврзува со ХПВ, отука студиите констатираат ХПВ ДНК асоцираност кај 19.7% од оралниот лихен планус но и ХПВ позитивитет кој кај овој ентитет прилично широко и нерамномерно варира од 0-100%.^{79,80}

Иако се смета дека само ерозивната форма на оралниот лихен планус е асоцирана со ХПВ позитивитет, овој податок не бил потврден во повеќе студии. Оралниот лихен планус е асоциран со високоризичните ХПВ типови каде ХПВ16 е констатиран кај 26.3% додека кај друга студија е констатирано присуство на ХПВ18 кај 27% сугерирајќи нејасна патолошка корелација помеѓу ХПВ и ОЛП.^{81,82,83}

Присуство на ХПВ- ДНК е констатирана кај 19.7% (n=14/115) од пациентите со ОЛП, со статистичка сигнификантност во споредба со контролните примероци (5/90;5.6%) (p=0.005). Во оваа студија ХПВ 18 е најфреквентниот детектиран генотип, и тоа кај 71.4%(10/14) од примероците.²²

Кај 82 пациенти дијагностицирани со атрофичен ОЛП, ХПВ инфекцијата била регистрирана кај 15.9% од лезиите, каде со генотипизација е потврдено присуство на генотиповите 6/11/16/31/33 како и една мултипла инфекција. Во ова истражување кај ХПВ позитивните примероци, со статична цитометрија е констатиран повисок индекс на пролиферација во супрабазалните слоеви (p=0.016) во споредба со ХПВ негативните слоеви.⁸⁴

Актиничната кератоза (АК) е преканцерозна лезија на кожата. Кога промената е локализирана на усните се дефинира како актиничен хеилит или кератоза. Актиничната кератоза (хеилит) се смета за патолошка состојба која е локализирана на вермилионот на долната усна. Семимукозната површина на долната усна која може да биде изложена на влијание на сончевите зраци исто така може да биде зафатена.^{85,86}

Хистопатолошките промени варираат со прилично широк дијапазон кој се движи од атрофија до хиперплазија на клеточниот епител. На епителот се детектирани: различен степен на кератинизација, нарушена клеточна матурација, зголемена митотичка активност и клеточна атипичност, со интактна базална мембрана. Поаѓајќи од наведените цитолошки и хистолошки промени овој ентитет се смета за интра - епителна лезија, или in-situ неоплазма.^{87,88}

Се претпоставува дека пушењето и инфекција на усните во комбинација со хуман папилома вирусот може дополнително да предизвика цитогенетски алтерации и да го зголеми ризикот за малигна алтерација кај актиничниот хеилит.⁸⁹

Последователни истражувањата наведуваат на заклучокот дека ХПВ има улога во развојот на актиничната кератоза. ХПВ е детектиран кај актиничната кератоза со мерливи вредности на вирусна репликација (1 ХПВ- ДНК копија за помалку од 50 клетки) детектирани кај 40% актинични кератози. Слично на УВ зрачењето, повисоки вредности на ХПВ детектирани кај АК укажуваат на потенцирана вирусна ДНК репликација.²⁶

Овој податок дава за право да се смета дека постои поврзаност меѓу ХПВ и абнормалната кератиноцитна пролиферација и диференцијација кај АК. Создадените услови обезбедуваат соодветна средина за репликација на ХПВ, која понатаму може да стимулира абнормална пролиферација што придонесува кон развојот на малигнитет.⁹⁰

Субмукозна фиброза е преканцерозна лезија која се карактеризира со екстремна субмукозна депозиција на сврзно ткиво и редуцирана васкуларизација во почетниот стадиум, а во подоцнежниот стадиум со епителна атрофија и хиперкератоза. Кај 10-15% од овие лезии докажана е епителна дисплазија. Поврзаноста на оралната субмукозна фиброза (ОСФ) со ХПВ инфекцијата првично е констатирана кај мал број примероци.⁹¹ Но подоцна во друго истражување, со примена на две различни методи за ХПВ детекција, констатиран е ХПВ позитивитет кај 27% пациенти со ОСФ.⁹²

Високоризичниот ХПВ 16 е потврден кај 80.0% од леукоплакиите, независно од степенот на дисплазија, додека во друго истражување утврден е ХПВ позитивитет кај 31% од лезиите и тоа за ХПВ 16 и 6. ХПВ 18 е детектиран кај 27% од пациентите со лихен планус, но не е потврдена статистичка сигнификантност помеѓу ХПВ инфекцијата и оралните лезии, оттука во тој поглед сугерирана е нејасна патолошка поврзаност помеѓу ХПВ и ОЛП.^{21,82}

Во истражувањето во кое е проучувана преваленцијата и влијанието на вискоризичните ХПВ 6 и 11 и високоризичните ХПВ 16 и 18 кај бенигните орални лезии

и оралниот карцином е констатирано дека ХПВ инфекцијата е присутна кај 15.4% од пациентите со лихен планус (10/65), при што ХПВ16 и ХПВ18 се детектирани кај 9.2%(6/65) пациенти со лихен планус.⁹³

ХПВ преваленцијата расте со агресивноста на промените: кај здрава лигавица евидентирано е присуство од 10%, кај бенигната леукоплакија 22%, кај интраепителната неоплазма 26%, кај орално сквамозниот карцином 46%.⁹⁴ Blount и сор.⁹⁵ во неговите наоди констатирал асоцираност на ХПВ и со ОПЛ: од кои 40% фиброми, 35.8% леукоплакии (не - диспластични), 31,6% диспластични леукоплакии.

ХПВ позитивитет е евидентиран кај 17.7% од оралните лезии, наспроти 6.8% од примероците од здрава лигавица. Докажано е дека високоризичните ХПВ доминираат кај потенцијално малигните лезии (ХПВ 16 кај 4,3% и ХПВ 31 кај 3,4%), додека кај бенигните пролиферативни лезии доминираат претежно недетерминирани типови на ХПВ (кај 6,8% од испитаниците).⁹⁶

Со цел да се утврди улогата на ХПВ во оралната карциногенеза, преку докажување на преваленцата на ХПВ во малигни, потенцијално малигни промени и здрава орална лигавица како и релација на ХПВ преваленцијата со останатите ризик фактори, биле проучуван 291 ткивен примерок од 258 пациенти кај кои е детектиран ХПВ со PCR методата. Резултатите покажале дека ХПВ е присутен во 32.9% од ткивните примероци односно кај 40 % здрава лигавица, 40% фиброми, 35,8% леукоплакии (не-диспластични) и 31, 6% диспластична леукоплакија како и во 22, 2% од сквамозно целуларен орален карцином. ХПВ доминира кај сите хистолошки групи.⁹⁴

Согласно на овие констатации, високоризичните ХПВ типови 16 и 18 се превалентни кај оралниот сквамозен целуларен карцином но и кај оралната леукоплакија вклучувајќи ја и пролиферативната верукозна леукоплакија.^{72,93}

Кај здрава лигавица истражувањата евидентирале ниска инциденца на ХПВ.⁹⁷ Само кај 10% од примероците од здрава лигавица констатирано е присуство на ХПВ наспроти 47% од примероците на орален сквамозно целуларен карцином, како и 46% од леукоплакиите.⁹⁸

Цитоморфолошката дијагноза на ХПВ инфекцијата се базира на ХПВ асоцирани цитопатски карактеристики како што е коилоцитозата, која се смета за значаен и најфреквентен морфолошки маркер, како и дискератозата, хиперкератозата, паракератоза, бинуклеација, кои означуваат не само присуство туку и активна инфекција со високоризични ХПВ типови.^{99,100,101}

Податоците за присуство на коилоцитоза кај оралните брисеви се доста варијабилни, така што истражување ќе констатира присуство на коилоцитозата кај 3 од вкупно четири леукоплакии.^{102,103}

Наспроти овие констатации дел од студиите не констатирале асоцираност меѓу ХПВ инфекцијата и леукоплакијата или сквамозно клеточниот карцином.¹⁰⁴ Со користење на метод на полимеразна верижна реакција (real-time quantitative PCR), не е демонстрирана асоцијација помеѓу ХПВ инфекцијата и оралните премалигни и малигни лезии.¹⁰⁵

Обемна контролирана (case-control) студија спроведена во девет земји исто така евидентирала ниска преваленција (3.9%) на ХПВ- ДНК кај 766 биопсии земени од пациенти со орален карцином и кај 18.3% од пациентите со орофарингеален карцином.⁹

ХПВ е детектиран и на здрава мукоза. Истражување базирано на популација за одредување преваленцата на ХПВ инфекцијата (US National Health and Nutrition Examination Survey, NHANES) со PCR методот констатирало преваленца на ХПВ од 6.9%. Преваленцата на високоризичните ХПВ изнесува 3.7% и за нискоризичните типови на ХПВ изнесува 3.1%. Најзастапен тип на ХПВ е ХПВ-16. ХПВ инфекцијата статистички сигнификантно е позастапена кај пушачи и алкохоличари, но значајно влијание имаат и демографските карактеристики како што се пол и возраст.¹⁰⁶

Истражување кај пациенти од машки пол констатирало почетна преваленција на ХПВ од 15.1%, и пораст на преваленцијата во период од седум години на 31.1%. Најфреквентни детектирани генотипови се ХПВ 16 (33.3%), ХПВ 33 (12.5%) и ХПВ 82 (12.5%). Констатирано е дека ХПВ 16 е најпревалентен тип и ниту еден демографски фактор не е значајно независен предиктор на инциденцата на ХПВ инфекцијата.

Истражувачите заклучиле дека оралната мукоза има значајна улога во ХПВ трансмисијата.³⁶

Кај примероци земени од здрава лигавица кај бремени жени, преваленција на ХПВ одредена со PCR методот, изнесувала 15%, а во период од шест години покажува пораст до 24%. Детектирани се 18 генотипови на ХПВ со најфреквентна застапеност на ХПВ 16 (9.7%-18.4%) по што следува ХПВ 18.³¹

Студиите укажуваат на ниска преваленција на ХПВ кај вакцинирана популација со бивалентна вакцина (ХПВ16/18, Cervarix) после четири години следење, како и негативен ХПВ статус кај вакцинирани лица.¹⁰⁷

Бројни студии кои ја проучувале поврзаноста помеѓу оралното здравје, оралната хигиена и пушењето со оралната ХПВ инфекција, констатирале статистичка сигнификантна асоцијација меѓу оралното здравје и оралната ХПВ инфекција. Лошата орална хигиена се смета за дополнителен ризик фактор за ХПВ инфекцијата, ако се земе во предвид дека ХПВ навлегува во базалните слоеви од епителот преку ерозии односно нарушување на интегритетот на епителот како што се ерозии и улцерации, како и хроничната инфламација, што води кон зголемување на осетливоста од ХПВ инфекцијата. Оралната хигиена се смета за независен ризик фактор за оралната ХПВ инфекција, и во тој контекст се сугерира промоција на оралната хигиена и оралното здравје како дополнителна мерка во превенција на ХПВ- асоцираните лезии.¹⁰⁸

Појавата и перзистенцијата на оралната ХПВ инфекција се поврзува и со хроничната инфекција и пародонтопатијата. Ако се земе во предвид дека основни карактеристики на пародонтопатијата се пролиферација и миграција на припојниот епител кои се всушност добро познати биолошки ефекти на ХПВ не случајно се претпоставува дека постои поврзаност меѓу овие два ентитета. Бактериите од пародонталните џебови и лошата орална хигиена се независни ризик фактори за ХПВ перзистенцијата во оралната празнина, независно од пушењето, кој најчесто е споменуван како фактор кој создава поприфатливи услови т.е. го олеснува совладувањето на оралната бариера. Кај хронична пародонтопатија констатирана е

преваленција на ХПВ од 16,6% и преваленција од 50% кај агресивната пародонтопатија, како и повисок ризик за ХПВ инфекција (Centers for Disease control and prevention) кај пациенти со лоша орална хигиена. ¹⁰⁹

ЦЕЛИ НА ИСТРАЖУВАЊЕТО

3. ЦЕЛИ НА ИСТРАЖУВАЊЕТО

Врз основа на бројните податоци од светската литература, но и предводени од потребата да дојдеме до сопствени сознанија за поврзаноста на оралните преканцерозни лезии со ХПВ инфекцијата, ги поставивме следните цели на нашето истражување:

- Да се одреди ХПВ статусот кај оралните преканцерозни лезии
- Да се генотипизираат детектираните типови на ХПВ
- Да се проследаат најчестите цитоморфолошки промени асоцирани со ХПВ позитивитетот
- Да се испита дали ХПВ инфекцијата влијае на индексот на матурација на клетките
- Да се детерминира асоцијацијата помеѓу позитивниот ХПВ статус и абнормалната цитологија
- Да се одреди онкогената активност (E6/E7- mRNA) на детектираните високоризични ХПВ типови
- Да се одреди пародонтолошкиот статус и улогата на оралното здравје во однос на ХПВ инфекцијата
- Да се испита улогата на демографските фактори (пол, возраст, пушење, навики) врз оралната ХПВ инфекција

3.1. ОБРАЗЛОЖЕНИЕ НА РАБОТНИТЕ ХИПОТЕЗИ И ТЕЗИ

Хипотеза 1. Оралните преканцерозни лезии асоцираат со ХПВ инфекцијата

Хипотеза 2. Високоризичните ХПВ типови се фактор или кофактор во етиологијата на ОНД

Хипотеза 3. ХПВ предизвикува цитопатски промени кај епителните клетки

Хипотеза 4. Репликацијата на ХПВ влијае на клеточниот циклус

Хипотеза 5. Абнормалната цитологија асоцира со позитивен ХПВ наод

Хипотеза 6. Високоризичните ХПВ типови имаат високо ниво на E6/E7 mRNA транскрипти и висока онкогена активност

Хипотеза 7. Хроничната инфекција и лошата орална хигиена влијаат на оралната ХПВ инфекција

Хипотеза 8. Демографските фактори, особено возраста и полот, се значајни за афекција и перзистенцијата на ХПВ

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД

4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД

За реализација на поставената цел спроведено е клиничко, молекуларно и цитоморфолошко испитување на Клиниката за болести на устата и пародонтот при Универзитетскиот стоматолошки клинички центар „Св. Пантелејмон„- Скопје, Институтот за јавно здравје при Медицинскиот факултет во Скопје, Клиниката за гинекологија и акушерство при Медицинскиот факултет во Скопје како и во цитолошката лабораторија на ПЗУ „Св. Мина„ во Скопје, Република Македонија.

4.1. Испитаници

Во студијата учествуваа 80 испитаници ($n=80$), од двата пола, 19 мажи (23.75%) и 61 жени (76.25%) упатени на клиниката за болести на устата и пародонтот за дијагностичко проследување.

Кај вкупно 40 пациенти, средна вредност $51.87 (SD \pm 6.08)$, констатирано е присуство на орални премалигни лезии, и тие ја сочинија испитуваната група со орални премалигни лезии (со ОПЛ). Друга група на пациенти, одбрани по случаен избор ($n=40$), со средна возраст $53.02 (SD \pm 4.9)$, и без видливи промени на оралната лигавица ја составија контролната група без орални премалигни лезии (без ОПЛ).

Критериуми за исклучување:

-поранешна или сегашна историја на малигно заболување, примање радиотерапија, примање хемотерапија, примање кортикостеродина терапија во моментот на проследување, возраст под 18 години.¹¹⁰

4.2. Клиничко проследување

Кај секој пациент спроведено е клиничко проследување со детална анамнеза, главни тегоби и сегашна болест, историја на минати заболувања (кардиоваскуларни, гастроинтестинални, ендокрини, нервни, социјална анамнеза, фамилијарна анамнеза и

брачен статус. Евидентирани се податоците од клиничките пародонтолошки параметри и орално- хигиенскиот статус, и тн.

Пациентите одговорија на структуриран прашалник кој содржеше прашања за демографските карактеристики односно возраст, пол, степен на образование (основно, средно и високо), навики- пушење и алкохол, социјални услови.*

Регистриран е статусот на лезијата односно сите карактеристики на оралните лезии вклучувајќи ги клиничката дијагноза, топографија, опис на промената во однос на големината, морфологијата, површинската структура, конзистенција, палпација на промените и секако истите беа и фотографирани.

Вклучените субјекти беа информирани за истражувањето при што потпишаа и писмена согласност.

КЛИНИКА ЗА БОЛЕСТИ НА УСТАТА И ПАРОДОНТОТ

АНАМНЕЗА

Име и презиме _____

Пол _____ Возраст _____ тежина _____ висина _____ Професија _____

Степен на образование: а. Основно б. Средно в. Високо

Место на живеење _____

Главни тегоби

Крварење; болка; печење; жарење; сувост на устата; разлабавување на забите;

Сегашна болест

Време, место и честота на појава на промените _____

Примена терапија _____

Лична анамнеза

Заболувања: кардиоваскуларни; гастроинтестинални; хематолошки; невролошки; ендокринолошки и други заболувања и состојби _____

Терапија која се користи во моментот _____

Дали користите: а. цигари(колку) б. Алкохол: ДА НЕ в. Дрога: ДА НЕ

Посета на стоматолог: а. Ретко б. Редовно

Одржување на орална хигиена: а. Да б. Не Користење на сопствена четка за заби: а. Да б. Не

ПАП тест: а. Ретко б. Редовно (наод)

Семејна анамнеза

Брачен статус _____

Дали имате деца (колку) _____

Малигни заболувања кај членови од потесно семејство (гатко, мајка, брат, сестра) _____

Сексуално преносливи заболувања _____

Социјална анамнеза

Услови за живот: а. Лоши услови за живот б. Добри услови за живот

Статус на лезија:

локација _____ големина _____ конфигурација(број) _____ боја _____

морфологија _____ Текстура _____ палпација _____

Орално хигиенски статус и пародонтолошки индекси:

8 7 6 5 4 3 2 1 1 2 3 4 5 6 7 8

8 7 6 5 4 3 2 1 1 2 3 4 5 6 7 8

Број на заби _____ екстрахирани заби _____

ИДП 0 1 2 3 ИГИ 0 1 2 3 ИГЗ 0 1 2 3 КГА 0 1 2 3 ИЛ 0 1 2 3

*Прашалник за пациентите

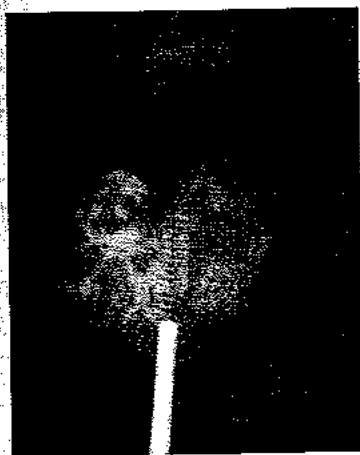
4.3. Молекуларно испитување

Детекција и типизација на ХПВ ДНК

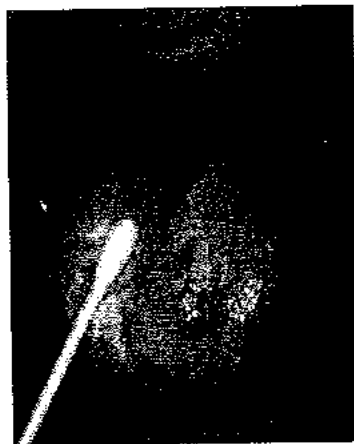
Техника на земање брис

За детекција и типизација на ХПВ- ДНК е користена е техника на ексфолијативна „brush„ цитологија. Брисевите се земени од детектираната орална лезија кај пациентите со орални лезии и од здрава лигавица кај пациентите од контролната група со користење на стерилна четка (Kito-Brush, Italy).

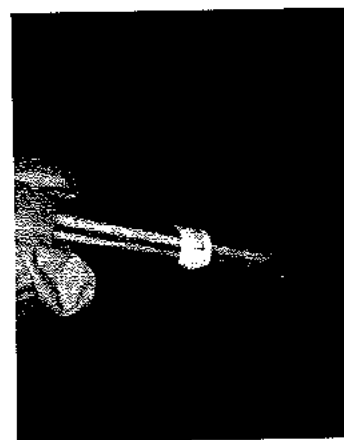
Мукозата се триеше со четка според упатството на производителот до појава на точкasto крварење. Во истражувањето дополнително се користеше и стерилно памучно тампонче, кои потоа (четката заедно со тампончето) се ставаа во стерилни центрифугални туби од 15ml (ISOLAB, Laborgeräte GmbH, Wertheim, Germany) кои содржеа 1 ml пуфер PBS (*buffered saline solution with phosphate*). Тубите се замрзнуваа во рок од 2 часа на -20°C до понатамошна обработка во лабораторија (сл. 1, 2 и 3).



Сл. 1. Техника на земање брис со стерилна четка



Сл. 2. Техника на земање брис со стерилно тампонче



Сл.3. Центрифугална туба со 1ml PBS раствор

Материјал

Како материјал за работа во тек на молекуларно- дијагностичките методи за детекција на ХПВ- ДНК и генотипизација на детектираните типови се користеше ДНК изолирана од брис од орална лигавица.

Методи

При Институтот за јавно здравје- Скопје како и во соработка со Клиниката за гинекологија и акушерство при Медицинскиот факултет во Скопје се спроведе молекуларно испитување во неколку етапи.

ХПВ- ДНК скрининг и генотипизација

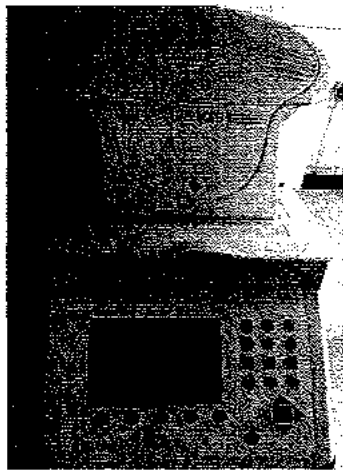
Анализите се реализирани со полимеразна верижна реакција (PCR) според работниот протокол на PureLinc™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, USA), примена на комерцијален кит HPV 4ACE Screening (Seegene, Korea), како и со "Dual Priming Oligonucleotide" (DPO) прајмери, кои се наменети скрининг за високо и нискоризични типови како и за генотипизација на високоризичните ХПВ тип 16 и 18.

ХПВ Скрининг – Изолација на ХПВ ДНК од брисевите од оралната мукоза е спроведено со примена на класична полимераза верижна реакција (PCR) со примена на консензус прајмери MY09/ MY11 кои амплифицираат фрагмент од L₁ регијата на вирусот. Позитивни и негативни контроли беа вклучени во секоја реакција. Визуелизацијата е изведена на агарозен гел 2,5%.

ХПВ генотипизација - Примероците кои покажаа позитивитет со присуство на 450 бп (базни парови) на фрагмент од L₁ регионот на ХПВ понатаму беа анализирани за одредување на генотипот со примена на Мултиплекс полимеразна верижна реакција во реално време (real time PCR) со примена на „HPV high risk genotyping test,, – Saccace, Italy. Тестот овозможува детекција на 12 најчести високоризични ХПВ типови (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 и 59). Тестот содржи 4 различни туби, од кои секоја содржи прајмери за детекција на специфичните ХПВ типови како и прајмери за β - globin гените,

како внатрешна контрола, а се изведуваше на апаратот IQ5 thermal cycler, BIORAD, со софтверски приказ на резултатите (Сл.4). Типовите ХПВ 41, 42, 53, 61, 62, 78 се дотипираат со примена на RFLP- (Restriction Fragment Polymorphism) анализата.

За ХПВ типизација се користени и тестови кои функционираат врз база на реверзна хибридизација наменети за генотипизација на 28 различни генотипови ХПВ со PCR- методот со кој се амплифицира дел од L1 регионот на ХПВ. Со примена на СПФ10 прајмерскиот сет (со можност да амплифицира 54 ХПВ типови) се амплифицира регион во L1 (open reading frame- ORF) отворената рамка за вчитување. Амплифицираните продукти се хибридизираат и со примена на стрип трака со 28 ленти со одредена секвенца (ДНК специфични проби) и дополнително уште 4 ленти на кои се фиксирани контролите. Тестот овозможува генотипизација на вкупно 28 ХПВ ниско и високоризични типови (нискоризични типови: 6, 11, 34, 40, 42, 43, 53, 54 и 70; високоризичните типови: 6, 18, 31,33, 35,39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 и 82 како и типовите 26, 69/71 и 74).



Сл. 4. Апарат за генотипизација на ХПВ

4.2.1. Одредување на онкогената активност

За одредување на присуство на вирусните E6/E7 онкогени протеини во испитуваниот материјал користена е мРНК (mRNA- messenger ribonucleic acid) изолирана од примероците од оралната мукоза во согласност со протоколот за изолација со примена на Nuclisens Isolation- кит, (Biomerieux, France).

Онкогениот ефект на вирусите се анализираше со квалитативна "real time" мултиплекс полимеразна верижна реакција (PCR) со примена на методот NASBA (Nucleid acid sequence based assay) – (анализата се следи во реално време) како и комерцијални тестови E6/E7 NucliSens EasyQ HPV (Biomerieux) во автоматизиран апарат NucliSens EasyQ Analyzer.

Детекцијата се остварува преку амплификација на едноверижна РНК, при изотермални услови на 61°C, а продуктот на амплификацијата повторно е едноверижна РНК. Тестот овозможува детекција на ХПВ E6/E7 мРНК на високоризичните ХПВ типови 16, 18, 33, 31 и 45. Резултатите се анализираат со соодветен софтвер (NucliSENS EasyQ Director) со отчитување на кривата на ампликоните.

4.4. Цитоморфолошка анализа

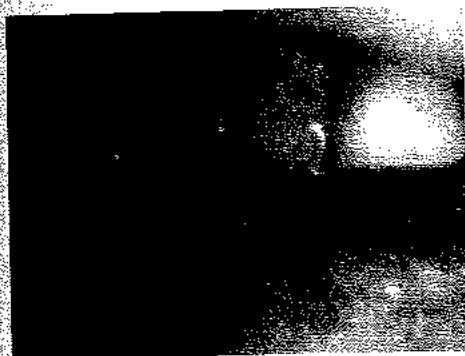
Цитолошката анализа е спроведена во цитолошката лабораторија при ПЗУ "Св. Мина"- Скопје од страна на специјалист патолог.

Цитоморфолошката анализа за детекција на ХПВ асоцираните цитоморфолошки алтерации е спроведена со земање на два бриса од секој пациент со орална лезија. Едниот брис е земен од самата орална лезија, додека вториот брис, кој истовремено ни претставува и контролен брис¹¹¹, е земен од најблиската површина на непроменета мукоза кај билатералните лезии односно од спротивната страна кај унилатералните лезии.

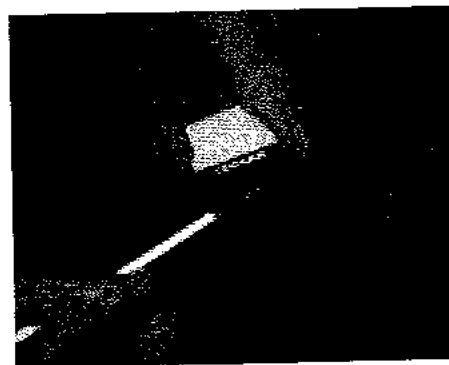
Брисевите се земени со техника на "cyto-brush" ексфолијативна цитологија,¹¹² со користење на стерилна четка (Kito Brush, Italy) и триење на површината до појава на точкасто крварење, по што следуваше пренесување на земениот примерок од оралната

мукоза односно размаска на површината на предметното стакло (ISOLAB- Laborgeräte GmbH, Germany). Размаската беше веднаш фиксирана со спреј за фиксација, Merckofix® spray fixative (Merck KGaA, Germany) до понатамошна обработка во цитолошка лабораторија (сл. 5, 6 и 7). Предметните стакла се боени со модифицирана Papicolaou- техника на боене (ПАП-тест).¹³

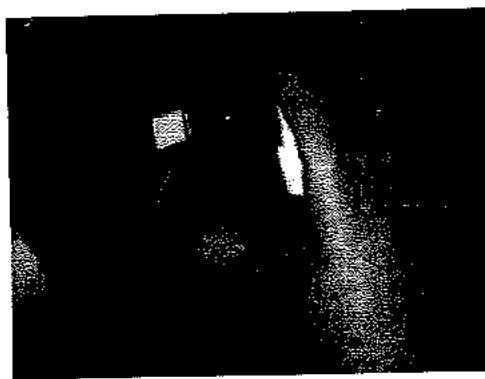
Подготвените предметни стакла се набљудувани и анализирани со светлосен микроскоп (Leica DM2000), при што се користени планахроматски објективи x4, x10, x20, x100. Видното поле е сликано со фотопарат (Nikon, Coolpix 950), и добиените слики се анализирани со соодветен софтвер (Image Analysis Software).



