

Pomen okužbe s humanimi virusi papiloma v etiopatogenezi epitelijskih novotvorb grla in požiralnika

The role of human papillomavirus infection in etiology and pathogenesis of laryngeal and esophageal epithelial neoplasms

Mario Poljak*, Nina Gale**, Vinko Kambič***, Anton Cerar****, Katja Seme*****

Deskriptorji

grlo novotvorbe – etiologija
požiralnik novotvorbe – etiologija
papilomavirus humani

Descriptors
laryngeal neoplasms-etiology
esophageal neoplasms-etiology
papillomavirus human

Izvleček. Pomembno vlogo pri nastanku in razvoju benignih in malignih epitelijskih novotvorb spolovil in rodil, zlasti ploščatoceličnega karcinoma materničnega vratu, pripisujejo okužbi z različnimi tipi humanih virusov papiloma. Manj je raziskana etiološka povezava med okužbo s humanimi virusi papiloma in nastankom podobnih bolezenskih sprememb ploščatoceličnega epitelijskega v drugih organih in organskih sistemih. V naših štiriletnih raziskavah, ki smo jih usmerili predvsem na ploščatocelične papilome in karcinome grla in požiralnika ter epitelijske hiperplastične spremembe sluznice grla s klinično sliko kroničnega laringitisa, smo poskušali odgovoriti na nekatera pomembna vprašanja o pomenu okužbe s humanimi virusi papiloma v etiopatogenezi teh novotvorb. V prispevku predstavljamo naše dosedanje raziskave na tem področju ter nekatera novejša dognanja o povezavi med okužbo s humanimi virusi papiloma ter vznikom in razvojem določenih novotvorb grla in požiralnika.

Abstract. Infection with certain types of human papillomaviruses is intimately linked with benign and malignant squamous epithelial cell lesions of the lower genital tract in both sexes. This relationship can be appreciated at many levels, as demonstrated by a wealth of molecular, experimental, morphological and clinical data. Despite extensive research, the role of human papillomavirus infection in the etiology of similar epithelial lesions of the upper part of the respiratory and digestive tract remains obscure. The purpose of the present review is to summarize the present knowledge of human papillomavirus infection and epithelial neoplasms of the larynx and esophagus, and to briefly present the results of human papillomavirus studies done in Slovenia.

Uvod

Humani virusi papiloma (HPV) so drobni DNA-virusi, ki jih taksonomsko uvrščamo v družino Papovaviridae, rod Papillomavirus (1). HPV dodatno razvrščamo v različne virusne tipe glede na skladnost nukleotidnih zaporedij. Do sedaj je odkritih že več kot 70 tipov HPV in njihovo število še vedno narašča (1). Po nedavnem sklepu Mednarodne komisije za nomenklaturu virusov papiloma vsak na novo osamljeni HPV, ki kaže več kot 10 % neskladnost nukleotidnega zaporedja z že znanimi tipi virusa v področjih E6, E7

*Asist. dr. sc. Mario Poljak, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, Korytkova 2, 61105 Ljubljana.

**Prof. dr. sc. Nina Gale, dr. med., Inštitut za patologijo, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, Korytkova 2, 61105 Ljubljana.

***Akad. prof. dr. sc. Vinko Kambič, dr. med., Slovenska akademija znanosti in umetnosti, Novi trg 3, 61100 Ljubljana.

****Doc. dr. sc. Anton Cerar, dr. med., Inštitut za patologijo, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, Korytkova 2, 61105 Ljubljana.

*****Asist. mag. sc. Katja Seme, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, Korytkova 2, 61105 Ljubljana.

in L1, dobi novo oznako (številko). Če je neskladnost med 2 in 10 %, je to virusni podtip, kadar pa je neskladnost manjša kot 2 %, opredelimo novo osamljeni virus kot različico enakega tipa (1). To pomeni, da so virusni tipi oštevilčeni popolnoma slučajno – po vrstnem redu osamitve in ne po bioloških lastnostih virusov ali njihovi genomske sorodnosti. Verjetno bo z napredovanjem znanja razvrščanje HPV poenostavljeno.

Kmalu po odkritju HPV so začeli posamezne bolezenske spremembe ploščatoceličnega epitelija v genitalnem traktu etiološko povezovati z okužbo z določenimi tipi HPV. Dokaz te tesne povezave je skupna ugotovitev številnih viroloških, molekularnih, patomorfoloških, epidemioloških in kliničnih raziskav (2). Povezava med okužbo z določenimi tipi HPV in nastankom nekaterih sprememb ploščatoceličnega epitelija v genitalnem traktu, zlasti ploščatoceličnega karcinoma materničnega vratu, je danes tako očitna, da v nekaterih delih sveta zgodnje odkrivanje in tipizacija HPV zavzema osrednjo vlogo v načrtovanju zmanjšanja incidence teh novotvorb (3). Domneva, da imajo nekateri tipi HPV večji vpliv na vznik in razvoj samo določenih vrst novotvorb, je narekovala delitev HPV, ki jih najdemo v genitalnem traktu v tri skupine: nizkorizični (tipi 6, 11, 42–44), mejno rizični (tipi 31, 33, 35, 51, 52, 58) in visokorizični HPV (tipi 16, 18, 45, 56). Okužbo z nizkorizičnimi tipi HPV povezujemo predvsem z vznikom in razvojem benignih novotvorb ploščatoceličnega epitelija, nasprotno pa okužbo z visokorizičnimi tipi etiološko povezujemo z intraepitelijsko neoplazijo najvišje stopnje in malignimi ploščatoceličnimi tumorji genitalnega trakta. Tako sta bila nizkorizična tipa HPV 6 in 11 odkrita v 85–100 % genitalnih kondilomov in 25–55 % intraepitelijskih neoplazij materničnega vratu nižje stopnje (CIN I, CIN II) (3, 4). Visokorizična tipa 16 in 18 so odkrili predvsem v intraepitelijski neoplaziji najvišje stopnje (CIN III) in v ploščatoceličnem karcinomu materničnega vratu. V teh spremembah so ugotovili okužbo z omenjenima tipoma HPV v 60–80 % (3, 4). Podobno razporeditev nizko- in visokorizičnih tipov HPV najdemo tudi v benignih in malignih novotvorbah zunanjega spolovila pri moških, vendar je pogostost okužbe nekoliko nižja (3). Vloga mejno rizičnih tipov HPV v etiologiji novotvorb spolovil in rodil še ni dokončno opredeljena.

Zaradi histomorfološke podobnosti novotvorb spolovil in rodil z enakimi spremembami ploščatoceličnega epitelija v drugih organih ali organskih sistemih so številne raziskovalne skupine v zadnjem času usmerile svoje raziskave tudi v ugotavljanje etiopatogenetske povezave med okužbo s HPV in nastankom drugih epitelijskih novotvorb pri človeku.

V štiriletnih raziskavah, ki jih predstavljamo v tem prispevku, smo poskušali odgovoriti na nekatera aktualna vprašanja o pomenu okužbe s HPV v etiopatogenezi določenih novotvorb in epitelijskih sprememb grla in požiralnika. Raziskave smo usmerili predvsem na ploščatocelične papilome in karcinome grla in požiralnika ter epitelijske hiperplastične spremembe sluznice grla s klinično sliko kroničnega laringitisa (2, 5–16).

Retrospektivna študija, ki je bila zasnovana na našem obsežnem biopsijskem materialu, nam je omogočila preverjanje zastavljenih domnev na velikem številu tkivnih vzorcev. Za dokazovanje okužbe s HPV in opredeljevanje posameznih tipov virusov smo uporabili trenutno najbolj občutljivi in specifični molekularni metodi: in situ hibridizacijo in

verižno reakcijo s polimerazo. Ker sta obe metodi dokaj zahtevni, smo po priporočilu več avtorjev pred začetkom raziskave pazljivo optimizirali vse pomembnejše reakcijske pogoje (17). Natančno optimizacijo smo izvedli na kliničnih vzorcih bolnikov, pri katerih smo po kliničnih in histopatoloških ali citoloških ocenah predvidevali veliko možnost okužbe s HPV (koničasti kondilomi penisa, ploščatocelični karcinomi materničnega vratu). V procesu uvajanja teh metod smo razvili tudi nekaj pomembnih tehničnih izboljšav predhodno opisanih postopkov za dokazovanje HPV in novo metodo za tipizacijo teh virusov (9, 10, 14).

Hibridizacija in situ

Hibridizacija in situ (ISH) je edina izmed metod molekularne virologije, pri kateri se postopek denaturacije in hibridizacije nukleinskih kislin odvija v okuženih celicah (in situ) in ne na najlonskih ali nitroceluloznih membranah (6). Uporabljamo jo predvsem za dokazovanje navzočnosti mikroorganizmov v citoloških vzorcih ali na tkivnih rezinah in za ugotavljanje lege določenih m-RNA. Tkivo je lahko sveže zmrznjeno, fiksirano v formalinu ali kakšnem drugem fiksativu pod pogoji, ki veljajo za vse imunohistokemične preiskave (6).

V naših raziskavah smo ISH izvajali z uporabo z biotinom označenih DNA-sond (kratki označeni komplementarni deli nukleinske kisline), značilnih za HPV-tipe 6/11, 16/18 in 31/33/51, in s komercialno dostopnim diagnostičnim kompletom (PathoGene in situ human papillomavirus hybridisation kit, ENZO Diagnostic Inc., New York, ZDA) po navodilih proizvajalca, z manjšimi spremembami (7, 12). Po vezavi sonde na komplementarni del virusne DNA smo biotin prikazali z uporabo visokospecifičnega avidina, označenega z encimom hrenova peroksidaza. Po dodatku substrata so se jedra epitelnih celic, ki so vsebovala HPV DNA, obarvala rjavo.

Največje težave pri uvajanju ISH smo imeli pri fiksaciji tkivnih rezin na objektna stekelca. V začetku raziskave smo za ta namen uporabljali poli-L-lizin (Sigma Chemical Co., St. Louis, ZDA). Čeprav je to klasičen adheziv za imunohistokemične raziskave, so se tkivne rezine pri našem delu slabo pritrjevale na objektna stekelca in so pri prvem spiranju po hibridizaciji največkrat odpadle. Kasneje smo poli-L-lizin zamenjali s 3-amino-propil-trietoksil silanom (Sigma Chemical Co., St. Louis, ZDA in se tako izognili prejšnjim težavam.

Verižna reakcija s polimerazo

Verižna reakcija s polimerazo (PCR) je trenutno najboljčutljivejša metoda molekularne mikrobiologije (18). Dokazovanje mikroorganizmov s PCR temelji na in vitro pomnoževanju za določen mikroorganizem specifičnega, majhnega odseka njegovega dednega materiala (največkrat od 100 do 1000 baznih parov) z encimom termostabilna polimeraza DNA. Z več različicami metode je mogoče določeni odsek tarčne DNA ali RNA v nekaj urah pomnožiti do več kot milijonkrat. Na ta način dobimo zadostno količino nukleinske kisline za nadaljnje molekularne analize, s katerimi končno potrdimo specifičnost pomnoženega genomskega odseka (18).

Ker začetni oligonukleotidi izbirajo odsek genoma, ki bo v reakciji pomnožen, je pravilen izbor le-teh najbolj pomemben korak optimizacije PCR. V želji, da v eni sami reakciji PCR zajamemo čim več v patologiji človeka pomembnih tipov HPV, smo se odločili, da v naših raziskavah za pomnoževanje uporabljamo t. i. grupno specifične začetne oligonukleotide. Ti so izbrani tako, da so skladni s področji genoma, ki so enaki pri večini tipov HPV. V dostopni literaturi je do sedaj opisanih 8 parov bolj ali manj učinkovitih grupno specifičnih začetnih oligonukleotidov HPV (16). Pred začetkom raziskav smo se odločili preizkusiti dva para takšnih začetnih oligonukleotidov, in sicer GP5/GP6 ter MY09/MY11, med katerima je slednji komercialno dostopen. Oba omenjena para začetnih oligonukleotidov, izbrana v zelo ohranjenem področju ORF L1, sta se namreč izkazala kot zelo uporabna za dokazovanje okužbe s HPV v številnih predhodnih raziskavah v različnih delih sveta (19, 20). Tudi v naših razmerah sta oba para HPV grupno specifičnih začetnih oligonukleotidov pokazala približno enako učinkovitost v dokazovanju različnih tipov HPV. PCR-pridelek MY09/MY11 je zaradi svoje velikosti in razvitih ustreznih tipizacijskih metod veliko bolj uporaben za tipizacijo HPV kot PCR-pridelek GP5/GP6, zato smo se v nadaljnjih raziskavah odločili predvsem za uporabo para začetnih oligonukleotidov MY09/MY11.

Za dokazovanje specifičnosti PCR-pridelkov, nastalih s pomnoževanjem 450 baznih parov dolgega dela ORF L1 s parom grupno specifičnih začetnih oligonukleotidov MY09/MY11, in istočasto določanje tipov HPV smo uporabljali nedavno razvito metodo encimske razgradnje PCR-pridelkov (19). Specifičnost PCR-pridelka potrdimo, če ga uporabljeni restrikcijski encimi razgradijo na delce, ki tako po velikosti kot tudi po številu ustrezajo predhodno teoretično določenemu vzorcu razgradnje. Razlikovanje tipov HPV temelji na različnih vzorcih razgradnje pomnoženega dela genoma HPV. Po dostopnih podatkih poznamo več kot 50 različnih vzorcev razgradnje PCR-pridelka MY09/MY11, od katerih je vsak povezan z določenim tipom oziroma podtipom HPV (19). V želji, da bi natančno opredelili čim več tipov HPV, smo metodo izvajali z uporabo sedmih različnih restrikcijskih endonukleaz: BamH I, Dde I, Hae III, Hinf I, Pst I, Rsa I in Sau 3A I (Gibco-BRL, Bethesda, ZDA). V nekaterih primerih smo za tipizacijo PCR-pridelka MY09/MY11 uporabljali še encimsko oligonukleotidni test, ki smo ga razvili v našem laboratoriju (14).

