

# Rola wirusów onkogennych w etiopatogenezie raka płaskonabłonkowego jamy ustnej – przegląd piśmiennictwa

## The role of oncogenic viruses in the etiopathogenesis of oral squamous cell carcinoma – literature review

*Magdalena Sawczuk<sup>1</sup>, Beata Sawczuk<sup>2</sup>, Agnieszka Miąsko<sup>3</sup>, Izabela Szarmach<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Zakład Ortodoncji, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Kierownik: dr hab. n. med. *Izabela Szarmach*

<sup>2</sup> Zakład Protetyki Stomatologicznej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Kierownik: prof. dr hab. *Maria Gołębiowska*

<sup>3</sup> Zakład Histologii i Embriologii, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Kierownik: dr hab. n. med. *Wiesława Ewa Niklińska*

---

---

### HASŁA INDEKSOWE:

rak płaskonabłonkowy w jamie ustnej, czynniki onkogenne w raku płaskonabłonkowym jamy ustnej, wirusy onkogenne, rola wirusa Ebsteina-Barr w rozwoju raka płaskonabłonkowego jamy ustnej, rola wirusa brodawczaka ludzkiego w rozwoju raka płaskonabłonkowego

---

---

### KEY WORDS:

squamous cell carcinoma of the oral cavity, oncogenic factors in oral squamous cell carcinoma, oncogenic viruses, role of Epstein-Barr virus in squamous cell carcinoma, role of human papillomavirus in squamous cell carcinoma

---

---

### Streszczenie

Do najliczniejszej grupy nowotworów w obrębie jamy ustnej zaliczane są raki płaskonabłonkowe. Choroba rozwija się pod wpływem różnorodnych czynników. Wiele prac potwierdza związek z występowaniem nowotworów w obrębie jamy ustnej a infekcją onkogennym wirusem. Za wirusy o najwyższym potencjale kancerogennym szczególnie w przypadku nowotworów jamy ustnej i gardła uznano wirus brodawczaka ludzkiego (HPV) oraz wirus Ebsteina-Barr (EBV).

**Cel.** Celem pracy było przedstawienie roli wirusów onkogennych w rozwoju raka płaskonabłonkowego jamy ustnej.

**Materiały i metody.** Przeprowadzono przegląd piśmiennictwa z okresu listopad 2014 – styczeń 2018 wykorzystując bazę „PubMed”, „MEDLINE”, „SCOPUS” używając słów kluczowych: rak płaskonabłonkowy w jamie ustnej, czynni-

---

---

### Summary

The most common kind of oral cancer is known to be the epithelial cells cancer. The disease develops under the influence of many factors. Extensive studies confirms relationship of the occurrence of cancer in the mouth area and infection with oncogenic virus. Papilloma virus (HPV) and Epstein-Barr (EBV) are considerate to be the most potent oncogenic viruses.

**Aim.** The aim of the studies was to present the role of the oncogenic virus in the development of squamous cell of oral cancer.

**Materials and methods.** Literature was carried out from November 2014 to January 2018 period using „Pub-Med”, MEDLINE, SCOPUS with keywords: squamous cell carcinoma of the Oral Cavity, oncogenic factors in squamous cell in oral carcinoma, oncogenic virus, role of Epstein-Barr virus in the development of squamous cell

*ki onkogenne w raku płaskonabłonkowym jamy ustnej, wirusy onkogenne, rola wirusa Ebsteina-Barr w rozwoju raka płaskonabłonkowego jamy ustnej, rola wirusa brodawczaka ludzkiego w rozwoju raka płaskonabłonkowego oraz squamous cell carcinoma of the oral cavity, oncogenic factors in oral squamous cell carcinoma, oncogenic viruses, role of Epstein-Barr virus in squamous cell carcinoma, role of human papillomavirus in squamous cell carcinoma.*

**Wyniki.** Do przeglądu zakwalifikowano 16 prac spełniających określone kryteria doboru piśmiennictwa. Identyfikacja cech porównawczych miała na celu znalezienie wspólnego mianownika wyników badań.

**Dyskusja.** W dokonanym przeglądzie skupiono się na roli czynników jakim są wirusy onkogenne. Analiza dostępnych danych potwierdziła, że coraz częstszą przyczyną obok powszechnie poznanych czynników, takich jak dym tytoniowy, alkohol, zaniedbania higieniczne oraz czynniki genetyczne stała się niewątpliwie rola czynnika wirusowego.

**Podsumowanie.** Wysoka zapadalność na nowotwory skłania do poszukiwania właściwych czynników etiologicznych w rozwoju procesu nowotworowego, szczególnie w obrębie jamy ustnej. Znajomość najbardziej kancerogennych czynników jest istotna z uwagi na profilaktykę oraz poszukiwania skuteczniejszych metod terapeutycznych. Ponadto w przytoczonych publikacjach zwraca uwagę fakt wykorzystania śliny jako materiału badawczego. Rzuca to nowe światło na pracę stomatologów i możliwość ich zaangażowania w proces detekcji nowotworu oraz czynników inicjujących onkogenezę.

*of oral carcinoma, role of human papillomavirus in the development of squamous cell carcinoma.*

**Results.** To the review 16 publications were qualified that meet certain criteria for good literature. Identification of comparative characteristics was aimed at finding a common denominator of research results.

**Discussion.** In the review the focus point was on the role of factors which is oncogenic virus. Analysis of the available data has confirmed that more and more frequent cause of commonly known factors such as tobacco smoke, alcohol, neglect hygiene, and genetic factor became undoubtedly the role of virus factor.