Сл. 5. Техника на земање брис од образна лигавица со стерилна четка



Сл. 6. Пренесување на испитуваниот материјал на предметно стакло



Сл. 7. Фиксација на земениот материјал со спреј

Промените кај испитуваните примероци од оралните лезии се класифицирани според системот на градација по Бетесда (Bethesda Analogous Grade System) како што следува:

1. здрава
2. реактивна
3. ниско- степена сквамозна интраепителна лезија- LGSIL (low- grade squamous intraepithelial lesion)
4. високо- степена сквамозна интраепителна лезија- HGSIL (high- grade squamous intraepithelial lesion)
5. инвазивен сквамозен клеточен карцином, други неоплазми.¹¹⁴

4.4.1. Детекција на цитопатски промени

Цитолошкото испитување опфати детекција и класификација на мајорните и минорните цитоморфолошки промени патогномични за ХПВ инфекцијата како што се коилоцитоза, анизоцитоза, дискератоза, паракератоза, хиперкератоза, кератохијалин и бинуклеација.

Во однос на цитолошките промени типични за ХПВ морфологијата, примероците се класифицирани според детектираните алтерации како што следува:

- Позитивни: евидентна коилоцитоза, дискариоза и дискератоза,
- Парцијални: парцијални знаци на коилоцитоза, дискариоза и дискератоза типични за ХПВ морфологијата, присуство на анизоцитоза, паракератоза, бинуклеација и инфламаторни инфективни или не- инфективни алтерации
- Негативни: без знаци за ХПВ инфекција

4.4.2. Одредување на индекс на епителна матурација

Индексот на епителна матурација овозможи одредување на соодносот меѓу клетките од епителните слоеви помеѓу здрава и ледирана лигавица како и во однос на ХПВ инфекцијата.

Се одредува со броење на сто добро формирани и изолирани клетки на цитолошки препарат, хоризонтално од лево кон десно, со зголемување од 400x. Броњето на клетките се изразува како процентуален сооднос помеѓу следниве слоеви на клетки:⁴⁹

- парабазални,
- интермедиерни
- суперфицијални

4.5.Проценка на оралното здравје

Проценката на оралното здравје и денталниот статус е спроведена со пародонтолошки клинички преглед, при што се одредени следниве клинички пародонтолошки параметри: индекс на дентален плак (ПИ-плак индекс) (Sillnes-Löe), индекс на гингивална инфламација (ИГИ) (Löe- Sillnes), индекс на гингивално зголемување (ИГЗ), индекс на клинички губиток на атачмент (КГА) (AAP, International Workshop for Classification of Periodontal Diseases,1999) и индекс на луксација (ИЛ):

1. Индекс на дентален плак по Sillnes-Löe(ИДП)⁷⁰

0 нема плак

1 плак на маргиналната гингива и во тенок слој околу вратот на забот

2 умерена количина на плак во гингивалниот сулкус и маргиналната гингива

3 големи видливи количини на плак

2. Индекс на гингвална инфламација (ИГИ) по Loe- Silnes⁵⁰

- 0 нормална гингива
- 1 слабо инфламирана гингива, нема крварење на сондирање
- 2 умерено инфламирана, крвари при сондирање
- 3 силно инфламирана гингива, со тенденција за спонтано крварење

3. Индекс на гингивално зголемување (IGZ), (Bokenkamp&Bohnhorst1994)

- 0 без знаци на зголемување
- 1 зголемување на интердентална папила
- 2 зголемување на интердентална папила и маргинална гингива
- 3 зголемувањето зафаќа три четвртини од коронката

4. Индекс на клинички губиток на атачмент (КГА) за проценка на степенот на деструкција и клиничкиот стадиум на пародонтопатија (AAP, International Workshop for Classification of Periodontal Diseases,1999)

- 1 Клинички губиток на атачмент до 2 мм
- 2 Клинички губиток на атачмент од 3-4 мм
- 3 Клинички губиток на атачмент над >5 мм

5. Индекс на луксација (ИЛ)

- 1 Луксација во вестибуло-орален (ВО) правец
- 2 Луксација во ВО и мезио- дистална (МД) насока
- 3 Луксација во три насоки (ВО, МД и апико- коронарно (АК))

Степен на образование

Пациентите се поделени и според степенот на образование во 3 групи: ²⁸

1 основно образование

2 средно образование

3 високо образование

4.6. Статистичка обработка и анализа на податоците

Статистичката анализа на податоците од истражувањето е извршена со помош на дескриптивно- статистички и аналитички статистички методи со компјутерски софтвер Statistika 7.1 и SPSS 19.0 (Statistical Package for Social Sciences, 19.0).

Статистичката обработка е реализирана преку низа постапки:

- Дескриптивно- статистичка обработка на податоците според дефинираните варијабли во базата на податоците (Microsoft Excel Data Base, 2013) и нивно табеларно и графичко прикажување

- Анализа на структурата на нумеричките серии со одредување на просек и стандардна девијација

- Тестирање на значајност на разликите меѓу две аритметички средини со Student- ов- t- тест , Fisher's exact тест и Chi- square тест за одредување на сигнификантност. Резултатите за "p" вредноста под $p < 0.05$ се сметаа за статистички сигнификантни.

- Бинарен класификационен тест со одредување на сензитивност и специфичност. Одреден е и интервал на можни вредности (Confidence intervals- CI, 95%) за сензитивност и специфичност, како и позитивна и негативна предиктивна вредност - (ppv- positive predictive values); (npv- negative predictive values).

РЕЗУЛТАТИ

5. РЕЗУЛТАТИ

Резултатите од студијата се структурирани во неколку категории според текот на заболувањето и добиените анамнестичките податоци, почнувајќи од демографските карактеристики на испитаниците односно возраст, пол, степен на образование, по што следуваат резултатите од молекуларното и цитолошкото испитување.

Прикажани се и дел од резултатите на испитаниците кои се однесуваат на претходните тегоби и сегашната болест, минати заболувања, навики, орално здравје и стоматолошки статус, фамилијарна и социјална анамнеза, брачен статус.

Демографски карактеристики на пациентите

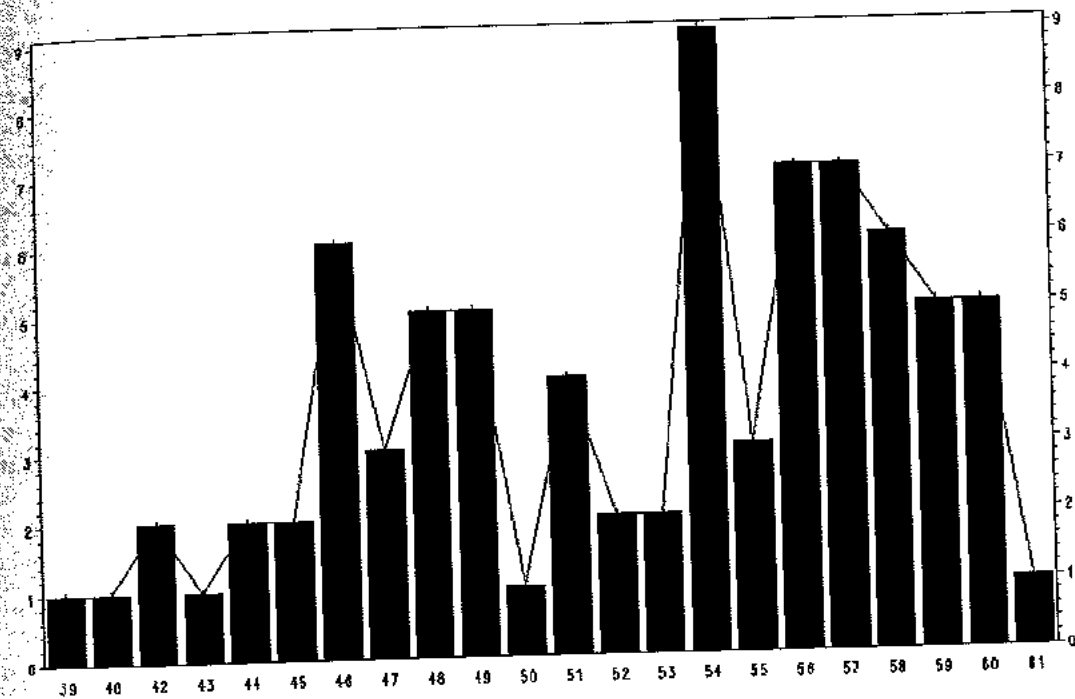
На табела 1. е прикажана дистрибуција на пациентите според возраст. Во зависност од промените на оралната лигавица пациентите се поделени во две групи и испитаници (n=40) со дијагностицирани орални преканцерозни лезии ја сочинуваа заболваната група (средна возраст 51.87, SD±6.08) и контролна група од вкупно 40 испитаници (n=40) (средна возраст 53.02, SD±4.9), со здрава орална лигавица, односно без забележливи промени на оралната лигавица.

Табела 1. Дистрибуција на пациентите од испитуваните групи според возраст

	n	Возраст		SE	Min.	Max.
		Mean	SD			
Испитаници (n=40)	40	51.875	6.0814	0.9616	39	61
Контролна група (n=40)	40	53.025	4.9948	0.7897	42	60
Разлика (p-вредност)		1.15	5.5647	1.2443		

Mean- средна вредност; SD- стандардна девијација; SE- стандардна грешка; Min.- најниска вредност; Max.- највисока вредност

На графикон 1. е прикажана застапеност на пациентите според возрасната граница. Во испитуваниот примерок се вклучени вкупно 80 (100.0%) пациенти на возраст од 39- 61 година. Просечна возраст на пациентите од испитуваниот примерок изнесува 52.45 (SD± 5.56).

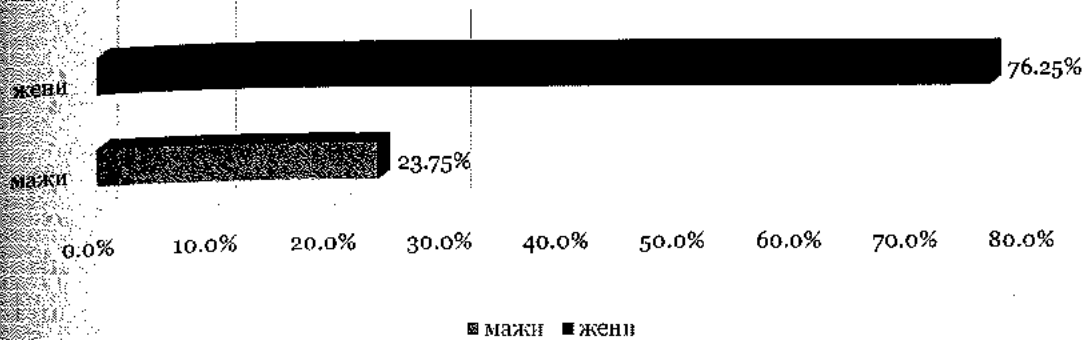


Графикон 1. Дистрибуција на испитуваните пациенти по возраст

На графикон 2. е прикажана дистрибуција на пациентите според пол.

Од вкупно 80 испитувани пациенти, 23.75% (19/80) од испитаниците се од машки пол и 76.25% (61/80) од пациенти се од женски пол.

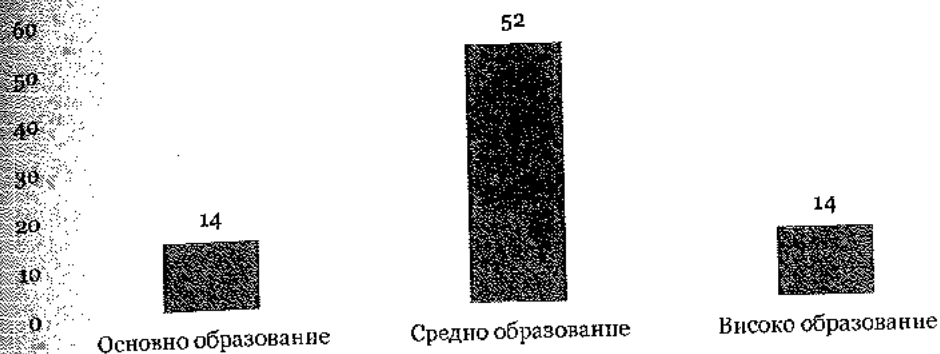
Во истражувачкиот примерок евидентно е дека доминира женската популација.



Графикон 2. Дистрибуција на пациентите според пол

На графикон 3. е прикажана дистрибуција на пациентите според степенот на образование.

Од вкупно 80(100.0%) прегледани пациенти, 14(14/80) се изјасниле дека имаат основно образование, 52 пациенти (52/80) имаат средно образование и 14 (14/80) пациенти се со високо образование.



Графикон 3. Дистрибуција на пациентите од испитуваниот примерок според степенот на образование

На табела 2. прикажана е дистрибуција на основните податоци за пациентите од двете испитувани групи, со и без ОПЛ, во однос на демографските карактеристики, главни тегоби (болка, крварење, разлабавување на забите, сувост на устата, оток), системски заболувања (кардиоваскуларни, ендокрини, нервни) историја на канцерогени заболувања, посета на стоматолог, брачен статус, услови за живот, пародонтолошки индекси, и др.

Разликата помеѓу испитуваните параметри е статистички сигнификантна само во однос на индексот на гингивално зголемување, односно според Student's t- тестот $t=3.20$, односно $p=0.00$.

Табела 2. Дистрибуција на основните податоци за пациентите од испитуваниот примерок, со и без ОПЛ, во однос на дел од демографските карактеристики, главни тегоби, минати заболувања, социјална анамнеза

	Без ОПЛ (n=40)		Со ОПЛ (n=40)		Diff (1-2)	t	p	df
	X 1	SD 1	X 2	SD 2				
Возраст	53.025	4.995	51.875	6.081	1.150	0.92	0.36	78
Болка	0.2	0.4	0.2	0.4	0.1	0.58	0.56	78
Крварење	0.6	0.5	0.5	0.5	0.1	0.44	0.66	78
Разлабавување на забите	0.8	0.4	0.7	0.5	0.1	0.73	0.47	78
Сувоот на устата	0.4	0.5	0.3	0.5	0.1	0.92	0.36	78
Оток	0.8	0.4	0.7	0.5	0.1	0.73	0.47	78
Кардиоваскуларни заболувања	0.9	0.3	0.8	0.4	0.1	0.97	0.34	78
Гастроинтестинални заболувања	0.9	0.3	1.0	0.2	0.0	-0.46	0.65	78
Нервни заболувања	1.0	0.2	1.0	0.2	0.0	-0.58	0.56	78
Ендокрини заболувања	1.0	0.2	1.0	0.2	0.0	-0.58	0.56	78
Историја на канцерогени заболувања	0.9	0.4	0.9	0.3	-0.1	-0.67	0.51	78
ПАП-тест	0.675	0.474	0.650	0.483	0.025	0.23	0.82	78
Посета на стоматолог	0.650	0.483	0.750	0.439	-0.10	-0.97	0.34	78
Брачен статус	0.3	0.4	0.3	0.4	0.0	0.00	1.00	78
Услови за живот	0.1	0.3	0.1	0.3	0.0	0.00	1.00	78
ИДП	1.5	0.6	1.5	0.6	0.0	0.19	0.85	78
ИГИ	1.4	0.7	1.5	0.6	-0.2	-1.24	0.22	78
ИГЗ	0.5	0.7	1.1	0.8	-0.5	-3.20	0.00	78
КГА	1.5	0.6	1.5	0.6	0.1	0.39	0.70	78
ИЛ	0.2	0.4	0.3	0.6	-0.1	-0.45	0.65	78

5.1.2. Топографија и карактеристики на оралните лезии

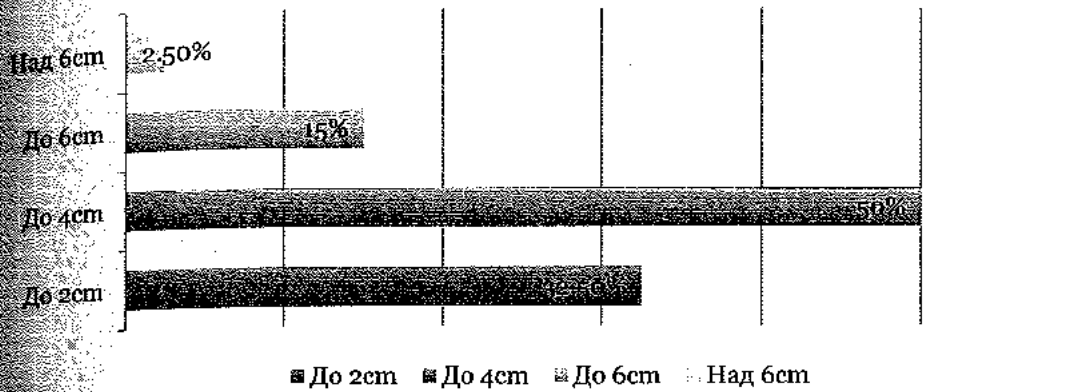
На табела 3. е прикажана дистрибуција на оралните лезии според топографијата. Од вкупно 80 прегледани пациенти кај 40 (50.0%) биле евидентирани промени во устата. Во однос на локализација на лезиите регистрирани се 6(15.0%) промени на јазик, 19(47.5%) промени се евидентирани на образната лигавица- билатерално, 8(20.0%) на образната лигавица-унилатерално, 2(5.0%) на подот на усната празнина, сублингвално 1(2.5%) и 4(10.0%) промени се регистрирани на усни.

Табела 3. Дистрибуција на оралните лезии топографијата

Топографија	Вкупно
	n/%
Јазик	6/15
Образна лигавица (билатерално)	19/47.5
Образна лигавица (унилатерално)	8/20.0
Под на усна празнина	2/ 5.0
Сублингвално	1/ 2.5
Усни	4/10.0
Вкупно	40/100.0

На графикон 4. е прикажан процентуален сооднос на оралните лезии според големината, т.е. според најголемиот промер на лезиите.

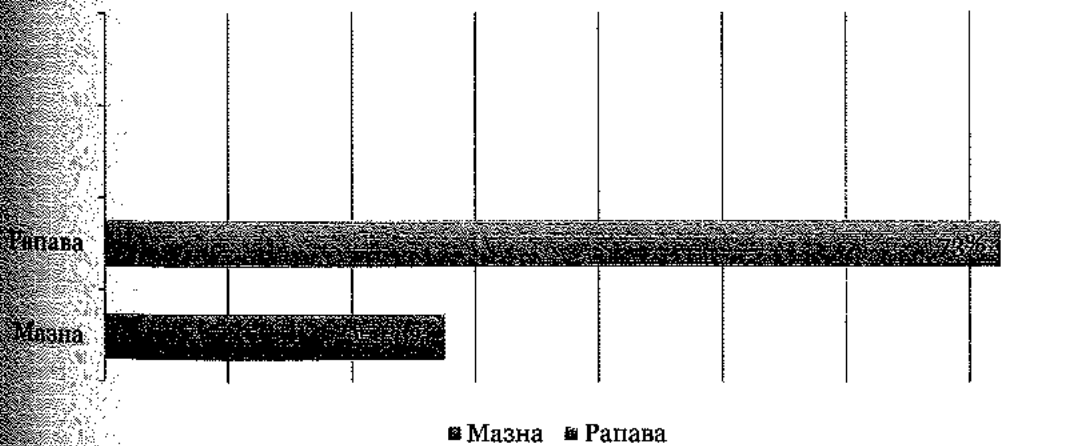
Кај 13(32.5%) пациенти се евидентирани промени до 2 cm, кај 20(50.0%) пациенти се регистрирани промени до 4 cm, кај 6(15.0%) пациенти се евидентирани промени до 6 cm и кај 1(2.5%) пациент била евидентирана промена над 6 cm. Најзастапени се промените до 4 cm со 50.0%.



Графикон 4. Процентуален приказ на промените според големината

На графикон 5. се прикажани резултатите кои се однесуваат на површинската структура на промените во устата.

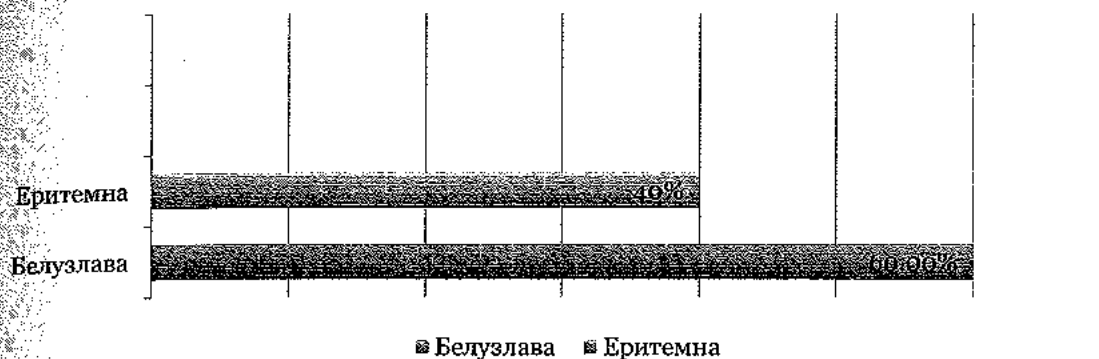
Од вкупно 40 испитаници со промени во устата кај 11(27.5%) испитаници е регистрирана мазна површина на промените, т.е. 29(72.5%) пациенти имаа промена со рапава површина.



Графикон 5. Процентуален приказ на промените според површинската структура

На графикон 6. се прикажани податоците кои се однесуваат на бојата на промените во устата.

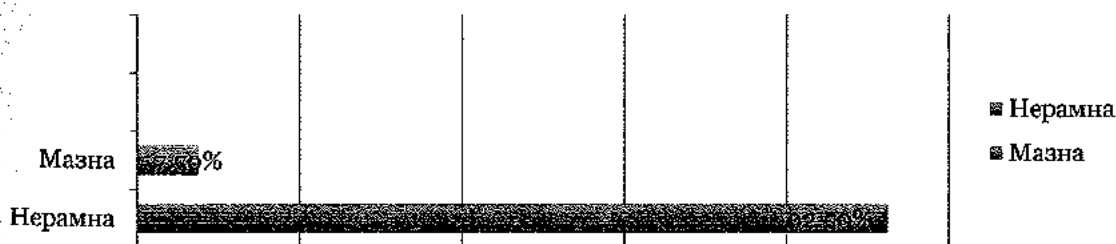
Од вкупно 40 пациенти со промени во устата, кај 24(60.0%) пациенти се евидентирани промени со белузлава боја, и кај 16(40%) од пациентите се евидентирани промени со еритемно обојување.



Графикон 6. Процентуален приказ на промените според бојата

На графикон 7. се прикажани резултатите кои се однесуваат на морфологијата на промените во устата.

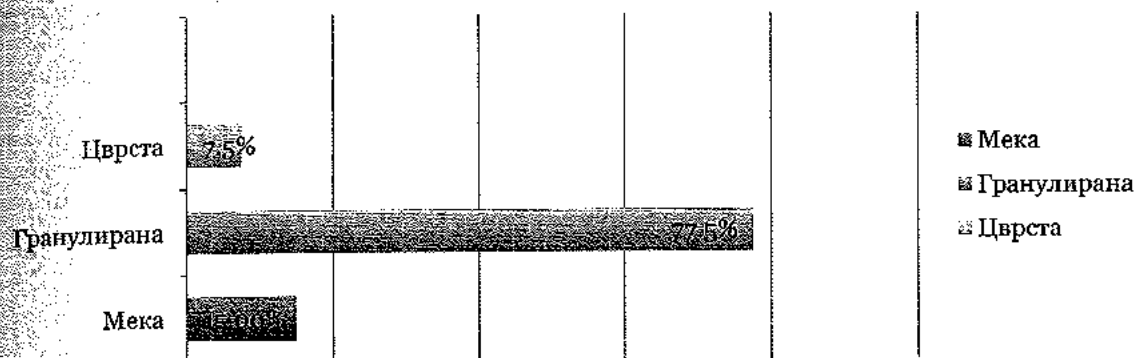
Од вкупно 40(100.0%) пациенти со промени во устата, кај 37(92.5%) се евидентирани промени со нерамна морфологија, и кај 3(7, 5%) од пациентите е констатирана мазна морфологија на промените.



Графикон 7. Процентуален приказ на промените според морфологијата

На графикон 8. се прикажани резултатите кои се однесуваат на конзистенцијата на промените во устата.

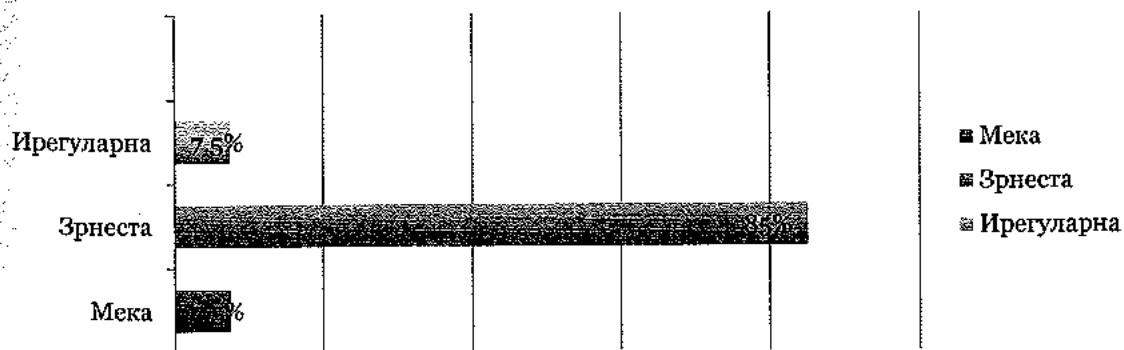
Вкупно 40(100.0%) пациенти имаа промени во устата, од кои 6(15.0%) промени се со мека конзистенција, кај 31(77.5%) е регистрирана гранулирана конзистенција и 3(7.5%) промени се со цврста конзистенција.



Графикон 8. Процентуален приказ на промените според конзистенција на промените

На графикон 9. се прикажани резултатите кои се однесуваат на палпација на промените во устата.

Вкупно 40 (100.0%) имаа промени во устата, од кои 3(7.14%) промени се меки на палпација, кај 34(80.95%) пациенти промените се зрнести, и кај 3(7.14%) пациенти промените се ирегуларни.

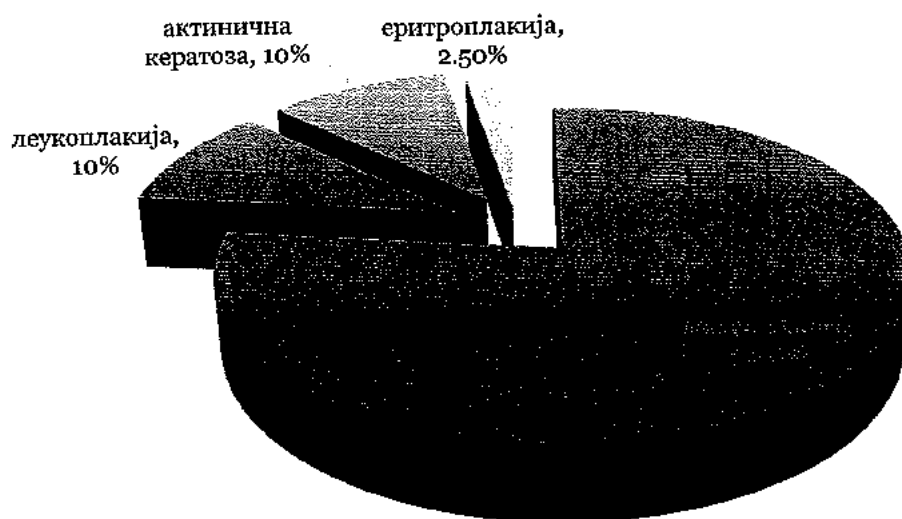


Графикон 9. Процентуален приказ на промените според палпација

5.1.3. Дијагностицирани орални преканцерозни лезии

На графикон 10. е прикажана процентуална застапеност на дијагностицираните орални преканцерозни лезии.

Врз основа на спроведената клиничка егзаминација како и поставената клиничка дијагноза, која беше и патохистолошки потврдена, во испитуваниот примерок се детектирани следниве орални преканцерозни лезии и состојби: лихен планус 77.5% (31/40), леукоплакија 10.0% (4/40), актинична кератоза 10.0% (4/40) и еритроплакија 2.5% (1/40).



Графикон 10. Приказ на процентуалната застапеност на оралните лезии

Резултатите кои се однесуваат на дистрибуција на пациентите според клиничката дијагноза и возраста се прикажани на табела 4.

Кај пациентите на возраст до 50 години се евидентирани 2(2.5%) пациенти со актинична кератоза, 1(1.3%), пациент со еритроплакија, 1(1.3%) пациент со леукоплакија, 11(13.8%) пациенти со лихен планус и 14(17.5%) пациенти од контролната група без орални лезии.

На возраст од 51- 56 години е регистриран 1(1.3%) пацент со актинична кератоза, 1(1.3%) пациент со леукоплакија, 12(15.0%) пациенти со лихен планус и 13(16.3%) пациенти од контролната група без орални лезии.

Над 56 годишна возраст се застапени вкупно 24 пациенти од кои 1(1.3%) пациент со актинична кератоза, 2(2.5%) пациенти со леукоплакија, 8(10.0%) пациенти со лихен планус и 13(16.3%) пациенти од контролната група.

