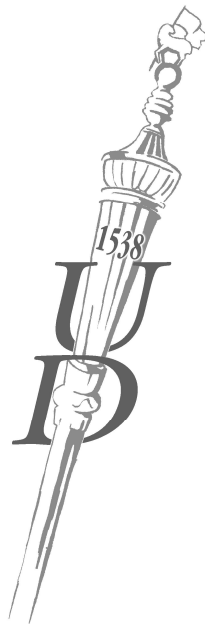


Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

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

Major Tamás

Témavezetők: Dr. Czeglédy Judit[†], Dr. Szarka Krisztina



DEBRECENI EGYETEM
Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2009

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

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

Major Tamás

Témavezetők: Dr. Czeglédy Judit[†], Dr. Szarka Krisztina

DEBRECENI EGYETEM
Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2009

Az értekezés címe: Humán papillomavírus DNS vizsgálata fej-nyaki epithelialis tumorokban

Doktori Iskola: DEOEC Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Témavezetők: Dr. Czeglédy Judit[†] PhD, Dr. Szarka Krisztina PhD

A Bíráló Bizottság

elnöke: Prof. Dr. Nemes Zoltán, az MTA doktora

Opponensek: Dr. Póka Róbert PhD, Dr. Tamás László PhD

Tagok: Dr. Klekner Álmos PhD, Dr. Minárovits János PhD

Az értekezés védésének

helyszíne: DE OEC I. sz. Belklinika tanterem

időpontja: 2009. április 17., 13 óra

1. BEVEZETÉS

1.1. Rendszertani besorolás, általános morfológiai jellemzés

A papillomavírusok (PV) a *Papillomaviridae* családba tartozó DNS vírusok. A család általános morfológiai jellemzői: 1. a kb. 8000 bp-ból álló cirkuláris kettősszálú DNS, melynek csak egyik száláról történik transzkripció; 2. ikozahedrális szimmetriájú, 52-55 nm átmérőjű, 72 kapszomerből álló kapszid. A papillomavírusokat a gazdaszervezet szempontjából kifejezett fajspecifitás jellemzi. Celluláris tropizmusuk is kifejezett, produktív fertőzést a bőr és a nyálkahártyák többrétegű laphámjában hoznak létre (epitheliotropizmus).

A cervix carcinomában a malignus betegségben nem szenvedő kontrollokhöz képest lényegesen gyakrabban detektált humán papillomavírus (HPV) típusokat magas onkogén kockázatúnak („high-risk” HPV 16, 18, 31, 33, 35, 56, 73, stb.), a carcinomákban és a kontrollokból azonos prevalenciájú típusokat alacsony onkogén kockázatúnak („low-risk” HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44, stb.) nevezzük.

1.2. A vírusgenom és az általa kódolt proteinek funkciója

A vírusgenom döntő többségét fehérjekódoló génszakaszok (nyitott leolvasási keretek, open reading frame; ORF) alkotják. 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 hosszú, fehérjét nem kódoló szakasza is (noncoding region = NCR), melyet funkciói alapján hosszú szabályzó régióknak (long control region = **LCR**) is neveznek. Az alábbiakban az értekezés szempontjából fontos virális proteineket ismertetem.

Az **E1 protein** a vírusreplikáció során az iniciációban és az elongációban játszik szerepet. DNS-kötő doménje révén kapcsolódik a replikációs origóhoz, ezt a kapcsolatot az E2 protein stabilizálja. Az E1 protein DNS-függő ATPáz és helikáz aktivitással rendelkezik. Az **E2 protein** - a PV genomban lévő kötőhelyeitől függően - a transzkripció során aktivátorként vagy represszorként is szerepelhet. A magas onkogén kockázatú típusok **E6 onkoproteinje** elsősorban a p53 tumorszupresszor protein, míg az **E7 onkoprotein** elsősorban a retinoblastoma tumorszupresszor protein (pRB) gátlása révén fejt ki transzformáló hatását. A késői ORF-ek expressziója csak produktív vírusinfekció esetén észlelhető. Az **L1 a fő kapszid protein**, a papillomavírusok immundomináns neutralizáló epitópjai ezen a fehérjén

helyezkednek el. Az **L2 protein** az L1 pentamerek egy részéhez kapcsolódva a vírusgenom enkapszidációjában játszik szerepet.

