

Oki összefüggés a humán papillomavírus-fertőzés és a fej-nyaki régió valamint a nyelőcső laphámrákjának egyes típusai között

Szentirmay Zoltán^{1,2}, Szántó Imre⁴, Bálint Ildikó^{1,2}, Pólus Károly^{1,3}, Remenár Éva^{1,3}, Tamás László⁶, Szentkúti Gabriella⁶, Melegh Zsombor^{1,2}, Nagy Pál⁵, Kásler Miklós¹

¹Országos Onkológiai Intézet ²Molekuláris Pathológiai Osztály, ³Fej-Nyak, Állcsont és Rekonstrukciós Sebészet, Onkológiai Helyreállító Plasztikai Sebészet és Laser Sebészeti Osztály, ⁴Semmelweis Egyetem, ÁOK, Sebészeti Tanszék, ⁵Országos Gyógyintézeti Központ, Pathológiai Tanszék, ⁶Jahn Ferenc Kórház, Fül-Orr-Gége Osztály, Budapest

A humán papillomavírus- (HPV) fertőzés rendszerint proliferatív elváltozásokat eredményez a többrétegű laphámban, egyes HPV-típusok pedig nagy valószínűséggel okoznak carcinomát. Mi a szájüreg és nyelőcső papillomáiban és carcinomáiban előforduló HPV kimutatására molekuláris biológiai módszereket alkalmaztunk. Összesen 150 műtéttel eltávolított friss szövetből vagy paraffinba ágyazott szövettani mintából DNS-t izoláltunk és a HPV jelenlétét polimeráz láncreakcióval (PCR) vizsgáltuk. A PCR analízishez a HPV L1 génhez illeszkedő 15 pár consensus primert, a HPV 16 prototípusra és L83V variánsra specifikus 3 primerpárt, valamint a HPV 6, 11, 16, 18, 52, 58, 66 és 73 HPV E6 specifikus primert használtunk. A 150 szövetmintából 61 esetben találtunk HPV szekvenciát. Az oropharyngealis régióban 16/32, a gégében 13/36, a nyelőcsőben 32/82 mintában mutattuk ki HPV jelenlétét. A nyelőcsőben a leggyakoribb típus a HPV 73 volt. Az összes vizsgált mintában a HPV 6/11 négy, a HPV 16 huszonhárom, a HPV 35, 45, 54, 58, 61, 66, 72 egy-egy, a HPV 68 két, HPV 70 három, a HPV 73 tizenhat, kettős vírusfertőzés két, nem azonosított HPV-típus négy esetben volt kimutatható. Érdekes eredmény, hogy minden verrucosus carcinomában és 22-ből 18 basaloid laphámrákban a HPV jelen volt. Nyolc HPV 16-pozitív laphámrákból kettőben E6 T350G mutáció (HPV 16 L83V variáns) fordult elő. Korrespondencia-analízissel bizonyítottuk, hogy a HPV-fertőzés a carcinomák specifikus csoportjával (verrucosus rák és basaloid laphámrák) függ össze. Nőkben a HPV-pozitív carcinomák aránya szignifikánsan magasabb, mint férfiakban. Eredményeink azt mutatják, hogy a nyálkahártya irritációja és a HPV együttes előfordulása szükséges a szájüreg- és nyelőcső-papillomák és a carcinomák egy meghatározott csoportjának a kialakulásához. *Magyar Onkológia* 46:35–41, 2002

HPVs commonly cause proliferative lesions of squamous epithelium, and infection with certain HPV types carries a high risk of malignant transformation. We used molecular techniques to detect and type HPV in papillomas and carcinomas in the oral cavity and esophagus. DNA was extracted from 150 fresh or paraffin embedded biopsy specimens, and analyzed for HPV by PCR with 15 sets of consensus primers directed to conserved regions of L1 gene, three sets of HPV16E6 primers (specific for the HPV 16 prototype and L83V variant), and sets of primers specific for the E6 gene of other mucosa type HPVs including HPV 6, 11, 16, 18, 52, 58, 66, and 73. Overall, HPV sequences were detected in 61 of 150 specimens. HPV DNA sequences were detected in 16/32 specimens in the oropharyngeal region, in 13/36 specimens in larynx and 32/82 specimens in esophagus. Papillomas contained only the episomal form of HPV 16. In the esophagus, the most common type was HPV 73. In all specimens examined, HPV 6/11 (4/150), HPV 16 (23/150), HPV 35 (1/150), HPV 45 (1/150), HPV 54 (1/150), HPV 58 (1/150), HPV 61 (1/150), HPV 66 (1/150), HPV 68 (2/150), HPV 70 (3/150), HPV 72 (1/150), HPV 73 (16/150), double HPV infection (2/150), and unidentified HPV type (4/150) was detected. Interestingly, HPV was found in all verrucous carcinomas and in 18/22 basaloid squamous cell carcinomas. HPV16E6 T350G mutant were observed only in two of eight carcinomas. Using correspondence analysis, a segregation of specific virus types in specific clinico-pathologic lesions (verrucous carcinoma and basaloid squamous cell carcinoma) was proved. It was shown that the relative rates of the HPV positive tumors were significantly higher in women than in men. The synergic action of mucosal irritation and HPV infection may be necessary for the development of the papillomas and the specific types of carcinomas in the oral cavity and in the esophagus. *Szentirmay Z, Szántó I, Bálint I, Pólus K, Remenár É, Tamás L, Szentkúti G, Melegh Zs, Nagy P, Kásler M. Causal association between human papilloma virus infection and head and neck and esophageal squamous cell carcinoma. Hungarian Oncology* 46:35–41, 2002

A munka a T30805 számú OTKA és 44/2000 számú ETT, valamint az NKFP 1/048 Széchenyi Pályázat támogatásával készült.

Érkezett: 2002. február 11.

Elfogadva: 2002. március 4.

Levelezési cím: Dr. Szentirmay Zoltán, Országos Onkológiai Intézet, Molekuláris Pathológiai Osztály, 1122 Budapest, Ráth György utca 7-9., Telefon: 1-224-8783, Fax: 1-224-8620, e-mail: szentirmay@oncol.hu

Bevezetés

Általános felfogás szerint a fej-nyaki régió valamint a nyelöcső laphámrákjait elsősorban környezeti karcinogének okozzák. Ezek között a két legjelentősebb faktor a dohányzás és az alkoholfogyasztás (16, 26). Vannak azonban ebben a régióban is olyan laphámrákok, amelyek nemdohányzóknak és nem alkoholfogyasztóknak alakulnak ki. A legújabb epidemiológiai és molekuláris patológiai adatok azt mutatják, hogy a humán papillomavírus (HPV) fertőzés ezekben a lokalizációkban is kimutatható, ezért ugyanúgy, mint az ano-genitalis tájékon, összefüggő laphámrákkal (13, 17, 29).

