

**Gyógyszertudományok Doktori Iskola**

**HUMÁN PAPILOMAVÍRUS DNS VIZSGÁLATA  
FEJ-NYAKI EPITHELIALIS TUMOROKBAN**

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

**Major Tamás**

Témavezetők: Dr. Czeglédy Judit<sup>†</sup>, Dr. Szarka Krisztina

Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum

Orvosi Mikrobiológiai Intézet

2009

*Dr. Czeglédy Judit (1944-2007)*

*emlékére*

## TARTALOMJEGYZÉK

<b>RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE</b>	5
<b>1. BEVEZETÉS</b>	6
1.1. Rendszertani besorolás, általános morfológiai jellemzés	6
1.2. A vírusgenom és az általa kódolt proteinek funkciója	7
1.3. A papillomavírusok életciklusa	10
1.4. A vírusgenom fizikai állapota	11
1.5. A humán papillomavírusok mint tumorvírusok	11
1.6. Humán papillomavírusok fej-nyaki carcinomákban	13
1.7. Recidiv respiratoricus papillomatosis	17
1.8. Cidofovir alkalmazása recidiv respiratoricus papillomatosisban	23
1.9. Céljaink	27
<b>2. BETEGEK ÉS MÓDSZEREK</b>	28
2.1. Betegkiválasztás és -követés	28
2.1.1. A carcinomás betegcsoport	28
2.1.2. A papillomás (RRP) betegcsoport	29
2.1.3. Papillomát és dysplasiát tartalmazó, a követés során malignusan degenerált elváltozások	31
2.2. Viroológiai mintavétel	32
2.3. HPV DNS detektálás PCR technikával	32
2.4. HPV tipizálás restrikciós enzimhasítással	33
2.5. A HPV DNS fizikai állapotának meghatározása az E1-, E2- és E1E2 régióra specifikus PCR-rel	33
2.6. A HPV DNS fizikai állapotának meghatározása Southern-blot hibridizációval (SBH)	34
2.7. Az E1-, E2-, E1E2- és az MY09/MY11-specifikus PCR érzékenységének összehasonlítása	35
2.8. HPV DNS pozitív papillomás és carcinomás minták kópiaszámának összehasonlítása	35
2.9. A HPV DNS kópiaszámának meghatározása real-time PCR technikával	35
2.10. A HPV DNS pozitivitás összefüggésének vizsgálata a carcinomás betegek klinikopatológiai paramétereivel és a betegség kimenetelével	36
2.11. A HPV DNS vizsgálata intralaesionalis cidofovir terápia során	36
<b>3. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS</b>	39
3.1. Metodikai megfontolások	39
3.2. A HPV DNS jellemzése a malignus tumoros betegcsoportban	43
3.2.1. HPV DNS pozitivitás és típusok	43
3.2.2. A HPV DNS fizikai állapota és kópiaszáma a carcinomás betegcsoportban	49
3.2.3. A HPV pozitivitás összefüggése a betegek klinikopatológiai paramétereivel	52
3.2.4. A klinikai, patológiai és mikrobiológiai jellemzők hatása a betegségekre	

kimenetelére	54
<b>3.2.5.</b> Összegzés	56
<b>3.3.</b> A HPV DNS jellemzése a papillomás betegcsoportban	57
<b>3.3.1.</b> HPV DNS pozitivitás és típusok	57
<b>3.3.2.</b> Fizikai állapot	62
<b>3.3.3.</b> Kópiaszám	63
<b>3.3.4.</b> Összegzés	65
<b>3.4.</b> A HPV DNS státusza a kezdetben vegyes elváltozást mutató, később malignusan degenerált betegcsoportban	66
<b>3.4.1.</b> HPV DNS pozitivitás és típusok	66
<b>3.4.2.</b> Fizikai állapot és kópiaszám	68
<b>3.4.3.</b> Összegzés	70
<b>3.5.</b> A HPV DNS státuszának jellemzése az RRP intralaesionalis cidofovir terápiája során	70
<b>3.5.1.</b> Az intralaesionalis cidofovir terápia irodalmi áttekintése	70
<b>3.5.2.</b> A szövettani leletek értékelése RRP cidofovir terápiája során	74
<b>3.5.3.</b> A cidofovir kezelés hatása a papillomatosis kiterjedésére	74
<b>3.5.4.</b> A cidofovir kezelés hatása a HPV DNS fizikai állapotára és kópiaszámára	75
<b>3.5.5.</b> Az intralaesionalis cidofovir terápia értékelése	79
<b>3.5.6.</b> Összegzés	80
<b>4.</b> <b>AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA</b>	81
<b>5.</b> <b>SUMMARY</b>	82
<b>6.</b> <b>KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS</b>	83
<b>7.</b> <b>IRODALOMJEGYZÉK</b>	84
<b>8.</b> <b>KÖZLEMÉNYEK</b>	91
<b>8.1.</b> Az értekezésben felhasznált közlemények	91
<b>8.2.</b> Egyéb közlemények	91
<b>9.</b> <b>ELŐADÁSOK, POSZTEREK</b>	92

## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

<b>AIDS</b>	szerzett immundeficiencia szindróma (acquired immune deficiency syndrome)
<b>A-RRP</b>	felnőttkori (adult) kezdetű recidiv respiratoricus papillomatosis
<b>bp</b>	bázispár
<b>BPV</b>	szarvasmarha (bovine) papillomavírus
<b>CDV</b>	cidofovir
<b>CMV</b>	cytomegalovírus
<b>CR</b>	komplett remisszió (complete remission)
<b>CRPV</b>	amerikai üreginyúl (cottontail rabbit) papillomavírus
<b>E régió</b>	korai (early) régió
<b>EBV</b>	Ebstein-Barr vírus
<b>EGF</b>	epidermalis növekedési faktor (epidermal growth factor)
<b>EGF-R</b>	epidermalis növekedési faktor receptor (epidermal growth factor receptor)
<b>FDA</b>	Gyógyszer- és Élelmiszerügyi Hivatal (Food and Drug Administration)
<b>G</b>	differenciáltsági fok (grade)
<b>HHV</b>	humán herpesvírus
<b>HPLC</b>	nagy felbontású folyadékkromatográfia (high performance liquid chromatography)
<b>HPV</b>	humán papillomavírus
<b>HSV</b>	herpes simplex vírus
<b>I3C</b>	indol-3-karbinol
<b>ICTV</b>	Nemzetközi Vírustaxonomiai Bizottság (International Committee on the Taxonomy of Viruses)
<b>IFN-<math>\alpha</math></b>	alfa-interferon
<b>ISH</b>	in situ hibridizáció
<b>J-RRP</b>	juvenilis kezdetű recidiv respiratoricus papillomatosis
<b>kD</b>	kilodalton
<b>L régió</b>	késői (late) régió
<b>LCR</b>	hosszú szabályzó régió (long control region)
<b>LMC</b>	laryngomicroscopia
<b>NCR</b>	nem kódoló régió (noncoding region)
<b>NTP</b>	nukleozid-trifoszfát
<b>OR</b>	esélyhányados (odds ratio)
<b>ORF</b>	nyitott leolvasási keret (open reading frame)
<b>PCR</b>	polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction)
<b>PDGF</b>	thrombocyta eredetű növekedési faktor (platelet derived growth factor)
<b>PR</b>	parciális remisszió (partial remission)
<b>pRB</b>	retinoblastoma protein
<b>PSS</b>	papilloma súlyossági skála (papilloma severity score)
<b>PV</b>	papillomavírus
<b>RRP</b>	Recidiv respiratoricus papillomatosis
<b>RT-PCR</b>	reverz transzkriptáz-polimeráz láncreakció
<b>SAGE</b>	génexpresszió soros analízise (serial analysis of gene expression)
<b>SBH</b>	Southern-blot hibridizáció
<b>SIL</b>	squamosus intraepithelialis laesio
<b>URR</b>	felső szabályzó régió (upstream regulatory region)
<b>VLP</b>	vírusszerű partikulum (virus-like particle)
<b>VZV</b>	varicella-zoster vírus

# 1. BEVEZETÉS

## 1.1. Rendszertani besorolás, általános morfológiai jellemzés

A papillomavírusokat (PV) klasszikusan a *Papovaviridae* családba sorolták (a papovavírus a „papillomavírus”, a „polyomavirus” és a „majmok vakuolizáló vírusa” kifejezések első két betűiből származó mozaikszó) [57]. A papillomavírusok és a polyomavirusok közötti lényeges strukturális (víruskapszid átmérője, DNS hossza) és genetikai (jelentős DNS homológia hiánya, transzkripció iránya, stb) különbségek miatt azonban a Nemzetközi Vírustaxonomiai Bizottság (International Committee on the Taxonomy of Viruses; ICTV) a papillomavírusok számára önálló *Papillomaviridae* családot hozott létre [29].

A család általános morfológiai jellemzői: 1. a kb. 8000 bp-ból álló cirkuláris kettőszálú DNS, melynek csak egyik száláról történik transzkripció; 2. ikozahedrális szimmetriájú, 52-55 nm átmérőjű, 72 kapszomerből álló kapszid. Peplonnal nem rendelkeznek.

A papillomavírusokat – a gazdaszervezet szempontjából – kifejezett fajspecifitással jellemzi, elsősorban magasabb rendű gerinceseket (emlősök, madarak) betegítenek meg. A fajspecifitás elnevezésükben is megjelenik: pl. humán papillomavírus (HPV), szarvasmarha (bovine) papillomavírus (BPV), amerikai üreginyúl (cottontail rabbit) papillomavírus (CRPV), stb. *Cellularis tropizmusuk* is kifejezett, produktív fertőzést a bőr és a nyálkahártyák többrétegű laphámjában hoznak létre (epitheliotropizmus) [57].

A papillomavírusoknak 2004-ben 118 – teljesen szekvenált genommal rendelkező – genotípusát ismerték. Filogenetikai klasszifikációjuk az ICTV ajánlása szerint, a genom legkonzervatívabb régiójában (L1 ORF) a nukleotid szekvencia összehasonlítása alapján történik nemzetségekbe (genus), egy nemzetségen belül fajokba (species), egy fajon belül típusokba, egy típuson belül altípusokra és egy altípuson belül variánsokra. Két típus esetén az L1 ORF nukleotid szekvenciája legalább 10 %-ban különbözik [29, 82].

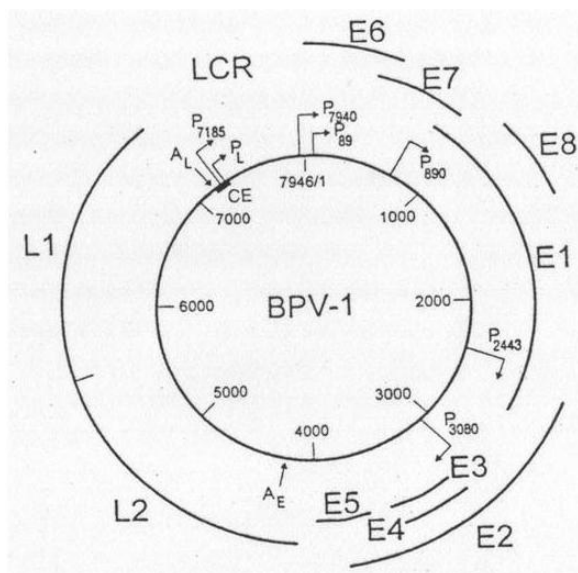
Már itt érdemes megemlíteni a HPV típusok epidemiológiai klasszifikációját. A genitális tractusban mintegy 40 HPV típus okoz infekciót: a cervix carcinomában a malignus betegségben nem szenvedő kontrollokhoz képest lényegesen gyakrabban detektált típusokat magas onkogén kockázatú (high-risk), a carcinomákban és a kontrollokban azonos prevalenciájú típusokat alacsony onkogén kockázatú (low-risk) típusoknak nevezzük [56]. Az epidemiológiai klasszifikációt az 1. táblázatban mutatom be.

<b>Magas onkogén kockázatú</b>	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82
<b>Valószínűleg magas onkogén kockázatú</b>	26, 53, 66
<b>Alacsony onkogén kockázatú</b>	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, 89

**1. táblázat.** A HPV típusok epidemiológiai klasszifikációja. Hoory T, Monie A, Gravitt P, et al. Molecular epidemiology of human papillomavirus. J Formos Med Assoc 2008;107:198-217. 3. táblázatának módosításával) [56]

## 1.2. A vírusgenom és az általa kódolt proteinek funkciója

A vírusgenom döntő többségét fehérjekódoló génszakaszok (nyitott leolvasási keretek, open reading frame; ORF) alkotják (1. ábra). Ezeket két csoportba soroljuk aszerint, hogy expressziójuk a vírus életciklusának korai (early; E) vagy késői (late; L) fázisában történik-e. Az E régió mintegy 4000 bp, az L régió 3000 bp hosszú. Van a genomnak egy kb. 1000 bp



**1. ábra. A BPV-1 genomja.** Knipe D, Howley P (szerk). Fields Virology 4th Ed. Lippincott-Raven, Philadelphia, 2001; 2231-2264. 3. ábra felhasználásával

hosszú, fehérjét nem kódoló szakasza is (noncoding region; NCR), melyet funkciói alapján felső szabályzó régióknak (upstream regulatory region; URR) vagy hosszú szabályzó régióknak (long control region; LCR) is neveznek. Itt a vírus replikációjának origója, valamint a vírusgenom transzkripciójában kulcsszerepet játszó E2 virális protein és cellularis transzkripciós faktorok kötőhelyei találhatóak [57]. Az alábbiakban az E és L proteinek funkcióit ismertetem, az ezekkel kapcsolatos ismereteink nagy része BPV vagy HPV típusokon végzett *in vitro* kísérleteken alapul.

A kb. 600 aminosavból álló **E1 protein** a vírusreplikáció során az iniciációban és az elongációban játszik szerepet. DNS-kötő doménje révén kapcsolódik a replikációs origóhoz. Ezt a kapcsolatot – az origóhoz közeli saját DNS-kötőhelyekkel rendelkező - E2 protein stabilizálja [81]. Az E1 protein DNS-függő ATPáz és helikáz aktivitással rendelkezik. A cellularis DNS-polimeráz alfa-primázzal kapcsolódva képes a gazdasejt DNS replikációjának iniciációs mechanizmusait a vírus replikációs origójára „toborozni”. Az utóbbi interakció azért különösen fontos, mert a papillomavírusok nem rendelkeznek saját DNS-polimerázzal. Az E1 prote-

innen az S-fázis-specifikus ciklin E-Cdk2 komplexhez történő kötődése felel a PV genom sejtciklus-függő replikációjáért [25].

A több mint 400 aminosavból álló teljes hosszúságú **E2 protein** egy szekvencia-specifikus DNS-kötő doménből és az N-terminális végén egy transzaktivátor és E1-kötő funkcióval rendelkező doménből áll. A PV genomban lévő kötőhelyeinek lokalizációja határozza meg azt, hogy – azokhoz kötődve – a transzkripció során aktivátorként vagy represszorként viselkedik. A represszor funkcióra jó példa a HPV 16 és 18 korai promotereinek közelébe történő kötődése és ezáltal a később részletezendő E6 és E7 proteinek transzkripciójának gátlása [12, 24]. Az E1 proteinnel átmeneti komplexet képezve a replikáció iniciációjában játszik szerepet. A mitózis telofázisa során részt vesz a PV plazmidnak a cellularis kromoszómákhoz kötődésében, ezáltal elősegíti a vírusgenom bejutását az utódsejtek magvába. Utóbbi funkció a vírusgenom fenntartása (maintenance) szempontjából fontos [10].

Az **E4 protein** – bár ORF-je a korai régióban van – a produktív vírusinfekció késői fázisában, az epithelium felső, differenciált rétegeiben detektálható. Vélhetően a virion sejtől történő kijutásában játszik szerepet a cytokeratin hálózat összeomlása révén [103].

Az alábbiakban ismertetett E5, E6 és E7 proteinek – a magas onkogén kockázatú típusok esetén - transzformáló hatásúak.

Az **E5 protein** primer célpontja BPV 1 esetében a thrombocyta eredetű növekedési faktor (platelet derived growth factor; PDGF)  $\beta$  receptor aktiválása, fibropapillomákban vélhetően ez felel a dermalis fibroblastok transzformációjáért [56]. A HPV 16 E5 proteinje *in vitro* az epidermalis növekedési faktor (epidermal growth factor; EGF) receptorát (EGF-R) aktiválja ill. annak degradációját késlelteti fibroblastokban, génje azonban HPV pozitív carcinomákban nem expresszálódik [122].

A mintegy 150 aminosavból álló HPV **E6 onkoprotein** – magas és alacsony onkogén kockázatú típusok esetén egyaránt – transzkripció-aktiváló hatással rendelkezik. A magas onkogén kockázatú típusok esetén észlelt transzformáló hatását azonban elsősorban a p53 tumorszupresszor protein gátlása révén fejt ki. A p53 protein egy szekvencia-specifikus transzkripció-aktivátor, mely a genotoxikus és citotoxikus ingerekre adott sejtválasz szabályozásában játszik kulcsszerepet. A sejtciklusban a G1-S fázis átmenetet a p21 ciklin-dependens kináz inhibitor transzkripciójának fokozása révén gátolja. A sejtciklus gátlása teszi

lehetővé a DNS károsodást javító mechanizmusok hatékony működését. A p53 protein – másfelől – az apoptózisban szerepet játszó gének transzkripcióját fokozza [135]. A sejtkárosító ingerekre adott végeredmény így a sejtciklus gátlása vagy apoptózis lehet. A magas onkogén kockázatú HPV típusok E6 proteinje ubiquitin-függő proteolízis révén a p53 protein szintjének gyors csökkenését eredményezi [106]. Az E6 protein azonban p53-independens transzformáló hatással is rendelkezik. Az utóbbi években számos cellularis target molekuláját írták le, ezek funkciója részben még ismeretlen [57].

Az alacsony onkogén kockázatú típusok E6 proteinje nem fokozza a p53 protein degradációját, azonban szelektíven befolyásolja annak egyes specifikus – a fertőzött sejtek proliferációját gátló vagy apoptosist indukáló – funkcióit. Az alacsony onkogén kockázatú E6 protein is csökkenti a sejtciklus regulációjában fontos p21 ciklin-dependens kináz inhibitor expresszióját [36].

A magas onkogén kockázatú HPV **E7 onkoprotein** fő cellularis targetje a retinoblastoma tumorsuppresszor protein (pRB). A pRB protein aktív, hipofoszforilált formájában az E2F cellularis transzkripció aktivátor proteinnel képez represszor komplexet, ezáltal gátolja a sejtciklus G1-S fázisának átmenetét. A pRB – ciklin-dependens kinázok által történő – foszforilációja következtében a pRB-E2F komplex disszociál és az E2F ismét aktivátorként működve elősegíti a G1-S fázis átmenetét. A magas onkogén kockázatú HPV típusok E7 proteinje a pRB hipofoszforilált formájával képez komplexet, elősegítve annak degradációját [14]. Megjegyzendő, hogy az alacsony onkogén kockázatú típusok E7 proteinjének pRB kötőhelye egyetlen aminosavban különbözik a magas onkogén kockázatú típusokétól, azonban pRB kötő képessége mindössze tizede a 16-os és a 18-as típusénak [105]. Az E7 protein további cellularis targetekhez is kötődik, ezek közül – az ugyancsak a sejtciklus szabályozásában szerepet játszó – p21ciklin-dependens kináz inhibitorra kifejtett gátló (azaz ezen az úton is a sejtciklust aktiváló) hatását emelem ki [45].

A késői proteinek expressziója csak produktív vírusinfekció esetén észlelhető. Az 55 kD **L1 a fő kapszid protein**, ennek 72 pentamerje alkotja a kapszidot. A papillomavírusok immundomináns neutralizáló epitópjai ezen a fehérjén helyezkednek el. A 70 kD **L2 protein** az L1 pentamerek egy részéhez kapcsolódva a vírusgenom enkapszidációjában játszik szerepet [74].

### 1.3. A papillomavírusok életciklusa

**Produktív infekció.** A papillomavírusok életciklusa igen szorosan kötődik a többrétegű laphám sejteinek differenciálódási folyamatához. A virion – akár mikroszkopikus méretű hámsérüléseken át – a *stratum basale* mitotikus aktivitással rendelkező hámsejteit fertőzi. Ezen sejtekbe vélhetően nem hámspecifikus felszíni receptorokhoz kötődve jut be a vírus. A sejt-magba kerülő és fehérjeburkától megszabaduló (dekapszidáció) virális DNS genomja előbb kis kópiaszámban amplifikálódik. Ezt a kópiaszám fenntartó állapota (maintenance) követi, ekkor a replikáció a sejtciklussal szinkron (átlagosan 1 alkalom / sejtciklus) zajlik. A kópiaszám több sejtgeneráción át relative állandó marad. A nagyszámú kópiát eredményező vegetatív DNS replikáció csak a terminálisan differenciált hámsejtekben észlelhető, az ezt aktiváló faktorok jórészt ismeretlenek [57].

A replikációhoz hasonlóan az E és L ORF-ek transzkripciója is a hámsejtek differenciálódásával szinkron történik. A mélyebb (basalis és parabasalis) hámrétegekben csak korai ORF-ek transzkriptjeit írták le a szövettani metszetekben a megfelelő mRNS-sel komplementer próbát alkalmazó ISH (in situ hibridizáció) során. A strukturális proteinek kódoló L gének expressziója csak a *stratum spinosum* felső részétől a felszínig detektálható [9]. A virionok összeszerelődése intranuclearisan történik. Érett virionok a *stratum granulosum* (többrétegű elszarusodó laphám esetén) és a *stratum planocellulare* területén láthatók, kiszabadulásuk a sejtől a hámfelszínen történik. A virion kiszáradásra rezisztens, fertőzőképességét a külvilágban hosszú ideig megőrzi [57].

**Látens és szubklinikai HPV infekció.** Látens infekció esetén a HPV DNS normál szövettani struktúrájú hámiban detektálható, szubklinikai infekció esetén a HPV DNS pozitivitás mellett a HPV fertőzés enyhe hisztopatológiai jelei jelentkeznek [27]. A cervicalis HPV fertőzések legnagyobb része látens vagy szubklinikai, az incidencia becsült értéke az USA-ban 10 millió fő/év, 90 %-uk azonban 2 éven belül spontán eliminálódik [56, 107]. A látens HPV fertőzés legszembetűnőbb példáját azonban a recidiv respiratoricus papillomatosis adja: a remisszióban lévő beteg szövettanilag ép légúti nyálkahártyáiban perzisztáló vírus DNS az akár évekkel későbbi recidiva forrása lehet [120].

#### 1.4. A vírusgenom fizikai állapota

Az intakt, cirkuláris, extrakromoszómális vírusgenomot **episzómalisnak** nevezzük, ennek struktúráját a korábbiakban részleteztem (1. ábra). Az episzómalis vírusgenom elsősorban a HPV-asszociált benignus bőr- és nyálkahártya laesiók, továbbá az enyhe cervicális dysplasiák jellegzetessége.

A súlyos dysplasiák és az invazív carcinomák többségében a vírusgenom felhasad és a gazdasajt kromoszómális DNS-ébe **integrálódik** [74]. A felhasadás döntően az E1 vagy az E2 ORF területén történik, az integráció során hosszabb-rövidebb génszakaszok deléciója következhet be [110]. Az integráció következménye az E1 és E2 proteinek expressziójának és így az E6 és E7 gének transzkripció regulációjának a megszűnése [8, 110]. A vírusgenom integrációja a gazdasajt DNS-ének transzkripcionálisan aktív, nem specifikus helyein történik, és általában az E6 és E7 gének fokozott expressziójával, mRNS-ük fokozott stabilitásával jár [58]. A bizonyos protoonkogének (c-myc, jun-B) közelébe történő integráció azok fokozott expresszióját okozhatja [21, 39]. Az integráció tehát – bár nem abszolút feltétele a carcinogenesisnek – annak több támadásponton is része lehet.

#### 1.5. A humán papillomavírusok mint tumorvírusok

A humán papillomavírusok – szigorú epitheliotropismusként megfelelően – az emberi szervezet bőrének és nyálkahártyáinak többrétegű laphámjaiban okoznak benignus proliferációt, azonban számos lokalizációban malignus epithelialis tumorokban is detektálhatók. A bőr leggyakoribb HPV-asszociált betegségei a következők: verruca vulgaris (HPV 2, 4), verruca plantaris (HPV 1), verruca plana (HPV 3, 10, 28, 41), mozaik szemölcs (HPV 2) és epidermodysplasia verruciformis (a malignus degenerációra hajlamos barnásvörös plakkokban HPV 5, 8) [74]. A nyálkahártyák legfontosabb HPV-asszociált betegségeit a 2. táblázatban részletezem.

HPV típus	Asszociált tumor
	<b>Anogenitalis régió</b>
Összes genitális HPV	Szubklinikai fertőzés
6, 11	Exophyt condyloma, bármely lokalizáció
6, 11, 16, 18, 31, egyéb	Lapos condyloma (általában cervix)
16	Bowenoid papulosis
6, 11	Buschke-Löwenstein tumor
16, 18, 31, 33, 45, 56, egyéb*	Cervix carcinoma
16	Vulva carcinoma
16	Penis carcinoma
	<b>Fej-nyaki régió</b>
13, 32	Focalis epithelialis hyperplasia (szájüreg)
6, 11, 16	Genitális HPV által okozott infekció (szájüreg)
2	Ajak laesio
16	Oropharynx (elsősorban tonsilla), szájüregi és gége carcinoma
6, 11	Recidiv respiratoricus papillomatosis
6, 11	Conjunctivalis papilloma

**2. táblázat.** A nyálkahártyák legfontosabb HPV-asszociált betegségei (Hoory T, Monie A, Gravitt P, et al. Molecular epidemiology of humán papillomavírus. J Formos Med Assoc 2008;107:198-217. 2. táblázatának módosításával) [56]. \* lásd az 1. táblázat adatait

Legismertebb a HPV fertőzéseknek a cervix carcinomával történő szoros asszociációja, mely ebben a lokalizációban bőven kimeríti az etiológiai kapcsolat fogalmát. A HPV cervicalis carcinogenesisben betöltött szerepét az alábbi érvek támasztják alá.

**Molekuláris epidemiológiai érvek.** Az invazív carcinoma kialakulását a cervix transzformációs zónájában előbb asymptomaticus HPV fertőzés, majd ún. squamosus intraepithelialis laesio (SIL) előzi meg. Utóbbit a citológiai Bethesda-rendszer szerint alacsony fokú (low-grade; L-SIL, szövettani megfelelője a condyloma és enyhe dysplasia) és magas fokú (high-grade; H-SIL, szövettani megfelelője a közepes és súlyos dysplasia, valamint a carcinoma in situ) típusra osztjuk. *Az évekig tartó, progresszív folyamat során HPV típusok - prospektív vizsgálatokkal igazoltan - végig detektálhatók, és jellemző a magas onkogén kockázatú típusok egyre magasabb prevalenciája.* A legtöbb SIL spontán visszafejlődik, a dysplasia fokozódásával azonban a regresszió valószínűsége egyre kisebb [107].

Az invazív cervix carcinomák több mint 90 %-a HPV pozitív: a laphámrákokban (az összes eset 85 %-a) a HPV 16, az adenocarcinomákban a HPV 18 a leggyakoribb típus.

**Molekuláris biológiai érvek.** A HPV indukálta carcinogenesis *in vitro* leírt kulcseseményei (a vírusgenom integrációja, a transzformáló E6 és E7 ORF-ek expressziója, az E6-p53 és az E7-pRB interakció következményei) *in vivo* is igazolhatók.

Végezetül megjegyzem, hogy magas onkogén kockázatú HPV DNS jelenléte esetén a cervix carcinoma relatív kockázata nagyobb, mint a dohányzóknál kialakuló tüdőráké [43]! A HPV infekció azonban önmagában nem elégséges feltétele a cervix carcinoma kialakulásának, ahhoz a többlépcsős carcinogenesis elmélete alapján más cellularis események is szükségesek [74].

## 1.6. Humán papillomavírusok fej-nyaki carcinomákban

**Definíció.** A „fej-nyak” fogalma sajnos nem egységes. Különböző anatómiai lokalizációk tartoznak ide: ajak, szájüreg, az orr és melléküregei, orrgarat, szájgarat, algarat, gége, nyelöcső, nyálmirigyek, valamint a nyak és a fül lágyrészei [125]. Számos szerző – bár fej-nyak carcinomáról ír – nem részletezi az általa ide értett lokalizációkat. Leggyakrabban a szájüreg, az oropharynx, a hypopharynx és a gége daganatait sorolják a fej-nyaki daganatok közé [55, 67, 125].

A fej-nyaki rosszindulatú daganatok elsősorban többsége epithelialis eredetű, ezen belül a laphámrák a leggyakoribb: a szájüreg és a garat malignus tumorainak 90 %-a, a gége malignus tumorainak 95 %-a carcinoma planocellulare [101, 125].

**Epidemiológia.** A fej-nyaki régió carcinomái elsősorban magas incidenciájuk és mortalitásuk miatt jelentenek állandó kihívást az orvoslás számára. A globális incidenciát (100 ezer főre vonatkoztatva) garatrák esetében férfiakban 3,3 eset, nőkben 0,6 eset; gégerák esetében férfiakban 4,7 eset, nőkben 0,6 eset [125]. 2002-ben világszerte mintegy 123 ezer oro- és hypopharynx rákot és 161 ezer gégerákot észleltek, a fej-nyaki régió leggyakoribb tumorának azonban 267 ezer új esettel a szájüregi rák bizonyult [88, 125]. A férfi-nő arány a gége laphámrákja esetében a legkifejezettebb: 7:1. A garat- és gégerákok incidenciájában jelentős területi eltérések észlelhetők, utóbbi esetében a hagyományosan magas incidenciájú Dél-Európa (férfiakban 10,9 eset, nőkben 0,6 eset / 100 ezer fő) mellé az utóbbi évtizedekben Ke-

let-Európa is felzárkózott (férfiakban 9,2 eset, nőkben 0,4 eset / 100 ezer fő), az incidencia azonban a fejlődő országokban is nő [92]. A gyakran késői diagnózis és a – főleg az oro- és hypopharynx, valamint a supra- és a subglottis esetében jellemző – gyakori metastasisok miatt a mortalitás is jelentős: 2005-re világszerte 228 ezer szájüregi és garatrákos, valamint 101 ezer gégerákos halálesetet becsültek [54, 125].

Hazánkban a Nemzeti Rákregiszter adatai szerint 2005-ben 1176 férfiban és 223 nőben diagnosztizáltak gégerákot, a Demográfiai Évkönyv szerint a betegségben 500 férfi és 59 nő hunyt el (forrás: Az Egészségügyi Minisztérium szakmai protokollja a gégedaganatok ellátásáról, [www.eum.hu](http://www.eum.hu)). A szájüreg- és garatrák 2003-ban regisztrált eseteinek száma (együttesen) közel 3000 volt. A tüdő-, a colorectalis, az emlő- és a prostata carcinoma után ez volt az ötödik leggyakoribb rosszindulatú daganat. Incidenciája az ismert adatok szerint Magyarországon a legmagasabb az egész világon! A mortalitás 2003-ban 15,5 eset / 100 ezer fő volt, közel négy évtized alatt csaknem az ötszörösére nőtt [59].

**Rizikófaktorok.** A két legfontosabb rizikófaktor a fej-nyaki carcinomák esetében a dohányzás és a túlzott alkoholfogyasztás. Szakirodalmi adatok szerint a gégerák relatív kockázata erős dohányzás (>20 szál cigaretta/nap) esetén 1,37-59,7 között, túlzott alkoholfogyasztás (>100 g alkohol/nap, „heavy drinker”) esetén 3,0-10,4 között van, együttes fennállás esetén a két hatás szinergista jellegű [98, 125]. Oropharynx tumorok esetén ez a relatív kockázat mindkét rizikófaktor esetében kevésbé kifejezett [55]. A fej-nyaki laphámrákok mintegy 15-20 %-a azonban ezen két fő rizikófaktor hiányában alakul ki [98].

**A humán papillomavírusok jelenléte** és etiológiai szerepe fej-nyaki carcinomákban elvileg több okból is felvetődhet:

1. a cervix uteri-hez hasonlóan ebben a régióban is több helyen található ún. squamociliaris junctio (többrétegű el nem szarusodó laphám és egyrétegű hengerhám átmenete); mely a HPV fertőzések predilekciós helye [125]
2. a felső légutak – elsősorban a gége – nyálkahártyája valóban fogékony bizonyos HPV típusok általi fertőzésre, amint azt a recidiv respiratoricus papillomatosis (RRP) is mutatja;
3. a HPV által okozott légúti papillomák egy része malignus degenerációt mutat.

