

Daša Gluvajić¹, Lea Hošnjak², Vida Stegel³, Srdjan Novaković⁴, Nina Gale⁵, Mario Poljak⁶, Irena Hočevnar Boltežar⁷

Rakava preobrazba v laringealni papilomatozi

Malignant Transformation in Laryngeal Papillomatosis

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: humani papilomavirus, grlo, papilom, ploščatocelični karcinom

IZHODIŠČA. Pri bolnikih z laringealno papilomatozo smo opredelili incidenco visokorizične intraepitelijske ploščatocelične spremembe in ploščatoceličnega karcinoma v papilomih grla ter dejavnike tveganja za nastanek navedenih epitelijskih sprememb. **METODE.** Pri 163 bolnikih z laringealno papilomatozo smo iz kliničnih podatkovnih zbirk retrospektivno zbrali podatke ter v arhivskih tkivnih vzorcih laringealnih papilomov z molekularnimi postopki opredelili okužbo s humanimi papilomavirusi (HPV), z *in situ* hibridizacijo pa mRNA prepise beljakovin *E6* in *E7* ter opravili sekvenciranje nekaterih gostiteljevih genov. **REZULTATI.** Visokorizične intraepitelijske ploščatocelične spremembe smo dokazali pri 21,5 %, ploščatocelični karcinom v papilomih grla pa pri 4,3 % bolnikov z laringealno papilomatozo. Najpomembnejša dejavnika tveganja za nastanek navedenih epitelijskih sprememb sta bila višja starost ob diagnozi in HPV-negativno tkivo laringealnih papilomov ($p < 0,05$). Visokorizične intraepitelijske ploščatocelične spremembe v tkivu laringealnih papilomov so se pokazale kot dejavnik tveganja za rakavo preobrazbo ($p < 0,05$). Patološke mutacije v gostiteljevih genih smo dokazali pri treh od sedmih bolnikov z rakavo preobrazbo laringealne papilomatoze. **RAZPRAVA.** Histopatološka ocena kirurško odstranjenih laringealnih papilomov in dokaz HPV DNA sta pomembna za zgodnje odkrivanje epitelijskih sprememb v laringealni papilomatozi. Potrebno je dodatno raziskovanje vloge mutacij gostiteljevih genov, ki lahko sodelujejo pri rakavi preobrazbi laringealne papilomatoze.

¹ Asist. Daša Gluvajić, dr. med., Klinika za otorinolaringologijo in cervikofacialno kirurgijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana; dasa.gluvajic@kclj.si

² Asist. znanst. sod. dr. Lea Hošnjak, univ. dipl. mikr., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

³ Dr. Vida Stegel, univ. dipl. biol., Oddelek za molekularno diagnostiko, Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana

⁴ Znan. svet. dr. Srdjan Novaković, univ. dipl. biol., Oddelek za molekularno diagnostiko, Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana

⁵ Prof. dr. Nina Gale, dr. med., Inštitut za patologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Korytkova ulica 2, 1000 Ljubljana

⁶ Prof. dr. Mario Poljak, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

⁷ Prof. dr. Irena Hočevnar Boltežar, dr. med., Klinika za otorinolaringologijo in cervikofacialno kirurgijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana; Katedra za otorinolaringologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana

ABSTRACT

KEY WORDS: human papillomavirus, larynx, papilloma, squamous cell carcinoma

BACKGROUND. The incidence and risk factors for the development of high-grade squamous intraepithelial lesions and laryngeal squamous cell carcinoma were assessed in patients with laryngeal papillomatosis. **METHODS.** Clinical data, the presence of human papillomaviruses (HPV), HPV E6/E7 mRNA transcripts and mutations of host genes in laryngeal papillomatosis biopsies of 163 patients were analysed. **RESULTS.** Progression to high-grade squamous intraepithelial lesions and laryngeal squamous cell carcinoma were identified in 21.5% and 4.3% of patients with laryngeal papillomatosis, respectively. Older age at laryngeal papillomatosis onset and lack of HPV infection were detected as risk factors for the development of high-grade squamous intraepithelial lesions and laryngeal squamous cell carcinoma ($p < 0.05$). The identification of a high-grade squamous intraepithelial lesion was associated with its progression to laryngeal squamous cell carcinoma ($p < 0.05$). Host gene mutations were identified in three out of seven patients with laryngeal squamous cell carcinoma. **DISCUSSION.** The histological monitoring of laryngeal papillomatosis and HPV typing are necessary for early detection of epithelial changes. Further research is needed to elucidate the role of host gene mutations in laryngeal squamous cell carcinoma transformation.

IZHODIŠČA

Laringealno papilomatozo (LP), ki se klinično kaže s hripavostjo, redkeje pa z oteženim dihanjem in stridorjem, glede na starost ob diagnozi delimo na juvenilno in odraslo obliko (1–3). Čeprav je trenutno uradno opredeljenih že več kot 220 različnih genotipov humanih papilomavirusov (HPV), HPV-6 in -11 iz rodu *Alphapapillomavirus* povzročata več kot 90 % vseh primerov LP (2, 4). Napoved poteka bolezni je pri večini bolnikov z LP dobra, vendar je klinični potek bolezni nepredvidljiv. Tako so Doyle in sodelavci glede na letno število opravljenih kirurških posegov, skupno število kirurških posegov in hitro širjenje papilomov v subglotis ter v distalne dihalne poti opredelili agresivni in neagresivni klinični potek LP (5). Poleg agresivnega lahko teži klinični potek predstavlja tudi rakava preobrazba LP. V strokovni literaturi je pojavljanje visokorizične intraepitelijske ploščatocelične spremembe (VR-IPS) v LP opisano pri do 17,6 % bolnikov, pojavljanje ploščatoceličnega karcinoma v laringealni

papilomatozi (PCK-LP) pa pri do 5,7 % bolnikov (6, 7). Čeprav je bilo dokazano, da se v LP lahko pojavljajo različne stopnje intraepitelijske ploščatocelične spremembe (IPS), še ni bilo potrjeno, ali je VR-IPS pri bolnikih z LP dejavnik tveganja za rakavo preobrazbo (7, 8). Glede na onkogeno zmožnost sta HPV-6 in -11 uvrščena v nizkorizične humane papilomaviruse (NR-HPV), saj zelo redko povzročata rakave bolezni. Genom NR-HPV je večinoma v episomalni obliki in ne izraža onkogenih virusnih beljakovin E6 in E7, ki imata sicer tudi nižjo afiniteto vezave na tumor zavirajoči beljakovino 53 (angl. *protein 53, p53*) in retinoblastomsko beljakovino (angl. *retinoblastoma protein, pRb*) (9). Čeprav v primerjavi z NR-HPV E6 in E7 visokorizičnih humanih papilomavirusov (VR-HPV) delujeta na več načinov, so nekatere od nalog virusnih onkogenih beljakovin podobne in tako lahko tudi po okužbi z NR-HPV pride do zaviranja celične apoptoze, čezmerne celične rasti in razmnoževanja ter celične nesmrtnosti, vendar redkeje kot pri VR-HPV (10). Do zdaj opisani

dejavniki tveganja za pojav VR-IPS in PCK-LP so: odsotnost HPV DNA v tkivu LP, okužba z VR-HPV, kajenje, predhodno obsevanje grla in uporaba dopolnilnega zdravila cidofovir, ki se vbrižga neposredno v glasilki po odstranitvi papilomov (6, 7). Dokaz HPV DNA v tkivu ni zadosten dokaz vzročne povezave med okužbo in nastankom PCK, saj je za nastanek navedene maligne preobrazbe celic potrebna vgraditev genoma HPV v gostiteljev genom in izražanje virusnih onkogenov *E6* in *E7*, kar lahko dokažemo z določanjem prisotnosti mRNA *E6* in *E7* v tkivu (11).

Namen naše raziskave je bil opredeliti incidenco VR-IPS ter PCK-LP pri bolnikih z LP in ugotoviti, kateri dejavniki tveganja vplivajo na pojav navedenih epitelijskih sprememb v LP. Dodatno smo v tkivu kirurško odstranjenih LP in PCK-LP želeli ugotoviti, ali pri rakavi preobrazbi LP pride do vgraditve HPV v gostiteljev genom in ali so v tkivu prisotne mutacije gostiteljevih genov (npr. *TP53* (angl. *tumor protein 53*)), ki so sicer pogoste pri malignih tumorjih glave in vratu.