1.3. A papillomavírusok életciklusa

Produktív infekció. A papillomavírusok életciklusa szorosan kötődik a többrétegű laphám sejtjeinek differenciálódási folyamatához. A virion a *stratum basale* mitotikus aktivitással rendelkező hámsejtjeit fertőzi. A sejtmagba 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 relatíve állandó marad. A nagyszámú kópiát eredményező **vegetatív DNS replikáció** csak a terminálisan differenciált hámsejtjeiben észlelhető. A replikációhoz hasonlóan az E és L ORF-ek transzkripciója is a hámsejtjeinek differenciálódásával szinkron történik. A strukturális proteinek kódoló L gének expressziója csak a *stratum spinosum* felső részétől a felszínig detektálható. A virionok összeszerelődése intranuclearisan történik. Érett virionok a *stratum granulosum* (többrétegű elszarusodó laphám esetén) és a *stratum planocellulare* területén láthatók, kiszabadulásuk a sejtéből a hámfelszínen történik. A virion kiszáradásra rezisztens, fertőzőképességét a külvilágban hosszú ideig megőrzi. **Látens HPV infekció** esetén a HPV DNS normál szövettani struktúrájú hámsejtben detektálható. A látens HPV fertőzés leghíresebb példáját a recidív respiratoricus papillomatosis adja: a remisszióban lévő beteg szövettanilag ép légúti nyálkahártyáiban perzisztáló vírus DNS az akár évekkel későbbi recidiva forrása lehet.

1.4. A vírusgenom fizikai állapota

Az intakt, cirkuláris, extrakromoszómális vírusgenomot **episzómálisnak** nevezzük, ez 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 gazdasejt kromoszómális DNS-ébe **integrálódik**. A felhasadás döntően az E1 vagy az E2 ORF területén történik, az integráció során hosszabb-rövidebb génszakaszok deléciója következhet be. Az integráció következménye az E1 és E2 ORF-ek expressziójának és így az E6 és E7 gének transzkripciójának a megszűnése. A vírusgenom integrációja a gazdasejt DNS-ének transzkripciósan aktív, nem specifikus helyein történik, és általában az E6 és E7 gének fokozott expressziójával, mRNS-

ük fokozott stabilitásával jár. A bizonyos celluláris protonkogének (c-myc, jun-B) közelébe történő integráció azok fokozott expresszióját okozhatja. 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 epitheliotropismusuknak megfelelően – az emberi szervezet bőrének és nyálkahártyáinak többrétegű laphámjaiban okoznak benignus proliferációt, azonban számos lokalizációban malignus epithelialis tumorokban is detektálhatók. Legismertebb a HPV fertőzéseknek a cervix carcinomával történő szoros asszociációja, mely ebben a lokalizációban kimeríti az etiológiai kapcsolat fogalmát. A HPV cervicalis carcinogenesisben betöltött szerepét az alábbi érvek támasztják alá: 1. az invazív cervix carcinomák több mint 90 %-a HPV pozitív (laphámrákokban a HPV 16, az adenocarcinomákban a HPV 18 a leggyakoribb); 2. 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.

1.6. Humán papillomavírusok fej-nyaki carcinomákban

Fej-nyaki carcinomákban 1983-ban detektáltak először nuclearis elhelyezkedésű HPV antigéneket. Az ezt követő években több szerző mutatott ki HPV DNS-t szájüregi, garat- és gégerákokban hibridizációs módszerekkel (in situ és Southern-blot hibridizáció), a kutatásoknak azonban a 90-es években a polimeráz láncrekció (PCR) – mint szenzitív és specifikus DNS detektálási módszer - széles körű elterjedése adott új lendületet. A HPV típusok közül mindegyik fej-nyaki lokalizációban a HPV 16 a leggyakoribb. HPV DNS leggyakrabban az oropharynxban, azon belül is a tonsilla palatina carcinomájában detektálható. A HPV genom fej-nyaki tumorokban episzómális és integrált **fizikai állapotban** egyaránt előfordulhat, sőt a kétféle fizikai állapot egyidejű jelenlétét is leírták. A **vírusgenom kópiaszámával** fej-nyaki carcinomákban kevés tanulmány foglalkozik. Általában igaz, hogy a fej-nyaki carcinomák HPV DNS kópiaszáma alacsonyabb, mint a cervix carcinomáé. Az egyetlen kivétel a tonsilla carcinoma lehet, ahol a HPV DNS kópiaszáma összemérhető a cervix carcinomával.

1.7. Recidiv respiratoricus papillomatosis (RRP)

A RRP a felső légutak leggyakoribb benignus tumora. Az exophyt, pendulált vagy sessilis, szemölcsös-bolyhos felszínű növedékek a légutak lényegében bármely részén kialakulhatnak. A leggyakoribb lokalizáció a gége, mely az esetek több mint 90 %-ában érintett. Az első tünetek leggyakrabban 1-5 éves kor között, valamint 20-30 éves kor között jelentkeznek, ez alapján *juvenilis kezdetű* (J-RRP) és *felnőttkori (adult) kezdetű* (A-RRP) formát különböztetünk meg.

