



A humán papillómavírus fertőzés, mint lehetséges etiológiai tényező fej-nyaki laphámcarcinomában

Koffol Tamás¹, Chira Liliana², Mocan Simona³, Horváth Emőke²

¹Marosvásárhelyi Orvosi és Gyógyszerészeti Egyetem, egyetemi hallgató, ²Patológia Tanszék

³Patológia Laboratórium, Maros Megyei Sürgősségi Kórház

Infecția HPV, posibil factor etiologic al carcinoamelor scuamoase cap-gât

În etiopatogeneza carcinoamelor scuamoase ale cavității orale, pe lângă fumat și consumul excesiv de alcool, infecția cu HPV (human papiloma virus) este considerată factor etiologic, în 90% a cazurilor fiind implicat HPV16. Pornind de la aceste datele din literatura de specialitate am cercetat posibile mecanisme de inactivare a genelor prelucrând 17 cazuri de carcinom scuamos al capului și gâtului, în vederea determinării rolului etiologic al virusului în apariția carcinomului. Cele 17 carcinoame provenite de la pacienți de vârstă medie (sub 60 ani) au fost împărțite în funcție de localizare și imunofenotip tumoral în trei categorii: p16+/Ki67+/p53-, p16+/Ki67-/p53+, respectiv p16-/Ki67-/p53+ după determinarea imunofenotipului tumoral cu metode imunohistochimice. Prezența sau absența ADN-HPV în cazul genotipurilor HPV-16, HPV-18 și HPV-33 am examinat prin reacția în lanță a polimerazei (PCR). Asocierea diferitelor genotipuri de ADN-HPV cu imunofenotipul celulelor tumorale, arată o corelație între inactivarea proteinei p16 și infecția HPV, dar în cazul fenotipului p16+/Ki67+/p53- absența ADN-lui viral, respectiv prezența lui în cazul fenotipului p16-/Ki67-/p53+ arată, că trebuie luate în considerare și restul genotipurilor cu risc înalt în carcinogeneză, respectiv combinarea celor două etiologii.

Cuvinte cheie: carcinomul scuamos cap-gât, virusul HPV, proteinul p16

A fej-nyak rák 6. leggyakoribb ráktípus világszerte [11], 2008-ban kb. 635 ezer új esetet regisztráltak és megközelítőleg 350 ezer halálesetet okozott ez a rák típus [8].

Horváth Emőke

540394 Marosvásárhely-Târgu-Mureș

Bogatei utca 14.

E-mail: horvath_emoke@yahoo.com

The Human Papiloma Virus infection, As a possible etiological factor in head and neck squamous cell carcinoma

Besides chronic alcoholism and smoking, the oral Human Papiloma Virus (HPV) infection is an etiological factor in oral squamous cell carcinoma, and is related to the oncologically high-risk HPV16 in 90% of the cases. Based on current literature data, we investigated the gene inactivation mechanisms of the two possible etiological factors in 17 head and neck carcinoma cases, looking for the degree to which the oral HPV infection is a predictive factor of head and neck squamous cell carcinomas. We investigated 17 cases of squamous cell carcinoma in young and middle aged patients, namely the expression of the p16, p53 and Ki-67 proteins with the immunohistochemical method, as well as the presence of HPV-DNA in the cases of HPV-16, HPV-18 and HPV-33 genotypes with Polymerase Chain Reaction method (PCR). Comparing the immunofenotypes of the tumor cells with the presence of HPV-DNA, we found, that the 3 HPV positive tumors don't always follow the p16 route of inactivation: along with the p16+/Ki67+/p53- phenotype, which would suggest a viral etiology, the p16+/Ki67-/p53- phenotype is also present in the case of the HPV-16 genotype, at the same time the HPV-33 genotype characterises the p16-/Ki67-/p53+ phenotype. The viral etiology of the tumor can be regarded as a prognostic factor only when the mechanisms of cancerogenesis are precisely mapped, it can not be regarded as having a predictive value on its own.

