

Sława Szostek¹, Barbara Zawilińska¹, Małgorzata Klimek², Jolanta Kopeć¹,
Magdalena Kosz-Vnenchak¹

CZY OBECNOŚĆ HERPESWIRUSÓW W WYDZIELINIE SZYJKI MACICY MOŻE BYĆ CZYNNIKIEM ROKOWNICZYM PATOLOGII SZYJKI MACICY KOBIEC ZAKAŻONYCH HPV?*

IS THE PRESENCE OF HERPESVIRUSES IN CERVICAL SECRETIONS A
PROGNOSTIC FACTOR FOR CERVICAL PATHOLOGY IN HPV-POSITIVE WOMEN?

¹ Zakład Wirusologii Katedra Mikrobiologii Collegium Medicum UJ, Kraków

Kierownik Katedry Mikrobiologii: Piotr B. Heczko

² Klinika Ginekologii Onkologicznej Centrum Onkologii-Instytut Onkologii

im. M. Skłodowskiej-Curie, Oddział Kraków

Kierownik Kliniki Ginekologii Onkologicznej: Krzysztof Urbański

STRESZCZENIE

Neoplazja komórek szyjki macicy jest procesem złożonym i niewątpliwie związanym z zakażeniem wirusem brodawczaka ludzkiego.

Oceniono udział wirusów CMV, HSV-1, HSV-2 i EBV w zmianach przednowotworowych i raku szyjki macicy u 125 kobiet z różnym rozpoznaniem klinicznym: LSIL – 44, HSIL-12, rak szyjki macicy – 27. Grupę kontrolną stanowiły 42 kobiety bez zmian atypowych komórek nabłonka szyjki macicy. Genomowe DNA izolowano z wydzieliny szyjki macicy i oceniano przy pomocy PCR i nPCR. Genotypy HPV określano metodą hybrydyzacji (*reverse hybridisation line probe assay*).

Wśród infekcji towarzyszących HPV najczęściej wykrywano DNA CMV (32%), rzadziej EBV (14%) i HSV-1 (3%). Zaobserwowano, że w raku szyjki macicy zakażenie CMV i EBV występowało istotnie częściej ($p < 0,001$) niż w pozostałych grupach badanych. Częstość infekcji EBV narastała wraz z zaawansowaniem zmian dysplastycznych i była związana z zakażeniem HPV-16 ($p = 0,009$).

Ryzyko wystąpienia HPV-16 było 6,5 razy wyższe u kobiet zakażonych CMV (OR=6,44; 95% PU 2,68-15,48; $p = 0,001$) i 4,5 razy wyższe u kobiet zakażonych EBV (OR=4,58; 95% PU 1,45-14,46; $p = 0,009$). DNA HSV-1 i/lub HSV-2 wykrywano rzadko i tylko u kobiet z LSIL i grupy kontrolnej.

Przeprowadzone badania sugerują, że herpeswirusy szczególnie EBV i CMV mogą współuczestniczyć wraz z HPV w patogenezie raka szyjki macicy.

Słowa kluczowe: HPV, herpeswirusy, śródnabłonkowa neoplazja, rak szyjki macicy

ABSTRACT

Cervical carcinogenesis is a complex problem where papillomavirus is widely accepted as a causative agent. The correlation of CMV, EBV, HSV-1, HSV-2 with precancerous and cancer cervical lesions was investigated in 125 women with different diagnoses: LSIL – 44, HSIL – 12, cervical carcinoma – 27 vs. 42 women without abnormality in cytology (control group). Cervical secretion samples were submitted for DNA extraction and determined by PCR and nPCR. HPV DNA genotyping was performed with the reverse hybridisation line probe assay. Among HPV-positive specimens, CMV was detected in 32% of samples, EBV in 14% and HSV-1 in 3%. The presence of CMV and EBV DNA was more frequent in cervical cancer specimen than in other study groups ($p < 0.001$). The prevalence of EBV infection was increasing with the severity of cervical smear abnormality and was associated with HPV-16 ($p = 0.009$). The risk for HPV-16 infection was 6.4 fold higher for CMV positive women (OR=6.44; 95% CI 2.68-15.48; $p = 0.001$) and 4.5 fold higher for EBV positive women (OR=4.58; 95% CI 1.45-14.46; $p = 0.009$). HSV-1 and/or HSV-2 infections were detected rarely and only in the women with LSIL and in the control group. Our data suggest that EBV and/or CMV may be associated with HPV in cervical carcinogenesis.

