

HPV- és nyirokcsomó-státusz méhnyakrákban. Hosszútávú eredmények

PÓKA RÓBERT DR., CZEGLÉDY JUDIT DR.*

*A Debreceni Orvostudományi Egyetem Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikája
(igazgató: Borsos Antal dr., egyetemi tanár) és Mikrobiológiai Intézete
(igazgató: Gergely Lajos dr., egyetemi tanár)* közleménye*

Összefoglalás: Cervix carcinoma primer tumorából valamint operált esetek eltávolított nyirokcsomóiból származó szövetszövetmintákban vizsgáltuk a humán papillomavírusok 16-os típusára jellemző DNS-szekvenciák jelenlétét PCR technikával. Az operált esetek kezelése többségben preoperatív helyi sugárkezelést követő Wertheim-műtéttől, valamint az eltávolított anyagok szövettani eredményétől függően külső és helyi posztoperatív sugárkezelésből állt. Két esetben egyszerű méheltávolítás történt. A nem operált esetek kezelésére kombinált külső és helyi sugárkezelést alkalmaztunk. A betegek nyomonkövetésének tartama 0 és 102 hónap között változott, átlagosan 37 hónap volt. Az operált és a műtét nélkül kezelt esetek átlagos recidívamentes túlélése sorrendben 43 és 28 hónap volt. A primer tumor HPV-16 pozitív eseteinek átlagos recidívamentes túlélése 37 hónap volt, ugyanannyi, mint a HPV-16 negatív eseteké. Azok a betegek, akiknél a műtét során eltávolított nyirokcsomókban HPV-16 DNS-t mutattunk ki, átlagosan 27 hónapig voltak teljes remisszióban nyomonkövethetők. Szövettanilag igazolt nyirokcsomó áttét, valamint tumormentes nyirokcsomók esetén az átlagos recidívamentes túlélés sorrendben 23 és 42 hónap volt. Metasztatikus nyirokcsomók esetén attól függően, hogy a primer tumor HPV-16 pozitív vagy negatív volt, szintén lényegesen különbözött a teljes remisszió tartama (7,5 ill. 38 hónap). Szövettanilag igazolt tumormentes nyirokcsomók esetén a primer tumor HPV-16 pozitívok átlagos recidívamentes túlélése 38 hónap, míg a negatívoké 46 hónap volt. Eredményeink alapján a recidívamentes túlélés vizsgált prognosztikai tényezői között legfontosabbak sorrendben az operábilis folyamat, a szövettanilag igazolt tumormentes kismencedei nyirokcsomók, valamint a HPV-16 negatív tumor voltak, bár ez utóbbi tényező jelentősége csak az operált esetekben volt számottevő.

Kulcsszavak: méhnyakrák, humán papillomavírus, nyirokcsomó, túlélés

A nemi úton átvihető tényezők szerepe a méhnyakrák kialakulásában régóta ismert. Az 1980-as évek óta egyre nagyobb figyelem fordult a humán papillomavírusok (HPV) etiológiai szerepének tanulmányozására. Meisels és zur Hausen 1977-ben közölt felismerését követően magyarországi vizsgálatok is igazolták a humán papillomavírusok jelenlétét a női alsó genitális traktus kóros el-

változásaiban [10]. Pontos szerepük máig sem ismert, azonban számos tanulmány megerősítette jelenlétüket a cervix preinvazív és invazív folyamataiban [3, 8, 9, 13, 14]. A HPV-k onkogén típusainak jelenléte kimutatható a méhnyakrák eseteinek többségében. Korábbi vizsgálatok szerint a rákos folyamat kiterjedésével párhuzamosan emelkedik a vírusok kimutathatósága, így azok-

nak a betegség előrehaladásában is jelentősége lehet [8]. Jelen tanulmányunkban összehasonlítottuk a pozitív és negatív HPV-eredményű eseteink hosszútávú nyomonkövetési eredményeit annak érdekében, hogy a víruskimutatás prognosztikai értékét meghatározzuk. Ugyanabban a betegcsoportban megvizsgáltuk az operábilis, valamint operált esetek között a nyirokcsomók állapotának prognosztikai jelentőségét.

