

Wstęp. Wirus brodawczaka ludzkiego (HPV, human papillomavirus) ma istotny udział w etiopatogenezie raka płaskonabłonkowego ustnej części gardła. Obecnie częstość występowania raka HPV-zależnego w krajach europejskich określa się na 24%-80%, w tym w Europie Środkowej i Wschodniej na 50%; natomiast w Stanach Zjednoczonych Ameryki rak HPV-zależny obejmuje około 70% przypadków. U ponad 90% chorych wykrywa się genotyp HPV16. W populacji polskiej brak jest wyczerpujących danych dotyczących częstości występowania raka ustnej części gardła wywołanego zakażeniem HPV oraz wykrywanych genotypów wirusa. Określenie infekcji HPV w raku płaskonabłonkowym gardła środkowego jest obecnie składową rozpoznania patomorfologicznego, a ocenę statusu wirusa dokonuje się z materiału histopatologicznego pobranego z tkanki nowotworowej. Aktualne rekomendacje dopuszczają stosowanie różnych metod służących detekcji HPV, zarówno na poziomie białka jakim oznaczenie immunohistochemicznej ekspresji p16 (IHC p16) oraz na poziomie molekularnym polegającym na wykryciu DNA lub mRNA HPV metodami reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR, Polymerase chain reaction) lub hybrydyzacji in situ (ISH, in situ hybridization). W najnowszym piśmiennictwie podkreśla się ogromne znaczenie doboru algorytmu diagnostycznego w identyfikacji chorych na raka wywołanego przez HPV. Obecnie ocena statusu wirusa ma znaczenie rokownicze, ale w przyszłości, w połączeniu z innymi czynnikami prognostycznymi i predykcyjnymi, może mieć wpływ na decyzje terapeutyczne i odmienne schematy leczenia chorych na raka płaskonabłonkowego ustnej części gardła w zależności od statusu HPV.

Cele pracy. Wobec nowych wyzwań w diagnostyce patomorfologicznej oraz nielicznych doniesień obejmujących polską populację, podjęto się badania na dużej grupie chorych na raka płaskonabłonkowego gardła środkowego mającego na celu: ocenę częstości występowania infekcji HPV w zależności od zastosowanej metody badawczej, porównanie metod identyfikacji wirusa, analizę danych kliniczno-histologicznych w zależności od statusu HPV oraz optymalizację schematu diagnostycznego w raku płaskonabłonkowym gardła środkowego z uwzględnieniem oceny HPV.

Materiał i metody. Do badania zostało włączonych 148 chorych na pierwotnego raka ustnej części gardła, którzy byli diagnozowani i leczeni w Centrum Onkologii-Instytucie w Warszawie w latach 2007-2017. Dane kliniczne uwzględniające: wiek, płeć, wywiad w kierunku palenia tytoniu, lokalizację nowotworu oraz stopień zaawansowania klinicznego wg siódmej edycji klasyfikacji TNM, zostały zebrane na podstawie wpisów obserwacji lekarskich dostępnych w szpitalnym systemie informatycznym. Dokonano weryfikacji rozpoznania histopatologicznego z podziałem na warianty morfologiczne raka płaskonabłonkowego oraz reklasyfikacji stopnia zaawansowania klinicznego wg kryteriów ósmej edycji klasyfikacji TNM. Badanie IHC p16 wykonano przy użyciu przeciwciała monoklonalnego CINtec16 Histology

