

A humán papillomavírus kóroki szerepe a hímvessző daganatokban

Doktori (PhD) értekezés

Dr. Damásdi Miklós

Pécsi Tudományegyetem, Klinikai Központ

Urológiai Klinika



Pécs, 2017.

Doktori iskolavezetője: Prof. Dr. Kovács L. Gábor

Programvezető: Prof. Dr. Pajor László

Témavezető: Prof. Dr. Kovács Gyula

1. Bevezetés.....	4
1.1 Epidemiológia	4
1.2 Rizikófaktorok és megelőzés	5
1.3. A hímvesző daganatok szövettani osztályozása	6
1.4 TNM klasszifikáció és prognózis.....	7
1.5 A hímvesző daganat nyirok utakon történő terjedése és távoli áttétek.....	10
1.6 Laboratóriumi és szövettani markerek a hímvesző daganatok prognosztikájában	12
1.7. Genetikai markerek	14
1.8. A humán papillomavírus (HPV)	15
1.8.1 A HPV vírusszerkezete	15
1.8.2 A HPV-DNS szabályozó szakasza.....	16
1.8.3 A humán papillomavírusok fajtái.....	17
1.9 A humán papillomavírus hatása a laphámsejtek homeostasisára.....	18
1.9.1 Az emberi papillomavírusok életfolyamata	18
1.9.2 A HPV és a hámsejt kapcsolódása	19
1.9.3 A HPV bejutása a sejtbe.....	20
1.9.4 A HPV kijutása a sejtekből	21
1.9.5 A sejtműködés megváltozásának különbségei alacsony-, és magas kockázatú HPV-fertőzéseknel.....	22
1.9 A HPV szerepe a különböző laphámrákok kialakulásában.....	23
1.9.1 A HPV és a méhnyak malignus folyamata	23
1.9.2 A HPV és a fej-nyak malignus daganatai	25
2. Célkitűzések	29
3. Betegek és módszerek	30
3.1 A HPV státusz meghatározása	32
3.2 Szöveti microarray (Tissue microarray, TMA).....	32
3.3 Immunhisztokémia	33
3.3.1 Az immunhisztológiai reakciók kiértékelése	34
3.3.2 Statisztikai módszer	35
4. Eredmények.....	36

4.1. A TLR4, P53 és P16 ^{ink4a} immunhisztológiai vizsgálata hímvesző daganatokban.....	37
4.1.1. TLR4	37
4.1.2. P53	38
4.1.3. P16 ^{ink4a}	39
4.1.4. A virológiai és immunhisztológiai (TLR4, p16 ^{ink4a} és p53) vizsgálatok eredménye	40
4.2 A HPV pozitívitas valamint a TLR4, P16 ^{INK4a} és p53 közötti összefüggés..	41
4.3 Tumor progresszióhoz társuló markerek immunhisztológiája.....	41
4.3.1 EZH2	43
4.3.2 MMP12	44
4.3.3 mTOR.....	45
4.3.4 E-Cadherin és vimentin.....	46
4.3.5 RARRES1	47
5. Megbeszélés	48
5.1 A HPV jelentősége a hímvesző daganatok kialakulásában	48
5.2 A TLR4 (toll-like receptor 4) protektív hatása a perzisztáló HPV infekciójával és a vírus nukleáris integrációjával szemben	49
5.3 A hímvesző daganatok vírus- és nem-vírus okozta kialakulásának folyamata	50
5.4 A hímvesző daganatok progressziójával összefüggő markerek	52
6. Következtetés	55
7. Irodalom	56
8. Rövidítések.....	64
9.1. A értekezés témájához kapcsolódó közlemények jegyzéke.....	65
9.2. Az értekezés témájához nem kapcsolódó közlemények jegyzéke	66
9.3. Könyvfejezetek:	67
9.4. Poszterek, előadások:	67
10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	69

1. Bevezetés

A hímvessző daganatok az onkológiai betegségeknek ritka formáját képviselik, hiszen a fejlett országokban a rosszindulatú daganatok kevesebb, mint 1%-át teszik ki. Mégis, a férfiakat tekintve jelentős pszichoszexuális terhet jelentenek, az urológus számára pedig komoly kihívás lehet a kezelésük.

1.1 Epidemiológia

A hímvessző malignus daganata ritka a fejlett nyugati társadalmakban, incidenciája kevesebb, mint 1/100,000 férfi Európában és az USA-ban. Jelentős különbségek figyelhetők meg egyes földrajzi régiók között. Nyugat-Európában és az Egyesült Államokban az életkor szerinti standardizált incidenciák aránya 0,3-1,0 / 100 000, ami az összes rosszindulatú betegség 0,4-0,6% -át teszi ki [ENCR 2001, Parkin DM et al 2002]. Spanyolország, Málta és Svájc területén az incidencia eléri, illetve meghaladja az 1,5/100,000 férfit. Ezzel szemben a fejlődő országokban a hímvessző daganatos megbetegedések jelentős egészségügyi problémát jelentenek. Paraguayban és Ugandában a hímvessző malignus daganatának incidenciája 4,2 – 4,4/100 000 között van [Parkin DM et al 2002.]. Ázsiai, afrikai és dél-amerikai országokban a férfiakban diagnosztizált összes rosszindulatú megbetegedések 20-30%-át a hímvessző malignus daganata teszi ki [Rubin MA et al 2001, Wabinga HR et al 200]. Hazánkban a hímvessző daganat az összes urogenitális daganatnak „mindössze” 2-5%-a [EM szalmai protokoll 2006].

A péniszrákos betegek átlagéletkora 60 év, leggyakrabban az 50-70 év közötti férfiakban fordul elő. A korrall összefüggő incidencia folyamatosan emelkedik, a legmagasabb szint 70 év körül mérhető. Az előfordulási arány az utóbbi években meglehetősen állandó maradt, sőt az Egyesült Államokban és Finnországban csökkent. A péniszrákos megbetegedések jelentős nemzetközi változása valószínűleg összefügg a társadalmi-gazdasági és vallási körülmények közötti különbségekkel.

Fontos megjegyezni, hogy a hímvessző daganat elsősorban a nem circumcindált férfi populációban fordul elő. Még azokban a fejlődő országokban is, ahol magas a péniszrák előfordulása, mint például Nigéria és India, a betegség a circumcindált férfiak körében ritkán fordul elő [Dillner J et al 2000].

1.2 Rizikófaktorok és megelőzés

A pénisz tumor rizikófaktorait először a Karolinska Intézet állította össze az 1966 és 2000 között megjelent irodalmi közlemények adatai alapján [Dillner J et al 2000]. Eset-kontroll tanulmányok jelentős rizikó faktorként azonosították a fitymaszűkületet, a krónikus gyulladós állapotokat (balanoposthitis, lichen sclerosis, balanitis xerotica obliterans) és az UVA foto-kemoterápiás kezelést. Jelen tudásunk és bizonyítékaink alapján a fitymaszűkület, a krónikus gyulladások (balanoposthitis, balanitis xerotica obliterans), a hímveszőt ért sérülések, az UVA sugárzás, a dohányzás, a promiszkuitás, a korábbi condyloma- és HPV-infekció tekinthetők egyértelmű kockázati tényezőnek.

A fitymaszűkület igen erős asszociációt mutat az invazív hímvesző daganat kialakulásával. A prevenció egyik alappilléret képezi az a széles körben elfogadott szemlélet, miszerint a neonatálisan elvégzett circumcisio protektív hatással bír a késői életkorban kialakuló laphámsejtes hímvesző daganattal szemben. Világszerte a férfiak kb. 25%-a circumcindált kulturális, vallási, vagy egészségügyi okok miatt. A neonatálisan, illetve kisgyermekkorban végzett circumcisio nemcsak a hímvesző daganat kialakulásának tekintetében fontos tényező, de szerepe van a gyermekkori húgyúti infekciók, valamint a szexuálisan terjedő fertőzések megelőzésében is. A pubertáskor után végzett beavatkozás nem csökkenti a hímvesző daganat kialakulásának kockázatát. A hímveszőt ért többszörös sérülések, abráziók közel négyszeresére emelik a hímvesző daganat kialakulásának kockázatát [Daling JR et al 2005, Elantholi P et al 2008]. További kockázati tényezőnek számít a krónikus balanitis és a balanoposthitis.

Számos tanulmány foglalkozott a dohányzás és a hímvesző daganat közötti esetleges összefüggéssel [Maden C et al 1993, Daling JR et al 2005, Hellberg D et al 1987]. Ezekben a vizsgálatokban kimutatták, hogy a dohányzás összefügg a péniszrák kialakulásának kockázatával. Bár a dohányzás pontos szerepe a betegség kialakulásában még nem ismert, feltételezik, hogy a dohány a metabolitjai révén segíti elő a tumor kialakulását [Harish K et al 1995].

A péniszrák egyéb kockázati tényezői közé tartozik a nemi partnerek száma és a nemi szervre lokalizált szemölcsök valamint szexuális úton terjedő betegségek előfordulása [Daling JR et al 2005]. A korábban rizikótényezőnek vélt

smegma karcinogén hatása egyértelműen kizárható. A hímvessző daganatok körülbelül 50-80%-ában kimutatható a humán papillomavírus DNS beépülése. Ezen esetek mintegy 70 %-ában HPV-16 típus mutatható ki. A rizikófaktorok közé tartoznak a hímvessző rákmegelőző állapotai (1. Táblázat)

1. Táblázat. Rákmegelőző állapotok

Sporadikus malignizálódó csoport:	Magas rizikójú malignizálódó csoport:
<ul style="list-style-type: none"> - Cutan szarv - Bowenoid papulosis - Balanitis sclerotica obliterans (lichen sclerosis et atrophicus) 	<ul style="list-style-type: none"> - Intraepithelialis neoplasia - Óriás condyloma (Buschke-Löwenstein) - Queyrat-féle erythroplasia - Bowen kór - Paget kór

1.3. A hímvessző daganatok szövettani osztályozása

A laphámsejtes karcinómáknak számos típusa létezik, amelyek különböző szöveti megjelenéssel és növekedési mintázattal jellemezhetőek (2. Táblázat)

A szövettani altípusok komoly prognosztikai jelentőséggel bírnak, míg condylomatosus karcinóma metasztatizálási hajlama 18,2%, a klasszikus elszarusodó laphámrákok 56,7%, a sarcomatoid karcinómáknak 89%. A hímvessző daganatok növekedési mintázatai a következők lehetnek: superficiális (42%), vertikális (magas malignitás jellemző rá, mélyen betérjed a hímvessző állományába (32%)), verrucosus (alacsony malignitású forma, papilláris vagy anophyt növekedéssel jellemezhető (18%)). Az esetek 8-9%-ában a hímvessző karcinóma multicentrikus, azaz egy időben két vagy több, egymástól függetlenül jelentkező primer daganat figyelhető meg.

2. Táblázat. (Chaux & Cubilla 2012.)

A laphámrákok klasszifikációja	
Szubtípus	Előfordulás (%)
Klasszikus elszarusodó laphámrák	48-65
Basaloid carcinoma	4-10
Condylomatosus carcinoma	7-10
Verrucosus carcinoma	3-8
Papilláris carcinoma	5-15
Sarcomatoid carcinoma	1-3
Kevert carcinoma	9-10
Adenosquamosus	1-2
Pseudohyperplaticus carcinoma	<1
Carcinoma cuniculatum	<1
Pseudoglandularis carcinoma	<1
Condylomatosus-basaloid carcinoma	9-14

1.4 TNM klasszifikáció és prognózis

Jelenleg az UICC 2016 Tumor Node Metastasis klasszifikációja van érvényben, mely már egy átdolgozott TNM rendszer, igazodva a korábbi UICC 2002 TNM klasszifikációs rendszerrel szemben megfogalmazott kritikákhoz (3. Táblázat).

3. Táblázat. UICC 2016 TNM klasszifikációs rendszer (EAU Guidelines 2017)

T - elsődleges tumor kategória	
Tx	Primer tumor nem megítélhető
T0	Nincs bizonyíték primer tumorra
Tis	Carcinoma in situ
Ta	Nem invazív verrucosus carcinoma
T1	Tumor infiltrálja a subepitheliumot
T1a	Tumor infiltrálja a subepitheliumot, lymphovascularis invázió nélkül, jól differenciált tumor T1G1-2
T1b	Tumor infiltrálja a subepitheliumot, lymphovascularis invázió jelei, rosszul differenciált tumor T1G3-4

T2	Corpus spongiosum érintettség húgycső érintettséggel vagy anélkül
T3	Corpus cavernosum érintettség húgycső érintettséggel vagy anélkül
T4	Környező szerv infiltrációja
N – regionális nyirokcsomó kategória	
Nx	Regionális nyirokcsomó nem megítélhető
N0	Nincs regionális nyirokcsomó metasztázis
N1	Mobilis, unilaterális inguinalis nyirokcsomómetasztázis
N2	Mobilis, unilaterális multiplex, vagy bilaterális inguinalis nyirokcsomómetasztázis
N3	Fixált inguinalis, vagy kismedencei nyirokcsomómetasztázis
M – távoli áttét kategória	
M0	nincs távoli áttét
M1	van távoli áttét
Patológiai klasszifikáció	
A pT kategória megfelel a klinikai klasszifikációnak	
A pN kategória az eltávolított vagy mintavételi eljárásba bevont nyirokcsomó szövettani feldolgozására alapul	
pNx	Regionális nyirokcsomó nem megítélhető
pN0	Nincs regionális nyirokcsomó metasztázis
pN1	Daganatos áttét egy vagy két inguinalis nyirokcsomóban
pN2	Daganatos áttét több mint két nyirokcsomóban egy oldalon, vagy mindkét oldali inguinalis régióban
pN3	Daganatos áttét a kismedencei nyirokcsomókban, vagy a regionális inguinalis nyirokcsomókban egy vagy két oldalon vagy extranodalis terjedéssel
pM – távoli áttét	
pM0	nincs távoli áttét
pM1	van távoli áttét
G – szövettani gradus	
Gx	a szövettani gradus nem megítélhető
G1	jól differenciált
G2	enyhe fokban differenciált
G3-4	rosszul differenciált/differenciálatlan

A fityma lemezen elhelyezkedő malignus elváltozások jobb prognózisúak, illetve a regionális metasztázisok kialakulása is kisebb valószínűséggel következik be. [Oertell J et al 2011]. A perineurális invázió és a szövettani gradus prediktív értéke rendkívül erős a daganat specifikus halálozás és a rossz prognózis tekintetében [Cubilla A et al 2009]. A daganat gradusa a metasztatizáló folyamat előre jelzője lehet, nagyon nehéz a heterogén megjelenésű és viselkedésű daganatok körében a gradust egyértelmű prognosztikai faktorként kezelni. A nyirok-invázió egyértelműen a metasztázis független prediktora, illetve a vénákba történő direkt terjedése a tumoroknak is elsősorban előre haladott folyamatokban látható. A laphám karcinóma következő szubtypusai rendelkeznek jó prognózissal: verrucosus, papilláris, condylomatosus, pseudohyperplasticus és a carcinoma cuniculatum. Ezek a szubtypusok lokálisan terjednek, ritkán képeznek áttéteket, és alacsony a daganat specifikus mortalitásuk.

A magas kockázatú laphám daganatok szubtypusai a következők: basaloid, sarcomatoid, adenosquamous és egyéb rosszul differenciált típusok, esetükben a lokális kiterjedés, és a metasztatizáló hajlam kifejezetten magas. Az úgynevezett intermedier csoportba a következő típusok tartoznak: a condylomatosus szubtypus kevert és pleiomorf formái.

A vizsgálatok azt bizonyítják, hogy a distalis húgycsőbe (glandularis) terjedő, pT3-as tumorok – az esetek 25%-ban láthatók – nem mutatnak rosszabb prognózist [Velazquez E.F et al 2005]. A proximális húgycsőbe törő, szintén pT3-as daganatok viszont sokkal agresszívebbek, illetve rosszabb prognosztikai paraméterekkel rendelkeznek.

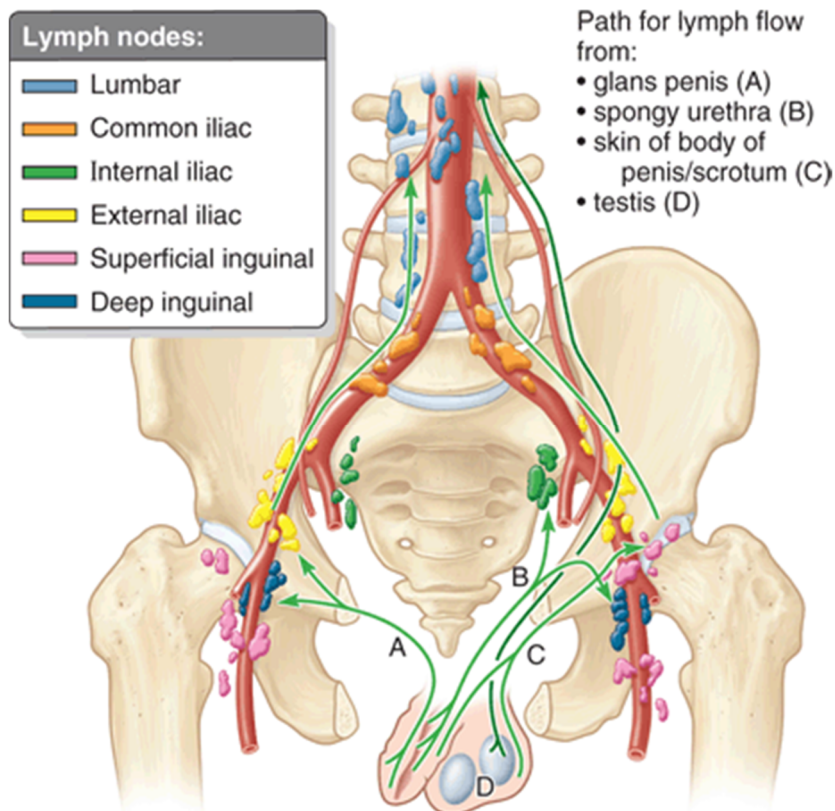
A corpus spongiosumba és a cavernosa állományába törő daganatok, melyek pT2-pT3-as csoportba sorolandók, klinikai megítélése már problematikus, ugyanis rendkívül eltérő prognosztikájúak. Egy 72, pT2-es patológiai stádiummal rendelkező beteg csoport klinikai adatait feldolgozó tanulmány [Rees RW et al 2008] három év átlagos követés után azoknál a betegeknél, ahol corpus cavernosum infiltráció volt 35%-os lokális kiújulást és 30%-os átlagos mortalitást mért szemben azon betegekkal, akiknél a daganat csak a glansot érintette. A hosszú távú túlélés a T2 és T3 tumoros betegeknél, valamint az N1 és N2 betegségben szenvedő betegeknél nem mutat szignifikáns különbséget [Leijte J.A et al 2008].

Vizsgálatok alapján a pT1 G1 tumorok alacsony kockázatú tumoroknak foghatók fel, ahol a nyirokcsomó metasztázis szinte kizárható, ellentétben a magas

kockázatos pT2/3, G2/3 tumorokkal, ahol a nyirokcsomó metasztázis valószínűsége elérheti a 83%-ot [Solsona E et al 2001]. A fennmaradó daganatok közepes kockázatos tumorok voltak, mintegy 33%-os nyirokcsomó metasztázis valószínűséggel. Egy fajta prognosztikai indexnek is lehet használni azokat a paramétereket, melyek együttes értékelésével (gradus, mélységi terjedés, perineurális invázió) a regionális nyirokcsomó-áttétek kialakulásának előre jelzése, illetve után követése végezhető [Chaux A et al 2009]. Minél alacsonyabb a számított pontérték, annál nagyobb az öt éves 95% -os túlélési valószínűség.

1.5 A hímvessző daganat nyirok utakon történő terjedése és távoli áttétek

A hímvessző nyirokkeringéséről feltétlenül említést kell tenni, hiszen a betegség lefolyását, a beteg további onkológiai kezelésének irányát elsősorban a nyirokcsomó státusa határozza meg. A regionális metasztázis irányait a hímvessző nyirokelvezetésének útvonala határozza meg. A tumor szóródásának legkorábbi megjelenése a femoralis és az inguinalis nyirokcsomókat érinti. A fitymabőr nyirokerei egyesülnek a hímvessző testéből jövő nyirokerekkel, innen a nyirok a felületes inguinalis nyirokcsomók irányába vezetődik. A „lymphatic crossover” (a nyirokerek minden szinten kétoldali összeköttetésben vannak egymással) miatt a tumor sejtek számára mindkét oldali inguinalis régió nyirokcsomói elérhetővé válnak. A makk nyirokelvezetése eltérő útvonalat követ és egyesül a corpus cavernosumok nyirokereivel. A cirkuláris nyirokkeringés, amely a felületes nyirokcsomók felé vezet el a nyirokot, lehetőséget biztosít arra, hogy a tumor mind a felszíni, mind a mély kismedencei nyirokcsomókat képes legyen elérni. A felszíni inguinalis csomók felől a nyirok a mély inguinalis nyirokcsomókhoz vezetődik, amelyek a fascia lata alatt helyezkednek el, innen a kismedencei nyirokcsomók irányába történik az elfolyás. A többszörös összeköttetés minden szinten való megvalósulása lehetővé teszi a hímvessző mindkét oldali nyirokelvezetését (1. Ábra).