Kljub uporabi učinkovitih postopkov ekstrakcije in izolacije DNA je treba zaradi vpliva številnih znanih in neznanih dejavnikov, ki lahko privedejo do inhibicije delovanja kompleksnega encimskega »ustroja« za pomnoževanje in posledičnega lažno negativnega rezultata reakcije PCR, vedno izvesti tudi t. i. notranje kontrolno pomnoževanje (17). Notranje kontrolno pomnoževanje je pomnoževanje delov vseprisotnih humanih genov (beta-globin, beta-aktin, deli HLA-genov) hkrati s tarčnim delom DNA HPV. Uspešno pomnoževanje notranje kontrole pomeni, da v vzorcu ni zaviralcev PCR. V primeru, da do pomnoževanja notranje kontrole ne pride, dobljenega rezultata HPV-PCR ne moremo opredeliti. Zato smo v naših raziskavah vsak vzorec ekstrahirane in/ali izolirane DNA pred začetkom dokazovanja okužbe s HPV testirali s PCR z začetnimi oligonukleotidi, specifičnimi za delce beta-globinskega ali beta-aktinskega gena (7, 12).

V naše delo smo za zmanjšanje možnosti lažno pozitivnih rezultatov PCR poleg nespecifičnih postopkov uvedli trenutno najboljši, specifični postopek, t. i. encimski N-uracil glikozilazni postopek (21). Pri tem postopku v reakcijski mešanici dTTP zamenjamo z dUTP,

kar privede do nastanka PCR-pridelkov, ki vsebujejo za DNA nenaravno nukleotidno bazo uracil. Na ta način lahko razlikujemo PCR-pridelke tarčnega dela DNA, ki vsebujejo uracil in predstavljajo možne vire kontaminacije, od izhodnega tarčnega dela vzorčne DNA, ki vsebuje timin. Če pred reakcijo PCR dodamo N-uracil glikozilazo (encim, ki razgrajuje nukleinske kisline, ki vsebujejo nukleotidno bazo uracil), bo ta v primeru kontaminacije uničila PCR-pridelke predhodnih reakcij (ker ti vsebujejo uracil), ne pa tarčne DNA, in na ta način preprečila nastanek lažno pozitivnega rezultata. Opisani postopek se je tudi pri našem delu izkazal kot zelo učinkovit (11).

Ploščatocelični papilomi grla in humani virusi papiloma

Med benignimi vzbrstmi sluznice grla je najpogostejši ploščatocelični papilom. Papilom je krhek, resičast ali cvetačast, bledo rožnat ali rdečkast tumor, velikosti 1–10 mm. Lahko vznikne kjerkoli na sluznici grla, najpogosteje na prostem robu glasilk in v sprednji komisuri. Pri otrocih lahko prekriva vso sluznico grla. Histološko je papilom grajen iz resičaste vezivnožilne strome, ki jo odeva večplasten, včasih poroženevajoč ploščatocelični epitelij (13, 22).

Klinična znamenja papilomov grla so odvisna od velikosti in lokalizacije sprememb. Papilomi na prostem robu glasilk povzročajo močno hripavost, medtem ko pri tistih, ki niso na glasilkah, tega bolezenska znamenja ni. Dihanje je ovirano le pri večjih novotvorbah, ki pomembno zožujejo svetlino grla. Incidenca spontane maligne preobrazbe papilomov grla je približno 1–2 % (v Sloveniji 0,8 %) in v izbranih skupinah, zdravljenih z obsevanjem, doseže tudi 10 % (13). Čeprav so ploščatocelični karcinomi, ki so nastali z maligno preobrazbo papilomov grla, histološko večinoma dobro diferencirani, so navadno zelo agresivni in povezani s slabo napovedjo (13).

Zdravljenje papilomov grla je najpogosteje kirurško, z endoskopsko-mikrolaringoskopsko ali lasersko odstranitvijo. Redkeje pri zdravljenju uporabljamo različna zdravila, kot so kemoterapevtiki, podofilin, interferoni, steroidni hormoni itd. Ponovitve bolezni so pogoste, še posebej pri otrocih (22).

Povezava med virusno okužbo in nastankom papilomov grla je znana že desetletja. Tako je že leta 1923 Ullman poročal o uspešnem eksperimentalnem prenosu papilomov grla (23). Z večkratnim vbizgavanjem celičnega ekstrakta papiloma grla, odstranjene ga šestletnemu otroku, mu je uspelo prenesti papilom na lastno roko in v nožnico psi-ce. Začetni poskusi dokazovanja virusnih delcev v tkivnih vzorcih papilomov grla z elektronsko mikroskopijo so bili večinoma neuspešni (24, 25). Tako npr. Svobodi in sodelavcem (24) ter Stephenu in sodelavcem (25) z uporabo elektronske mikroskopije ni uspelo dokazati delcev HPV niti v enem od 33 pregledanih biopsijskih vzorcev ploščatoceličnih papilomov grla. Z izboljšavo elektronskomikroskopskih tehnik je raziskovalcem končno uspelo potrditi okužbo s HPV v posameznih primerih papilomov grla (26, 27). Imunohistokemične metode in uporaba sprva poliklonskih in kasneje monoklonskih protiteles proti veliki plaščni beljakovini so v zgodnjih osemdesetih letih omogočile dokaz HPV antigenov že v več kot polovici pregledanih papilomov grla (28, 29). Z uvedbo molekularno viroloških metod v raziskave okužbe s HPV se je odstotek ugotovljene okužbe s temi virusi v papilomih grla večal in v primeru uporabe PCR v posameznih skupinah

papilomov grla, predvsem pri otrocih, že dosegel 100 %. Pregled vseh pomembnejših molekularno-viroloških raziskav okužbe s HPV v papilomih grla je prikazan v tabeli 1.

Ploščatocelične papilome grla tradicionalno delimo glede na starost bolnikov pri prvem pojavu bolezni na papilome pri otrocih in papilome pri odraslih (42). Lindeberg in sodelavci (43) so leta 1986 papilome grla dodatno razvrstili v štiri skupine:

- številni pri otrocih (angl. juvenile multiple);
- posamezni pri otrocih (angl. juvenile solitary);
- številni pri odraslih (angl. adult multiple);
- posamezni pri odraslih (angl. adult solitary).

Tabela 1. Pregled vseh pomembnejših molekularno-viroloških raziskav okužbe s humanimi virusi papiloma v ploščatoceličnih papilomih grla. HPV – humani virus papiloma, ISH – hibridizacija in situ, SB – hibridizacija po Southernu, PCR – verižna reakcija s polimerazo, J – papilomi grla pri otrocih, A – papilomi grla pri odraslih, JM – številni papilomi grla pri otrocih, JS – posamezni papilomi grla pri otrocih, AM – številni papilomi grla pri odraslih, AS – posamezni papilomi grla pri odraslih.

Raziskovalna skupina	Leto raziskave	Število primerov	Metode, uporabljene za dokazovanje okužbe s HPV	Rezultati raziskave
Terry in sod. (30)	1987	10	ISH; tipi 6/11	HPV tipa 6 in 11 dokazana v 10/10 J papilomov
Corbitt in sod. (31)	1988	14	dot-blot in SB; tipi 6,11,16,18	HPV tip 6 dokazan v 10/14 in tip 11 v 3/14 papilomov
Terry in sod. (32)	1989	41	ISH; tipi 6/11, 16/18	HPV tipa 6 in 11 dokazana v 12/13 JM, 3/3 JS, 5/14 AM, 2/11 AS
Quiney in sod. (33)	1989	45	ISH; tipi 6/11, 16/18, 31/33/35	HPV tipa 6 in 11 dokazana v 8/14 J papilomov in 20/31 A papilomov
Tsutsumi in sod. (34)	1989	20	ISH; tipi 6/11, 16/18, 31/33/35	HPV tipa 6 in 11 dokazana v 8/8 AM in 0/12 AS papilomov
Levi in sod. (35)	1989	19	PCR z grupno-specifičnimi začetnimi oligonukleotidi	HPV tip 6 dokazan v 13/13 J papilomov in 6/6 A papilomov
Greer in sod. (36)	1990	2	dot-blot; tipi 6,11,16,18,31,33,35	HPV tip 6 dokazan v 2/2 papilomov
Lindeberg in sod. (37)	1990	20	ISH; tipi 6/11, 16/18	HPV tipa 6 in 11 dokazana v 19/20 AS papilomov
Brandsma in sod. (38)	1990	9	PCR z grupno-specifičnimi začetnimi oligonukleotidi	HPV tip 6 dokazan v 5/9 in HPV tip 11 v 4/11 papilomov
Dickens in sod. (39)	1991	27	dot-blot; tipi 6,11,16,18,31,33,35	HPV tip 11 dokazan v 13/27 in HPV tipi 6,11,16 v 3/27 papilomov
Rimmel in sod. (40)	1992	20	ISH; tipi 6/11, 16/18, 31/33/35	HPV tipa 6 in 11 dokazana v 11/11 J in 9/9 A papilomov
Arndt in sod. (41)	1992	35	ISH; tipi 6/11, 16/18, 31/33/35	HPV tipa 6 in 11 dokazana v 8/8 J in 25/27 A papilomov
Gale in sod. (12)	1994	79	ISH; tipi 6/11, 16/18, 31/33/35 in PCR z grupno-specifičnimi začetnimi oligonukleotidi	HPV tipa 6 in 11 dokazana v 28/29 J, 26/30 AM in 17/20 AS papilomov

Takšno razvrstitev ploščatoceličnih papilomov grla opravičujejo z različnim kliničnim potekom bolezni pri odraslih in pri otrocih (bistveno težji potek pri otrocih) ter z ugotovljeno neenakomerno razporeditvijo bolezni med spoloma pri odraslih, za razliko od enakomerne razporeditve bolezni med spoloma pri otrocih. Nenazadnje je upravičenost navedene razvrstitve papilomov grla narekovala tudi domneva o različni etiologiji teh tumorjev pri otrocih in odraslih, ki je temeljila na ugotovljeni, statistično pomembni razliki v prevalenci HPV-okužbe pri odraslih in otrocih s papilomi grla (tabela 1) (32, 34, 42). Posebno nizko prevalenco okužbe s HPV so raziskovalci ugotovili v podskupini posameznih papilomov grla pri odraslih. Tako je npr. Terryju in sodelavcem (32) z uporabo ISH uspelo dokazati okužbo s HPV tipoma 6/11 le v 2 od 11 primerov (18 %) posameznih papilomov grla pri odraslih ter le v 5 od 14 primerov (35 %) številnih papilomov pri odraslih, medtem ko so dokazali prisotnost teh dveh tipov HPV v 15 od 16 primerov (93 %) papilomov pri otrocih. Še večjo razliko v prevalenci okužbe s HPV v posameznih skupinah papilomov so ugotovili Tsutsumi in sod. (34), ki jim z uporabo ISH ni uspelo dokazati prisotnosti HPV v nobenem od 12 primerov posameznih papilomov pri odraslih, medtem ko so v skupini številnih papilomov pri odraslih dokazali okužbo v vseh 8 primerih, vključenih v raziskavo. Nekaterim raziskovalnim skupinam je z uporabo bolj občutljivih metod (PCR, ISH z radioaktivno označenimi sondami) uspelo dokazati okužbo s HPV v približno enakem odstotku pri papilomih grla pri odraslih in otrocih, čeprav je treba omeniti, da v raziskanih serijah delež posameznih papilomov pri odraslih nikoli ni presegel 15 % (35, 40, 41). Na osnovi raziskave, v kateri sta z uporabo ISH z radioaktivno označenimi sondami dokazala okužbo s HPV-tipoma 6/11 v 19 od 20 posameznih papilomov grla pri odraslih, sta Lindeberg in Johansen prva postavila domnevo o enotni etiologiji vseh skupin oz. podskupin ploščatoceličnih papilomov grla (37).

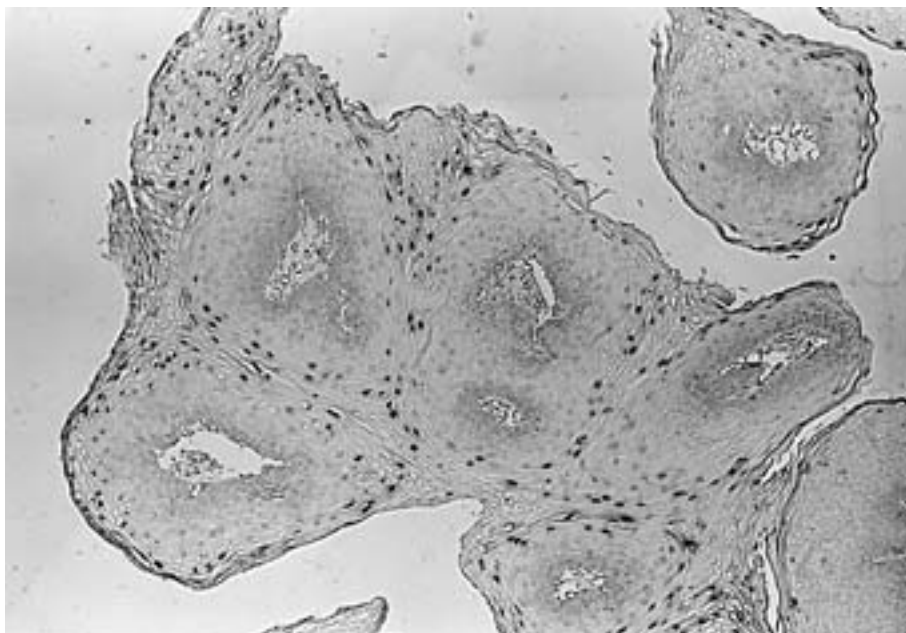
Glede na rezultate naših kliničnih, histopatoloških ter preliminarnih molekularno patoloških raziskav, v katerih nismo zasledili pomembnih razlik med papilomi pri otrocih in odraslih, smo enako kot Lindeberg in Johansen (37) domnevali, da vsi papilomi grla predstavljajo biološko entiteto z enotno etiologijo. Našo domnevo smo preverili z raziskavo, ki je bila po podatkih iz literature opravljena na do sedaj največjem številu papilomov grla in z uporabo trenutno najbolj občutljivih metod za odkrivanje okužbe s HPV (12). V raziskavo smo vključili 79 tkivnih vzorcev, fiksiranih v formalinu in vključenih v parafin, odvzetih 36 bolnikom, ki so se zdravili na Kliniki za otorinolaringologijo in cervikofacialno kirurgijo v Ljubljani v obdobju od leta 1980 do 1993. Bolniki vključeni v raziskavo, so bili izbrani naključno. Najmlajši bolnik je bil v času študije star 10 mesecev, najstarejši pa 71 let. Trije bolniki in šest bolnic so bili v času študije mlajši od 18 let (otroška skupina), medtem ko je bilo 17 bolnikov in 10 bolnic starejših od 18 let (odrasla skupina). Povprečna starost bolnikov je bila 37 let. 24 bolnikov (67 %) je imelo v času študije zaradi papilomov več kot en kirurški poseg (med njimi vsi bolniki iz otroške skupine), 12 bolnikov pa en sam kirurški poseg.

