



Andrejs Lifšics

Cilvēka papilomas vīrusa ietekme uz galvas un kakla vēzi: izplatības un prognostiskās nozīmes izpēte

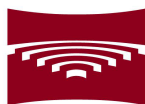
Promocijas darba kopsavilkums zinātnes doktora grāda
“zinātnes doktors (*Ph. D.*)” iegūšanai

Nozaru grupa – medicīnas un veselības zinātnes

Nozare – klīniskā medicīna

Apakšnozare – otorinolaringoloģija

Rīga, 2024



RĪGAS STRADIŅA
UNIVERSITĀTE

Andrejs Lifšics

ORCID 0000-0002-3546-5612

Cilvēka papilomas vīrusa ietekme
uz galvas un kakla vēzi: izplatības un
prognostiskās nozīmes izpēte

Promocijas darba kopsavilkums zinātnes doktora grāda
“zinātnes doktors (*Ph. D.*)” iegūšanai

Nozaru grupa – medicīnas un veselības zinātnes

Nozare – klīniskā medicīna

Apakšnozare – otorinolaringoloģija

Rīga, 2024

Promocijas darbs izstrādāts Rīgas Stradiņa universitātes Anatomijas un antropoloģijas institūtā, Mikrobioloģijas un virusoloģijas institūtā, Latvijā

Promocijas darba vadītāji:

Dr. habil. med. profesore **Valērija Groma**,
Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija

Dr. med. asociētā profesore **Modra Murovska**,
Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija

Oficiālie recenzenti:

Dr. med. profesore **Ingrīda Čēma**,
Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija

Dr. med. vet. profesors **Ilmārs Dūrītis**,
Latvijas Biozinātņu un tehnoloģiju universitāte

Dr. med. asociētais profesors **Justinas Ivaška**,
Viļņas Universitāte, Lietuva

Promocijas darbs tiks aizstāvēts Rīgas Stradiņa universitātes Klīniskās medicīnas promocijas padomes atklātā sēdē 2024. gada 24. aprīlī plkst. 14.00 attālināti tiešsaistes platformā *Zoom*.

Ar promocijas darbu var iepazīties RSU bibliotēkā un RSU tīmekļa vietnē:
<https://www.rsu.lv/promocijas-darbi>

Eiropas Sociālā fonda un Latvijas valsts budžeta projekta Nr. 8.2.2.0/20/1/004
“Atbalsts doktorantu iesaistei zinātniskajā pētniecībā un studijās” ietvaros
Rīgas Stradiņa universitātē.

Promocijas padomes sekretārs:

Dr. med. asociētais profesors **Artūrs Ozoliņš**

Satura rādītājs

Satura rādītājs.....	3
Darbā izmantotie saīsinājumi.....	5
Ievads.....	6
Darba mērķis.....	9
Darba uzdevumi.....	9
Darba hipotēzes.....	10
Darba novitāte.....	10
1. Materiāli.....	11
2. Metodes.....	12
2.1. Pirmā daļa. Pacientu ar OFPŠK izdzīvotības analīze atkarībā no histopatoloģiskās atrades, slimības stadijas, audzēja lieluma, kaitīgiem ieradumiem un saņemtās ārstēšanas.....	12
2.2. Otrā daļa. Prospektīvs pētījums ar 106 pacientiem ar GKPŠK.....	14
2.2.1. Pacientu raksturojums.....	14
2.2.2. Molekulārās bioloģijas metodes.....	16
2.2.3. Imūnhistoķīmiskā analīze.....	17
3. Statistiskā analīze.....	19
3.1. Pirmā daļa (retrospektīvā).....	19
3.2. Otrā daļa (prospektīvā).....	19
4. Rezultāti.....	20
4.1. Retrospektīvā 247 pacientu ar OFPŠK izdzīvotības analīze.....	20
4.2. Prospektīvās daļas pirmā publikācija.....	24
4.2.1. CPV genoma sekvenču noteikšana GKPŠK paraugos (FFPI audu blokos).....	24
4.2.2. Dažādu genotipēšanas metožu rezultātu salīdzinājums.....	24
4.3. Prospektīvās daļas otrā publikācija.....	25
4.3.1. CPV genoma sekvenču klātbūtne audzēju paraugos (HFPŠK un BPŠK).....	25
4.3.2. CPV genotipa noteikšana, izmantojot CPV16 un CPV18 L1 praimerus un <i>Anyplex II HPV28</i> reālā laika PQR.....	25
4.3.3. IHĶ noteikta p16 ekspresija.....	26
4.3.4. IHĶ noteikta CPV16 E6 un E7 onkoproteīnu ekspresija.....	27
4.4. Prospektīvās daļas trešā publikācija.....	29
4.4.1. CPV DNS un genotipi dažādos GKPŠK veidos.....	29
4.4.2. CPV16 E6/E7 mRNS CPV16 pozitīvos GKPŠK paraugos..	29
4.4.3. IHĶ noteikta p16 ekspresija GKPŠK paraugos.....	29

4.4.4.	IHĶ noteikta p53 ekspresija GKPŠK paraugos.....	30
4.4.5.	IHĶ noteikta CPV16 E6 un E7 onkoproteīnu ekspresija GKPŠK paraugos.....	30
4.4.6.	Kaplana-Mejera izdzīvotības analīze	31
4.4.7.	Daudzfaktoru <i>Cox</i> regresijas analīze	32
5.	Diskusija	34
5.1.	Zemākas T un N pakāpes, kaitīgu ieradumu neesamība un ķirurģiska ārstēšana saistīti ar labāku izdzīvotību un zemāku riska attiecību OFPŠK (retrospektīvajā pētījumā).....	34
5.2.	DNS izdalīšana no FFPI audu blokiem ir uzticama. Vēlams izmantot vairākus diagnostiskus PĶR testus (prospektīvās daļas pirmā publikācija).....	37
5.3.	CPV var būt nozīmīga loma ne-OFPŠK gadījumā (prospektīvās daļas otrā publikācija)	38
5.4.	CPV infekcija būtiski ietekmē gan OFPŠK pacientu, gan ar ne-OFPŠK pacientu izdzīvotību. AR-CPV E6 proteīna IHĶ noteikšana kalpo kā ērts prognostisks faktors GKPŠK (prospektīvās daļas trešā publikācija).....	41
	Secinājumi	46
	Publikācijas un ziņojumi par promocijas darba tēmu.....	47
	Literatūras saraksts.....	49
	Pielikumi.....	61
	1. pielikums	62
	2. pielikums	65

Darbā izmantotie saīsinājumi

AR	augsta riska
BPŠK	balsenes plakanšūnu karcinoma
CPV	cilvēka papilomas vīruss
FFPI	ar formalīnu fiksēti parafīnā ieguldīti
GKPŠK	galvas un kakla plakanšūnu karcinoma
HFPŠK	hipofaringeālā plakanšūnu karcinoma
IHK	imūnhistoķīmisks, -i, imūnhistoķīmija
KI	kopējā izdzīvotība
KPŠK	plakanšūnu karcinoma ar pārragošanos
ĶĀ	ķirurģiska ārstēšana
ĶT	ķīmijterapija
NKPŠK	plakanšūnu karcinoma bez pārragošanās
OFPŠK	orofaringeālā plakanšūnu karcinoma
PĶR	polimerāzes ķēdes reakcija
RT	radioterapija
SSI	slimības specifiskā izdzīvotība
ZR-	zema riska

Ievads

Plakanšūnu karcinoma ir visbiežāk sastopamais ļaundabīgais audzējs galvas un kakla rajonā (Sung et al., 2021). Galvas un kakla plakanšūnu karcinoma (GKPŠK) ir septītais izplatītākais vēzis pasaulē, katru gadu reģistrējot vairāk nekā 660 000 jaunus saslimšanas gadījumus un 325 000 nāves gadījumus (Gormley et al., 2022). Saskaņā ar GLOBOCAN datiem 2020. gadā tika reģistrēti 98 412 jauni orofaringeālās (OFPŠK), 98 412 jauni balsenes (LARCC) un 84 254 jauni hipofaringeālās plakanšūnu karcinomas (HFPŠK) gadījumi (Sung et al., 2021).

Tabakas smēķēšana un alkohola lietošana ir nozīmīgi sinerģiski riska faktori GKPŠK attīstībai (Kuper et al., 2002; Hashibe et al., 2009). Šo faktoru izraisītajos vēžu audos bieži vien ir novērojamas p53 gēna mutācijas, ietekmējot šūnu cikla regulēšanu (Carlos de Vicente et al., 2004). Iespējamās mutācijas arī p16 audzēja supresora gēnā, kā rezultātā p16 zaudē *CDK* inhibitora funkciju (Beck et al., 2017; Deneka et al., 2022). Parasti p16 saistās ar *CDK4/CDK6* kompleksu, nomācot *pRb*. Savukārt p16 funkcijas traucējumu rezultātā tiek traucēta šūnu cikla regulācija, izraisot nekontrolētu šūnu proliferāciju (Kotake et al., 2015; Senga & Grose, 2021). Neraugoties uz GKPŠK saslimstības vispārēju samazināšanos pēdējo 20 gadu laikā, ir novērots mutes dobuma un rīkles plakanšūnu karcinomu saslimstības pieaugums (Taylor et al., 2021; Kawakita et al., 2022).

Papildus šiem tradicionāliem riska faktoriem par atsevišķiem un neatkarīgiem GKPŠK riska faktoriem tiek uzskatīti arī augsta riska cilvēka papilomas vīrusa (AR-CPV) veidi, jo īpaši CPV16, kas ir īpaši saistīts ar OFPŠK. CPV var būt iesaistīts arī mutes dobuma plakanšūnu karcinomas patoģenēzē, bet vispēcīgākā ir saistība starp CPV un OFPŠK (Chaturvedi et al., 2011; Gillison et al., 2015).

Lai gan AR-CPV infekcija, jo īpaši CPV16, ir cieši saistīta ar OFPŠK attīstību un CPV izplatība šajos vēžos sasniedz pat 70 % (Schache et al., 2016; Timbang et al., 2019), AR-CPV loma citos galvas un kakla vēža paveidos, piemēram, BPŠK un HFPŠK, joprojām ir diskusiju objekts, jo šie vēži biežāk ir CPV negatīvi un salīdzinājumā ar OFPŠK tiek pētīti retāk.

CPV pozitīvs galvas un kakla vēzis būtiski atšķiras no CPV negatīva vēža molekulāro mehānismu, audzēja progresēšanas, epidemioloģijas un pacientu izdzīvotības ziņā. CPV klātbūtne, jo īpaši OFPŠK, kalpo kā prognostisks faktors, kuru saista ar samazinātu nāves un recidīvu risku (Mallen-St Clair et al., 2016). CPV ir cieši saistīts ar aukslēju mandeļu vēzi, mēreni saistīts ar citiem orofaringeāla vēža paveidiem un vāji saistīts ar mutes dobuma vēzi (Hobbs et al., 2006). CPV16 seropozitivitāte palielina OFPŠK attīstības risku gan smēķētājiem un alkohola lietotājiem, gan nesmēķētājiem un alkohola nelietotājiem (D'Souza et al., 2007). Tomēr attiecībā uz citiem GKPŠK veidiem nav noteikta galīga saistība starp CPV statusu un izdzīvotības rezultātiem (H. Wang et al., 2019; Wu et al., 2021; Sharkey Ochoa et al., 2022). CPV pozitīviem GKPŠK piemīt noteiktas molekulāras iezīmes, tostarp *wild-type* p53 degradācija, p53 gēna mutāciju neesamība, samazināta *pRb* ekspresija un attiecīgi palielināta p16 ekspresija. Šīs molekulārās atšķirības var palīdzēt atšķirt ar CPV saistītu vēzi, ieviest izmaiņas ārstēšanā un kalpot kā prognostiskie marķieri (Mallen-St Clair et al., 2016).

Vīrusu onkoproteīns E6, kas ir viens no galvenajiem faktoriem ar CPV saistītos vēžos, veicina p53 degradāciju, izmantojot ar E6 saistīto ubikvitīna ligāzi. Šāda šūnu cikla kontrolpunktu izjaukšana, izvairīšanās no apoptozes un p21 inaktivācija izraisa šūnu cikla apstāšanos G1 fāzē (Pal & Kundu, 2019; Johnson et al., 2020). Turpretī ar CPV nesaistītiem galvas un kakla vēžiem parasti novēro p53 gēna mutācijas, kas izraisa p53 funkcijas zudumu un veicina invāziju, metastazēšanos un vēža šūnu proliferāciju (Nathan et al., 2022).

Pētījumi liecina, ka pacientiem ar CPV pozitīviem GKPŠK ar samazinātu p53 ekspresiju (E6 izraisītas degradācijas dēļ) ir labvēlīgāka prognoze un labāka kopējā izdzīvotība (Smith et al., 2010).

Turpretī E7 spēcīgi saistās ar *pRb* un veicina tā degradāciju proteasomālā ceļā, kā rezultātā atbrīvojas *E2F* transkripcijas faktors un tiek stimulēta šūnu cikla progresēšana S fāzē (Boyer et al., 1996; Berezutskaya & Bagchi, 1997; Pal & Kundu, 2019). E7 mediētā *pRb* degradācija izraisa arī p16 augšup-regulāciju. P16 hiperekspresijas noteikšana kalpo par molekulāro pazīmi ar CPV saistītu OFPŠK identificēšanai un pozitīvi ietekmē pacientu izdzīvotību šajos gadījumos. Tomēr šī saistība nav stingri noteikta attiecībā uz neorofaringeāliem GKPŠK veidiem (Bishop et al., 2015; Du et al., 2019), pētījumos ziņojot vai nu par p16 ekspresijas trūkumu pat CPV mRNS klātbūtnē, vai arī par līdzīgu p16 ekspresijas līmeni neatkarīgi no CPV statusa (Castellsagué et al., 2016; Senga & Grose, 2021).

Tomēr vīrusu onkogēnu E6 un E7 ekspresija ir nepieciešama, bet ne pietiekama, lai attīstītos epitēlija displāzija un ar CPV saistītas karcinomas. Veicot dzemdes kakla vēža audu molekulāro analīzi, ir novērots, ka vīrusa genoms bieži integrējas saimnieka šūnu genomā (zur Hausen, 2000).

Lai secinātu vīrusa iesaistīšanos onkoģenēzē, ir nepieciešams noteikt tā transkripcijas aktivitāti (Snijders et al., 2003; Jung et al., 2010). Pie transkripcijas ziņā aktīviem CPV marķieriem parasti pieskaita p16 pārmērīgu ekspresiju, kā arī E6 un E7 proteīnu ekspresiju (Wiest et al., 2002; Jung et al., 2010; Kato et al., 2020).

Kopumā CPV pozitīvai GKPŠK ir labāka prognoze nekā CPV negatīvai GKPŠK. Vairāki pētījumi liecina, ka pacienti ar CPV pozitīvu OFPŠK labāk padodas ārstēšanai nekā pacienti ar CPV negatīvu OFPŠK (Kumar et al., 2007, 2008).

Latvijā pēdējā laikā p16 noteikšana OFPŠK ir kļuvusi par ierastu praksi. Tomēr CPV statusa noteikšana GKPŠK pacientiem nav standarta prakse, lai gan tā ir plaši izplatīta attīstītajās valstīs.

Darba mērķis

Šī pētījuma mērķis ir noskaidrot CPV infekcijas (CPV DNS un E6/E7 mRNS) prevalenci pacientiem ar OFPŠK, HFPŠK un BPŠK, kā arī tās nozīmi audzēja attīstībā un pacientu izdzīvotībā, papildus imūnhistoķīmiski (IHĶ) novērtējot audzēja supresoru proteīnu (p16 un p53) un AR-CPV E6 un E7 onkoproteīnu ekspresiju.

Darba uzdevumi

Lai sasniegtu promocijas darba mērķi, ir izvirzīti šādi uzdevumi:

1. Analizēt saistību starp anamnēzes datiem (pacienta dzimums un vecums, izdzīvotības dati), primārā audzēja atrašanās vietu, TNM datiem, kaitīgiem ieradumiem (smēķēšana un alkohola lietošana), morfoloģiskajiem un molekulārās virusoloģijas rezultātiem, lai izpētītu CPV lomu OFPŠK, HFPŠK un BPŠK attīstībā, kā arī to ietekmi uz izdzīvotību.
2. Noteikt CPV DNS (zema riska (ZR-) un AR-) klātbūtni GKPŠK audos, izmantojot PĶR ar konsensa praimeriem.
3. Noteikt AR-CPV DNS (īpaši CPV16, 18) klātbūtni CPV+ GKPŠK.
4. Noteikt AR-CPV transkripcijas aktivitāti AR-CPV+ GKPŠK, nosakot E6/E7 mRNS.
5. Analizēt audzēja supresoru proteīnu p16 un p53, kā arī AR-CPV E6/E7 onkoproteīnu IHĶ ekspresiju audzēju audos no pacientiem ar histoloģiski apstiprinātu OFPŠK, HFPŠK un BPŠK.

Darba hipotēzes

1. CPV infekcijai ir nozīme OFPŠK, HFPŠK un BPŠK attīstībā.
2. CPV statuss pacientiem ar OFPŠK, HFPŠK un BPŠK ir neatkarīgs prognostisks faktors.
3. p16, p53, AR-CPV E6/E7 onkoproteīniem ir prognostiska nozīme, un tie ietekmē izdzīvotību.
4. Pastāv saistība starp p16, p53, CPV statusu (CPV DNS, E6/E7 mRNS, AR-CPV E6/E7 onkoproteīna imunoekspressija) un izdzīvotību pacientiem ar OFPŠK, HFPŠK un BPŠK.

Darba novitāte

Šī pētījuma novitāte ir CPV lomas izpēte BPŠK un HFPŠK etiopatogēnēzē. Lai gan CPV loma OFPŠK ir labi zināma, joprojām pastāv ievērojamas neskaidrības par tā saistību ar BPŠK un HFPŠK. Izmantojot daudzpusīgas molekulārās un imūnhistokīmiskās analīzes, šis pētījums apstiprina CPV iesaisti BPŠK un HFPŠK attīstībā, izgaismojot līdz šim novārtā atstātu ar CPV saistīto vēža veidu aspektu.

Šī pētījuma būtiskākā daļa ir AR-CPV E6/E7 onkoproteīnu imūnhistokīmiskās noteikšanas efektivitātes pierādīšana un to izmantošana prognostiskos nolūkos, īpaši neorofaringeālu vēžu gadījumos. Imūnhistokīmijas izmantošana kļūst par vērtīgu līdzekli šo vēža veidu prognozes novērtēšanai, būtiski uzlabojot mūsu izpratni par CPV lomu BPŠK un HFPŠK karcinoģenēzē. Visbeidzot, šis pētījums ir novatorisks ieguldījums, jo paplašina mūsu izpratni par ar CPV saistīto GKPŠK attīstību. Iegūtie rezultāti ir daudzsoļi, jo izmantojami BPŠK un HFPŠK diagnostikas, prognozes un, iespējams, ārstēšanas stratēģiju pilnveidošanai.

1. Materiāli

Pētījums sastāvēja no divām daļām – retrospektīvās un prospektīvās.

Retrospektīvais pētījums tika veikts Rīgas Austrumu klīniskās universitātes slimnīcas Latvijas Onkoloģijas centrā; tajā tika iekļauti 247 pacienti ar diagnosticētu OFPŠK, kas tika klasificēti saskaņā ar Starptautiskās Pretvēža savienības izstrādāto ļaundabīgo audzēju TNM klasifikāciju (6. izdevums). Pētījuma periods bija no 2000. gada 1. janvāra līdz 2010. gada 31. decembrim. Pacientu dati tika iegūti no slimnīcas arhīva un Slimību profilakses un kontroles centra. Apkopoti šādi dati: vai pacients ir dzīvs vai miris, nāves datums (ja attiecināms), vecums diagnozes noteikšanas brīdī, dzimums, TNM statuss, slimības stadija, kaitīgie ieradumi, ārstēšanas veids, primārā audzēja atrašanās vieta un audzēja histopatoloģiskais variants.

Otrajā daļā tika veikta 106 pacientu ar histoloģiski diagnosticētu GKPŠK kompleksa analīze. Pacientu uzņemšanas periods bija no 2015. gada janvāra līdz 2019. gada augustam. Pētījums tika veikts, apkopojot pacientu klīniskos datus un veicot savākto audzēja paraugu IHĶ un molekulāro analīzi. Pētījumā tika izmantotas vairākas morfoloģiskās metodes – IHĶ un imūnfluorescences metode. Papildus tika izmantotas dažādas molekulārās bioloģijas metodes. Pētījums tika veikts Rīgas Austrumu klīniskās universitātes slimnīcas Latvijas Onkoloģijas centrā. Papildus svaigiem audzēju paraugiem (iegūti operāciju un biopsiju laikā) tika iegūti formalīnā fiksēti un parafinā ieguldīti audzēja audu bloki (FFPI) kopā ar patohistoloģiskās izmeklēšanas slēdzieniem Rīgas Austrumu klīniskās universitātes slimnīcas Patoloģijas centrā. Visi morfoloģiskie pētījumi tika veikti Anatomijas un antropoloģijas institūta Apvienotajā elektronu mikroskopijas laboratorijā. Molekulāri bioloģiskie pētījumi veikti Rīgas Stradiņa universitātes Mikrobioloģijas un virusoloģijas institūtā.

2. Metodes

2.1. Pirmā daļa. Pacientu ar OFPŠK izdzīvotības analīze atkarībā no histopatoloģiskās atrades, slimības stadijas, audzēja lieluma, kaitīgiem ieradumiem un saņemtās ārstēšanas

Pētījums aprakstīts manuskriptā “Lifsics, A., Rate, E., Ivanova, A., Tars, J., Murovska, M., and Groma, V. (2020). Survival analysis of oropharyngeal squamous cell carcinoma patients linked to histopathology, disease stage, tumor stage, risk factors, and received therapy. *Experimental oncology*. 42(1), 51–59. <https://doi.org/10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-42-no-1.14147>”.