1. Ábra. (A hímvessző regionális nyirokvezetése) Healthappointments.com Chapter 3: Pelvis and Perineum

A hímvessző daganatok kezelésében - a primer elváltozás eltávolítása után - a legfontosabb prognosztikai faktor a regionális nyirokcsomók státusza. A malignus megbetegedés felismerésének időpontjában a betegek közel 25%-a nyirokcsomó pozitív [EAU Guidelines 2017]. A betegek nyirokcsomó státuszának meghatározása az előbb említett okból kifolyólag elengedhetetlen. A betegek közel 20%-nál klinikailag negatív nyirokcsomó státus igazolható, az occult metasztázisok 2-66% közé tehetők. A CT vagy MRI vizsgálatok alacsony szenzitivitású, és specificitású vizsgálatok, a patológiás méretűnek leírt nyirokcsomók kevesebb, mint 50%-a mutat kórszöveti pozitívítást. Egyéb más diagnosztikai vizsgálatok, mint a PET (fludeoxyglucose-18), CT vagy MR diagnosztikai haszna megkérdőjelezhető. A minimál invazív technikák, mint a finom tű aspiráció (FNAB) vagy a dinamikus szentinel nyirokcsomó biopszia (DSNB) jó alkalmazható módszerek, fals negatív arányuk 7%, szövődmény arányuk mintegy 4,7% körüli [Mohs F.E et al 1992], együttes alkalmazásuk a DSNB szenzitivitását növeli. A gold standard nyirokcsomó meghatározás továbbra is az inguinalis nyirokcsomó eltávolítás,

melynek invazivitása, illetve magas morbiditása miatt további prognosztikai faktor meghatározásra van szükség.

A távoli metasztázisok megjelenése (tüdő, máj, csont, agy) ritkán fordul elő a betegség lefolyása során, gyakrabban jelentkezik a primer tumor kezelését követően.

1.6 Laboratóriumi és szövettani markerek a hímvesző daganatok prognosztikájában

Jelenleg nincs elfogadott biomarker a hímvesző daganatok progressziójának előre jelzésére. Többek közt plazma biomarkerek (SCCAg, CRP), sejtproliferációhoz társuló biomarkerek (Ki-67, PCNA), p53, EZH3, MMP12, mTOR pathway gének, CD57, epithel-mesenchyma átmenetet jelző E-cadherin és vimentin vizsgálatát végezték el, de megbízhatóan használható marker még nem áll rendelkezésre.

Laphámsejtes carcinoma antigén (SCCAg) egy tumor asszociált glycoprotein, mely a serine proteáz inhibitor család tagja. A végbél-, és méhnyak rák diagnosztikában, illetve után követésben jól használható marker a hímvesző daganatok diagnosztikai vizsgálataiban kevésbé ismert és kutatott. Az SCCAg diagnosztikai, illetve a betegek után követésben, korai recidívák felismerésében játszott esetleges szerepéről csak alacsony betegszámot vizsgáló tanulmányok jelentek meg. Laniado és munkatársai által végzett vizsgálat a nyirokcsomó metasztázisokkal rendelkező betegekben jelentős mértékben emelkedett SCCAg szintet igazolt, a 1,5 µg/L-es mérési határ felett 50%-os szenzitivitási, és 100%-os specificitási értékek nyertek felismerést [Laniado M.E et al 2003]. Egy másik, 16 hímvesző daganatos beteget vizsgáló tanulmány szerint a plazma SCCAg meghatározása előre jelezheti a regionális nyirokcsomók, vagy távoli régiók daganatos áttétét, még mielőtt a képalkotó vizsgálatok azokat kimutatnák, illetve után követésre is alkalmas lehet [Touloupidis S et al 2007]. Egy 54 beteg klinikai adatait vizsgáló tanulmány összefüggést mutatott ki a plazma SCCAg emelkedett szintje és a tumor növekedés, a regionális nyirokcsomók és távoli áttétek jelenléte között, illetve a kezelést követően a daganat kiújulását is jól mutatta annak emelkedése révén [Hungerhuber E et al 2007]. Zhu és munkatársai saját beteganyaguk vizsgálatának kiértékelésekor a SCCAg eltérést független prognosztikai faktorként nevezték meg a pozitív nyirokcsomókkal rendelkező

betegek esetén [Zhu Y et al 2008]. A biztató eredmények ellenére a SCCAg irányelv szintű használatára, jelenleg a rendelkezésre álló alacsony beteg számú tanulmányok, és az ellentmondásos eredmények miatt eddig nem került sor.

C-reaktív protein (CRP) szintje, amelyet a májsejtek termelnek, elsősorban bakteriális fertőzések, trauma, autoimmun kórképek vagy malignus folyamatok kapcsán emelkedik meg. Számos teória merült fel azzal kapcsolatban, hogy a CRP szintje miért is emelkedik meg daganatos betegségekben, szerepet játszhat a daganatos sejtek kiváltotta gyulladás, a tumor antigénnel szembeni immunválasz vagy önmagában csak az idült gyulladásos folyamat is, mely etiológiai tényező lehet a karcinogenezisben. A magas CRP szint rossz prognosztikai jel bizonyos daganatos kórképekben, többek között a vese sejt daganatokban, vagy az uroteliális daganatokban, ha ki tudjuk zárni valamilyen a háttérben lévő gyulladásos folyamatot. Két klinikai tanulmány foglalkozott a CRP, hímvesző daganatokban betöltött prognosztikai szerepével [Steffens S et al 2013, Al Ghazal A et al 2013]. A tanulmányok ugyan igazolták, hogy az emelkedett CRP értékek mellett a daganatmentes túlélés csökkent, de nem tudták független prognosztikai faktorként alkalmazni a fehérjét.

A *Ki-67* egy nukleáris mátrix fehérje, mely a sejtciklus szinte minden fázisában expresszálódik, kivéve a G0 fázist. A *Ki-67*-es fehérje termelődése összefüggésben áll a sejt proliferáció mértékével, de prognosztikai faktorként történő alkalmazása a hímvesző malignus daganataiban ellentmondásos. Az eddig rendelkezésre álló klinikai adatok alapján a *Ki-67* mátrix fehérje szintje szignifikáns összefüggést mutat a tumor gradusával, de nem sikerült szignifikáns összefüggést kimutatni a regionális nyirokcsomó metasztázisok és a túlélés között, ennek megfelelően független prognosztikai faktorként nem alkalmazható [Stankiewicz E et al 2012].

A *Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA)* fehérje a sejtosztódáshoz kapcsolódó fehérje molekula. A PCNA szintjének vizsgálatát több klinikai tanulmány is elvégezte hímvesző daganatos betegekben, szignifikáns összefüggés mutatható ki a PCNA szintje és a nyirokcsomó metasztázisok között, de a túlélésben már nem mutatható szignifikáns eltérés a beteg adatai között [Guimaraes GC et al 2007].

A *p53* fehérjét kódoló gén (*TP53*) a 17-es kromoszóma rövid karján helyezkedik el, amelynek a mutációja a szolid tumorok mintegy 70%-ban

kimutatható. A *TP53* gén mutációja során termelődő stabil fehérje a tumor sejtekben felszaporodva immun hisztokémiai módszerekkel kimutatható. A p53 túltermelődése vagy mutációja, a hímvesző daganatok 26-91%-ban kimutatható. Annak ellenére, hogy számos klinikai tanulmány igazolta a p53 kifejeződés és a HPV infekció közötti negatív korrelációt [Levi JE et al 1998], vannak tanulmányok melyek kimutatták a p53 túltermelődését mind a HPV pozitív, mind pedig a HPV negatív esetekben is [Bethune G et al 2012]. A rendelkezésre álló vizsgálati eredmények alapján sajnos a p53 nem tekinthető egyértelműen független prognosztikai faktornak a hímvesző daganatok vizsgálataiban.

1.7. Genetikai markerek

A hímvesző daganatok DNS vizsgálatát legelőször Alves és munkatársai végezték el, később Busso-Lopes és munkatársainak sikerült kimutatni a 3p, 3q és 8p kromoszómák eltéréseit, és a daganatos progresszió, azaz a csökkent daganat specifikus túlélések közötti összefüggést [Busso-Lopes AS et al 2015]. Mikroszatellita vizsgálattal kimutatták, hogy a LOH (loss of heterozygosity) a 6, 9 és 12 kromoszómákon szintén összefüggésbe hozható a daganatos áttétek képződésével, mi több, a 6p22-23-as kromoszóma allél veszteséhez rossz klinikai prognózis társul. Egy részletes BAC-array vizsgálat 64 hímvesző daganatban a kromoszóma 1 (88%), 3 (86%), 5p (67%), és 8 (84%) duplikációját találta. Ezen kívül a kromoszóma 2q (86%), 3p (83%) és 11q (81%) vesztes volt a legjellemzőbb elváltozás. Egyes kromoszóma elváltozások eltértek a HPV pozitív és negatív tumor csoportban [Poetsch M et al 2007].

A fent említett kromoszóma eltérések mellett a MYC gén amplifikációját is megfigyelték [Alves G et al 2001]. A MYC gén a 8q24-es kromoszómán lokalizált proto-onkogén, mely olyan transzkripciós faktorok termeléséért felelős, melyek a daganat sejtek proliferációjában, differenciálódási folyamatában, illetve apoptózisában játszanak szerepet. A MYC gén vizsgálata számos onkológiai betegségben, többek között méhnyak rákban és a hímvesző malignus daganatos betegségben is megtörtént. A fent említett onkológiai elváltozásokban a MYC gén direkt aktiválásáért a HPV is felelőssé tehető.

Az epigenetikai modifikációk potenciálisan visszafordítható változások, melyek elsősorban a DNS metilációs, hiszton modifikációs és regulációs

változásokkal nem kódoló olyan RNS irányította gén expressziók, melyek a malignus transzformációban fontos szerepet játszhatnak. Az epigenetikai modifikációkról azonban csak korlátozott számban állnak rendelkezésre vizsgálati eredmények, azon belül is a leggyakrabban vizsgált változás a CDKN2A promóter régiójának a hypermetilációja, melyet a vizsgálat hímvesző daganatos minták 0-42%-ban figyeltek meg [Kuasne H et al 2013]. A CDKN2A 2 tumor szuppresszor fehérjét kódol, többek között a P16^{INK4a} fehérjét. Kuasne és munkatársai által különböző szövettani grádusú hímvesző daganatban elvégzett vizsgálatok során az alacsony BDNF gén metilációs aktivitást regionális nyirokcsomó metasztázist adó daganat típusokban tudták kimutatni, melyek rövidebb túlélést mutattak [Kuasne H et al 2015].

1.8. A humán papillomavírus (HPV)

A HPV vírusfertőzés számos malignus daganat, mint a méhnyak, oropharynx, végbél és a hímvesző daganatainak kialakulásában játszik szerepet. Epidemiológiai adatok alapján a HPV DNS integrációja malignus hímvesző daganatokban a 20-80% között van. A statisztikai adatok szóródásának a mértéke nagy valószínűséggel a földrajzi elhelyezkedés, és a laboratóriumi vizsgálatok típusai között keresendők [Bősze P és mts 2008].

1.8.1 A HPV vírusszerkezete

A papilloma vírusok évmilliók óta léteznek, számtalan élőlényben megtalálhatók, sajátosan fajgyediek. Elnevezésük a faji egyediségüket jelzi (emberi papillomavírus), ennek megfelelően csak az emberre veszélyes. A humán papilloma vírusok csoportja heterogén, de közös tulajdonságuk, hogy csak a hámszövethez (nyálkahártya, bőr) kapcsolódnak. A nyálkahártyát fertőző (mucosotropic) HPV-k az ún. α -nemzetség (α -papillomavírus, α -genus) - ide tartoznak az emberi HPV-k -, míg a bőrhöz kötődők (cutaneotropic) a β -nemzetség (β -papillomavírus, β -genus). Egyes HPV-k a bőr és a nyálkahártya hámsejtjeihez is képesek kapcsolódni.

A HPV DNS-lánca körkörös, zárt, nagyjából 7900 bázispárból áll (hozzávetőlegesen 8 kb hosszú), és három szakaszra osztható: a korán és a későn

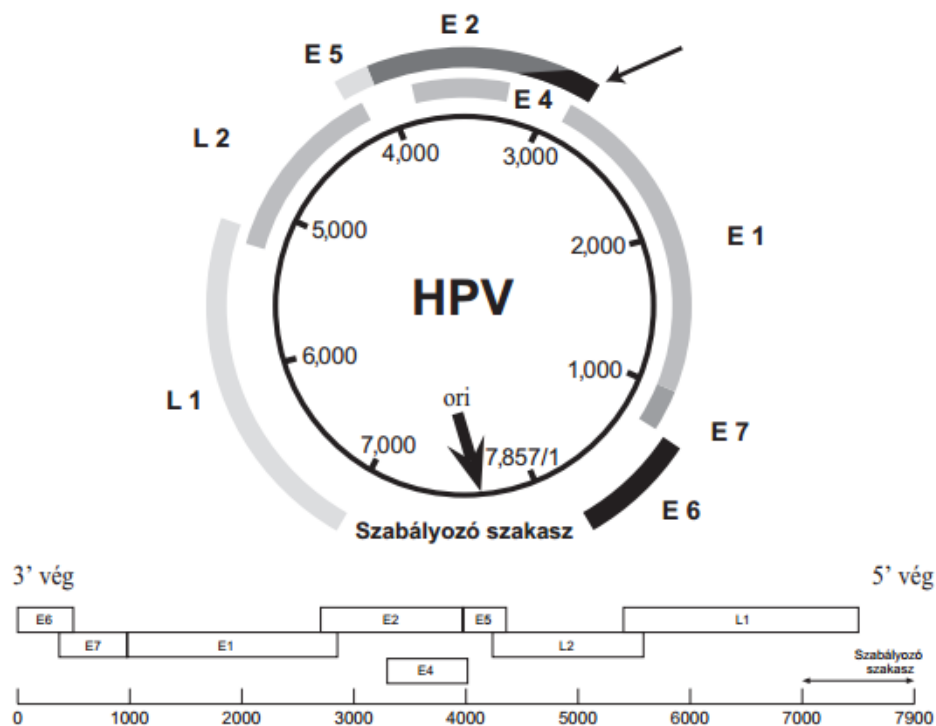
átíródo gének szakaszára (early and late genes region), illetve a szabályozó egységre. A korai gének fertőzés során a hámérésnek (differenciálódás) már kezdeti szakaszában kifejeződnek, míg a későiek csak a kialakult, érett hámiban (vagyis a hámérés késői szakaszában) képeznek fehérjéket. A leolvasási keretek (open reading frame, ORF), azaz a kódoló gének, jellegzetesen a DNS-nek csak egyik szálán helyezkednek el (single sense strand), következésképpen csak az egyik szála irányítja a fehérje képződést.

A korán átíródo gének (E-gének, early region) szakasza hat féle fehérjét (E1, E2, E4, E5, E6 és E7) képeznek. A korai gének az úgynevezett szabályozó fehérjéket, a vírus életfolyamatait beindító, ellenőrző fehérjéket képezik. A későn átíródo gének (L-gének, late region) szakasza két leolvasási keretből (L1 és L2) áll, és a vírusburok kétféle fehérjéjét (L1- és L2-fehérjék) hozzák létre. Ezek a fehérjék egyrészt az új vírusok szerkezetét építik fel (szerkezeti fehérjék), másrészt, mint enzimek, a vírus kialakítását – a DNS és a fehérjeburok összeépülését – szabályozzák.

1.8.2 A HPV-DNS szabályozó szakasza

A szabályozó szakaszt többféleképpen nevezik: hosszú szabályozó szakasz (long control region, LCR), nem kódoló szakasz (non coding region vagy untranslated region [UTR]) megjelölést rendszeresen átnevezték, újabban az upstream regulatory region (URR) megnevezés terjedt el, amelyet magyarul szabályozó szakasznak nevezhetünk. A szabályozó szakaszon egy korai és egy késői átíródoást indító egységet (promoter) különböztetnek meg: a korai már az osztódó sejtekben működik, a késői csak az érett hámsejtekben társul hozzá. Ez utóbbi indítja be az E1-, E2-, E4- és E5-fehérjék számottevő képzését. A szabályozó szakaszon helyezkedik el a DNS-másolást beindító bázisegység, az ún. ORI (viral origin of replication) is.

A szabályozó szakasz működését a hozzá kapcsolódó korai vírusfehérjék – elsősorban az E2 és az E1 – és különböző sejtfehérjék irányítják; a vírusgének kifejeződését tehát az E1-E2 fehérjék, a szabályozó szakasz és bizonyos sejtfehérjék határozzák meg. A szabályozó szakasz végeredményben az új vírusok képződésének minden lépését (fehérjék képződése, a DNS sokszorozódása és a fehérjék, valamint a DNS összeépülése) irányítja.



2. Ábra. A körkörös HPV-DNS szerkezete vázlatosan (Bősze P. Az emberi papillomavírus szerepe a rákképződésben: alapvető sejten belüli molekuláris változások. Nőgyógy Onkol 2008;13:75–89)

1.8.3 A humán papillomavírusok fajtái

A legkorszerűbb osztályozás a HPV-k E6-, E7- és L1-fehérjéinek kódoló DNS-szakaszára, bázis sorrendjére alapozott.

Eddig több mint 120 fajta HPV-t azonosítottak, de még mindig ismernek fel újakat. Az ismert HPV-k szerkezetükben nagyon hasonlóak, ám hatásukban – mind a fertőzés helyét, mind az okozott elváltozás formáját illetően – nagyon különbözőek lehetnek. Ez minden bizonnyal azzal magyarázható, hogy ugyan az egyes HPV-típusok közös ősektől származtak, de külön-külön utakon fejlődtek. A végbelet és a nemi szerveket fertőző HPV-k száma meghaladja a negyvenet. A leggyakoribbak a HPV6, -11, -16, -18, -26, -30, -31, -33, -35, -39, -40, -42, -43, -44, -45, -51, -52, -53, -54, -56, -58, -59, -66 és -68.

A HPV alacsony- és magas kockázatú csoportokra (low- és high-risk HPV; LR-HPV, illetve HR-HPV) oszthatók:

- A **magas kockázatú HPV**-ket rákkeltő (karcinogén) típusnak is nevezik. Az utóbbiakhoz a HPV 16, -18, -31, -33, -35, -39, -45, -51, -52, -56, -58, -59, -68, -73 és -82 tartoznak; közülük a HPV 16, -18, -31, -33 és -45 a legjelentősebbek. A

HPV16 fertőzés a leggyakoribb. Többek között a méhnyak rákok, a külső női- és férfi nemi szervi, a végbél- és a vastagbélrákok, valamint a száj-, garatüregi rákok többségének keletkezésében van a legnagyobb szerepe.

- **Az alacsony kockázatú HPV-k** jóindulatú elváltozásokat, szemölcsös növedékeket és rák megelőző (CIN1, VIN1) állapotokat okoznak. Közülük a HPV6 és -11 a leggyakoribb. A bőrfelszínhez kötődő HPV-k: a HPV 1, -4, -5, -8, -41, -48, -60, -63 és -65. A bőr és a nyálkahártyák hámsejtjeit is megtámadni képesek a HPV 2, -3, -7, -10, -27, -28, -29, -40, -43, -57, -61, -62 és -72.

1.9 A humán papillomavírus hatása a laphámsejtek homeostasisára

1.9.1 Az emberi papillomavírusok életfolyamata

Minden élőlény alapvető biológiai tulajdonsága fajtájának fenntartása, szaporodása, utódok létrehozása. Ez a biológiai alaptörvény a vírusokra, így a HPV-re is érvényes. Az egyetlen DNS-ből és az azt körülvevő fehérjeburokból álló, parányi HPV önmagában nem képes kettőződni, az utódvírusok létrehozásához a hámsejteket használja fel: átalakítja a hámsejtek élettani változásait, igénybe veszi a sejt aminosavait, energiáját, fehérje- és DNS-képző enzimeit. A vírusfehérjéket, a vírusgén kódjai alapján, a gazdasejt fehérjeképző rendszere állítja elő a sejtplazmában vagy a riboszómákon. Hasonlóan, a vírusok DNS-t is a sejtek DNS-enzimjei mintázzák, az utódvírust is a sejt rakja össze. A HPV-k csak a hámsejtekben maradhatnak meg és sokszorozódhatnak, ezért nevezzük ezeket sejten belüli (intracelluláris) vírusoknak. A sejten kívülre az életjelenségeket nem mutató, de a HPV-vel azonos szerkezetű, úgynevezett virion (emberi papillomavirion) kerül. A HPV sejten belüli létezése összehasonlíthatatlanul hosszabb, mint a sejten kívüli; az utóbbi többnyire néhány nap, előbbi legfeljebb egy-két hónap.

A HPV életfolyamata szorosan kapcsolódik a hámsejtekéhez. A HPV a parányi sérülések miatt szabaddá váló (hámmal nem fedett) alaphártyákhoz (membrana basalis) kötődik, és a hám helyreállítására odavándorló alapsejteket fertőzi meg. Ezek a sejtek osztódva képezik az alap közeli (parabasalis) sejtréteget. Egy-egy osztódó fertőzött hámsejtben a HPV-DNS a sejtmagban van, a kromoszómáktól függetlenül, számuk 50–100, és bennük a vírus korai génjei, szemben a későiekkel,

némileg már kifejeződnek. Az érő, érett hámsejtekben képződnek fokozottan a korai HPV-fehérjék, és másolódik a vírus-DNS. A késői fehérjék csak a legfelső hámréteg sejtjeiben (felszíni sejtek) keletkeznek, és ezek a sejtek rakják össze a vírus DNS-ét és fehérjéit (virion). Az újonnan képződött HPV a hámsejtek leválásával, szétesésével a környezetbe jut, és újra fertőzhet, ám többnyire elpusztul. Ez magyarázza, hogy a HPV-fertőzések szokásosan átmenetiek. A vírus sokszorozódási ideje legkevesebb három hét, a hámsejtek ugyanis ennyi idő alatt formálódnak teljesen, válnak az alap sejtekből felszíni sejtekké, és lökődnek le.