A RRP fő **etiológiai** tényezője a HPV 6-os és 11-es típusa. Kellően szenzitív DNS detektálási módszerekkel a légúti papillomák HPV DNS pozitivitása megközelíti vagy eléri a 100 %-ot. HPV DNS a papillomatosis melletti – makroszkóposan ép – szövetekben, a papillomatosistól távoli légúti lokalizációkban, valamint komplett remisszióban lévő betegek légúti nyálkahártyáiban is kimutatható. A virális DNS jelenléte ezen ép szövetekben egyrészt a gyakori recidiva forrását képezheti, másrészt megmagyarázza a RRP pusztán sebészi eradikációjának gyakori kudarcát.

J-RRP esetekben a HPV infekció vélhetően születéskor, a fertőzött szülőutakon történő áthaladás következtében történik (**maternofoetalis transzmisszió**). A-RRP esetében a transzmisszió legvalószínűbb módja az orogenitalis szex, azonban korábbi – akár születéskor szerzett – látens fertőzés aktiválódása sem zárható ki.

Az elváltozás **predilectiós helyei** a felső légutakban számos helyen meglévő természetes többrétegű el nem szarusodó laphám – egyrétegű csillószerű hengerhám átmenetek.

A **tünetek** a lokalizációtól és a beteg életkorától (a légutak átmérőjétől) függenek. Vezető tünet a leggyakoribb hangszalagi lokalizáció esetén a progresszív rekedtség. A második leggyakoribb tünet a stridor. Elsősorban kisgyermekkorban, a papillomatosis szűk légutakban történő rapid növekedése esetén légzési elégtelenség jelentkezhet.

A **természetes kórlefolyás** kiszámíthatatlan, a betegséget gyakori recidivahajlam jellemzi. A J-RRP általában a pubertás körül spontan remissziót mutat. Általában több évtizedes fennállás után az esetek 3-5 %-ában a RRP malignus degenerációját írták le.

A RRP – fizikális vizsgálattal vagy fiberscopiával felvetődött - gyanúja esetén narcosisban, laryngomicroscopia (LMC) során a laesiókból hisztológiai mintavételt végzünk. A RRP **diagnózisa szövettani**: a többrétegű el nem szarusodó laphám benignus proliferációja a fibrovascularis stromával együtt ujjszerű nyúlványokat képez. A HPV fertőzések specifikus cytopathiás hatása a koilocytosis. Gyakori az abnormális keratinisatio (elsősorban parakeratosis) is.

A RRP **kezelésének** alapja a laesiók **műtéti eltávolítása**: a leggyakoribb laryngealis lokalizáció esetében a feltárás LMC útján történik, a laesiókat élesen, CO₂ lézer vagy microdebrider útján távolítjuk el. Súlyos, akut légzési elégtelenség esetén, elsősorban kisgyermekben **urgens tracheotomiára** lehet szükség. **Adjuváns kezelésre** az RRP esetek mintegy 10 %-ában kerül sor, napjainkban a két leggyakrabban alkalmazott szer az alfa-interferon (IFN- α) és a cidofovir.

A RRP kiszámíthatatlan természetes kórlefolyása és potenciális veszélyei miatt kétségbeesett próbálkozások irányulnak a **prognózis** előrevetítésére. Általában az alacsonyabb életkort és a HPV 11-es típusát 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, CDV) számos DNS vírus replikációjának inhibitora. Napjainkra a RRP egyik leggyakrabban alkalmazott „off-label” adjuváns gyógyszere lett. A RRP CDV kezelésének tapasztalataival az utóbbi 15 évben számos közlemény foglalkozik, ezekben közös az alacsony esetszám és a pár hetes időközönként alkalmazott intralaesionalis gyógyszeradás.

A cidofovir biológiai hatásosulása igen gyenge (<5%), ezért HPV asszociált laesiók esetén általában helyileg (RRP esetén intralaesionalisan) alkalmazzák. Az intralaesionalis gyógyszeradás a leggyakoribb laryngealis lokalizáció esetén narkózisban, LMC útján történik. Az aktív intracellularis difoszfát metabolit féléletideje 17-65 óra, a gyakorlatban azonban az intralaesionalis CDV injekciók kezdeti 2 hetes intervalluma is hatékonyan csökkenti a papillomatosis kiterjedését.

RRP sorozatos intralaesionalis CDV terápiájában egységes **dózis és alkalmazási protokoll** nincs. A CDV terápia során állatkísérletekben leírt carcinogenesisist és nephrotoxicitást intralaesionalis CDV kezelés során nem észlelték.

2.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. 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), patológiai (pT, pN, grade, lokalizáció) paraméterei és kimenetele között?
6. Van-e HPV DNS státusz vizsgálatának prognosztikai értéke?
7. Hogyan befolyásolja a HPV DNS státuszát az RRP adjuváns intralaesionalis cidofovir terápiája?

3. BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Betegkövetés

Vizsgálatainkat a DEOEC Fül-Orr-Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Klinika fekvőbetegei körében végeztük 2001. márciusa és 2006. októbere között. A virológiai mintavétel a kuratív műtétek során a szövettani mintavétellel egy időben, steril műtéti körülmények között történt. 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.