(klon E6H4), zgodnie z zalecanym przez producenta protokołem barwienia. Za dodatni wynik badania uznano równoczesne występowanie: silnej, rozlanej, cytoplazmatyczno-jądrowej, ekspresji w $\geq 70\%$ komórek raka. W przypadku niespełnienia któregośkolwiek z czterech powyższych kryteriów, wynik badania uznawano za ujemny. Do oceny DNA HPV metodą ISH użyto zestawu Inform HPV III Family 16 probe (Ventana Medical Systems), który jest koktajlem znakowanych sond umożliwiających wykrycie dwunastu genotypów HPV o wysokim ryzyku onkogennym, takich jak: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 i 66. Badanie wykonano przy użyciu zautomatyzowanego systemu Ventana Bench ULTRA, wg zalecanego przez producenta protokołu barwienia. Wynik badania ISH był oceniony jako dodatni, gdy w mikroskopie świetlnym wykryto charakterystyczny dla formy episomalnej i/lub zintegrowanej typ wybarwienia przynajmniej w jednym jądrze komórek raka. Ocenę DNA HPV metodą PCR wykonano przy użyciu zautomatyzowanego systemu Cobas 4800, który oprócz wyżej wymienionych genotypów HPV pozwala na wykrycie dwóch kolejnych (dodatkowych), tj. 59 i 68. Po wstępnej lizie i przeprowadzeniu materiału z bloczków parafinowych do podłoża płynnego, kolejne etapy oznaczenia DNA metodą PCR prowadzono zgodnie z protokołem badania zalecanym przez producenta. Automatyczna analiza klasyfikuje próbki jako negatywne, bez walidacji, dodatnie na HPV16, dodatnie na HPV18 lub dodatnie na inny z pozostałych genotypów. W przypadkach o wykrytych innych niż 16 i 18 genotypach HPV wykonano badanie multipleksowej reakcji PCR z genotypowaniem. Uzyskane wyniki opracowano statystycznie przy użyciu testu Chi-kwadrat i testu Fishera oraz oceniono czułości i swoistości metody ISH względem PCR.

Wyniki. Dodatni wynik badania IHC p16 stwierdzono u 56,08% (83/148), a wynik ujemny u 43,92% (65/148) chorych. Obecność wirusowego DNA metodą ISH wykryto w jądrach komórek raka w materiale pochodzącym od 47,97% (71/148) chorych. U żadnego chorego nie stwierdzono obecności DNA HPV w nienowotworowym nabłonku. Wyniki oznaczenia DNA HPV metodą PCR uzyskano u 95,95% (142/148) chorych. W 4,05% (6/148) przypadkach nie określono statusu wirusa z powodu braku walidacji materiału histopatologicznego z β -globiną, która stanowiła badanie kontrolne. W 58,45% (83/142) przypadków wykryto DNA HPV. Najczęściej stwierdzanym genotypem wirusa był HPV16, który stanowił 96,38% (80/83) przypadków dodatnich. U 3,62% (3/83) chorych wykryto inne genotypy HPV o wysokim ryzyku onkogennym, w dwóch przypadkach stwierdzono genotyp HPV33 a w jednym HPV59.

Wyniki oceny statusu HPV przy zastosowaniu wszystkich trzech metod uzyskano u 95,95% (142/148) pacjentów. Wyniki potrójnie zgodne stwierdzono u 85,92% (122/142) chorych, w tym wyniki zgodne dodatnie (IHC p16+/ISH+/PCR+) stanowiły 47,18% (67/142) a zgodne ujemne (IHC p16-/ISH-/PCR-) odpowiednio 38,73% (55/142) przypadków. Wyniki rozbieżne występowały u 14,08% (20/142) chorych, w tym najliczniejszą grupę stanowili pacjenci

o wynikach rozbieżnych IHC p16+/ISH-/PCR+ (8,45%; 12/142). W analizie danych uzyskano potwierdzenie istotnego statystycznie związku między wynikami oceny statusu wirusa HPV określanymi metodą IHC p16 a technikami ISH i PCR ($p<0.000001$). Porównując techniki wykrywające DNA HPV wykazano, że czułość i swoistość metody ISH względem PCR wynosiła odpowiednio 85,36% i 100%.

W przeprowadzonym badaniu chorzy na raka HPV-zależnego byli zidentyfikowani na podstawie równoczesnego dodatniego wyniku badania IHC p16 i DNA HPV niezależnie od zastosowanej metody (ISH i/lub PCR). W tym celu przeanalizowano trzy algorytmy diagnostyczne. W każdym algorytmie wykonywano badanie IHC p16 a następnie oceniano DNA HPV w algorytmie 1 przy pomocy PCR, w algorytmie 2 metodą ISH, natomiast w algorytmie 3 w pierwszej kolejności wykonywano badanie ISH, a następnie w przypadkach ujemnych dodatkowo oznaczano DNA HPV techniką PCR. We wszystkich algorytmach uzyskano cztery grupy wyników: IHC p16+/DNA HPV+, IHC p16-/ DNA HPV-, IHC p16+/ DNA HPV-, IHC p16-/ DNA HPV+. Po zastosowaniu algorytmów 1 i 3 uzyskano tak samo wysoki odsetek chorych o wynikach IHC p16+/DNA HPV+, który wynosił 53,38% (79/148) przypadków. W algorytmie 2 do grupy tej należało tylko 45,27% (67/148) chorych.