A fej-nyaki régió benignus és malignus betegségeiben 1983-ban detektáltak először humán papillomavírusokat [123, 124]. Arra a megfigyelésre alapozva, hogy a fej-nyaki papillomák és carcinomák szövettani vizsgálatakor esetenként HPV fertőzésre specifikus cytopathiás jelek (elsősorban koilocytosis) láthatók, Syrjanen és mtsai egy orrüregre és arcüregre terjedő papillomát, valamint 40 szájüregi carcinomát vizsgáltak meg immunhiszokémiai módszerrel: a papillomában és 16 carcinomában nuclearis elhelyezkedésű HPV antigéneket detektáltak [123, 124]. Az ezt követő években több szerző mutatott ki HPV DNS-t szájüregi, garat- és gégerákban hibridizációs módszerekkel (ISH, Southern-blot hibridizáció; SBH), a kutatásoknak azonban a 90-es években a polimeráz láncreakció – mint szenzitív és specifikus DNS detektálási módszer - széles körű elterjedése adott új lendületet [116]. A különféle DNS detektálási technikákkal azonban kaotikus eredmények születtek: a szájüregi és garatrákok, valamint a gégerák esetében is 0 és 100 % közötti HPV DNS pozitivitási arányokat közöltek [54]. Ezek az óriási különbségeket nem lehet pusztán a vizsgált populációk különbségeivel, valamint az eltérő mintavételi és DNS detektálási módszerekkel magyarázni. Jóval egységesebb a szakirodalom abban a tekintetben, hogy a HPV típusok közül minden fej-nyaki lokalizációban a magas onkogén kockázatú HPV 16 a leggyakoribb [67, 116]. Konszenzus van abban a tekintetben is, hogy a HPV DNS leggyakrabban az oropharynxban, azon belül is a tonsilla palatina nyálkahártyájában detektálható [67, 116, 125].

A HPV DNS detektálása azonban önmagában nem egyenlő annak a carcinogenesisben betöltött *in vivo* etiológiai szerepével [23, 54, 67]. Az oki kapcsolat igazolásához a legtöbb szerző szerint a HPV DNS kimutatása mellett még legalább két esemény szükséges: 1. a vírusgenomnak a gazdasejt kromoszómális DNS-ébe történő integrációja; 2. a transzformáló E6 és E7 gének expressziója, azaz az E6 és E7 mRNS detektálása [7, 54, 55, 116, 133, 134]. Az első esemény azonban – csakúgy mint a cervix carcinoma esetében - nem abszolút feltétel, ugyanis tonsilla- és gégerákban is a HPV DNS episzómális fizikai állapota mellett is írtak le E6 és E7 expressziót [117, 134]. Ugyanazon fej-nyaki carcinomákból származó szövetmintákban – a DNS és az RNS integritásának ellenőrzése után - HPV E6 és E7 transzkriptek lényegesen ritkábban fordultak elő, mint vírus DNS-e [133]. A HPV genom fej-nyaki tumorokban episzómális és integrált **fizikai állapotban** egyaránt előfordulhat, sőt a kétféle fizikai állapot egyidejű jelenlétét is leírták [65, 78, 117, 134].

Egyes szerzők szerint az oki kapcsolat igazolásának további feltétele a vad típusú p53 gén jelenléte, azaz a p53 mutáció kizárása, mivel a magas onkogén kockázatú HPV típusok E6 proteinje az intakt p53 tumorszupresszor proteinnel képez komplexet [55, 133]. A vad típusú

p53 protein megléte magyarázhatja a HPV pozitív oropharynx tumorok egyes tanulmányokban leírt fokozott sugárérzékenységet is, mivel a vad típusú p53 protein HPV E6-mediált degradációja funkcionálisan nem egyenértékű a p53 génmutáció okozta funkcióvesztésével [73, 127]. A p53 génmutáció és a HPV DNS pozitivitás azonban más közleményekben éppen szimultán jelentkezett vagy nem igazolódott közöttük kapcsolat [133]. Újabb érv lehet az oki kapcsolat mellett a HPV DNS, valamint az E6 és E7 mRNS jelenléte az aktív E6 és E7 expressziót mutató tumorok áttéteiben [133].

A **vírusgenom kópiaszámával** fej-nyaki carcinomákban kevés tanulmány foglalkozik. Általában igaz, hogy a fej-nyaki carcinomák HPV DNS kópiaszáma alacsonyabb, mint a cervix carcinomáé [125]. Az egyetlen kivétel a tonsilla carcinoma lehet, ahol a HPV DNS kópiaszáma összemérhető a cervix carcinomával [54].

A **HPV fertőzés forrása** vitatott. Férfiakban az első szexuális aktus korábbi időpontja, a szexuális partnerek száma és az anamnézisben szereplő genitális HPV infekció növelte a szájüregi carcinoma kialakulásának esélyét [109]. Az anogenitalis régió HPV-asszociált rákjainak egyidejű fennállása a tonsilla carcinoma relatív kockázatát 4,3-szeresére növelte [44]. Ezek az eredmények – különösen a szájüregi carcinomára vonatkozóak – orogenitalis transzmisszió mellett szólnak.

Természetesen felvetődött az igény a **HPV pozitivitás és a betegek klinikai, valamint patológiai paramétereinek közötti összefüggés** vizsgálatára: életkor [4, 48, 92, 116], nem [127], dohányzás [4, 7], alkoholfogyasztás [7], lokalizáció [7, 55, 80, 98, 116, 127], TNM stádium [15, 65] és differenciáltsági fok [7, 134]. Lényegesen kevesebb tanulmány foglalkozik a HPV státusz (pozitivitás, típus, fizikai állapot, kópiaszám) **prognosztikai értékével** [23, 78, 92]. Az eredmények mind a klinikopatológiai, mind a prognosztikai paraméterek esetében ellentmondásosak.

Hazánkban és a hazai szakirodalomban Szentirmay és mtsai vizsgálták fej-nyaki laphámrákok HPV pozitivitását, az egyes HPV típusok megoszlását, a HPV 16 ún. európai (E6 L83V) variánsának jelenlétét, valamint a HPV pozitivitásnak a klinikopatológiai paraméterekkel történő kapcsolatát [127]. Az északkelet-magyarországi lakosság szájüregi carcinomáinak rizikófaktorai – többek között a HPV típusok jelenlétével – Nemes és mtsai foglalkoztak [87].

## 1.7. Recidiv respiratoricus papillomatosis (RRP)

**Definíció.** A RRP a felső légutak leggyakoribb benignus tumora. Makroszkópos megjelenését tekintve a légutak lényegében bármely részén kialakuló exophyt, pendulált vagy sessilis, szemölcsös-bolyhos felszínű növedékek [32]. A leggyakoribb lokalizáció a gége, mely az esetek több mint 90 %-ában érintett, és gyakran ez az egyetlen érintett régió [60].

**Epidemiológia.** A RRP-re bimodális kormegoszlás jellemző: az első tünetek leggyakrabban 1-5 éves kor között, valamint 20-30 éves kor között jelentkeznek. Ez alapján tehát *juvenilis kezdetű* (J-RRP) és *egy felnőttkori (adult) kezdetű* (A-RRP) formát különböztetünk meg [137]. A juvenilis és az adult forma életkor alapján történő definiálása a szakirodalomban nem egységes, bár a legtöbb szerző 12 éves kor előtt észlelt tünetek esetén egyértelműen J-RRP-ről, 20 éves kor felett jelentkező első tünetek esetén egyértelműen A-RRP-ről beszél [32, 62, 91]. Az USA-ban a J-RRP éves incidenciája 4,3 eset /100 000 lakos, az A-RRP incidenciája 1,8 eset / 100 000 lakos [137].

A RRP fő **etiológiai** tényezője a humán papillomavírus 6-os és 11-es típusa [32, 137]. Kellően szenzitív DNS detektálási módszerekkel a légúti papillomák HPV DNS pozitivitása megközelíti vagy eléri a 100 %-ot [46, 96]. A betegek követése során a recidivákból nyert sorozatos szövetmintákban általában egyazon alacsony onkogén kockázatú HPV típus DNS-e detektálható [46]. Igen ritkán HPV 16, 18 és egyéb típusok is kimutathatók papillomákban [17, 89].

HPV DNS a papillomatosis melletti – makroszkóposan ép - szövetekben is detektálható [2, 40, 91]. A papillomatosistól távoli légúti régiók is tartalmazhatnak HPV DNS-t [91], sőt a vírus DNS komplett remisszióban lévő betegek légúti nyálkahártyáiban is kimutatható [120]. A HPV DNS jelenléte ezen ép szövetekben egyrészt a gyakori recidiva forrását képezheti, másrészt megmagyarázza a RRP pusztán sebészi eradikációjának gyakori kudarcát is.

**Transzmisszió.** A J-RRP esetekben a HPV infekció vélhetően születéskor, a fertőzött szülőutakon történő áthaladás következtében történik. Ezt a vertikális transzmissziót a következő érvek támasztják alá: 1. a J-RRP-ben szenvedő gyermekek esetében az anya anamnézisében 30-60 %-ban szerepel genitális condyloma, míg ez az arány a J-RRP-ben nem szenvedő gyermekek esetében 5 % alatt van; 2. csaknem valamennyi, J-RRP-ben szenvedő gyermek per vias naturales jön a világra, bár császármetszés után is írtak már le J-RRP-t; 3. hat héttel a szülés után az anyák genitális és a csecsemők buccalis kenetei azonos HPV típusokat tartal-

maznak [42, 64]. A genitális condylomák és a RRP esetében a HPV spektrum megegyezik (6-os és 11-es típus) [61]. A vertikális transzmisszió forrása sajnos végtelen, mivel a 15-49 éves nők 10-20 %-ának cervix kenetében detektálható HPV DNS [50]. A terhes nők 11-28 %-a HPV DNS pozitív hibridizációs módszerekkel [108], klinikai tünetekkel is járó HPV fertőzés 1,5-5 %-ukban figyelhető meg [11]. A juvenilis esetek egy részében nem zárható ki a nemi erőszak útján történő terjedés sem [141]. A-RRP esetében a transzmisszió legvalószínűbb módja az orogenitális kontaktus [32], azonban korábbi – akár születéskor szerzett – látens fertőzés aktiválódása sem zárható ki [43].

**Patogenezis.** A korábban leírtaknak megfelelően a HPV életciklusa igen szorosan kötődik a hámsejtek érési folyamatához. A produktív infekció következménye a vírus részéről a felszíni hámsejtekben érett virionok összeszerelődése, a fertőzött többrétegű el nem szarusodó laphám részéről pedig abnormálisan differenciált hámsejtekből álló papilloma képződése. A papilloma képződés fő mechanizmusa vélhetően a fertőzött hámsejtek felhalmozódása azok érési gátlásának következtében [2]. A gégepapillomák basalis és parabasalis hámrétegében a mitózisok száma ugyanis nem haladja meg a normál epitheliumra jellemző rátát [121]. A differenciálódás zavarát a normális differenciálódás-specifikus proteinek (pl. keratin 13, filaggrin) szintézisének csökkenése és abnormális differenciálódás-specifikus proteinek (pl.  $\Psi$ -3) megjelenése mutatja [121].

Az elváltozás predilectiós helyei a felső légutakban számos helyen meglévő természetes többrétegű el nem szarusodó laphám – egyrétegű csillósörös hengerhám átmenetek: a hangszalagok alsó felszíne, a ventriculus laryngis alsó és felső széle, az epiglottis laryngealis felszínének középső régiója, a lágyszájpad epipharyngealis felszíne, valamint a limen vestibuli az orrbemenetben [60].

**Tünettan.** A tünetek a lokalizációtól és a beteg életkorától (a légutak átmérőjétől) függenek. Vezető tünet a leggyakoribb hangszalagi lokalizáció esetén a progresszív rekedtség, mely súlyos esetekben aphonyához vezethet. Csecsemőben, kisgyermekben kóros sírési hang jelentkezhet. A második leggyakoribb tünet a stridor, mely a laesiók növekedésének megfelelően előbb inspiratoricus, később bifázisos jellegű. Elsősorban kisgyermekkorban, a papillomatosis szűk légutakban történő rapid növekedése esetén légzési elégtelenség jelentkezhet orrszárnai légzéssel, mellkasi behúzózással és cyanosissal. Ritka esetben krónikus köhögés, ismétlődő

pneumonia, dysphagia, globus-érzés, kisgyermekben szomatikus retardáció jelentkezhet [32, 137].

A **természetes kórlefolyás** kiszámíthatatlan, a betegséget – amint elnevezése is mutatja – magas recidivahajlam jellemzi. A juvenilis esetek 50 %-a több mint 10, 7 %-a több mint 100 beavatkozáson esik át élete során. A felnőttkori kezdetű esetek mintegy felében a teljes követés során kevesebb mint 5 beavatkozás elegendő [33]. J-RRP-ben a gyakori recidiva mellett általában a multiplex lokalizáció, A-RRP-ben a solitaer lokalizáció és a malignus degeneráció nagyobb valószínűsége jellemző [101]. A J-RRP általában a pubertás körül spontan remissziót mutat, bár az esetek kb. harmada serdülőkor után is perzisztál [89, 130].

Általában több évtizedes fennállás után az esetek 3-5 %-ában a papillomatosis malignus degenerációját írták le [16, 64]. A malignus degeneráció az esetek többségében radioterápia után figyelhető meg (63). Radioterápiát a gyakran recidiváló, kiterjedt RRP kezelésére még az 1970-es években is alkalmaztak [63]. A papillomatosis előzetes irradiáció nélküli malignus degenerációja jóval ritkább, ez általában a fej-nyaki carcinogenesis ismert rizikófaktorainak (dohányzás, rendszeres alkoholfogyasztás) fennállása mellett történik [99, 100]. Írtak már le malignus degenerációt a papillomatosis bleomycin terápiája után is [70]. Az ismert rizikófaktorok hiányában bekövetkező malignus degeneráció irodalmi ritkaság, 1995-ig mindössze 21 esetet közöltek [53]. A papillomatosis talaján kialakult carcinoma – a leggyakoribb laryngealis lokalizáció mellett - lehet extralaryngealis (trachealis vagy bronchopulmonalis) is [53, 97, 100]. A malignus tumor szövettanilag laphámrák, ritkán annak verrucosus változata [32, 90]. A RRP észlelése és a carcinoma első diagnózisa között általában 10-30 év telik el. Az anamnézisben szereplő irradiáció esetén ez az időszak rövidebb (átlagosan 10 év) és a carcinoma prognózisa is rosszabb [63].

**Diagnózis.** A kisgyermekkorú rekedtség második leggyakoribb oka az RRP, ezért progresszív vagy krónikus rekedtség esetén ebben a korosztályban kötelező a gége eszközös direkt vizsgálata [137]. Hazánkban is általános elv az alapellátásban, hogy minden, 3 héten túl fennálló rekedtségben szenvedő beteget fül-orr-gégészhez kell irányítani (felnőttben általában malignus folyamat kizárására). Az első ambuláns fül-orr-gégészeti vizsgálat során felnőttben indirect laryngoscopyt végzünk, míg gyermek esetében - az indirecte gyakran nem vizsgálható - légutakat fiberoscopyával tekintjük át. RRP gyanúja esetén narcosisban, laryngomicroscopia során a laesióból hisztológiai mintavételt végzünk [32, 130].

A RRP diagnózisa szövettani [130]. A juvenilis és az adult esetek kórszövettani képe megegyezik, ezt a többrétegű el nem szarusodó laphám benignus proliferációja jellemzi, mely a fibrovascularis stromával együtt ujjszerű nyúlványokat képez [2]. Jellemző a basalis hámréteg hyperplasiája, mely a hám teljes vastagságának mintegy harmadát alkotja. A membrana basalis ép, cellularis atypia, dysplasia nem jellemző. Az abnormális keratinisatio legjellemzőbb - ám nem HPV-specifikus szövettani jele a parakeratosis: az erősen eosinophil felszíni rétegekben a hámsejtek megtartják magfestődésüket [2, 75]. A HPV fertőzések specifikus cytopathiás hatásának a koilocytosist tartják: az érett koilocyta jellemzői a sejt megnagyobbodása, a perinuclearis cytoplasmaticus vacuolisatio, valamint a nuclearis hyperchromasia és polymorphismus [66, 75]. A koilocytosis RRP-ben is gyakori szövettani elváltozás [2].

A HPV DNS tipizálást mint diagnosztikai eszközt elsősorban prognosztikai célból végzik [130].

**Differenciáldiagnózis.** Csecsemő- és kisgyermekkorban, tartós rekedtség és stridor fennállása esetén a RRP-t elsősorban a veleszületett gégebetegségektől (laryngomalacia, subglotticus stenosis, subglotticus haemangioma, hangszálbénulás) kell elkülöníteni, ez a már említett direkt eszközös vizsgálatokkal történik [32].

**Terápia.** Tekintettel arra, hogy a HPV DNS gyakran a komplett remisszióban lévő betegben, valamint RRP esetén a laesiókkal szomszédos vagy akár távoli lokalizációk nyálkahártyáiban is kimutatható, a HPV fertőzés teljes eradikációja lenne kívánatos [16]. A fentiek alapján érthető, hogy a sebészi terápia – bár a RRP kezelésének alapját képezi – önmagában nem lehet kuratív [137]. A sebészi kezelést éppen ezért adjuváns kezelési módokkal egészítik ki, az adjuváns terápia javallatát általában a betegség súlyosságához (évente szükséges műtétek száma, diagnózistól számított teljes műtéti szám, alsó légúti terjedés, stb.) kötik [32, 64]. A RRP - mint krónikus, recidiv betegség - kezelésének az alábbi céljai lehetnek: 1. szabad légutak biztosítása; 2. a lehető legjobb minőségű hang biztosítása; 3. a műtétek gyakoriságának csökkentése a mellékhatások megelőzése érdekében [64].

A **sebészi kezelés** a papillomatosis totális, esetenként szubtotális eltávolítására irányul, utóbbi elsősorban a commissura anterior és posterior területén lévő papillomatosis esetén, a gyakori postoperatív szövődmények (hegesedés, hártaképződés) elkerülése érdekében végezzük [64]. A sebészi kezelés alapja a leggyakrabban érintett gége feltárása merev eszközzel, a laesiók éles eltávolítása a laryngomicrochirurgiás úton és a laesiók alapjának CO<sub>2</sub> lézer

evaporizációja. Számos intézményben maga az excisio is CO<sub>2</sub> lézerrel történik [32]. A CO<sub>2</sub> lézer előnye a laesiók precíz eltávolításának lehetősége minimális vérzés kíséretében, hátránya a szomszédos szövetek hegesedést okozó termikus sérülése és megfelelő óvintézkedések híján a légúti égés veszélye. A lézer további hátránya a HPV virionok megjelenése a műtő légterében az evaporizáció után, ez a műtő személyzete számára lehet ártalmas [64].

Az utóbbi évtizedben terjedt el a microdebrider használata: ez egy endoszkóposan bevezetett, saját szívóval rendelkező, gyors körkörös mozgást végző integrált pengével rendelkező eszköz, melynek segítségével a laesiók gyorsan és precízen távolíthatók el [130]. Használata termikus sérülést, hegesedést nem okoz [84].

RRP műtéti eltávolításakor a fül-orr-gégész és az aneszteziológus közös munkaterülete miatt kulcsfontosságú **az anesztézia módja**. Legelterjedtebb a spontán ventiláció [50]. A gége jet ventiláció esetén is hozzáférhető marad a fül-orr-gégész számára, hátránya azonban a HPV virionoknak a distalis légutakba történő kerülésének veszélye, pneumothorax vagy pneumomediastinum kialakulása, valamint a nyálkahártya extrém kiszáradása [32]. Az apnoe technika során intubatio után a beteget 100 % oxigénnel átlélegeztetik, majd az endotrachealis tubust időszakosan 90-120 s időtartamokra eltávolítják a gégében lévő laesiók precíz excisiója érdekében. Az endotrachealis intubatio a distalis terjedés veszélye miatt nem ajánlott [32].

Súlyos, akut légzési elégtelenség esetén, elsősorban kisgyermekben urgens **tracheotomiára** lehet szükség [137]. Mivel a hosszú ideig fenntartott tracheostoma területén és a tracheában is laphám metaplasia és ezáltal iatrogen laphám-hengerhám átmenet jön létre, a tracheotomia a RRP trachealis majd bronchopulmonalis terjedésére hajlamosít [60]. Ezen megfontolásból a stomazárást a légúti akadály megszűnetése után a lehető leghamarabb el kell végezni [32].

**Adjuváns kezelésre** a RRP esetek mintegy 10 %-ában kerül sor [64]. Az adjuváns terápiák hatékonyságának megítélését nagymértékben nehezíti az igen alacsony esetszám, a betegek beválogatásának eltérő szempontjai, a nagyban eltérő kezelési protokollok alkalmazása és a megfelelő kontroll csoport hiánya [16]. A legtöbb tanulmány evidenciaszintje (az Oxford Centre for Evidence-Based Medicine kritériumai alapján) 4-es (esettanulmány) vagy 5-ös (esetismertetés) ([www.cebm.net/levels\\_of\\_evidence.asp#levels](http://www.cebm.net/levels_of_evidence.asp#levels)). Megfelelő létszámú beteganyagon elvégzett randomizált, kontrollált, kettős vak vizsgálatok csak az alfa-interferonnal (IFN- $\alpha$ ) kapcsolatban állnak rendelkezésünkre [64]. Az IFN- $\alpha$  egy glikoprotein, melyet elsősorban leukocyták termelnek vírusfertőzés esetén. Antivirális hatását a vírusfertőzött sejtek-

ben több mint 20 különböző effektor protein produkciójának fokozása révén fejt ki, melyek fő támadáspontjai a vírus penetrációjának, a vírusgenom transzkripciójának és translációjának, valamint a virionok összeszerelődésének és sejtből történő kijutásának gátlása [111]. Hosszú távú subcutan alkalmazásával a betegek harmada tartható tartós komplett, további harmada pedig parciális remisszióban [69]. A kezelés leállítása után gyakori a rebound jelenség [32]. Rekombináns DNS technikával előállított formáját alkalmazva az egyébként jelentős akut (influenzaszerű tünetek, láz) és krónikus (májkárosodás, leukopenia, spasticus diplegia, szomatikus retardáció, stb.) mellékhatásai némileg csökkentek [32].

Az antivirális szerek közül a cidofovir alkalmazásával külön fejezet részben foglalkozom. A többi adjuváns (indol-3-karbinol, retinoidok, fotodinámiás kezelés, gastrooesophagealis reflux kezelése, stb.) és antivirális (acyclovir, ribavirin, mumps vakcina, HspE7 vakcina) kezelési mód részletezése meghaladja a jelen értekezés kereteit [16, 64, 130].

A cervicalis HPV infekciók megelőzésére és kezelésére a közelmúltban az Európai Unióban két védőoltást törzskönyvezték: ezek a Gardasil<sup>®</sup> (Merck) és a Cervarix<sup>®</sup> (GSK). Mindkettő rekombináns DNS technikával előállított HPV L1 molekulát tartalmazó vírusszerű partikulum (virus-like particle; VLP), mely aktív módon immunizálja a gazdaszervezetet. Mivel a quadrivalens Gardasil<sup>®</sup> a magas onkogén kockázatú HPV 16 és 18 mellett a HPV 6 és 11 L1 proteinjét is tartalmazza, a közeljövőben a genitális HPV 6 és 11 infekciók incidenciájának csökkenése várható, mely közvetett módon csökkentheti a RRP incidenciáját is [43].

A RRP – bár szövettani szempontból benignus betegség – számtalan veszélyt rejt magában (a kisgyermekkorú légutak gyors elzárása révén okozott fulladásveszély, alsó légúti terjedés és a malignus degeneráció lehetősége). Ezen veszélyek miatt a RRP-ben szenvedő beteg szoros követést és gondozást igényel. A fül-orr-gégész társadalom részéről a betegség relative alacsony incidenciája nehezíti a rizikófaktorok és prognosztikai faktorok feltérképezését, valamint a különböző kezelési módok kellő számú betegen történő objektív megítélését. A probléma áthidalására, a szakma összefogásaként az USA-ban 1993-ban külön szervezet alakult (Task Force on Recurrent Respiratory Papillomas) [33]. A betegek és a hozzátartozók közötti információcserét külön alapítvány (Recurrent Respiratory Papillomatosis Foundation) és honlap ([www.rpf.org](http://www.rpf.org)) teszi lehetővé.

A RRP kiszámíthatatlan természetes kórlefolyása és potenciális veszélyei miatt kétségbeesett próbálkozások irányulnak a betegség rizikófaktorainak feltérképezésére, illetve a már fennálló

RRP esetén a prognózis előrevetítésére. J-RRP esetén a tizenéves anya – elsőszülöttség – per vias naturales szülés triászát, A-RRP esetén a szexuális partnerek összes számát és az orogenitalis szexet tartják általános rizikófaktornak a légúti papillomatosis kialakulása szempontjából [62]. Már meglévő betegség esetén általában a 3 vagy 4 éves kor előtti kezdetet [6, 46, 137] és a HPV 11-es típusát [52, 96, 137] tartják negatív prognosztikai faktornak (betegség teljes tartama, műtétek száma, tracheotomia szükségessége, alsó légúti terjedés veszélye).

### **1.8. Cidofovir alkalmazása recidiv respiratoricus papillomatosisban**

Az aciklikus nukleozid-foszfátok csoportjába tartozó (S)-1-(3-hidroxi-2-foszfonilmetoxipropil)-citozin (cidofovir) számos DNS vírus (EBV, CMV, VZV, HSV, HHV-6, HHV-8, adenovírusok, polyomavirusok, poxvirusok, HPV) replikációjának inhibitora. Bár az Egyesült Államok Gyógyszer- és Élelmiszerügyi Hivatala (Food and Drug Administration; FDA) eredetileg AIDS-betegek cytomegalovirus retinitisének intravénás kezelésére hagyta jóvá használatát, napjainkra azonban – a magas recidiva-hajlammal és a korábbi kezelések kudarcának köszönhetően - légúti papillomatosisban is az egyik leggyakrabban alkalmazott „off-label” adjuváns gyógyszer lett [36].

Első fej-nyaki alkalmazásáról egy kazuisztikában Van Cutsem számol be 1995-ben: egy algaratra és nyelöcsőre lokalizálódó recidiv papillomás nőbeteg sorozatos intralaesionalis cidofovir kezelése kapcsán tartós komplett remissziót ért el [132]. A RRP cidofovir kezelésének betegcsoporton nyert tapasztalataival az utóbbi 10 évben számos közlemény foglalkozik, az első leíró felnőtt betegeknél Snoeck (1998), juvenilis betegeknél Pransky (1999) [95, 118]. Ezekben közös az alacsony esetszám (3-26) és a pár hetes időközönként alkalmazott intralaesionalis gyógyszeradás, az esetek egy részében a laesiók éles eszközzel vagy lézerrel történő eltávolításával együtt. Összefoglalva, a RRP betegek 40-50 %-a kerül tartós remisszióba, ugyanakkor 20%-a lényegében nem reagál cidofovir terápiára [31].

**A cidofovir hatásmechanizmusa HPV-asszociált betegségekben.** A cidofovir (amely eleve egy aciklikus nukleozid-monofoszfát) foszforilációja intracellularisan két lépésben történik: az aktív metabolit az így létrejött cidofovir-difoszfát, mely a nukleozid-trifoszfátok analógja [104]. A cidofovir számos vírus DNS polimeráz enzimjének kompetitív inhibitora. Amennyiben két cidofovir molekula egymás után épül be a DNS láncba, a vírus DNS szintézise meg-

szakad [140]. Megjegyzendő azonban, hogy a humán papillomavírusok nem rendelkeznek saját DNS polimeráz enzimmel, replikációjuk a cellularis DNS polimerázok segítségével történik. A cidofovir tehát – kevésbé szelektíven – a cellularis DNS replikációnak is inhibitora [36].

*In vitro* kísérletekben a cidofovir hatékonynak bizonyult a magas onkogén kockázatú HPV típusokkal asszociált tumorok kezelésében. Me180 (HPV 16 és 18 asszociált cervix carcinoma) és HEP2 (gége laphám carcinoma) sejtvonalakban a cidofovir hatékonyan csökkentette az E6 és E7 onkoproteinek expresszióját, ezt a gátló hatást – szemikvantitatív reverz transzkriptáz-polimeráz láncreakcióval (RT-PCR) igazolva – a transzkripció szintjén fejtette ki. Ennek megfelelően, cidofovir hatására Me180 sejtvonalon a vad típusú p53 tumorszupresszor protein expressziójának növekedését és kifejezett nuclearis akkumulációját észlelték. A cidofovir kezelés a fenti sejtvonalak sugárérzékenységét hatékonyan fokozta [1]. Az E6 mRNS szintje CaSki (HPV 16 és 18 asszociált cervix carcinoma) és SCC90 (HPV 16 asszociált oropharyngealis laphám carcinoma) sejtvonalakban is hatékonyan csökkent cidofovir kezelés és irradiáció együttes alkalmazásakor [113]. *In vivo* állatkísérletekben, egérbe ültetett Me180 és HEP2 xenograftok növekedését a cidofovir gátolta, ez a gátló hatást az egyidejű irradiáció tovább fokozta [1].

HPV pozitív sejtvonalak cidofovir kezelésekor, különböző apoptózis paraméterek vizsgálata (CPP32 proteáz aktivitás, foszfatidil-szerin transzlokációja a plazmamembrán külső rétegébe, a nuclearis matrix protein dezintegrációja, DNS fragmentáció, apoptózisban lévő sejtek arányának növekedése sejtciklus analízis során) során apoptózis indukciót, és a sejtciklus gátlását (S phase arrest) észlelték, mindkettőt a kezelés dózistól és időtartamától függő módon [5].

*In vitro* a recidiv respiratoricus papillomatosis modellezésére szolgáló, HPV6 E6-expresszáló C33AT6E6 sejtvonalak cidofovir-érzékenysége azonban elmaradt a HPV16 E6-expresszáló C33AT16E6 sejtvonalakétól [35]. Az alacsony onkogén kockázatú HPV típusokkal asszociált sejtvonalak előállítása –gyenge immortalizáló potenciáljuknak köszönhetően - sajnos igen nehéz. Épp ezért a cidofovir RRP-ban kifejtett hatásának vizsgálatokor elsősorban kis létszámú betegcsoportokon észlelt klinikai tapasztalatokra szorulunk [36]. *In vivo*, cidofovir terápia után, RRP-ból származó sejtek génextpressziójának soros analízise (serial analysis of gene expression; SAGE) során a sejtproliferációval, a metabolizmussal és a transzporttal kapcsola-

tos gének expressziójának fokozódását, míg a transzkripcióval, a nukleinsav metabolizmus szabályozásával és a jelátvitellel kapcsolatos gének expressziójának csökkenését írták le [93].

**Farmakokinetika.** A cidofovir biológiai hasznosulása (bioavailability) igen gyenge (<5%), ezért CMV retinitis esetén általában intravénásan, vagy HPV asszociált laesiók esetén általában helyileg (külsőleg vagy RRP esetén intralaesionalisan) alkalmazzák [36]. Az intralaesionalis gyógyszeradás a leggyakoribb laryngealis lokalizáció esetén narkózisban, laryngomicrochirurgia útján történik [3, 13, 20, 22, 34, 68, 76, 85, 94, 95, 112, 118, 138]. A gégszeti intralaesionalis alkalmazás alternatív módja a percutan injekció, melynek előnye, hogy helyi érzéstelenítésben elvégezhető; hátránya azonban, hogy csak bizonyos lokalizációk esetén ajánlott (commissura anterior, valódi hangszalagok) és igen nagy tapasztalatot igényel [19]. RRP esetén a systemás gyógyszeradás nem jellemző, bár disseminált bronchopulmonalis terjedés esetén számoltak már be regressziót okozó intravenás alkalmazásról [131].

A sejtekbe folyadékfázisú endocitózissal bekerülő molekula kétlépcsős foszforiláció után nyeri el aktív formáját. Az aktív intracellularis metabolit féléletideje 17-65 óra [104]. A gyakorlatban azonban – RRP intralaesionalis kezelésekor – a cidofovir injekciók kezdeti 2 hetes majd hosszabb intervalluma is hatékonyan csökkenti a papillomatosis kiterjedését [19, 20, 95, 118, 138]. Intralaesionalis gyógyszeradás esetén a cidofovir koncentrációja a szérumban folyadékromatográfiás úton (high performance liquid chromatography; HPLC) mérhető, az általánosan elfogadott intralaesionalis dózis esetén azonban jóval a nephrotoxicus szint alatt marad [86]. Kiürülése a szervezetből vesén keresztül, glomerularis filtratio és tubularis secretio útján történik, utóbbit az egyidejűleg adott probenecid lassítja [104].

**Kiszerelés.** A Vistide<sup>®</sup> 5 mL-es üvegampullája 375 mg vízmentes cidofovir koncentrátumot tartalmaz (75 mg / mL koncentráció). A cidofovir oldata steril fiziológiás sóoldattal hígítható a kívánt mértékre. Szobahőmérsékleten az oldat hónapokig stabil marad [118].

**Dózis, alkalmazási protokollok.** CMV retinitis esetén az egyszeri dózis 5 mg/ttkg. Az indukciós szak két intravenás infúzióból áll egy hetes időközzel, majd a fenntartó szakban további infúziók következnek kéthetes időközzel. RRP sorozatos intralaesionalis cidofovir terápiajában egységes dózis és egységes alkalmazási protokoll nincs, az ezzel kapcsolatos adatokat az Eredmények és Megbeszélés c. fejezetben részletezem.

**A cidofovir kezelés kockázatai. Carcinogenesis.** Rágcsálókban végzett állatkísérletekben emlő adenocarcinoma kialakulását észlelték heti rendszerességgel adott subcutan injekciók után, mely a humán intravénás dózis 0,04-szeresének 19 héten át történő beadása során jelentkezett. Patkányokban a humán intravenás dózis 1,1-szeresének megfelelő legnagyobb sorozatos heti iv. cidofovir dózis adásakor 37 nőtény állatból 22-ben emlő adenocarcinoma, 32 hím állatból 6-ban Zymbal-mirigy carcinoma alakult ki (a Zymbal-mirigy rágcsálókban a külső hallójárat-tól anteroventralisan elhelyezkedő módosult faggyúmirigy) [31]. Főemlősök (cynomolgus majmok) egy éven át tartó, heti – az emberi iv. dózis 0,7-szeresének megfelelő - iv. cidofovir kezelése során malignitás nem jelentkezett [31]. RRP intralaesionalis cidofovir terápiájával összefüggésbe hozható invazív malignus tumort ezidáig emberben sem észleltek [13, 20, 31, 85, 94, 95, 112].

