

P R A C E K A Z U I S T Y C Z N E
ginekologia

Rak przedinwazyjny sromu i szyjki macicy u 32-letniej kobiety DNA HPV 16 pozytywnej z mutacją mtDNA – opis przypadku

Preinvasive vulvar and cervical cancer in a 32-year-old woman, DNA HPV 16 positive with mtDNA mutation – case study

Kędzia Witold^{1,2}, Malkowska-Walczak Blanka^{1,2}, Józefiak Agata², Wadowicka Alicja³, Guglas Bogna⁴, Pruski Dominik^{1,2}, Kędzia Helena⁵, Spaczyński Marek¹

¹ Klinika Onkologii Ginekologicznej UM im Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

² Pracownia Patofizjologii Szyjki Macicy GPSK w Poznaniu

³ Zakład Wirusologii Molekularnej UAM w Poznaniu

⁴ Uniwersytet Medyczny im Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

⁵ Pracownia Patomorfologii GPSK w Poznaniu

Streszczenie

Jednoczesowe współistnienie przedinwazyjnego raka sromu i szyjki macicy u młodych kobiet jest zjawiskiem rzadko występującym. Zmiany typu VIN 3/ rak przedinwazyjny oraz CIN 3/ rak przedinwazyjny są ściśle związane z podłożem wirusowym i mają charakter wieloogniskowy.

W przedstawionym przypadku wykonano test HPV DNA na obecność 13 typów onkogennych HPV, test m RNA HPV na obecność transkryptów HPV 16, 18, 31, 33, 45 oraz poddano analizie region pętli D mitochondrialnego DNA.

U badanej pacjentki wykazano zakażenie HPV 16 oraz stwierdzono obecność transkryptów genów E6/E7 HPV 16. Analiza regionu pętli D mt DNA wykazała zmiany nukleotydydowe: T>C 16.192, T>C 16.223, T>C 16.292, C>T 16.325, C>T 16.519.

Słowa kluczowe: **rak przedinwazyjny sromu / rak przedinwazyjny szyjki macicy / HPV 16 / mitochondrialny DNA /**

Summary

Coincidence of preinvasive vulvar and cervical cancer in young women is very rare. Lesions like VIN 3 / preinvasive vulvar cancer and CIN 3 / preinvasive cervical cancer are strictly connected with viral infection and are multilocular.

In the presented case the following tests have been performed: HPV DNA test for the presence of 13 oncogenic HPV types, mRNA HPV test for the presence of transcripts for HPV 16, 18, 31, 33, 45 and the analysis of mtDNA D-Loop region.

In the examined patient HPV 16 infection, as well as the presence of transcripts for HPV 16 E6/E7 were diagnosed. The analysis of mtDNA D-Loop region showed nucleotide lesions like: T>C 16.192, T>C 16.223, T>C 16.292, C>T 16.325, C>T 16.519.

Key words: **preinvasive vulvar cancer / preinvasive cervical cancer / HPV 16 / mtDNA /**

Adres do korespondencji:

Witold Kędzia
Klinika Onkologii Ginekologicznej,
Katedry Ginekologii, Położnictwa i Onkologii Ginekologicznej UM w Poznaniu
60-535 Poznań, ul. Polna 33
tel. 061 84-19-330, fax 061 84-19-465
e-mail: onko@gpsk.am.poznan.pl

Otrzymano: 01.06.2008

Zaakceptowano do druku: 20.04.2009

Wstęp

Przetrwałe zakażenie onkogennym typem wirusa brodawczaka ludzkiego HPV (*human papilloma virus*) jest głównym czynnikiem ryzyka rozwoju raka szyjki macicy. Spośród 13 typów HPV obdarzonych właściwościami onkogennymi, HPV 16 i HPV 18 cechuje szczególnie duży potencjał karcinogeny. Wyraża się to w znacząco częściej, w porównaniu do innych typów, odsetku rozwoju przetrwałego zakażenia, które jest podstawowym czynnikiem ryzyka powstania nowotworu i zależy od typu wirusa. Średnia czasu trwania zakażenia dla HPV 16 wynosi 18,3 miesiąca i znacznie przekracza średnie czasy trwania zakażenia dla innych onkogennych typów wirusa np. HPV 31 – 14,6 miesiąca, HPV 53 – 14,9 miesiąca, HPV 6, 11 i inne nisko onkogenne – 13,4 miesiąca [1].