Табела 4. Дистрибуција на оралните лезии според возраст кај пациентите од испитуваниот примерок

	Возраст n/%														
	АК*			Е			Л			ЛП			Контролна група		
	50г.	51-56г.	56г.	50г.	50г.	51-56г.	56г.	50г.	51-56г.	56г.	50г.	51-56г.	56г.		
Со 40/100	2/5.0	1/2.5	1/2.5	1/2.5	1/2.5	1/2.5	2/5.0	11/27.5	12/30.0	8/20	0.0	0.0	0.0		
Без 40/100	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	14/35.0	13/32.5	13/32.5		
Вкуп 80/100	2/2.5	1/1.3	1/1.3	1/1.3	1/1.3	1/1.3	2/2.5	11/13.8	12/15.0	8/10	14/17.5	13/16.3	13/16.3		

*АК- Актинична кератоза; Е- Еритроплакија; Л- Леукоплакија; ЛП- Лихен планус

На сликите 8-12 се прикажани дел од испитуваните орални преканцерони лезии.

На сл. 8а) и 8б) се прикажани ретикуларната и ерозивна форма на оралниот лихен планус на образната лигавица.

На сл. 9 и 10. е прикажана клиничка манифестација на леукоплакија на образната лигавица и леукоплакија со локализација на алвеоларниот гребен и сублингвално.

На сл. 11. е прикажана клиничка манифестација на актиничен хеилит на долна усна.

На сл. 12. е прикажана еритроплакија со локализација на образната лигавица.



Сл. 8. Лихен планус на образна лигавица- а) ретикуларна форма; б) ерозивна форма



Сл 9. Леукоплакија на образна лигавица



Сл. 10. Леукоплакија на алвеоларниот гребен и сублингвална регија



Сл. 11. Актиничен хеилит



Сл. 12. Еритроплакија

5.2. Молекуларно испитување

5.2.1. Скрининг и детекција на ХПВ

Дистрибуција на пациентите според скринингот од молекуларното испитување со полимеразна верижна реакција (real-time PCR) за детекција на ХПВ- ДНК е прикажана на табела 5.

Од вкупно 40 (100.0%) испитани пациенти со орални преканцерозни лезии, ХПВ- ДНК е детектиран кај 30.0% (12/40) од пациентите од испитуваната група со ОПЛ.

ХПВ- ДНК негативни резултатраа 70.0% (28/40) од пациентите од испитуваната група со орални преканцерозни лезии.

Кај 2.5% пациенти (1/40) од групата без орални лезии е детектирано присуство на ХПВ ДНК.

ХПВ ДНК негативни резултатраа 97.5% (39/40) пациенти од контролната група без орални преканцерозни лезии

Табела 5. Дистрибуција на пациентите од испитуваниот примерок според детекцијата на ХПВ- ДНК

	ХПВпозитивни		ХПВнегативни	
	п	%	п	%
Со ОПЛ	12	30,00	28	70,00
Без ОПЛ	1	2,50	39	97,50

Значајност на разликата помеѓу ХПВ позитивните и ХПВ негативните пациенти кај групата со орални лезии е одредена со Chi- square тестот и констатирана е статистичка сигнификантност за $\text{Chi} = 6.4$ и $p = 0.0114$.

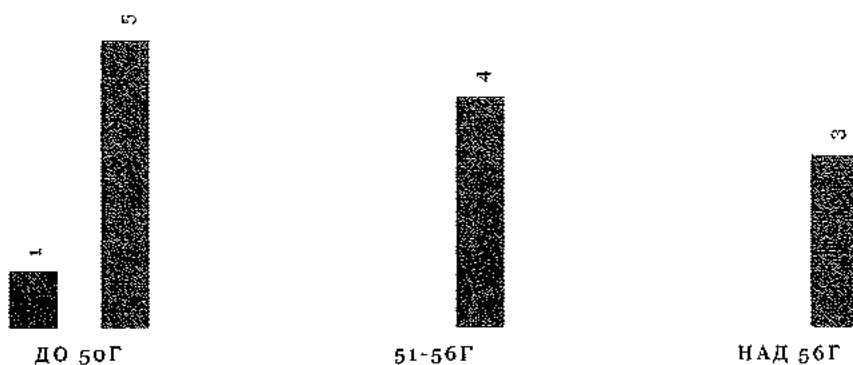
Разликата помеѓу ХПВ позитивните и ХПВ негативните пациенти во рамките на двете испитувани групи ($n=80$) е статистички сигнификантна за Chi- square тестот = 36.45 и $p < .0001$.

На графикон 11. прикажана е дистрибуција на ХПВ ДНК позитивните пациенти од испитуваниот примерок според возрастната група во која припаѓаат, односно до 50 години, од 51- 56 години и над 65 годишна возраст.

На возраст до 50 години се евидентирани 5 ХПВ ДНК позитивни пациенти од групата со ОПЛ и 1 ХПВ позитивен пациент од групата без ОПЛ.

На возраст од 51-56 години се евидентирани 4 ХПВ ДНК позитивни пациенти од групата со ОПЛ.

На возраст над 56 години се регистрирани 3 ХПВ ДНК позитивни пациенти од групата со ОПЛ.



Графикон 11. Дистрибуција на ХПВ ДНК позитивните пациенти од испитуваниот примерок по возрастни групи

На табела 6. се прикажани резултатите кои се однесуваат на дистрибуција на ХПВ позитивитетот по возрастни групи.

Во групата до 50 годишна возраст регистрирани се 12.5% (5/40) ХПВ позитивни пациенти од групата со ОПЛ.

Во групата од 51- 56 годишна возраст констатирано е присуство на ХПВ кај 10.0% (4/10) од испитаниците со орални лезии.

Во групата над 56 годишна возраст ХПВ е детектиран кај 7.5% (3/40) од пациентите од групата со ОПЛ.

Кај групата без ОПЛ ХПВ позитивитет е евидентиран во групата на пациенти до 50 годишна возраст кај 2.5% (1/40). Во останатите возрастни групи (од 51-56г и над 56год.) кај пациентите без ОПЛ, ХПВ наодот е негативен.

Во прикажаната дистрибуција за ХПВ позитивитетот во однос на возраста кај пациентите со ОПЛ, разликата не е статистички сигнификантна за Chi-square= 0.1319 и p= 0.936.

Табела 6. Дистрибуција на ХПВ позитивитетот по возрастни групи

		ХПВ негативни			ХПВ позитивни		
		возраст			возраст		
		до 50г	51-56г	над 56г	до 50г	51-56г	над 56г
		n/%	n/%	n/%	n/%	n/%	n/%
Со ОПЛ	40	10/25.0	10/25.0	8/20.0	5/12.5	4/10.0	3/7.5
Без ОПЛ	40	13/32.5	13/32.5	13/32.5	1/2.5	0.0	0.0
Вкупно	80	23/ 28.8	23/28.8	21/26.3	6/7.5	4/5.0	3/3.8

На табела 7. е прикажана дистрибуција на ХПВ позитивните пациенти кај групата со ОПЛ според топографијата.

Од вкупно 6(15.0%) регистрирани промени на јазикот, 2(5.0%) промени резултираа ХПВ позитивни.

На образната лигавица со билатерална локализација на промените се регистрирани вкупно 19(47.5%) промени од кои 8(20.0%) резултираа ХПВ позитивни.

На образната лигавица со унилатерална локализација се регистрирани вкупно 8(20.0%) промени од кои 1(2.5%) е ХПВ позитивна.

На усни се регистрирани вкупно 4(10.0%) промени од кои сите се ХПВ негативни.

На подот на усната празнина се регистрирани 2(5.0%) промени кои резултираат ХПВ негативни.

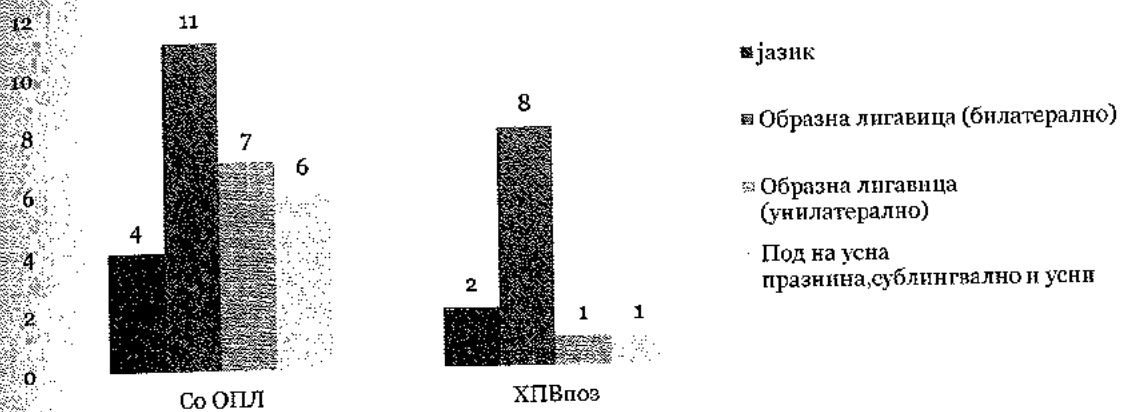
Со сублингвална локализација е регистрирана 1 (2.5%) промена која е ХПВ позитивна.

Табела 7. Дистрибуција на ХПВ позитивните пациенти според топографијата

	Со ОПЛ	ХПВпоз	Вкупно
Јазик	4/10.0	2/5.0	6/15.0
Образна лигавица (билатерално)	11/27.5	8/20.0	19/47.5
Образна лигавица (унилатерално)	7/17.5	1/ 2.5	8/20.0
Под на усна празнина	2/5.0	0/0	2/5.0
Сублингвално	0/0	1/ 2.5	1/ 2.5
Усни	4/10.0	0/0	4/10.0
Вкупно	28/70.0	12/30.0	40/100.0

На графикон 12. е прикажана дистрибуција на ХПВ позитивните пациенти според топографијата.

Во прикажаната дистрибуција за локализација на промените разликата помеѓу ХПВ позитивните примероци е статистички сигнификантна за Chi- square=11.33 и p=0.01.



Графикон 12. Дистрибуција на ХПВ позитивните пациенти според топографијата

5.2.2. Степен на образование и ХПВ наод

На табела 8. е прикажана дистрибуција на ХПВ позитивитетот според степенот на образование. Кај пациентите со основно образование е регистриран 1(2.5%) пациент со позитивен ХПВ наод.

Кај пациентите со средно образование се евидентирани 11(27.5%) пациенти со ХПВ позитивен наод.

Кај пациентите со високо образование е евидентиран 1(2.5%) пациент со позитивен наод.

Во прикажаната дистрибуција за ХПВ позитивитетот и степенот на образование, разликата не е статистички сигнификантна за Chi-square=0.709 и p= 0.7015.

Табела 8. Дистрибуција на ХПВ позитивитетот според степен на образование

	Вкупно		Степен на образование									
			Основно		Средно		Високо					
	Вкупно	ХПВ	Вкупно	ХПВ	Вкупно	ХПВ	Вкупно	ХПВ	Вкупно	ХПВ		
	ХПВнег	ХПВпоз	ХПВнег	ХПВпоз	ХПВнег	ХПВпоз	ХПВнег	ХПВпоз	ХПВнег	ХПВпоз		
со ОПЛ	40/100	28/70.0	12/30.0	6/15.0	6/15.0	0.0	26/65.0	15/37.5	11/27.5	8/20.0	7/17.5	1/2.5
без ОПЛ	40/100	39/97.5	1/2.5	8/20.0	7/17.5	1/2.5	26/65.0	26/65.0	0.0	6/15.0	6/15.0	0.0
вкупно	80/100.0	67/83.3	13/16.3	14/17.5	13/16.3	1/1.3	52/65.0	41/51.3	11/13.8	14/17.5	13/16.3	1/1.3

На табела 9. е прикажана дистрибуција на пациентите од испитуваниот примерок според степенот на образование и ХПВ позитивитетот.

Од вкупно 13(100%) пациенти кај кои е констатиран ХПВ позитивитет, 1(7.7%) пациент, на возраст до 50 години, од групата без ОПЛ, е со основно образование.

Регистрирани се вкупно 11(83.9%) ХПВ позитивни пациенти со средно образование од кои 4(30.8%) до 50 годишна возраст, 4 на возраст од 51-56 години и 3(23.1%) на возраст над 56 години.

ХПВ позитивитет е регистриран кај 1(7.7%) пациент на возраст над 56 години, со високо образование, од групата со ОПЛ.

Табела 9. Дистрибуција на ХПВ позитивитетот според степенот на образование,
возраст и ХПВ наод

		Основно образование			Средно образование			Високо образование			
		Возраст			Возраст			Возраст			
		До 50г.	51-56г.	Над 56г.	До 50г.	51-56г.	Над 56г.	До 50г.	51-56г.	Над 56г.	
Со ОПЛ	ХПВпоз*	12/100	0.0	0.0	0.0	4/33.3	4/33.3	3/25.0	1/8.3	0.0	0.0
	ХПВнег*	28/100	0.0	2/7.1	4/14.3	8/28.6	5/17.9	2/7.1	2/7.1	3/10.7	2/7.1
	Вкупно	40/100	0.0	2/5.0	4/10.0	12/30.0	9/22.5	5/12.5	3/7.5	3/7.5	2/5.0
Без ОПЛ	ХПВпоз	1/100	1/100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	ХПВнег	39/100	1/2.6	3/7.7	3/7.7	9/23.1	7/17.9	10/25.6	3/7.7	3/7.7	0.0
	Вкупно	40/100	2/5.0	3/7.5	3/7.5	9/22.5	7/17.5	10/25.0	3/7.5	3/7.5	0.0
Вкупно	ХПВпоз	13/100	1/7.7	0.0	0.0	4/30.8	4/30.0	3/23.1	1/7.7	0.0	0.0
	ХПВнег	67/100	1/1.5	5/7.5	7/10.4	17/25.4	12/17.9	12/17.9	5/7.5	6/9.0	2/3.0
	Вкупно	80/100	2/2.5	5/6.3	7/8.8	21/26.3	16/20.0	15/18.8	6/7.5	6/7.5	2/2.5

*ХПВпоз- ХПВ позитивни; ХПВнег- ХПВ негативни

5.2.3. Навики и ХПВ наод

Навиката за пушење во однос на ХПВ позитивитетот се прикажани на табела 10.

Од 22(27.5%) пациенти кои се изјаснија дека се редовни пушачи, ХПВ е детектиран кај 4 пациенти (5.0%).

ХПВ негативен наод е регистриран кај 18 (22.5) пациенти кои се изјаснија како редовни пушачи.

Од 58 (72.5%) непушачи, ХПВ е детектиран кај вкупно 9 (11.25%) пациенти, од кои 1(1.25%) е од контролната група без орални лезии.

ХПВ негативен наод е евидентиран кај 49(61.25%) пациенти без ОПЛ.

Во прикажаната дистрибуција за ХПВ наодот и навиката за пушење разликата не е статистички сигнификантна за $\text{Chi-square}=0.0832$ и $p=0.773$

Табела 10. Дистрибуција на пациентите според пушењето и ХПВ позитивитетот

Пушење	ХПВнег (n/%)	ХПВпоз (n/%)	Вкупно (n/%)
Да	18/22,5	4/5.0	22/27,5
Не	49/61,25	9/11.25	58/72,5
Вкупно	67/93,50	13/6.5	80/100,00

Дистрибуцијата на ХПВ позитивитетот според консумацијата на алкохол е прикажана на табела 11.

Од 5 пациенти (6.25%) кои се изјаснија дека консумираат алкохол секој ден, орален ХПВ позитивитет е евидентиран само кај еден пациент (1.25%).

Регистрирани се 4(5.0%) ХПВ негативни пациенти кои секојдневно консумираат алкохол.

Кај пациентите кои се изјаснија дека ретко консумираат алкохол 75 (93.75%), ХПВ позитивитет е детектиран 12(15.0%) од пациентите.

ХПВ негативни резултираа 63(78.75) пациенти.

Во прикажаната дистрибуција за ХПВ позитивитетот и консумацијата на алкохол разликата не е статистички сигнификантна за $\text{Chi-square}=0.055$ и $p=0.8144$.

Табела 11. Дистрибуција на ХПВ позитивитетот според консумацијата на алкохол

Алкохол	ХПВнег (n/%)	ХПВпоз (n/%)	Вкупно (n/%)
Секој ден	4/5,00	1/1,25	5/6,25
Ретко	63/78,75	12/15,0	75/93,75
Вкупно	67/83,75	13/16,25	80/100,00

На табела 12. е прикажан ХПВ позитивитетот во однос на ПАП- тестот.

Во истражувањето учествуваа вкупно 61 пациенти од женски пол, односно 31 (%) пациентки беа дел од контролната група и 30 (%) од испитуваната група.

Вкупно 13 (41.9%) пациенти од контролната и 14 (46.7%) од испитуваната група се изјаснија дека редовно прават ПАП- тест.

Во однос на ХПВ позитивитетот 3 пациентки (10 %) кои редовно прават ПАП-тест резултираа ХПВ позитивни.

Кај контролната група 1 (3.2%) пациентка која исто така редовно прави ПАП-тест е ХПВ позитивна.

Табела 12. Приказ на ХПВ позитивитетот во однос на ПАП-тестот

	ХПВ негативни				ХПВ позитивни				
	Вкупно n/%	ПАП-тест n/%		Вкупно n/%	ПАП-тест n/%		Вкупно n/%	ПАП-тест n/%	
		Да	Не		Да	Не		Да	Не
Со ОПЛ	30/100	14/46.7	16/53.3	23/76.7	11/36.7	12/40.0	7/23.3	3/10	4/13.3
Без ОПЛ	31/100	13/41.9	18/58.1	30/96.8	12/38.7	18/58.1	1/3.2	1/3.2	0.0
Вкупно	61/100	27/44.3	34/55.7	53/86.9	23/37.7	30/49.2	8/13.1	4/6.6	4/6.6

5.2.4. Орално здравје кај пациентите во однос на ХПВ инфекцијата

На табела 13. прикажани се резултатите во однос на прашањето за „посета на стоматолог„.

Резултатите во однос на прашањето за „посета на стоматолог„ покажаа дека 10(25.0%) пациенти од испитуваната група со орални лезии и 14(35.0%) пациенти од контролната група редовно посетуваат стоматолог. Од испитуваната група со ОПЛ 2(5.0%) пациенти резултираат ХПВ позитивни.

Вкупно 30(75.0%) пациенти од групата со ОПЛ и 26(65.0%) пациенти од контролната група не посетуваат редовно стоматолог.

Позитивен ХПВ наод констатиравме кај 10(25.0%) пациенти од групата со ОПЛ и кај 1(2.5%) пациент од контролната група.

Според прикажаната дистрибуција за ХПВ наодот и редовната посета на стоматолог, разликата не е статистички сигнификантна според Fisher's exact test за добиените наоди ($p=0.324$).

Табела 13. Посета на стоматолог и ХПВ позитивитетот

	Вкупно n/%		Посета на стоматолог n/%						
	Вкупно	ХПВ		Вкупно	Да		Вкупно	Не	
		ХПВнег	ХПВпоз		ХПВнег	ХПВпоз		ХПВнег	ХПВпоз
Со ОПЛ	40/100	28/70.0	12/30.0	10/25.0	8/20.0	2/5.0	30/75.0	20/50.0	10/25.0
Без ОПЛ	40/100	39/97.5	1/2.5	14/35.0	14/35.0	0/0.0	26/65.0	25/62.5	1/2.5
Вкупно	80/100	67/83.3	13/16.3	24/30.0	22/27.5	2/2.5	56/70.0	45/56.3	11/13.8

Резултатите кои се однесуваат за редовноста на одржување на оралната хигиена како и користење сопствена четка за заби се прикажани на табела 14.

Сите пациенти 80(100%) одговорија позитивно во однос на навиката за редовно одржување орална хигиена како и користење сопствена четка за заби.

Во однос на двете прашања кај 1(2.5%) пациент од испитуваната група со орални лезии и кај 12(30%) од контролната група констатиран е ХПВ позитивитет.

ХПВ негативен наод е регистриран кај 67(83.8%) од пациентите кои редовно одржуваат орална хигиена и кои користат сопствена четка за заби.

Според прикажаната дистрибуција за ХПВ наодот и редовната одржување на орална хигиена како и користење на сопствена четка за заби, разликата не е статистички сигнификантна според Fisher's exact test за добиените наоди ($p=1.0$).

Табела 14. ХПВ позитивитет и орална хигиена

	Вкупно n/%		Одржување орална хигиена n/%				Користење сопствена четка за заби n/%			
			Да				Да			
	Вкупно	ХПВ	Вкупно	ХПВ		Вкупно	ХПВ			
	ХПВнег	ХПВпоз	ХПВнег	ХПВпоз	ХПВнег	ХПВпоз	ХПВнег	ХПВпоз		
Со ОПЛ	40/100	28/70.0	12/30.0	40/100	28/70.0	12/30.0	40/100	28/70.0	12/30.0	
Без ОПЛ	40/100	39/97.5	1/ 2.5	40/100	39/97.5	1/ 2.5	40/100	39/97.5	1/ 2.5	
Вкупно	80/100	67/83.3	13/16.3	80/100	67/83.8	13/16.3	80/100	67/83.8	13/16.3	

5.2.5. Главни тегоби и ХПВ наод

На табела 15. прикажани се резултатите кои се однесуваат на субјективни симптоми: болка, жарење и печење.

Вкупно 34(85.0%) пациенти од испитуваната група се изјаснија дека имаат субјективни симптоми, од кои 10(25.0%) се ХПВ позитивни.

Од вкупно 6(15.0%) пациенти кои се изјаснија дека немаат субјективни симптоми кај 2(5.0%) пациенти е констатиран ХПВ позитивитет.

Табела 15. Субјективни симптоми кај испитуваните пациенти и ХПВ позитивитет

	Вкупно n/%		Болка, печење и жарење n/%						
			Да			Не			
	Вкупно	ХПВ	Вкупно	ХПВ		Вкупно	ХПВ		
	ХПВнег	ХПВпоз	ХПВнег	ХПВпоз	ХПВнег	ХПВпоз	ХПВнег	ХПВпоз	
Со ОПЛ	40/100	28/70.0	12/30.0	34/85.0	24/60.0	10/25.0	6/15.0	4/10.0	2/5.0
Без ОПЛ	40/100	39/97.5	1/2.5	32/80.0	31/77.5	1/2.5	8/20.0	8/20.0	0.0
Вкупно	80/100	67/83.3	13/16.3	66/82.5	55/68.8	11/13.8	14/17.5	12/15.0	2/2.5

На табела 16. се прикажани резултатите кои се однесуваат на субјективниот исказ на пациентите за главни тегоби во однос на крварење од непцата.

Вкупно 38(47.5%) од пациентите се изјаснија дека имаат крварење од непцата од кои 6(15%) пациенти од групата со ОПЛ се ХПВ позитивни.

Од 20 (50%) пациенти кои негираат крварење од непцата, ХПВ позитивни се 6(15%) од испитуваната и 1(2.5%) од контролната група.

Табела 16. Крварење од непцата и ХПВ наод

	Вкупно n/%		Крварење од непцата n/%						
			Да			Не			
	Вкупно	ХПВ	Вкупно	ХПВ	Вкупно	ХПВ	Вкупно	ХПВ	
	ХПВнег	ХПВпоз	ХПВнег	ХПВпоз	ХПВнег	ХПВпоз	ХПВнег	ХПВпоз	
Со ОПЛ	40/100	28/70.0	12/30.0	20/50.0	14/35.0	6/15.0	20/50.0	14/35.0	6/15.0
Без ОПЛ	40/100	39/97.5	1/2.5	18/45.0	18/45.0	0.0	22/55.0	21/52.5	1/2.5
Вкупно	80/100	67/83.3	13/16.3	38/47.5	32/40.0	6/7.5	42/52.5	35/43.8	7/8.8

На табела 17. се прикажани резултатите кои се однесуваат на субјективниот исказ за разлабавување на забите.

Разлабавување на забите е констатирано кај 13(32.5%) пациенти од испитуваната група со орални лезии од кои 6(15%) се ХПВ позитивни.

Разлабавување на забите немаат 27(67.5%) пациенти од испитуваната група од кои 6(15%) се ХПВ позитивни.

Табела 17. Разлабавување на забите и ХПВ наод

	Вкупно n/%		Разлабавување на забите n/%						
			Да			Не			
	Вкупно	ХПВ	Вкупно	ХПВ	Вкупно	ХПВ	Вкупно	ХПВ	
	ХПВнег	ХПВпоз	ХПВнег	ХПВпоз	ХПВнег	ХПВпоз	ХПВнег	ХПВпоз	
Со ОПЛ	40/100	28/70.0	12/30.0	13/32.5	7/17.5	6/15.0	27/67.5	21/52.5	6/15.0
Без ОПЛ	40/100	39/97.5	1/2.5	10/25.0	10/25.0	0.0	30/75.0	29/72.5	1/2.5
Вкупно	80/100	67/83.3	13/16.3	23/28.8	17/21.3	6/7.5	57/71.3	50/62.5	7/8.8

На табела 18. се прикажани резултатите кои се однесуваат на сувост на устата.

Сувост на устата е констатирана кај 27(67.5%) пациенти од испитуваната група со орални лезии од кои 6(15%) резултираат ХПВ позитивни.

Вкупно 13(32.5%) пациенти немаа сувост на устатата. Кај 6(15.0%) е констатиран ХПВ позитивитет.

Табела 18. Сувост на устата како субјективен симптом и ХПВ наод

	Вкупно n/%		Сувост на устата n/%						
			Да			Не			
	Вкупно	ХПВ	Вкупно	ХПВ		Вкупно	ХПВ		
	ХПВнег	ХПВпоз	ХПВнег	ХПВпоз		ХПВнег	ХПВпоз		
Со ОПЛ	40/100	28/70.0	12/30.0	27/67.5	21/52.5	6/15.0	13/32.5	7/17.5	6/15.0
Без ОПЛ	40/100	39/97.5	1/2.5	23/57.5	23/57.5	0.0	17/42.5	16/40.0	1/2.5
Вкупно	80/100	67/83.3	13/16.3	50/62.5	44/55.0	6/7.5	30/37.5	23/28.8	7/8.8

Резултатите кои се однесуваат на присуство на оток и ХПВ наод се прикажани на табела 19.

Вкупно 13(32.5%) пациенти од испитуваната група со орални лезии укажаа на присуство оток.

Регистрирани се 5(12.5%) ХПВ позитивни пациенти со присуство на овој наод.

Од испитуваната група (со лезии) присуство на оток негираа 27(67.5%) пациенти од кои 7(17.5%) пациенти беа ХПВ позитивни.

Според прикажаната дистрибуција за ХПВ наодот и присуството на оток, разликата не е статистички сигнификантна според Fisher's exact test за добиените наоди ($p=0.747$).

Табела 19. Присуство на оток и ХПВ наод

	Вкупно n/%			Оток n/%					
	Вкупно	ХПВ		Вкупно	Да		Вкупно	Не	
		ХПВнег	ХПВпоз		ХПВнег	ХПВпоз		ХПВнег	ХПВпоз
Со ОПЛ	40/100	28/70.0	12/30.0	13/32.5	8/20.0	5/12.5	27/67.5	20/50.0	7/17.5
Без ОПЛ	40/100	39/97.5	1/2.5	10/25.0	10/25.0	0.0	30/75.0	29/72.5	1/2.5
Вкупно	80/100	67/83.3	13/16.3	23/28.8	18/22.5	5/6.3	57/71.3	49/61.3	8/10.0

5.2.6. Минати заболувања

Резултатите кои се однесуваат на кардиоваскуларни заболувања и ХПВ позитивитет се прикажани на табела 20.

Кардиоваскуларни заболувања се констатирани кај 7(17.5%) пациенти од испитуваната група и кај 4(10.0%) пациенти од контролната група.

ХПВ позитивен наод е констатиран кај 1(2.5%) пациент со кардиоваскуларно заболување.

Вкупно 33 (82.5%) пациенти од испитуваната група со ОПЛ немаа кардиоваскуларно заболување, од кои 11(27.5%) имаа ХПВ позитивен наод.

Според прикажаната дистрибуција за ХПВ наодот и кардиоваскуларните заболувања, разликата не е статистички сигнификантна според Fisher's exact test за добиените наоди ($p=0.68$).

Табела 20. Кардиоваскуларни заболувања и ХПВ инфекција

	Вкупно п/%		Кардиоваскуларни заболувања						
			Да			Не			
	Вкупно	ХПВ	Вкупно	ХПВ	Вкупно	ХПВ	Вкупно	ХПВ	
	ХПВнег	ХПВпоз	ХПВнег	ХПВпоз	ХПВнег	ХПВпоз	ХПВнег	ХПВпоз	
Со ОПЛ	40/100	28/70.0	12/30.0	7/17.5	6/15.0	1/ 2.5	33/82.5	22/55.0	11/27.5
Без ОПЛ	40/100	39/97.5	1/ 2.5	4/10.0	4/10.0	0.0	36/90.0	35/87.5	1/ 2.5
Вкупно	80/100	67/83.8	13/16.3	11/13.8	10/12.5	1/ 1.3	69/86.3	57/71.3	12/15.0

Резултатите кои се однесуваат на гастроинтестинални заболувања и ХПВ наодот се прикажани на табела 21.

Гастроинтестинални заболувања се евидентирани кај 2(5.0%) од пациентите од испитуваната група и кај 3(7.5%) пациенти од контролната.

ХПВ позитивитет е констатиран кај 1(2.5%) пациенти од испитуваната група кои имаат гастроинтестинално заболување.