3. Ábra. A hámsejtek életfolyamata (a nyíl a basal sejteket mutatja) (Bősze P. Nőgyógy Onkol 2008;13:75–89)

1.9.2 A HPV és a hámsejt kapcsolódása

A HPV a szabadon fekvő (hámfosztott) alaphártyához kötődik, a heparan sulfate proteoglycan-hoz (HSPG) kapcsolódva, és a basal membran helyreállítására

odavándorló, kezdetleges, osztódó képes alapsejteket fertőzi. A HPV-fertőzés végeredményben a hámsérülés és a gyógyulás eseményéhez kapcsolódik. A vírusok hámsejtekhez kötődése tehát két lépcsős, egymástól elválasztott folyamat: a vírus alaphártya, illetőleg az átalakított vírus és a sejt kapcsolódásából áll, és több órát vesz igénybe. A HPV-k kötődéséhez az L1- és az L2-fehérjék egyaránt szükségesek.

1.9.3 A HPV bejutása a sejtbe

A sejtbe fűződött HPV bejut a sejtplazmába: a vírust a hámsejtek fajlagos kötőfehérjéi juttatják a sejtbe lassan, néhány óra alatt; más vírusok kötődése és sejtbe jutása néhány percig tart. A sejtbe bevitt vírust a kötőfehérjével együtt hólyagocská (korai endosoma) veszi körül, amely későbbi endosomává alakulva a vírus külső (L1) burkát néhány óra alatt lebontja, majd a vírus-DNS az L2-vel együtt a kiszabadul a sejtplazmába. A plazmába jutott DNS-L2-együttest, valószínűleg a mikrotubulosok a sejtmagba szállítják. Az egész folyamat (a HPV sejtbe kötődésétől a magba jutásig) nem egészen 24 óráig tart.

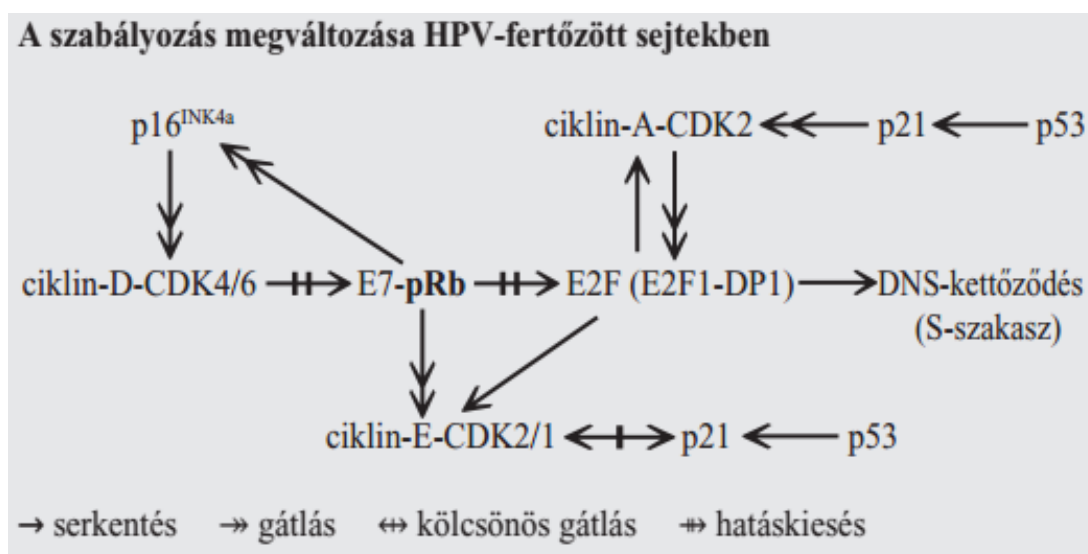
A DNS-L2 a magban az ún. ND10-hez (nuclear domain 10, más néven promyelocytic leukemia protein oncogenic domain [POD]) kapcsolódik, ahol a DNS átíródása, a mRNS képződése azonnal megkezdődik.

A HPV az osztódó hámsejtekben valószínű, hogy a magba került DNS-L2 hatására a maghártya széttörik, és a sejt osztódik. Az E1-E2 fehérjék a kezdeti DNS-másolódást indítják el. Egy-egy alapsejtbe csupán néhány HPV hatol, a HPV-DNS-ek száma tehát az alapsejtekben kicsi, ám a sejtek osztódásával – a kezdeti DNS-másolódás eredményeként – osztódásonként mindig nagyobb lesz.

A HPV az érő, érett hámsejtekben a korai HPV-fehérjék számottevő képződése a hámsejtek érésével, közbenső és felszíni sejtekké válásával indul meg és fokozódik; a HPV-DNS is ezekben a sejtekben másolódik, sokszorozódik jelentősen.

A sejtérésnek, az E7-pRb kapcsolódás következményeként kialakult zavarát a sejt – elsősorban a p53 – felismeri, és védekező folyamatokat indít el: a sejtosztódást a G1–S vagy a G2–S szakaszban megállítja (cell cycle arrest), és a hibákat kijavítja. Ha ez nem sikerül, életbe lép az irányított sejtihalál. Bizonyították, hogy a pRb lebontására a sejtek a p53-képződés fokozásával válaszolnak. Az E6-

fehérjék a p53 megkötésével megakadályozzák, hogy a sejt a genetikai kisiklását felismerje és a sejt a sejthalál útjára (apoptosis) terelődjék. A p53 kiiktatása a vírusok létéhez nélkülözhetetlen; amelyik vírus erre nem képes, az nem maradhat meg. A p53 ugyanis elpusztítja a HPV-vel fertőzött sejtet, és ekként a vírust is. A DNS-vírusok mindegyike, köztük a HPV is, a p53-sejthalál útját akadályozzák meg. A késői gének a burokfehérjéket a hámszövet legfelső sejtrétegeiben képezik, ezekben alakul ki a teljes vírus.



4. Ábra. A G1-S ellenőrzőpont szabályozása ép hámsejtekben, illetve annak megváltozása HPV fertőzés esetén (Bősze P. Nőgyógy Onkol 2008;13:75–89)

1.9.4 A HPV kijutása a sejtekből

Az újonnan képződött vírusok rendre a felszíni sejtekből szabadulnak ki azok leválásakor, a sejtek szétesésével. A HPV-vírusok tömegét tartalmazó felszíni sejtek nem oldódnak fel, nem halnak el, gyulladásszerű jelenségek nem keletkeznek. Az E4-fehérjék elősegítik a vírusok kijutását a sejtekből: valószínűleg a felszíni hámsejtek kapcsolódását lazítják, és így a sejtek könnyebben leválnak. A szabaddá vált vírusok (virionok) újra fertőzhetnek, az alapsejtekhez kötődhetnek, és a folyamat kezdődik előlről.

A HPV-k életfolyamatához az éretlen alapsejtek, az osztódó hámsejtek, az érésben lévő, érett és leváló hámsejtek egyaránt szükségesek, azaz a hám mindegyik rétege. Ezt nevezzük termékeny (produktív) fertőzésnek, amely 2–3 hét alatt zajlik le. Ha bármelyik lépés kimarad, utódvírusok nem képződnek. A HPV-k

szabályos életfolyamatát a sejt kromoszómáival nem egyesült (episomalis) korai gének irányítják. A korai fehérjék már az alap- és osztódó hámsejtekben is képződnek, csak nagyon-nagyon kevés mennyiségben, nem így a későiek, amelyek kizárólag az érett, felszíni laphámában keletkeznek. A vírus-DNS, mai ismereteink szerint, csak a sejtmagban másolódik, kezdetben a sejt S-szakaszától függetlenül, az érett hámsejtekben azonban már a sejt DNS - képző enzimeinek segítségével és bőséggel. Végeredményben a HPV-k a már nem osztódó (érő/érett) hámsejtek működését három szinten változtatják meg:

- bekapcsolják a sejtek DNS-képző enzimeit anélkül, hogy a sejtek osztódnának;
- késleltetik a sejtérést;
- meggátolják, hogy a károsodott sejt elpusztítsa önmagát.

1.9.5 A sejtműködés megváltozásának különbségei alacsony-, és magas kockázatú HPV-fertőzéseknel

A kétféle fertőzés különböző megnyilvánulásának számos oka van, közülük sok még tisztázatlan, de az már ismert, hogy mindkettőnél ugyanazok a fehérjék működnek, ezek aminosav-összetételében azonban van különbség, és különböznek az E6-E7 fehérjék hírvivő RNS-ei is: az alacsony kockázatú E6-E7 fehérjék leolvasási kereteit külön-külön, míg a magas kockázatúakét csak egyetlen RNS szállítja.

Talán a leglényegesebb különbség az alacsony-, és a magas kockázatú HPV-k hatása között az, hogy az utóbbiak E6-E7 fehérjéi a p53-at és a pRb-t nemcsak fékezik, hanem le is bontják és ez által a folyamatot visszafordíthatatlanná alakítják. A pRb és a p53 lebontása sarkalatos, az E6- és E7-fehérjék ugyanis rövid életűek, és nem valószínű – még a HPV16/18-fertőzéseknel sem –, hogy a sejtekben annyi E6-, E7-fehérje képződjék, amennyi egyszerű kötődéssel a pRb és a p53 működését hathatósan visszaszorítaná. A pRb és a p53 lebontása a folyamat visszafordíthatatlanságának kulcsa.

Alapvető különbség még az alacsony-, és a magas kockázatú HPV-fertőzések között az is, hogy a magas kockázatú HPV-DNS képes tartósan beépülni a sejtek kromoszómáiba, DNS-kettőződési zavarokat, kromoszómahibákat okozva. Az

alacsony kockázatú vírus DNS-e a kromoszómákba nem épül be, a magban azoktól függetlenül megtalálható.

Az alacsony kockázatú HPV-k (például a HPV 5) E6/E7-fehérjéi IL8 (interleukin-8), MCP1 (monocyte chemoattractant protein-1), ICAM1 (intercellular adhesion molecule-1) képződését váltják ki. Ezek a molekulák fokozzák a gyulladásos immunválaszt. A magas kockázatú HPV-k E6/E7-fehérjéi ezzel ellentétben fékezik e molekulák képződését, gátolják az immunvédekezést, következésképpen a gyulladásos immunfolyamatokat is. A legjelentősebb valószínűleg mégis az E5-fehérje képzésének különbsége: a magas kockázatú, HPV-fertőzésekben – szemben az alacsony kockázatúakkal – az E5 folyamatosan képződik, és fékezi a helyi immunvédekezést.

A magas kockázatú E6, ellentétben az alacsony kockázatúval, a telomeráznak, az enzim működését gyorsító alegységét (hTERT) serkenti, és különböző, a hTERT átíródását fokozó molekulákhoz (C-MYC, E6AP, MAX stb.) kötődve elősegíti a telomeráz működését, és így gátolja a telomerek rövidülését. A kromoszómavégek rövidülése a sejtek öregedéséhez, pusztulásához vezet, a rövidülés fékezése viszont meghosszabbítja az életüket. Mindezek együtt teszik lehetővé, hogy a magas kockázatú HPV-k a sejteket halhatatlanná tehetik, anélkül, hogy a sejtekben kromoszómahibák keletkeznének. Erre a kis kockázatú HPV-k nem képesek.

1.9 A HPV szerepe a különböző laphámrákok kialakulásában

1.9.1 A HPV és a méhnyak malignus folyamata

A méhnyakrák az uterus alsó harmadából, a cervixből kiinduló rosszindulatú daganat. Kialakulhat a méhszáj felszínén, vagy endocervicalisan, a portio laphámjából, vagy az itt elhelyezkedő ectopiás mirigyhámból; valamint a nyakcsatorna hengerhámjából, illetve az endocervix ectopiás laphámjából. Leggyakrabban a 35-60 éves korban fordul elő, de egyre növekszik a fiatal - 30 év alatti - betegek aránya. A daganat a megjelenési típusát illetően lehet kifelé terjedő az úgynevezett Clark tumor; infiltrative növekvő daganat és magasan a nyakcsatornában kialakuló, okkult, vagy kulisszarák. A daganat viszonylag korán infiltrálja a parametriumokat.

A rosszindulatú női nemi szervi daganatok közül - hazai statisztikai adatok szerint - a méhnyak rákok előfordulása az összes nőlakosra vonatkoztatva 25-27 száz ezrelék, így évente mintegy 1300-1400 megbetegedéssel kell számolni. Az Amerikai Egyesült Államokban a tömeges szűrővizsgálatok bevezetésével az elmúlt 40 év során a cervix karcinoma incidenciáját 24-ről 8 száz ezrelékre sikerült csökkenteni, ami a mortalitásban 70 %-os csökkenést eredményezett. A skandináv államokban még jobb eredményeket értek el. A méhnyakrák incidenciája világviszonylatban csökkent, de a jelentős különbség mutatkozik a földrajzi viszonylatban. A cervix karcinoma a nők daganatos megbetegedésének tekintetében a 2. helyen áll. Mintegy 450.000 új esetet fedeznek fel évente, amelyből 25.000 esetet az EU országokban diagnosztizálnak [Muñoz N et al 2003].

Egyes tanulmányok szerint átlagosan a szexuálisan aktív nők 20-46%-a fertőzött egyidejűleg, mások akár 60%-ra is becsülik esélyét annak, hogy a nemileg aktív nők életük során megfertőződjenek [Koutsky L et al 1997]. A HPV fertőzés becsült prevalenciája a magyar női populációban 17.6%, a legmagasabb a 17-22 éves nők körében [Kornya L et al 2002]. A HPV fertőzés a méhnyakrák kialakulásának szükséges, de nem elégséges feltétele. Promiszkuitás, mint szexuális magatartás (pl. gyakori partnerváltás) a nemi szervi HPV fertőzés egyik legfontosabb kockázati tényezője, habár nem szabad figyelmen kívül hagyni az úgynevezett „férfi-faktor” szerepét sem: a férfi partner szexuális partnereinek számát. A prostituáltakkal rendszeres kapcsolatot létesítő férfiak mintegy vektorként tovább viszik a fertőzést feleségüknek, élettársuknak, ezáltal megnövekedett kockázatnak teszik ki őket a HPV fertőzés, valamint a méhnyakrák kialakulása szempontjából.

A kolposzkópiával kiegészített PAP-kenet hatékony szűrési módszer a méhnyakrák megelőzésében. Magyarországon a Szülészeti és Nőgyógyászati Szakmai Kollégium ajánlása alapján javasolt a szexuális élet megkezdését követően, illetve 25 és 65 éves kor között legalább 3 évente nőgyógyászati szűrővizsgálaton részt venni. A daganat kiterjedésétől és a beteg általános állapotától, esetleges egyéb betegségeitől függően műtét, sugárkezelés illetve kombinált kezelés (műtét és sugárkezelés) vagy kemoterápiás kezelés végezhető.

1.9.2 A HPV és a fej-nyak malignus daganatai

Világszerte évente mintegy 600 000 új fej-nyaki daganatos betegséget diagnosztizálnak, ezzel a fej-nyaki daganatos betegség az ötödik leggyakoribb malignitás [Ferlay J et al 2012]. A magyar epidemiológiai adatokat tekintve megállapítható, hogy hazánkban ez az entitás a tüdő, vastagbél, illetve emlődaganatokat követően a 4. leggyakoribb daganatos megbetegedés. A daganat kialakulás virális elméletét Peyton Rous alapozta meg 1911-ben végzett kísérleteivel, melyek alapján azonosították az első onkogén vírust, a Rous-féle Sarcoma Vírust (RSV). A fej-nyaki daganatok esetében több vírus karcinogén szerepe is ismert, többek között az Epstein-Barr Vírus (EBV), a Humán papillómavírus (HPV), Herpes Simplex Vírus (HSV), Humán Immundeficiencia Vírus (HIV). 2000-ben Gillison és munkatársai által közölt cikk bizonyította az ok-okozati összefüggést a humán papillomavírus (HPV) és a fej-nyaki daganatok egy csoportja között [Gillison M.L et al 2000]. Jelenlegi becslések szerint világviszonylatban az oropharyngeális laphámsejtes daganatok 18%-áért a HPV felelős [Herrero R et al 2003]. Ez az arány országonként eltérő, az Egyesült Államokban valamivel 50% felett van, míg Svédországban 90%-körüli.

Az egyéb fej-nyaki régiókban, mint gége, garat, szájüreg, a HPV-asszociált daganatok aránya jóval kisebb. Az elsődleges infekció a legnagyobb valószínűséggel oro-genitális érintkezés útján jön létre, ugyanakkor a közelmúltban leírtak oro-orális terjedésre utaló bizonyítékokat is. A HPV-infekciótól a fej-nyaki daganat kialakulásáig eltelt idő mintegy 10-15 év, szerotípust tekintve jóval kisebb diverzitás jellemzi a HPV-asszociált szájgarati daganatokat, összehasonlítva a cervix tumoraival: az esetek közel 90%-át a HPV 16 okozza [Kreimer A.R et al 2005].

A fej-nyaki tumoros betegségek kezelésében 3 terápiás lehetőséget különíthetünk el: a sebészi kezelés, sugárterápia, valamint gyógyszeres terápia, mely utóbbin belül beszélhetünk „hagyományos” citotoxikus gyógyszerekről, valamint molekulárisan célzott (receptor, enzim, immune checkpoint gátló) kezelésekről. A sebészi terápia rendkívül sokat fejlődött az elmúlt évtizedekben. Egyrészt mind a primer tumor, mind a nyaki áttétek kezelésében az onkológiai radikalitás mellett nagy hangsúly került a szerv/funkció megőrzésre, így például a különböző részleges gége reszekciók – megfelelő indikáció mellett - elfogadható

funkciót biztosítanak a radikális műtétekkel megegyező túlélési mutatók mellett. A sugárkezelés a sebészi terápia mellett a másik definitív lokális kezelésnek tekinthető modalitás a fej-nyaki onkológiában. Az esetek döntő többségében teleterápiát alkalmaznak. A 3D konformális besugárzást (3DCRT) kezdi felváltani az ún. intenzitás modulált sugárkezelés (IMRT), mely mind a mellékhatások, mind a terápiás eredmények tekintetében előnyösebbnek mondható. A fej-nyaki rákok citotoxikus kezelése tekintetében a platinaszármazékok (cisplatin és carboplatin), a taxán vegyületek (paclitaxel és docetaxel), az 5-fluorouracil, valamint a másodvonalban alkalmazott metotrexát a legfontosabbak.

1.9.3 A HPV szerepe a hímvesztő daganatok kialakulásában

A HPV mint rizikófaktor régóta ismert tény, mi több az is ismert tény, hogy a külső genitáliák HPV érintettsége jelentősen alacsonyabb a circumcindált férfi populációban. A méhnyakrákkal szemben a HPV fertőzés önmagában nem oka a hímvesztő daganat kialakulásának, a primer daganatban történő előfordulása 15-71%-ban ugyan kimutatható [Rubin M.A et al 2001], prognosztikai faktorként történő alkalmazása sem egyértelmű. A HPV indukálta magas méhnyakrák prevalencia szemben a jelentősen alacsonyabb hímvesztő daganatokéval valószínűleg annak köszönhető, hogy a cervixben jóval magasabb a vírus érintette hámsejtek mitotikus aktivitása [Curado M.P et al 2007]. Mindkét daganatos betegség szoros összefüggést mutat a magas rizikójú (onkogén típus) HPV 16, 18-as szubtypusokkal, bár a hímvesztő daganatban közel 10-szer kisebb gyakorisággal [Morris B.J et al 2007]. A Közép-, és Kelet-Európai országokban elvégzett multicentrikus klinikai vizsgálatok összefoglaló adataiból kiderül, hogy az érintett régiókban a méhnyakrákban szenvedő nőbetegek körében elvégzett vizsgálatok alapján a HPV-DNS előfordulása 52,8-100%-os, míg a HPV pozitív betegek tipizálási eredményei az említett populációban a HPV 16/18-as típus előfordulását 61-80,9%-ra becsüli [Mateja S et al 2013].

Nagy valószínűséggel a hímvesztő malignus daganatának kialakulásában két alternatív út lehetséges, a *vírus-, és non-vírus indukálta út*: HPV fertőzésen keresztül vezető út és az úgynevezett környezeti faktorokon keresztül vezető út (fitymaszűkület, dohányzás, rossz higiéniai állapot, krónikus gyulladás) [Rubin M.A et al 2001]. A jelenleg rendelkezésre álló irodalmi adatok a HPV malignus

folyamat kialakulását a vírus az epithel sejtbe történő integrációjában, annak DNS genomjának manipulálásában látják a magyarázatot.

A HPV mediálta pénisz daganatok létrejöttének első lépése a HPV asszociálta premalignus állapotok kialakulása. A vírus genom úgynevezett korai (E) régiókat – ezek kódolják a replikációhoz, regulációhoz és a host-sejt sejtmagjának, cytoplazmájának átalakulását - és késő (L) régiókat – ezek kódolják a kapszid fehérjét – tartalmaznak. A fent említett E régió kódolta E6-7 fehérje termékeknek rendkívül fontos szerepe van a vírus kiváltotta karcinogenezisben, hiszen az E6 és E7 fehérjék a p53 és RB tumorszupresszor gének termékeihez kapcsolódva azokat inaktiválják. A hímvesződaganatok közel felében a betegség kialakulását a magas kockázatú („onkogenetikus”) HPV (hrHPV) vírus váltja ki, azok altípusai közül is a HPV 16-os altípus. A többi esetben a daganatos betegség kialakulása független a vírus jelenlététől. Hasonló jellegű patogenezis látható a vulva, illetve a fej-nyak daganatoknál. A hímvesződaganatok kialakulásában nagy valószínűséggel a p14^{ARF} (MDM2), p53 és/vagy a p16^{INK4a}/cyclin D/Rb vírus (HPV), vagy nonvírus indukálta molekulárgenetikai utak kereszteződéséből alakulhatnak ki. Ez kontrollálatlan sejtosztódáshoz, csökkent apoptózishoz, kromoszóma instabilitáshoz vezethet.

