

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Aušra
Stumbrytė

Žmogaus papilomos viruso ir
navikiniame procese dalyvaujančių
genų polimorfizmo reikšmė gerklų ir
plaučių vėžiu sergančių pacientų
išgyvenamumui

DAKTARO DISERTACIJA

Biomedicinos mokslai,
biologija (01 B)

VILNIUS 2018

Disertacija rengta 2013–2017 metais Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centre ir Nacionaliniame vėžio institute
Mokslinė vadovė – dr. Živilė Gudlevičienė (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, biologija – 01 B, medicina – 06 B)

Turinys

SANTRUMPOS	7
ĮVADAS	9
DARBO TIKSLAS	9
DARBO UŽDAVINIAI	10
DARBO AKTUALUMAS IR NAUJUMAS, MOKSLINĖ REIŠMĖ	10
1. LITERATŪROS APŽVALGA	11
1.1 Žmogaus papilomos viruso infekcija.....	11
1.1.1 Žmogaus papilomos viruso onkogeninis potencialas.....	11
1.1.2 Žmogaus papilomos viruso morfologija, genai ir jų funkcijos	12
1.1.3 Žmogaus papilomos viruso gyvavimo ciklas.....	15
1.1.4 Žmogaus papilomos viruso perdavimo keliai	19
1.2 Kancerogenezės procesas. Vėžinės ląstelės bruožai. TNM klasifikacija	21
1.3 Genai, kurių mutacijos gali sukelti vėžį. VNP vaidmuo kancerogenezės procese	22
1.4 Kancerogenezės procese dalyvaujantys genai ir jų sąveika su ŽPV ..	22
1.4.1 <i>TP53</i> , <i>MDM2</i> ir <i>MDM4</i> komplekso genai ir ŽPV	23
1.4.2 <i>TP53</i> genas	24
1.4.3 <i>MDM2</i> ir <i>MDM4</i> – genai homologai.....	25
1.4.4 <i>MTHFR</i> , <i>CASP8</i> , <i>CCR5</i> genai, jų VNP ir sąsajos su ŽPV	27
1.5 Gimdos kaklelio vėžys ir jo sąsajos su ŽPV	28
1.6 Gerklų vėžys ir jo sąsajos su ŽPV	29
1.7 Plaučių vėžys ir jo sąsajos su ŽPV	30
2. TYRIMO METODIKA.....	32
2.1 Tiriamųjų atranka ir įtraukimas į tyrimą	32
2.2. Tyrimo dizainas.....	32
2.3. Metodai.....	35
2.3.1. DNR gryninimas iš navikinio audinio	35
2.3.2 Išgrynintos DNR kokybės vertinimas	35