Hatvannyolc évvel ez előtt Shope és Hurst (34) megfigyelték, hogy a gyapjasfarkú nyulak papillomavírus-fertőzése következményes papillomatosus laphám-elváltozások kifejlődéséhez vezetett, amelyek közül egyesek invazív laphám-daganatokká alakultak át. Ez volt az első megfigyelés, amely arra utalt, hogy DNS-vírus is okozhat emlősökben daganatot. A HPV-k a papovavírusok csoportjába tartoznak és mintegy 8000 bázis hosszú cirkuláris kétszálú DNS-ből állnak. A teljesen kialakult vírus mintegy 55 nm átmérőjű, capsidja 72 morfológiai egységből (capsomer) áll (21). Mostanáig a HPV több mint 100 alfaja különböztethető meg, ame-

lyek közül a több mint 35 nyálkahártya-típusú vírus fertőzheti meg a szájüreg, gége, nyelöcső és ano-genitalis tractust és nem egyforma gyakorisággal, de carcinomát okozhat. A vírus két onkoproteinje felelős a daganatos transzformációért. Az E6 gén által kódolt fehérje a p53 fehérjét, az E7 fehérje a retinoblastoma tumorszuppresszor fehérjét (pRB) inaktiválja (8, 19). A p53 funkció kiesése a mutációk halmozódását eredményezi a genomban, a pRB hiánya a sejtciklus-szabályozást károsítja és együttes hatásuk a hámsejt daganatos transzformációjához vezet (28). A HPV-fertőzés tehát a fej-nyaki régió laphámrákjai kialakulásának egy másik, de a kémiai karcinogenezissel összemérhető gyakoriságú mechanizmusát jelenti.

A HPV előfordulási gyakorisága a világon mindenütt közel azonos, azonban a ritkább típusok megjelenése a méhnyakrákban geográfiai különbségeket mutat (27). Előzetesen közöltük a különféle HPV-törzsek magyarországi előfordulási gyakoriságát és megoszlását a méhnyak különböző elváltozásaiban (37). Jelenleg azonban még nincsenek hasonló magyar adatok a fej-nyaki régió és nyelöcső daganatos elváltozásaiban előforduló HPV-típusokról. Ebben a tanulmányban 150 beteg szájüregéből, garatjából, gégejéből és nyelöcsővégből származó túlnyomórészt daganatos szövetmintában polimeráz láncreakció (PCR) segítségével vizsgáltuk a HPV különböző típusainak régiónkénti előfordulási gyakoriságát és összefüggését a szövettani képpel.

Vizsgálati anyag és módszerek

Betegek

Az Országos Onkológiai Intézet Molekuláris Pathológiai Osztályán 1998.01.01. és 2001.05.08. között 150 beteg szövetmintáját dolgoztuk fel, ami az Országos Onkológiai Intézetből, a Semmelweis Egyetem Egészségtudományi Kar Sebészeti Tanszék endoscopos laboratóriumából, és a délpesti Jahn Ferenc kórház Fül-Orr-Gégészeti Osztályáról származott. A betegek verrucosus hyperplasia vagy papilloma, illetve carcinoma gyanúja miatt kerültek műtetre. A műtéti anyag régiónként az alábbiak szerint oszlott meg: szájüreg – garat – tonsilla 32, gége 36, nyelöcső 82 minta.

Vizsgálati anyag és szövettani feldolgozás

Minden mintából szövettani és párhuzamosan HPV-PCR vizsgálat történt. A műtéttel eltávolított elváltozás egy részét mélyfagyasztottuk és -70°C -on tároltuk, majd belőle DNS-t izoláltunk. Az anyag másik részét formalinban fixáltuk, paraffinba ágyasztuk és hagyományos H.E.-festett metszeteket készítettünk szövettani vizsgálat céljára. Néha csak formalin-fixált és beágyazott szövet állt rendelkezésre, ilyenkor a DNS-izolálást a megfelelő elváltozást tartalmazó paraffinos anyagból végeztük el. Az elváltozásokat szövettani vizsgálatlal az alábbiak szerint csoportosítottuk:

1. laphámpapilloma,
2. leukoplakia (keratosis hyperplasiával, dysplasia/in situ carcinoma)

1. táblázat.

A HPV-típusok azonosítására használt consensus és törzspecifikus PCR primerek. Az UPF-GP5/MY9A/GMYR/GMZR/HPV713R primerkombinációkkal az alábbi HPV-típusok mutathatók ki: HPV 7, 13, 16, 39, 40, 43, 52, 55, 56, 57, 61, 66, 70, 72, 76, 77

Név	Szekvencia (5'–3')	T _m °C	Fragment- hossz	Specificitás
GP6	TTTGTACTG TGGTAGATAC	54,7	*	Hpv 6,11,13,16,18,31,33,
GP5	GAAAAATAAA CTGTAATCA	52,5	139-145	35,43,45,62,67,72,74
FY1	CCTGATCCTA ATAAGTTTGG	56,2	*	hpv 18,30,40,45,54,
FY2	ATTAAATAAT GGATGACCAC	56,2	141	59,66,70
FY3	CATATCACCA TCCTGTATAG	56,5	366	16,54,61,72,73
MY11A	GCACAAGGTC ATAATAATGG	56,6	*	hpv 16,32,33,35,58,
MY9A	CGTCCCAAAG GAAACTGATC	62,6	449-458	62,64,66,73
MY11B2	GCACAGGGAC ACAACAATGG	61,6	*	hpv 30,35,49,69,75,
GMYR2	ATATTCTCC ACATGCCITTA AA	59,6	168	76,80
GMZF1	CACAGTTGTT TAATAAGCCC TATTGG	63,0	*	hpv 6,18,53,61,70,72,
GMZR1	TAGGCCATAA CGTCAGCAGT TAA	64,8	256-262	74
HPV713F	TGGATACAAA AGGCCAGGG	62,9	*	hpv 7, 13, 40
HPV713R	ATATATGTCA TAACCTCTGC	54,1	242	
OS1	GGACAGCCCT TAGGTGTTGG T	64,6	*	hpv 42, 44, 53, 55
OS2	GTTGGTATTA GTGGGCATCC A	61,0	259	
OS3	TCCACCATAT CACCATCCTC AAT	60,3	274	
NY1	TCTGTGGACT ACAAACAAC	57,1	*	hpv 80,82,83,84,86,87
NY2	AAAAAACATA CAATCGCCAT A	59,0	303	
UPF	CAGGGCCACA ATAATGGCAT	61,5	181	Kombinálható: GP5, 452, 159 MY9A, GMYR, 218, 227 GMZR, HPV713R
HPV611F	GCTGGACAAC ATGCATGGAA	60,2	*	E7, hpv 6, 11
HPV611R	CACATCCACA GCAACAGGTC	60,7	194	
HPV16EFF	GTATATGACT TTGCTTTTCG	57,7	*	hpv 16
HPV16E6R	ATGATCTGCA ACAAGACATA	55,0	304	
HPV18F	CACTTCACTG CAAGACATAG	56,9	*	hpv 18
HPV18R	GATTCAACGG TTTCTGGCAC	62,7	275	
HPV52F	GCAATGTTG GGGCAATCAG	60,4	*	hpv 52
HPV52R	GTCCTCCAAA GATGCAGACG	62,8	281	
HPV58E6F3	AGCGATCTGA GGTATATGAC	58,7	*	hpv 33, 58
HPV58E6R5	CTGTCCAACG ACCCGAATA	63,7	228	
HPV66BF	GGTTTAGGAC CGAAAACGGT A	65,4	*	hpv 66
HPV66BR	ATGTTGCCCC ATACACTGAA	59,7	328	
HPV73F	CCAATTGAGA AGAACGACCA	60,4	*	hpv 73
HPV73R1	GGCAITTTCC GCACCTTAT	62,6	312	
HPV73R2	CGGTTGTTGG TTTCAGGTCT	62,8	496	