Po mikrolaringoskopski sliki tumorjev pri prvem pregledu smo 29 papilomov grla opredelili kot številne pri otrocih, 30 papilomov kot številne pri odraslih, 20 papilomov pa kot posamezne pri odraslih.

Spremembe epitelijske ploščatocelične papilome grla smo opredelili po Kambič-Lenartovi klasifikaciji (44) kot navadno hiperplazijo v 33 papilomih 14 bolnikov, kot abnormno hiperplazijo v 43 papilomih 19 bolnikov in kot atipično hiperplazijo ali nevarnostni epitelij pri 3 papilomih 3 bolnikov.

Koilocitozo, edini svetlobnomikroskopsko viden citopatski učinek okužbe s HPV, smo našli v 71 (90 %) od 79 pregledanih ploščatoceličnih papilomov grla.

Z uporabo ISH smo okužbo s HPV tipoma 6/11 dokazali v 25 od 29 številnih papilomov pri otrocih, 23 od 30 številnih papilomov pri odraslih ter v 13 od 20 posameznih papilomov pri odraslih. Specifično rdeče rjavo obarvanost jeder, ki govori o navzočnosti HPV, smo videli izključno v celicah spinoznega sloja epitelijskega, nikoli pa v bazalnih celicah. V vseh HPV-pozitivnih vzorcih so se specifično obarvala samo jedra epiteljskih celic in nikoli celična citoplazma ali membrana. Področja specifično obarvanih celic so se v večini primerov ujemala s svetlobnomikroskopsko ugotovljenimi koilociti. Primer ploščatoceličnega papiloma grla, v katerem smo z ISH dokazali HPV tipa 6/11, je prikazan na sliki 1. V nadaljevanju raziskave smo hoteli preveriti, ali 18 tkivnih vzorcev ploščatoceličnih papilomov grla, v katerih z ISH nismo dokazali okužbe s HPV, resnično ne vsebuje teh virusov. Zato smo te vzorce pregledali tudi s PCR z grupno specifičnimi začetnimi oligonukleotidi MY09/MY11. Kot pozitivne kontrole smo izbrali 10 vzorcev ploščatoceličnih



Slika 1. Primer ploščatoceličnega papiloma grla, v katerem smo s hibridizacijo in situ dokazali navzočnost humanega virusa papiloma tipa 6/11. Pozitivna reakcija je vidna v rdeče rjavo obarvanih jedrih v zgornjih dveh tretjinah ploščatoceličnega epitelijskega. Kontrastirano z Mayerjevim hematoksilinom.

papilomov grla, v katerih smo predhodno z ISH dokazali okužbo s HPV, kot negativne kontrole pa 5 avtopsijskih vzorcev normalnega grla. Kakovost ekstrahirane DNA smo v vseh 33 vzorcih preverjali s pomnoževanjem delcev beta-globinskega gena z začetnimi oligonukleotidi GH20/PC04. S PCR smo uspeli dokazati okužbo s HPV v 10 od 18 (55 %) primerov ISH-negativnih ploščatoceličnih papilomov grla, med njimi v 3 papilomih, opredeljenih kot številni pri otrocih, v 3 papilomih, opredeljenih kot številni pri odraslih, in v 4 papilomih, opredeljenih kot posamezni pri odraslih. Delce beta-globinskega gena smo uspešno pomnožili v vseh 18 HPV ISH-negativnih papilomih. Za opredelitev tipa HPV v 10 papilomih, ki so bili PCR-pozitivni in ISH-negativni, smo uporabili metodo encimske razgradnje PCR-pridelka MY09/MY11, ki je pokazala prisotnost HPV-tipa 6 v vseh 10 papilomih grla. Prisotnost HPV smo s PCR dokazali tudi v vseh 10 tkivnih vzorcih ploščatoceličnih papilomov grla, v katerih smo predhodno z ISH dokazali okužbo s HPV-tipoma 6 in 11 (pozitivne kontrole). Nasprotno s PCR nismo dokazali okužbe s HPV v nobenem od 5 avtopsijskih vzorcev normalnega grla (negativne kontrole). Iz vseh 15 tkivnih kontrolnih vzorcev smo uspešno pomnožili delce beta-globinskega gena z začetnimi oligonukleotidi GH20/PC04.

Skupno smo z uporabo ISH in PCR okužbo s HPV-tipoma 6/11 dokazali v 28 od 29 številnih papilomov pri otrocih, 26 od 30 številnih papilomov pri odraslih in v 17 od 20 posameznih papilomov pri odraslih (12).

Rezultati naše raziskave torej v celoti podpirajo navedeno domnevo Lindeberga in Johansena (37). Menimo, da je bila različna pogostost okužbe s HPV v posameznih podskupinah papilomov ugotovljena zaradi uporabe premalo občutljivih in specifičnih metod za odkrivanje te okužbe ter zaradi raziskav, opravljenih na premajhnem številu primerov. Možna razlaga za statistično značilno nižjo prevalenco okužbe s HPV v podskupini posameznih papilomov pri odraslih, ugotovljeno v vseh študijah razen v Lindeberg-Johansenovi (37) in naši, je manjše število virusov, prisotnih v tej podskupini papilomov v primerjavi z ostalimi. Različno število prisotnih virusov bi pri uporabi manj občutljivih metod za dokazovanje okužbe s HPV lahko privedlo do navidezne razlike v prevalenci te okužbe v posameznih podskupinah papilomov grla. Tkivnih vzorcev z relativno majhnim številom HPV, ki je pod pragom občutljivosti omenjenih metod, le-te namreč ne bi prepoznale kot HPV-pozitivne. Pri uporabi bolj občutljivih metod za dokazovanje okužbe s HPV takšne navidezne razlike ni, ker s temi metodami spoznamo okužbo s HPV tudi v tkivnih vzorcih z majhnim številom virusov.

Pojavljanje bolezni v dveh starostnih obdobjih je temelj delitve papilomov grla v dve skupini (43). Nastanek in razvoj papilomov grla pri otrocih in mladostnikih povezujejo s prenosom HPV z okužene matere na novorojenca pri prehodu skozi porodni kanal (40, 45). Način okužbe sluznice grla s HPV pri odraslih bolnikih še ni dokončno razjasnjen. Najpogosteje omenjajo reaktivacijo latentne okužbe s HPV, pridobljene pri porodu ali kasnejšo okužbo zaradi orogenitalnih stikov ali stikov z aerosoli, ki vsebujejo virusne delce (45). Menimo, kot nekateri drugi avtorji (38, 40), da je prva možnost malo verjetna. Z reaktivacijo latentne okužbe s HPV si težko razlagamo prvi pojav posameznega papiloma grla v starosti 71 let pri bolnici, vključeni v našo raziskavo. Če bi bila domneva o reaktivaciji latentne okužbe s HPV pravilna, bi morali zaradi pogoste prisotnosti tipa

HPV 16 in 18 v kanalu materničnega vratu (tudi do 15 % v populaciji ginekološko popolnoma zdravih žensk) (2), tudi v sluznici grla pogostejše najti tipa HPV 16 in 18, kar je izjemno redko. Prav tako bi morala biti v primeru pravilnosti te domneve razporeditev papilomov grla med spoloma pri odraslih enakomerna (takšna, kot je pri papilomih grla pri otrocih), ne pa približno dvakrat večja pri moških, kot je ugotovljeno v vseh klinično patoloških študijah.

Tradicionalno delitev papilomov grla po starosti mnogi utemeljujejo z različnim kliničnim potekom bolezni pri otrocih in odraslih. Pri otrocih s papilomi grla je namreč klinični potek včasih dramatičen in se bolezen pogosto ponavlja, medtem ko je potek bolezni pri odraslih v glavnem blažji (43, 46). Menimo, da je razlika v klinični sliki bolezni pri otrocih in odraslih posledica izključno manjšega premera dihalnih poti pri otrocih v primerjavi s premerom dihalnih poti pri odraslih in ne posledica različne etiologije teh dveh skupin papilomov grla (12).

Na osnovi rezultatov naših predhodnih kliničnih in patohistoloških ter predstavljenih molekularno-viroloških raziskav, opravljenih na velikem številu primerov, lahko zaključimo, da le-ti podpirajo domnevo o enotni etiologiji vseh ploščatoceličnih papilomov grla (12, 13). Njihov nastanek je tesno povezan z okužbo s tipoma HPV 6/11. Rezultati kažejo, da so vsi ploščatocelični papilomi grla biološko enotna skupina in da le razlike v klinični sliki ne upravičujejo delitve teh novotvorb v posamezne skupine oz. podskupine.

Epitelijske hiperplastične spremembe sluznice grla s klinično sliko kroničnega laringitisa in humani virusi papiloma

Pogoste bolezenske spremembe v grlu, predvsem na glasilkah, so tiste, ki jih laringologi po kliničnem pregledu poimenujejo kronični laringitis. S posredno ali neposredno laringoskopijo največkrat ugotovijo simetrično zadebeljene glasilke z neravno, umazano rdečkasto površino, pogosto pokrito z različno velikimi belkastimi lisami. Končna diagnoza je vedno odvisna od histološke slike, v kateri so lahko vidne vse spremembe od začetne zadebelitve ploščatoceličnega epitelija do invazivnega karcinoma (22).

Za histološko opredelitev kroničnih bolezenskih sprememb sluznice grla in napoved poteka bolezni se od leta 1971 v Sloveniji uporablja Kambič-Lenartova klasifikacija (13, 22, 44, 47–50). Klasifikacija je rezultat dolgoletnih izkušenj slovenskih zdravnikov pri obravnavanju in zdravljenju epitelijskih hiperplastičnih sprememb sluznice grla s klinično sliko kroničnega laringitisa. Pri vrednotenju in razvrščanju teh sprememb v posamezne skupine se upošteva predvsem zadebelitev celotnega epitelija, zakasnelo dozorevanje epitelijskih celic, jedrne in celične atipije, število diskeratotičnih celic ter število imunokompetentnih celic v subepitelijski stromi. Po Kambič-Lenartovi klasifikaciji razvrščamo epitelijske spremembe v naslednjih pet skupin (44):

- navadna hiperplazija (hyperplasia simplex): epitelij je zadebeljen na račun celic spinozne plasti; plast bazalnih celic je nespremenjena, v subepitelijskem vezivu skoraj ni imunokompetentnih celic;

- abnormna hiperplazija (*hyperplasia abnormalis*): nedozorele celice bazalnega tipa so pomnožene in dosežejo polovico debeline epitelija, v višjih plasteh najdemo tudi posamezne diskeratotične celice, v subepitelijskem vezivu je zmerna kronična vnetna infiltracija;
- atipična hiperplazija (*hyperplasia atypica*) ali nevarnostni epitelij: v vsej debelini epitelija so pomnožene nedozorele celice bazalnega tipa z zelo zmernimi jedrnimi in celičnimi atipijami in številne diskeratotične celice, subepitelijsko je pogosto viden močan odziv organizma v obliki infiltracije s številnimi imunokompetentnimi celicami;
- intraepitelijski karcinom (*carcinoma in situ*): vidne so vse značilnosti rakaste rašče, hude jedrne in celične atipije, porušena je celotna epitelijska zgradba, prisotne so patološke mitoze ter številne diskeratotične celice, bazalna epitelijska membrana je ohranjena;
- invazivni karcinom (*carcinoma invasivum*): viden je vdor rakastih celic skozi bazalno membrano v subepitelijsko stromo.

Prvi dve skupini sprememb sta izrazito benigni, v skupino prekancerov ali nevarnostnega epitelija uvrščamo le atipično hiperplazijo (13, 22).

Prekanceroza naj bi bila epitelijska sprememba sluznice grla, iz katere se bo verjetno v določenem času, iz nam še neznanih vzrokov, razvila maligna novotvorba. Pri današnjem pomanjkljivem znanju o nastanku karcinoma grla, predvsem pa zaradi zapletenega in večkrat tudi neuspešnega zdravljenja, je večina avtorjev mnenja, da so za izid bolezni izredno pomembni zgodnja spoznava prekancerov, njihovo pravilno vrednotenje ter zgodnje zdravljenje (13, 22).