Key words: HPV, herpesviruses, squamous intraepithelial lesions, cervical carcinoma

* Badania finansowane z funduszy projektu badawczego MNiSW nr NN401219034

Praca przedstawiona na Konferencji Naukowej „Leczenie chorób zakaźnych” 18-20 września 2008, Bydgoszcz

WSTĘP

Wirus Papilloma (HPV) jest uznanym czynnikiem etiopatologicznym raka szyjki macicy. U młodych kobiet zakażenia HPV występują powszechnie i często mają charakter przejściowy. Długoletnia infekcja przetrwała, szczególnie genotypami HPV o wysokim potencjale onkogennym prowadzi do integracji wirusa z genomem komórki gospodarza i ekspresji onkogenów wirusowych E6 i E7. Ocenia się, że 75% aktywnych seksualnie kobiet ma kontakt z wirusem, a na każdy milion zakażonych przypada 100 000 kobiet, u których rozwijają się zmiany przednowotworowe (1). Tak więc, infekcja wirusowa faktycznie wyprzedza w czasie pojawienie się raka szyjki macicy, ale samo zakażenie HPV nie jest czynnikiem wystarczającym do rozwoju nowotworu. Na proces karcinogenezy ma również wpływ szereg innych czynników, do których zaliczyć można współistniejące zakażenia przenoszone drogą płciową.

Już w latach 60. i 70. XX wieku zwrócono uwagę na 2-3 krotnie wyższe ryzyko rozwoju raka szyjki macicy u kobiet posiadających przeciwciała swoiste dla wirusa *Herpes simplex* typu 2 (HSV-2) w porównaniu z kobietami seronegatywnymi (2). Eksperymenty przeprowadzone *in vitro* dotyczące indukcji transformacji nowotworowej, immortalizowanych przez HPV ludzkich komórek nabłonka szyjki macicy przy pomocy sekwencji *XhoII* genomu wirusa HSV-2 pokazały taki związek (3). Udało się też indukować zmiany dysplastyczne i nowotworowe w obrębie szyjki macicy u myszy po doświadczalnym zakażeniu inaktywowanym ludzkim wirusem cytomegalii (CMV) (4). Również wirus Epsteina-Barr (EBV) odpowiedzialny za rozwój chłoniaków (chłoniak Burkitta, Hodgkina, chłoniaki z limfocytów T) i raka nosogardzieli jest brany pod uwagę w etiopatogenezie takich nowotworów jak rak żołądka i piersi (5, 6).

Celem pracy było określenie częstości występowania zakażeń wirusami z rodziny *Herpesviridae* takich jak CMV, HSV-1, HSV-2 i EBV u kobiet zakażonych HPV, u których stwierdzono zmiany patologiczne w szyjce macicy.

MATERIAŁ I METODY

Wymazy z tarczy i kanału szyjki macicy pobrano od 125 kobiet w wieku 18-77 lat (śr. wiek 39 ± 15), u których rozpoznano śród nabłonkową neoplazję małego stopnia - LSIL (n = 44), dużego stopnia - HSIL (n = 12) i raka szyjki macicy (n = 27). Kontrolę stanowiły 42 kobiety w wieku 18-35 lat (śr. wiek 26 ± 7), poddane badaniom profilaktycznym przed planowaną ciążą, u których nie wykazano zmian atypowych komórek

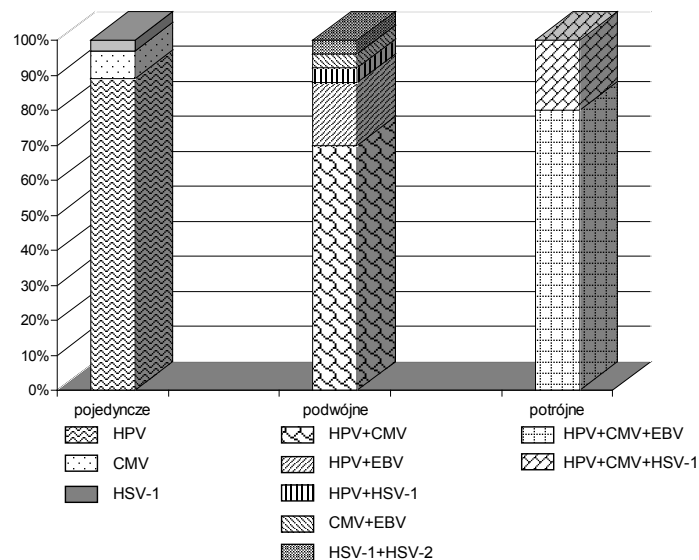
nabłonka szyjki macicy. Do czasu wykonania oznaczeń materiały przechowywano w soli fizjologicznej w stanie zamrożenia w -70°C .