Од вкупно 38(95.0%) пациенти кои немаат гастроинтестинално заболување 11(27.5) се ХПВ позитивни.

Табела 21. Гастроинтестинални заболувања и ХПВ инфекција

	Вкупно n/%		Гастроинтестинални заболувања n/%						
			Да			Не			
	Вкупно	ХПВ	Вкупно	ХПВ	Вкупно	ХПВ	Вкупно	ХПВ	
	ХПВнег	ХПВпоз	ХПВнег	ХПВпоз	ХПВнег	ХПВпоз	ХПВнег	ХПВпоз	
Со ОПЛ	40/100	28/70.0	12/30.0	2/5.0	1/ 2.5	1/ 2.5	38/95.0	27/67.5	11/27.5
Без ОПЛ	40/100	39/97.5	1/ 2.5	3/7.5	3/7.5	0.0	37/92.5	36/90.0	1/ 2.5
Вкупно	80/100	67/83.8	13/16.3	5/6.3	4/5.0	1/ 1.3	75/93.8	63/78.8	12/15.0

На табела 22. прикажани се резултатите кои се однесуваат на невролошки заболувања и ХПВ наод.

Нервни заболувања се евидентирани кај 1(2.5%) пациент од испитуваната група и кај 2(5.0%) пациенти од контролната група. Сите пациенти со нервно заболување се ХПВ негативни.

Табела 22. Нервни заболувања и ХПВ инфекција

	Вкупно n/%		Нервни заболувања n/%					
			Да			Не		
	Вкупно	ХПВ	Вкупно	ХПВ	Вкупно	ХПВ	Вкупно	ХПВ
	ХПВнег	ХПВпоз	ХПВнег	ХПВпоз	ХПВнег	ХПВпоз	ХПВнег	ХПВпоз
Со ОПЛ	40/100	28/70.0	12/30.0	1/ 2.5	1/ 2.5	39/97.5	27/67.5	12/30.0
Без ОПЛ	40/100	39/97.5	1/ 2.5	2/5.0	2/5.0	38/95.0	37/92.5	1/ 2.5
Вкупно	80/100	67/83.8	13/16.3	3/3.8	3/3.8	77/96.3	64/80	13/16.3

На табела 23. се прикажани резултатите кои се однесуваат на ендокрините заболувања и ХПВ инфекцијата.

Вкупно 1(2.5%) пациент од испитуваната група со орални преканцерозни лезии има ендокрино заболување.

ХПВ е детектиран кај 1(2.2%) пациент од испитуваната група со ендокрино заболување.

Според прикажаната дистрибуција за ХПВ позитивитетот и гастроинтестиналните, нервните и ендокрините заболувања, разликата не е статистички сигнификантна според Fisher's exact test за добиените наоди ($p=1.0$; $p=1.0$; $p=0.42$).

Табела 23. Ендокрини заболувања и ХПВ инфекција

	Вкупно n/%		Ендокрини заболувања n/%					
	ХПВ		Вкупно о	Да		Не		Вкупно о
	ХПВне г	ХПВпо з		ХПВне г	ХПВпо з	ХПВне г	ХПВпо з	
Со ОПЛ	40/100	28/70.0 12/30.0	1/2.5	0.0	1/2.5	39/97.5	28/70.0	11/27.5
Без ОПЛ	40/100	39/97.5 1/2.5	2/5.0	2/5.0	0.0	38/95.0	37/92.5	1/2.5
Вкупно о	80/100	67/83.8 13/16.3	3/3.8	2/2.5	1/1.3	77/96.3	65/81.3	12/15.0

5.2.7. Социјална анамнеза

На табела 24. прикажани се резултатите кои се однесуваат на прашањето „услови за живот,“. Вкупно 37(92.5%) од пациентите со орални лезии се изјаснија дека живеат во „добри услови за живот,“ и 3(7.5%) се изјаснија дека живеат во „лоши услови за

живот. Кај 11(27.5%) пациенти од испитуваната група со орални преканцерозни лезии кои се изјаснија дека живеат во „добри услови за живот“, евидентирано е ХПВ присуство.

Кај 1(2.5%) пациенти од групата со орални лезии кои се изјаснија дека живеат во „лоши услови за живот“, констатирано е ХПВ присуство.

Табела 24. Услови за живот и ХПВ статус

	Вкупно n/%	Услови за живот							
		ХПВ		Добри услови за живот				Лоши услови за живот	
		ХПВнег	ХПВпоз	Вкупно	ХПВ		Вкупно	ХПВ	
					ХПВнег	ХПВпоз		ХПВнег	ХПВпоз
Со ОПЛ	40/100	28/70.0	12/30.0	37/92.5	26/65.0	11/27.5	3/7.5	2/5.0	1/ 2.5
Без ОПЛ	40/100	39/97.5	1/ 2.5	37/92.5	37/92.5	0.0	3/7.5	2/5.0	1/ 2.5
Вкупно	80/100	67/83.8	13/16.3	74/92.5	63/78.8	11/13.8	6/7.5	4/5.0	2/2.5

Резултатите кои се однесуваат на брачниот статус и ХПВ наодот се прикажани на табела 25.

Од испитуваната група на пациенти со орални лезии 30(75.0%) пациенти се изјаснија дека се во брак и 10(25.0%) пациенти се изјаснија дека не се во брак.

ХПВ позитивитет е констатиран кај 9(22.5%) пациенти од испитуваната група со ОПЛ кои се во брак и кај 3(7.5%) пациенти од испитуваната група кои не се во брак.

Кај контролната група без ОПЛ 30(75.0%) пациенти се изјаснија дека се во брак и 10(25.0%) пациенти се изјаснија дека не се во брак.

Кај 1(2.5%) пациент без ОПЛ кој е во брак е регистриран ХПВ позитивен наод.

Според прикажаната дистрибуција за ХПВ позитивитетот и брачниот статус како и условите за живот, разликата не е статистички сигнификантна според Fisher's exact test за добиените наоди ($p=1.0$; $p=0.25$).

Табела 25. Брак и ХПВ инфекцијата

	Вкупно n/%		Брак						
			Да			Не			
	Вкупно	ХПВ	Вкупно	ХПВ		Вкупно	ХПВ		
		ХПВнег	ХПВпоз	ХПВнег	ХПВпоз	ХПВнег	ХПВпоз		
Со ОПЛ	40/100	28/70.0	12/30.0	30/75.0	21/52.5	9/22.5	10/25.0	7/17.5	3/7.5
Без ОПЛ	40/100	39/97.5	1/2.5	30/75.0	29/72.5	1/2.5	10/25.0	10/25.0	0.0
Вкупно	80/100	67/83.8	13/16.3	60/75.0	50/62.5	10/12.5	20/25.0	17/21.3	3/3.8

На табела 26. прикажани се резултатите кои се однесуваат на фамилијарната историја за канцерогени заболувања и ХПВ наодот.

Вкупно 4(10.0%) пациенти од групата со орални лезии одговорија дека имале фамилијарна историја за канцерогени заболувања, од кои 1(2.5%) имаше позитивен ХПВ наод.

Кај 36(90.0%) пациенти кои негираа присуство на канцерогено заболување во семејството, ХПВ позитивен наод е констатиран кај 11(27.5%) паценти од испитуваната група со орални лезии.

Табела 26. Дистрибуција на пациентите според фамилијарна историја на канцерогени заболувања и ХПВ статус

	Вкупно n/%		Канцерогени заболувања						
			Да			Не			
	Вкупно	ХПВ	Вкупно	ХПВ	Вкупно	ХПВ	Вкупно	ХПВ	
	ХПВнег	ХПВпоз	ХПВнег	ХПВпоз	ХПВнег	ХПВпоз	ХПВнег	ХПВпоз	
Со ОПЛ	40/100	28/70.0	12/30.0	4/10.0	3/7.5	1/2.5	36/90.0	25/62.5	11/27.5
Без ОПЛ	40/100	39/97.5	1/2.5	6/15.0	6/15.0	0.0	34/85.0	33/82.5	1/2.5
Вкупно	80/100	67/83.3	13/16.3	10/12.5	9/11.3	1/1.3	70/87.5	58/72.5	12/15.0

5.2.8. Пародонтолошки статус

Во склоп на клиничкиот преглед спроведен е пародонтолошки клинички преглед при што се евидентирани следниве пародонтолошки параметри: индекс на дентален плак (ИДП), индекс на гингивално зголемување (ИГЗ), индекс на гингивална инфламација (ИГИ), клинички губиток на атачмент (КГА) и индекс на луксација (ИЛ).

На табела 27. прикажани се вредностите на клиничките пародонтолошки параметри кај пациентите од двете групи, групата со орални преканцерозни лезии и групата без орални лезии.

Според Student's t- тест за ИДП $t=0.190$ ($p=0.512$), за ИГИ $t=-1.240$ ($p=0.320$), за ИГЗ $t=-3.200$ ($p=0.002$), за КГА $t=0.390$ ($p=0.219$), за ИЛ $t=-0.450$ ($p=0.646$).

Разликата помеѓу двете групи за ИДП, ИГИ, КГА и ИЛ не е статистички сигнификантна.

Разликата помеѓу двете испитувани групи е статистички сигнификантна само за ИГЗ ($p=0.002$).

Табела 27. Дескриптивна статистика на испитуваните клинички пародонтолошки

индекси кај пациенти со орални промени

	Без ОПЛ (n=40)		Со ОПЛ (n=40)		Diff (1-2)	t	p	df
	X 1	SD 1	X 2	SD 2				
ИДП	1.5	0.6	1.5	0.6	0.0	0.190	0.512	78
ИГИ	1.4	0.7	1.5	0.6	-0.2	-1.240	0.320	78
ИГЗ	0.5	0.7	1.1	0.8	-0.5	-3.200	0.002	78
КГА	1.5	0.6	1.5	0.6	0.1	0.390	0.219	78
ИЛ	0.2	0.4	0.3	0.6	-0.1	-0.450	0.646	78

На табела 28. се прикажани вредностите на пародонтолошките параметри во однос на ХПВ инфекцијата помеѓу сите ХПВ позитивни (n=13) и ХПВ негативните (n=67) пациенти.

ИДП помеѓу сите ХПВ негативни пациенти и ХПВ позитивни пациенти $t=0.530$ $p=0.595$), за ИГЗ $t= -0.300$ ($p=0.768$), за ИГИ $t=-1.110$ ($p=0.271$), за КГА $t=0.790$ ($p=0.432$) и за ИЛ $t=-0.460$ ($p=0.646$).

Разликата помеѓу ХПВ позитивните и ХПВ негативните пациенти од вкупниот број на испитувани пациенти (контролна и испитувана) во однос на сите испитувани пародонтолошки клинички параметри не е статистички сигнификантна.

Табела 28. Приказ на пародонтолошките параметри во однос на ХПВ инфекцијата помеѓу сите ХПВ позитивни и ХПВ негативни пациенти

	ХПВнег (n=67)		ХПВпоз (n=13)		Diff (1-2)	t	p	df
	X 1	SD 1	X 2	SD 2				
ИДП	1.5	0.6	1.4	0.5	0.1	0.530	0.595	78
ИГИ	1.4	0.6	1.6	0.7	-0.2	-1.110	0.271	78
ИГЗ	0.8	0.8	0.8	0.8	-0.1	-0.300	0.768	78
КГА	1.5	0.6	1.4	0.7	0.1	0.790	0.432	78
ИЛ	0.2	0.5	0.3	0.6	-0.1	-0.460	0.646	78

На табела 29. се прикажани пародонтолошките параметри во однос на ХПВ инфекцијата помеѓу ХПВ позитивните (n=12) и ХПВ негативните пациенти (n=28) во рамките на испитуваната група на пациенти со орални преканцерозни лезии.

Според Student's t- тест за ИДП $t=0.870$ ($p=0.389$), за ИГИ $t=-0.400$ ($p=0.692$), за ИГЗ $t=0.700$ ($p=0.488$), за КГА $t=1.060$ ($p=0.296$), за ИЛ $t=0.180$ ($p=0.855$).

Разликата помеѓу ХПВ позитивните и ХПВ негативните пациенти за ИДП, ИГЗ, ИГИ, КГА не е статистички сигнификантна.

Табела 29. Приказ на пародонтолошките параметри во однос на ХПВ инфекцијата помеѓу ХПВ позитивните и ХПВ негативните пациенти со ОПЛ

	ХПВнег (n=28)		ХПВпоз (n=12)		Diff (1- 2)	t	p	df
	X 1	SD 1	X 2	SD 2				
ИДП	1.5	0.6	1.3	0.5	0.2	0.870	0.389	38
ИГИ	1.5	0.6	1.6	0.7	-0.1	-0.400	0.692	38
ИГЗ	1.1	0.8	0.9	0.8	0.2	0.700	0.488	38
КГА	1.5	0.5	1.3	0.7	0.2	1.060	0.296	38
ИЛ	0.3	0.5	0.3	0.6	0.0	0.180	0.855	38

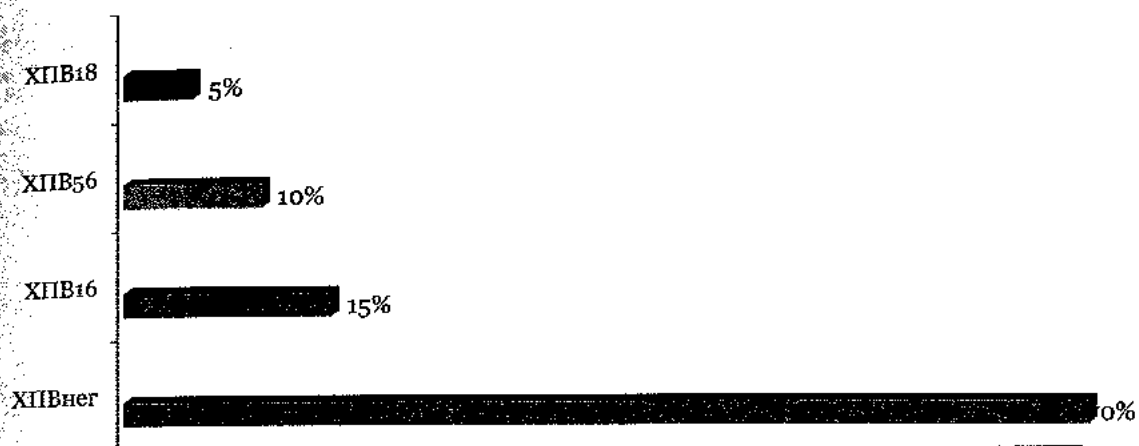
5.3. Генотипизација на детектираните ХПВ типови

Дистрибуција на различните ХПВ типови кај испитуваната група е прикажана на графикон 13.

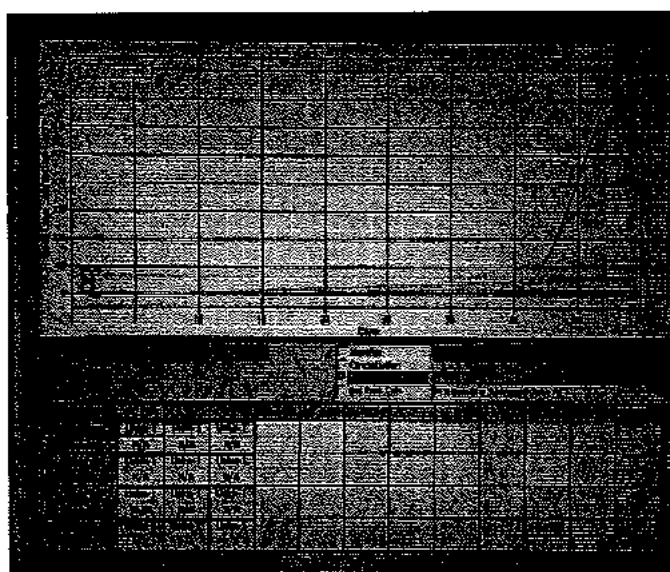
Со методот за генотипизација се детектирани вкупно четири различни генотипови на ХПВ: ХПВ 16, ХПВ 18, ХПВ 56 и ХПВ 31.

Констатирано е присуство на ХПВ 16 кај 6(15%) од пациентите (6/40), HPV 56 кај 4(10.0%) од пациентите (4/40) и HPV 18 кај 2(5.0%) од пациентите (2/40), додека 28 (70.0%) (28/40) од пациентите се ХПВ негативни.

На сл. 13 е прикажан резултат од позитивен ХПВ ДНК наод со детерминиран генотип 56.



Графикон 13. Дистрибуција на ХПВ типовите во групата со ОПЛ



Сл. 13. Резултат од ХПВ ДНК генотипизација, во прва колона пациент позитвен за ХПВ 56.

ХПВ типизацијата според клиничката дијагноза односно дијагностицираните орални преканцерозни лезии е прикажана на табела 30.

Сите ХПВ позитивни пациенти имаа единечна инфекција, односно детектиран е само по еден ХПВ тип. Мултипла инфекција не е детектирана кај ниеден пациент.

Кај пациентите со орални преканцерозни лезии евидентирани се вкупно 30.0% (12/40) ХПВ позитивни пациенти и 70.0% (28/40) ХПВ негативни пациенти.

ХПВ 56 е детектиран кај 4 (10.0%) испитаници со лихен планус.

ХПВ 16 е детектиран кај 3(7.5%) пациенти со лихен планус, кај 2(5.0%) испитаници со леукоплакија и кај 1(2.5%) пациент со еритроплакија.

ХПВ 18 е детектиран кај 2(5.0%) пациенти со леукоплакија.

ХПВ негативни се вкупно 28(70.0%) испитаници, од кои 24(60.0%) испитаници со лихен планус и 4(10.0%) со актинична кератоza.

Табела 30. ХПВ позитивитет кај оралните лезии и кај здрава лигавица

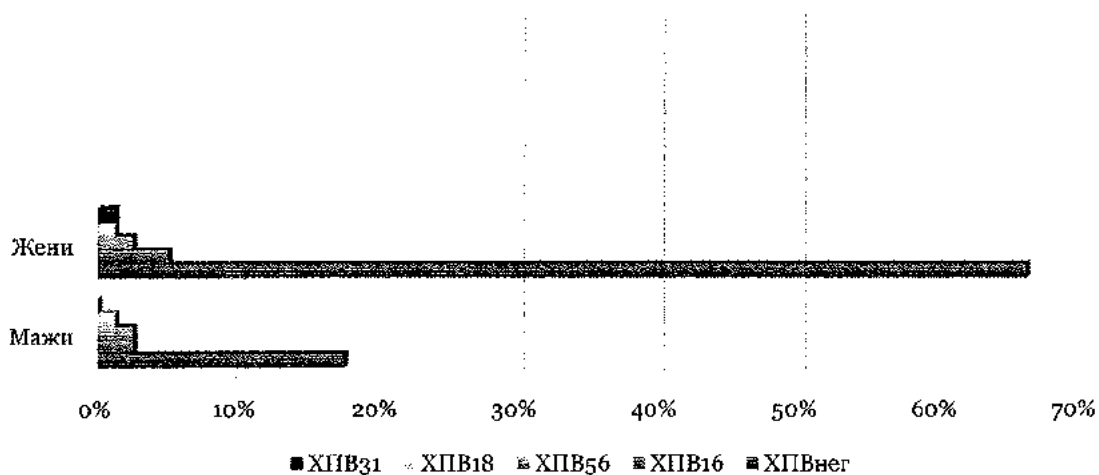
Орален ХПВ	Лихен планус (n/%)	Актинична кератоza (n/%)	Леукоплакија (n/%)	Еритроплакија (n/%)	Здрава лигавица (n/%)	Вкупно (n/%)
ХПВнег	24/30,00	4/5,00	0/0,00	0/0,00	39/48,75	67/83,75
ХПВ56	4/5,00	0/0,00	0/0,00	0/0,00	0/0,00	4/5,00
ХПВ16	3/3,75	0/0,00	2/2,5	1/1,25	0/0,00	6/7,5
ХПВ18	0/0,00	0/0,00	2/2,5	0/0,00	0/0,00	2/2,5
ХПВ31	0/0,00	0/0,00	0/0,00	0/0,00	1/1,25	1/1,25
Вкупно	31/38,75	4/5,00	4/5,00	1/1,25	40/50,00	80/100,00

На графикон 14. е прикажана дистрибуција на ХПВ генотиповите според полова дистрибуција.

Кај пациенти од машки пол се детектирани следниве генотипови: ХПВ 56 кај 2 (2.5%) пациенти, ХПВ 16 кај 2 (2.5%) пациенти и ХПВ 18 кај 1 (1.25%) пациент.

Кај пациенти од женски пол се детектирани следниве ХПВ генотипови: ХПВ 56 кај 2 (2.5%) пациенти, ХПВ 16 кај 4 (5%) пациенти, ХПВ 18 (1.25%) кај еден пациент и ХПВ 31 (1.25%) кај еден пациент.

Според Fisher's Exact Test за позитивни и негативни ХПВ пациенти разликата помеѓу половите не е статистички сигнификантна ($p < 0.28$).



Графикон 14. ХПВ позитивитет според полова застапеност

На табела 31 е прикажана дистрибуцијата на ХПВ генотиповите во однос на пушењето. Од 22(27.5%) пушачи, ХПВ56 е детектиран кај 1 пациент (1.25%); ХПВ16 е детектиран кај 2 пациенти (2.5%) и ХПВ18 кај еден пациент (1.25%).

Помеѓу непушачите ($n=58$, 72.5%) ХПВ56 е детектиран кај 3 пациенти (3.75%), ХПВ16 е детектиран кај 4 пациенти(5%), ХПВ 18 кај еден пациент (1.25%) и ХПВ 31 кај еден пациент (1.25%).

Табела 31. Дистрибуција на пациенти според пушењето и ХПВ генотиповите

Пушење	ХПВ позитивитет					Вкупно
	ХПВнег (n/%)	ХПВ56 (n/%)	ХПВ16 (n/%)	ХПВ18 (n/%)	ХПВ31 (n/%)	
Да	18/22,5	1/1,25	2/2,5	1/1,25	0/0,00	22/27,5
Не	49/61,25	3/3,75	4/5,00	1/1,25	1/1,25	58/72,5
Вкупно	67/93,50	4/2,00	6/3,00	2/1,00	1/0,50	80/100,00

Дистрибуцијата на ХПВ генотиповите во однос на консумацијата на алкохол е прикажана на табела 32.

Од 5 пациенти (6.25%) кои се изјаснија дека консумираат алкохол секој ден, орален ХПВ позитивитет е евидентиран само кај еден пациент (1.25%), кој е позитивен на ХПВ 16.

Кај пациенти кои се изјаснија дека ретко консумираат алкохол 75 (93.75%), ХПВ 56 позитивитет е детектиран кај 4 пациенти (5.0%), ХПВ16 кај 5 пациенти (6.25%), ХПВ 18 кај 2 пациенти (2.5%) и ХПВ 31 кај еден пациент (1.25%).

Табела 32. Дистрибуција на ХПВ генотиповите според консумацијата на алкохол

Алкохол	Орален ХПВ					Вкупно n/%
	ХПВneg	ХПВ56	ХПВ16	ХПВ18	ХПВ31	
Секој ден	4/5,00	0/0,00	1/1,25	0/0,00	0/0,00	5/6,25
Ретко	63/78,75	4/5,00	5/6,25	2/2,50	1/1,25	75/93,75
Вкупно	67/83,75	4/5,00	6/7,50	2/2,50	1/1,25	80/100,00

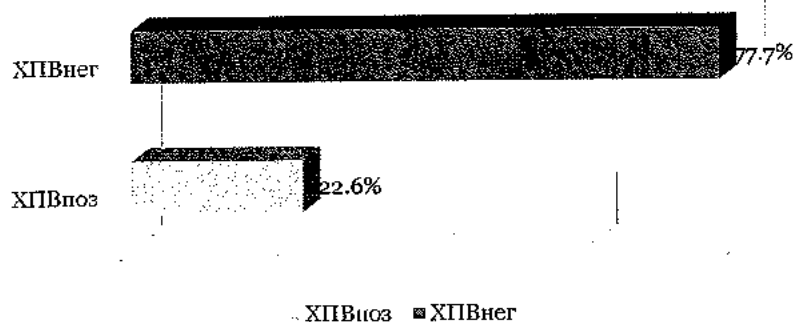
5.3.1. Дистрибуција на ХПВ кај пациенти со орален лихен планус (ОЛП)

Во испитуваниот примерок со орални преканцерозни лезии, регистрирани се 31 (77.5%) пациент со орален лихен планус (средна возраст 51.9, SD± 6.23), од двата пола.

Според клиничката манифестација на оралниот лихен планус пациентите се поделени во две групи: со ерозивна 9(29.0%) и ретикуларна форма на ОЛП 22(71.0%).

На графикон 15. е прикажана дистрибуција на пациентите со орален лихен планус според ХПВ наодот.

Детектирани се вкупно 22.6% (7/31) ХПВ позитивни и 77.7%(24/31) ХПВ негативни испитаници со орален лихен планус.



Графикон 15. Дистрибуција на ХПВ кај пациентите со орален лихен планус

На табела 33. е прикажана дистрибуцијата на ХПВ позитивните и ХПВ негативните пациенти според клиничката манифестација на ОЛП.

Резултатите покажаа 12.9% (4/31) ХПВ позитивни пациенти кај ретикуларната и 9.7% (3/31) ХПВ позитивни пациенти кај ерозивната форма на ХПВ.

Според Fisher's Exact Test разликата помеѓу ХПВ позитивните и ХПВ негативните пациенти и клиничката манифестација на ОЛП не е статистички сигнификантна ($p=0.38$).

Табела 33. ХПВ позитивитет според клиничката манифестација на ОЛП

ОЛП	ХПВпоз	ХПВнег	Вкупно
	n/%	n/%	n/%
Ретикуларна форма	4/12,9	18/58,1	22/71,0
Ерозивна форма	3/9,7	6/19,3	9/29,0
Вкупно	7/22,6	24/77,4	31/100

Резултатите кои се однесуваат на ХПВ позитивитетот според полот кај пациентите со лихен планус се прикажани на табела 34.

Од 19.35% (6/31) мажи вклучени во испитувањето, 6.45%(2/31) се позитивни на ХПВ и од 80.65% (25/31) вклучени жени 16.13% (5/31) се ХПВ позитивни.

Според Fisher's Exact Test за разликата помеѓу половите и ХПВ позитивитетот кај пациенти со ОЛП не е статистички сигнификантна ($p=0.59$).

Табела 34. ХПВ позитивитет според полот кај пациенти со орален лихен планус

ХПВ	Мажи	Жени	Вкупно
	n/%	n/%	n/%
ХПВпоз	2/6,45	5/16,13	7/22,58
ХПВнег	4/12,9	20/64,52	24/77,42
Вкупно	6/19,35	25/80,65	31/100

Генотипизацијата покажа присуство на ХПВ 16 кај 9.7% (3/31) пациенти со ерозивна форма на ОЛП и ХПВ 56 е детектиран кај 12.9% (4/31) пациенти со ретикуларна форма на ОЛП.

Дистрибуцијата на детектираните ХПВ типови според клиничката манифестација на оралниот лихен планус е прикажана на табела 35.

Табела 35. Детектирани ХПВ типови според клиничката манифестација на ОЛП

ОЛП	ХПВ16	ХПВ56	ХПВнег	Вкупно
	n/%	n/%	n/%	n/%
Ретикуларна форма	0/0.00	4/12.9	18/58.06	22/71.00
Ерозивна форма	3/9.7	0/0.00	6/19.3	9/29.0
Вкупно	3/9.7	4/12.9	24/77.4	31/100.00

5.4. Детерминација на E6/E7 mRNA

На табела 36. се прикажани наодите кои се однесуваат на детекцијата на E6/E7 mRNA.

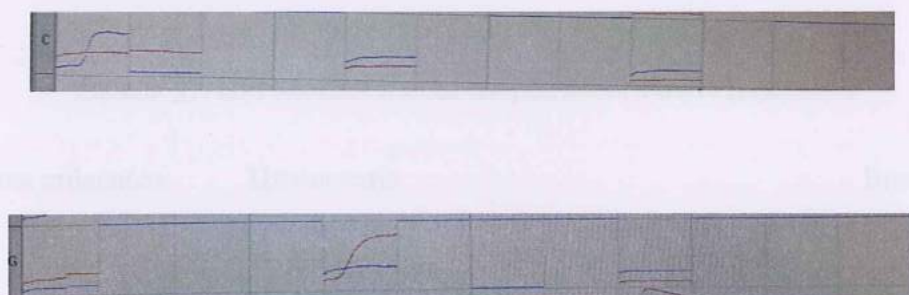
Од вкупно 80(100.0%) испитани пациенти, ХПВ позитивен наод е констатиран кај 13(16.25%) пациенти.

E6/E7 mRNA не е регистриран ниту кај еден испитаник, независно во која група припаѓа (со или без ОПЛ), односно независно од клиничкиот наод или возрастната и полова дистрибуција.

Табела 36. Приказ на наодот за E6/E7 mRNA кај ХПВ позитивните пациенти

	Вкупно n/%	позE6/E7 mRNA n/%	негE6/E7 mRNA n/%
ХПВпоз	13/ 16.25	0.0	13/ 16.25
ХПВнег	67/83.75	0.0	67/83.75

На сл. 14. прикажан е резултат од анализа на пациенти негативен за ХПВ E6/E7 мРНК.



