

A HPV és egyes molekuláris markerek jelentősége fiatal, szájüregi daganatos betegeknél

Doktori tézisek

Dr. Csurgay Katalin

Semmelweis Egyetem
Rácz Károly Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Németh Zsolt, Ph.D., egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Kiss András PhD., DSc.,
med. habil., egyetemi tanár
Dr. Dr. Piffkó József PhD., DSc.,
med. habil., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság elnöke:
Dr. Nagy Péter PhD., DSc., med. habil., egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai:
Dr. Gyulai-Gaál Szabolcs PhD., egyetemi docens
Dr. Sultész Mónika PhD., főorvos

Budapest
2022

1. Bevezetés

A szájüregi daganatok előfordulása világszerte csökkenő tendenciát mutat, ezzel szemben a fiatalkorban diagnosztizált szájüregi laphámdaganatok incidenciája még mindig nem elhanyagolható. A fiatalkorban megjelenő malignus daganatok problémája éppen ezért kiemelt fontosságú, és széleskörben kutatott terület.

Szájüregi rákok tekintetében Magyarország, mind férfiak, mind nők esetében az európai statisztikák élén áll.

Egyre több, 50 évesnél fiatalabb szájüregi daganatos beteg jelentkezik, kerül kezelésre, akiknél a két meghatározó etiológiai faktor, a dohányzás és az alkoholfogyasztás nem játszik meghatározó szerepet. A fiatal életkor és a "klasszikus" etiológiai faktorok hiánya miatt felmerül, hogy más tényezők is szerepet játszanak a szájüregi daganatok patogenezisében.

A fej-nyaki (elsősorban nyelv, mesopharynx) rákoknál felmerül a HPV-eredet, mint etiológiai faktor.

A humán papillómavírus mellett -mely véleményünk szerint nem kizárólagos felelőse a megemelkedett esetszámoknak- a különböző génextpressziós eltérések is

hangsúlyosak a fiatalkori szájüregi daganatok etiológiájában.

2. Célkitűzések

A fiatalkori szájüregi laphámrákrok valamint a HPV asszociált tumorok előfordulási aránya nem elhanyagolható. Szakirodalmi adat, hogy a fiatal betegcsoportnál diagnosztizált szájüregi laphámrákrokra az agresszívabb terjedés és korai recidíva jellemző, tehát az életkor prognosztikai jelentőséggel bír. Feltételezzük, hogy a fiatalkori szájüregi daganatok etiológiai hátterében a dohányzás és alkoholfogyasztás helyett a génexpressziós profil változások, és/vagy HPV vírus kóroki szerepe állnak. Kutatásunkban arra vállalkoztunk, hogy saját beteganyagunkon elemezzük a fiatal daganatos beteg etiológiai, prognosztikai faktorait, a fiatal betegcsoporton belül meghatározzuk a rizikópácienseket, vizsgáljuk a prognózist. A HPV-asszociált tumorokról tudjuk, hogy jobb prognózisúak, mint a HPV-negatívak. Amennyiben azt feltételezzük, hogy a fiatalkori daganatok hátterében a vírusionkogenezis áll, jobb túlélési mutatókat kell

találunk saját beteganyagunkon is. Vita tárgyát képezi, hogy önmagában a HPV terjedése magyarázza-e a fiatalkori daganatok számának növekedését. Számos vizsgálat szerint, az egyén genetikai kódjának sérülékenysége is meghatározó szerepet játszik a tumorprogresszióban. A fokozott EGFR, Ki67 expresszió, és a p53 mutáció rossz prognózist von maga után, mindezek ismerete segít meghatározni a rizikóbetegeket. A rizikópáciensek kiszűrésével lehetőségünk lesz a terápia és az utánkövetés méginkább személyre szabottabb kialakítására.