*forward primer

3. típusos laphámcarcinoma (jól, közepesen vagy rosszul differenciált és pseudoglandularis),
4. basalioid laphámcarcinoma (basaloid sejtcsoportok perifériás pallidas állású sejtekkel, orsósejtes komponens vagy laphám-irányú differenciációt mutató területek lehetségesek),
5. verrucosus carcinoma.

Polimeráz láncreakció (PCR)

A fixálatlan szövetmintából vagy formalin-fixált paraffinba ágyazott szövetből standard fenol-kloroform módszerrel DNS-t izoláltunk PCR vizsgálatok céljára. A vírusok tipizálására összesen 34-féle PCR primert használtunk, amelyek szekvenciáit az 1. táblázat tartalmazza. Ezek közül 19 consensus primer az L1 génszekvenciának felel meg és egyszerre többféle HPV-törzs kimutatására szolgál. Két primer E7, a többi 13 primer E6 gén-specifikus és az egyes vírustípusok egyedi azonosítására való. A DNS-mintákat rendszerint 5 (néha több) PCR primerpárral vizsgáltuk. Az amplifikáció primerpáronként külön reakciótubusban történt. A HPV-törzsek végső azonosítását tehát a primerek változatos kombinációja teszi lehetővé. A 25 µl reakcióelegy 2,5 µl 10x Sigma Taq DNS-polimeráz puffert (100 mM Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM KCl, 15 mM MgCl₂ és 0,01% zselatin), 200–2000 µM végkoncentrációban dATP-t, dGTP-t, dCTP-t és dTTP-t, 1 egység Sigma Taq DNS-polimeráz enzimet, 10 pmol primert tartalmazott. A hozzáadott templát DNS mennyisége a mintából izolált DNS 4%-a volt. Gondosan vigyáztunk a reakcióelegy kontaminációjának elkerülésére és mindig használtunk negatív és pozitív kontrollokat.

HPV mutációanalízis valós idejű kvantitatív PCR-rel

A HPV 16-nak a típuson belüli változatai közül az európai (E) variáns „real time” PCR technikával vizsgáltuk. Az E-variáns abban különbözik a HPV 16 prototípustól, hogy az E6 génben a 350. bázis (83. kodon) helyen lévő timin (T) guaninnal (G) van felcserélve. Az analízist HPV 16*F és HPV 16*R primerekkel (2. táblázat), hagyományos PCR amplifikációval kezdtük. A PCR program 1 ciklus 97°C 2 perc, 49,3°C 1 perc, 72°C 1,5 perc, 1 ciklus 95°C 50 mp, 49,2°C 1 perc, 72°C 1 perc 20 mp, 35 ciklus 94°C 50 mp, 47°C 55 mp és 72°C 1 perc 10 mp lépéseket tartalmazott, amelyet 72°C-on történő 6 perces végső primer extenzió követett. Az első PCR reakció terméknél végeztük a mutációanalízist 20 µl végtérfogaton, LightCycler (Roche) valós idejű kvantitatív PCR készülékkel. A mutációanalízishez alkalmazott próbák fluoreszcinnel és LC-Red 640-nel voltak jelölve (2. táblázat) és mennyiségük a reakciókeverékben 3 pmol volt. A HPV GTT és HPV GTG próba egymástól mindössze egy bázisban különbözött a táblázatban jelzett helyen, ami megfelel a HPV 16 európai prototípus, illetve variáns vírusok közötti különbségnek. Az analízis 30 mp 95°C kezdeti hőmérsékletre indult, 20°C/mp meredekséggel, majd ugyanekkora meredekséggel érte el a 40°C-ot. Ezen a hőmérsékleten a reakcióelegy 90 mp-ig volt. Az adatgyűjtés a következő lépésben tör-

tént, ekkor a hőmérséklet 0,1°C/mp sebességgel emelkedett 80°C-ig. Az analízist 30 mp-es hűtés követte 40°C-on. Az amplifikált DNS-fragmentumok mennyiségi változását a LightCycler készülék grafikusan jelenítette meg. A LightCycler reakcióval kimutatott minden mutációt ABI Prism 310 Genetic Analyser (Perkin, Elmer) készülékkel végzett DNS-szekvencia-analízissel is ellenőriztük.

Statisztikai analízis

A betegek életkorát, az elváltozások lokalizációját és szövettani típusait, a HPV-pozitivitást vagy -negativitást, illetve a kimutatott HPV-típusokat adatbázisban kódolva tároltuk. BMDP90 statisztikai software programcsomag segítségével (12), a tárolt adatok egymásközi összefüggését és ezek szignifikanciáját a következő módszerekkel vizsgáltuk: az adatok gyakorisági eloszlása (BMDP 2D), „two-way” és „multiway” gyakorisági táblázatok (BMDP 4F), korrelációs matrix (BMDP 3D), többváltozós korrespondencia-analízis.