**Summary.** High incidence of cancers has led to the search for relevant etiological factors in the development carcinoma process, especially in and around oral cavity. Knowledge of the most cancerogenic factors is important in order to prevent, and the search of effective treatments. In addition, the cited publications, draws attention to the fact the use of saliva as research material. This throws a new light on the work of dentists and the possibility of their involvement in the process of tumor detection and the initiating factor of oncogenesis.

---

## Wstęp

Rak płaskonabłonkowy jest jednym z najczęściej diagnozowanych nowotworów złośliwych w obrębie jamy ustnej. Szósty najczęstszy rak na świecie, został zaliczony do wysoce heterogenicznej grupy nowotworów. Stomatolog jest jednym z pierwszych lekarzy, który może rozpoznać zmianę w obrębie jamy ustnej.

Ostatecznie postawione rozpoznanie zgodnie z klasyfikacją TNM (tumour/ node/ metastasis; służącą do określania stopnia zaawansowania klinicznego nowotworu) pozwala na wybór odpowiedniej metody leczenia (zabieg chirurgiczny, radioterapię, chemioterapię lub kombinację wymienionych metod).<sup>1</sup>

Rak płaskonabłonkowy w obrębie jamy ustnej najczęściej lokalizuje się na błonie śluzowej

policzków, dziąseł, podniebienia twardego, ustnej części języka i dna jamy ustnej. Niewątpliwe znaczenie dla etiologii raka płaskonabłonkowego jamy ustnej mają czynniki egzogenne. Ryzyko występowania raka płaskonabłonkowego jamy ustnej (OSCC – oral squamous cell carcinoma) zwiększają kancerogeny zawarte w dymie tytoniowym, alkohol, wirusy onkogenne oraz niewłaściwa higiena jamy ustnej. Nie wyklucza się również udziału endogennych czynników zwiększających prawdopodobieństwo rozwoju nowotworów, takich jak uwarunkowania genetyczne.

Wzrost liczby badań nad udziałem wirusów onkogennych w rozwoju nowotworów wskazuje, że wirusy stają się jednym z kluczowych czynników kancerogennych. Wśród najlepiej dotychczas zbadanych i opisanych wirusów mających udział w etiopatogenezie raka płaskonabłonkowego jamy ustnej znalazły się wirus Ebsteina-Barr, wirus brodawczaka ludzkiego (HPV) oraz herpes simplex.<sup>2,3</sup>

Jak dowodzą wyniki badań niebezpieczne zachowania seksualne zwiększają możliwość ekspozycji na wirusy. Wpływa to na obniżenie się wieku pacjentów dotkniętych rakiem płaskonabłonkowym. Coraz częściej obserwowana jest zachorowalność w przedziale wiekowym 20-44 lata, a nie jak dotychczas po 50 roku życia. Znajomość dróg rozprzestrzeniania się wirusów o charakterze onkogennym może mieć udział w szerzeniu oświaty dotyczącej negatywnych potencjalnie infekcyjnych zachowań.<sup>4</sup>

Dogłębne poznanie czynników ryzyka w rozwoju raka płaskonabłonkowego jamy ustnej pozwoli usprawnić diagnostykę oraz terapię w jego leczeniu. Stały rozwój nowoczesnych technik badawczych w wykrywaniu wirusów onkogennych wskazuje na ciągłą potrzebę dążenia w kierunku selekcji oraz możliwości eliminacji kancerogenów jakim są wirusy.<sup>1-4,8,10-16,18-20</sup>

## Cel pracy

Celem pracy była prezentacja wirusów onkogennych jako czynników etiologicznych w rozwoju raka płaskonabłonkowego w obrębie jamy ustnej, na podstawie piśmiennictwa z okresu listopad 2014 – styczeń 2018.

## Material i metody

Przeprowadzono przegląd piśmiennictwa z okresu listopad 2014 – styczeń 2018 wykorzystując bazę PubMed i używając słów kluczowych: rak płaskonabłonkowy w jamie ustnej, czynniki onkogenne w raku płaskonabłonkowym jamy ustnej, wirusy onkogenne, rola wirusa Ebsteina-Barr w rozwoju raka płaskonabłonkowego jamy ustnej, rola wirusa brodawczaka ludzkiego w rozwoju raka płaskonabłonkowego oraz squamous cell carcinoma of the oral cavity, oncogenic factors in oral squamous cell carcinoma, oncogenic viruses, role of Epstein-Barr virus in squamous cell carcinoma, role of human papillomavirus in squamous cell carcinoma. Badania uzupełniono o opracowania, które nie zostały ujęte w bazie Pub Med. Uwzględniono publikacje napisane w języku polskim oraz angielskim. Włączone zostały tylko oryginalne prace badawcze opisujące wyniki badań nad rolą wirusów onkogennych w powstawaniu raka płaskonabłonkowego jamy ustnej.

## Wyniki

Ocena publikacji zakwalifikowanych do przeglądu wykazała różnice między badanymi grupami, uniemożliwiając proste zsumowanie poszczególnych prac. Zakwalifikowano 16 prac opartych na badaniach retrospektywnych, spełniających określone kryteria doboru piśmiennictwa. Porównano prace uwzględniając następujące cechy prowadzonych badań: wielkość badanej grupy, rodzaj badanego wirusa,