3.1.1. A carcinomás betegcsoport (n=33). 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). A 31 férfi és 2 nő átlagéletkora 54,5 év (37-71 év) volt. A **szövetteni diagnózis** 32 esetben carcinoma planocellulare és 1 esetben adenocarcinoma volt. Differenciáltsági fok szempontjából 9 esetben G-I, 8 esetben G-II, 16 esetben G-III elváltozást észleltünk. **Lokalizáció** szerint a carcinoma 15 esetben laryngealis, 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. Két beteg esetében a virológiai mintavételt partialis resectióval járó műtét után recidiváló carcinomából végeztük.

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. 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.

3.1.2. A papillomás (RRP) betegcsoport (n=14). Az ebbe a csoportba soroláshoz alapfeltétel volt a papilloma – dysplasiás jelek nélküli - szövetteni diagnózisa. A betegek nagy részének anamnézisében már szerepelt RRP. A csoportba azonban bekerült két olyan beteg is, akiknek az esetében a praeeoperatív klinikai vizsgálatok során vetődött fel RRP lehetősége és ezt – a virológiai vizsgálattal egyidőben elvégzett - szövetten is igazolta. A vizsgálat kezdetén rögzítettük az életkort, a nemet, a lokalizációt és az anamnesztikus adatokat.

A **J-RRP csoportban (n=6)** 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- α terápiában. A J-RRP csoportból két beteg a vizsgálat kezdetén felnőtt korú volt (26 ill. 62 évesek). Az **A-RRP csoportban (n=8)** a papillomatosis diagnózisa átlagosan 34,75 éves (18-71 év) korban született. Két kivétellel (egy lágyszájpadí és egy orrüregi lokalizációjú RRP) 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- α kezelést egy beteg kapott. A **prospektív vizsgálati időszak** az első (néhány esetben egyetlen) friss műtéti virológiai mintavételtől indult.

3.1.3. Papillomát és dysplasiát tartalmazó, a követés során malignusan degenerált elváltozások (n=5). 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. A 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 recidívája 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.

3.2. Virológiai mintavétel

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 CO₂ lézer evaporizáció előtti éles eltávolításakor, carcinomák esetén közvetlenül a szerv eltávolítása után, annak fixálószerbe történő helyezése előtt történt. Az eltávolított szöveteket további feldolgozásig -70 °C-on tároltuk.

3.3. HPV DNS detektálás PCR technikával

Mintáinkból a DNS-t fenol-kloroform-izoamilalkohol elegyével nyertük ki, az extraktum DNS tartalmát és tisztaságát spektrofotometriás úton ellenőriztük. A DNS integritását a humán β -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 kb. 450 bp szakaszt amplifikál. A virális DNS detektálásának második körét GP5+/GP6+ konszenzus (nested) PCR-rel végeztük, mely – szintén a legtöbb nyálkahártya-asszociált HPV típus esetében – az MY09/MY11 PCR amplimerjén belül egy kb. 145 bp szakaszt detektál. A PCR termékeket agaróz gélelektroforézis (az agaróz gélét etidium-bromiddal festettük) után ultraibolya fényben értékeltük.

3.4. HPV tipizálás restriktív enzimhasítással

A HPV DNS pozitív PCR produktumokat *RsaI*, valamint *MseI* restriktív endonukleázzal hasítottuk. A létrejött fragmentumokat nem denaturáló poliakrilamid gélen futtattuk, majd ezüstfestéssel detektáltuk, és a futási képet referencia plazmidokból nyert, azonos restriktív enzimekkel hasított GP amplimerok elektroforetikus mintázatához viszonyítottuk. Pozitív kontrollként HPV 6, 11, 16 és 18 DNS-t tartalmazó referencia plazmidokat használtunk.

3.5. A HPV DNS fizikai állapotának meghatározása az E1-, E2- és E1E2 régióra specifikus PCR-rel

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 a kérdéses régiót az adott HPV típus E1-, E2- és E1E2 ORF-jére specifikus PCR-ek segítségével vizsgáltuk, az amplimerok 845-2206 bp hosszúságúak voltak. A PCR termékeket agaróz gélelektroforézis után ultraibolya fényben értékeltük.

3.6. A HPV DNS fizikai állapotának meghatározása Southern-blot hibridizációval (SBH)

A SBH technikával az E1, E2 és E1E2 specifikus PCR-ek pozitívítása esetén a mintában egyidejűleg integrált fizikai állapotú HPV DNS-t kerestünk. A virális DNS-t 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 emésztettük, majd a DNS-t agaróz gélelektroforézis után kapilláris transzferral blottoltuk át pozitív töltésű

nylon filterre. A HPV specifikus szekvenciák azonosításához típus specifikus próba DNS-t használtunk. A PCR technikákhoz képest relative kisebb szenzitivitása és nagy minta DNS igénye miatt a SBH rutinszerű alkalmazását a tanulmány során később felfüggesztettük.