Gyakrabban előforduló sejtszintű elváltozások a daganatos betegség lefolyásában a későbbiekben előforduló megváltozott gén expresszió miatt létrejövő fokozódó progresszió, invázió, angiogenezis, metasztatizáló hajlam. A sejtosztódásban és az apoptózisban bekövetkező zavarok a sejt kromoszóma állományának instabilitását, és a későbbi karcinogenezis beindulását vetítik elő. Hasonló folyamatot indít el a HPV (elsősorban HPV 16) és annak prekursorai a vulva daganatoknál. Meg kell azonban említeni azt, hogy míg a vulva daganatok sajátos koreloszlást mutatnak – a HPV mediálta daganatos betegségek korábbi életkorban, míg a nem HPV mediálta, asszociálta folyamatok később a hetedik-, nyolcadik évtized környékén eredményeznek malignus elváltozásokat. Cubilla és munkatársainak a HPV pozitív és a HPV negatív esetek között sikerült ugyan kimutatni koreloszlásban különbséget, egyéb tanulmányok nem erősítették meg ezt a megfigyelést.

A hímvesző daganatok azon csoportja, mely nem HPV infekció talaján alakul ki, olyan precancerosus állapotokból alakul ki, mint például a lichen

sclerosus. Klinikai kutatások érdekes módon a nem HPV-asszociált hímvesződaganatok esetében is kimutatott általános genetikai változásokat – p53 alteráció, és promóter metiláció – sőt ezek nagyobb gyakorisággal fordultak elő, mint a HPV asszociálta esetekben. Számos klinikai tanulmány számol be non-virális utakról, melyek a hímvesző malignus folyamatához vezetnek: p14^{ARF}/MDM2/p53, vagy a p16^{INK4a}/cyclin D/Rb termékek módosulása, melyek a HPV független daganatok kialakulásához vezethetnek.

Összefoglalva, mind a HPV asszociálta, mind pedig a HPV független mechanizmus a malignus folyamat irányába vezethet, különbözve abban, hogyan aktiválja a már jól ismert vírus onkogéneket (E6 és E7), vagy direkt módon aktivál tumor szupresszor gén inaktiváló mechanizmusokat. Néhány tanulmány összefüggést vélt felfedezni a primer tumor HPV vírus státusa és a daganatos betegség progressziója között. A HPV pozitív és negatív tumorok túlélési adatai között egyes tanulmányok szignifikáns különbséget tudtak kimutatni a HPV pozitív tumorok javára, azonban ezzel ellentétes tanulmányok is megjelentek, melyek nem tudtak kimutatni szignifikáns különbséget a HPV pozitív és negatív tumorok túlélési adatai között.

A hímvesző primer daganatának HPV érintettségét számos tanulmány vizsgálta, vizsgálja, annak prognosztikai faktorként történő értékelhetősége megosztja a szakmát. Európai irodalmi adatok szerint 2006-ban Lont és munkatársai 171 vizsgálat hímvesző daganatos esetből 50-ben (29,2%) tudott HPV-DNS-t kimutatni, az 50 igazolt HPV-DNS pozitív esetből 38-ban (76%) HPV 16-os szubtypus igazolódott, 3 esetben (6%) csak HPV 18-as szubtypus nyert igazolást [Lont A.P et al 2006]. Heidman és munkatársai az általuk vizsgált beteganyagban a vizsgált beteganyag 55,4%-ban tudtak HPV pozitivitást igazolni, a pozitív esetek közül 52%-ban tudtak HPV 16-os, 6%-ban HPV 18-os szubtypus genetikai nyomait kimutatni [Heidman D.A et al 2007]. Dán kutatók 37 hímvesző daganatos beteg primer tumorának PCR módszerrel történt vírus DNS analízise során az össz pozitív esetek 65%-ban tudtak HPV 16-os szubtypust és 3%-ban alacsony rizikójú, HPV 6-os szubtypust kimutatni [Madsen B.S et al 2010].

2. Célkitűzések

- A HPV infekció gyakoriságának megállapítása hímvesző tumorban, továbbá a HPV tipizálása a hímvesző daganatokban leggyakrabban előforduló szubtípus megállapítására.
- TLR4 protektív szerepének vizsgálata a perzisztáló HPV fertőzésben, a vírus nukleáris integrációjában és így a hímvesző tumorok kialakulásában.
- A HPV pozitivitás valamint a TLR4, p16INK4a és a p53 szöveti kifejeződése közötti összefüggés vizsgálata.
- A hímvesző daganatok vírus-, és nem vírus okozta kialakulásának igazolása vagy elvetése.
- A hímvesző daganatok progressziójával összefüggő markerek, mint az EZH2, MMP12, mTOR, RARRES1 valamint az E-Cadherin és vimentin vizsgálata.

3. Betegek és módszerek

A Pécsi Tudományegyetem Urológiai Klinikáján 2002-2012 között malignus hímvessző daganat miatt elvégzett műtéti beavatkozások során mind a primer tumorból, mind pedig a regionális nyirokcsomókból vettünk szövetmintákat. A mintákat további kórszövettani feldolgozásra küldtük, ahol a szövetek paraffin beágyazása történt meg. A fontosabb klinikai és szövettani adatok a 4. Táblázatban foglaltuk össze. A szövetminták gyűjtését és feldolgozását a PTE ÁOK Etikai Bizottság engedélyének birtokában végeztük (Etikai engedély száma: 4828)

1. Táblázat. Összefoglaló táblázat a HPV tesztek eredményei, TNM stádium meghatározás sebészeti ellátás formáiról és a betegek életkoráról (Damásdi M et al. Pathol Oncol Res. 2016; 3:643-646)

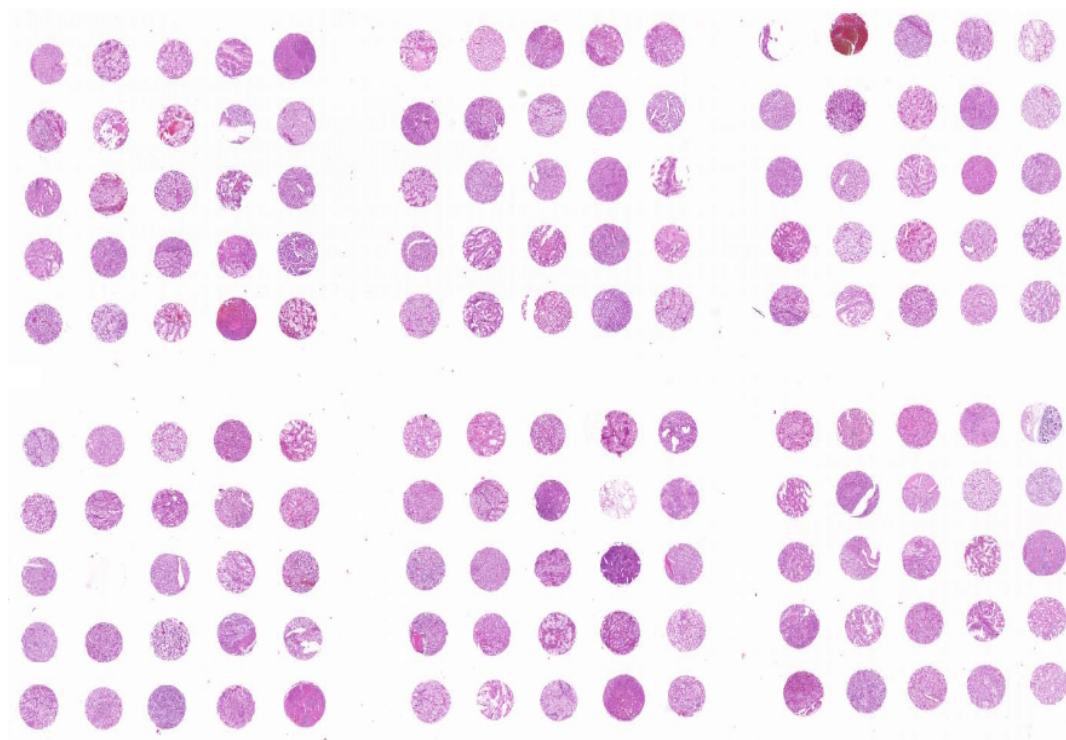
Betegszám	TNM	Sebészeti ellátás	Kor (év)
1	pT1pN0GII	excision	61
2	pT1pN0MxGI	partial amputation	81
3	pT3pN0MxGII-III	amputation	53
4	pT1pN0M0GI	excision	87
5	pT2N2MxGI	partial amputation	82
6	pT1pN0GI	excision	56
7	pT4pN2MxGIII	emasculinisation	44
8	pT1pN0MxGI	excision	54
9	pT3pN2MxGII-III	amputation	53
10	pT1pN2MxGI-II	excision	79
11	pT1pN0GIII-IV	amputation	63
12	pT1pN3MxGIV	excision	56
13	pT2pN2MxGII-III	amputation	50
14	pT4pN2GIII-IV	emasculinisation	52
15	pT3pN1MxGIII-IV	emasculinisation	52
16	pT2pN0MxGII-III	partial amputation	78
17	pT1bpN0MxGIII-IV	excision	60
18	pT1apN0MxGI-II	partial amputation	74
19	pT1pN0MxGI	excision	73
20	pT1CISpN0MxGIII	excision	61
21	pT1bpN3MxGIII-IV	amputation	53
22	pT1pN0MxGII	excision	72
23	pT1pN0MxGII	excision	59
24	pT2pN0MxGII	amputation	44
25	pT2pN0MxGII-III	amputation	60
26	pTapN0MxGI	excision	59
27	pT2pN0MxGI-II	amputation	57
28	pT1pN0MxGII	excision	46
29	pT3pN3MxGI	amputation	78
30	pT2pN3M1GIII-IV	amputation	59
31	pT3pN2MxGIII-IV	amputation	61
32	pT2pN0MxGIII	amputation	48
33	pT3pN2MxGIV	amputation	71
34	pT3pN2MxGII	amputation	56
35	pT2pN0GII	excision	50

3.1 A HPV státusz meghatározása

A továbbiakban a retrospektív molekuláris vizsgálatokhoz a paraffin blokkokból 10 µm-es szövetmetszetek készültek, amikből a deparaffinálás után totál DNS kivonást végeztünk HPV kimutatás céljából. A DNS kivonásához a sejteket QIAGEN sejtfeltáró készülékkel (TissueLyser, Qiagen, Biomarker Ltd. Hungary) tártuk fel, majd a finomabb struktúrák bontását enzimatikus emésztéssel (Proteinase-K) végeztük. A DNS preparálása QIAGEN kittel (QIAmp DNA FFPE Tissue Kit) történt, a gyártó utasításainak megfelelően. A HPV örökítő anyagának kimutatását vírus-specifikus TaqMan próbával (DiaSTD HPV Screening Kit, DIAGON) polimeráz lánreakció (PCR) alkalmazásával erősítettük fel, amely alkalmas a HPV minden genotípusának egyidejű kimutatására. A méréseket LineGene 9600-as valós-idejű PCR készülékkel végeztük, ahol az 530 nm-en megjelenő fluoreszcens jel detektálásával igazoltuk a mintában a HPV virális nukleinsav jelenlétét.

3.2 Szöveti microarray (Tissue microarray, TMA)

A vizsgálat során a karcinómát tartalmazó paraffin blokkokat használtunk fel tissue microarray (TMA) készítéséhez. A tumoros blokkokból készített hematoxilin-eozinnal festett metszetek áttekintése során kijelöltük a mintavétel helyet. Ezt követően a kijelölt területnek megfelelően a paraffinba ágyazott szövetblokkból Manual Tissue Arrayer (MTA1, Beecher Instruments, Inc. Sun Prairie, USA) készülék segítségével 0,6 mm átmérőjű szövethengereket emeltünk ki. Minden egyes tumorból, de különösen a különböző morfológiájú vagy grádusú területekkel rendelkező tumorokból több (3-5) mintát vettünk. Az így nyert szövethengereket az MTA1 készülék segítségével egy közös paraffin blokkba ágyaztuk be, lehetővé téve az összes vizsgált tumor egy metszeten történő egyidejű vizsgálatát. (5. Ábra).



5. Ábra. Példa a TMA-ra 150 tumor mintával.

3.3 Immunhisztokémia

A TMA-ból készített 4 μm vastagságú metszetekből a paraffint xilol segítségével eltávolítottuk, majd a metszeteket leszálló etanol sorozatban rehidráltuk. Ezt követően az antigén feltárás 10 mM nátrium-citrát pufferben (pH 6,0) vagy TE pufferben (pH 9,0) történő kezeléssel értük el, amit a 2100-Retriever (Pick-Cell Laboratories, Amsterdam, Hollandia) készülékben végeztünk el.

Az endogén peroxidáz aktivitás és a nem specifikus kötőhelyek blokkolása 1% normál ló szérumot tartalmazó 3%-os hidrogénperoxidban történt szobahőmérsékleten 10 percig. Ezt követően a metszeteket a primer antitesttel nedves kamrában 4°C-on inkubáltuk.

A következő antitesteket használtuk fel:

- **nyúl anti-TLR4 antitest** (PA5-23124, Thermo-Fisher Scientific, Budapest, Hungary) 1:100 hígításban;
- **nyúl anti-mTOR antitest** (PA5-34663, Thermo-Fisher), 1:100 hígításban;
- **nyúl anti-RARRES1 antitest** (PA5-22310, Thermo Fisher), 1:200 hígításban;

- **nyúl anti-MMP12 antitest** (NBP1-31225, Novus Biologicals, Littleton, CO, USA), 1:250 hígításban.

Harminc percig történő HRP konjugált anti-nyúl másodlagos antitest (MACH4 Universal HRP-Polymer, Biocare Medical, Concord, USA) alkalmazását követően az előhívás AEC szubsztrát és DAB (DAKO Glostrup, Danemark) segítségével történt, majd a metszeteket Mayer hematoxilinnel festettük.

A következő antitestek detektálását a Leica Bond Max Autostainerben végeztük el:

- **nyúl monoklonális anti-P53 antitest** (SP5, Thermo-Fisher) 1:200 hígításban;
- **nyúl monoklonális anti-p16 antitest** (R19-D, DB Biotech) 1:100 hígításban;
- **egér monoklonális anti-EZH2 antitest** (6A10, Novocastra, Leica) 1:200 hígításban,
- **egér monoklonális anti-Vimentin antitest** (V9, Boehringer-Manheim, Mannheim) 1:1000 hígításban;
- **egér monoklonális anti-E-Cadherin antitest** (NHC-38, DAKO) 1:200 hígításban.

Végül a metszetek kétszeres kiértékelése történt a klinikai adatok ismerete nélkül. A kiértékelést Leica LaborluxS mikroszkóppal végeztük a fotókat Leitz DMRBE mikroszkópra helyezett ProgRes C14 kamerával készítettük.

3.3.1 Az immunhisztológiai reakciók kiértékelése

A TLR4, P16ink4a és P53 immunhisztológia eredményét két alkalommal értékeltük ki a HPV státusz ismerete nélkül. Az EZH2, mTOR, RARRES1, MMP12 kiértékelése a tumorok progressziójának ismerete nélkül történt. Mivel ezekkel az antitestekkel a pozitív sejtek aránya 80%-fölött volt, a százalékos arányt nem értékeltük ki paraméterként. Az értékelés kizárólag a reakció intenzitásán alapult: hiányzó, gyenge, közepes és erős festődés. Az E-cadherin valamint a vimentin immunhisztológia kizárólag egy-két esetben volt pozitív, így nem került kiértékelésre.

3.3.2 Statisztikai módszer

A HPV pozitivitás, TLR4, p53 és p16 expresszió közötti összefüggést Pearson's Chi square teszttel értékeltük. Az eredményt akkor tartottuk szignifikánsnak, ha a p érték 0.05 alatt volt. A számításokat az SPSS (IBM Corporation, New York, USA, v24.0) programmal végeztük el (Fisher Exact Test).

4. Eredmények

A vizsgálati időszakban összesen 47 beteg estében távolítottuk el a primer tumort, illetve 35 esetben a regionális nyirokcsomót, 24 esetben végeztünk dinamikus szentinel nyirokcsomó meghatározást. Az alkalmazott DNS preparálási módszerrel megfelelő mennyiségű és minőségű nukleinsavat sikerült kinyernünk, amelyet a továbbiakban a virális nukleinsav kimutatásához használtunk fel. Az végleges vizsgálatokban 35 beteg primer tumor és nyirokcsomó mintáit teszteltük párhuzamosan. Természetesen azon betegek anyagainak összehasonlítására nyílt csak lehetőség, akiknél mind a primer tumor, mind pedig a regionális nyirokcsomó (akár szentinel nyirokcsomó, akár lymphadenectomiás anyag) rendelkezésre állt, illetve HPV pozitivitást tudtunk kimutatni.

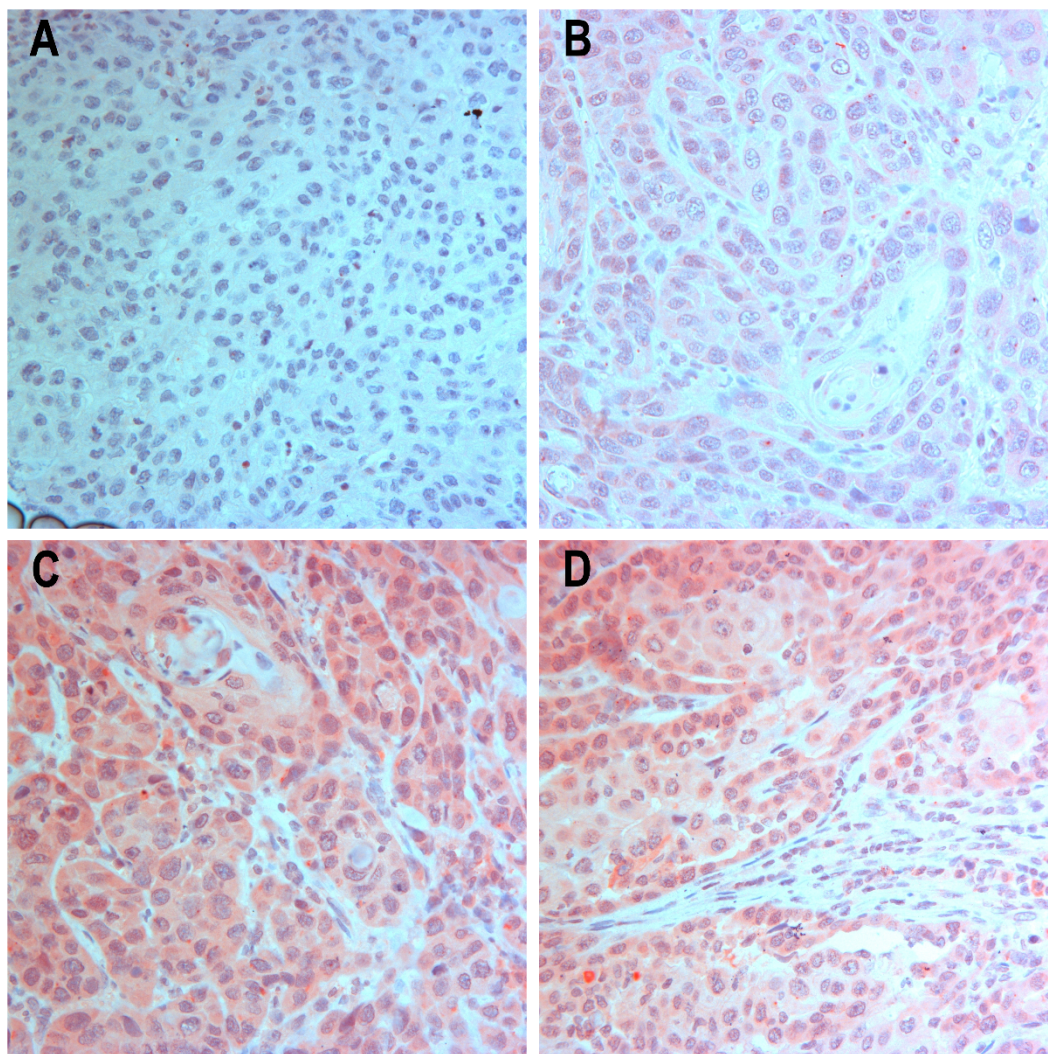
A saját beteganyagon elvégzett klinikai vizsgálat során a sikerrel bevont 31 betegnél összességében 16 esetben tudtunk a primer daganatból magas malignitású HPV DNS-t izolálni, és 3 esetben tudtunk a hozzá tartozó regionális (inguinalis) nyirokcsomókból HPV-t kimutatni. A további molekulár biológiai vizsgálatok, illetve tipizálási folyamatok során a 16 magas malignitású HPV pozitív primer daganatos beteg közül 13 esetben tudtuk a magas szenzitivitású vizsgáló módszerrel a tipizálást elvégezni. A tipizálás során összesen 10 betegnél (76,92%) HPV 16 szubtypus, 3 esetben (23,07%) HPV 51, 82, 59 szubtypusok igazolódtak. Azon 3 betegnél, akiknél mind a primer, mind pedig a nyirokcsomó HPV analízise pozitív eredménnyel zárult megegyező HPV 16 szubtypust tudtunk kimutatni.