Natančna vloga prekanceroze v procesu maligne preobrazbe še ni jasno opredeljena in prav tako ne njene biološke lastnosti, etiologija in histološka slika. Tako nikoli ne moremo zanesljivo trditi, da se bo iz določene vrste hiperplastičnih sprememb sluznice grla razvil karcinom. Rakasta rašča se namreč lahko razvije iz na videz popolnoma zdravega tkiva, in to najbrž pogosteje kot iz tako imenovanih prekancerov. Zato menimo, da bi namesto izraza prekanceroza, ki že sam po sebi nekaj vnaprej določa, raje uporabljali izraz nevarnostni ali rizični epitelij (13, 22). Ta izraz ničesar vnaprej ne določa, opozarja pa nas, da moramo biti pri obravnavanju bolnika s takšno spremembo sluznice grla zelo previdni in da ga moramo nenehno nadzorovati.

Kljub številnim epidemiološkim, eksperimentalnim in kliničnim raziskavam etiopatogeneza epitelijskih hiperplastičnih sprememb sluznice grla do danes še ni povsem znana (13). Domnevajo, da na njihov vznik vpliva več bolj ali manj pomembnih etiopatogenetskih dejavnikov:

- kajenje;
- prekomerno uživanje alkoholnih pijač;
- ionizirajoče sevanje;
- pomanjkanje vitamina A;
- genetični dejavniki;
- hormoni;
- izpostavljenost azbestu;
- toplotna radiacija;
- kronične okužbe.

Glede na dejstvo, da je 88–98 % bolnikov, zbolelih za rakom grla, aktivnih kadilcev in nekaj manj prekomernih uživalcev alkoholnih pijač, večina avtorjev danes meni, da sta kajenje in alkohol (zlasti v kombinaciji) najpomembnejša etiološka dejavnika v etiopatogenezi teh sprememb (13). Policiklični aromatski ogljikovodiki (metilholantren, benzopiren in benzantracen) ter nitrozamini, osamljeni iz tobaka, so izraziti karcinogeni za sluznico grla. Natančen mehanizem karcinogenega delovanja etanola še ni jasen, domnevajo pa, da je le-ta verjetno sodejavnik, ki spodbuja karcinogeno delovanje drugih karcinogenov in ne samostojen karcinogen (13).

Tabela 2. Pregled vseh pomembnejših molekularno-viroloških raziskav okužbe s humanimi virusi papiloma v ploščatoceličnih karcinomih grla. HPV – humani virusi papiloma, SB – hibridizacija po Southernu, ISH – hibridizacija in situ, PCR – verižna reakcija s polimerazo.

Raziskovalna skupina	Leto raziskave	Število primerov	Metode, uporabljene za dokazovanje okužbe s HPV	Rezultati raziskave
Kahn in sod. (52)	1986	42	SB; tip 30	HPV tip 30 dokazan v 1/42 karcinomov
Scheurlen in sod. (53)	1986	36	SB; tip 16	HPV tip 16 dokazan v 1/36 karcinomov
Stremlau in sod. (54)	1987	30	SB; tipi 1,2,4,8–11,13,16,18	HPV tip 16 dokazan v 3/30 karcinomov
Syrjanen in sod. (55)	1987	116	ISH; tipi 6/11,16,30	HPV tip 16 dokazan v 15/116 karcinomov
Zarod in sod. (56)	1988	1	SB, tipa 6 in 11	dokazan HPV tip 6
Brandsma in sod. (38)	1989	60	SB; tipi 6,11,16,18,31	HPV tip 16 dokazan v 3/60 karcinomov
Kiyabu in sod. (57)	1989	10	PCR; tipa 16 in 18	HPV tip 16 dokazan v 4/10 karcinomov
Lindeberg in sod. (58)	1989	4	ISH; tipi 6,11,16,18,30	HPV tip 11 dokazan v 2/4 karcinomov
Hoshikawa in sod. (59)	1990	34	PCR; tipi 6b,11,16	HPV tip 6b dokazan v 1/34 in tip 16 v 3/34 karcinomov
Perez-Ayala in sod. (60)	1990	48	PCR; tipa 11 in 16	HPV tip 16 dokazan v 26/48 karcinomov
Somers in sod. (61)	1990	25	SB; tipi 2,6,11,16,18,30,31,33	HPV tip 16 dokazan v 1/25 karcinomov
Watts in sod. (62)	1991	9	SB in PCR; tipi 2,6/11,16/18,13	HPV tipa 6 in 11 dokazana v 4/9 in tipa 16 in 18 v 1/9 karcinomov
Brandwein in sod. (63)	1993	40	PCR z grupno-specifičnimi začetnimi oligonukleotidi	HPV tip 16 dokazan v 3/40 karcinomov
Clayman in sod. (64)	1994	78	PCR z grupno-specifičnimi začetnimi oligonukleotidi	HPV dokazani v 30/78 karcinomov
Simon in sod. (65)	1994	1	ISH; tipi 11,16,18,31,33,35,39,42	dokazana HPV tipa 18 in 33
Poljak (16)	1995	20	ISH; tipi 6/11,16/18,31/33/51 in PCR z grupno-specifičnimi začetnimi oligonukleotidi	HPV tip 16 dokazan s PCR v enem karcinomu

Za razliko od epitelijskih hiperplastičnih sprememb sluznice v genitalnem traktu smo v dostopni literaturi zasledili le eno poročilo o povezavi okužbe s HPV z nastankom epitelijskih hiperplastičnih sprememb sluznice grla s klinično sliko kroničnega laringitisa (51). V literaturi smo zasledili več poročil o dokazu posameznih tipov HPV v posameznih primerih karcinoma grla. Pregled vseh pomembnejših molekularno-viroloških raziskav okužbe s HPV v ploščatoceličnem karcinomu grla je prikazan v tabeli 2.

Naše dosedanje raziskave epitelijskih hiperplastičnih sprememb sluznice grla s klinično sliko kroničnega laringitisa so temeljile na iskanju objektivnih histomorfoloških kriterijev za razvrščanje teh sprememb v posamezne skupine, kar je odločujoče za pravilno izbiro ustreznega zdravljenja in napovedi bolezni (13, 15, 22, 44, 47–50). Temeljile so predvsem na uporabi tradicionalnih svetlobnomikroskopskih, histokemičnih, imunohistokemičnih in elektronskomikroskopskih metod. Z molekularnimi metodami smo želeli ugotoviti, ali je med etiološkimi dejavniki pri nastanku teh sprememb treba upoštevati tudi virusno okužbo.

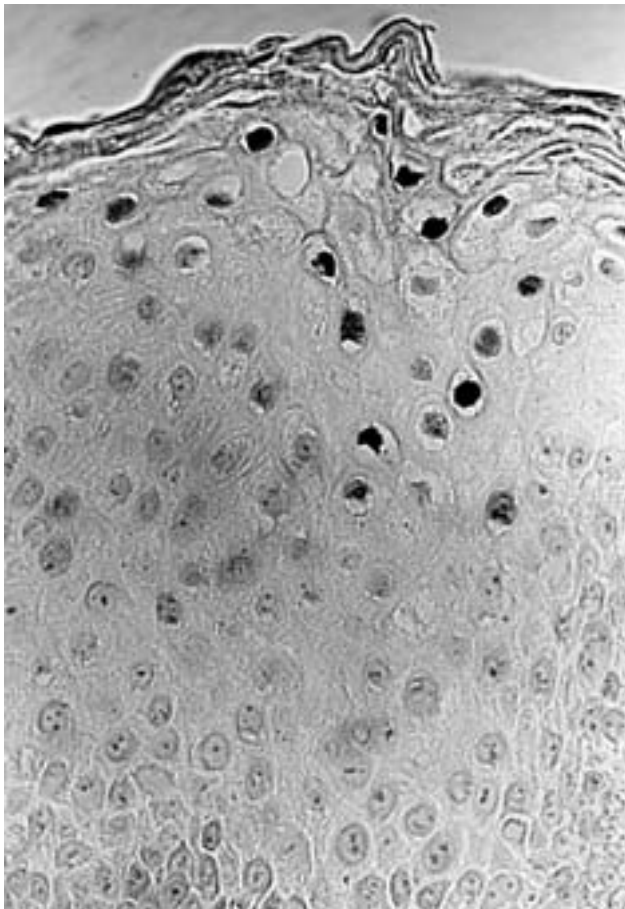
V raziskavo povezave med okužbo s HPV in nastankom epitelijskih hiperplastičnih sprememb sluznice grla s klinično sliko kroničnega laringitisa smo vključili 61 tkivnih vzorcev, fiksiranih v formalinu in vklopljenih v parafin, odvzetih 38 bolnikom, ki so se zdravili na Kliniki za otorinolaringologijo in cervikofacialno kirurgijo v Ljubljani v obdobju od leta 1985 do 1992 (16). Bolniki, vključeni v raziskavo, so bili izbrani naključno.

Po Kambič-Lenartovi klasifikaciji (44) smo tkivne vzorce v 14 primerih histopatološko opredelili kot navadno hiperplazijo, v 13 primerih kot abnormno, v 14 primerih kot atipično hiperplazijo ali nevarnostni epitelij ter v 20 primerih kot intraepitelijski ali invazivni ploščatocelični karcinom grla.

Z ISH smo okužbo s HPV-tipoma 6/11 dokazali le v enem primeru navadne hiperplazije (slika 2). Okužbe s HPV-tipi 16/18 in 31/33/51 nam ni uspelo dokazati z ISH v nobenem od pregledanih 61 tkivnih vzorcev. S PCR z grupno specifičnimi začetnimi oligonukleotidi MY09 in MY11 smo potrdili okužbo s HPV v ISH-pozitivnem vzorcu navadne hiperplazije sluznice grla in jo dokazali v enem primeru invazivnega ploščatoceličnega karcinoma grla. Za opredelitev HPV-tipa smo uporabili metodo encimske razgradnje PCR-pridelka ter encimsko oligonukleotidni test. Obe metodi sta pokazali prisotnost HPV-tipa 6 v tkivnem vzorcu navadne hiperplazije in HPV-tipa 16 v vzorcu invazivnega ploščatoceličnega karcinoma grla. Delce beta-globinskega gena smo uspešno pomnožili z uporabo začetnih oligonukleotidov GH20/PC04 in KM29/RS42 iz 60 oz. 59 tkivnih vzorcev.

Skupno smo torej, kljub uporabi trenutno najbolj občutljivih metod, dokazali okužbo s HPV-tipom 6 le v enem primeru navadne hiperplazije ter s HPV-tipom 16 le v enem primeru karcinoma grla (16). O podobno nizki prevalenci okužbe s HPV v nekaterih epitelijskih hiperplastičnih spremembah sluznice grla so nedavno poročali tudi Rihkanen in sodelavci (51).

V literaturi smo do konca leta 1994 zasledili dvanajst pomembnejših molekularno-viroloških raziskav povezave med okužbo s HPV in nastankom ploščatoceličnega karcinoma grla (tabela 2). Rezultati teh raziskav, opravljenih z različno občutljivimi in specifič-



Slika 2. Primer navadne hiperplazije epitelijske sluznice grla, v kateri smo s hibridizacijo in situ dokazali navzočnost humanega virusa papiloma tipa 6/11. Pozitivna reakcija je vidna v rdeče rjavo obarvanih jedrih v zgornjih dveh tretjinah ploščatoceličnega epitelijskega tkiva. Kontrastirano z Mayerjevim hematoksilinom.

nimi metodami, so si nasprotujoči. Prevalenca dokazane okužbe s HPV v raziskavah v obdobju pred uporabo PCR se giblje med 2 in 12 % (16). Več kot 90 % HPV, dokazanih v karcinomih grla, je bilo v teh raziskavah opredeljenih kot HPV-tip 16. Tri raziskovalne skupine so s PCR dokazale okužbo s HPV v 40–54 % pregledanih tkivnih vzorcev ploščatoceličnega karcinoma grla (57, 60, 64), nasprotno pa je bila ugotovljena prevalenca okužbe s HPV v treh raziskavah, vključno z našo, nižja od 10 % (16, 59, 63).

Pomembne razlike v prevalenci okužbe s HPV, ugotovljene v navedenih študijah, so lahko rezultat več dejavnikov. PCR je izredno občutljiva metoda in lažno pozitivni rezulta-

ti so pri vsakodnevnem delu sorazmerno pogosti (18). Zatorej menimo, enako kakor Brandwein in sodelavci (63), da obstaja velika možnost, da so nekateri od HPV-pozitivnih karcinomov grla, odkriti v študijah z zelo visoko prevalenco okužbe s HPV (57, 60, 64), posledica kontaminacije oz. lažno pozitivni rezultati. V vseh treh študijah z ugotovljeno zelo visoko prevalenco okužbe s HPV raziskovalci namreč niso uporabljali nobenega od priporočenih specifičnih postopkov za zmanjševanje možnosti lažno pozitivnih rezultatov PCR. Uporabljali so samo nekatere nespecifične postopke, ki po rezultatih več multicentričnih študij niso dovolj učinkoviti za preprečevanje pojava lažno pozitivnih rezultatov PCR (17). Nasprotno sta bila v raziskavi Brandweina in sodelavcev (63) in v naši raziskavi v delo vključena posebna, specifična postopka za preprečevanje pojava lažno pozitivnih rezultatov PCR, in sicer N-uracil glikozilazni postopek in PCR z začetkom na visoki temperaturi (angl. hot start PCR).