3.7. Az E1-, E2-, E1E2- és az MY09/MY11-specifikus PCR érzékenységének összehasonlítása

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

3.8. HPV DNS pozitív papillomás és carcinomás minták kópiaszámának összehasonlítása

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. 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.

3.9. A HPV DNS kópiaszámának meghatározása real-time PCR technikával

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 amplifikációs keverék 10 ng templát DNS-t tartalmazott. A fluoreszcencia spektrumokat minden PCR ciklus elongációs lépése során regisztráltuk. A SYBR Green jelenlétében létrejött PCR termékek azonosítása és ellenőrzése céljából olvadáspont analízist végeztünk. A vírusgenom kópiaszámát HPV 6 és 11 plazmid DNS segítségével felvett standard görbe segítségével határoztuk meg.

3.10. A HPV DNS pozitivitás összefüggésének vizsgálata a carcinomás betegek klinikopatológiai paramétereivel és a betegség kimenetelével

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. 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 megjelenő lokális recidivát, regionális nyirokcsomó recidivát vagy távoli áttétet jelentett.

3.11. A HPV DNS vizsgálata intralaesionalis cidofovir (CDV) terápia során

A RRP betegcsoportban szereplő, 1994-ben született fiú másfél éves korában tartós rekedtség háttérében LMC és szövettani mintavétel útján RRP igazolódott. A CDV terápia elindításáig 28 alkalommal részesült éles eszközzel vagy CO₂ lézerrel történő papilloma eltávolításban. 1999. júniusa óta a DEOEC Fül-Orr-Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Klinika betege, ekkor indult sc. IFN- α terápiája, mely több mint öt éven át, a CDV kezelés kezdetéig tartott. 2001. augusztusában a gége mellett a lágyszájpadon is papillomák jelentek meg. 2004. augusztusában heveny légúti obstructio miatt urgens tracheotomia történt. A tracheostomát – a közben is gyakori fulmináns recidivák miatt - 2005. márciusáig, a CDV terápia kezdetéig kénytelenek voltunk fenntartani.

A CDV terápiát (Vistide[®]) Chetri protokolljának módosítása alapján végeztük: 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 intratrachealis narcosisban végeztük (az endotrachealis intubatio a 7. kezelésig fenntartott tracheostomán át, az utolsó két alkalommal a perzisztáló tracheocutan fistulán át történt). A lágyszájpadi 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, mely a különböző légúti lokalizációk esetén külön-külön egy 0 és 3 közötti pontértéket (papilloma severity score = **PSS**) határoz meg (0 = nincs laesio; 1= felszíni laesio; 2 = előemelkedő laesio; 3 = tömeges laesio). A kétgócú betegség pontosabb követése érdekében a gége és a lágyszájpad pontszámát külön-külön vezettük. A PSS értékek rögzítése után a laesiókat éles eszközzel eltávolítottuk, alapjukat CO₂ lézerrel evaporizáltuk. A CDV 40 mg egyszeri dózisát (kb. 1 mg/ttkg) fiziológiás sóoldattal hígítottuk a kívánt mértékre: a lágyszájpad lokalizáció esetén 5 mg/mL (2-2 mL a lágyszájpad szabad szélének

bal és jobb oldalán a submucosába), a gégében – a jóval szűkebb anatómiai viszonyok miatt – 10 mg/mL koncentrációt alkalmaztunk (1-1 mL mindkét valódi hangszalag állományába). A rutin kórszövettani vizsgálatra küldött minta mellett a szövetminta másik részét gyorsfagyasztás után virológiai vizsgálat céljából tároltuk. Viroológiai vizsgálatra a teljes remisszió esetén is vettünk szövetmintát a korábbi laesio helyéből. A CDV hatásának vizsgálatára, kontrollként a beteg korábbi 5 virológiai feldolgozásra szánt szövetmintáját használtuk fel, ezeket a CDV terápia kezdete előtt 190, 165, 131, 53 és 41 héttel vettük.

A HPV DNS detektálása, a vírusgenom fizikai állapotának, valamint kópiaszámának meghatározása 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 CDV adást – gyakorivá vált recidivák miatt - egy felnőtt beteg 6. műtéténél is végeztünk.

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

4.1. A HPV DNS jellemzése a carcinomás betegcsoportban

Lokalizáció	HPV	HPV típus				
	poz/összes	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
Összesen	15/33	5	3	1	6	0

HPV DNS pozitivitás és típusok. A teljes fej-nyaki régióban észlelt 45,5 %-os (15/33 beteg) HPV DNS pozitivitás meghaladja a carcinomás szövetekben PCR technikával detektált HPV DNS pozitivitás irodalmi adatainak többségét: a 60 közlemény értékeiből újraszámolt prevalencia 25,9 % volt.

