

LARS SAND, leg tandläkare, odont dr, Käkkirurgiska kliniken, Akademiska sjukhuset, Uppsala

Tobaks- och alkoholvanor i relation till cancerutveckling i munhålan

🕒 Fredagen den 16 november 2001 försvarade legitimerade tandläkaren Lars Sand sin avhandling för odontologie doktorsexamen *"Human Papilloma Virus and Epstein-Barr Virus in Oral Tumours and Epithelial Lesions"* vid avdelningen för oral och maxillofacial kirurgi, Odontologiska fakulteten, Sahlgrenska akademien, Göteborgs universitet.

Fakultetsopponent var professor Lars Rymo, Göteborgs universitet.

Huvudhandledare under arbetet har varit professor Jan Hirsch, institutionen för kirurgiska vetenskaper, oral och maxillofacial kirurgi, Medicinska fakulteten, Uppsala universitet och biträdande handledare har varit docent Per-Anders Larsson, Kirurgiska kliniken, Ängelholms lasarett.

Syftet med avhandlingen var att, genom att studera förekomsten av HPV/EBV virus i orala premaligna och maligna lesioner samt att kartlägga tobaks- och alkoholvanor hos patienter, kunna se om det fanns något samband mellan dessa faktorer och cancerutveckling i munhålan.

AUTOREFERAT

Oral cancer utgör cirka 1–2 % av alla maligna tumörer i Sverige. Prevalensen är något högre hos män. I Sverige upptäcks omkring 600 nya fall av oral cancer årligen och cirka 250 patienter dör varje år till följd av oral cancer. Ungefär 90 % av all oral cancer utgörs av skivepitelcancer. Oral cancer anses ha en multifaktoriell etiologi, där konsumtion av tobak och alkohol anses utgöra de viktigaste riskfaktorerna. Storkonsumenter av tobak och alkohol har en nästan tiofaldigt ökad risk att drabbas av oral cancer. I olika delar av världen används oförbränd tobak, exempelvis *betel* i Indien, *toombak* i Sudan. I Sverige är det snuset som dominerar. Dessa produkter innehåller framför allt tobaksspecifika nitrosaminer som är cancerframkallande. Medan såväl *betel* som *toombak* har visat sig öka risken för oral cancer hos människa så har man endast djurexperimentellt kunnat påvisa denna effekt av det svenska snuset. Underläppen och tungan är de vanligaste lokaliseringarna som drabbas av oral cancer. Allmäntandläkare är den yrkeskategori som har störst möjlighet att upptäcka en oral cancer. Detta är mycket viktigt, eftersom prognosen är beroende av hur tidigt canceren upptäcks.

Enligt vissa beräkningar behövs det 7–10 förändringar av DNA i en cell för att cancer ska utvecklas och man räknar med att det finns cirka 100 så kallade målgener som kan drabbas. En av de viktigaste generna som är inblandad i oral cancer är den så kallade p53-genen. Denna gen är en tumörsuppressorgen vilket förenklat innebär att den fungerar som cellens ”bromspedal” om DNA blir skadat. p53 ser till att en cell med skadat DNA inte kan fortsätta att dela sig. Om däremot en mutation uppstår på p53-genen förlorar cellen sin förmåga att försvara sig mot DNA-skador. En muterad cell kan då fortsätta att dela sig oändligt och i värsta fall utvecklas till en cancercell.

Ibland ses en progression av enskilda epitelcellsförändringar (atypi) till en generaliserad förändring av skivepitetelet (dysplasi), därefter till cancer *in situ* och till slut invasiv skivepitelcancer. Detta förlopp ses i vissa så kallade premaligna förändringar. De vanligaste och viktigaste formerna av premaligna förändringar är leukoplakier och erosiv/atrofisk lichen planus.

Prevalensen av leukoplakier i Sverige är cirka 2–4 %, och risken för malign celltransformation bedöms till cirka 4 %. Utländska studier har dock visat att upp till 17 % av orala leukoplakier kan maligniseras.

Oral lichen planus (OLP) brukar av vissa författare indelas i retikulär, plaque, erosiv och atrofisk lichen planus. Huruvida OLP är premalign eller ej har debatterats under många decennier, men numera anses att de atrofiska och erosiva formerna

är premaligna. Prevalensen av OLP i Sverige är cirka 1,9 %. Man bedömer att omkring 0,4 % av dessa utvecklas till maligna förändringar. Vissa andra studier har visat att upp till 5,6 % av OLP utvecklas till cancer. Rökning, men även konsumtion av alkohol, har visat sig ha ett starkt samband med förekomsten av premaligna förändringar, framför allt leukoplakier.