2.3.3	DNR amplifikavimas PGR metodu	35
2.3.4.	PGR produktų vizualizavimas elektroforezės pagalba	41
2.3.5	Tikro laiko (TL) PGR ŽPV kopijoms nustatyti.....	42
2.3.6	Duomenų statistinė analizė.....	43
3.	REZULTATAI	44
3.1	Gimdos kaklelio vėžiu sergančios moterys	44
3.1.1	Gimdos kaklelio vėžiu sergančių moterų klinikinių-patologinių duomenų analizė.....	44
3.1.2	Gimdos kaklelio vėžiu sergančių moterų infekuotumo ŽPV tyrimai	44
3.2	Gerklų vėžiu sergančių pacientų tyrimai	44
3.2.1	Gerklų vėžiu sergančių pacientų klinikinių-patologinių duomenų	44
3.2.2	ŽPV infekcijos, <i>TP53</i> , <i>MDM2</i> , <i>MDM4</i> , <i>MTHFR</i> , <i>CASP8</i> , <i>CCR5</i> VNP dažnių sąsajos su klinikiniais-patologiniais rodikliais gerklų vėžiu sergančiųjų pacientų grupėje	45
3.2.3	<i>TP53</i> , <i>MDM2</i> , <i>MDM4</i> , <i>MTHFR</i> , <i>CASP8</i> , <i>CCR5</i> VNP dažnių, klinikinių-patologinių duomenų sąsajos su gerklų vėžiu sergančiųjų pacientų išgyvenamumo rodikliais	49
3.2.4	ŽPV infekcijos, <i>TP53</i> , <i>MDM2</i> , <i>MDM4</i> , <i>MTHFR</i> , <i>CASP8</i> , <i>CCR5</i> VNP dažnių klasterinė analizė	51
3.3	Plaučių vėžiu sergančių pacientų grupės tyrimai	54
3.3.1	Plaučių vėžiu sergančių pacientų klinikinių-patologinių duomenų analizė	54
3.3.2	ŽPV infekcijos, <i>TP53</i> , <i>MDM2</i> , <i>MDM4</i> , <i>MTHFR</i> , <i>CASP8</i> , <i>CCR5</i> VNP dažnių ir klinikinių-patologinių rodiklių sąsajos plaučių vėžiu sergančiųjų pacientų grupėje	55
3.3.3	ŽPV infekcijos, <i>TP53</i> , <i>MDM2</i> , <i>MDM4</i> , <i>MTHFR</i> , <i>CASP8</i> , <i>CCR5</i> VNP dažnių, klinikinių-patologinių charakteristikų sąsajos su plaučių vėžiu sergančiųjų pacientų išgyvenamumo rodikliais	59
3.3.4	ŽPV infekcijos, <i>TP53</i> , <i>MDM2</i> , <i>MDM4</i> , <i>MTHFR</i> , <i>CASP8</i> , <i>CCR5</i> VNP dažnių klasterinė analizė	61
4.	REZULTATŲ APTARIMAS	64
4.1	ŽPV infekcija gimdos kaklelio, gerklų ir plaučių navikiniame audinyje	64

4.2 Tirtųjų genų VNP funkcija ir sinergistinis veikimas gimdos kaklelio, gerklų ir plaučių kancerogenezės procesuose.....	67
4.2.1 <i>TP53, MDM2, MDM4, MTHFR, CASP8, CCR5</i> VNP dažnių sąsajos su klinikinėmis-patologinėmis charakteristikomis.....	68
4.2.2 Genų <i>TP53, MDM2, MDM4, MTHFR, CASP8, CCR5</i> VNP, klinikinių-patologinių duomenų sąsajos su plaučių ir gerklų vėžiu sergančių pacientų išgyvenimo trukmės rodikliais.....	69
4.2.3 <i>TP53, MDM2, MDM4, MTHFR, CASP8, CCR5</i> VNP ir ŽPV kombinuoto veikimo analizė bei sąsajų su išgyvenamumu paieška.....	70
IŠVADOS.....	73
PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS.....	73
MOKSLINIŲ STRAIPSNIŲ IR PRANEŠIMŲ PUBLIKACIJOS DISERTACIJOS TEMA.....	74
FINANSINĖ PARAMA.....	77
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	78
PADĖKA.....	92