Keywords: head and neck squamous cell carcinoma, HPV virus, p16 protein

A magas morbiditási arány, és az 50% feletti mortalitás a többi rosszindulatú daganathoz statisztikát eredményez, 2008-ban Európában több mint 91 ezer új esetet és 41 ezer halálesetet okozva [10].

2007-ben végzett Francia felmérés szerint a fej-nyak daganatok 95%-a laphám carcinoma [22]. Rizikótényezőit az irodalom 3 fő csoportba sorolja, melyek lehetnek környezeti tényezők, genetikai fogékonyság, valamint az

életstílushoz kötöttek (alkohol, dohányzás). A fej-nyak daganatok kialakulásában a túlzott alkohol fogyasztásnak és dohányzásnak etiológiai szerepe van, ezért az életstílus klasszikus rizikótényezőnek tekinthető.

A dohányzás jelentős háttérbe szorulása ellenére 1973-2001 között AEÁ-ban ill. Skandináv országokban készült felmérés szerint 2,1-3,9%-os növekedés/év mutatható ki a száj-garat laphámrákokban, a hipofajinx- és larynx-rák növekedési frekvenciához viszonyítva [9, 19].

A változó életstílust figyelembe véve, bebizonyosodott a magas rizikójú HPV vírus onkogén szerepe a cervix carcinomákban. Ugyanakkor a HPV vírus onkogén szerepe a fej-nyak laphámrák kialakulásában is felmerült.

HPV vírus epiteliotropikus, nem kapszulált, kettős szálú DNS vírus [2]. Több mint 100 genotípusa van, melyből kb. 15 típus összefüggésbe hozható az anogenitális és felső légúti traktus prekancerózis és cancerózis nyálkahártya lézióival (HPV 16, 18 és 31). 8-kb (8000 bp) genom kódolja a vírus proteinekét, melyből 3 onkoprotein (E5, E6, E7) és 2 kapszid protein (L1, L2) [18].

HPV vírus carcinogenesisének a mechanizmusa azzal magyarázható, hogy a gazdasejt DNS-be integrálódott HPV vírus E6 és E7 onkoproteinekét expresszálva felborítva a sejtciklus regulációs mechanizmusait, DNS károsodást és kontrollálatlan sejtosztódást idéz elő, ami daganatos sejtburjánzáshoz vezet.

A genetikai állományának a károsodása esetén a CDK-inhibitorok (CDKN2A gén által kódolt p16INK4a protein) leállítják a sejtciklust, és a p53 központi jelentőségű tumorsuppresszor protein segítségével a hiba kijavításra kerül, vagy a p53 pro-apoptotikus gének indukciójával apoptózist idéz elő.

A TP53 17p12 tumorsuppresszor gén p53 fehérjét expresszálva tumorsuppresszor szerepet játszik a fej-nyak carcinomákban. A fej-nyak carcinomák fele mutáns TP53 gént tartalmaz [1, 3, 17, 20], illetve ez a leggyakoribb génmutáció fej nyak carcinomákban [15]. A TP53 mutációt szenvedett sejt nem válaszol a sejtciklust felfüggesztő szignálokra, apoptózisra. A p53 mutáció ellenőrizetlen sejtosztódáshoz, genetikai instabilitáshoz és a sejt tumoros elfajulásához vezet. A TP53 károsodás mutáció, deléción, inaktivációs mechanizmusok révén jöhet létre. TP53 mutációval rendelkező daganatok legnagyobb része terápia rezisztens [7, 12, 21]. A HPV vírus E6 onkoprotein, a p53 tumorsuppresszor protein inaktiválásán keresztül fejti ki onkogén hatását. Fej-nyak daganatokban talált gén káro-

sodások gyakorisága az esetek nagy százalékában a p53, valamint a p16 túlexpresszióval áll összefüggésben [1].

