

PhD Tézis

**A MÉHNYAKRÁKSZŰRÉS HATÉKONYSÁGÁNAK NÖVELÉSE
CITOLÓGIAI ÉS MOLEKULÁRIS MÓDSZEREK
EGYÜTTES ALKALMAZÁSÁVAL**

Dr. Várnai Alinda Dalma

Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar

Pathológiai Intézet

Pécs

2007

PhD Tézis

**A MÉHNYAKRÁKSZŰRÉS HATÉKONYSÁGÁNAK NÖVELÉSE
CITOLÓGIAI ÉS MOLEKULÁRIS MÓDSZEREK
EGYÜTTES ALKALMAZÁSÁVAL**

Dr. Várnai Alinda Dalma

Doktori Iskola:	Klinikai orvostudományok
Doktori Iskola vezetője:	Prof. Dr. Nagy Judit
PhD program:	Molekuláris patomorfológia
Programvezető:	Prof. Dr. Pajor László

Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar

Pathológiai Intézet

Pécs

2007

BEVEZETÉS

A Papanicolau (Pap)-keneteken végzett citológiai szűrés fő célja a méhnyakrák fokozott kockázatát hordozó cervikális elváltozások (CIN/SIL) felismerése és ezáltal az érintett nők korai, megfelelő kezelése. Általánosan elfogadott, hogy súlyosfokú citológiai lézió diagnózisa esetén a nőt azonnal szakorvoshoz kell irányítani további vizsgálatok céljából. Elegendő bizonyíték igazolja, hogy a nőgyógyászati citológiai szűrés csökkenti a méhnyakrák incidenciáját és mortalitását. Ugyanakkor, a statisztikai adatok arra utalnak, hogy a konvencionális citológia eredményessége tovább nem javítható, így a betegség gyakorisági és halálozási arányának további csökkentése csak újabb módszerek, illetve egy hatékonyabb szűrési stratégia bevezetésétől várható.

Annak a felismerése, hogy a méhnyakrákok többségét világszerte bizonyos onkogén HPV-típusokkal való perzisztáló fertőzés okozza, a citológiát kiegészítő HPV kimutatási eljárások kifejlesztéséhez vezetett. Ezek célja: i) a citológiai szűrés érzékenységének növelése, ii) a kérdéses citológiai kenetek tisztázása és iii) a sebészeti kezelés utáni nyomonkövetés. Az enyhe citológiai elváltozásokat mutató nők ellátása azonban továbbra is vitatott, a HPV-vizsgálat eredményessége pedig az alacsony specifitás miatt kérdéses citológiai lelet esetében ellentmondásos.

A méhnyakrák megelőzésére számos új, vizuális, mikroszkópos és virológiai szűrési módszer, illetve ezek kombinációja került kipróbálásra, amelyek lehetséges alkalmazásának irodalma folyamatosan nő. Egy a citológiát követő második érzékeny teszttel a szakorvosi beutalást igénylő álpozitív, illetve a fennálló cervikális neoplázia melletti álnegatív citológiai esetek számát csökkenteni lehetne.

Azonban még a HPV genotipizálás és a citológia igen érzékeny teszt-kombinációja sem képes felbecsülni egy fennálló cervikális intraepitheliális neoplázia biológiai potenciálját. Egy ideális teszt-kombináció azt mutatná ki, hogy okozott-e egy onkogén HPV-típus a sejtekben genetikai instabilitást, amely malignus transzformációra hajlamosít és terápia nélkül progresszióhoz vezethet.

Következésképpen alternatív protokollokra van szükség, amelyekben egy továbbfejlesztett citológia mellett a humán papillomavírus (HPV) teszt, illetve a neoplastikus transzformáció egyéb biológiai markereinek vizsgálata is szerepel. E módszerek kombinációja a szűrés hatékonyságát várhatóan növelné.

A fentiek alapján kidolgoztunk egy rizikó-adaptált, multimodális cervikális szűrési és ellátási protokollt a Bonn-Duisdorfi Patológiai Intézetben, amely folyadék-fázisú citológiát, PCR-

alapú dinamikus HPV genotipizálást és DNS citometriát foglal magában. Ezt a módszert elsőként vezettük be a mindennapi klinikai gyakorlatba Németországban.