Betegek és módszerek

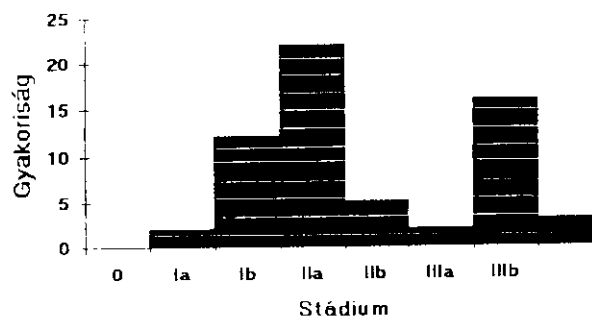
A tanulmányunkban vizsgált méhnyakrákos esetek 1988 és 1990 között kerültek felismerésre illetve kezelésre a Debreceni Orvostudományi Egyetem Női Klinikáján. A primer tumorból, valamint operált esetekben a sebészileg eltávolított kismedencei nyirokcsomókból vett szövetszövetmintákban is vizsgáltuk a HPV-16 DNS-szekvenciák jelenlétét PCR technikával. DNS-preparálásra proteináz-K emésztést, fenol-kloroform-izoamil-alkoholos extrakciót, ribonukleáz-A kezelést és etanolos precipitációt alkalmaztunk. A HPV 16-os típusának E6 és E7 jelzésű transzformáló génszakaszaiban működő indítószekvenciákat Applied Biosystem DNS-szintetizátorral készítettük. A polimeráz láncreakció során a felolvasztás-hibridizálás-lánchosszabbítás 35 ciklusát végeztük el. A denaturálást 95°C-on 30 másodpercig, a hibridizálást 55°C-on 30 másodpercig, a lánchosszabbítást pedig 70°C-on 30 másodpercig végeztük minden ciklusban. A reakciótermékeket, illetve a PCR specifitását gélelektroforézissel és Southern-blot technikával vizsgáltuk tovább. A gélben lévő felszaporított DNS-t nylon filterre átszivattva szigorú feltételek mellett (a-³²P)dATP-vel jelölt PstI enzimmel hasított HPV-16 próbával hibridizáltuk. Az etidium-bromiddal festett gél és a Southern-blot reakció érzékenysége sorrendben 100 és 10 darab HPV-16 DNS volt [14].

A betegek átlag életkora 50,2 év volt. A vizsgált esetek közül 2 volt Ia stádiumban, 12 Ib stádiumban, 22 IIa stádiumban, 5 IIb stádiumban, 2 IIIa stádiumban, 16 IIIb stádiumban és 3 pedig IV. stádiumban került felismerésre. A szövetszöveti diagnózis minden esetben carcinoma planocellulare dyskeratosum cervicis uteri volt. A két Ia stádiumú esetben egyszerű méheltávolítás történt. Ib és IIa stádiumú eseteink kezelése – többségben preoperatív helyi sugárkezelést követő – Wertheim-műtéttől, valamint az eltávolított anyagok szövetszöveti eredményétől függően külső és helyi posztoperatív sugárkezelésből állt [12]. Az intézetünkben végzett Wertheim-műtétek technikáját és szövetszöveti eredményeit korábbi közleményben ismertettük [11]. A nem operált esetek kezelésére kombinált külső és helyi sugárkezelést alkalmaztunk. A betegek nyomonkövetési vizsgálata során recidívára utaló tünetekre (fogyás, hüvelyi vérzés, bűzös folyás, véres széklet, vizelet panaszok) kérdeztünk, hüvelyi feltárást végzünk, vaginális és rektális vizsgálattal tájékozódunk a csomok illetve az

uterus mobilitásáról, valamint a parametriumok beszűrttségéről. A vese és a húgyutak állapotát izotóp renográfiaival, illetve a vérkémiai paraméterek meghatározásával ellenőrizzük. Recidíva gyanúja esetén hasi és kismedencei ultrahang, majd CT vizsgálatot végzünk. Bizonytalan, illetve ellentmondásos eredmények esetén MRI vizsgálatot is kérünk.

Harmincöt operált beteg közül az adatfeldolgozás idején 32-nél állt rendelkezésre a nyirokcsomók állapotára vonatkozó szövetszöveti adat. A három hiányzó esetből kettőnél egyszerű méheltávolítás történt, egynél pedig a folyamat előrehaladottsága miatt nem történt limfadenektómia.

A betegek klinikai adatait és a nyomonkövetés eredményét összehasonlítottuk a kórszöveti és a vírusvizsgálati eredményekkel. Hatvankét beteg kezelési adatai, HPV-eredménye és nyomonkövetési adata állt rendelkezésünkre. Öt esetben csak üregi sugárkezelés után állt módunkban anyagot venni a primer tumorból HPV-vizsgálatra. A biopsziára mind az öt esetben legalább egy héttel a kezelés után került sor. Az összes vizsgált eset stádium-megoszlása az 1. ábrán látható.



