

Występowanie wirusów *Papilloma* (HPV) w przerzutach do węzłów chłonnych u kobiet z rakiem szyjki macicy – badania wstępne

Sława Szostek¹, Małgorzata Klimek², Janusz Ryś³,
Jolanta Kopec¹, Barbara Zawilińska¹

Infekcja HPV jest ściśle związana z rozwojem zmian przednowotworowych i rakiem szyjki macicy (s.m.). Integracja wirusowego DNA z genomem zakażonej komórki może sprzyjać rozprzestrzenianiu wirusa. Występowanie typów HPV o wysokim potencjale onkogenym w przerzutach odległych może mieć ważne znaczenie rokownicze.

Cel. Określenie typów HPV w zmianie pierwotnej raka s.m. i przerzutach do węzłów chłonnych.

Materiał i metody. Badania przeprowadzono u 5 kobiet poddanych histerektomii i leczonych napromieniowaniem. Materiał pochodził ze zmiany pierwotnej i usuniętych węzłów biodrowych wewnętrznych, zewnętrznych lub wspólnych. We wszystkich węzłach chłonnych wykazano komórki nowotworowe. Izolację DNA przeprowadzono metodą fenolizy. DNA HPV wykrywano metodą PCR przy użyciu starterów SPF 10, charakterystycznych dla regionu L1 HPV. Produkty reakcji poddano genotypowaniu metodą hybrydyzacji na paskach nitrocelulozowych z sondami charakterystycznymi dla 25 typów wirusa.

Wyniki. We wszystkich badanych materiałach wykazano obecność HPV 16 i inne typy HPV wysokiego ryzyka. U wszystkich pacjentek wykrywano zakażenie mieszane w zmianie zasadniczej, natomiast w węzłach chłonnych nastąpiła selekcja typów do HPV 16 i HPV 52.

Wnioski. Wstępne badania sugerują istnienie wybiórczej transmisji typów HPV wysokiego ryzyka do zmian przerzutowych. Określenie typów wirusa w usuniętych węzłach chłonnych może być dodatkowym markerem rokowniczym w raku szyjki macicy.

The presence of papillomaviruses (HPV) in lymph node metastases in women with cervical cancer – a preliminary report

HPV infection is strongly associated with the development of preinvasive lesions and cervical cancer. Integration of viral DNA into the host genome has been suggested as a phenomenon which facilitates the spread of the virus. The presence of high risk HPV types in lymph node metastases could have significant prognostic value.

Purpose. To assess the types of HPV in primary cervical cancer and in the nodal metastases.

Material and methods. The investigated group consisted of five patients who had undergone radical hysterectomy and adjuvant irradiation. The clinical samples were obtained from the primary tumour and the internal, external and common iliac lymph nodes. The presence of cancer cells was confirmed in all the lymph nodes. DNA extraction was performed using the phenol-chloroform method. HPV detection was achieved using SPF 10 primers characteristic for HPV L1 region. The PCR products were genotyped using a reverse hybridization line probe assay for 25 HPV types.

Results. In all specimens HPV 16 and other high risk HPV types were detected. In the primary tumours multiple infections were confirmed, while in the metastatic nodes we only found HPV 16 and HPV 52.

Conclusions. Preliminary study results suggest selective transmission of the high risk HPV types to metastatic nodes. The detection of HPV types in extracted lymph nodes could be an additional prognostic marker in the case of women suffering from cervical cancer.

Słowa kluczowe: wirusy *Papilloma*, HPV, rak szyjki macicy, przerzuty do węzłów chłonnych
Key words: *papilloma viruses*, HPV, cervical cancer, lymph node metastases

¹ Zakład Wirusologii Katedry Mikrobiologii
CM UJ w Krakowie

² Klinika Ginekologii Onkologicznej

³ Zakład Patologii Nowotworów
Centrum Onkologii – Instytut Onkologii
im. Marii Skłodowskiej-Curie
Oddział w Krakowie