Tabela 1. Ocena jednorodności włączonych badań

Autor	Rok	Wielkość badanej grupy oraz użyty materiał badawczy	Badany czynnik wirusowy	Inne czynniki ryzyka	Rodzaj metody badawczej
<i>Pauline MW</i> <sup>1</sup>	2015	164 OSCC 191 OPSCC (tkanki)	HPV typ 16	–	Multiplex ligation
<i>Petito G</i> <sup>2</sup>	2017	82 przypadki OSCC	HPV typ 16 HPV typ 18	tytoń (78%) alkohol (70%)	Detekcja DNA wirusa – PCR
<i>Bagan L</i> <sup>3</sup>	2016	Gr 1: 12 OSCC Gr2: 12 PMD Gr3: 47 kontrola	EBV	–	Detekcja DNA wirusa – real time PCR
<i>Dahlstrom KR</i> <sup>4</sup>	2015	91 próbek tkankowych	HPV, EBV HPV/EBV	tytoń, niebezpieczne zachowania seksualne	Hybrydyzacja in situ, PCR
<i>Shahrabi-Farahani</i> <sup>11</sup>	2018	94 przypadków	EBV	–	Nested – PCR
<i>Caves EA</i> <sup>10</sup>	2017	293 próbki komórkowe	EBV	–	Detekcja DNA wirusa – PCR
<i>Kerishnan JP</i> <sup>12</sup>	2016	206 próbek surowicy OSCC 134 gr. kontrolna	HPV typ 16	tytoń, alkohol, betel	Detekcja DNA wirusa – PCR
<i>Chen XJ</i> <sup>13</sup>	2016	40 próbek tkankowych z OSCC 59 próbek z PMD	HPV typ 16 HPV typ 18	–	Detekcja przeciwciał – test ELISA
<i>Dang J</i> <sup>14</sup>	2016	121 próbek z j.ustnej 100 próbek z cz.ustnej gardła	HPV typ 16	–	Detekcja DNA wirusa – real time PCR
<i>Wang Z</i> <sup>15</sup>	2016	188 próbek tkankowych z OSCC	HPV	tytoń, alkohol	Detekcja DNA wirusa – real time PCR

występowanie innych czynników kancerogennych, metodę detekcji wirusa. Celem porównania określonych cech było znalezienie wspólnego mianownika wyników badań. (tab. 1).

Wielkość badanych grup kształtowała się w sposób następujący: najliczniejszą grupę badawczą stanowiły badania *Dahlstrom* i wsp. oraz *Kristina* i wsp. odpowiednio na 365 przypadkach, najmniej liczne badania *Bagan* i wsp. dotyczyły grupy 71 przypadków. W dziewięciu pracach prowadzono

poszukiwania wirusa na próbkach tkanek pochodzących z raka płaskonabłonkowego jamy ustnej.<sup>1,3,12,13,15,16,18,20</sup> W dwóch pracach wykorzystano tkankę pochodzącą ze zmian potencjalnie złośliwych (PMD).<sup>3,13</sup> *Caves* i wsp. przeprowadzili badania na hodowlach tkankowych.<sup>11</sup> W piętnastu pracach posłużono się metodą detekcji wirusowego DNA, jaką jest reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR).<sup>2-4,8,9,11-16,18-20</sup> W czterech pracach poszukiwano również przeciwciał wirusowych za

Tabela 1. c.d.

Autor	Rok	Wielkość badanej grupy oraz użyty materiał badawczy	Badany czynnik wirusowy	Inne czynniki ryzyka	Rodzaj metody badawczej
<i>Kristina R</i> <sup>16</sup>	2015	365 próbek tkankowych z OSCC	HPV	tytoń, niebezpieczne zachowania seksualne	Hybrydyzacja in situ, PCR
<i>Chai RC</i> <sup>17</sup>	2016	82 próbki tkankowe z OSCC	HPV typ 16	–	Hybrydyzacja in situ, PCR
<i>Polz-Gruszka D</i> <sup>18</sup>	2015	62 próbki tkankowe w postaci bloczków parafinowych	HPV, EBV, HPV/EBV, BKV/HPV/EBV	tytoń, alkohol	Detekcja DNA wirusa – PCR
<i>Polz-Gruszka D</i> <sup>19</sup>	2015	80 próbek tkankowych z OSCC	HPV, EBV, HPV/EBV, HHV1, CMV	tytoń, alkohol	Detekcja DNA wirusa – real time PCR
<i>Polz-Dacewicz</i> <sup>20</sup>	2016	78 próbek tkankowych z OSCC	HPV, EBV, HPV/EBV	tytoń, alkohol	Detekcja DNA wirusa – real time PCR
		40 próbek tkankowych od zdrowych pacjentów			Detekcja DNA wirusa – PCR

Wykaz skrótów użytych w tabeli:

OSCC – oral squamous cell carcinoma – rak płaskonabłonkowy jamy ustnej,  
 OPSCC – oropharyngeal squamous cell carcinoma – rak płaskonabłonkowy jamy ustnej i gardła,  
 PMD – potentially malignant oral disorders – zmiany potencjalnie złośliwe,  
 PCR – polymerase chain reaction – reakcja łańcuchowa polimerazy,  
 HPV – human papilloma virus,  
 EBV – ebstein – barr virus,  
 BKV – BK virus – wirus BK (rodzaj *Polyomavirus*).

pomocą hybrydyzacji in situ.<sup>4,8,15,16</sup> W jednej z prac do detekcji przeciwciał użyto testu ELISA.<sup>12</sup> W dziewięciu pracach wykazano obecność innych czynników ryzyka rozwoju procesu nowotworowego.<sup>2,4,8,12,15,16,19,20</sup> We wszystkich dziewięciu pracach występowała współzależność palenia tytoniu, w sześciu pracach stwierdzono wśród pacjentów nadmierne spożycie alkoholu.<sup>2,12,15,19,20</sup> W trzech pracach zwrócono uwagę na niebezpieczne zachowania seksualne, w tym częstą zmianę

partnerów.<sup>4,8,16</sup> W jednym przypadku współwystępującym czynnikiem ryzyka było żucie betelu (tab. 1).<sup>12</sup>