Genomowe DNA izolowano metodą kolumnkową wg zaleceń producenta stosując odczynniki Genomic DNA Prep Plus kit firmy A&A Biotechnology. Obecność wirusowego DNA oceniano przy pomocy PCR i nPCR. Reakcje amplifikacji wykonywano z użyciem swoistych starterów i zgodnie z opublikowaną wcześniej procedurą (7, 8, 9, 10). Produkty reakcji PCR wykrywano elektroforetycznie. Genotypy HPV określano metodą hybrydyzacji stosując zestaw INNO-LiPA HPV *genotyping assay* (Innogenetics), umożliwiający rozróżnienie genotypów o wysokim potencjale onkogennym (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 70) i niskim potencjale onkogennym (HPV 6, 11, 34, 40, 42, 43, 44, 53, 54, 74). Prawidłowość reakcji PCR sprawdzano dołączając do każdego cyklu odpowiednie kontrole dodatnie (komórki linii CaSki z insertem HPV16, MRC-5 zakażone CMV AD-169, linia Namalwa z chłoniaka Burkitta, komórki linii RK-13 zakażone szczepami wzorcowymi HSV-1 i HSV-2). Jako kontrole ujemne stosowano DNA izolowane z hodowli niezakażonych wirusami i dejonizowaną wodę. Reakcja PCR ze starterami swoistymi dla beta-aktyny stanowiła kontrolę procesu izolacji DNA z materiału klinicznego (11).

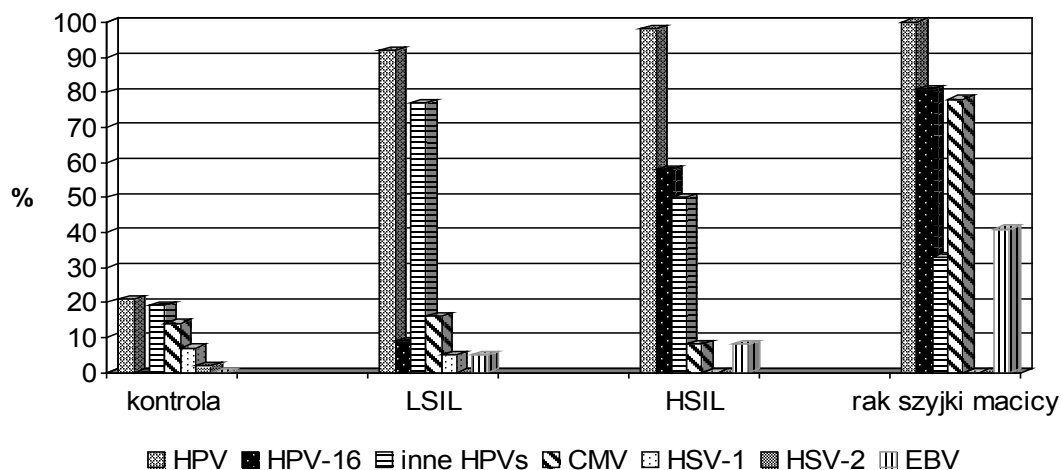
Uzyskane wyniki analizowano stosując testy statystyczne: Fishera (Fisher's exact test) i Kruskal-Wallisa. Aby określić wpływ zakażeń herpeswirusowych na rozwój zmian śród nabłonkowych szyjki macicy oraz podatność na infekcję wysoko onkogenicznymi typami HPV wykonano analizę regresji logistycznej standaryzowanej do wieku. Do analizy statystycznej użyto pakietu statystycznego STATA 8.0