METODE

Izbor preiskovancev

V longitudinalno retrospektivno raziskavo smo vključili 217 bolnikov s histopatološko potrjeno diagnozo LP, ki so se med letoma 1974 in 2018 zdravili na Kliniki za otorinolaringologijo (ORL) in cervikofacialno kirurgijo (CFK) Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana.

Izmed navedenih 217 bolnikov smo nato na podlagi pregleda kliničnih podatkovnih zbirk in histopatološkega arhiva Inštituta za patologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani izbrali 163 preiskovancev z LP, ki so bili na Kliniki za ORL in CFK spremljani vsaj eno leto. Zaradi krajšega obdobja spremljanja in pomanjkanja arhivskih tkivnih vzorcev smo iz raziskave izključili preostalih 54 bolnikov.

Vsi tkivni vzorci so bili odvzeti po predhodnem soglasju bolnikov in v skladu

s Helsinško deklaracijo, raziskavo pa je odobrila tudi Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko (št. dokumenta 79/07/15).

Klinični podatki preiskovancev

Iz popisov bolezni smo za vseh 163 bolnikov, vključenih v raziskavo, pridobili naslednje podatke: spol, starost ob diagnozi LP, število in datume kirurških posegov, širjenje LP v subglotis in distalne dihalne poti, opravljena traheotomija zaradi LP, kajenje, dopolnilno zdravljenje s cidofovirjem in čas sledenja. Glede na starost ob histopatološki diagnozi LP (več ali manj kot 15 let) smo bolnike razvrstili v skupini z odraslo in juvenilno obliko LP (1, 12). Klinični potek LP smo kot agresiven opredelili po naslednjih merilih: pri zdravljenju LP je bilo potrebnih deset ali več kirurških posegov in/ali tri ali več kirurških posegov letno in/ali hitra (v šestih mesecih od diagnoze) razširitev papilomov v subglotis in/ali v distalne dihalne poti (5).

Skupino 163 bolnikov z LP smo glede na pregledane histopatološke izvide vseh opravljenih kirurških posegov v skladu z Modificirano ljubljansko razvrstitvijo razdelili v skupino z dokazano nizkorizično intraepitelijsko ploščatocelično spremembo (NR-IPS) (128/163; 78,4 %), skupino z dokazano VR-IPS v vsaj enem tkivnem vzorcu LP (35/163; 21,5 %) (13, 14).

Opredeljevanje okužbe s humanimi papilomavirusi

Pri vseh 163 bolnikih smo v vsaj enem tkivnem vzorcu LP in/ali PCK-LP osamili celokupno DNA s komercialno dostopnim kompletom kemikalij QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Nemčija) po predhodno opisanem postopku, opredelili koncentracijo celokupne DNA na napravi NanoDrop 2000c (NanoDrop Technologies, Oxfordshire, Velika Britanija) in primernost izolatov DNA za nadaljnje analize na podlagi pomnoževanja 150 baznih parov (bp) dolgega dela gena za človeški beta-globin (15–17).

V nadaljevanju smo opredelili prisotnost HPV-6/-11 z verižno reakcijo s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction*, PCR) v realnem času, ki omogoča zelo občutljivo in specifično zaznavanje ter zanesljivo razlikovanje med HPV-6 in -11 ter dodatno tudi razlikovanje med prototipskimi (HPV-6b) in neprototipskimi različicami HPV-6 (HPV-6a) po predhodno opisanem postopku (18). Če nismo zaznali HPV-6/-11 DNA v tkivih, smo izvedli še opredeljevanje prisotnosti drugih klinično pomembnih virusov iz rodu *Alphapapillomavirus*, pri tem smo uporabili splošni začetnik (angl. *general primer*, GP) 5+/6+/68 za PCR, s katerim lahko poleg HPV-6/-11 dokažemo tudi 140–150 bp velik del gena *L1* naslednjih genotipov HPV: HPV-13, -26, -16, -18, -30, -31, -32, -33, -34, -35, -39, -40, -42, -43, -44, -45, -51, -52, -53, -54, -55, -56, -57, -58, -59, -61, -66, -68, 70, -71, -72, -73, -81, -82, -83, -84, -89, -90 in -91 (19–21). Da bi se izognili lažno negativnim rezultatom, smo pri GP5+/6+/68 PCR-negativnih vzorcih dodatno uporabili še komercialno dostopen Anyplex II HPV28 Detection Kit (Seegene, Seoul, Južna Koreja), ki omogoča sočasno pomnoževanje s PCR v realnem času in zaznavanje 14 VR-HPV (HPV-16, -18, -31, -33, -35, -39, -45, -51, -52, -56, -58, -59, -66 in -68) in devetih NR-HPV (HPV-6, -11, -40, -42, -43, -44, -54, -61 in -70), v skladu z navodili proizvajalca.

Opređeljevanje vgraditvene in prepisovalne dejavnosti humanih papilomavirusov

Pri dveh tkivnih vzorcih PCK v LP smo predhodno dokazali prisotnost HPV DNA in v njih z *in situ* hibridizacijo na podlagi dokazovanja mRNA prepisov VR-HPV (HPV-16, -18, -31, -33, -35, -52, -58) ali NR-HPV (HPV-6, -11), glede na predhodno dokazan genotip HPV, dodatno opredelili izražanje virusnih beljakovin E6 in E7. Pri tem smo uporabili diagnostični komplet kemikalij in sonde RNA scope Probe 2.5 HD Assay-Brown

(Advanced Cell Diagnostics, Hayward, ZDA) po navodilih proizvajalca.

Genotipizacija tumor protein 53 za dokaz vloge mutacije gena tumor protein 53 pri rakavi preobrazbi laringealnih papilomov

Za vsakega od sedmih bolnikov s PCK-LP smo izbrali vzorec LP pred rakavo preobrazbo in vzorec PCK-LP (14 vzorcev) ter v raziskavo dodatno vključili osem kontrolnih vzorcev bolnikov z LP z dokazano NR-IPS. Postopek smo začeli z osamitvijo DNA iz fiksiranih tkivnih vzorcev, s formalinom vklopljenih v parafin (angl. *formalin-fixed paraffin-embedded*, FFPE) z uporabo QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen).

Kvantifikacijo osamljene DNA smo izvedli na Qubit Fluorimetru (Thermo Fisher Scientific) z uporabo Qubit dsDNA HS Assay Kita (Thermo Fisher Scientific, Waltham, ZDA) po navodilih proizvajalca. Kakovost genomske DNA smo ocenili glede na delta vrednosti praga cikla (angl. *cycle threshold*, Ct), ki smo jih pridobili z uporabo TruSeq FFPE DNA Library Prep QC Kita (Illumina, San Diego, ZDA) in izračunali kot razliko med vrednostmi-Ct svojih vzorcev in kontrolne DNA. Tako smo opredelili DNA dobre kakovosti (delta Ct 0–2), DNA srednje kakovosti (delta Ct 2–4) in DNA slabe kakovosti (delta Ct 4–6).

Analizo vzorcev smo izvedli s postopkom sekvenciranja druge generacije (angl. *next generation sequencing*) na aparatu MiSeqDx (Illumina) s kompletom reagentov za pripravo knjižnic TruSightTumor 15 Kit (Illumina), ki omogoča sekvenciranje najpogostejših klinično pomembnih točkovnih mutacij (angl. *hot spot mutations*) na vseh kodirajočih področjih (eksonih) gena *TP53* in v širokem razponu nekaterih drugih genov (*AKT1* (angl. *Ras-related C3 botulinum toxin substrate-beta serine/threonine-protein kinase 1*), *BRAF* (angl. *serine/threonine-protein kinase B-rapidly accelerated fibrosarcoma*), *EGFR* (angl. *epidermal growth factor receptor*),

ERBB2 (angl. *Erb-B2 receptor tyrosine kinase 2*), FOXL2 (angl. *forkhead box L2*), GNA11 (angl. *G protein subunit alpha 11*), GNAQ (angl. *guanine nucleotide-binding protein G(q) subunit alpha*), KIT (angl. *KIT proto-oncogene, receptor tyrosine kinase*), KRAS (angl. *Kirsten rat sarcoma virus*), MET (angl. *MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase*), NRAS (angl. *neuroblastoma rat sarcoma virus viral oncogene homolog*), PDGFRA (angl. *platelet-derived growth factor receptor alpha*), PIK3CA (angl. *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha*), RET (angl. *rearranged during transfection*)).