Retrospektīvajā pētījumā tika iekļauti 247 pacienti ar histoloģiski apstiprinātu OFPŠK. Iegūtie dati tika analizēti, lai noteiktu visu pacientu kopējo un slimībai specifisko trīs un piecu gadu izdzīvotību (*Kaplan-Meier* analīze) un analizēto faktoru riska attiecības (*Cox* regresija), lai noteiktu būtiskos faktorus, kas ietekmē pacientu izdzīvotību. Pacientu raksturojums ir apkopots 2.1. tabulā.

OFPŠK FFPI paraugi tika iegūti no Latvijas Onkoloģijas centra Patoloģijas nodaļas arhīva. Tika pārskatīti visu audzēju patohistoloģiskās izmeklēšanas slēdzieni, kā arī veikta hematoksilīnu un eozīnu iekrāsoto paraugu patstāvīga mikroskopiska analīze. Audzēji tika klasificēti, pamatojoties uz to histoloģiskajām pazīmēm. Tomēr jāatzīmē, ka šī retrospektīvā pētījuma sākumposmā daži faktori, piemēram, invāzijas modelis audzēja malā, perineirālās invāzijas klātbūtne un imūnsistēmas atbildes reakcija, ko ierosināja *Brandwein* un līdzautori (*Brandwein-Gensler et al., 2005*) un vēlāk apsprieda citi pētnieki (*Duvvuri et al., 2014*), tika novērtēti par zemu. Līdz ar to histopatoloģiskajā novērtējumā netika ņemta vērā ķirurģisko malu pārskatīšana un blakusaudu novērtējums. Mikrofotogrāfijas tika uzņemtas, izmantojot *Leitz* DMRB spilgtā lauka optiku, kas aprīkota ar digitālo kameru DC 300F.

Pacientu raksturojums

Dzimums – n (%):	
• vīriešu	227 (91,90)
• sievietes	20 (8,10)
Vecums (gados):	
• vidējais (SD)	60 (8,985)
• diapazons	27–85
Slimības stadija – n (%)*:	
• I	3 (1,22)
• II	19 (7,72)
• III	61 (24,80)
• IV	163 (66,26)
T pakāpe – n (%)**:	
• T1	23 (9,39)
• T2	59 (24,08)
• T3	73 (29,80)
• T4	90 (36,73)
N pakāpe – n (%)*:	
• N0	77 (31,0)
• N1	54 (21,95)
• N2	82 (33,33)
• N3	30 (12,20)
• Nx	3 (1,22)
Alkohola lietošana – n (%)***:	
• jā	82 (35,19)
• nē	151 (64,81)
Smēķēšana – n (%)****:	
• jā	180 (75,95)
• nē	57 (24,05)
Alkohols un smēķēšana – n (%):	
	73 (31,47)

* Nav zināma 1 pacientam.

** Nav zināma 2 pacientiem.

*** Nav zināma 14 pacientiem.

**** Nav zināma 10 pacientiem.

2.2. Otrā daļa. Prospektīvs pētījums ar 106 pacientiem ar GKPŠK

Šīs daļas rezultāti ir publicēti trijos manuskriptos:

1. “Lifšics, A., Čistjakovs, M., Groma, V. & Murovska, M. (2021). Detection and Genotyping of Human Papillomavirus in Hypopharyngeal Carcinoma Samples. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B. Natural, Exact, and Applied Sciences*. 75(1), 11–15. <https://doi.org/10.2478/prolas-2021-0002>”;
2. “Lifšics, A., Groma, V., Cistjakovs, M., Skuja, S., Deksnis, R. & Murovska, M. (2021). Identification of High-Risk Human Papillomavirus DNA, p16, and E6/E7 Oncoproteins in Laryngeal and Hypopharyngeal Squamous Cell Carcinomas. *Viruses*. 13(6), 1008. <https://doi.org/10.3390/v13061008>”;
3. “Lifšics, A., Cistjakovs, M., Sokolovska, L., Deksnis, R., Murovska, M. & Groma, V. (2023). The Role of the p16 and p53 Tumor Suppressor Proteins and Viral HPV16 E6 and E7 Oncoproteins in the Assessment of Survival in Patients with Head and Neck Cancers Associated with Human Papillomavirus Infections. *Cancers*. 15(10), 2722. <https://doi.org/10.3390/cancers15102722>”.

Pētījums tika apstiprināts Rīgas Stradiņa universitātes Ētikas komitejā (Lēmums Nr. 3/24.09.2015.) un veikts saskaņā ar Helsinku deklarāciju.

2.2.1. Pacientu raksturojums

Katram pacientam tika novērtēts dzimums, vecums, TNMG statuss, smēķēšanas un alkohola lietošanas paradumi, kā arī ārstēšanas veids. Dati par to, vai pacients dzīvs vai miris, tika iegūti no Slimību profilakses un kontroles centra 2022. gada 1. janvārī. Kopumā 34 no 106 pacientiem bija OFPŠK, 41 pacientam bija BPŠK un 31 pacientam bija HFPŠK. Pacientu dati apkopoti 2.2. tabulā.

Pacientu raksturojums

	Gadījumi (n = 106)		
	OFPŠK (n = 34)	BPŠK (n = 41)	HFPŠK (n = 31)
Dzimums:			
• vīriešu	27	39	29
• sievieti	7	2	2
Vecums (mediāna)	58,5	64,3	65,9
T pakāpe:			
• T1	6	4	0
• T2	6	8	4
• T3	6	24	16
• T4	16	5	11
N pakāpe:			
• 0	1	35	6
• 1	15	4	16
• 2	12	2	8
• 3	6	0	1
M pakāpe:			
• 0	34	40	27
• 1	0	1	4
G pakāpe *:			
• 1	5	5	6
• 2	21	34	21
• 3	7	2	4
Kaitīgie ieradumi:			
• nav	9	4	3
• smēķēšana	8	29	20
• smēķēšana un alkohola lietošana	17	8	8
Ārstēšana ^:			
• RT	16	1	21
• KĀ	0	9	0
• RT+KĀ	2	29	4
• RT+KT (Cetuksimab)+/-KĀ	10	0	0
• Simptomātisks	6	1	6

* Vienam pacientam OFPŠK grupā trūka datu. Vienam pacientam BPŠK grupā trūka datu. RT – staru terapija, KĀ – ķirurģiska ārstēšana, KT – ķīmijterapija.

2.2.2. Molekulārās bioloģijas metodes

DNS ekstrakcija no svaigi sasaldēta audu materiāla tika veikta, izmantojot standarta fenola/hloroforma ekstrakcijas metodi. DNS ekstrakcija no FFPI tika veikta, izmantojot *blackPREP FFPE DNA Kit (Analytik Jena, Vācija)*, ievērojot ražotāja protokolu.

RNS ekstrakcija tika veikta tikai no tiem paraugiem, kuros konstatēta AR-CPV DNS. Svaigi sasaldētiem audu paraugiem tika izmantota standarta RNS ekstrakcija ar *TRIzol LS* reaģentu no *Thermo Fisher Scientific* saskaņā ar ražotāja protokolu. RNS ekstrakcijai no FFPI vēža paraugiem tika izmantots *PureLink FFPE Total RNA Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific, ASV)*, ievērojot ražotāja protokolu.

Visi iegūtie DNS paraugi tika izmeklēti ar PĶR, izmantojot konsensa praimerus MY9/MY11 un GP5+/6+, lai noteiktu plašu AR-CPV un ZR-CPV tipu klāstu. Rezultāti tika vizualizēti ar elektroforēzi 1,7 % agarozes gelā. Par CPV pozitīviem tika uzskatīti 450 bp un 150 bp gari amplifikācijas produkti attiecīgi MY09/11 un GP5+/6+ gadījumā. Katrā reakcijā tika iekļauta pozitīvā un negatīvā kontrole.

Tika veiktas arī PĶR, izmantojot CPV16 un 18. tipam specifiskos praimerus. PĶR, izmantojot CPV16 specifiskos praimerus, tika iegūti 152 bp gari amplikoni, bet, izmantojot CPV18 specifiskos praimerus, – 216 bp gari amplikoni. Visi pieejamie paraugi tika analizēti, izmantojot šos praimerus.

Anplex II HPV28 multiplex reālā laika PĶR tika veikta saskaņā ar ražotāja ieteikumiem (*Seegene, Dienvidkoreja*). Rezultāti tika analizēti, izmantojot *Seegene Viewer* programmatūru (*Seegene, Seula, Korejas Republika*). Ar šo komplektu tika analizēti tikai tie paraugi, kas bija pozitīvi PĶR ar konsensa vai ar CPV16/18 L1 praimeriem.

HPV High-Risk Screen Real-TM Quant (Sacace Biotechnologies, Itālija) ir *in vitro* reālā laika amplifikācijas tests 16., 18., 31., 33., 35., 39., 45., 51., 52.,

56., 58., 59. CPV tipu kvantitatīvai noteikšanai. Tas ietver praimeru maisījumu, kas paredzēts CPV A7, A9 grupai (CPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 58, 59), CPV A5 grupai (CPV51) un CPV A6 grupai (CPV56), un tam ir iekšējā kontrole (β -globīna gēns). Tika analizēti tikai tie paraugi, kas bija pozitīvi PĶR ar konsensa vai ar CPV16/18 L1 praimeriem.

E6/E7 mRNS tika noteikta reālā laika PĶR, izmantojot *PreTect HPV-Proofer* komplektu. Šī pārbaude ļāva kvalitatīvi identificēt AR-CPV E6/E7 onkogēnu mRNS, tostarp CPV16, 18, 31, 33 un 45. E6/E7 mRNS noteikšanai tika izmantoti tikai AR-CPV DNS pozitīvi paraugi.

2.2.3. Imūnhistoķīmiskā analīze

FFPI paraugi tika izmantoti IHĶ analīzei. CPV16 E6/E7 proteīnu, p53 un p16 proteīnu IHĶ reakcijas paraugos tika veiktas saskaņā ar iepriekš apstiprinātu protokolu (Skuja et al., 2018; Zake et al., 2018).

Īsumā, 4–5 μ m biezi FFPI audzēju griezumi tika uzlikti uz *SuperFrost Plus* priekšmetstikliņiem (*Gerhard Menzel GmbH*, Braunšveiga, Vācija) un tiem veikta standarta sagatavošanas procedūra. Pēc tam tos inkubēja uz nakti 4 °C temperatūrā ar specifiskām primārajām antivielām. Tika izmantota monoklonālā peles antiViela pret CDKN2A/p16^{INK4a} (*Abcam*, Kembridža, Apvienotā Karaliste, atšķaidīta 1:300, ab201980), monoklonālā peles antiViela pret p53 (*Santa Cruz Biotechnology, Inc.*, Dalasa, Teksasas štats, ASV, atšķaidīta 1:50, sc-47698), monoklonālā peles antiViela pret CPV16 E6 + CPV18 E6 (*Abcam*, Kembridža, Apvienotā Karaliste, iepriekš atšķaidīta, ab51931) un monoklonālā peles antiViela pret CPV16 E7 (*Santa Cruz Biotechnology, Inc.*, atšķaidīta 1:50, sc-6981). IHĶ reakciju vizualizācijai tika izmantota *HiDef Detection HRP* polimēru sistēma un diamīnobenziDīna tetrahidrohlorīda substrāta komplekts (*Cell Marque*, Roklina, Kalifornijas štats, ASV). Tika veikta

šūnu kodolu pretkrāsošana ar *Mayer* hematoksilīnu. Katrā reakcijā tika iekļauta negatīva kontrole, nepievienojot primāro antivielu.

Par pozitīvu imūnreaktivitāti liecināja brūni reakcijas produkti. p53 un CPV16 E7 proteīnu gadījumā bija kodolu krāsojums, bet p16 proteīna un CPV16 E6 proteīna gadījumā – kodola un citoplazmas krāsojums. p16 hiperekspressija tika definēta kā p16 imūnpozitivitāte > 50 % audzēja šūnu. p53 imūnpozitivitātes novērtēšanu veica puskvantitatīvi. p53 hiperekspressija tika definēta kā p53 imūnpozitivitāte > 50 % audzēja šūnu ar intensitāti = 2 vai > 25 % audzēja šūnu ar intensitāti = 3. Paraugus, kas neatbilda šiem kritērijiem, uzskatīja par p53 negatīviem (p53–).

E6 un E7 proteīnu IHĶ noteikšana tika veikta tikai AR-CPV DNS pozitīvajos paraugos (visi paraugi bija CPV16 DNS pozitīvi). E6 un E7 proteīnu ekspresijas puskvantitatīva novērtēšana tika veikta katra parauga 20 nejauši izvēlētos redzes laukos. Novērtēšanai tika izmantoti divi interpretācijas veidi:

- Atkarībā no imūnpozitīvo šūnu īpatsvara E6 un E7 imūnekspressijas līmenis tika klasificēts attiecīgi kā negatīvs – 0, vājš – $\leq 10\%$, mērens – 11–50 % un spēcīgs – $> 50\%$ (publikācija *MDPI Viruses*).
- E6 un E7 imūnekspressijas līmenis tika novērtēts kā negatīvs, ja tika konstatēts $< 10\%$ imūnpozitīvu šūnu, un pozitīvs, ja tika konstatēts $\geq 10\%$ imūnpozitīvu šūnu (publikācija *MDPI Cancers*).

3. Statistiskā analīze

3.1. Pirmā daļa (retrospektīvā)

Statistiskā analīze tika veikta, izmantojot IBM SPSS, lai novērtētu saistību starp analizējamiem rādītājiem un izdzīvotību, kā arī vidējo kopējo dzīvildzes laiku pēc diagnozes noteikšanas. Atkarībā no grupas lieluma atšķirības starp grupām tika novērtētas, izmantojot Pīrsona hī kvadrāta testu vai Fišera tiešo testu, ar nozīmīguma līmeni $p < 0,05$. Lai noteiktu saistību starp nomināliem datiem, tika noteikti Krāmēra V rādītāji. Lai salīdzinātu dzīvildzes vidējos laikus atkarībā no dažādiem nominālajiem rādītājiem, tika izmantots Manna-Vitnija vai Kruskala-Valisa tests. Kaplana-Meijera izdzīvotības analīzē novērtēja 3 un 5 gadu kopējo izdzīvotību (KI) un slimībai specifisko izdzīvotību (SSI), izmantojot Logranka testu, lai salīdzinātas grupas, ņemot vērā visus laika punktus vienkopus ($p < 0,05$ tika uzskatīts par statistiski nozīmīgu). Riska attiecības tika aprēķinātas, izmantojot Koksas regresijas metodi.

3.2. Otrā daļa (prospektīvā)

Statistiskā analīze, izmantojot *GraphPad Prism*, ietvēra normalitātes testus skaitlisko datu sadalījuma noteikšanai, vienvirziena ANOVA salīdzināja vidējos rādītājus starp grupām, Kruskala-Valisa vai Frīdmena testu izmantoja neparametrisko datu gadījumā. Manna-Vitnija tests vai Vilkoksona tests tika izmantots, lai salīdzinātu skaitliskās vērtības starp divām grupām. Neparametriskā Spīrmena korelācijas analīze izvērtēja sakarības starp analizējamām grupām. Statistiskā nozīmība tika noteikta kā $p < 0,05$.

Seegene rezultāti tika puskvantitatīvi novērtēti un kodēti, bet *Sacace* testa vīrusa slodze tika \log_{10} transformēta statistiskajai analīzei. Koena κ tests novērtēja saskaņu starp CPV noteikšanas metodēm. Ar Kaplana-Meijera metodi tika veikta vienfaktora izdzīvotības analīze attiecībā uz KI un SSI, bet ar Koksas regresijas metodi tika veikta daudzfaktoru izdzīvotības analīze. Statistiskā nozīmība tika noteikta kā $p < 0,05$.

4. Rezultāti

4.1. Retrospektīvā 247 pacientu ar OFPŠK izdzīvotības analīze

Retrospektīvajā kohortas pētījumā tika pētīti 247 pacienti ar histoloģiski apstiprinātu OFPŠK dažādās stadijās. Kohortā iekļautiem pacientiem primārā audzēja lokalizācija bija aukslēju mandeles ($n = 110, 44,52\%$), mēles pamatne ($n = 76, 30,77\%$), mīkstās aukslējas ($n = 20, 8,10\%$) un rīkles mugurējā siena ($n = 41, 16,60\%$). Lielākajai daļai pacientu bija slimības vēlīnās stadijas. Lielākā daļa pacientu bija vīrieši ($n = 227, 91,90\%$), vidējais vecums 60,20 gadi.

Sieviešu dzimtes pacientiem bija ievērojami ilgāks vidējais dzīvildzes laiks nekā vīriešiem. Tomēr nebija korelācijas starp izdzīvotības ilgumu un dzimumu, un KI atšķirība starp dzimumiem nebija statistiski nozīmīga. SSI sievietēm bija ievērojami labāks nekā vīriešiem. Pacienti tika iedalīti arī trijās vecumgrupās (< 55 gadi, $55-64$ gadi un > 65 gadi). Lai gan vecākajā apakšgrupā bija ievērojami vairāk mirušo pacientu, korelācija starp vecumgrupu un izdzīvotības ilgumu netika novērota. Kaplana-Meijera analīze norādīja izdzīvotības ilguma samazināšanos, pieaugot vecumam, taču, ņemot vērā visas trīs vecumgrupas, statistiski nozīmīgas atšķirības netika atrastas. Pārveida salīdzinājumi atklāja statistiski nozīmīgu atšķirību izdzīvotības ilgumā starp pacientiem, kas jaunāki par 55 gadiem, un pacientiem, kas vecāki par 64 gadiem ($p = 0,048$).

Pētījumā tika pētīta arī saistība starp izdzīvotības ilgumu un slimības stadiju, atklājot mērenu korelāciju. Kaplana-Meijera izdzīvotības analīze atklāja statistiski nozīmīgas atšķirības ($p = 0,058$) KI un SSI atkarībā no slimības stadijas. Tomēr, veicot pārveida salīdzinājumus, netika konstatētas statistiski nozīmīgas KI un SSI atšķirības starp konkrētām slimības stadijām. Konstatēts, ka vidējais izdzīvotības laiks un labvēlīgie iznākumi (pacients dzīvs) samazinājās, palielinoties T pakāpei, norādot uz mērenu korelāciju starp

iznākumu un audzēja izmēru. Pacienti ar mazākiem audzējiem (T1–2) bija labāka KI un SSI nekā pacientiem ar lielākiem audzējiem (T3–4).

Starp izdzīvotības ilgumu un N statusu nebija korelācijas. KI un SSI būtiski neatšķīrās atkarībā no N statusa (N0 pret N+). Tika konstatēta mērena korelācija starp smēķēšanu un izdzīvotības ilgumu, un nesmēķētājiem bija labāki KI un SSI. Pārmērīga alkohola lietošana nebija saistīta ar izdzīvotības ilgumu vai vidējo KI laiku. Zīmīgi, ka pacientiem, kuri gan smēķēja, gan pārmērīgi lietoja alkoholu, statistiski nozīmīgi pasliktinājās KI un SSI (2. pielikuma 1. attēls).

Audzēja atrašanās vieta neietekmēja vidējo KI laiku vai KI ilgumu. Pacienti ar rīkles sienas un aukslēju mandeļu audzējiem bija sliktākie KI ($p = 0,03$) un SSI ($p = 0,026$) rādītāji, savukārt pacientiem ar mīksto aukslēju audzējiem bija labāki rezultāti. Lielākā daļa audzēju bija plakanšūnu karcinomas ar pārragošanos (KPŠK; 70,85 %), mazāk bija plakanšūnu karcinomu bez pārragošanās (NKPŠK; 19,43 %), nediferencētu karcinomu (1,21 %) vai adenokvamožu karcinomu (0,4 %). Audzēja histoloģiskais variants būtiski neietekmēja KI vai SSI.

KPŠK audu paraugos tika konstatētas lielas, labi norobežotas poligonālas plakanšūnas dažādās diferenciācijas pakāpēs – no labi diferencētām līdz vāji diferencētām, ar dažādu keratinizācijas pakāpi. Tika novērotas keratīna pārles, kas norāda uz keratīna veidošanos. Pat zemu diferencētos audzējos bez pārragošanās bija vērojama difūza plakanšūnu nobriešana. KPŠK paraugos bieži bija novērojamas norobežotas šūnu saliņas ar bagātīgu eozinofilo citoplazmu un kodolu pleomorfismu. Bieži bija novērojamas audzēja šūnu infiltratīvas saliņas desmoplastiskajā stromā. NKPŠK paraugos tika novērota šūnu organizācija pavedienu, saliņu, kā arī neregulāras formas veidojumu veidā ar skaidri izsekojamām robežām. Šiem audzējiem bija raksturīgas relatīvi monomorfas, blīvi sakoptas bazaloīdas šūnas ar olveida un vārpstiņveida morfoloģiju, nenoteiktām šūnu robežām, izteikti hiperhromatiskiem, lieliem kodoliem.

Lai gan pētījumā netika noteikti CPV pozitīvi un CPV negatīvi audzēji, var pieņemt, ka KPŠK audzēji, visticamāk, ir CPV negatīvi, savukārt NKPSK audzēji varētu būt saistīti ar CPV infekciju. NKPSK bija raksturīga augšana pavedienu, saliņu, kā arī neregulāras formas veidojumu veidā ar skaidri izsekojamām robežām, un audzēju šūnām bija bazaloīdas iezīmes ar perifēru šūnu rozešu veidošanu.