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

W przeprowadzonych badaniach pojedyncze zakażenie wirusowe szyjki macicy obserwowano u 62 kobiet, w tym w 89% przypadków były to papillomawirusy, w 8% CMV i w 3% HSV-1. Obecność 2 wirusów stwierdzono u 27 kobiet (w 70% HPV i CMV, w 18% HPV i EBV, w 4% HPV i HSV, w 4% CMV i EBV lub HSV-1 i HSV-2) (ryc. 1). Natomiast potrójne zakażenie dotyczyło głównie pacjentek z rakiem szyjki macicy (w 8 przypadkach na 10). Obecność HPV wykazano u wszystkich pacjentek z rakiem szyjki macicy, 98% z HSIL, 92% kobiet z LSIL i 21% badanych profilaktycznie. Genotypowanie pozwoliło na zidentyfikowanie dziewiętnastu różnych typów HPV. Dominował HPV-16 (37%), następnie HPV-51 (28%) i HPV-52 (17%). Wśród zakażeń towarzyszących HPV najczęściej wykrywano DNA CMV (32%), rzadziej EBV (14%) i HSV-1 (3%).



Ryc. 1. Występowanie wirusowego DNA w wydzielinie szyjki macicy (zakażenia pojedyncze i mieszane)
 Fig. 1. The presence of viral DNA in cervical smears (single and multiple infection)



Ryc. 2. Częstość występowania DNA HPV, CMV, HSV-1, HSV-2 oraz EBV w wydzielinie szyjki macicy u 125 kobiet w zależności od zaawansowania zmian śród nabłonkowych

Fig. 2. Prevalence of HPV, CMV, HSV-1, HSV-2 and EBV DNA in the cervix of 125 women according to the degree of cervical lesion

Wykazano znamienne wyższą częstość występowania DNA wirusów HPV, EBV, CMV w grupie badanej w porównaniu do grupy kontrolnej ($p < 0,05$) (ryc. 2). Zaobserwowano, że w raku szyjki macicy zakażenie CMV i EBV występowało istotnie częściej ($p < 0,001$) niż w pozostałych grupach rozpoznania. W naszych badaniach wykazano wyższy odsetek (78%) zakażonych wirusem cytomegalii w grupie pacjentek z rakiem szyjki macicy w porównaniu z danymi dotyczącymi chorych z Tajwanu (67%) i z Australii (4%) (12, 13). Choć ostatnie doniesienia dotyczące badań przeprowadzonych we Włoszech nie potwierdzają bezpośredniego związku CMV z procesem onkogenezy szyjki macicy, to wskazują na możliwą kooperację wirusa cytomegalii z innym herpeswirusem, HHV-6, w rozwoju zmian

śród nabłonkowych szyjki macicy (14). Mechanizm transformacji komórkowej przy udziale CMV mógłby być związany z ekspresją wczesnych białek wirusowych IE1 i IE2, które okazały się mutagenne na modelu zwierzęcym (15). Zwolennicy teorii „hit and run” uważają wirusa cytomegalii za jeden z czynników inicjujących transformację, a trudności z bezpośrednim potwierdzeniem tego zakażenia w komórkach nowotworowych tłumaczą eliminacją wirusowego DNA w trakcie procesu onkogenezy (16). Z kolei autorzy angielscy, na podstawie badań porównawczych przeprowadzonych wśród pacjentek zakażonych wysoko onkogennymi typami HPV i wśród HPV- negatywnych kobiet, sugerują rolę CMV, HHV-6 i HHV-7 jako wirusów tylko współwystępujących w nabłonku szyjki macicy, a nie

kofaktorów procesu nowotworowego (17). W badaniach własnych zaobserwowano znamienne korelację pomiędzy obecnością DNA CMV a papillomawirusami, bez względu na genotyp HPV ($p=0.045$).

Częstość zakażeń EBV w badanej grupie narastała wraz z zaawansowaniem zmian dysplastycznych ($p<0,001$) i wynosiła 5% u kobiet z LSIL, 8% z HSIL, oraz 41% u kobiet z rakiem szyjki macicy. Obserwowano także związek pomiędzy występowaniem tego wirusa i zakażeniem HPV-16 ($p=0.009$). Nie wykazano obecności DNA EBV w grupie kontrolnej (ryc. 2). Podobnie znamienne różnice w częstości występowania DNA EBV wykazali inni autorzy u kobiet ze śródnabłonkową neoplazją i rakiem szyjki macicy w porównaniu do grupy kobiet bez zmian cytologicznych. *Sasagawa* i in. stwierdzili obecność EBV u 55% kobiet z rakiem w porównaniu do 26% kobiet z grupy kontrolnej, natomiast *Szkaradkiewicz* i in. odpowiednio 50% vs 31% a *Kim* i in. - 37% vs 9% (18, 19, 20). Rola wirusa EBV w onkogenezie szyjki macicy może być między innymi związana ze wzmożoną ekspresją wirusowych genów LMP-1 i EBNA-2, którym przypisuje się udział w procesie transformacji ludzkich limfocytów B (18). Również pewne znaczenie może mieć obecność metylowanych regionów promotorowych genów regulatorowych gospodarza w komórkach zakażonych wirusami HPV i EBV (20, 21).