SANTRUMPOS

Ap1, Sp1 – replikacijos veiksniai
ASR – atvirasis skaitymo rėmelis
ATF – adenzintrifosfatas
Brd4 – bromo domeną turintis ląstelės baltymas
CASP8 – kaspazės (8-tos) genas
CC – invazinis gimdos kaklelio vėžys (angl. *cervical carcinoma*, CC)
CCR5 – cisteino-cisteino chemokino receptoriaus genas
Cdk2 – ciklino kinazės kompleksas
CIS – neinvazinis gimdos kaklelio vėžys (angl. *cervical carcinoma in situ*, CIS)
DNR – deoksiribonukleorūgštis
DVL – citoplazminių fosfoproteinų šeimos baltymas (angl. *dishevelled*)
E – ankstyvasis regionas (angl. *early* – E)
EDTA – dinatrio etilendiamino-tetraacetatas
E1-E6 – ŽPV funkciniai genai
E2F – transkripcijos veiksys
F – prasmis pradmuo (angl. *forward*, F)
G1, S – ląstelės ciklo fazės
HDAC – histonų deacetilazė
iRNR – informacinė ribonukleorūgštis
FOXM1 – transkripcijos veiksnys
L1-L2 – ŽPV viruso struktūriniai genai
L – vėlyvasis regionas (angl. *late*, L)
LCR – ilgasis kontrolinis regionas (angl. *long control region*, LCR)
LRP – lipoproteino receptorius
M – TNM klasifikacijoje metastazės (angl. *metastasis*, M)
M (IQR) – išgyvenimo trukmė
MDM2, MDM4 – ubikvitino ligazės genas (angl. *murine double minute 2, 4*)
MTHFR – metilentetrahidrofolato reduktazės genas
N – TNM klasifikacijoje metastazės sritiniuose limfmazgiuose (angl. *nodus*, N)
n – pacientų skaičius
ORI – replikacijos pradžios sritis (angl. *origin* – O)
P – reikšmingumo lygmuo
PCNA – slystančio žiedo kompleksas
PGR – polimerazės grandininė reakcija
PI – pasikliautiniai intervalai

p16, p21, p53 – baltymai vėžio slopikliai
PSO – Pasaulio sveikatos organizacija
R – antiprasminis pradmuo (angl. *reverse*, R)
Rb – retinoblastomos baltymas
RFC – replikacinis baltymas C
RS – rizikos santykis
SD – standartinis nuokrypis
T1-T4 – pirminio naviko išplitimas (angl. *tumor*, T)
TAE – buferinis tirpalas (angl. TRIS – *acetate* – EDTA) TRIS – aminometanas; EDTA – dinatrio etilendiamino-tetraacetatas
TCF – transkripcijos veiksnys
TNM – piktybinių navikų klasifikacija: T– pirminis navikas, N – limfmazgis, M – metastazė
VNP – vieno nukleotido polimorfizmas (angl. *Single Nucleotide Polymorphism*, *SNP*)
Wnt – tai signalinių baltymų šeima, sudaryta iš 19 skirtingų izoformų hidrofobinių glikobaltymų, randamų žmogaus organizme

IVADAS

Plaučių vėžys, jo diagnostika ir gydymas yra aktuali onkologijos problema. Šis vėžys – viena dažniausių onkologinių ligų ne tik Lietuvoje, bet ir pasaulyje. Pasaulio sveikatos organizacijos (PSO) 2012 metų duomenimis, sergamumo plaučių vėžiu rodikliai siekia 1,8 mln. atvejų, tai sudaro apie 12,7 % visų diagnozuojamų vėžio atvejų. Mirtigumas siekia 1,59 mln. atvejų (18,2 %). Nacionalinio vėžio instituto (NVI) Vėžio registro duomenys rodo panašias tendencijas – sergamumas 2012 m. siekia 1421 naujų atvejų (8 % visų diagnozuotų vėžio atvejų), fiksuota 1355 mirčių (16,9 %).

Gerklų vėžys – vienas dažniausių galvos-kaklo piktybinių navikų. Gerklų vėžys onkologinių ligų struktūroje užima 20-ą vietą, pasaulyje kasmet diagnozuojama 151 000 naujų šios ligos atvejų ir 90 000 su ja susijusių mirčių. Nepaisant to, jog pagrindiniai šios ligos rizikos veiksniai yra tabako ir alkoholio vartojimas, neatmetama galimybė, kad infekciniai patogenai, tokie kaip žmogaus papilomos viruso (ŽPV) infekcija, gali veikti kaip kancerogeninis veiksnys.

Įrodyta, kad ŽPV yra vienas pagrindinių intraepitelinų gimdos kaklelio ikivėžinių pokyčių ir vėžio rizikos veiksnių. ŽPV vaidmuo gerklų vėžio atveju taip pat plačiai tyrinėjamas. Užsikrėtimas virusu šių navikų atvejais yra tiesioginio kontakto būdu. Tačiau manoma, kad ŽPV gali plisti ne tik tiesioginio kontakto (dažniausiai lytiniu keliu), bet ir hematogeniniu bei oro lašeline būdu, taip pasiekdamas ir giliau esančių organų, pvz., plaučių audinių ląsteles.