A p53 specifikus immunfestés eredményeként a sejtek 0 vagy 60-100%-a pozitív expressziót mutat, akkor átlagosan 94% ($P < 0.001$) a TP53 gén mutációs rátája. [23]. Az alacsony (10-50%-os) expressziós szintet nem lehet a TP53 vad típus markereként értelmezni [23].

Összegezve tehát 10-50%-os p53 immunoexpresszió nem utal TP53 gén mutációra, valamint 60% feletti p53 immunoexpresszió a TP53 gén károsodására utal. HPV negatív daganatok esetén a p53 protein esetleges inaktivációja nem vírus eredetű, más mechanizmusok játszanak szerepet benne, de a p53 overexpresszió (>60%) ebben az esetben is a TP 53 gén mutációjára utal.

A fej-nyak carcinomákban leggyakrabban a HPV-16, 18 és 33 típusok mutathatók ki, míg a HPV+ szájgarat carcinomák 90%-ában a HPV-16 az oki tényező [6].

Mivel hazai viszonylatban kevés irodalmi adat utal a HPV és a szájüregi laphámrákok kapcsolataira, megpróbáltuk feltérképezni a rendelkezésünkre álló kazuisztika és a HPV kapcsolatát olyan fehérjék immunhisztokémiai kimutatásával, melyeknek a HPV indukált carcinogenezisében meghatározó szerepük van.

A p16, a CDKN2A (Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A) /p16INK4A, Cdk-inhibitor gén által expresszált protein. A fej-nyak laphám carcinomák 9-12%-ában kimutatható a CDKN2A gén mutáció, deléción és LOH [1,20]. A p16 proteinnek nagyon fontos szerepe van a sejtciklus regulációban. A Cdk inhibíciója révén gátolja a retinoblastoma (Rb) tumor suppresszor protein foszforilációját. A hipofoszforilált Rb protein, a sejtciklus a G1 fázisban való felfüggesztését eredményezi [5, 14, 16]. A CDKN2A gén mutációja gyakori jelenség fej-nyak carcinomákban, de kimutatható benignus epiteliális daganatokban is, így az irodalom szerint a CDKN2A gén mutációja önmagában nem elégséges a malignizációhoz [4]. HPV pozitív fej-nyak daganatokban p16 protein overexpressziót lehet kimutatni, amihez a MKI67 gén által kódolt sejtproliferációt jelző Ki67 magprotein társul. A HPV negatív daganatok esetén a p16 nem expresszálódik a Cdk-Rb útvonal kikapcsolódása miatt.

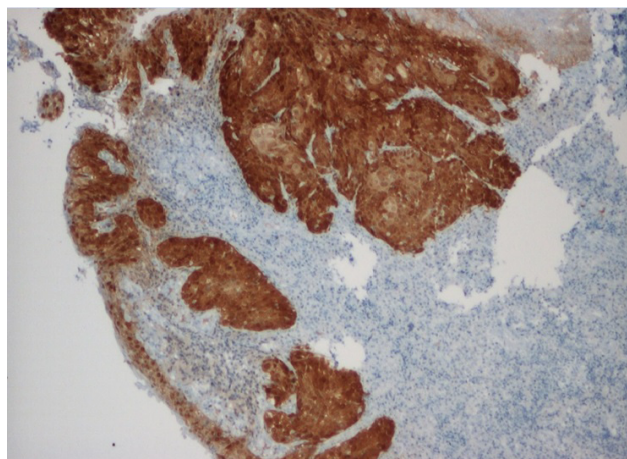
Az irodalmi adatokra támaszkodva 17 fej-nyak carcinomában vizsgáltuk a két lehetséges etiológiai faktor gén inaktivációs mechanizmusait, arra keresve választ, hogy az orális HPV fertőzés milyen mértékben prediktív tényezője a fej-nyak laphámcarcinomákban.