Chorzy na raka HPV-zależnego i na raka HPV-niezależnego nie różnili się średnią wieku w momencie rozpoznania, która w obu grupach wynosiła 60 lat. W grupie chorych na raka wywołanego infekcją HPV stosunek mężczyzn do kobiet był niższy w porównaniu do chorych na raka HPV-niezależnego i wynosił odpowiednio 2,67 i 5,9 ($p=0,031$). Stwierdzono istotny statystycznie związek między lokalizacją rozwoju raka a statusem HPV. W obszarach z bogatym utkaniem chłonnym (migdałek podniebienny i nasada języka) częściej rozwijał się rak HPV-zależny (57,89%; 77/133), natomiast w obszarach bez utkania chłonnego odpowiednio rak HPV-niezależny (86,67%; 13/15) ($p<0,001$). U 28 chorych na raka HPV-niezależnego, ze znanym wywiadem dotyczącym palenia tytoniu, odsetek pacjentów palących wynosił 82,14% (23/28). Dla porównania u 29 chorych na raka HPV-zależnego osoby palące stanowiły tylko 37,93% (11/29) pacjentów ($p<0,001$). Stosując kryteria siódmej edycji klasyfikacji TNM w ocenie zaawansowania klinicznego guza pierwotnego (T) stwierdzono istotne statystycznie różnice między chorymi na raka HPV-zależnego i HPV-niezależnego. Ponad połowa pacjentów z rakiem wywołanym infekcją HPV charakteryzowała się niskim stopniem zaawansowania guza, tj. T1-T2 (59,21%; 45/76), natomiast u chorych na raka HPV-niezależnego ten odsetek był ponad dwukrotnie niższy i wynosił 26,47% (18/68) przypadków ($p<0,001$). Przerzuty do węzłów chłonnych stwierdzono u 93,43% (71/76) pacjentów z rakiem HPV-zależnym. U chorych na raka HPV-niezależnego odsetek ten wynosił 75,00% (51/68) przypadków ($p=0,004$). Stosując kryteria 7 edycji klasyfikacji TNM nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic między chorymi na raka HPV-zależnego

i HPV-niezależnego w zaszeregowaniu pacjentów do grup prognostycznych. Różnice zaobserwowano po zastosowaniu 8 edycji klasyfikacji. U chorych na raka HPV-zależnego bardzo znacząco zwiększył się odsetek chorych włączonych do grup o pomyślnym rokowaniu (I oraz II), tj. z 3,93% (3/76) do 77,63% (59/76) przypadków ($p < 0,001$).

Stwierdzono istotny statystycznie związek między podtypem morfologicznym raka a statusem HPV. Chorzy z rozpoznaniem wariantu nierogowaciejącym raka w 93,23% (55/59) przypadków wykazywali dodatni status HPV, natomiast u chorych o wariantu rogowaciejącym w 95,50% (55/57) przypadków nie wykryto wirusa ($p < 0,001$). W nowotworach związanych z etiologią wirusową odsetek przypadków ocenianych jako niskozróżnicowane (G3) był znacząco wyższy niż w grupie raków HPV-niezależnych (93,67% vs. 30,43%), ($p < 0,001$).

W oparciu o zgromadzone w ramach prowadzonej pracy doświadczenia własne, w połączeniu z rekomendacjami światowymi, opracowano zoptymalizowany schemat diagnostyczny raka płaskonabłonkowego gardła środkowego z uwzględnieniem oceny statusu HPV, który powinien zawierać: ocenę histopatologiczną wariantu morfologicznego raka, wykonanie barwień histo- i immunohistochemicznych, w przypadkach w których obraz mikroskopowy nie jest jednoznaczny i wymaga doprecyzowania rozpoznania, ocenę statusu HPV przy pomocy połączonych metod IHC p16 i technik wykrywających DNA HPV oraz ocenę histopatologicznego stopnia złośliwości w rakach HPV-niezależnych.