1. ábra Betegek stádium-megoszlása

Kiválasztott betegcsoportjaink túlélésének összehasonlítására a recidívamentes túlélést és a nyomonkövetési időt vettük alapul. A méhnyakrák kórszöveti prognosztikai tényezői szerint, mint például a differenciáltsági fok, vér- és nyirokérinvázió jelenléte vagy a sejtméret és keratinizáció foka szerint nem választottuk eseteinket külön csoportba, mivel ez az esetszámok drasztikus csökkenéséhez vezetett volna. Kis esetszámú csoportok esetén az eredmények statisztikai összehasonlítása csak igen nagy eltérések kimutatására alkalmas. Az adatok feldolgozásához betegcsoportonként elkészítettük a recidívamentes túlélési idők eloszlási diagramjait és kiszámítottuk az átlagos recidívamentes túlélési időt az adatfeldolgozás idején még nyomonkövetés alatt álló betegek között. A vizsgált változók átlagértékeit Z-próbával hasonlítottuk össze. A Kaplan-Meier típusú túlélési görbék elkészítéséhez és összehasonlításukra *life-table* módszert alkalmaztunk.

Eredmények

Harcincöt beteg elsődleges kezelése műtét volt, további 27 esetben primer kombinált sugárkezelést végeztünk. A két betegcsoport átlagos recidívamentes túlélése sorrendben 42,8 és 26,3 hónap volt.

Az operált betegek közül 32 esetben állt rendelkezésünkre a nyirokcsomókra vonatkozó szövettani eredmény. Huszonnyolc esetben a műtéti anyagok feldolgozása nem igazolt nyirokcsomó-áttétet. Négy esetben legalább egy kismedencei nyirokcsomóban volt metasztázis kimutatható. Az adatok feldolgozásának idején a nyirokcsomó-negatív és az áttétes esetek átlagos recidívamentes túlélési ideje sorrendben 46,4 és 22,5 hónap volt.

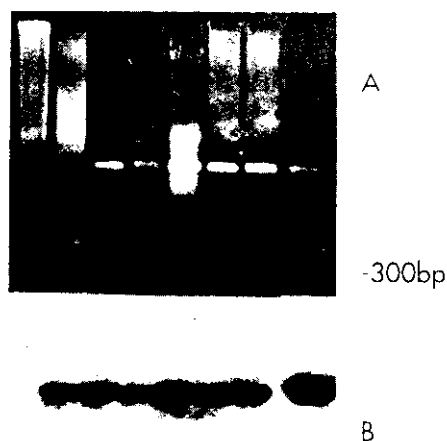
Mind a hatvankét betegnél elvégeztük a primer tumor biopsziáját és az így nyert anyagokból mintát vettünk a HPV-16 DNS-vizsgálatra. Összesen 21 esetben volt pozitív a vírusvizsgálat eredménye. A pozitív eredmény viszonylag alacsony gyakoriságát részben magyarázhatja az, hogy az esetek egy részénél az anyagvételre a helyi sugárkezelés után került sor. (2. ábra)

Az adatfeldolgozás idején a primer tumorban HPV-16 pozitív, valamint negatív esetek átlagos recidívamentes túlélési ideje sorrendben 36,7 és 35,8 hónap volt. Ezek az adatok arra utalnak, hogy szemben néhány irodalmi közléssel, a HPV-16 pozitív és negatív tumorok aggresszivitásában nincs kimutatható különbség. Az eltérő eredményeket magyarázhatják a metodikai különbségek, valamint a vizsgált betegcsoportok eltérő körülményei. Hasonlóan meglepő epidemiológiai eredményre jutottunk, amikor a feltételezetten agresszívabb fiatalkori méhnyakrák túlélését hasonlítottuk össze idősebb betegekével igen nagy anyagon [15].