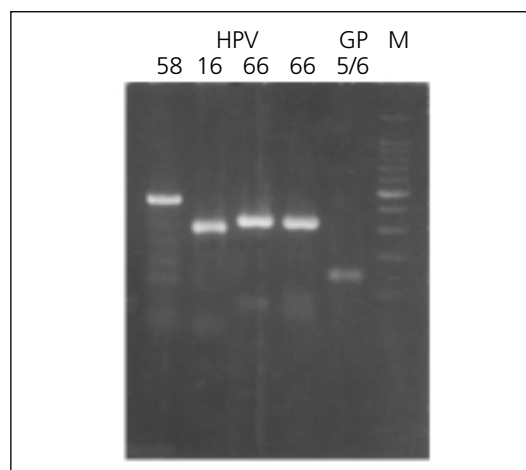
Eredmények

A vizsgált 150 beteg kormegoszlása 21 és 84 év között változott, 98 beteg életkora 41–55 év közé esett. A betegcsoport 120 férfiból és 30 nőből állt (fi:nő = 4:1), a férfiak túlnyomó része erősen dohányzott és alkoholt is fogyasztott, nőknél a nemdohányzók és alkoholt nem fogyasztók voltak többségben. Az 1. ábra a HPV PCR-rel történő azonosítására mutat példát. A szövetmintákban a HPV-pozitivitás aránya régióként a következő volt: szájüreg – garat – tonsilla 50%, gége 36,1%, nyelöcső 39%. Szignifikáns összefüggés van a HPV-típusok előfordulási

2. táblázat.

A HPV 16 prototípus és európai variáns vírusok kimutatására használt „real time” PCR primerek és fluoreszcens jelzősű próbák, amelyek a primerek által amplifikált DNS-fragmentumokhoz kötődnek. Ha a specifikus kötődés megtörtént, közöttük fluoreszcencia rezonancia-energia-transzfer lép fel.

Név	Szekvencia (5'–3')	Jelölés	HPV16 lokalizáció (bázis)	T _m °C
HPV16*F	GAG GTA TAT GAC TTT GCT TTT CG	Nincs	224-246	57,4
HPV16*R	TCT ACG TGT TCT TGA TGA TCT GC	Nincs	521-544	62,2
HPV GTG	TGT TAT AGT GTG TAT GGA ACA ACA TT	Fluoreszcein	339-366	53,2
HPV GTT	TGT TAT AGT GTT TAT GGA ACA ACA TT	Fluoreszcein	339-366	52,7
HPV Sens.	ACA GCA ATA CAA CAA ACC GTT GTG TGA	LC Red640	370-396	62,0



1. ábra. Polimeráz láncreakció gélelektroforézis képe. Etidium-bromid festés. Az első négy csík HPV 58-, HPV 16- és két HPV 66-pozitív mintának felel meg. A GP5/6 consensus primerpárral egyszerre 14 HPV-típus ismerhető fel. Ebben az esetben a pozitív reakciót a HPV 16 jelenléte okozta. Az egyik HPV 66 minta pozitív kontroll. M = fragment-hossz marker.

3. táblázat.

A különféle HPV-típusok lokalizációnkénti előfordulási gyakorisága 61 HPV-pozitív elváltozásban. Pearson χ^2 P-érték = 0,0069

HPV-típusok	Előfordulási gyakoriság (%)		
	Szájüreg	Gége	Nyelőcső
6/11	12,5	15,4	-
16	18,8	38,5	46,9
68, 70, 72	12,5	15,4	6,2
73	12,5	23,0	40,6
Különféle egyéb	43,7	7,7	6,3

4. táblázat. Az összes vizsgált elváltozásban a HPV-típusok előfordulási gyakorisága. A basalooid és verrucosus laphámcarcinomák szignifikánsan összefüggnek HPV-fertőzéssel, az elszarusodó laphámrákok túlnyomó része HPV-negatív. Pearson χ^2 P-érték = 0,0000

HPV-típusok	Leukoplakia	Papilloma	Elszarosodó laphámrák	Basalooid laphámrák	Verrucosus carcinoma	Összesen
Negatív	9	14	62	4	-	89
6	-	2	-	-	1	3
11	-	1	-	-	-	1
16	1	5	8	8	1	23
35	-	1	-	-	-	1
45	-	-	-	1	-	1
54	-	-	-	-	1	1
58	-	1	-	-	-	1
61	-	-	1	-	-	1
66	-	-	1	-	-	1
68	1	-	-	1	-	2
70	-	-	-	1	2	3
72	-	-	-	-	1	1
73	2	2	4	5	5	18
Ismeretlen	-	-	-	2	2	4
Összesen	13	26	76	22	13	150

5. táblázat. A lényeges elváltozások nemek közötti eloszlása. A HPV-vel összefüggő elváltozások a nőknél, a külső karcinogénekkal (alkohol, dohányzás) összefüggő elszarusodó laphámrák a férfiaknál fordul elő sokkal gyakrabban. P = 0,001

Elváltozások	Férfiak (120)		Nők (30)	
	No.	%	No.	%
Papilloma	11	9,2	8	26,7
Basalooid + verrucosus ca.	24	20,0	16	53,3
Elszarosodó laphámrák	85	70,8	6	20

gyakorisága és lokalizáció, valamint az elváltozások szövettani szerkezete között. A szájüregben a legkülönbözőbb muco-cutan HPV-típusok találhatóak meg, a gégében és a nyelőcsőben főleg a HPV 16- és a HPV 73-fertőzés dominál (3. táblázat). Elváltozásonként és vírustípusonként a HPV előfordulási gyakoriságát a 4. táblázat mutatja. A típusos elszarusodó laphámrák 18,4%-a, a hyperplasiák és dysplasiák

30,8%-a, a papillomák 46,2%-a, a basalooid laphámrák 81,8%-a, a verrucosus carcinomák 100%-a HPV-pozitívnak bizonyult. A HPV 16 a basalooid laphámrákban 36,4%-ban, a papillomában 19,2%-ban, elszarusodó laphámrákban 10,5%-ban, dysplasiában és verrucosus carcinomában 7,7-7,7%-ban volt megtalálható. Az egyes elváltozások jelentősen eltérő arányban oszlottak meg a nemek között. A HPV-vel összefüggő elváltozások nőknél sokkal magasabb arányban fordultak elő, férfiaknál pedig a döntően HPV-negatív elszarusodó laphámrák volt a gyakoribb (5. táblázat).

Eddig azt mutattuk be, hogy milyen szövettani elváltozás társul vírustípustól függetlenül a HPV jelenlétéhez. A továbbiakban a fej-nyaki régió és a nyelőcső carcinomái és az egyes HPV-típusok összefüggését tanulmányoztuk korrespondencia-analízis segítségével (2. ábra). Ez a módszer az ún. felderítő többváltozós statisztikák közé tartozik, amely a gyakorisági eloszlást olyan grafikus ábrába konvertálja, amelyben a táblázat sorai és oszlopai pontokként szerepelnek. A technika lényege, hogy az eredmény kétdimenziós síkban ábrázolódik úgy, hogy az egymással kapcsolatban lévő változók (ebben az esetben a carcinomák szövettani szerkezete és a megfelelő HPV-típusok) egymás közelébe kerülnek, és minél közelebb vannak egymáshoz az Lx és Ly koordináták által határolt síkon, annál szorosabb közöttük az összefüggés. A 2. ábrán jól látható, hogy a típusos laphámrákok döntően HPV-negatívak, a basalooid laphámrákban főleg HPV 16, a verrucosus carcinomákban elsősorban HPV 70, 72 és 73, ritkábban egyéb HPV-típusok fordulnak elő. Az eredmény erősen szignifikáns, P = 0,000.