Lai izprastu audzēja agresīvo raksturu, tika novērtēti tādi faktori kā perineirālā izplatība, limfovaskulārā un muskuļu invāzija, ņemot vērā, ka diferenciācijas pakāpe, kas pamatojas tikai pārragošanās stadijā, var nebūt pietiekama, lai spriestu par klīnisko iznākumu. Pētījumā konstatēts, ka perineirālā invāzija un limfovaskulārā invāzija ir bieži sastopamas plakanšūnu karcinomās un to klātbūtne korelē ar samazinātu izdzīvotību. Turklāt, audzēja audiem izplatoties dziļāk, ļaundabīgās šūnas infiltrēja šķērsvītrotās muskulatūras audus, veidojot saliņas un pavedienus.

Tika novērota spēcīga korelācija starp izdzīvotības ilgumu un izmantoto ārstēšanu. Savukārt korelācija starp terapiju un vidējo izdzīvotības ilgumu netika atrasta. Starp dažādām ārstēšanas metodēm tika konstatētas būtiskas KI un SSI atšķirības. Pacientiem ĶĀ un RT + ĶĀ grupās bija labāki izdzīvotības rezultāti salīdzinājumā ar citām ārstēšanas grupām. Pārveida salīdzinājumi atklāja būtiskas atšķirības KI tikai starp RT un RT + ĶĀ grupām, RT + ĶĀ un RT + ĶT (*Cetuximab*) +/- ĶĀ grupām ($p < 0,05$) un gandrīz statistiski nozīmīgas atšķirības starp RT un ĶĀ grupām. Šie rezultāti liecina par augstāku izdzīvotību ķirurģiskās iejaukšanās gadījumā, savukārt RT grupā (izņemot simptomātisko ārstēšanu) izdzīvotības rādītāji (KI un SSI) bija viszemākie.

Lielākajai daļai pētījumā iekļauto pacientu ārstēšanas ietvaros netika veikta ķirurģiska iejaukšanās ($n = 196$). Tikai nelielam skaitam pacientu tika veikta primārā audzēja izgriešana ($n = 10$), kakla disekcija ($n = 28$) vai abas ($n = 13$). Analizējot ķirurģiskās iejaukšanās ietekmi uz pacientu izdzīvošanu,

mēs konstatējām, ka mirušo pacientu skaits bija ievērojami lielāks, ja operācija netika veikta.

Turklāt vidējais KI ilgums pēc slimības diagnosticēšanas bija ievērojami ilgāks ķirurģiski ārstētiem pacientiem. Tomēr mēs neatklājām korelāciju starp vidējo KI ilgumu un konkrēto veiktās operācijas veidu. Kaplana-Meijera analīze parādīja statistiski nozīmīgas izdzīvotības ilguma (kopējā un slimībai specifiskā) atšķirības atkarībā no tā, vai pacientam tika veikta operācija vai ne, ar ievērojami lielāku izdzīvotības ilgumu pacientiem, kuriem tika veikta operācija ($p < 0,0001$). Tomēr dažādu ķirurģisko procedūru veidu pārveida salīdzinājums neuzrādīja statistiski nozīmīgas atšķirības KI ($p = 0,29$) vai SSI ($p = 0,11$).

Daudzfaktoru Koksas regresijas analīze parādīja, ka statistiski nozīmīga ietekme uz nomiršanas risku bija T2 pakāpei, N pakāpei, kaitīgiem ieradumiem un ārstēšanas veidam RT + ĶĀ. Pacientiem ar T2 pakāpes audzējiem bija par 57 % un 77 % mazāks nomiršanas risks salīdzinājumā ar pacientiem ar T3 un T4 pakāpes audzējiem. Turklāt N0 pakāpe bija saistīta ar par 34 % zemāku nomiršanas risku nekā N+ gadījumā.

Pētījumā arī atklājās, ka ĶĀ un RT kombinācijai kā ārstēšanas metodei bija ievērojami mazāks nomiršanas risks salīdzinājumā ar citām ārstēšanas metodēm, tostarp tikai RT vai kombinācijā ar ĶT ar cetuksimabu (2. pielikuma 2. attēls).

Nomiršanas risks bija par 300 % mazāks, ja tika veikta RT+ ĶĀ, salīdzinot ar simptomātisku ārstēšanu, un par 154 % mazāks, salīdzinot ar RT + ĶT (*Cetuximab*) +/- ĶĀ. Turklāt, salīdzinot RT + ĶĀ ārstēšanas veidu ar RT vai ĶĀ atsevišķi, tika aprēķināts, ka nomiršanas risks ir 2,02 un 1,27 reizes lielāks attiecīgi RT un ĶĀ gadījumā. Daudzfaktoru Koksas regresijas analīze arī apstiprināja, ka pārmērīga alkohola lietošana un/vai smēķēšana palielināja nomiršanas risku.

4.2. Prospektīvās daļas pirmā publikācija

4.2.1. CPV genoma sekvenču noteikšana GKPŠK paraugos (FFPI audu blokos)

DNS izdalīšana no FFPI audu blokiem, izmantojot *blackPREP FFPI DNS Kit* komplektu, bija salīdzinoši vienkārša un ātra procedūra. Zemākā izdalītās DNS koncentrācija bija 16,54 ng/μl, lielākajā daļā izdalīto DNS paraugu koncentrācija bija virs 60 ng/μl. Visi izdalītie DNS paraugi bija β globīna gēna pozitīvi, tāpēc tie bija derīgi turpmākai analīzei.

Paraugu skrīnings ar MY09/11 konsensa praimeriem atklāja tikai 1/31 pozitīvu paraugu. Tomēr PĶR, izmantojot GP5+/6+ konsensa praimerus, bija daudz efektīvāka, un tās rezultāts bija 100 % pozitīvs (n = 31) attiecībā uz CPV DNS.

CPV genotipa noteikšana, izmantojot tipam specifiskus praimerus (CPV16 un 18), uzrādīja pozitīvu rezultātu tikai CPV16 – 15/31 (48,4 %).

Izmantojot *Anyplex II HPV28* testu, CPV DNS tika konstatēta 14/31 (45,2 %) paraugos. Vienā gadījumā tika konstatēta divu CPV tipu (16. un 56. tipa) koinfekcija. Pārējos 13 gadījumos bija CPV16 monoinfekcija.

Izmantojot *Sacace HPV High-Risk Screen Real-TM Quant*, CPV DNS tika konstatēta 12/31 (38,7 %) paraugos, turklāt tikai *HEX* kanālā, kas atbilst CPV A9 grupai (16, 31, 33, 33, 35, 52, 58).

4.2.2. Dažādu genotipēšanas metožu rezultātu salīdzinājums

Tos pašus DNS ekstraktus no 31 atlasītā FFPI parauga, kas testēti ar konsensa praimeriem un CPV16 specifiskajiem praimeriem, tālāk pārbaudīja ar *Anyplex II HPV28* testu un *Sacace HPV High-Risk Screen RealTM Quant* testu. Izmantojot abus testus, tika iegūti derīgi rezultāti visiem biopsijas paraugiem.

Daudz pretrunīgu rezultātu bija starp PĶR ar CPV16 specifiskiem praimeriem un reālā laika PĶR testiem (*Anyplex* un *Sacace*). Saskaņu starp PĶR

ar HPV16 specifiskajiem praimeriem un *Anyplex* testa rezultātiem nebija iespējams novērtēt augstas p vērtības dēļ (Koena κ koeficients = 0,288, $p = 0,156$). PĶR ar CPV16 specifiskajiem praimeriem un *Sacace* testa rezultātu salīdzinājums uzrādīja līdzīgu ainu (Koena κ koeficients = 0,285, $p = 0,149$), kas nozīmē, ka šo divu metožu savstarpējā saskaņa nebija statistiski nozīmīga.

No 14 CPV pozitīvajiem paraugiem, kas tika iegūti ar *Anyplex* testu, 11 (78,6 %) bija pozitīvi ar *Sacace* testu. Abu metožu saskaņa bija laba (Koena κ koeficients = 0,736, $p < 0,001$).

Turklāt tika konstatēta mērena pozitīva korelācija starp vīrusa slodzi (novērtēta ar *Sacace* testu) un puskvantitatīvi novērtētajiem *Anyplex* testa rezultātiem ($r_s = 0,60$, intervāls 0,30–0,79, $p = 0,0004$; 2. pielikuma 3. attēls).

4.3. Prospektīvās daļas otrā publikācija

4.3.1. CPV genoma sekvenču klātbūtne audzēju paraugos (HFPSK un BPSK)

No 72 testētajiem audzēju paraugiem 11 paraugos (15,3 %) tika konstatēta CPV DNS, izmantojot MY09/11 praimerus, savukārt 55 paraugi (76,4 %) bija pozitīvi, izmantojot GP5+/6+ praimerus. Kopumā, testējot ar konsensa PĶR, 61 audzēja audu paraugā (84,7 %) tika konstatēta CPV DNS, no kuriem 31 paraugs bija HFPSK un 30 paraugi bija BPSK.

4.3.2. CPV genotipa noteikšana, izmantojot CPV16 un CPV18 L1 praimerus un *Anyplex II HPV28* reālā laika PĶR

Visiem 72 audzēja audu paraugiem veica CPV genotipa noteikšanu, izmantojot CPV16 un CPV18 L1 praimerus. Divi audzēju paraugi (abi BPSK), kas bija pozitīvi, veicot PĶR ar CPV16 L1 praimeriem, bija negatīvi konsensa PĶR. Nevienā no paraugiem netika konstatēta CPV18 DNS. Kopumā 26 paraugi (36,1 %) bija CPV16 pozitīvi, no tiem 10 paraugi bija BPSK un 16 – HFPSK. Turpmākai analīzei tika izmantoti 63 CPV DNS+ paraugi.

63 CPV pozitīvie paraugi, kas apstiprināti, izmantojot konsensa praimerus vai CPV16 specifiskos praimerus, tika tālāk analizēti, izmantojot *Anyplex II HPV28* multipleksu reālā laika PĶR. No 63 paraugiem 28 paraugi bija CPV DNS negatīvi, novērtējot ar *Anyplex II HPV28* testu. No atlikušajiem CPV DNS pozitīvajiem paraugiem 32 paraugos tika konstatēta CPV16 DNS, 2 paraugos tika konstatēta vienlaicīgi CPV16 un CPV31 DNS un 1 paraugā tika konstatēta vienlaicīgi CPV16 un CPV56 DNS. No 32 AR-CPV+ paraugiem 19 BPŠK un 13 HFPŠK paraugi bija CPV16+, 2 BPŠK paraugiem konstatēja CPV16 un CPV31 koinfekciju, bet 1 HFPŠK paraugam – CPV16 un CPV56 koinfekciju.

Interesanti, ka 7 audzēja audu paraugi (1 BPŠK un 6 HFPŠK), kas sākotnēji tika apstiprināti kā CPV16+, izmantojot CPV16 L1 praimeru PĶR, bija negatīvi, izmantojot *Anyplex II HPV28* reālā laika PĶR. Tādējādi mēs kopumā ieguvām 42/72 (58,3 %) CPV16+ paraugus. CPV16 infekcijas prevalence, ieskaitot vairākas infekcijas vienā paraugā, bija 22/41 (53,7 %) BPŠK un 20/31 (64,5 %) HFPŠK gadījumā. Visi CPV16+ HFPŠK paraugi bija III vai IV stadijas audzēji (2. pielikuma 4. A attēls).

No CPV16+ paraugiem 21 paraugā tika konstatēta zema vīrusa slodze, 9 paraugos – vidēja vīrusa slodze un 2 paraugos – augsta vīrusa slodze, izmantojot *Anyplex II* testu (2. pielikuma 4. B attēls).

4.3.3. IHĶ noteikta p16 ekspresija

IHĶ analīze apstiprināja, ka 11,1 % audzēja audu paraugu bija vērojama p16 ekspresija. No 41 BPŠK parauga un 31 HFPŠK parauga attiecīgi sešos un divos paraugos tika konstatēta p16 ekspresija. Salīdzinot p16 un CPV statusu, audzēji tika iedalīti šādās kategorijās: 7/72 (9,7 %) bija p16+/CPV+, 1/72 bija p16+/CPV-, 8/72 (11,1 %) bija p16-/CPV- un 56/72 (77,8 %) bija p16-/CPV+. Lielākā daļa p16+/CPV+ audzēju bija BPŠK (5 gadījumi), bet divi gadījumi bija

HFPŠK. Tikai vienā gadījumā tika konstatēts p16+/CPV- audzējs, kas bija BPŠK. No septiņiem p16+/CPV+ audzējiem sešos gadījumos vienīgā infekcija bija CPV16, bet vienā gadījumā bija CPV16 un CPV31 koinfekcija. No 56 p16-/CPV+ audzējiem 27 bija BPŠK, bet 29 bija HFPŠK. No tiem 35 gadījumos tika konstatēta CPV16 monoinfekcija, izmantojot *Anyplex II* reālā laika PQR un CPV16 L1 praimeru PQR, savukārt divos gadījumos bija minētās AR-CPV koinfekcijas (2. pielikuma 4. C attēls).

4.3.4. IHĶ noteikta CPV16 E6 un E7 onkoproteīnu ekspresija

CPV16 onkoproteīnu E6 un E7 IHĶ noteikšana tika veikta 42 FFPI paraugos (22 BPŠK un 20 HFPŠK), kas bija CPV16+, izmantojot molekulārās virusoloģijas testus.

E6 onkoproteīna ekspresija CPV16+ BPŠK paraugos tika konstatēta 21/22 gadījumos. Imūnpozitīvas struktūras tika novērotas audzēja masā un virsmas epitēlijā ar displāzijas pazīmēm. Dažos gadījumos E6 onkoproteīnu saturēja tikai atsevišķa audzēja šūnu saliņa izmeklējamajā paraugā. Spēcīga CPV16 E6 onkoproteīna imūnekspresija audzēja masā (> 50 %) tika novērota 3/22 gadījumos, un divos no tiem spēcīga imūnekspresija tika novērota arī displastiskajā epitēlijā (1. pielikuma 1. A attēls; 2. pielikuma 5. A, B attēls). 12/22 BPŠK paraugos konstatēja vāju E6 onkoproteīna ekspresiju audzēja masā (2. pielikuma 5. A attēls). Displastiskajā epitēlijā E6 ekspresijas līmeņu sadalījums paraugos bija atšķirīgs. Trijos gadījumos netika konstatēta E6 ekspresija displastiskā epitēlija šūnās, divos no tiem audzēja masā bija zema imūnpozitivitāte (2. pielikuma 5. B attēls). Lielākajā daļā paraugu tika novērota imūnpozitivitāte invazīvajā frontē, parasti suprabazālajās šūnās (1. pielikuma 1. B, C attēls). CPV16 E6 proteīna ekspresija bieži tika novērota arī mazo asinsvadu endotēlija šūnās (1. pielikuma 1. B, C attēls).

CPV16 E7 proteīna imūnekspressija tika apstiprināta 20/21 BPŠK paraugā (2. pielikuma 5. C attēls). Imūnpozitīvām šūnām bija kodola reakcija, dažām – kodola un citoplazmas reakcija. CPV16 E7 onkoproteīna ekspresija tika novērota pseidodaudzkārtainā cilindriskā epitēlijā un daudzkārtainā plakanā epitēlijā, pārsvarā bazālajās un suprabazālajās šūnās (1. pielikuma 2. A, B attēls).

Spēcīga CPV16 E7 onkoproteīna imūnekspressija audzēja audos tika konstatēta 8 no 21 BPŠK parauga (1. pielikuma 2. C attēls; 2. pielikuma 5. C, D attēls).

18/20 HFPŠK paraugos tika konstatēta CPV16 E6 onkoproteīna imūnekspressija (2. pielikuma 5. E, F attēls). Lielākajā daļā paraugu bija novērojama CPV16 E6 onkoproteīna imūnekspressija displastiska epitēlija šūnu citoplazmā. E6 onkoproteīna ekspresija audzēja masā kopumā bija zema (1. pielikuma 1. D attēls).

13/20 HFPŠK gadījumu tika konstatēta CPV16 E7 onkoproteīna imūnekspressija, galvenokārt kodolā (2. pielikuma 5. G, H attēls). Pozitīvas reakcijas tika novērotas audzēja šūnās un epitēlija suprabazālajās šūnās, kā arī endotēlija šūnās (1. pielikuma 2. D attēls).

Kopumā netika konstatētas būtiskas atšķirības audzēja vai displastiskā epitēlija CPV16 E6/E7 onkoproteīnu ekspresijā, izņemot būtiskas atšķirības E6 onkoproteīna imūnekspressijas ziņā HFPŠK paraugos (2. pielikuma 5. E attēls). Kopumā gan BPŠK, gan HFPŠK, gan audzēja masā, gan displastiskajā epitēlijā tika novērots līdzīgs CPV16 E6/E7 onkoproteīnu ekspresijas līmenis, kā parādīts 2. pielikuma 5. A, C un G attēlā.

Tika veikta puskvantitatīvo reālā laika PQR un E6/E7 onkoproteīna imūnekspressijas rezultātu neparametriskā korelācijas analīze. Starp puskvantitatīviem reālā laika PQR un CPV16 E7 IHQ datiem BPŠK audu paraugos, jo īpaši displastiskajā epitēlijā, tika novērota mērena pozitīva korelācija ($r_s = 0,445$, $p = 0,056$). HFPŠK audu paraugos tika konstatēta vāja līdz mērena pozitīva korelācija, bet tā nebija statistiski nozīmīga.

4.4. Prospektīvās daļas trešā publikācija

4.4.1. CPV DNS un genotipi dažādos GKPŠK veidos

Tika analizēti pacientu ar GKPŠK paraugi, lai noteiktu CPV DNS klātbūtni un tā genotipus. 92/106 (86,79 %) GKPŠK paraugi bija CPV DNS pozitīvi. CPV DNS klātbūtne atšķīrās dažādos GKPŠK veidos: 29/34 OFPŠK paraugi (85,29 %), 32/41 BPŠK paraugi (78,05 %) un 31 HFPŠK paraugs (100 %) bija CPV DNS pozitīvi. Visbiežāk atklātais AR-CPV genotips bija CPV16, kas tika konstatēts 68/106 (65,09 %) GKPŠK paraugos. CPV16 bija konstatēts 26/34 (76,47 %) OFPŠK paraugos, 22/41 (53,66 %) BPŠK paraugos un 20/31 (64,52 %) HFPŠK paraugos. CPV koinfekcija ar CPV16 tika novērota 7/106 GKPŠK paraugos, CPV31 tika konstatēts 2 paraugos, CPV33 – 1 paraugā, CPV35 – 1 paraugā un CPV56 – 4 paraugos. Ņemot vērā tā lielo izplatību, turpmākajā analizē galvenā uzmanība tika pievērsta CPV16.

4.4.2. CPV16 E6/E7 mRNS CPV16 pozitīvos GKPŠK paraugos

Pētījumā tika analizēta CPV16 E6/E7 mRNS klātbūtne CPV16 pozitīvos GKPŠK paraugos. No CPV16 pozitīvajiem paraugiem CPV16 E6/E7 mRNS tika konstatēta 15/26 (57,7 %) OFPŠK paraugos, 2/22 (9 %) BPŠK paraugos un 0/20 HFPŠK paraugos. Korelācijas analīze atklāja mērenu pozitīvu korelāciju starp puskvantitatīvo CPV16 vīrusa slodzi un CPV16 E6/E7 mRNS klātbūtni ($r_s = 0,601$, $p < 0,0001$). Turklāt tika novērota vāja pozitīva korelācija starp IHĶ p16 ekspresiju un E6/E7 mRNS klātbūtni ($r_s = 0,472$, $p < 0,0001$). Tomēr netika konstatēta korelācija starp IHĶ p53 ekspresiju un E6/E7 mRNS klātbūtni.

4.4.3. IHĶ noteikta p16 ekspresija GKPŠK paraugos

Lai novērtētu p16 ekspresiju GKPŠK paraugos, tika veikta IHĶ (1. pielikuma 3. A attēls). No 106 GKPŠK paraugiem p16 hiperekspresija tika novērota 24 paraugos (22,64 %). Precīzāk, tā tika konstatēta 16/34 OFPŠK

paraugos (47,06 %), 6/41 BPŠK paraugos (14,63 %) un 2/31 HFPŠK paraugos (6,45 %). Ņemot vērā CPV16 pozitivitāti, p16 hiperekspresija tika apstiprināta 15/26 CPV16+ OFPŠK paraugos (57,69 %), 5/22 CPV16+ BPŠK paraugos (22,73 %) un 2/20 CPV16+ HFPŠK paraugos (10 %).

4.4.4. IHĶ noteikta p53 ekspresija GKPŠK paraugos

Pētījumā atklājās, ka p53 hiperekspresija (p53+; 1. pielikuma 3. B attēls) tika apstiprināta 49/106 (46,23 %) GKPŠK paraugos. Starp dažādiem GKPŠK apakšveidiem p53 hiperekspresija tika novērota 17/34 (50 %) OFPŠK paraugos, 21/41 (51,22 %) BPŠK paraugā un 11/31 (35,48 %) HFPŠK paraugā.

Pēc tam, analizējot CPV16+ paraugus, ievērojamā daļā gadījumu netika konstatēta p53 ekspresija (p53-). 15/26 (57,69 %) OFPŠK paraugi bija p53-, kā arī 10/22 (45,45 %) BPŠK paraugi bija p53-. Attiecībā uz HFPŠK paraugiem 14/20 (70 %) paraugu bija p53-.

Turklāt to paraugu apakšgrupā, kuros tika konstatēta E6/E7 mRNS, kas norāda uz aktīvu CPV infekciju, p53- rezultāts tika konstatēts 11/15 (73,33 %) OFPŠK paraugos un 1/2 (50 %) BPŠK paraugos.

4.4.5. IHĶ noteikta CPV16 E6 un E7 onkoproteīnu ekspresija GKPŠK paraugos

CPV16 E6 proteīna hiperekspresija (1. pielikuma 3. C attēls) tika apstiprināta 44/106 (41,5 %) GKPŠK paraugos. Precīzāk, tā tika novērota 21/34 (61,8 %) OFPŠK paraugos, 14/41 (34,1 %) BPŠK paraugā un 9/31 (29,0 %) HFPŠK paraugā.