**Nephrotoxicitas.** A cidofovir iv. adása után jelentkező nephrotoxicitas az összdózistól és az ennek megfelelő plazmakoncentrációtól függ. Egy tanulmányban a cidofovir szérumszintje 2,8 mg/ttkg és 4,1 mg/ttkg intralaesionalis adás után is az 1 mg/kg intravénás dózis után várható szérumszint alatt maradt, ugyanakkor az ajánlott iv. dózis CMV retinitisben 5 mg/ttkg [86]. Ennek megfelelően - intralaesionalis adás után – a szérum kreatinin és urea szint rendszeres ellenőrzése mellett nephrotoxicitást nem észleltek [20, 76, 94, 95, 112, 118]. A nephrotoxicitás esélye intravénás adás után orális probenecid adásával, adekvát parenteralis folyadékbevitellel, az injekciók közötti intervallum nyújtásával és proteinuria esetén a terápia felfüggesztésével csökkenthető [131].

**Egyéb mellékhatások.** Májfunkciós zavarokat, neutropeniát, szemtüneteket (szemnyomás csökkenés, iritis, uveitis), bőrkiütéseket RRP intralaesionalis kezelése után nem észleltek [31].

## 1.9. Céljaink

Célunk a HPV DNS státuszának felmérése a DE EOC Fül-Orr-Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Klinika beteganyagában: fej-nyaki carcinomákban, RRP eseteiben, valamint néhány - papillomát és dysplasiát tartalmazó – később malignus degenerációt mutató vegyes elváltozásban (*1. dolgozat, lásd a 91. oldalon*).

Vizsgálatainkat **friss, gyorsfagyasztott szöveteken** végezzük, melyek várakozásaink szerint megfelelő mennyiségű, autolízistől és a hisztológiai feldolgozás hatásaitól mentes DNS-t tartalmaznak.

**Prospektív vizsgálatot** tervezünk, az egyes betegek követése során minél több szövetminta virológiai feldolgozására törekszünk a HPV infekciók természetes kórlefolyásának tanulmányozása érdekében.

**Főbb kérdéseink** a következők.

1. Milyen arányban mutatható ki HPV DNS az egyes betegcsoportokban?
2. Mely HPV típusok detektálhatók?
3. Milyen a HPV DNS fizikai állapota?
4. Milyen a HPV DNS kópiaszáma?
5. Van-e összefüggés carcinomák esetében a HPV DNS státusza és a betegek klinikai (életkor, nem, dohányzás, alkoholfogyasztás) és patológiai (pT, pN, grade, lokalizáció) paramétereik között?
6. Van-e HPV DNS státusz vizsgálatának prognosztikai értéke?
7. Hogyan befolyásolja a HPV DNS státuszát az RRP adjuváns intralaesionalis cidofovir terápiaja? (*2. dolgozat, lásd a 91. oldalon*)

## 2. BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

### 2.1. Beteg kiválasztás és –követés (1. dolgozat)

Vizsgálatainkat a DEOEC Fül-Orr-Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Klinika fekvőbetegei körében végeztük 2001. márciusa és 2006. októbere között. A malignus tumoros betegeket – a kórszövettani diagnózis ismeretében kuratív műtétre kerülő betegek közül – véletlenszerűen választottuk ki. A papillomás betegcsoportban a kórszövettanilag már igazolt esetek recidívája esetén igyekeztünk a Klinika teljes beteganyagát bevonni a vizsgálatba, ill. törekedtünk valamennyi recidívából történő friss mintavételre virológiai vizsgálatok céljából. A kórszövettanilag még nem igazolt esetekben a papillomatosisnak – praeoperatív vizsgálatok során felvetődött - gyanúja is elegendő volt a mintavételhez (a papillomatosiszt a hisztopatológiai vizsgálat végül is valamennyi ilyen esetben alátámasztotta). Minden mintavételnél feltétel volt a személyes jelenlétem, mivel a mintavételt vagy én magam végeztem, vagy az operációs mikroszkóp segédokulárjával követtem az operátor által endoscopos úton végzett műveletet. A személyes távollétem sajnos limitálta a vizsgálatba bevonható betegek számát.

A betegkövetésnél a MEDSOLUTION 97 adatbázisban a DE OEC intézményeiben történt ambuláns és fekvőbeteg megjelenéseket vettük figyelembe. A követési idő az első virológiai mintavételtől a betegek utolsó megjelenéséig tartott. Az adatbázis utolsó ellenőrzése 2008. július 12-én történt.

**2.1.1. A carcinomás betegcsoport.** Az értekezésben az oropharynx, a hypopharynx és a gége daganatait nevezem összefoglalóan fej-nyaki daganatnak, mivel valamennyi vizsgált szövetmintánk ezen három szerv valamelyikéből származott. A vizsgálatba történő bevonáskor rögzítettük a betegek nemét, életkorát, a tumor lokalizációját, a klinikaival összevetett patológiai TNM stádiumát, pontos szövettani típusát és differenciáltsági fokát (grade; G) [139].

A malignus tumoros betegcsoportba 31 férfi és 2 nő került, átlagéletkoruk 54,5 év (37-71 év) volt. A **szövettani diagnózis** 32 esetben carcinoma planocellulare és 1 esetben adenocarcinoma volt. A 33 carcinoma esetében hisztológiai szempontból 9 esetben G-I, 8 esetben G-II, 16 esetben G-III elváltozást észleltünk.

**Lokalizáció** szerint a carcinoma 15 esetben laryngealis (8 esetben supraglotticus+glotticus, 3 esetben glotticus, 3 esetben supraglotticus, 1 esetben glotticus+subglotticus), 5 esetben oropharyngealis, 1 esetben hypopharyngealis, 8 esetben laryngo-hypopharyngealis, 3 esetben laryngo-oropharyngealis és 1 esetben laryngo-trachealis volt. A **primer tumor patológiai T stádiuma** 9 esetben T1-2, 24 esetben T3-4 volt.

A betegek **patológiai N stádiumának** megoszlása a következő volt: N0: 18 esetben; N1: 9 esetben, N2: 6 esetben. **Távoli áttéte** a vizsgálat kezdetén egyik betegnek sem volt, egy esetben azonban nyaki nyirokcsomó-metastasis a környező harántcsíktolt izomszövetbe tört.

Két beteg esetében a virológiai mintavételt már a vizsgálat kezdetén recidiv carcinomából végeztük: esetükben az első – parciális rezekcióval járó – műtét után 37, ill. 8 hónappal került sor a második műtétre.

A követés során rögzítettük a teljes követési időt, a recidivamentes túlélést (az utolsó recidivamentes megjelenésig számolva, ez a tumormentes betegeknél megegyezett a teljes követési idővel), a localis recidivákat, a regionális nyirokcsomó recidivákat és a távoli áttéteket. A teljes **követési idő** átlaga a malignus tumoros csoportban 29,9 hónap (0-78 hónap) volt. Egy beteg a műtét után többé nem jelent meg a Klinikán. A recidivamentes túlélés átlagosan 24,9 hónap (0-78 hónap) volt.

Tizenkét beteg a teljes követési idő alatt **tumormentes** volt. **Lokális recidiva** 10 esetben, **regionális nyirokcsomó recidiva** 8 esetben, **távoli áttét** 2 esetben jelentkezett. Kilenc beteg **exitált** lokális recidiva vagy regionális nyirokcsomó recidiva következtében. Egy beteg az alapbetegségtől független ok következtében hunyt el.

**2.1.2. A papillomás (RRP) betegcsoport.** Az ebbe a csoportba soroláshoz alapfeltétel volt a papilloma – dysplasiás jelek nélküli - szövettani diagnózisa. A betegek nagy részének anamnézisében már szerepelt RRP. A csoportba azonban bekerült két olyan beteg is, akiknek az esetében a praeoperatív klinikai vizsgálatok során vetődött fel fel RRP lehetősége és ezt – a virológiai vizsgálattal egyidőben elvégzett - szövettan is igazolta. A vizsgálat kezdetén rögzítettük az életkort, a nemet, az anamnesztikus adatokat (lásd a 3. táblázat adatait) és a lokalizációt. Két betegben korábban már végeztünk virológiai vizsgálatot a formalinban fixált, paraffinba ágyazott archív szövetekből az általunk már közölt metodika szerint [26, 75].

Sor-szám	Nem	RRP kezdete	Korábbi lokalizáció	Korábbi műtétek száma	Korábbi szövettan	Korábbi HPV státusz	Korábbi adjuváns terápia	Korábbi követési idő
<b>J-RRP</b>								
J1	F	1 év 11 hó (1,92)	gége	1 <sup>1</sup>	P <sup>2</sup>	-	-	0
J2	F	1 év 6 hó (1,5)	gége (1-20) lágyszájpad (20)	20	P	-	IFN	6 év
J3	F	2 év 2 hó (2,17)	gége	7	P	11 (2.) 11 (3.) 11 (4.) 11 (5.) 11 (6.)	IFN	7 év
J4	F	3 év 1 hó (3,08)	gége	0	-	-	-	0
J5	N	8 év	gége	3	P <sup>2</sup>	-	nem	18 év
J6	F	12 év	gége	3	P <sup>2</sup>	-	nem	50 év
<b>A-RRP</b>								
A1	N	18 év	gége	1	P <sup>2</sup>	-	nem	2 hó
A2	F	26 év	lágyszájpad	2	P <sup>2</sup>	-	nem	2 év
A3	F	28 év	gége	2	P	-	nem	3 év
A4	F	30 év	gége	1	P <sup>2</sup>	-	nem	5 év
A5	F	33 év	gége	5	P	11 (2.) 11 (3.)	IFN	3 év
A6	F	35	orrüreg	0	-	-	-	0
A7	F	37 év	gége	1	P <sup>2</sup>	-	nem	2 év
A8	N	71	gége	2	P <sup>2</sup>	-	nem	10 hó

**3. táblázat.** A papillomás betegcsoport anamnesztikus adatai. J-RRP = juvenilis kezdetű recidiv respiratoricus papillomatosis; A-RRP = felnőttkori kezdetű recidiv respiratoricus papillomatosis; Korábbi követési idő = a RRP első diagnózisa és a prospektív vizsgálatunk kezdete között eltelt idő. Két beteg HPV típusát a betegek archív szöveteinek korábbi virológiai feldolgozása útján ismerjük; F = férfi; N = nő; P = papilloma, dysplasia nélkül; <sup>1</sup> = tracheotomia és szövettani mintavétel más intézményben; <sup>2</sup> = a szövettani diagnózis nem intézményünkben született; IFN = alfa-interferon.

A papillomás betegcsoport 14 betegből 6 juvenilis kezdetű (J-RRP), 8 felnőttkori kezdetű (A-RRP) papillomatosisban szenvedett. A **J-RRP csoportban** a betegség kezdetén az átlagéletkor 4,78 év (1,9-12 év) volt, a leggyakoribb lokalizációnak a gége bizonyult. Az első diagnózistól a jelen vizsgálat kezdetéig eltelt idő 0-50 év között volt, ezalatt a betegek átlagosan 5,67 (0-20) műtéten estek át. Ketten részesültek adjuváns IFN- $\alpha$  terápiában. A J-RRP csoportból két beteg a vizsgálat kezdetén felnőtt korú volt (26 ill. 62 évesek). Az **A-RRP csoportban** a papillomatosis diagnózisa átlagosan 34,75 éves (18-71 év) korban született. Két kivétellel (A2 és A6 beteg) a leggyakoribb lokalizáció itt is a gége volt. Az első diagnózistól a jelen vizsgálatig átlagosan 2 év (0-5 év) telt el, a betegek ezalatt átlagosan 1,75 (0-5) műtéten estek át. Adjuváns IFN- $\alpha$  kezelést egy beteg kapott.

A **prospektív vizsgálati időszak** az első (néhány esetben egyetlen) friss műtéti virológiai mintavételtől indult.

**2.1.3. Papillomát és dysplasiát tartalmazó, a követés során malignusan degenerált elváltozások.** Ebbe a betegcsoportba az az öt beteg került, akiknek az anamnézisében szereplő műtétek szövettani lelete kezdetben esetleg csak papillomát vagy a papilloma mellett eleve különböző mértékű dysplasiát is igazolt. A benignus és a praemalignus elváltozás a későbbiekben az ismételt mintavételek során egyidejűleg megfigyelhető. A folyamat végül valamennyi esetben – vagy már a prospektív vizsgálati periódusunk kezdetén vagy az alatt - malignus degenerációt mutatott.

Valamennyi esetben a kezdeti lokalizáció a gége volt, azon belül 4 esetben glotticusan, 1 esetben glotticusan és supraglotticusan helyezkedett el az elváltozás. Megjelenését tekintve az esetek többségében széles alapú, egyenetlen felszínű, akár mindkét – eleinte jól mozgó - hangszalagot érintő laesiót észleltünk, jól körülírt, solitaer papillomát csak egy beteg első jelentkezésekor láttunk.

A betegek részletes kórtörténetét és szövettani leleteit az Eredmények és megbeszélés c. fejezetben a 10. táblázatban ismertetem.

Az 5 beteg (4 férfi és 1 nő) átlagéletkora a vegyes elváltozás első észlelésekor 51 év (44-60 év) volt, ettől kezdve a carcinoma első diagnózisáig átlagosan 41,6 hónap (13-71 hónap) telt el. A carcinoma diagnózisától az utolsó megjelenésig számított követési idő átlaga 31,2 hónap (5-58 hónap) volt. A követési idő végére egy beteg lokális recidiva és távoli metastasisok miatt exitált, egy betegnek regionális nyirokcsomó recidivája jelentkezett, 3 beteg pedig tumormentes volt.

A teljes követési idő alatt a betegek átlagosan 5,6 (4-7) szövettani mintavétellel is járó beavatkozáson estek át. A carcinoma diagnózisához szükséges műtétek számának átlaga 4 volt (3 és 6 között). Betegenként 1-3 virológiai mintavételt végeztünk, két esetben csak a már malignus elváltozásból.

## **2.2. Viroológiai mintavétel (1. és 2. dolgozat)**

A virológiai vizsgálatra szánt mintavételnél alapvető szempont volt, hogy a legalább 3x3x3 mm-es szövetet az elváltozás centrumából nyerjük. Feltétel volt az is, hogy a mintavétellel ne befolyásoljuk a pontos kórszövettani diagnózis lehetőségét: kisebb papillomák esetén ügyelnünk kellett a szövet elegendő térfogatára, carcinomák esetén pedig arra, hogy a műtéti rezekciós vonalat ne érintsük (az éppen történő kimetszés megítélése érdekében). A papillomák esetén a kórszövettani mintavétel az elváltozás CO<sub>2</sub> lézer evaporizáció előtti éles eltávolításakor, carcinomák esetén közvetlenül a szerv eltávolítása után, annak fixálószerbe történő helyezése előtt történt. Az eltávolított szöveteket azonnal szárazjégbe téve szállítottuk át az Orvosi Mikrobiológiai Intézetbe, ahol további feldolgozásig -70 °C-on tároltuk.

## **2.3. HPV DNS detektálás PCR technikával (1. és 2. dolgozat)**

Mintáinkból a DNS-t fenol-kloroform-izoamilalkohol 25:24:1 arányú elegyével nyertük ki, az extraktum DNS tartalmát és tisztaságát spektrofotometriás úton ellenőriztük. A DNS integritását a humán  $\beta$ -globin gén egy 110 bp szakaszát amplifikáló PC03/PC04 PCR segítségével ellenőriztük. A HPV DNS detektálásának első lépése az MY09/MY11 konszenzus PCR volt, mely számos nyálkahártya-asszociált HPV típus genomjának L1 régiójából egy 450 bp szakaszt amplifikál. A 25  $\mu$ L végtérfogatú reakcióelegy 1x enzimspecifikus gyári összeállítású puffert, 200-200  $\mu$ M dNTP-t, továbbá 25-25 pmol MY09 (CGTCCMARRGGAWACTGATC) és MY11 (GCMCAGGGWCATAAYAATGG) primert, 1 U (GoTaq) polimerázt és 2  $\mu$ L mintát tartalmazott. Az MY09/MY11 PCR 40 ciklusa az alábbi lépésekből állt: denaturálás (96 °C, 20 s), annealáció (50 °C, 5 s), extenzió (72 °C, 90 s). A 40 ciklus után egy végső extenziós lépés következett (72 °C, 90 s).

A HPV DNS detektálásának második körét GP5+/GP6+ konszenzus (nested) PCR-rel végeztük, mely – szintén a legtöbb nyálkahártya-asszociált HPV típus esetében – az MY09/MY11 PCR által amplifikált 450 bp szekvencián belül egy 145 bp szakaszt detektál. Az 50  $\mu$ L végtérfogatú reakcióelegy a következő összetevőket tartalmazta: 1x gyári összeállítású enzimspecifikus puffer, 200-200  $\mu$ M dNTP, 50-50 pmol GP5+ (TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC) és GP6+ (GAAAATAAACTGTAAATCATATTC) primer, 2,5 U (GoTaq) polimeráz, valamint 1  $\mu$ L MY körből származó minta. A GP5+/GP6+

PCR egy kezdeti denaturálás (94 °C, 4 min) után a következő lépések 35 ciklusát tartalmazta: denaturálás (94 °C, 60 s), annealáció (48 °C, 90 s) és extenzió (72 °C, 90 s). A 35 ciklus után itt is egy végső extenzió következett (72 °C, 2 min).

A PCR termékeket agaróz gélelektroforézis (etidium-bromiddal festett 1,5 % agaróz gélben, 100 V, 1 h) után ultraibolya fényben értékeltük.

#### **2.4. HPV tipizálás restrikciós enzimhasítással (1. és 2. dolgozat)**

A HPV DNS pozitív PCR produktumok 5 µL-ét 2 µL (10 U/µL) *RsaI*, valamint *MseI* restrikciós endonukleázzal - 1x restrikciós enzim puffer jelenlétében - 20 µL végtérfogatban hasítottuk. Inkubáció (37 °C, 2 h) után a létrejött fragmentumokat 21 %-os nem denaturáló poliakrilamid gélen futtattuk, majd ezüstfestéssel detektáltuk, és a futási képet referencia plazmidokból nyert, *RsaI* és *MseI* restrikciós enzimekkel hasított GP amplimerek elektroforetikus mintázatához viszonyítottuk. Pozitív kontrollként HPV 6, 11, 16 és 18 DNS-t tartalmazó referencia plazmidokat használtunk.

#### **2.5. A HPV DNS fizikai állapotának meghatározása az E1-, E2- és E1E2 régióra specifikus PCR-rel (1. és 2. dolgozat)**

Integráció során a HPV genom – a bevezetésben leírtak szerint - leggyakrabban az E1 vagy az E2 ORF területén hasad fel. A HPV 6, 11 és 16 DNS pozitív mintákon elvégzett E1-, E2- és E1E2-specifikus PCR-ek primereit, produktumait és paramétereit a 4. táblázatban foglalom össze. A PCR amplifikációs keverék tartalma a következő volt: 1x RedTaq PCR puffer (Sigma, Poole, Dorset, Egyesült Királyság) 1,1 mM MgCl<sub>2</sub>-dal, 100 µL dNTP (Promega, Mannheim, Németország), 0,2 µg primer, 2,5 U RedTaq polimeráz (Sigma) és 2 µL (0,1-0,3 µg) DNS, 50 µL végtérfogatban.

A PCR termékeket agaróz gélelektroforézis (etidium-bromiddal festett 1,5 % agaróz gélben, 100 V, 1 h) után ultraibolya fényben értékeltük.

HPV típus	Primer megn.	szekvencia és genomikus pozíció	PCR termék	PCR paraméterek
6	E1	E1/1: 5' - GGC ACA GCA GGA ATA TTG GA-3' (nt 1403-1422) E1/2: 5' - GAT GTT ACT AGC AGA GGT GG - 3' (nt 2513-2532)	1130 bp	1 ciklus: 94 °C, 2:00 min 40 ciklus: 94 °C, 1:00 min; 50 °C, 1:30 min; 72 °C, 1:30 min 1 ciklus: 72 °C, 2:00 min
	E2	E2/1: 5' - TTA GAT GCG TGC CAG GAA CA - 3' (nt 2745-2764) E2/2: 5' - TGC ACT ATA GGC GTA GCT GA - 3' (nt 3570-3589)	845 bp	
	E1E2	E1E2L: 5' - CAG GCA CAG CAG GAA TAT TG - 3' (nt 1250-1269) E1E2R: 5' - TTG GAC TCC TCG TGC TCG TT - 3' (nt 3436-3455)	2206 bp	
11	E1	E1/1: 5' - GGC ACA GCA GGA ATA TTG GA - 3' (nt 1688-1707) E1/2: 5' - GAT GTT ACT AGC AGA GGT GG - 3' (nt 2749-2768)	1081 bp	Lásd HPV 6 E1E2 PCR, de annealációs T = 52 °C (E1E2 PCR); 35 ciklus
	E2	E2/1: 5' - TTA GAT GCG TGC CAG GAA CA - 3' (nt 2704-2723) E2/2: 5' - TGC ACT ATA GGC GTA GCT GA - 3' (nt 3734-3753)	1050 bp	
	E1E2	E1E2L: 5' - CAG GCA CAG CAG GAA TAT TG - 3' (nt 1391-1410) E1E2R: 5' - TTG GAC TCC TCG TGC TCG TT - 3' (nt 3306-3325)	1935 bp	
16	E1 <sup>1</sup>	E1/1: nt 1796-1815 E1/2: nt 2863-2881	1086 bp	Lásd HPV 6 E1E2 PCR, de annealációs T = 55 °C; 35 ciklus
	E <sup>2</sup>	E2/1: nt 2734-2753 E2/2: nt 3853-3872	1139 bp	
	E1E2 <sup>3</sup>	E1E2L: nt 1808-1827 E1E2R: nt 3532-3551	1744 bp	

**4. táblázat.** HPV 6, 11 és 16 típusok esetén elvégzett E1, E2 és E1E2 specifikus PCR-ek. <sup>1</sup>Chen és mtsai [18], <sup>2</sup>Das és mtsai [28]; <sup>3</sup>Szarka és mtsai [126]

## 2.6. A HPV DNS fizikai állapotának meghatározása Southern-blot hibridizációval (SBH) (1. dolgozat)

A SBH technikával az E1, E2 és E1E2 specifikus PCR-ek pozitivitása esetén a mintában egyidejűleg integrált fizikai állapotú HPV DNS-t kerestünk. Kb. 5 µg DNS-t emésztettünk HPV 6 esetében a HPV genomot nem hasító *EcoRI* és egy helyen hasító *BamHI*, HPV 11 esetében a HPV genomot nem hasító *BglII* és egy helyen hasító *BamHI* restriktív enzimmel, majd a DNS-t agaróz gélelektroforézis után kapilláris transzferral blottoltuk át pozitív töltésű nylon filterre (Boehringer Mannheim). A HPV specifikus szekvenciák azonosításához típus specifikus próba DNS-t használtunk. A próba DNS jelölése, a hibridizáció és a jeldetektálás a Boehringer Mannheim Digoxigenin DNA Labelling and Detection Kit felhasználásával, a gyártó ajánlása szerint történt, kemilumineszcens detektálási módszer alkalmazásával.

A PCR technikákhoz képest relative kisebb szenzitivitása és nagy minta DNS igénye miatt a SBH rutinszerű alkalmazását a tanulmány során később felfüggesztettük, az így megvizsgált mintákat az Eredmények és megbeszélés c. fejezetben a 8. táblázatban külön feltüntettem.

### **2.7. Az E1-, E2-, E1E2- és az MY09/MY11-specifikus PCR érzékenységének összehasonlítása (1. dolgozat)**

Az E1-, E2-, E1E2- és az MY09/MY11-specifikus PCR érzékenységét azoknak egy HPV 6 pozitív betegminta tízszeres hígítási sorozatának tagjain történő elvégzésével hasonlítottuk össze.

### **2.8. HPV DNS pozitív papillomás és carcinomás minták kópiaszámának összehasonlítása (1. dolgozat)**

A nested PCR-rel HPV 6 pozitívnak bizonyult néhány carcinomás és papillomás, valamint HPV 11 pozitívnak bizonyult néhány carcinomás és papillomás minta kópiaszámát HPV 6 és 11 genomot tartalmazó pBR322 plazmid tízszeres hígítási sorozata segítségével hasonlítottuk össze (1 µL oldat  $2 \times 10^9$ ,  $10^9$ ,  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  és 10 kópia HPV DNS-t tartalmazott). A kalibráló hígítási sorozaton és a – spektrofotometriás úton mérve - 1 µg DNS-t tartalmazó mintákon elvégezve az MY09/MY11 PCR-t, az amplimerek agaróz gélelektroforézise után a minták kópiaszámát a kalibráló oldatsor segítségével, a csíkok denzitometriás mérésével becsültük.

### **2.9. A HPV DNS kópiaszámának meghatározása real-time PCR technikával (1. és 2. dolgozat)**

A HPV DNA kópiaszámának meghatározása az Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System és ABI SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, PN, USA) segítségével történt. A PCR amplifikációt 20 µL végtérfogatban végeztük, melynek tartalma a következő volt: 1x ABI SYBR Green PCR Master Mix, 5 pmol MY09 és MY11 primer, valamint 10 ng templát DNS. Az amplifikáció egy kezdeti denaturáló lépés (95 °C, 10 min) után a következő

lépések 45 ciklusából állt: denaturálás (95 °C, 20 s), annealáció (52 °C, 20 s) és extenzió (60 °C, 1 min). A fluoreszcencia spektrumokat minden PCR ciklus elongációs lépése során regisztráltuk. A SYBR Green jelenlétében létrejött PCR termékek azonosítása és ellenőrzése céljából olvadáspont analízist végeztünk 60 °C-tól 95 °C-ig 0,1 °C/s léptékkal. A vírusgenom kópiaszámát HPV 11 plazmid DNS segítségével felvett standard görbe segítségével ( $10^{11}$ - $10^0$  kópia/ $\mu$ L) határoztuk meg.

## **2.10. A HPV DNS pozitivitás összefüggésének vizsgálata a carcinomás betegek klinikopatológiai paramétereivel és a betegség kimenetelével (1. dolgozat)**

A carcinomás betegcsoportban a HPV pozitivitás és a betegeknek a diagnózis idején rögzített klinikai (életkor, nem, dohányzási és alkoholfogyasztási szokások), valamint patológiai (pT, pN, pM, lokalizáció, differenciáltsági fok) jellemzői közötti összefüggéseket a SPSS 15.0 for Windows statisztikai szoftver segítségével, logisztikus regresszióval vizsgáltuk, a nyers esélyhányados (crude odds ratio; OR) és p értékek feltüntetésével. Az erős férfi túlsúly miatt az eredményeket a betegek nemére korrigáltuk.

A fent említett klinikopatológiai jellemzőknek és a HPV pozitivitásnak a betegség kedvezőtlen kimenetelére (poor outcome) gyakorolt hatását is megvizsgáltuk logisztikus regresszióval. A kedvezőtlen kimenetel a követés során bármikor megjelenő lokális recidivát, regionális nyirokcsomó recidivát vagy távoli áttétet jelentett.

## **2.11. A HPV DNS vizsgálata intralaesionalis cidofovir terápia során (2. dolgozat)**

A papillomás betegcsoportban szereplő, 1994-ben született fiú (J2 beteg) távolabbi anamnesisében koraszülöttség (30 gestációs hétre) és adenotomia szerepel. Másfél éves korában (1996-ban) tartós rekedtség háttérében laryngomicroscopia (LMC) és szövettani mintavétel útján RRP igazolódott. A cidofovir terápia elindításáig 28 alkalommal részesült éles eszközzel vagy CO<sub>2</sub> lézerrel történő papilloma eltávolításban. 1999. júniusától a DE OEC Fül-Orr-Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Klinika betege, ekkor indult sc. IFN- $\alpha$  terápiaja, mely több mint öt éven át, a cidofovir kezelés kezdetéig tartott. 2001. augusztusában a gége mellett a lágyszájpadon is papillomák jelentek meg. A kombinált (sebészi + IFN) terápia ellenére

papillomatosisa a Doyle-kritériumok alapján agresszívvé vált (legalább 10 műtét az anamnézisben, egy éven belül 3 vagy több beavatkozás és/vagy distalis terjedés a subglottis szintje alá) [37]. 2004. augusztusában heveny légúti obstructio miatt urgens tracheotomia történt. A tracheostomát – a közben is gyakori fulmináns recidivák miatt - 2005. márciusáig, a cidofovir terápia kezdetéig kénytelenek voltunk fenntartani.

A cidofovir terápiát Chetri protokolljának módosítása alapján végeztük [20]. Az eredeti protokoll szerint az első 4 injekciót kéthetes időközönként adják, ezután a további injekciók intervalluma fokozatosan egy héttel nő (0, 2, 4, 6, 9, 13, 18, 24 hét, stb.). Betegünk az injekciókat 0, 2, 4, 8, 12, 16, 24, 42 és 55 hétre kapta.

A LMC-t Kleinsasser-féle merev eszközzel, általános érzéstelenítésben végeztük (az endotrachealis intubatio a 7. kezelésig fenntartott tracheostomán át, az utolsó két alkalommal a perzisztáló tracheocutan fistulán át történt). A légyszájpad lokalizáció esetén a garat feltárása az altatásos mandulaműtéteknél használatos szájterpesszel történt.

A műtéti feltárás után első lépésként a papillomatosis kiterjedésének kvantitatív meghatározását végeztük a Derkay-skála alapján [30]. Ez a skála a 2. ábrán látható lokalizációk esetén külön-külön egy 0 és 3 közötti pontértéket határoz meg (0 = nincs laesio; 1= felszíni laesio; 2 = előemelkedő laesio; 3 = tömeges laesio).

A kétgócú betegség pontosabb követése érdekében a gége és a légyszájpad pontszámát külön-külön vezettük, nem az eredeti skála szerinti összpontszámot (papilloma severity score; PSS) használtuk a terápia sikerének követésére. A PSS értékek rögzítése után a laesiókat éles eszközzel eltávolítottuk, alapjukat CO<sub>2</sub> lézerrel evaporizáltuk. A cidofovirt az eredeti ampullából 5 ml-es fecskendővel és steril tűvel szívtuk fel (40 mg egyszeri összdózist számolva), majd fiziológiás sóoldattal hígítottuk a kívánt mértékre. A légyszájpad lokalizáció esetén 5 mg/mL (2-2 mL a légyszájpad szabad szélének bal és jobb oldalán a submucosába), a gégeben – a jóval szűkebb anatómiai viszonyok miatt – 10 mg/mL koncentrációt alkalmaztunk (1-1 mL mindkét valódi hangszalag állományába). Figyelembe véve a légutakba került pár század mL-es veszteséget, a 35 kg-os gyermek kb. 1 mg / ttkg egyszeri összdózist kapott).

<b>GÉGE:</b>			
Epiglottis			
Lingualis felszín	_____		Laryngealis felszín _____
Aryepiglotticus redő:	_____	jobb _____	bal _____
Álhangszalagok:		jobb _____	bal _____
Hangszalagok:		jobb _____	bal _____
Arytájak:		jobb _____	bal _____
Commissura anterior	_____		Commissura posterior _____
Subglottis:	_____		
<b>TRACHEA</b>			
Felső harmad	_____		
Középső harmad	_____		
Alsó harmad	_____		
Bronchusok:	jobb _____		bal _____
Tracheostoma:	_____		
<b>EGYÉB:</b>			
Orr	_____		
Szájpad	_____		
Garat	_____		
Nyelőcső	_____		
Tüdők	_____		
Egyéb	_____		
<b>ÖSSZPONTSZÁM</b> _____			

**2. ábra.** A Derkey-skála a papillomatosis kiterjedésének kvantitatív megítélésére

Rutin kórszövettani vizsgálatra minden esetben küldtünk mintát, amennyiben a beteg nem volt teljes remisszióban. A szövetszövetmintát másik részét gyorsfagyasztás után virológiai vizsgálat céljából tároltuk. Virológiai vizsgálatra a teljes remisszió esetén is vettünk szövetszövetmintát a korábbi laesio helyéből.

A cidofovir hatásának vizsgálatára, kontrollként a beteg korábbi 5 virológiai feldolgozásra szánt szövetszövetmintáját használtuk fel, ezeket a cidofovir terápia kezdete előtt 190, 165, 131, 53 és 41 héttel vettük.

A HPV DNS detektálása MY09/MY11 és GP5+/GP6+ PCR technikával, a vírusgenom fizikai állapotának meghatározása E1-, E2- és E1E2-specifikus PCR technikával, a vírusgenom kópiaszámának meghatározása real-time PCR technikával, a korábban leírtak szerint történt.

A terápia befejezése után, ellenőrző vizsgálatként – a rutin indirect laryngoscopyán túl - 76 hétnél ambuláns 70°-os merev eszközzel videolaryngoscopyát, 117 hétnél altatásban LMC-t és a recidiv laesiók eltávolítását végeztük.

Egyszeri intralaesionalis cidofovir adást – gyakorivá vált recidivák miatt - egy felnőtt beteg (A3) 6. műtéténél is végeztünk.