Wstęp

Zakażenie wirusami *Papilloma* (HPV) jest ściśle związane z procesem karcinogenezy w obrębie narządów płciowych i odbytu. Spośród dotychczas scharakteryzowanych około 100 typów wirusa, 40 uważa się za tzw. typy anogenitalne, które na podstawie częstości występowania w zmianach przednowotworowych takich jak śródnaślónkowa neoplazja szyjki macicy i w raku szyjki macicy (s.m.), podzielono pierwotnie, na trzy grupy:

- o niskim potencjale onkogennym – HPV 6, 11, 42, 43, 44, wykrywane najczęściej w łagodnych zmianach rozrostowych, jak kłykcina kończysta, w śródnaślónkowej neoplazji małego stopnia, rzadko w raku;
- średnim potencjale onkogennym – HPV 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56 – spotykane w kłykcinach kończystych, śródnaślónkowej neoplazji oraz w 20-25% przypadków nowotworów narządów płciowych;
- o wysokim potencjale onkogennym – HPV 16 i 18 – najsilniej związane z rakiem inwazyjnym i izolowane w 50-98% raków s.m, pochwy, sromu, okolicy odbytu oraz narządów płciowych męskich [1, 2].

Obecnie wirusy HPV o średnim i wysokim potencjale onkogennym często traktowane są jako jedna grupa wirusów, stanowiąca wysoki stopień zagrożenia rozwojem choroby nowotworowej. Badania epidemiologiczne potwierdziły, że kobiety zakażone wirusami o średnim lub wysokim potencjale onkogennym są znamienne bardziej narażone na rozwój raka s.m., w porównaniu do kobiet nie zakażonych lub zakażonych wirusami o niskim potencjale onkogennym. Infekcja wirusowa wyprzedza w czasie rozwój nowotworu, a proces karcinogenezy zależy również od szeregu innych czynników, takich, jak czas trwania zakażenia, wiek pacjentki, występowanie współzakażeń np. *Herpes simplex*, *Chlamydia trachomatis*, ewentualne zaburzenia hormonalne, wydolność układu immunologicznego, występowanie mutacji w genomie komórek gospodarza. Wirus po wnikięciu do komórki naślónkowej s.m. znajduje się w cytoplazmie i jądrze zakażonej komórki w postaci episomalnej. W trakcie transformacji nowotworowej dochodzi do włączenia DNA HPV do genomu komórki gospodarza. Integracja wirusowego DNA z genomem zakażonej komórki może ułatwić rozprzestrzenianie się wirusa w organizmie. Jakkolwiek uznano HPV za czynnik inicjujący raka s.m., jednakże znaczenie tego zakażenia wirusowego w dalszym przebiegu choroby nowotworowej jest słabo poznane.

Celem pracy była odpowiedź na pytanie, czy i w jakim stopniu w trakcie przerzutowania raka s.m. do okolicznych węzłów chłonnych dochodzi do przeniesienia zakażenia HPV?

Materiały i metody

Badania przeprowadzono u pięciu kobiet z rozpoznaniem histopatologicznie inwazyjnym rakiem s.m. U wszystkich chorych wykonano radykalną histerektomię, a następnie włączono uzupełniające leczenie napromienianiem w dawkach standardowych. Materiał do badań wirusologicznych pobrano ze zmiany pierwotnej i z usuniętych węzłów biodrowych

wewnętrznych, zewnętrznych lub wspólnych. We wszystkich węzłach chłonnych wykazano komórki nowotworowe.

Izolację genomowego DNA przeprowadzono z tkanek zatopionych w parafinie metodą fenolizy. Skrawki parafinowe o grubości 3 µm po odparafinowaniu w ksylenie, odwodnieniu w etanolu i wysuszeniu trawiono proteolitycznie (20 µg/ml proteinazy K) w temp. 55°C przez 48 godz. Reakcję enzymatyczną przerywano, gotując próbki 10 min. Następnie zastosowano standardową metodę fenolizy [3]. Z fazy wodnej wytrącano DNA 7,5 M octanem amonu i zmrożonym alkoholem absolutnym.