Czas trwania procesu karcinogenezy liczony od zakażenia do rozwoju nowotworu szacuje się na około 15 lat. Ryzyko progresji zmian wywołanych zakażeniem HPV 16 dotyczy 20% zakażonych kobiet w porównaniu do 5% zakażonych innymi typami HPV wysokiego ryzyka. Średnia czasu rozwoju CIN 3 u kobiet HPV 16 pozytywnych wynosi 10 lat i jest znacząco krótsza od czasu nowotworzenia związanego z infekcją wywołaną innymi typami HPV [2].

Według IARC (*International Agency for Research on Cancer*) oprócz typu wirusa za progresję zmian odpowiadają: co najmniej 10-letnia hormonalna antykoncepcja, wielorództwo (RR dla raka inwazyjnego szyjki macicy wzrasta o 10% wraz z każdą donoszoną ciążą), nałogowe palenie tytoniu oraz zakażenia współistniejące: *Herpes simplex* wirus-2, *Chlamydia Trachomatis*, HIV.

Opis przypadku

Źródłem materiału badawczego była pacjentka lat 32, która zgłosiła się do Pracowni Patofizjologii Szyjki Macicy GPSK Poznaniu w maju 2008 roku z powodu nieprawidłowego wyniku wymazu cytologicznego HSIL.

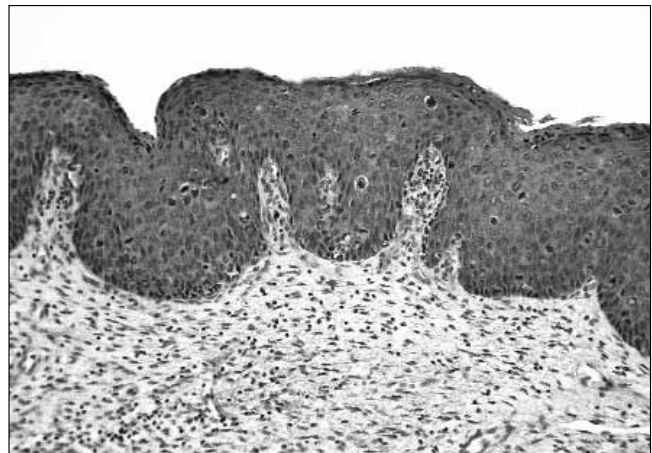
Kobieta była nieródką, w przeszłości nie stosowała antykoncepcji hormonalnej, paliła około 4-5 papierosów dziennie, od kilku lat, w wywiadzie podała czterech partnerów płciowych. W wywiadzie rodzinnym podaje, że matka chorowała we wczesnym wieku, około 40 roku życia na raka sutka, zmarła z powodu udaru mózgu. Pacjentka, poprzednie badanie cytologiczne miała wykonane przed trzema laty i było ono prawidłowe. Test na obecność HIV był ujemny.

W badaniu podmiotowym stwierdzono obecność licznych zmian egzofitycznych, ciemno przebarwionych, wieloogniskowych i rozproszonych w okolicy anogenitalnej, ze szczególnym nasileniem w obszarze okołoodbytniczym i spoidła tylnego warg sromowych. W satysfakcjonującym badaniu kolposkopowym stwierdzono rozległy obszar zbielenia po aplikacji 3% kwasu octowego, zlokalizowany głównie na wardze górnej szyjki macicy, od godziny 10.00 do 14.00, dochodzący prawie do sklepienia przedniego. Oprócz zbielenia zaobserwowano wypukłą mozaikę, a całość obszaru zmienionego była jodonegatywna. Pacjentka relacjonowała, że zmiany w obrębie skóry i błony śluzowej przedsionka pochwy wystąpiły 3-4 miesiące temu i dosyć gwałtownie narastały bez żadnych dolegliwości bólowych, czy dyskomfortu.

(Fot. 1a, 1b). (Fot. 2a, 2b).



Fot. 1a. Wieloogniskowe, barwnikowe, egzofityczne zmiany zlokalizowane w obrębie warg sromowych większych i mniejszych oraz odbytu i krocza.



Fot. 1b. Rozpoznanie patomorfologiczne VIN 3, carcinoma praeinvasivum vulvae.