Tāpat CPV16 E7 proteīna (1. pielikuma 3. D attēls) hiperekspresija tika konstatēta 39/106 (36,8 %) GKPŠK paraugos. Precīzāk, tā tika novērota 19/34 (55,9 %) OFPŠK paraugos, 14/41 (24,1 %) BPŠK paraugā un 6/31 (19,4 %) HFPŠK paraugā.

4.4.6. Kaplana-Meijera izdzīvotības analīze

KI un SSI atkarībā no CPV DNS (AR-CPV un ZR-CPV)

Piecu gadu KI un SSI tika novērtētas CPV+ un CPV- pacientiem atkarībā no primārā audzēja atrašanās vietas. Pacientiem ar OFPŠK KI rādītāji bija 26,82 % CPV+ pacientiem un 0 % CPV- pacientiem, lai gan atšķirība nebija statistiski nozīmīga ($p = 0,077$; 2. pielikuma 6. A attēls). Tomēr SSI rādītāji bija 27,78 % CPV+ pacientiem un 0 % CPV- pacientiem, un tas bija statistiski nozīmīgi ($p < 0,05$; 2. pielikuma 6. B attēls).

Pacientiem ar BPŠK KI rādītāji bija 64,59 % CPV+ pacientiem un 44,44 % CPV- pacientiem, sasniedzot statistisko nozīmīgumu ($p < 0,05$; 2. pielikuma 6. C attēls). SSI rādītāji bija 68,90 % CPV+ pacientiem un 50 % CPV- pacientiem, sasniedzot statistisko nozīmīgumu ($p < 0,05$; 2. pielikuma 6. D attēls).

Tā kā visi HFPŠK paraugi bija CPV DNS pozitīvi, šai grupai nevarēja veikt Kaplana-Meijera izdzīvotības analīzi.

KI un SSI atkarībā no CPV16 DNS, CPV16 E6/E7 mRNS un p16, p53, E6 un E7 proteīnu IHĶ ekspresijas

Tika veikta Kaplana-Meijera izdzīvotības analīze, stratificējot pacientus pēc primārā audzēja atrašanās vietas. Tika aprēķināta KI un SSI, un lielākajai daļai mainīgo lielumu vienfaktora izdzīvotības analīze, izmantojot Kaplana-Meijera metodi, nerasniedza statistisko nozīmību.

Tomēr starp p16+ un p16- OFPŠK pacientiem bija gandrīz statistiski nozīmīgas atšķirības ($p = 0,057$; 2. pielikuma 7. A, B attēls) KI un statistiski nozīmīgas atšķirības SSI.

Analizējot p53+ un p53- HFPŠK pacientus, tika konstatētas statistiski nozīmīgas atšķirības KI un SSI (2. pielikuma 7. C, D attēls), un p53- grupas pacientu izdzīvotības rādītāji bija labāki.

CPV16 E6 proteīna IHĶ hiperekspressija bija saistīta ar ievērojami labāku KI un SSI pacientiem ar OFPŠK (2. pielikuma 7. attēls E, F).

4.4.7. Daudzfaktoru Cox regresijas analīze

OFPŠK

Grupā bija 34 pacienti, no kuriem 26 nomira. Divi pacienti tika izslēgti no analīzes, jo trūka datu. Koksas regresijas analīze atklāja, ka p16, p53 un CPV16 proteīnu E6 un E7 IHĶ ekspresija, audzēja izmērs, ārstēšana un smēķēšana būtiski ietekmēja OFPŠK pacientu izdzīvošanu.

p16, p53 un CPV16 E6 proteīna hiperekspresija bija saistīta ar daudz zemākiem riska attiecības rādītājiem, kas norāda uz zemāku nomiršanas risku. No otras puses, CPV16 E7 proteīna hiperekspresija bija saistīta ar lielāku nomiršanas risku.

Šos secinājumus apstiprināja arī datu grafiskā analīze. Pacientiem ar p16+ audzējiem bija labāki izdzīvotības rādītāji salīdzinājumā ar pacientiem ar p16- audzējiem (2. pielikuma 8. A attēls). Tomēr CPV16 E7 proteīna hiperekspresija bija saistīta ar samazinātu izdzīvotības ilgumu. Interesanti, ka, kombinējot abus marķierus (p16 un CPV16 E7 proteīnu), E7 proteīna hiperekspresija samazināja izdzīvotības ilgumu pat pacientiem ar p16+ audzējiem (2. pielikuma 8. A attēls). Vēl viens interesants atklājums bija saistīts ar p53 un CPV16 E6 proteīna IHĶ ekspresiju. Pacientiem ar p53+/E6+ audzējiem bija vislabākie izdzīvotības rādītāji, savukārt pacientiem ar p53-/E6- audzējiem izdzīvotības rādītāji bija vissliktākie (2. pielikuma 8. B attēls). Izdzīvotības ilgums neatšķīrās starp pacientiem ar p53-/E6+ un p53+/E6- audzējiem.

BPŠK

Koksas regresijas analīze attiecībā uz BPŠK neuzrādīja nevienu faktoru, kas būtiski ietekmētu izdzīvotības ilgumu.

HFPŠK

Grupā bija 31 pacients, no tiem 29 nomira. Koksa regresijas modelis rādīja, ka vairāki faktori statistiski nozīmīgi ietekmēja HFPŠK pacientu izdzīvošanu. Šie faktori ietvēra p16 un CPV16 E6 proteīna IHĶ ekspresiju, CPV16 DNS klātbūtni, kaitīgus ieradumus un T, N un M statusu.

IHĶ p16 un CPV16 E6 proteīnu hiperekspresija bija saistīta ar ļoti zemu nomiršanas risku (2. pielikuma 9. A, C attēls). Tomēr, pārbaudot p16 un CPV16 E7 proteīna kombinēto statusu, tika konstatēts, ka E7 proteīna ekspresija būtiski neietekmēja izdzīvotības ilgumu (2. pielikuma 9. B attēls). Aplūkojot p53 un CPV16 E6 proteīna kombinēto statusu, tika novērots, ka pacientiem ar E6+ audzējiem bija labāki izdzīvotības rādītāji un p53 hiperekspresija, šķiet, vēl vairāk uzlaboja šo pacientu izdzīvošanu (2. pielikuma 9. D attēls). Pacientu grupai ar p53-/E6- audzējiem bija vissliktākie izdzīvotības rādītāji.

CPV16 DNS klātbūtne bija saistīta ar ievērojami augstāku nomiršanas risku (2. pielikuma 9. E attēls). Turklāt Koksa regresijas analīze atklāja, ka lielāki primārie audzēji bija saistīti ar augstāku nomiršanas risku. Konkrēti, pacientiem ar T3 audzējiem bija par 87 % mazāks nomiršanas risks salīdzinājumā ar pacientiem ar T4 audzējiem. Turklāt zemāka N stadija bija saistīta ar zemāku riska attiecību. Tika konstatēts, ka distālo metastāžu klātbūtne ir cieši saistīta ar 22 reizes lielāku nāves risku. Visbeidzot, tika konstatēts, ka smēķējošiem pacientiem bija 57 reizes lielāks nomiršanas risks salīdzinājumā ar nesmēķētājiem / alkoholu nelietojošajiem.

5. Diskusija

5.1. Zemākas T un N pakāpes, kaitīgu ieradumu neesamība un ķirurģiska ārstēšana saistīti ar labāku izdzīvotību un zemāku riska attiecību OFPŠK (retrospektīvajā pētījumā)

Izdzīvotības analīze tika veikta pacientiem ar OFPŠK, kas ārstēti vienā Latvijas slimnīcā 10 gadu laika posmā. Pētījuma mērķis bija noteikt prognostiskos faktorus, izvērtējot slimības stadiju, audzēja lielumu, lokoreģionālo metastāžu esamību, vecumu, dzimumu, kaitīgos ieradumus (smēķēšana, pārmērīga alkohola lietošana), audzēja histopatoloģisko variantu, primārā audzēja atrašanās vietu un saņemto ārstēšanu. Analīze atklāja, ka lielākā daļa pacientu bija smēķētāji (76 %) un ievērojamai daļai bija problēmas ar alkohola lietošanu (35 %). Smēķēšana un pārmērīga alkohola lietošana bija neatkarīgi saistītas ar KI un SSI samazināšanos, turklāt smēķēšanai bija izteiktāka ietekme uz SSI. Šo riska faktoru kombinācija vēl vairāk samazināja izdzīvotības ilgumu. Līdzīgi secinājumi ir minēti iepriekšējos pētījumos (Kuper et al., 2002; Farsi et al., 2017). Daudzfaktoru analīze, izmantojot Kokska riska modeli, rādīja lielāku nomiršanas risku, ja bija vismaz viens no šiem riska faktoriem.

Pētījuma rezultāti liecina, ka lielākajai daļai pacientu slimība tika diagnosticēta vēlīnās slimības stadijās (III un IV stadija), kas nozīmē sliktāku prognozi. Kaplana-Meijera KI un SSI aplēses, pamatojoties uz slimības stadiju, liecināja par sliktāku izdzīvotību pacientiem ar vēlīno slimības stadiju. No 247 pētījumā iekļautajiem pacientiem tikai 3 un 19 pacientiem tika diagnosticēta attiecīgi I un II stadijas slimība. Šie rezultāti uzsvēr agrīnas vēža atklāšanas un tūlītējas nosūtīšanas pie speciālistiem nozīmi, kas tika uzsvērta iepriekšējos pētījumos (Pitchers & Martin, 2006).

OFPŠK ir pazīstama ar savu agresivitāti, bieži vien tā tiek diagnosticēta vēlīnā stadijā un tai ir augsts limfmezglu metastāžu īpatsvars (Yuan et al., 2018).

Šajā pētījumā lielākajai daļai pacientu bija klīniski pozitīva kakla slimība. Kamēr pacientiem ar pozitīviem limfmezgliem bija augstāks nomiršanas risks (daudzfaktoru Koksas regresijas analīze), tomēr KI un SSI rādītāji būtiski neatšķīrās.

Pētījums atklāja sakarību starp zemākām T pakāpēm un labākiem slimības iznākumiem. Šo secinājumu apstiprināja Kaplana-Meijera KI un SSI aplēses, kas liecināja par būtisku izdzīvotības ilguma samazināšanos, palielinoties T pakāpei, un visilgākais izdzīvotības ilgums tika novērots gadījumos ar zemāku T pakāpi. Tomēr ir svarīgi atzīmēt, ka šajā pētījumā iegūtās izdzīvotības aplēses bija zemākas, salīdzinot ar tām, par kurām ziņots rietumu puslodē (Gillison et al., 2019).

Rīkles sienas un auzslēju mandeļu audzēji bija saistīti ar sliktākajiem KI un SSI rezultātiem, kas atbilst iepriekš veiktajiem pētījumiem (Cohan et al., 2009). Lielākajai daļai šajā pētījumā iekļauto pacientu bija plakanšūnu karcinoma auzslēju mandeļu un mēles saknes rajonā.

Ķirurģiskā ārstēšana, īpaši RT + ĶĀ grupā, uzrādīja labākus KI un SSI rādītājus salīdzinājumā ar citiem ārstēšanas veidiem. Lai gan netika novērotas būtiskas izdzīvotības atšķirības atkarībā no konkrētā operācijas veida, būtiskas atšķirības radās, ja jebkuru ķirurģisku iejaukšanos salīdzināja ar neķirurģisku ārstēšanu. Ir svarīgi atzīmēt pētījuma ierobežojumus, piemēram, nevienmērīgo un salīdzinoši nelielo pacientu skaitu. Pašreizējā literatūra apstiprina, ka ķirurģiska ārstēšana ir būtiska un vēlama pieceja lielākajai daļai pacientu (Ling et al., 2013).

Turklāt vairākos citos pētījumos ir konstatēts, ka pacientiem, kuriem veikta ķirurģiska ārstēšana, ir labākas izdzīvotības iespējas, pat ņemot vērā CPV statusu (Karatzanis et al., 2012; Kamran et al., 2018). Tomēr rezultātu interpretācija attiecībā uz CPV statusa ietekmi uz izdzīvotības ilgumu ir bijusi pretrunu objekts. *Münscher* ar kolēģiem veica pētījumu, kurā tika izteikts

pieņēmums, ka CPV statusam, iespējams, nav būtiskas ietekmes uz izdzīvotības ilgumu (Münscher et al., 2017). Nepieciešami turpmāki pētījumi, lai novērtētu OFPŠK iznākumu pacientiem, kuriem veikta vienpusēja vai abpusēja kakla disekcija. Tomēr dažos pētījumos ir ziņots, ka ilgtermiņā nav būtisku atšķirību izdzīvotības ilgumā starp vienpusēju un abpusēju kakla disekciju pacientiem ar klīniski negatīvu kakla kontralaterālo pusi (Lanzer et al., 2012; Al-Mamgani et al., 2017).

Salīdzinot dažādus ārstēšanas veidus, *Gillison* ar kolēģiem pētījumā pierādīts, ka CPV pozitīva OFPŠK gadījumā cisplatīna un staru terapija ir pārāka par cetuksimabu un staru terapiju (*Gillison et al., 2019*). Tomēr cetuksimabs bija vienīgais ķīmijterapeitiskais līdzeklis, ko Latvijā pētījuma veikšanas laikā izmantoja GKPŠK ārstēšanai. Ir pamatoti pārskatīt ķīmijterapijā izmantoto medikamentu izvēli. Papildus šajā pētījumā veiktā pacientu ar OFPŠK izdzīvotības analīze atklāja, ka gados jaunākiem pacientiem bija mazāks nomiršanas risks salīdzinājumā ar gados vecākiem pacientiem. Ir norādīts, ka RT var ilgstoši nomākt imūnsistēmu, tādējādi potenciāli padarot dažus OFPŠK pacientus neaizsargātākus pret audzēja recidīvu un sliktākiem izdzīvotības rezultātiem (*Dovšak et al., 2018*).

Prognozes faktori ir ļoti svarīgi, izvēloties ārstēšanu OFPŠK pacientiem. Audzēja izmērs, "RT + ĶĀ" terapijas veids, kaitīgi ieradumi (smēķēšana, pārmērīga alkohola lietošana) reģionālās limfmezglu metastāzes skaidri prognozē pacientu iznākumu. Kakla disekcija, jo īpaši ipsilaterālā plānveida kakla disekcija klīniski negatīviem kakliem, šķiet nepieciešama, pamatojoties uz citiem pētījumiem (*Fasunla et al., 2011; Psychogios et al., 2013*). Diemžēl šajā pētījumā trūka datu par pacientu CPV statusu, kas ierobežoja CPV prognostiskās nozīmes novērtēšanu, un šo faktoru atzīst arī citi pētnieki. CPV statusa iekļaušana būtu varējusi sniegt vērtīgu ieskatu par pacientu izdzīvotību (*Andrews et al., 2009; Gillison et al., 2019*).

Pēdējās desmitgadēs saskāšanās ar OFPŠK ir palielinājusies, iespējams, pateicoties CPV ietekmei. CPV pozitīvai OFPŠK ir labāka prognoze nekā CPV negatīvai OFPŠK, tādējādi uzsverot, cik svarīgi ir noteikt CPV statusu prognozes un ārstēšanas plānošanas nolūkā (Sinha et al., 2018).

Pētījumu ierobežo tā retrospektīvais dizains un salīdzinoši nelielā populācija. Novērtēt ārstēšanas metožu nozīmi ir sarežģīti, ņemot vērā iespējamās atlases novirzes, piemēram, pacienti ar progresējušu vēzi un sliktu vispārējo veselības stāvokli saņem tikai staru terapiju. Pētījums arī liecina, ka ir nepieciešama plašāka ķīmijpreparātu izvēle un lietošana šo vēžu ārstēšanā. Lai gan iepriekšējos pētījumos tika atbalstīta supraomohioīda kakla disekcija kā primārā ārstēšanas metode klīniski N0 audzēju gadījumā (Süslü et al., 2013), pētījumā netika vērtēta atšķirība starp kakla disekcijas līmeņiem un veidiem (vienpusējs pret abpusēju).

5.2. DNS izdalīšana no FFPI audu blokiem ir uzticama. Vēlams izmantot vairākus diagnostiskus PQR testus (prospektīvās daļas pirmā publikācija)

Pēdējos gados DNS ekstrakcija no FFPI audu blokiem un tās izmantošana testēšanai ir kļuvusi arvien izplatītāka. Turklāt vienādu DNS ekstraktu izmantošana visām metodēm nodrošina augstu rezultātu precizitāti un piemērojamību, novērtējot dažādu CPV noteikšanas metožu saskaņu.

Anyplex II HPV28 tests ir piemērota un uzticama CPV noteikšanas metode (Veyer et al., 2018; Baasland et al., 2019). Tomēr ir iegūti dati, kuros atzīta nepieciešamība pēc papildu konformas CPV16 genotipam specifiskas molekulārās noteikšanas, jo īpaši CPV negatīviem paraugiem (Veyer et al., 2018). Šajā pētījumā nevarēja droši secināt par *Anyplex II* testu un PQR ar CPV16 L1 praimeriem rezultātu saskaņu. Bija vairāki CPV16 pozitīvi paraugi PQR ar CPV16 specifiskiem praimeriem, kas diagnosticēti kā negatīvi *Anyplex*

II HPV28 testā, un otrādi. Tas liecina, ka ir nepieciešamas vairākas CPV DNS noteikšanas metodes, izmantojot no FFPI izdalītus DNS paraugus.

No FFPI iegūtais ģenētiskais materiāls ir ļoti atšķirīgs DNS kvalitātes un kvantitātes ziņā (Lillsunde Larsson et al., 2015). Novērtējuma rezultātus ietekmē dažādi faktori – fiksācijas procedūrā izmantotie reaģenti, fiksācijai pakļauto audu daudzums, turpmākā audu apstrāde u. c. (Ludyga et al., 2012). Hipofaringeālā vēža biopsijas materiāls bieži ir ierobežots, jo biopsijas tiek veiktas ar vietējo anestēziju un netiešu vizualizāciju. Tomēr mūsu iegūtie rezultāti liecina par veiksmīgu CPV DNS noteikšanu pat paraugos ar nelielu DNS koncentrāciju.

GP5+/6+ konsensa praimeru (150 bp) 100 % pozitīvais rezultāts pretstatā 1/31 pozitīvajam rezultātam ar MY09/11 konsensa praimeriem (450 bp) liecina, ka praimeris, kas rada īsākus amplikonus, ir piemērotāki, jo īpaši fragmentētas DNS, kas iegūta no FFPI paraugiem, gadījumā.

Mūsu novērojumi liecina, ka *Anyplex II HPV28* un *Sacace HPV HighRisk Screen Real-TM Quant* testus var izmantot klīniskajā laboratorijā, lai noteiktu un genotipētu CPV, izmantojot DNS no FFPI audzēju paraugiem. Šo divu testu kombinācija ir laba, atklājot dažādus CPV tipus un novērtējot vīrusa slodzi.

5.3. CPV var būt nozīmīga loma ne-OFPŠK gadījumā (prospektīvās daļas otrā publikācija)

Pieejamie dati liecina, ka aptuveni 20 % BPŠK un 5 % HFPŠK gadījumu ASV izraisa CPV infekcija (Saraiya et al., 2015). Saslimstība ar CPV pozitīvu galvas un kakla vēzi Eiropā kopumā ir zemāka (Ndiaye et al., 2014), lai gan attīstītās valstīs, piemēram, Apvienotajā Karalistē, Dānijā un Vācijā, tā ir augstāka salīdzinājumā ar mazāk attīstītajām Austrumeiropas valstīm (Chaturvedi et al., 2013; Wittekindt et al., 2019). Šīs atšķirības tiek skaidrotas ar atšķirībām dzīvesveidā, ieradumiem, seksuālajiem paradumiem un, kas ir svarīgi, pilnvērtīgas CPV testēšanas trūkumu. Lai gan smēķēšana ir nozīmīgs faktors galvas un kakla vēža attīstībā Latvijas sabiedrībā (Lifsics et al., 2020), šis

pētījums liecina par CPV lomu ne-orofaringeālā vēža karcinogēnēzē, jo īpaši CPV16, kas visbiežāk novērots BPŠK un HFPŠK un saskan ar citu pētījumu rezultātiem (Ndiaye et al., 2014; Janecka-Widła et al., 2020).

Šis pētījums uzsver augsto CPV pozitīvu audzēju sastopamību un AR-CPV saikni ar HFPŠK un BPŠK Latvijā, salīdzinot ar Eiropu un Ziemeļameriku. Pētījums atklāj lielāku CPV16 prevalenci gan BPŠK, gan HFPŠK. Tomēr, lai noteiktu CPV infekcijas aktivitāti audzēja audos, ir jāveic papildu pētījumi (Jung et al., 2010). Papildu skaidrību varētu sniegt CPV E6/E7 mRNS noteikšana BPŠK un HFPŠK audu paraugos (Wittekindt et al., 2018). Primārā audzēja lokalizācijas pareiza noteikšana joprojām ir izaicinājums, jo īpaši vēlīnā slimības stadijā. Ļoti svarīgi ir optimizēt diagnostikas precizitāti, jo īpaši vēlīnās ļaundabīgo audzēju stadijās. Neraugoties uz grūtībām precīzi noteikt primāro audzēja izejas vietu, ir pierādījumi, kas liecina par AR-CPV infekcijas biežāku izplatību vēlīnā hipofaringeālā vēža stadijā (ErnouxNeufcoeur et al., 2011). Šajā pētījumā lielākajai daļai pacientu bija III un IV stadijas audzēji un visiem CPV pozitīvajiem HFPŠK tika diagnosticēti III vai IV stadijas audzēji.