A protokoll használatával kapcsolatban három célt fogalmaztunk meg: (1) a cervikális carcinogenesis lépcsőzetes morfológiai és molekuláris változásaival kapcsolatos ismereteink növelését, (2) a cervikális szűrés hatékonyságának fokozását, és (3) a korai CIN (cervikális intraepitheliális neoplázia) viselkedésének és a kezelés utáni nyomonkövetés prognosztikai markereinek meghatározását.

CÉLKITŰZÉSEK

- I. Az ú.n. „nem-klasszikus“ HPV-indukált citológiai jelek jellemzése és összehasonlítása
 - i) a PCR-által meghatározott HPV genotípussal
 - ii) az immunhisztokémiailag detektált HPV L1 kapszidfehérje expressziójával és
 - iii) az in situ hibridizációval (CISH) kimutatható HPV DNS jelenlétével.

- II. A HPV- fertőzés molekuláris alapjelenségeinek meghatározása:
 - i) FISH/DNS citometria
 - ii) HPV mRNS kimutatása a NorChip teszttel (NASBA)

- III. A HPV-genotípusok megoszlásának meghatározása
 - i) az alacsony-kockázatú és a bizonytalan kockázatú HPV-típusok által okozott cervikális léziók spektrumának jellemzése
 - ii) a ritka onkogén HPV-típusok és
 - iii) a bizonytalan kockázatú HPV-típusok előfordulásának gyakorisága a rák megelőző állapotokban és karcinómákban

- IV. A rizikó-adaptált multimodális szűrési stratégia (bonni protokoll) hatékonyságának meghatározása egy kb. 30.000-es női populáció rutin szűrési anyagán a bonni régióból

ANYAG ÉS MÓDSZER

Betegek és minták

- Időtartalom: 2000 január 1-től – 2005 december 31-ig

1. kb. 30.000 nő évente; összesen: 300521 Pap-teszt a rutin szűrésből (kenet + ThinPrep)

2. 5943 nő, akiknél PCR-alapú HPV-vizsgálat is történt (ú.n. „triage” populáció); összesen 8503 HPV DNS-teszt

3. különböző nagyságú csoportok különböző fokú léziókkal módszertani vizsgálatokhoz

Alkalmazott eljárások

1) Citológia

ThinPrep technikával készült folyadék-alapú citológia. A citológiai diagnózisok a módosított Münchener II Citológiai Klasszifikáció (Németországban szabvány) alapján születtek, amelyeket egyeztetünk a 2001-es Bethesda terminológiával.

2) Szövettan

A makroszkópos és a mikroszkópos feldolgozás a szabvány kórszöveti protokolloknak megfelelően történt, a szövettani diagnózisok alapjául a WHO klasszifikáció (1975) szolgált.

3) PCR-alapú HPV DNS kimutatás és genotipizálás szekvenálás segítségével

A HPV-DNS kimutatása közvetlenül a folyadék-alapú citológiai minta maradékából történt PCR módszerrel MY09/MY11 konszenzus primerekkel, valamint GP5+/6+ általános primerkombinációval automatizált PCR termékanalízissel kiegészítve. A nyert szekvenciákat összehasonlítottuk a GenBank adatbázisban található vírus szekvenciákkal a BLAST program segítségével. Egy HPV-típus onkogén potenciálját a méhnyakrák kialakulásának epidemiológiai kockázata alapján határoztuk meg, amely az irodalomból ismert.

4) Statikus DNS citometria

A DNS ploidia vizsgálata Feulgen-festést követően ugyanabból a folyadék-alapú citológiai mintából történt, amelyet a citológiai vizsgálat és a HPV-tipizálás során is használtunk. Legalább 100 dysplastikus hámsejt, valamint 30 kontroll normális morfológiájú intermediális sejt DNS-tartalmát mértük interaktívan, egyedenként fókuszált sejtmagokban, az ACAS citométer rendszerrel (Ahrens, Bargtheide, Németország).