### 3. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

#### 3.1. Metodikai megfontolások (1. és 2. dolgozat)

**A kontroll csoport kérdése.** Friss mintavételről lévén szó, kontroll csoport kialakítása igen nehéz. Helyi érzéstelenítésben is könnyen feltárható régió az oropharynx, ráadásul a nagy számban végzett gyermek és felnőtt tonsillectomia nem és esetleg kor szerint is megfelelő kontroll csoportot kínál. Esetünkben azonban mind a carcinomák mind a papillomák esetén a leginkább érintett régió a gége volt, amelynek HPV pozitívítási arányai lényegesen eltérnek az oropharynxtól [54, 67, 125]. Lokalizáció szerint is megfelelő kontroll csoporthoz nem neoplasticus és nem praeneoplasticus elváltozásban szenvedő betegek narcosisban végzett műtétei jöhetnek szóba: énekescsomó vagy hangszálpolypok eltávolítása. Ezekben az esetekben azonban a rutin szövettani vizsgálat mellett kérdéses, hogy virológiai mintavételre marad-e megfelelő térfogatú szövet. A laryngitis chronica hyperplastica műtéte bőséges szövetmintát adhatna virológiai vizsgálatra is, azonban ezen elváltozás esetleges praecancerosis szerepe nem egyértelmű. A Reinke-oedema az idült, erős dohányzással történő szoros asszociációja miatt nem képez ideális kontroll csoportot, mivel a HPV fertőzések és a dohányzás kapcsolata nem tisztázott. Friss mintavétel esetén tehát kor, nem és lokalizáció szerint is megfelelő, garantáltan tumormentes kontroll csoport kialakítása lényegében lehetetlen.

Az eset-kontroll tanulmányok többsége vagy archív szövetminták vizsgálatával készül [23, 55, 98], vagy a HPV DNS detektálására szövetminta helyett szájjüregi öblítőfolyadékkal vagy citológiai kefével vett exfoliált sejteket használ fel [54, 98, 125]. Az exfoliált sejtek HPV DNS pozitívítása azonban eltér a biopsziák HPV DNS pozitívításától, ráadásul öblítőfolyadék esetén a lokalizációra sem specifikus [98]. Egy tanulmány szerint a biopsziával HPV DNS pozitívnak bizonyult szájjüregi carcinomák 90 %-a esetében az exfoliált sejtek HPV negatívak voltak [54]. Az eset-kontroll tanulmányok egy további csoportja pedig L1, L2, esetleg E7 protein ellenes antitesteket vizsgál szérumban [55, 98]. A szerológiai eredmények azonban nem lokalizáció-specifikusak, a múltban lezajlott HPV fertőzések és a HPV-ellenes immunitás is nagyban befolyásolja eredményüket, ráadásul főleg carcinomák esetén nem obligát esemény a késői HPV proteinek expressziója [54, 82, 98].

A kontroll csoport igényét elsősorban az a tény teremti meg, hogy tumormentes egyének fej-nyaki nyálkahártyáiban is detektálható HPV DNS. Gyermekkori tonsillectomiás minták 2%-a volt HPV pozitív (50 mintából 1 tartalmazott HPV 11 DNS-t), a HPV fertőzés szövettani jelei nélkül [114]. Clayman és mtsai 30 tumormentes archív gége ill hypopharynx szövetminta vizsgálata során 1 esetben detektáltak HPV DNS-t [23]. Garcia-Milián 25 tumormentes gégeből 3-ban talált HPV 6 DNS-t, egyben HPV 6 és 16 koinfekciót [48]. Fej-nyaki carcinomák HPV pozitivitást vizsgáló eset-kontroll tanulmányinak meta-analízisei során a magas onkogén kockázatú HPV 16 DNS jelenléte tumormentes fej-nyaki nyálkahártyákban 3,8-5,7 % között alakult [98].

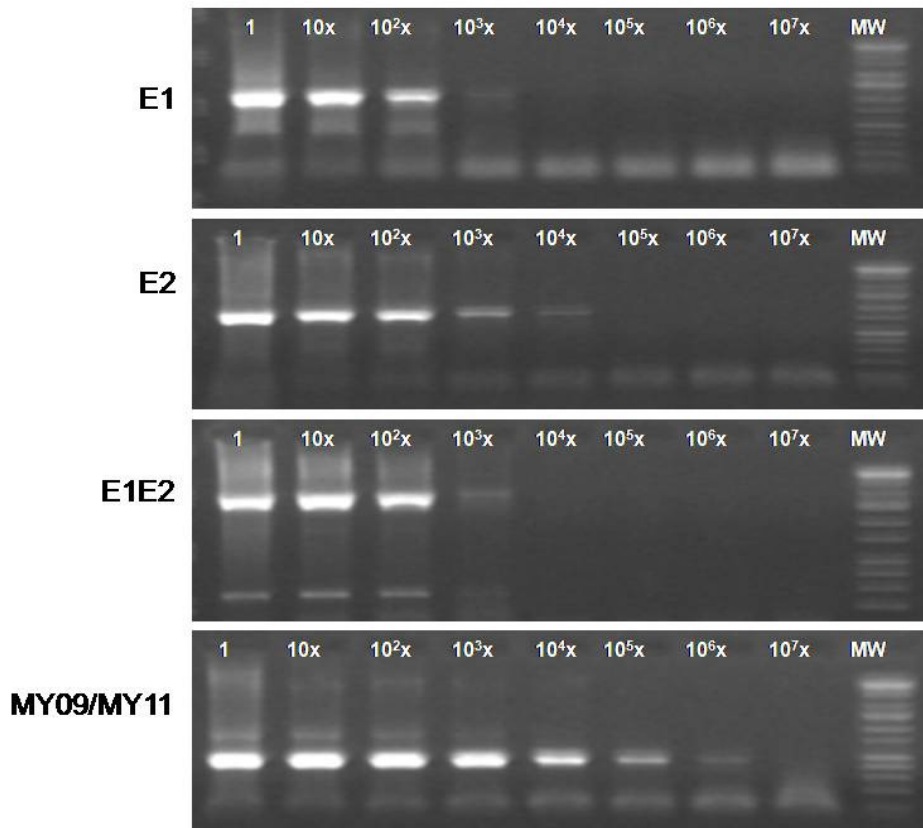
**Mintavétel.** Az előző fejezetrész választ ad arra, hogy – a HPV antigénekkal szemben - miért a DNS-t, és – az exfoliált sejtekkel szemben - miért a szövetmintákat választottuk vizsgálatunk tárgyának. A friss minták azonnali fagyasztása az autolysis során az endonukleáz aktivitás következtében degradált DNS miatti fals negativitás megelőzésére szolgál [82]. A friss szövetminta előnye a formalinban fixált és paraffinba ágyazott mintákkal szemben nyilvánvaló: a fixálás ideje és a fixálószer anyagi minősége nagyban befolyásolná a PCR során amplifikálható szekvenciák hosszát és az amplifikáció hatékonyságát (a PCR termék jelintenzitását az agaróz gélen) [51]. Az archív feldolgozásnak azonban vannak előnyei is: 1. akár több éves periódus gyors retrospektív vizsgálatát teszi lehetővé [51]; 2. könnyen kialakítható kor, nem és lokalizáció szerint megfelelő kontroll csoport; 3. a virológiai vizsgálathoz felhasznált metszetsor előtti és utáni metszet szövettani vizsgálatával egyértelműen és könnyen megállapítható, hogy a virológiai mintavétel a kérdéses tumorszövetből történt-e [72, 117]. Az elváltozások centrumából végzett makroszkópos mintavétel utóbbira sajnos nem adott lehetőséget, ráadásul a carcinomák esetében arra is ügyelnünk kellett, hogy a mintavétel során ne érintsük a rezekciós vonal épségét. A virológiai mintavétel közvetlen közeléből végzett rutin szövettani vizsgálat azonban minden esetben igazolta a kérdéses benignus vagy malignus tumor, valamint praeneoplasticus elváltozás jelenlétét.

A mintában a DNS integritásának vizsgálatát kötelezőnek tartjuk, erre szolgált a  $\beta$ -globin specifikus PC03/PC04 PCR. Mivel ez minden mintában pozitív eredményt adott, kellő mennyiségű és minőségű amplifikálható DNS jelenlétére következtettünk. Fej-nyaki carcinomák esetén a DNS integritását is ellenőrző közlemények HPV DNS pozitivitása azonban lényegében nem különbözik az integritás ellenőrzését mellőző közlemények eredményeitől [67].

**Az MY09/MY11 – GP5+/GP6+ nested PCR alkalmazása.** A HPV DNS detektálására alkalmazott konszenzus PCR technika specificitását a 450 bp hosszabb amplimer, szenzitivitását nested körben amplifikált kb. 145 bp rövidebb szekvencia biztosította. Az igen konzervatív L1 régióra specifikus nested PCR számos nyálkahártya-asszociált HPV típus detektálását teszi lehetővé: 6, 7, 10, 13, 16, 18, 31, 32, 33, 34, 35, 40, 42, 44, 45, 51, 52, 54, 55, 56, 58, 59, 61, 62, 66, 72, 73 [72]. A konszenzus PCR által nem amplifikált típusok esetleges jelenlétéből adódó fals negativitás mértéke a fej-nyaki régióban eddig leírt típusok ismeretében elhanyagolható.

**A minták kontaminációjának megelőzése.** A valódi HPV negatív minták a mintavételkor, a DNS extrakció vagy a PCR során fertőződhetnek HPV DNS-sel. A kontamináló HPV DNS a HPV pozitív mintákból, a pozitív kontrollokból vagy magából a laboratóriumból és annak eszközeiből származhat [72]. A mintavételt műtéti körülmények között, bemosakodva, steril eszközökkel, steril kesztyűben végeztük, a szállítás és a tárolás is steril körülmények között történt, a minták feldolgozása közben pedig betartottuk a PCR laboratóriumra vonatkozó szigorú metodikai és higiéniai szabályokat.

**A vizsgálataink során alkalmazott DNS kimutatási módszerek érzékenysége.** Eredményeink értékelése szempontjából kulcsfontosságú, hogy tisztában legyünk a vizsgálómódszereink szenzitivitásával és korlátaival, ezért a vírusdetektálás első körében alkalmazott MY09/MY11 PCR és a fizikai állapot meghatározására szolgáló E1-, E2- és E1E2-PCR érzékenységét egy ismert HPV 6 DNS pozitív papillomás mintából preparált DNS tízszeres léptékű hígítási sorozatával hasonlítottuk össze (3. ábra).



**3. ábra.** Egy ismert HPV 6 DNS pozitív papillomás minta tízszeres léptékű hígítási során elvégzett egyes PCR-ek eredménye. A számok a hígítás mértékét jelzik. MW: Sigma Wide Range molekulásúly marker. HPV 6 DNS esetében az E1 PCR 1130 bp, az E2 PCR 845 bp, az E1E2 PCR 2206 bp, az MY09/MY11 PCR 450 bp amplimert eredményez.

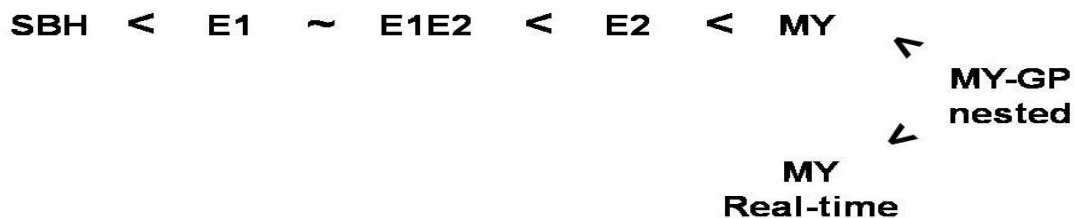
A relatív érzékenységbeli különbségek elsősorban az amplimerek hosszának különbségeivel magyarázhatók [82]. Az 1000 bp-nál is hosszabb amplimereket eredményező E1 és E1E2 PCR valamint a 450 bp amplimert adó MY09/MY11 PCR érzékenységében legalább 3 nagyságrendnyi különbség van. A HPV DNS detektálás második körében elvégzett GP5+/GP6+ PCR-rel kiegészített nested technika érzékenysége értelemszerűen az MY09/MY11 PCR-nél is sokkal nagyobb: ezt jelezte az a tény, hogy a nested PCR utáni agaróz gélelektroforézis után számos esetben csak a GP5+/GP6+ PCR termékének 145 bp csíkja jelent meg a gélen.

A HPV DNS kópiaszámának meghatározására szolgáló real-time PCR érzékenysége 10 ng DNS-ben kb. 10 kópia jelenléte. Amint azt az intralaesionalis cidofovir terápia során vett mintákban is látni fogjuk, voltak esetek, amikor a HPV DNS kópiaszáma a real-time PCR detek-

tálási küszöbe alatt volt, ilyenkor csak a nested PCR pozitivitása jelezte az igen kis kópiaszámban meglévő vírusgenom jelenlétét.

A fizikai állapot meghatározását szolgáló Southern-blot hibridizáció – melyet target amplifikáció nem előz meg – jóval kevésbé érzékeny módszer, mint a PCR technikák [98, 116].

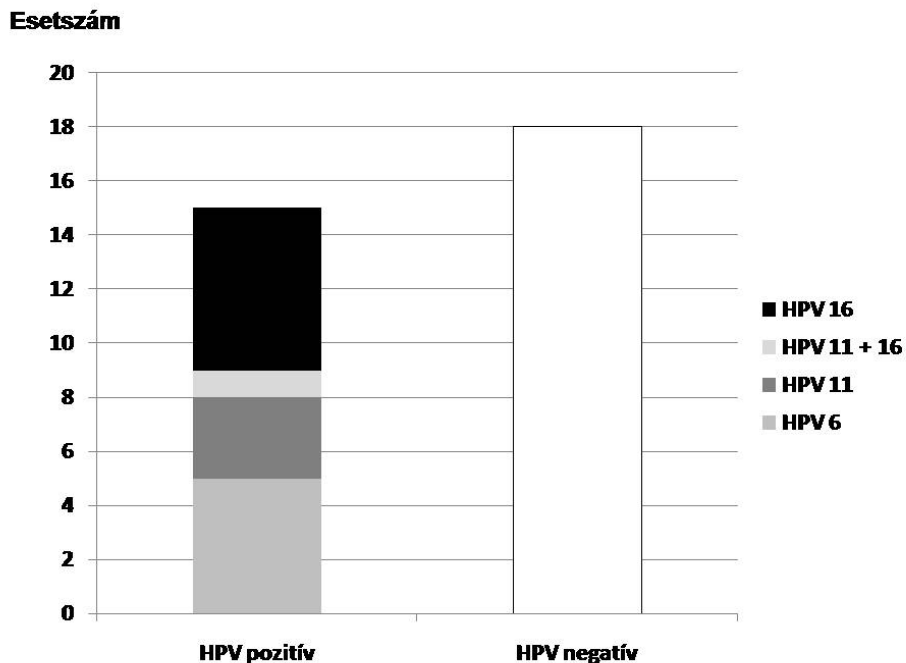
Módszereink – adataink és a szakirodalom által meghatározott – relatív (egymáshoz viszonyított) érzékenységét a 4. ábra szemlélteti.



**4. ábra.** DNS-detektálási módszereink (a SBH és a PCR technikák) relatív érzékenysége

### **3.2. A HPV DNS jellemzése a carcinomás betegcsoportban (1. dolgozat)**

**3.2.1. HPV DNS pozitívitas és típusok.** A fej-nyaki carcinomában szenvedő 33 betegből – a nested PCR technikát alkalmazva - 15 esetben detektáltunk HPV DNS-t. Itt jegyzem meg, hogy a nested PCR utáni agaróz gélelektroforézis alkalmával egyetlen mintában jelent meg az MY09/MY11 PCR-re jellemző 450 bp amplimer. A különböző HPV típusok megoszlását az 5. ábrán mutatom be.



**5. ábra.** A HPV DNS pozitívitas megoszlása a malignus tumoros betegcsoportban

A különböző HPV típusok DNS-ének megoszlását az egyes lokalizációkban az 5. táblázat szemlélteti.

Lokalizáció	HPV poz/összes	HPV típus				
		6	11	11+16	16	egyéb
Larynx	5/15	1	2	0	2	0
Larynx + hypopharynx	5/8	1	1	1	2	0
Oropharynx	2/5	1	0	0	1	0
Larynx + oropharynx	2/3	1	0	0	1	0
Hypopharynx	0/1	0	0	0	0	0
Larynx + trachea	1/1	1	0	0	0	0
<b>Összesen</b>	<b>15/33</b>	<b>5</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>6</b>	<b>0</b>

**5. táblázat.** A HPV DNS pozitívitas lokalizáció szerinti megoszlása

A teljes fej-nyaki régióban észlelt 45,5 %-os (15/33 beteg) HPV DNS pozitívitas meghaladja a carcinomás szövetekben PCR technikával detektált HPV DNS pozitívitas irodalmi adatainak többségét: a 60 közlemény értékeiből újrászámolt prevalencia 25,9 % volt [67]. Eredményeinkkel teljesen megegyező HPV pozitívitas arányt közölnek Clayman és mtsai, akik gége- és hypopharynx carcinomákon végezték vizsgálataikat: esetünkben is ez a régió volt túlsúlyban [23]. Hazai fej-nyaki carcinomás populáció vizsgálata során Szentirmay és mtsai a mi ered-

ményeinkhez hasonló HPV pozitivitást észleltek: 150 oropharynx, gége- és nyelőcsőrőkből 61 tartalmazott HPV szekvenciákat (40,7 %) [127].

A magas onkogén kockázatú 16-os típust 7 esetben detektáltuk (egy esetben 11-essel együtt), ez a teljes carcinomás csoport 21,2 %-ának felel meg. Ez az érték lényegében megfelel a 20 %-os szakirodalmi átlagnak [67, 80, 133]. A HPV 16 prevalenciája a *gégére és a hypopharynxra lokalizálódó* carcinomák esetében 20,8 % (5/24 eset), ez az érték minimálisan magasabb, mint a 35 tanulmányból számolt átlagos prevalencia (17 %) [67]. Az *oropharyngealis vagy az oropharynxot is érintő* esetekben a HPV 16 prevalenciája 25 % (2/8 eset), ez minimálisan alacsonyabb, mint a 27 tanulmány adataiból számolt prevalencia (31 %) [67]. Nem igazolódott a HPV 16 jelentős oropharyngealis predilekciója, bár az esetszám az oropharynx tumorok esetén nagyon alacsony [116]. A lokalizációk ezen önkényes csoportosítását az említett irodalmi összefoglalással történő összevetés érdekében végeztem, ugyanis a gége és a lényegesen ritkábban vizsgált hypopharynx eredményeit Kreimer és mtsai együttesen tárgyalják [67].

Egyetlen esetben sem detektáltunk HPV 18-at, pedig fej-nyaki carcinomákban is ezt a típust tartják a második leggyakoribbnak [67, 80, 125].

Meglepő eredmény az alacsony onkogén kockázatú HPV típusok (6 és 11) magas prevalenciája, esetünkben egyértelműen ez a jelenség felel a magas össz-pozitivitási arányért is. Az alacsony onkogén kockázatú típusok prevalenciája a teljes carcinomás csoportban (az egy HPV 11 és 16 koinfekciót is beleszámítva) 27,3 % (9/33 eset) volt, megoszlásuk az egyes lokalizációk között lényegében egyenletes volt: a gége és a hypopharynx területén 6/24 eset, a oropharynx érintettsége esetén 2/8 eset, egyéb lokalizációkban 1/1 eset.

Kreimer és mtsai irodalmi összefoglalása szerint a HPV 16 és 18 után a 6-os a harmadik, a 11-es a negyedik leggyakoribb típus fej-nyaki carcinomákban, prevalenciájuk azonban messze elmarad az első két magas onkogén kockázatú típushoz képest [67]. Venuti és mtsai 25 gégerákos szövetmintából azonban 5-ben detektáltak HPV 6-ot [134]. Badaracco és mtsai 66 fej-nyaki carcinomából 10-ben mutattak ki HPV 6-ot, predilekciós helynek a gége és az oropharynx bizonyult, ebben a tanulmányban 3 oropharyngealis tumor HPV 11 pozitív lett [7]. Ugyanakkor a két említett tanulmányban is a magas onkogén kockázatú típusok voltak a leggyakoribbak [7, 134]. Matsha és mtsai 23 HPV pozitív nyelőcsőrőkből 11 esetben detektáltak HPV 11-et [77]. A két leggyakoribb alacsony onkogén kockázatú HPV típust egy-egy eset

kapcsán más szerzők is leírják fej-nyakon, valamint anogenitalis carcinomákban (cervix, vulva, Buschke-Löwenstein tumor) is [48, 116, 125, 127].

A szokatlan földrajzi HPV típusmegoszlás nem ismeretlen a szakirodalomban: ilyen a HPV 11 gyakorisága nyelőcső rákban (lásd fent) vagy a HPV 73 magas prevalenciája gége- és nyelőcsőrákban [77, 127]. A 6-os és a 11-es típus magas prevalenciáját – egyéb magyarázat híján – földrajzi sajátosságnak tarthatjuk.

Két HPV típus koinfekcióját egy esetben (3%) észleltük: egy laryngo-hypopharyngealis lokalizációjú carcinoma 11-es és 16-os típust is tartalmazott. A 16-os és 18-as típus koinfekcióját leírták már gégeben [4, 48]. Irodalmi adatok szerint a koinfekciók prevalenciája fej-nyaki tumorokban 3,6 %, leggyakoribb a 16-os típusnak valamely más típussal történő együttes jelenléte [67]. A koinfekciót – legalábbis az anogenitalis régióban - ismételt HPV expozíció következményének tartják [82].

Lokalizációk szerinti felbontásban *a gége- és hypopharynxra lokalizálódó* tumorok 41,7 %-a (10/24 eset), *az oropharynx- vagy az oropharynxot is érintő* tumorok fele (4/8 eset) bizonyult HPV pozitívnek, bár az alacsony esetszám miatt egyetlen eset pozitivitása is nagyfokban befolyásolhatja az eredményeket. Az alacsony onkogén kockázatú típusok már tárgyalt jelenléte miatt ez a két érték meghaladja a gége és a hypopharynxra 35 PCR tanulmány eredményei alapján számolt 24 %-os, valamint az oropharynxra 27 PCR tanulmány eredményei alapján számolt 35,6 %-os prevalenciát [67]. Az oropharynxon belül a tonsilla palatina carcinomáiban a legmagasabb a HPV DNS pozitívitas, akár a 70 %-ot is elérheti [116]. A tonsillaris predilekció hátterében egyrészt a lacunáknak és cryptáknak köszönhetően meglévő kiterjedt nyálkahártya felszín, másrészt a többrétegű el nem szarusodó laphám és az alatta fekvő nyirokszövet igen szoros kapcsolatát említik, melyet egyes szerzők – véleményem szerint hisztológiai szempontból tévesen - a squamociliaris junctióhoz hasonlítanak [54, 67].

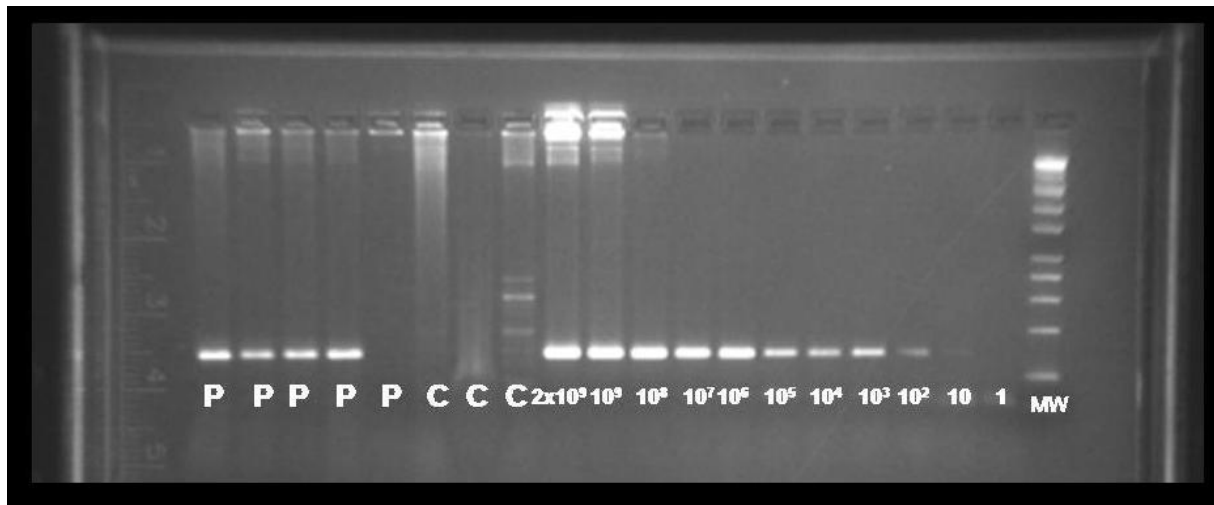
A fej-nyaki carcinomák - különféle módon vizsgált – HPV pozitívitasának jelentős különbségeit és az egyes HPV típusok előfordulási gyakoriságának eltéréseit a valódi földrajzi különbségeken túl a következő populációs és metodikai okok is magyarázhatják.

1. A vizsgált **populáció mérete** és a HPV DNS pozitívitas általában fordított arányban áll egymással, különösen a szájüreg és a gége carcinomái esetében [67]. A jelenség oka vélhetően az, hogy a kis esetszámú populáción észlelt meglepően magas HPV pozitívitas arányt előszeretettel publikálják [67]. Az adott populációra jellemző valós HPV pozitívitas és a típusok megoszlása így torzulhat.
2. A vizsgált populáció **életkora** is befolyásolhatja az eredményeket, ugyanis néhány tanulmány szerint szájüregi, illetve „fej-nyaki” carcinomák esetében fiatalabb életkorban gyakoribb a HPV DNS pozitívitas, a különbség szignifikancia-közeli [92, 116]. Más szerzők gége carcinoma esetén nem észleltek összefüggést a HPV prevalencia és az életkor között [4, 48]. Esetünkben az 55 év alatti korosztály 14 betegének 50 %-a, az 55 éves vagy idősebb korosztály 18 betegének 42,1 %-a volt HPV pozitív, a különbség egyváltozós logisztikus regresszióval vizsgálva nem szignifikancia-közeli (lásd később a 6. táblázatban).
3. A **férfi-nő arány** is befolyásolhatja a HPV pozitívitas, ugyanis egyes vizsgálatok szerint nők fej-nyaki carcinomáiban nagyobb a HPV prevalenciája [73, 127]. A jelenséget a nők mértékletesebb dohányzási és alkoholfogyasztási szokásaival magyarázzák [127]. A legtöbb tanulmányban az eleve kis esetszám és az erős férfi túlsúly miatt nincs mód a betegek nemének HPV pozitívitasra gyakorolt hatását vizsgálni. Esetünkben mindössze két nő szerepelt a carcinomás betegcsoportban.
4. A „fej-nyaki” carcinomákon belül az egyes **lokalizációk megoszlásának aránya** is módosíthatja az eredményeket: a több oropharynx (különösen tonsilla) carcinoma nagyobb HPV DNS pozitívitas eredményez [67, 125]. Az egyes régiók HPV DNS pozitívitasát ezért – a jobb összehasonlíthatóság kedvéért – külön-külön érdemes vizsgálni.
5. A **tumor elhelyezkedésének helytelen megítélése** befolyásolhatja az egyes lokalizációra vonatkozó HPV DNS pozitívitas arányát. Több szerző a nyelvgyöki carcinomákat a szájüreghez sorolta, holott a nyelvgyök a TNM Atlasz szerint is az oropharynx része [55, 139]. Ez a fajta helytelen lokalizálás eredményezhette például a szájüregi daganatok magasabb HPV pozitívitasát az ázsiai népességben [67].

6. A nagyobb **primer tumorméret (magasabb T stádium)** egyes szerzők szerint nagyobb HPV pozitívítási aránnyal jár [15]. Esetünkben a késői szakorvoshoz fordulás miatt sajnos csak 9 tumor volt T1-2 stádiumú, ugyanakkor 24 volt T3-4 stádiumú, a HPV pozitívítási arány 22,2 % ill. 54,2 % volt, a különbség egyváltozós logisztikus regresszióval vizsgálva azonban csak szignifikancia-közeli volt (lásd később a 6. táblázatban).
7. A **mintavétellel** kapcsolatos különbségeket (HPV ellenes antitestek vizsgálata szérumból, DNS vizsgálata exfoliált sejtekből vagy szövetmintákból), valamint szövetminták esetén az archív és a friss mintákból eredő eltéréseket korábban tárgyaltuk. Megjegyzendő azonban, hogy a HPV DNS archív és a friss mintákból PCR technikával történő vizsgálati eredményeinek áttekintése során a prevalenciában egyik lokalizáció esetében sem adódtak eltérések [67].
8. A különböző **DNS detektálási eljárások érzékenysége** is jelentősen eltér, a csak a DNS szignált amplifikáló hibridizációs eljárások kevésbé szenzitívek, mint a target DNS-t amplifikáló PCR technikák [82].
9. **PCR technika** alkalmazása mellett a pozitívítást a vizsgálat elve befolyásolhatja: a gyakoribb **típusokra specifikus** primerek alkalmazása eleve kizárja a kevésbé gyakori HPV típusok detektálását [80]. **Konszenzus primerek** használata mellett a leggyakoribb nyálkahártya-specifikus típusok többnyire kimutathatók [72]. Nem véletlen tehát, hogy a szerzők többsége a HPV detektáláshoz konszenzus primerek közül is a legtöbb típust kimutató MY09/MY11 párt használja [4, 7, 48, 72, 134]. A PGMY konszenzus PCR azonban az MY09/MY11-specifikushoz képest is több HPV típust képes detektálni és szenzitivitása is nagyobb [82]. A konszenzus primerek használatát – ellenőrző jelleggel, HPV tipizálásra vagy a ritkább típusok detektálására – egyes szerzők típus-specifikus primerekkel egészítik ki [4, 7, 134].
10. Lindeberg és mtsai - a szakirodalom áttekintése során - csak gégerákokban és csak PCR technikával 3 és 85 % közötti HPV prevalenciát észleltek. Az extrém magas HPV prevalencia hátterében a **minták kontaminációját** említik [72].

**3.2.2. A HPV DNS fizikai állapota és kópiaszáma a carcinomás betegcsoportban.** Az E1-, E2- és E1E2-specifikus polimeráz láncreakciók a 33 carcinomás betegből egyetlen mintában adtak értékelhető eredményt: ez egy 60 éves férfibeteg T2 stádiumú, HPV 6 DNS pozitív oropharynx tumorából származott, a tumor a nyelvgyökben és a jobb oldali tonsillolinguális átmenetben helyezkedett el. Az ő mintája volt egyben az egyetlen, amely esetében a nested PCR után - az első kör hosszabb amplimernek megfelelő - 450 bp csík is látható volt az agaróz gélen, jelezvén a többi mintához képest nagyobb mennyiségű HPV DNS jelenlétét. Esetében az E1-PCR pozitivitása és az E2- ill. E1E2-PCR negativitása alapján azt feltételezzük, hogy a genom felhasadása az E2 ORF területén történt. A vizsgálómódszerek eltérő érzékenysége jelen esetben vélhetően nem befolyásolta az eredményt, mivel a kevésbé érzékeny E1 PCR lett pozitív a szenzitívebb E2 PCR negativitása mellett. A HPV DNS integrációja az egyébként alacsony onkogén kockázatú HPV 6 etiológiai szerepe mellett szólhat.

Metodikai hibát a többi carcinomás minta negatív E1, E2 és E1E2 PCR- eredményei háttérében nem feltételezzük, mivel a carcinomás és a papillomás mintákat érkezésük sorrendjében vizsgáltuk és valamennyi esetben találtunk pozitív és negatív mintákat (lásd majd a 8. ábrát), valamint a pozitív és a negatív kontrollok is valamennyi esetben működtek. A jelenség valószínű oka a vírusgenom igen alacsony kópiaszáma. Ennek igazolására a nested PCR-rel HPV 6 pozitívnak bizonyult 3 carcinomás és 5 papillomás, valamint HPV 11 pozitívnak bizonyult 3 carcinomás és 5 papillomás minta kópiaszámát HPV 6 és 11 genomot tartalmazó pBR322 plazmid tízszeres hígítási sorozata segítségével becsültük meg, az MY09/MY11 PCR elvégzésével. Ez alapján a carcinomákban mind a HPV 6 mind a 11 DNS kópiaszáma mindegyik mintában 10 alatti volt (1 µg minta DNS-re vonatkozóan), míg a papillomák nagy részében a kópiaszám a  $10^2$ - $10^7$  nagyságrendben alakult. A carcinomák kópiaszámának real-time PCR-rel történő becslésének ezután nem láttuk értelmét. A 6. ábrán példaként a HPV 6 DNS pozitív minták kópiaszámának denzitometriás becslését mutatom be.