A molekulár biológiai eredmények mellé rendelt klinikai, illetve patológiai vizsgálatok során a magas malignitású HPV pozitív esetek 47%-ban pTa-pT1, míg 53%-ában pT2-pT4 stádiumú lokális folyamatok igazolódtak. A klinikai vizsgálat rámutatott arra, hogy azon 3 beteg, akiknél mind a primer, mind pedig a regionális nyirokcsomó pozitív volt, a primer daganat lokálisan előrehaladott (pT3-pT4), illetve kismedence nyirokcsomó pozitivitást eredményezett. Mind a 3 betegnél kiterjesztett primer daganat eltávolítást (emasculinisatio) voltunk kénytelenek elvégezni, a rendelkezésre álló staging, illetve patológiai eredmények, a folyamat rapid előrehaladása miatt adjuváns kemoterápiás kezelés lett volna szükséges, azonban a betegek rossz kompliance miatt a további onkológiai kezelés nem valósult meg.

4.1. A TLR4, P53 és P16^{ink4a} immunhisztológiai vizsgálata hímvesző daganatokban

4.1.1. TLR4

A TLR4 diffúz kifejeződést mutatott 17 hímvesző daganatban, míg 14 esetben nem találtunk immunreakciót (6. Ábra). 16 HPV pozitív hímvesző daganatból csak 4 mutatott TLR4 pozitivitást, ugyanakkor a 15 HPV negatív daganatból 13 tumorban találtuk meg a TLR4 gén kifejeződését. A Pearson's Chi square teszt szignifikans inverz korrelációt mutatott a HPV pozitivitás és TLR4 immunreakció között ($p=0.0006$).

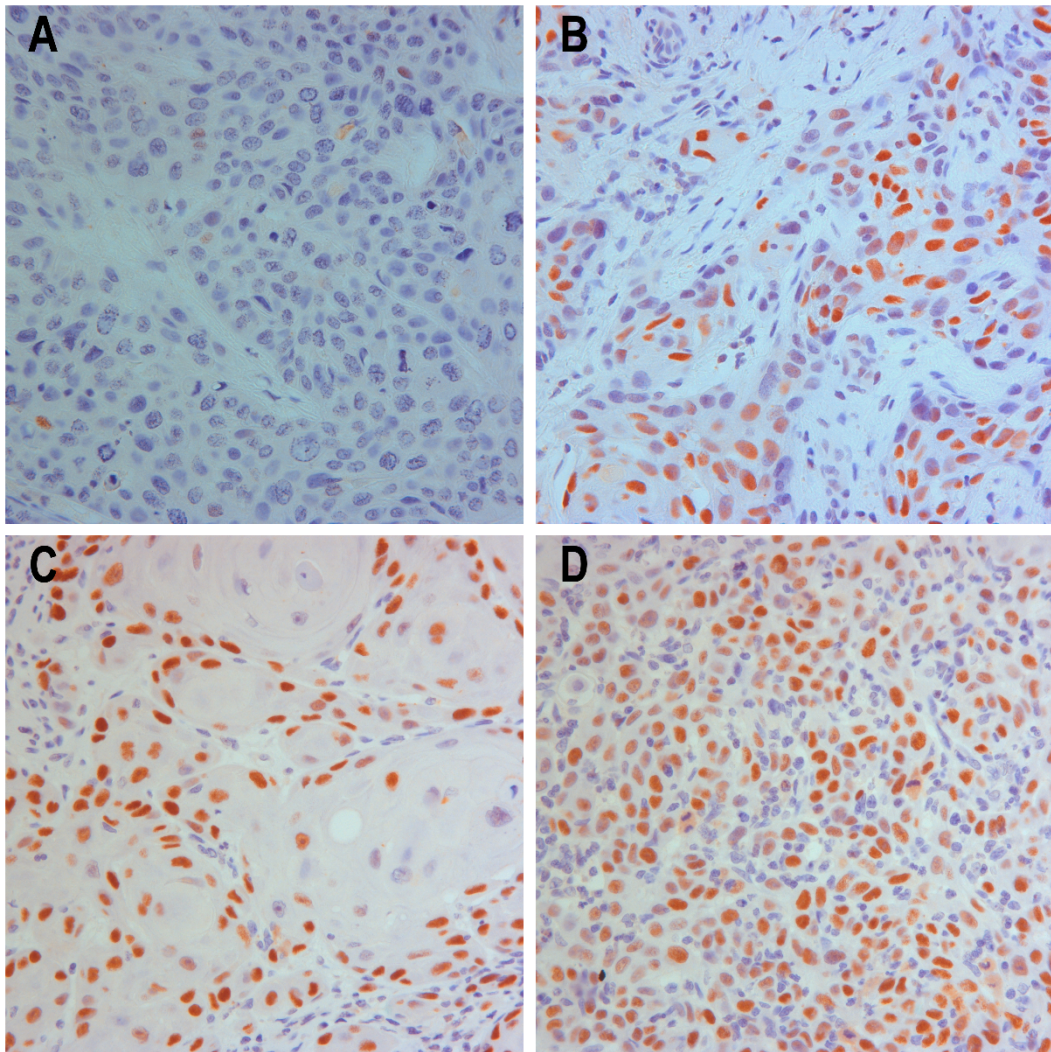


6. Ábra. A TLR4 immunhisztológiai vizsgálata. **A**, Hiányzó TLR4 kifejeződés anaplasztikus laphámrákban. **B**, Enyhe citoplazmatikus TLR4 pozitivitas. **C**, közepes intenzitású immunreakció a TLR4 antitesttel. **D**, Erős citoplazmatikus TLR4 pozitivitást mutató infiltratív hímvesző daganat.

Pozitív festődésű makrofágok a tumor stromájában (nyíl).

4.1.2. P53

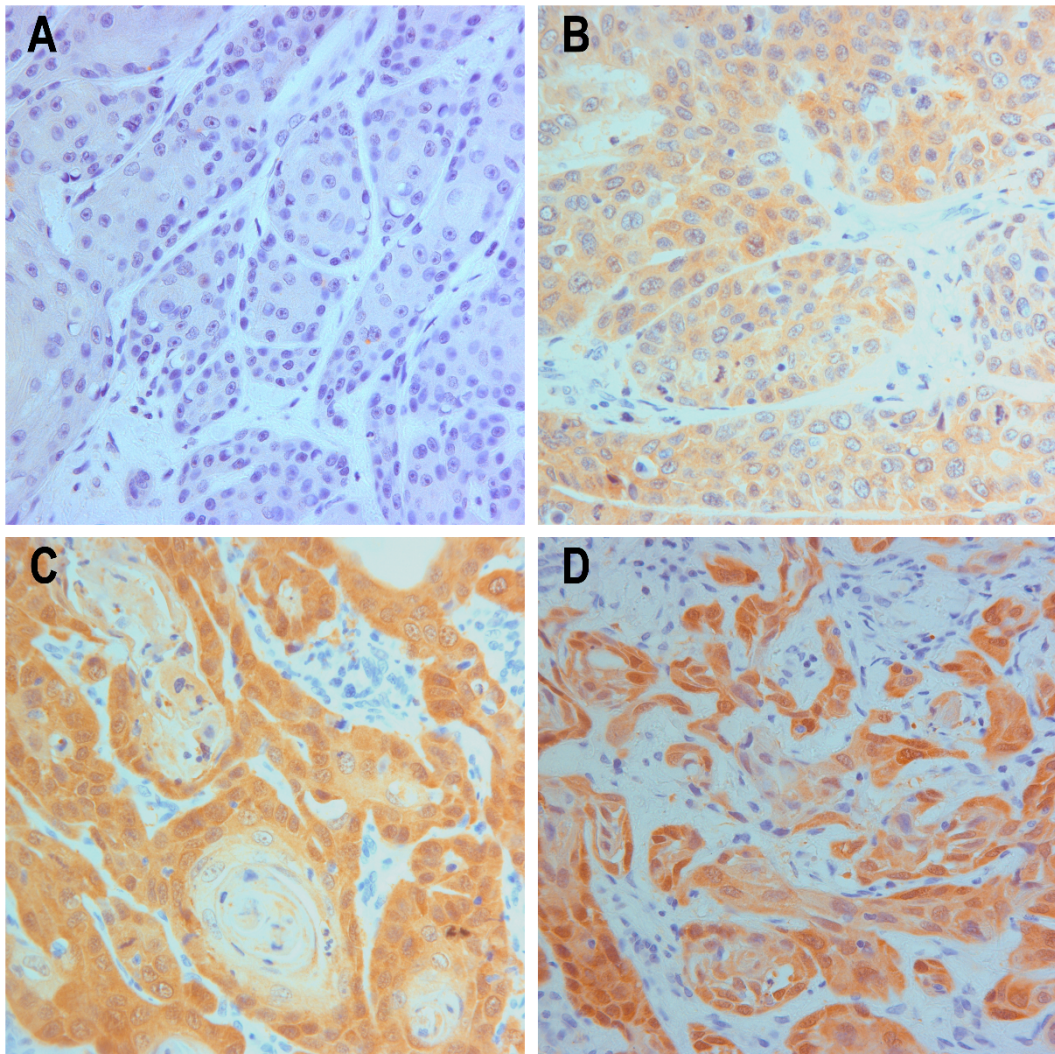
A p53 immunhisztológiai vizsgálata 16 hímvesző karcinómában közepes vagy erős intenzitású magfestést mutatott (7. Ábra). A 16 HPV pozitív hímvesző daganat közül csak 5 tumor mutatott pozitív festődést a p53 antitesttel. A másik oldalon 15 HPV negatív tumorból 11-ben (73%) tudunk erős és diffúz sejtmag pozitivitást kimutatni. A Pearson's Chi square teszt szignifikáns korrelációt mutatott a hiányzó HPV integráció és p53 immunreakció között ($p=0.0191$).



7. Ábra. A p53 tumor szupresszor protein immunhisztológiai vizsgálata. **A**, Hiányzó p53 immunreakció anaplasztikus hímvesző laphámrákban. **B**, Pozitív p53 festődés a sejtmagok 50-60%-ában. **C**, Intenzív p53 nukleáris immunreakció egy elszarusodó laphámrákban. **D**, Erős sejtmag pozitivitást mutató anaplasztikus infiltratív hímvesző daganat

4.1.3. P16^{ink4a}

Kifejezett p16INK4a immunreakciót figyeltünk meg 10 hímvesző daganat cytoplazmájában, illetve a tumor sejtmagban is (8. Ábra). Mindegyik p16INK4a pozitív malignoma HPV pozitív volt. Ezzel ellentétben a HPV negatív hímvesző daganatok nem mutattak p16INK4a immunreakciót. Pearson's Chi square teszt szignifikáns korrelációt mutatott a HPV pozitivitás és a p16INK4a fehérje kifejeződése között ($p=0.0002$).



8. Ábra. P16^{ink4a} immunhisztológiai vizsgálata. **A**, Hiányzó P16^{ink4a} kifejeződés anaplasztikus hímvesző laphámrákban. **B**, Diffúz, közepes intenzitású P16^{ink4a} immunreakció infiltratív hímvesző daganatsejtek cytoplazmájában. **C**, Intenzív citoplazmatikus P16^{ink4a} immunreakció, egy-egy tumor sejtben sejtmag pozitivitással. **D**, Erős sejtmag pozitivitást mutató infiltratív hímvesző daganat (nyíl).

4.1.4. A virológiai és immunhisztológiai (TLR4, p16^{ink4a} és p53) vizsgálatok eredménye

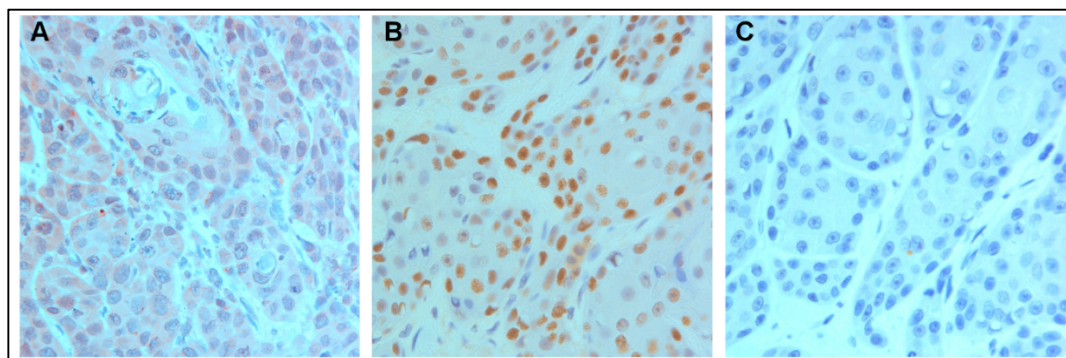
5. Táblázat.

Eset	TNM-G	HPV/ szubtípus	TLR4	p16 ^{ink4a}	p53
1	pT2,N0,Mx,G3	pos/16	0	1	1
2	pT2,N0,Mx,G2	pos/16	1	1	0
3	pT2,N0,Mx,G3	pos/16	0	1	0
4	pT1,N0,Mx,G2	pos/16	0	0	0
5	pT2,N0,Mx,G2	pos/16	0	0	0
6	pT1,N3,Mx,G3	pos/16	1	1	1
7	pT1,N0,Mx,G1	pos/16	0	1	1
8	pT4,N2,Mx,G3	pos/16	1	1	0
9	pT4,N2,Mx,G3	pos/16	0	0	0
10	pT3,N1,Mx,G3	pos/16	0	0	0
11	pT1,N0,Mx,G3	pos/59	1	1	1
12	cis	pos/51,82	0	1	0
13	pTa,N0,Mx,G1	pos/82	0	0	0
14	pT1,N3,Mx,G3	pos/na	0	1	1
15	pT3,N0,Mx,G3	pos/na	0	0	0
16	pT3,N2,Mx,G3	pos/na	0	1	0
17	pT3,N2,Mx,G3	neg	1	0	1
18	pT2,N3,M1,G3	neg	1	0	0
19	pT1,N0,Mx,G1	neg	1	0	1
20	pT2,N2,Mx,G1	neg	0	0	0
21	pT1,N0,Mx,G1	neg	0	0	1
22	pT3,N2,Mx,G2	neg	1	0	1
23	pT1,N0,Mx,G1	neg	1	0	1
24	pT1,N2,Mx,G2	neg	1	0	1
25	pT1,N0,Mx,G3	neg	1	0	0
26	pT2,N2,Mx,G3	neg	1	0	1
27	pT2,N0,Mx,G2	neg	1	0	1
28	pT1,N0,Mx,G2	neg	1	0	1
29	pT1,N0,Mx,G1	neg	1	0	1
30	pT1,N0,Mx,G2	neg	1	0	0
31	pT3,N2,Mx,G3	neg	1	0	1

na - nem vizsgált; 0 - negatív; 1 - pozitív (Damásdi M et al. Anticancer Res. 2017; 10:5515-5519)

4.2 A HPV pozitivitás valamint a TLR4, P16^{INK4a} és p53 közötti összefüggés

A HPV integráció és a három gén expressziójának összehasonlítása során két tumor csoportot tudunk elkülöníteni. A HPV negatív tumor csoportban 10 hímvesző daganat volt mind TLR4-re mind p53-ra pozitív. A két marker koexpressziója szignifikáns volt ($p=0.0198$). A HPV pozitív hímvesző daganatok pozitív immunreakciót mutattak a P16^{INK4a} antitesttel, míg a HPV negatív esetekben nem tudunk P16^{INK4a} pozitivitást kimutatni. Nemcsak a HPV kimutatása, hanem a három gén kombinált kifejeződése is egyértelműen meghatározta a hímvesző daganat különböző kialakulásának a valószínűségét (9. Ábra).



9. Ábra. A TLR4, p53 és P16^{INK4a} immunhisztológiája hímvesző karcinómában. **A**, pozitív TLR4 festődés a sejtek citoplzmájában. **B**, Erős p53 pozitivitás a tumor sejtek magjában. **C**, Hiányzó immunreakció a P16^{INK4a} antitesttel.

4.3 Tumor progresszióhoz társuló markerek immunhisztológiája

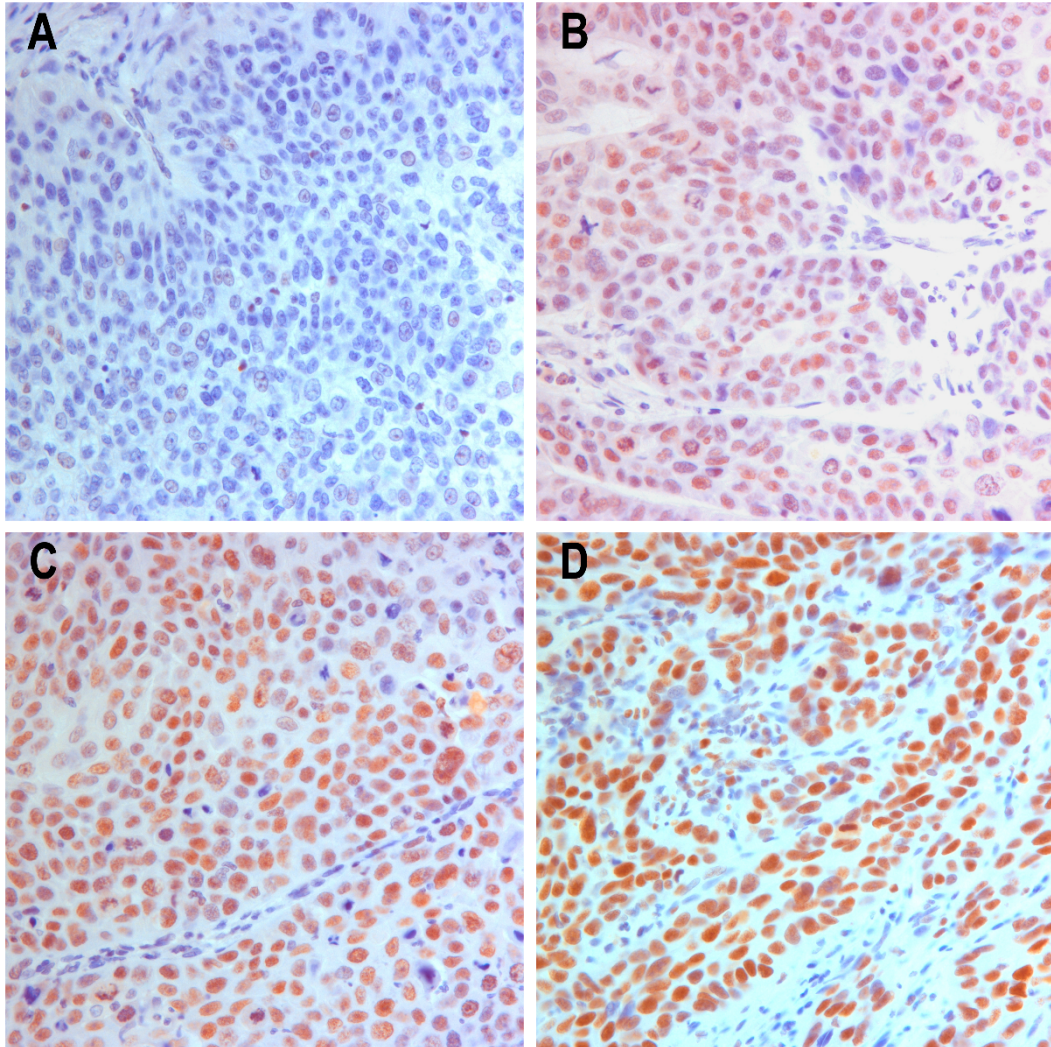
Számos tumor progresszióhoz társított marker közül kiválasztottuk azokat, amelyeket még nem, vagy csak ritkán néztek meg hímvesző tumorokban. A progresszióval összefüggést mutató gének (EZH2, mTOR és RARRES1) kifejeződését az 6. Táblázatban mutatjuk be.

