

Tytuł: Porównanie ekspresji wybranych markerów nowotworowych komórek macierzystych między podgrupą chorych na nowotwory narządów głowy i szyi z infekcją HPV16 i podgrupą chorych na nowotwory narządów głowy i szyi bez infekcji HPV16

Słowa kluczowe: nowotwory narządów głowy i szyi, markery nowotworowych komórek macierzystych, infekcja HPV16

Streszczenie

Wprowadzenie: Infekcja wirusami brodawczaka ludzkiego (HPV) jest obecnie ważnym czynnikiem etiologicznym w rozwoju niektórych płaskonabłonkowych raków narządów głowy i szyi (HNSCC). W nowotworach tych najczęściej wykrywanym typem wirusa jest HPV16. Liczne badania kliniczne ujawniły, że chorzy na HNSCC HPV dodatnie charakteryzują się lepszym rokowaniem niż chorzy niezakażeni. Potwierdziły to wyniki czterech metaanaliz, obejmujących łącznie około 200 badań. Jak wskazują współczynniki ryzyka (ang. *hazard ratios*) z tych metaanaliz, podgrupa chorych na HNSCC HPV dodatnie nie jest jednak jednorodna pod względem rokowania i u ponad 40% spośród tych osób dochodzi do progresji nowotworu. Wyróżnienie chorych na HNSCC z wirusową infekcją o lepszym i gorszym rokowaniu jest szczególnie istotne ze względu na toczące się badania kliniczne dotyczące możliwości deeskalacji leczenia przeciwnowotworowego chorych na HNSCC zależne od HPV. Istnieje zatem pilna konieczność zidentyfikowania czynników prognostycznych i predykcyjnych, na podstawie których będzie można wyróżnić podgrupę chorych z zakażeniem HPV odnoszących faktyczną korzyść z deeskalacji leczenia. Niektóre prace sugerują, że rolę takich czynników mogą odegrać markery komórek macierzystych (CSCs).

Cel pracy: Celem aplikacyjnym projektu jest wskazanie potencjalnych czynników prognostycznych związanych z nowotworowymi komórkami macierzystymi w podgrupach chorych na HPV16-zależnego i HPV16-ujemnego płaskonabłonkowego raka narządów głowy i szyi dla możliwości lepszego oszacowania rokowania u indywidualnych chorych. Szczegółowe cele pracy obejmują: (1) analizę obecności infekcji HPV16 w HNSCC, (2) ocenę wpływu infekcji HPV16 na całkowite i bezobjawowe przeżycia badanych chorych, (3) porównanie ekspresji wybranych markerów CSC (CD44, CD98, ALDH1/2, Oct-3/4, Sox-2, Nanog) między podgrupą chorych na HNSCC z infekcją HPV16 i podgrupą chorych bez tego zakażenia, (4) ocenę korelacji między analizowanymi cechami epidemiologicznymi, klinicznymi, histopatologicznymi i ekspresją wybranych markerów CSCs, (5) analizę wpływu

ekspresji wybranych markerów CSCs na przeżycia całkowite (OS) i bezobjawowe (DFS) u chorych na guzy HPV16-zależne i HPV16-ujemne.

Materiały i metody: Badania wykonano w oparciu o utrwalone w formalinie i zatopione w parafinie (FFPE) fragmenty tkanki nowotworowej pozyskane od 152 chorych przed rozpoczęciem leczenia przeciwnowotworowego. Występowanie infekcji HPV16 badano metodą łańcuchowej reakcji polimerazy z detekcją w czasie rzeczywistym (qPCR) z zastosowaniem jako matrycy DNA wyizolowanego z nowotworowych tkanek FFPE zestawem odczynników ReliaPrep FFPE gDNA MiniPrep System firmy Promega. Ocenę ekspresji wybranych markerów CSCs (CD44, CD98, ALDH1/2, Oct-3/4, Sox-2, Nanog) przeprowadzono na podstawie barwienia immunohistochemicznego. Wpływ ekspresji wybranych markerów CSCs na OS i DFS u chorych na guzy HPV16-zależne i HPV16-ujemne oceniono metodą Kaplana-Meiera i testem log-rank. W celu wyróżnienia niezależnych czynników wpływających na przeżycia przeprowadzono analizę wielowymiarową z wykorzystaniem modelu proporcjonalnych hazardów Coxa.