**6. ábra.** HPV 6 DNS pozitív carcinomák és papillomák kópiaszámának összehasonlítása HPV 6 DNS-t tartalmazó pBR322 plazmid DNS tízszeres léptékű hígítási sorával, az MY09/MY11 PCR-t elvégezve. P=papillomás minták, C=carcinomás minták, MW= Sigma Wide Range molekulásúly marker. A kópiaszámot a kalibráló oldatsor segítségével, denzitométerrel határoztuk meg

A HPV genom fizikai állapota fej-nyaki carcinomákban lehet integrált vagy episzómális, de a kétféle fizikai állapot egyidejű előfordulását is leírták [7, 65, 78, 117, 134]. Venuti és mtsai – gégében PCR és 2 dimenziós SBH technikával vizsgálva - 7 HPV 16 pozitív carcinomából 3 esetben, 5 HPV 6 pozitív carcinomából egy esetben észleltek integrált fizikai állapotot, a többi esetben a genom episzómálisnak bizonyult [134]. A rezekciós vonalból és a szomszédos ép nyálkahártyából származó szövetmintákban – egy kivétellel – valamennyi esetben ugyanazon típus genomjának episzómális állapotát észlelték. RT-PCR technikát alkalmazva a transzformáló E6 és E7 gének expresszióját csak a HPV 16 esetében detektálták [134]. Egy másik közleményben E2-specifikus PCR alkalmazásával 7/12 HPV 16 pozitív és 1/10 HPV 6 pozitív esetben észlelték a HPV genom integrációját [7]. Snijders és mtsai négy tonsilla carcinoma kapcsán vizsgálta a HPV genom fizikai állapotát és expresszióját: a 2 HPV 16 pozitív esetben a genom tisztán episzómális, egy HPV 33 pozitív esetben tisztán integrált és egy másik HPV 33 pozitív esetben episzómális és integrált volt; E6 és E7 mRNS-t azonban mindegyik esetben detektáltak [117].

Koskinen és mtsai 23, különböző lokalizációjú, 16 HPV DNS pozitív fej-nyak carcinomában vizsgálta a vírus DNS fizikai állapotát, az arányok a következők voltak: 11 integrált (48 %), 8 episzómális (35 %) és 4 kevert (17 %) [65]. Badaracco és mtsai a HPV 6 és 16 pozitív

carcinomák fizikai állapota és lokalizációja között nem találtak összefüggést [7]. Mellin és mtsai vizsgálatai szerint tonsilla carcinomák többségében az episzómális fizikai állapot a jellemző [78]. A fizikai állapot prognosztikai értékét fej-nyaki carcinomákban nem ismerjük.

A fenti tanulmányok metodikája hatékonyak bizonyult a fizikai állapot meghatározására. Vélhetően nagyobb mennyiségű (vagy nagyobb HPV DNS tartalmú) minta DNS állt a szerzők rendelkezésére és a DNS-detektáló módszereik szenzitivitása is meghaladhatta az általunk alkalmazottakét.

A fizikai állapot meghatározására szolgáló SBH és az E1, E2 és E1E2 specifikus PCR technikákat különböző klinikai stádiumú cervix carcinomákban és azok metastasisaiban is alkalmazva, az I-hez képest nagyobb kópiaszámmal járó II. stádiumban, az esetek többségében a fizikai állapot egyértelműen meghatározható volt [126]. Az I. stádium kisebb kópiaszáma gyakran a SBH érzékenységi küszöbe alatt volt. Az azonos metodika mellett a fej-nyaki és a genitális régióban észlelt eltérő eredményekből arra következtetünk, hogy a fej-nyaki carcinomák HPV DNS kópiaszáma általában kisebb, mint a cervix carcinomáé. Ezt a következtetést irodalmi adatok is alátámasztják [125].

A kópiaszám becslésének módszerei és így kifejezésének formái is meglehetősen eltérőek. Snijders és mtsai a HPV 16 pozitív fej-nyaki carcinomák kópiaszámát ismert kópiaszámú, SiHa sejtekből származó DNS hígítási sora segítségével határozták meg, „magas” kópiaszámnak a legalább 1 kópia/100 sejt értéket tekintve a HPV pozitív tonsillatumorok 80 %-a, a többi oropharynx tumor mintegy fele volt „magas” kópiaszámú, míg a gégetumorok közül csaknem valamennyi a határérték alatti kópiaszámot mutatott [116]. A magas kópiaszámú esetekben gyakrabban detektáltak E6 és E7 transzkripteket, míg az ISH vizsgálat a HPV és a neoplasticus sejtek klonális kapcsolatára utalt [116]. A HPV DNS kópiaszáma kifejezhető a cellularis  $\beta$ -aktin gén arányában is: ez alapján vizsgálva a tonsilla tumorok kópiaszáma 10 és néhány száz HPV DNS kópia /  $\beta$ -aktin között alakult, ráadásul a 190 kópia /  $\beta$ -aktin értéknél magasabb kópiaszámú esetek 3 éves túlélése szignifikánsan jobb volt, mint az ez alatti kópiaszámú eseteké [78]. Koskinen és mtsai eredményei szerint a tonsilla carcinomák HPV DNS kópiaszáma átlagosan mintegy 80 ezerszer magasabb, mint a többi HPV pozitív fej-nyaki tumor esetében [65]. A két utóbbi szerző real-time PCR technikával becsülte a HPV genom kópiaszámát. A tonsilla carcinomák HPV DNS kópiaszáma összemérhető a cervix

carcinomáéval [54]. Esetünkben az E1, E2 és E1E2 specifikus PCR érzékenységi küszöbét meghaladó egyetlen tumor is épp egy tonsillát is érintő oropharynx tumor volt.

**3.2.3. A HPV pozitívitás összefüggése a betegek klinikopatológiai paramétereivel.** Az egyes HPV típusokra pozitív betegek alacsony száma miatt a nested PCR technikával észlelt összes HPV DNS pozitívitás kapcsolatát vizsgáltuk meg a klinikopatológiai paraméterekkel. Eredményeinket a 6. táblázatban foglalom össze.

Faktorok	HPV pozitívitas eset/összes (%)	Nyers esélyhányados (95 % konfidencia intervallum)	p
<b>Klinikai jellemzők</b>			
<b>Életkor</b>			
55 < 14 fő	7/14 (50,0%)	1,00	0,251
<=55 19 fő	8/19 (42,1%)	0,44 (0,11-1,79)	
<b>Nem</b>			
Nő 2 fő	2/2 (100,0%)	0,18 (0,0075-4,34)	0,291
Férfi 31 fő	13/31 (41,9%)	1,00	
<b>Dohányzás</b>			
Negatív 4 fő	2/4 (50,0%)	1,00	1,00
Pozitív 16 fő	8/16 (50,0%)	1,00 (0,11-8,95)	
14 esetben nincs adat			
<b>Alkohol</b>			
Negatív/Alkalmanként 9 fő	3/9 (33,3%)	1,00	0,215
Pozitív 6 fő	4/6 (66,7%)	4,00 (0,45-35,79)	
19 esetben nincs adat			
<b>Patológiai jellemzők</b>			
<b>pT</b>			
pT1-2 9 fő	2/9 (22,2%)	1,00	0,115
pT3-4 24 fő	13/24 (54,2%)	4,14 (0,71-24,16)	
<b>pN</b>			
pN0 18 fő	9/18 (50,0%)	1,00	0,566
pN1- 15 fő	6/15 (40,0%)	0,67 (0,17-2,67)	
<b>pM nem értékelhető</b>			
pM1 1			
pM0 33			
<b>Lokalizáció</b>			
H vagy M 6 fő	2/6 (33,3%)	1,00	0,514
L vagy LX 27 fő	13/27 (48,1%)	1,86 (0,29-11,90)	
<b>Differenciáltsági fok</b>			
G-I / G-II 17 fő	7/17 (41,2%)	1,00	0,611
G-III 16 fő	8/16 (50,0%)	1,43 (0,36-5,66)	

**6. táblázat.** A HPV pozitívitás összefüggése a betegek klinikai és patológiai paramétereivel. A lokalizációnál H=hypopharynx, M=oropharynx, L=larynx, LX=laryngo-hypopharyngealis, laryngo-oropharyngealis vagy laryngo-trachealis

A betegek **klinikai paramétereit és a HPV pozitívítást** között nem igazolható szignifikáns összefüggés. A **patológiai jellemzők** közül egyedül a patológiai T stádiummal igazolható szignifikancia-közeli kapcsolat: az előrehaladottabb primer tumorok gyakrabban tartalmaznak HPV DNS-t ( $p=0,115$ ). Mivel a nyers esélyhányados értékek alapján a többi tényező nem gyakorol szignifikancia közeli hatást sem ( $p<0,200$ ) a HPV pozitívítást kialakulására, így ezt az elemzést többváltozós formában nem folytattuk.

A követés során kedvezőtlen eseményt mutató csoportban a HPV pozitívítást aránya (50 %) némileg meghaladta a tumormentes csoportét (41,7 %).

Az általunk vizsgált klinikai és patológiai paraméterek és a HPV pozitívítást között egy 66 és egy 101 fej-nyaki carcinomás beteget feldolgozó tanulmányban sem találtak szignifikáns összefüggést [7, 92]. Az első esetben egyedül az anamnézisben szereplő szájüregi trauma és a HPV pozitívítást kapcsolata bizonyult szignifikánsnak (Fisher-teszt,  $p=0,03$ ), ezt a kapcsolatot a szerzők a sérült basalis hámsejtek HPV expozíciójával magyarázták [7]. A második esetben a nyirokcsomó metastasis hiánya és a HPV pozitívítást kapcsolata bizonyult szignifikancia-közelinek (Pearson-féle  $\chi^2$  teszttel,  $p=0,0635$ ) [92]. Clayman és mtsai 65 gége- és algarati carcinoma retrospektív feldolgozása során a HPV pozitívítást és a pN stádium, az extralaryngealis és subglotticus terjedés, valamint a porc-, a vascularis és a neuralis invasio között nem találtak kapcsolatot [23].

A **szöveti paraméterek** közül a differenciáltsági fok és a HPV pozitívítást más szerzők szerint sem függ össze [133, 134]. Külön kérdés a **szöveti típus** és a HPV pozitívítást összefüggése. Esetünkben a 33 carcinoma közül mindössze 1 volt adenocarcinoma, a többi laphámráknak bizonyult. A laryngealis lokalizációjú adenocarcinomában nem detektáltunk HPV DNS-t. A laphámrákok között verrucosus carcinoma nem volt, a HPV 11 és 16 koinfekciót hordozó alacsony differenciált gége- és algarati ráknak azonban ún. basaloid karaktere volt. A basaloid laphámrák jellemzői: basaloid sejtcsoportok perifériás paliszád állású sejtekkel; orsósejtes komponens vagy laphám irányú differenciációt mutató területek lehetségesek [127]. Egy hazai vizsgálat szerint a fej-nyaki basaloid laphámrákok 81 %-a, a verrucosus carcinomák 100 %-a volt HPV pozitív [127]. Van Houten és mtsai a basaloid karakter és a HPV pozitívítást szoros kapcsolatát nem tudták megerősíteni [133].

A fej-nyaki carcinomák 15-20 %-a a két legfontosabb rizikófaktor, a dohányzás és az alkoholfogyasztás hiányában alakul ki [98]. Epidemiológiai adatok szerint a két káros szenvedély carcinogenesisben betöltött relatív kockázata a fej-nyaki lokalizációk közül az oropharynx carcinomák esetén a legkisebb [55]. A HPV DNS prevalenciája pedig épp ebben a régióban a legmagasabb [67]. A HPV pozitív oropharynx carcinomák nagyobb valószínűséggel alakulnak ki nemdohányzóknak és alkoholt nem fogyasztóknak, bár ezekben az esetekben a dohányzás és az alkoholfogyasztás hiánya elsősorban a női nemhez köthető [49, 73, 127]. A gége és a teljes fej-nyaki régióra vonatkoztatva azonban a HPV pozitivitás és a két legfőbb rizikófaktor fennállása között – eredményeinkhez hasonlóan – nem igazolódott összefüggés [4, 7].

**3.2.4. A klinikai, patológiai és mikrobiológiai jellemzők hatása a betegség kimenetelére (7. táblázat).** Már az alacsony esetszámnál is látható, hogy a **dohányzás és az alkoholfogyasztás** kedvezőtlenül befolyásolja a kimenetelt, bár az összefüggés – feltehetően az alacsony értékelhető esetszám miatt - egyik esetben sem szignifikáns. A **patológiai jellemzők** közül a diagnózis idején észlelt nyirokcsomó **metastasis** (pN) kedvezőtlen hatása a tumormentes túlélésre egyértelmű ( $p=0,025$ ). Látszólag meglepő módon a T1-2 stádiumú tumorok esetén a kedvezőtlen kimenetel esélye némileg nagyobb, mint előrehaladottabb primer tumor esetén. A válasz a lokalizációban rejlik: a T1-2 stádiumú 9 carcinoma közül 5 a rossz prognózisú oropharyngealis lokalizációban helyezkedett el. A laryngealis **lokalizáció** némileg jobb prognózist jelent, bár az összefüggés itt sem szignifikáns. A HPV pozitivitás valamennyi lokalizációt együtt vizsgálva fokozza a rossz prognózis esélyét.

A **HPV pozitivitás prognosztikai szerepe** a szakirodalomban nem egyértelmű, az azonban több tanulmány eredményeiből is körvonalazódik, hogy az oropharynx (és a tonsilla) carcinomák esetében a HPV pozitivitás jobb prognózist jelent a 3 éves recidivamentes túlélés szempontjából [54, 79]. A korábban említettek szerint HPV 16 pozitív tonsilla carcinomák magas HPV kópiaszáma is jó prognosztikai jelnek bizonyult [78]. Pintos és mtsai – hozzánk hasonlóan – a teljes fej-nyaki carcinomás csoportban vizsgálták a HPV prognosztikai hatását (recidivamentes túlélés, összes túlélés) és – hozzánk hasonlóan – ők sem észleltek kapcsolatot [92]. Clayman és mtsai szerint gége és hypopharynx rákokban a HPV pozitivitás szignifikánsan rontja a túlélést, a kapcsolat erőssége megegyezik a nyirokcsomó metastasis vagy a vascularis invasio hatásával [23].

Faktorok	Kedvezőtlen kimenetel	Nyers esélyhányados (95 % konfidencia intervallum)	p
<b>Klinikai jellemzők</b>			
<b>Életkor</b>			
55 < 14 fő	9/14 (64,3%)	1,00	0,854
<=55 18 fő	11/18 (61,1%)	0,87 (0,21-3,71)	
<b>Nem</b>			
Nő 2 fő	1/2 (50,0%)	1,00	0,709
Férfi 30 fő	19/30 (63,3%)	1,73 (0,1-30,45)	
<b>Dohányzás</b>			
Negatív 4 fő	1/4 (25,0%)	1,00	0,103
Pozitív 15 fő	11/15 (73,3%)	8,25 (0,63-104,20)	
13 esetben nincs adat			
<b>Alkohol</b>			
Negatív/Alkalmanként 8 fő	3/8 (37,5%)	1,00	0,068
Pozitív 6 fő	6/6 (100,0%)	20,00 (0,80-500,84)	
18 esetben nincs adat			
<b>Patológiai jellemzők</b>			
<b>pT</b>			
pT1-2 9 fő	6/9 (66,7%)	1,00	0,405
pT3-4 23 fő	14/23 (60,9%)	0,47 (0,08-2,81)	
<b>pN</b>			
pN0 18 fő	8/18 (44,4%)	1,00	0,025
pN1-2 14 fő	12/14 (85,7%)	7,50 (1,29-43,69)	
<b>pM nem értékelhető</b>			
pM1 1			
pM0 32			
<b>Lokalizáció</b>			
H vagy M 5 fő	5/5 (100,0%)	1,00	0,175
L vagy LX 27 fő	15/27 (55,6%)	0,13 (0,006-2,52)	
<b>Grade</b>			
G-I / G-II 16 fő	9/16 (56,3%)	1,00	0,467
G-III 16 fő	11/16 (68,8%)	1,71 (0,40-7,27)	
<b>Mikrobiológiai jellemző</b>			
<b>HPV</b>			
Negatív 17 fő	10/17 (58,8%)	1,00	0,648
Pozitív 15 fő	10/15 (66,7%)	1,40 (0,33-5,93)	

**7. táblázat.** A klinikai, patológiai és mikrobiológiai jellemzők összefüggése a betegség kimenetelével. Kedvezőtlen kimenetel = lokális recidiva, regionális nyirokcsomó áttét vagy távoli áttét a követési idő alatt bármikor. A lokalizációnál H=hypopharynx, M=oropharynx, L=larynx, LX=laryngo-hypopharyngealis, laryngo-oropharyngealis vagy laryngo-trachealis. A táblázatban 32 beteg adatai szerepelnek, mivel egy beteg a műtét után nem jelentkezett többet a Klinikán, az ő későbbi kórtörténetét nem ismerjük.

A nyers esélyhányados értékek és a szignifikancia alapján ( $p < 0,200$ ) kiválogattuk azokat a tényezőket, amelyek hatását többváltozós regresszióval is érdemes vizsgálni: pN, lokalizáció, dohányzás, és alkoholfogyasztás. Ezek közül a dohányzás és az alkoholfogyasztás a HPV pozitívitásnak a kedvezőtlen kimenetelre gyakorolt hatását erősíti, de az összefüggés nem éri el a szignifikancia küszöbét: *dohányzás + HPV pozitívítás* esetén a nyers esélyhányados (95 % konfidencia intervallum) = 6,12 (0,52-72,50),  $p=0,151$ ; *alkoholfogyasztás + HPV pozitívítás* esetén a nyers esélyhányados (95 % konfidencia intervallum) = 8,59 (0,58-127,05)  $p=0,118$ .

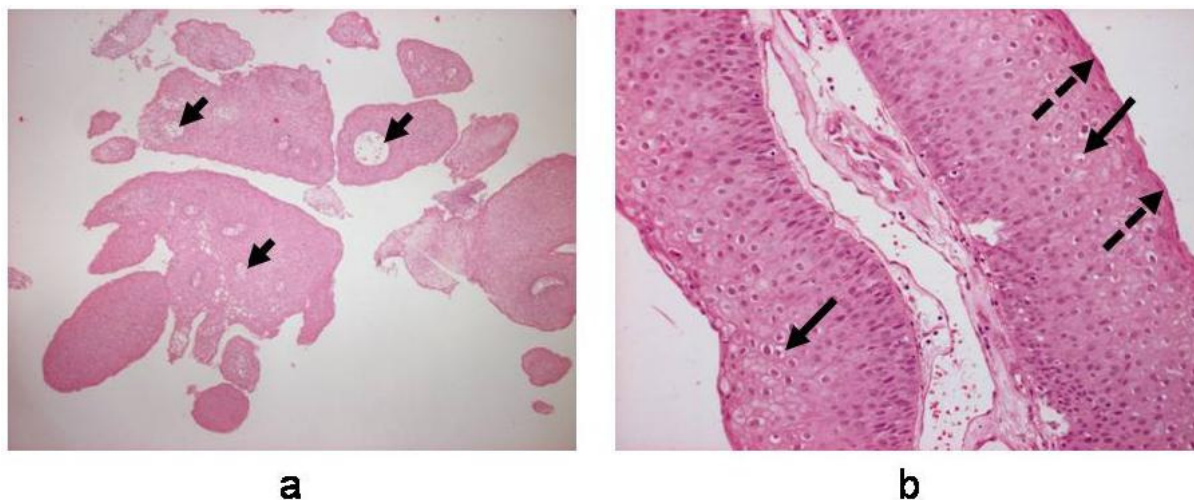
A klinikopatológiai paraméterekkel és a kimenetellel történő összefüggést a magas onkogén kockázatú HPV 16 esetén külön megvizsgáltuk, szignifikáns eltérést azonban ekkor sem észleltünk.

**3.2.5. Összegzés.** *A magas HPV DNS pozitívítási arány (és az alacsony onkogén kockázatú típusok gyakori jelenléte) önmagában nem jelent általános érvényű etiológiai kapcsolatot, az következménye is lehet a carcinogenesisnek. A carcinomás betegcsoportunkban a PCR módszereink érzékenységi küszöbe alatti HPV DNS kópiaszám és a klinikopatológiai paraméterekkel, valamint a prognózissal történő összefüggés hiánya a HPV fej-nyaki carcinogenesisben betöltött etiológiai szerepe ellen szól, bár az esetszámunk igen alacsony volt.*

*A fej-nyaki carcinomák egy kisebb részében (különösen az oropharynxban) – irodalmi adatok szerint - a HPV genom magasabb kópiaszáma és főleg annak expressziója a humán papillomavírusok etiológiai szerepét igazolja. Az általunk vizsgált esetek közül az egyetlen magasabb kópiaszámú és integrált fizikai állapotú HPV 6 pozitív oropharynx carcinoma erősíti meg ezt a hipotézist.*

### 3.3. A HPV DNS jellemzése a papillomás betegcsoportban (1. dolgozat)

A szövettani lelet ebben a betegcsoportban egységesen papillomatosist igazolt, dysplasia nélkül (7. ábra).



**7. ábra. a:** a többrétegű el nem szarusodó laphám benignus proliferációja a fibrovascularis stromával (nyilak) együtt ujszerű nyúlványokat képez (*J2 beteg, 25. műtét, HE, 40x*); **b:** jól látható a basalis hámréteg hyperplasiája, a koilocytosis (folytonos nyilak) és a parakeratosis (szaggatott nyilak). A hámrétegződése megtartott, cellularis atypia nincs (*J2 beteg, 25. műtét, HE, 200x*)

**3.3.1. HPV DNS pozitivitás és típusok.** Az elvégzett műtétek döntő többségénél módunk volt a virológiai mintavételre. A 14 betegből összesen 26 mintát dolgoztunk fel (8. táblázat). Az intralesionalis cidofovir terápia 9 műtete során vett minták eredményeit a későbbiekben külön részletezem.

A követési idő átlagosan 31,7 hónap (0-86 hónap) volt, 0 abban az esetben, ha a beteg az első (és egyetlen) műtete után többször nem jelentkezett a Klinikán. A követési idő alatt összesen 33, betegenként átlagosan 2,35 (1-10) beavatkozás történt (a később ismertető cidofovir terápiához szükséges műtéteket nem számolva).

Sor-szám	Kor	Nem	Követési idő	Műtétek száma	Lokalizáció	HPV típus	Fizikai állapot	Kópiaszám
<b>J-RRP</b>								
J1	2 év	F	12 hó	1	L	11 (2.)	E	10 <sup>2</sup>
J2	7 év 6 hó	F	6 év 9 hó	10 + 9(CDV)	P	11 (21.)	E	3x10 <sup>3</sup>
					L	11 (22.)	E	2x10 <sup>2</sup>
					L,P	11 (23 <sup>+</sup> .)	E*	10 <sup>3</sup>
					L	11 (25.)	E	10 <sup>4</sup>
					L	11 (26.)	E	10 <sup>3</sup>
				L,P	11 (29-37)	E	l. 15.-16. ábra	
J3	9 év 2 hó	F	7 év 2 hó	2	L	11 (8.)	E*	NV
					L	11 (9.)	E	5x10 <sup>2</sup>
J4	3 év 1 hó	F	5 év	1	L	6 (1.)	E	NV
J5	26 év	N	0	1	L	11 (4.)	E	7x10 <sup>4</sup>
J6	62 év	F	4 év 1 hó	1	L	11 (4.)	E	10 <sup>4</sup>
<b>A-RRP</b>								
A1	18 év	N	1 év 7 hó	3	L	11 (2.)	E	NV
					L	11 (4.)	E*	3x10 <sup>4</sup>
A2	28 év	F	7 hó	2	P	6 (3.)	E*	NV
					P	6 (4.)	E*	2x10 <sup>5</sup>
A3	31 év	F	6 év 6 hó	2 + 1(CDV)	L	6 (3.)	E	5x10 <sup>3</sup>
					L	6 (4.)	E	2x10 <sup>3</sup>
					L	6 (5A.)	E	10
					L	6 (5B.)	E	7x10 <sup>4</sup>
A4	35 év	F	0	1	L	6 (1.)	E*	10 <sup>3</sup>
A5	36 év	F	1 év 11 hó	2	L	11 (6.)	E*	5x10 <sup>3</sup>
						11 (7.)	E	2x10 <sup>3</sup>
A6	35 év	F	0	1	N	11 (1.)	E*	10 <sup>2</sup>
A7	39 év	F	2 év 1 hó	3	L	6 (2.)	E*	NV
					L	6 (4.)	E	NV
A8	71 év	N	4 hó	2	L	6 (3.)	E	NV

**8. táblázat.** A papillomás betegcsoport HPV státusza. J-RRP = juvenilis kezdetű recidiv respiratoricus papillomatosis; A-RRP = felnőttkori kezdetű RRP; CDV: intralaesionalis cidofovir terápia (lásd később). A lokalizáció jelölése: L=gége, P=lágyszájpad, N=orrüreg. A HPV típus után zárójelben a műtét sorszáma szerepel az anamnézisben szereplő legelső műtéttől számolva; egyidejűleg több lokalizáció esetén a virológiai mintavétel helyét a műtét sorszámanál felső indexben jelölöm. A fizikai állapot jelölése: E=episzómális, \*a tisztán episzómális fizikai állapotot SBH is igazolja; a kópiaszámnál feltüntetett értékek 10 ng templát DNS-ben lévő HPV DNS mennyiségére vonatkoznak; NV=nem vizsgáltuk az elégtelen mintatérfogattól miatt.

**Valamennyi** papillomás beteg HPV DNS pozitívnak bizonyult. A legtöbb esetben a nested PCR utáni agaróz gélelektroforézis során a 450 bp hosszabb amplimer is látható volt, jelezvén a vélhetően nagyobb kópiaszámú HPV DNS jelenlétét. A 100 %-os HPV DNS pozitivitás nem meglepő annak ismeretében, hogy jó minőségű, friss, az esetek többségében bőséges szövetmintát vizsgáltunk egy kellően szenzitív technikával. Hasonló vagy nagyobb számú friss műtéti biopszián PCR technikát alkalmazva más szerzők is 100 %-os vagy azt közelítő HPV DNS pozitivitást észleltek [85, 94, 129, 137]. Több szerző végzett archív (formalinban fixált és paraffinba ágyazott) szövetekből retrospektív HPV DNS detektálást PCR technikával, a HPV pozitivitási arány ezekben az esetekben is közelítette a 100 %-ot [46, 52, 89].

Nyolc betegben HPV 11 DNS-t, 6 betegben HPV 6 DNS-t detektáltunk.

Egy beteg követése során következetesen egyazon HPV típus DNS-ének jelenléte volt igazolható. Két beteg esetében a jelen vizsgálat előtti periódusban archív (formalinban fixált és paraffinba ágyazott) szövetmintákból is megvizsgáltuk a HPV típusát, és az mindkét betegben megegyezik a friss szövetmintákban detektálttal (lásd a 3. és a 8. táblázat eredményeit). Hasonló sorozatos biopsziák HPV tipizálása a szakirodalomban nem gyakori. Gabbott és mtsai is azonos HPV típus jelenlétét igazolták az egy beteg laesióiból különböző időpontokban vett mintákban [46]. Mindez megerősíti a 6-os és a 11-es típusnak a RRP etiológiájában betöltött szerepét.

Egyidejűleg több HPV típus jelenlétét egyetlen papillomás mintában sem tapasztaltuk. A HPV koinfekciók tekintetében a szakirodalom nem egységes. Gabbott és mtsai 44 beteg 183 mintájában detektáltak HPV DNS-t, koinfekciót azonban - eredményeinkhez hasonlóan – nem észleltek [46]. Wiatrak és mtsai 58 betegből 4-ben észleltek HPV 6 és 11 koinfekciót, közülük két esetben mindkét szülő anamnézisében genitális condyloma szerepelt [137]. Egy mexikói tanulmányban 47 betegből 35-ben detektáltak HPV koinfekciót, ezt a jelenséget szerzők a vizsgált populáció sajátosságaival magyarázták [89]. A koinfekciók egyedi és kirívóan magas aránya háttérben véleményem szerint inkább a minták kontaminációja állhat.

A **juvenilis** kezdetű RRP (J-RRP) csoportban a követési idő átlagosan 48 hónap (0-86 hónap) volt, ezalatt összesen 16, betegenként átlagosan 2,7 (1-10) beavatkozás történt. A 11-es típus (6 betegből 5-ben) volt a gyakoribb. Légzési elégtelenség miatt urgens tracheotomiára 3 esetben volt szükség (J1, J2, J3), ők valamennyien HPV 11 pozitívak voltak.

A  **felnőttkori**  kezdetű RRP (A-RRP) csoportban a követési idő átlagosan 19,5 hónap (0-78 hónap) volt, ezalatt összesen 17, betegenként átlagosan 2,1 (1-3) műtétet végeztek. A HPV 6 jelenléte (8 betegből 5-ben) volt a gyakoribb. Egy beteg (A1) igényelt urgens tracheotomiát papillomatosis okozta légúti szűkület miatt, ő is HPV 11 pozitív volt.

A  **HPV 6 pozitív**  betegek követési ideje átlagosan 29 hónap (0-78) volt, ami alatt összesen 12, betegenként átlagosan 2 (1-3) műtéten estek át.

A  **HPV 11 pozitív**  betegek esetén a követési idő átlaga 33,5 hónap (0-86), a műtétek összege 21, betegenkénti átlaga 2,63 (1-10) volt.

Esetszámunk túl alacsony ahhoz, hogy messzemenő következtetéseket vonhassunk le a HPV típusok megoszlásával kapcsolatban. A 6-os és 11-es típus kizárólagos jelenléte RRP-ben általánosan elfogadott [2, 46, 52, 85, 91, 94, 96, 129, 137]. Magas onkogén kockázatú (HPV 16, 18) típusok jelenléte RRP-ben igen ritka, és általában a papillomatosis malignus degenerációjához kötődik [83, 38]. Kivétel ebből a szempontból is a már említett mexikói tanulmány, amelyben – a gyakori koinfekció mellett – a HPV 16 volt a leggyakoribb típus [89].

A 6-os és a 11-es típus megoszlásával kapcsolatban a szakirodalom nem egységes. Két – relative nagy esetszámú – tanulmány szerint J-RRP-ben a 11-es típus, A-RRP-ben a 6-os típus némileg gyakoribb [46, 52]. Más vizsgálatok szerint a 6-os és a 11-es típus gyakorisága J-RRP-ben lényegében megegyezik [96], vagy a 6-os típus a gyakoribb [137]. Ezek az eredmények – J-RRP esetében - már magyarázhatók a populációk különbözőségeivel, melynek hátterében az infekció forrásául szolgáló genitális HPV típusok eltérő gyakorisága állhat.

Régi törekvés a HPV típusok prognosztikai értékének vizsgálata RRP-ben. Számos adat szól amellet, hogy a HPV 11 rosszabb prognózist jelent [52, 96, 137]. Egy 18 évre kiterjedő retrospektív vizsgálat szerint a HPV 11 pozitív betegek több műtétet igényeltek a teljes vizsgálati idő alatt [52]. Rabah és mtsai 61 J-RRP eseten végzett vizsgálata szerint a HPV 11 pozitív betegek papillomatosisa fiatalabb életkorban jelentkezik, teljes tartama hosszabb, több műtétet igényelnek, a vizsgálat lezárásakor nagyobb valószínűséggel szenvednek aktív betegségben és nagyobb a malignus degeneráció valószínűsége is [96]. Wiatrak és mtsai vizsgálata szerint a HPV 11 pozitivitás – kvantitatív skála szerint megítélve – kiterjedtebb betegséggel, gyakoribb műtétekkel, az adjuváns terápia és a tracheotomia gyakoribb szükségével, valamint gyakoribb trachealis és bronchialis terjedéssel járt [137]. Rimmel és mtsai J-RRP-ben végzett vizsgálata

szerint a HPV 11 pozitív esetekben gyakoribb a tracheotomiát igénylő légúti obstrukció [102]. Más tanulmányok szerint a HPV 6 és 11 prognosztikai szerepe nem különbözik egymástól [2, 46].

Esetünkben – bár ismét hangsúlyozom az alacsony esetszámot – a HPV 6 és 11 pozitív betegek követési ideje nem különbözött jelentősen (29 hónap és 33,5 hónap). A HPV 11 pozitív betegek némileg több műtétet igényeltek átlagosan (2,63 kontra 2 műtét). Az egyik HPV 11 pozitív beteg (J2) intralaesionalis cidofovir terápiájának 9 műtétét – mivel azok tervezettek voltak – kihagytam a műtėti szám összesítéséből. A tracheotomiát igénylő betegek azonban valamennyien HPV 11 pozitívak voltak. Eredményeink megerősítik a HPV 11 negatív prognosztikai szerepét.

A J-RRP betegcsoportban említést érdemel egy 62 éves férfibeteg, akinek gégepapillomatosisa 12 éves korában kezdődött, majd 22 és 27 évesen recidiva miatt operáltak. Az ezt követő remisszió időszaka – a tanulmányunkba történő bevonás előtti fulmináns recidiváig számolva – 35 év (!) volt. Hasonló hosszú remissziós időszakról más szerzők is beszámolnak: Abramson és mtsai tanulmányában az egyik beteg papillomatosisa 31 év után recidivált [2], míg Erisen és mtsai egy 44 és egy 47 éven át tartó remisszió utáni RRP recidivát közölnek [41]. Utóbbi szerzők a légutak szubklinikai HPV fertőzését tartották a recidiva forrásának [41]. Nem zárható ki azonban egy – orogenitalis kontaktus útján történő – „szekunder primer” HPV infekció lehetősége sem.