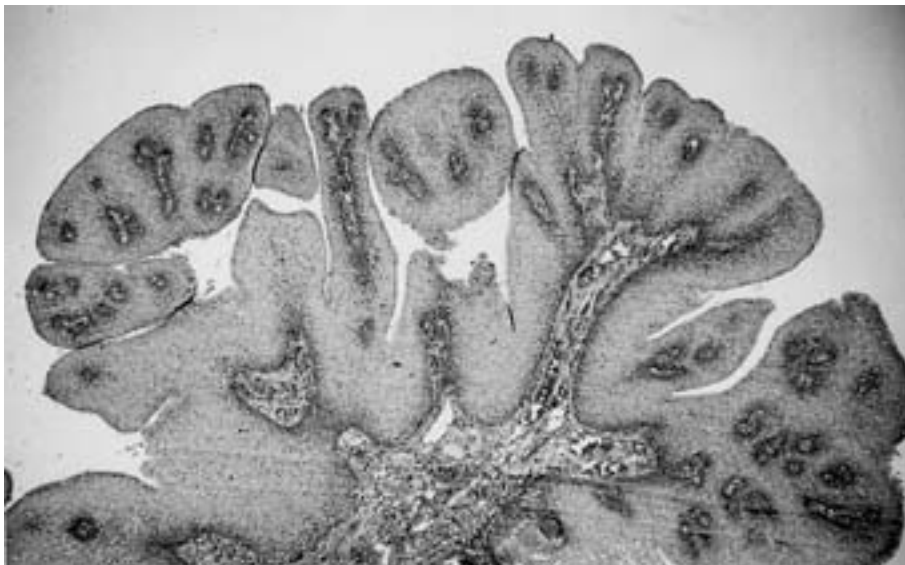
Obstaja tudi možnost, da je majhen delež HPV-pozitivnih ploščatoceličnih karcinomov grla, odkritih v študijah z nizko prevalenčno stopnjo okužbe s HPV, posledica lažno negativnih rezultatov v teh študijah, čeprav je po našem mnenju takšna možnost zelo majhna. V vseh treh raziskavah z odkrito nizko prevalenčno stopnjo okužbe s HPV so raziskovalci namreč poleg delcev HPV istočasno pomnoževali tudi delce najmanj enega vseprisotnega gena oz. izvajali notranje kontrolno pomnoževanje. Dodatno so v vseh treh raziskavah za dokazovanje specifičnosti PCR-pridelka uporabljali zelo občutljivi in specifični metodi, kot sta hibridizacija po Southernu ali encimsko oligonukleotidni test. Z navedenimi ukrepi je bila možnost lažno negativnih rezultatov PCR zmanjšana na najmanjšo možno mero.

Različna prevalenca okužbe s HPV, ugotovljena v ploščatoceličnih karcinomih grla, je po mnenju Brandweina in sodelavcev (63) posledica večje povezanosti okužbe s HPV z nastankom in razvojem teh novotvorb v določenih zemljepisnih področjih sveta, tako kot je to npr. dokazano za ploščatocelične karcinome požiralnika. Menimo, da tudi ta razlaga ni pravilna, saj ploščatocelični karcinom grla ni novotvorba z izrazito zemljepisno razporeditvijo, za razliko od ploščatoceličnega karcinoma požiralnika, ki se v določenih področjih sveta pojavlja tudi 500-krat pogosteje od svetovnega povprečja.

Čeprav je bila naša raziskava opravljena na relativno majhnem številu tkivnih vzorcev, lahko zaključimo, da pri bolnikih v Sloveniji okužba s HPV verjetno ni pomembnejši etiološki dejavnik pri vzniku in razvoju epitelijskih hiperplastičnih sprememb sluznice grla s klinično sliko kroničnega laringitisa, vključno s ploščatoceličnim karcinomom grla. Rihkanen in sodelavci (51) so nedavno objavili zelo zanimivo študijo, v kateri so s PCR odkrili prisotnost DNA HPV tudi v manjšem odstotku tkivnih vzorcev klinično in histološko normalnega grla. Glede na to, da smo v naši študiji ugotovili prevalenco okužbe s HPV v hiperplastičnih spremembah sluznice grla podobno prevalenci v normalnem grlu, menimo podobno kot Rihkanen in sodelavci (51), da o etiološki povezavi med okužbo s HPV in novotvorbami grla, v katerih virusno DNA odkrijemo v nizkem odstotku, ne smemo sklepati samo na osnovi dokaza prisotnosti virusne DNA.

Ploščatocelični papilomi požiralnika in humani virusi papiloma

Ploščatocelični papilom požiralnika je zelo redka benigna epitelijska novotvorba. Do sedaj je v literaturi opisanih le 168 primerov (67). Običajno je to resičasta ali cvetačasta, rožnato rdečkasta sprememba, velikosti od 0,4 do 1,5 cm. Najdemo ga kjerkoli na sluznici požiralnika, najpogosteje v spodnji tretjini. Papilomi so večinoma posamezni, številne so našli v manj kot 10 % primerov. Papilom požiralnika se pojavlja enako pogosto pri moških in ženskah, predvsem pri odraslih. Histološko je papilom grajen iz resičaste vezivno-žilne strome, ki jo odeva večplasten ploščatoceličen, včasih poroženevajoč epitelij (slika 3).



Slika 3. Pregledna slika ploščatoceličnega papiloma požiralnika, ki kaže razvejano vezivno-žilno stromo, ki jo odeva neporoženevajoč večskladen ploščatocelični epitelij.

Klinična znamenja so odvisna od velikosti in lokalizacije spremembe. Več kot polovica bolnikov je brez kliničnih znakov bolezni; pri njih papilome najpogosteje odkrijejo slučajno pri endoskopskem pregledu zaradi drugih težav. Večji papilomi, še posebej tisti v spodnji tretjini požiralnika, povzročajo nelagodje ali epigastrične bolečine, večkrat tudi oteženo požiranje. V literaturi do sedaj ni poročil o spontani maligni preobrazbi teh novotvorb (66–68).

Zdravljenje je najpogosteje kirurško. Ponovitve bolezni so redke (67).

Zaradi redkosti papilomov požiralnika je etiopatogeneza teh novotvorb še vedno nerazjasnjena. Kot najpomembnejši etiopatogenetski dejavnik navajajo kronično vnetje požiralnika zaradi gastroezofagalnega refluksa pri različnih boleznih zgornjih prebavil

(hiatalna hernija, peptična razjeda). Po natančni analizi dostopnih kliničnih podatkov vseh do sedaj objavljenih primerov ploščatoceličnih papilomov požiralnika so Orlowska in sodelavci (67) nedavno zaključili, da je etiopatogenetska povezava med nastankom teh novotvorb in kroničnim vnetjem sluznice požiralnika zaradi drugih bolezni zgornjih prebavil bolj naključna kot stvarna. Pri več kot polovici opisanih primerov bolnikov s papilomi požiralnika namreč ni bilo zaslediti druge bolezni zgornjih prebavil, in dodatno, ze-

Tabela 3. Pregled vseh raziskav okužbe s humanimi virusi papiloma v ploščatoceličnih papilomih požiralnika. EM – elektronska mikroskopija, IHC – imunohistokemične metode, ISH – hibridizacija in situ, PCR – verižna reakcija s polimerazo.

Raziskovalna skupina	Leto raziskave	Število primerov	Metode, uporabljene za dokazovanje okužbe s HPV	Rezultati raziskave
Colina in sod. (70)	1980	3	poskus kultivacije in EM	poskus kultivacije neuspešen, z EM ni dokazanih virusnih delcev
Syrjanen in sod. (69)	1982	1	IHC	dokazana velika plaščna beljakovina
Lesec in sod. (71)	1985	1	IHC	dokazana velika plaščna beljakovina
Toet in sod. (72)	1985	4	EM	ni dokazanih virusnih delcev
Winkler in sod. (73)	1985	2	IHC	ni dokazana velika plaščna beljakovina
Sablich in sod. (74)	1988	11	EM	ni dokazanih virusnih delcev
Hording in sod. (75)	1989	1	dot-blot; tipi 6/11,16,18	dokazana HPV tipa 6/11
Janson in sod. (76)	1991	1	ISH	dokazana HPV tipa 6/11
Fontollet in sod. (77)	1991	33	ISH; tipi 6/11,16/18,31/33/35	HPV tipi 31,33,35 dokazani v 6/33 papilomov (šibek hibridizacijski signal)
van Cutsem in sod (78)	1991	1	IHC in EM	dokazana velika plaščna beljakovina
Chang in sod. (68)	1991	12	ISH in PCR; tipi 6,11,16,18	DNA HPV ni dokazana
Politoske (79)	1992	1	ISH; tipi 6/11,16/18,31/33/35	dokazana HPV tipa 6/11
Odze in sod. (80)	1993	26	PCR; tipi 6b/11,16,18	HPV tip 16 dokazan v 9 papilomih, HPV tipa 16 in 18 v 3 papilomih in HPV tipa 6b in 11 v enem papilomu
Carr in sod. (81)	1994	23	ISH; tipi 6/11,16/18,31/33/51 in PCR z grupno-specifičnimi začetnimi oligonukleotidi	HPV tipa 6/11 dokazana z ISH in PCR v enem papilomu
Poljak in Cerar (8)	1994	7	ISH; tipi 6/11,16/18,31/33/51 in PCR z grupno-specifičnimi začetnimi oligonukleotidi	HPV tip 6 dokazan s PCR v enem papilomu
Poljak in sod. (11)	1995	29	ISH; tipi 6/11,16/18,31/33/51 in PCR z dvema paroma grupno-specifičnih začetnih oligonukleotidov	HPV tip 6 dokazan s PCR v enem papilomu

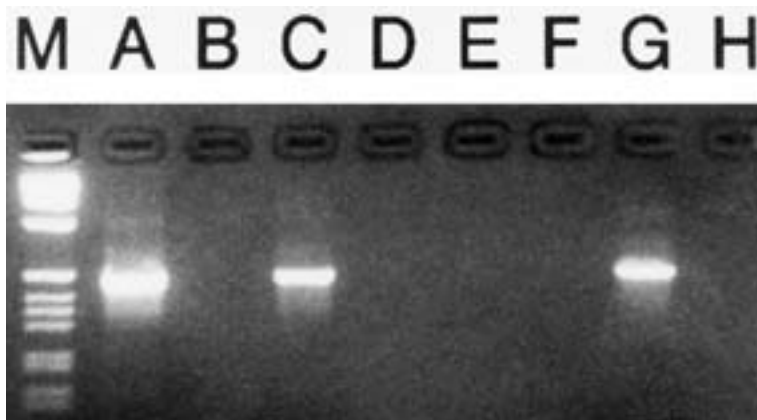
lo nizka prevalenca papilomov požiralnika, ugotovljena v dosedanjih študijah, je v nasprotju z velikim številom bolnikov z boleznimi zgornjih prebavil kot sta peptična razjeda ali hiatalna hernija. Dodatno je bila več kot polovica objavljenih primerov ploščatoceličnih papilomov požiralnika endoskopsko odstranjena iz srednje ali zgornje tretjine požiralnika, kjer je vpliv gastroezofagealnega refluksa na sluznico požiralnika bistveno manjši.

Okužbo s HPV je kot možen dejavnik v etiopatogenezi papilomov požiralnika prvič omenil Syrjanen leta 1982 (69), ko je dokazal prisotnost velike plaščne beljakovine HPV v enem primeru papiloma požiralnika. Kasneje je raziskovalcem z uporabo imunohistokemičnih in hibridizacijskih metod ter PCR uspelo dokazati prisotnost antigenov HPV ali DNA HPV še v 26 primerih ploščatoceličnih papilomov požiralnika, medtem ko v 95 papilomih okužba ni bila dokazana (tabela 3). Čeprav so bile omenjene študije opravljene večinoma na majhnem številu papilomov (sedem na enem samem primeru) in z uporabo različno občutljivih in specifičnih metod, lahko sklepamo, da večina papilomov požiralnika verjetno ni etiološko povezana z okužbo s HPV.

V želji, da preverimo navedeno domnevo, smo v sodelovanju z Oddelkom za gastroenterologijo Medicinskega centra za podiplomsko izobraževanje iz Varšave zbrali do sedaj največjo zbirko papilomov požiralnika, na kateri smo izvedli raziskavo vloge HPV v etiopatogenezi teh novotvorb (8, 11). V raziskavo smo vključili 36 arhivskih tkivnih vzorcev teh novotvorb, fiksiranih v formalinu in vklopljenih v parafin ali paraplast. 23 tkivnih vzorcev, odvzetih istemu številu bolnikov, smo izbrali iz histopatoloških arhivov Inštituta za patologijo Medicinske fakultete v Ljubljani, medtem ko smo 13 vzorcev 12 bolnikov izbrali iz arhivov Oddelka za gastroenterologijo Medicinskega centra za podiplomsko izobraževanje iz Varšave. V raziskavo vključeni tkivni vzorci so bili stari od 1 do 14 let.

Najmlajši bolnik je bil v času študije star 25, najstarejši pa 83 let. Povprečna starost bolnikov je bila 50,2 let. En bolnik je imel v požiralniku dva papiloma, ki sta bila istočasno endoskopsko odstranjena. Vsi ostali bolniki so imeli v požiralniku en sam papilom. 22 papilomov je bilo endoskopsko odstranjenih iz spodnje, 7 iz srednje in 7 iz zgornje tretjine požiralnika. Makroskopsko so bili papilomi požiralnika resičastega ali cvetačastega videza, rožnate ali rdeče barve, v premeru veliki od 2 do 20 mm (povprečni premer 4,4 mm). Histološko so bili grajeni iz rahle razvejane vezivno-žilne strome, ki jo je odeval neporoženevajoč večskladen ploščatocelični epitelij brez znakov celičnih atipij.