Z powierzchni szyjki macicy i kanału pobrano wymaz za pomocą szczoteczki na podłoże płynne w celu wykonania testu molekularnego na obecność DNA HPV 13 typów onkogennych. Następnie wykonano biopsję miejsc najbardziej podejrzanych w obrębie egzocervix i biopsję sromu pod kontrolą kolposkopu. Z kanału szyjki macicy pobrano wyskrobiny. Do badań molekularnych zabezpieczono 10ml krwi z żyły odłokciowej.

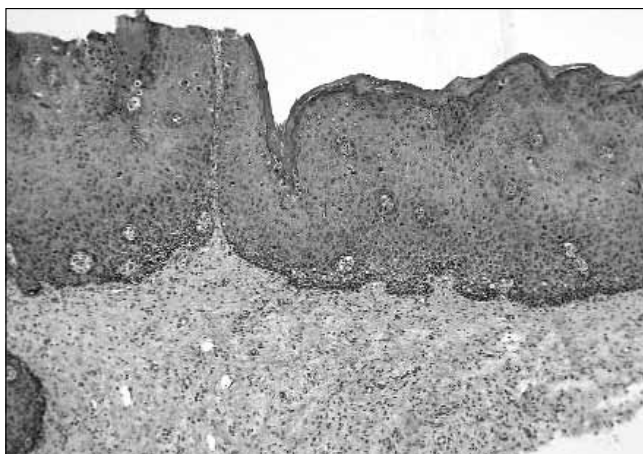
Jako kontrolę testów molekularnych na obecność mitochondrialnego DNA wykorzystano krew oraz skrawki tkankowe pobierane od pacjentek operowanych równocześnie z powodu mięśniaków macicy z prawidłowym wynikiem wymazu cytologicznego, DNA HPV HR negatywnych.

U pacjentki przeprowadzono badanie DNA HPV na obecność któregośkolwiek z 13 typów onkogennych HPV, oraz m RNA HPV na obecność transkryptów HPV 16, 18, 31, 33, 45.

Rak przedinwazyjny sromu i szyjki macicy...



Fot. 2a. Zbielenie po aplikacji 3% roztworu kwasu octowego obszaru położonego na wardze górnej szyjki macicy, widoczna wypukła mozaika.



Fot. 2b. Rozpoznanie patomorfologiczne biopsji okolicy strefy przekształceń CIN 3, *carcinoma intraepitheliale colli uteri*.

Ponadto analizie poddano region pętli D mitochondrialnego, DNA (mt DNA). DNA ekstrahowano z krwi obwodowej oraz skrawków tkankowych i oczyszczano za pomocą zestawów odczynnikowych. Reakcję PCR przeprowadzono z wykorzystaniem starterów komplementarnych do pętli D mt DNA. Produkty PCR poddawano automatycznemu sekwencjonowaniu. Uzyskane sekwencje nukleotydowe poddawano analizie z użyciem programów Chromas Pro oraz DNASTar i porównywano do Banku Genów.

Wynik badania patomorfologicznego pierwszej biopsji szyjki macicy i sromu identyfikował obecność CIN 2 i CIN 3 jak również strzępków nabłonka dysplastycznego w materiale pochodzącym ze skrobienia kanału szyjki macicy. Przeprowadzony test molekularny na obecność któregośkolwiek z onkogennych typów DNA HPV HR był pozytywny. Genotypowanie wykazało zakażenia HPV 16.

U badanej pacjentki w wymazach z szyjki macicy stwierdzono obecność transkryptów genów E6/E7 HPV 16. Analiza regionu pętli D mt DNA wykazała następujące zmiany nukleotydowe: T>C 16.192, T>C 16.223, T>C 16.292, C>T 16.325, C>T 16.519. Wszystkie zidentyfikowane zmiany występowały w krwi oraz wymazach z szyjki macicy. Zmiana nukleotydowa w pozycji 16.519 występowała także w próbach kontrolnych. Biopsja sromu wykazała obecność VIN 3.

Po przeprowadzeniu rozmowy z pacjentką i wyjaśnieniu charakteru choroby ustalono plan wieloetapowego leczenia oszczędzającego, na który chora wyraziła świadomą zgodę. W lipcu 2008r. wykonano konizację chirurgiczną szyjki macicy oraz przy zastosowaniu roztworu błękitu toluidyny wykonano biopsję miejsc podejrzanych na sromie. Wynik badania patomorfologicznego usuniętych tkanek identyfikował raka przedinwazyjnego szyjki macicy, usuniętego w granicach tkanek zdrowych i raka przedinwazyjnego sromu. Zmiana na szyjce macicy została określona jako wieloogniskowa z różnym zaawansowaniem procesu neogenezy. Wobec młodego wieku pacjentki podjęto decyzję o dwuetapowym, częściowym wycięciu sromu. Zabieg wykonano we wrześniu 2008r. Wynik histopatologiczny potwierdził rozpoznanie pierwotne. Po wygojeniu rany pooperacyjnej w listopadzie 2008r, pod kontrolą kolposkopu ponownie pobrano 7 wycinków z miejsc podejrzanych na sromie.