Humant papillomvirus (HPV) är ett så kallat DNA-virus vilket betyder att det endast består av DNA och ett omgivande hölje. HPV är helt beroende av skivepitelceller som värdceller. HPV fungerar genom att det infekterar en skivepitelcell och låter sitt eget DNA integreras i skivepitelcellens DNA. Därefter ”luras” skivepitelcellen att tillverka de beståndsdelar som behövs för att tillverka nya papillomvirus. HPV kan alltså inte föröka sig självt utan använder värdcellen för detta ändamål. Oftast resulterar detta i benigna förändringar, där de vanligaste är vårtor på huden. I munhålan ger HPV upphov till benigna förändringar i form av papillom, condylom, verruca vulgaris (vårta) samt fokal epitelial hyperplasi (FEH). Under speciella omständigheter har HPV visat sig ge upphov till maligna förändringar. Framför allt i cervix har HPV en starkt cancerogen potential. Man har i tidigare studier även föreslagit ett samband mellan oral cancer och HPV.

Epstein-Barr virus (EBV) är i likhet med HPV ett DNA-virus men mycket större. EBV infekterar två typer av celler: epitelceller i oropharynx/nasopharynx samt B-lymfocyter. EBV kan inte heller leva utan värdcell och är beroende av framför allt B-lymfocyter för sin överlevnad. Även EBV utnyttjar värdcellens DNA för att tillverka nya EBV. Över 90 % av befolkningen har antikroppar mot EBV. EBV kan ge upphov till benigna sjukdomar som körtelfeber och hårig leukoplaki hos immunosupprimerade patienter, har också visats ge upphov till skivepitelcancer i nasopharynx samt till Burkitt's lymför, som är en B-lymfocyt cancer. Endast ett fåtal studier har undersökt sambandet mellan oral cancer och EBV.

Målsättning

Vår hypotes var att en kombination av virusinfektion och exponering av tobak och alkohol är faktorer som kan bidra till utvecklingen av orala tumörer och epiteliala lesioner. Genom att studera förekomsten av HPV/EBV i orala premaligna och maligna lesioner samt att kartlägga patienternas tobaks- och alkoholvanor ville vi se om det fanns något samband mellan dessa faktorer och cancerutveckling i munhålan. Patienterna fick själva uppge sina vanor som sedan klassificerades och konsumtionen bedömdes som låg, måttlig eller hög. Genom att ställa frågorna i ”rätt” ordning minskar man



FIGUR 1. Oral skivepitelcancer frontalt i maxillans omslagsveck. Denna patient hade ett mångårigt bruk av snus där appliceringen av "prillan" sammanföll med området där cancern uppstod.



FIGUR 2. Erosiv lichen planus i buckala slemhinnan på en 50-årig kvinna som rökte cirka 20 cigaretter/dag.



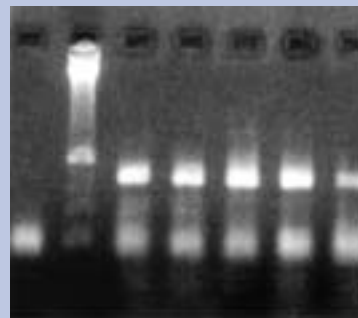
FIGUR 3. Leukoplaki på underläppen hos en 60-årig man som både rökte och snusade. Förändringen innehöll ingen dysplasi.



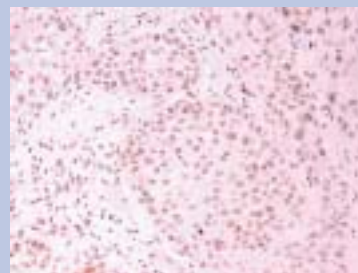
FIGUR 4. Homogen leukoplaki i munbotten. Denna lokalisation utgör högre risk för malign celltransformation.



FIGUR 5. Snusinducerad lesion hos en man med mångårigt bruk av lösförpackad snus. Dessa förändringar är reversibla om bruket upphör.



FIGUR 6. Gelelektrofores efter PCR-körning för detektion av EBV. Raderna 3-7 är positiva för EBV.



FIGUR 7. Immunohistokemisk färgning av biopsi från oral skivepitelcancer visar att ett protein från EBV finns i tumörcellerna och bekräftar PCR-resultatet i fig 2.

underskattningen av sina vanor, vilket annars är en stor risk framför allt vad gäller konsumtionen av alkohol.

Metoder

Som ett första steg i arbetet utvecklade vi en säker och snabb metod för att extrahera DNA från gamla

formalinfixerade paraffinbäddade biopsier [1]. Förekomsten av HPV och EBV studerades med polymerase chain reaction (PCR). PCR är en molekylärbiologisk metod där man med hjälp av så kallade primerpar kan upptäcka specifika DNA-kedjor som man vet är utmärkande för en särskild virustyp. Då detta känns igen kan man med speciella enzymer, så kallade Taq-polymeras, mångfaldiga det virusspecifika DNA-fragmentet. Man kan därefter på en gelelektrofores undersöka om det finns virus i biopsin eller inte. Metoden är mycket känslig och teoretiskt kan man upptäcka enstaka virus i en biopsi. Risken för falskt positiva svar är dock inte obetydlig varför vi ville bekräfta våra positiva PCR-svar. Tre patienter med oral cancer, sex med OLP, två med leukoplakier [2], och åtta med ameloblastom [3] var positiva för HPV med PCR. För att bekräfta dessa resultat gjordes analyser med Southern blot hybridisering och även då var dessa prov HPV-positiva.