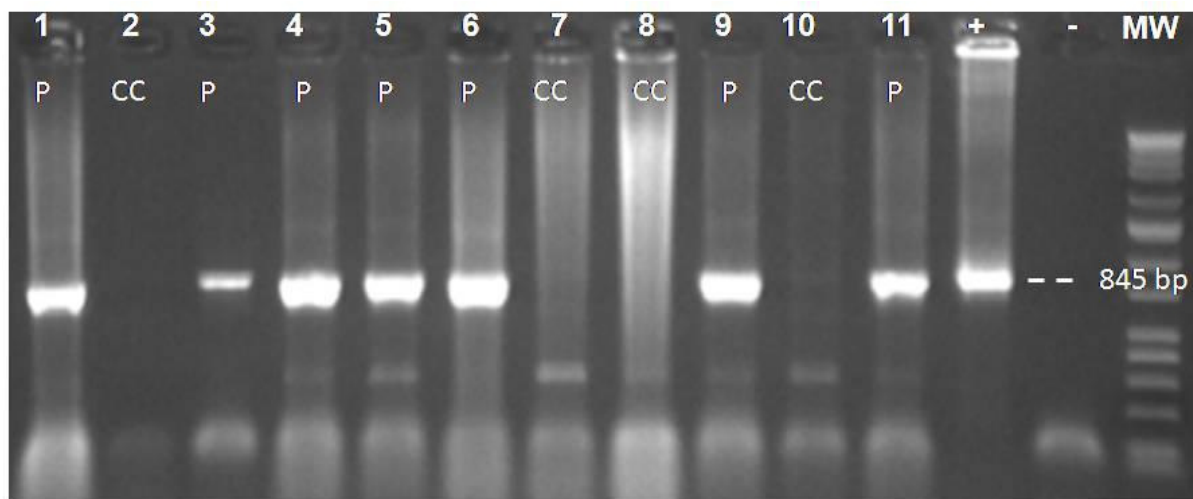
Trachealis vagy bronchopulmonalis terjedést egyetlen esetben sem észleltünk.

Az utolsó járó- vagy fekvőbeteg jelentkezés adatait figyelembe véve a betegek státuszát a 9. táblázat szemlélteti. Az utolsó – egyes esetekben az egyetlen – műtét után kilenc beteg jelentkezett kontroll vizsgálatra a tanulmány lezárásának időpontjáig.

	HPV 6 pozitív	HPV 11 pozitív
<b>Recidivamentes</b>	J4, A3	J1, J6, A5
<b>Recidiv</b>	A7	J2, J3, A1

**9. táblázat.** Az utolsó jelentkezéskor észlelt státusz a HPV 6 és 11 DNS pozitív betegcsoportban

**3.3.2. Fizikai állapot.** A vírusgenom fizikai állapotának meghatározását célzó E1, E2 és E1E2 specifikus PCR valamennyi papillomás mintában pozitív lett, mely intakt E1 és E2 ORF jelenlétét feltételezi (8. ábra). Pusztán az intakt E1E2 régió jelenléte nem zárja ki az episzómális mellett az integrált fizikai állapotú HPV DNS egyidejű jelenlétét (kevert előfordulás) valamint a több kópiában történő tandem integráció lehetőségét sem, ezek detektálására végeztük a SBH-t. A SBH 7 beteg 9 mintája esetében volt értékelhető, és tisztán episzómális állapotú HPV DNS-t igazolt (8. táblázat). A többi papillomás betegben nincs adatunk az egyidejű integrált fizikai állapot jelenlétére.



**8. ábra.** HPV6 pozitív mintákon elvégzett E2 specifikus PCR eredménye. 1-11: betegminták. +: HPV 6 DNS-t tartalmazó plazmid vektor, mint pozitív kontroll; -: negatív kontroll; MW: Sigma Wide Range molekulásúly marker

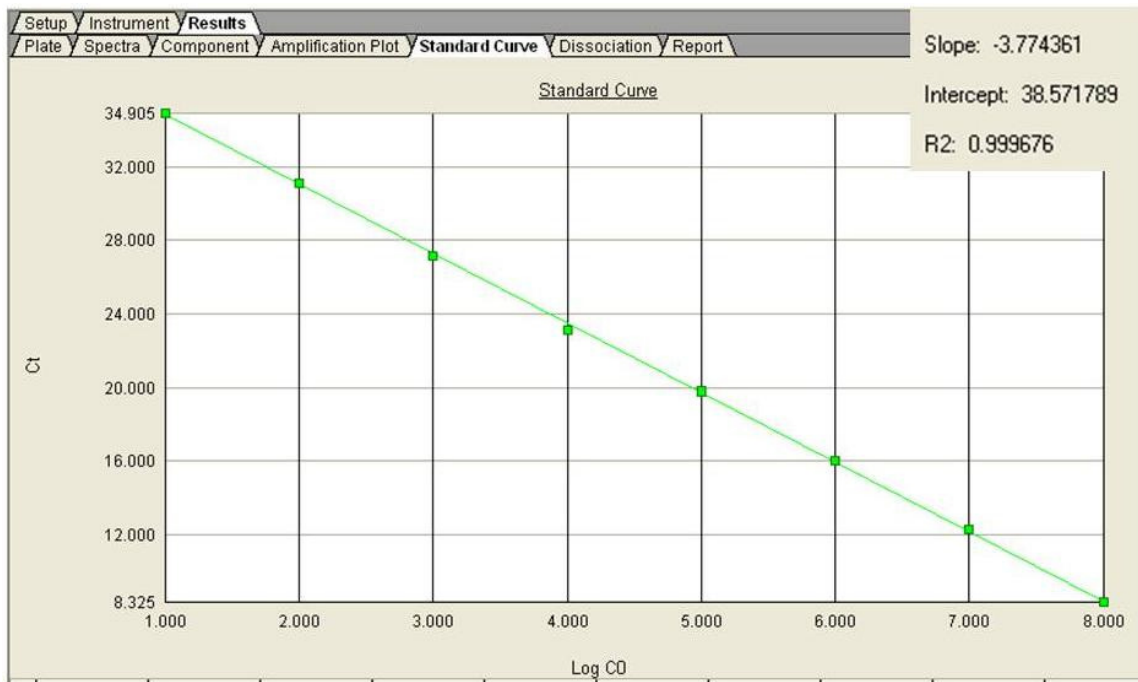
A betegek felében (7 esetben) észlelt tisztán episzómális fizikai állapot vélhetően jó prognózist jelent az esetleges malignus degeneráció elkerülése szempontjából, bár további, folyamatos követés szükséges. Reidy és mtsai 9, RRP talaján kialakult gége- és bronchus carcinomás beteg malignus szövetmintáit vizsgálták meg: valamennyi minta HPV 11-et tartalmazott. Hét beteg mintájának RT-PCR technikával történő vizsgálata során 3 esetben észlelték a HPV 11 DNS integrációját [100]. Egy másik esetben egy hosszan fennálló bronchopulmonalis papillomatosis talaján alakult ki nyirokcsomó metastasist adó laphámrák a tüdőben: a tracheobronchialis benignus laesiók mind episzómális, mind integrált HPV 11 DNS-t tartalmaztak, míg a malignus tumorból származó mintákban csak integrált állapotú HPV DNS volt

jelen. A HPV DNS kizárólagos integrált állapota mellett a p53 tumorszupresszor gén mutációját írták le, melyet a szerzők a vírus DNS integrációja következményének tartottak [97].

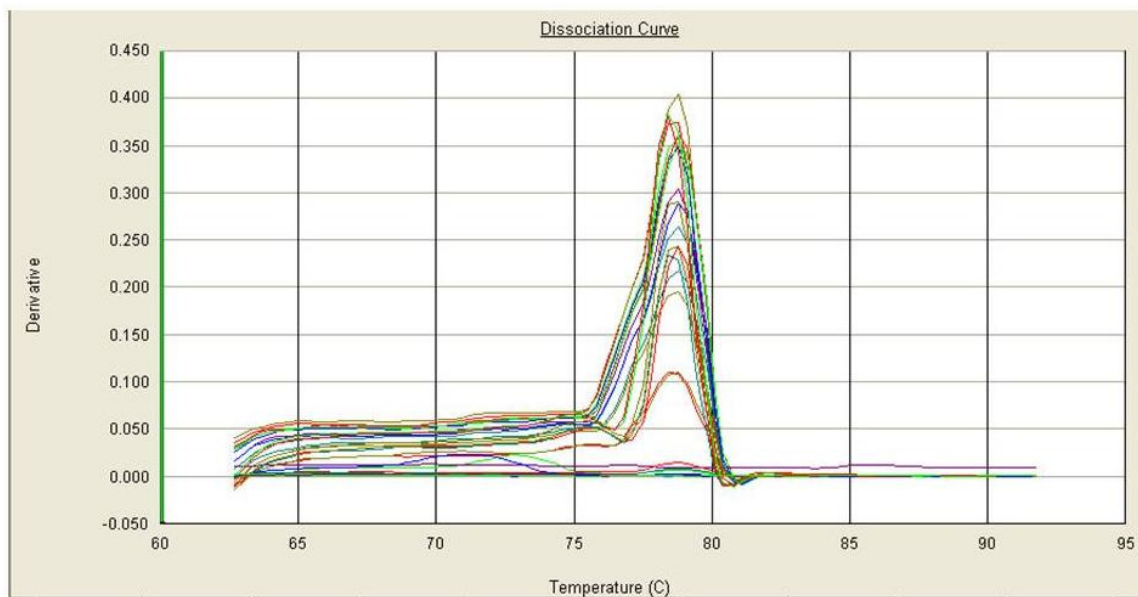
**3.3.3. Kópiaszám.** A vírusgenom kópiaszámát real-time PCR technikával vizsgáltuk (9-11. ábra). A PCR termékek ellenőrzése céljából olvadáspont-analízist végeztünk, melyet a 11. ábrán mutatok be.



**9. ábra.** Real-time PCR, a SYBR Green fluoreszcencia detektálása a PCR ciklusszám függvényében. Jelnek a zöld vízszintes vonal feletti fluoreszcencia intenzitást tekintjük.



**10. ábra.** Real-time PCR, a HPV11 plazmid hígítási sor ( $10^8$ - $10^1$ ) alapján felvett standard görbe. Minél nagyobb a kópiaszám, annál kevesebb ciklusszám elegendő a SYBR Green zaj feletti fluoreszcens jelének detektálásához.



**11. ábra.** Real-time PCR, az amplimerok olvadáspont analízise – ezzel a módszerrel az esetleges primer dimerek és az amplifikált melléktermékek jelenléte vizsgálható. A különböző hosszúságú termékek különböző olvadásponttal rendelkeznek, ez alapján különíthetők el egymástól. A fluoreszcencia csúcsintenzitását a minta lehűlésekor a létrejövő kettősszálú DNS-be beépülő SYBR Green adja. A minták amplimerjeinek és a legintenzívebb fluoreszcenciát adó HPV 11 plazmid DNS 450 bp amplimerének olvadáspontja megegyezik.

Sok esetben sajnos – a tipizálás és a fizikai állapot meghatározása után – már nem állt rendelkezésünkre elegendő minta a real-time PCR elvégzésére. A kópiaszám mindkét típus esetén akár nagyságrendi különbségeket is mutatott (HPV 6:  $10 - 2 \times 10^5$ , HPV 11:  $10^2 - 7 \times 10^4$ ). Ezek a nagyságrendi különbségek gyakran jelentkeztek egyazon beteg követése során, sőt egy beteg azonos időben vett két mintája között is (HPV 6 pozitív 31 éves férfibeteg 5. mütéte).

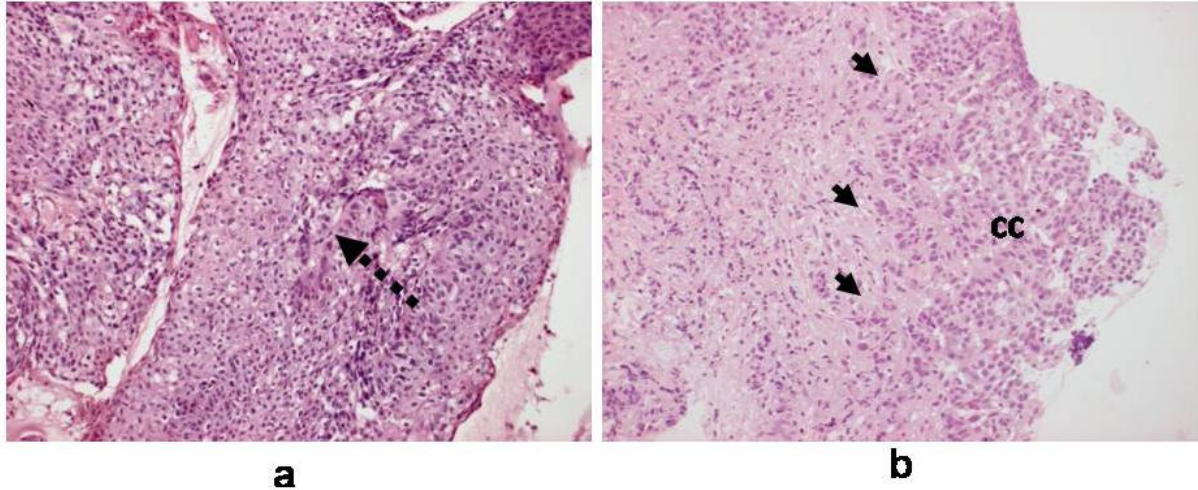
Ismereteink szerint a HPV DNS kópiaszámának követését RRP esetekben még nem vizsgálták. A kópiaszám ingadozásai megfelelhetnek a betegség természetes kórlefolrásának, melyet a HPV fertőzés és a gazdaszervezet cellularis immunitásának egyensúlya határoz meg. A HPV fertőzés szükséges, de nem elégséges feltétele a RRP kialakulásának [114], ahhoz a gazdaszervezet cellularis immunitásának alulműködése is hozzájárul [119]. Befolyásoló tényező lehet azonban maga a mintavétel is: amennyiben a feldolgozott mintában több felszíni hámsejt – a HPV produktív életciklusának megfelelően itt jellemző a tömeges vegetatív DNS replikáció - értelemszerűen magasabb kópiaszám várható. A real-time PCR technikával feldolgozott alacsony mintaszám miatt a kópiaszám és a klinikai paraméterek (pl. életkor, nem, a betegség kiterjedése, korábbi adjuváns terápia, vagy az adott mintavételt követő remisszió hossza) közötti összefüggéseket nem vizsgáltuk.

A HPV 6 és 11 pozitív papillomák és carcinomák HPV DNS kópiaszámának összehasonlítása alapján megállapítható, hogy RRP esetén a vírusgenom kópiaszáma általában nagyságrendekkel magasabb (6. ábra), megerősítvén a humán papillomavírusoknak a RRP etiológiájában betöltött kulcsszerepét.

**3.3.4. Összegzés.** *A 100 %-os HPV DNS pozitivitás, a HPV 6 és 11 kizárólagos detektálása, a betegek követése során egyazon típus következes jelenléte az alacsony onkogén kockázatú típusoknak a RRP etiológiájában betöltött szerepét igazolja. Az epizómális fizikai állapot és a carcinomákhoz képest magas kópiaszám produktív vírusinfekciót jelez. A kópiaszám széles határok közötti ingadozása a természetes kórlefolrás következménye lehet.*

### 3.4. A HPV DNS státusza a kezdetben vegyes elváltozást mutató, később malignusan degenerált betegcsoportban (korábban nem közölt, új eredmény)

A malignus degeneráció szövettani nyomonkövetésének egy példáját a 12. ábra szemlélteti.



**12. ábra. a:** dysplasia. A papillomatosus hám rétegződése felbomlik, a hám teljes vastagságában cellularis atypia jellemző, mely a szaggatott nyíllal jelölt helyen különösen kifejezett. A membrana basalis intact (*M2 beteg, 5. műtét, HE, 200x*); **b:** az azonos glotticus lokalizációból 32 hónappal később vett minta invazív laphámrákot igazol. A nyilak az inváziós frontot mutatják; cc = carcinoma (*M2 beteg, 6. műtét, HE, 200x*)

**3.4.1. HPV DNS pozitivitás és típusok.** Az öt beteg kórtörténetét és HPV státuszát a 10. táblázatban foglalom össze.

A vegyes elváltozás első észlelésekor a betegek átlagéletkora csaknem 16 évvel haladta meg az A-RRP betegcsoportét (51 év kontra 34,75 év).

A vizsgálat prospektív periódusában az 5 beteg 17 műtéten esett át, virológiai mintavételre 10 alkalommal volt lehetőségünk. A HPV DNS vizsgálatát két esetben mind a praemalignus mind a már malignus elváltozásból sikerült elvégezni. Egy betegben csak a praemalignus, két betegben csak a már malignus elváltozásból történt virológiai mintavétel.

A papillomát és dysplasiát is mutató elváltozások közül HPV DNS-re 4 minta negatív volt, egy esetben a 16-os típus DNS-ét detektáltuk. Carcinoma stádiumban 4 beteg 5 szövetmintáját vizsgáltuk, 4 minta HPV DNS negatívnak, egy minta HPV 16 DNS pozitívnak bizonyult.

Sor-szám	Kor	Nem	Műtét	Szövet-tan	HPV	Idő Σ	Megjegyzés
<b>M1</b>	52 év	F	1. LMC	P+DI	-	0	
			2. LMC	P+DI <sup>1</sup>	neg.	19 hó	
			3. LMC	P+CC	neg.	28 hó	utána fél évig nem jelentkezik
			4. LMC	CC	neg.	34 hó	
			5. HL	CC	NV	35 hó	pT2 pN0, irradiáció
			6. LMC	CC	NV	39 hó	
			7. TL	CC	NV	39 hó	kemoterápia
					55 hó	exit (lokális recidiva, távoli metastasisok)	
<b>M2</b>	50 év	F	1. LMC	P	-	0	
			2. LMC	P	-	1 hó	Ismételt mintavétel
			3. LMC	P+DII-III <sup>1</sup>	-	6 hó	
			4. LMC	P+DIII <sup>1</sup>	neg.	9 hó	
			5. LMC	D	16	39 hó	
			6. LMC+T	CC	NV	71 hó	Fulladás, praelaryngealis abscessus, tracheotomia
			7. TL	CC (G-II)	NV	72 hó	pT4 pN0, irradiáció, regionális nyirokcsomó recidiva miatt kiegészítő irradiáció
					84 hó	regionális nyirokcsomó recidiva, kemoterápia	
<b>M3</b>	49 év	F	1. LMC	P+D	-	0	Mintavétel más intézményben
			2. LMC	P+D <sup>1</sup>	neg. <sup>2</sup>	7 hó	Immunhisztokémia: CK14 inváziót kizár, p21+, p53+
			3. LMC	P+D	neg.	33 hó	p21-, p53+
			4. LMC+T	P+CC	16	50 hó	Fulladás, tracheotomia TL-től elzárkózik
			5. TL+ND	CC (G-III)	NV	64 hó	pT3 pN0
					108 hó	Tumormentes	
<b>M4</b>	44 év	N	1. LMC	P	-	0	
			2. LMC	P	-	6 hó	Lézer,
			3. LMC	P+D <sup>1</sup>	-	18 hó	Lézer, IFN-alfa kezelés indul
			4. LMC	CC	-	46 hó	Fulladás
			5. TL	CC	neg.	47 hó	pT3 pN0
					51 hó	Tumormentes	
<b>M5</b>	60 év	F	1. LMC	P+D	-	0	
			2. LMC	P+D <sup>1</sup>	-	1 hó	Ismételt mintavétel
			3. LMC+T	CC	neg.	13 hó	Fulladás, tracheotomia
			4. TL	CC (G-III)	NV	13 hó	pT3
					66 hó	Tumormentes	

**10. táblázat.** A malignizálódott gégepapillomás betegek kórtörténete és HPV típusa. Idő Σ: a legelső mintavételtől számított idő. A műtéteknél LMC = laryngomicroscopia, T = tracheotomia, TL = total laryngectomy, HL = hemilaryngectomy; a szövettani leleteknél: P = papilloma, D = dysplasia (I = enyhe, II = közepes, III = súlyos), <sup>1</sup> = a patológus a beteg gondos követését javasolta, <sup>2</sup> = a vizsgálatot korábban, archív mintából végeztük, NV = nem vizsgáltuk; - = a prospektív periódus előtt végzett mintavétel

Két betegben a HPV 16 DNS jelenlétét (egy papilloma + dysplasiában és egy carcinomában) negatív eredmény előzte meg (papilloma + dysplasiában). Alacsony onkogén kockázatú típusokat az általunk vizsgált 10 szövetmintában nem találtunk.

**3.4.2. Fizikai állapot és kópiaszám.** A HPV 16 DNS pozitív mintában a genom fizikai állapotának meghatározására irányuló E1-, E2- és E1E2 specifikus PCR-ek mindkét esetben negatívnak bizonyultak, mely vélhetően ezekben az esetekben is az igen alacsony kópiaszám következménye. A RRP-re jellemző 6-os és 11-es típus magas kópiaszámú jelenlétét tehát – a papilloma szövettani diagnózis ellenére – nem észleltük. A malignus degeneráció észlelésekor, ill. az azt megelőző években az elváltozások HPV státusza sokkal inkább emlékeztet az eleve invazív carcinomaként diagnosztizált esetekére: vírus DNS az eseteknek csak egy részében és akkor is vélhetően igen kis kópiaszámban van jelen.

Vajon a gégepapillomatosis malignus degenerációjáról van-e szó ebben a betegcsoportban? Irodalmi adatok szerint a *RRP malignus degenerációjának kritériumai* a következők: 1. kezdetben klinikailag és hisztológiailag egyértelműen benignus papillomatosis jelenléte; 2. a papillomatosis és a carcinoma diagnózisa között eltelt legalább 5 év; 3. a carcinoma észlelésekor az egyértelműen benignus papillomatosis egyidejű jelenléte a szövettani leletekben [70, 99]. Az *első feltétel* két betegünkönél teljesül (M2 és M4), a másik három betegnek a dysplasiát már az első szövettani leletben is leírták a papilloma mellett. A *második feltétel* nem túl szigorú annak ismeretében, hogy a közölt kazuisztikák vagy esettanulmányok többségében több mint 10 év telik el a papilloma és a carcinoma első diagnózisa között [53, 63, 90, 97]. A témában – az eleve ritka betegségnek is mindössze 3-5 % valószínűséggel bekövetkező malignus degenerációja miatt – nagy létszámú betegcsoport vizsgálata igen nehéz, extrém hosszú időszak retrospektív vizsgálata szükséges a megfelelő esetszám összegyűjtéséhez. Lie és mtsai 102 eseten végzett vizsgálata szerint a carcinoma diagnózisáig átlagosan 24 év telt el [70]. Esetünkben ez az időszak átlagosan mindössze 41,6 hónap volt, az 5 éves határértéket csak egy beteg (M2) érte el. A *harmadik feltételnek* két beteg (M1 és M3) felel meg. Mivel a három feltétel egyik betegben sem teljesül egyidejűleg, ezen az alapon nem beszélhetünk a gégepapillomatosis malignus degenerációjáról.

A RRP-re jellemző virológiai státuszt a prospektív periódus elején már egyik betegben sem észleltük. Ennek megfelelően nem észleltük a papillomatosis etiológiájában kulcsszerepet játszó alacsony onkogén kockázatú HPV fertőzés perzisztálását sem, azaz egyazon HPV típus jelenlétét a papillomában és a carcinomában, bár az esetszám és a mintavételek száma is limitált. A szakirodalomban fellelhetők olyan kazuisztikák vagy esettanulmányok, ahol a HPV malignus degenerációban betöltött etiológiai szerepe megalapozott: ilyen a HPV 11 genom már említett jelenléte és integrált fizikai állapota RRP talaján kialakult invazív carcinomában [97, 100]. Kashima és mtsai egy előzetesen irradiált papillomatosis malignus degenerációját után, a carcinomás mintában HPV 6 DNS jelenléte mellett az L1 protein expresszióját is észlelték [63].

A papillomatosis HPV-asszociált malignus degenerációjának másik módja a korábbi alacsony mellett magas onkogén kockázatú típusok megjelenése [38, 71]. Doyle és mtsai egy RRP-ben szenvedő gyermek tisztán benignus szövetmintáiban HPV 6 és 11 koinfekciót észleltek. A cellularis atypia progressziója során és a carcinoma észlelésekor az alacsony onkogén kockázatú típusok SBH jelintenzitásának gyengülése mellett HPV 16 DNS-t detektáltak [38]. Lin és mtsai egy súlyos dysplasiás területet is tartalmazó gégepapillomában HPV 11 és 16 koinfekciót észleltek, és a HPV 16 specifikus ISH pettyes nuclearis pozitivitásából a vírusgenom integrációjára következtettek [71]. Két betegünkben negatív HPV DNS eredmény után detektáltunk kis kópiaszámú HPV 16 DNS-t a következő műtéti anyagból (egy dysplasiában és egy carcinomában). A fizikai állapotot sajnos nem tudtuk meghatározni, az ezt követő műtétekből pedig nem történt virológiai mintavétel. A HPV 16 esetleges etiológiai szerepére vonatkozóan az elégtelen számú adat miatt nem tudunk következtetéseket levonni.

Meg kell említeni a laryngealis squamosus intraepithelialis laesiók HPV státuszával kapcsolatos irodalmi adatokat. A laryngealis SIL egy tágan értelmezett szövettani fogalom, az ún. Ljubljana-rendszerben a squamosus hyperplasiától a malignus degeneráció fokozott veszélyével járó atypusos hyperplasián át (ennek felel meg a dysplasia rendszer közepes vagy súlyos foka) a carcinoma in situ-ig terjedő spektrumot foglalja magában [47]. Laryngealis SIL estén a HPV DNS prevalenciája 0 és 56 % közötti (átlagosan 12,4 %), leggyakoribb a HPV 16 jelenléte [47]. Az általunk vizsgált 5 eset HPV státusza elsősorban a SIL-nek (és a hozzá illeszthető dysplasiáknak) felel meg.

**3.4.3. Összegzés.** *A malignus degeneráció észlelésekor, ill. az azt megelőző években a vegyes elváltozások (papilloma + dysplasia) HPV státusza sokkal inkább emlékeztet az eleve invazív carcinomaként diagnosztizált esetekére: a vírus DNS az eseteknek csak egy részében és akkor is vélhetően igen kis kópiaszámban van jelen. A virológiai eredmények alapján a papilloma jelleggel szemben a dysplasia jelleg az erősebb. A vegyes elváltozások malignus degenerációja pedig az ismert rizikófaktorok hatására, és nem HPV-asszociált módon mehetett végbe (három beteg erős dohányos volt, ketten fogyasztottak rendszeresen alkoholt). A két esetben detektált alacsony kópiaszámú HPV 16 etiológiai szerepének megítélésére nincs elegendő adatunk. Mivel a RRP és a vegyes elváltozások HPV DNS státusza alapvetően különbözik, a vírugenom státuszának meghatározása – a szövettani vizsgálat mellett - a differenciáldiagnózis fontos kiegészítő eszköze lehet.*

### **3.5. A HPV DNS státuszának jellemzése az RRP intralaesionalis cidofovir terápiája során (2. dolgozat)**

**3.5.1. Az intralaesionalis cidofovir terápia irodalmi áttekintése.** Intralaesionalis cidofovir kezeléssel kapcsolatban szerzett tapasztalatokról számos szerző számol be, az általam hivatkozott közlemények főbb adatainak összehasonlítását a 11. és a 12. táblázat tartalmazza.

A közlemények objektív összehasonlítása gyakorlatilag lehetetlen. A betegcsoportok eleve kis létszámúak (3-26 főből állnak). A juvenilis és az adult RRP eleve eltérő klinikai viselkedést mutat. Különböznek a cidofovir terápia indikációi is. Számos közleményben a betegek a kezelés előtt vagy alatt egyéb adjuváns kezelésben is részesültek [68, 112]. A HPV DNS típusát is a betegek alig több mint felében ismerjük, az azonosított típusok egységesen alacsony malignitásúak (11. táblázat).

Szerző	Betegcsoport	Esetszám	Indikációk / kizáró okok	HPV
<b>Bielamowicz (2002) [13]</b>	felőtt	13	1. min. 18 év a kezelés kezdetén 2. supraglottis és subglottis közötti betegség 3. Kizárást jelent, ha két egymás utáni inj-ra nincs javulás	n.v.
<b>Chetri (2002) [19]</b>	felőtt	5	1. 2-3 havonta műtétet igénylő RRP 2. commissura ant. vagy hangszalagi lokalizáció	n.v.
<b>Chetri (2003) [20]</b>	gyerek	5	nincs külön indikáció	6/11: 5
<b>Chung (2006) [22]</b>	gyerek	11	hangsúlyozottan nincs külön kritériumhoz kötve	n.v.
<b>Dikkers (2006) [34]</b>	felőtt	9	Ismételt műtéteket igénylő progresszív RRP vagy laesiók kimetszésének technikai akadályai	6: 1 6/11: 8
<b>Lee (2003) [68]</b>	felőtt gyerek	13 3	1. 3-4 havonta műtétet igénylő vagy laryngotrachealisan terjedő „súlyos” RRP 2. I3C-n kívül más adjuváns kezelés az anamnézisben kizáró ok	n.v.
<b>Mandell (2004) [76]</b>	gyerek	4	1. min. 4 műtét évente a légutak biztosítása érdekében 2. min. 6 hónapos életkor	n.v.
<b>Naiman (2003) [85]</b>	felőtt	16	CDV kezelés alatt más adjuváns terápiát nem kaphat	6/11: 26
<b>Pransky (1999) [95]</b>	gyerek	5	1. „agresszív” RRP (havi több mint 1 műtét); 2. Eddigi kezelés sikertelensége	6: 1 11: 2 6/11: 2
<b>Pransky (2000) [94]</b>	gyerek	5	1. „agresszív” RRP (havi több mint 1 műtét) 2. Eddigi kezelés sikertelensége	11: 3 6/11: 2
<b>Shirley (2004) [112]</b>	gyerek	11	6 hetente vagy gyakrabban szükséges műtétek	6: 1 11: 10
<b>Snoeck (1998) [118]</b>	felőtt gyerek	14 3	„súlyos” RRP	6/11: 2 n.v.: 15
<b>Wilson (2001) [138]</b>	felőtt	3	felőttkori RRP	6/11: 3

**11. táblázat.** Az intralaesionalis cidofovir kezelésbe bevont betegcsoportok, a kezelés indikációi és a betegek HPV státusza. n.v.: nem vizsgálták. I3C = indol-3-karbinol. CDV = cidofovir.

Különbözik a műtéti technika: az esetek egy részében csak intralaesionalis cidofovir injekciót alkalmaztak, más részében azonban ezt a makroszkópos laesiók eltávolítása előzte meg (éles eszközzel, lézerrel vagy microdebriderrel). Eltért a cidofovir egyszeri és kumulatív összdózisa, valamint koncentrációja is. Az alkalmazási protokollokban általában közös a 2-8 hetes intervallummal adott néhány (4-6) injekcióból álló indukciós, majd az esetek egy részé-

ben egy hosszabb intervallummal adott fenntartó kezelés. Az injekciók száma (1-19 alkalom) és a terápia tartama a kitűzött céltől függött, mely általában a komplett remisszió vagy a stabil alacsony PSS értékű residualis betegség volt. A közlemények egy részében összerosódik a terápia ideje és a terápia utáni követési idő (12. táblázat).