Wyniki badań serologicznych przeprowadzonych w kilku ośrodkach wskazują, że przeciwciała swoiste dla HSV-2 występują znacznie częściej u chorych na raka szyjki macicy w porównaniu do kobiet z grupy kontrolnej (22, 23, 24). W naszych badaniach zaobserwowano obecność wirusów opryszczki w wydzielinie szyjki macicy tylko u kobiet z grupy kontrolnej i z rozpoznaniem LSIL. Pacjentki te nie miały klinicznych objawów zakażenia. Z kolei u kobiet ze znacznymi zmianami dysplastycznymi (HSIL) i rakiem szyjki macicy nie obserwowano tych zakażeń. Podobnie *Tran-Thanh* i in. badając wycinki raka szyjki macicy nie wykazali sekwencji swoistych dla HSV-2, a *Finan* i in. oceniając ryzyko rozwoju raka u kobiet HPV-pozytywnych, zakażonych *Chlamydia trachomatis* i/lub wirusami opryszczki nie obserwowali takiego związku w przypadku wirusa HSV-2 (25, 26). W badaniach własnych ryzyko wystąpienia HPV-16, typu najsilniej związanego z rakiem szyjki macicy, wzrastało u kobiet zakażonych CMV 6,4 krotnie ($OR=6,44$; 95% PU 2,68-15,48; $p=0,001$) i 4,5 krotnie u pacjentek zakażonych EBV ($OR=4,58$; 95% PU 1,45-14,46; $p=0,009$).

WNIOSEK

Przeprowadzone badania wśród kobiet z różnym stopniem zaawansowania zmian śródnabłonkowych

szyjki macicy wskazują, że ryzyko progresji nowotworzenia wzrasta u kobiet HPV dodatnich zakażonych wirusami EBV i CMV. Wyniki nasze przemawiają, że wirusy te mogą współuczestniczyć wraz z HPV w patogenezie raka szyjki macicy.

PIŚMIENNICTWO

1. Scheurer ME, Tortolero-Luna G, Adler-Storthz K. Human papillomavirus infection: biology, epidemiology, and prevention. *Int J Gynecol Cancer* 2005; 15: 727-746.
2. Rawls WE, Tompkins WA, Figueroa ME, i in. Herpesvirus type 2: association with carcinoma of the cervix. *Science* 1968;161: 1255-6.
3. DiPaolo JA, Woodworth CD, Coutlée F, i in. Relationship of stable integration of herpes simplex virus-2 Bg/II N subfragment Xho2 to malignant transformation of human papillomavirus-immortalized cervical keratinocytes. *Int J Cancer* 1998; 76: 865-71.
4. Heggie AD, Wentz WB, Reagan JW, i in. Roles of cytomegalovirus and Chlamydia trachomatis in the induction of cervical neoplasia in the mouse. *Cancer Res* 1986; 46: 5211-4.
5. Vo QN, Geradts J, Gulley ML, i in. Epstein-Barr virus in gastric adenocarcinomas: association with ethnicity and CDKN2A promoter methylation. *J Clin Pathol* 2002; 55: 669-75.
6. Glaser SL, Hsu JL, Gulley ML. Epstein-Barr virus and breast cancer: state of the evidence for viral carcinogenesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13: 688-97.
7. Szostek S, Klimek M, Zawilińska B, i in. Detection of human papillomavirus in cervical cell specimens by hybrid capture and PCR with different primers. *Acta Biochim Pol* 2006; 53: 603-7.
8. Zawilińska B, Piatkowska-Jakubas B, Kopeć J, i in. Zakażenia wirusem Epsteina-Barr (EBV) u pacjentów leczonych allogenicznym przeszczepieniem komórek hemmopoetycznych (allo-HCT). *Przegl Epidemiol* 2006; 60: 87-92.
9. Zawilińska B, Bulek K, Kopeć J, i in. In situ detection of DNA and mRNA of human cytomegalovirus to distinguish different forms of viral infection in leukocytes. *Acta Biochim Pol* 2006; 53: 457-61.
10. Cassinotti P, Mietz H, Siegl G, i in. Suitability and clinical application of a multiplex nested PCR assay for the diagnosis of herpes simplex virus infections. *J Med Virol* 1996; 50: 75-81.
11. Guzik K, Bzowska M, Dobrucki J, i in. Heat-shocked monocytes are resistant to Staphylococcus aureus-induced apoptotic DNA fragmentation due expression of HSP 72. *Infect Immun* 1999; 67: 4216-22.
12. Han CP, Tsao YP, Sun CA. Human papillomavirus, cytomegalovirus and herpes simplex virus infections for cervical cancer in Taiwan. *Cancer Lett* 1997; 120: 217-21.
13. Thompson CH, Rose BR, Elliott PM. Cytomegalovirus and cervical cancer: failure to detect a direct association