Tikai nedaudzos pētījumos ir raksturota CPV E6 un E7 onkoproteīnu ekspresija audzēja un displastiskā epitēlija šūnās, izmantojot IHĶ metodi (Rodrigues et al., 2016; Brand et al., 2018). Dažos pētījumos ir ziņots par CPV DNS un RNS *in situ* hibridizācijas rezultātiem, izmantojot FFPI paraugus un parasto gaismas mikroskopiju (Augustin et al., 2020; Chi et al., 2020). Šajā pētījumā tika izmantoti FFPI paraugi no CPV16 pozitīviem audzējiem (n = 42), kas identificēti ar molekulārās bioloģijas metodēm. Lielākajai daļai CPV16 pozitīvo paraugu tika konstatēta pozitīva E6 vai E7 onkoproteīnu IHĶ ekspresija. Tomēr E6/E7 onkoproteīnu imūnekspresijas trūkums dažos paraugos liecina, ka audzēju attīstībā ir iesaistīti arī citi ar CPV nesaistīti mehānismi.

Šī pētījuma mērķis bija raksturot balsenes un *hypopharynx* audzēju karcinogēnēzi, koncentrējoties uz AR-CPV DNS, p16 un E6/E7 onkoproteīniem,

kas novērtēti, izmantojot molekulāro virusoloģiju un IHĶ. Lai gan dažas korelācijas nebija statistiski nozīmīgas, vāja līdz vidēji pozitīva korelācija starp molekulārās virusoloģijas un IHĶ rezultātiem norāda uz, iespējams, aktīvu CPV infekciju. Tomēr galīgajiem secinājumiem par CPV aktivitāti ir nepieciešama turpmāka izpēte. PĶR apstiprināja CPV DNS klātbūtni BPŠK un HFPŠK paraugos, taču izmantotās molekulārās bioloģijas metodes nespēja atšķirt aktīvu infekciju no latentas. Tomēr AR-CPV E6/E7 proteīnu klātbūtne, kas, kā zināms, veicina audzēju attīstību, liecina par AR-CPV aktīvu iesaistīšanos audzēju veidošanās procesā.

Dažos CPV16 pozitīvos paraugos audzēja šūnās netika konstatēta CPV16 E6/E7 onkoproteīnu imūnekspressija, bet displastiskajā epitēlijā bija pozitīva. Turklāt dažas endotēlija šūnas bija CPV16 E6/E7 proteīnu imūnpozitīvas, norādot uz PĶR analīzes ierobežojumiem ģenētiskā materiāla avota noteikšanā. AR-CPV E6 un E7 onkoproteīnu klātbūtne liecina par iespējamu vēža transformāciju, taču vīrusa integrācija (Münger et al., 2004), kas ir izplatīts mehānisms ar CPV saistītos vēža veidos, GKPŠK notiek retāk. Šajos audzējos var rasties E6/E7 gēnu disregulācija episomālā stāvoklī, iespējams, metilēšanas dēļ, kas izjauc CPV E2 saistīšanās vietas (McBride & Warburton, 2017). CPV16 E6/E7 onkoproteīnu neesamība audzēja šūnās kopā ar to klātbūtni displastiskā epitēlija un endotēlija šūnās var liecināt par CPV integrācijas trūkumu. Vēlīnās audzēja stadijās var notikt vīrusa DNS klīrens un alternatīvi karcinogēzes mehānismi.

Šajā pētījumā tika identificēts ievērojams skaits p16-/CPV+ paraugu BPŠK un HFPŠK pacientiem, kas liecina, ka p16 nevar tikt pilnvērtīgi izmantots kā CPV infekcijas surrogātmārķieris šajos vēža veidos (Lewis et al., 2017). Tomēr daži autori ierosina, ka AR-CPV infekcija varētu veicināt balsenes karcinogēzi ar vīrusa DNS integrāciju saimnieka šūnas genomā, kas izraisa palielinātu p16 ekspresiju (Torrente et al., 2011).

Šajā pētījumā tika izmantots plašs CPV specifisko testu klāsts, tostarp PĶR, p16 un E6/E7 onkoproteīnu IHĶ. Neraugoties uz stiprajām pusēm, ierobežojumi ietver salīdzinoši nelielu paraugu skaitu, datu trūkumu par CPV mRNS klātbūtni un novēroto dzimuma un audzēju stadiju nelīdzsvarotību, lai gan tie būtiski neietekmēja kopējos rezultātus.

5.4. CPV infekcija būtiski ietekmē gan OFPŠK pacientu, gan ar ne-OFPŠK pacientu izdzīvotību. AR-CPV E6 proteīna IHĶ noteikšana kalpo kā ērts prognostisks faktors GKPŠK (prospektīvās daļas trešā publikācija)

Šī pētījuma mērķis bija novērtēt CPV infekcijas un ar to saistīto marķieru, tostarp p16, p53, CPV16 E6/E7 onkoproteīnu, CPV DNS un E6/E7 mRNS klātbūtnes ietekmi uz pacientu izdzīvošanu. Kaplana-Meijera izdzīvotības analīze atklāja, ka ne tikai AR-CPV, bet arī ZR-CPV infekcija varētu ietekmēt pacientu ar OFPŠK un BPŠK izdzīvošanu. Aptuveni vienai trešdaļai pacientu bija iespējama ZR-CPV infekcija. Pētījuma rezultāti liecina, ka pacientiem ar CPV DNS pozitīvu OFPŠK un BPŠK ir labāka piecu gadu KI un SSI. Šie rezultāti saskan ar pētījumiem, kas liecina par labākiem izdzīvotības rādītājiem pacientiem ar GKPŠK un aukslēju mandeļu vēzi, ja viņu audzējos konstatēta CPV DNS (Fakhry et al., 2008; Attner et al., 2012). Iespējamais šā novērojuma skaidrojums ir tāds, ka CPV pozitīvie audzēji ir jutīgāki pret staru terapiju, kas ļauj veikt mazāk agresīvu ārstēšanu un pacientiem nodrošināt labākus iznākus (Attner et al., 2012). Turklāt ar CPV inficētās šūnas varētu būt vieglāk atpazīstamas imūnsistēmai, tādējādi atvieglojot to identificēšanu un iznīcināšanu.

Pētījumi konsekventi liecina par labākiem trīs un piecu gadu izdzīvotības rādītājiem CPV pozitīviem OFPŠK gadījumiem salīdzinājumā ar CPV negatīviem gadījumiem (You et al., 2019). Lai gan šī vienprātība galvenokārt attiecināma uz AR-CPV tipiem, jo īpaši CPV16 un 18, vairāki pētījumi liecina,

ka CPV pozitīviem BPŠK audzējiem nav būtisku izdzīvotības uzlabojumu (Ahmadi et al., 2018; Hughes et al., 2019). Tomēr jaunākie dati, tostarp šis pētījums, atklāj labākus izdzīvotības rezultātus pacientiem ar CPV pozitīvu BPŠK (H. Wang et al., 2019).

Turpretī šajā pētījumā galvenā uzmanība tika pievērsta pacientu ar GKPŠK stratifikācijai, pamatojoties uz primārā audzēja atrašanās vietu un konkrētu CPV tipu noteikšanu. Mēs atklājām, ka CPV16 DNS klātbūtne HFPŠK gadījumos ievērojami samazināja pacientu izdzīvotības rādītājus, kas varētu liecināt par nozīmīgu CPV16 lomu HFPŠK attīstībā. Tomēr jāņem vērā arī imunoloģiskie aspekti. Vīrusu antigēnu klātbūtne potenciāli varētu stimulēt pretvēža imūnās atbildes reakcijas, kas uzlabotu pacientu izdzīvotības rādītājus (Masterson et al., 2016; Cillo et al., 2020).

Šajā pētījumā, izmantojot vienfaktora izdzīvotības analīzi, tika atkārtoti apstiprināta p16 prognozējošā loma OFPŠK, kas saskan ar iepriekš veiktajiem pētījumiem (Wendt et al., 2021). Koksas regresijas analīze apstiprināja, ka p16 ir statistiski nozīmīgs OFPŠK prognozējošs rādītājs. Lai gan HFPŠK un BPŠK vienfaktora analīze neapstiprināja šo saistību, Koksas regresija liecināja par labāku izdzīvotību un samazinātu nāves risku p16+ HFPŠK, norādot uz to kā iespējamu prognozējošo marķieri. Tas saskan ar citu pētījumu rezultātiem (Tribius et al., 2018; Shi et al., 2022). Saistība starp p16 un CPV aktivitāti ne-OFPŠK izraisa jautājumus par tā izmantošanu kā surogātmarķieri CPV infekcijai un tā piemērotību izdzīvotības prognozei. Pētījumi liecina, ka p16 hiperekspressija bieži vien neatbilst CPV statusam ne-orofaringeālā vēža gadījumā, taču tam ir prognostiska vērtība attiecībā uz izdzīvotību (Sánchez Barrueco et al., 2019; Gallus et al., 2022).

Vienfaktora izdzīvotības analīze attiecībā uz p53 IHĶ ekspresiju parādīja ievērojami labāku KI un SSI pacientiem ar p53– HFPŠK, ko varētu skaidrot ar AR-CPV E6 proteīna nomācošo darbību atšķirībā no Koksas regresijas analīzes,

tomēr bez statistiskas nozīmības. OFPŠK pacientu Koksas regresijas analīze rādīja, ka p53 hiperekspresija bija saistīta ar ievērojami mazāku nomiršanas risku. Šo novērojumu varētu skaidrot ar p53 audzēju nomācošajām īpašībām. Tomēr OFPŠK bija ievērojams skaits CPV16+ paraugu, tostarp CPV16 E6/E7 mRNS pozitīvu paraugu. Ir loģiski sagaidīt, ka CPV izraisītā vēža gadījumā p53 tiks nomākts, kas atspoguļojas kā p53– IHĶ rezultāts. Publicētie dati liecina, ka CPV izraisītos audzējos vērojama p53 nomākšana (S. Wang et al., 2021). Turpretī vairākos pētījumos ziņots, ka p53 hiperekspresija korelē ar labāku atbildes reakciju uz ķīmijterapiju un ir saistīta ar labāku izdzīvotību (Hasegawa et al., 2018; Sun et al., 2021). Tomēr šajos pētījumos netika pētīts CPV statuss. Sākotnēji CPV izraisītā vēža gadījumā p53 hiperekspresija varētu būt saistīta ar *pRb* degradāciju, ko izraisa E7 onkoproteīns, kā rezultātā palielinās p53 stabilizācija (Howie et al., 2009). Metaanalīze par mēles plakanšūnu karcinomu liecina, ka p53 nevar izmantot kā šo audzēju prognostisku biomarkieri (Almangush et al., 2017). Līdzīgus secinājumus *Halec* ar kolēģiem izdarīja arī par BPŠK (Halec et al., 2013). Diemžēl mūsu pētījumā netika vērtētas TP53 gēna mutācijas, kas varētu sniegt skaidrību par iepriekš minētajiem jautājumiem (Zhou et al., 2016). Turklāt pastāv iespēja, ka p53 hiperekspresija nav saistīta ar CPV infekciju, īpaši ņemot vērā lielo smēķētāju skaitu mūsu pētījumā. Nepieciešami turpmāki pētījumi, lai izpētītu p53 prognostisko nozīmi GKPŠK, īpaši OFPŠK un HFPŠK.

Cik mums zināms, ir maz pētījumu, kuros raksturota CPV E6/E7 onkoproteīnu IHĶ ekspresija un to nozīme izdzīvotības vai nomiršanas riska izvērtēšanā. Gan OFPŠK, gan HFPŠK gadījumā IHĶ rezultāti atklāja, ka CPV16 E6 proteīna imūnpozitivitāte audzēja paraugos bija saistīta ar labākiem izdzīvotības rādītājiem. Tomēr tika novērots, ka augsta p16 vai p53 ekspresija bieži vien sakrita ar E6 ekspresiju, ko varētu uzskatīt par pozitīvu rezultātu marķieri pacientiem. Turklāt pastāv iespēja, ka E6 onkogēnam nav bijis

pietiekami daudz laika, lai izjauktu šūnu ciklu. Piemēram, E6 iniciē no proteasomām atkarīgu p53 noārdīšanu, piesaistot ubikvitīna ligāzi E6AP. Turklāt tikai E6 un E6AP kombinētais komplekss var mijiedarboties ar p53. Tas nozīmē, ka atsevišķa CPV16 E6 proteīna ekspresija var neietekmēt p53 degradāciju, padarot tā noteikšanu mazāk informatīvu, lai prognozētu pacientu iznākumu (Li et al., 2019). Diemžēl šajā pētījumā netika vērtēta E6AP aktivitāte. Tomēr pacientiem ar HFPSK, veicot IHK, tika konstatēta E6 proteīna imūnekspresija audzēja audos, bet E6 mRNS netika konstatēta un CPV16 DNS joprojām bija nosakāma. Šis atklājums var netieši norādīt uz persistējošu CPV16 infekciju, kas varētu būt viens no iemesliem, kāpēc CPV16 DNS klātbūtne HFPSK paraugos bija saistīta ar sliktākiem rezultātiem.

Pamatojoties uz mutāciju analizēm, E7 tiek uzskatīts par AR-CPV galveno transformējošo proteīnu (Basukala & Banks, 2021). Turklāt ir pierādīts, ka E7 ir izšķiroša nozīme agrīnā karcinogēnēzes procesā (Song et al., 2000). Šis pētījums parādīja, ka CPV16 E7 proteīna hiperekspresija OFPSK ir saistīta ar sliktāku prognozi, izmantojot Koksas regresijas analīzi. Tomēr paredzams, ka ar CPV saistītos audzējos E7 olbaltumviela ir virzošais faktors p16 hiperekspresijai, kas ir saistīta ar labāku izdzīvošanu. No otras puses, daži pētījumi liecina, ka p16 hiperekspresija konsekventi korelē ar labvēlīgu atbildes reakciju uz terapiju un labākiem klīniskajiem rezultātiem OFPSK un ne visos gadījumos p16 hiperekspresiju var saistīt ar CPV onkogēnu aktivitāti (Rich et al., 2009; Fischer et al., 2010). Tas liecina, ka ar E7 proteīnu saistītā karcinogēnēzē pastāv papildu mehānismi. Vairākos pētījumos ir pierādīts, ka E7 izraisa dažādu matricas metaloproteināžu augšupregulāciju (Menges et al., 2006; Srivastava et al., 2015), kas ir saistītas ar audzēju invazivitātes veicināšanu (Basukala et al., 2019). Turklāt AR-CPV E7 proteīna funkcija ir saistīta ar stabilāku mitotisko funkciju, kas nepieciešama vīrusu genoma uzturēšanai un replikācijai (Yu & Munger, 2013). Šie procesi varētu veicināt invazīvu un potenciāli metastātisku vēža

fenotipu, tādējādi izskaidrojot sliktāku prognozi, kas novērota OFPŠK ar IHĶ CPV16 E7 proteīna ekspresiju (Basukala & Banks, 2021). *Oton-Gonzalez* ar kolēģiem atklāja, ka OFPŠK pacientiem ar nosakāmu CPV16 E7 proteīnu serumā bija sliktāka kopējā un bezrecidīvu izdzīvotība. Autori arī konstatēja korelāciju starp E7 proteīna līmeni serumā un E7 mRNS ekspresiju, kas ļāva viņiem secināt, ka E7 proteīna avotam jābūt CPV16 pozitīvam vāzīm, īpaši cirkulējošām audzēja šūnām, kas norāda uz metastātisku procesu (*Oton-Gonzalez et al.*, 2021). Ir svarīgi atzīmēt, ka ne visi audzēji ir saistīti ar CPV un ir pierādīts, ka vīrusa izraisīta onkoģenēze attīstās ilgstoši un dažiem pacientiem ar GKPŠK var būt vienlaikus CPV infekcija (Basukala & Banks, 2021).

Viens no šī pētījuma ierobežojumiem ir salīdzinoši neliels pacientu skaits katrā grupā (*oropharynx*, balsene un *hypopharynx*), kas var mazināt statistisko jaudu un ierobežot secinājumus, jo īpaši attiecībā uz marķieriem, kas nesasniedza statistisko nozīmību. Tomēr ir grūti neņemt vērā novērotās tendences attiecībā uz pētītajiem marķieriem un to ietekmi uz izdzīvošanu. Vēl viens ierobežojums ir tas, ka gandrīz visi HFPŠK paraugi bija FFPI, kas potenciāli varēja izraisīt ģenētiskā materiāla, īpaši RNS, degradāciju. Tomēr visi paraugi bija piemēroti analīzei, pamatojoties uz mRNS noteikšanai izmantotā testā esošo iekšējo kontroli vai β -globīna gēna noteikšanu DNS kvalitātes novērtēšanai.

Secinājumi

1. Pacienti ar mazāku primāro audzēju, bez lokoreģionālo limfmezglu iesaistes, bez kaitīgiem ieradumiem (smēķēšana, pārmērīga alkohola lietošana), kā arī pacientiem, kuriem ārstēšanas ietvaros tika veikta ķirurģiska iejaukšanās, tika novērota labāka KI un SSI, kā arī zemākas riska attiecības.
2. CPV infekcijai ir ievērojama ietekme uz GKPŠK attīstību, īpaši OFPŠK gadījumā. Ne tikai AR-CPV, bet arī ZR-CPV var ietekmēt BPŠK un OFPŠK pacientu izdzīvotību.
3. Reālā laika PQR testi, kas amplificē mazākus DNS fragmentus, ir labi un uzticami CPV ģenētiskā materiāla noteikšanai FFPI paraugos.
4. CPV16 genotips ir plaši izplatīts ne tikai orofaringeālā, bet arī balsenes un hipofaringeālā vēža gadījumos, kas apstiprināts ar CPV PQR testiem.
5. OFPŠK tika apstiprināta mērena korelācija starp E6/E7 mRNS klātbūtni paraugā un CPV16 vīrusa slodzi, savukārt šī korelācija netika novērota neorofaringeālo vēžu gadījumos.
6. CPV E6/E7 onkoproteīnu ekspresijas trūkums CPV DNS pozitīvos audzējos liecina par alternatīvu, no vīrusu integrācijas atšķirīgu audzēju veidošanās mehānismu esamību.
7. p16 hiperekspresija ir saistīta ar labākiem izdzīvotības rezultātiem un zemāku riska attiecību ne tikai pacientiem ar OFPŠK, bet arī pacientiem ar HFPŠK. P53 ekspresijas kā prognostiskā rādītāja izmantošana pacientiem ar GKPŠK joprojām ir diskutabla un neskaidra. CPV16 E6 proteīna ekspresijas novērtēšana, izmantojot IHK, ir vērtīgs prognostisks rādītājs gan OFPŠK, gan HFPŠK gadījumā.

Publikācijas un ziņojumi par promocijas darba tēmu

Publikācijas:

1. Lifšics, A., Rate, E., Tārs, J., Murovska, M., & Groma, V. (2019). Smoking and alcohol abuse – predictive factors in oropharyngeal squamous cell carcinoma: A retrospective study. SHS Web of Conferences, 68 02013. <https://doi.org/10.1051/shsconf/20196802013>.
2. Lifšics, A., Rate, E., Ivanova, A., Tars, J., Murovska, M., & Groma, V. (2020). Survival analysis of oropharyngeal squamous cell carcinoma patients linked to histopathology, disease stage, tumor stage, risk factors, and received therapy. *Experimental oncology*. 42(1), 51–59. <https://doi.org/10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-42-no-1.14147>.
3. Lifšics, A., Čistjakovs, M., Groma, V. & Murovska, M. (2021). Detection and Genotyping of Human Papillomavirus in Hypopharyngeal Carcinoma Samples. Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B. *Natural, Exact, and Applied Sciences*. 75(1), 11–15. <https://doi.org/10.2478/prolas-2021-0002>.
4. Lifšics, A., Groma, V., Cistjakovs, M., Skuja, S., Deksnis, R., & Murovska, M. (2021). Identification of High-Risk Human Papillomavirus DNA, p16, and E6/E7 Oncoproteins in Laryngeal and Hypopharyngeal Squamous Cell Carcinomas. *Viruses*. 13(6), 1008. <https://doi.org/10.3390/v13061008>.
5. Lifšics, A., Cistjakovs, M., Sokolovska, L., Deksnis, R., Murovska, M., & Groma, V. (2023). The Role of the p16 and p53 Tumor Suppressor Proteins and Viral HPV16 E6 and E7 Oncoproteins in the Assessment of Survival in Patients with Head and Neck Cancers Associated with Human Papillomavirus Infections. *Cancers*. 15(10), 2722. <https://doi.org/10.3390/cancers15102722>.