- A teljes beteganyag karakterisztikájának vizsgálata
- Az 50 évesnél fiatalabb (vizsgálati) és az 50 évesnél idősebb (kontroll) betegek klinikopatológiai paramétereinek összehasonlítása
- Az 50 évesnél fiatalabb (vizsgálati) betegek génexpressziós profiljának (EGFR, Ki67, p16, p53) összehasonlítása az 50 évesnél idősebb (kontroll) betegek génexpressziós profiljával (EGFR, Ki67, p16, p53)
- Az 50 évesnél fiatalabb betegek HPV-DNS

státuszának összehasonlítása az 50 évesnél idősebb betegek HPV-DNS státuszával, PCR módszerrel

- A progresszió, és a túlélés vizsgálata
- Prognosztikus értékű klinikopatológiai paraméterek meghatározása
- A progressziómentes és teljes túlélés vizsgálata subgroup elemzések alapján

3. Módszerek

A Semmelweis Egyetem, Fogorvostudományi Kar, Arc-Állcsont-Szájsebészeti és Fogászati Klinika beteganyagát vizsgáltuk a 2013 és 2018 közötti időszakban, szigorú beválogatási kritériumok szerint. A vizsgálatot részben retrospektív, részben prospektív módon végeztük.

Beválogatásra került minden olyan, 10-90 év közötti beteg, akinél próbaexcízió során laphámrák igazolódott. Lokalizációt tekintve csak nyelv, szájfenék, bucca, reszekábilis, T₁₋₄, N_{0-2a2b2c}, M₀ stádiumú laphám-daganatos betegeket vettünk be a vizsgálatba.

A vizsgálati és kontroll betegcsoportokat életkor szerint alakítottuk ki. Az 50 éves kor alatti (fiatal) daganatos betegek alkotják a vizsgálati, az 50 éves kor feletti pedig a kontroll betegcsoportot. 101 fő került elsődlegesen beválogatásra 68 férfi, és 33 nő, ebből 6 beteg 30 éves vagy annál fiatalabb volt. A vizsgálatok során 2 fő esetében az immunhisztokémiai eredmény bizonytalansága miatt, 11 fő esetében egyéb okból történt kizárás, így végül 50 fő került a kontroll és 38 fő a vizsgálati betegcsoportba. A férfi/nő megoszlás 61/27 volt. Az átlagéletkor 53 év, a legfiatalabb beteg 22, a legidősebb 85 éves volt.

A rutin klinikopatológiai paraméterek mellett immunhisztokémiai módszerrel (szöveti multiblokk-TMA) vizsgáltuk a két betegcsoport p53, p16, Ki67, EGFR génexpressziós profilját. A módszer segítségével, standard reakciókörülmények között (inkubációs idő, hőmérséklet, antigén feltárás, reagens-koncentráció) tudtunk egyidejűleg, több száz mintát vizsgálni, ez a kapott eredmények sokkal nagyobb pontosságát eredményezi.

HPV-fertőzés kimutatása és tipizálása FFPE mintákból

Full Spectrum HPV-DNS-PCR módszerrel történt. 100 db FFPE szájúregi daganatos mintából végeztünk HPV kimutatást, és tipizálást.

Az FFPE mintákból a patológiás területről lemetezett minták deparaffinálását követően, DNS preparálás, automatizált paramagnetikus módszerű, szilika bázisú DNS preparálási eljárással történt.

A HPV kimutatása és tipizálása egy microplate formátumban kivitelezhető, HPV-DNS amplifikáción és típus-specifikus próbákkal történő hibridizáción alapuló módszer.

Az eredményeket statisztikai módszerekkel értékeltük ki. A statisztikai elemzésekhez az *IBM SPSS Statistics 27* programot használtuk. A kategoriális változók páronkénti függetlenségvizsgálatára *Fisher-féle egzakt tesztet* használtunk. 2 csoport összehasonlítására, normál eloszlás esetén, *t-próbát*, nem normál eloszlás esetén *Mann-Whitney U* tesztet alkalmaztunk. Keresztábrás elemzéseknél, *Pearson-féle khi négyzet* próbával dolgoztunk. A regresszió-analízist *Cox regresszió*, és binomiális logisztikus regresszió alkalmazásával végeztük el. A lineáris változókat a *Box-Tidwell*

módszerrel értékeltük. A többszörös összehasonlításból eredő hibalehetőségek kiküszöbölésére a *Bonferroni* módszert használtuk.

Kaplan Meier (Log rank teszttel) és Cox regresszióval vizsgáltuk a teljes és a progressziómentes túlélést.