Statistična obdelava podatkov

Opisne spremenljivke smo opisali s frekvencami in deleži, številske pa z aritmetično sredino in standardnim odklonom (angl. *standard deviation*, SD). Povezavo med dejavniki tveganja in nastankom VR-IPS in/ali PCK-LP smo preverili s testom χ^2 ali v primeru majhnega števila preiskovancev s Fisherjevim testom. Za oceno vpliva statistično značilnih dejavnikov tveganja za nastanek VR-IPS in/ali PCK-LP smo uporabili relativno tveganje (95 % interval zaupanja (IZ)). Vse povezave in razlike s $p < 0,05$ smo obravnavali kot statistično značilne.

REZULTATI

V tabeli 1 so prikazane klinične značilnosti 163 bolnikov (113 moških in 50 žensk) s povprečnim časom sledenja 11,4 leta (SD 11,3, razpon: 1–62 let). Večina bolnikov (132/163, 81,0 %) s povprečno starostjo ob diagnozi LP 37,2 leta (SD 20,7, razpon: 1–82 let) (tabela 1) je imela odraslo obliko LP.

Opređeljevanje okužbe s humanimi papilomavirusi

HPV DNA smo dokazali pri 139/163 (85,3 %) bolnikov in pri večini (93/139, 66,9 %) opredelili okužbo s HPV-6: HPV-6a je bil prisoten pri 66/93 (71,0 %) bolnikov, HPV-6b pri 27/93 (29,0 %) bolnikov, en bolnik pa je imel sočasno okužbo s HPV-6a

in -6b (1/139, 0,7 %). Medtem ko smo okužbo z genotipom HPV-11 dokazali pri 38/139 (27,3 %) bolnikov, so 4/139 (2,9 %) bolnikov imeli sočasno okužbo s HPV-6 in -11. Dodatno smo pri 2/139 (1,4 %) bolnikov opredelili prisotnost HPV-16, pri enem bolniku pa sočasno okužbo s HPV-11 in -16 (1/139, 0,7 %). Pri statistični analizi nismo upoštevali bolnikov s sočasno okužbo HPV-6 in -11, medtem ko smo bolnika s sočasno okužbo s HPV-11 in -16 pri analizi vključili k bolnikom z dokazanim HPV-16.

Incidenca nizko- in visokorizične intraepitelijske ploščatocelične spremembe v laringealni papilomatozi

Medtem ko je pregled histopatoloških izvidov tkivnih vzorcev, odvzetih pri vseh opravljenih kirurških posegih, pokazal prisotnost NR-IPS v LP pri 128/163 (78,5 %) bolnikov, je bila VR-IPS dokazana v vsaj enem od tkivnih vzorcev LP pri 35/163 (21,5 %) bolnikov. Pri 9/35 (25,7 %) bolnikov smo VR-IPS dokazali že ob diagnozi iz prvega tkivnega vzorca LP, pri preostalih pa je bil povprečen čas od histopatološke diagnoze LP do pojava VR-IPS 6,9 leta (SD 10,1, razpon: 0–43 let). Povprečni čas sledenja med skupinama se ni statistično značilno razlikoval, saj je pri bolnikih z NR-IPS v LP znašal 11,3 leta (SD 11,7, razpon: 1–62 let), pri bolnikih z VR-IPS v LP pa 11,7 leta (SD 13,8, razpon: 1–61 let) ($p = 0,933$).

Ugotovili smo, da so bili v primerjavi s skupino z odraslo obliko LP (povprečna starost 58,2 leta, SD 16,7, razpon: 27–82 let) bolniki v skupini z juvenilno obliko LP ob pojavu VR-IPS v LP statistično značilno mlajši (povprečna starost 27 let, SD 15,9, razpon: 10–46 let) ($p < 0,001$). Prav tako je bil v skupini bolnikov z juvenilno obliko LP povprečni čas med histopatološko diagnozo LP in nastankom VR-IPS v LP daljši (21 let, SD 16,1, razpon: 1–42 let) v primerjavi z bolniki z odraslo obliko LP (3,9 leta, SD 3,4, razpon: 0–19 let) ($p = 0,004$).

Tabela 1. Opisna statistika in analiza dejavnikov tveganja v skupini bolnikov z dokazano nizkorizično intraepitelijsko ploščatocelično spremembo (NR-IPS) v laringealnih papilomih (LP) in skupini bolnikov z dokazano visokorizično intraepitelijsko ploščatocelično spremembo (VR-IPS) in/ali ploščatoceličnim karcinomom v laringealni papilomatozi (PCK-LP). N – število bolnikov, NR-IPS – nizkorizična intraepitelijska ploščatocelična sprememba, LP – laringealna papilomatoza, VR-IPS – visokorizična intraepitelijska sprememba, PCK-LP – ploščatocelični karcinom v laringealni papilomatozi, SD – standardni odklon (angl. *standard deviation*), HPV – humani papilomavirus.

Dejavniki tveganja	Vsi bolniki (N = 163) N (%)	Skupina bolnikov z NR-IPS v LP (N = 127) N (%)	Skupina bolnikov z VR-IPS in/ ali PCK-LP (N = 136) N (%)	p-vrednost
Spol				
Moški	113 (69,3 %)	86 (67,7 %)	27 (75,0 %)	0,403
Ženski	50 (30,7 %)	41 (32,3 %)	9 (25,0 %)	/
Povprečna starost ob diagnozi LP v letih	37,2	34,4	46,5	0,013
(SD)	(20,7)	(19,1)	(24,1)	/
Razpon	1–82	1–73	1–82	/
Oblika LP				
Juvenilna oblika	31 (19,0 %)	25 (19,7 %)	6 (16,7 %)	0,684
Odrasla oblika	132 (81,0 %)	102 (80,3 %)	30 (83,3 %)	/
Povprečno število kirurških posegov	5,6	5,2	7,1	0,754
(SD)	(6,7)	(5,1)	(10,6)	/
Razpon	1–48	1–27	1–48	/
Agresivni potek LP	33 (20,2 %)	25 (19,7 %)	8 (22,2 %)	0,738
Širjenje v subglotis	56 (34,4 %)	39 (30,7 %)	17 (47,2 %)	0,066
Širjenje v distalne dihalne poti	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	/
Traheotomija	6 (3,7 %)	4 (3,1 %)	2 (5,6 %)	0,499
HPV				
Pozitivno	139 (85,3 %)	112 (88,2 %)	27 (75,0 %)	0,049
Negativno	24 (14,7 %)	15 (11,8 %)	9 (25,0 %)	/
Kajenje	65 (41,0 %)	52 (42,8 %)	13 (38,1 %)	0,698
Manjkajoči podatki	5 (3,1 %)	3 (2,4 %)	2 (5,6 %)	/
Zdravljenje s cidofovirjem	15 (9,1 %)	9 (7,1 %)	6 (16,7 %)	0,100

Dejavniki tveganja za nastanek visokorizične intraepitelijske ploščatocelične spremembe in/ali ploščatoceličnega karcinoma v laringealni papilomatozi

Bolnike smo razdelili v dve skupini: (i) 127/163 (77,8 %) bolnikov z ugotovljeno NR-IPS v LP brez histološkega razvoja v višjo IPS v času sledenja in (ii) sestavljena skupina 36/163 (22,1 %) bolnikov z ugotovljeno VR-IPS v LP in/ali tistih z rakavo histološko spremembo PCK-LP.

V tabeli 1 smo prikazali analizo dejavnikov tveganja (spol, starost ob diagnozi, oblika LP, število posegov, potek LP, širjenje v subglotis in pljuča, prisotnost traheotomije, okužba s HPV, kajenje, zdravljenje s cidofovirjem) in ugotovili, da sta statistično značilna dejavnika za nastanek VR-IPS in/ali PCK-LP višja povprečna starost ob diagnozi ($p = 0,013$) in odsotnost HPV DNA v tkivu LP ($p = 0,049$).

Kot je razvidno iz tabele 1, so bili bolniki z VR-IPS in/ali PCK-LP ob diagnozi LP statistično značilno starejši v primerjavi s tistimi, ki so imeli le NR-IPS v LP (46,5 leta proti 34,4 leta). Dodatno pa smo dokazali tudi statistično značilno večje relativno tveganje za nastanek VR-IPS in PCK-LP po 40. letu (2,9-krat; 95 % IZ: 1,5–5,6), 50. letu

(2,5-krat; 95 % IZ: 1,4–4,4) in 60. letu (3,0-krat; 95 % IZ: 1,8–5,2) starosti ob diagnozi LP ($p < 0,001$). Kot smo nakazali že zgoraj, smo ugotovili, da so imeli bolniki, pri katerih nam HPV DNA ni uspelo opredeliti, v primerjavi z bolniki z dokazanim HPV DNA v tkivu LP 1,8-krat (95 % IZ: 1,0–3,6) večje relativno tveganje za nastanek VR-IPS v LP.