Anyag és módszerek

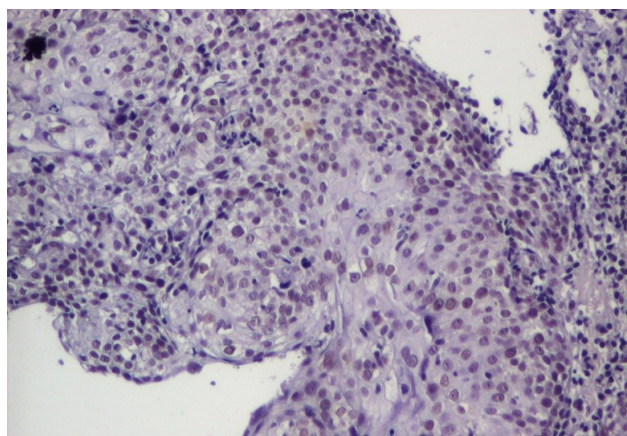
Megyei Sürgősségi Kórház Morfopatológia Laboratóriumának 2007-es kazuisztikájára támaszkodva 194 fej-nyak laphámrákot osztályoztunk a WHO osztályozási kritériuma szerint [23]. Eseteinket lokalizáció, korcsoport és nemek szerint csoportosítottuk. Kazuisztikánkban a 194 esetből a férfi/nő arány 6/1 (168/26). A legfiatalabb beteg 37 éves, míg a legidősebb 84 éves, átlagéletkoruk 58,5 év. Az irodalmi adatok értelmében, a vírusetiológia tanulmányozása érdekében a fiatal és középkorosztályra fókuszáltunk, ebből a nagy esetszámból kiválasztottuk a 60 év alatti betegeket a daganatok lokalizációja tükrében. A szelektált 17 esetből immunhisztokémiai módszert alkalmazva elvégeztük a p16, Ki67 és p53 expresszió vizsgálatát, mint a carcinogenezis klasszikus és vírusindukált mechanizmusának reakciótermékét.

Az antigének immunhisztokémiai kimutatását a formalinban fixált, paraffinba ágyazott és előzetesen laphámráknak diagnosztizált tumormintákból 5 µm vastag metszeteken végeztük el, a metszetek megfelelő előkészítése után. Az antigén feltárást követően (nedves hővel és nyomás alatt), 1mM citrát pufferben (pH:6 és pH:9) a metszeteket 30 percig inkubáltuk a primér antitestekkel: p16 (DB Biotech, klón R-19D, hígítás 1/100), p53 (DAKO, klón DO-7, hígítás 1/100) és Ki67 (DAKO, klón MIB-1, hígítás 1:200). Másodlagos antitestként DAKO En Vision TM Flex, High pH immunodetection systemet (K 8010) használtunk. A reakciótermékeket DAB (diamino-benzidin) kromogénnel vizualizáltuk. A lokalizáció meghatározására hematoxilin háttérfestést alkalmaztunk. Az antitestek specificitását pozitív és negatív kontrollokkal ellenőriztük.