Сл. 14. Резултат од анализа на пациент негативен за ХПВ E6/E7 мРНК.

а) Првиот квадрат (C) сината крива и петиот квадрат од б)G редот се позитивни - внатрешна и контрола за ХПВ 18, останатите ХПВ 16, 18, 31, 33 и 45 сини и црвени линии како мултиплекс – негативни.

5.5. ХПВ асоцирани цитоморфолошки промени

На табела 37. прикажани се резултатите кои се однесуваат на детектираните цитолошки промени кај дијагностицираните орални преканцерозни лезии.

Од вкупно испитувани 31(77.5%) примероци со лихен планус, 4(10%) примероци имаа позитивни цитолошки резултати, 23(57.5%) имаа негативна цитологија и кај 4(10%) е констатирана парцијална морфологија.

Од 4(10%) пациенти со актинична кератоза, кај 3(7.5%) регистрирана е негативна цитологија, и 1(2.5%) каде се пронајдени парцијални знаци за ХПВ инфекција.

Од 4(10%) пациенти со леукоплакија, кај 2(5%) е евидентирана позитивна цитологија, кај 1(2.5%) примерок цитологијата е негативна, додека кај еден брис констатирано е присуство на парцијални знаци 1(2.5%).

Единствениот случај дијагностициран како еритроплакија покажа присуство на парцијални цитолошки знаци типични за ХПВ инфекцијата (2.5%).

Табела 37. Цитолошки наоди според клиничката дијагноза

Клиничка дијагноза	Цитологија			Вкупно (n/%)
	Позитивна (n/%)	Негативна (n/%)	Парцијална (n/%)	
Лихен планус	4/10,00	23/57,50	4/10,00	31/77,50
Актинична кератоза	0/0,00	3/7,50	1/ 2,50	4/10,00
Леукоплакија	2/5,00	1/ 2,50	1/ 2,50	4/10,00
Еритроплакија	0/0,00	0/0,00	1/ 2,50	1/ 2,50
Вкупно	6/15,00	27/67,50	7/17,50	40/100,00

Цитолошките наоди кои асоцираа со одредени ХПВ типови се прикажани на табела 38. Од 4(10%) примероци со орален ХПВ56, 2 (5%) примероци имаа позитивна

цитологија, 1(2.5%) примерок имаше негативна цитологија и кај преостанатиот 1(2.5%) примерок констатирана е парцијална цитоморфологија.

Од вкупно 6(15%) примероци со орален ХПВ16, позитивна цитоморфологија е констатирана кај 2(5%) примероци и 3(7.5%) примероци имаа негативна цитоморфологија. Парцијална морфологија е евидентирана кај 1(2.5%) примерок. Од 2(5%) примероци со орален ХПВ18, кај 1(2.5%) е евидентирана позитивна цитологија и кај 1(2.5%) е регистрирана парцијална цитологија.

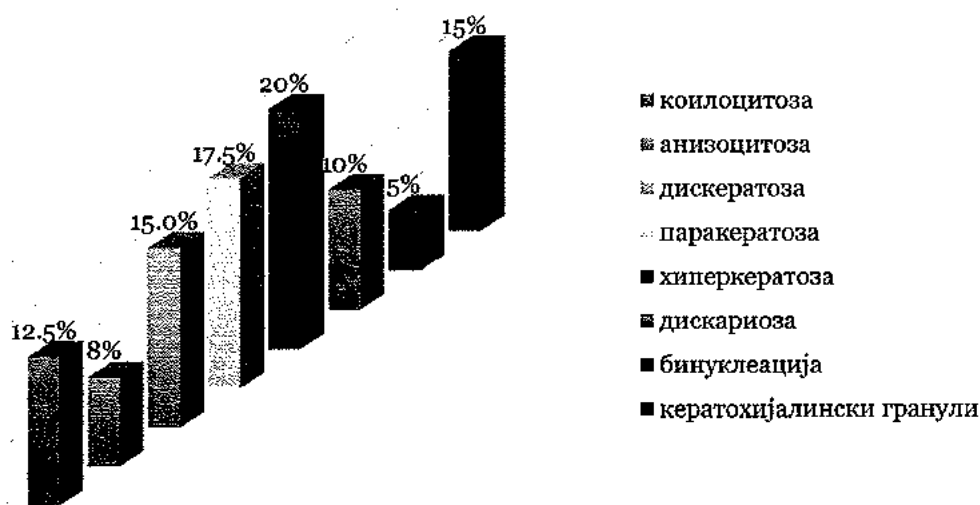
Табела 38. Цитолошки резултати според ХПВ типовите

Орален ХПВ	Цитоморфологија			Вкупно (n/%)
	Позитивна (n/%)	Негативна (n/%)	Парцијална (n/%)	
ХПВнег	1/ 2,50	23/57,50	4/10,00	28/70,00
ХПВ56	2/5,00	1/2,50	1/ 2,50	4/10,00
ХПВ16	2/5,00	3/7,50	1/ 2,50	6/15,00
ХПВ18	1/ 2,50	0/0,00	1/ 2,50	2/5,00
Вкупно	6/15,00	27/67,50	7/17,50	40/100,00

Разликата помеѓу позитивните (вклучувајќи ги и парцијалните) и негативните цитолошки наоди во однос на ХПВ позитивитетот, одредено со Fishers Exact Test, покажа статистичка сигнификантност ($p=0,008$).

На графикон 16. е прикажана процентуалната дистрибуција на најчестите цитоморфолошки промени асоцирани со присуството на ХПВ во клетките кај брисеви од оралните преканцерозни лезии. Евидентирана е застапеност на мајорната алтерација коилоцитозата со 12.5%.

Дискератозата која се смета за втор позначаен индикатор за ХПВ инфекцијата е присутна со 15%, хиперкератоза е констатирана кај 20% испитаници, бинуклеација кај 5% од испитаниците и кератохијалински гранули се евидентирани кај 15% од испитаниците.



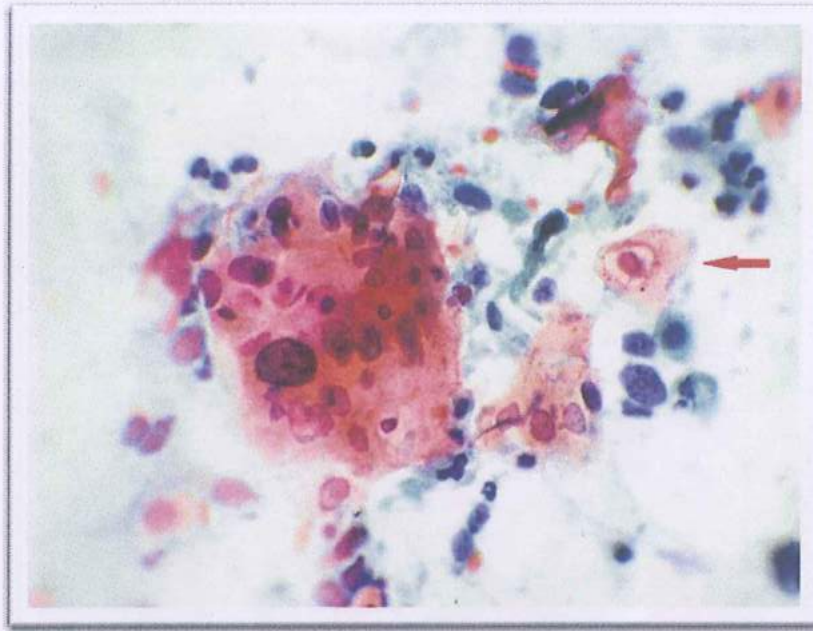
ХПВ алтерации

Графикон 16. Дистрибуција на клеточните алтерации типични за ХПВ инфекцијата

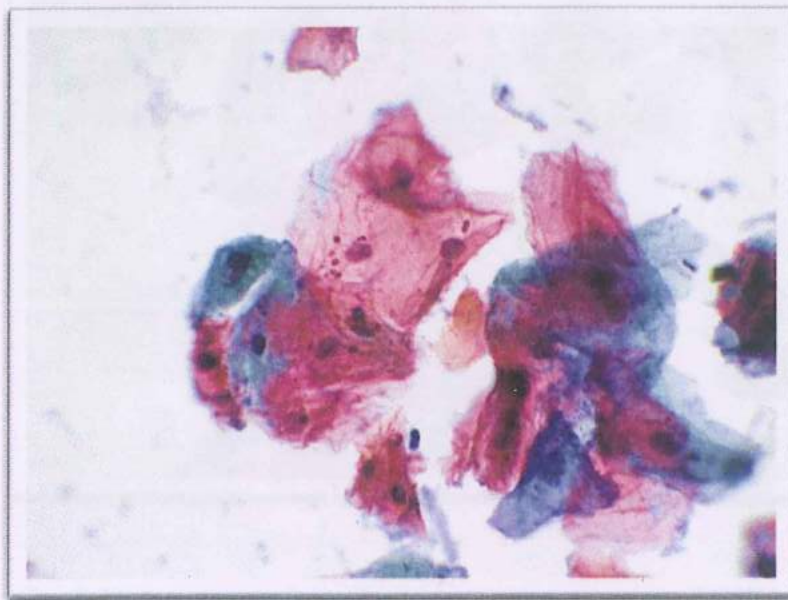
На сликите 15-21. се прикажани најчестите цитоморфолошки промени кои се детектирани кај испитуваните примероци од оралните преканцерозни лезии.

Кај ХПВ позитивните примероци е евидентирана изменета морфологија типична за ХПВ инфекцијата со присуство на орална коилоцитоза, дискератоза, хиперкератоза, паракератоза, нагласена митотичка активност.

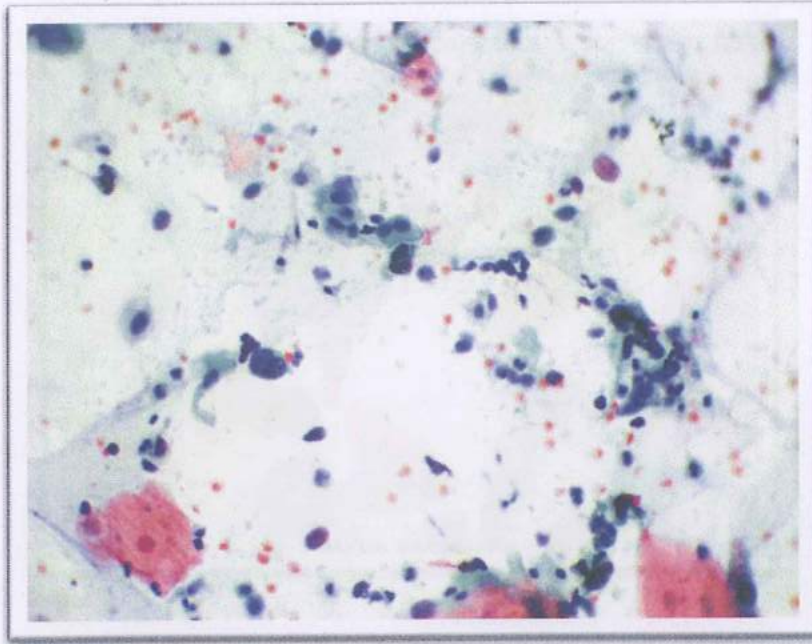
На слика 22. е прикажан брис од здрава лигавица без знаци за ХПВ морфологија.



Сл. 15. Цитолошки идентификувани алтерации вообичаени за ХПВ инфекцијата кај орална леукоплакија со евидентна коилоцитоза, умерена дисплазија и назначена митотичка активност. (магнификација 10x40)



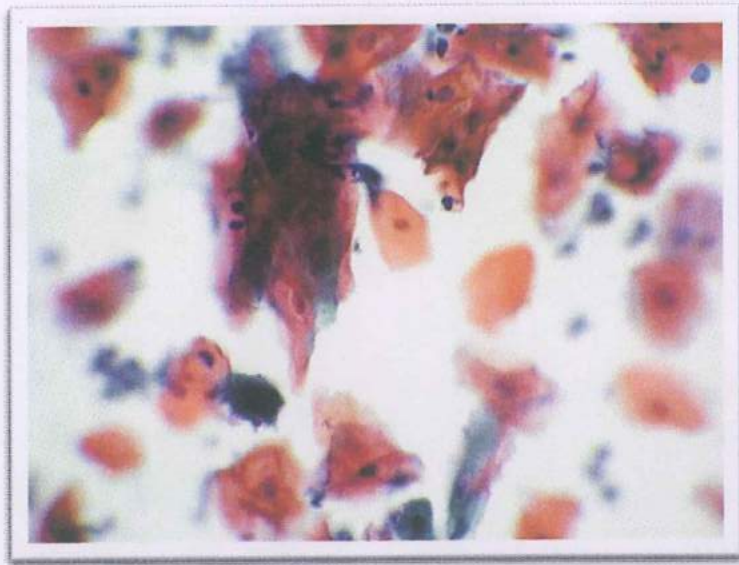
Сл. 16. Кератохијалински гранули како еден од знаците за присуство на ХПВ вирусот.(10x40)



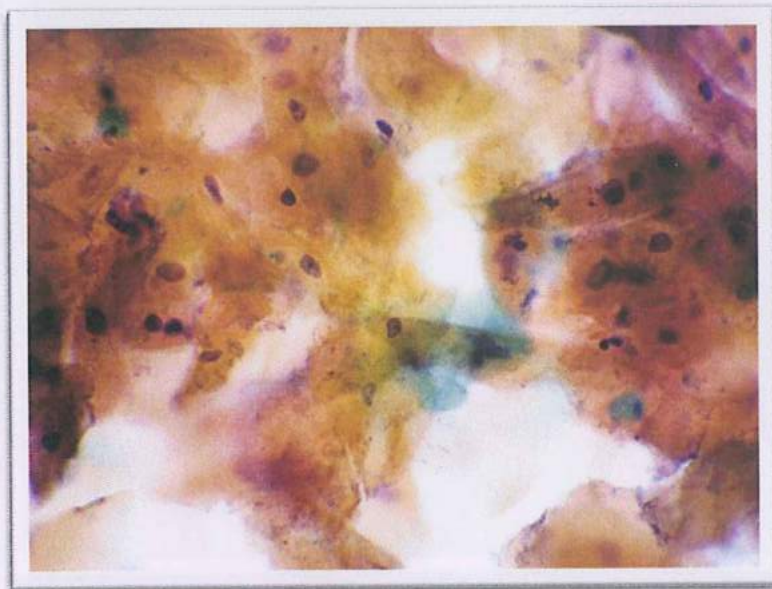
Сл. 17. Бројни клетки со морфологија на високо- степена сквамозна интраепителна лезија (HGSIL). (10x25)



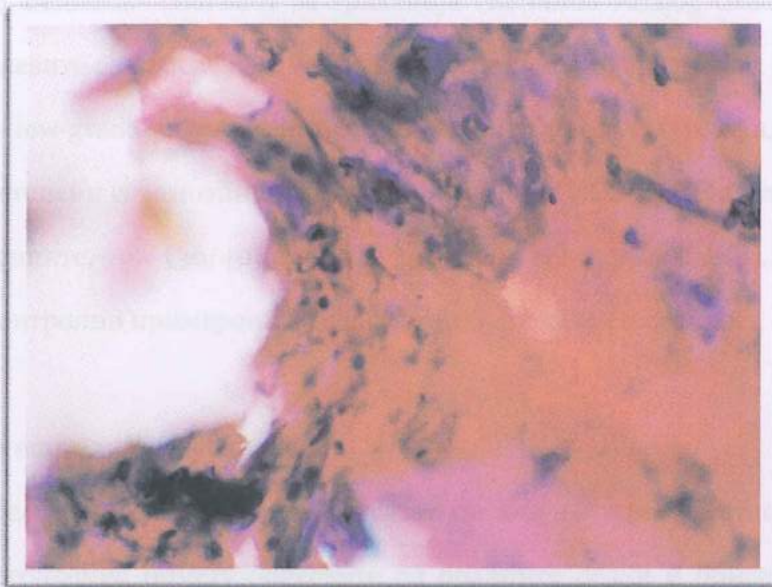
Сл. 18. Ниско-степена сквамозна интраепителна лезија (LGSIL), присутна коилоцитоза, зголемување на јадрото. (10x40)



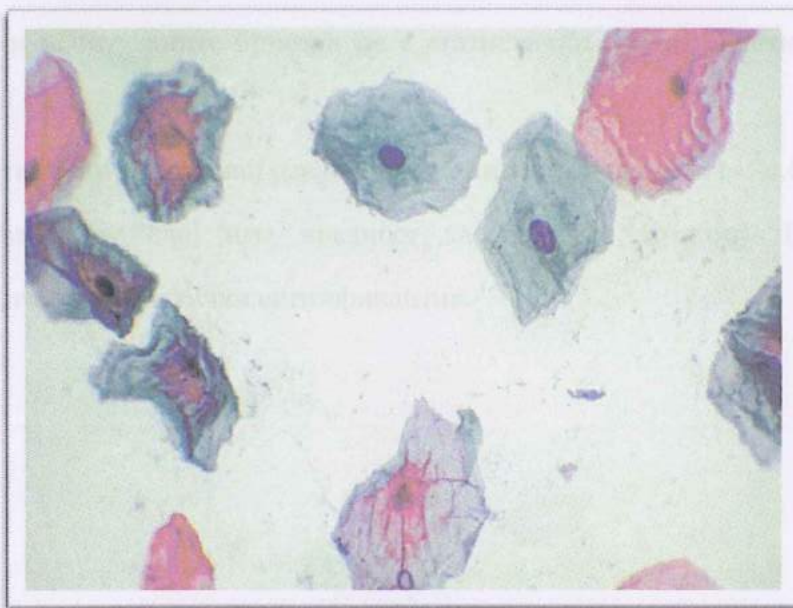
Сл. 19. Хиперкератоза со дискретна коилоцитоза како парцијални знаци за ХПВ морфологија. (10x40)



Сл. 20. Хиперкератоза и паракератоза. (10x40)



Сл. 21. Кератински сквами со присутни знаци за парцијална
ХПВ морфологија. (10 x 40)



Сл. 22. Нормална морфологија на суперфицијални и интермедиерни
сквамозни клетки без знаци за ХПВ морфологија. (10 x 40)

Според Bethesda- системот за градација (Bethesda Analog Grade System) 7.5% (3/40) од брисевите се класифицирани како ниско-степенни сквамозни интраепителни лезии (LGSIL- low-grade squamous intraepithelial lesion), 2.5% (1/40) се идентификувани како високо- степенни сквамозни интраепителни лезии (HGSIL) (Сл.2) и преостанатиот дел од примероците, 90% (36/40), се класифицирани како „реактивни„.

Сите контролни примероци се класифицирани како „нормални„ (100%, 40/40).

5.6. Индекс на епителна матурација

На табела 39. се прикажани резултатите кои се однесуваат на индексот на епителната матурација помеѓу брисевите од оралните лезии и брисевите од здрава лигавица.

Просечните вредности за суперфицијалниот слој изнесуваа 86.0%, за интермедиерниот слој 13.5% и за парабазалниот 0.25%.

Според Student's t- тест разликата кај суперфицијалните слоеви помеѓу контролните и испитуваните брисеви не е статистички сигнификантна за $t = 0.890$ ($p = 0.562$).

Кај интермедиерниот слој разликата не е сигнификантна за $t = -0.660$ ($p = 1.00$).

Парабазалниот слој има вредност за $t = -1.00$ ($p = 1.00$). Разликата кај парабазалниот не е статистички сигнификантна.

Табела 39. Индекс на епителна матурација помеѓу контролните и испитуваните

	контролни		брисеви		Diff (1-2)	t	p	df
	% (n=40)		ОПЈ%					
	X 1	SD 1	X 2	SD 2				
Суперфицијален	87.625	7.424	86.000	8.858	1.625	0.890	0.562	78
Интермедиерен	12.375	7.424	13.500	7.861	-1.125	-0.660	1.000	78
Парабазален	0.000	0.000	0.250	1.581	-0.250	-1.000	1.000	78

На табела 40. се прикажани резултатите кои се однесуваат на индексот на епителна матурација помеѓу ХПВ позитивните и ХПВ негативните брисеви од примероците од оралните лезии.

Просечната вредност кај ХПВ позитивните брисеви на суперфицијалниот слој изнесува 87.7%, додека пак на интермедиерниот слој 12.3% и 0.0% за парабазалниот.

Според Student's t- тест разликата помеѓу ХПВ позитивните и ХПВ негативните примероци кај суперфицијалните слоеви не е статистички сигнификантна за $t = 0.890$ ($p = 0.066$).

Кај интермедиерните слоеви разликата не е сигнификантна за $t = -1.470$ ($p = 0.150$).

Кај парабазалните слоеви има вредност $t = -1.560$ ($p = 0.128$). Не е констатирана статистичка сигнификантност помеѓу слоевите.

Табела 40. Индекс на епителна матурација помеѓу ХПВ позитивните и ХПВ негативните брисеви од испитуваните примероци

	ХПВпоз (n=28)	SD 1	ХПВнег (n=12)	SD 2	Diff (1- 2)	t	p	df
Суперфицијален	87.7	7.5	82.1	10.8	5.6	1.890	0.066	38
Интермедиерен	12.3	7.5	16.3	8.3	-3.9	-1.470	0.150	38
Парабазален	0.0	0.0	0.8	2.9	-0.8	-1.560	0.128	38

5.7. Сензитивност и специфичност

Резултатите кои се однесуваат на цитолошкиот наод и резултатите добиени со PCR се прикажани на табела 41.

Вистински позитивни пациенти се вкупно 8(20.0%), лажно позитивни 5(12.5%) пациенти, лажно негативни 4(10.0%) и вистински негативни 23(57.5%) пациенти.

Табела 41. Дистрибуција на пациентите според цитолошкиот наод и PCR наодот

PCR	Позитивна цитологија*	n/%	Негативна цитологија	n%	Вкупно
Позитивни	Вистински позитивни	8/20.0	Лажно позитивни	5/12.5	13/32.5
Негативни	Лажно негативни	4/10.0	Вистински негативни	23/57.5	27/67.5
Вкупно		12/30.0		28/70.0	40/100.0

*Позитивна цитологија- ги опфаќа наодите за позитивна и парцијална цитологија

На табела 42. се прикажани резултатите кои се однесуваат на тестот за сензитивност и специфичност на цитолошките наоди, кои се базираат на резултатите добиени со PCR наодот.

Констатирана е сензитивност на цитолошкиот тест од 66.67% (95%CI;34.89-90.08). Специфичноста на цитолошкиот метод изнесуваше 82.14% (95%CI; 63.11- 93.94).

Преваленцијата на ХПВ изнесуваше 30.0% (95%CI; 16.56- 46.53). Позитивната предиктивна вредност изнесува 61.54% (95%CI; 39.66- 79.57). Негативната предиктивна вредност изнесува 85.19% (95%CI; 71.72- 92.88).

Табела 42. Специфичност и сензитивност на цитолошкиот метод

	%	95% CI
Сензитивност	66.67	34.89- 90.08
Специфичност	82.14	63.11- 93.94
Positive Likelihood Ratio	3.73	1.53 to 9.09
Negative Likelihood Ratio	0.41	0.18 to 0.92
Преваленција	30.00	16.56- 46.53
Позитивна предиктивна вредност	61.54	39.66- 79.57
Негативна предиктивна вредност	85.19	71.72- 92.88

ДИСКУСИЈА

6. ДИСКУСИЈА

Оралните преканцерозни лезии како што се леукоплакија, оралниот лихен планус, актинична кератоza, еритроплакија и други диспластични лезии на оралната лигавица, се сметаат за најчести лезии со способност за малигнена алтерација. Малигната трансформација на оралните лезии, покрај бројните ризик фактори, се поврзува и со високоризичните ХПВ типови, особено со најфреквентно идентификуваните типови ХПВ16 и ХПВ18, за кои се смета дека имаат значајна улога во оралната карциногенеза.¹¹⁵

И покрај тоа што нивната комплексна етиопатогенеза како и трансформацијата во орален карцином останува сеуште нејасна, бројните клинички, молекуларни и патохистолошки истражувањата се насочени кон ефикасна превенција на овие ентитети но и кон адекватен третман, со цел намалување на стапките на морбидитет и морталитет како и подобрување на квалитетот на животот.^{116,117}

Улогата на оралната ХПВ инфекција кај оралните преканцерозни лезии и нивната малигнена алтерација останува сеуште неразјаснета и покрај податокот дека ХПВ има минорна улога во етиологијата на сквамозниот клеточен карцином во предните регии на оралната празнина каде што е идентификуван кај само 2.9- 5.9% од случаевите.^{104, 24}

Со цел да се дефинира улогата на ХПВ инфекцијата во етиологијата на оралните преканцерозни лезии, односно асоцираноста на високоризичните ХПВ типови со овие лезии, во студијата беа вклучени вкупно 80 пациенти од двата пола, 23.75% мажи (19/80) и 76.25% жени (61/80) од кои 40 пациенти (n=40) со дијагностицирани орални преканцерозни лезии ја сочинуваа испитуваната група (средна возраст 51.87, SD±6.08) и контролна група од вкупно 40 пациенти (n=40) (средна возраст 53.02, SD±4.9), одбрани по случаен избор, со здрава орална лигавица, односно без видливи промени на оралната лигавица.

Во истражувањето, со скрининг методот ХПВ-ДНК е детектиран кај 30.0% од испитуваните пациенти со дијагностицирана орална премалигна лезија (12/40; 95% CI; 16.56- 46.53). Кај пациентите со здрава лигавица е детектиран само еден ХПВ позитивен пациент, 2.5% (1/40).

Значајноста на разликата помеѓу ХПВ позитивните и негативните пациенти во рамките на групата со орални лезии е статистички сигнификантна (Chi-square = 6.4 и $p = 0.0114$). Разликата помеѓу сите ХПВ позитивните и ХПВ негативните пациенти кај двете испитувани групи ($n=80$) е исто така статистички сигнификантна (Chi-square = 36.45 и $p < 0.0001$).

Со методот на генотипизација констатирано е дека сите детектирани типови, вклучувајќи го и тој од здрава орална лигавица, припаѓаат на високо-ризични ХПВ типови. Резултатите евидентираа присуство на ХПВ 16 кај 15% од испитуваните пациенти (6/40), ХПВ 56 кај 10% од пациентите (4/40), и ХПВ 18 кај 5% од пациентите (2/40). Сите детектирани ХПВ позитивни пациенти имаа единечна инфекција, односно во истражувањето не е констатирано мултипла инфекција кај ни еден пациент.

Дистрибуцијата на поединечните типови во однос на дијагнозата покажа присуство на ХПВ 16 кај 7.5% од пациентите со лихен планус (3/40), 5% од пациентите со леукоплакија (2/40), и 2.5% од пациентите со еритроплакија (1/40). ХПВ 18 е детектиран кај 5% од пациентите со леукоплакија (2/40) и ХПВ 56 кај 10% од пациентите со лихен планус (4/40). Од прикажаната дистрибуција за орален ХПВ позитивитет според Fisher's Exact Test за позитивни и негативни примероци од двете групи разликата е статистички сигнификантна ($p < 0.0014$).

Овие резултати се во согласност со податоците од литературата кои укажуваат на ХПВ позитивитет кај 17.8% различни орални лезии, премалигни и бенигни лезии, како и 6.8% позитивни ХПВ примероци од здрава лигавица, со доминантна преваленција на високоризичните ХПВ типови кај потенцијално малигните нарушувања (ХПВ16 и 31). Истата студија ќе укаже и на значењето на топографијата на промената која

статистички сигнификантно асоцира со ХПВ позитивитетот на одредена лезија нарекувајќи ги "најфреквентно изложени места" на микротраума.⁹⁶

Во ова истражување раликата во однос на топографијата и позитивните ХПВ примероци е статистички сигнификантна ($p=0.01$), со доминантна застапеност на ХПВ позитивните лезии на образната лигавица со билатерална локализација на промените 20.0%, на јазикот 5.0% од промените се ХПВ позитивни, на образната лигавица со унилатерална локализација се регистрирани 2.5% ХПВ позитивни промени и со сублингвална локализација се регистрирани 2.5% ХПВ позитивни промени.