5) *In situ* hibridizáció

- A HPV fertőzés citomorfológiai és molekuláris jellemzőinek meghatározására az INFORM HPV III Család 16 Próbát (B) használtuk a Benchmark Staining Platform segítségével a gyártó előírásait követve. A próbakeverék a következő HPV-genotípusokhoz mutat affinitást: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 51, 52, 56, 58 és 66.
- A HPV-fertőzött sejtek kromoszóma-rendellenességeinek kimutatására fluoreszcens *in situ* hibridizációt (FISH) alkalmaztunk 3-as és 17-es pericentromerikus kromoszómális próbák felhasználásával.

6) A HPV L1 kapszid fehérje immunhisztokémiai kimutatása

A vizsgálatokat a Cytoactive® HPV Screening Set (Cytoimmun, Németország) segítségével végeztük a gyártó ajánlását követve.

7) HPV mRNS kimutatás

A HPV-törzsek E6/E7 oncogén mRNS-ének kimutatására a kereskedelmi forgalomban elérhető PreTect HPV-Proofer kit-et (NorChip AS Norway) használtuk valós-idejű NASBA technológia alkalmazásával, a gyártó ajánlását követve.

EREDMÉNYEK

A dolgozat leadásáig a következő eredményekre jutottunk a feltett kérdéseket illetően:

I. A HPV-fertőzés citomorphológiai és molekuláris alapjelenségei

1. A HPV-hatásra utaló „nem-klasszikus” citomorphológiai jelek vizsgálata a minimális kóros eltéréseket hordozó laphámsejtekben növeli a HPV-fertőzés kimutatásának citológiai érzékenységét az elsődleges szűrés során. Ezek közül is kiemelendő, hogy az enyhe fokú sejtmageltérések 100%-os szenzitivitással és 100% negatív prediktív értékkel mutattak összefüggést a PCR által kimutatott HPV fertőzéssel, MY01/MY11 konszenzus primereket, illetve a GP5+/6+ primer keveréket használva. Pusztán a citomorphológia alapján nem lehetett különbséget

tenni a különböző HPV-típusok által okozott elváltozások között. Ez a tény megerősíti a HPV genotipizálás fontosságát.

2. Az INFORM HPV III Család 16 próba (B) különböző HPV-genomikus próbák keverékéből és formamid-alapú oldószerből áll. A próbával a gyakori, cervikális neopláziával összefüggést mutató, magas-kockázatú HPV-törzsek jelenléte mutatható ki. A próbakeverék a következő genotípusokhoz mutat affinitást: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 51, 52, 56, 58 és 66. A HPV-fertőzést a cervikális hámsejtek sejtmagjaiban megfigyelt epizomális, vagy integrált mintázat jelzi. A módszer nagyon érzékeny, már néhány virális DNS kópiát is kimutat, mint azt a „nem-klasszikus” citológiai eltérésekkel járó látens HPV-fertőzések, valamint dysplasticus hámelváltozások esetén is láttuk.
3. A HPV-okozta genetikai instabilitás a laphámsejtekben polyploidizációt, illetve ritkán véletlenszerű kromoszóma rendellenességeket okoz. Megvizsgáltuk, hogy vajon a magasfokú poly-, illetve aneuploiditást mutató sejtekben kimutatható-e genetikai eltérés a kromoszómák szintjén. 13 HSIL citológiai diagnózisú mintában meghatároztuk a HPV-típust és a DNS tartalmat. Amennyiben a mintában 5c, illetve 9c-nél nagyobb DNS-tartalmú polyploid sejtek előfordultak, akkor a 3-as és 17-es kromoszómákra specifikus próbákkal FISH-t is végeztünk. A FISH gyakran mutatott poliszómiát. Az aneuszómia gyakorisága szignifikánsan magasabb volt a >9c sejtekben, mint a >5c sejtekben, vagy a normális sejtek esetében. A 3-as és a 17-es kromoszóma kiegyensúlyozatlansága szintén gyakoribb volt >9c DNS-tartalom mellett. Ráadásul, 3/13 HSIL mintában visszatérő, a sejtek jelentős részében előforduló abnormalis 3:7-es kromoszóma-arányt észleltünk, ami közös eredetükre utal. Ezek a kromoszóma-rendellenességek tumorigenikus potenciállal rendelkező sejtekben kialakuló korai eltéréseknek felelhetnek meg.
4. A különböző fokú citológiai léziókban a HPV L1 capsid fehérje immunhisztokémiai kimutatásával tettünk különbséget a produktív és a nem-produktív HPV-fertőzés között. Ehhez 204 nő rutinszerűen festett folyadék-bázisú citológiai kenetén, amelyek enyhétől súlyosfokú dysplasiáig terjedő elváltozásokat mutattak (LSIL/HSIL), immuncitokémiai vizsgálatot végeztünk egy össz-HPV-L1-specifikus monoclonális antitesttel (Cytoactiv®). A HPV genotipizálás a fent ismertetett PCR módszerrel történt. Kilencvenkilenc esetben a pozitív immunreakció produktív infekcióra utalt, ezekből 69 eset (69,70%) LSIL-t, 30 eset (36,36%) pedig HSIL-t mutatott. Hatvanhárom esetben (63,64%) di/polyploiditást,