I studien [5] var elva patienter med oral cancer och sex med OLP positiva med PCR. Dessa resultat kunde delvis bekräftas med immunohistokemisk färgning.

Patienter

Försöksgrupperna bestod av konsekutivt utvalda patienter med oral skivepitelcancer, oral lichen planus och orala leukoplakier [2, 5]. Vi studerade även patienter med snusinducerade lesioner [4]. Enstaka case-reports hade påvisat HPV i ameloblastom. För att studera detta närmare gjordes också en retrospektiv studie på preparat från intraosseösa ameloblastom [3]. Som kontroller användes i de olika studierna totalt 89 delvis åldersmatchade friska försökspersoner som remitterats för dentoalveolära besvär [2, 4, 5].

Resultat

Det fanns en ökad HPV-prevalens (20,8 %) hos patienterna med oral skivepitelcancer, oral lichen planus och orala leukoplakier. Konsumtionen av tobak och alkohol påverkade inte HPV-prevalensen [2]. Ingen av patienterna med snusinducerade lesioner var HPV-positiva. 41 % av ameloblastomen var HPV-positiva vid primära operationstillfället, men den siffran ökade till 67 % efter det kirurgiska ingreppet [3]. Kirurgiska ingrepp samt närheten till oralt epitel är sannolikt orsaken till att HPV har spridit sig från munhålan till ameloblastomen. HPV är troligen ingen etiologisk faktor till dessa tumörer.

16,3 % av de snusinducerade lesionerna var positiva för EBV, men det var inte någon statistiskt signifikant ökning jämfört med kontrollgruppen där 4,5 % var EBV-positiva [4]. Man såg däremot en statistiskt signifikant ökad EBV-prevalens i ora-

la skivepitelcancer (37,9 %) samt i oral lichen planus (26,1 %) jämfört med kontrollgruppen [5]. Immunohistokemi bekräftade att EBV fanns i tumörcellerna samt i epitelet i oral lichen planus. Man kunde inte finna någon skillnad i EBV-prevalens hos rökande kontrollpatienter jämfört med icke-rökande kontrollpatienter. Varken tobaksanvändning, alkoholkonsumtion eller ålder inverkar på EBV-prevalensen i denna studie [5].

Konklusion

Tidig upptäckt av maligna och premaligna förändringar är av mycket stor betydelse för terapi och prognos av oral cancer. Allmäntandläkaren har här en mycket viktig uppgift att upptäcka tidiga förändringar i munhålan. Förebyggande arbete vad gäller användning av såväl alkohol som olika former av tobak är också ett område där allmäntandläkaren kan göra en viktig insats.

De viktigaste slutsatserna var att varken konsumtion av snus eller alkohol och inte heller rökning ökar risken för HPV- eller EBV-infektion i orala skivepitelcancer, epiteliala lesioner eller i normal oral slemhinna. EBV är närvarande i ett stort antal skivepitelcancer samt i biopsier från oral lichen planus, och kan vara en etiologisk faktor i dessa lesioner. HPV-infektion verkar vara ett sekundärt fenomen i orala skivepitelcancer, tumörer och epiteliala lesioner och inträffar sannolikt i ett sent stadium av dessa lesioner.

Referenser

1. Jalouli J, Sand LP, Gustavsson B, Hirsch J-M, Larsson P-A. High-throughput DNA extraction from old paraffin-embedded biopsies. *Biotechniques* 1999; 27: 334–8.
2. Sand LP, Jalouli J, Larsson P-A, Hirsch J-M. Human papilloma viruses in oral lesions. *Anticancer Res* 2000; 20: 1183–8.
3. Sand LP, Jalouli J, Larsson P-A, Magnusson B, Hirsch J-M. Presence of human papilloma viruses in intraosseous ameloblastoma. *J Oral Maxillofac Surg* 2000; 58: 1129–34.
4. Sand LP, Wallström M, Jalouli J, Larsson P-A, Hirsch J-M. Epstein-Barr virus and human papillomavirus in snuff-induced lesions of the oral mucosa. *Acta Otolaryngol* 2000; 120: 880–4.
5. Sand LP, Jalouli J, Larsson P-A, Hirsch J-M. Prevalence of Epstein-Barr virus in oral squamous cell carcinoma, oral lichen planus and normal oral mucosa. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001; Accepted.

Adress:

Lars Sand, Käkkirurgiska kliniken,
Akademiska sjukhuset, 751 85 Uppsala
e-post: lars.sand@telia.com