Badanie patomorfologiczne pobranego materiału opisywało; 2 fragmenty sromu bez zmian nabłonkowych, 2 ogniska raka wewnątrz nabłonkowego oraz 3 fragmenty z śródnabłonkową neoplazją sromu średniego stopnia VIN 2. W grudniu 2008r. przeprowadzono drugi etap częściowego usunięcia sromu. Ostateczny wynik badania histopatologicznego – VIN 1/VIN 2.

Obecnie pacjentka pozostaje pod stałą kontrolą PPSM. Nie stwierdza się zmian w obrazie kolposkopowym w obrębie skóry krocza, błony śluzowej przedsionka pochwy jak również szyjki macicy. Zarówno kontrolne badanie kolposkopowe jak i pobierane sekwencyjnie wymazy cytologiczne nie identyfikują zmian kojarzonych z przybyłym rakiem przedinwazyjnym czy infekcją wirusową. Pomimo tego test na obecność transkryptów, czyli badanie mRNA HPV HR, przeprowadzony na przełomie 10/11.2008 wykazał obecność E6/E7 HPV 16. (Fot. 3a, 3b).

Dyskusja

Autorzy popularnej monografii z zakresu onkologii ginekologicznej Di Saia i Creasman opisali w 1999 roku zjawisko stopniowego obniżania się wieku występowania CIN 3, w oparciu o własny materiał badawczy, z 40 lat na około 28 lat [3]. Zarazem w rozdziale poświęconym neoplazji sromu, ci sami autorzy stwierdzili, że około 15% nowotworów sromu pojawia się u kobiet poniżej 40 roku życia, czemu towarzyszy rozlana wewnątrz nabłonkowa neoplazja skóry sromu. Natomiast łączne występowanie obu patologii, na etapie raków przedinwazyjnych, u kobiet około 30 roku życia jest zjawiskiem możliwym aczkolwiek rzadko obserwowanym. Częstość występowania VIN 3 ocenia się na 0,0-3,5/100 000 kobiet. Od 72-100% zmian typu VIN 3 jest HPV dodatnich. Wśród HPV dodatnich przypadków VIN 3, HPV 16 występuje u 65-93% chorych kobiet [4].

Kędzia W, et al.



Fot. 3a. Stan w trakcie gojenia po drugiej operacji usunięcia przedinwazyjnego raka sromu.



Fot. 3b. Stan obecny, pomimo braku zmian klinicznych test na obecność transkryptów mRNA HPV 16 jest pozytywny, wysokie ryzyko nawrotu śródnabłonkowej neoplazji szyjki i sromu.

Zmiany typu VIN 3 /rak przeinwazyjny rozpoznawane u kobiet młodych, około 30 roku życia mają charakter wielogniskowy i są ściśle związane z podłożem wirusowym. Zdecydowanie inny charakter dominuje w VIN 3 u kobiet powyżej 50 roku życia, gdzie obserwowane zmiany są jednoogniskowe, DNA HPV ujemne. Od dawna wiadomo, że zmiany przedinwazyjne na sromie i w obrębie szyjki macicy u młodych, około 30-letnich kobiet wywołuje najczęściej, najbardziej onkogeny typ wirusa tj. HPV 16 [5]. Zmiany te cechowało stosunkowo niskie ryzyko dynamicznej progresji do raka inwazyjnego szacowane na około 8% ale zauważono znaczny potencjał do nawrotowości VIN szacowany nawet na 25%, co jest charakterystyczne dla patologii skóry i nabłonka wywołanej infekcją HPV [6, 7, 8, 9].

Charakterystyczne jest to, że publikacje opisujące przedinwazyjne procesy ograniczone tylko do sromu u kobiet około 30 roku życia bazują na materiale nie przekraczającym pięciu analizowanych przypadków, co potwierdza rzadkość tego typu patologii sromu u młodych kobiet [6].