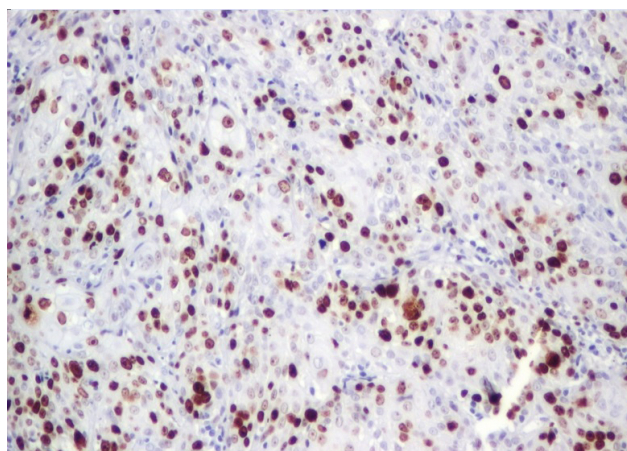
Az eredményeket a biomarkerek expressziójának intenzitása és a lokalizáció függvényében minőségileg és mennyiségileg értékeltük. Fokálisnak tekintettük a daganatsejtek kevesebb mint 10 %-át jelölő p16 reakciót, míg a daganatsejtek több mint 50 %-át jelölő diffúz expresszióként értékeltük, de mindkét esetet pozitív mintának tekintettük. A magra és citoplazmára lokalizált reakciót egyaránt pozitívnak értékeltük (**1. ábra**). A p53 esetében a 50% fölötti (**2. ábra**), Ki-67 esetében az erősen pozitív (10% feletti), magra lokalizált reakciót tekintettük pozitívnak (**3. ábra**). A kvantifikálást egymástól függetlenül két patológus végezte a sejtsztruktúrákhoz kötött lokalizáció (mag/citoplazma) függvényében. A daganatsejtek immunfenotípusa alapján, valamint a lokalizáció függvényében a tumorokat 3 csoportba soroltuk: p16+/Ki67+/p53-, p16-/Ki67-/p53+, p16+/Ki67-/p53+.



1. ábra. p16 expresszió (DAB kromogén): a daganatsejtek egyaránt expresszálják a proteint a citoplazma és a mag szintjén (4X).



2. ábra. p53 expresszió (DAB kromogén): a magra lokalizálódó reakció a daganatsejtek kevesebb mint 1%-át érinti (10X).



3. ábra. Ki67 expresszió (DAB kromogén): a daganatsejtek erős expressziót mutatnak.

1.táblázat. A fenotípus és genotípus összefüggése a különböző anatómiai régióra lokalizált laphámrákokban (SSC: Squamous Cell Carcinoma)

Lokalizáció	Fenotípus/Genotípus		
	p16+/Ki67+/p53-,	p16-/Ki67-/p53+,	p16+/Ki67-/p53+.
Oropharynx (7SCC)	3, HPV negatív	3, HPV negatív	1, HPV negatív
Naso/Hypopharynx (4 SCC)	3 (2 HPV negatív és 1 HPV16+)	1, HPV negatív	
Larynx (4 SCC)	1, HPV negatív	2 (1 HPV33+ és 1 HPV negatív)	1, HPV16+
Szájüreg (2SCC)	1, HPV negatív	1, HPV negatív	0

A metszés alkalmával félvastag metszeteket is készítettünk a mintáinkból; a HPV-16, 18 illetve 33 genotípusok vírus DNS-ének, direkt módszerrel való kimutatása céljából nested polimeráz láncreakció (PCR) vizsgálatnak vetettük alá. A kétlépcsős módszer során az első amplifikálás alatt felszaporított DNS fragmentumról amplifikáltunk a második lépésben egy kisebb szakaszt, Az első amplifikálás a vírus több típusában megtalálható, a HPV-16, 18 és 33 E6 ORF-jére tervezett konszenzus primerpárt használva történt. A második (típus-specifikus) lépésben a felszaporított fragmentumról (PCR 1 terméke) specifikus primerpárok segítségével adott HPV típusra jellemző (16, 18, 33) DNS szakasz amplifikációja történt. A keletkezett PCR termékek elválasztása 1µg/ml etidium-bromidot tartalmazó agaróz gélen történt. A gélek vizualizálása és analízise UV fényben történt videodenzitométer segítségével. A láncreakciós vizsgálat a Semmelweis Egyetem 1.sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetében történt.

Az eredmények kiértékelése és összefoglalása során a daganatok immunprofilját összevetettük a vírus DNS jelenlétével vagy hiányával.

Eredmények

A 17 laphámcarcinomát lokalizáció szerint a következő csoportokba soroltuk: oropharynx (7 db), nazo-/hypopharynx (4 db), larynx (4 db), szájüreg (2 db). A betegek életkora 37-60 év között változott, az átlagéletkor 48,5 év. Férfi/nő arány 17/0.