V tabeli 2 smo prikazali, da se prevalenca okužbe HPV in prisotnost določenih (pod)tipov HPV med analiziranimi skupinama ni statistično značilno razlikovala (tabela 2).

Analiza skupine preiskovancev z rakavo preobrazbo laringealnih papilomov

Pri 7/163 (4,3 %) bolnikov (šest moških, ena ženska) s povprečnim časom sledenja 13,8 leta (SD 20,6, razpon: 2–60 let) in mediano časa sledenja 5 let (kvartilni razmik (angl. *interquartile range*, IQR): 5–13) je histopatološka diagnostika razkrila, da se je v tkivu predhodno histopatološko opredeljenih LP razvil PCK-LP. Povprečna starost ob diagnozi LP v navedeni skupini bolnikov je bila 55,3 leta (SD 29,1, razpon: 3–82 let), kar je v primerjavi s celotno kohorto bolnikov (34,4 leta proti 55,3 leta; razlika povprečnih

Tabela 2. Opredeljeni (pod)tipi humanih papilomavirusov (HPV) v tkivnih vzorcih bolnikov z dokazano nizkorizično intraepitelijsko ploščatocelično spremembo (NR-IPS) v primerjavi s skupino bolnikov z dokazano visokorizično intraepitelijsko ploščatocelično spremembo (VR-IPS) in/ali ploščatoceličnim karcinomom v laringealni papilomatozi (PCK-LP). HPV – humani papilomavirus, NR-IPS – nizkorizična intraepitelijska ploščatocelična sprememba, LP – laringealna papilomatoza, N – število bolnikov, VR-IPS – visokorizična intraepitelijska sprememba, PCK-LP – ploščatocelični karcinom v laringealni papilomatozi.

HPV tip	Skupina bolnikov z NR-IPS v LP (N = 107) N (%)	Skupina bolnikov z VR-IPS in/ali PCK-LP (N = 27) N (%)	p-vrednost
HPV-6	73 (68,2 %)	20 (74,1 %)	0,771
HPV-6a	55 (75,3 %)	11 (55,0 %)	0,169
HPV-6b	18 (24,6 %)	9 (45,0 %)	0,159
HPV-11	33 (30,8 %)	5 (18,5 %)	0,130
HPV-16	1 (0,9 %)	2 (7,4 %)	0,123

vrednosti: 19,1; 95 % IZ: 3,4–34,6) statistično značilno višje ($p = 0,017$). Povprečna starost ob diagnozi PCK-LP je bila 65,3 leta (SD 20,3, razpon: 29–87 let), s povprečnim časom od diagnoze LP do rakave preobrazbe 9,8 leta (SD 18,5, razpon: 0–49 let).

V navedeni skupini smo pred pojavom PCK-LP pri 6/7 (85,6 %) bolnikov dokazali prisotnost VR-IPS v LP s povprečnim časom razvoja iz VR-IPS v PCK-LP 3,1 leta (SD 2,6, razpon: 0–6 let). Ugotovili smo, da je relativno tveganje za nastanek PCK-LP pri bolnikih z dokazano VR-IPS 21,8-krat večje (95 % IZ: 2,6–176,3) v primerjavi z bolniki, ki so imeli dokazano NR-IPS v LP (17,2 % proti 0,8 %) ($p < 0,001$).

Razliki v incidenci PCK v LP med bolniki z juvenilno in tistimi z odraslo obliko LP (3,1 % proti 4,4 %; $p = 1,000$) ter med kadilci in nekadilci (7,7 % proti 2,1 %; $p = 0,612$) nista bili statistično značilni. Kot je prikazano v tabeli 3, noben izmed sedmih bolnikov s PCK-LP ni bil zdravljen s cidofovirjem in le eden je imel agresivni klinični potek LP (tabela 3).

Opređeljevanje vgraditvene in prepisovalne aktivnosti humanih papilomavirusov

Pri večini bolnikov (5/7, 71,3 %) v tkivu LP in PCK-LP nismo opredelili prisotnosti HPV. Ugotovili smo, da do nastanka PCK v primerjavi s HPV-pozitivnimi statistično značilno pogosteje pride v HPV-negativnih LP (1,4 % proti 20,8 %, $p = 0,001$) in da je relativno tveganje za nastanek PCK 14,5-krat večje (95 % IZ: 2,8–70,3), če v tkivu LP ne moremo dokazati HPV DNA.

Kot smo predstavili v tabeli 3, smo pri 2/7 (28,6 %) PCK-LP bolnikov opredelili okužbo z istim (pod)tipom HPV (pri bolniku št. 1 HPV-6b in bolniku št. 7 HPV-16) v tkivu LP pred rakavo preobrazbo in v tkivu z dokazanim PCK. V obeh primerih smo v tkivnem vzorcu PCK-LP s postopkom *in situ* hibridizacije naknadno dokazali, da je prišlo do vgraditve HPV DNA v človeški genom (tabela 3).

Genotipizacija gena *tumor protein 53* za dokaz vloge njegove mutacije pri rakavi preobrazbi laringealne papilomatoze

Genotipizacijo *TP53* smo uspešno opravili v vseh (8/8, 100,0 %) kontrolnih vzorcih NR-IPS v LP in v vsaj enem vzorcu 4/7 (57,1 %) bolnikov s PCK-LP (št. 1, 2, 3, 7). Ne glede na prisotnost okužbe HPV v kontrolni skupini v navedenih vzorcih nismo dokazali mutacij v tarčnem delu človeškega genoma. Kot smo prikazali v tabeli 4, smo v tkivu PCK bolnika št. 1 odkrili verjetno patogeno različico *TP53*, ki pa je nismo mogli preveriti v tkivu LP, saj v njem genotipizacija ni bila uspešna. Pri bolniku št. 2 smo v tkivu PCK dokazali patogeno različico *PIK3CA*, vendar tudi v tem primeru genotipizacija v tkivu LP ni bila uspešna. Pri bolniku št. 3 nismo dokazali mutacij *TP53*, sta pa bili v tkivu LP dokazani patogeni različici *AKT1* in *PIK3CA*. Pri bolniku št. 7, pri katerem je bila dokazana okužba s HPV-16, nismo dokazali mutacije v *TP53* (tabela 4).

RAZPRAVA

V svojo raziskavo smo vključili 163 bolnikov z LP s povprečnim časom sledenja 11,4 leta (SD 11,3, razpon: 1–62). Bolnike smo spremljali več kot eno leto. Večina je imela odraslo obliko LP (132/163, 81,0 %) in bila moškega spola (113/163, 69,3 %), kar je podobno opisanim deležem v raziskavah na večjem številu bolnikov z juvenilno in odraslo obliko LP (6, 23, 24).

Tako VR-IPS kot PCK-LP se pri LP redko pojavita. V svoji skupini smo VR-IPS dokazali pri 35/163 (21,5 %) bolnikov, medtem ko se je PCK-LP pojavil pri 7/163 (4,3 %) bolnikov, kar sta relativno visoka deleža glede na rezultate preostalih raziskav. V raziskavah s kohortami nad 50 bolnikov z LP sta deleža navedenih diagnoz namreč precej spremenljiva. Tako je bila VR-IPS opisana pri 3,2 do 17,6 %, PCK-LP pa pri 0 do 5,7 % bolnikov (6, 7, 23–29). Pri oceni

Tabela 3. Značilnosti bolnikov z razvojem ploščatoceličnega karcinoma v tkivu laringealnih papilomov. VR-IPS – visokorižna intraepitelijska sprememba, LP – laringealni papilomi, PCK-LP – ploščatocelični karcinom v laringealni papilomatozi, HPV – humani papilomavirus, ISH – *in situ* hibridizacija, neg – negativno, poz – pozitivno, NO – ni bilo opredeljeno.