35-ben (36,36%) pedig DNA-aneuploidiát mértünk. Irodalmi adatok szerint a nem-produktív HPV-fertőzés kapcsán jelentkező súlyosfokú, aneuploid elváltozások nagy progressziós hajlammal rendelkeznek. Ezért a Cytoactiv® teszt citológiával, HPV-genotipizálással és DNS citometriával kombinálva alkalmas módszer lehet a progresszív és a nagy valószínűséggel spontán visszafejlődő elváltozások megkülönböztetésére a betegek nyomonkövetése és klinikai ellátása szempontjából.

5. A HPV mRNS expressziós vizsgálatok szignifikáns összefüggést igazoltak a HPV genotípusok és a mintában exprimált mRNS típusa között. A HPV mRNS (NorChip) vizsgálat diagnosztikus megbízhatósága HPV-infekció kimutatásának szempontjából a következő adatokkal jellemezhető: 61,3% szenzitivitás, 100% specificitás, 100% pozitív és 14,3% negatív prediktív érték. A NorChip vizsgálat prognosztikai ereje a citológiai progresszió szempontjából a következőképpen alakult: 82,35% szenzitivitás, 68,75% specificitás, 73,68% pozitív prediktív érték és 78,57% negatív prediktív érték. A HPV E6/E7 mRNS kimutatása a HPV onkogén aktivitását mutatja, ezért fontosabb klinikai indikátora a méhnyakrák kialakulásának, mint egyedül a HPV DNS kimutatása. A HPV E6/E7 mRNS expresszió egy klinikai prediktív markerként használható a súlyosfokú cervikális dysplázia progressziós potenciáljának, illetve a méhnyakrák kockázatának kimutatására.

II. A HPV genotípusok megoszlása és a HPV-indukált cervikális elváltozások spektruma

1. Az alacsony rizikójú (low-risk, LR), illetve a bizonytalan rizikójú (undefined risk, UR) HPV-típusok által előidézett cervikális elváltozások spektrumának vizsgálata során leggyakoribbnak az ASC-US bizonyult (63%), melyet az LSIL (23%), az intraepitheliális elváltozásra negatív (no-ASC, 9%), illetve a HSIL (5%) követett. Karcinómát nem észleltünk. Az LR és UR HPV-infekciók megoszlása a különböző citopathológiai csoportokban nem mutatott szignifikáns különbséget. Valamennyi negatív kenet (no-ASC), illetve ASC-US esetben legalább egy, de általában több enyhe, nem-klasszikus, HPV-indukált citológiai elváltozás mutatkozott. Az LSIL és a HSIL esetek többségében klasszikus (koilocytosis és dyskeratosis), illetve nem-klasszikus HPV-jelek egyaránt megfigyelhetők voltak.