Siekiant nustatyti gerklų ir plaučių kancerogenezės proceso, kurį galimai veikia ŽPV, veikiančius genus, atlikta genų kandidatų paieška klasterinės analizės būdu. Atliekant šią analizę sujungiami klinikiniai-patologiniai duomenys (iš paciento ligos istorijos), ŽPV infekcijos ir su šia infekcija susijusių genų vieno nukleotido polimorfizmo (VNP) sąsajos, siekiant nustatyti ilgesnę pacientų išgyvenimo trukmę lemiančius veiksnys.

DARBO TIKSLAS

Tikslas – įvertinti žmogaus papilomos viruso infekcijos, *TP53*, *MDM2*, *MDM4*, *MTHFR*, *CASP8*, *CCR5* genetinių polimorfizmų ir klinikinių-patologinių rodiklių sąsajas bei jų reikšmę gerklų ir plaučių vėžiu sergančių pacientų išgyvenamumui.

DARBO UŽDAVINIAI

1. Nustatyti pacientų, sergančių gimdos kaklelio, gerklų ir plaučių vėžiu infekuotumą ŽPV.
2. Įvertinti genų *TP53*, *MDM2*, *MDM4*, *MTHFR*, *CASP8*, *CCR5* VNP dažnius tiriamuosiuose mėginiuose ir sąsajas su klinikiniais-patologiniais pacientų duomenimis.
3. Įvertinti gerklų ir plaučių vėžiu sergančių pacientų išgyvenamumo priklausomybę nuo tirtųjų molekulinį žymenų.
4. Atrinkti potencialius prognozinis žymenis gerklų ir plaučių vėžiu sergančių pacientų ligai įvertinti.

DARBO AKTUALUMAS IR NAUJUMAS, MOKSLINĖ REIKŠMĖ

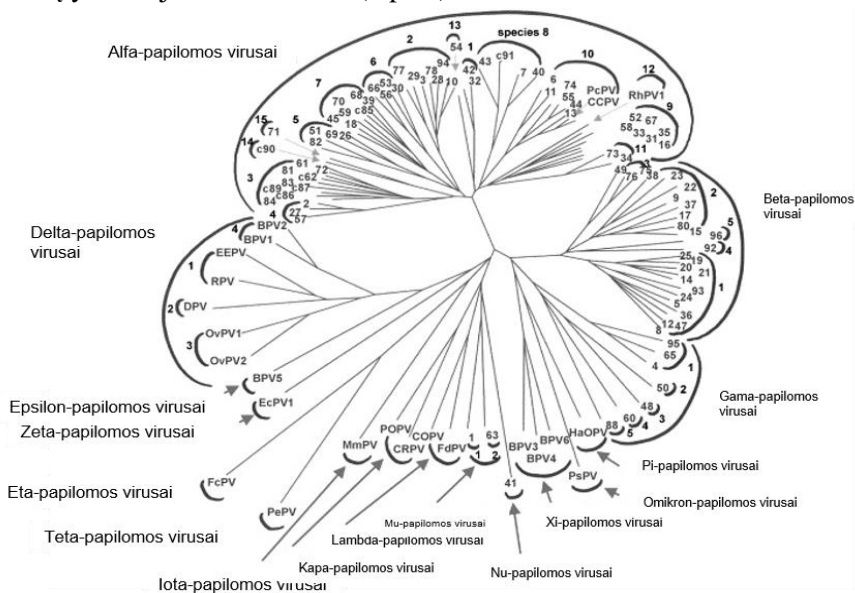
Tyrimo metu, klasterinės analizės būdu, buvo siekiama įvertinti ne tik ŽPV poveikį plačiai tyrinėto gimdos kaklelio, gerklų ir plaučių kancerogenezės procesui, bet ir šiame procese veikiančius genų polimorfizmus. ŽPV paplitimas gimdos kaklelio vėžio atveju išliko nepakitęs palyginti su ankstesnių Lietuvos tyrėjų duomenimis ir siekė 74,3 % invazinio bei 85,6 % neinvazinio vėžio atvejais, gerklų vėžio – 42,86 %. Pirmą kartą Lietuvoje tirtas plaučių vėžiu sergančiųjų asmenų infekuotumas ŽPV siekė 3,3 %. Klasterinės analizės būdu atlikta ŽPV infekcijos, tirtųjų genų (*TP53*, *MDM2*, *MDM4*, *MTHFR*, *CASP8*, *CCR5*) VNP dažnių, gerklų ir plaučių vėžio pacientų išgyvenamumo priklausomybės nuo VNP ir klinikinių-patologinių duomenų analizė. Nustatyti kelių genų VNP, klinikinių-patologinių duomenų ir ŽPV infekcijos deriniai, galintys lemti geresnį ar blogesnį išgyvenamumą. Nustatyta, kad navikinių ląstelių plitimas į regioninius limfmazgius, *CASP8* ins/del VNP ir ŽPV nebuvimas navikiniame audinyje – blogos išgyvenamumo prognozės žymenų derinys gerklų vėžio atvejais. O *MDM2* T/T VNP, naviko neplitimas į limfmazgius – geros išgyvenamumo prognozės žymenys gerklų vėžio atvejais. *MTHFR* geno C/T ir *MDM2* geno T/T VNP derinys gali būti prognozinis žymuo, operacinio ar konservatyvaus gydymo taktikai parinkti plaučių vėžio atvejais.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Žmogaus papilomos viruso infekcija