Z ISH nismo uspeli dokazati okužbe s HPV v niti enem od 36 pregledanih ploščatoceličnih papilomov požiralnika. S PCR z grupno specifičnimi začetnimi oligonukleotidi MY09/MY11 in GP5/GP6 smo dokazali okužbo s HPV v dveh tkivnih vzorcih ploščatoceličnih papilomov požiralnika (slika 4). Oba para grupno specifičnih začetnih oligonukleotidov sta za HPV-pozitivna spoznala ista tkivna vzorca. Za opredelitev tipa HPV v pozitivnih vzorcih ploščatoceličnih papilomov požiralnika smo uporabili metodo encimske razgradnje PCR-pridelka MY09/MY11 in encimsko oligonukleotidni test. Obe metodi sta pokazali prisotnost HPV tipa 6 v obeh tkivnih vzorcih papilomov požiralnika. Delce beta-globinskega gena smo uspešno pomnožili z uporabo začetnih oligonukleotidov GH20/PC04 in KM29/RS42 iz 36 oz. 35 tkivnih vzorcev. Za uspešno pomnoževanje del-



Slika 4. Primeri uspešnega (elektroforezni koloni C in G) in neuspešnega (elektroforezne kolone B, D, E, F in H) pomnoževanja delcev DNA humanega virusa papiloma iz tkivnih vzorcev ploščatoceličnih papilomov požiralnika. Elektroforezna kolona A, pozitivna kontrola. Elektroforezna kolona M, molekularni označevalac VI (Boehringer Mannheim GmbH, Nemčija).

cev beta-globinskega gena iz dveh vzorcev DNA je bilo potrebno dodatno redčenje izhodiščne DNA 1:10.

Oba HPV-pozitivna ploščatocelična papiloma požiralnika smo odkrili pri slovenskih bolnikih. Prvi je bil odstranjen iz srednje tretjine požiralnika 61-letni bolnici, po poklicu gospodinji, kadilki, ki je bila endoskopsko pregledana zaradi ponavljajočih se epigastričnih bolečin. Pri pregledu so kot osnovni vzrok epigastričnih težav ugotovili refluksni ezofagitis. Odstranjeni papilom je bil rožnate barve in je v premeru meril 4 mm. Drugi HPV-pozitivni papilom požiralnika je bil odstranjen iz spodnje tretjine požiralnika 41-letnemu moškemu, po poklicu kovaču, kadilcu, ki je bil endoskopsko pregledan zaradi ponavljajočega se epigastričnega nelagodja. Pri pregledu so kot vzrok nelagodja ugotovili samo papilom požiralnika. Odstranjeni papilom je bil prav tako rožnate barve in je v premeru meril 7 mm.

Domnevo, da večina papilomov požiralnika verjetno ni etiološko povezana z okužbo s HPV, smo torej potrdili tudi z našo raziskavo, v kateri nam je uspelo dokazati okužbo s HPV le v 2 od 36 preiskanih papilomov požiralnika (8, 11).

Tudi z uporabo tako občutljive metode kot je PCR, HPV niso pogosto odkrili v papilomih požiralnika. V treh od štirih do sedaj objavljenih PCR-raziskavah, vključno z našo, je bila prevalenca okužbe s HPV v papilomih požiralnika med 0 in 5,5 % (8, 11, 68, 81). Nasprotno so Odze in sodelavci (80) nedavno objavili rezultate raziskave, v kateri so s PCR dokazali okužbo s HPV v 50 % (13 od 26) papilomov požiralnika. Za razliko od ostalih raziskav, v katerih so dokazali navzočnost nizkorizičnih HPV-tipov 6 ali 11, so Odze in sodelavci v papilomih požiralnika dokazali predvsem visokorizična HPV-tipa 16 in 18.

Pomembna razlika v prevalenci okužbe s HPV, ki je bila ugotovljena v navedenih PCR-študijah, je lahko posledica več dejavnikov. Podobno kot pri študijah ploščatoceličnih karcinomov grla z ugotovljeno zelo visoko prevalenco okužbe s HPV (glej prejšnje poglav-

je) menimo, da obstaja velika možnost, da so nekateri od HPV-pozitivnih papilomov požiralnika, odkriti v študiji Odzeja in sodelavcev (80), posledica kontaminacije oz. lažno pozitivni rezultati. Vzroki za to so predvsem:

- visoka prevalenca okužbe s HPV, ugotovljena v tej študiji, ki ni primerljiva z ostalimi študijami;
- dokaz prisotnosti za to vrsto novotvorb precej neobičajnih tipov HPV;
- uporaba samo nespecifičnih postopkov za zmanjševanje možnosti lažnopolozitivnih rezultatov.

Podobno kot pri raziskavah karcinoma grla obstaja tudi možnost, da je majhno število HPV-pozitivnih papilomov požiralnika, odkritih v študijah z nizko prevalenčno stopnjo okužbe s HPV, posledica lažno negativnih rezultatov v teh študijah, čeprav je po našem mnenju takšna možnost zelo majhna. V vseh raziskavah z odkrito nizko prevalenčno stopnjo okužbe s HPV (8, 11, 68, 81) so namreč raziskovalci pred pomnoževanjem delcev HPV pomnoževali delce najmanj enega vseprisotnega gena oz. izvajali notranje kontrolno pomnoževanje. Vse tri raziskovalne skupine, vključno z našo, so v študijo uvrstile le vzorce DNA, v katerih je bilo notranje kontrolno pomnoževanje uspešno oz. v katerih ni bilo prisotnih zaviralcev pomnoževanja. Naslednja možnost za nastanek lažno negativnih rezultatov je prisotnost takšnih tipov HPV v tkivnih vzorcih, ki jih z izbranimi začetnimi oligonukleotidi ne moremo zajeti (18). Za zmanjševanje te možnosti so vse tri raziskovalne skupine uporabljale grupno specifične začetne oligonukleotide, ki zajamejo veliko število tipov HPV, med njimi tudi vse, ki so zaenkrat opredeljeni kot pomembni v patologiji človeka. V naši raziskavi smo v ta namen uporabljali dva različna para grupno specifičnih začetnih oligonukleotidov. Z uporabo začetnih oligonukleotidov GP5/GP6, ki pomnožujeta relativno kratek delec DNA HPV (140–150 baznih parov), smo dodatno zmanjšali možnost nastanka lažno negativnih rezultatov zaradi znane, nekoliko slabše učinkovitosti pomnoževanja večjih delcev DNA iz arhivskih tkivnih vzorcev (36). Dodatno so v vseh treh raziskavah za dokazovanje specifičnosti PCR-pridelka uporabljali zelo občutljivi in specifični metodi, kot sta hibridizacija po Southernu ali encimsko oligonukleotidni test. Z vsemi navedenimi ukrepi je bila po našem mnenju možnost lažno negativnih rezultatov PCR v vseh treh raziskavah z ugotovljeno nizko prevalenco okužbe s HPV v papilomih požiralnika zmanjšana na najmanjšo možno mero.

Na osnovi naših rezultatov lahko zaključimo, da okužba s HPV verjetno ni pomembnejši etiološki dejavnik pri vzniku in razvoju ploščatoceličnih papilomov požiralnika. Podobno kot Carr in sodelavci (81) menimo, da občasno odkritje DNA HPV v ploščatoceličnih papilomih požiralnika ni posledica virusne okužbe, ki bi pripeljala do razvoja teh novotvorb, ampak prej naključne kolonizacije ali nedejavne okužbe papilomov, ki so vzniknili in se razvili pod vplivom drugih, še neznanih etioloških dejavnikov.

Ploščatocelični karcinomi požiralnika in humani virus papiloma

Ploščatocelični karcinom predstavlja 90 % vseh malignih novotvorb požiralnika. Polovica teh novotvorb zraste v srednji tretjini požiralnika, 30 % v spodnji in 20 % v zgornji tretjini. Makroskopsko raste karcinom najpogosteje v obliki eksofitične tvorbe, redkeje kot

razpadajoča razjeda ali infiltrativno. Karcinom požiralnika se pogosto hitro razrašča v okoličico in zaseva v področne bezgavke (82).

Začetni rak požiralnika je običajno brez kliničnih znamenj. Prvo znamenje karcinoma je pogosto povečana bezgavka na vratu ali nad ključnico. Ko se pojavi prva klinična znaka, oteženo požiranje in hujšanje, je bolezen navadno že razširjena. Bolečina pri požiranju se pojavlja pozno in izžareva v hrbet. Pogosta znaka sta tudi regurgitacija in bruhanje. Zaradi prizadetosti in pareze levega n. laryngeus recurrens s posledično paralizo glasilk se pogosto pojavi tudi hripavost. Krvaveče bolezenske spremembe so lahko vzrok za hematemezo ali meleno. Zdravljenje je kirurško z dodatnim obsevanjem in kemoterapijo (83).

Ploščatocelični karcinom požiralnika je novotvorba, za katero je značilna izrazita zemljepisna razporeditev bolezni (82, 83). V večini dežel je incidenca bolezni na 100.000 prebivalcev 2,5–8 pri moških in 1,5–2,5 pri ženskah (84). Nasprotno so številne epidemiološke raziskave pokazale, da je v določenih manjših zemljepisnih področjih, iz dosedaj še nedokončno pojasnjenih razlogov, incidenca te novotvorbe tudi do 500-krat večja od svetovnega povprečja. V ta področja prištevamo: provinco Linxian na Kitajskem, Hong-Kong, področje okoli Kaspijskega jezera v Iranu, Singapur, provinco Transkei v Južnoafriški republiki, ter provinci Calvados in Bas Rhin v Franciji (84). V Sloveniji zbolijo letno od 70 do 100 ljudi; incidenca znaša 7,3 za moške in 1,7 za ženske (84). Po incidenčni stopnji Slovenijo uvrščamo med dežele s srednjo stopnjo tveganja za razvoj ploščatoceličnega karcinoma pri moških ter z nizko pri ženskah.

Kljub številnim epidemiološkim, eksperimentalnim in kliničnim raziskavam, še posebej v področjih z visoko stopnjo tveganja za razvoj te novotvorbe, etiopatogeneza karcinoma požiralnika do danes še ni povsem znana (82). Domnevajo, da vpliva na nastanek tega tumorja več pomembnih dejavnikov oz. sodejavnikov tveganja (82, 85):

- kontaminacija hrane z glivami;
- visoka koncentracija nitritov in nitrozaminov v hrani;
- pomanjkanje vitaminov A, C, riboflavina, tiamina in piridoksina;
- pomanjkanje oligoelementov, kot so cink, selen in molibden;
- kajenje;
- prekomerno uživanje alkoholnih pijač.

Značilno prehrano v zemljepisnih območjih, kjer je karcinom požiralnika zelo pogost, sestavljajo predvsem maščobe ter malo sveže zelenjave in sadja. Pri takšni prehrani organizmu primanjkuje številnih vitaminov in oligoelementov in prav to pomanjkanje naj bi bil najbolj pomemben dejavnik tveganja za razvoj karcinoma požiralnika. V omenjenih deželah, še posebej na Kitajskem in v Iranu, je pogost tudi kronični nerefleksni ezofagitis, ki sčasoma preko atrofije in različnih stopenj displazije preide v karcinom (85).

Opisanega hipotetičnega modela razvoja karcinoma požiralnika ne zasledimo v območjih z nizko incidenco te novotvorbe. Tu se karcinom požiralnika razvija pogosteje pri bolnikih z ahalazijo, brazgotinami po kavstičnih poškodbah in divertiklih požiralnika ter pri kadilcih in osebah, ki uživajo alkoholne pijače v prekomernih količinah. Etanol in kajenje v karcinogenezi verjetno delujeta sinergistično (86). Nitrozamini, osamljeni iz toba-

ka, so najmočnejši karcinogeneni za sluznico požiralnika. Natančen mehanizem karcinogenega delovanja etanola še ni jasen, domnevajo pa, da je le-ta verjetno le sodejavniki, ki spodbuja delovanje drugih karcinogenov in ne samostojen karcinogen. Nekateri raziskovalci so mnenja, da etanol samo povečuje prepustnost epitelijskega požiralnika za druge karcinogene kot so npr. nitrozamini iz tobačnega dima (85, 86).

Med pomembnejšimi dejavniki, ki jih v zadnjem času vse bolj omenjajo v etiopatogenezi ploščatoceličnega karcinoma požiralnika (še posebej v področjih z visoko incidenco teh novotvorb), je okužba z določenimi tipi HPV. Okužbo s HPV je kot možen karcinogeni dejavnik v etiopatogenezi karcinomov požiralnika prvič omenil Syrjanen leta 1982 (87), ko je opisal histološke spremembe, značilne za to okužbo, v 24 od 60 pregledanih tkivnih vzorcev teh novotvorb. Kasneje je uspelo raziskovalcem iz različnih delov sveta z uporabo imunohistokemičnih in hibridizacijskih metod ter PCR v 0–71 % pregledanih tkivnih vzorcev dokazati prisotnost antigenov HPV ali DNA HPV (tabela 4). Tako veliko razliko v prevalenci okužbe s HPV razlagamo s tem, da so bile raziskave opravljene na populacijah z zelo različno stopnjo tveganja za nastanek karcinoma požiralnika in z uporabo različnih metod za odkrivanje okužbe s HPV. Čeprav so si rezultati dosedanjih raziskav povezave med okužbo s HPV in nastankom karcinoma požiralnika (tabela 4) na prvi pogled nasprotujoči, lahko z njihovo natančno analizo domnevamo, da je prevalenca dokazane okužbe s HPV v karcinomih požiralnika v določeni populaciji sorazmerna incidenčni stopnji karcinoma požiralnika v tej populaciji. Tako se prevalenca dokazane okužbe s HPV v tkivnih vzorcih karcinomov požiralnika v raziskavah, opravljenih v nekaterih področjih z visoko incidenčno stopnjo te novotvorbe (provinca Linxian na Kitajskem (92, 99), provinca Transkei v Južnoafriški republiki (95), provinca Calvados in Bas Rhin v Franciji (96), jugovzhodna Koreja (94)) giblje med 24 in 71 %. Nasprotno v večini študij iz dežel z nizko incidenčno stopnjo karcinoma požiralnika (Avstralija (89), ZDA – populacija belcev (38, 90), Japonska (97), Anglija (98), Švedska (101)) raziskovalcem ni uspelo dokazati okužbe s HPV v niti enem tkivnem vzorcu karcinoma požiralnika (38, 89, 90, 98, 101) ali le v posameznih primerih te novotvorbe (97). Edina izjema med temi raziskavami je študija Lokeja in sod. (93), v kateri raziskovalcem ni uspelo dokazati okužbe s HPV v niti enem od 37 pregledanih karcinomov požiralnika, čeprav so bili le-ti odvzeti bolnikom iz Hong-Konga, ki je znan kot področje z izredno visoko incidenčno stopnjo te novotvorbe. Rezultate te raziskave lahko razložimo z relativno nižjo občutljivostjo metod, ki so jih uporabljali za dokazovanje okužbe s HPV (ISH, dot-blot). Omenjene metode v času, ko je bila raziskava opravljena (1988–1989) tudi še niso bile dokončno izpopolnjene. Prav tako je mogoče, da je bila študija opravljena na populaciji angleških priseljencev in ne na domači populaciji (navedeni populaciji imata namreč popolnoma različne incidenčne stopnje te novotvorbe), kar na žalost ni posebej opredeljeno v objavi.