W opisywanej sytuacji klinicznej, czynnikiem decydującym o nieczęsto spotykanej progresji zmian u młodej kobiety było niewątpliwie zakażenie najbardziej onkogenym typem wirusa HPV 16. Należy pamiętać, że wirus ten jest podstawowym czynnikiem etiologicznym prowadzącym do rozwoju procesu karcinogenezy w obrębie nabłonka wielowarstwowego płaskiego. Według aktualnych danych infekcja HPV 16 odpowiada za powstanie 545 raków płaskonabłonkowych. Dla porównania HPV 18 bierze udział w rozwoju „tylko” 17% raków szyjki macicy. Szacuje się, że przetrwałe zakażenie HPV 16 rokuje najgorzej ze wszystkich typów HPV i łączy się z 5-krotnym wzrostem ryzyka rozwoju zmian śródnabłonkowych wysokiego stopnia w porównaniu do innych onkogennych typów HPV.

Aczkolwiek wiele przesłanek świadczy o tym, że same zakażenie HPV 16 nie jest wystarczającym wytłumaczeniem dla dynamicznej progresji zmian zarówno szyjki jak i sromu u młodych kobiet około 30 roku życia. Jedną z teorii starającą się wyjaśnić ten nietypowy potencjał onkogeny niektórych wirusów typu 16 mówi o mutacjach w wirusowym DNA lub DNA gospodarza warunkujących szybszą progresję zmian przednowotworowych. Larson opisał mutacje genów supresorowych w komórkach zakażonych HPV, sprzyjające progresji CIN. Chodzi tu o zaburzoną strukturę supresorów w loci 3p, 11q, 4q i 4p. Szczególnie zmiany w obszarze 3p korelują w ponad 80% z powstaniem CIN 3 u kobiet zakażonych HPV. Mutacje genów wirusowych kodujących onkoproteiny E6 i E7 mają wpływ na dynamikę progresji [10].

Podobne konsekwencje mają mutacje miejsc wiążących białka, które są odpowiedzialne za represję transkrypcji wirusowych genów YY1 i PSM [11].

Interesującą koncepcją tłumaczącą podatność młodych kobiet na zakażenia onkogennymi typami HPV oraz sporadycznie obserwowaną dynamiczną progresję CIN i VIN jest teoria związana z mitochondrialnym DNA (mtDNA). MtDNA zlokalizowane jest w liczbie 4-10 kolistych cząsteczek w mitochondrium. Każda cząsteczka zbudowana z 16 569 par zasad koduje 37 genów. Kod genetyczny mtDNA różni się od kodu jądrowego. Mitochondria jednej komórki mogą mieć odmienne mtDNA, które może się różnić nawet w obrębie

jednego mitochondrium. Dziedziczenie mtDNA u człowieka zachodzi prawie wyłącznie po linii żeńskiej. Mutacje mtDNA objawiają się chorobami przekazywanymi dziedzicznie po linii matczynej, które dotyczą głównie tkanki mięśniowej i nerwowej. Przykładem dziedzicznej choroby mitochondrialnej jest zespół Leigha czyli encefalopathia mitochondrialna z kwasicą mleczanową, charakteryzujący się epizodami podobnymi do udaru mózgu. Częstość występowania chorób mitochondrialnych określa się jak 1:15 000.

Ostatnie lata skierowały zainteresowanie biologii molekularnej na mutacja mtDNA u kobiet z rakiem szyjki macicy. Szczególnie interesujące są przypadki nowotworów występujące u młodych kobiet z niecodzienną dynamiką progresji nietypową dla tego nowotworu. Chen i wsp. przebadali 24 raki szyjki macicy pod kątem obecności mutacji w mtDNA. Analizując pętlę D mt DNA opisali 30 mutacji tego regionu, u 9 z 24 badanych raków. Częstość występowania tych mutacji była zadziwiająco wysoka, wyniosła 37,5% [12].

Sharma opisał 95% częstość występowania mutacji mitochondrialnego DNA u kobiet z rakiem szyjki macicy. Według tego autora mutacje mtDNA dotyczą również prawidłowych komórek aczkolwiek występują tam znacząco rzadziej. Sharma stwierdził istnienie bardzo prawdopodobnej zależności pomiędzy mutacjami mtDNA i zakażeniem wysoko onkogennymi typami HPV [13].