Bolnik	VR-IPS	Starost pri LP/VR-IPS/ PCK-LP diagnozi (leta)	Juvenilna/ odrasla LP	Agresivna/ neagresivna LP	Kajenje	Cidofovir	Genotip HPV v LP in v PCK-LP	ISH mRNA HPV	Sledenje (leta)
1.	da	3/46/52	juvenilna	agresivna	ne	ne	6b	poz	60
2.	ne	60 /.../ 64	odrasla	neagresivna	da	ne	neg	NO	5
3.	da	70/71/77	odrasla	neagresivna	da	ne	neg	NO	7
4.	da	82/82/87	odrasla	neagresivna	da	ne	neg	NO	5
5.	da	82/82/84	odrasla	neagresivna	da	ne	neg	NO	2
6.	da	62/64/64	odrasla	neagresivna	da	ne	neg	NO	5
7.	da	29/29/29	odrasla	neagresivna	ne	ne	16	poz	13

Tabela 4. Patogene in verjetno patogene različice človeških genov v tkivnih vzorcih bolnikov s ploščatoceličnim karcinomom v laringealni papilomatozi (PCK-LP), dokazane s komercialno dostopnim kompletom kemikalij TruSightTumor15 (Illumina, San Diego, ZDA). HPV – humani papilomavirus, RT-PCR – verižna reakcija s polimerazo v realnem času (angl. *real-time polymerase chain reaction*), Ct – prag cikla (angl. *cycle threshold*), TP53 – angl. *tumor protein 53*, AF – alelna frekvenca različice v vzorcu, LP – laringealna papilomatoza, PCK – ploščatocelični karcinom, neg – negativno, NO – ni bilo opredeljeno, PIK3CA – angl. *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha*, AKT1 – angl. *Ras-related C3 botulinum toxin substrate-beta serine/threonine-protein kinase 1*.

Tkivni vzorci	Genotip HPV	DNA koncentracija Qubit (ng/μl)	DNA kvaliteta z RT-PCR (delta Ct)	Uspešna genotipizacija	TP53 genotip	Druge mutacije človeškega genoma	AF
1.	LP	HPV-6b	0,3	7,2	ne	/	/
	PCK	HPV-6b	13,1	0,5	TP53:c.536A>C p.(His179Arg) ^a	ni mutacije	65,4
2.	LP	HPV-neg	10,6 ^b	NO	ne	/	/
	PCK	HPV-neg	0,6	4,3	da	PIK3CA: c.3140A>Tp.(His1047Leu) ^c	33,9
3.	LP	HPV-neg	1,3	4,8	da	AKT1: c.49C>A p.(Glu17Lys) ^c	30,6
						PIK3CA: c.1633G>Ap.(Glu545Lys) ^c	7,9
	PCK	HPV-neg	4,6	4,0	da	ni mutacije	/
4.	LP	HPV-neg	0,1 ^b	NO	ne	/	/
	PCK	HPV-neg	0,1 ^b	NO	ne	/	/
5.	LP	HPV-neg	0,6	9,2	ne	/	/
	PCK	HPV-neg	12,2	8,3	ne	/	/
6.	LP	HPV-neg	3,6	8,8	ne	/	/
	PCK	HPV-neg	2,6	8,4	ne	/	/
7.	LP	HPV-16	9,7 ^b	NO	da	ni mutacije	/
	PCK	HPV-16	10,7 ^b	NO	ne	/	/

^a verjetno patogene različice glede na ClinVar razvrstitev (22)
^b V primeru nizke koncentracije DNA, ki je s postopkom Qubit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, ZDA) nismo mogli zaznati, smo uporabili NanoDrop (NanoDrop Technologies, Oxfordshire, Velika Britanija).
^c patogene ali verjetno patogene različice glede na razvrstitev ClinVar (22)

deleža bolnikov z rakavo preobrazbo je sicer treba razlikovati med bolniki s PCK-LP in tistimi z rakavo preobrazbo v redkejših pljučnih papilomih (7, 29, 30). Razlike v ocenjenih deležih IPS so lahko posledica uporabe različnih razvrstitev, poleg tega pa je ocena IPS v tkivu lahko otežena zaradi histopatoloških sprememb, ki so posledica okužbe HPV, in je tako precej odvisna od ocenjevalca in interpretacije epitelijskih sprememb (7, 14, 31).

Pri klinični in histopatološki diferencialni diagnozi PCK-LP moramo biti pozorni tudi na dva redkejša podtipa PCK, papilarni in verukozni karcinom, ki se lahko pojavljata v grlu in imata nekatere makroskopske in mikroskopske podobnosti z LP (32).

Hall in sodelavci so opisali relativno kratek čas od diagnoze LP do nastanka IPS v epiteliju LP, saj so ocenili, da do pojava epitelijskih sprememb v povprečju mine 16 mesecev, vendar pa niso specifično opisali časa do nastanka VR-IPS (26). Pri svojih bolnikih smo VR-IPS v tkivu ob diagnozi LP dokazali pri 25,6 % (9/35) bolnikov, medtem ko je bil povprečen čas od prvotne diagnoze LP do nastanka VR-IPS in PCK-LP dolg 6,9 leta (SD 10,1, razpon: 0–43) oz. 9,8 leta (SD 18,5, razpon: 0–49). Opisana dolžina časa, ki je potrebna za nastanek navedenih epitelijskih sprememb v tkivu papilomov, dodatno poudarja pomen dolgega časovnega sledenja, ki je bil v naši raziskavi povprečno 11 let pri bolnikih z NR-IPS in tistih z VR-IPS (11,3 leta, SD 11,7, razpon: 1–62 proti 11,7 leta, SD 13,8, razpon: 1–61; $p = 0,933$). Pri bolnikih s PCK-LP je bil povprečen čas sledenja še daljši in je znašal 13,8 leta (SD 20,6, razpon: 2–60, mediana časa 5 let). Tudi ta značilnost naše raziskave je v primerjavi z drugimi lahko vzrok za višji delež VR-IPS (6, 23, 24, 28, 33).

Pri ocenjevanju nastanka epitelijskih sprememb v LP je ključnega pomena razlikovanje juvenilne in odrasle oblike, saj se pri bolnikih, ki so imeli ugotovljeno LP

v otroštvu, pričakuje, da se lahko višja stopnja IPS pojavi pri nižji starosti. Naši rezultati kažejo, da se je VR-IPS v tkivu bolnikov z juvenilno obliko pojavila pri statistično značilno nižji starosti v primerjavi z odraslimi bolniki (27 let, SD 15,9, razpon: 10–46 proti 58,2 leta, SD 16,7, razpon: 27–82; $p < 0,001$), vendar pa je bil čas od diagnoze LP do pojava VR-IPS statistično značilno daljši pri bolnikih z juvenilno obliko (21 let, SD 16,1, razpon: 1–42 proti 3,9 leta, SD 3,4, razpon: 0–19; $p = 0,004$). Krajši čas (tri do pet let) do nastanka VR-IPS pri odrasli obliki je opisan tudi v drugih raziskavah (6, 29).

Dejavniki tveganja za nastanek visokorizične intraepitelijske ploščatocelične spremembe in/ali ploščatoceličnega karcinoma v laringealni papilomatozi

Naša analiza dejavnikov tveganja za nastanek VR-IPS in/ali PCK-LP je pokazala, da je bila odsotnost HPV DNA pri 9/36 (25,0 %) bolnikov z VR-IPS in/ali PCK-LP statistično značilen dejavnik tveganja za nastanek sprememb epitelija v LP ($p = 0,049$), kar je v skladu z rezultati nekaterih predhodnih raziskav (6, 34). Dodatno smo ugotovili, da ima negativna biopsija papilomov grla HPV v primerjavi s pozitivno biopsijo HPV skoraj dvakrat (95 % IZ: 1,0–3,6) večje relativno tveganje za nastanek VR-IPS. Na tem mestu je sicer treba navesti možnost, da bi v tkivu, ki je bilo ocenjeno kot HPV-negativno in pri katerem smo opravili dodatne teste za dokaz več različnih HPV, kljub temu lahko bili prisotni tudi genotipi HPV, ki jih nismo dokazovali, ali mogoče taki, ki še niso bili opredeljeni in tako tudi niso vključeni v te teste.