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. 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 PCR tanulmányból számolt átlagos prevalencia (17 %). Az *oropharyngealis* vagy az *oropharynxot is érintő* esetekben a HPV 16 prevalenciája 25 % (2/8 eset), ez minimálisan alacsonyabb, mint a 27 PCR tanulmány adataiból számolt prevalencia (31 %). Nem igazolódott a HPV 16 jelentős oropharyngealis predilekciója, bár az esetszám az oropharynx tumorok esetén nagyon alacsony.

Egyetlen esetben sem detektáltunk **HPV 18**-at, pedig fej-nyaki carcinomákban is ezt a típust tartják a második leggyakoribbnak. 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. A 6-os és a 11-es típus magas prevalenciáját földrajzi sajátosságnak tarthatjuk.

Két HPV típus **koinfekcióját** egy esetben (3%) észleltük: egy laryngo-hypopharyngealis lokalizációjú carcinoma 11-es és 16-os típust is tartalmazott. Irodalmi adatok szerint a koinfekciók prevalenciája fej-nyaki tumorokban 3,6 %, leggyakoribb a 16-os típusnak valamely más típusal történő együttes jelenléte. A koinfekciót az ismételt HPV expozíció következményének tartják.

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 pozitívnak, 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.

Fizikai állapot és kópiaszám. 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. 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 HPV DNS integrációja az egyébként alacsony onkogén kockázatú HPV 6 etiológiai szerepe mellett szólhat.

A többi HPV DNS pozitív carcinomás minta negatív E1, E2 és E1E2 PCR- eredményei háttérében elsősorban a vírusgenom igen alacsony kópiaszámát feltételezzük. 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 fizikai állapot meghatározhatatlanságának másik fő oka módszereink eltérő érzékenysége lehet, melyet egy HPV 6 pozitív papillomás minta tízszeres léptékű hígítási sorozatán elvégzett PCR-ekkel igazoltunk: legérzékenyebbnek az MY09/MY11 PCR bizonyult, ezt követte az E2 PCR, majd az E1 és az E2 PCR.

A HPV DNS pozitivitás összefüggésének vizsgálata a betegek klinikopatológiai paramétereivel. Az egyes HPV típusokra pozitív betegek alacsony száma miatt a nested PCR technikával észlelt összes HPV DNS pozitivitás kapcsolatát vizsgáltuk meg a klinikopatológiai paraméterekkel. A betegek **klinikai paramétere**i és a HPV pozitivitás 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 ($p=0,115$).

A klinikai, patológiai és mikrobiológiai jellemzők hatása a betegség kimenetelére. 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 ($p=0,025$). A pT stádium és a lokalizáció kedvezőtlen kimenetelre gyakorolt hatása nem volt 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.

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

4.2. A HPV DNS jellemzése a papillomás betegcsoportban

HPV DNS pozitivitás és típusok. A 14 betegből összesen 26 mintát dolgoztunk fel.

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).

Valamennyi papillomás beteg HPV DNS pozitívnak bizonyult. Nyolc betegben HPV 11 DNS-t, 6 betegben HPV 6 DNS-t detektáltunk. A 100 %-os HPV DNS pozitivitás nem meglepő annak ismeretében, hogy jó minőségű, friss, az esetek többségében bőséges szövetmintát vizsgáltunk egy kellően szenzitív technikával.

A betegek egy részének követése során következetesen egyazon HPV típus DNS-ének jelenléte volt igazolható. Mindez megerősíti a 6-os és a 11-es típusnak a RRP etiológiájában betöltött szerepét. Hasonló sorozatos biopsziák HPV tipizálása a szakirodalomban nem gyakori.

HPV koinfekciót egyetlen papillomás mintában sem tapasztaltuk. A koinfekciók tekintetében a szakirodalom nem egységes, egyes populációkban akár több HPV típus egyidejű jelenléte is gyakran észlelhető.

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, ők valamennyien HPV 11 pozitívak voltak.

A **felnyitott** 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 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.

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, más vizsgálatok szerint a 6-os és a 11-es típus gyakorisága J-RRP-ben lényegében megegyezik.

Esetünkben – bár az esetszám igen alacsony – 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). 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 operálták. Az ezt követő remisszió időszaka – a tanulmányunkba történő bevonás előtti fulmináns recidiváig számolva – 35 év (!) volt. Hasonló hosszú remissziós időszakról más szerzők is beszámolnak. Nem zárható ki azonban egy – orogenitalis kontaktus útján történő – „szekunder primer” HPV infekció lehetősége sem.

Trachealis vagy bronchopulmonalis terjedést egyetlen esetben sem észleltünk.

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. Pusztán az intakt E1E2 régió jelenléte nem zárja ki az epizómális 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 epizómális állapotú HPV DNS-t igazolt. A többi papillomás betegben nincs adatunk az egyidejű integrált fizikai állapot jelenlétére. Az esetek felében igazolt tisztán epizómális fizikai állapot vélhetően jó prognózist jelent az esetleges malignus degeneráció elkerülése szempontjából, bár további, folyamatos követés szükséges.