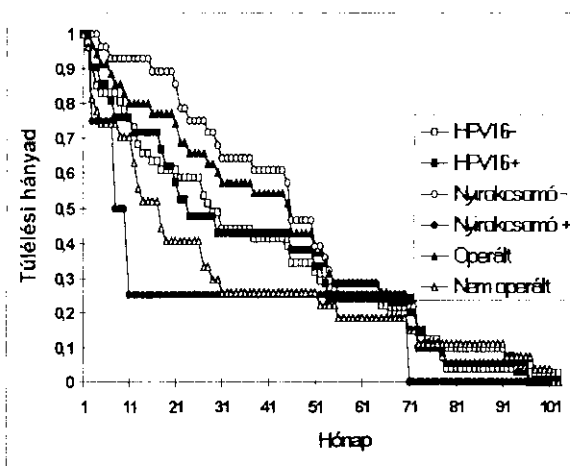
A HPV-k valódi prognosztikai szerepét elvileg csak egy homogén betegcsoportban, például a 22 IIa stádiumú eset között lehetne vizsgálni. Ezek között nyolc beteg primer tumorában volt HPV-16 DNS kimutatható, s átlagos progressziómentes túlélésük 37 hónap volt. A 14 HPV-negatív primer tumorral kezelt IIa stádiumú eset átlagosan 53 hónapon keresztül volt tumormentesen nyomonkövethető. Bár a két csoport remissziótartamainak különbsége statisztikailag szignifikáns ($p < 0,05$) volt, a nyomonkövetés során igazolt recidívák gyakorisága azonban lényegesen nem különbözött. A IIa stádiumú HPV-pozitív és -negatív betegek között sorrendben 2 és 4 esetben igazoltunk recidívát a nyomonkövetés ideje alatt.

A recidívamentes túlélés még pontosabb összehasonlítására ad lehetőséget a Kaplan-Meier típusú

túlélési görbék elemzése. A 3. ábra különböző prognosztikai jegyekkel elkülönített betegcsoportokban mutatja a még nyomonkövetés alatt álló teljes remisszióban lévő betegek arányát a nyomonkövetési idő függvényében. A HPV-16 pozitív (telített négyzet) és negatív (üres négyzet) esetek recidívamentes túlélési görbéi csaknem azonosak. Ezzel szemben az operált (telített háromszög) és a műtét nélkül kezelt (üres háromszög) esetek túlélési görbéi jelentősen eltérnek egymástól az operált esetek javára. Még ennél is nagyobb különbség észlelhető a nyirokcsomó-áttétes (telített kör) és a tumormentes nyirokcsomókkal (üres kör) jellemzett operált esetek túlélési görbéi között. A három betegcsoport-pár túlélésének összehasonlítása során észlelt különbségek szignifikancia szintje sorrendben 0,21, 0,013 és 0,00043 volt (3. ábra).



2. ábra (A) Cervixcarcinomából izolált DNS-ek HPV16/E6 specifikus PCR termékei etidium-bromiddal festve: 1. negatív minta, 2-7. pozitív minták, 8. pozitív kontroll (HPV16 plazmid-vektor). (B) Ugyanazon gél Southern-blot hibridizációs jelei megegyeznek a PCR jeleivel



3. ábra Nyomonkövetés alatt állók recidívamentes túlélési aránya

Megbeszélés

Korábbi vizsgálataink során invazív cervix carcinomából származó szövetmintákban mutattuk ki a humán papillomavírusok 6, 11, 16 és 18-as típusának jelenlétét Southern-blot DNS-hibridizációs módszerrel, P32-vel jelzett teszt-DNS felhasználásával. A 16 és 18-as típusok jelenléte méhnyakrákban gyakran volt kimutatható [7]. A HPV-16 jelenlétének gyakorisága méhnyakrákban a stádiummal és az életkorral is korrelációt mutat, ami a vírusnak a betegség kialakulásában játszott szerepére utal [1, 8]. Jelen tanulmányunk anyagának egy korábban közölt részében a szövettanilag igazolt nyirokcsomó áttét 10 esetből 9-ben HPV-16 pozitív volt. A szövettanilag tumormentes 36 nyirokcsomó HPV-16 vizsgálata 11 esetben pozitív volt. A primer tumorban HPV-negatív esetek egyikénél sem volt a nyirokcsomókban HPV-16 kimutatható [14].