Érdekes további két megfigyelést kiemelni: (a) Általánosan elfogadott, hogy bármilyen lokalizációjú papilloma HPV-eredetű, és alacsony rizikójú vírusok, mint a HPV 6, 11, 13, 32, 34, 40, 41, 42, 44, 53, 54, 55, 63 okozzák. Mi azt találtuk, hogy a papillomák több mint felében HPV nem volt kimutatható, a HPV-pozitív papillomák háromnegyed részében pedig magas rizikójú vírusok, elsősorban HPV 16, továbbá HPV 35 és 58 volt megtalálható. (b) Az is általános nézet, hogy az alacsony rizikójú HPV-k általában jóindulatú folyamatokból mutatathatók ki, tehát nem okoznak malignus transzformációt. Anyagunkban négy alacsony rizikójú HPV közül három valóban papillomában fordult elő, viszont egy további HPV 6-szekvencia verrucosus carcinomában jelent meg (4. táblázat).

A HPV-nek nemcsak típusok közötti, hanem típuson belüli változatai is vannak. Ismereteink szerint ezek jelenlétét a fej-nyaki régió és nyelőcső tumoraiban még nem vizsgálták. Mi a HPV 16 Európában gyakori szekvenciavariánsát kerestük kvantitatív PCR és olvadáspont-analízis módszerrel LightCycler (Roche) készülékkel. Összesen 8 HPV 16-pozitív mintát analizáltunk, ebből két esetben sikerült HPV 16 E6 L83V szekvenciavariánsot kimutatni (3. ábra).

Diszkusszió

A HPV-fertőzés epidemiológiájának vizsgálata e vírusoknak a méhnyakdaganatok kialakulásában ját

szott etiológiai szerepére szolgáltatott bizonyítékokat (33). Az említett vizsgálatok azt is igazolták, hogy a cervicális régió elváltozásai vonatkozásában a HPV a leggyakoribb szexuális úton fertőző ágens (2). Ezzel szemben McKaig és mtsai (29) összefoglaló tanulmányukban áttekintették az irodalmi adatokat és azokban nem találtak bizonyítékot arra, hogy a szájüreg, gége vagy nyelőcső HPV-fertőzése összefüggene az érintettek szexuális szokásaival. Más szóval, a méhnyak HPV-fertőzése nem hajlamosít orális HPV-fertőzésre. Ezekkel az adatokkal némileg ellentmondó újabb megfigyelést is közöltek (13), azonban a fertőzés kialakulásának mechanizmusa a fej-nyaki régióban és a nyelősőben továbbra sem tisztázott.

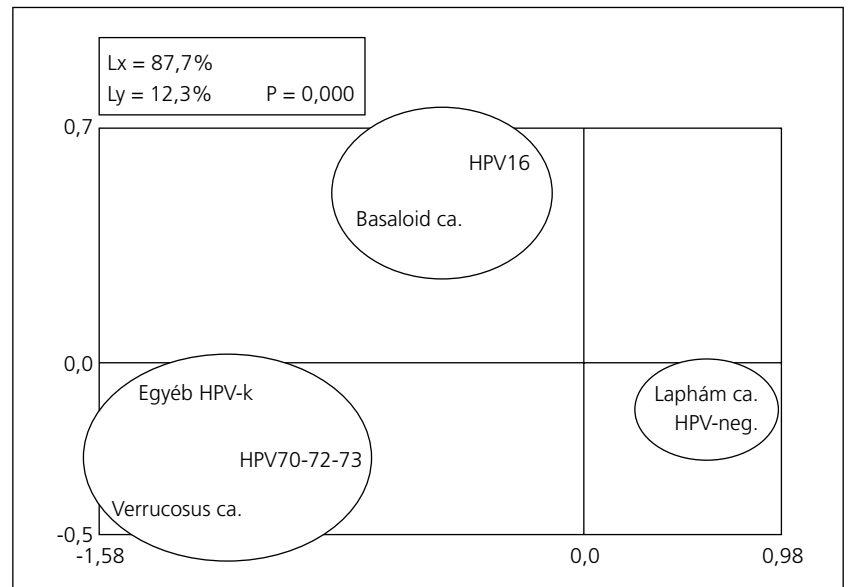
A papillomavírusokat alacsony és magas rizikójú csoportba lehet osztani. Funkcionális különbség a két víruscsoport között abban áll, hogy az alacsony rizikójú HPV-típusok rendszerint jóindulatú elváltozásokkal, a magas rizikójú típusok pedig malignus folyamatokkal függenek össze. Papillomákban és rák megelőző állapotokban a HPV DNS cirkuláris (episomális) formában, míg malignus tumorokban a genomba integrált formában van jelen (1, 10). HPV 6 vagy HPV 11 malignus tumorban ritkán található, azonban közölték e vírusok előfordulását vulvarákban (32), méhnyakrákban (15), malignus gégepapillómában (45), Buschke-Löwenstein tumorban (3). Ehhez a szériához csatlakozik saját megfigyelésünk a HPV 6 DNS jelenlétéről verrucosus gégerákban. Egy alacsony rizikójú HPV okozta malignus transzformáció úgy képzelhető el, hogy a vírus kivételesen linearizálódott majd a genomba integrálódott, és ekkor már úgy hat, mint egy magas rizikójú onkogén vírusfertőzés (20, 25).

A HPV-pozitív laphámpapillomák háromnegyed részében magas rizikójú HPV-fertőzést találtak és mindössze egynegyed részében volt alacsony rizikójú HPV-szekvencia kimutatható. Lényegében hasonló összetételű víruselőfordulást ilyen elváltozásokban mások is megfigyeltek (29, 39). Az a kérdés, hogy a magas rizikójú onkogén vírusok a papillomákban miért nem okoznak malignus transzformációt? Előzetes vizsgálatunkban (38) kimutattuk, hogy ezekben az elváltozásokban a magas rizikójú vírusok is episomális formában fordulnak elő, ezért kezdetben kiváltják ugyan a sejtproliferációt, de a folyamat később leáll, sőt egy idő után az elváltozás spontán vírusmentessé válhat (37). Mindez egybevág azzal a jelenlegi megfigyelésünkkel is, hogy a papillomák több mint 50%-a HPV-negatív.