Во литературата ХПВ позитивни промени се регистрирани на јазик (19.1%) и на лабијалниот епител (17.1%). Во истата студија стапките на ХПВ преваленцијата кај оралната епителна дисплазија, сквамозен клеточен карцином и кератотични лезии варираат од 0% кај малигните лезии и оралните преканцерози до 10% кај хиперкератози (акантози), одредени со *in situ* хибридизација¹¹⁸, додека во друга студија кај парафин- заситени примероци со PCR методот ХПВ е детектиран кај 11.4% сквамозни карциноми на глава и врат (15/131), кај 9.4% дисплазии (3/32) и кај 10.5% кератозите (2/19). Кај сите лезии (карциноми, преканцерози и кератотични) најфреквентен тип на ХПВ е високоризичниот тип 16, кој е детектиран кај 80.0% од позитивните примероци.¹¹⁹

Целокупната преваленција на оралната ХПВ инфекција во САД изнесува 6.9% со доминација на високоризичните типови 3.7%.¹⁰⁵ Во мета- анализа е констатирана преваленција од 24.5% за ХПВ16 и 18 со *in situ* хибридизација и PCR при што е констатирано дека тие се присутни во раните фази на оралниот и орофарингеалниот карцином.¹²⁰

Литературата покажува дека ХПВ преваленцијата расте со агресивноста на промените при што најниска ХПВ преваленција е констатирана кај здрава лигавица со 10%, кај бенигна леукоплакија со 22%, и највисока застапеност е евидентирана кај оралниот сквамозен целуларен карцином со 46%.⁹³

Бројни орални лезии вклучувајќи ги и оралниот лихен планус, леукоплакијата како и разни орални епителни дисплазии покажале за 4–5 повисока застапеност на ХПВ ДНК во однос на нормалната мукоза.⁶⁵

Во оваа студија констатирано е присуство на ХПВ 16 и ХПВ 18 кај оралните премалигни лезии, но и на ХПВ тип 56 кој исто така припаѓа на високоризични типови. Во светската литература ХПВ 16 е детектиран со PCR методот кај 34% од потенцијално малигните лезии и 31% од здрава мукоза.¹²¹ ХПВ 56 е евидентиран во здрава орална лигавица³⁶, и според присуството на поединечните генотипови, почнувајќи од најфреквентниот тип по застапеност, се детектирани ХПВ типовите 16, 6, 18, 56 и 66.¹²²

Дел од студиите евидентирале релативно ниски вредности на HPV 16 со real-time квантитативниот PCR метод, односно кај само 1/102 (1%) пациент од групата со орални преканцерозни лезии, и кај парафин- заситените архивирани примероци констатиран е исто така само еден позитивен случај со ХПВ 16 (0.98%).¹⁰⁴ Високо- ризичен ХПВ е детектиран и кај вкупно пет испитувани орални епителни дисплазии.¹²³

Високоризичниот ХПВ тип 18 е еден од најпревалентните типови кај оралните лезии, но во ова истражување е детектиран само кај 5% од испитаниците. Во литературата во одредени истражувања не е детектиран кај ниеден пациент.¹⁰⁹

Недостатокот на податоци од литературата за поврзаноста помеѓу ХПВ 56 и оралните лезии, односно со оралниот лихен планус како во оваа студија (10%), ја наметнуваат потребата за понатамошни истражувања, неопходни за одредување на поврзаноста на ХПВ 56 со овој ентитет, локализацијата на појавување или евентуалната поврзаност со ова географско подрачје.

Здравата лигавица исто така е изложена на влијанието на ХПВ инфекцијата. Оралната застапеност на ХПВ кај макроскопски здрава лигавица е доста варијабилна, но причината за тоа се уште не е разјаснета.¹²⁴

Според резултатите од оваа студија, преваленцијата на ХПВ ДНК кај здрави индивидуи е ниска и изнесува 2.5% (1/40) и е во согласност со податоците од

литературата при што во дел од истражувањата не е евидентиран ХПВ ДНК кај здрава лигавица.^{97,125}

Детектираниот ХПВ 31 од здрава лигавица исто така припаѓа на високоризичните типови, што е показател дека и здравата лигавица може да биде носител на високоризичните типови од овој вирус. Оттука се смета дека лошата орална хигиена може да ја зголеми осетливоста и инфективноста на ХПВ како дополнителен ризик фактор.¹⁰⁷

Оралниот лихен планус како една од најчестите заболувања на оралната лигавица¹²⁶, покажува пониска малигна алтерација во однос на останатите заболувања на оралната лигавица (0.4%- 5.3%)¹²⁷ но сепак има недоволно податоци за поврзаност на различните форми на овој ентитет со ХПВ инфекцијата. И покрај тоа што истражувањата не успеаја да демонстрираат таква поврзаност, мулти-каузалната етиологија и фреквентната клиничка појава на овие ентитети имплицираат понатамошна претпазливост.

Во оваа студија се вклучени 31 (77.5%) пациенти со ОЛП (средна возраст 51.9, SD+/- 6.23), од двата пола. Според клиничката манифестација на оралниот лихен планус пациентите се поделени во две групи: со ерозивна форма на ОЛП 9/31(29.0%) и ретикуларна форма на ОЛП 22/31(71.0%).

Со скрининг методот кај лихен планус детектирани се 22.6% (7/31) на ХПВ позитивни пациенти. Инфекцијата е потврдена кај двете најфреквентни форми на ОЛП, односно 9.7% (3/31) ерозивни форми на ОЛП се ХПВ позитивни и 12.9% (4/31) пациенти со ретикуларна форма на ОЛП кои се ХПВ позитивни.

Констатирано е дека и двете најчести клинички манифестации на оралниот лихен планус, ретикуларната и ерозивната форма, се поврзани со високоризичните ХПВ типови што може да влијае на нивната клиничка манифестација како и можната малигна алтерација.

Типизацијата потврди присуство на високо - ризични ХПВ типови, при што констатиравме присуство на ХПВ 16 што е конзистентно на останатите истражувања

вообичаено за премалигни и малигни лезии, и за ХПВ 56 кој исто така припаѓа на високо-ризичните типови претходно детектиран кај здрави примероци.³⁶

Литературата демонстрира присуство на ХПВ- ДНК кај 19.7% ($n = 14/71$) од пациентите со ОЛП, со значајна статистичка разлика во споредба со контролната група каде високоризичниот ХПВ18 е најфреквентен детектиран генотип (71.4%).⁷⁸

ХПВ16 е детектиран и кај 15.9% на атрофична форма на ОЛП и се смета дека нискиот ХПВ позитивитет кај оралниот лихен планус се должи на улогата на локалниот клеточен имунитет во неговата имунопатогенеза.⁸³ Други студии прикажуваат и повисока фреквенција на ХПВ кај лихен планус дури и до 65.0%.¹²⁸

ХПВ инфекцијата најчесто е асоцирана со ерозивната форма на ОЛП со објаснување дека улцерацијата ја прави лигавицата поосетлива на инфекција. Се потенцира и улогата на хронична употреба на стероидите кои можат да предизвикаат имунолошка супресија со што се поддржува ХПВ репликацијата.⁶⁵

Независно од релативно нискиот малиген потенцијал, асоцираноста со ХПВ инфекцијата како и присуството на високоризичните ХПВ типови кај ОЛП лезиите, наметнуваат темелна егзаминација и фреквентни контроли на овие лезии, есенцијално за успешни превентивни мерки, со детерминација на ХПВ статусот како и следење на перзистенцијата на детектираните типови на ХПВ.

Оралната ХПВ преваленција асоцира со зголемување на возраста. Највисока преваленција е утврдена кај мажи (ХИВ позитивни) на возраст од 55-81 година (34.5%) што се смета дека се должи на намалување на имунитетот со тек на годините но и на подолгата перзистенција на вирусот. По усогласување со останатите ризик фактори (пушење и број на партнери), констатирано е дека разликата не е статистички сигнификантна.¹²⁹

Спротивно на овие констатации во оваа студија највисока преваленција на ХПВ е констатирана кај пациенти до 50 годишна возраст со 12.5%. На возраст од 51- 56 години констатирано е присуство на ХПВ кај 10.0% од испитаниците со орални лезии и кај пациенти над 56 годишна возраст ХПВ е детектиран кај 7.5% од пациентите. Кај

контролната група ХПВ позитивитет е детектиран во групата на пациенти до 50 годишна возраст, кај 1(2.5%) пациент.

Истражување на млада популација (просечна возраст 22.0; од 18-35 години) демонстрирало ХПВ позитивитет кај 2.3% (7/307) испитаници, од кои 43% биле позитивни на ХПВ 18. Шест од вкупно седум ХПВ позитивни испитаници биле од машки пол ($p=0.008$). Возраста и покрај тоа што не асоцира статистички сигнификантно со оралниот ХПВ позитивитет, дошле до заклучок дека преваленцијата на ХПВ расте со зголемување на возраста.²³

Највисока преваленција на цервикалната ХПВ инфекција кај жените се појавува во дваесеттите години, за подоцна повторно да доминира во период на постменопауза. Во прилог на овој наодот е и фактот дека ова е најактивниот сексуален период кај жените. Сепак останува дилемата дали, ХПВ позитивитетот во постменопаузата се должи на перзистенција на ХПВ вирусот или на нова аквизиција. Доколку се земе во предвид дека интервалот помеѓу појавата на ХПВ инфекција и цервикалниот карцином изнесува 10 - 20 години се смета дека најдобар период за тестирање за цервикална ХПВ инфекција е помеѓу 30 и 40 годишна возраст.^{130,131}

Оралната ХПВ инфекција е најзастапена кај пациенти со средно образование 11(83.9%). Не е констатирана разлика помеѓу степенот на образование и оралната ХПВ инфекција ($p=0.7015$).

Оралните преканцерозни лезии, во литературата познати и како лезии со орална епителна дисплазија повеќето со клиничка манифестација на орална леукоплакија, претежно се карактеристични за возрасни мажи и се позитивни на високо - ризичните ХПВ типови. Овие промени се појавуваат на вентралната површина на јазикот или подот на усната празнина, но и двете површини се сметаат за високоризични за појава на орален карцином. Се препорачува користење на терминот ХПВ- асоцирани орални интраепителни неоплазии поради конзистенција во номенклатурата со ХПВ- асоцираните лезии на долен аногенитален тракт.¹³²

Кај здрави индивидуи преваленцијата на ХПВ не се разликува значително помеѓу мажите и жените, односно 47/1017 мажи и 117/3690 жени имале речиси исти вредности за ХПВ позитивитетот (4.6% / 4.4%). ХПВ 16 е детектиран кај 1.3% од оралната лигавица на вкупно 3977 здрави лица и опфаќа 28% од сите ХПВ типови детектирана во оралната лигавица.¹³³

Fornatora и сор.⁹⁸ опишале 31 случај со машка доминација (сооднос 5:1) и 7 од 31 пациенти позитивни на ХИВ или со висок ризик за ХИВ. Некои од лезиите со локализација на усните покажале присуство на нискоризични ХПВ типови.

Од вкупно 80 испитувани пациенти, вкупно 19(23.75%) пациенти беа од машки и 61 (76.25%) пациенти од женски пол.

Кај пациентите од машки пол се детектирани следниве генотипови: ХПВ 56 е детектиран кај 2 (2.5%) пациенти, ХПВ 16 кај 2 (2.5%) пациенти и ХПВ 18 кај 1 (1.25%) пациент.

Кај пациенти од женски пол се детектирани следниве ХПВ генотипови: ХПВ 56 е детектиран кај 2 (2.5%) пациенти, ХПВ 16 кај 4 (5%) пациенти, ХПВ 18 (1.25%) кај еден пациент и ХПВ 31 (1.25%) кај еден пациент. Разликата за позитивните и негативните ХПВ типови помеѓу половите не е статистички сигнификантна ($p < 0.28$).

Во ова истражување кај пациентите со орален лихен планус резултатите кои се однесуваат на ХПВ позитивитетот според полот покажаа дека од 19.35% (6/31) мажи вклучени во испитувањето, 6.45%(2/31) беа позитивни на ХПВ и од 80.65% (25/31) вклучени жени 16.13% (5/31) беа ХПВ позитивни.

Според Fisher's Exact Test за разликата помеѓу половите и ХПВ позитивитетот кај пациентите со лихен планус не е статистички сигнификантна ($p = 0.59$).

Евидентирано е сигнификантно повисок број на мажи со ХПВ позитивни лезии (27.1% наспроти 13.0%; $p = 0.0096$). Истите автори известуваат за поголем процент на ХПВ кај потенцијално малигни лезии кај мажите наспроти жените кои имале повеќе бенигни пролиферативни лезии (32.4% наспроти 18.2%).⁹⁵ Спротивно на овие

констатации истражување кај адолесценти покажало повисока орална ХПВ преваленција кај млади жени во однос на мажи (3.1% наспроти 0.6%).¹³⁴

ХПВ инфекцијата е локализирана инфекција во одредена анатомска регија и совпаѓањето помеѓу оралната и гениталната ХПВ инфекција е ниска потенцирајќи го значењето на локалните етиолошки фактори.¹³⁵ Гениталниот ПАП- тест како скрининг метод е значаен во превенција на цервикалниот карцином но ако се земат предвид и можните начини на ХПВ трансмисија може да биде релевантен податок за превенција и на оралните ХПВ инфекции. И покрај тоа што овој метод е вообичаен за женската популација, ПАП- тестот како скрининг метод е предложен и кај одредена категорија мажи поради ризик од анални интраепителни неоплазии и карцином, со дополнителни инвазивни испитување кај пациентите со абнормален наод.¹³⁶

Во ова истражување на прашањето „дали редовно правите ПАП-тест“, одговорија само пациентки од женски пол (n= 61), односно 31 (%) беа дел од контролната група и 30 (%) од испитуваната група со орални лезии. Вкупно 13 (41.9%) пациентки од контролната и 14 (46.7%) од испитуваната група се изјаснија дека редовно прават ПАП-тест. Во однос на ХПВ позитивитетот 3 (10.0 %) пациентки кои редовно прават ПАП-тест резултираат ХПВ позитивни и 1 (3.2%) пациентка од контролната група која исто така редовно прави ПАП- тест е позитивна на ХПВ.

Пушењето и консумацијата на алкохол можно е да имаат значајна улога во креирањето на соодветна средина за аквизиција или перзистенција на ХПВ вирусот. Студиите констатираат дека пушењето може да ја модифицира или изложеноста на ХПВ 16 вирусот, имунолошкиот одговор на изложеноста, или и двете, но пушењето само по себе не ја поддржува активната инфекција¹³⁷, што може да се види и во рамките на резултатите од ова истражување.

Всушност кај 22(27.5%) пушачи, ХПВ56 е детектиран кај 1 пациент (1.25%); ХПВ16 е детектиран кај 2(2.5%) пациенти и ХПВ 18 кај еден пациент (1.25%). Помеѓу непушачите (n=58, 72.5%)ХПВ56 е детектиран кај 3 пациенти (3.75%), ХПВ16 е

детектиран кај 4 пациенти (5%), ХПВ 18 кај еден пациент (1.25%) и ХПВ 31 исто така кај еден пациент (1.25%).

Во ова истражување вкупно 5 пациенти (6.25%) се изјасниле дека консумираат алкохол секој ден. Орален ХПВ позитивитет е евидентиран само кај 1 (1.25%) пациент кој се изјаснил дека секојдневно консумира алкохол при што е констатирано присуство на ХПВ 16. Кај пациенти кои се изјаснија дека ретко консумираат алкохол 75 (93.75%), ХПВ 56 позитивитет е детектирана кај 4 пациенти (5.0%), ХПВ 16 кај 5 пациенти (6.25%), ХПВ 18 кај 2 пациенти (2.5%) и ХПВ 31 кај 1 (1.25%) пациент.

Бројни студии дошле до заклучок дека алкохолот и пушењето сигнификантно асоцираат со оралната ХПВ преваленција.^{138,139} Пушењето преку канцерогените материи може да предизвика орална епителна абразија со што ја олеснува аквизицијата на ХПВ и придонесува за повисока преваленција на ХПВ кај пушачи.¹⁴⁰ Спротивно на овие констатации, поврзаноста помеѓу ХПВ инфекцијата и критичните ризик фактори за оралните премалигни и малигни лезии, алкохол и пушење, во ова истражување не се статистички сигнификантни ($p > 0.05$), отука сметаме дека ХПВ инфекцијата е независна манифестација во однос на овие ризик фактори. Не се исклучува можноста за синергистички ефект на овие ризик фактори, всушност при истражување на 201 карциноми на глава и врат, каде што ХПВ е детектиран со PCR метод, констатиран е статистички сигнификантен синергистички ефект помеѓу високоризичните ХПВ типови и прекумерна консумација на алкохол.¹⁴¹

Истражување базирано на популација за поврзаноста помеѓу оралниот статус и оралните инфекции како ризик фактор за појава на орален и орофарингеален сквамозен клеточен карцином во Шведска покажало дека лошата и просечна орална хигиена, одредувана преку плак индексот, се сметаат за предиктори на заболување во споредба со добрата орална хигиена. Редовните посети на стоматолог се асоцирани со значајна редуција на ризикот за сквамозен клеточен карцином. Пациентите со назначен губиток на алвеоларната коска, како маркер за прогресија на пародонталната болест, исто така покажале повисок ризик за карцином.¹⁴²

Во рамките на оваа студија резултатите во однос на прашањето за „посета на стоматолог, покажаа дека 10(25.0%) пациенти од испитуваната група со орални лезии и 14(35.0%) пациенти од контролната група редовно посетуваат стоматолог, од кои 2(5.0%) пациенти од испитуваната група резултираат ХПВ позитивни.

Вкупно 30(75.0%) пациенти од испитуваната група и 26(65.0%) пациенти од контролната група не посетуваат редовно стоматолог од кои со ХПВ позитивитет резултираа 10(25.0%) пациенти од испитуваната група (со орални лезии) и 1(2.5%) пациент од контролната група.

Сите пациенти 80(100%) одговорија позитивно во однос на навиката за редовно одржување на орална хигиена како и користење на сопствена четка за заби. Во однос на двете прашања кај 12(30%) пациенти од испитуваната група со орални лезии и кај 1(2.5%) пациент од контролната група констатиран е ХПВ позитивитет.

Пародонтопатијата, како хронично-инфламаторно и деструктивно заболување на потпорните ткива на забот, се смета за потенцијален ризик фактор во оралната карциногенеза. Односно зголеменото ниво на циркулирачки инфламаторни маркери предизвикани од пародонтопатијата (про-инфламаторните плазма цитокини, леукоцити, матрикс металопроотеинази) и пародонталните патогени, кои имаат улога во локалниот имунолошки одговор, може да доведат до нарушување на нормалниот клеточен раст и потенцијална карциногенеза.¹⁴³ Теоретски се смета дека припојниот епител фенотипски и функционално (пролиферација, миграција, улога на базална мембрана и клетки кои не се диференцираат) целосно одговара на потребите на ХПВ вирусот за репликација.^{144,145}

Пародонталните ткива се сметаат за резервоар на одредени вируси со можност да влијаат врз патогенезата и клиничкиот тек на пародонтопатијата.¹⁴⁶ Од друга гледна точка се смета дека маргиналната гингива има максимум рецептори за ХПВ (хепаран сулфат проетогликан- syndecan 1), и истите се детектирани и на епителниот припој. Истите автори констатирале преваленција на ХПВ во маргинална гингива од 26%.¹⁴⁷

Во литературата податоците за ХПВ преваленцијата во пародонталните ткива е варијабилна и се движи од 0%- 92.31%. При детекција на ХПВ во ткиво од маргиналната гингива кај пациенти со длабочина на пародонтални цепови $>5\text{mm}$ ($n=67$), не е детектирано присуство на високоризичниот ХПВ тип 16, со што не е констатирана поврзаност помеѓу овој тип на ХПВ и пародонтопатијата, односно се смета дека овој вирус нема улога во патогенезата на пародонтопатијата кај системски здрави лица, што е потврдено и во други истражувања. Секако ова истражување не је исклучува можноста за присуството и улогата на останатите типови на ХПВ. ^{148,149}

Во оваа студија, во склоп на клиничкиот преглед, спроведен е пародонтолошки преглед при што се евидентирани следниве клинички пародонтолошки параметри: индекс на денгален плак (ИДП), индекс гингивално зголемување (ИГК), индекс на гингивална инфламација (ИГИ), клинички губиток на атачмент (КГА) и индекс на луксација (ИЛ).

Со исклучок на ИЛ разликата не е статистички сигнификантна за сите останати параметри независно од ХПВ статусот.

За вредностите на пародонтолошките параметри во однос на ХПВ инфекцијата помеѓу сите ХПВ позитивни ($n=13$) и ХПВ негативните пациенти ($n=67$) разликата не е статистички сигнификантна за сите испитувани параметри односно, за ИДП $t=0.530$ ($p=0.595$), за ИЗК $t=-0.130$ ($p=0.899$), за ИГИ $t=-1.110$ ($p=0.271$), за КГА $t=0.790$ ($p=0.432$) и за ИЛ $t=-0.460$ ($p=0.646$).

Разликата за пародонтолошките параметри во однос на ХПВ инфекцијата помеѓу ХПВ позитивните ($n=12$) и ХПВ негативните пациенти ($n=28$) во рамките на испитуваната група на пациенти со орални лезии исто така не е статистички сигнификантна во рамките на ова истражување, односно според Student's t- тест кај ИДП $t=0.870$ ($p=0.389$), ИГИ $t=-0.400$ ($p=0.692$), ИГЗ $t=0.700$ ($p=0.488$), за КГА $t=1.060$ ($p=0.296$), за ИЛ $t=0.180$ ($p=0.855$).

Доколку се земе предвид дека сите пациенти имаа хронична пародонтопатија и разликата за сите испитувани параметри не е статистички сигнификантна, независно

од ХПВ позитивитетот но и во однос на ХПВ инфекцијата, може да се заклучи дека хроничната пародонтопатијата нема улога во оралната ХПВ инфекција. Секако не треба да се занемари податокот дека брисевите се земени од оралната лигавица (со и без орални преканцерозни лезии) но не и од пародонталните џебови. Оттука резултатите добиени од ова истражување во однос на улогата на пародонтопатијата кај оралната ХПВ инфекција не можат целосно да се споредат со споменатата литература пред се поради разликите во користените методи за детекција, биолошкиот материјал кој се испитува, клиничките параметри, испитуваната популација, и тн.

Дел од испитаниците 34(85.0%) се изјаснија дека имаат субјективни симптоми: болка, жарење и печење од кои 10(25.0%) се ХПВ позитивни. Од вкупно 6(15.0%) пациенти кои се изјасниле дека немаат субјективни симптоми кај 2(5.0%) пациенти е констатиран ХПВ позитивитет.

Вкупно 38(47.5%) од пациентите се изјаснија дека имаат крварење од непцата од кои 6(15%) пациенти од испитуваната група се ХПВ позитивни. Од 20 (50%) пациенти кои негираат крварење од непцата, ХПВ позитивни се 6(15%) од испитуваната и 1(2.5%) од контролната група.

Разлабавување на забите е констатирано кај 13(32.5%) пациент од испитуваната група со орални лезии од кои 6(15%) се ХПВ позитивни.

Разлабавување на забите немаат 27(67.5%) пациенти од испитуваната група од кои 6(15%) се ХПВ позитивни.

Сувогост на устата е констатирана кај 27(67.5%) пациенти од испитуваната група со орални лезии од кои 6(15%) резултираат ХПВ позитивни. Вкупно 13(32.5%) пациенти немале сувогост на устатата. Кај 6(15.0%) е констатиран ХПВ позитивитет.

Вкупно 13(32.5%) од пациентите од испитуваната група со орални лезии укажале на присуство на оток. ХПВ позитивни резултирале 5(12.5%) пациенти со присуство на оток.

Од испитуваната група (со лезии) присуство на оток негирале 27(67.5%) од пациентите од кои 7(17.5%) пациенти биле ХПВ позитивни.

Во однос на субјективниот наод кај сите пациенти од двете испитувани групи не е констатирана статистички сигнификантна поврзаност помеѓу позитивниот ХПВ наод и испитуваните субјективни симптоми односно според Fisher's exact test $p > 0.05$ за сите испитувани параметри.

Кај ХПВ индуцираните цервикални карциноми и карциноми на глава и врат значајни кофактори за малиген исход на промените се сметаат имунолошкиот и нутритивниот статус, разликите во социоекономските услови на испитуваната популација, пушење, коинфекција со *Chlamydia trachomatis*, HIV како и можната доминација на бројни останатите фактори или ко- фактори на живот.^{150, 151}

Во склоп на деталната анамнеза се регистрирани и податоци за постоење на системски заболувања кај пациентите од двете испитувани групи. Кардиоваскуларни заболувања се изјасниле дека имаат 7(17.5%) пациенти од испитуваната група и 4(10.0%) од пациенти од контролната група. ХПВ позитивен наод е констатиран кај 1(2.5%) пациент со кардиоваскуларно заболување. Вкупно 33(82.5%) пациенти од испитуваната група немале кардиоваскуларно заболување, од кои 11(27.5%) имале ХПВ позитивен наод.

Гастроинтестинални заболувања се евидентирани кај 2(5.0%) пациенти од испитуваната група и кај 3(7.5%) пациенти од контролната. ХПВ позитивитет е констатиран кај 1(2.5%) од пациентите од испитуваната група кои имаат гастроинтестинално заболување. Од вкупно 38(95.0%) пациенти кои немаат гастроинтестинално заболување 11(27.5%) се ХПВ позитивни.

Невролошко заболување е евидентирано кај 1(2.5%) пациент од испитуваната група и кај 2(5.0%) пациенти од контролната група. Сите пациенти со невролошко заболување се ХПВ негативни.

Вкупно 1(2.5%) пациенти од испитуваната група со орални лезии имаа ендокрино заболување. ХПВ е детектиран кај 1(2.2%) пациент од испитуваната група со ендокрино заболување.

Во ова истражување не е констатирана поврзаност помеѓу системските заболувања и ХПВ позитивитетот кај сите испитувани параметри, односно *spored Fisher's exact test* $p > 0.05$ за сите испитувани параметри. Сметаме дека системското здравје индиректно може да влијае на перзистенцијата на ХПВ инфекција преку намалување на системскиот имунитет.

Повеќето инфекции со ХПВ се повлекуваат во период од 2 години и останува нејасно дали имунолошки посредуваната регресија ја елиминира инфекцијата или предизвикува трајна супресија, сепак вирусот не може клинички да се манифестира со лезија. Бројни (бихејвиорални) фактори на ризик придонесуваат за подолга перзистенција особено на високоризичните ХПВ типови и овие инфекции се со висок ризик за појава на карцином.¹⁵²

Секако варијабилноста на клиничката манифестација и микроскопските промени како и текот на ХПВ инфекциите се условени од комплексната интеракција помеѓу помеѓу специфичните ХПВ генотипови, вирусните генетски варијации но и од домаќинскиот имунолошки одговор, фенотипот на инфицираната епителна клетка, како и од бројните услови од средината и животниот стил.¹⁵³

Како дел од студијата регистрирани се податоци кои се однесуваат на социјалната анамнеза. На прашањето за „услови за живот,“ вкупно 37(92.5%) од пациентите со орални лезии се изјасниле дека живеат во „добри услови за живот,“ и 3(7.5%) се изјасниле дека живеат во „лоши услови за живот,“.

Кај 11(27.5%) од пациентите од испитуваната група со орални лезии кои се изјасниле дека живеат во „добри,“ услови за живот евидентирано е присуство на ХПВ. Кај 1(2.5%) од пациентите од групата со орални лезии кои се изјасниле дека живеат во „лоши,“ услови за живот констатирано е присуство на ХПВ.

Во однос на брачниот статус и ХПВ наодот 30(75.0%) од испитуваната група на пациенти со орални лезии се изјасниле дека се во брак и 10(25.0%) пациенти се изјасниле дека не се во брак. ХПВ позитивитет е констатиран кај 9(22.5%) пациенти од

испитуваната група кои се во брак и кај 3(7.5%) од пациентите од испитуваната група кои не се во брак.

Вкупно 4(10.0%) пациенти од групата со орални лезии се изјасниле дека имаат фамилијарна историја за канцерогени заболувања, од кои 1(2.5%) имал позитивен ХПВ наод. Кај 36(90.0%) пациенти кои негирале појава на канцерогено заболување во семејството, ХПВ позитивен наод е регистриран кај 11(27.5%) пациенти од испитуваната група со орални лезии.

Во ова истражување не е констатирана поврзаност помеѓу „условите за живот“, брачниот статус, историја на канцерогени заболувања во семејството и ХПВ позитивитетот, односно според Fisher's exact test $p > 0.05$ за сите испитувани параметри.