2. A HPV-pozitív esetek között nem volt negatív citológiát mutató eset! Még a cellularis atypia hiányában is megfigyelhetőek voltak enyhe, nem-klasszikus, HPV-hatásra utaló jelek, kellően alapos vizsgálat mellett.
3. Összesen 30 különböző HPV-típus került kimutatásra az LR, vagy UR-HPV mono-infekciók eseteiben. 19 UR HPV-típus közül három új genotípusnak bizonyult.
4. Miután eseteinket az ismert HPV-típusok filogenetikai csoportosítása alapján újraértékeltek, 19 UR-HPV típus közül 12 vagy az alacsony-rizikójú (HPV 32, 62, 83, 84, 86, 87, 91, 74), vagy a vélhetően magas-rizikójú (HPV 69, 30, 67, 34) csoportba került. Egy vélhetően magas-rizikójú HPV-típussal történt fertőzés a HSIL-be, illetve karcinomába való progresszió fokozott kockázatát jelzi. Ez ismét aláhúzza a HPV-genotipizálás fontosságát.

III. A rizikó-adaptált, multimodális szűrés és ellátási stratégia (Bonn-protokoll) hatékonysága a méhnyakrák megelőzésében

1. Előzetes adataink alapján a citológia, a HPV-genotipizálás és a DNS-citometria kombinációja 88,2%-ra növelte a közepes–magasfokú cervikális dysplasia és karcinóma (\geq CIN2) kimutatásának pozitív predikciós értékét az egyedüli tesztek vagy kettős tesztkombinációk használatához képest 2002-ben.
2. Ennek a kombinációs protokollnak a további előnye az, hogy előre tudja jelezni a hisztológiailag igazolt, de pusztán egyetlen vizsgálattal álpozitív esetként észlelt CIN1 léziók későbbi kimenetelét. CIN1 elváltozásban magas-kockázatú HPV, vagy DNS aneuploiditás kimutatása a progresszió fokozott veszélyét jelzi, míg a magas-kockázatú HPV diploid DNS-tartalom mellett vélhetően benignus lefolyásra utal.
3. Multimodális módszerünk segítségével lehetővé válik azoknak a nőknek a kiszűrése egy korai, kezelhető fázisban, akiknek alacsonyfokú intraepitheliális elváltozásuk (LSIL/CIN1) valószínűleg progrediálni fog, valamint el lehet különíteni őket azoktól, akiknél pusztán egy produktív HPV-fertőzés által okozott átmeneti elváltozás áll fent. Így számos nő esetében elkerülhető lenne a felesleges kolposzkópia, illetve konizáció, míg azoknál, akik nagyobb progressziós hajlamú léziókat hordoznak a terápia időben elkezdődhetne.

PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

1. Poser I, Dominguez D, de Herreros AG, Varnai A, Buettner R, Bosse AK. Loss of E-cadherin expression in melanoma cells involves upregulation of the transcriptional repressor Snail. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 24661-24666.
IF: 6.854
2. Varnai A, Bollmann M, Griefingholt H, Bollmann R, Schmitt C, Speich N, Decker D: HPV in anal squamous cell carcinoma and anal intraepithelial neoplasia (AIN): Impact of HPV analysis of anal lesions on diagnosis and prognosis. *Int J Colorectal Dis.* 2006; 21:135-42.
IF: 1.749
3. Bollmann M, Varnai A, Griefingholt H, Bankfalvi A, Callenberg H, Speich N, Schmitt C, Bollmann R: Predicting treatment outcome in cervical diseases using liquid-based cytology, dynamic HPV genotyping and DNA cytometry. *Anticancer Res.* 2006; 26:1439-46.
IF: 1.604
4. Várnai AD, Bollmann M, Bánkfalvi A, Griefingholt H, Pfening N, Schmitt C, Pajor L, Bollmann R: The Spectrum of Cervical Diseases Induced by Low-risk and Undefined-risk HPVs: Implications for Patient Management. *Anticancer Res* 2007; 27: 563-570.
IF: 1.604
5. Walgenbach-Bruenagel G, Tolba RH, Varnai AD, Bollmann M, Hirner A, Walgenbach KJ: Detection of lymphatic invasion in early stage primary Colorectal cancer with the monoclonal antibody D2-40. *Eur Surg Res* 2006; 38: 438-444
IF: 0, 755
6. Mehes G, Kovacs G, Kajtar B, Lacza A, Varnai A, Losonczy H, Pajor L: Karyotype complexity and VH gene status in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica.* 2006; 91(10):1430-1.
IF: 4,192