Z našo raziskavo smo želeli z uporabo visoko občutljivih metod preveriti domnevo, ali je okužba s HPV pomemben etiološki dejavnik pri nastanku karcinoma požiralnika tudi v srednje rizični populaciji, kot je slovenska (7).

V raziskavo smo vključili 28 arhivskih tkivnih vzorcev, fiksiranih v formalinu in vklopljenih v parafin, odvzetih 27 bolnikom, ki so se zdravili na Kliniki za torakalno kirurgijo v Ljub-

Tabela 4. Pregled vseh pomembnejših raziskav okužbe s humanimi virusi papiloma v ploščatoceličnih karcinomih požiralnika. IHC – imunohistokemične metode, PCR – verižna reakcija s polimerazo, SB – hibridizacija po Southernu, ISH – hibridizacija in situ.

Raziskovalna skupina	Leto raziskave	Področje raziskave	Število primerov	Metode uporabljene za dokazovanje okužbe s HPV	Rezultati raziskave
Syrjanen (87)	1982	Švedska	60	histologija	značilne morfološke spremembe dokazane v 24/60 karcinomov
Hille in sod. (88)	1985	JAR	24	histologija	značilne morfološke spremembe dokazane v 8/24 karcinomov
Kulski in sod. (89)	1986	Avstralija	120	IHC	L1 beljakovina ni dokazana
Kiyabu in sod. (90)	1989	ZDA	13	PCR; tipa 16 in 18	DNA HPV ni dokazana
Mori in sod. (91)	1989	Kitajska	46	IHC	L1 beljakov. dokazana v 8/46 karcinomov
Brandtsma in sod. (38)	1989	ZDA	12	SB; tipi 11,16,18	DNA HPV ni dokazana
Chang in sod. (92)	1990	Kitajska	51	ISH; tipi 6,11,16,18	HPV tip 6 dokazan v 3/51, tip 11 v 3/51, tipa 16 in 18 v 16/51 karcinomov
Loke in sod. (93)	1990	Hong-Kong	37	ISH, dot-blot; tipi 6/11,16/18	DNA HPV ni dokazana
Kim in sod. (94)	1991	Koreja	24	PCR; tipa 16 in 18	HPV tip 16 dokazan v 16/24 karcinomov
Williamson in sod. (95)	1991	JAR	14	PCR	DNA HPV dokazana v 10/14 karcinomov
Benamouzig in sod. (96)	1992	Francija	12	ISH in dot-blot; tipi 6,11,16,18,31,33	HPV tipa 16 in 18 dok. v 5/12 karcinomov
Toh in sod. (97)	1992	Japonska	45	PCR	HPV tipa 16 in 18 dok. v 3/45 karcinomov
Ashworth in sod. (98)	1993	Anglija	10	ISH; tipi 6/11,16/18,31/33/35	DNA HPV ni dokazana
Chang in sod. (99)	1993	Kitajska	363	ISH z mešanico HPV-sond in hibridizacijo v pogojih nizke strogosti	HPV 6 in 11 dokazana v 6/363, tipa 16 in 18 v 18/363, tip 30 v 5/363 in neopredeljeni tipi v 59/363 karcinomov
Poljak in Cerar (7)	1993	Slovenija	20	ISH; tipi 6/11, 16/18,31/33/51 in PCR	HPV tip 16 dokazan v 2/20 karcinomov
Togawa in sod. (100)	1994	več dežel	72	PCR	DNA HPV dokazana v 10/72 karcinomov
Lewensohn in sod. (101)	1994	Švedska	10	PCR	DNA HPV ni dokazana

Ijani v obdobju od leta 1985 do 1992. Bolniki, vključeni v raziskavo, so bili izbrani naključno. Najmlajši bolnik je bil v času študije star 47, najstarejši pa 76 let. Povprečna starost bolnikov je bila 60,2 let. Vsi bolniki, vključeni v raziskavo, so bili moški.

Histopatološko smo 5 tkivnih vzorcev opredelili kot dobro diferencirani, 17 vzorcev kot srednje diferencirani in 6 vzorcev kot slabo diferencirani ploščatocelični karcinom požiralnika. Štiri tumorske tkivne vzorce smo opredelili kot zgodnje karcinome (rakaste celice vidne samo v submukozi), ostalih 24 vzorcev pa kot napredovale karcinome (viden vdor rakastih celic skozi lamino muskularis proprijo v lamino adventicijo ter v nekaterih primerih v mezigovnice in žilje).

Z ISH nismo uspeli dokazati okužbe s HPV v niti enem od pregledanih 28 ploščatoceličnih karcinomov požiralnika. S PCR z grupno specifičnimi začetnimi oligonukleotidi MY09 in MY11 smo dokazali okužbo s HPV v dveh tkivnih vzorcih ploščatoceličnih karcinomov požiralnika. Prvi HPV-pozitivni tkivni vzorec je bil zgodnji karcinom, drugi pa napredovali karcinom požiralnika. Za opredelitev HPV-tipa v obeh pozitivnih vzorcih ploščatoceličnih karcinomov požiralnika smo uporabili metodo encimske razgradnje PCR-pridelka MY09/MY11 in encimsko oligonukleotidni test. Obe metodi sta pokazali prisotnost HPV-tipa 16 v obeh tkivnih vzorcih karcinomov požiralnika. Delce beta-globinskega gena smo uspešno pomnožili z uporabo začetnih oligonukleotidov GH20/PC04 in KM29/RS42 iz vseh 28 tkivnih vzorcev ploščatoceličnih karcinomov požiralnika.

V naši raziskavi, ki je bila prva, narejena na populaciji s srednjo stopnjo tveganja za nastanek karcinoma požiralnika (v raziskavo so bili vključeni samo moški bolniki), nam je, kljub uporabi visoko občutljivih metod, uspelo dokazati okužbo s HPV le v 2 od 28 (7,1 %) pregledanih tkivnih vzorcev teh novotvorb (7, 16). Ugotovljena prevalenca okužbe s HPV je pri slovenskih bolnikih s ploščatoceličnim karcinomom požiralnika nekje med prevalenco okužbe v področjih z visoko in tisto v področjih z nizko stopnjo tveganja. Zato lahko zaključimo, da rezultati naše študije potrjujejo upravičenost domneve o premo sorazmernem odnosu med prevalenco okužbe s HPV v karcinomi požiralnika v določeni populaciji in incidenčno stopnjo omenjenega karcinoma v tej populaciji.

Če je navedena domneva pravilna, lahko na osnovi rezultatov dosedanjih raziskav zaključimo, da je okužba z določenimi tipi HPV mogoče eden od tistih karcinogenih dejavnikov, ki v sodelovanju z ostalimi dejavniki odločujoče vpliva na pogostejši pojav teh novotvorb v določenih manjših področjih sveta.

Literatura

1. van Ranst MA, Tachezy R, Delius H, Burk RD. Taxonomy of the human papillomaviruses. *Papillomavirus Res* 1993; 4: 61–5.
2. Uršič-Vrščaj M, Poljak M. Voznik ali sopotnik? Pomen okužbe s humanimi virusi papiloma v etiologiji nekaterih novotvorb pri človeku. *Zdrav Vestn* 1995; 64: 223–8.
3. Crum CP. Genital papillomaviruses and related neoplasms: causation, diagnosis and classification. *Mod Pathol* 1994; 7: 138–45.
4. Laimins LA. The biology of human papillomaviruses: from warts to cancer. *Infect Agents Dis* 1993; 2: 74–86.
5. Poljak M, Gale N, Ferluga D, Kambič V. Etiology of laryngeal papillomatosis. *Il Friuli Medico* 1992; 47: 461–2.
6. Poljak M, Ferluga D, Gale N, Petrovec M. Molekularna diagnostika okužbe s humanim virusom papiloma (HVP) v patologiji. *Zdrav Vestn* 1993; 62: 105–9.

7. Poljak M, Cerar A. Human papillomavirus type 16 DNA in oesophageal squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 1993; 13: 2113–6.
8. Poljak M, Cerar A. Detection of human papilloma virus type 6 DNA in an esophageal squamous cell papilloma. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994; 13: 188–9.
9. Poljak M, Barlič J. Rapid and simple method for extraction of DNA from archival Papanicolaou stained cervical smears. *Acta Cytol (v tisku)*.
10. Poljak M, Barlič J, Seme K, Avšič-Županc T, Zore A. Isolation of DNA from archival Papanicolaou stained cytological smears using a simple salting-out procedure. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 1995; 48: M55–6.
11. Poljak M, Orlowska J, Cerar A. Human papillomavirus infection in esophageal squamous cell papillomas: a study of 29 lesions. *Anticancer Res* 1995; 15: 965–70.
12. Gale N, Poljak M, Kambič V, Ferluga D, Fischinger J. Laryngeal papillomatosis: molecular, histopathologic, and clinical evaluation. *Virchows Arch* 1994; 425: 291–5.
13. Kambič V, Gale N. *Epithelial hyperplastic lesions of the larynx*. Amsterdam: Elsevier, 1995.
14. Poljak M, Seme K. Rapid detection and typing of human papillomaviruses by consensus polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay. *J Virol Methods (v tisku)*.
15. Gale N, Poljak M, Kambič V, Zidar N, Cör A. Preneoplastic epithelial lesions of the larynx. *Semin Diagn Pathol (v tisku)*.
16. Poljak M. *Pomen okužbe s humanimi virusi papiloma v etiopatogenezi epitelijskih novotvorb grla in požiralnika*. Doktorska naloga. Ljubljana: Medicinska fakulteta, 1995.
17. Bockstahler LE. Overview of international PCR standardization efforts. *PCR Methods Applic* 1993; 3: 263–7.
18. Poljak M, Avšič-Županc T, Seme K. Verižna reakcija s polimerazo – nova raziskovalna in diagnostična metoda v virologiji. *Med Razgl* 1994; 33: 379–400.
19. Bernard H-U, Chan S-Y, Manos MM et al. Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. *J Infect Dis* 1994; 170: 1077–85.
20. Resnick RM, Cornelissen MT, Wright DK et al. Detection and typing of human papillomavirus in archival cervical cancer specimens by DNA amplification with consensus primers. *J Natl Cancer Inst* 1990; 82: 1477–84.
21. Longo MC, Berninger MS, Hartley JL. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene* 1990; 93: 125–8.
22. Kambič V. *Otorinolaringologija*. Ljubljana: Mladinska knjiga, 1984: 165–70.
23. Ullman EV. On the aetiology of laryngeal papilloma. *Acta Otolaryngol* 1928; 5: 317–38.
24. Svoboda DJ, Kirchner FR, Provd GO. Electron microscopic study of human laryngeal papillomatosis. *Cancer Res* 1963; 23: 1084–9.
25. Stephens CB, Arnold GE, Butchko GM, Hardy CL. Autogenous vaccine treatment of juvenile laryngeal papillomatosis. *Laryngoscope* 1979; 89: 1689–96.
26. Boyle WF, Riggs JL, Oshiro LS, Lennette EH. Electron microscopic identification of PAPOVA virus in laryngeal papillomata. *Laryngoscope* 1978; 83: 1102–8.
27. Spoendlin M, Kistler O. Papovavirus in laryngeal papilloma. *Arch Otorhinolaryngol* 1978; 218: 289–92.
28. Braun L, Kashima H, Eggleston J, Shah K. Demonstration of papillomavirus antigen in paraffin sections of laryngeal papillomas. *Laryngoscope* 1982; 92: 640–3.
29. Costa J, Howley PM, Bowling MC, et al. Presence of human papilloma viral antigens in juvenile multiple laryngeal papilloma. *Am J Clin Pathol* 1981; 75: 194–7.
30. Terry RM, Lewis FA, Griffiths S, Wells M, Bird CC. Demonstration of human papillomavirus types 6 and 11 in juvenile laryngeal papillomatosis by in situ DNA hybridization. *J Pathol* 1987; 153: 245–8.
31. Corbitt G, Zarod AP, Arrand JR, Longson M, Farrington WT. Human papillomavirus (HPV) genotypes associated with laryngeal papilloma. *J Clin Pathol* 1988; 41: 284–8.
32. Terry RM, Lewis FA, Robertson S, Blythe D, Wells M. Juvenile and adult laryngeal papillomata: classification by in situ hybridization for human papillomavirus. *Clin Otolaryngol* 1989; 14: 135–9.