Podobno kot v preostalih raziskavah na mešani juvenilni in odrasli populaciji je bil tudi v naši raziskavi v tkivu HPV-pozitivnih papilomov (139/163, 85,3 %) najpogostejše opredeljen HPV-6 (94/139, 67,5 %). Vendar pa smo v primerjavi z drugimi

avtorji opredelili tudi (pod)tip HPV-6 in kot najpogostejšega opredelili HPV-6a (66/93, 71,0 %). Kolikor nam je znano, smo v svoji raziskavi prvi ocenili vlogo (pod)tipov HPV-6 pri nastanku VR-IPS in/ali PCK-LP. V tej skupini naših bolnikov je bil najpogostejši (74,1 %, 20/27) opredeljen HPV-6 in pri tem je pri 55,5 % (11/20) primerov šlo za HPV-6a in pri 45,0 % (9/20) primerov za HPV-6b. Vsakega od (pod)tipov HPV smo ocenili tudi kot morebitni dejavnik tveganja za nastanek VR-IPS in/ali PCK-LP, vendar statistično značilnega vpliva nismo dokazali (vsi $p > 0,05$).

Sočasne ali izolirane okužbe z VR-HPV, najpogostejše s HPV-16, so pri bolnikih z LP lahko prisotne pri manj kot 9 %, vendar pa v nasprotju s pričakovanji ni bilo dokazano, da bi bile okužbe z VR-HPV pogostejše v tkivih z VR-IPS in/ali PCK-LP (6, 23, 25, 35). Čeprav smo HPV-16 dokazali tudi pri enem bolniku s PCK-LP, so rezultati naše raziskave pokazali, da okužba VR-HPV ni pomemben dejavnik tveganja za nastanek VR-IPS in/ali PCK-LP ($p = 0,123$).

V primerjavi z bolniki z NR-IPS v LP so bili tisti z ugotovljeno VR-IPS in/ali PCK-LP ob diagnozi LP statistično značilno starejši (34,4 leta, SD 19,1, razpon: 1–73 let proti 46,5 leta, SD 24,1, razpon: 1–82 let, $p = 0,013$), medtem ko so bili bolniki s PCK-LP v povprečju skoraj dve desetletji (19,1 leta; 95 % IZ: 3,4–34,6) starejši od preostale kohorte in je bila pri teh bolnikih povprečna starost ob diagnozi statistično značilno višja (55,3 leta, SD 29,1, razpon: 3–82 let proti 34,4 leta, SD 19,1, razpon: 1–73 let; $p = 0,017$). Podobno so Karatayli in sodelavci opisali višjo povprečno starost ob diagnozi pri tistih bolnikih, ki so pozneje razvili VR-IPS, v primerjavi s tistimi, ki so imeli v LP le NR-IPS (56 let proti 45 let; $p = 0,005$) (7).

Pri bolnikih, ki so bili ob diagnozi LP starejši od 40 let, je bilo v primerjavi z mlajšimi večje tveganje za pojav VR-IPS in/ali PCK-LP. Tako je bilo relativno tveganje

za napredovanje epitelijskih sprememb glede na starost ob diagnozi 2,9-krat višje (95 % IZ: 1,5–5,6) po 40. letu, 2,5-krat višje (95 % IZ: 1,4–4,4) po 50. letu in 3-krat višje (95 % IZ: 1,8–5,2) po 60. letu ($p < 0,001$). Če povzamemo, je višja starost ob diagnozi LP pomemben dejavnik tveganja za nastanek VR-IPS in/ali PCK-LP, kar so opisali tudi nekateri drugi avtorji (7, 29, 33, 35).

Nekateri avtorji so sicer poročali o redkejšem pojavu VR-IPS pri bolnikih z juvenilno LP, vendar pa v skladu z rezultati raziskav, opravljenih na večjem številu bolnikov z LP, tudi mi nismo dokazali razlike med pojavom VR-IPS in/ali PCK-LP med juvenilno in odraslo obliko (19,3 % proti 22,7 %; $p = 0,684$), čeprav je bila VR-IPS pogostejša pri bolnikih z odraslo obliko (6, 7, 24, 27, 36, 37). Eden od možnih razlogov, zakaj sta VR-IPS in PCK-LP pogostejši pri odraslih bolnikih, je daljša izpostavljenost karcinogenim dejavnikom, kot sta alkohol in kajenje (36).

V svoji raziskavi, v skladu z rezultati do zdaj objavljenih raziskav, nismo dokazali, da ima sicer pogostejši moški spol bolnikov z LP ($p = 0,403$) povezavo z nastankom VR-IPS in/ali PCK-LP. Agresivni klinični potek LP ($p = 0,738$) in oba označevalca agresivnega poteka, višje število posegov ($p = 0,754$) in subglotisna rast papilomov ($p = 0,066$), niso pomembni dejavniki tveganja za nastanek VR-IPS in PCK-LP, kar so predhodno opisali tudi drugi raziskovalci (6, 7, 23, 26, 33).

Znano je, da ima distalno širjenje papilomov v dihalih slabšo napoved bolezni in da je glavni dejavnik tveganja zanj traheotomija, ki je bila pri naših bolnikih opravljena redko (7/165, 3,7 %), kar je tudi najverjetnejši razlog, da v svoji skupini bolnikov nismo imeli primera pljučne papilomatoze z značilno pogostejšo rakavo preobrazbo (7). Pričakovano se traheotomija ni pokazala kot dejavnik tveganja za pojav VR-IPS in/ali PCK-LP v grlu ($p = 0,499$).

Ker je kajenje dokazan karcinogeni dejavnik in ima vlogo pri nastanku PCK

grla, preseneča dejstvo, da se kajenje v nobeni od raziskav ni pokazalo kot statistično značilen etiološki dejavnik za nastanek VR-IPS in PCK-LP, čeprav so bili bolniki s PCK-LP pogosto kadilci (7, 25, 26, 33, 34, 38–40). Naši rezultati so prav tako potrdili, da med kadilci ni statistično značilne razlike v pojavnosti NR-IPS in VR-IPS in/ali PCK-LP (38,1 % proti 42,8 %; $p = 0,698$). Med bolniki s PCK-LP je bilo namreč 71,4 % (5/7) bolnikov kadilcev, vendar razlika v deležu rakave preobrazbe med kadilci in nekadilci ni bila statistično značilna (7,7 % proti 2,1 %; $p = 0,612$).

Dopolnilno zdravilo cidofovir se vbrizga neposredno v tkivo glasilk, pri tem pa je nekaj avtorjev po uporabi navedenega zdravila poročalo o primerih nastanka VR-IPS v LP, kar je sprožilo številne raziskave o morebitni karcinogenosti tega zdravila (41–43). Naši rezultati niso dokazali vloge cidofovirja pri nastanku VR-IPS in/ali PCK-LP, saj razlika med deležema bolnikov, ki so prejeli to vrsto dopolnilnega zdravljenja in imeli NR-IPS ali VR-IPS in/ali PCK-LP, ni bila statistično značilno različna (16,7 % proti 7,1 %, $p = 0,100$), kar je pred nami opisalo tudi več drugih avtorjev (7, 33, 36, 40, 44).

Analiza skupine preiskovancev z rakavo preobrazbo laringealnih papilomov

Pri bolnikih z dokazanim PCK-LP smo ločeno opravili tudi analizo dejavnikov tveganja za razvoj navedene patologije. V tej skupini je imelo 71,3 % (5/7) bolnikov HPV-negativno tkivo LP, pri čemer je bila razlika v pojavljanju PCK-LP med bolniki s HPV-negativnimi in -pozitivnimi LP statistično značilna (1,4 % proti 20,8 %, $p = 0,001$). HPV-negativna biopsija papilomov se je nadalje pokazala kot skoraj 15-krat (95 % IZ: 2,8–70,3) višje relativno tveganje za PCK-LP v primerjavi s HPV-pozitivno biopsijo.

VR-IPS smo dokazali v 85,6 % (6/7) LP pred pojavom PCK-LP in se je v primerja-

vi z NR-IPS statistično značilno pogostejše pojavljala v papilomih pred rakavo preobrazbo (12,2 % proti 0,8 %; $p < 0,001$). Dokaz VR-IPS v LP predstavlja kar 22-krat (95 % IZ: 2,6–176,3) višje relativno tveganje za PCK-LP v tkivu. Tudi Omland in sodelavci so ugotovili, da je najpomembnejši dejavnik tveganja za nastanek PCK-LP prisotnost VR-IPS v tkivu papiloma in pri teh bolnikih ocenili 50-krat višje relativno tveganje za rakavo preobrazbo v primerjavi z bolniki s papilomi z NR-IPS (6).

