

A humán papillomavírus kóroki szerepe a hímvesző daganatokban

Doktori (PhD) értekezés tézisei

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

A hímvesző daganatok az onkológiai betegségeknek viszonylag ritka formáját képviselik, hiszen arányuk a fejlett országokban kevesebb, mint 1% közelében mozog. Mégis, a férfiakat tekintve jelentős pszichoszexuális terhet képviselnek, az urológus számára pedig kihívást jelenthet kezelésük. A hímvesző daganatos betegek körében elvégzett epidemiológiai vizsgálatok, összességében hat olyan rizikó faktor szerepét véleményezték, melyek jelenléte esetén a daganatos betegség kialakulása a kontroll populációhoz képest jelentős mértékű növekedést mutatott: fitymaszűkület, krónikus gyulladással járó kórképek (balanoposthitis, balanitis xerotica obliterans), sporale és UV-A fototerápiás kezelés, dohányzás, humán papillómavírus infekció (HPV), promiszkuítás.

Epidemiológiai vizsgálatok felvetették a humán papillómavírusok onkogén típusainak kóroki szerepét a pénisz tumorok esetében is. Backes és munkatársai 2009-ben közzétett áttekintő közleménye szerint a hímvesző daganatban szenvedő betegek mintegy 40%-a volt HPV érintett, ezen belül a HPV 16-os szubtypus volt a leggyakrabban előforduló típus. A másik érdekes összefüggés a HPV érintettség, illetve a hímvesző daganat között, hogy bizonyos hímvesző daganat típusok között sokkal gyakoribb a kapcsolat (pl. basalooid, condylomatosus megjelenés 76%), mint egyéb (pl. verrucosus carcinoma 24,5%) megjelenési típusok között.

A hímvesző daganatok klinikai lefolyását, illetve a túlélést egyértelműen a nyirokcsomó státusz határozza meg. A klinikailag negatív nyirokcsomók 5 éves daganatmentes túlélése 75-93%, a klinikailag igazolt kismedencei nyirokcsomó érintettség esetén az 5 éves daganatmentes túlélés 20-34% közé esik. Felmerül a kérdés, hogy a HPV érintett primer daganat esetén, előrehaladott folyamat, klinikailag pozitív, illetve esetlegesen az eltávolított szentinel nyirokcsomó daganatos érintettsége esetén a csomók HPV érintettsége vajon összefüggést mutat-e, illetve azonos szubtypusok, onkogén HPV típusok jelenléte kimutatható-e mindkét szöveti környezetben. Ha igen, a daganatos betegség klinikai lefolyásában mutatnak-e ezen betegek különbséget a kontroll populációhoz képest.

Kiterjedt kutatás és adatgyűjtés csak szórványosan folyik a férfiak között, a világ urológus társaságainak irányelvei érdemben nagyon keveset foglalkoznak a humán papillómavírussal. A magyar urológia a világ többi országához hasonlóan idáig nem mutatott különösebb érdeklődést a HPV problematika iránt.

Az ezzel kapcsolatos érdektelenséget próbáltuk áthidalni kutatásainkkal, melyek során a primer tumorban, valamint az inguinális nyirokrégióban vizsgáltuk a humán papillómavírus

jelenlétét, kerestünk olyan biológiai markereket, melyek a hímvesző daganatok progressziójával összefüggenek, illetve vizsgáltuk a toll-like receptor 4 (TLR4) protektív szerepét a hímvesző daganatok kialakulásában. Ezen kívül szerettük volna összefoglalni a HPV és a hímvesző daganatokról megszerzett tudást.

A HPV kóroki szerepe ugyan lényegesen kisebb, mint a nők esetében, az ezzel kapcsolatos kutatás sok hasznot vonhat maga után: a védőoltásoknak a hímvesző daganatos esetekben is preventív szerepe lehet, emellett a HPV prognosztikai szerepére is fény derülhet.

2. Célkitűzések

- A HPV infekció gyakoriságának megállapítása hímvesző tumorban, továbbá a HPV tipizálása a hímvesző daganatokban leggyakrabban előforduló szubtypus 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, p16^{INK4a} 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 módszer

A Pécsi Tudományegyetem Urológiai Klinikáján 2002-2012 között malignus hímvesző 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 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

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	emasculation	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	emasculation	52
15	pT3pN1MxGIII-IV	emasculation	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 sejtfeltárási készülékkel (TissueLyser, Qiagen, Biomarker Ltd. Hungary) tártuk fel, majd a finomabb struktúrák bontását enzimátikus 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 láncreakció (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 hematoxin-eozinnal festett metszetek áttekintése során kijelöltük a mintavétel helyét. 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 ágyasztuk be, lehetővé téve az összes vizsgált tumor egy metszeten történő egyidejű vizsgálatát.

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, P16^{INK4a} 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. A 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. 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 szignifikáns inverz korrelációt mutatott a HPV pozitívítás és TLR4 immunreakció között ($p=0.0006$).

4.1.2. p53

A p53 immunhisztológiai vizsgálata 16 hímvesző karcinómában közepes vagy erős intenzitású magfestést mutatott. 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 ($p=0.0191$).