Szerző	Műtét	Dózis	Protokoll	Inj. száma	Terápia tartama	Követés
<b>Bielamowicz (2002) [13]</b>	csak CDV	6,25 mg/ml 6 ml/műtét	havonta, CR elérése után további 1 injekció	1-19 (6)	0,02- 3,67 (1,03)év	n.a.
<b>Chetri (2002) [19]</b>	CDV adás percutan technikával helyi érzéstelenítésben	37,5 mg/ml 38-57 (47) mg/műtét	2-4 hetente majd statustól függően hosszabb időnként	2-12 (7,2)	7-16 (12) hó	n.a.
<b>Chetri (2003) [20]</b>	Éles v. lézer eltávolítás + CDV	5 mg/ml 1 mg/ttkg egyszeri dózis	2 hetente 2 alkalommal, majd az intervallum fokozatosan 1 héttel nő	8-22 (12,6)	31-123 (65,8) hét	n.a.
<b>Chung (2006) [22]</b>	Lézer eltávolítás + CDV	5 mg/ml, 0,2-3 ml, PR vagy recidiva esetén 10 mg/ml, 1-3 ml	Havi időközrel 4 injekció, 1 hónap múlva kontroll vizsgálat, PR vagy recidiva esetén havi időközrel 4 injekció az emelt dózissal	4 vagy 8	4 vagy 9 hó	(30,9) hó
<b>Dikkers (2006) [34]</b>	Éles eltávolítás + CDV	2,5 mg/ml 10,5-128 (55,7) mg kumulatív összdózis	6 hetente 6 alkalommal, majd residualis betegség esetén tovább Kontroll vizsgálat 1, 3, 6, 12, 18, 24 és 36 hó múlva	6-17 (8,8)	min. 30 hét	6 hó–3 év (1,7) év
<b>Lee (2003) [68]</b>	Éles v. lézer eltávolítás + CDV	2,5 majd 5 mg/ml 133,5 mg átlagos kumulatív összdózis	3 hetente injekciók, átlagosan 2-3 alkalommal	1-9 (3,5)	min. 3 hét	11-48 hó (25,4) hó <sup>1</sup>
<b>Mandell (2004) [76]</b>	Lézer eltávolítás + CDV	5 mg/ml, 0,8 ml/műtét	2 havi időközrel 6 injekció, majd 2-3 havonta kontroll, recidiva esetén folytatás	9-14 (11)	min. 10 hó	20-30 (26,5) hó <sup>2</sup>
<b>Naiman (2003) [85]</b>	Éles v. lézer eltávolítás (csak légúti obstrukció v. CDV rezisztencia esetén) + CDV	5 mg/ml Egyénileg meghatározott, légúti obstrukciót nem okozó volumen	Havi időközrel 3 injekció, utána további injekciók a 3-6 havi kontroll endoszkópiától függően	felnőtt: 1-7 (4) gyerek: 2-20 (6,1)	felnőtt: (10,9) hó gyerek: (13,8) hó	felnőtt: 1-32 (9) hó gyerek: 1-35 (7) hó

12. táblázat. Folytatás a túloldalon

Szerző	Műtét	Dózis	Protokoll	Inj. száma	Terápia tartama	Követés
<b>Pransky (1999) [95] újraértékelve 2000-ben</b>	Éles v. lézer eltávolítás + CDV	2,5 majd 5 mg/ml 1-2 ml/műtét	2-3 hetente	8-18 (13,4)	3 ¾ -13 ¾ (8,15) hó	18-22 hó (19,4) hó
<b>Pransky (2000) [94]</b>	Éles v. lézer eltávolítás + CDV	5 mg/ml 2-4 ml/műtét	2 hetente	4	6 hét	12-17 hét (13,8) hét
<b>Shirley (2004) [112]</b>	Microdebrider + CDV	5-7,5 mg/kg 2-3 ml/műtét	2 hetente 4 alkalommal, aztán a kezelőorvos döntésétől függően	(6)	min. 6 hét	(2,5) év
<b>Snoeck (1998) [118]</b>	csak CDV adás	2,5 mg/ml 4-8 ml/műtét	2 hetente, klinikai válaszig. CR elérése után további 2 CDV	2-15 (7,2)	1-13 (4,7) hó	0-27 hó (13,8) hó
<b>Wilson (2001) [138]</b>	csak CDV	4,17 mg/ml 5-10 ml/műtét	2-4 hetente 2 egymást követő CR esetén leállítás	9 - >15	4-7 <sup>3</sup> hó	24 hó <sup>2</sup>

**12. táblázat.** Az intralaesionalis cidofovir terápia protokolljai. A követési időt az utolsó injekciótól számítjuk. <sup>1</sup>: csak a komplett remisszióban lévő betegekre vonatkozó adat; <sup>2</sup>: a követést az első cidofovir injekciótól számolja; <sup>3</sup>: egy beteg a 7 hónapos terápia utáni követési szakban recidiva miatt további cidofovirt kapott. CDV = cidofovir; CR = komplett remisszió. PR = parciális remisszió. Az utolsó három oszlop zárójelbe tett számai átlagértékeket jelölnek.

Nem egységes a komplett és a parciális remisszió fogalma sem, a szerzők egy része a PSS=0 érték egyszeri elérését már komplett remissziónak tekinti, függetlenül az akár pár hét múlva észlelt recidivától. Chadha és mtsai ezen az elven 17 közlemény adatait (158 beteg) feldolgozva a következő eredményt kapta: komplett remisszióba 90 beteg (57 %), parciális remisszióba pedig 55 beteg (35 %) került, 13 beteg (8%) nem reagált a kezelésre [16]. Az intralaesionalis cidofovir terápia tehát általában sikeresnek mondható.

A kezelés általunk alkalmazott paraméterei (9 injekció 55 hét alatt, 1 mg / ttkg egyszeri összdózis, 5 mg/ml vagy 10 mg/ml koncentráció lokalizációtól függően, 62 hét követési idő) megfelelnek a szakirodalmi adatoknak. Chadha és mtsai fent említett irodalmi összefoglalása szerint a az intralaesionalis cidofovir terápia paramétereinek medián értéke a következő volt: 2,5-5 mg/ml egyszeri cidofovir dózis, 2-4 hetes terápiás intervallum és 12 hónapos kezelési idő [16]. Ismereteink szerint a HPV DNS fizikai állapotát és kópiaszámát intralaesionalis cidofovir terápia során a korábbiakban még nem vizsgálták.

**3.5.2. A szövettani leletek értékelése RRP cidofovir terápiája során.** Betegünk esetében a szövettani vizsgálat – egy eset kivételével – papillomatosiszt igazolt, az utolsó három kezelés alkalmával enyhe dysplasiával. Súlyos dysplasiát vagy malignus degenerációt a leletező patológus nem észlelt. Az egyetlen kivétel a gégeből a 3. injekció alkalmával vett szövetminta, melynek diagnózisa laryngitis chronica volt.

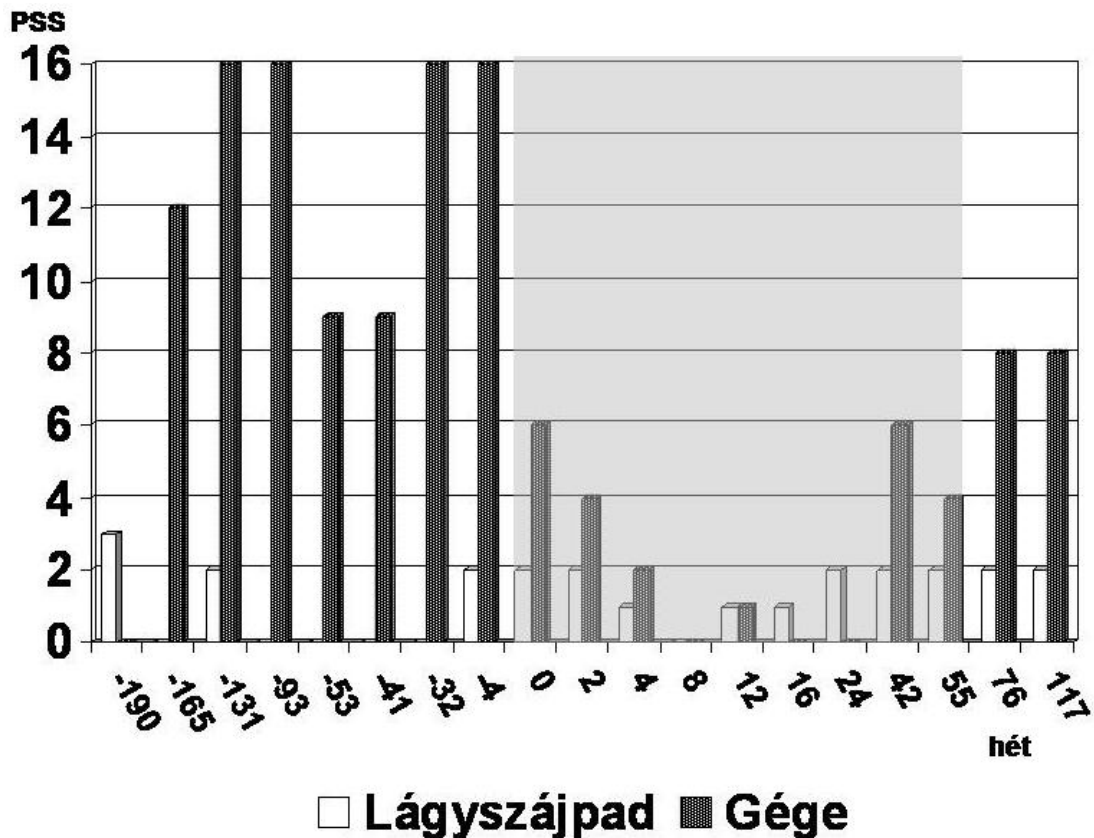
RRP cidofovir terápiája kapcsán kialakult invazív malignus tumort még nem észleltek, a dysplasia is irodalmi ritkaság. Egy 9 betegből álló csoport intralaesionalis cidofovir kezelése során a hangszalagon egy esetben jelentkezett dysplasia egy 52 éves betegben, 6 injekcióban adott 83,5 mg cidofovir összdózis után 6 hónappal (a dysplasia fokát a szerző nem részletezi). A további cidofovir terápia során azonban a dysplasia megszűnt, 19 hónappal a kérdéses biopsia után a beteg komplett remissióban van [34]. Wemer és mtsai egy 28 éves nőbeteg 27 hónapos intralaesionalis cidofovir kezelése során súlyos dysplasia kialakulásáról számoltak be [136]. Snoeck és mtsai 2 cidofovir kezelésben részesült felnőtt beteg terápia *előtti* szövettanában észleltek gócban verrucosus carcinomát. Az egyik beteg későbbi leleteiben malignitás már nincs, a HPV DNS irányú ISH vizsgálat pedig negatív [118]. Az esetleges cidofovir indukálta malignitás az Egyesült Államokban bejelentésre kötelezett mind a FDA, mind a RRP Task Force intézménye felé [31]. A dysplasia előfordulása miatt mi kötelezőnek tartjuk a cidofovir kezelés rendszeres szövettani követését.

Hegesedést már írtak le a hangszalagokon il. cidofovir terápia kapcsán a betegek egy részében, de ebben az ismételt LMC és CO<sub>2</sub> laser kezelés is szerepet játszhatott [68].

Systemás mellékhatást – a szakirodalommal összhangban – nem észleltünk [34, 86, 118, 131].

**3.5.3. A cidofovir kezelés hatása a papillomatosis kiterjedésére.** A kétgócú papillomatosis követésére szolgáló PSS értékeket a cidofovir kezelés előtt, alatt és után a 13. ábra mutatja. A kezelés előtti időszakban a laryngealis PSS értékek 9 és 16 között fluktuáltak, dacára a kombinált CO<sub>2</sub> lézer és IFN-alfa terápiának. A légyszájpad betegség ennél kevésbé kiterjedt (PSS maximum 3), ráadásul több mint két éven át ez a lokalizáció remisszióban is volt. Négy héttel a cidofovir kezelés előtt a betegből a légyszájpad hátsó szélét érintő és a gége csaknem egészét kitöltő papillomatosiszt távolítottunk el.

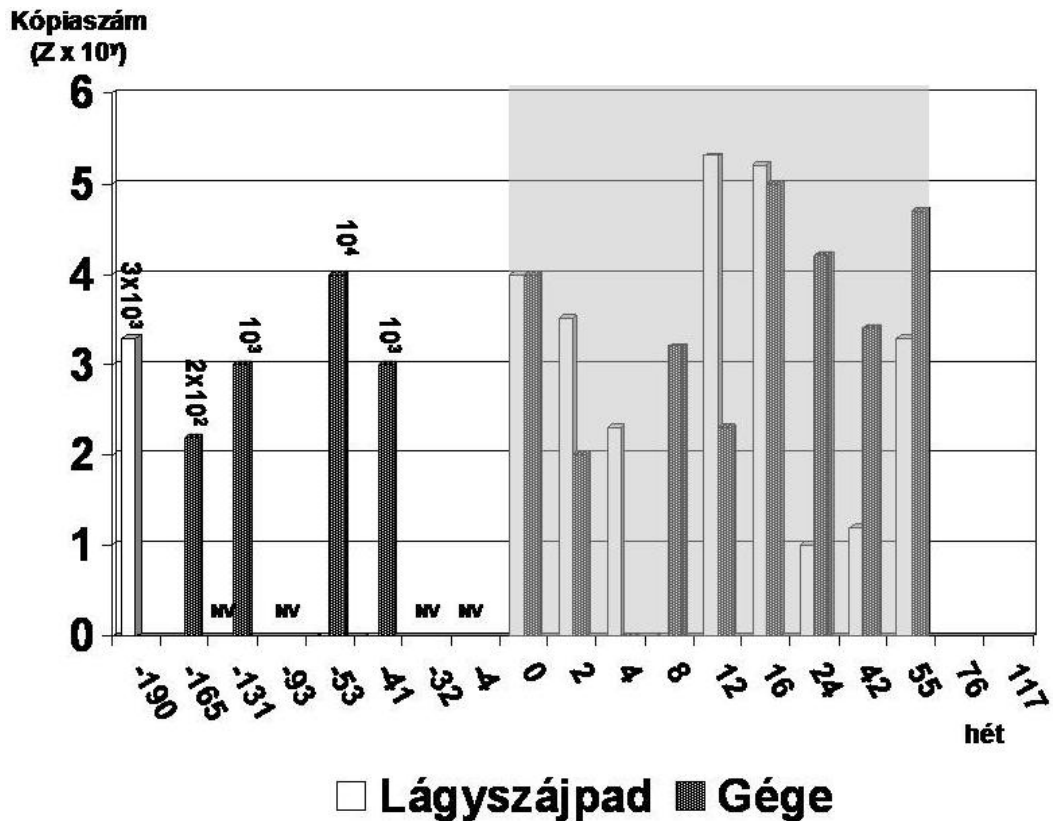
A betegség súlyosságát jelzi, hogy mindössze négy héttel később (a cidofovir kezelés kezdetekor) a gégeben 6-os, a lágyszájpadon 2-es PSS értékű recidivát észleltünk. A kétheti intervallummal adott első 4 injekció alkalmával a PSS értékek mindkét lokalizációban csökkennek, a 4. injekció idejére (8 hét) a beteg komplett remisszióba kerül. Később, amint az injekciók intervalluma nő, a RRP kontrollált recidívája jelentkezik, a kezelést megelőzőnél alacsonyabb laryngealis PSS értékekkel (maximum 6 a gége és 2 a lágyszájpad esetében). Ez a parciális remisszió a kezelés utáni 62 hetes követési időben stabil maradt.



**13. ábra.** A PSS (papilloma severity score) értékek alakulása az idő (hét) függvényében a két érintett lokalizációban. A „0” idő a cidofovir terápia kezdetét, a halványszürke szakasz a kezelés tartamát mutatja. A negatív számok a cidofovir kezelés előtti időszakot reprezentálják.

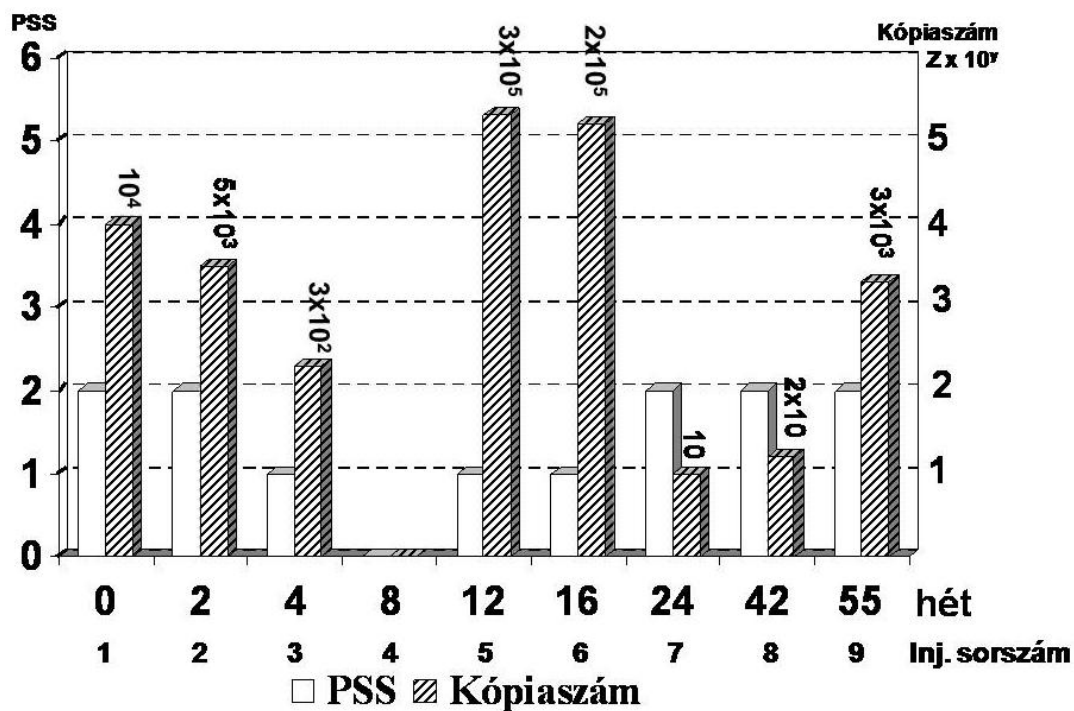
**3.5.4. A cidofovir kezelés hatása a HPV DNS státuszára.** Valamennyi biopsiában *HPV 11 DNS-t* detektáltunk. Amennyiben a kópiaszám elérte az E1, E2 és E1E2 PCR-ek érzékenységi küszöbét – az epizómális *fizikai állapotra* jellemző intakt E1E2 régiót észleltük. A HPV DNS kópiaszámának ingadozását a cidofovir kezelés előtt, alatt és után a 14. ábra mutatja. A kezelés előtti időszakban a laryngealis kópiaszám mintegy 2 nagyságrendnyi fluktuációt mutat, a lágyszájpad kópiaszámot csak egy alkalommal határoztuk meg. A laryngealis kópi-

szám ingadozását (kombinált műtéti és IFN terápia mellett is) a HPV fertőzés természetes kórlefordulása és a gazdaszervezet antivirális immunitásának változásai magyarázhatják.

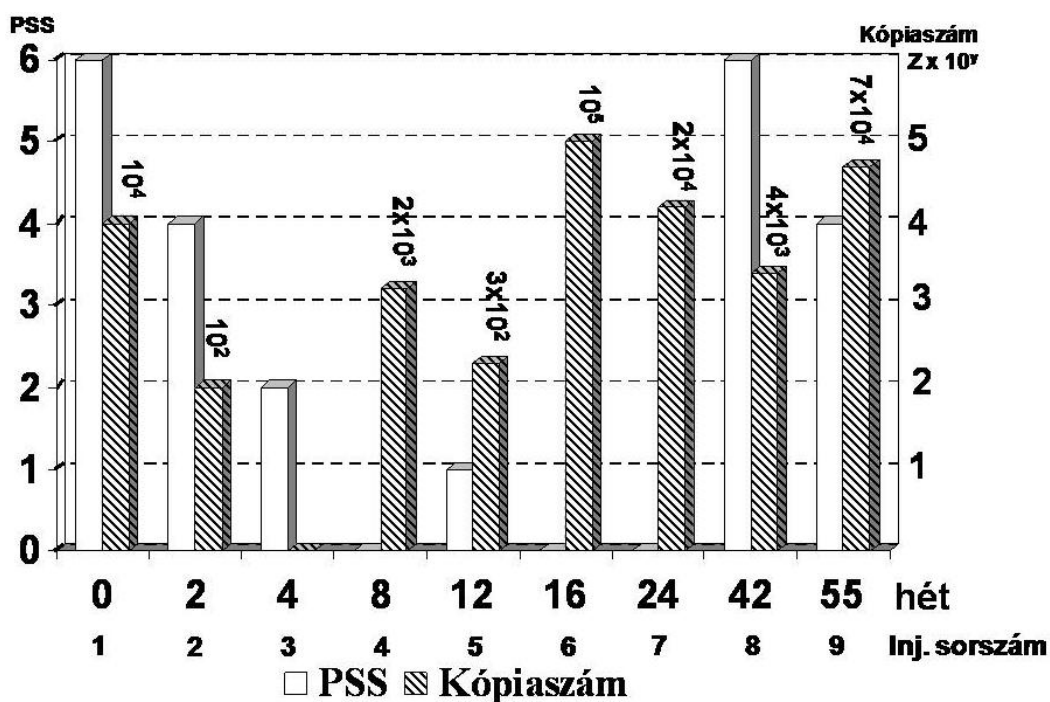


**14. ábra.** A HPV DNS real-time PCR technikával meghatározott kópiaszámának ábrázolása logaritmikus skálán az idő (hét) függvényében a két érintett lokalizációban. A 10 ng templát DNS-re vonatkozó kópiaszámot a  $Z \times 10^y$  képlettel fejezzük ki, ahol „y” az ordinátán jelölt hatványkitevő (egész szám), „Z” a két egymás utáni „y” egész szám közötti tizedesek száma. A kezelés előtti időszak pontos kópiaszám értékeit a megfelelő oszlopok felett is feltüntettük. Az „NV” jelölés a kópiaszámra nem vizsgált műtéti biopsziavételt jelenti

A 15. és a 16. ábra szimultán szemlélteti a PSS értékek és a HPV DNS kópiaszámának alakulását a cidofovir kezelés alatt, mindkét lokalizációban.



15. ábra. A PSS értékek és a HPV DNS kópiaszámának egyidejű ábrázolása cidofovir terápia idejének (hét) függvényében, a légcsőpad esetében. A  $Z \times 10^Y$  képlet jelentését lásd a 14. ábra magyarázatánál. A pontos kópiaszám-értékeket a megfelelő oszlopok felett is feltüntettük.



16. ábra. A PSS értékek és a HPV DNS kópiaszámának egyidejű ábrázolása cidofovir terápia idejének (hét) függvényében, a gége esetében. A  $Z \times 10^Y$  képlet jelentését lásd a 14. ábra magyarázatánál. A pontos kópiaszám-értékeket a megfelelő oszlopok felett is feltüntettük.

A cidofovir kezelés alatt a gége esetében az első három, a lágyszájpad esetében az első négy injekció során a PSS értékének csökkenését a vírusgenom kópiaszámának csökkenése kíséri. A negyedik injekció idejére – amikor a beteg átmeneti komplett remisszióba került – a lágyszájpadban a kópiaszám a detektálási küszöb alatti (lásd fent), a papilloma-mentes gégeben  $2 \times 10^3$  volt. Előbbi esetben csak az MY09/MY11 – GP5+/GP6+ nested PCR mutatta a HPV DNS jelenlétét, mely vélhetően extrém alacsony kópiaszámban lehetett jelen.

Említést érdemel a gége 3. injekciója, amikor PSS=2 értéknél (felszíni laesiók a commissura anterior és a bal oldali hangszalag területén) a real-time PCR negatív eredményt mutat. Ezzel összhangban volt a papillomát kizáró, idült gyulladást igazoló szövettani lelet is. Ebben az esetben is csak a nested PCR igazolta a HPV 11 DNS jelenlétét.

A cidofovir terápia későbbi – megnövelt intervallumú - fázisában azonban a papillomatosis mindkét lokalizációban recidivál, és ekkor a PSS értékek és a HPV DNS kópiaszáma egymástól függetlenül fluktuál. A lágyszájpad 5. injekciója esetén például egy kis felszíni laesiót (PSS=1) magas HPV DNS kópiaszám ( $3 \times 10^5$ ) kísér. A gége a 6. és a 7. injekció alkalmával remisszióban van, ugyanakkor a vírusgenom kópiaszáma igen magas ( $10^5$ , ill.  $2 \times 10^4$ ). A kópiaszám ingadozásában az egyes lokalizációk esetében akár 4 nagyságrendi eltérés is van, ráadásul a két lokalizáció kópiaszáma egymástól függetlenül fluktuál. Megjegyzendő az is, hogy a kezelés késői szakában – bár a PSS értékek a kezelés előttihez képest csökkentek – a vírusgenom kópiaszáma esetenként mindkét lokalizációban meghaladta a kezelés előtti értéket (13. és 14. ábra).

Eredményeink alapján látható, hogy esetünkben a cidofovir a HPV DNS-nek sem a típusát, sem a fizikai állapotát nem befolyásolta. Az egységes episzómális fizikai állapot a papillomák jellegzetessége. A RRP-ban detektált változatlan HPV típus endogén reinfekció mellett szól, melynek forrása a HPV DNS-nek a makroszkóposan ép nyálkahártyában észlelt jelenléte lehet (látens infekció) [118]. Éppen ezért néhány szerző a komplett remisszió elérése után is ad egy vagy két intralaesionalis injekciót a RRP korábbi lokalizációjának nyálkahártyájába [13, 118]. Esetünkben a látens infekciót – mint a későbbi recidiva forrását – a recidivamentes szövetben kimutatott, esetenként magas HPV DNS kópiaszám bizonyítja (gége, 4., 6. és 7. injekció). A látens HPV fertőzéssel kapcsolatos másik probléma az, hogy a RRP által korábban nem érintett –akár távoli - lokalizációkban is előfordulhat [91, 115]. A látens fertőzés ismeretlen loka-

lizációit azonban sem műtétechnikailag, sem a cidofovir összdózisa szempontjából nem lehet helyi injekciókkal kezelni.

A cidofovir kezelés **kezdeti szakasza** (kéthetes intervallummal adott első négy injekció) mind a betegség kiterjedése (PSS érték) mind a HPV DNS kópiaszámának szempontjából meglehetősen sikeresnek bizonyult. A gége esetében a 3., a lágyszájpad esetében a 4. injekció idejére a vírus DNS kópiaszáma real-time PCR technikával a detektálhatóság határa alá csökkent. A kópiaszám csökkenésével egyidejűleg a PSS érték is mindkét lokalizációban csökkent. A cidofovir hatékony antivirális hatásának kifejtéséhez tehát – úgy tűnik – kéthetes injekciós intervallum szükséges. Ez azonban egyrészt a beteg szempontjából lenne elviselhetetlen, másrészt nem feledkezhetünk meg a cidofovir esetleges toxikus hatásairól sem! Ezen érvek miatt a szerzők többsége vagy eleve hosszabb intervallummal adja a cidofovirt, vagy egy rövid intervallumú indukciós kezelés után növeli az injekciók intervallumát (12. táblázat). A cidofovir kezelés második – **hosszabb intervallumú** – szakaszában a HPV kópiaszám ismét mindkét lokalizációban nő (esetenként akár meg is haladja a kezelés előtti értékeket) és újra megjelennek a fluktuációk. A virológiai lelettel ellentétben a betegség mindkét lokalizációban „kontrollált” recidivát mutat. A papillomatosis tartós kontrollját a cidofovir hosszú távú – a vírusreplikáció gátlásától független – hatásai magyarázhatják. Van Cutsem egy a tumorsejtekre kifejtett közvetlen gátló hatást, illetve a gazdaszervezett fokozott immunválaszát (emelkedett natural killer sejt aktivitást) feltételezett [132]. Itt utalok a bevezetésben részletezett *in vitro* és *in vivo* kísérleti eredményekre is: E6 és E7 expresszió csökkenése transzkripció szinten, sejtciklus gátlás „S” fázis blokk révén, apoptózis indukció, stb. [1, 5]. Ezeket a kísérleteket ugyan carcinoma sejtvonalakon végezték, de a vírus DNS transzkripciójának cidofovir által okozott gátlása papillomák esetében is működhet.

**3.5.5. Az intralaesionalis cidofovir terápia értékelése.** A cidofovir hatásának megítélését számos körülmény nehezíti. A PSS értékek kezdeti csökkenését az ebben a szakban rövid intervallummal végzett műtétek önmagukban magyarázhatják (azaz a beteg gyakrabban esett át LMC-n mint azt a betegség természetes kórlefolyása indokolta volna). Ráadásul a cidofovir terápia előtt mindössze 4 héttel a gégéből kiterjedt papillomatosis eltávolítása történt (laryngealis PSS=16). A virológiai leleteket a megelőző IFN terápia és annak felfüggesztése is befolyásolhatja. A terápia második szakaszában a kontrollált betegséget az RRP természetes kórlefolyása – elsősorban a praepubertas jótékony hatása – is befolyásolhatta.

Összefoglalva, esetünkben az intralaesionalis cidofovir terápia hatékonynak bizonyult, de nem kuratívnak. A kezelés előtti HPV DNS kópiaszámot a kezelés második szakaszában észlelttel összehasonlítva azonban nem ítéltük sikeresnek a cidofovirt, legalábbis a feltételezett vírusreplikáció-gátlás szempontjából nem. A terápia sikerének megítélése a szakirodalomban is meglehetősen szubjektív, egyrészt a Derkay-skála pontértékeinek csökkenését, másrészt a cidofovir kezelés utáni követési szakban észlelt ritkább műtéti frekvenciát jelenti [20, 22, 95]. A fenti két kritérium esetünkben teljesül. Amennyiben az agresszív RRP definícióját vesszük alapul [37], a korábbi agresszív betegség nem agresszív formába ment át.

A beteg tracheostomáját a 7. injekció után megszüntettük, ekkor a gége tumormentes volt, a lágyszájpad szabad szélén mindkét oldalon borsónyi előemelkedő laesio helyezkedett el (PSS=2). A kezelés végén és a követési szakban is perzisztáló 3 mm átmérőjű tracheocutan fistula azonban jelezte a gége részben szűkítő recidív papillomatosis, miközben a lágyszájpad laesio stabil maradt.

Esetünkben a kiterjedt, a korábbi kombinált kezelésre (műtét + adjuváns) nem reagáló RRP tette szükségessé a cidofovir „off-label” használatát. Számos más szerrel ellentétben relative hosszú adagolási intervallumának, helyi alkalmazhatóságának (ez ugyan általános narkózist igényel) és a mellékhatások igen ritka előfordulási gyakoriságának köszönhetően a cidofovir mára világszerte a RRP elleni fegyvertár egyik leggyakrabban alkalmazott adjuváns gyógyszer lett [36].

Gyakorivá vált recidívák miatt egy HPV 6 pozitív felnőtt beteg (A3) 6. műtéténél is végeztünk intralaesionalis cidofovir injekciót. Az ezt követő 33 hónapos követés során a beteg végig komplett remisszióban volt. Ennek megfelelően a kópiaszám sorozatos meghatározására ebben az esetben nem volt lehetőség.

**3.5.6. Összegzés.** *Az intralaesionalis cidofovir kezelés a HPV DNS típusát és fizikai állapotát nem befolyásolta. A kezdeti, rövid intervallummal adott szakaszban a HPV DNS kópiaszámának hatékony csökkenését észleltük, ezzel párhuzamosan a beteg komplett remisszióba került. A hosszabb injekciós intervallummal járó fenntartó fázisban a betegség stabil, kontrollált mértékben recidivált, a HPV 11 DNS kópiaszáma ismét több nagyságrendnyi fluktuációt mutatott. Az intralaesionalis cidofovir terápia tehát hatékonynak bizonyult, de nem kuratívnak.*

#### **4. AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA**

A fej-nyaki carcinomák (n = 33), papillomák (n = 14), valamint kezdetben papillomát és dysplasiát tartalmazó, később malignusan degenerált vegyes elváltozások (n = 5) HPV DNS státuszát (előfordulási gyakoriság, típusok, fizikai állapot, kópiaszám) friss műtéti biopsziákban, polimeráz láncreakciókkal és Southern-blot hibridizációval vizsgáltuk.

A fej-nyaki carcinomákban a HPV DNS pozitivitás előfordulása 45 % volt (33 betegből 15 mintája tartalmazott HPV DNS-t). Alacsony (6 és 11) valamint magas onkogén kockázatú (16) típusok egyaránt kimutathatók, lokalizációtól függetlenül. Az alacsony kópiaszám miatt a HPV DNS fizikai állapotát nem tudtuk meghatározni, kivéve egy oropharynx tumoros mintát, amelyben a genom vélhetően integrált állapotban volt jelen, a felhasadás az E2 régióban történhetett. Nem találtunk összefüggést a HPV pozitivitás és a betegek klinikopatológiai paraméterei, valamint a prognózis között. Eredményeink alapján a humán papillomavírusoknak a fej-nyaki carcinogenesisben betöltött szerepe kérdéses.

A papillomás csoport összes betege (14/14) pozitívnak bizonyult HPV 6-ra vagy 11-re. Számos beteg esetén egyazon HPV típus jelenléte az egymás utáni műtétek során következetesen igazolható. A HPV 11 jelenléte vélhetően rosszabb prognózist jelent (némi gyakoriabban recidivák, tracheotomia szükségessége). A vírus episzómális fizikai állapotban és a carcinomákhoz képest lényegesen magasabb kópiaszámban van jelen, utóbbiban a betegség természetes kórlefolyása során akár több nagyságrendnyi fluktuációk is vannak.

A papillomát és dysplasiát tartalmazó vegyes elváltozások malignus degenerációja során – a mintát a praemalignus vegyes elváltozásból vagy a már invazív carcinomából véve - a legtöbb vizsgált szövet HPV DNS negatív lett, két betegben detektáltunk HPV 16 DNS-t. A kópiaszám ezekben az elváltozásokban is igen alacsony. Ezen betegcsoport HPV státusza tehát a carcinomákéhoz hasonló.

Egy recidiv respiratoricus papillomatosisban szenvedő 14 éves gyermek intralaesionalis cidofovir terápiája során a rövidebb intervallummal járó indukciós fázisában a betegség remisszióját a HPV DNS kópiaszámának hatékony csökkenése kísérte. A hosszabb injekciós intervallummal járó fenntartó fázisban a betegség stabil, kontrollált mértékben recidivált, a HPV 11 DNS kópiaszáma ismét több nagyságrendnyi fluktuációt mutatott. Ebben a szakaszban a betegség kontrollált kiterjedéséért a cidofovir DNS replikáció-gátlástól független hosszútávú hatásai és a természetes kórlefolyás együttesen felelhetnek.

**Tárgyszavak:** humán papillomavírus, DNS, fej-nyak, carcinoma, papilloma, cidofovir

## 5. SUMMARY

The human papillomavirus DNA status (prevalence, types, physical state and copy number) of head and neck cancers (n = 33), recurrent respiratory papillomatosis cases (n = 14), and mixed lesions initially harbouring papilloma and dysplasia and showing malignant degeneration at follow-up (n = 5) was examined in fresh-frozen tissue biopsies by polymerase chain reaction and Southern blot hybridization techniques.

Forty-five percents of cancers were positive for HPV DNA. Both low-risk (6 and 11) and high-risk (16) types were detected, regardless of cancer site. As a consequence of low copy number we failed to determine the physical state of HPV DNA except one HPV 6 positive oropharyngeal cancer, in which the viral genome was integrated and the disruption of circular DNA affected the E2 ORF. There were no relationships between the HPV positivity and the clinico-pathological features or prognoses of patients. According to these results, the etiological role of HPVs in head and neck carcinogenesis remains equivocal.