Kópiaszám. A vírusgenom kópiaszámát real-time PCR technikával vizsgáltuk. A PCR termékek ellenőrzése céljából olvadáspont-analízist végeztünk. 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.

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 celluláris immunitásának egyensúlya határoz meg. A real-time PCR technikával feldolgozott alacsony esetszám 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, ezáltal is megerősítvén a humán papillomavírusoknak a RRP etiológiájában betöltött kulcsszerepét.

4.3. A HPV DNS státusza a kezdetben vegyes elváltozást mutató, később malignusan degenerált betegcsoportban

HPV DNS pozitivitás és típusok. A vegyes elváltozás első észlelésekor a betegek átlagéletkora több, mint 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** 5 beteg szövetszövetmintáját vizsgáltuk, 4 minta HPV DNS negatív, egy minta HPV 16 DNS pozitív lett.

Két betegben a HPV 16 DNS jelenlétét (egy papilloma + dysplasiában és egy carcinomában) negatív eredmény előzte meg (papilloma + dysplasiában).

Fizikai állapot és kópiaszám. A HPV 16 DNS pozitív mintákban az 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 – a papilloma szövetszöveti diagnózis ellenére – 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 kazuistikák vagy esettanulmányok, ahol a HPV malignus degenerációban betöltött etiológiai szerepe megalapozott: ilyen a HPV 11

genom jelenléte és integrált fizikai állapota RRP talaján kialakult invazív carcinomában. A papillomatosis HPV-asszociált malignus degenerációjának másik módja a korábbi alacsony mellett magas onkogén kockázatú típusok megjelenése. 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 (SIL) HPV státuszával kapcsolatos irodalmi adatokat. A laryngealis SIL egy tágan értelmezett szövettani fogalom, 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. Irodalmi adatok szerint laryngealis SIL esetén a HPV DNS prevalenciája átlagosan 12 %, leggyakoribb a HPV 16 jelenléte. Az általunk vizsgált 5 eset HPV státusza elsősorban a SIL-nek (és a hozzá illeszthető dysplasiáknak) felel meg.

4.4. A HPV DNS státuszának jellemzése az RRP intralaesionalis cidofovir terápia során

Az intralaesionalis CDV terápia irodalmi áttekintése. Intralaesionalis CDV kezeléssel kapcsolatban szerzett tapasztalatokról számos szerző számol be. A közlemények objektív összehasonlítása gyakorlatilag lehetetlen. A betegcsoportok eleve kis létszámúak (3-26 főből állnak). A J-RRP és az A-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. Különbözik a műtéti technika: az esetek egy részében csak intralaesionalis CDV injekciót alkalmaztak, más részében azonban ezt a makroszkópos laesiók műtéti eltávolítása előzte meg. Eltért a CDV 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 részében 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. Egy 17 közlemény adatait (158 beteg) feldolgozó irodalmi összefoglalás szerint a betegek 57 %-a került komplett

remisszióba, 35 %-uk parciális remisszióba, míg 8% nem reagált a kezelésre. Az intralaesionalis CDV terápia tehát általában sikeresnek mondható.

A kezelés általunk alkalmazott paraméterei (9 injekció 55 hét alatt, 1 mg / ttkg egyszeri összdózis, 5-10 mg/mL koncentráció lokalizációtól függően, 62 hét követési idő) megfelelnek a szakirodalmi adatoknak. Systemás mellékhatást nem észleltünk.

A szövettani leletek értékelése. Betegünk esetében a szövettani vizsgálat – egy eset kivételével – papillomatosist igazolt, az utolsó három kezelés alkalmával enyhe displasiával. Súlyos displasiát vagy malignus degenerációt a leletező patológus nem észlelt. Az egyetlen kivétel a gégeből a 3. injekció alkalmával vett szövetszövetmintából, melynek diagnózisa laryngitis chronica volt. A RRP CDV terápiajának kapcsán kialakult invazív malignus tumort még nem észleltünk, a dysplasia is irodalmi ritkaság.

A cidofovir kezelés hatása a papillomatosist kiterjedésére (PSS). A kezelés előtti időszakban a laryngealis PSS értékek 9 és 16 között fluktuáltak, dacára a kombinált CO₂ lézer és IFN- α terápianak. A lágyszájpad betegség ennél kevésbé kiterjedt (PSS maximum 3), ráadásul több mint két éven át ez a lokalizáció remisszióban is volt. Négy héttel a CDV kezelés előtt a betegből a lágyszájpad hátsó szélét érintő és a gége csaknem egészét kitöltő papillomatosist távolítottunk el.