Razlike med pojavljanjem PCK-LP pri juvenilni in odrasli obliki bolezni (3,1 % proti 4,4 %; $p = 1,000$) v svoji raziskavi nismo ugotovili.

Ker je genom NR-HPV redkeje v vgrajeni obliki, ima manjše onkogeno delovanje v primerjavi z VR-HPV (9). Dokazano je bilo, da je pri onkogenezi malignih tumorjev grla ena od najpogostejših genskih mutacij tista v *TP53*, medtem ko je ta gen nemutiran in deluje običajno pri tumorjih, ki jih povzročajo VR-HPV in izražajo virusna gena *E6* in *E7* (45–51).

V naši raziskavi sta imela dva bolnika s PCK-LP (2/7, pri enem bolniku HPV-6b in drugem HPV-16) dokazan enak (pod)tip HPV v tkivu LP in PCK. Iz strokovne literature vemo, da je pri manjšem deležu PCK-LP mogoče dokazati vgraditev genoma NR-HPV in s tem prepisovalno aktivno okužbo (35, 52–55). V nadaljevanju analize smo zato v tkivih PCK-LP obeh navedenih bolnikov z *in situ* hibridizacijo dokazali tudi mRNA *E6* in *E7* in tako v obeh primerih potrdili vgraditev HPV v genom gostiteljeve celice.

V svoji raziskavi smo v tkivu LP in PCK-LP vseh sedmih bolnikov s PCK-LP opravili sekvenciranje razpona genov, za katere je bilo dokazano, da so pri malignih tumorjih glave in vratu pogosto mutirani. Genotipizacija v tkivu PCK-LP je bila uspešna pri 4/7 bolnikov, pri tem je bila patogena različica *TP53* dokazana pri bolniku, ki je imel tudi vgrajeno obliko okužbe HPV-6b. To

nakazuje, da so kljub vgraditvi NR-HPV najverjetneje potrebni dodatni dejavniki za rakavo preobrazbo v LP.

Pri bolnici z dokazano vgrajeno okužbo HPV-16 mutacije genov v tkivu LP nismo dokazali, medtem ko genotipizacija v tkivu PCK-LP žal ni bila uspešna, kar je onemogočilo dodatne ugotovitve. Kljub temu lahko domnevamo, da je v primeru VR-HPV izražanje onkogenov *E6* in *E7* zadosten pogoj za rakavo preobrazbo celic, kar je bilo že dokazano v s HPV povzročenimi tumorji glave in vratu (49, 50).

S sekvenciranjem gostiteljevih genov smo v tkivu PCK-LP dodatno dokazali patogeno različico *PIK3CA*, v tkivu LP drugega bolnika pa morebitni patogeni različici *AKT1* in *PIK3CA*. Zaradi slabe kakovosti tkivnih vzorcev je bila genotipizacija žal neuspešna v večini tkiv, kar je onemogočilo dodatne ugotovitve o vplivu mutacij v testiranih genih pri nastanku PCK-LP.

Pomanjkljivost naše analize bolnikov s PCK-LP je poleg retrospektivnega zajemanja podatkov, zaradi katerega smo izpustili nekatere znane dejavnike tveganja, ki sodelujejo v karcinogenezi grla (uživanje alkohola in laringo-faringealni refluks), tudi majhno število analiziranih bolnikov, ki pa je po drugi strani primerljivo z drugimi raziskavami (6, 7, 13, 29, 31, 35).

VR-IPS v LP (21,5 %) in PCK-LP (4,3 %) sta se v skupini 163 bolnikov s povprečnim časom sledenja 11 let pojavljala redko, kljub temu pa smo lahko prepoznali tiste

bolnike, pri katerih je bilo tveganje za nastanek navedenih epitelijskih sprememb v LP višje. Višja starost ob diagnozi LP in odsotnost dokazljive HPV DNA v papilomih sta pomembna dejavnika tveganja za VR-IPS in PCK-LP. V primerjavi s HPV-pozitivnimi papilomi je bilo v HPV-negativnih papilomih relativno tveganje za nastanek VR-IPS dvakrat večje in za nastanek PCK-LP 15-krat večje. Pomembna ugotovitev naše raziskave je, da je VR-IPS v LP dejavnik tveganja za rakavo preobrazbo papilomov, saj do 22-krat poveča relativno tveganje za nastanek PCK-LP v primerjavi z NR-IPS. Tako smo pri bolniku s PCK-LP in dokazano okužbo VR-HPV ter pri tistem z okužbo NR-HPV v tkivu PCK-LP dokazali vgraditev HPV v gostiteljev genom. V nadaljevanju analiz smo pri bolniku z NR-HPV dokazali tudi patogeno različico *TP53*, iz česar bi lahko sklepali, da je v primeru NR-HPV za to, da pride do rakave preobrazbe tkiva, najverjetneje potreben dodaten dejavnik, kot je v tem primeru mutacija v tumor zavirajočem genu gostitelja. Povzamemo lahko, da se nakazujeta dve skupini bolnikov z rakavo preobrazbo v LP. Pokazalo se je namreč, da je HPV-negativna LP dejavnik tveganja za nastanek PCK-LP, hkrati pa smo tudi dokazali, da v redkih primerih rakava preobrazba lahko nastane tudi v HPV-pozitivnih papilomih, v katerih pride do vgraditve HPV DNA v gostiteljev genom in posledičnega izražanja virusnih onkogenov.

LITERATURA

1. Lindeberg H, Oster S, Oxlund I, et al. Laryngeal papillomas: Classification and course. *Clin Otolaryngol Allied Sci.* 1986; 11 (6): 423–9.
2. Carifi M, Napolitano D, Morandi M, et al. Recurrent respiratory papillomatosis: Current and future perspectives. *Ther Clin Risk Manag.* 2015; 11: 731–8.
3. Derkay CS, Darrow DH. Recurrent respiratory papillomatosis. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2006; 115 (1): 1–11.
4. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, et al. Classification of papillomaviruses. *Virology.* 2004; 324 (1): 17–27.
5. Doyle DJ, Gianoli GJ, Espinola T, et al. Recurrent respiratory papillomatosis: Juvenile versus adult forms. *Laryngoscope.* 1994; 104 (5): 523–7.
6. Omiland T, Lie KA, Akre H, et al. Recurrent respiratory papillomatosis: HPV genotypes and risk of high-grade laryngeal neoplasia. *PLoS One.* 2014; 9 (6): e99114.
7. Karatayli-Ozgursoy S, Bishop JA, Hillel A, et al. Risk factors for dysplasia in recurrent respiratory papillomatosis in an adult and pediatric population. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2016; 125 (3): 235–41.
8. Gale N, Poljak M, Kambic V, et al. Laryngeal papillomatosis: Molecular, histopathological, and clinical evaluation. *Virchows Arch.* 1994; 425 (3): 291–5.
9. Pim D, Banks L. Interaction of viral oncoproteins with cellular target molecules: Infection with high-risk vs low-risk human papillomaviruses. *APMIS.* 2010; 118 (6–7): 471–93.
10. Venkatesan NN, Pine HS, Underbrink MP. Recurrent respiratory papillomatosis. *Otolaryngol Clin North Am.* 2012; 45 (3): 671–94.
11. Torrente MC, Rodrigo JP, Haigentz M Jr, et al. Human papillomavirus infections in laryngeal cancer. *Head Neck.* 2011; 33 (4): 581–6.
12. Pinter B, Čeh F, Verdenik I, et al. Spolno vedenje slovenskih srednješolcev v letu 2004. *Zdrav Vestn.* 2006; 75: 615–9.
13. Gale N, Poljak M, Zidar N. Update from the 4th edition of the World Health Organization classification of head and neck tumours: What is new in the 2017 WHO Blue Book for tumours of the hypopharynx, larynx, trachea and parapharyngeal space. *Head Neck Pathol.* 2017; 11 (1): 23–32.
14. Gale N, Blagus R, El-Mofty SK, et al. Evaluation of a new grading system for laryngeal squamous intraepithelial lesions – A proposed unified classification. *Histopathology.* 2014; 65 (4): 456–64.
15. Fujs Komloš K, Kocjan BJ, Košorok P, et al. Tumor-specific and gender-specific pre-vaccination distribution of human papillomavirus types 6 and 11 in anogenital warts and laryngeal papillomas: A study on 574 tissue specimens. *J Med Virol.* 2012; 84 (8): 1233–41.
16. Kocjan BJ, Hošnjak L, Poljak M. Detection of alpha human papillomaviruses in archival formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue specimens. *J Clin Virol.* 2016; 76 (Suppl 1): S88–97.
17. Hošnjak L, Kocjan BJ, Pirš B, et al. Characterization of two novel gammapapillomaviruses, HPV179 and HPV184, isolated from common warts of a renal-transplant recipient. *PLoS One.* 2015; 10 (3): e0119154.
18. Kocjan BJ, Seme K, Poljak M. Detection and differentiation of human papillomavirus genotypes HPV-6 and HPV-11 by FRET-based real-time PCR. *J Virol Methods.* 2008; 153 (2): 245–9.
19. de Roda Husman AM, Walboomers JM, van den Brule AJ, et al. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol.* 1995; 76 (4): 1057–62.
20. Jacobs MV, Snijders PJ, van den Brule AJ, et al. A general primer GP5+/GP6(+)-mediated PCR-enzyme immunoassay method for rapid detection of 14 high-risk and 6 low-risk human papillomavirus genotypes in cervical scrapings. *J Clin Microbiol.* 1997; 35 (3): 791–5.
21. van den Brule AJC, Pol R, Fransen-Daalmeijer N, et al. GP5+/6+ PCR followed by reverse line blot analysis enables rapid and high-throughput identification of human papillomavirus genotypes. *J Clin Microbiol.* 2002; 40 (3): 779–87.
22. Landrum MJ, Lee JM, Benson M, et al. ClinVar: Improving access to variant interpretations and supporting evidence. *Nucleic Acids Res.* 2018; 46 (D1): D1062–7.
23. Sanchez GI, Jaramillo R, Cuello G, et al. Human papillomavirus genotype detection in recurrent respiratory papillomatosis (RRP) in Colombia. *Head Neck.* 2013; 35 (2): 229–34.
24. Papaioannou VA, Lux A, Voigt-Zimmermann S, et al. Treatment outcomes of recurrent respiratory papillomatosis: Retrospective analysis of juvenile and adult cases. *HNO.* 2018; 66 (Suppl 1): 7–15.
25. Davids T, Muller S, Wise JC, et al. Laryngeal papillomatosis associated dysplasia in the adult population: An update on prevalence and HPV subtyping. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2014; 123 (6): 402–8.