Експресијата на ХПВ е регулирана од бројни клеточни и вирусни фактори на транскрипција кои се врзуваат за специфични елементи во склоп на LCR (low copy region). Транскрипцијата е комплексен процес кој зависи од типот на инфицираната клетка домаќин, статусот на диференцијацијата како и од начинот на кој е интегриран вирусниот геном (епизомален или хромозомски интегриран). Е6 и Е7 онкопротеините имаат клучна улога во ХПВ асоцираната малигна трансформација на епителните клетки. Овие онкопротеини со различен афинитет се врзуваат за протеините на клетката домаќин и ја нарушуваат нормалната епителна диференцијација и апоптоза преку стимулација на клеточна пролиферација, ДНК синтеза, и инхибиција на контролата на клеточниот циклус.³¹

Најзначајна улога се смета дека е деградација на TP53 и pRB. Инактивација на pRB протеините преку Е7 на високоризичните ХПВ резултира во ослободување на E2F факторот на транскрипција и понатамошна регулација на гените на клеточниот циклус. На овој начин Е7 го инактивира Rb супресорниот ген и останатите клеточни протеини асоцирани со регулација на клеточниот циклус, ја активира синтезата на ДНК и механизмите за клеточна репликација кои се неактивни во зрели епителни клетки, иницирајќи патолошки клеточен раст. Е6 онкопротеинот предизвикува деградација на p53- тумор супресорниот протеин и ја дополнува улогата на Е7 преку индукција на

клеточно преживување и закаснета апоптоза, со што заедно ја посредуваат ХПВ асоцираната епителна клеточна имортализација и клеточна геномска нестабилност што ги стимулира инфицираните клетки да пројават целосно малиген фенотип.¹⁵⁴

Перзистентната експресија на Е6 и Е7 се смета дека може да биде индикатор за прогресијата од интраепителна неоплазија до инвазивен карцином. Оттука детекцијата на mRNA кодирана од Е6 и Е7 онкопротеините се смета за директен индикатор на ХПВ онкогената активност. За детекција на онкогената активност преку детекција на mRNA за Е6 и Е7 на високоризичните ХПВ типови: 16, 18, 31, 33, и 45 се користи РНК изолирана од примероци од оралните промени со примена на современа молекуларна метода Е6/Е7 mRNA – базирани есеи. И покрај тоа што начинот на трансмисија и факторите за перзистенција се недоволно разјаснети, предложена е детекција на ХПВ- статусот кај тумори на глава и врат преку специфични маркери на активна ХПВ инфекција односно преку Е6/Е7 mRNA или p16 кои се детектирани кај повеќето орофарингеални канцери.¹⁵⁵

Од вкупно 80(100.0%) испитани пациенти, ХПВ позитивен наод е констатиран кај 13(16.25%) пациенти. Кај сите ХПВ позитивни пациенти е констатиран негативен наод во однос на Е6/Е7 mRNA и сметаме дека овој наод се должи на типот на застапени лезии односно 7.5% (3/40) од брисевите се дефинирани како ниско-степенни сквамозни интраепителни лезии (LGSIL- low-grade squamous intraepithelial lesion), 2.5% (1/40) се идентификувани како високо- степенни сквамозни интраепителни лезии (HGSIL) и преостанатиот дел од примероците, 90% (36/40), се класифицирани како „реактивни”.

Негативниот наод е показател дека не постои дисрегулација на механизмите на клеточен раст, односно укажува на постоење бенигна промена. Сметаме дека одредување на онкогената активност преку Е6/Е7 mRNA е оправдана кај ХПВ позитивни ниско и високо- степенни сквамозни интраепителни лезии кои перзистираат подолг временски период.

Цитолошката анализа на клетките од оралната мукоза се смета за неагресивен метод кој има значајна улога во идентификацијата на клеточните промени. Покрај

бројни инструменти кои може да се користат за реализација на истата, искуствата покажале дека четката е најадекватно средство при земање на материјал за испитување пред се поради длабочината на продирање (транс-епителен примерок; full- thickness sampling).^{156,157}

При проучување на поврзаноста помеѓу абнормалната цитологија и ХПВ инфекцијата кај пациенти со орален сквамозен клеточен карцином на глава и врат, немалигни лезии и здрава лигавица (n=164) со метод на ексфолијативна цитологија со четка, констатираниот ХПВ позитивитет кај орофарингеалните „cyto- brush„ брисеви е асоциран со 5 - кратно повисок ризик за присуство на абнормална цитологија. Заклучено е дека ХПВ позитивитетот асоцира со орофарингеалниот карцином.⁵³

Одредени истражувања укажуваат дека ХПВ инфекцијата не е задолжително поврзана со цитопатски промени.¹⁵²

Во ова истражување цитолошките брисеви се земени кај секој пациент со орална преканцерозна лезија, при што едниот брис е земен од самата лезија и друг брис од најблиската здрава мукоза од истиот пациент, со улога на контролен брис.

Во однос на дијагнозата, позитивна ХПВ цитоморфологија карактеристична за ХПВ инфекцијата е евидентирана кај 10% (4/40) примероци на лихен планус, или вкупно 20%(8/40) доколку се земат во предвид и парцијалните знаци исто така. Кај 7.5% (3/40) од брисеви од леукоплакија се детектирани цитоморфолошки алтерации.

Во оваа студија кај ХПВ позитивните примероци е евидентирана изменета морфологија типична за ХПВ инфекцијата со присуство на орална коилоцитоза, дискератоза, хиперкератоза, паракератоза и нагласена митотичка активност. Констатирана е застапеност на мајорната алтерација коилоцитозата со 12.5%, дискератозата која се смета за втор позначаен индикатор за ХПВ инфекцијата е присутна со 15%, хиперкератоза е констатирана кај 20% испитаници, бинуклеација кај 5% од испитаниците и кератохијалински гранули е евидентирана кај 15% од испитаниците.

Резултатите од оваа студија се конзистентни и со податоците од литературата, каде коилоцитозата е идентификувана кај 13% од испитаниците.¹⁵⁸ Друга студија евидентирала коилоцитоза кај 37.3% (31/83) од анализирани примероци од биопсии на орален сквамозен целуларен карцином и дополнително истата студија покажа дека не постои статистичка сигнификантна корелација помеѓу присуството на хистопатолошки промени сугестивни за ХПВ инфекцијата како и присуството на ХПВ-ДНК потврдено со PCR.⁵¹

Резултатите покажаа дека ХПВ 16 и ХПВ 56 асоцираат со цитоморлошки карактеристики кај 7.5% (3/40) од примероците и ХПВ 18 кај 5% (2/40) од примероците.

Во однос на клиничката дијагноза од вкупно испитувани 31(77.5%) примероци од лихен планус, кај 4(10%) примероци е евидентирана позитивна ХПВ цитоморфологија, 23(57.5%) со негативна цитологија и кај 4(10%) е констатирана парцијална морфологија.

Од 4(10%) пациенти со актинична кератоза, 3(7.5%) имаат негативна цитологија, и 1(2.5%) примерок резултирал со парцијални знаци за ХПВ инфекција.

Од 4(10%) пациенти со леукоплакија, 2(5%) примероци имаа позитивна цитологија, и кај 1(2.5%) брис цитологијата е негативна, додека кај еден брис констатирано е присуство на парцијални знаци 1(2.5%).

Единствениот случај дијагностициран како еритроплакија покажа присуство на парцијални цитолошки знаци типични за ХПВ инфекцијата (2.5%).

Цитоморфолошките промени во однос на детерминирани ХПВ типови кај ХПВ 56 констатира позитивна цитологија кај 2 (5.0%) примероци, 1(2.5%) примерок негативна цитологија и кај преостанатиот 1(2.5%) примерок утврдена е парцијална цитоморфологија.

Од вкупно 6(15.0%) примероци со орален ХПВ16, позитивна цитоморфологија е констатирана кај 2(5.0%) примероци и 3(7.5%) примероци имаа негативна цитоморфологија. Парцијална морфологија е евидентирана кај 1(2.5%) примерок.

Од 2(5.0%) примероци со орален ХПВ18, 1(2.5%) имаше позитивна цитологија и 1(2.5%) имаше парцијална цитологија.

Во оваа студија е констатирана сигнификантна разлика помеѓу позитивните (вклучувајќи ги и парцијалните) и негативните цитолошки наоди во однос на ХПВ позитивитетот, одредено со Fisher's Exact Test ($p=0,008$).

И покрај тоа што оралната цитологија се смета за едноставна, неагресивна, релативно безболна и добро толерирана од страна на пациентите¹⁵⁹, инконзистенцијата на резултатите во однос на оваа методологија генерално се однесуваат на субјективноста на цитолошката евалуација.¹⁶⁰

Доколку се земе во предвид дека цитопатските алтерации се индиректен показател на вирусното присуство сметаме дека тие треба да се третираат само како индикатори на можна ХПВ инфекција со висока индикација и препорака за понатамошно спроведување на посензитивни дијагностички процедури со цел да се утврди присуството на вирусот.¹⁶¹

Податоците од литературата покажуваат зголемена точност на техниката браш биопсија, и варијации на сензитивноста и специфичноста помеѓу 79%- 97% и 95.1%- 99.5%.¹⁶²

Во ова истражување констатирана е сензитивност на цитолошкиот метод од 66.7% (95%CI 34.89-90,8) и специфичност од 82,14% (95%CI 63,11-93,94). Позитивната предиктивна вредност изнесува 61.54% (95%CI; 39.66- 79.57) и негативната предиктивна вредност е 85.19% (95%CI; 71.72- 92.88).

Примената на цитоморфолошки тестови паралелно со детекцијата и типизацијата на ХПВ, како ко-тестирање во прва линија на скрининг за подобрување на сензитивнста кај цервикалните лезии се смета за поефикасен дијагностички пристап.¹¹

Слични дијагностички комбинирани модалитети биле предложени и кај оралните лезии. Се предлага комбинирана браш биопсија со цитолошка/ДНК-цитометриска егзаминација за микроскопска евалуација на бели или црвени промени на оралната мукоза (леукоплакија или еритроплакија) со оглед дека нуклеарната ДНК содржина во клетките кај оралната леукоплакија може да биде искористена да се

предвиди ризикот од орална епителна дисплазија дури 5 години пред воспоставување на хистолошката дијагноза.¹⁶³

Сепак дел од истражувањата не го подржуваат дијагностичкото значење на коилоцитозата како меродавен индикатор за ХПВ инфекцијата што се должи на 30% лажно позитивни резултати.^{164,165}

Позитивниот ХПВ статус не асоцира со абнормалната цитологија типична за ХПВ инфекцијата, оттука клиничкиот пристап и дијагностичките процедури за тестирање на ХПВ кај оралните премалигни лезии треба да бидат сеопфатни, со користење на супериорноста на молекуларните дијагностички процедури.

Епителните клетки во основа се претставени со две популации на клетки: прогенитор и матурациони. Прогенитор клетките се наоѓаат во базалните и парабазалните слоеви, со капацитет да пролиферираат со митотски делби, по што дел од нив влегуваат во процес на созревање низ различните морфолошки слоеви кон површината. Останатиот дел се одговорни за интегритетот на базалната мембрана. Кај клетките од оралната лигавица процесот на матурација може да заврши со или без кератинизација.¹⁶⁶

Матурациониот индекс, односно индексот на епително созревање, претставува квантитативен метод кој има за цел проценка на процесот на клеточно созревање. Може да има дијагностичко значење, со препознавање на варијациите од нормална лигавица, и да служи како основа за орални цитолошки испитувања. И покрај тоа што циклусот на клеточна диференцијација се разликува во различни регии од оралната празнина, се смета дека возраста, полот и менструалниот циклус не влијаат на клеточниот цртеж.¹⁶⁷ Сепак современите истражувања констатирале дека алкохолот, пушењето, полот и возраста влијаат на процесот на матурација. Не е утврдено влијанието на орално-хигиенскиот статус или социо-економските фактори.¹⁶⁸

Циклусот на матурација кај инфицираните епителни клетки е под влијание на циклусот на ХПВ, при што продукцијата на зрели вириони е сведена само на зрелите супрабазални епителни клетки. Во процесот на матурација кај инфицирана епителна

клетка во базалните клетки доаѓа до експресија на E1 и E2 протеините кои ја регулираат вирусната ДНК транскрипција. Кај високоризичните ХПВ кај инфицираните базални клетки доаѓа до експресија и на E6 и E7 по што епителот влегува во пролиферативна фаза- со зголемување на бројот на базални ХПВ инфицирани клетки што води кон интраепителна или инвазивна промена односно неоплазија.^{29,56}

Кај латентните инфекции зафатениот епител изгледа клинички и хистолошки нормално бидејќи експресијата на гените е сведена само на E1 и E2 протеините но не и на E6 и E7. Вирусот може да остане латентен подолг временски период, и при тоа да биде елиминиран од имунолошкиот систем или да биде активиран и да иницира активна инфекција.¹⁶⁹

Резултатите кои се однесуваат на индексот на епителна матурација помеѓу контролните и испитуваните брисеви покажаа просечни вредности за суперфицијалниот слој кој изнесува 86.0%, за интермедиерниот слој 13.5%, за парабазалниот 0.25%. Според Student's t- тест разликата кај суперфицијалните слоеви помеѓу контролните и испитуваните брисеви од лезиите не е статистички сигнификантна ($p=0.562$), и истото се однесува и на интермедиерниот слој, парабазалниот ($p=1.00$).

Резултатите кои се однесуваат на индексот на епителна матурација помеѓу ХПВ позитивните и ХПВ негативните брисеви од примероците од оралните лезии покажаа дека просечната вредност кај ХПВ позитивните брисеви на суперфицијалниот слој изнесува 87.7%, на интермедиерниот слој 12.3%, и 0.0% за парабазалниот.

Според Student's t- тест разликата кај суперфицијалните слоеви помеѓу ХПВ позитивните и ХПВ негативните примероци не е статистички сигнификантна ($p=0.066$), и истото се однесува и на интермедиерниот слој ($p=0.150$) и парабазалниот слој ($p=0.128$).

Сметаме дека овој наод е очекуван доколку се земе предвид и негативниот резултат кој се однесува на E6/E7 активноста што укажува на постоење латентна инфекција со ХПВ. Оттука произлегува и нашиот став во однос на испитуваните орални

преканцерозни лезии за кои сметаме дека не се клиничка манифестација на ХПВ инфекцијата, но долгата перзистенција на високоризичните ХПВ може да влијае на клиничкиот тек на лезијата.

Како резултат на скрининг програмите за детекција на цитоморфолошките алтерации и рана детекција на високоризичните ХПВ инциденцата на цервикалниот канцер е во опаѓање¹⁷⁰ но затоа сеуште претставува водечки причинител на смрт во земјите во развој каде таквиот скрининг не се применува.¹⁷¹

Цитолошки скрининг и детекција на ХПВ кај оралните преканцерозни лезии, аналогно на цервикалниот скрининг, како дел од дијагностичките постапки при следење на оралните преканцерозни лезии, може да придонесе во адекватен третман на овие промени.

Оваа студија претставува научна основа која ќе овозможи да се дефинира улогата и значењето на оралната ХПВ инфекција во комплексната етиологија и генеза на оралните преканцерозни лезии. Навремената детекција на високоризичните ХПВ типови кај суспектни лезии, како можен фактор или кофактор во етиологијата на овие промени, овозможува рана дијагностика и терапија односно, внимателно следење на промената со можност за целосно отстранување, со цел да се спречи малигната трансформација како последица на пролонгирано дејство на овие вируси и експресија на онкогената активност.

Наодите нудат базични научни сознанија и се основа за ефективна превенција како и третман на овие заболувања со можност за понатамошни истражувања кои ќе поттикнат еден нов пристап во превенцијата и терапијата на оралните преканцерозни лезии.

Промоција на орално здравје има клучна улога во намалување на перзистенцијата, динамиката и ХПВ трансмисијата во популација преку оралната лигавица. Превенцијата на ХПВ инфекцијата треба да се насочи кон едукација на населението за начините на пренесување на ХПВ инфекцијата и заштита при лични контакти со цел да се намали динамиката на ХПВ трансмисијата во популацијата. Со

ефикасна превенција се очекува и навремена дијагностика и терапија на ХПВ асоцираните лезии со цел да се намали можноста за малигна алтерација на овие лезии а со тоа и стапката на морбидитет и малигнитет.

Асоцираноста на високоризичните ХПВ со оралните преканцерозни лезии сугерира на можен позитивен ефект на ХПВ вакцината и кај оралните лезии. Од страна на FDA (FDA-food and drug administration) и CDC (CDC- Centers for Disease Control and Prevention) се одобрени три вакцини за ХПВ составени од не-инфективни вирусни партикули кои потекнуваат од L1 капсидниот протеин (FDA 2006- Gardasil, FDA2009- Cervarix, FDA 2014- Gardasil 9).

Квадривалентната Gardasil заштитува од ХПВ типовите 6,11, 16 и 18, и во 2006 година е одобрена за девојчиња и жени од 9-26 години (11-12). Се дава во интервал од три серии (0, 1-2 и 6 месеци). Cervarix вакцината заштитува само од високоризичните 16 и 18 типови. Се смета дека дава вкрстена заштита и од ХПВ 31,33 и 45. Gardasil се покажала 100% ефикасна во заштита од цервикални преканцерозни лезии, кај неизложени жени, но не и кај веќе ХПВ изложени жени. Цитолошкиот скрининг треба да продолжи и по вакцинирањето. Gardasil9 заштитува од повеќе ХПВ типови (6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52, 58). Се смета дека овие вакцини може да имаат значајна улога и во превенција на орално асоцирани ХПВ инфекции.¹⁰⁷

Независно од тоа што високоризичните ХПВ се поврзани со оралните преканцерозни лезии, останува нејасно дали кај оралните преканцерозни лезии ХПВ има улога на „невин„ сопатник или има активна улога во иницијацијата на развој на преканцерозна лезија. Секако пристапот кон овие лезии треба да биде ист, имајќи ја во предвид природата на овие вируси, со што не се исклучува улогата на овој вирус (како фактор или кофактор) во оралната карциногенеза.

Пациентите со детектиран високоризичен ХПВ да се третираат како пациенти со високоризичен профил за развивање на малигна алтерација и стоматологот треба да има клучна улога во нивна идентификација. Се препорачува следење на промената како

дел од протоколот за ефективна превенција и третман на оралните преканцерозни лезии и нивна малигна трансформација.

Цитологијата како ефтин, безболен и едноставен дијагностички метод овозможува ефикасен скрининг на оралните преканцерозни лезии. Но резултатите од оваа студија демонстрираа дека позитивниот ХПВ статус не асоцира со абнормална цитологија типична за ХПВ инфекцијата, оттука клиничкиот пристап и дијагностичките процедури за ХПВ кај оралните преканцерозни лезии треба да бидат сеопфатни со примена на супериорноста на молекуларните дијагностички процедури.

ЗАКЛУЧОЦИ

7. ЗАКЛУЧОЦИ

1. Кај пациентите со орални преканцерозни лезии ХПВ-ДНК е детектиран кај 30.0% од испитуваните пациенти ($\text{Chi-square} = 6.4$ и $p = 0.0114$) и разликата е статистички сигнификантна, односно постои поврзаност помеѓу оралните преканцерозни лезии и ХПВ.

2. Кај пациентите без орални лезии е детектиран само еден ХПВ позитивен пациент, 2.5% (1/40). Во испитуваниот примерок разликата помеѓу ХПВ позитивните и ХПВ негативните пациенти помеѓу двете испитувани групи е статистички сигнификантна ($p < 0.0001$).

3. Генотипизацијата констатира дека сите детектирани ХПВ типови, вклучувајќи го и тој од здрава орална лигавица, припаѓаат на високо-ризични ХПВ. Кај оралните преканцерозни лезии е евидентирано присуството на ХПВ 16, ХПВ 56, ХПВ 18. Кај пациентите со здрава лигавица е детектиран ХПВ31.

4. Високоризичните ХПВ асоцираат со оралните премалигни лезии и не се вклучува улогата на овој вирус (како фактор или кофактор) во етиопатогенезата, клиничката манифестација и можната малигна алтерација на овие лезии. Здравата лигавица може да биде носител на високоризични ХПВ типови.

5. Кај лихен планус детектирани се 22.6% (7/31) ХПВ позитивни пациенти и инфекцијата е потврдена кај двете најфреквентни форми на ОЛП. Ретикуларните (12.9%) и ерозивни форми (9.7%) на орален лихен планус се поврзани со високоризичните ХПВ типови што може да влијае на нивната клиничка манифестација како и можна малигна алтерација.

6. Највисока преваленција на ХПВ е констатирана кај пациенти до 50 годишна возраст кај испитуваниот примерок, со ОПЛ (12.5%) и без ОЛ (2.5%). Оралната ХПВ инфекција е најзастапена кај пациенти со средно образование (83.9%). Разликата за позитивните и негативните ХПВ типови помеѓу половите не е статистички сигнификантна ($p < 0.28$).

7. Пушењето и конзумацијата на алкохол во однос на ХПВ инфекцијата не се статистички сигнификантни ($p > 0.05$).

8. Разликата за пародонтолошките параметри во однос на ХПВ инфекцијата помеѓу ХПВ позитивните и негативните пациенти кај групата со орални лезии во рамките на испитуваната група пациенти со орални лезии не е статистички сигнификантна во рамките на ова истражување.

9. Субјективните симптоми (болка, жарење, печење, сувост на устата, разлабавување на забите, оток, крварење), историјата за системските заболувања (кардиоваскуларни, гастроинтестинални, нервни, ендокринолошки), податоците за фамилијарната и социјална анамнеза не асоцираат со ХПВ инфекцијата.

10. Кај сите ХПВ позитивни пациенти е констатиран негативен наод во однос на E6/E7 mRNA. Негативниот наод е показател дека не постои дисрегулација на механизмите на клеточен раст, односно на постоење на латентна инфекција.

11. Високоризичните ХПВ 16 и ХПВ 56 асоцираат со цитоморфолошки карактеристики кај 7.5% (3/40) и ХПВ 18 кај 5% (2/40) од примероците. Најзастапени цитоморфолошки промени се коилоцитозата, и дискариозата, како и дискератоза, акантоза и присуство на кератохијалински гранули.

12. Според индексот на епителна матурација не постои разлика помеѓу епителните слоеви од примероците со и без ХПВ инфекција.

13. Независно од тоа што високо-ризичните ХПВ се поврзани со оралните преанцерозни лезии, останува нејасно дали кај оралните преанцерозни лезии ХПВ има улога на „невин„ сопатник или има активна улога во иницијацијата на развој на премалигна лезија.

14. Испитуваните орални преанцерозни лезии не се клиничка манифестација на ХПВ инфекцијата, но долгата перзистенција на високоризичните ХПВ може да влијае на клиничкиот тек на лезијата.

15. Пациентите со детектиран високоризичен ХПВ да се третираат како пациенти со високоризичен профил за развивање на малигно заболување. Препорачуваме ко-тестирање со цитолошки и молекуларни методи како задолжителна дијагностичка постапка кај сомнителни и перзистентни лезии.

ЛИТЕРАТУРА

8. ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Kumaraswamy KL, Vidhya M. Human papilloma virus and oral infections: An update. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*. 2011; 7, 2, pp. 120-127.
- ²Report of a meeting of investigators on the histological definition of precancerous lesions. Geneva: World Health Organization; 1973.
- ³William WN Jr. Oral premalignant lesions: any progress with systemic therapies? *Curr Opin Oncol*. 2012 May;24(3):205-10.
- ⁴Saman DM. A review of the epidemiology of oral and pharyngeal carcinoma: update. *Head Neck Oncol*. 2012; 9:1.
- ⁵Hayat MJ, Howlader N, Reichman ME, Edwards BK. Cancer statistics, trends, and multiple primary cancer analyses from the surveillance, epidemiology, and end results (SEER) program. *Oncologist*. 2007;12(1):20-37.
- ⁶Ferreira Antunes JL, Toporcov TN, Biazevic MGH, Boing AF, Scully C, Petti S. Joint and Independent Effects of Alcohol Drinking and Tobacco Smoking on Oral Cancer: A large Case-Control Study. *PLoS ONE*. 2013;8(7): e68132. doi:10.1371/journal.pone.0068132.
- ⁷Yardimeci G, Kutlubay Z, Engin B, Tuzun Y. Precancerous lesions of oral mucosa. *World J Clin Cases* 2014;16;2(12):866-872. doi: 10.12998/wjcc.v2.i12.866
- ⁸Warnakulasuriya S. Causes of oral cancer – an appraisal of controversies. *British Dental Journal*. 2009; 207, 471 - 475 (2009). doi:10.1038/sj.bdj.2009.1009.
- ⁹Herrero R: Human papillomavirus and cancer of the upper aerodigestive tract. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2003, 31: 47-51.

¹⁰Syrjänen KJ, Pyrhonen S, Syrjänen SM, Lamberg MA. Immunohistochemical demonstration of human papilloma virus antigens in oral squamous cell lesions. *Br J Oral Surg* 1983;21:147-53. PMID:6307342

¹¹Chan KS, Picconi MA, Cheung TH, Giovannelli L, Park JS. Laboratory and clinical aspects of human papillomavirus testing. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2012 Aug; 49(4): 117-136. doi: 10.3109/10408363.2012.707174. PMID: PMC3469219.

¹²Miller CS, White DK. Human papillomaviruses expression in oral mucosa, premalignant conditions and squamous cell carcinoma: a retrospective review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1996;82(1): 57-68.

¹³ IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Part B: biological agents LYON , France 2011, Volume 100Bpp.278-80.

¹⁴ Flores Y, Shah K, Lazcano E, Hernández M, Bishai D, Ferris DG, Lorincz A, Hernández P, Salmerón J, Morelos Study Collaborators: Design and methods of the evaluation of an HPV-based cervical cancer screening strategy in Mexico: The Morelos HPV Study. *SaludPublica Mex* 2002,44:335-344.

¹⁵ Villa LL. Overview of the clinical development and results of a quadrivalent HPV (types 6, 11, 16,18) vaccine. *Int J Infect Dis* 2007.11(Suppl.2):S17-S25.

¹⁶Kademani D. Oral cancer. *Mayo Clin Proc*. Jul2007;82(7):878-87.

¹⁷ Silverman S, Jr. Demographics and occurrence of oral and pharyngeal cancers. The outcomes, the trends, the challenge. *J Am Dent Assoc*. 2001; 132 Suppl:7S-11S.

¹⁸ Kreimer AR; Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005;14(2):467-75.

¹⁹ Snow AN, Laudadio J. Human Papillomavirus Detection in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *Adv Anat Pathol*. 2010;17(6):394-403.

²⁰ Moore AK, Mehta V. The Growing Epidemic of HPV- Positive Oropharyngeal Carcinoma: A Clinical Review for Primary Care Providers. *J Am Board Fam Med*. 2015. 28(4):498-503.doi:10.3122/jabfm.2015.04.140301

²¹ Maitland NJ, Cox MF, Lynas C, Prime SS, Meanwell CA, Scully C. Detection of human papilloma virus DNA in biopsies of human oral tissues. *Br J Cancer*. 1987;56:245-50.

²² Campisi G, Giovannelli L, Aricò P, Lama A, Di Liberto CH, Ammatuna P, D'Angelo M., HPV DNA in clinically different variants of oral leukoplakia and lichen planus. *Oral Surg Oral Med, Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004.98; (6):705-11.

²³ Antonsson A, Cornford M, Perry S, Davis M, Dunne PM, Whiteman DC. Prevalence and risk factors for oral HPV infection in young Australians. *PLoS One*. 2014; 9(3):e91716.

²⁴ Herrero R, Castellsagué X, Pawlita M, Lissowska J, Kee F, Balaram P, et al. Human Papillomavirus and Oral Cancer: The International Agency for Research on Cancer Multicenter Study. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 2003; 95(23): 1772-1783.doi: 10.1093/jnci/djg107

²⁵ Smith EM, Rubenstein LM, Haugen TH, Pawlita M, Turek LP (2012) Complex etiology underlies risk and survival in head and neck cancer human papillomavirus, tobacco, and alcohol: a case for multifactor disease. *J Oncol* 2012: 571862 doi: 10.1155/2012/571862. pmid:22315596

²⁶ Feller L, Wood NH, Khammissa RA, Lemmer J. Human papillomavirus mediated carcinogenesis and HPV-associated oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. Part 2: Human papillomavirus associated oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Head Face Med*. 2010; 15;6:15.

²⁷ Kellokoski JK, Syrjanen S, Chang F, Yliskoski M, Syrjanen K. Southern blot and PCR in detection of oral human papillomavirus (HPV) infections in women with genital HPV infections. *J Oral Pathol Med.* 1992a;21:459-64.

²⁸ Kellokoski JK, Syrjanen SM, Yliskoski M, Syrjanen KJ. Dot blot hybridization in detection of human papillomavirus (HPV) infections in the oral cavity of women with genital HPV infections. *Oral Microbiol Immunol* 1992b;7:19-23.

²⁹ Longworth MS, Laimins LA. Pathogenesis of human papillomavirus in differentiating epithelia. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2004;68:362-372.

³⁰ Zhang ZY, Sdek P, Cao J, Chen WT. Human papillomavirus type 16 and 18 DNA in oral squamous cell carcinoma and normal mucosa. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery.* 2004;33(1): 71-74.

³¹ Rautava J, Syrjänen S. Biology of Human Papillomavirus infections in head and neck carcinogenesis. Laboratory and clinical aspects of human papillomavirus testing. *Head Neck Pathol.* 2012;6(Suppl 1):3-15.

³² Rampias T, Sasaki C, Weinberger P, Psyrris A. E6 and E7 gene silencing and transformed phenotype of human papillomavirus 16- positive oropharyngeal cancer cells. *Journal of the national Cancer Institute.* 2009;101(6):412-423.

³³ De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology.* 2004;324:17-27.

³⁴ Schiffman M, Clifford G, Buonaguro FM. Classification of weakly carcinogenic human papillomavirus types: addressing the limits of epidemiology at the borderline. *Infect Agent Cancer.* 2009;4:8. Doi:10.1186/1750-9378-4-8.

³⁵ Guily S, Lacau J, Jackuard AC, Pretet JL, Haesebaert J, et al. (2011) Human papillomavirus genotype distribution in oropharynx and oral cavity cancer in France- The EdITH VI study. *J Clin Virol*

³⁶ Kero K, Rautava J, Syrjanen K, Grenman S, Syrjanen S. Oral mucosa as a reservoir of human papillomavirus: point prevalence, genotype distribution and incident infections among males in a 7-year prospective study. *Eur Urol.* 2012;62(6):1063-70.