W konkluzji należy stwierdzić, że mutacje identyfikowane w regionie pętli D mt DNA u badanej pacjentki w DNA ekstrahowanym z wymazów oraz krwi obwodowej mogą być dziedziczne i świadczyć o genetycznych predyspozycjach do rozwoju infekcji HPV i procesu nowotworowego.

Implikacją kliniczną opisanego przypadku jest zalecenie kontroli cytologicznej wszystkich kobiet leczonych z powodu kłykcin kończystych sromu, pochwy, odbytu lub VIN.

Piśmiennictwo

- Richardson H, Kelsall G, Tellier P, [et al.]. The natural history of type-specific human papillomavirus infections in female university students. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2003, 12, 485-490.
- Bosch F, de Sanjose S, Castellsague X, [et al.]. HPV and genital cancer: the essential epidemiology. Vaccines for the prevention of cervical cancer. Ed. Stern P, Kitchener H. Oxford Oncology Library: Oxford University Press, 2008.
- DiSaia P, Creasman W. Ginekologia Onkologiczna. Wydanie I. Lublin: Czelej, 1999.
- Guliano A, Tortolero-Luna G, Ferrer E, [et al.]. Epidemiology of human papillomavirus infection in men, cancers other than cervical and benign conditions. *Vaccine.* 2008, 26, Suppl 10, 17-28.
- Bergeron C, Naghashfor Z, Canaan C, [et al.]. Human papilloma virus type 16 in intraepithelial neoplasia (Bowenoid papulosis) coexistent invasive carcinoma of the vulva. *Int J Gynecol Pathol.* 1987, 6, 1-11.
- Buscema J, Woodruff J. Progressive histobiologic alterations in the development of vulvar cancer. Report of five cases. *Am J Obstet Gynecol.* 1980, 138, 146-150.
- Woodruff J, Parmley T, Julian C. Topical 5-fluorouracil in the treatment of vaginal carcinoma-in-situ. *Gynecol Oncol.* 1975, 3, 124-132.
- Andreasson B, Bock J. Intraepithelial neoplasia in the vulvar region. *Gynecol Oncol.* 1985, 21, 300-305.
- Anderson M, Brown C, Buckley C, [et al.]. Current views on cervical intraepithelial neoplasia. *J Clin Pathol.* 1991, 44, 969-978.
- Larson A, Lio S-Y, Stanbridge E, [et al.]. Genetic alterations accumulate during cervical tumorigenesis and indicate a common origin for multifocal lesions. *Cancer Res.* 1997, 57, 4171-4176.
- Schmidt M, Kedzia W, Goździcka-Józefiak A. Intratype HPV 16 sequence variation within LCR of isolates from asymptomatic carriers and cervical cancers. *J Clin Virol.* 2001, 23, 65-77.
- Chen D, Zhan H. Study on the mutations in the D-loop region of mitochondrial DNA in cervical carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2009, 135, 291-295.
- Sharma H, Singh A, Sharma C, [et al.]. Mutations in the mitochondrial DNA D-loop region are frequent in cervical cancer. *Cancer Cell Intern.* 2005, 5, 34, 1.

Polish Gynaecology

Ginekologia Polska

Warunki prenumeraty

Uprzejmie informujemy, iż członkowie Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego będą otrzymywali Ginekologię Polską po wcześniejszym opłaceniu składki członkowskiej w odpowiednim Oddziale PTG.

Wysyłka Ginekologii Polskiej do członków PTG jest dokonywana na podstawie list dostarczonych z poszczególnych oddziałów PTG do Redakcji „Ginekologii Polskiej”.

Uprzejmie prosimy wszystkich zainteresowanych o zaktualizowanie danych adresowych w swoich Oddziałach PTG.

Koszt rocznej prenumeraty (krajowa i zagraniczna) dla osób nie będących członkami PTG i instytucji na 2008 rok wynosi 180,00 PLN.

Zamówienie wraz z kserokopią dowodu wpłaty prosimy przysyłać na adres:

Redakcja „Ginekologii Polskiej”

Małgorzata Skowrońska

60-535 Poznań, ul. Polna 33

tel. 061 84-19-265; fax.: 061 84-19-465

e-mail: redakcjagp@gpsk.am.poznan.pl; ginpol@onet.eu

www.ginekolpol.com

Wpłaty należy dokonywać na konto:

ING Bank Śląski – nr konta: **14 1050 1953 1000 0023 1354 3718**

Instrukcja dla autorów w języku polskim i angielskim znajduje się na stronie: www.ginekolpol.com

Redakcja