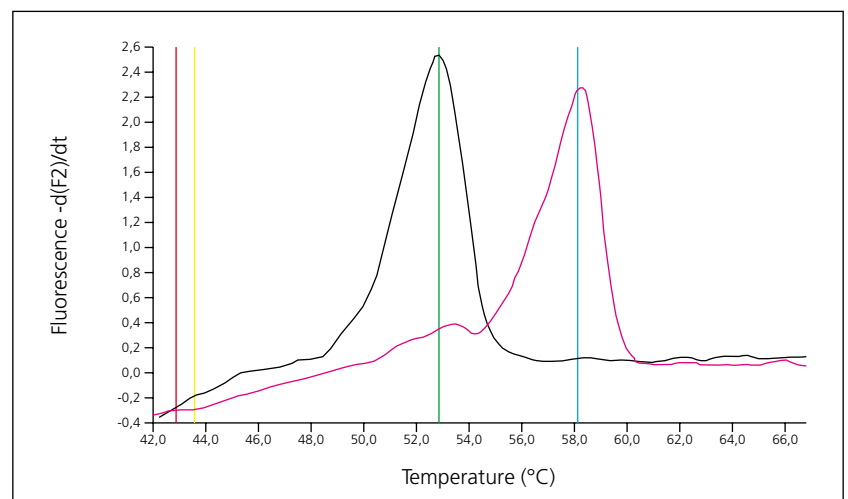
Általánosan elismert tény, hogy a fej-nyaki régió és a nyelőcső laphámrákjai kialakulásának egyik fontos etiológiai tényezője a dohányzás és alkoholfogyasztás (26). Egyre több bizonyíték gyűlik össze arra is, hogy ebben a régióban is bizonyos daganatok kialakulásáért a HPV a felelős (1, 14, 24). A szájüregi daganatok több mint 50%-a HPV-pozitív tumor, a gégeben és nyelősőben ez az arány valamivel kisebb (1, 23, 29, 35, 43). Saját adataink a fent említett irodalmi adatokhoz nagyon hasonlóan, nálunk a szájüregben a HPV-pozitív elváltozások aránya 50%, a gégeben és nyelősőben 36% illetve 39% volt. Több közleményben is vizsgálták az

összefüggést a dohányzás és alkoholfogyasztás, valamint a HPV-fertőzés között. Gillison és mtsai (14) 253 fej-nyaki tumoros beteget magába foglaló anyagukban, Lindel és mtsai (24) 139 hasonló daganatos beteg vizsgálata során a nemdohányzók között találtak szignifikánsan nagyobb számú HPV-pozitív carcinomát. Továbbá Lindel és mtsai (24), valamint Mellin és mtsai (30) a HPV-pozitív tumorokat jelentősen nagyobb számban találták meg nőkben. Ezekkel az adatokkal saját megfigyeléseink nagyon erősen összevág, mert mi is szignifikánsan magasabb arányban láttunk HPV-pozitív daganatokat nőkben és HPV-negatív tumorokat dohányzó és alkoholt fogyasztó férfiakban (5. táblázat). Mellin és mtsai (30) azt találták, hogy a tonsilla HPV-pozitív carcinomái a hasonló szövettani szerkezetű HPV-negatív tumoroknál sokkal jobb prognózisúak. A tonsillarákos betegek műtét helyett vagy a poszt-

2. ábra. Korrespondencia-analízis a fej-nyaki régió- és nyelőcsőrakok szövettani szerkezte és a benne található HPV-törzsek közötti biológiai összefüggés kimutatására. Hatvanegy HPV-pozitív tumorszövet. A rajzon bekarikázott elváltozások és vírusok között szignifikáns oki kapcsolat mutatható ki.



3. ábra. HPV 16 E6 L83V szekvenciavariáns kimutatása 74 éves férfibeteg rosszul differenciált nyelőcső-laphámrákjában. LightCycler analízis. Az ábrán a specifikus GTG és GTT próbák leolvadási hőmérséklete látszik az előzőleg PCR-rel amplifikált DNS-mintáról. A GTG próba (2. táblázat) 58,12°C-on válik le a termékről, míg a GTT próba már 52,83°C-on leválik. Ez azt jelenti, hogy a vizsgált HPV 16 E6 gén 350. bázisa timin helyett guanint tartalmaz, vagyis mutáns. A GTT próba 1 bázisnyi hibás illeszkedése 5°C-kal csökkentette az olvadási hőmérsékletet.



operatív kezelés részeként rendszerint sugárkezelésben részesülnek. A HPV-pozitív tumorokon észlelt jó terápiás sugárhatás feltehetően az ilyen tumorok fokozott sugárérzékenységével magyarázható. Lindelnek és munkatársainak (24) sikerült bebizonyítani, hogy a fej-nyaki régió minden HPV-pozitív tumora egyformán fokozottan sugárérzékeny. Az idézett szerzők ezt a jelenséget a p53 gén épségével hozták összefüggésbe. Másokkal együtt (14) azt figyelték meg, hogy a HPV-pozitív tumoroknál a p53 fehérje rendszerint nem ad a sejtmagban pozitív immunhisztokémiai reakciót, ami a p53 gén szomatikus mutációja ellen szól. Annál gyakoribb a pozitív p53-immunreaktivitás HPV-negatív tumorokban. Ezzel egyezően saját korábbi vizsgálatainkban mi is 80%-os gyakoriságú immunhisztokémiai p53-pozitivitást találtunk a fej-nyaki régió olyan szövettani csoportba tartozó laphámcarcinomáiban, amelyeket most jellemzően a HPV-negatív tumorok közé sorolunk (nem közölt megfigyelés).

A HPV E6 fehérje által kiváltott vad típusú p53 fehérje degradációja funkcionálisan nem egyenértékű a szomatikus p53 génmutáció okozta funkcióvesztéssel, amely utóbbira egyébként a pozitív p53 immunhisztokémiai reakció utal (5, 18). A HPV-pozitív tumorok nyilvánvalóan jelentős mennyiségű ép és funkcionáló p53 fehérjét termelnek, és ezzel fokozzák a sejtek sugárhatás által indukált apoptózisát (4, 11).

A HPV-negatív és -pozitív szájüregi, gége- és nyelöcsőrakok a szövettani képpel szignifikáns összefüggést mutattak (4. táblázat). A HPV-negatív tumorok túlnyomórészt típusos laphámrákok, a HPV-pozitív tumorok basalooid vagy verrucosus carcinomák voltak. A basalooid laphámrákokban legtöbbször a magas rizikójú HPV 16-ot mutattuk ki, verrucosus carcinomákban kevésbé kifejezett transzformáló képességű vírusokat találtunk, amelyek közül leggyakrabban a HPV 73 fordult elő, ami kifejezett filogenetikai rokonságot mutat az alacsony rizikójú HPV 34-gyel és HPV 64-gyel. Ezt a vírust először Chan és mtsai (7) 1995-ben írták le, majd West és mtsai (40) 1996-ban a nyelöcső in situ laphámrákjában is megtalálták.