Számos tanulmány foglalkozott a HPV-k prognosztikai jelentőségével. *Higgins és munkatársai* 242 beteg paraffinos blokkjaiban vizsgálta a HPV-RNS jelenlétét [5]. Az eredményeket a túléléssel összevetve azt találták, hogy a HPV-negativitás önálló, kedvezőtlen prognosztikai faktorként értékelhető. További megfigyelésük volt, hogy a fiatal betegek között gyakoribb a HPV-pozitivitás. Mindezek alapján eredményeik ellentmondóak, hiszen a HPV-negativitást kedvezőtlen prognosztikai jelként értékelik, ugyanakkor a méhnyakrák fiatalkori agresszívabb formájának létét feltételezik. Magyarországi eredmények alapján a fiatalkori méhnyakrák lefolyása nem kedvezőtlenebb, mint az idősebb korcsoportoké [15]. *Sebbelov és munkatársai* Norvégiából származó tanulmányában HPV-16 DNS a méhnyakrákos esetek 52%-ában volt kimutatható, és ez nem mutatott korrelációt sem a stádiummal, sem az életkorral, sem pedig az ötéves túléléssel [6]. A vírus-DNS jelenlétének prognosztikai szerepét vizsgálva későbbi tanulmányok sem tudták igazolni azt, hogy a nyirokcsomók szövettani állapota mellett a vírusvizsgálat eredménye tovább differenciálná a prognózist [1]. *Thomassen és munkatársai* szerint fiatal betegekben a HPV-16 69%-ban mutatható ki, és ez a gyakoriság nem különbözik a többi korcsoportban észlelt gyakoriságtól. Vizsgálataik szerint a HPV-negatív csoport túlélése magasabb volt, mint a HPV-pozitívaké (43 és 22%), de az alacsony esetszámok miatt szignifikáns különbség nem volt kimutatható [2]. Tanulmányunkban a primer tumorban HPV-16 pozitív, valamint negatív esetek átlagos recidívamentes

túlélési ideje sorrendben 36,7 és 35,8 hónap volt. A HPV-pozitív és negatív esetek túlélési görbéi is azonosak voltak (3. ábra). A prognosztikai tanulmányok áttekintő meta-analízise szerint a HPV-k méhnyakrákban játszott etiológiai szerepe igazolt, azonban a 16-os és 18-as HPV-típusok jelenlétének prognosztikai jelentősége nem megalapozott [4].

A HPV-vizsgálatoknak nagyobb jelentőséget tulajdonítunk preinvazív esetekben. Korábbi vizsgálatunkban 184 negatív citológiai eredményű eset 27%-ában volt HPV-DNS kimutatható. Az egyidejű kolposzkópos vizsgálat 17 esetben nem mutatott kórosat. A hagyományos citológián és kolposzkópos vizsgálaton alapuló méhnyakrák-szűrés hatékonysága a vírusvizsgálatokkal tovább fokozható [9].

Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a méhnyakrák recidívamentes túlélésének vizsgált prognosztikai tényezői között jelentőségük sorrendjében legfontosabbak az operábilis alapfolyamat, a szövettanilag tumormentes és a HPV-16 negatív kismedencei nyirokcsomók. A HPV-16 DNS primer tumorbeli jelenlétének eredményeink alapján nincs lényeges prognosztikai értéke a méhnyakrák túlélésében. A HPV-k progresszióban játszott szerepének tisztázására további vizsgálatokat tartunk indokoltnak.

Irodalom

- [1] *Kenter GG, Cornelisse C, Jiwa NM, Aartsen EJ, Hermans J, Mooi W, Heintz AP, Fleuren GJ.* Human papillomavirus type 16 in tumor tissue of low-stage squamous carcinoma of the uterine cervix in relation to ploidy grade and prognosis. *Cancer* 1993; 71: 397-401.
- [2] *Thomassen LV, Warshaw J, Lawhead RA Jr, Unger ER.* Invasive cervical cancer in young women. Clinicopathologic correlation and demonstration of human papillomavirus by in situ hybridization. *J Reprod Med* 1992; 37:901-906.
- [3] *Tosi P, Cintonino M, Santopietro R, Lio R, Barbini P, Ji H, Chang F, Kataja V, Syrjanen S, Syrjanen K.* Prognostic factors in invasive cervical carcinomas associated with human papillomavirus (HPV). Quantitative data and cytokeratin expression. *Pathol Res Pract* 1993; 188:866-873.
- [4] *Franco EL.* Prognostic value of human papillomavirus in the survival of cervical cancer patients: an overview of the evidence. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1992; 1(6):499-504.
- [5] *Higgins GD, Davy M, Roder D, Uzelin DM, Phillips GE, Burrell CJ.* Increased age and mortality associated with cervical carcinomas negative for human papillomavirus RNA. *Lancet* 1991; 338:910-913.
- [6] *Sebbelov AM, Kjorstad KE, Abeler VM, Norrild B.* The prevalence of human papillomavirus type 16 and