Each patient in the RRP group harboured either HPV 6 or 11 DNA. The presence of a certain low-risk HPV type is consistently demonstrable in serial samples deriving from a number of patients. HPV 11 positivity tends to predict a worse prognosis (slightly more frequent relapses, necessity of tracheotomy). In contrast to cancers, the viral genome exists in episomal physical state and in substantially higher copy numbers, with fluctuations of the latter in several orders of magnitude.

During the malignant degeneration of mixed lesions initially comprising of papilloma and dysplasia - by performing biopsy from the precancerous mixed lesion or the already invasive cancer – the majority of tissue samples were negative for HPV DNA. Two samples harboured HPV 16 DNA, presumably in very low copy numbers. Therefore the HPV status of this group is similar to those diagnosed initially as invasive cancers.

During the intralesional cidofovir therapy of a 14-year-old child with RRP, the initial phase of therapy with injections given at shorter intervals the complete remission of lesions was accompanied by the substantial decrease of HPV DNA copy number. In the maintenance phase with injections given at longer intervals, disease recurred at a controlled rate and HPV DNA copy number showed fluctuations in several orders of magnitude again, similarly to the pretreatment period. In this maintenance phase the long-term effects of cidofovir other than the inhibition of DNA replication and the natural history of RRP can account for the controlled disease.

**Key words:** human papillomavirus, DNA, head and neck, cancer, papilloma, cidofovir

## 6. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném megköszönni témavezetőmnek, **Dr. Czeglédy Judit** tudományos főmunkatársnak (DE OEC Orvosi Mikrobiológiai Intézet), hogy 1996-ban bevezetett a virológiai kutatás világába, és előbb tudományos diákköri, majd levelező PhD témavezetőként elvállalta tudományos tevékenységem irányítását. Közös munkánknak Czeglédy Tanárnő 2007-ben bekövetkezett tragikus halála vetett véget. Ezt az értekezést az ő emlékének szánom.

Megköszönöm **Dr. Szarka Krisztina** adjunktusnak (DE OEC Orvosi Mikrobiológiai Intézet), hogy PhD hallgatói munkám során végig szorosan együttműködhettünk elsősorban virológiai-metodikai téren. Külön köszönettel tartozom neki PhD tanulmányaim vezetéséért Czeglédy Tanárnő halála után.

Megköszönöm **Prof. Dr. Sziklai Istvánnak**, a DE OEC Fül-Orr-Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Klinika igazgatójának, hogy a klinikus szemszögéből – 1998. óta tartó fül-orr-gégészeti pályám során – végig hasznos tanácsokkal látott el. Az értekezésben szereplő betegek többségét Sziklai Professzor Úr operálta.

Megköszönöm **Prof. Dr. Gergely Lajos** egyetemi tanárnak és **Dr. Kónya József** egyetemi docensnek, a DE OEC Orvosi Mikrobiológiai Intézet korábbi és jelenlegi igazgatójának, hogy közleményeim és PhD értekezésem elkészítése során hasznos tanácsokkal láttak el.

Megköszönöm **Dr. Tóth Lászlónak**, a DE OEC Patológiai Intézet tanársegédjének a papillomát és dysplasiát tartalmazó vegyes elváltozások szövettani metszeteinek átnézését és a fényképek elkészítését.

Megköszönöm **Dr. Brian J. Wiatrak** (Department of Pediatric Otolaryngology, Children's Hospital, University of Alabama, Birmingham, AL) segítőkészségét. A cidofovir terápia tervezése során ismeretlenül megkeresve Őt, azonnal, önzetlenül, hasznos tanácsokkal látott el. Megköszönöm **Dr. Kraszits Istvánnak**, az Egyetemi Gyógyszertár szakgyógyszerészének a cidofovir gyors beszerzését.

Megköszönöm az Orvosi Mikrobiológiai Intézet részéről **Márton Józsefnek**, valamint a Fül-Orr-Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Klinika részéről **a műtéteket végző kollégáimnak és a műtő valamennyi dolgozójának**, hogy a virológiai mintavételben, a minták szállításában és tárolásában segítségemre voltak.

## 7. IRODALOMJEGYZÉK

1. Abdulkarim B, Sabri S, Deutsch E, et al. Antiviral agent cidofovir restores p53 function and enhances the radiosensitivity in HPV-associated cancers. *Oncogene* 2002;**21**:2334-2346.
2. Abramson A, Steinberg B, Winkler B. Laryngeal papillomatosis: clinical, histopathologic and molecular studies. *Laryngoscope* 1987;**97**:678-685.
3. Akst L, Lee W, Discolo C, et al. Stepped-dose protocol of cidofovir therapy in recurrent respiratory papillomatosis in children. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2003;**129**:841-846.
4. Almadori G, Cadoni G, Cattani P, et al. Human papillomavirus infection and epidermal growth factor receptor expression in primary laryngeal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2001;**7**:3988-3993.
5. [Andrei G](#), [Snoeck R](#), [Schols D](#), et al. Induction of apoptosis by cidofovir in human papillomavirus (HPV)-positive cells. [Oncol Res](#) 2000;**12**:397-408.
6. Armstrong L, Derkay C, Reeves W. Initial results from the national registry for juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis. RRP Task Force. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1999;**125**:743-748.
7. 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* 2000;**20**:1301-1306.
8. Baker C, Phelps W, Lindgren V, et al. Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. *J Virol* 1987;**61**:962-971.
9. Barksdale S, Baker C. Differentiation-specific expression from the bovine papillomavirus type 1 P<sub>2443</sub> and late promoters. *J Virol* 1993;**67**:5605-5616.
10. Bastien N, McBride A. Interaction of the papillomavirus E2 protein with mitotic chromosomes. *Virology* 2000;**270**:124-134.
11. Bennett R, Powell K. Human papillomavirus: association between laryngeal papillomas and genital warts. *Pediatr Infect Dis J* 1987;**6**:229-232.
12. Bernard B, Bailly C, Lenoir M et al. The human papillomavirus type 18 (HPV 18) E2 gene product is a repressor of the HPV 18 regulatory region in human keratinocytes. *J Virol* 1989;**63**:4317-4324.
13. Bielamowicz S, Villagomez V, Stager S, et al. Intralaesional cidofovir therapy for laryngeal papilloma in an adult cohort. *Laryngoscope* 2002;**112**:696-699.
14. Boyer S, Wazer D, Band V. E7 protein of human papilloma virus 16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. *Cancer Res* 1996;**56**:4620-4624.
15. Brandwein M, Nuovo G, Biller H. Analysis of prevalence of human papillomavirus in laryngeal carcinomas. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1993;**102**:309-313.
16. [Chadha N](#), [James A](#). Antiviral agents for the treatment of recurrent respiratory papillomatosis: a systematic review of the English-language literature. [Otolaryngol Head Neck Surg](#). 2007;**136**:863-869.
17. Chang F, Wang L, Syrjänen S, et al. Human papillomavirus infections in the respiratory tract. *Am J Otolaryngol* 1992;**13**:210-225.
18. Chen C, Shyu M, Au L, et al. Analysis of deletion of the integrated human papillomavirus 16 sequence in cervical cancer: a rapid multiplex polymerase chain reaction approach. *J Med Virol* 1994;**44**:206-211.
19. Chetri D, Blumin J, Shapiro N, et al. Office-based treatment of laryngeal papillomatosis with percutaneous injection of cidofovir. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2002;**126**:642-648.
20. Chetri D, Shapiro N. A scheduled protocol for the treatment of juvenile recurrent respiratory papillomatosis with intralaesional cidofovir. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2003;**129**:1081-1085.
21. Choo K, Huang C, Chen C, et al. Jun-B oncogene aberrations in cervical cancer cell lines. *Cancer Lett* 1995;**93**:240-253.

22. Chung B, Akst L, Koltai P. 3,5-year follow-up of intralesional cidofovir protocol for pediatric recurrent respiratory papillomatosis. *Int J Ped Otorhinolar* 2006;**70**:1911-1917.
23. Clayman G, Stewart M, Randal S, et al. Human papillomavirus in laryngeal and hypopharyngeal carcinomas. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1994;**120**:743-748.
24. Cripe T, Haugen T, Turk J, et al. Transcriptional regulation of the human papillomavirus-16 E6-E7 promoter by a keratinocyte-dependent enhancer, and by viral E2 trans-activator and repressor gene products: Implications for cervical carcinogenesis. *EMBO J* 1987;**6**:3745-3753.
25. Cueille N, Nougarede R, Mechali F, et al. Functional interaction between the bovine papillomavirus type 1 replicative helicase E1 and cyclin E-Cdk2. *J Virol* 1998;**72**:7255-7262.
26. Czeglédy J, Major T, Juhász A, Répássy G, Gergely L. Human papillomavirus génszakaszok kimutatása laryngealis daganatokban és praemalignus elváltozásokban polimeráz láncreakcióval. *Orv Hetil* 1997;**138**:1891-1897.
27. Czeglédy J. Human papillomavírusok a genitális régióban. Kandidátusi értekezés, DOTE, 1991.
28. Das B, Sharma J, Gopalakrishna V, et al. Analysis by polymerase chain reaction of the physical state of human papillomavirus type 16 DNA in cervical preneoplastic and neoplastic lesions. *J Gen Virol* 1992;**73**:2327-2336.
29. de Villiers E, Fauquet C, Broker T, et al. Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004;**324**:17-27.
30. Derkay C, Malis D, Zalzal G, et al. A staging system for assessing severity of disease and response to therapy in recurrent respiratory papillomatosis. *Laryngoscope* 1998;**108**:935-937.
31. Derkay C. Cidofovir for recurrent respiratory papillomatosis (RRP): a re-assessment of risks. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2005;**69**:1465-1467.
32. Derkay C. Recurrent respiratory papillomatosis. *Laryngoscope* 2001;**111**:57-69.
33. Derkay C. Task Force on recurrent respiratory papillomas: a preliminary report. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1995;**121**:1386-1391.
34. Dikkers F. Treatment of recurrent respiratory papillomatosis with microsurgery in combination with intralesional cidofovir - a prospective study. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2006;**263**:440-443.
35. [Donne A](#), [Hampson L](#), [He X](#), et al. Effects of cidofovir on a novel cell-based test system for recurrent respiratory papillomatosis. [Head Neck](#) 2007;**29**:741-50.
36. Donne A, Rothera M, Homer J. Scientific and clinical aspects of the use of cidofovir in recurrent respiratory papillomatosis. *Int J Ped Otorhinolaryngol* 2008;**72**:939-944.
37. Doyle D, Gianoli G, Espinola T, et al. Recurrent respiratory papillomatosis: juvenile versus adult forms. *Laryngoscope* 1994;**104**:523-527.
38. Doyle D, Henderson L, LeJeune F, et al. Changes of human papillomavirus typing of recurrent respiratory papillomatosis progressing to malignant neoplasm. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1994;**120**:1273-1276.
39. Durst M, Croce C, Gissmann L, et al. Papillomavirus sequences integrate near cellular oncogenes in some cervical carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;**84**:1070-1074.
40. Élő J, Hídvégi J, Bajtai A. Papova viruses and recurrent laryngeal papillomatosis. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1995;**115**:322-325.
41. [Erisen L](#), [Fagan JJ](#), [Myers EN](#). Late recurrences of laryngeal papillomatosis. [Arch Otolaryngol Head Neck Surg](#) 1996;**122**:942-944.
42. [Fredericks B](#), [Balkin A](#), [Daniel H](#), et al. Transmission of human papillomaviruses from mother to child. [Aust N Z J Obstet Gynaecol](#) 1993;**33**:30-2.
43. Freed G, Derkay C. Prevention of recurrent respiratory papillomatosis: Role of HPV vaccination. *Int J Ped Otorhinolar* 2006;**70**:1799-1803.
44. [Frisch M](#), [Biggar R](#). Aetiological parallel between tonsillar and anogenital squamous-cell carcinomas. [Lancet](#) 1999;**354**:1442-1443.

45. Funk J, Waga S, Harry J, et al. Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes Dev* 1997;**11**:2090-2100.
46. Gabbott M, Cossart Y, Kan A, et al. Human papillomavirus and host variables as predictors of clinical course in patients with juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis. *J Clin Microbiol* 1997;**35**:3098-3103.
47. Gale N, Michaels L, Luzar B, et al. Current review on squamous intraepithelial lesions of the larynx. *Histopathology* 2008;**10**:1-18.
48. García-Milián R, Hernández H, Panadé L, et al. Detection and typing of human papillomavirus DNA in benign and malignant tumours of laryngeal epithelium. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1998;**118**:754-758.
49. [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* 2000;**92**:709-720.
50. Goon P, Sonnex C, Jani P, et al. Recurrent respiratory papillomatosis: an overview of current thinking and treatment. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2008;**265**:147-151.
51. Greer C, Peterson S, Kiviat N, et al. PCR amplification from paraffin-embedded tissues. *Am J Clin Pathol* 1991;**95**:117-124.
52. Hartley C, Hamilton J, Birzgalis A, et al. Recurrent respiratory papillomatosis – the Manchester experience, 1974-1992. *J Laryngol Otol* 1994;**108**:226-229.
53. Hasan S, Dutt S, Kini U, et al. Laryngeal carcinoma ex-papilloma in a non-irradiated, non-smoking patient: a clinical record and review of the literature. *J Laryngol Otol* 1995;**109**:762-766.
54. Herrero R. Human papillomaviruses and cancer of the upper aerodigestive tract. *J Natl Cancer Inst* 2003;**31**:47-51.
55. Hobbs C, Sterne J, Bailey M, et al. Human papillomavirus in head and neck cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clin Otolaryngol* 2006;**31**:259-266.
56. Hoory T, Monie A, Gravitt P, et al. Molecular epidemiology of human papillomavirus. *J Formos Med Assoc* 2008;**107**:198-217.
57. Howley P, Lowy D. Papillomaviruses and their replication. In: Knipe D, Howley P (szerk). *Fields Virology* 4th Edition. Lippincott-Raven, Philadelphia, 2001;2231-2264.
58. Jeon S, Lambert P. Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: Implications for cervical carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;**92**:1654-1658.
59. Józán P. Rákepidemiológiai viszonyok Magyarországon. *Magyar Tudomány* 2005;**8**:931-944.
60. Kashima H, Mounts P, Leventhal B, et al. Sites of predilection in recurrent respiratory papillomatosis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1993;**102**:580-583.
61. Kashima H, Mounts P, Shah K. Recurrent respiratory papillomatosis. [Obstet Gynecol Clin North Am](#) 1996;**23**:699-706.
62. Kashima H, Shah F, Lyles A, et al. A comparison of risk factors in juvenile-onset and adult-onset recurrent respiratory papillomatosis. *Laryngoscope* 1992;**102**:9-13.
63. Kashima H, Wu T, Mounts P, et al. Carcinoma ex-papilloma: histologic and virologic studies in whole-organ sections of the larynx. *Laryngoscope* 1988;**98**:619-624.
64. Kimberlin D. Current status of antiviral therapy for juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis. *Antiviral Res* 2004;**63**:141-151.
65. [Koskinen W](#), [Chen R](#), [Leivo I](#), et al. Prevalence and physical status of human papillomavirus in squamous cell carcinomas of the head and neck. [Int J Cancer](#) 2003;**107**:401-406.
66. Koss L. Carcinogenesis in the uterine cervix and human papillomavirus infection. In: Syrjänen K, Gissmann L, Koss L. *Papillomaviruses and human disease*. Springer Verlag, Berlin, 1987;235-267.
67. Kreimer A, Clifford G, Boyle P, et al. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: A systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;**14**:467-475.

68. Lee A, Rosen C. Efficacy of cidofovir injection for the treatment of recurrent respiratory papillomatosis. *J Voice* 2003;**18**:551-556.
69. Leventhal B, Kashima H, Mounts P, et al. A long-term study of lymphoblastoid interferon in recurrent respiratory papillomatosis. *N Engl J Med* 1991;**325**:613-617.
70. Lie E, Engh V, Boysen M, et al. Squamous cell carcinoma of the respiratory tract following laryngeal papillomatosis. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1994;**114**:209-212.
71. Lin K, Westra W, Kashima H, et al. Coinfection of HPV-11 and HPV-16 in a case of laryngeal squamous papillomas with severe dysplasia. *Laryngoscope* 1997;**107**:942-947.
72. Lindeberg H, Krogdahl A. Laryngeal cancer and human papillomavirus: HPV is absent in the majority of laryngeal carcinomas. *Cancer Lett* 1999;**146**:9-13.
73. [Lindel K](#), [Beer K](#), [Laissue J](#), et al. Human papillomavirus positive squamous cell carcinoma of the oropharynx: a radiosensitive subgroup of head and neck carcinoma. [Cancer](#) 2001;**92**:805-813.
74. Lowy D, Howley P. Papillomaviruses. In: Knipe D, Howley P (szerk). *Fields Virology* 4th Edition. Lippincott-Raven, Philadelphia, 2001;2197-2229.
75. Major T, Jókay I, Soós Gy, et al. A juvenilis gégepapillomatosis virológiai vonatkozásai. *Orv Hetil* 1999;**140**:405-409.
76. Mandell D, Arjmand E, Kay D, et al: Intralesional cidofovir for pediatric recurrent respiratory papillomatosis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2004;**130**:1319-1323.
77. Matsha T, Erasmus R, Kafuko A, et al. Human papillomavirus associated with oesophageal cancer. *J Clin Pathol* 2002;**55**:587-590.
78. [Mellin H](#), [Dahlgren L](#), [Munck-Wikland E](#), et al. Human papillomavirus type 16 is episomal and a high viral load may be correlated to better prognosis in tonsillar cancer. [Int J Cancer](#) 2002;**102**:152-158.
79. [Mellin H](#), [Friesland S](#), [Lewensohn R](#), et al. Human papillomavirus (HPV) DNA in tonsillar cancer: clinical correlates, risk of relapse, and survival. [Int J Cancer](#) 2000;**89**:300-304.
80. Mineta H, Ogino T, Amano H, et al. Human papilloma virus (HPV) type 16 and 18 detected in head and neck squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 1998;**18**:4765-4768.
81. Mohr I, Clark R, Sun S, et al. Targeting the E1 replication protein to the papillomavirus origin of replication by complex formation with the E2 transactivator. *Science* 1990;**250**:1694-1699.
82. Molijn A, Kleter B, Quint W, et al. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *J Clin Virol* 2005;**32S**:S41-S51.
83. Moore C, Wiatrak B, McClatchey K, et al. High-risk human papillomavirus types and squamous cell carcinoma in patients with recurrent respiratory papillomatosis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1999;**120**:698-705.
84. Myer C, Wiliging P, Cotton R. Use of laryngeal microresector system. *Laryngoscope* 1999;**109**:1165-1166.
85. Naiman A, Ceruse P, Coulombeau B, et al. Intralesional cidofovir and surgical excision for laryngeal papillomatosis. *Laryngoscope* 2003;**113**:2174-2181.
86. Naiman A, Roger G, Gagnieu M, et al. Cidofovir plasma assays after local injection in respiratory papillomatosis. *Laryngoscope* 2004;**114**:1151-1156.
87. [Nemes J](#), [Boda R](#), [Rédli P](#), et al. Szájüregi laphámrákok az észak-kelet magyarországi régióban II. Etiológiai tényezők. *Fogorv Szle* 2006;**99**:179-185.
88. Parkin D, Bray F, Ferlay J et al. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005;**55**:74-108.
89. Penaloza-Plascencia M, Montoya-Fuentes H, Flores-Martinez S, et al. Molecular identification of 7 human papillomavirus types in recurrent respiratory papillomatosis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2000;**126**:1119-1123.
90. Petersen B, Buchwald C, Gerstoft J, et al. An aggressive and invasive growth of juvenile papillomas involving the total respiratory tract. *J Laryngol Otol* 1998;**112**:1101-1104.

91. Pignatari S, Smith E, Gray S, et al. Detection of human papillomavirus infection in diseased and nondiseased sites of the respiratory tract in recurrent respiratory papillomatosis patients by DNA hybridization. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1992;**101**:408-412.
92. Pintos J, Franco E, Black M, et al. Human papillomavirus and prognoses of patients with cancers of the upper aerodigestive tract. *Cancer* 1999;**85**:1903-1909.
93. Poetker D, Patel N, Kerschner J. Cidofovir modulated gene expression in recurrent respiratory papillomatosis. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2008;**72**:1385-1392.
94. Pransky S, Brewster D, Magit A, et al. Clinical update on 10 children treated with intralesional cidofovir injections for severe recurrent respiratory papillomatosis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2000;**126**:1239-1243.
95. Pransky S, Magit A, Kearns D, et al: Intralesional cidofovir for recurrent respiratory papillomatosis in children. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1999;**125**:1143-1148.
96. Rabah R, Lancaster W, Thomas R, et al. Human papillomavirus-11-associated recurrent respiratory papillomatosis is more aggressive than human papillomavirus-6-associated disease. *Ped Dev Pathol* 2001;**4**:68-72.
97. Rady P, Schnadig V, Weiss R, et al. Malignant transformation of recurrent respiratory papillomatosis associated with integrated human papillomavirus type 11 DNA and mutation of p53. *Laryngoscope* 1998;**108**:735-740.
98. Rees L, Birchall M, Bailey M, et al. A systematic review of case-control studies of human papillomavirus infection in laryngeal squamous cell carcinoma. *Clin Otolaryngol* 2004;**29**:301-306.
99. Rehberg E, Kleinsasser O. Malignant transformation in non-irradiated juvenile laryngeal papillomatosis. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1999;**256**:450-454.
100. Reidy P, Dedo H, Rabah R, et al. Integration of human papillomavirus type 11 in recurrent respiratory papilloma-associated cancer. *Laryngoscope* 2004;**114**:1906-1909.
101. Ribári O (szerk). *Fül-orr-gégészeti fej-nyak sebészet*. Medicina, Budapest, 1997.
102. Rimell F, Shoemaker D, Pou A, et al. Pediatric respiratory papillomatosis: prognostic role of viral typing and cofactors. *Laryngoscope* 1997;**107**:915-918.
103. Roberts S, Ashmole I, Johnson G et al. Cutaneous and mucosal human papillomavirus E4 proteins form intermediate filament-like structures in epithelial cells. *Virology* 1993;**197**:176-187.
104. Safrin S, Cherrington J, Jaffe H. Clinical uses of cidofovir. *Rev Med Virol* 1997;**7**:145-156.
105. Sang B, Barbosa M. Single amino acid substitutions in „low-risk” human papillomavirus (HPV) type 6 E7 protein enhance features characteristic of the „high-risk” HPV E7 oncoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;**89**:8063-8067.
106. Scheffner M, Werness B, Huibregtse J, et al. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 1990;**63**:1129-1136.
107. Schiffman M, Castle P, Jeronimo J, et al. Human papillomaviruses and cervical cancer. *Lancet* 2007;**370**:890-907.
108. Schneider A, Hotz N, Gissmann L. Increased prevalence of detection of human papillomaviruses in the lower genital tract of pregnant women. *Int J Cancer* 1987;**40**:198-201.
109. [Schwartz S](#), [Daling J](#), [Doody D](#), et al. Oral cancer risk in relation to sexual history and evidence of human papillomavirus infection. [J Natl Cancer Inst](#) 1998;**90**:1626-1636.
110. Schwarz E, Freese U, Gissmann L, et al. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* 1985;**314**:111-114.
111. Sen G, Ransohoff R. Interferon induced antiviral actions and their regulation. *Adv Virus Res* 1993;**42**:57-102.
112. Shirley W, Wiatrak B: Is cidofovir a useful adjunctive therapy for recurrent respiratory papillomatosis in children? *Int J Ped Otorhinolaryngol* 2004;**68**:413-418.

113. Sirianni N, Wang J, Ferris R. Antiviral activity of cidofovir on a naturally human papillomavirus-16 infected squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN) cell line improves radiation sensitivity. *Oral Oncol* 2005;**41**:423-428.
114. Sisk J, Schweinfurth J, Wang X, et al. Presence of human papillomavirus DNA in tonsillectomy specimens. *Laryngoscope* 2006;**116**:1372-1374.
115. Smith E, Pignatary S, Gray S, Haugen T, Turek L. Human papillomavirus infection in papillomas and nondiseased respiratory sites of patients with recurrent respiratory papillomatosis using polymerase chain reaction. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1993;**119**:554-557
116. Snijders P, Brule A, Meijer C, et al. HPV and cancer of the aerodigestive tract. *Papillomavirus Rep* 1995;**6**:157-162.
117. Snijders P, Meijer C, Brule A, et al. Human papillomavirus (HPV) type 16 and 33 E6/E7 region transcripts in tonsillar carcinomas can originate from integrated and episomal HPV DNA. *J Gen Virol* 1992;**73**:2059-2066.
118. Snoeck R, Wellens W, Desloovere C, et al: Treatment of severe laryngeal papillomatosis with intralesional injections of cidofovir [(S)-1-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)cytosine]. *J Med Virol* 1998;**54**:219-225.
119. Snowden R, Thompson J, Horwitz E, et al. The predictive value of serum interleukins in recurrent respiratory papillomatosis: a preliminary study. *Laryngoscope* 2001;**111**:404-408.
120. Steinberg B, Gallagher T, Stoler M, et al. Persistence and expression of human papillomavirus during interferon therapy. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1988;**114**:27-32.
121. Steinberg B, Meade R, Kalinowski S, et al. Abnormal differentiation of human papillomavirus-induced laryngeal papillomas. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1990;**116**:1167-1171.
122. Straight S, Hinkle P, Jewers R, et al. The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 transforms fibroblasts and effects the downregulation of the epidermal growth factor receptor in keratinocytes. *J Virol* 1993;**67**:4521-4532.
123. [Syrjänen K](#), [Pyrhönen S](#), [Syrjänen S](#). Evidence suggesting human papillomavirus (HPV) etiology for the squamous cell papilloma of the paranasal sinus. [Arch Geschwulstforsch](#) 1983;**53**:77-82.
124. Syrjänen K, Syrjänen S, Lamberg M, et al. Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis. [Int J Oral Surg](#) 1983;**12**:418-24.
125. Syrjänen S. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. *J Clin Virol* 2005;**32S**:S59-S66.
126. Szarka K, Veress G, Juhász A, et al. Integration status of virus DNA and p53 codon 72 polymorphism in human papillomavirus type 16 positive cervical cancers. *Anticancer Res* 2000;**20**:2161-2168.
127. Szentirmay Z, Szántó I, Bálint I, et al. Oki összefüggés a humán papillomavírus-fertőzés és a fej-nyaki régió valamint a nyelöcső laphámrákjainak egyes típusai között. *Magyar Onkológia* 2002;**46**:35-41.
128. Szládek G, Juhász A, Kardos G, et al. [High co-prevalence of genogroup 1 TT virus and human papillomavirus is associated with poor clinical outcome of laryngeal carcinoma.](#) *J Clin Pathol* 2005;**58**:402-405.
129. Tachezy R, Hamsikova E, Valvoda J, et al. [Antibody response to a synthetic peptide derived from the human papillomavirus type 6/11 L2 protein in recurrent respiratory papillomatosis: correlation between Southern blot hybridization, polymerase chain reaction, and serology.](#) *J Med Virol* 1994;**42**:52-59.
130. Tasca R, Clarke R. Recurrent respiratory papillomatosis. *Arch Dis Child* 2006;**91**:689-691.
131. Valckenborgh I, Wellens W, De Boeck K, et al. Systemic cidofovir in papillomatosis. *CID* 2001;**32**:62-64.
132. Van Cutsem E, Noeck R, Van Ranst M, et al: Successful treatment of a squamous papilloma of the hypopharynx-esophagus by local injections of (S)-1-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl) cytosine (cidofovir). *J Med Virol* 1995;**45**:230-235.

133. Van Houten V, Snijders P, Brekel M, et al. Biological evidence that human papillomaviruses are etiologically involved in a subgroup of head and neck squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* 2001;**93**:232-235.
134. Venuti A, Manni V, Morello R, et al. Physical state and expression of human papillomavirus in laryngeal carcinoma and surrounding normal mucosa. *J Med Virol* 2000;**60**:396-402.
135. Vogelstein B, Lane D, Levine A. Surfing the p53 network. *Nature* 2000;**408**:307-310.
136. [Wemer R](#), [Lee J](#), [Hoffman H](#), et al. Case of progressive dysplasia concomitant with intralesional cidofovir administration for recurrent respiratory papillomatosis. [Ann Otol Rhinol Laryngol](#) 2005;**114**:836-839.
137. Wiatrak B, Wiatrak D, Broker T, et al. Recurrent respiratory papillomatosis: a longitudinal study comparing severity associated with human papilloma viral types 6 and 11 and other risk factors in a large pediatric population. *Laryngoscope* 2004 Suppl;**114**:1-23.
138. Wilson W, Hashemiyoony R, Hawrych A. Intralesional cidofovir for recurrent laryngeal papillomas: Preliminary report. [Ear Nose Throat J](#) 2000;**79**:236-238.
139. Wittekind C, Greene F, Hutter R, et al. (szerk.). TNM Atlas: Illustrated Guide to the TNM classification of malignant tumours. 5th edition. *Springer-Verlag*, Berlin, 2005.
140. Xiong X, Smith JL, Chen MS: Effect of incorporation of cidofovir into DNA by human cytomegalovirus DNA polymerase on DNA elongation. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;**41**:594-599.
141. Yoshpe N. Oral and laryngeal papilloma: a pediatric manifestation of sexually transmitted disease? [Int J Pediatr Otorhinolaryngol](#) 1995;**31**:77-83.

## 8. KÖZLEMÉNYEK

### 8.1. Az értekezésben felhasznált közlemények

**Major T**, Szarka K, Sziklai I, Gergely L, Czeglédy J. The characteristics of human papillomavirus DNA in head and neck cancers and papillomas. *J Clin Pathol* 2005;**58**:51-55.

1. dolgozat **IF: 2,170**

**Major T**, Sziklai I, Czeglédy J, Gáll T, Gergely L, Szarka K. Follow-up of HPV DNA copy number in cidofovir therapy of recurrent respiratory papillomatosis. *Anticancer Research* 2008;**28**:2169-2174

2. dolgozat **IF: 1,414**

### 8.2. Egyéb közlemények

Czeglédy J, **Major T**, Juhász A, Répássy G, Gergely L. Human papillomavirus génszakaszok kimutatása laryngealis daganatokban és praemalignus elváltozásokban polimeráz láncreakcióval. *Orv Hetil* 1997;**138**:1891-1897.

**Major T**, Jókay I, Soós Gy, Gergely L, Czeglédy J. A juvenilis gégepapillomatosis virológiai vonatkozásai. *Orv Hetil* 1999;**140**:405-411.

**Major T**, Jókay I, Ashtari A, Soós Gy, Sziklai I. Schwannoma a parapharyngealis térben. *Fül-Orr-Gégegyógyászat*,2001;**47**:43-47.

[Major T](#), [Nagy A](#), [Erdélyi G](#), [Sziklai I](#). Lymphangioma of the sphenoid sinus. [J Laryngol Otol](#) 2003;**117**:564-565.

**IF: 0,528**

Szládek G, Juhász A, Kardos G, Szőke K, **Major T**, Sziklai I, Tar I, Márton I, Kónya J, Gergely L, Szarka K. [High co-prevalence of genogroup 1 TT virus and human papillomavirus is associated with poor clinical outcome of laryngeal carcinoma.](#) *J Clin Pathol* 2005;**58**:402-405.

**IF: 2,170**

## 9. ELŐADÁSOK, POSZTEREK

**Major T**, Gergely L, Czegléd J. Human papillomavirus génszakaszok kimutatása laryngealis daganatokban és praemalignus elváltozásokban polimeráz láncreakcióval. Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, 1997. augusztus 25-27., Szekszárd

**Major T**, Juhász A, Jókay I, Sziklai I, Gergely L, Czegléd J. Human papillomaviruses and laryngeal neoplasia. 15th International Medical Sciences Student Congress, 28 April – 1 May, 1999, Istanbul, Turkey – **2. díj**

**Major T**, Juhász A, Jókay I, Sziklai I, Gergely L, Czegléd J. Human papillomaviruses and laryngeal neoplasia. Leiden International Medical Students Congress, 26-27 November, 1999, Leiden, The Netherlands

**Major T**, Czegléd J, Sziklai I. Human papillomavirus génszakaszok a gége laphámrákjaiban. Magyar Fül-, Orr-, Gégeorvosok Egyesületének jubileumi, 36. Nemzeti Kongresszusa, 2000. október 24-28., Hévíz (poszter)

**Major T**, Szarka K, Sziklai I, Gergely L, Czegléd J. Human papillomavirus DNS vizsgálata laryngealis és pharyngealis daganatokban. Magyar Fül-, Orr-, Gégeorvosok Egyesületének 37. Nemzeti Kongresszusa, 2002. október 2-5., Siófok

**Major T**, Czegléd J, Sziklai I, Szarka K. Cidofovir intralaesionalis alkalmazása recidiv felső légúti papillomatosisban. Magyar Fül-, Orr-, Gégeorvosok Egyesülete 39. Nemzeti Kongresszusa, 2006. szeptember 6-9., Debrecen

**Major T**, Sziklai I, Czegléd J, Gáll T, Gergely L, Szarka K. Follow-up of human papillomavirus DNA copy number in cidofovir therapy of recurrent respiratory papillomatosis. 8<sup>th</sup> International Conference of the European Society of Paediatric Otorhinolaryngology, 8-11 June, 2008, Budapest, Hungary