4.1.3. P16^{INK4a}

Kifejezett p16^{INK4a} immunreakciót figyeltünk meg 10 hímvesző daganat cytoplazmájában, illetve a tumor sejtmagban is. Mindegyik p16^{INK4a} pozitív malignoma HPV pozitív volt. Ezzel ellentétben a HPV negatív hímvesző daganatok nem mutattak p16^{INK4a} immunreakciót. Pearson's Chi square teszt szignifikáns korrelációt mutatott a HPV pozitívítás és a p16^{INK4a} fehérje kifejeződése között ($p=0.0002$). A HPV sztubtípus, TLR4, p16^{ink4a}, p53 fehérjék összefüggése a 2. Táblázatban tekinthető meg.

2. Táblázat. A virológiai és immunhisztológiai (TLR4, p16^{INK4a} és p53) vizsgálatok eredménye

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.

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) kifejeződése az 3. Táblázatban tekinthető meg.

3. 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

Az EZH2 diffúz kifejeződést mutatott 17 hímvesző daganatban, míg 14 esetben nem találtunk immunreakciót. A 9 progressziót mutató hímvesző daganat közül 8 volt pozitív EZH2-re (90%), míg a 22 nem progrediáló hímvesző daganatból csak 8 esetben találtunk EZH2 pozitivitást. Érdeemes megemlíteni, hogy 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 ($p=0.021$).

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. A tumor sejtek pozitivitása az enyhe festődéstől az erősen pozitív citoplazmatikus immunreakcióig változott. A 24 MMP12 pozitív esetből 9 hímvesző daganat progrediált (38%), míg a 7 negatív tumor remisszióban maradt. A tumorok stromájában különböző számban fordultak elő makrofágok, amelyek MMP12 pozitivitást mutattak. A statisztika nem mutatott összefüggést az MMP12 pozitívítás és a hímvesző tumorok progressziója között.

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 pozitívítás és p53 pozitívítás között. Ellenben az mTOR expressziója és a tumorok progressziója közt szignifikáns összefüggést tudunk kimutatni ($p=0.012$).

4.3.4 E-cadherin és vimentin

A mi anyagunkban a minden napi rutinban használt és megbízhatóan működő E-cadherin és vimentin antitestet is megvizsgáltuk. A 31 hímvesző karcinómából csak 5 esetben figyeltünk meg E-cadherin pozitivitást

4.3.5 RARRES1

RARRES1 pozitivitást találtunk 16 hímvesző daganatban, 7 esetben erős immunreakciót figyeltünk meg a stromát infiltráló immunsejtekben. A RARRES1 pozitivitas 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 pozitivitást. Szignifikáns összefüggés volt a hímvesző daganatok progressziója és a RARRES1 gén kifejeződése között ($p=0.045$).

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 inaktíváló 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 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 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.

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 TLR4 közötti szignifikáns inverz korrelációt ($p=0.003$). Eredményünk felveti a TLR4 protektív szerepét a HPV infekcióval szemben. A szervezet immunrendszerének jelentős szerepe van a vírus infekciók kivédésében. 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 gyulladáshoz vezető citokinek valamint a természetes immunrendszer fehérjék kifejeződéséhez vezet. Elmondhatjuk, hogy ellentétben az E6 és E7 vírus onkogénekkel 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. A HPV infekció esetén a TLR4 aktiválása az azonnali, nem specifikus természetes immunreakcióhoz vezet, az adaptív immunreakció csak később és lassan alakul ki. 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. Érdekes megemlíteni a TLR4 védő szerepével kapcsolatban a HPV 16 gyakori előfordulását magas kockázatú vírusok közül. HPV pozitív eseteink közül a HPV 16 a tumorok 76,92%-ában fordult elő, míg a HPV 51, HPV 52 és HPV 82 csak egy-egy esetben volt megfigyelhető. Ezt a különbséget azzal lehet megmagyarázni, hogy a HPV 16 képes bizonyos esetekben az természetes immunreakciót kikapcsolni a TLR4 kifejeződés manipulálásával, és így a fertőzött sejtben tartósan megmarad, ami a genomikus beépülés egyik feltétele. Vizsgálataink hasonló eredményhez vezettek a hímvesztő daganatban, a TLR4 kifejeződése egy szignifikáns inverz asszociációt mutatott a HPV pozitivitás tekintetében ($p=0.0006$). A fentiek ismeretében elmondhatjuk, hogy a TLR4 expressziójának jelentős szerepe van a HPV vírus infekció leküzdésében.

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 p16^{INK4a} 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 alábbi következtetésre jutottunk:

- A hímvesző daganatokban mintegy 76,92%-ban a HPV 16-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 szűrőteszt 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. 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/ <i>mammalian Target of Rapamycin</i>
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

Publications of the author / A szerző publikációi

Original research publications related to the thesis / Az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények

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 penistumorok ellátásában MAGYAR UROLÓGIA 22:(3) p. 122. (2010)

Pytel A, Damásdi M, Frick A, Schmidt E, Zábó 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, Zábó 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 / The impact factor of the dissertation publications: 6.21

Kumulatív impakt faktor (idézhető absztraktok nélkül) / Cumulative impact factor (without abstracts): 9.38

Original publications not related to the thesis / Egyéb – nem az értekezés témájában megjelent – eredeti közlemények

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)

Textbook chapters / 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

Oral and poster presentations / Szóbeli és poszter 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 arteria 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)

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 közzléséért. Külön köszönet illeti a Patológiai Intézet munkatársait, Keresztúri Marikát és Pék Zsuzsannát a metszetek elkészítéséért.

Köszönet minden társszerzőnek, hogy munkájukkal, javaslataikkal hozzájárultak az eredmények közzléséhez. 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.