6. Táblázat. A virológiai és immunhisztológiai (EZH2, mTOR és RARRES1) vizsgálatok eredménye.

Eset	TNM-G	HPV/ szubtípus	EZH2	mTOR	RARRES1
1	pT2,N0,Mx,G3	pos/16	0	1	1
2	pT2,N0,Mx,G2	pos/16	1	1	0
3	pT2,N0,Mx,G3	pos/16	0	1	0
4	pT1,N0,Mx,G2	pos/16	0	0	0
5	pT2,N0,Mx,G2	pos/16	0	0	0
6	pT1,N3,Mx,G3	pos/16	1	1	1
7	pT1,N0,Mx,G1	pos/16	0	1	1
8	pT4,N2,Mx,G3	pos/16	1	1	0
9	pT4,N2,Mx,G3	pos/16	0	0	0
10	pT3,N1,Mx,G3	pos/16	0	0	0
11	pT1,N0,Mx,G3	pos/59	1	1	1
12	cis	pos/51,82	0	1	0
13	pTa,N0,Mx,G1	pos/82	0	0	0
14	pT1,N3,Mx,G3	pos/na	0	1	1
15	pT3,N0,Mx,G3	pos/na	0	0	0
16	pT3,N2,Mx,G3	pos/na	0	1	0
17	pT3,N2,Mx,G3	neg	1	0	1
18	pT2,N3,M1,G3	neg	1	0	0
19	pT1,N0,Mx,G1	neg	1	0	1
20	pT2,N2,Mx,G1	neg	0	0	0
21	pT1,N0,Mx,G1	neg	0	0	1
22	pT3,N2,Mx,G2	neg	1	0	1
23	pT1,N0,Mx,G1	neg	1	0	1
24	pT1,N2,Mx,G2	neg	1	0	1
25	pT1,N0,Mx,G3	neg	1	0	0
26	pT2,N2,Mx,G3	neg	1	0	1
27	pT2,N0,Mx,G2	neg	1	0	1
28	pT1,N0,Mx,G2	neg	1	0	1
29	pT1,N0,Mx,G1	neg	1	0	1
30	pT1,N0,Mx,G2	neg	1	0	0
31	pT3,N2,Mx,G3	neg	1	0	1

na - nem vizsgált; 0 - negatív; 1 – pozitív

4.3.1 EZH2

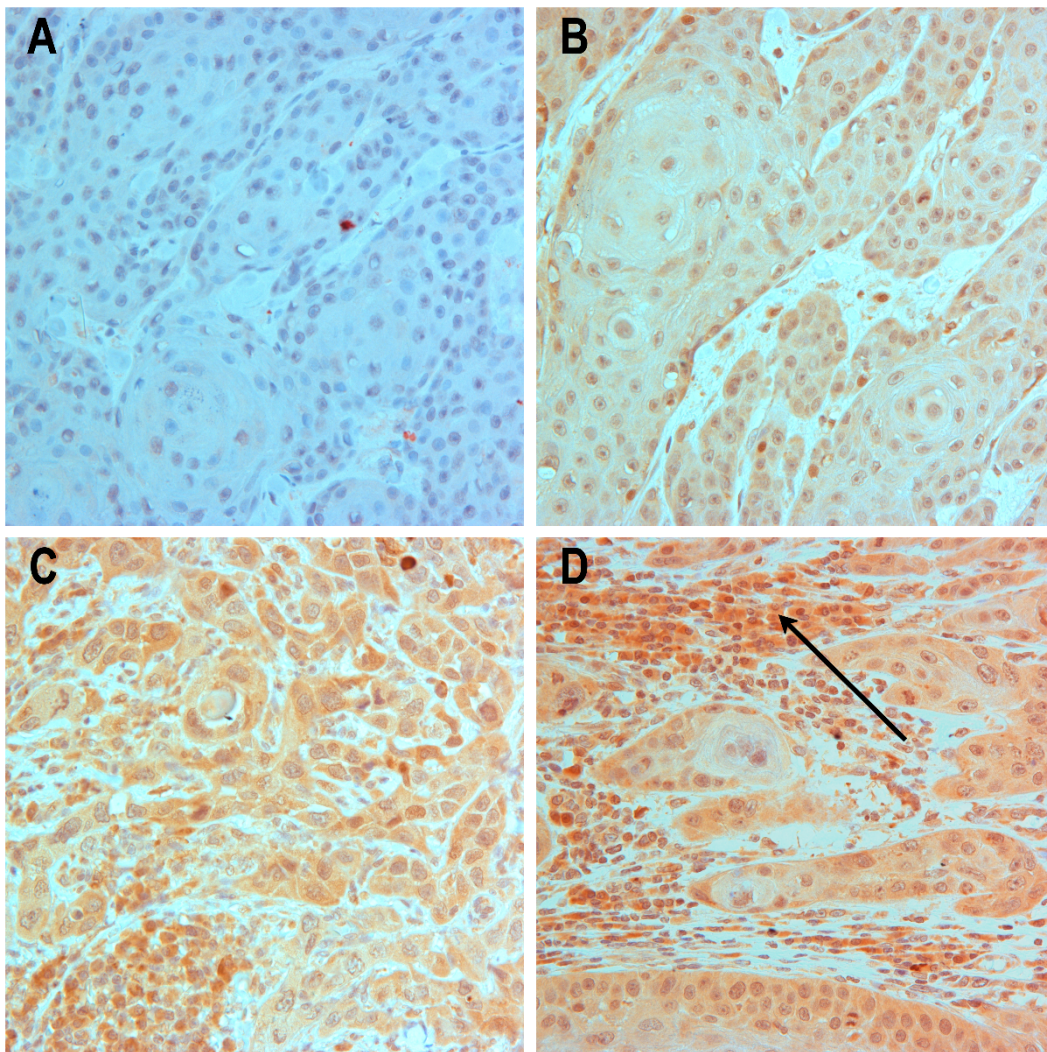


10. Ábra. Az EZH2 immunhisztológiai vizsgálata. **A**, Hiányzó EZH2 kifejeződés anaplasztikus laphámrákban. **B**, Enyhe EZH2 sejtmag pozitivitás. **C**, Közepes intenzitású immunreakció az EZH2 antitesttel. **D**, Erős sejtmag pozitivitást mutató infiltratív hímvesző daganat.

Az *EZH2* diffúz kifejeződést mutatott 17 hímvesző daganatban, míg 14 esetben nem találtunk immunreakciót (10. Ábra). A 9 progressziót mutató hímvesző daganat közül 8 volt pozitív *EZH2*-re (90%), míg a 22 nem progressziós hímvesző daganatból csak 8 esetben találtunk *EZH2* pozitivitást. Érdeemes megemlíteni, hogy a 14 *EZH2* negatív esetből csupán egyetlen hímvesző daganat progressziót mutatott. Az *EZH2* immunreakció és a hímvesző daganat progressziója a Fisher's Exact Teszt alapján szignifikáns összefüggést mutatott ki ($p=0.021$).

4.3.2 MMP12

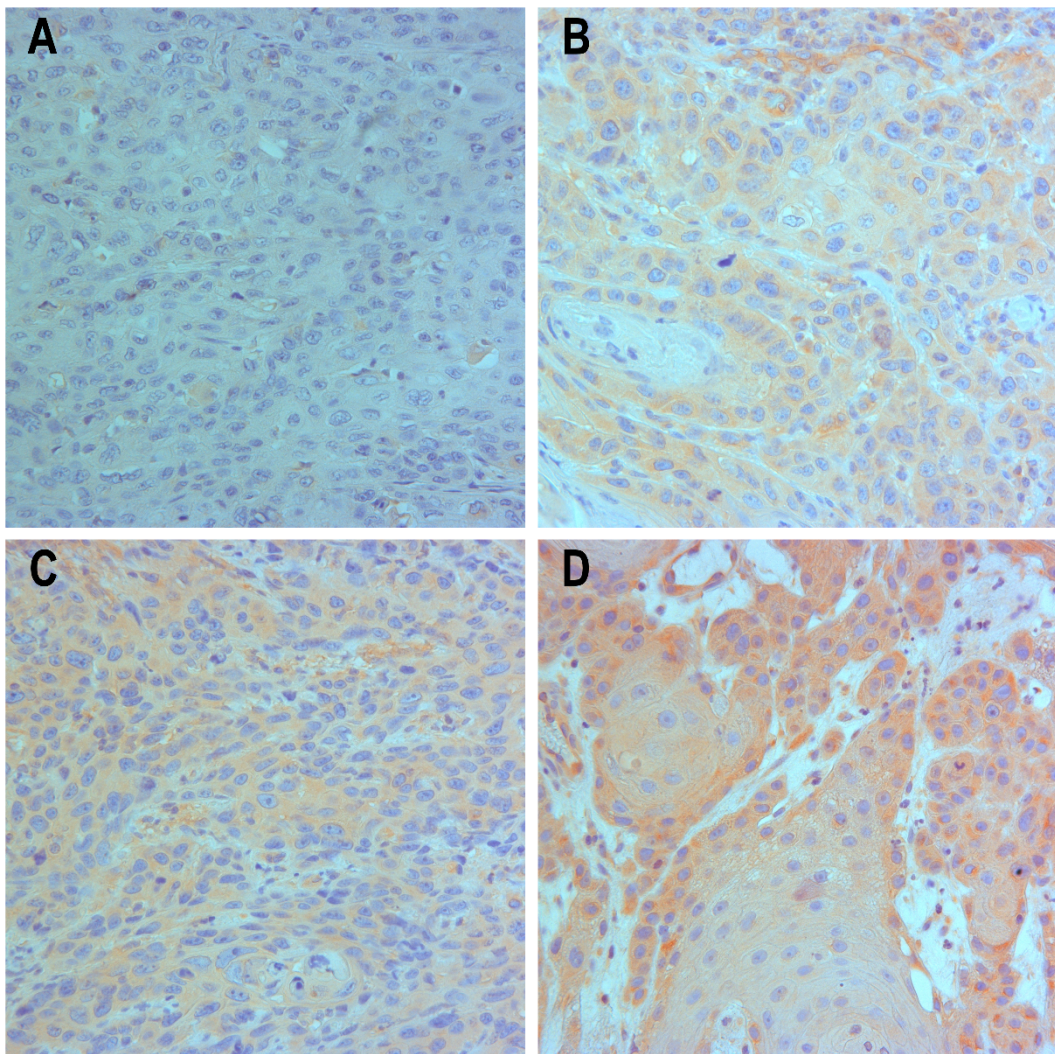
A human macrophage metalloproteinase MMP12 a legtöbb hímvesző tumorban kifejeződött, csak 7 tumor volt negatív. A jobban differenciált elszarusodó laphámrákok többnyire MMP12 negatívak voltak (11. Ábra, **A**). A tumor sejtek pozitivitása az enyhe festődéstől az erősen pozitív citoplazmatikus immunreakcióig változott (11. Ábra **B** és **C**). A 24 MMP12 pozitív esetből 9 hímvesző daganat progressziált (38%), míg a 7 negatív tumor remisszióban maradt. A tumorok stromájában különböző számban fordultak elő makrofágok, amelyek MMP12 pozitivitást mutattak (11.Ábra, **D**). A statisztika nem mutatott összefüggést az MMP12 pozitívítás és a hímvesző tumorok progressziója között.



11. Ábra. MMP12 immunhisztológia. **A**, Negatív MMP12 immunreakció egy elszarusodó laphámrákban. **B**, Gyenge MMP12 festődés figyelhető meg az infiltráló laphámrák citoplazmájában. **C**, Erős festődés egy anaplasztikus hímvesző laphámrákban. **D**, Enyhe MMP12 reakció a tumor sejtekben, de erőteljes MMP12 festődés a stromát infiltráló makrofágokban (nyíl).

4.3.3 mTOR

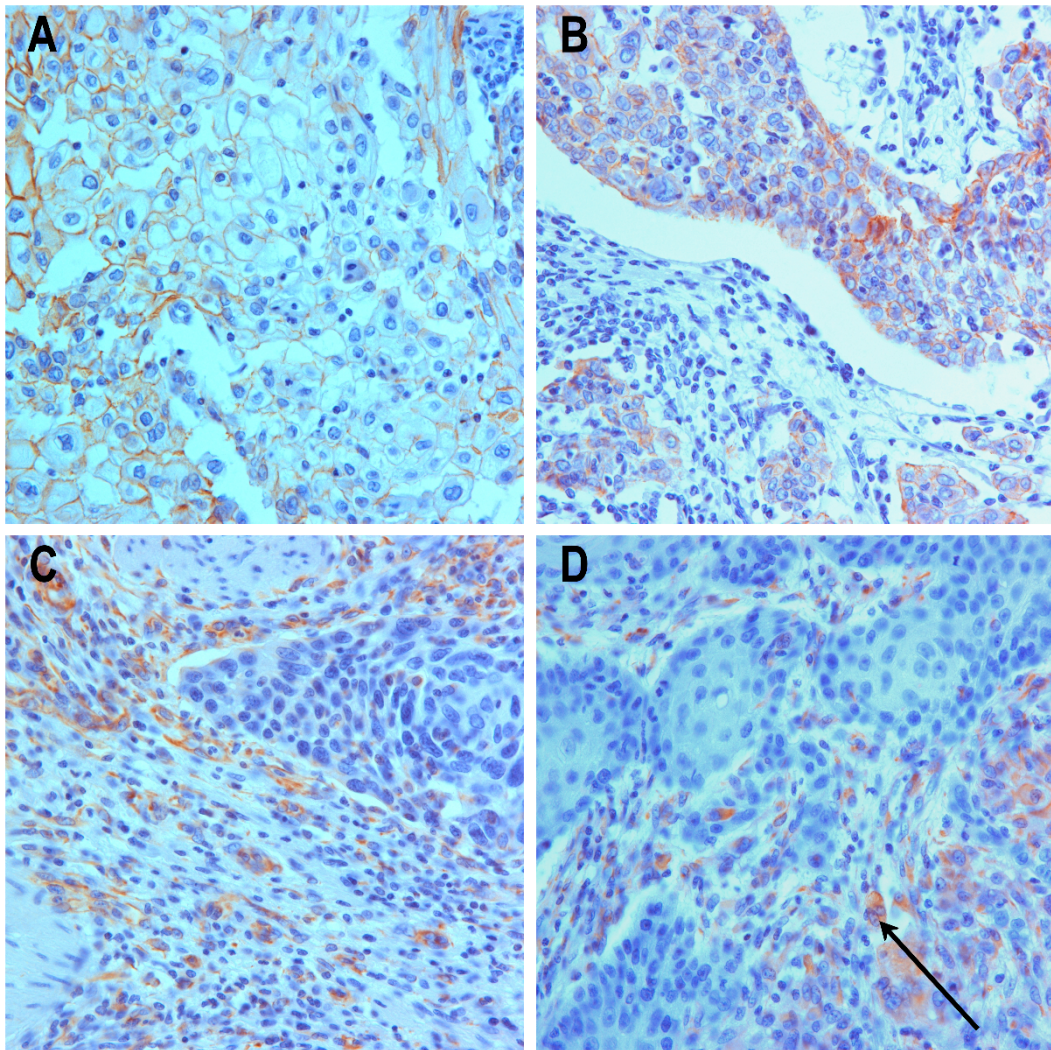
Diffúz mTOR pozitivitást találtunk 21 hímvesző daganatban. A pozitív festődés nem függött össze a tumorok szövettani típusával, a pozitív esetek közt mind anaplasztikus vagy jól differenciált elszarusodó laphámrák is előfordult. A 16 HPV pozitív tumorból 10 mTOR pozitív volt, ami ugyan nem szignifikáns, de valamilyen összefüggést sejtet. A 21 mTOR pozitív tumorból 9 progrediált 12 pedig remissziót mutatott. Nem találtunk szignifikáns összefüggést az mTOR pozitivitás és p53 pozitivitás között. Ellenben az mTOR expressziója és a tumorok progressziója közt szignifikáns összefüggést tudtunk kimutatni ($p=0.012$)



12. Ábra. mTOR immunhisztológia. **A**, Hiányzó mTOR immunreakció egy közepesen differenciálódott hímvesző daganatban. **B**, Közepes intenzitású mTOR immunreakció. **C**, Erős citoplazmatikus mTOR festődés egy anaplasztikus hímvesző daganatban. **D**, Elszarusodó laphámrák, különösen a széli infiltratív régiókban mutat mTOR pozitív festődést.

4.3.4 E-Cadherin és vimentin

A mi anyagunkban a minden napi rutinban használt és megbízhatóan működő E-cadherin és vimentin antitestet (13. Ábra) is megvizsgáltuk. A 31 hímvesző karcinómából csak 5 esetben figyeltünk meg E-cadherin pozitivitást (13. Ábra, **A** és **B**). Vimentin pozitívitás a legtöbb tumorban a stromális sejtekre vonatkozott (13. Ábra, **C**), vimentin pozitív tumor sejteket csupán egyetlen tumorban fedeztünk fel (13. Ábra, **D**).

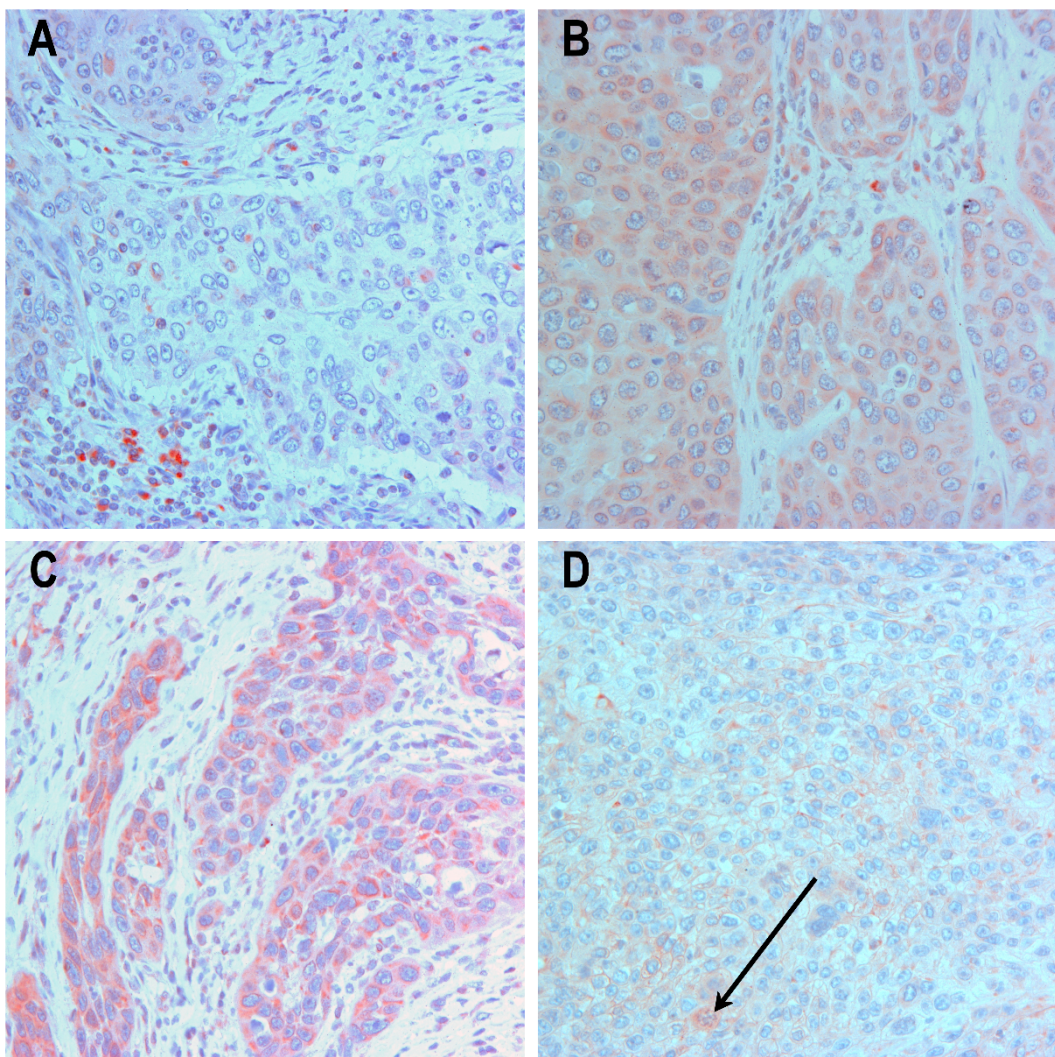


13. Ábra. E-cadherin és vimentin immunhisztológia. **A**, Gyenge E-cadherin festődés néhány tumor sejt membránján. **B**, Erőteljesebb E-cadherin pozitívítás a strómát infiltráló tumor sejtek felszínén.

C, Erős vimentin pozitívítást mutató stróma fibroblasztok. **D**, Néhány tumor sejtben közepes erősségű vimentin festődés (nyíl).

4.3.5 RARRES1

RARRES1 pozitívítást találtunk 16 hímvesző daganatban, 7 esetben erős immunreakciót figyeltünk meg a stromát infiltráló immunsejtekben. A RARRES1 pozitívítás nem függött össze a tumorok szövettani típusával, a pozitív esetek közt mind anaplasztikus vagy jól differenciált elszarusodó laphámrák is előfordult. A 16 HPV pozitív tumorból mindössze 5 mutatott pozitív immunreakciót, míg a 15 HPV negatív tumorból 11-ben találtunk RARRES1 pozitívítást. Szignifikáns összefüggés volt a hímvesző daganatok progressziója és a RARRES1 gén kifejeződése között ($p=0.045$).



14. Ábra. A RARRES1 gén immunhisztokémiai vizsgálata. **A**, A tumor sejtek nem adtak pozitív reakciót a RARRES1 antitesttel, pozitív festődést kizárólag a stromában lévő immunsejtek adtak. **B**, Diffúz, közepes intenzitású immunreakció a tumor sejtek cytoplazmájában. **C**, Intenzív RARRES1 reakció az infiltratív terjedő tumor sejtekben. **D**, Közepes intenzitású reakció a tumor sejtek és intenzív reakció a stromát infiltráló immunsejtekben (nyíl).

5. Megbeszélés

5.1 A HPV jelentősége a hímvesző daganatok kialakulásában

Mind a HPV asszociálta, mind pedig a HPV független mechanizmus a malignus hímvesző elváltozás folyamat irányába vezethet, különbözve abban, hogyan aktiválja a már jól ismert vírus onkogéneket (E6 és E7), vagy direkt módon aktivál tumor szupresszor gén inaktiváló mechanizmusokat. Néhány tanulmány összefüggést vélt felfedezni a primer tumor HPV vírus státusa és a daganatos betegség progressziója között. A HPV pozitív és negatív tumorok túlélési adatai között egyes tanulmányok szignifikáns különbséget tudtak kimutatni a HPV pozitív tumorok javára, azonban ezzel ellentétes tanulmányok is megjelentek, melyek nem tudtak kimutatni szignifikáns különbséget a HPV pozitív és negatív tumorok túlélési adatai között.

A hímvesző primer daganatának HPV érintettségét számos tanulmány vizsgálta, vizsgálja, annak prognosztikai faktorként történő értékelhetősége megosztja a szakmát.

Az első sikeres klinikai eredmények – az európai adatokkal hasonló módon - egyértelműen igazolták a HPV jelenlétét (55,4%) [Heidman D.A et al 2007] a hímvesző daganatokban, valamint a daganatokkal egy időben eltávolított regionális nyirokcsomókban. Az általunk elvégzett klinikai vizsgálatok az európai eredményekkel korrelálnak, a vizsgálati anyagban a HPV 16 szubtípus 76,92%-ban volt jelen, mely a méhnyakrákban a Közép-Kelet Európai régióban vizsgált nő populációban előforduló HPV 16-os szubtípus arányának megfelelő. A HPV pozitív esetek 53%-ban magas malignitású lokális patológiai stádiumba sorolhatók, ezen felül azon 3 beteg, akiknél mind a primer tumor, mind pedig az eltávolított nyirokcsomó blokk is pozitívnak bizonyult pT3-pT4 besorolást kapott. Következtetésként levonható, hogy a HPV asszociálta hímvesző malignus daganatok kórlefolysa a HPV negatív esetekhez képest rosszabb, illetve a nyirokcsomó pozitivitás esetén különösképpen rapid lefolyású.