26. Hall JE, Chen K, Yoo MJ, et al. Natural progression of dysplasia in adult recurrent respiratory papillomatosis. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2011; 144 (2): 252–6.
27. Ribeiro El Achkar VN, Duarte A, Carlos R, et al. Histopathological features of juvenile-onset laryngeal papillomatosis related to severity. *Head Neck.* 2019; 41 (5): 1412–7.
28. Jeong WJ, Park SW, Shin M, et al. Presence of HPV type 6 in dysplasia and carcinoma arising from recurrent respiratory papillomatosis. *Head Neck.* 2009; 31 (8): 1095–101.
29. Ilmarinen T, Hagström J, Haglund C, et al. Low expression of nuclear Toll-like receptor 4 in laryngeal papillomas transforming into squamous cell carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2014; 151 (5): 785–90.
30. Omland T, Akre H, Lie KA, et al. Risk factors for aggressive recurrent respiratory papillomatosis in adults and juveniles. *PLoS One.* 2014; 9 (11): e113584.
31. Gale N, Gnepp DR, Poljak M, et al. Laryngeal squamous intraepithelial lesions: An updated review on etiology, classification, molecular changes, and treatment. *Adv Anat Pathol.* 2016; 23 (2): 84–91.
32. Zidar N, Cardesa A, Gillison M, et al. Verrucous squamous cell carcinoma. *Pathology and Genetics of Tumours of the Head and Neck WHO Classification of Tumours, 4th ed.* Lyon IARC; 2017. p. 84–5.
33. Blumin JH, Handler EB, Simpson CB, et al. Dysplasia in adults with recurrent respiratory papillomatosis: Incidence and risk factors. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2009; 118 (7): 481–5.
34. Lee LA, Cheng AJ, Fang TJ, et al. High incidence of malignant transformation of laryngeal papilloma in Taiwan. *Laryngoscope.* 2008; 118 (1): 50–5.
35. Weiss D, Heinkle T, Rudack C. Reliable detection of human papillomavirus in recurrent laryngeal papillomatosis and associated carcinoma of archival tissue. *J Med Virol.* 2015; 87 (5): 860–70.
36. Sajan JA, Kerschner JE, Merati AL, et al. Prevalence of dysplasia in juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2010; 136 (1): 7–11.
37. Lindsay F, Bloom D, Pransky S, et al. Histologic review of cidofovir-treated recurrent respiratory papillomatosis. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2008; 117 (2): 113–7.
38. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Tobacco smoke and involuntary smoking. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum.* 2004; 83: 1–1438.
39. Rasmussen ER, Schnack DT, Schjellerup Jørvok A, et al. Long-term follow-up and outcome in patients with recurrent respiratory laryngeal papillomatosis. *Dan Med J.* 2017; 64 (12).
40. Moore JE, Garcia A, Sanyal S, et al. Degrees of dysplasia based on viral typing in patients with cidofovir use and recurrent respiratory papillomatosis. *J Voice.* 2013; 27 (6): 765–8.
41. Snoeck R, Wellens W, Desloovere C, et al. Treatment of severe laryngeal papillomatosis with intralesional injections of cidofovir [(S)-1-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)cytosine]. *J Med Virol.* 1998; 54 (3): 219–25.
42. Wemer RD, Lee JH, Hoffman HT, et al. Case of progressive dysplasia concomitant with intralesional cidofovir administration for recurrent respiratory papillomatosis. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2005; 114 (11): 836–9.
43. Dikkers FG. Treatment of recurrent respiratory papillomatosis with microsurgery in combination with intralesional cidofovir—a prospective study. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2006; 263 (5): 440–3.
44. Tjon Pian Gi REA, Ilmarinen T, van den Heuvel ER, et al. Safety of intralesional cidofovir in patients with recurrent respiratory papillomatosis: An international retrospective study on 635 RRP patients. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2013; 270 (5): 1679–87.
45. van Houten VM, Snijders PJ, van den Brekel MW, et al. Biological evidence that papillomaviruses are etiologically involved in a subgroup of head and neck squamous cell carcinomas. *Int J Cancer.* 2001; 93 (2): 232–5.
46. Braakhuis BJ, Snijders PJF, Keune WJH, et al. Genetic patterns in head and neck cancers that contain or lack transcriptionally active human papillomavirus. *J Natl Cancer Inst.* 2004; 96 (13): 998–1006.
47. Braakhuis BJM, Brakenhoff RH, Meijer CJLM, et al. Human papilloma virus in head and neck cancer: The need for a standardised assay to assess the full clinical importance. *Eur J Cancer.* 2009; 45 (17): 2935–9.
48. Halec G, Holzinger D, Schmitt M, et al. Biological evidence for a causal role of HPV16 in a small fraction of laryngeal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer.* 2013; 109 (1): 172–83.
49. Westra WH, Taube JM, Poeta ML, et al. Inverse relationship between human papillomavirus-16 infection and disruptive p53 gene mutations in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res.* 2008; 14 (2): 366–9.
50. Gillison ML, Alemany L, Snijders PJF, et al. Human papillomavirus and diseases of the upper airway: Head and neck cancer and respiratory papillomatosis. *Vaccine.* 2012; 30 (Suppl 5): F34–54.
51. Manterola L, Aguirre P, Larrea E, et al. Mutational profiling can identify laryngeal dysplasia at risk of progression to invasive carcinoma. *Sci Rep.* 2018; 8 (1): 6613.

52. Reidy PM, Dedo HH, Rabah R, et al. Integration of human papillomavirus type 11 in recurrent respiratory papilloma-associated cancer. *Laryngoscope*. 2004; 114 (11): 1906–9.
53. Huebbers CU, Preuss SF, Kolligs J, et al. Integration of HPV6 and downregulation of AKR1C3 expression mark malignant transformation in a patient with juvenile-onset laryngeal papillomatosis. *PLoS One*. 2013; 8 (2): e57207.
54. Garcia JA, Best SR, Rooper LM. HPV RNA in-situ hybridization as a diagnostic aid in papillary laryngeal lesions. *Laryngoscope*. 2020; 130 (4): 955–60.
55. Bedard MC, de Alarcon A, Kou YF, et al. HPV strain predicts severity of juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis with implications for disease screening. *Cancers (Basel)*. 2021; 13 (11): 2556.