W dziewięciu pracach prowadzono badania jedynie w kierunku detekcji HPV.<sup>1,2,4,12-16,18</sup> W trzech pracach badano wpływ infekcji EBV na rozwój raka płaskonabłonkowego jamy ustnej.<sup>3,10,11</sup> W czterech pracach badania prowadzono w kierunku zakażenia zarówno EBV, jak i HPV oraz badano wpływ koinfekcji tymi wirusami na rozwój nowotworu.<sup>8,18-20</sup> W jednej

z prac przedstawiono badania potwierdzające wpływ koinfekcji HPV, EBV oraz BKV na rozwój raka płaskonabłonkowego w obrębie jamy ustnej.<sup>18</sup> Jedna z czterech wymienionych prac wskazywała na możliwy kancerogeny wpływ wirusów HHV1 oraz CMV (Tab. 1).<sup>19</sup>

## Dyskusja

Badacze w dalszym ciągu poszukują czynników odpowiedzialnych za powstawanie raka płaskonabłonkowego jamy ustnej. Jak podkreśla *Bregman*, lekarz stomatolog wraz z całym zespołem powinien dokładać starań w niesieniu ratunku pacjentom, po pierwsze poprzez edukację społeczeństwa dotyczącą czynników ryzyka powstawania nowotworów, po drugie poprzez opracowanie nowoczesnych protokołów praktyki dentystycznej opierających się na wnikliwym badaniu klinicznym pacjenta oraz właściwej interpretacji danych z wywiadu, po trzecie poprzez pogłębianie wiedzy w zakresie nowych badań i technologii diagnostycznych.<sup>5</sup>

W dokonanym przeglądzie przedstawiono najnowsze doniesienia, skupiając się na roli czynników jakim są wirusy onkogenne. Analiza dostępnych danych potwierdziła, że coraz częstszą przyczyną rozwoju raka płaskonabłonkowego jamy ustnej, obok powszechnie poznanych czynników, takich jak: dym tytoniowy, alkohol, zaniedbania higieniczne oraz czynniki genetyczne, stała się niewątpliwie rola czynnika wirusowego, do których zalicza się między innymi: HPV, EBV, HHV1, CMV.

### *Wirus Ebsteina –Barr (EBV)*

Około 90-95% dorosłych na całym świecie ulega zakażeniu EBV, zwykle w dzieciństwie lub w okresie wczesnej młodości. Zakażenie u osób powyżej 10 roku życia w połowie przypadków daje objawy mononukleozy zakaźnej. Ekspozycja wirusa ma miejsce po kontakcie ze śliną, krwią i chłonką. Jama ustna stanowi główne wrota zakażenia.<sup>6</sup>

Wirus EBV po raz pierwszy został wyizolowany w 1964 roku przez Ebsteina i wsp. z hodowli komórek chłoniaka Burkitta. EBV jest dwuniciowym wirusem DNA, z rodziny *Herpes*. Wielkość DNA wirusa kształtuje się na ok 170kb i koduje on ok. 80 genów. Do replikacji wirusa wymagany jest antygen jądrowy 1 oznaczony jako EBV-1 (EBNA-1) oraz EBNA-2, a także antygen błonowy – 1 (LMP-1). Antygen jądrowy EBNA1 warunkuje nieśmiertelność zakażonych limfocytów B. Koduje fragmenty tripletów aminokwasów gly-gly-ala, blokujących degradację wirusa i następową prezentację antygenów wirusowych przez cząsteczki HLA klasy I limfocytom T cytotoksycznym.

Przy upośledzonej odporności może dochodzić do rozwoju chorób limfoproliferacyjnych. Jak podkreślają *Kikuchia* i wsp. sąsiedztwo jamy ustnej w okolicach pierścienia Waldeyera stanowi predylekcję do inwazji wirusa. Jest to związane z poznaną już skłonnością do infekcji EBV limfocytów B układu chłonnego głowy i szyi. W konsekwencji wykazano duże prawdopodobieństwo rozwoju nowotworów układu limfatycznego i śródbłonkowego w obrębie jamy ustnej po infekcji tym wirusem.<sup>7</sup>

*Jiang* i wsp. wykazali ponadto tropizm wirusa Ebsteina-Barr do komórek nabłonkowych. W badaniach podano, że większość zakażeń przebiegała bezobjawowo. Wcześniej rozpoznano potencjał nowotworowy wirusa, a także dowiedziono związek między infekcją wirusem EBV, a rozwojem nowotworów układu limfatycznego oraz nabłonkowego. Wykazano, że narażenie na infekcję EBV jest znacznie częstsze niż występowanie nowotworu złośliwego, stąd istotna okazała się identyfikacja biomarkerów, dzięki którym można potencjalnie przewidzieć, u których osobników narażonych na kontakt z wirusem może rozwinąć się nowotwór. Ma to kluczowe znaczenie dla prowadzenia odpowiedniej profilaktyki. Podatność komórek za zakażenie wirusem EBV jest ściśle

kontrolowana przez białka powierzchniowe. Pośredniczą w ataku wirusa i wywołują fuzję otoczki wirusa z błoną komórkową, ułatwiając penetrację nukleokapsydu do wnętrza komórki. Głównym receptorem, który umożliwia połączenie komórki z wirusem, jest receptor typu dopełniacza 2 lub CD21. Receptory występują na wszystkich dojrzałych komórkach B, przy czym ich występowanie na komórkach nabłonka *in vivo* jest rzadsze. Ekspresja CD21 na komórce nabłonka zwiększa znacznie łatwość infekcji.