Obecność DNA HPV wykazywano metodą PCR, z zastosowaniem starterów SPF 10, rozpoznających sekwencje zlokalizowane w rejonie L1 HPV [4]. Amplifikację przeprowadzono w 50 µl mieszaniny reakcyjnej, zawierającej: bufor do PCR (10 mM Tris-HCl pH 9.0, 50 mM KCl, 0,1% Triton X-100, 0,01% żelatyna), 2.0 mM MgCl₂, 200 µM każdego z nukleotydów, 15 pmol starterów, 1.5 U Ampli Taq Gold DNA polimerazy (f-my Perkin Elmer) oraz 10 µl izolowanego DNA. Reakcja PCR składała się ze wstępnej inkubacji w temperaturze 94°C/9 min., 40 cykli obejmujących denaturację w temperaturze 94°C/30 sek., przyłączenie starterów 52°C/45 sek., wydłużanie łańcucha 72°C/45 sek. oraz końcową elongację w temperaturze 72°C/5 min. Do każdej reakcji dołączano kontrolę ujemną (H₂O) i dodatnią (komórki linii HeLa z insertem HPV 18). Produkty reakcji PCR wykrywano elektroforetycznie po rozdziale w 3% agarozie.

Wszystkie produkty reakcji PCR genotypowano, stosując metodę hybrydyzacji INNO-LiPA (Innogenetics), która umożliwia wykrycie 25 poszczególnych typów HPV:

- typy wysokiego ryzyka – HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 70
- typy niskiego ryzyka – HPV 6, 11, 34, 40, 42, 43, 44, 53, 54, 74.

Produkt reakcji hybrydyzacji uwidaczniano w reakcji enzymatycznej stosując, jako koniugat streptawidynę, znakowaną alkaliczną fosfatazą.

Wyniki i ich omówienie

Charakterystykę kliniczną chorych oraz wyniki badań histopatologicznych i wirusologicznych ujęto w Tabeli I. DNA HPV stwierdzono we wszystkich badanych próbkach, zarówno w materiałach ze zmiany pierwotnej, jak i w usuniętych węzłach chłonnych. Genotypowanie wykazało obecność typów HPV o wysokim potencjale onkogennym; we wszystkich materiałach występował HPV 16. W każdym przypadku w zmianie pierwotnej zakażenie miało charakter infekcji mieszanej. Tylko u jednej pacjentki, z rozpoznaniem histopatologicznie rakiem płaskonaślónkowym i gruczołowym, wykryto HPV 18. Podobnie wykazały badania innych autorów, że DNA HPV 18 częściej występuje w komórkach gruczolakoraka niż raka płaskonaślónkowego s.m. [5, 6].

Wyniki dotyczące występowania HPV w przerzutach do węzłów chłonnych potwierdziły obecność tylko typów HPV 16 i/lub HPV 52. Nie wykryto pozostałych typów wirusa identyfikowanych w zmianie pierwotnej. Zbyt mała grupa badana nie pozwala jeszcze na realną ocenę znaczenia selektywnego rozsiewu określonych typów wirusa, ale wydaje się, że jest to zjawisko ciekawe i może mieć znaczenie w lepszym poznaniu patomechanizmu przerzutowania do okolicznych węzłów chłonnych.

Rokowanie we wczesnych stadiach raka s.m. po radykalnej histerektomii zależy m.in. od wielkości guza,

Tab. I. Charakterystyka kliniczna pacjentek i wyniki genotypowania HPV

Pacjentka	Wiek	Guzy (mm)	Stopień wg FIGO	Rozpoznanie hist-pat.*	Typy HPV	
					szyjka macicy	węzły chłonne
TP	48	75x40	IB	1	16, 52	16
JN	41	35x30	IB	1	16, 68	16
MM	51	35x30	IB	1	16, 51, 52, 66	16, 52
KO	36	40x40	IB	3	16, 18, 51, 52	16, 52
DB	32	15x10	IB	2	16, 51, 52	16

* Wyniki badań histopatologicznych:

1 – rak płaskonabłonkowy nierogowaczący

2 – rak płaskonabłonkowy rogowaczący

3 – rak płaskonabłonkowy i gruczolowy (o mieszanej komponentce)

głębokości inwazji, inwazji do naczyń i węzłów limfatycznych oraz histologicznego typu guza. Przerzuty do węzłów chłonnych grają jednak wiodącą rolę w nawrotach choroby nowotworowej. Precyzyjna ocena histopatologiczna wyciętych węzłów chłonnych jest ważna w przewidywaniu wyniku leczenia. Obecność DNA HPV niemal we wszystkich rakach s.m. sugeruje możliwość użycia tego parametru jako markera wczesnych przerzutów do węzłów chłonnych. Niektórzy autorzy wykazali powiązanie pomiędzy obecnością DNA HPV w węzłach chłonnych, w których nie wykryto wcześniej histopatologicznych dowodów przerzutowania, a późniejszymi nawrotami choroby nowotworowej [7-9]. Natomiast Chan i wsp. [10] nie wykazali u żadnej z obserwowanych przez nich 7 pacjentek nawrotu choroby, pomimo obecności onkogenych typów HPV w ich węzłach chłonnych, z równoczesnym negatywnym badaniem histopatologicznym. Obecność DNA HPV w węzłach chłonnych może być związana albo z przerzutami komórek nowotworowych z HPV pozytywnej zmiany pierwotnej, albo z pojawieniem się w krążeniu komórek niosących sfagocytowane cząstki wirusa. Obecność wirusa w węzłach chłonnych „wolnych” od nowotworu może być tłumaczona mikroprzerzutowaniem nie wykrywanym badaniem histopatologicznym, jak również występowaniem cząstek wirusowych w układzie limfatycznym. Łukaszczyk i wsp. [9] w swojej pracy formułuje nawet wniosek, że ocena DNA HPV może być bardziej czułą metodą wykrywania zagrożenia przerzutem do węzłów chłonnych, niż klasyczne badanie histopatologiczne.

Wstępne wyniki naszych badań sugerują, że istnieje wybiórcza transmisja określonych typów HPV do zmian przerzutowych. Mechanizm tego zjawiska nie jest jeszcze poznany i wymaga dalszych badań metodami *in situ*. Z uwagi na nieliczną grupę analizowanych chorych praca ma charakter wstępny.

Dr Sława Szostek

Zakład Wirusologii Katedra Mikrobiologii

Collegium Medicum UJ

ul. Czysła 18, 31-121 Kraków

e-mail: sszostek@cm-uj.krakow.pl

Piśmiennictwo

- Lorincz AT, Reid R, Jenson AB i wsp. Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of fifteen common anogenital types. *Obstet Gynecol* 1992; 79: 328-31.
- Bosch FX, Lorincz A, Munoz M i wsp. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2002; 55: 244-65.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
- Kleter B, van Doorn LJ, ter Schegget J i wsp. Novel short fragment PCR assay for highly sensitive broad spectrum detection of anogenital human papillomaviruses. *Am J Pathol* 1998; 153: 1731-9.
- Hording U, Teglbaerg CS, Visfeldt J i wsp. Human papillomavirus types 16 and 18 in adenocarcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 1992; 46: 313-6.
- Chen TM, Chen CA, Wu CC i wsp. The genotypes and prognostic significance of human papillomaviruses in cervical cancer. *Int J Cancer* 1994; 57: 181-4.
- Kobayashi Y, Yoshinouchi M, Tiangi G i wsp. Presence of human papilloma virus DNA in pelvic lymph nodes can predict unexpected recurrence of cervical cancer in patients with histologically negative lymph nodes. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 979-83.
- Pilch H, Günzel S, Schäffer U i wsp. Human papillomavirus (HPV) DNA in primary cervical cancer and in cancer free pelvic lymph nodes – correlation with clinico-pathological parameters and prognostic significance. *Zentralbl Gynakol* 2001; 123: 91-101.
- Łukaszczyk K, Liss J, Woźniak I i wsp. HPV and histological status of pelvic lymph node metastases in cervical cancer: a prospective study. *J Clin Pathol* 2004; 57: 472-6.
- Chan PKS, Yu MMY, Cheung TH i wsp. Detection and quantitation of human papillomavirus DNA in primary tumor and lymph nodes of patients with early stage cervical carcinoma. *J Clin Virol* 2005; 33: 201-20.

Otrzymano: 6 listopada 2006 r.

Przyjęto do druku: 2 stycznia 2007 r.