4. Eredmények

Klinikopatológiai paraméterekkel összefüggő eredmények:

A vizsgálatban résztvevő 88 főből a férfiak 44,3%-a, a nőknek pedig 40,7%-a 50 év alatti, 6 beteg pedig fiatalabb volt harmincévesnél, mikor szájüregi daganatot diagnosztizáltak náluk. A mintánk közel fele-fele arányban nyelv és szájfenék daganatokból állt. 48,9%-ban nyelv, 46,6%-ban szájfenéki, 4,5%-ban buccalis elhelyezkedésűek voltak a tumorok. A lokalizációt tekintve, a nyelvdaganatok inkább a nőknél, míg a szájfenéki elhelyezkedésű daganatok férfiaknál gyakoribbak ($p=0,025$, Fisher exact).

A klasszikus etiológiai faktorokat vizsgálva, a férfiak és a nők dohányzási és alkoholfogyasztási szokásai között

szignifikáns különbséget találtunk. A férfiak 83,1%-a, míg a nők 59,3%-a dohányzik (Pearson $\chi^2=5,681$ df=1, p=0,017). Statisztikai elemzésünk szerint jóval több férfi fogyaszt alkoholt, mint nő, vagyis a férfiak 44,1%-a, a nők 15,4%-a alkoholizál (Pearson $\chi^2=6,502$ df=1, p=0,011). Vizsgálataink során, az életkor tekintetében, a vizsgálati és kontroll betegcsoportunk káros szokásai között azonban nem találtunk összefüggést. Úgy tűnik tehát, hogy a fiatal generáció éppen annyira hódol a káros szenvedélyeknek, mint az idősebb.

Az alkoholfogyasztás és a túlélés kapcsolata szignifikáns, akik rendszeresen fogyasztanak alkoholt, rosszabb daganatmentes túléléssel számolhatnak (Kaplan-Meier, Log rank, p=0,027), ugyanez a dohányzó, szájüregi daganatos betegekre nem igazolódott (p=0,515).

Immunhisztokémiai markerekkel összefüggő eredmények:

A p16 tumorszuppresszor gén expresszió nagyobb értékeket mutat az 50 évesnél fiatalabb betegek között (p<0,001, Mann-Whitney).

A Ki67 és EGFR expresszió magasabb értékeket mutat az 50 évesnél idősebb kontrollcsoportban. A különbség szignifikáns a Ki67 esetében, és erősen

szignifikanciaközeli az EGFR esetében (Ki67: $p < 0,001$, EGFR: $p = 0,059$, Mann-Whitney).

Túlélési elemzések eredményei:

A **progressziómentes túlélést** negatívan befolyásolja az EGFR expresszió, ha a H score érték 90 feletti. Multivariációs elemzés azt mutatja, hogy a fiataloknál nagyobb a relapszus kockázata, mint az 50 évesnél idősebeknél, továbbá, ha a p16 expresszió 60% feletti, jobb a progressziómentes túlélés, kisebb a relapszus esélye.

A subgroup elemzés azt mutatja, hogy időseknél rosszabb a progressziómentes túlélés, ha az EGFR expresszió 90 feletti H score ($p = 0,033$), valamint ha a beteg rendszeresen fogyaszt alkoholt ($p = 0,049$).

Fiataloknál, ha a p16 expresszió 60% feletti, szignifikánsan kedvezőbb a prognózis, kisebb a relapszus kockázata ($p = 0,025$).

A **teljes túlélés** rosszabbnak bizonyult az alkoholt rendszeresen fogyasztóknál, N₁, N₂ nyirokcsomó érintettségénél, és a III-IV stádiumú daganatoknál.

A subgroup elemzés során a teljes túlélés szintén kedvezőbb a fiataloknál, ha a p16 expresszió 60% feletti.

5. Következtetések

Vizsgálataink alapján megállapítható, hogy az életkor bizonyos szempontok alapján prognosztikai jelentőséggel bír. Elmondhatjuk, hogy azzal szemben, ahogyan ezt sokan feltételezték, a fiatalkori orális daganatok kialakulásában a klasszikus etiológiai faktorok egyáltalán nem elhanyagolhatóak. A vizsgálati, fiatal betegcsoport káros szokásai sok tekintetben hasonlítanak az idősebb, kontroll betegcsoport jól megszokott dohányzási és alkoholfogyasztási szokásaihoz. Az általunk vizsgált beteganyagban (szigorúan szájüregi lokalizációjú daganatok) a HPV vírus nem játszik szerepet a fiatal korban kialakult szájüregi daganatok etiológiájában. Sokkal nagyobb jelentőséget kell tulajdonítani a génprofil-eltérések vizsgálatának, nemcsak a fiataloknál, de az 50 évesnél idősebbek esetében is. A fiatal orális daganatos betegeknél célszerű vizsgálni a p16 pozitivitást. Az 50 év felettieknél pedig érdemes figyelembe venni az EGFR expressziót, valamint azt, hogy a káros szokások közül, mint dohányzás, alkoholfogyasztás, melyik faktor játszhat szerepet még a prognózis kimenetelében. A p16 pozitívitas jobb