Autorzy uznali, że ekspresja receptora CD21 może być biomarkerem podczas wykrywania EBV, jednakże w przypadku komórek nabłonkowych nie jest to biomarker wystarczająco silny.<sup>8</sup>

W celu lepszego poznania cyklu życiowego EBV Temple i wsp. przeprowadzili badania *in vitro* na komórkach nabłonka w organotypowych hodowlach, pozwalając komórkom na różnicowanie i stratyfikację, tak jak w warunkach *in vivo*. Wybór metody badawczej poparto stwierdzeniem, że nabłonek *in vivo* istnieje jako tkanka wielowarstwowa, co sugeruje, że hodowle organotypowe mogą służyć jako lepszy model do detekcji EBV w nabłonku, w porównaniu z kulturami monowarstwowymi. Wirus może występować w swym cyklu w formie litycznej lub latentnej. Zainfekowana komórka gospodarza może posłużyć do szybkiego namnażania wirusa i uwolnienia wirionów potomnych w przebiegu cyklu litycznego, czego skutkiem będzie śmierć zarażonej komórki. Podczas cyklu latentnego wirus może bytować w postaci utajonej, replikując się wraz z materiałem genetycznym gospodarza. Jako czuły sposób wykrywania wszystkich form ukrytej infekcji, wykorzystano hybrydyzację *in situ*. W badaniach wykazano, że EBV może infekować wielowarstwowy nabłonek *in vitro*, a zainfekowanie jednej komórki wywołuje w efekcie rozprzestrzenianie się wirusa w całej hodowli komórkowej. Wykryto również białka

EBNA1 i LMP1 w komórkach z aktywną infekcją. Chociaż oba białka są zwykle uważane za związane z formą utajoną, są one również obecne podczas aktywnej infekcji zarówno w limfocytach B, jak i w komórkach nabłonka.<sup>9</sup>

Caves i wsp. w swoich badaniach potwierdzili, że białko błonowe EBV-LMP1 jest onkogenne. Określono je jako białko sygnalizacyjne, obecne w cyklach utajonych i litycznych. Badania przeprowadzono na 293 hodowlach komórkowych nabłonka, które poddano zakażeniu wirusem. Wyniki badania potwierdziły obecność białka LMP1.<sup>10</sup>

Shahrabi-Farahani i wsp. przeprowadzili badania na grupie 94 pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym języka. Za pomocą reakcji PCR badano obecność genomu wirusa Ebsteina – Barr. DNA wirusa wykryto w 72,3% przypadków. Pacjenci byli podzieleni na różne grupy pod względem płci, wieku, zaangażowania węzłów oraz stopnia zaawansowania guza. Nie stwierdzono korelacji z wiekiem pacjentów, a występowaniem wirusa. Nie było również znaczącej różnicy w przypadku obu płci z nieznaczną przewagą występowania EBV w materiale badawczym pochodzącym od kobiet. Według autorów uzyskany wynik przemawia za rolą EBV w rozwoju raka płaskonabłonkowego w obrębie jamy ustnej. Autorzy zwracają także uwagę na różne typy wirusa. Wyodrębnione do tej pory dwa typy EBV: typ A oraz typ B (odpowiednio EBV1 i EBV2), genetycznie różnią się mało znacząco. Bardziej istotne różnice między tymi dwoma typami dotyczą lokalizacji geograficznej. Typ A występuje najpowszechniej w krajach Europy Zachodniej, powodując prawie 90% wszystkich zakażeń EBV. Natomiast typ B, to typ dominujący w rejonach Afryki równikowej.<sup>11</sup>

*Human papillomavirus (HPV) – wirus brodawczaka ludzkiego*

Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem uznała wirus brodawczaka ludzkiego

(HPV) za czynnik biologiczny rakotwórczy dla ludzi oraz odpowiedzialny za rozwój różnych nowotworów. HPV należy do rodziny Papillomaviridae. Jest to mały, kolisty, dwuniciowy wirus DNA otoczony ikozaedralnym kapsydem. Genom wirusa złożony jest z części ulegającej wczesnej oraz późnej transkrypcji. Wszystkie geny HPV znajdują się na jednej nici DNA i tylko ona jest aktywna transkrypcyjnie. Geny E1 i E2 odpowiadają za regulację replikacji i transkrypcji wirusowego DNA, natomiast geny E6 i E7 kodują onkoproteiny, mające zdolność do łączenia się z kluczowymi białkami cyklu komórkowego i zaburzenia ich funkcji przeciwnowotworowych.<sup>12</sup>

Wykryto około 200 różnych podtypów HPV. Poszczególne podtypy wirusa zostały określone jako podtypy niskiego lub wysokiego ryzyka, na podstawie ich obecności w zmianach nowotworowych.

Wyróżniono 20 podtypów, które uznano jako niosące największe ryzyko rozwoju raka płaskonabłonkowego. Należą do nich podtyp: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 i 68.