- 18 DNA in cervical cancer in different age groups: a study on the incidental cases of cervical cancer in Norway in 1983. *Gynecol Oncol* 1991; 41:141–148.
- [7] Póka R, Czeglédy J, Hernádi Z. Humán papillomavírusok kimutatása méhnyakrákban. *Magy Nőorv L* 1991; 54:48–50.
- [8] Póka R, Czeglédy J, Hernádi Z, Gergely L, Lampé L. Stage-related detection rate of human papillomavirus DNA in invasive cervical cancer. *J Obstet Gynaecol* 1991; 11:448–450.
- [9] Póka R, Czeglédy J, Gergely L, Lampé L. Potential contribution of human papillomavirus testing to cervical cancer screening. *Clin Exp Obstet Gynaecol* 1994; 21:203–206.
- [10] Czeglédy J, Gergely L, Hernádi Z, Póka R. Papillomavírus DNS kimutatása a női genitális rendszer alsó szakaszában. *Orv Hetil* 1988; 129:1637–1640.
- [11] Papp Z, Lampé L. A kiterjesztett hasi méheltávolítás és lymphadenectomia (Wertheim-műtét) helye a mai nőgyógyászatban. *Orv Hetil* 1989; 130:1481–1485.
- [12] Póka R, Szluha K, Hernádi Z, Juhász B, Lampé L. Analysis of survival in stage Ib and IIa cervical cancer treated with or without preoperative local radiotherapy. *Eur J Gynaecol Oncol* 1995; 16:208–211.
- [13] Czeglédy J, Gergely L, Hernádi Z, Póka R. Detection of human papillomavirus deoxyribonucleic acid in the female genital tract. *Med Microbiol Immunol* 1989; 178:309–314.
- [14] Czeglédy J, Póka R, Veress G, Gergely L. Amplification of human papillomavirus type 16 transforming genes from cervical cancer biopsies and lymph nodes of Hungarian patients. *J Clin Microbiol* 1992; 30:233–236.
- [15] Póka R, Juhász B, Lampé L. Cervical cancer in young women: a poorer prognosis? *Int J Gynecol Obstet* 1994; 46:33–37.

Póka R, Czeglédy J. *HPV and lymph node status in cervical cancer. Long-term results*

Cervical cancer biopsy specimens from primaries and, in surgical cases, from pelvic lymph-nodes too were analysed for the presence of human papillomavi-

rus type 16 DNA-sequences using PCR technique. The management of surgical cases with two exceptions included Wertheim's hysterectomy predominantly with preoperative local radiotherapy and also with postoperative local and external beam radiotherapy depending on the histology. Non-surgical cases were treated with combined local and external radiotherapy to pelvic fields. Patients have been followed up for an average of 37 months after treatment ranging between 0 and 102 months. The mean progression-free survival time of surgical and non-surgical cases were 43 and 28 months, respectively. Patients with HPV-16 positive biopsies from the cervical primary lesion had an average progression-free survival of 37 months, the same as those with HPV-16 negative cervical biopsies. Those patients who were found to carry HPV-16 DNA in their surgically removed pelvic lymph-nodes had an average of 27 months progression-free survival. The mean progression-free survival among histologically node-positive and node-negative surgical cases were 23 and 42 months, respectively. The mean progression-free survival time of node-positive cases with HPV-16 positive cervical primary lesions was 7.5 months while that of patients with HPV-16 negative cervical biopsies was 38 months. Among histologically node-negative patients, HPV-16 positive and negative cases had an average progression-free survival time of 38 and 46 months, respectively. We conclude, that overall the most important factors to predict progression-free survival were surgically amenable disease, histologically negative pelvic lymph-nodes and HPV-16 negative cervical biopsies, though this latter one proved significant only among surgical cases.

Key words: cervical cancer, human papillomavirus, lymph-node, survival

Közlésre elfogadva: 1996. szeptember 17.

KÖZLEMÉNY

A Magyar Pre- és Perinatális Pszichológiai és Orvostudományi Társaság (MPPOT) első országos kongresszusát tartja.

Címe: Várandósság, születés, gyermeknevelés a magyarországi kultúrákban.

Időpontja: 1998. március 27–29.

Helyszín: HOTEL NIMRÓD – Dobogókő

20 perces referátumokkal, 10 perces előadásokkal, videoillusztrációval, poszterekkel lehet jelentkezni.

A jelentkezéseket 1998. január 31-ig a titkárság címére várjuk: Levélcím: 1016 Budapest, Tigris u. 49.

Telefon/fax modem: 213-6586