Az eredmények a vizsgálatok folytatására, valamint a tumorokban jelenlévő vírusok pontosabb genotípus meghatározására ösztönzi kutatócsoportunkat. A 2008-ban FED engedélyt kapott férfi populáció négy-, illetve kilenc komponensű oltóanyagának alkalmazása a fenti klinikai vizsgálat tükrében feltétlenül indokolt

lenne, hiszen régióinkban a HPV 16/18-as típusok előfordulása messze gyakoribb az egyéb non-HPV 16-18-as típusokhoz képest. A további szűrőtesztek mellett, a pozitív mintákat először a magas kockázati csoportba tartozó HPV vírusokra, majd speciálisan a HPV 16/18 genotípusára kívánjuk szűrni a jövőben.

5.2 A TLR4 (toll-like receptor 4) protektív hatása a perzisztáló HPV infekciójával és a vírus nukleáris integrációjával szemben

Vizsgálataink során először mutattuk ki a HPV genomikus integrációja és a toll like receptor 4 (TLR4) közötti szignifikáns inverz korrelációt ($p=0.003$). Eredményünk felveti a TLR4 protektív szerepet a HPV infekcióval szemben. A szervezet immunrendszerének jelentős szerepe van a vírus infekciók kivédésében. Erre utal az a tény is, hogy a HPV pozitív méhnyak rák előfordulása sokkal gyakoribb immunszuppresszált egyéneknél. A toll like receptoroknak jelentős szerepük van a természetes immunreakciók kiváltásában vírus infekciók, köztük HPV infekció esetében [Daud II et al 2011].

Összesen 11 hasonló szerkezetű transzmembrán jelátvivő receptor TLR ismert. Amennyiben a TLR felismer egy idegen antigént, mint pl. egy vírus, aktiválja az NF- κ B szignál rendszert és a gyulladáscsökkentő citokinek valamint a természetes immunrendszer fehérjék kifejeződéséhez vezet [Carpenter S et al 2007]. Elmondhatjuk, hogy ellentétben az E6 és E7 vírus onkogénekkal a TLR4 szignál átvivő rendszer az immunreakciók megerősítéséhez vezet.

Talán a TLR4 szerepét a HPV infekcióval szemben akkor értjük meg a legjobban, ha figyelembe vesszük azt a tényt, hogy az esetek igen nagy többségében a HPV csak átmenetileg fertőzi meg a hámsejteket és csak kevés személyben alakul ki krónikus infekció [Walboomers JM et al 1999]. A HPV infekció esetén a TLR4 aktiválása az azonnali, nem specifikus természetes immunreakcióhoz vezet, az adaptív immunreakció csak később és lassan alakul ki [Frazer IH et al 2009]. Az azonnali természetes immunreakció attól függ, hogy a sejt azonosítani tudja a patogén vírust, mint idegen ágenszt. A TLR-k jelfelismerő receptorok, amelyek felismerik a patogén mikrobák konzervált komponenseit és elindítják az természetes immunreakciót. A TLR4 felismeri a Gram negatív baktériumok endotoxinját, a vírusokat, heat shock proteint, extracelluláris matrix komponenseket [Takeda K et al 2005]. A HPV felismerése esetén a TLR4

közvetített szignál az NFkB-n keresztül a gyulladáshoz vezető citokinek és természetes immunrendszer fehérjék kifejeződéséhez vezet [Faure E et al 2000; Kitchens RL et al 2005].

Érdekes megemlíteni a TLR4 védő szerepével kapcsolatban a HPV16 gyakori előfordulását magas kockázatú vírusok közül. HPV pozitív eseteink közül a HPV16 a tumorok 76,92%-ában fordult elő, míg a HPV51, HPV52 és HPV82 csak egy-egy esetben volt megfigyelhető. Ezt a különbséget azzal lehet megmagyarázni, hogy a HPV16 képes bizonyos esetekben az természetes immunreakciót kikapcsolni a TLR4 kifejeződés manipulálásával, és így a fertőzött sejtben tartósan megmarad, ami a genomikus beépülés egyik feltétele [Yang R et al 2005]. Erre utal az a megfigyelés is, hogy a HPV16 mintegy 50-szer gyakrabban fertőzi meg krónikusan a cervix hámsejteket, mint az egyéb magas rizikójú HPV típusok [Clifford G et al 2006; Schiffman M et al 2005]. A fej-nyaki laphámrákokban, hasonlóan a mi eseteinkhez, a TLR4 csökkent kifejeződését figyelték meg azokban a tumorokban, amelyekben a HPV integrációt ki tudták mutatni [Pannone G et al 2016]. Vizsgálataink hasonló eredményhez vezettek a hímvesző daganatban, a TLR4 kifejeződése egy szignifikáns inverz asszociációt mutatott a HPV pozitívitas tekintetében ($p=0.0006$).

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy a TLR4 expressziójának jelentős szerepe van a HPV vírus fertőzés leküzdésében.

5.3 A hímvesző daganatok vírus- és nem-vírus okozta kialakulásának folyamata

A hímvesző daganatok ritkasága miatt viszonylag kevés tanulmány foglalkozik a betegség molekulárbiológiai hátterével. A rendelkezésre álló tanulmányok szerint két alapvető út vezethet a daganatos betegség kialakulásához: *vírus-, és nem-vírus indukálta út*. Vizsgálati anyagunk 51,61%-ában találtunk HPV pozitívitas, amelyhez szignifikáns módon a p16^{INK4a} fokozott kifejeződése társult. A daganatok másik közel 50%-ában a TLR4 valamint p53 kifejeződése dominált. Ez megegyezik a már korábban feltételezett két molekuláris mechanizmussal, amelyeknek a hímvesző daganatok kialakulásában jelentős szerepet tulajdonítanak: **1.** a HPV fertőzés okozta daganatképződés illetve **2.** az úgynevezett

környezeti faktorok (fitymaszűkület, dohányzás, rossz higiéniai állapot, krónikus gyulladás) által okozott hímvesző daganat.

A vírus indukálta tumor keletkezés. A jelenleg rendelkezésre álló irodalmi adatok a HPV malignus folyamat kialakulását a vírus az epithel sejtbe történő integrációjában, a sejt DNS-ének manipulálásában látják a magyarázatot. A HPV mediálta pénisz daganatok létrejöttének elő lépése a HPV asszociálta premalignus állapotok kialakulása. A vírus genom úgynevezett korai (E) régiókat – ezek kódolják a replikációhoz, regulációhoz és a host-sejt sejtmagjának, cytoplasmájának átalakulását - és késő (L) régiókat – ezek kódolják a kapszid fehérjét – tartalmaz. A fent említett E régió kódolta E6-7 fehérje termékeknek rendkívül fontos szerepe van a vírus kiváltotta karcinogenezisben, hiszen az E6 és E7 fehérjék a p53 és RB tumorszupresszor gének termékeihez kapcsolódva azokat inaktiválják.

A hímvesződaganatok közel felében a betegség kialakulását a magas kockázatú („onkogenetikus”) HPV (hrHPV) vírus, azok altípusai közül is a HPV-16-os altípus genomikus integrációja váltja ki. Ez kontrollálatlan sejtosztódáshoz, csökkent apoptózishoz, kromoszóma instabilitáshoz vezethet. Gyakrabban előforduló sejtszintű elváltozások a daganatos betegség lefolyásában a későbbiekben előforduló megváltozott gén expresszió miatt létrejövő fokozódó progresszió, invázió, angiogenezis, metasztatizáló hajlam. A sejtosztódásban és az apoptózisban bekövetkező zavarok a sejt kromoszóma állományának instabilitását, és a későbbi karcinogenezis beindulását vetítik elő.

Hasonló folyamatot indít el a HPV (elsősorban HPV-16) vulva daganatoknál. Meg kell azonban említeni azt, hogy míg a vulva daganatok sajátos korelációt mutatnak – a HPV mediálta daganatos betegségek korábbi életkorban, míg a nem HPV mediálta, asszociálta folyamatok később a hetedik-, nyolcadik évtized környékén eredményeznek malignus elváltozásokat. Hasonló jellegű patogenezis látható a fej-nyak daganatoknál.

Nem vírus alapú tumor keletkezés. A hímvesző daganatok azon csoportja, mely nem HPV infekció talaján, hanem olyan állapotok talaján alakul ki, mint krónikus gyulladás, fitymaszűkület, UV-A fototerápia és lichen sclerosis. A nem HPV-

asszociált hímvesző daganatok esetében a p53 alterációja és promóter metilációja nagyobb gyakorisággal fordul elő, mint a HPV asszociálta esetekben. Több klinikai tanulmány beszámol a nonvirális útról, mint pl. p14^{ARF}/MDM2/p53 termékek módosulása, melyek a HPV infekciótól függetlenül daganatok kialakulásához vezetnek. A HPV integrációtól független daganatban a p53 fehérje gyakori és fokozott expresszióját és a p16^{ink4a} kifejeződésének a hiányát írták le. Vizsgálatunk során szoros összefüggést találtunk a HPV fertőzés és p16^{ink4a} fokozott kifejeződése között, amelyek a daganatok “virális” csoportját jellemezték. A másik csoportot a TLR4 fokozott kifejeződése és a HPV integráció hiánya jellemezte. Ebben a csoportban szignifikáns korreláció volt a HPV negativitás és p53 kifejeződése, valamint a TLR4 pozitívitás és p53 pozitívitás között ($p=0.02$).

Összefoglalva, mind a HPV asszociálta, mind pedig a HPV független mechanizmus a malignus folyamat irányába vezethet, különbözve abban hogyan aktiválja a már jól ismert vírus onkogéneket (E6 és E7), vagy direkt módon aktivál tumor szupresszor gén inaktíváló mechanizmusokat.

5.4 A hímvesző daganatok progressziójával összefüggő markerek

Korábbi vizsgálatok arra utaltak, hogy a HPV integráció valamint a p53 expresszió a tumorok progressziójával függ össze. A mi anyagunkban nem sikerült ezt megerősíteni, ezért megvizsgáltuk néhány már ismert, illetve a hímvesző daganattal eddig nem összefüggésbe hozott marker expresszióját.

Számos tumor a progresszió során a normális sejtekben és differenciálódott tumor sejtekben megfigyelt E-cadherin pozitivitást vimentin pozitívításra váltja, így gyakorlatilag az úgynevezett epitheliális-mesenchymalis átmenet jön létre, amelynek a tumorok progressziójában tulajdonítanak szerepet. Az irodalomban leírt epithelial-mesenchymal tranzíció (E-cadherin váltás vimentinre), mint a laphámrákok progressziójára utaló marker vizsgálataink alapján a hímvesző daganatok progressziójának megítélésére nem használható, mivel csak 5 esetben találtunk E-cadherin pozitivitást és csupán egy esetben sikerült vimentin pozitív tumor sejteket azonosítani, ennek megfelelően nem tudtuk megerősíteni Masferrer és munkatársai megfigyelését, akik a hímvesző daganatok 43%-ában E-cadherin-vimentin tranzíciót találtak (Masferrer et al. 2015).

A human makrophage metalloproteinaznak (MMP12) jelentős szerepet tulajdonítanak a bazális membrán és szöveti stroma azaz a IV. típusú kollagén, fibronectin, laminin és vitronektin leépítésében, így a tumor sejtek invazív növekedésében, metasztatikus tulajdonságában (Chandler et al. 1996). A laphamrákban is összefüggésbe hozták az MMP12 kifejeződését a tumor sejtek dedifferencialódásával és szövettani aggresszív növekedéssel (Kerkela et al. 2000). A mi anyagunkban az MMP12 kifejeződése nem mutatott korrelációt a hímvesző daganatok progressziójával.

Az „*enhancer of zeste homolog 2*” (*EZH2*) fokozott kifejeződését számos daganatban, többek között emlőrákban, húgyhólyag tumorban és prosztatarákban megfigyelték (Kleer et al. 2003; Varambally et al. 2002; Wang et al. 2012). Szoros összefüggést lehetett kimutatni a tumorok progressziója és a fokozott *EZH2* kifejeződése között. Az *EZH2* egy polycomb represszív komplex része és funkciója többek közt tumor szupresszor gének csendesítése (Tan et al. 2014), immunhisztológiai vizsgálata a tumorok nagyobb többségében enyhe, közepes vagy erős pozitivitást mutatott. Anyagunkban a 9 progressziót mutató hímvesző daganat közül 8 volt pozitív *EZH2*-re (90%) és a 14 *EZH2* negatív esetből csupán egyetlen hímvesző daganat progrediált. Az *EZH2* immunreakció és a hímvesző daganat progressziója a Fisher's Exact Teszt alapján szignifikáns összefüggést mutatott ki ($p=0.021$).

A retinoic acid receptor responder1 gene (*RARRES1*) vagy más nevén tazarotene-induced gene (*TIG*) expressziója különböző tumor típusokban ellentétes klinikai megfigyelésekhez vezetett. Statisztikailag szignifikáns korrelációt mutattak ki a *RARRES1* expressziója és az emlőrák progressziója között (Wang et al. 2013). Ez az adat, amelyet kísérletekkel is alátámasztottak, a *RARRES1* szerepét mutatja a tumor progresszióban. A másik oldalról mind prosztatrákban, fej-nyak tumorokban és endometriális daganatban a *RARRES1* hiányzó vagy jelentősen csökkent expressziója függött össze a tumor progressziójával (Jing C et al. 2002; Takai et al. 2005; Tokumaru et al. 2005). Ezek az adatok arra utalnak, hogy a *RARRES1*-nek tumor típus specifikus funkciója van. A hímvesző daganatok *RARRES1* fokozott expressziója a tumor progressziójával mutatott szignifikáns korrelációt ($p=0,09999$)

Az *mTOR* szignál átvitel szerepét számos daganat létrejöttében és progressziójában feltételezik, emellett a kezelésben potenciális molekuláris célként

javasolják blokkolását (Populo H et al. 2012). Az mTOR-gátlókat mint metasztázis gátlót alkalmazzák a fej-nyaki tumorok kezelésében és terápiás hatását már cervikális daganatban is tesztelték (Patel et al. 2011). Az mTOR szignálút aktiválását, azaz az mTOR expresszióját a hímvesző daganatok progressziójával hozták összefüggésbe. Anyagunkban szignifikáns összefüggést tudtunk kimutatni az mTOR expressziója és a tumorok progressziója között ($p=0.012$). Mivel az mTOR viszonylag gyakran (66%) kifejeződik a hímvesző daganatokban, az mTOR pozitivitást fel lehet használni az mTOR gátlók terápiás alkalmazásának eldöntésére.

Összefoglalva, három új prognosztikai markert azonosítottunk. A jövőben a vizsgálatainkba bevont daganatos esetek számának emelésére törekszünk és a RARRES1, mTOR es EZH2 kombinált vizsgálatával próbáljuk ezen gének prognosztikus értékét pontosabban meghatározni.

6. Következtetés

Összefoglalva, először mutattuk be a HPV fertőzés és a TLR4 expresszió közötti különbséget a hímvesző daganatban. A megnövekedett TLR4 expresszió HPV negatív tumorokat jelöl, a p16INK4a expresszió fokozódása pedig HPV pozitív hímvesző daganatos betegekben jelentkezik. Adataink arra utalnak, hogy a TLR4 receptor expressziója megvédi a vírusfertőzés tartós fennállását. A HPV-fertőzés és annak a p53-expresszióval való inverz kapcsolata a HPV-hez nem kapcsolódó patogenézisre utal. Vizsgálataink alapján az álabbi következtetésre jutattunk:

- A hímvesző daganatokban mintegy 76,92%-ban a HPV16-os szubtypus integrációnak van kóroki szerepe. A 2008-ban FED engedélyt kapott férfi populáció bivalens és quadrivalens oltóanyagainak alkalmazása a fenti klinikai vizsgálat tükrében feltétlenül indokolt lenne, hiszen régióinkban a HPV 16/18-as típusok előfordulása messze gyakoribb az egyéb non-HPV 16/18-as típusokhoz képest. A további szűrőtesztek mellett, a pozitív mintákat először a magas kockázati csoportba tartozó HPV vírusokra, majd speciálisan a HPV 16/18 genotípusára kívánjuk szűrni a jövőben.
- A rutin patológiai vizsgálatok során fel lehet használni a p16 pozitivitást a HPV integráció gyanújának felvetésére.
- Elsőként mutattuk ki, hogy a TLR4 receptort kifejező hámsejtek sokkal ellenállóbbak a krónikus HPV infekcióval és így a HPV integrációjával szemben. A TLR4 immunreakció elvégzését szeretnénk a hímvesző daganatok rutin hisztológiai vizsgálatába bevezetni.
- A HPV es p16 pozitívitás egy virális patomechanizmust, míg a TLR4 valamint a p53 kifejeződése egy non-virális tumor keletkezést támaszt alá.
- Az mTOR, EZH2 és RARRES1 immunhisztológiai kifejeződése szignifikáns korrelációt mutat a hímvesző daganatok progressziójával.
- Az mTOR a hímvesző daganatok két harmadában (66%) kifejeződik, így az mTOR pozitívitás esetén fel lehet vetni az mTOR gátlók terápiás alkalmazásának lehetőségét.

7. Irodalom

Al Ghazal A, Steffens S, Steinestel J, et al. Elevated C-reactive protein values predict nodal metastasis in patients with penile cancer. *BMC Urol* 2013;13:53.

Alves G, Heller A, Fiedler W, et al. Genetic imbalances in 26 cases of penile squamous cell carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2001;31: 48–53.

Az Egészségügyi Minisztérium szakmai protokollja a penis daganatok ellátásáról, 2006.

Az emberi papillomavírus szerkezete, fajtái és életfolyamata *Nőgyógyászati Onkológia* 2011; 16:103–110.

Bethune G, Campbell J, Rocker A, et al. Clinical and pathologic factors of prognostic significance in penile squamous cell carcinoma in a North American population. *Urology* 2012; 79:1092–7.

Bösze P. Az emberi papillomavírus szerepe a rákképződésben: alapvető sejten belüli molekuláris változások. *Nőgyógy onkol* 2008; 13:75–89.

Busso-Lopes AF, Marchi FA, Kuasne H, et al. Genomic profiling of human penile carcinoma predicts worse prognosis and survival. *Cancer Prev Res (Phila)* 2015; 8:149–56.

Carpenter S and O'Neill LAJ: How important are Toll-like receptors for antimicrobial responses? *Cellular Microbiology* 9: 1891-1901, 2007.

Chandler S, Cossins J, Lury J, Wells G. Macrophage metalloelastase degrades matrix and myelin proteins and processes a tumour necrosis factor-alpha fusion protein *Biochem Biophys Res Commun.* 1996 Nov 12; 228 (2):421-9.

Chaux, A., et al. The prognostic index: a useful pathologic guide for prediction of nodal metastases and survival in penile squamous cell carcinoma. *Am J Surg Pathol*, 2009. 33: 1049.

Clifford G, Franceschi S, Diaz M, Munoz N and Villa LL: HPV type-distribution in women with and without cervical neoplastic diseases. *Vaccine* 24: S26-34,2006.

Cubilla, A.L. The role of pathologic prognostic factors in squamous cell carcinoma of the penis. *World J Urol*, 2009. 27: 169.

Curado, M.P.; Edwards, B.; Shin, H.R; Storm, H.; Ferlay, J.; Heanue, M. & Boyle, P. Cancer incidence in five continents. IARC Scientific Publications, Vol. IX, No. 160, ISBN 978-92-832-2162-3, 2007, Lyon, France

Daling JR, Madeleine MM, Johnson LG, Schwartz SM, Shera KA, Wurscher MA, Carter JJ, Porter PL, Galloway DA, McDougall JK, Krieger JN. Penile cancer: importance of circumcision, human papillomavirus and smoking in situ and invasive disease. *Int J Cancer* 2005; 116 (4):606-16.

Daud 11, Scott ME, Ma Y, Shiboski S, Farhat S and Moscicki AB: Association between toll-like receptors expression and human papillomavirus type 16 persistence. *Int J Cancer* 128: 879-886, 2011.

Dillner J, von Krogh G, Horenblas S, Meijer CJLM (2000) Etiology of squamous cell carcinoma of the penis. *Scand J Urol Nephrol* 34:189–193.

Dillner, J. et al. Etiology of squamous cell carcinoma of the penis. *Scand J Urol Nephrol Suppl*, 2000: 189.

Elantholi P. Saibishkumar, Juanita Crook, Joan Sweet. Neonatal circumcision and invasive squamous cell carcinoma of the penis: a report of 3 cases and a review of the literature. *CUAJ*, 2008; 2 (1): 39-42.

ENCR (European Network of Cancer Registries). Eurocim version 4.0. European incidence database V2.2 (1999). Lyon, France: IARC, 2001.

European Association of Urology Guidelines, 2017.

Faure E, Equils O and Sieling PA: Bacterial lipopolysacchride activates NF-kappaB through toll-like receptor 4 (TLR-4) in cultured human dermal endothelial cells. Differential expression of TLR-4 and TLR-2 in endothelial cells. *J Biol Chem* 275: 11058-11063, 2000.

Ferlay, J. Soerjomataram, I., Dikshit, R, Eser, S, Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D. M., Forman, D. Bray, F. 2015. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*, 136, E359-86.