Wyniki: W grupie 152 chorych na HNSCC, infekcję HPV16 stwierdzono w przypadku 36 (23,7%) nowotworów, przy czym statystycznie istotnie największy odsetek guzów HPV16 dodatnich odnotowano w podgrupie 63 płaskonabłonkowych raków gardła środkowego (OPSCC) (41,5%). W badanej grupie 152 osób, 5-letnie OS i DFS wynosiły, odpowiednio: 45,1% i 62,0%. Chorzy na HPV16-zależne HNSCC charakteryzowali się większym prawdopodobieństwem 5-letnich OS i DFS w porównaniu do chorych HPV16 ujemnych, choć w przypadku obu punktów końcowych różnica nie była istotna statystycznie ($P=0,121$ dla OS i $0,078$ dla DFS). Ponieważ wykazano statystycznie istotnie większy odsetek infekcji HPV16 w OPSCC, osobną analizę przeżyć przeprowadzono dla podgrupy 63 chorych na guzy w tej lokalizacji. W podgrupie tej obecność HPV16 nie wpływała w statystycznie istotny sposób na 5-letnie OS ($P=0,086$), natomiast zakażenie to było statystycznie istotnie skorelowane z większym prawdopodobieństwem 5-letnich DFS ($P=0,048$). Biorąc zatem pod uwagę ten wynik, jak również fakt, że największy odsetek wirusowej infekcji stwierdzono w podgrupie chorych na OPSCC, a w pozostałych lokalizacjach był on statystycznie istotnie mniejszy, zdecydowano przeprowadzić dalszą część analizy w podgrupie 63 chorych na OPSCC. Wśród 63 OPSCC, nadekspresję CD44, CD98, ALDH1/2, Nanog Oct-3/4 i Sox-2 stwierdzono odpowiednio w: 43 (68,2%), 30 (47,6%), 33 (52,4%), 53 (84,1%), 0 (0,0%) i 27 (42,9%) nowotworach. Rozkład guzów z brakiem nadekspresji i nadekspresją CD44 był

statystycznie istotnie zależny od stopnia zaawansowania klinicznego T ($P=0,024$) i immunoreaktywności P16 ($P=0,040$). Brak nadekspresji CD98 istotnie częściej stwierdzono w guzach kobiet ($P=0,029$), starszych chorych ($P=0,032$), nienadużywających alkoholu ($P=0,0135$) i niepalących nałogowo papierosów ($P=0,042$). Brak nadekspresji ALDH1/2 istotnie częściej występował wśród guzów rogowaciejących ($P=0,005$). Odsetek guzów z brakiem nadekspresji bądź nadekspresją Nanog był statystycznie istotnie związany z wiekiem chorych ($P=0,017$), płcią ($P=0,003$) i poziomem spożycia alkoholu ($P=0,014$). Wśród HPV16 dodatnich OPSCC statystycznie istotnie częściej występowały nowotwory z brakiem nadekspresji CD98 ($P=0,011$), nadekspresją Nanog ($P=0,033$) i brakiem nadekspresji Sox-2 ($P=0,003$). W podgrupie chorych HPV16-zależnych ($n=25$), jednoczynnikowa analiza przeżyć wykazała istotnie wyższe OS chorych z mniejszym poziomem palenia tytoniu ($P=0,037$) i mniejszymi stopniami klinicznego zaawansowania N ($P=0,028$). Wieloczynnikowa analiza regresji Coxa ujawniła, że w podgrupie z wirusową infekcją niezależnymi korzystnymi czynnikami prognostycznymi były: mniejszy poziom palenia tytoniu ($P=0,036$) i mniejsze stopnie klinicznego zaawansowania N ($P=0,023$). W podgrupie tej odnotowano także istotnie większe 5-letnie DFS dla chorych charakteryzujących się mniejszymi stopniami klinicznego zaawansowania T ($P=0,043$), brakiem nadekspresji CD44 ($P=0,049$), brakiem nadekspresji Sox-2 ($P=0,003$) oraz leczonych jednoczesną chemioradioterapią z cisplatyną (CRT-CisPt) ($P=0,049$). Warto zaznaczyć, że wszyscy chorzy z infekcją HPV16 i leczeni CRT-CisPt (radycznie lub uzupełniająco) przeżywali 5 lat bez objawów choroby nowotworowej. W podgrupie HPV16 dodatniej w wieloczynnikowej analizie regresji Coxa zidentyfikowano jako niezależne korzystne czynniki prognostyczne dla 5-letnich DFS: brak nadekspresji CD44 ($P=0,012$) i brak nadekspresji Sox-2 ($P=0,027$). W podgrupie chorych na HPV16-ujemne OPSCC jako niezależne korzystne czynniki prognostyczne ujawniono mniejsze stopnie zaawansowania T ($P=0,000$) dla OS oraz mniejsze stopnie zaawansowania T ($P=0,016$) i N ($P=0,045$) dla DFS. W tej podgrupie, oceniane markery CSCs nie miały wpływu na przeżycia chorych.

Wnioski: W podgrupie chorych na HPV16-zależne płaskonabłonkowe raki gardła środkowego niezależnymi korzystnymi czynnikami prognostycznymi w przypadku przeżyć bezobjawowych są: brak nadekspresji CD44 i brak nadekspresji Sox-2. Wprowadzenie oznaczenia tych markerów do praktyki klinicznej celem różnicowania rokowania chorych z infekcją HPV16 wymaga jednak dalszej walidacji immunohistochemicznej metody oznaczania ich ekspresji, badań

eksperymentalnych mających na celu wyjaśnienie mechanizmów biologicznych przedstawionych odkryć oraz badań klinicznych na większej liczbie chorych. Analizowane markery nowotworowych komórek macierzystych nie mają prognostycznego znaczenia w podgrupie chorych na HPV16-ujemnego płaskonabłonkowego raka gardła środkowego.