33. Quiney RE, Wells M, Lewis FA, Terry RM, Michaels L, Croft CB. Laryngeal papillomatosis: correlation between severity of disease and presence of HPV 6 and 11 detected by in situ DNA hybridisation. *J Clin Pathol* 1989; 42: 694–8.
34. Tsutsumi K, Nakajima T, Gotoh M, Shimosato Y, Tsunokawa Y, Terada M, Ebihara S, Ono I. In situ hybridization and immunohistochemical study of human papillomavirus infection in adult laryngeal papillomas. *Laryngoscope* 1989; 99: 80–5.
35. Levi JE, Delcelo R, Alberti VN, Torloni H, Villa LL. Human papillomavirus DNA in respiratory papillomatosis detected by in situ hybridization and the polymerase chain reaction. *Am J Pathol* 1989; 135: 1179–84.
36. Greer CE, Wheeler CM, Manos MM. Sample preparation and PCR amplification from paraffin-embedded tissues. *PCR Methods Applic* 1994; 3: S113–22.
37. Lindeberg H, Johansen L. The presence of human papillomavirus (HPV) in solitary adult laryngeal papillomas demonstrated by in situ DNA hybridization with sulphonated probes. *Clin Otolaryngol* 1990; 15: 367–71.
38. Brandsma JL, Abramson AL. Association of papillomavirus with cancers of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1989; 115: 621–5.
39. Dickens P, Srivastava G, Loong Loke S, Larkin S. Human papillomavirus 6, 11, and 16 in laryngeal papillomas. *J Pathol* 1991; 165: 243–6.
40. Rimell F, Maisel R, Dayton V. In situ hybridization and laryngeal papillomas. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1992; 101: 119–26.
41. Arndt O, Zeise K, Bauer I, Brock J. Der nachweis humaner Papillomviren (HPV) in Larynxpapillomen. Eine in situ hybridisierungsstudie. *Laryngorhinootologie* 1992; 71: 132–6.
42. Shunmugarathnam K, Sobin LH. *Histological typing of tumours of the upper respiratory tract and ear*. Heidelberg: Springer, 1991: 20–1.
43. Lindeberg H, Oster S, Oxlund I, Elbrond O. Laryngeal papillomas: classification and course. *Clin Otolaryngol* 1986; 11: 423–9.
44. Kambič V, Lenart I. Notre classification des hyperplasies de l'epithelium du larynx au point de vue pronostic. *JFORL* 1971; 20: 1145–50.
45. Chang F, Wang L, Syrjanen S, Syrjanen K. Human papillomavirus infections in the respiratory tract. *Am J Otolaryngol* 1992; 13: 210–25.
46. Lindeberg H, Elbrond O. Laryngeal papillomas: clinical aspects in a series of 231 patients. *Clin Otolaryngol* 1989; 14: 333–42.
47. Kambič V, Gale N. Significance of keratosis and dyskeratosis for classifying hyperplastic aberrations of laryngeal mucosa. *Am J Otolaryngol* 1986; 7: 323–33.
48. Kambič V, Gale N, Ferluga D. Laryngeal hyperplastic lesions, follow-up study and application of lectins and anticytokeratins for their evaluation. *Pathol Res Pract* 1992; 188: 1067–77.
49. Kambič V, Gale N, Ferluga D, Fischinger J, Cör A. Die Bedeutung der immunhistochemischen und histochemischen Methoden zur Klassifizierung der hyperplastischen Aberrationen der Kehlkopfschleimhaut. *GBK. Fortbildung aktuell* 1993; 63: 29–34.
50. Kambič V, Gale N, Fischinger J. Local immune response in hyperplastic lesions of the larynx. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 1994; 56: 217–23.
51. Rihkanen H, Peltomaa J, Syrjanen S. Prevalence of human papillomavirus DNA in vocal cords without laryngeal papillomas. *Acta Otolaryngol* 1994; 114: 348–51.
52. Kahn T, Schwarz E, zur Hausen H. Molecular cloning and characterization of the DNA of a new human papillomavirus (HPV 30) from a laryngeal carcinoma. *Int J Cancer* 1986; 37: 61–5.
53. Scheurlen W, Stremlau A, Gissmann L, Hohn D, Zenner HP, zur Hausen H. Rearranged HPV 16 molecules in an anal and in a laryngeal carcinoma. *Int J Cancer* 1986; 38: 671–6.
54. Stremlau A, Zenner HP, Gissmann L, zur Hausen H. Nachweis und Organisationsstruktur der DNS menschlicher Papillomviren beim Kehlkopf und Hypopharynxkarzinom. *Laryngorhinootologie* 1987; 66: 311–5.
55. Syrjanen S, Syrjanen K, Mantyjarvi R, Collan Y, Karja J. Human papillomavirus DNA in squamous cell carcinomas of larynx demonstrated by in situ hybridization. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 1987; 49: 175–86.

56. Zarod AP, Rutherford JD, Corbitt G. Malignant progression of laryngeal papilloma associated with human papilloma virus type 6 (HPV 6) DNA. *J Clin Pathol* 1988; 41: 280–3.
57. Kiyabu MT, Shibata D, Arnheim N, John Martin W, Fitzgibbons PL. Detection of human papilloma-virus in formalin-fixed, invasive squamous carcinomas using the polymerase chain reaction. *Am J Surg Pathol* 1989; 13: 221–4.
58. Lindeberg H, Syrjanen S, Syrjanen K. Human papillomavirus type 11 DNA in squamous cell carcinoma and pre-existing multiple laryngeal papillomas. *Acta Otolaryngol* 1989; 107: 141–9.
59. Hoshikawa T, Nakajima T, Uhara H, et al. Detection of human papillomavirus DNA in laryngeal squamous cell carcinomas by polymerase chain reaction. *Laryngoscope* 1990; 100: 647–50.
60. Perez-Ayala M, Ruiz-Cabello F, Esteban F, et al. Presence of HPV 16 sequences in laryngeal carcinomas. *Int J Cancer* 1990; 46: 8–11.
61. Somers KD, Cartwright SL, Schechter GL. Human papillomavirus DNA in squamous cell carcinoma of the larynx and tongue. *Proc Ann Meet Am Assoc Cancer Res* 1990; 31: A1932.
62. Watts SL, Brewer EE, Fry TL. Human papillomavirus DNA types in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1991; 71: 701–7.
63. Brandwein MS, Nuovo GJ, Biller H. Analysis of prevalence of human papillomavirus in laryngeal carcinomas. Study of 40 cases using polymerase chain reaction and consensus primers. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1993; 102: 309–13.
64. Clayman GL, Stewart MG, Weber RS, El-Naggar AK, Grimm EA. Human papillomavirus in laryngeal and hypopharyngeal carcinomas. Relationship to survival. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1994; 120: 743–8.
65. Simon M, Kahn T, Schneider A, Pirsig W. Laryngeal carcinoma in a 12 year old child. Association with human papillomavirus 18 and 33. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1994; 120: 277–82.
66. Quitadamo M, Benson J. Squamous papilloma of the esophagus: a case report and review of the literature. *Am J Gastroenterol* 1988; 83: 194–201.
67. Orlowska J, Jarosz D, Gugulski A, Pachlewski J, Butruk E. Squamous cell papillomas of the esophagus: report of 20 cases and literature review. *Am J Gastroenterol* 1994; 89: 434–7.
68. Chang F, Janatuinen E, Pikkariainen P, Syrjanen S, Syrjanen K. Esophageal squamous cell papillomas: Failure to detect human papillomavirus DNA by in situ hybridization and polymerase chain reaction. *Scand J Gastroenterol* 1991; 26: 535–43.
69. Syrjanen K, Pyrhonen S, Aukee S, Koskela E. Squamous cell papilloma of the esophagus: a tumor probably caused by human papilloma virus. *Diagn Histopathol* 1982; 5: 291–6.
70. Colina F, Solis JA, Munoz MT. Squamous papilloma of the esophagus. A report of three cases and review of the literature. *Am J Gastroenterol* 1980; 74: 410–4.
71. Lesec G, Gogusev J, Fermaud H, Gorce D, Lemaitre JP, Verdier A. Presence of papilloma group viral antigen in an esophageal papilloma in man. *Gastroenterol Clin Biol* 1985; 9: 166–8.
72. Toet AE, Dekker W, Odo Op den Orth J, Blok P. Squamous cell papilloma of the esophagus: Report of four cases. *Gastrointest Endosc* 1985; 31: 77–9.
73. Winkler B, Capo V, Reumann W, et al. Human papillomavirus infection of the esophagus. *Cancer* 1985; 55: 149–55.
74. Sablich R, Benedetti G, Bugnucolo S, Serraino D. Squamous cell papilloma of the esophagus. Report on 35 endoscopic cases. *Endoscopy* 1988; 20: 5–7.
75. Hording M, Hording U, Daugaard S, Norrild B, Faber V. Human papilloma virus type 11 in a fatal case of esophageal and bronchial papillomatosis. *Scand J Infect Dis* 1989; 21: 229–31.
76. Janson JA, Baillie J, Pollock M. Endoscopic removal of esophageal condylomata acuminatum containing human papilloma virus. *Gastrointest Endosc* 1991; 37: 367–9.
77. Fontollet C, Hurlimann J, Monnier P, Ollyo B, Levi F, Savary M. Le papillome de l'oesophage est-il une lesion preneoplastique? Etude de 33 cas. *Schweiz Med Wochenschr* 1991; 121: 754–7.
78. van Cutsem E, Geboes K, Visser L et al. Squamous papillomatosis of the oesophagus with malignant degeneration and demonstration of the human papillomavirus. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1991; 3: 561–6.

79. Politoske EJ. Squamous cell papilloma of the esophagus associated with the human papillomavirus. *Gastroenterology* 1992; 102: 668–73.
80. Odze R, Antonioli D, Shocket D, Noble-Topham S, Goldman H, Upton M. Esophageal squamous papillomas. A clinicopathologic study of 38 lesions and analysis for human papillomavirus by the polymerase chain reaction. *Am J Surg Pathol* 1993; 17: 803–12.
81. Carr NJ, Brathauer GL, Lichy JH, Taubenberger JK, Monihan JM, Sobin LH. Squamous cell papillomas of the esophagus: a study of 23 lesions for human papillomavirus by in situ hybridization and the polymerase chain reaction. *Hum Pathol* 1994; 25: 536–40.
82. Blot JW. Esophageal cancer trends and risk factors. *Semin Oncol* 1994; 21: 403–10.
83. Marković S. Tumorji požiralnika. In: Kocijančič A, Varl B, eds. *Interna medicina*. Ljubljana: DZS, 1993: 351.
84. Whelan SL, Parkin DM, Masuyer E. *Patterns of cancer in five continents – IARC Scientific Publications No. 102*. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 1990: 14–104.
85. Jaskiewicz K. Oesophageal carcinoma: cytopathology and nutritional aspects in aetiology. *Anticancer Res* 1991; 9: 1847–52.
86. Yu MC, Garabrant DH, Peters JM, Mack TM. Tobacco, alcohol, diet, occupation, and carcinoma of the esophagus. *Cancer Res* 1988; 48: 3843–8.
87. Syrjänen K. Histological changes identical to those of condylomatous lesions found in esophageal squamous cell carcinomas. *Arch Geschwulstforsch* 1982; 52: 283–92.
88. Hille JJ, Markowitz S, Margolius KA, et al. Human papillomavirus and carcinoma of the esophagus. *N Engl J Med* 1985; 312: 1707.
89. Kulski J, Demeter T, Sterett GF, Shilkin KB. Human papillomavirus DNA in oesophageal carcinoma. *Lancet* 1986; ii: 683–4.
90. Kiyabu MT, Shibata D, Arnheim N, John Martin W, Fitzgibbons PL. Detection of human papillomavirus in formalin-fixed, invasive squamous carcinomas using the polymerase chain reaction. *Am J Surg Pathol* 1989; 13: 221–4.
91. Mori M, Shimono R, Inoue T, Kuwano H, Sugimachi K, Zhang RG. Papillomavirus and oesophageal cancer in the Japanese and Chinese. *Am J Gastroenterol* 1989; 84: 1126–7.
92. Chang F, Syrjänen S, Shen Q, Ji H, Syrjänen K. Human papillomavirus DNA in esophageal precancer lesions and squamous cell carcinomas from China. *Int J Cancer* 1990; 45: 21–5.
93. Loke SL, Ma L, Wong M, Srivastava G, Lo I, Bird CC. Human papillomavirus in oesophageal squamous cell carcinoma. *J Clin Pathol* 1990; 43: 909–12.
94. Kim WH, Song SY, Kang JK, Park IS, Choi HJ. Detection of human papillomavirus DNA from esophageal cancer tissue using the polymerase chain reaction. *Gastroenterology* 1991; 100: 375.
95. Williamson AL, Jaskiewicz K, Gunning A. The detection of human papillomavirus in oesophageal lesions. *Anticancer Res* 1991; 11: 263–6.
96. Benamouzig R, Pigot F, Quiroga G, et al. Human papillomavirus infection in esophageal squamous-cell carcinoma in western countries. *Int J Cancer* 1992; 50: 549–52.
97. Toh Y, Kuwano H, Tanaka S, Baba K, Matsuda H, Sugimachi K, Mori R. Detection of human papillomavirus DNA in esophageal carcinoma in Japan by polymerase chain reaction. *Cancer* 1992; 70: 2334–8.
98. Ashworth MT, McDicken IW, Southern SA, Nash JRG. Human papillomavirus in squamous cell carcinoma of the oesophagus associated with tylosis. *J Clin Pathol* 1993; 46: 573–5.
99. Chang F, Syrjänen S, Shen Q, Wang I, Syrjänen K. Screening for human papillomavirus infections in esophageal squamous cell carcinomas by in situ hybridization. *Cancer* 1993; 72: 2525–30.
100. Togawa K, Jaskiewicz K, Takahashi H, Meltzer SJ, Rustgi AK. Human papillomavirus DNA sequences in esophagus squamous cell carcinoma. *Gastroenterology* 1994; 107: 128–36.
101. Lewensohn-Fuchs I, Munck-Wikland E, Berke Z, et al. Involvement of aberrant p53 expression and human papillomavirus in carcinoma of the head, neck and esophagus. *Anticancer Res* 1994; 14: 1281–6.