- or an interaction with human papillomaviruses. *Gynecol Oncol* 1994; 54: 40-6.
14. Broccolo F, Cassina G, Chiari S. Frequency and clinical significance of human beta-herpesviruses in cervical samples from Italian women. *J Med Virol* 2008; 80: 147-53.
 15. Shen Y, Zhu H, Shenk T. Human cytomegalovirus IE1 and IE2 proteins are mutagenic and mediate "hit-and-run" oncogenic transformation in cooperation with the adenovirus E1A proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 3341-5.
 16. Lanham S, Herbert A, Basarab A, i in. Detection of cervical infections in colposcopy clinic patients. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 2946-50.
 17. Chan PK, Chan MY, Li WW, i in. Association of human beta-herpesviruses with the development of cervical cancer: bystanders or cofactors. *J Clin Pathol* 2001; 54: 48-53.
 18. Sasagawa T, Shimakage M, Nakamura M, i in. Epstein-Barr virus (EBV) genes expression in cervical intraepithelial neoplasia and invasive cervical cancer: a comparative study with human papillomavirus (HPV) infection. *Hum Pathol* 2000; 31: 318-26.
 19. Szkaradkiewicz A, Wal M, Kuch A, i in. Human papillomavirus (HPV) and Epstein-Barr virus (EBV) cervical infections in women with normal and abnormal cytology. *Pol J Microbiol* 2004; 53: 95-9.
 20. Kim NR, Lin Z, Kim KR, i in. Epstein-Barr virus and p16INK4A methylation in squamous cell carcinoma and precancerous lesions of the cervix uteri. *J Korean Med Sci* 2005 ; 20: 636-42.
 21. Lattario F, Furtado YL, Fonseca R, i in. Analysis of human papillomavirus and Epstein-Barr virus infection and aberrant death-associated protein kinase methylation in high-grade squamous intraepithelial lesions. *Int J Gynecol Cancer* 2008; 18: 785-9.
 22. Smith JS, Herrero R, Bosetti C, i in. Herpes simplex virus-2 as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94(21): 1604-13.
 23. Thomas DB, Qin Q, Kuypers J, i in. Human papillomaviruses and cervical cancer in Bangkok. II. Risk factors for in situ and invasive squamous cell cervical carcinomas. *Am J Epidemiol* 2001; 153: 732-9.
 24. Muñoz N, Kato I, Bosch FX, i in. Cervical cancer and herpes simplex virus type 2: case-control studies in Spain and Colombia, with special reference to immunoglobulin-G sub-classes. *Int J Cancer* 1995; 60: 438-42.
 25. Tran-Thanh D, Provencher D, Koushik A, i in. Herpes simplex virus type II is not a cofactor to human papillomavirus in cancer of the uterine cervix. *Am J Obstet Gynecol* 2003;188:129-34.
 26. Finan RR, Musharrafieh U, Almawi WY. Detection of Chlamydia trachomatis and herpes simplex virus type 1 or 2 in cervical samples in human papilloma virus (HPV)-positive and HPV-negative women. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12: 927-30.

Adres do korespondencji:

Dr Sława Szostek
Zakład Wirusologii Katedra Mikrobiologii Collegium
Medicum UJ
ul. Czysza 18, 31-121 Kraków,
tel. 012/634-54-00;
e-mail: szostek@cm-uj.krakow.pl