A víruseredetre utaló p16+/Ki67+/p53- fenotípus mellett a p16+/Ki67-/p53+ fenotípus is megjelent a HPV-16 genotípus esetén, ugyanakkor a HPV-33 genotípust a p16-/Ki67-/p53+ fenotípus jellemezte (**1. táblázat**).

Megbeszélés

Egyes szerzők a HPV pozitív daganatokat a HPV negatívaktól megkülönböztető jelentős epidemiológiai, etiológiai és molekuláris biológiai (prognosztikus) különbségek miatt külön entitású daganatokként kezelik. X. Dufour és mtsai. a **2. táblázatban** foglalták össze a HPV pozitív és HPV negatív orofarinx carcinomák közötti különbségeket [22].

Tanulmányunkban a p53 pozitivitást irodalmi adatok alapján értékeltük. Nem találtunk lokalizáció függő expressziót, a 60 év alatti populáció körében. A Ki-67 sejtproliferációs marker nem hozható összefüggésbe a

2.táblázat. HPV pozitív és HPV negatív carcinomák klinikai és biológiai jellemzői

HPV státus	HPV+	HPV-
Kor	fiatalabb (45-50 éves)	idősebb (55-65 éves)
Neme	férfi	férfi
Dohányzás	nem/ritkán dohányzik	kemény dohányos
Alkohol	nem/alkalmanként	rendszeres alkohol fogyasztó
Szexuális rizikó tényezők	magas	nem jellemző
Biológia	-p53: megnövekedett katabolizmusa (E6) -pRB: megnövekedett katabolizmusa -abnormális p16 (INK4a) expresszió	-p53: mutációs inaktiváció -pRb: nincs degradálódva -P16 (INK4A)-CyclineD1/CDK-pRb útvonal kikapcsolva: p16 INK4a nem expresszálódik
Általános állapot	jó	módosult
Prognózis	viszonylag jó	kedvezőtlen

p16 illetve a p53 markerek koexpressziójával (**1. táblázat**). A 17 általunk vizsgált daganatban a daganatsejtek immunfenotípusát összevetve a HPV-DNS jelenléte arra utal, hogy a 3 HPV pozitív daganat nem minden esetben követi a p16 inaktivációs utat: a víruseredetre utaló p16+/ Ki67+/p53- fenotípus mellett a p16-/ Ki67-/ p53+ fenotípus is megjelent a HPV 16 genotípus esetén, ugyanakkor a HPV-33 genotípust a p16+/ Ki67-/p53+ fenotípus jellemezte.

Következtetés

Eredményeink alapján feltételezzük, hogy a daganatszövetből kimutatott vírus DNS a p16-/ Ki67-/p53+ fenotípus esetében nem a HPV-16 volt az etiológiai tényező, hiszen tünetmentes fiatal egyének orális hámsajtjeiben a vírus jelen lehet. Ugyanakkor a p16+/Ki67-/p53+ fenotípus esetén az etiológia valószínűleg kombinált (a HPV fertőzéshez és a dohányzás/alkoholfogyasztáshoz egyaránt kötött). Mivel az etiológiának prognosztikus jelentősége van, a p16+/ Ki67+/p53- fenotípus HPV-16, 18, 33 genotípussal való asszociáció nélkül arra enged következtetni, hogy a daganat vírusetiológiájának kizárásához nem elegendő csupán a fent említett három genotípus meghatározása.