A fej-nyaki régióban és nyelöcsőben általunk észlelt halmozott HPV 73-előfordulás a méhnyak HPV-pozitív elváltozásaira egyáltalán nem jellemző (37). Vírustípustól függetlenül a basalooid és verrucosus carcinomák összefüggését a HPV-fertőzéssel mind a fej-nyaki régióban, mind más lokalizációban (anus, penis, vulva) korábban mások is leírták (9, 14, 22, 41, 42).

A HPV genom szekvenciaváltozatait az 5, 6, 8, 11, 16, 18 és 45-ös típusokon tanulmányozták és azt találták, hogy az egymásközi eltérés legfeljebb 2% a fehérjekódoló és 5% a nem kódoló szakaszokon. Azt is kiszámították, hogy kb. 1% szekvenciaeltérés 100 000 év alatt alakul ki. A változások ilyen mértéke sokkal lassúbb, mint az RNS-vírusoké, vagyis a HPV DNS nagyon stabil (6, 31). A HPV ezen állandósága teszi lehetővé a jellegzetes szekvenciavariánsok hosszú idejű létezését. A típusokon belüli variánsok egy meghatározott génszakasz, rendszerint az E6 gén szekvenciaváltozataival jellemez-

hetők. Legjobban ismertek a HPV 16 szekvenciaváltozatai, amelyek földrészenként egymástól eltérnek. Így megkülönböztetünk európai (E), ázsiai (As), ázsiai amerikai (AA), afrikai-1 (Af1) és afrikai-2 (Af2) változatokat (44). Az Af1 és Af2 változatot afrikai eredetű méhnyakrákokból izolálták, az As változat Északkelet-Ázsiában gyakori. Az AA változat Közép- és Dél-Amerikában valamint Spanyolországban található, ahova feltehetően a konkvisztádorok hozták be Amerikából. Az E-változat Európán kívül Észak-Amerikában fordul elő és abban különbözik a HPV 16 prototípustól, hogy az E6 génben a 350. bázis (83. codon) helyen lévő timin (T) guaninnal (G) van felcserélve és ez a kódolt fehérjében leucin-valin cserét okoz. Ez az aminosavcsere megváltoztatja az E6 fehérje biológiai tulajdonságát, mert gátolja a laphámsejt differenciációját, még kifejezettebb p53 fehérjedegradációt okoz, és ezáltal fokozza a HPV 16 amúgy is meglévő malignus transzformációt kiváltó képességét (36, 46). A HPV 16 variáns vírus biológiai hatása fej-nyaki és nyelöcsőtumorokban nem tisztázott. Saját anyagunkban mindkét HPV 16 variánst nyelöcsőrakban találtuk meg. Előfordulási gyakoriságuk – kisszámú összehasonlító adataink szerint – ebben a régióban nem különbözik a méhnyakelváltozásokban általunk észlelt, illetve az észak-amerikai populációban korábban leírt előfordulási gyakoriságtól (37, 44), ezért feltehető, hogy biológiai hatásuk sem különböző. Az ilyen típusú vírusfertőzések természetének még jobb megértéséhez azonban további vizsgálatok szükségesek.

A szájüregi, gége- és nyelöcsőelváltozásokból történő HPV-kimutatás és -típezés segítheti a patológiai diagnózist, a második primer tumor megkülönböztetését az áttétől, segít megérteni a daganatok egy jól meghatározott csoportjának kialakulását és elősegíti terápiájuk legkedvezőbb megválasztását, végül prognosztikai jelentőséggel bír.

Köszönetnyilvánítás

Megköszönjük munkatársainknak, Budai Jenőné, Schád Béláné, Takács Józsefné és Veleczki Jánosné szakasszisztenseknek a cytologiai és szövettani vizsgálatokban, a polimeráz láncreakció kivitelezésében és az adatbázisok elkészítésében nyújtott nélkülözhetetlen technikai segítségüket. Köszönjük Horváth-Gaudi Istvánnak a magas szintű statisztikai analízist.

Irodalom

1. Badaracco G, Venuti A, Morello R, et al. Human papillomavirus in head and neck carcinomas: prevalence, physical status and relationship with clinical/ pathological parameters. *Anticancer Res* 20:1301-1306, 2000
2. Barasso R, De Brux J, Croissant O, Orth G. High prevalence of papillomavirus-associated penile intraepithelial neoplasia in sexual partners of women with cervical intraepithelial neoplasia. *N Eng J Med* 317:916-923, 1987
3. Boshart M, zur Hausen H. Human papillomavirus in Buschke-Löwenstein tumors: physical state of the DANN and identification of a tandem duplication in the non-coding region of a HPV 6 subtype. *J Virol* 58:963-966, 1986
4. Bristow RG, Benchimol S, Hill RP. The p53 gene as a modifier of intrinsic radiosensitivity: implications of radiotherapy. *Radiother Oncol* 40:197-223, 1996