Ziņojumi un tēzes starptautiskos kongresos un konferencēs:

1. Lifšics, A., Tārs, J., Ivanova, A., Safronovs, J., Groma, V., Murovska, M. Survival rates of patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma at Riga East Clinical University Hospital. 2016. gada zinātniskās konferences tēzes (Rīga, 2016. g. 17.–18. martā) / Rīgas Stradiņa universitāte. Rīga, 2016. 214. (Stenda referāts)
2. Lifšics, A., Veinberga, L., Groma, V., Rāte, E., and Murovska, M. The prevalence of high-risk HPV in patients with oropharyngeal, hypopharyngeal, and laryngeal squamous cell carcinomas. RSU Scientific Conference (Rīga, 22–23 March 2018): Abstracts. Rīga: RSU, IX, 98. (Stenda referāts)
3. Sokolovska, L., Čistjakovs, M., Sultanova, A., Lifšics, A., Čapenko, S., and Murovska, M. Detection of High-risk Human Papillomaviruses Type Frequency and Viral Load in Latvian Patients with Laryngeal/Oropharyngeal Cancer. RSU Scientific Conference (Rīga, 22–23 March 2018): Abstracts. Rīga: RSU, IV, 39. (Mutisks referāts)

4. Lifšics, A., Groma, V., and Murovska, M. 2018. Smoking and alcohol abuse – predictive factors in oropharyngeal squamous cell carcinoma (a retrospective study). 7th International Interdisciplinary Scientific Conference “Society. Health. Welfare: Contemporary Social Dynamics and Welfare: Urban and Rural Development Perspectives” (Rīga, 10–12 October 2018): Abstracts. Rīga: RSU, 79. (Mutisks referāts)
5. Lifšics, A., Cistjakovs, M., Groma, V., Murovska, M. Detection and genotyping of human papillomavirus in hypopharyngeal carcinoma samples. Rīga Stradiņš University International Research Conference on Medical and Health Care Sciences “Knowledge for Use in Practice” (Rīga, 24–26 March 2021): Abstracts. Rīga: RSU, xix, 249. (Mutisks referāts)

Literatūras saraksts

1. Ahmadi, N., Ahmadi, N., Chan, M. V., Huo, Y. R., Sritharan, N., & Chin, R. (2018). Laryngeal Squamous Cell Carcinoma Survival in the Context of Human Papillomavirus: A Systematic Review and Meta-analysis. *Cureus*, 10(2), e2234. <https://doi.org/10.7759/cureus.2234>
2. Al-Mamgani, A., van Werkhoven, E., Navran, A., Karakullukcu, B., Hamming-Vrieze, O., Machiels, M., van der Velden, L.-A., Vogel, W. V., & Klop, W. M. (2017). Contralateral regional recurrence after elective unilateral neck irradiation in oropharyngeal carcinoma: A literature-based critical review. *Cancer Treatment Reviews*, 59, 102–108. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2017.07.004>
3. Almangush, A., Heikkinen, I., Mäkitie, A. A., Coletta, R. D., Läärä, E., Leivo, I., & Salo, T. (2017). Prognostic biomarkers for oral tongue squamous cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *British Journal of Cancer*, 117(6), 856–866. <https://doi.org/10.1038/bjc.2017.244>
4. Andrews, E., Seaman, W. T., & Webster-Cyriaque, J. (2009). Oropharyngeal carcinoma in non-smokers and non-drinkers: A role for HPV. *Oral Oncology*, 45(6), 486–491. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2008.07.008>
5. Attner, P., Näsman, A., Du, J., Hammarstedt, L., Ramqvist, T., Lindholm, J., Munck-Wikland, E., Dalianis, T., & Marklund, L. (2012). Survival in patients with human papillomavirus positive tonsillar cancer in relation to treatment. *International Journal of Cancer*, 131(5), 1124–1130. <https://doi.org/10.1002/ijc.26490>
6. Augustin, J. G., Lepine, C., Morini, A., Brunet, A., Veyer, D., Brochard, C., Mirghani, H., Péré, H., & Badoual, C. (2020). HPV Detection in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas: What Is the Issue? *Frontiers in Oncology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01751>
7. Baasland, I., Romundstad, P. R., Eide, M. L., & Jonassen, C. M. (2019). Clinical performance of Anyplex II HPV28 by human papillomavirus type and viral load in a referral population. *PLoS ONE*, 14(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210997>
8. Basukala, O., & Banks, L. (2021). The Not-So-Good, the Bad and the Ugly: HPV E5, E6 and E7 Oncoproteins in the Orchestration of Carcinogenesis. *Viruses*, 13(10), 1892. <https://doi.org/10.3390/v13101892>
9. Basukala, O., Mittal, S., Massimi, P., Bestagno, M., & Banks, L. (2019). The HPV-18 E7 CKII phospho acceptor site is required for maintaining the transformed phenotype of cervical tumour-derived cells. *PLoS Pathogens*, 15(5), e1007769. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007769>
10. Beck, T. N., Smith, C. H., Flieder, D. B., Galloway, T. J., Ridge, J. A., Golemis, E. A., & Mehra, R. (2017). Head and neck squamous cell carcinoma: Ambiguous human papillomavirus status, elevated p16, and deleted retinoblastoma 1. *Head & Neck*, 39(3), E34–E39. <https://doi.org/10.1002/hed.24604>

11. Berezutskaya, E., & Bagchi, S. (1997). The human papillomavirus E7 oncoprotein functionally interacts with the S4 subunit of the 26 S proteasome. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(48), 30135–30140. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.48.30135>
12. Bishop, J. A., Lewis, J. S., Rocco, J. W., & Faquin, W. C. (2015). HPV-related squamous cell carcinoma of the head and neck: An update on testing in routine pathology practice. *Seminars in Diagnostic Pathology*, 32(5), 344–351. <https://doi.org/10.1053/j.semdp.2015.02.013>
13. Boyer, S. N., Wazer, D. E., & Band, V. (1996). E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. *Cancer Research*, 56(20), 4620–4624.
14. Brand, T. M., Hartmann, S., Bhola, N. E., Li, H., Zeng, Y., O’Keefe, R. A., Ranall, M. V., Bandyopadhyay, S., Soucheray, M., Krogan, N. J., Kemp, C., Duvvuri, U., LaVallee, T., Johnson, D. E., Ozbun, M. A., Bauman, J. E., & Grandis, J. R. (2018). Cross-talk Signaling between HER3 and HPV16 E6 and E7 Mediates Resistance to PI3K Inhibitors in Head and Neck Cancer. *Cancer Research*, 78(9), 2383–2395. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-1672>
15. Brandwein-Gensler, M., Teixeira, M. S., Lewis, C. M., Lee, B., Rolnitzky, L., Hille, J. J., Genden, E., Urken, M. L., & Wang, B. Y. (2005). Oral squamous cell carcinoma: Histologic risk assessment, but not margin status, is strongly predictive of local disease-free and overall survival. *The American Journal of Surgical Pathology*, 29(2), 167–178. <https://doi.org/10.1097/01.pas.0000149687.90710.21>
16. Carlos de Vicente, J., Junquera Gutiérrez, L. M., Zapatero, A. H., Fresno Forcelledo, M. F., Hernández-Vallejo, G., & López Arranz, J. S. (2004). Prognostic significance of p53 expression in oral squamous cell carcinoma without neck node metastases. *Head & Neck*, 26(1), 22–30. <https://doi.org/10.1002/hed.10339>
17. Castellsagué, X., Alemany, L., Quer, M., Halc, G., Quirós, B., Tous, S., Clavero, O., Alòs, L., Biegner, T., Szafarowski, T., Alejo, M., Holzinger, D., Cadena, E., Claros, E., Hall, G., Laco, J., Poljak, M., Benevolo, M., Kasamatsu, E., ... ICO International HPV in Head and Neck Cancer Study Group. (2016). HPV Involvement in Head and Neck Cancers: Comprehensive Assessment of Biomarkers in 3680 Patients. *Journal of the National Cancer Institute*, 108(6), djv403. <https://doi.org/10.1093/jnci/djv403>
18. Chaturvedi, A. K., Anderson, W. F., Lortet-Tieulent, J., Curado, M. P., Ferlay, J., Franceschi, S., Rosenberg, P. S., Bray, F., & Gillison, M. L. (2013). Worldwide trends in incidence rates for oral cavity and oropharyngeal cancers. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 31(36), 4550–4559. <https://doi.org/10.1200/JCO.2013.50.3870>
19. Chaturvedi, A. K., Engels, E. A., Pfeiffer, R. M., Hernandez, B. Y., Xiao, W., Kim, E., Jiang, B., Goodman, M. T., Sibug-Saber, M., Cozen, W., Liu, L., Lynch, C. F., Wentzensen, N., Jordan, R. C., Altekruise, S., Anderson, W. F., Rosenberg, P. S., &

- Gillison, M. L. (2011). Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 29(32), 4294–4301. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.36.4596>
20. Chi, J., Preeshagul, I. R., Sheikh-Fayyaz, S., Teckie, S., Kohn, N., Ziemba, Y., Laser, A., Frank, D., Ghaly, M., Kamdar, D., Kraus, D., Paul, D., & Seetharamu, N. (2020). Evaluating of HPV–DNA ISH as an adjunct to p16 testing in oropharyngeal cancer. *Future Science OA*, 6(9). <https://doi.org/10.2144/fsoa-2020-0052>
 21. Cillo, A. R., Kürten, C. H., Tabib, T., Qi, Z., Onkar, S., Wang, T., Liu, A., Duvvuri, U., Kim, S., Soose, R. J., Oesterreich, S., Chen, W., Lafyatis, R., Bruno, T. C., Ferris, R. L., & Vignali, D. A. (2020). Immune landscape of viral- and carcinogen-driven head and neck cancer. *Immunity*, 52(1), 183–199.e9. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.11.014>
 22. Cohan, D. M., Papat, S., Kaplan, S. E., Rigual, N., Loree, T., & Hicks, W. L. (2009). Oropharyngeal cancer: Current understanding and management. *Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery*, 17(2), 88–94. <https://doi.org/10.1097/moo.0b013e32832984c0>
 23. Deneka, A. Y., Baca, Y., Serebriiskii, I. G., Nicolas, E., Parker, M. I., Nguyen, T. T., Xiu, J., Korn, W. M., Demeure, M. J., Wise-Draper, T., Sukari, A., Burtneess, B., & Golemis, E. A. (2022). Association of TP53 and CDKN2A mutation profile with tumor mutation burden (TMB) in head and neck cancer. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 28(9), 1925–1937. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-21-4316>
 24. Dovšak, T., Ihan, A., Didanovič, V., Kansky, A., Verdenik, M., & Hren, N. I. (2018). Effect of surgery and radiotherapy on complete blood count, lymphocyte subsets and inflammatory response in patients with advanced oral cancer. *BMC Cancer*, 18(1), 235. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4136-9>
 25. D’Souza, G., Kreimer, A. R., Viscidi, R., Pawlita, M., Fakhry, C., Koch, W. M., Westra, W. H., & Gillison, M. L. (2007). Case–Control Study of Human Papillomavirus and Oropharyngeal Cancer. *New England Journal of Medicine*, 356(19), 1944–1956. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa065497>
 26. Du, E., Mazul, A. L., Farquhar, D., Brennan, P., Anantharaman, D., Abedi-Ardekani, B., Weissler, M. C., Hayes, D. N., Olshan, A. F., & Zevallos, J. P. (2019). Long-term Survival in Head and Neck Cancer: Impact of Site, Stage, Smoking, and Human Papillomavirus Status. *The Laryngoscope*, 129(11), 2506–2513. <https://doi.org/10.1002/lary.27807>
 27. Duvvuri, U., Seethala, R. R., & Chiosea, S. (2014). Margin assessment in oral squamous cell carcinoma. *Cancer*, 120(3), 452–453. <https://doi.org/10.1002/cncr.28432>
 28. Ernoux-Neufcoeur, P., Arafa, M., Decaestecker, C., Duray, A., Rimmelink, M., Leroy, X., Herfs, M., Somja, J., Depuydt, C. E., Delvenne, P., & Saussez, S. (2011).

- Combined analysis of HPV DNA, p16, p21 and p53 to predict prognosis in patients with stage IV hypopharyngeal carcinoma. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 137(1), 173–181. <https://doi.org/10.1007/s00432-010-0871-2>
29. Fakhry, C., Westra, W. H., Li, S., Cmelak, A., Ridge, J. A., Pinto, H., Forastiere, A., & Gillison, M. L. (2008). Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *Journal of the National Cancer Institute*, 100(4), 261–269. <https://doi.org/10.1093/jnci/djn011>
 30. Farsi, N. J., Rousseau, M.-C., Schlecht, N., Castonguay, G., Allison, P., Nguyen-Tan, P. F., Soulières, D., Coutlée, F., Hier, M., Madathil, S., Franco, E. L., & Nicolau, B. (2017). Aetiological heterogeneity of head and neck squamous cell carcinomas: The role of human papillomavirus infections, smoking and alcohol. *Carcinogenesis*, 38(12), 1188–1195. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgx106>
 31. Fasunla, A. J., Greene, B. H., Timmesfeld, N., Wiegand, S., Werner, J. A., & Sesterhenn, A. M. (2011). A meta-analysis of the randomized controlled trials on elective neck dissection versus therapeutic neck dissection in oral cavity cancers with clinically node-negative neck. *Oral Oncology*, 47(5), 320–324. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2011.03.009>
 32. Fischer, C. A., Zlobec, I., Green, E., Probst, S., Storck, C., Lugli, A., Tornillo, L., Wolfensberger, M., & Terracciano, L. M. (2010). Is the improved prognosis of p16 positive oropharyngeal squamous cell carcinoma dependent of the treatment modality? *International Journal of Cancer*, 126(5), 1256–1262. <https://doi.org/10.1002/ijc.24842>
 33. Gallus, R., Gheit, T., Holzinger, D., Petrillo, M., Rizzo, D., Petrone, G., Miccichè, F., Mattiucci, G. C., Arciuolo, D., Capobianco, G., Delogu, G., Valentini, V., Tommasino, M., & Bussu, F. (2022). Prevalence of HPV Infection and p16INK4a Overexpression in Surgically Treated Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. *Vaccines*, 10(2), 204. <https://doi.org/10.3390/vaccines10020204>
 34. Gillison, M. L., Chaturvedi, A. K., Anderson, W. F., & Fakhry, C. (2015). Epidemiology of Human Papillomavirus-Positive Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*, 33(29), 3235–3242. <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.61.6995>
 35. Gillison, M. L., Trotti, A. M., Harris, J., Eisbruch, A., Harari, P. M., Adelstein, D. J., Jordan, R. C. K., Zhao, W., Sturgis, E. M., Burtness, B., Ridge, J. A., Ringash, J., Galvin, J., Yao, M., Koyfman, S. A., Blakaj, D. M., Razaq, M. A., Colevas, A. D., Beitler, J. J., ... Le, Q. T. (2019). Radiotherapy plus cetuximab or cisplatin in human papillomavirus-positive oropharyngeal cancer (NRG Oncology RTOG 1016): A randomised, multicentre, non-inferiority trial. *Lancet (London, England)*, 393(10166), 40–50. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32779-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32779-X)
 36. Gormley, M., Creaney, G., Schache, A., Ingarfield, K., & Conway, D. I. (2022). Reviewing the epidemiology of head and neck cancer: Definitions, trends and risk

- factors. *British Dental Journal*, 233(9), 780–786. <https://doi.org/10.1038/s41415-022-5166-x>
37. Halec, G., Holzinger, D., Schmitt, M., Flechtenmacher, C., Dychhoff, G., Lloveras, B., Höfler, D., Bosch, F. X., & Pawlita, M. (2013). Biological evidence for a causal role of HPV16 in a small fraction of laryngeal squamous cell carcinoma. *British Journal of Cancer*, 109(1), 172–183. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.296>
 38. Hasegawa, Y., Goto, M., Hanai, N., Ozawa, T., & Hirakawa, H. (2018). Predictive biomarkers for combined chemotherapy with 5-fluorouracil and cisplatin in oro- and hypopharyngeal cancers. *Molecular and Clinical Oncology*, 8(2), 378–386. <https://doi.org/10.3892/mco.2017.1521>
 39. Hashibe, M., Brennan, P., Chuang, S.-C., Boccia, S., Castellsague, X., Chen, C., Curado, M. P., Dal Maso, L., Daudt, A. W., Fabianova, E., Fernandez, L., Wunsch-Filho, V., Franceschi, S., Hayes, R. B., Herrero, R., Kelsey, K., Koifman, S., La Vecchia, C., Lazarus, P., ... Boffetta, P. (2009). Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: Pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 18(2), 541–550. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-08-0347>
 40. Hobbs, C. G. L., Sterne, J. a. C., Bailey, M., Heyderman, R. S., Birchall, M. A., & Thomas, S. J. (2006). Human papillomavirus and head and neck cancer: A systematic review and meta-analysis. *Clinical Otolaryngology: Official Journal of ENT-UK; Official Journal of Netherlands Society for Oto-Rhino-Laryngology & Cervico-Facial Surgery*, 31(4), 259–266. <https://doi.org/10.1111/j.1749-4486.2006.01246.x>
 41. Howie, H. L., Katzenellenbogen, R. A., & Galloway, D. A. (2009). Papillomavirus E6 proteins. *Virology*, 384(2), 324. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.11.017>
 42. Hughes, R. T., Beuerlein, W. J., O'Neill, S. S., Porosnicu, M., Lycan, T. W., Waltonen, J. D., Frizzell, B. A., & Greven, K. M. (2019). Human papillomavirus-associated squamous cell carcinoma of the larynx or hypopharynx: Clinical outcomes and implications for laryngeal preservation. *Oral Oncology*, 98, 20–27. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2019.09.008>
 43. Janecka-Widła, A., Mucha-Malecka, A., Majchrzyk, K., Halaszka, K., Przewoźnik, M., Slonina, D., & Biesaga, B. (2020). Active HPV infection and its influence on survival in head and neck squamous-cell cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 146(7), 1677–1692. <https://doi.org/10.1007/s00432-020-03218-6>
 44. Johnson, D. E., Burtneess, B., Leemans, C. R., Lui, V. W. Y., Bauman, J. E., & Grandis, J. R. (2020). Head and neck squamous cell carcinoma. *Nature Reviews. Disease Primers*, 6(1), 92. <https://doi.org/10.1038/s41572-020-00224-3>
 45. Jung, A. C., Briolat, J., Millon, R., Reyniès, A. de, Rickman, D., Thomas, E., Abecassis, J., Clavel, C., & Wasylyk, B. (2010). Biological and clinical relevance of transcriptionally active human papillomavirus (HPV) infection in oropharynx

- squamous cell carcinoma. *International Journal of Cancer*, 126(8), 1882–1894. <https://doi.org/10.1002/ijc.24911>
46. Kamran, S. C., Qureshi, M. M., Jalisi, S., Salama, A., Grillone, G., & Truong, M. T. (2018). Primary surgery versus primary radiation-based treatment for locally advanced oropharyngeal cancer. *The Laryngoscope*, 128(6), 1353–1364. <https://doi.org/10.1002/lary.26903>
 47. Karatzanis, A. D., Psychogios, G., Mantsopoulos, K., Zenk, J., Velegrakis, G. A., Waldfahrer, F., & Iro, H. (2012). Management of advanced carcinoma of the base of tongue. *Journal of Surgical Oncology*, 106(6), 713–718. <https://doi.org/10.1002/jso.23135>
 48. Kato, M. G., Baek, C.-H., Chaturvedi, P., Gallagher, R., Kowalski, L. P., Leemans, C. R., Warnakulasuriya, S., Nguyen, S. A., & Day, T. A. (2020). Update on oral and oropharyngeal cancer staging—International perspectives. *World Journal of Otorhinolaryngology – Head and Neck Surgery*, 6(1), 66–75. <https://doi.org/10.1016/j.wjorl.2019.06.001>
 49. Kawakita, D., Oze, I., Iwasaki, S., Matsuda, T., Matsuo, K., & Ito, H. (2022). Trends in the incidence of head and neck cancer by subsite between 1993 and 2015 in Japan. *Cancer Medicine*, 11(6), 1553–1560. <https://doi.org/10.1002/cam4.4539>
 50. Kotake, Y., Naemura, M., Murasaki, C., Inoue, Y., & Okamoto, H. (2015). *Transcriptional Regulation of the p16 Tumor Suppressor Gene*. *Anticancer Research*, 35(8), 4397–4401.
 51. Kumar, B., Cordell, K. G., Lee, J. S., Prince, M. E., Tran, H. H., Wolf, G. T., Urba, S. G., Worden, F. P., Chepeha, D. B., Teknos, T. N., Eisbruch, A., Tsien, C. I., Taylor, J. M. G., D’Silva, N. J., Yang, K., Kurnit, D. M., Bradford, C. R., & Carey, T. E. (2007). Response to therapy and outcomes in oropharyngeal cancer are associated with biomarkers including human papillomavirus, epidermal growth factor receptor, gender, and smoking. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 69(2 Suppl), S109–111. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2007.05.072>
 52. Kumar, B., Cordell, K. G., Lee, J. S., Worden, F. P., Prince, M. E., Tran, H. H., Wolf, G. T., Urba, S. G., Chepeha, D. B., Teknos, T. N., Eisbruch, A., Tsien, C. I., Taylor, J. M. G., D’Silva, N. J., Yang, K., Kurnit, D. M., Bauer, J. A., Bradford, C. R., & Carey, T. E. (2008). EGFR, p16, HPV Titer, Bcl-xL and p53, Sex, and Smoking As Indicators of Response to Therapy and Survival in Oropharyngeal Cancer. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 26(19), 3128–3137. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.12.7662>
 53. Kuper, H., Boffetta, P., & Adami, H.-O. (2002). Tobacco use and cancer causation: Association by tumour type. *Journal of Internal Medicine*, 252(3), 206–224. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2796.2002.01022.x>
 54. Lanzer, M., Zemann, W., Lübbers, H. T., Kruse, A., & Reinisch, S. (2012). Do patients with oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma benefit from elective