A betegség súlyosságát jelzi, hogy mindössze négy héttel később (a CDV kezelés kezdetekor) a gégeben 6-os, a lágyszájpadon PSS=2 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 recidivája 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.

A cidofovir kezelés hatása a HPV DNS státuszára. Valamennyi biopsziában *HPV 11 DNS-t* detektáltunk. Ismereteink szerint a HPV DNS fizikai állapotát és kópiaszámát intralaesionalis CDV terápia során a korábbiakban még nem vizsgálták. Amennyiben a kópiaszám elérte az E1, E2 és E1E2 PCR-ek érzékenységi küszöbét – az episzómális **fizikai állapotra** jellemző intakt E1E2 régiót észleltük. A kezelés előtti időszakban a laryngealis **kópiaszám** mintegy 2 nagyságrendnyi fluktuációt mutat ($2 \times 10^2 - 10^4$ kópia / 10 ng templát DNS), a lágyszájpad kópiaszámot csak egy alkalommal határoztuk meg (3×10^3). A laryngealis kópiaszám ingadozását (kombinált műtéti és IFN- α terápia mellett is) a HPV fertőzés természetes kórlefolyása és a gazdaszervezet antivirális immunitásának változásai magyarázhatják.

A CDV kezelés kéthetes intervallummal járó kezdeti, indukciós fázisában 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 (<10), a papilloma-mentes gégegében 2×10^3 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 CDV terápia későbbi megnövelt intervallumú, fenntartó 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 (3×10^5) kísért. A gége a 6. és a 7. injekció alkalmával remisszióban van, ugyanakkor a vírusgenom kópiaszáma igen magas (10^5 , ill. 2×10^4). 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 értékeket.

A beteg tracheostomáját a 7. injekció után megszüntettük, ekkor a gége tumormentes volt. A kezelés végén és a követési szakban is perzisztáló 3 mm átmérőjű tracheocutan fistula azonban jelezte a gége részben szűkítő recidiv papillomatosis, miközben a lágyszájpad laesio stabil maradt.

A CDV hatékony antivirális hatásának kifejtéséhez tehát – úgy tűnik – kéthetes injekciós intervallum szükséges. Ez azonban egyrészt a beteg szempontjából lenne elviselhetetlen, másrészt nem feledkezhetünk meg a CDV esetleges toxikus hatásairól sem! Ezen érvek miatt a szerzők többsége vagy eleve hosszabb intervallummal adja a CDV-t, vagy egy rövid intervallumú indukciós kezelés után növeli az injekciók intervallumát. A CDV kezelés második – **hosszabb intervallumú** – szakaszában a fluktuáló, esetenként magas kópiaszám ellenére a betegség mindkét lokalizációban „kontrollált” recidivát mutat. A papillomatosis tartós kontrollját a CDV hosszú távú – a vírusreplikáció gátlásától független – hatásai

magyarázhatják, melyet *in vivo* és *in vitro* kísérleti eredmények igazolnak (E6 és E7 expresszió csökkenése transzkripciós szinten, sejtciklus gátlás „S” fázis blokk révén, apoptózis indukció, stb.). Ezeket a kísérleteket ugyan carcinoma sejtvonalakon végezték, de a vírus DNS transzkripciójának CDV által okozott gátlása papillomák esetében is működhet.

Az intralaesionalis CDV terápia értékelése. A CDV 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). 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 CDV terápia hatékonynak bizonyult, de nem kuratív.

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

Egy HPV 6 pozitív felnőtt beteg 6. műtéténél is végeztünk intralaesionalis CDV 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.

5. 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 (némielgyakoribb 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 terápiaja 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.

6. KÖZLEMÉNYEK

6.1. 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**:51-5.

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**:2169-74

IF: 1,414

6.2. 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**:1891-7.

Major T, Jókay I, Soós Gy, Gergely L, Czeglédy J. A juvenilis gégepapillomatosis virológiai vonatkozásai. *Orv Hetil* 1999;**140**:405-11.

Major T, Jókay I, Ashtari A, Soós Gy, Sziklai I. Schwannoma a parapharyngealis térben. *Fül-Orr-Gégegyógyászat*,2001;**47**:43-7.

Major T, Nagy A, Erdélyi G, Sziklai I. Lymphangioma of the sphenoid sinus. *J Laryngol Otol* 2003;117:564-5

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**:402-5.

IF: 2,170

7. ELŐADÁSOK, POSZTEREK

Major T, Gergely L, Czeglédy 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, Czeglédy 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, Czeglédy J. Human papillomaviruses and laryngeal neoplasia. Leiden International Medical Students Congress, 26-27 November, 1999, Leiden, The Netherlands

Major T, Czeglédy 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, Czeglédy J. Human papillomavirus DNS vizsgálata laryngealis és pharyngealis daganatokban. Magyar Fül-, Orr-, Gégeorvosok Egyesületének 37. Nemzeti Kongresszusa, 2002. október 2-5., Siófok

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