Irodalom

- Agrawal N., Frederick M. J., Pickering C. R. et al. - Exome sequencing of head and neck squamous cell carcinoma reveals inactivating mutations in NOTCH1. *Science* 2011;333:1154; and Stransky N., Egloff A. M., Tward A. D., et al. - The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. *Science* 2011;333:1157.
- Beby-Defaux A., Dichamp I., Agius G. - Papillomavirus humains. In: EMC, editor. *Biologie clinique*. 2008; 90-55-0070.
- Brennan J. A., Boyle J. O., Koch W. M., et al. - Association between cigarette smoking and mutation of the p53 gene in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 1995;332:712.
- Califano J., van der Riet P., Westra W. et al. - Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res* 1996;56:2488.
- Chen P. L., Scully P., Shew J. Y. et al. - Phosphorylation of the retinoblastoma gene product is modulated during the cell cycle and cellular differentiation. *Cell* 1989;58:1193.
- Evans M., Powell N. G. - The changing aetiology of head and neck cancer: the role of human papillomavirus. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2010;22:538—46.
- Ganly I., Soutar D. S., Brown R. et al. - p53 alterations in recurrent squamous cell cancer of the head and neck refractory to radiotherapy. *Br J Cancer* 2000;82:392.
- Globocan, Cancer incidence and mortality worldwide, 2008, <<http://globocan.iarc.fr/>> (accessed 1.11.10).
- Hansson B. G., Rosenquist K., Antonsson A. et al. - Strong association between infection with human papillomavirus and oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: a populationbased case-control study in southern Sweden. *Acta Otolaryngol* 2005;125:1337-44.
- J. Ferlay, D. M. Parkin, E. Steliarova-Foucher - Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008, *J. Cancer* 46 (2010) 765–781.
- K. D. Hunter, E. K. Parkinson, P. R. Harrison - Profiling early head and neck cancer, *Nat. Rev. Cancer* 5 (2005) 127–135.
- Koch W. M., Brennan J. A., Zahurak M. et al. - p53 mutation and locoregional treatment failure in head and neck squamous cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:1580.
- Leon B., John W. Eveson, Peter R. - *Head and Neck Tumours*, Lyon 2005, 9-208.
- Lukas J., Parry D., Aagaard L. et al. - Retinoblastoma-protein dependent cell-cycle inhibition by the tumour suppressor p16. *Nature* 1995;375:503.
- Marietta T., Jeffrey N. M., Nishant A. - Oral Cavity and Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma Genomics. *Otolaryngol Clin N Am* 46 (2013) 545–566.
- Mihara K., Cao X. R., Yen A. et al. - Cell cycle-dependent regulation of phosphorylation of the human retinoblastoma gene product. *Science* 1989;246:1300.
- Poeta M. L., Manola J., Goldwasser M. A. et al. - TP53 mutations and survival in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 2007;357:2552.
- Rampias T., Sasaki C., Weinberger P. et al - E6 and e7 gene silencing and transformed phenotype of human papillomavirus 16-positive oropharyngeal cancer cells. *J Natl Cancer Inst*, 2009, 101:412-423.
- Ryerson A. B., Peters E. S., Coughlin S. S. et al. - Burden of potentially human papillomavirus-associated cancers of the oropharynx and oral cavity in the US, 1998—2003. *Cancer* 2008;113(10):2901—9.
- Stransky N., Egloff A. M., Tward A. D. et al. - The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. *Science* 2011;333:1157.
- Temam S., Flahault A., Perie S. et al. - p53 gene status as a predictor of tumor response to induction chemotherapy of patients with locoregionally advanced squamous cell carcinomas of the head and neck. *J Clin Oncol* 2000;18:385.
- X. Dufour, A. Beby-Defaux, G. Agrius - HPV and head and neck cancer, *European Annals of Otorhinolaryngology, Head and Neck diseases* (2012) 129, e26-e31
- Yemelyanova A., Vang R., Kshirsagar M. et al. - Immunohistochemical staining patterns of p53 can serve as a surrogate marker for TP53 mutations in ovarian carcinoma: an immunohistochemical and nucleotide sequencing analysis. *Mod Pathol*. 2011 Sep;24(9):1248-53. doi: 10.1038/modpathol.2011.85. Epub 2011 May 6.