5. Butz K, Whitaker N, Denk C, et al. Induction of the p53-target gene GADD45 in HPV positive cancer cells. *Oncogene* 18:2381-2386, 1999
6. Campione-Piccardo J, Montpetit ML, Gregoire L, Arella M. A highly conserved nucleotide string shared by all genomes of human papillomaviruses. *Virus Genes* 5:349-357, 1991
7. Chan SY, Delius H, Halpern AL, Bernard HU. Analysis of genomic sequences of 95 papillomavirus type: uniting typing, phylogeny, and taxonomy. *J Virol* 69:3074-3083, 1995
8. Crook T, Tidy JA, Vousden KH. Degradation of p53 can be targeted by HPV E6 sequences distinct from those required for p53 binding and trans-activation. *Cell* 67:547-556, 1991
9. Cubilla AL, Reuter VE, Gregoire L, et al. Basaloid squamous cell carcinoma: a distinctive human papilloma virus-related penile neoplasm. A report of 20 cases. *Am J Surg Pathol* 22:155-761, 1998
10. Cullen AP, Reid R, Campion M, Lőrincz A. Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNA in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. *J Virol* 65:606-612, 1991
11. Dahm-Daphi J. p53: biology and role for cellular radiosensitivity. *Stahlenther Oncol* 176:278-285, 2000
12. Dixon W J (editor). *BMDP Statistical Software, Inc. Release 7*, University of California Press, Berkeley, Los Angeles, Oxford, 1992
13. Gillison M, Koch WM, Shah KV. Human papillomavirus and head and neck squamous cell carcinoma: are some head and neck cancers sexually transmitted disease? *Curr Opin Oncol* 11:191-199, 1999
14. Gillison ML, Koch WM, Capone RB, et al. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* 92:709-720, 2000
15. Gissmann L, Wolnik L, Ikenberg H, et al. Human papillomavirus type 6 and 11 sequences in genital and laryngeal papillomas and some cervical cancer biopsies. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:560-563, 1983
16. Franceschi S, Talamini R, Barra S, et al. Smoking and drinking in relation to cancers of the oral cavity, pharynx, larynx, and esophagus in northern Italy. *Cancer Res* 50:6502-6507, 1990
17. Franceschi S, Munoz N, Bosch XF, et al. Human papillomavirus and cancers of the upper aero-digestive tract: a review of epidemiological and experimental evidence. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 5:567-575, 1996
18. Huang H, Li CY, Little JB. Abrogation of p53 function by transfection of HPV 16 E6 gene does not enhance resistance of human tumour cells to ionizing radiation. *Int J Rad Biol* 70:151-160, 1996
19. Jones DL, Munger K. Analysis of the p53 mediated G1 growth arrest pathway in cell expressing the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *J Virol* 71:2905-2912, 1997
20. Kahn T, Turazza E, Ojeda R, et al. Integration of human papillomavirus type 6a DNA in a tonsillar carcinoma: Chromosomal localization and nucleotide sequence of the genomic target region. *Cancer Res* 54:1305-1312, 1994
21. Kirnbauer R, Taube J, Greenstone H, et al. Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles. *J Virol* 67:6923-6936, 1993
22. Kurman RJ, Toki T, Schiffman M. Basaloid and warty carcinomas of the vulva. Distinctive types of squamous cell carcinoma frequently associated with human papillomavirus. *J Surg Pathol* 17:133-145, 1993
23. Lavergne D, de Villiers EM. Papillomavirus in esophageal papillomas and carcinomas. *Int J Cancer* 80:681-684, 1999
24. Lindel K, Beer KT, Laissue J, et al. Human papillomavirus positive squamous cell carcinoma of the oropharynx. A radiosensitive subgroup of head and neck carcinoma. *Cancer* 92:805-813, 2001
25. Manias D, Ostrow R, McGlennen R, et al. Characterization of integrated human papillomavirus type 11 DNA in primary and metastatic tumors from a renal transplant recipient. *Cancer Res* 49:2514-2519, 1989
26. Mashberg A, Boffetta P, Winkelmann R, Garfinkel L. Tobacco smoking, alcohol drinking, and cancer of oral cavity and oropharynx among U.S. veterans. *Cancer* 72:1369-1375, 1993
27. Matsukura T, Sugase M. Identification of genital human papillomaviruses in cervical biopsy specimens: segregation of specific virus types in specific clinicopathologic lesions. *Int J Cancer* 61:13-22, 1995
28. McDougall JK. Immortalization and transformation of human cells by human papillomavirus. *Curr Top Microbiol Immunol* 186:101-119, 1994
29. McKaig RG, Baric RS, Olshan A. Human papillomavirus and head and neck cancers: Epidemiology and molecular biology. *Head Neck* 20:250-265, 1998
30. Mellin H, Friesland S, Lewenshon R, et al. Human papillomavirus (HPV) DNA in tonsillar cancer: clinical correlates, risk of relapse, and survival. *Int J Cancer* 89:300-304, 2000
31. Pfister H, Fuchs PG. Anatomy, taxonomy and evolution of papillomaviruses. (Review.) *Intervirolgy* 37:143-149, 1994
32. Rando R, Groff D, Chirikjian J, Lancaster W. Isolation and characterization of novel human papillomavirus type 6 DNA from an invasive vulvar carcinoma. *J Virol* 57:353-356, 1986
33. Schiffman MH. Recent progress in defining the epidemiology of human papillomavirus infection and cervical neoplasia. (Review.) *J Natl Cancer Inst* 84:394-398, 1992
34. Shope RE, Hurst EW. Infectious papillomatosis of rabbits. *J Exp Med* 58:607-623, 1933
35. Snijders PJF, Scholes AGM, Hart A, et al. Prevalence of mucosotropic human papillomaviruses in squamous-cell carcinomas of the head and neck. *Int J Cancer* 64:464-469, 1996
36. Stöppler MC, Ching K, Stöppler H, et al. Natural variants of the human papillomavirus type 16 E6 protein differ in their abilities to alter keratinocyte differentiation and to induce p53 degradation. *J Virol* 70:6987-6993, 1996
37. Szentirmay Z, Cseh J, Pulay T, Kásler M. Humán papillomavirus és méhnyakrák: A tumoros folyamat kialakulásának genetikai háttere. *Orv Hetil* 142:1429-1436, 2001
38. Szentirmay Z, Szántó I, Melegh Zs, et al. Identification of human papillomaviruses (HPVs) in oral, pharyngeal, and esophageal papillomas and carcinomas. XXIII International Congress of the International Academy of Pathology and 14th World Congress of Academic and Environmental Pathology. October 15-20, 2000, Nagoya. *Abstr.: Pathol. Internat., 50: Suppl., 2000, FP-26-9.*
39. Völter C, He Y, Delius H, et al. Novel HPV types present in oral papillomatous lesions from patients with HIV infection. *Int J Cancer* 66:453-456, 1996
40. West AB, Soloway GN, Lizarraga G, et al. Type 73 human papillomavirus in esophageal squamous cell carcinoma. A novel association. *Cancer* 77:2440-2444, 1996
41. Wilczynski SP, Lin BTY, Xie Y, Paz B. Detection of human papillomavirus DNA and oncoprotein overexpression are associated with distinct morphological patterns of tonsillar squamous cell carcinoma. *Am J Pathol* 152:145-156, 1998
42. Williams G R, Lu Q L, Love S B, et al. Properties of HPV positive and HPV negative anal carcinomas. *J Pathol* 180:378-382, 1996
43. Woo YJ, Yoon HK. In situ hybridization study on human papillomavirus DNA expression in benign and malignant squamous lesions of the esophagus. *J Korean Med Sci* 11:467-473, 1996
44. Yamada T, Manos MM, Peto J, et al. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancer: A worldwide perspective. *J Virol* 71:2463-2472, 1997
45. Zarod AP, Rutherford JD, Corbitt G. Malignant progression of laryngeal papilloma associated with human papillomavirus type 6 (HPV-6) DNA. *J Clin Pathol* 41:280-283, 1988
46. Zhebe I, Wilander E. Human papillomavirus infection and invasive cervical neoplasia: A study of prevalence and morphology. *J Pathol* 181:270-275, 1997