- contralateral neck dissection? A long-term analysis. *Head & Neck Oncology*, 4(3), Article 3. <https://doi.org/10.5167/uzh-70818>
55. Lewis, J. S., Jr, Beadle, B., Bishop, J. A., Chernock, R. D., Colasacco, C., Lacchetti, C., Moncur, J. T., Rocco, J. W., Schwartz, M. R., Seethala, R. R., Thomas, N. E., Westra, W. H., & Faquin, W. C. (2017). Human Papillomavirus Testing in Head and Neck Carcinomas: Guideline From the College of American Pathologists. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 142(5), 559–597. <https://doi.org/10.5858/arpa.2017-0286-CP>
 56. Li, S., Hong, X., Wei, Z., Xie, M., Li, W., Liu, G., Guo, H., Yang, J., Wei, W., & Zhang, S. (2019). Ubiquitination of the HPV Oncoprotein E6 Is Critical for E6/E6AP-Mediated p53 Degradation. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2483. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02483>
 57. Lifscics, A., Rate, E., Ivanova, A., Tars, J., Murovska, M., & Groma, V. (2020). Survival analysis of oropharyngeal squamous cell carcinoma patients linked to histopathology, disease stage, tumor stage, risk factors, and received therapy. *Experimental Oncology*, 42(1), 51–59. <https://doi.org/10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-42-no-1.14147>
 58. Lillsunde Larsson, G., Carlsson, J., Karlsson, M. G., & Helenius, G. (2015). Evaluation of HPV Genotyping Assays for Archival Clinical Samples. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 17(3), 293–301. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2014.12.004>
 59. Ling, W., Mijiti, A., & Moming, A. (2013). Survival pattern and prognostic factors of patients with squamous cell carcinoma of the tongue: A retrospective analysis of 210 cases. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery: Official Journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, 71(4), 775–785. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2012.09.026>
 60. Ludyga, N., Grünwald, B., Azimzadeh, O., Englert, S., Höfler, H., Tapio, S., & Aubele, M. (2012). Nucleic acids from long-term preserved FFPE tissues are suitable for downstream analyses. *Virchows Archiv*, 460(2), 131–140. <https://doi.org/10.1007/s00428-011-1184-9>
 61. Mallen-St Clair, J., Alani, M., Wang, M. B., & Srivatsan, E. S. (2016). Human papillomavirus in oropharyngeal cancer: The changing face of a disease. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1866(2), 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2016.07.005>
 62. Masterson, L., Lechner, M., Loewenbein, S., Mohammed, H., Davies-Husband, C., Fenton, T., Sudhoff, H., Jani, P., Goon, P., & Sterling, J. (2016). CD8+ T cell response to human papillomavirus 16 E7 is able to predict survival outcome in oropharyngeal cancer. *European Journal of Cancer* (Oxford, England: 1990), 67, 141–151. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2016.08.012>
 63. McBride, A. A., & Warburton, A. (2017). The role of integration in oncogenic progression of HPV-associated cancers. *PLoS Pathogens*, 13(4). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006211>

64. Menges, C. W., Baglia, L. A., Lapoint, R., & McCance, D. J. (2006). Human Papillomavirus Type 16 E7 Up-regulates AKT Activity through the Retinoblastoma Protein. *Cancer Research*, 66(11), 5555–5559. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0499>
65. Münger, K., Baldwin, A., Edwards, K. M., Hayakawa, H., Nguyen, C. L., Owens, M., Grace, M., & Huh, K. (2004). Mechanisms of Human Papillomavirus-Induced Oncogenesis. *Journal of Virology*, 78(21), 11451–11460. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.21.11451-11460.2004>
66. Münscher, A., Bussmann, L., Sehner, S., Knaack, S., Gliese, A., Tribius, S., Clauditz, T., & Lörincz, B. B. (2017). Survival analysis of 287 oropharyngeal squamous cell carcinoma patients in a single institution: A retrospective comparison of two consecutive time intervals with surgical and conservative treatment approaches. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology: Official Journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies (EUFOS): Affiliated with the German Society for Oto-Rhino-Laryngology – Head and Neck Surgery*, 274(8), 3211–3219. <https://doi.org/10.1007/s00405-017-4615-7>
67. Nathan, C.-A., Khandelwal, A. R., Wolf, G. T., Rodrigo, J. P., Mäkitie, A. A., Saba, N. F., Forastiere, A. A., Bradford, C. R., & Ferlito, A. (2022). TP53 mutations in head and neck cancer. *Molecular Carcinogenesis*, 61(4), 385–391. <https://doi.org/10.1002/mc.23385>
68. Ndiaye, C., Mena, M., Alemany, L., Arbyn, M., Castellsagué, X., Laporte, L., Bosch, F. X., de Sanjosé, S., & Trottier, H. (2014). HPV DNA, E6/E7 mRNA, and p16INK4a detection in head and neck cancers: A systematic review and meta-analysis. *The Lancet Oncology*, 15(12), 1319–1331. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70471-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70471-1)
69. Oton-Gonzalez, L., Rotondo, J. C., Lanzillotti, C., Mazzoni, E., Bononi, I., Iaquinta, M. R., Cerritelli, L., Malagutti, N., Ciorba, A., Bianchini, C., Pelucchi, S., Tognon, M., & Martini, F. (2021). Serum HPV16 E7 Oncoprotein Is a Recurrence Marker of Oropharyngeal Squamous Cell Carcinomas. *Cancers*, 13(13), 3370. <https://doi.org/10.3390/cancers13133370>
70. Pal, A., & Kundu, R. (2019). Human Papillomavirus E6 and E7: The Cervical Cancer Hallmarks and Targets for Therapy. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03116>
71. Pitchers, M., & Martin, C. (2006). Delay in referral of oropharyngeal squamous cell carcinoma to secondary care correlates with a more advanced stage at presentation, and is associated with poorer survival. *British Journal of Cancer*, 94(7), 955–958. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603044>
72. Psychogios, G., Mantsopoulos, K., Bohr, C., Koch, M., Zenk, J., & Iro, H. (2013). Incidence of occult cervical metastasis in head and neck carcinomas: Development over time. *Journal of Surgical Oncology*, 107(4), 384–387. <https://doi.org/10.1002/jso.23221>

73. Rich, J. T., Milov, S., Lewis, J. S., Thorstad, W. L., Adkins, D. R., & Haughey, B. H. (2009). Transoral Laser Microsurgery (TLM) ± Adjuvant Therapy for Advanced Stage Oropharyngeal Cancer: Outcomes and Prognostic Factors. *The Laryngoscope*, 119(9), 10.1002/lary.20552. <https://doi.org/10.1002/lary.20552>
74. Rodrigues, L. C., Speck, N. M. de G., Focchi, G. R. de A., Schmidt, M. A., Marques, R. M., & Ribalta, J. C. L. (2016). Immunoexpression of HPV 16/18 E6 and E7 oncoproteins in high-grade cervical squamous intraepithelial lesions in HIV-positive women. *Genetics and Molecular Research: GMR*, 15(1). <https://doi.org/10.4238/gmr.15017220>
75. Sánchez Barrueco, A., González Galán, F., Villacampa Aubá, J. M., Díaz Tapia, G., Fernández Hernández, S., Martín-Arriscado Arroba, C., Cenjor Español, C., & Almodóvar Álvarez, C. (2019). P16 Influence on Laryngeal Squamous Cell Carcinoma Relapse and Survival. *Otolaryngology – Head and Neck Surgery: Official Journal of American Academy of Otolaryngology – Head and Neck Surgery*, 160(6), 1042–1047. <https://doi.org/10.1177/0194599818821910>
76. Saraiya, M., Unger, E. R., Thompson, T. D., Lynch, C. F., Hernandez, B. Y., Lyu, C. W., Steinau, M., Watson, M., Wilkinson, E. J., Hopenhayn, C., Copeland, G., Cozen, W., Peters, E. S., Huang, Y., Saber, M. S., Altekruse, S., & Goodman, M. T. (2015). US Assessment of HPV Types in Cancers: Implications for Current and 9-Valent HPV Vaccines. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 107(6). <https://doi.org/10.1093/jnci/djv086>
77. Schache, A. G., Powell, N. G., Cuschieri, K. S., Robinson, M., Leary, S., Mehanna, H., Rapozo, D., Long, A., Cubie, H., Junor, E., Monaghan, H., Harrington, K. J., Nutting, C. M., Schick, U., Lau, A. S., Upile, N., Sheard, J., Brougham, K., West, C. M. L., ... Jones, T. M. (2016). HPV-Related Oropharynx Cancer in the United Kingdom: An Evolution in the Understanding of Disease Etiology. *Cancer Research*, 76(22), 6598–6606. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-0633>
78. Senga, S. S., & Grose, R. P. (2021). Hallmarks of cancer-the new testament. *Open Biology*, 11(1), 200358. <https://doi.org/10.1098/rsob.200358>
79. Sharkey Ochoa, I., O'Regan, E., Toner, M., Kay, E., Faul, P., O'Keane, C., O'Connor, R., Mullen, D., Nur, M., O'Murchu, E., Barry-O'Crowley, J., Kernan, N., Tewari, P., Keegan, H., O'Toole, S., Woods, R., Kennedy, S., Feeley, K., Sharp, L., ... Martin, C. M. (2022). The Role of HPV in Determining Treatment, Survival, and Prognosis of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancers*, 14(17), 4321. <https://doi.org/10.3390/cancers14174321>
80. Shi, J., Wang, L., Yao, N., Sun, L., Hu, W., Li, X., Yang, Y., Wang, Y., Zhu, W., & Li, B. (2022). The effect of HPV DNA and p16 status on the prognosis of patients with hypopharyngeal carcinoma: A meta-analysis. *BMC Cancer*, 22, 658. <https://doi.org/10.1186/s12885-022-09769-w>
81. Sinha, P., Karadaghy, O. A., Doering, M. M., Tuuli, M. G., Jackson, R. S., & Haughey, B. H. (2018). Survival for HPV-positive oropharyngeal squamous cell carcinoma with surgical versus non-surgical treatment approach: A systematic

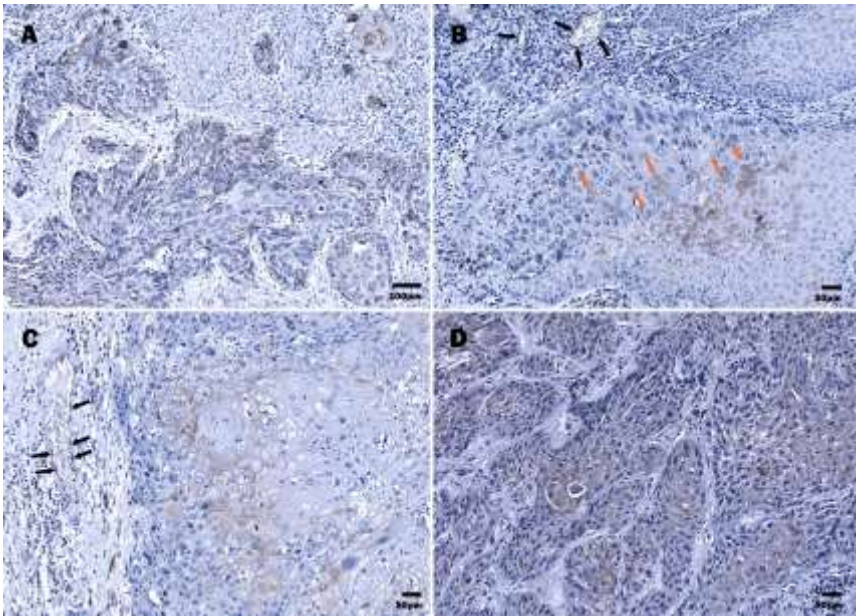
- review and meta-analysis. *Oral Oncology*, 86, 121–131. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2018.09.018>
82. Skuja, S., Vilmane, A., Svirskis, S., Groma, V., & Murovska, M. (2018). Evidence of Human Parvovirus B19 Infection in the Post-Mortem Brain Tissue of the Elderly. *Viruses*, 10(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/v10110582>
83. Smith, E. M., Rubenstein, L. M., Hoffman, H., Haugen, T. H., & Turek, L. P. (2010). Human papillomavirus, p16 and p53 expression associated with survival of head and neck cancer. *Infectious Agents and Cancer*, 5, 4. <https://doi.org/10.1186/1750-9378-5-4>
84. Snijders, P. J. F., van den Brule, A. J. C., & Meijer, C. J. L. M. (2003). The clinical relevance of human papillomavirus testing: Relationship between analytical and clinical sensitivity. *The Journal of Pathology*, 201(1), 1–6. <https://doi.org/10.1002/path.1433>
85. Song, S., Liem, A., Miller, J. A., & Lambert, P. F. (2000). Human papillomavirus types 16 E6 and E7 contribute differently to carcinogenesis. *Virology*, 267(2), 141–150. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.0106>
86. Srivastava, K., Pickard, A., McDade, S., & McCance, D. J. (2015). P63 drives invasion in keratinocytes expressing HPV16 E6/E7 genes through regulation of Src-FAK signalling. *Oncotarget*, 8(10), 16202–16219. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3892>
87. Sun, J., Lin, L., Zhang, J., Hu, C., & Wang, J. (2021). The prognostic value of USP7 and p53 in advanced hypopharyngeal carcinoma. *Annals of Diagnostic Pathology*, 51, 151695. <https://doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2020.151695>
88. Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
89. Süslü, N., Hoşal, A. Ş., Aslan, T., Sözeri, B., & Dolgun, A. (2013). Carcinoma of the oral tongue: A case series analysis of prognostic factors and surgical outcomes. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery: Official Journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, 71(7), 1283–1290. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2013.01.018>
90. Taylor, M. A., Switchenko, J., Stokes, W., Patel, M. R., McDonald, M., Steuer, C., Aiken, A., Beitler, J. J., Shin, D. M., & Saba, N. F. (2021). Incidence trends of squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN) in the aging population – A SEER-based analysis from 2000 to 2016. *Cancer Medicine*, 10(17), 6070–6077. <https://doi.org/10.1002/cam4.4134>

91. Timbang, M. R., Sim, M. W., Bewley, A. F., Farwell, D. G., Mantravadi, A., & Moore, M. G. (2019). HPV-related oropharyngeal cancer: A review on burden of the disease and opportunities for prevention and early detection. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 15(7–8), 1920–1928. <https://doi.org/10.1080/21645515.2019.1600985>
92. Torrente, M. C., Rodrigo, J. P., Haigentz, M., Dikkers, F. G., Rinaldo, A., Takes, R. P., Olofsson, J., & Ferlito, A. (2011). Human papillomavirus infections in laryngeal cancer. *Head & Neck*, 33(4), 581–586. <https://doi.org/10.1002/hed.21421>
93. Tribius, S., Würdemann, N., Laban, S., Sharma, S. J., Wagner, S., Hoffmann, T. K., Wittekindt, C., & Klussmann, J. P. (2018). Update on HPV-associated head and neck cancer-highlights of the 2018 ASCO Annual Meeting. *HNO*, 66(12), 888–895. <https://doi.org/10.1007/s00106-018-0577-3>
94. Veyer, D., Wack, M., Grard, O., Bonfils, P., Hans, S., Belec, L., Badoual, C., & Péré, H. (2018). HPV detection and genotyping of FFPE head and neck cancer biopsies by molecular testing to address new oropharyngeal squamous cell carcinoma classification based on HPV status. *bioRxiv*, 469387. <https://doi.org/10.1101/469387>
95. Wang, H., Wei, J., Wang, B., Meng, L., Xin, Y., Dong, L., & Jiang, X. (2019). Role of human papillomavirus in laryngeal squamous cell carcinoma: A meta-analysis of cohort study. *Cancer Medicine*, 9(1), 204–214. <https://doi.org/10.1002/cam4.2712>
96. Wang, S., Zhuang, X., Gao, C., & Qiao, T. (2021). Expression of p16, p53, and TLR9 in HPV-Associated Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Clinicopathological Correlations and Potential Prognostic Significance. *Oncotargets and Therapy*, 14, 867–877. <https://doi.org/10.2147/OTT.S293163>
97. Wendt, M., Hammarstedt-Nordenvall, L., Zupancic, M., Friesland, S., Landin, D., Munck-Wikland, E., Dalianis, T., Näsman, A., & Marklund, L. (2021). Long-Term Survival and Recurrence in Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma in Relation to Subsites, HPV, and p16-Status. *Cancers*, 13(11), 2553. <https://doi.org/10.3390/cancers13112553>
98. Wiest, T., Schwarz, E., Enders, C., Flechtenmacher, C., & Bosch, F. X. (2002). Involvement of intact HPV16 E6/E7 gene expression in head and neck cancers with unaltered p53 status and perturbed pRb cell cycle control. *Oncogene*, 21(10), 1510–1517. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205214>
99. Wittekindt, C., Wagner, S., Bushnak, A., Prigge, E.-S., Doerberitz, M. von K., Würdemann, N., Bernhardt, K., Pons-Kühnemann, J., Maulbecker-Armstrong, C., & Klussmann, J. P. (2019). Increasing Incidence rates of Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma in Germany and Significance of Disease Burden Attributed to Human Papillomavirus. *Cancer Prevention Research*, 12(6), 375–382. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-19-0098>
100. Wittekindt, C., Wagner, S., Sharma, S. J., Würdemann, N., Knuth, J., Reder, H., & Klußmann, J. P. (2018). HPV – a Different View on Head and Neck Cancer. *Laryngo-Rhino- Otologie*, 97(Suppl 1), S48–S113. <https://doi.org/10.1055/s-0043-121596>

101. Wu, Q., Wang, M., Liu, Y., Wang, X., Li, Y., Hu, X., Qiu, Y., Liang, W., Wei, Y., & Zhong, Y. (2021). HPV Positive Status Is a Favorable Prognostic Factor in Non-Nasopharyngeal Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Patients: A Retrospective Study From the Surveillance, Epidemiology, and End Results Database. *Frontiers in Oncology*, 11, 688615. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.688615>
102. You, E. L., Henry, M., & Zeitouni, A. G. (2019). Human papillomavirus – associated oropharyngeal cancer: Review of current evidence and management. *Current Oncology*, 26(2), 119–123. <https://doi.org/10.3747/co.26.4819>
103. Yu, Y., & Munger, K. (2013). Human Papillomavirus Type 16 E7 oncoprotein inhibits the anaphase promoting complex/cyclosome activity by dysregulating EMI1 expression in mitosis. *Virology*, 446(0), 251–259. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.08.013>
104. Yuan, Y., Wang, L., Li, Q. X., Zhang, J. Y., Xu, Z. X., & Guo, C. B. (2018). Retrospective study of survival in human papillomavirus-negative oropharyngeal squamous cell carcinoma treated with primary surgery and associated prognostic factors. *OncoTargets and Therapy*, 11, 2355–2362. <https://doi.org/10.2147/OTT.S156494>
105. Zake, T., Skuja, S., Kalere, I., Konrade, I., & Groma, V. (2018). Heterogeneity of tissue IL-17 and tight junction proteins expression demonstrated in patients with autoimmune thyroid diseases. *Medicine*, 97(25), e11211. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000011211>
106. Zhou, G., Liu, Z., & Myers, J. N. (2016). TP53 Mutations in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma and Their Impact on Disease Progression and Treatment Response. *Journal of Cellular Biochemistry*, 117(12), 2682–2692. <https://doi.org/10.1002/jcb.25592>
107. Zur Hausen, H. (2000). Papillomaviruses causing cancer: Evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *Journal of the National Cancer Institute*, 92(9), 690–698. <https://doi.org/10.1093/jnci/92.9.690>

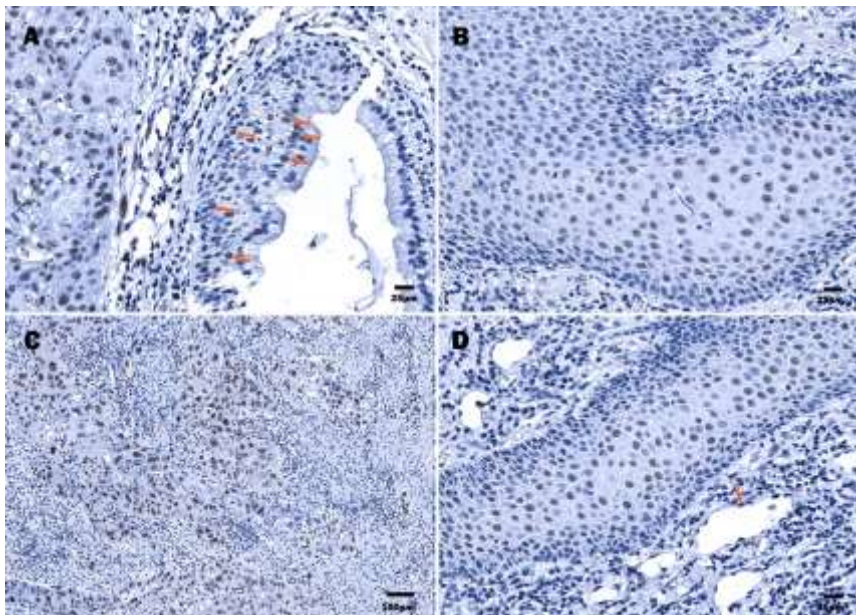
Pielikumi

GKPSK paraugu imūnhistoķīmiskais novērtējums



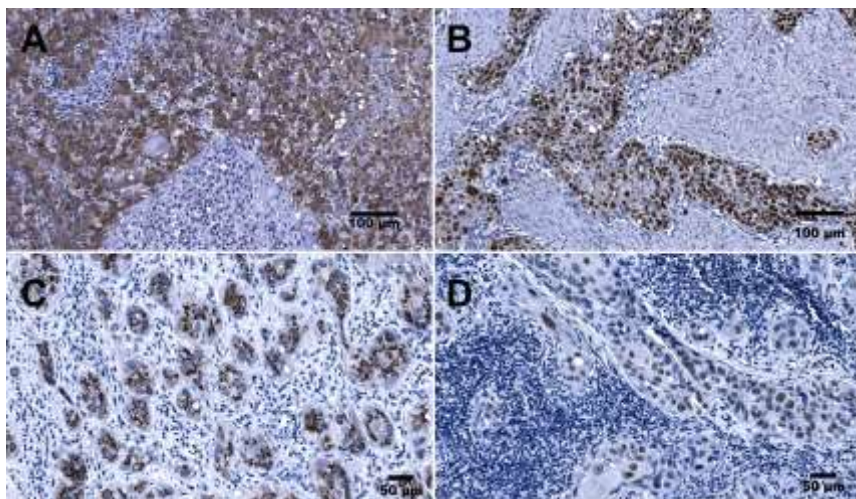
1. attēls. CPV16 E6 onkoproteīna noteikšana ar IHĶ*

- * **A** – BPŠK, audzēja šūnu veidoti pavedieni un saliņas, kas sastāv no difūzi izkliedētām E6 proteīna pozitīvām šūnām, starp kurām ir E6 onkoproteīna negatīvas šūnas; **B** – BPŠK, diferencētas suprabazālas audzēja šūnas, kurās redzama bagātīga CPV16 E6 pozitīva citoplazma un polimorfiski kodoli (oranžas bultas), E6 pozitīvi endoteliocīti (melns bultas); **C** – BPŠK, CPV16 E6 imūnpozitivitāte suprabazālajās, vairāk diferencētajās audzēja šūnās, E6 pozitīvas endotēlija šūnas (melns bultas); **D** – HFPŠK, blīvi audzēja šūnu pavedieni ar CPV16 E6 onkoproteīna imūnpozitīvu šūnu klātbūtni pārsvarā vairāk diferencētās šūnās.