Bírálat:

1. Bollmann R, Bankfalvi A, Varnai AD, Bollmann M: Risiko-adaptierte multimodale gynäkozytologische Krebsvorsorge – Der Pap-Test der Zukunft. Pathologe, 2007 (in press)

Könyvfejezet:

1. Bollmann R, Varnai AD, Bankfalvi A, Bollmann M: Alternative approaches to cervical cancer prevention: risk-adapted multimodal laboratory cervical screening. In: New Research on Cervical Cancer, Eds: George Z. Rolland, Nova Science Publishers, Inc., 2007.

Poszterek és prezentációk:

1. **Varnai A**, Bosserhoff A, Büttner R.: Molecular Alterations of the E-Cadherin Gene in Melanoma and Colorectal Carcinoma Cell Lines. Arch. Hung. Med. Assoc. America 10 (2): 12-13, 2002.
2. Bollmann R, Méhes G, **Varnai A**, Bollmann D, Speich N , Bollmann M: DNA aneuploidy/polyploidy is associated with oncogenic HPV infection in ASCUS and SIL. Pathol. Res. Pract. 200 (4): 356, 2004.
3. Méhes G, Speich N, **Varnai A**, Bollmann D, Bollmann M, Bollmann R: Chromosomal aberrations accumulate in polyploid cells of high-grade squamous intraepithelial lesions (HSIL). Pathol. Res. Pract. 200 (4): 356, 2004.
4. Speich N, Schmitt CH, **Varnai A**, Bollmann D, Bollmann R, Bollmann M: Human papillomavirus (HPV) study of 2.916 cytological samples by PCR and DNA sequencing: Genotype spectrum of patients from the West-German area. Pathol. Res. Pract. 200 (4): 357, 2004.
5. **Varnai A**, Bollmann D, Bollmann O, Bollmann R: Dynamic Telemacropathology with internet cameras. 7th Telepathology Congress, Poznan, 9th July 2004.
6. **Varnai A.**, Speich N., Bollmann R., Bolmann M.: Das HPV-genotyp-Spektrum in Nordrhein-Westfalen: Ergebnisse der HPV-PCR und nachfolgender DNA-Sequenzierung an 2916 zytologischen Präparaten. 55 Kongress der Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe, Hamburg, 14.-17.September 2004
7. **Varnai A**, Speich N, Bollmann R, Bollmann M, Méhes G: Chromosomal Aberrations Accumulate in Polyploid Cells of High Grade Squamous Intraepithelial Lesions. Hungarian Med. Assoc. America, 36th Annual Scientific Meeting. Sarasota, Florida, October 24-29, 2004.

8. **Varnai A**, Griefingholt H, Bollmann R, Speich N, Bollmann M: HPV in Anal Squamous Cell Carcinoma and in Anal Intraepithelial Neoplasia (AIN). Hungarian Med. Assoc. America, 36th Annual Scientific Meeting. Sarasota, Florida, October 24-29, 2004.
9. **Varnai A**, Bollmann M, Griefingholt H, Bollmann R, Schmitt C, Speich N, Türler A, Decker D: Diagnostische und prognostische Bedeutung der HPV- Analyse analer Läsionen. 60. Jahrestagung der DGVS (Deutsche Gesellschaft für Verdauung und Stoffwechselerkrankungen) Köln, September 2005.
10. **Varnai AD**, Bollmann M, Bollmann B, Trosic A, Speich N, Schmitt C, Bankfalvi A, Bollmann R. Validity of non-classic cytomorphological signs for the prediction of HPV infection in minimally abnormal cervical smears. 90. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie, Berlin, April 19-21, 2006
11. **Varnai AD**, Bollmann D, Bollmann M, Griefingholt H, Bankfalvi A, Bollmann R. A combination of enhanced cytology, HPV genotyping and DNA cytometry enables individual prediction of clinical outcome of residual cervical diseases. Magyar Orvosok és Gyógyszerészek Világtalálkozója, Debrecen, June 8-10. 2006.