prognózisra utal a fiataloknál, annak ellenére, hogy HPV negatív beteganyagról van szó.

Nem lehet figyelmen kívül hagyni az immunhisztokémiai markerek és az életkor összefüggéseit sem. A Ki67 expresszió szignifikánsan magasabb értékekkel fordul elő az 50 év feletti csoportban, mint a fiatal betegcsoportban. Az 50 év alatti szájüregi daganatos betegekénél pedig a p16 expressziós értékei mutatkoznak magasabbnak, az 50 év feletti csoporthoz képest.

Kutatómunkánk alapján, az alábbi új megállapításokat tehetjük:

1. Az életkor tekintetében meghatározóak a génprofil eltérések: A p16 génexpresszió a fiatal életkorban szignifikánsan magasabb értékeket mutat, mint az idősebb, 50 év feletti betegcsoportban.
2. Az 50 év feletti, szájüregi tumoros betegek génprofiljában a Ki67 expresszió szignifikánsan magasabb értékekkel fordul elő, mint a fiatalok génprofiljában.
3. A hagyományos etiológiai faktorok közül az alkoholfogyasztás befolyásolja döntően a

progressziómentes túlélést (>50év), és a teljes túlélést.

4. Az EGFR 90 H score feletti expressziós értéke negatívan befolyásolja a progressziómentes túlélést.
5. Az 50 évesnél fiatalabb betegcsoportban -HPV negativitás esetén- a progressziómentes és a teljes túlélés is jobb, ha a p16 60% feletti expressziós értékeket mutat.
6. Az 50 évesnél idősebb betegcsoportban szignifikánsan rosszabb a progressziómentes túlélés, ha az EGFR expresszió 90 feletti H score.

6. Saját publikációk jegyzéke

A disszertációhoz kapcsolódó közlemények:

Csurgay K, Zalatnai A, Benczik M, Csomó BK, Horváth F. Lőrincz Á, Komlós G, Németh Z (2021) A Study Of Prognostic Factors in Young Patients with Non-HPV Oral Cancer in Central Europe. Pathology and Oncology Research 27:1609991

<https://doi.org/10.3389/pore.2021.1609991>

Komlós G, **Csurgay K**, Horváth F, Pelyhe L, Németh Z (2021) Periodontitis as a risk for oral cancer: a case-control study. *BMC Oral Health* 21:640 <https://doi.org/10.1186/s12903-021-01998-y>

Németh Zs, Turi K, Léhner Gy, Veres DS, **Csurgay K** (2013) The prognostic role of age in oral cancer. A clinical study. *Magyar Onkológia* 57:166-172.

Túri K, Barabás P, **Csurgay K**, Léhner GY, Lőrincz A, Németh Z (2013) An analysis of the epidemiological and etiological factors of oral tumors of young adults in a Central-Eastern European population. *Pathology and Oncology Research* 19:353-363. <https://doi.org/10.1007/s12253-013-9628-y>

A disszertációhoz nem kapcsolódó közlemények:

Kaposvári I, Körmöczi K, **Csurgay K**, Horváth F, Ashourion AH, Buglyó A, Turai AR, Joób-Fancsaly Á (2021) Delayed-onset infections after lower third molar surgery: a Hungarian case-control study. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology* 132:641-647 doi: 10.1016/j.oooo.2021.04.052

Vuity D, Bogdán S, **Csurgay K**, Sági Z, Németh Zs (2013) Malignant Fibrous Histiocytoma/Undifferentiated High-Grade Pleomorphic Sarcoma of the Maxillary Sinus: Report of a case and review of the literature. *Pathology and Oncology Research* 19:605-609 doi: 10.1007/s12253-013-9640-2