2. attēls. CPV16 E7 onkoproteīna noteikšana ar IHĶ*

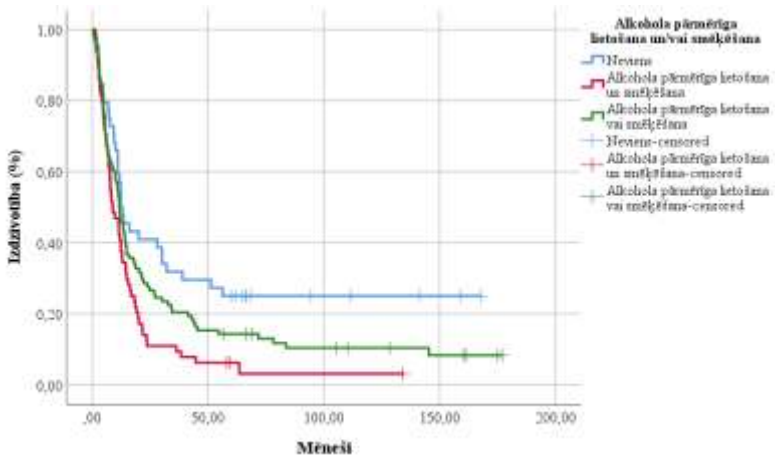
* **A** – BPŠK, audzēja šūnas saliņā un dažas virsmas šūnas (oranžas bultas), kas uzrāda CPV16 E7 imūnpozitīvu kodolu; **B** – BPŠK, daudzas CPV16 E7 imūnpozitīvas šūnas ar kodolu krāsošanos; **C** – BPŠK, ļoti polimorfās CPV16 E7 imūnpozitīvas audzēja šūnas ar gandrīz pilnīgu kodolu dekorāciju; **D** – HFPSK, daudzas CPV16 E7 imūnpozitīvas šūnas ar kodolu krāsošanos, endotēlija (oranža bulta) šūnas.



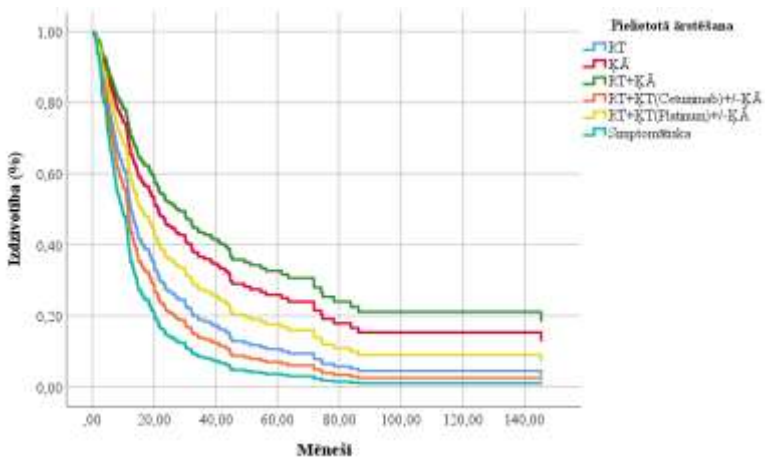
3. attēls. **IHK p16, p53, CPV16 E6 un E7 antigēnu noteikšana GKPŠK***

* **A** – OFPŠK (aukslēju mandele). Reģistratīvs attēls, kurā redzams > 75 % p16 imūnopozītvu audzēja šūnu ar galvenokārt kodola un citoplazmas reakciju. **B** – BPŠK. Reģistratīvs attēls ar p53 hiperekspresiju ar viendabīgu, spēcīgu audzēja šūnu kodola krāsojumu. **C** – OFPŠK (aukslēju mandele). Reģistratīvs attēls, kurā redzama CPV16 E6 proteīna citoplazmas ekspresija audzēja šūnās. **D** – OFPŠK (aukslēju mandele). Reģistratīvs attēls, kurā redzama CPV16 E7 proteīna imūnekspresija audzēja šūnu kodolos. Mēroga joslas: 100 µm un 50 µm.

Statistiskā analīze

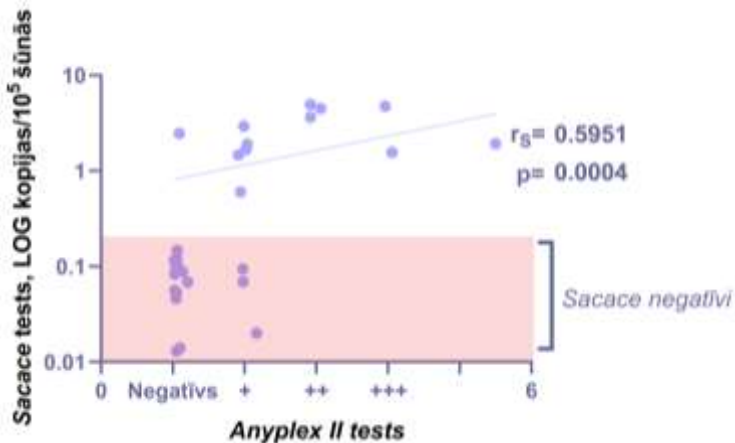


1. attēls. Kaplana-Meijera SSI diagramma atkarībā no kaitīgiem ieradumiem

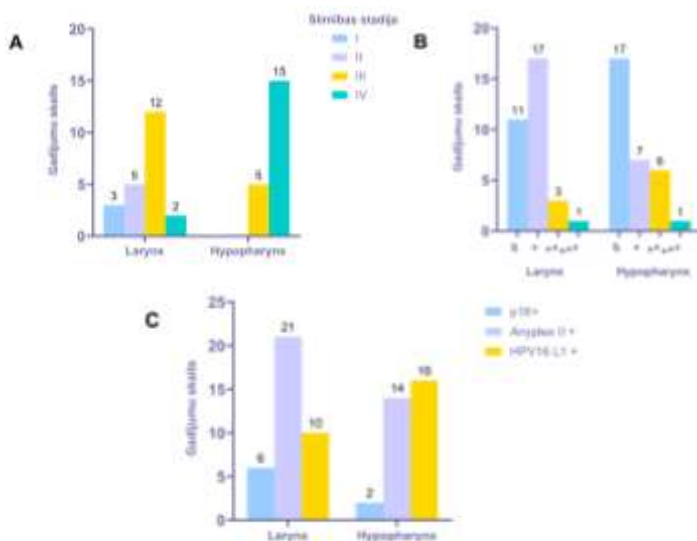


2. attēls. Koksas regresijas kumulatīvās izdzīvotības diagramma*

* Faktori – dzimums, vecuma grupa, T stadija, N statuss, pārmērīga alkohola lietošana un/vai smēķēšana, ārstēšana, primārā audzēja atrašanās vieta, histoloģiskais variants. Terapijas diagramma.

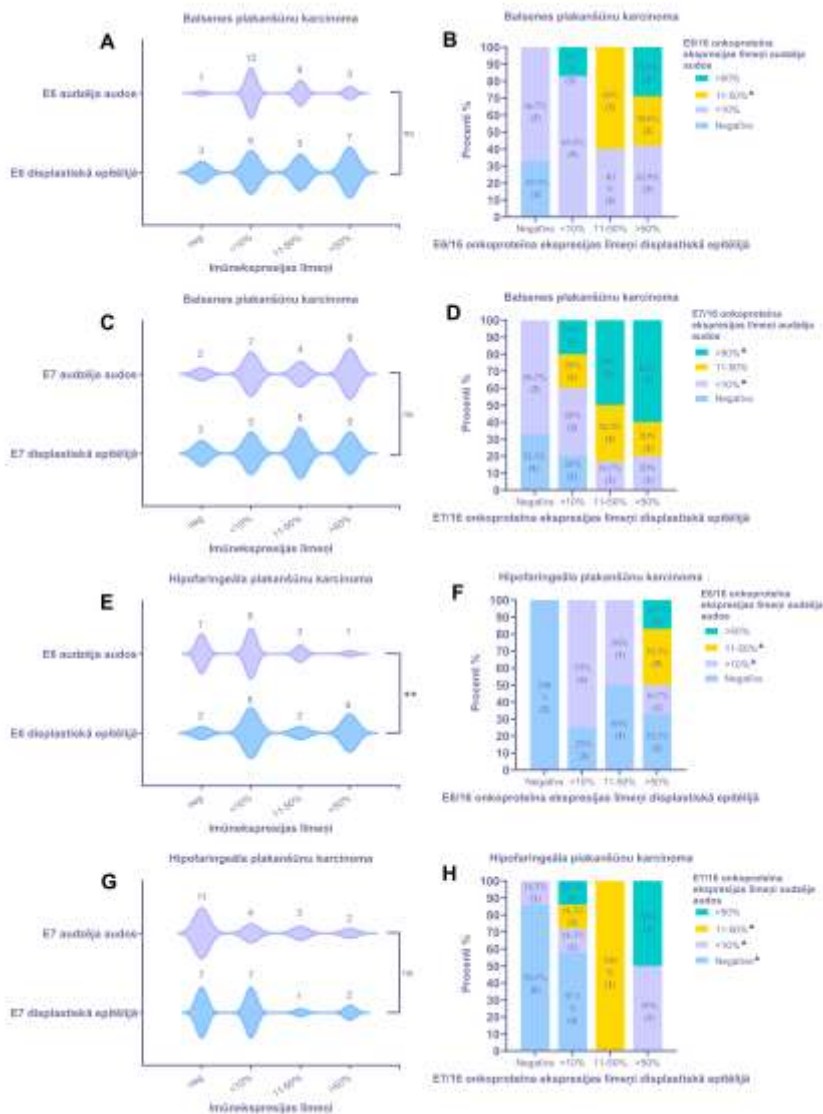


3. attēls. Divu reālā laika PĶR testu korelācija



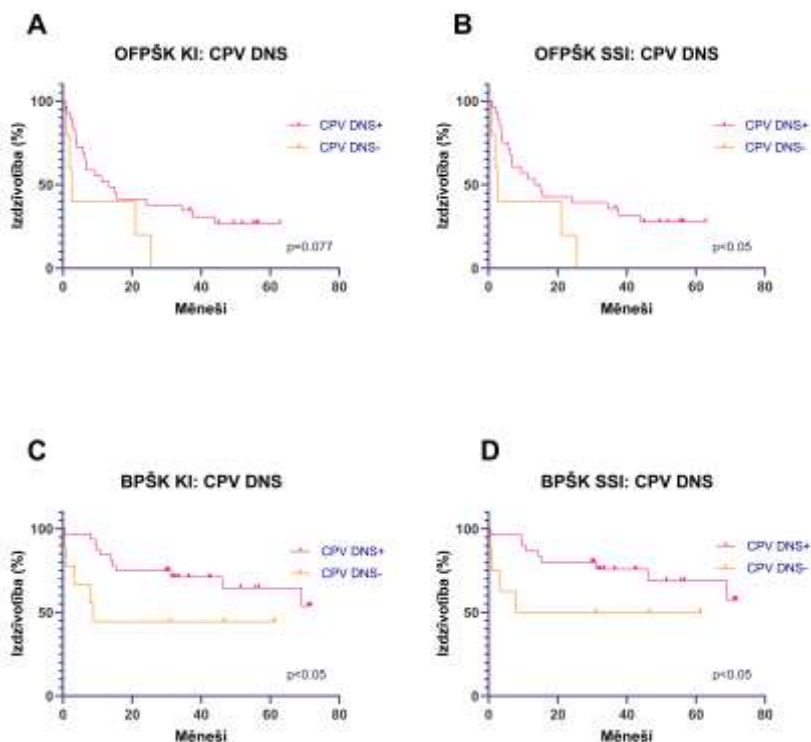
4. attēls. CPV16+ audzēju paraugu sadalījums pēc atrašanās vietas, slimības stadijas un PĶR datiem*

- * **A** – CPV16+ audzēju paraugu sadalījums pēc atrašanās vietas un slimības stadijas;
- B** – CPV16+ paraugu sadalījums pēc atrašanās vietas un *Anyplex* testa rezultātiem;
- 0 – negatīvs, + zema vīrusa slodze, ++ vidēja vīrusa slodze, +++ augsta vīrusa slodze;
- C** – CPV16+ paraugu sadalījums pēc atrašanās vietas, p16 IHĶ un genotipēšanas rezultātiem.



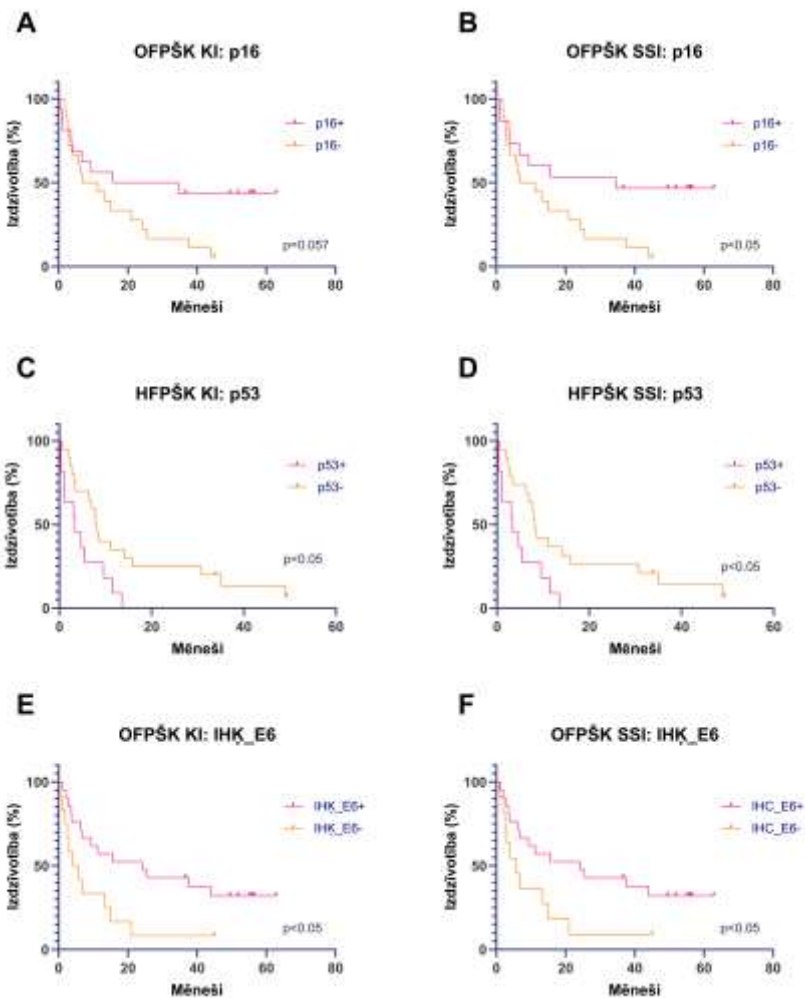
5. attēls. Vīrusu onkoproteīnu E6 un E7 novērtējums CPV16+ balsenes (A–D) un hipofaringeālā (E–H) vēža audu paraugos, izmantojot IHĶ un statistiku*

* **A, C** – CPV onkoproteīna E6 (**A**) un E7 (**C**) imūnēkspresijas raksturojums audzēja masā un displastiskā epitēlijā BPŠK paraugos; **B, D** – IHK CPV onkoproteīna E6 (**B**) un E7 (**D**) ekspresijas līmeņi audzēja masā, kas novērtēti attiecībā pret līmeņiem attiecīgā BPŠK parauga displastiskajā epitēlijā; **E, G** – CPV onkoproteīna E6 (**E**) un E7 (**G**) imūnēkspresijas raksturojums HFPŠK paraugu audzēja masā un displastiskajā epitēlijā; **F, H** – CPV onkoproteīna E6 (**F**) un E7 (**H**) IHK ekspresijas līmeņi audzēja masā, kas novērtēti attiecībā pret līmeņiem attiecīgā HFPŠK parauga displastiskajā epitēlijā. Vijoļdiagrammās: zvaigznītes norāda nozīmīguma līmeni (ns – nenozīmīgs, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$), atšķirībām starp grupām (divpakāpju Vilkoksona tests). Kolonnu diagrammās – krusttabulu analīze, trijstūri (\blacktriangle) attēlo paraugu, kurā nav vērtējumam piemērota epitēlija apgabala, tāpēc tas nav iekļauts krusttabulu analīzē.



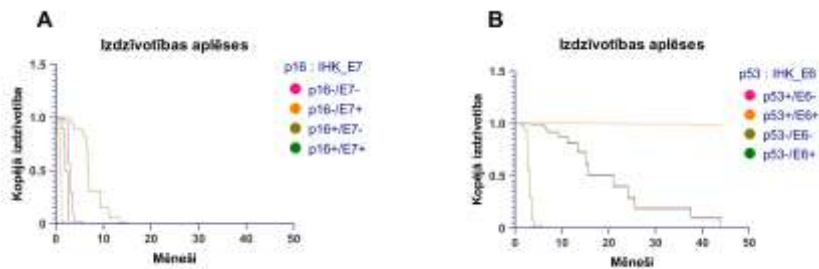
6. attēls. **Kaplaņa-Meijera izdzīvotības analīze***

* **A, B** – KI un SSI aplēses atkarībā no CPV DNS klātbūtnes (AR- un ZR-) OFPŠK; **C, D** – KI un SSI aplēses atkarībā no CPV DNS klātbūtnes (AR- un ZR-) BPŠK.



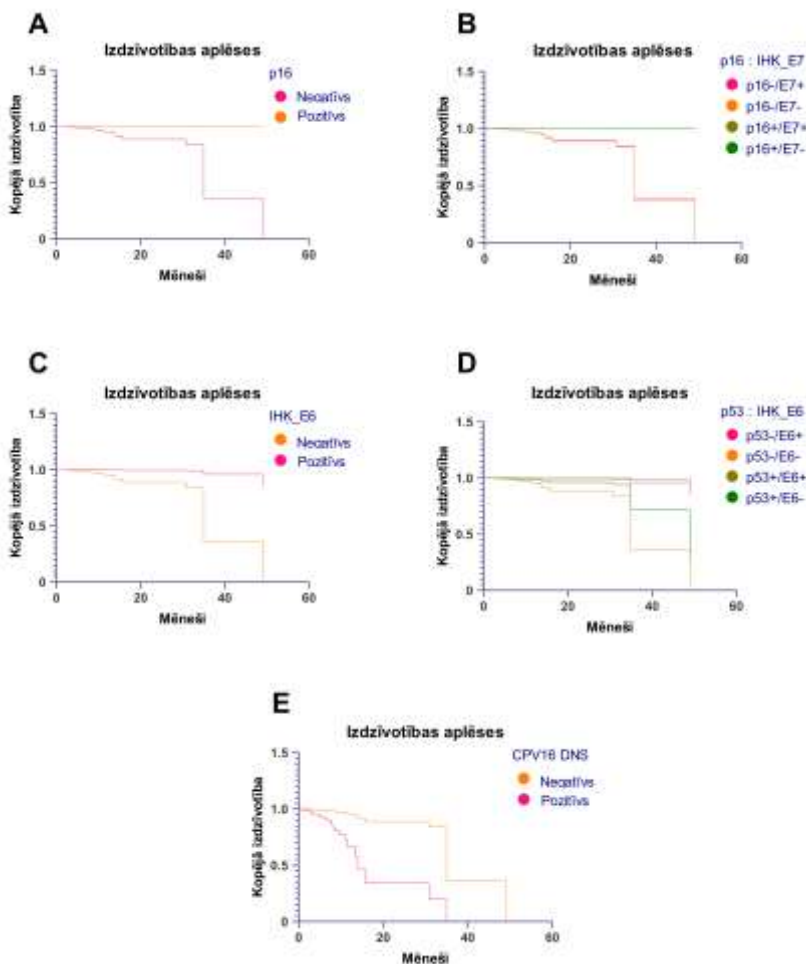
7. attēls. **Kaplana-Meijera izdzīvotības analīze***

* **A, B** – KI un SSI aplēses atkarībā no IHĶ p16 ekspresijas rezultātiem OFPŠK; **C, D** – KI un SSI aplēses atkarībā no IHĶ p53 ekspresijas rezultātiem HFPŠK; **E, F** – KI un SSI aplēses atkarībā no IHĶ CPV16 E6 proteīna ekspresijas rezultātiem OFPŠK.



8. attēls. Izdzīvotības aplēses, Koksas regresija*

* **A** – paredzamās izdzīvotības novērtējums atkarībā no p16 un E7 proteīna IHK ekspresijas; **B** – paredzamās izdzīvotības novērtējums atkarībā no p53 un E6 proteīna IHK ekspresijas.



9. attēls. Izdzīvotības aplēses, Koksas regresija*

* **A** – aprēķinātā izdzīvotība atkarībā no p16 IHK ekspresijas; **B** – aprēķinātā izdzīvotība atkarībā no p16 un CPV16 E7 proteīna IHK ekspresijas; **C** – aprēķinātā izdzīvotība atkarībā no CPV16 E6 proteīna IHK ekspresijas; **D** – aprēķinātā izdzīvotība atkarībā no p53 un CPV16 E6 proteīna IHK ekspresijas; **E** – aprēķinātā izdzīvotība atkarībā no CPV16 DNS klātbūtnes.