Frazer IH: Interaction of human papillomaviruses with the host immune system: a well evolved relationship. *Virology* 384: 410-414, 2009.

Gillison, M. L., Koch, W. M., Capone, R. B., Spafford, M., Westra, W. H. Wu, L., Zahurak, M. L., Daniel, R. W, Viglione, M., Symer, D. E., Shah, K. V. Sidransky, D. 2000. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *Journal of the National Cancer Institute*, 92, 709-720.

Guimaraes GC, Leal ML, Campos RS, et al. Doproliferating cell nuclear antigen and MIB-1/Ki-67 have prognostic value in penile squamous cell carcinoma? *Urology* 2007; 70:137–42.

Heidman, D. A; Waterboer, T.; & Pawlita, M. (2007). Human papillomavirus 16 is the predominant type etiologically involved in penile squamous cell carcinoma. *Journal of clinical Oncology*, Vol. 25, No. 29, (October 2007), pp. 4550-4556, ISSN 2218-333.

Hellberg D, Valentin J, Eklund T, Nilsson S (1987) Penile cancer: is there an epidemiological role for smoking and sexual behaviour? *Br Med J (Clin Res Ed)* 295 (6609):1306–1308.

Herrero, R, Castellsagué, X., Pawlita, M. Lissowska, J. Kee, F., Balaram, P., Rajkumar, T., Sridhar, H., Rose, B., Pintos, J., Fernández, L., Idris, A., Sánchez, M. J., Nieto, A., Talamini, R., Tavani, A., Bosch, F. X., Reidel, U., Snijders, P. J. F., Meijer, C. J. L. M., Viscidi, R., Muñoz, N., Franceschi, S. Group, F. T. I. M. O. C. S. 2003. Human Papillomavirus and Oral Cancer: The International Agency for Research on Cancer Multicenter Study. *Journal of the National Cancer Institute*, 95, 1772-1783.

Hungerhuber, E., Schlenker, B., Schneede, P. et al. Squamous cell carcinoma antigen correlates with tumor burden but lacks prognostic potential for occult lymph node metastases in penile cancer. *Urology*. 2007; 70: 975–979.

Jing C, Eé-Ghany MA, Beesley C, et al. Tazarotene-induced gene 1 (TIG1) expression in prostate carcinomas and its relationship to tumorigenicity. *INCI* 2002;94:482-490.

Kerkela E., Ala-Aho R., Jeskanen L., et al. Expression of human macrophage metalloelastase (MMP-12) by tumor cells in skin cancer *J Invest Dermatol*, 114 (2000), pp. 1113-1119.

Kitchens RL and Thompson PA: Modulatory effects of sCD14 and LBP on LPS-host cell interactions. *J Endotoxin Res* 11: 225-229, 2005.

Kleer CG, Cao Q, Varambally S et al. EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells. *PNAS* 2003;100:11606-11611.

Kornya L, Cseh I, Deak J, Bak M, Fulop V. The diagnostics and prevalence of genital human papillomavirus (HPV) infection in Hungary. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2002; 100 (2):231-6.

Koutsky L. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am J Med* 1997; 102:3-8.

Kreimer, A.R., Clifford, G. M., Boyle, P.Franceschi, S. 2005. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: A systematic review. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 14, 467-475.

Kuasne H, Co'lus IM, Busso AF, et al. Genome-wide methylation and transcriptome analysis in penile carcinoma: uncovering new molecular markers. *Clin Epigenetics* 2015;7:46.

Kuasne H, Marchi FA, Rogatto SR, et al. Epigenetic mechanisms in penile carcinoma. *Int J Mol Sci* 2013; 14:10791–808.

Laniado, M.E., Lowdell, C., Mitchell, H. et al. Squamous cell carcinoma antigen: a role in the early identification of nodal metastases in men with squamous cell carcinoma of the penis. *BJU Int.* 2003; 92: 248–250.

Leijte, J.A, et al. Evaluation of current TNM classification of penile carcinoma. *J Urol*, 2008. 180: 933.

Levi JE, Rahal P, Sarkis AS, et al. Human papillomavirus DNA and p53 status in penile carcinomas. *Int J Cancer* 1998; 76:779–83.

Lont, A.P.; Kroon, B.K.; Horenblas, S. Galle, M.P.; Berkhof, J.; Meijer, C.J. & Snijders, P.J.(2006). Presence of high-risk human papillomavirus DNA in penile carcinoma predicts favorable outcome in survival. *International Journal of Cancer*, Vol. 119, No. 5, (September 2006), pp. 1078-1081, ISSN 0020-7136.

Maden C, Sherman KJ, Beckmann AM, Hislop TG, Teh CZ, Ashley RL, Daling JR (1993) History of circumcision, medical conditions, and sexual activity and risk of penile cancer (see comments). *J Natl Cancer Inst* 85 (1):19–24.

Madsen, B.S.; van den Bruke, A.J.; Jensen, H.L.; Wohlfahrt, J. & Frisch, M. (2008). Risk factors for squamous cell carcinoma of the penis-population based case-control study in Denmark. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, Vol. 17, No.10.

Masferrer E, Ferrandiz-Pulido C, Masferrer-Niubo M et al. Epithelial to mesenchymal transition in penile squamous cell carcinoma. *J Urol* 2015 193:699-705).

Mateja Skamperle, Bostjan J. Kocjan, Polona J. Maver, Katja Seme, Mario Poljak Human papillomavirus (HPV) prevalence and HPV type distribution in cervical, and anal cancers in central eastern Europe. *Acta Dermatovenerologica (APA)* 2013; 22:1-5.

Mohs, F.E., et al. Mohs micrographic surgery for penile tumors. *Urol Clin North Am*, 1992. 19: 291.

Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ; International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N. Engl. J. Med.* 2003; 348:518-27.

Oertell, J. et al. Differentiated precursor lesions and low-grade variants of squamous cell carcinomas are frequent findings in foreskins of patients from a region of high penile cancer incidence. *Histopathology*, 2011. 58: 925.

Pannone G, Bufo P, Pace M, et al. : TLR4 down-regulation identifies high risk HPV infection and integration in head and neck squamous cell carcinomas. *Front Biosci* 8: 15-28, 2016.

Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Teppo L, Thomas DB (eds). *Cancer Incidence in Five Continents. Vol. VIII. IARC Scientific Publications. No. 155.* Lyon, France: IARC, 2002.

Patel V, Marsh CA, Dorsam RT, Mikelis CM, Masedunskas A, Amornphimoltham P. Decreased lymphangiogenesis and lymph node metastasis by mTOR inhibition in head and neck cancer. *Cancer Res.* 2011;71:7103–7112.

Poetsch M, Schuart B-J, Schwesinger G, et al. Screening of microsatellite markers in penile cancer reveals differences between metastatic and nonmetastatic carcinomas. *Mod Pathol* 2007; 20:1069–77.

Populo H, Lopes JM, Soares P. The mTOR signalling pathway in human cancer. *Int J Mol Sci* 2012;13:1886.

Rees RW, F.A, Borley N, et al. pT2 penile squamous cell carcinomas: cavernosus vs. spongiosus invasion. *Eur Urol Suppl*, 2008. 7: 111 (abstract #163).

Rubin MA, Kleter B, Zhou M, Ayala G, Cubilla AL, Quint WG, Pirog EC (2001) Detection and typing of human papillomavirus DNA in penile carcinoma: evidence for multiple independent pathways of penile carcinogenesis. *Am J Pathol* 159 (4):1211–1218.

Rubin, M.A.; Kleter, B.; Zhou, M.; Ayala, G.; Cubilla, A.L.; Quint, W.G.V. & Pirog, E.C. (2001). Detection and Typing Human Papillomavirus DNA in Penile Carcinoma (Evidence for multiple independent pathways of penile carcinogenesis). *American Journal of Pathology*, Vol. 159, No. 4, (April 2001), pp. 1211-1218, ISSN 0002-9440.

Schiffman M, Herero R, Desalle R, Hildesheim A, Wacholder S, Rodriguez AC, Batti MC, Sherman ME, Morales J, Guillen D, Alfaro M, Hutchinson M, Wright TC, Solomon D, Chen Z, Schussler J, Castle PE and Burk RD: The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution. *Virology* 337: 76-84, 2005.

Solsona, E., et al. Prospective validation of the association of local tumor stage and grade as a predictive factor for occult lymph node micrometastasis in patients with penile carcinoma and clinically negative inguinal lymph nodes. *J Urol*, 2001. 165: 1506.

Stankiewicz E, Ng M, Cuzick J, et al. The prognostic value of Ki-67 expression in penile squamous cell carcinoma. *J Clin Pathol* 2012; 65:534–7.

Steffens S, Al Ghazal A, Steinestel J, et al. High CRP values predict poor survival in patients with penile cancer. *BMC Cancer* 2013; 13:223.

Takai N, Kawamata N, Walsh CS et al. Discovery of epigenetically masked tumor suppressor genes in endometrial cancer. *Mol Cancer Res* 2005;3:261-269.

Takeda K and Akira S: Toll-like receptor in innate immunity. *Int Immunol* 17: 1-14.

Tokumaru Y, Yaqqhata Y, Fujii M. Aberrant promoter hypermethylation of tazarotene-induced gene 1 (TIG1) in head and neck cancer. *Nippon Jibinkoka Gakkai Kaiho* 2005;108:1152-1157.

Touloupidis, S., Zisimopoulos, A., Giannakopoulos, S. et al. Clinical usage of the squamous cell carcinoma antigen in patients with penile cancer. *Int J Urol*. 2007; 14: 174–176.

Varambally S, Dhanasekaran SM, Zhou M et al. The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature* 2002;419:624-629.

Velazquez, E.F, et al. Epithelial abnormalities and precancerous lesions of anterior urethra in patients with penile carcinoma: a report of 89 cases. *Mod Pathol*, 2005. 18: 917.

Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ and Munoz N: Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 189: 12-19, 1999.

Wang H, Albadine R, Magheli A, et al. Increased EZH2 protein expression is associated with invasive urothelial carcinoma of the bladder *Urol Oncol* 2012;30:428-433.

Yang R, Murillo FM, Delannoy MJ, Blosser RL, Yutzy WH, Uematsu S, Takeda K, Akira S, Viscidi RP and Roden RBS: B lymphocyte activation by human papillomavirus—like particles directly induces Ig class switch recombination via TLR4- MyD88. *J Immunol* 174: 7912-7919, 2005.

Zhu, Y., Ye, D.W., Yao, X.D. et al. The value of squamous cell carcinoma antigen in the prognostic evaluation, treatment monitoring and follow-up of patients with penile cancer. *J Urol*. 2008; 180: 2019–2023.

8. Rövidítések

BXO	Balanitis Xerotica Obliterans
CIN	Cervical Intraepithelial Neoplasia
CRP	C-reaktív protein
DSNB	Dinamikus szentinel nyirokcsomó biopszia (Dynamic Sentinel Lymph Node Biopsy)
EZH2	Enhancer of Zeste Homolog 2
FNAB	Finom tű aspiráció (Fine-Needle Aspiration Biopsy)
HPV	Humán Papillomavírus
hrHPV	high risk Humán Papillomavírus
LCR	Long Control Region
LOH	Loss of Heterozygosity
lrHPV	low risk Humán Papillomavírus
MMP12	Macrophage Metalloproteinase 12
mTOR	mechanistic/mammalian Target of Rapamycin
ORF	Open Reading Frame
ORI	Viral Origin of Replication
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCR	Polymerase Chain Reaction
RARRES1	Retinoic Acid Receptor Responder 1
SCCAg	Laphámsejtes carcinoma antigén
TLR4	Toll Like Receptor 4
TMA	Tissue microarray
URR	Upstream Regulatory Region
UTR	Untranslated Region
UVA	Ultra-Violet A
VIN	Vulvar Intraepithelial Neoplasia

9. KÖZLEMÉNYEK

9.1. A értekezés témájához kapcsolódó közlemények jegyzéke

Damasdi M, Kovacs K, Farkas N, Jakab F, Kovacs G Down-regulation of Toll-like Receptor TLR4 Is Associated with HPV DNA Integration in Penile Carcinoma. Anticancer Res. 2017 Oct;37 (10):5515-5519 **IF: 1.93**

Damásdi M, Jakab F, Kovács K, Oldal M, Kemenesi G, Szabó E, Vályi-Nagy I, Pytel Á, Farkas L, Szántó Á Prevalence and type diversity of human papillomaviruses in penile cancers in Hungary PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH: (2016) **IF: 1.96**

Akos Pytel, Miklos Damasdi, Erzsebet Schmidt, Anges Frick, Laszlo Farkas Advantages of dynamic sentinel lymphnode biopsy technique in the management of penile cancer In: Advantages of dynamic sentinel lymphnode biopsy technique in the management of penile cancer. Konferencia helye, ideje: Washington, Amerikai Egyesült Államok, 2011.05.14-2011.05.19.p. x.

Pytel Ákos, Damásdi Miklós, Frick Ágnes, Farkas László Műtéti technika előrehaladt penisztumorok ellátásában MAGYAR UROLÓGIA 22:(3) p. 122. (2010)

Pytel A, Damásdi M, Frick A, Schmidt E, Zámbó K, Farkas L Surgical management of low and medium risk penile cancer with isotope guided sentinel lymphnode biopsy technik pp. 63-64. (2009)

Pytel A, Damasdi M, Fritz A, Schmidt E, Zámbó K, Farkas L Low and Medium Risk Penile Cancers with Isotope Guided Sentinel Lymphnode Biopsie Technic UROLOGY 74:(4 Suppl.) pp. S63-S64. (2009) **IF: 2.3**

Pytel Á, Damásdi M, Frick Á, Farkas L Kezeléssel összefüggő morbiditás csökkentésének lehetőségei pénisztumorok esetében MAGYAR UROLÓGIA 20: pp. 124-125. (2008)

A disszertáció alapjául szolgáló közlemények impakt faktora:	6.21
Kumulatív impakt faktor (idézhető absztraktok nélkül):	9.38

9.2. Az értekezés témájához nem kapcsolódó közlemények jegyzéke

Damásdi Miklós, Rózsa Annamária Lymphangiomatosis scroti ritka esete fiatal férfi betegnél Magyar Urológia | 2017 | 29. évfolyam, 1. szám

Vártokné Hevér Noémi, Péntek Márta, Balló András, Gulácsi László, Baji Petra, Brodszky Valentin, Damásdi Miklós, Bognár Zita, Tóth György, Buzogány István, Szántó Árpád Health related quality of life in patients with bladder cancer: A cross-sectional survey and validation study of the Hungarian version of the Bladder Cancer Index PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH 21:(3) pp. 619-627. (2015) **IF: 1.94**

Terhesség során végzett vizeletelvezetés tapasztalatai 23 beteg retrospektív vizsgálata kapcsán Dr. Damásdi Miklós, Dr. Vecsei Anna, Dr. Engert Zoltán, Dr. Farkas László, Dr. Szántó Árpád MAGYAR UROLÓGIA XXVI. évfolyam, 4. szám, (2014): 171-174

Damásdi M, Vágási K, Molnár GA, Farkas L, Wittmann I High-tone electric muscles stimulation of thigh augments the impaired penile blood flow of diabetic patients without improving symptoms of erectile dysfunction. CLINICAL NEPHROLOGY 79:(Suppl. 1) pp. 46-48. (2013) **IF: 1.23**

Olah A, Katona Gy, Gal N, Muller A, Damasdi M, Boncz I, Betlehem J The comparison of two minimal invasive surgeries, the tension-free vaginal tape (TVT) and the transobturator tape (TOT) in terms of efficiency and the complications SOUTH EASTERN EUROPE HEALTH SCIENCES JOURNAL 2:(2) pp. 82-87. (2012)

Damásdi Miklós, Vágási Katalin, Molnár Gergő Attila, Farkas László, Wittmann István A 2-es típusú cukorbetegségben szenvedő súlyos fokú merevedési diszfunkcióval rendelkező, férfi betegeknél elért arteria dorsalis penis áramlás-fokozódás magas frekvenciás idegáram-kezelés alkalmazása során MAGYAR UROLÓGIA 22:(3) p. 161. (2010)

Jávorházy András, Fábos Zoltán, Damásdi Miklós, Farkas László Nitinol húgycsőstent implantációt követően észlelt szövődmények kezelése MAGYAR UROLÓGIA 22:(3) p. 122. (2010)

Damásdi Miklós, Rákász István, Farkas József, Császár László, Kovács Zsuzsanna, Bajzik Gábor Multilokuláris cisztás vesesejtes karcinóma. MAGYAR UROLÓGIA 17:(3) pp. 144-149. (2005)

9.3. Könyvfejezetek:

1. Sürgősségi kórképek az urológiai gyakorlatban (jegyzet) Dr. Damásdi Miklós, Dr. Pytel Ákos, prof. Dr. Farkas László, Dr. Szántó Árpád, TÁMOP-4.1.1.C-13/1/KONV-2014-0001 számú projekt, 2015
2. Bizonyítékokon Alapuló Rehabilitációs Medicina (Szexuális funkciózavarok fejezet 341-349. oldal) szerkesztő: Dr. Vekerdy-Nagy Zsuzsanna, Medicina Könyvkiadó, 2017

9.4. Poszterek, előadások:

1. Primér húgycső adenocarcinoma férfi betegnél, Damásdi Miklós dr., Bagheri Fariborz, Szántó Árpád dr., Pytel Ákos dr., Farkas László dr., 2009. MUT Kongresszus, Keszthely (poszter)
2. 2-es típusú cukorbetegségben szenvedő, súlyos fokú merevedési diszfunkcióval rendelkező férfi betegeknél elért artériás áramlás fokozódás magasfrekvenciás ingeráram kezelés alkalmazása során, Damásdi Miklós, Vágási Katalin, Molnár Gergő Attila, Farkas László, Turu Dorottya, Wittmann István 2010. MUT Kongresszus, Debrecen (poszter)

3. Merevedési zavarban szenvedő, diabeteses, férfi betegeknél elért artéria dorsalis penis áramlásfokozódás magas frekvenciás ingeráram kezeléssel, Damásdi Miklós 2010. Lilly Akadémia (előadás)
4. Multiplex vesekövesség okaként felfedezett Chusing-syndroma komplex urológiai - endokrinológiai – idegsebészeti – plasztikai sebészeti ellátása, Dr. Damásdi Miklós, Dr. Rucz Károly, prof. Dr. Czirják Sándor, Dr. Lakatos Levente, prof. Dr. Farkas László 2011. MUT Kongresszus, Budapest (poszter)
5. A HPV szerepe az urológiában, Dr. Damásdi Miklós, 2012. MUT Kongresszus, Szeged (előadás)
6. A humán papillomavírus kóroki szerepe a hímvessző daganatokban a Pécsi Tudományegyetem Urológiai Klinikájának beteganyagán (2002-2012), Dr. Damásdi Miklós 2014. MUT Kongresszus, Siófok (előadás)
7. Elég-e a tesztoszteron? Tesztoszteron pótlás az urológiai gyakorlatban, Dr. Damásdi Miklós, 2015. Endokrinológiai Kongresszus, Pécs (előadás)
8. A HPV vírus szerepe a férfi külső nemi szervek megbetegedéseiben, és fertilitási zavaraiiban, Dr. Damásdi Miklós, 2015, STI Kongresszus, Budapest (előadás)
9. Ritka érfejlődési rendellenesség (Diótörő szindróma – Nutcracker szindróma) klinikai tapasztalatai 4 beteg kapcsán a PTE Urológiai Klinika és II. számú Belgyógyászati Klinika beteganyagában Dr. Molnár Ágnes, Dr. Damásdi Miklós, Dr. Molnár Gergő Attila, Dr. Szántó Árpád, 2015. MUT Kongresszus, Budapest (poszter)
10. Prevalence and type diversity of human papillomaviruses in penile cancer in Hungary, Miklos Damasdi, 2015. CEM, Budapest (poszter)

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A doktori értekezésem alapjául szolgáló kutatómunkát a PTE KK Urológiai Klinikán végeztem. Mindenekelőtt köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Kovács Gyula professzor úrnak, hogy messzemenően támogatta a témához kapcsolódó kutatásaimat, tevékenységemet mindvégig figyelemmel kísérte, kutató munkámat segítette, irányította. Hálával tartozom az Urológiai Klinika korábbi és jelenlegi igazgatójának, Dr. Farkas László professzor úrnak és Dr. Szántó Árpád docens úrnak, mert lehetővé tették, hogy betegellátási és oktatási feladataim mellett a kutatómunkára is tudjak időt szakítani.

Külön köszönetet szeretnék mondani Dr. Pytel Ákos adjunktus úrnak a téma alapjául szolgáló sebészeti anyag biztosításáért, illetve azért, hogy a hímvessző daganatok komplex kezelésért felelős, általa irányított munkacsoportba bekapcsolódhattam, szakmai képzésemet irányította, mindvégig segítette. Köszönet Dr. Kovács Krisztina adjunktus asszonynak a munka során felhasznált hímvessző tumorok paraffin blokkjainak átengedéséért illetve egyes patológiai paraméterek közléséért. Külön köszönet illeti a Patológiai Intézet munkatársait, Kereszturi Marikát és Pék Zsuzsannát a metszetek elkészítéséért.

Köszönet minden társszerzőnek, hogy munkájukkal, javaslataikkal hozzájárultak az eredmények közléséhez. Külön köszönettel tartozom Dr. Jakab Ferenc docens úrnak, aki a kezdetektől fogva segített a virológia és a tudományos közlemények útvesztőjében eligazodni.

Végezetül köszönöm családom (feleségem Katalin, gyermekeim Miklós és Gellért) megértő türelmét és támogatását, hogy szeretetükkel és türelmükkel biztosították számomra a kutató munkához szükséges nyugodt háttérrel.