³⁷ Feller L, Khammissa RAG, Wood NH, Lemmer J. Epithelial maturation and molecular biology of oral HPV. *Infect Agent Cancer.* 2009;4:16.

³⁸ Yoshida K, Furumoto H, Abe A, et al. The possibility of vertical transmission of human papillomavirus through maternal milk. *Journal of Obstetrics and Gynaecology.* 2011;31(6):503-506.

³⁹ Sedlacek TV, Lindheim S, Eder C, Hasty L, Woodland M, Ludomirsky A et al. Mechanism for human papillomavirus transmission at birth. *Am J Obstet Gynecol* 1989, 161:55-9.

⁴⁰ Kreimer AR, Alberg AJ, Daniel R, Gravitt PE, Viscidi R, Garrett ES, Shah KV, Gillison ML: Oral human papillomavirus infection in adults is associated with sexual behavior and HIV serostatus. *J Infect Dis.* 2004;189: 686-698.

⁴¹ Moscicki AB, Ellenberg JH, Farhat S, Xu J. Persistence of human papillomavirus infection in HIV- infected and -uninfected adolescent girls: risk factors and differences, by phylogenetic type. *J Infect Dis.* 2004;190(1):37-45.

⁴² Syrjänen S. Current concepts on human papillomavirus infections in children. *APMIS* 2010;118:494-509. 4.

43 Feller L, Khammissa RA, Wood NH, Malema V, Meyerov R, Lemmer J. Focal epithelial hyperplasia (Heck disease) related to highly active antiretroviral therapy in an HIV-seropositive child. A report of a case, and a review of the literature. *SADJ* 2010;65:172-175.

44 Feller L, Khammissa RA, Wood NH, Marnewick JC, Meyerov R, Lemmer J. HPV-associated oral warts. *SADJ* 2011;66:82-85.

45 González JV, Gutiérrez RA, Keszler A, Colacino Mdel C, Alonio LV, Teyssie AR, Picconi MA. Human papillomavirus in oral lesions. *Medicina (B Aires)* 2007;67:363-368.

46 Handisurya A, Schellenbacher C, Kirnbauer R. Diseases caused by human papillomaviruses (HPV). *J Dtsch Dermatol Ges* 2009;7:453- 466; quiz 466, 467.

47 Kajiji S, Tamura RN, Quaranta V. A novel integrin (alpha6beta4) from human epithelial cells suggests a fourth family of integrin adhesion receptors. *EMBO J.* 1989;8:673-680.

48 Shafti- Kramat S, Handisurya A, Kriehuber E, et al. Different eparan sulfate proteoglycans serve as cellular receptors for human papillomaviruses. *J Virol.*2003;77:13125-13135.

49 Conway MJ, Meyers C. Replication and assembly of human papillomavirus. *J Dent Res.*2009;88:307-317.

50 da Silva Baumgart C, Darolt BN, Maraschin JB, Haas A, Visioli F, Rados VP. Influence of factors in the oral mucosa maturation pattern: a cross- sectional study applying multivariate analyses. *Braz J Oarl Sci.*2016.15(1):27-34.

51 Miyahara IG, Simonato ES, Mattar JN, Camilo JD, Biasoli RE. Correlation between koilocytes and human papillomavirus detection by PCR in oral and oropharynx squamous cell carcinoma biopsies. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011;106.2.ISSN 0074-0276.

52Singh M, Chaudhary AK, Pandya S, et al. Morphometric analysis in potentially malignant head and neck lesions: oral submucous fibrosis. *Asian Pac J Cancer Pev.* 2010;11(1):257-60.

⁵³Fakhry C, Rosenthal TB, Clark PD, Gillison LM. Associations between oral HPV 16 infection and cytopathology: evaluation of an oropharyngeal "Pap-test equivalent" in high-risk populations. *Cancer Prev Rev (Phila)*.2011; 4(9):1378-1384.

⁵⁴Dona MG, Giuliani M, Vocaturo A, Spriano G, Pichi B, Rollo F, Ronchetti L, Covello R, Pescarmona E, Benevolo M. Cytology and human papillomavirus testing on cytobrushing samples from patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer*. 2014; 120(22): 3477-84.

⁵⁵Gichki AS, Buajeev W, Doungudomdacha S, Khovidhunkit SO. Detection of human papillomaviruses in normal oral cavity in a group of Pakistani subjects using real- time PCR. *Asian Pac J Cancer Prev*.2012.13(5): 2299- 304.

⁵⁶Doorbar J. The papilloma life cycle. *J Clin Virol*. 2005;32(Suppl 1): S7-S15.

⁵⁷Thiery F. Transcriptional regulation of the papillomavirus oncogenes by cellular and viral transcription factors in cervical carcinoma. *Virology*.2009;384: 375- 379.

⁵⁸McCaffery M. Autopsy of a mummy - warts and all. . *Can Fam Physician*. 1974 Sep; 20(9):89-91.

⁵⁹Onon TS. History of human papillomavirus, warts and cancer: what do we know today? *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2011 Oct;25(5):565-74. Epub 2011 Jun 25.

⁶⁰zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. *Virology*. 2009 Feb 20;384(2):260-5. Epub 2009 Jan 8.

⁶¹Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer : from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2: 342-350.

⁶²IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans (2007)IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans: Human

papillomaviruses. Lyon, France: International Agency for research on cancer, World Health Organisation. 690p.

⁶³ Meyer MF, Valter M, Klussmann JP, Preuss SF. Prevalence and risk factors for oral human papillomavirus infection in 129 women screened for cervical HPV infection. *Oral Oncol.* 2014;50(1):27-31.

⁶⁴ Thompson IO, van der Bijl P, van Wyk CW and van Eyk AD: A comparative light-microscopic, electron-microscopic and chemical study of human vaginal and buccal epithelium. *Arch Oral Biol* 2001.46: 1091-1098.

⁶⁵ Chang F, Syrjanen S, Nuutinen J, et al. Detection of human papillomavirus (HPV) DNA in oral squamous cell carcinomas by in situ hybridization and polymerase chain reaction. *Arch Dermatol Res.* 1990;282:493-497. doi:10.1007/BF00371942[PubMed][Cross Ref]

⁶⁶ Syrjänen S, Lodi G, I von Bültzingslöwen, Aliko A, Arduino P, Campisi G, et al. Human papillomaviruses in oral carcinoma and potentially malignant disorders: a systematic review. *Oral Dis.* 2011;17, supp.s1:58-72. doi: 10.1111/j.1601-0825.2011.01792.x

⁶⁷ Mehanna H, Franklin N, Compton N, Robinson M, Powell N, Biswas- Baldwin N, et al. Geographic variation in human papillomavirus-related oropharyngeal cancer: Data from 4 multinational randomized trials. *Head Neck.* 2016 Apr; 38(Suppl 1): E1863-E1869. doi: 10.1002/hed.24336. PMID: PMC4869674

⁶⁸ Baric JM, Alman JE, Feldman RS et al. Influence of cigarette, pipe, and cigar smoking, removable partial dentures, and age on oral leukoplakia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1982 Oct;54(4):424-9.

⁶⁹ Neville BW., Damm DD., Allen CM., Bouquot JE. *Oral & Maxillofacial Pathology.* Philadelphia-W.B. Saunders Company; 2009.

⁷⁰ Kramer IRH, Lucas RB, Pindborg JJ, Sobin LH. Definition of leukoplakia and related lesions: an aid to studies on oral pre-cancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1978 Oct;46(4): 518-39.

⁷¹ Liu W, Shi LJ, Wu L, Feng JQ, Yang X, Li J, Zhou ZT, Zhang CP. Oral Cancer Development in Patients with Leukoplakia – Clinicopathological Factors Affecting Outcome *PLoS One*. 2012;7(4):e34773. Epub 2012 Apr 13.

⁷² Llamas-Martínez S, Esparza-Gómez G, Campo-Trapero J, Cancela-Rodríguez P, Bascones-Martínez A, Moreno-López LA, et al. Genotypic determination by PCR-RFLP of human papillomavirus in normal oral mucosa, oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma samples in Madrid (Spain). *Anticancer Res*. 2008 Nov-Dec;28(6A):3733-41.

⁷³ Babichenko II, Rabinovich OF, Ivina AA, Rabinovich IM, Togonidze AA. Papillomavirus in the genesis of oral leucoplakia. *Arkh Patol*; 76(1):32- 6.

⁷⁴ Villa A, Villa C, Abati S. Oral cancer and oral erythroplakia: an update and implication for clinicians. *Aust Dent J*. 2011 Sep;56(3):253-6.

⁷⁵ Nielsen H, Norrild B, Vedtofte P, Praetorius F, Reibel J, Holmstrup P. Human papillomavirus in oral premalignant lesions. *Eur J Cancer B Oral Oncol*. 1996 Jul;32B(4): 264-70.

⁷⁶ Syrjänen S, Syrjänen K (2000). HPV infections of the oral mucosa, Chapter 17. In: Syrjänen K, Syrjänen S, eds. *Papillomavirus infections in human pathology*. J. Wiley & Sons: New York, pp. 379–412.

⁷⁷ Warnakulasuriya S, Johnson NW, van der Waal I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med*. Nov 2007;36(10):575-80.

⁷⁸ Epstein JB, Wan LS, Gorsky M, Zhang L. Oral lichen planus: Progress in understanding its malignant potential and the implications for clinical management. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003 Jul;96(1):32-7.

⁷⁹ Campisi G, Giovannelli L, Arico P, et al. HPV DNA in clinically different variants of oral leukoplakia and lichen planus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* Dec 2004;98(6):705-11.

⁸⁰ Lodi G, Scully C, Carrozzo M, et al (2005). Current controversies in oral lichen planus: report of an international consensus meeting. Part 1. Viral infections and etiopathogenesis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 100, 40- 51.

⁸¹ O'Flatharta C, Flint SR, Toner M, Butler D, Mabruk MJ. Investigation into a possible association between oral lichen planus, the human herpesviruses and the human papillomaviruses. *Mol Diagn* 2003;7:73-83.

⁸² Gonzalez-Moles MA, Rodriguez-Archilla A, Ruiz Avila I, Esteban F, Gonzalez-Moles S and Bravo M: Presence of HPV 16 sequences in oral lichen planus lesions. *Bull Group Int Rech Sci Stomatol Odontol.* 1998; 40: 92-97.

⁸³ Sand L, Jaiouli J, Larsson PA, Hirsch JM. Human papilloma viruses in oral lesions. *Anticancer Res.* 2000 Mar-Apr;20(2B):1183-8.

⁸⁴ Mattila R, Rautava J, Syrjänen S. Human papillomavirus in oral atrophic lichen planus lesions. *Oral Oncol.* 2012;48(10):980-4.

⁸⁵ Schwartz RA, Bridges TM, Butani AK, Ehrlich A. Actinic keratoses: an occupational and environmental disorder. *Eur Acad Dermatol Venerol.* 2008;22:606-615.

⁸⁶ Nico MMS, Rivitti EA, Laurencio SV. Actinic cheilitis: histologic study of the entire vermilion and comparison with previous biopsy. *J Cutan Pathol.* 2007;34:309-314.

⁸⁷Cockerell CJ. Pathology and pathobiology of the actinic (solar) keratosis. *Br J Dermatol.* 2003;149(suppl 66):34-36.

⁸⁸ Neto Pimentel DR, Michalany N, Alchorne M, Abreu M, Borra RC, Weckx L. Actinic cheilitis: histopathology and p53. *J Cutan Pathol.* 2006;33:539-544.

⁸⁹ Chiller KG, Washington C, Sober AJ, Koh HK. Cancer of the skin. In: Kasper DL, et al., editors. *Harrisons Principles of Internal Medicine.* 16th ed. New York: McGraw-Hill; 2005. pp. 497-503.

⁹⁰ Weissenborn, SJ; Nindl, I; Purdie, K; Harwood, C; Proby, C; Breuer, J; Majewski, S; Pfister, H; Wieland, U (July 2005). "Human papillomavirus-DNA loads in actinic keratoses exceed those in non-melanoma skin cancers". *The Journal of Investigative Dermatology.* 125 (1): 93-7.

⁹¹Luo CW, Roan CH, Liu CJ. Human papillomaviruses in oral squamous cell carcinoma and pre-cancerous lesions detected by PCR-based gene-chip array. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2007 Feb;36(2):153-8. Epub 2006 Nov 15.

⁹² Chaudhary AK, Pandya S, Mehrotra R, Bharti AC, Singh M, Singh M. Comparative study between the Hybrid Capture II test and PCR based assay for the detection of human papillomavirus DNA in oral submucous fibrosis and oral squamous cell carcinoma. *Virology.* 2010 Sep 23;7:253.

⁹³ Ostwald C, Rutsatz K, Schweder J, Schmidt W, Gundlach K, Barten M. Human papillomavirus 6/11, 16 and 18 in oral carcinomas and benign oral lesions. *Med Microbiol Immunol.* 2003 Aug;192(3):145-8. Epub 2002 Nov 1.

⁹⁴ Babiker AY, Eltom FM, Abdalaziz MS, Rahmani A, Abusail S, Ahmed HG. Screening for high risk human papillomavirus (HR-HPV) subtyper, among Sudanese patients with oral lesions. *Int J Clin Exp Med.* 2013; 6(4): 275- 81.

⁹⁵ Bloumi E, Chatzidimitrou D, Pazartzi Ch, Katopodi T, Tzimagiorgis G, Ammanouil-Nikoloussi EN, Markoloulos A, et al. Detection and typing of human papillomaviruses (HPV) in malignant, dysplastic, nondysplastic and normal oral epithelium by nested polymerase chain reaction, immunohistochemistry and transitional electron microscopy in patients of northern Greece. *Oral Oncol* 2014; 50(9): 840-7.

⁹⁶ Mravak- Stipetic M, Sabol I, Kranjcic J, Knezevic M, Grce M. Human Papillomavirus in the Lesions of the Oral Mucosa According to Topography. *PLoS One*. 2013; 8(7): e69736.

⁹⁷ Migaldi M, Pecorari M, Forbicini G, Nanni N, Grottola A, Grandi T et al. Low prevalence of human papillomavirus infection in the healthy oral mucosa of a Northern Italian population. *J Oral Pathol Med*. 2012;41(1):16-20

⁹⁸ Miller SC, Johnstone BM. Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: a meta analysis, 1982- 1997. *Oral Surg Oral Med Endod Oral Pathol Oral Radiol*. 2001;91:622-635.

⁹⁹ Fornatora M, Jones AC, Kerpel S, Freedman P. Human papillomavirus-associated oral epithelial dysplasia (Koilocytic dysplasia): an entity of unknown biologic potential. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1996;82:47-56.

¹⁰⁰ Krawczyk E, Suprynowicz FA, Liu X, Dai Y, Hartmann DP, Hanover J, Schlegel R. Koilocytosis: a cooperative interaction between the human papillomavirus E₅ and E₆ oncoproteins. *Am J Pathol* 2008; 173: 682-688.

¹⁰¹ Aggarwal S, Arora VK, Gupta S, Singh N, Bhatia A. Koilocytosis: correlations with high-risk HPV and its comparison on tissue sections and cytology, urothelial carcinoma. *Diagn Cytopathol* 2009;37:174-177.

¹⁰²Giraldo PC, Simões JA, Ribeiro Filho DA, Tambascia JK, Dias ALV, Pacello PCC. Avaliação citológica da orofaringe de mulheres portadoras do HPV genital. *Rev Bras Ginec Obstet* 1996; 18(3):737-42.

¹⁰³Löning T, Meichsner M, Milde- Langosch K, Hinze H, Orlt I, Hormann K, Sesterhenn K, Becker J, Reichart P. HPV DNA detection in tumors of the head and neck: a comparative light microscopy and DNA hybridization study. *ORLJ Otorhinolaryngol Relat Spec* 1987;49:259-269.

¹⁰⁴Kristoffersen AK, Enersen M, Kverndokk E, Sunde PT, Landin M, Solheim T, Olsen I, Grinde B. Human Papillomavirus subtypes in oral lesions compared to healthy oral mucosa. *J Clin Virol*. 2012; 53(4): 364-6. doi:10.1016/j.jcv.2011.12.023. Epub 2012

¹⁰⁵ Ha PK, Pai SI, Westra WH, Gillison ML, Tong BC, Sidransky D, Califano JA. Real-time quantitative PCR demonstrates low prevalence of human papillomavirus type 16 in premalignant and malignant lesions of the oral cavity. *Clin Cancer Res* 2002; 8:1203-1209.

¹⁰⁶ Gillison ML, Broutian T, Pickard RK et al. Prevalence of oral HPV infection in the United States, 2009-2010. *JAMA* 2012;307:693-703.

¹⁰⁷ Herrero R, Quint W, Hildesheim A, Gonzalez P, Struijk L, et al. Reduced Prevalence of Oral Human Papillomavirus (HPV) 4 Years after Bivalent HPV Vaccination in a Randomized Clinical Trial in Costa Rica. *PLoS One*. 2013; 8(7): e68329.

¹⁰⁸ Bui TC, Markham CM, Ross MW, Mullen PD. Examining the association between oral health and oral HPV infection. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2013;6(9):917-24.

¹⁰⁹ Madinier I, Doglio A, Cagnon L, Lefebvre JC, Monteil RA. Southern blot detection of human papillomaviruses (HPVs) DNA sequences in gingival tissues. *J Periodontol*. 1992;63:667-73.

¹¹⁰ Xavier SD, Filho IB, Carvalho JM, Framil VMS, Castro TMPPG. Frequency of Appearance of Human Papillomavirus (HPV) in Oral Mucosa of Men with Anogenital HPV by a Molecular Technique. *Arq. Int. Otorrinolaringol.* 2007;11(1):36-44

¹¹¹ Cowpe JG, Longomare RB, Green MW. Quantitative exfoliative cytology of abnormal oral mucosal smears. *J R Soc Med* 1988;81:509-13.

¹¹² Boon ME, Alons-van Kordelaar JJM, Rietveld-Scheffers PEM. Consequences of the introduction of combined spatula and cytobrush sampling for cervical cytology improvements in smear quality and detection rates. *Acta Cytol.* 1986;30:264-70.

¹¹³ Gupta S, Chachra KL, Bhadola P, Sodhani P. Modified Papanicolaou staining protocol with minimum alcohol use: a cost-cutting measure for resource-limited settings. *Cytopathology.* 2010;21(4):229-33.

¹¹⁴ Afrogheh A, Wright CA, Sellars SL, Pelsar A, Wetter J, Schubert PT, Hille J. An evaluation of the Shandon PapSpin liquid based oral test utilizing a novel cytologic scoring system. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 2012;113:799:807.

¹¹⁵ Boulet G, Horvath C, Broeck DV, Sahebali S, Bogers J (2007). Human papillomavirus: E6 and E7 oncogenes. *Int J Biochem Cell Biol*, 39, 2006-11.

¹¹⁶ Jahanshahi GH. A guide book for differential diagnosis of oral lesions. 3rd ed. Isfahan: Isfahan University of Medical Sciences; 2005. pp. 244-7.

¹¹⁷ Ho MW, Risk JM, Woolgar JA, Field EA, Field JK, Steele JC, et al. The clinical determinants of malignant transformation in oral epithelial dysplasia. *Oral Oncol.* 2012;48:969-76. PubMed PMID: 22579265.

¹¹⁸ Zeus MS, Miller CS, White DK. In situ hybridization analysis of human papillomavirus DNA in oral mucosal lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1991;71:714-720.

¹¹⁹ Fouret P, Martin F, Flahault A, et al. Human papillomavirus infection in the malignant and premalignant head and neck epithelium. *Diagn Mol Pathol* 1995;4:122-127.

¹²⁰ Jayaprakash V, Reid M, Hatton E et al. Human papillomavirus types 16 and 18 in epithelial dysplasia of oral cavity and oropharynx: a meta-analysis, 1985-2010. *Oral Oncol* 2011;47:1048-1054.

¹²¹ D'Costa J, Saranath D, Dedhia P et al. Detection of HPV-16 genome in human oral cancers and potentially malignant lesions from India. *Oral Oncol* 1998;34:413-420.

¹²² Rautava J, Willberg J, Louvanto K, Wideman L, Syrjänen K, Grénman S, Syrjänen S. Prevalence, Genotype Distribution and Persistence of Human Papillomavirus in Oral Mucosa of Women: A six-Year Follow-Up Study. *PLoS One*.2012;7(8):e42171. doi:10.1371/journal.pone.0042171.

¹²³ Bouda M, Gorgoulis VG, Kastrinakis NG et al. 'High risk' HPV types are frequently detected in potentially malignant and malignant oral lesions, but not in normal oral mucosa. *Mod Pathol* 2000;13:644-653.

¹²⁴ Sánchez-Vargas LO, Díaz-Hernández C and Martínez-Martínez A. Detection of Human Papilloma Virus (HPV) in oral mucosa of women with cervical lesions and their relation to oral sex practices. *Infect Agent Cancer* 2010, 5:25 doi: 10.1186/1750-9378-5-25.

¹²⁵ Esquenazi D, Bussoloti Filho J, Carvalho Mda G, Barros FS. The frequency of human papillomavirus findings in normal oral mucosa of healthy people by PCR. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2010;76(1):78-84.

¹²⁶ Shirasuna K. Oral lichen planus: Malignant potential and diagnosis. *Oral Science International*.2014;11(1):4-7.

-
- ¹²⁷ Van der Wal I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. *Oral Oncol.* 2009;9:317-323.
- ¹²⁸ Jontell M, Watts S, Wallstrom M, Levin L and Sloberg K: Human papilloma virus in erosive oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* 19: 273-277, 1990.
- ¹²⁹ Colon- López V, Quiñones- Avila V, Toro- Mejías LMD, Reyes K, Rivera EM, Nieves K, et al. Oral HPV infection in a clinic- based sample of HOspanic men. *BMC Oral Health.* 2014; 14:7.
- ¹³⁰ Nauder P, Ryd W, Törnberg S, et al. Human papillomavirus and Papanicolaou tests to screen for cervical cancer. *N Engl J Med.* 2007;357(16): 1589- 1597 (2008;359(15):1637).
- ¹³¹ Snijders PJ, Steenbergen RD, Heideman DA, Meijer CJ. HPV- mediated cervicalcarcinogenesis: concepts and clinical implications. *J Pathol.* 2006; 208(2):152- 164.
- ¹³² Woo BS, Emma C Cashman CE, Lerman AM. Human papillomavirus-associated oral intraepithelial neoplasia. *Modern Pathology.* 201; 26, 1288–1297.
- ¹³³ Kreimer AR, Bhatia RK, Messeguer AL, González P, Herrero R, Giuliano AR. Oral human papillomavirus in healthy individuals: a systematic review of the literature. *Sex Transm Dis.* 2010;37(6):386-91.
- ¹³⁴ Nordfors C, Grun N, Haeggblom L, Tertipis N, Sivars L, et al. Oral human papillomavirus prevalence in high school students of one municipality in Sweden. *Scand J Infect Dis.* 2013.
- ¹³⁵ Adelstein DJ, Ridge JA, Gillison ML, et al. Head and neck squamous cell cancer and the human papillomavirus: summary of a National Cancer Institute State of the Science Meeting, November 9-10, 2008, Washington, D.C. *Head&neck.* 2009;31(11)1393-1422.

- ¹³⁶ Cranston RD, Hart SD, Gornbein JA, Hirschowitz SL, Cortina G, Moe AA. The prevalence and predictive value of abnormal cytology to diagnose anal dysplasia in a population of HIV-positive men who have sex with men. *Int J STD AIDS*. 2007;18(2):77-80.
- ¹³⁷ Kelsey KT, Nelson HL, Kim S, Pawlita M, Langevin SM, Eliot M, Michaud DS, McClean M. Human papillomavirus serology and tobacco smoking in a community control group. *BMC Infect Dis*. 2015 ;15: 8. Doi: 10.1186/s12879-014-0737-3.
- ¹³⁸ Fakhry C, Gillison M, MD'Souza G. Tobacco Use and Oral HPV 16 infection. *JAMA*. 2014.312(14)1465-7. 10.1001/jama.2014.13183 PMID: PMC4266546.
- ¹³⁹ Kumar R, Rai AK, Das D, Das R, Kumar RS, Sarma A, et al. Alcohol and Tobacco Increases Risk of High Risk HPV Infection in Head and Neck Cancer Patients: Study from North- East Region of India. *PLoS ONE*. 2015. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0140700>.
- ¹⁴⁰ Read TR, Hocking SS, Vodstrail LA, et al. Oral human papillomavirus in men having sex with men: risk factors and sampling. *PLoS One*. 2012;7(Suppl1): e 49324.
- ¹⁴¹ Smith EM, Ritchie JM, Summeragill KP, Hoffroan HT, Wang DH, Haugen TH, Turek LP. Human papillomavirus in oral exfoliated cells and risk of head and neck cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2004;17;96(6):449-55.
- ¹⁴² Rosenquist K, Wennerberg J, Schildt EB, Bladstrom A, Goran Hansson B, Andersson G. Oral status, oral infections and some lifestyle factors as risk factors for oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. A population-based case-control study in southern Sweden. *Acta Otolaryngol*. 2005;125:1327-1336.
- ¹⁴³ Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002;420:860-867.

-
- ¹⁵³ Martin MP, Carrington M. Immunogenetics of viral infections. *Curr Opin Immunol.* 2005;17:510-516.
- ¹⁵⁴ Jameson JL. In: *Principles of molecular medicine 1*. Jameson JL, editor. Totowa New Jersey: Humana Press Inc; 1998. Oncogenes and tumor suppressor genes; pp.73-82.
- ¹⁵⁵ Gillison ML, Alemany L, Snijders PS, Chaturvedi A, Steinberg BM, Schwartz S, et al. Human papillomavirus and diseases of the upper airway: head and neck cancers and respiratory papillomatosis. *Vaccine.* 2012;30((Suppl5)):F34-F54.
- ¹⁵⁶ Jones AC, Pink FE, Sandow PL, Stewart CM, Migliorati CA, Baughman RA. The Cytobrush Plus sell collector in oral cytology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994;77:95-9.
- ¹⁵⁷ Ogden GR, Cowpe JG, Green M. Cytobrush and wooden spatula for oral exfoliative cytology. A comparison. *Acta Cytol* 1994;35:706-10.
- ¹⁵⁸ Sarruf M, Dias EP. Avaliação citopatológica da cavidade bucal em pacientes portadores de infecção genital pelo papilomavírus humano (HPV). *J Bras Doenças Sex Trans* 1997, 9(2):4-18.
- ¹⁵⁹ Driemel O, Kunkel M, Hullmann M, et al. Diagnosis of oral squamous cell carcinoma and its precursor lesions. *J German Soc Derm.* 2007;5:1095-100.
- ¹⁶⁰ Nichols ML, Quin FB Jr, Schnadig VJ, Zaharopoulos P, Hokanson JA, Des Jardins L, et al. Interobserver variability in the interpretation of brush cytologic studies from head and neck lesions. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1991, 117:1350-5.
- ¹⁶¹ Zuna RE, Wang SS, Schiffman M, Solomon D. Comparison of human papillomavirus distribution in cytologic subgroups of low-grade squamous intraepithelial lesion. *Cancer* 2006;108:288-297.
- ¹⁶² Merhotra, R. *Oral Cytology/ A Concise Guide*; Springer, New York, NY, USA. 2013; p27.

- ¹⁶³Sudbo J, Kildal W, Risberg B, Koppang HS, Danielsen HE, Reith A: DNA content as a prognostic marker in patients with oral leukoplakia. *N Engl J Med* 2001, 344:1270-8.
- ¹⁶⁴ Salvia PN, Bergo SM, Bonesso- Saabadini PI, Tagliarini EB, Hackel C, De Angelo Anrdrade LA. Correlation between histological criteria and human papillomavirus presence based on PCR assay in cervical biopsies. *Int J Gynecol Cancer* 2004. 14;126-132.
- ¹⁶⁵ Rick GM, Slater L. Oral brush biopsy: the problem of false positives. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003, 96:252.
- ¹⁶⁶ Nanci A. *Ten cate's Oral Histology. Development, Structure and Function.* 7. Chapter 2. Missouri: Mosby Elsevier; 2008: pp.319-357.
- ¹⁶⁷ Montgomery PW. Study of exfoliative cytology of normal human oral mucosa. *JD Res.* 1951.30:12.
- ¹⁶⁸ Burzlaff JB, Bohrer PL, Paiva RL, Visioli F, Sant'Ana Filho M, da Silva VD, et al. Exposure to alcohol or tobacco affects the pattern of maturation in oral mucosal cells: a cytohistological study. *Cytopathology.* 2007; 18: 367-75.
- ¹⁶⁹ Miller CS. Pleiotrophic mechanisms of virus survival and persistence. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol endod.* 2005; 100:527-536.
- ¹⁷⁰ Saslow D, Runowicz CD, Solomon D, Moseicki AB, Smith RA, Eyre HJ, Cohen C. American Cancer Society Guideline for the Early Detection of Cervical Neoplasia and Cancer. *J Low Genit Tract Dis.* 2003;7:67-86.
- ¹⁷¹ GLOBOCAN 2008. Cervical cancer incidence and mortality worldwide in 2008: summary. <http://globocan.iarc.fr/factsheets/cancers/cervix.asp>.