*Kerishnan* i wsp. przeprowadzili badania na 206 pacjentach z rakiem płaskonabłonkowym jamy ustnej oraz na 134 wycinkach pochodzących ze zdrowych tkanek (jako próbę kontrolną). Próbkę poddano analizie serologicznej w kierunku antygenów HPV16. 84 próbki z wycinkami raka płaskonabłonkowego poddano badaniu PCR w kierunku poszukiwań DNA wirusowego. Materiał pochodzący od pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym oraz materiał stanowiący próbę kontrolną, zbadano za pomocą testu ELISA, specyficznego dla HPV16. Za pomocą testu ELISA poszukiwano immunoglobuliny G (IgG) oraz immunoglobuliny M (IgM). Na podstawie powyższych testów wykazano, że 197 pacjentów z 206 z rakiem płaskonabłonkowym jamy ustnej oraz 89 pacjentów z 134 z próby kontrolnej posiadało w surowicy przeciwciała IgG przeciw HPV, podczas

gdzie tylko u 42 z 206 w surowicy wykryto przeciwciała IgM przeciw HPV. Wszystkie z 84 próbek poddanych badaniu PCR dały pozytywny wynik. Celem badań było wykazanie, że HPV należy do coraz powszechniejszych czynników ryzyka w rozwoju nowotworów, w tym szczególnie raków.<sup>12</sup>

*Chen* i wsp. przeprowadzili badania wykorzystując próbki tkanek i surowicy, pozyskane od 40 pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym jamy ustnej oraz 59 pacjentów ze zmianami potencjalnie złośliwymi. Posłużono się reakcją real-time PCR, aby wykryć gen E6 HPV16 i HPV18. Wykrycie onkogennych białek HPV wysokiego ryzyka (E6 i E7), potwierdziłoby ich udział w rozwoju nowotworu. W żadnym z badanych przypadków raka płaskonabłonkowego jamy ustnej oraz zmiany potencjalnie złośliwej w jamie ustnej, nie wykryto genu E6, co wykluczyło infekcję HPV16 i HPV 18.<sup>13</sup>

*Dang* i *Feng* poddały badaniu 121 próbek pochodzących z biopsji raka płaskonabłonkowego jamy ustnej oraz 100 próbek materiału pochodzącego z raka części ustnej gardła. Do detekcji DNA wirusowego użyto testu real – time PCR. Wśród pacjentów z rakiem jamy ustnej u 9% stwierdzono zakażenie HPV16, które było mniejsze niż u pacjentów z rakiem części ustnej gardła, gdzie 79% miało wynik dodatni dla HPV16. Badacze wykazali ponadto różnice między płcią badanych pacjentów. Stwierdzono siedem razy częstsze występowanie infekcji wirusem HPV u mężczyzn.<sup>14</sup>

*Wang* przeprowadził analizę 188 próbek stanowiących materiał pochodzący z raków jamy ustnej. Wykryto zakażenie wirusem brodawczaka ludzkiego (HPV), ekspresję genu p53 oraz mutację w genie TP53 w raku płaskonabłonkowym jamy ustnej. Badaczom zależało na określeniu użyteczności prognostycznej znalezionych czynników oraz poprawie możliwości terapeutycznych stosowanych u pacjentów zamieszkujących wschodnią część Chin. Obecność zakażenia HPV badano za pomocą



immunohistochemii i potwierdzono poprzez zastosowanie reakcji PCR oraz hybrydyzacji in situ. W 22 z 188 próbek potwierdzono związek z zakażeniem HPV. HPV16 było zidentyfikowane we wszystkich 22 próbkach, podczas gdy żadne próbki nie były dodatnie dla HPV18. Badane próbki były negatywne pod względem p53 i nie zawierały mutacji TP53.<sup>15</sup>

*Dahlstrom* i wsp. zbadali 365 pacjentów z histologicznie potwierdzonym rakiem płaskonabłonkowym jamy ustnej i gardła. Badania trwały w okresie od maja 1995 r. do kwietnia 2013 r. Ocenie poddano najczęstsze czynniki kancerogenne, w tym: infekcję HPV, palenie tytoniu, używanie alkoholu oraz niebezpieczne zachowania seksualne. Status HPV określono za pomocą badania immunohistochemicznego w kierunku ekspresji p16, hybrydyzacji in situ HPV i testu PCR. Opierając się o wyniki badań laboratoryjnych oraz dane pochodzące z kwestionariusza wykazano, że największą grupę z dodatnim wynikiem w kierunku HPV stanowili pacjenci z wyższym poziomem wykształcenia oraz o wyższym statusie socjoekonomicznym. Wyciągnięto wniosek, że pacjenci z rakiem płaskonabłonkowym jamy ustnej u których stwierdzono obecność HPV, posiadający wyższe wykształcenie i lepsze warunki socjoekonomiczne, mają częściej większą liczbę partnerów seksualnych. Powyższe dane autorzy uznali za ważny czynnik ryzyka infekcji HPV.<sup>16</sup>

*Chai* i wsp. wykazali w swoich badaniach istotę ekspresji genu p16 w komórkach nowotworowych zakażonych HPV. Materiał badawczy stanowiła ślina. Badaniu poddano próbki śliny pochodzące od 82 pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym w obrębie głowy i szyi, 42 pacjentów (co stanowiło 51,2% przypadków) zostało sklasyfikowanych jako pozytywnych w kierunku ekspresji białka p16, a 40 pacjentów (co stanowiło 48,8% przypadków) oznaczono jako ujemnych w kierunku ekspresji białka p16. Chcąc potwierdzić onkogenny wpływ wirusa HPV badacze poddali materiał analizie w

kierunku DNA wirusowego. Do detekcji wirusa wykorzystano reakcję PCR. Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że w 39 przypadkach z 42 badanych z nowotworem dodatnim w kierunku ekspresji p16 stwierdzono obecność DNA HPV, co stanowi 92,9% przypadków. Natomiast u 40 pacjentów z wynikiem ujemnym w kierunku p16, nie potwierdzono obecności DNA wirusa HPV, co dało wynik 100%.