Wnioski. Wyniki oceny częstości występowania raka ustnej części gardła wywołanego infekcją HPV różnią się w zależności od zastosowanej pojedynczej techniki: IHC p16, HPV ISH lub HPV PCR i w przeprowadzonym badaniu wynoszą odpowiednio 56,08%, 47,97% i 58,45%. Wyższy odsetek przypadków dodatnich wykrywanych przy użyciu metod IHC p16 i HPV PCR w porównaniu do HPV ISH jest zgodny z wynikami przedstawianymi w piśmiennictwie.

Jednoczesne zastosowanie wszystkich wyżej wymienionych metod pozwala na uzyskanie wyników potrójnie zgodnych (dodatnich lub ujemnych) w 85,92% przypadków. Ze względu na istniejące w części przypadków rozbieżności w ocenie statusu HPV chorzy na raka HPV-zależnego ustnej części gardła powinni być definiowani na podstawie równoczesnego dodatniego wyniku badania IHC p16 i DNA HPV.

Badanie IHC p16 należy uznać za metodę „pierwszej linii” w klasyfikowaniu chorych do oceny DNA HPV lub do stosowania pojedynczo w przypadku braku możliwości wykonania badań molekularnych, ponieważ jest techniką szeroko dostępną, która może być stosowana w każdym zakładzie patomorfologii dysponującym pracownią immunohistochemiczną. Typ reakcji barwnej z p16 nie stwarza trudności w interpretacji, pozwala na jednoznaczną ocenę z podziałem na wyniki dodatnie i ujemne. Należy mieć jednak na uwadze, że w kilku

procentach przypadków z ekspresją IHC p16 nie wykrywa się DNA HPV. Z tego powodu w ośrodkach, które dysponują technikami biologii molekularnej, wydaje się być uzasadniona dodatkowa ocena DNA HPV u chorych IHC p16 dodatnich.

W badanej grupie 148 chorych częstość występowania raka ustnej części gardła wywołanego przez HPV (IHC p16+/ DNA HPV+) wynosiła 53,37% przypadków. Jest to wynik zbliżony z osiągniętymi rezultatami w populacji Europy Środkowej i Wschodniej oraz Wielkiej Brytanii. Podobnie jak w piśmiennictwie, najczęściej wykrywanym genotypem wirusa był HPV16; znacznie rzadziej stwierdzano genotyp HPV33.

Rak HPV-zależny w porównaniu do raka HPV-niezależnego statystycznie częściej rozwijał się u pacjentów niepalących, z wariantem nierogowaciejącym raka płaskonabłonkowego i w lokalizacjach z utkaniem chłonnym. Chorzy na raka HPV-zależnego statystycznie częściej niż chorzy na raka HPV-niezależnego charakteryzowali się niskim stopniem zaawansowania guza pierwotnego i wyższym odsetkiem przerzutów do węzłów chłonnych. Zastosowanie kryteriów z nowej ósmej edycji klasyfikacji TNM w zaszeregowaniu pacjentów do grup prognostycznych odzwierciedla różnice w rokowaniu w zależności od statusu HPV, ze zwiększeniem się odsetka chorych na raka HPV-zależnego zaklasyfikowanych do grup o pomyślnym rokowaniu.

Obecnie ocena statusu HPV w raku ustnej części gardła powinna stanowić integralną składową rozpoznania patomorfologicznego. Patomorfolog powinien umieć zinterpretować wyniki reakcji barwnej IHC p16 i HPV ISH oraz zlecić ocenę DNA HPV techniką PCR w przypadkach, które wymagają dodatkowego oznaczenia. Do roli patomorfologa należy również sformułowanie rozpoznania w raku płaskonabłonkowym ustnej części gardła z uwzględnieniem nowych wytycznych wyodrębniających raka HPV-zależnego oraz raka HPV-niezależnego oraz wymienienie technik wykorzystanych do oceny statusu wirusa. Opracowany algorytm diagnostyczny wydaje się być użyteczny zarówno dla ośrodków o niższym poziomie referencyjności (ocena IHC p16) jak i dla ośrodków o wyższym poziomie referencyjności, zwłaszcza przy kwalifikacji chorych do badań klinicznych (ocena IHC p16 i DNA HPV).