Wykazano, że płyny ustrojowe, takie jak ślina, mogą służyć jako nieinwazyjna i opłacalna alternatywa dla biopsji, umożliwiając szybszą detekcję procesu nowotworowego, a przy tym złagodzenie jego następstw.<sup>17</sup>

#### *Koinfekcja EBV i HPV oraz współwystępowanie innych wirusów*

W coraz większym zakresie prowadzone są badania w kierunku oceny powiązań między koinfekcją onkogennymi wirusami. Zgodnie z definicją koinfekcję określa się jako jednoczesne zakażenie EBV i HPV stwarzające zwiększone ryzyko rozwoju choroby lub pogarszające jej przebieg kliniczny. Zaobserwowano częste współwystępowanie obu wymienionych wirusów w komórkach pochodzących z ogniska raka płaskonabłonkowego jamy ustnej. Naukowcy próbują znaleźć korelację między rozwojem raka płaskonabłonkowego a koinfekcją wirusami HPV i EBV.<sup>18</sup> Badacze poszukują również nowych rozwiązań diagnostycznych, które mogłyby usprawnić proces rozpoznania czynnika inicjującego onkogenezę w danym przypadku. Ważnym krokiem w tym kierunku było wykorzystanie śliny jako materiału badawczego.<sup>20</sup>

*Polz-Gruszka* i wsp. postawili za cel badania potwierdzenie hipotezy, że współzakażenie BKV, HPV i EBV odgrywa rolę w raku płaskonabłonkowym jamy ustnej i gardła. Poddano również analizie korelację pomiędzy występowaniem raka płaskonabłonkowego a infekcją wirusową, lokalizacją anatomiczną, stopniem zaawansowania nowotworu przed

leczeniem oraz występowaniem przerzutów do węzłów chłonnych. Zbadano materiał pobrany od 62 pacjentów i przechowywany w postaci bloków parafinowych. Uzyskano następujące wyniki: HPV występowało w 24,2% przypadków, EBV występowało w 27,4% przypadków, a BKV stwierdzono w 17,7% przypadków. Zaobserwowano koinfekcję EBV i BKV w 8% przypadków, HPV i BKV w 4,8%, a HPV i EBV w 9% przypadków. Tylko w dwóch przypadkach stwierdzono obecność wszystkich trzech wirusów. Badania nie potwierdziły jednoznacznie stawianej hipotezy, jednakże wskazały na potrzebę dalszych badań w tym kierunku oraz lepszego poznania współzależności między poszczególnymi czynnikami nowotworowymi.<sup>18</sup>

W innych badaniach *Polz-Gruszka* i wsp. poruszyli problem współwystępowania wirusów EBV i HPV oraz innych wirusów uznanych za potencjalnie onkogenne. Poddano analizie częstość występowania wirusa Epstein-Barr, wirusa opryszczki ludzkiej typu 1, wirusa cytomegalii i wirusa brodawczaka ludzkiego u pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym jamy ustnej w populacji polskiej. Badaniu poddano materiał w postaci świeżo zamrożonych fragmentów tkanki nowotworowej pobranych od 80 pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym jamy ustnej, za pomocą reakcji łańcuchowej polimerazy. HPV wykryto w 32,5% przypadków, EBV zidentyfikowano w 57,5% przypadków, HHV-1 w 7,5% przypadków, a CMV u 10% pacjentów. Koinfekcja jednym lub większą liczbą wirusów została stwierdzona w 30% przypadków, a najczęściej było to współwystępowanie EBV i HPV (15%).

W rezultacie przedstawiono wniosek, że dalsze badania są potrzebne w celu określenia roli EBV, HPV oraz możliwego znaczenia HHV-1 jako czynnika potencjalnie wywołującego raka płaskonabłonkowego jamy ustnej.<sup>19</sup>

*Polz-Dacewicz* i wsp. przeprowadzili badania na grupie 78 pacjentów z potwierdzonym

histopatologicznie rakiem płaskonabłonkowym jamy ustnej i gardła oraz 40 osobach zdrowych. Za pomocą testu ELISA zbadano stężenie IL-10, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  i VEGF w surowicy i ślinie u osób ze zmianą nowotworową oraz u osób zdrowych. DNA EBV wykrywano za pomocą reakcji PCR. Detekcję HPV przeprowadzono za pomocą testu INNO-LiPA HPV (Innogenetics N. V, Gent, Belgia). Poziom TNF- $\alpha$  był wyższy u pacjentów zakażonych EBV, podczas gdy TGF- $\beta$  był wyższy u pacjentów zakażonych HPV oraz jednocześnie HPV i EBV.

Stężenie IL-10 było wyższe w surowicy pacjentów zainfekowanych HPV i EBV, jak również przy koinfekcji HPV i EBV. Wyniki badań na obecność cytokin ślinowych, potwierdzają występowanie poszczególnych wirusów i mogą być pomocne we wczesnej diagnostyce, doborze odpowiednich metod terapeutycznych oraz stawianiu rokowania u pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym jamy ustnej.<sup>20</sup>

## Podsumowanie

Poszukiwania czynników etiologicznych w rozwoju procesu nowotworowego mają związek z wysoką zapadalnością na nowotwory, szczególnie w obrębie jamy ustnej. Poznanie czynników onkogennych jest kluczem do sukcesu diagnostycznego oraz terapeutycznego. Badacze dążą również do określenia możliwie najskuteczniejszej metody profilaktyki. W osiągnięciu powyższych celów nieodzowna jest dokładna znajomość czynników ryzyka, określenie ich patogenezy oraz możliwości eliminacji. Obiecujące wyniki badań z wykorzystaniem śliny jako materiału diagnostycznego otwierają nowe horyzonty w badaniach nad poszukiwaniem czynników onkogennych. Rzuca to nowe światło na pracę stomatologów i możliwość ich zaangażowania w proces detekcji nowotworu oraz czynników inicjujących onkogenezę.

## Piśmiennictwo

1. *Van Kempen PM, Noorlag R, Braunius WW, Moelans CB, Rifi W, Savola S, Koole R, Grolman W, van Es RJ, Willems SM*: Clinical relevance of copy number profiling in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Cancer Med* 2015; 4(10): 1525-1535.
2. *Petito G, Carneiro MA, Santos SH, Silva AM, Alencar RC, Gontijo AP, Saddi VA*: Human papillomavirus in oral cavity and oropharynx carcinomas in the central region of Brazil. *Braz J Otorhinolaryngol* 2017; 83(1): 38-44.
3. *Bagan L, Ocete-Monchon MD, Leopoldo-Rodado M, Murillo-Cortes J, Díaz-Fernández JM, Medina-Gonzalez R, Gimeno-Cardona C, Bagan JV*: Prevalence of salivary Epstein-Barr virus in potentially malignant oral disorders and oral squamous cell carcinoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2016; 21(2): e157-60.
4. *Dahlstrom KR, Bell D, Hanby D, Li G, Wang LE, Wei Q, Williams MD, Sturgis EM*: Socioeconomic characteristics of patients with oropharyngeal carcinoma according to tumor HPV status, patient smoking status, and sexual behavior. *Oral Oncol* 2015; 51(9): 832-838.
5. *Bregman JA*: The Oral Cancer Epidemic. *Today's FDA*. 2016; 28(2): 32-33, 35.
6. *Houldcroft CJ, Kellam P*: Host genetics of Epstein-Barr virus infection, latency and disease. *Rev Med Virol* 2015; 25: 71-84.
7. *Kikuchi K, Inoue H, Miyazaki Y, Ide F, Kojima M, Kusama K*: Epstein-Barr virus (EBV)-associated epithelial and non-epithelial lesions of the oral cavity. *Jpn Dent Sci Rev* 2017; 53(3): 95-109.
8. *Jiang R, Ekshyyan O, Moore-Medlin T, Rong X, Nathan S, Gu X, Abreo F, Rosenthal EL, Shi M, Guidry JT, Scott RS, Hutt-Fletcher LM, Nathan CA*: Association between HPV/EBV co-infection and oral carcinogenesis. *J Oral Pathol Med* 2015; 44(1): 28-36.
9. *Temple RM, Zhu J, Budgeon L, Christensen ND, Meyers C, Sample CE*: Efficient replication of Epstein-Barr virus in stratified epithelium in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; 111(46): 16544-9.
10. *Caves EA, Butch RM, Cook SA, Wasil LR, Chen C, Di YP, Lee N, Shair KHY*: Latent Membrane Protein 1 Is a Novel Determinant of Epstein-Barr Virus Genome Persistence and Reactivation. *mSphere* 2017; 2(6). pii: e00453-17.
11. *Shahrabi-Farahani M, Karimi E, Mostaan LV, Saba S, Yazdani N, M Amoli M*: Association between Epstein-Barr virus and tongue squamous cell carcinoma in Iranian patients. *Pathol Res Pract* 2018; 214(1): 130-133.
12. *Kerishnan JP, Gopinath SC, Kai SB, Tang TH, Ng HL, Rahman ZA, Hashim U, Chen Y*: Detection of Human Papillomavirus 16-Specific IgG and IgM Antibodies in Patient Sera: A Potential Indicator of Oral Squamous Cell Carcinoma Risk Factor. *Int J Med Sci* 2016; vol. 13.
13. *Chen XJ, Sun K and Jiang WW*: Absence of high-risk HPV 16 and 18 in Chinese patients with oral squamous cell carcinoma and oral potentially malignant disorders. *Chen et al. Virology J* 2016; 13: 81.
14. *Dang J, Feng Q*: HPV16 infection in oral cavity and oropharyngeal cancer patients. *J Oral Sci* 2016; 58(2): 265-269.
15. *Wang Z, Xia RH, Ye DX, Li J*: Human Papillomavirus 16 Infection and TP53 Mutation: Two Distinct Pathogeneses for Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma in an Eastern Chinese Population. *PLoS One* 2016; 11(10).
16. *Dahlstrom KR, Bell D, Hanby D, Li G, Wang LE, Wei Q, Williams MD, Sturgis EM*: Socioeconomic characteristics of patients with oropharyngeal carcinoma according to tumor HPV status, patient smoking status, and sexual behavior. *Oral Oncol* 2015; 51(9): 832-838.

17. Chai RC, Lim Y, Frazer IH, Wan Y, Perry C, Jones L, Lambie D, Punyadeera C: A pilot study to compare the detection of HPV-16 biomarkers in salivary oral rinses with tumour p16INK4a expression in head and neck squamous cell carcinoma patients. *BMC Cancer* 2016; 16: 178.
18. Polz-Gruszka D, Morshed K, Jarzyński A, Polz-Dacewicz M: Prevalence of Polyoma BK Virus (BKPyV), Epstein-Barr Virus (EBV) and Human Papilloma Virus (HPV) in Oropharyngeal Cancer. *Pol J Microbiol* 2015; 64(4): 323-328.
19. Polz-Gruszka D, Stec A, Dworzański J, Polz-Dacewicz M: EBV, HSV, CMV and HPV in laryngeal and oropharyngeal carcinoma in Polish patients. *Anticancer Res* 2015; 35(3).
20. Polz-Dacewicz M, Strycharz-Dudziak M, Dworzański J, Stec A, Kocot J: Salivary and serum IL-10, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , VEGF levels in oropharyngeal squamous cell carcinoma and correlation with HPV and EBV infections. *Infect Agent Cancer* 2016; 11: 45.

Zaakceptowano do druku: 28.06.2018 r.

Adres autora: 15-269 Białystok, ul. Waszyngtona 15A.

© Zarząd Główny PTS 2018.