1.1.1 Žmogaus papilomos viruso onkogeninis potencialas

Vėžys – tai daugiaveiksni ligi. Dar XX a. pradzioje buvo pastebėta, kad vienu iš jos išsivystymo veiksnių gali būti organizmo infekavimas specifiniais onkogeniniais virusais. Šiuo metu žinomos net kelios deoksiribonukleorūgšties (DNR) ir ribonukleorūgšties (RNR) virusų šeimos, kurių atstovai, kaip manoma, sukelia apie 10-15 % visų žmogaus vėžio atvejų¹. Viena tokių didžiausių onkogeniniu potencialu pasižyminčių virusų šeimų – *Papillomaviridae* virusų šeima, kuriai priklauso mažas, genetiškai stabilus žmogaus papilomos virusas. Manoma, jog apie 4-5 % visų vėžio formų yra susijusios su ŽPV^{2,3} (1 pav.).



1 pav. Filogenetinis ŽPV medis. Filogenetinis medis vaizduoja ŽPV tipų priskyrimą pagal rūšis (pvz., Species 8, apimančią 7, 40, c91 bei 43 tipus) bei gentis (pvz., Genus *Alpha-papillomavirus*). Pagal de Villiers et al⁴

Remiantis literatūros duomenimis, šiuo metu priskaičiuojama daugiau nei 200 skirtingų ŽPV tipų⁵. Jų klasifikacija paremta viruso L1 genų sekų skirtumais⁶. Skirtingų ŽPV tipų nukleotidų sekų tarpusavio skirtumai neviršija 2 % koduojančiuose ir 5 % nekoduojančiuose geno regionuose^{7,8}. Skirtingi ŽPV tipai pasižymi ir skirtingu onkogeniniu potencialu, pagal kurį juos įprasta skirstyti į didelės, vidutinės ir mažos vėžio

rizikos tipus⁶ (2 pav.). Mažiausiai penkiolika ŽPV yra priskiriami vidutinės ir didelės onkogeninės rizikos tipų virusams⁹. Didelės ir vidutinės onkogeninės rizikos tipų ŽPV, patekę į chromosomas, sukelia nevaldomą ląstelių dalijimąsi, dėl ko ląstelės kinta ir piktybėja⁶.

Didelės ir vidutinės onkogeninės rizikos tipų ŽPV

16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82

Mažos onkogeninės rizikos tipų ŽPV

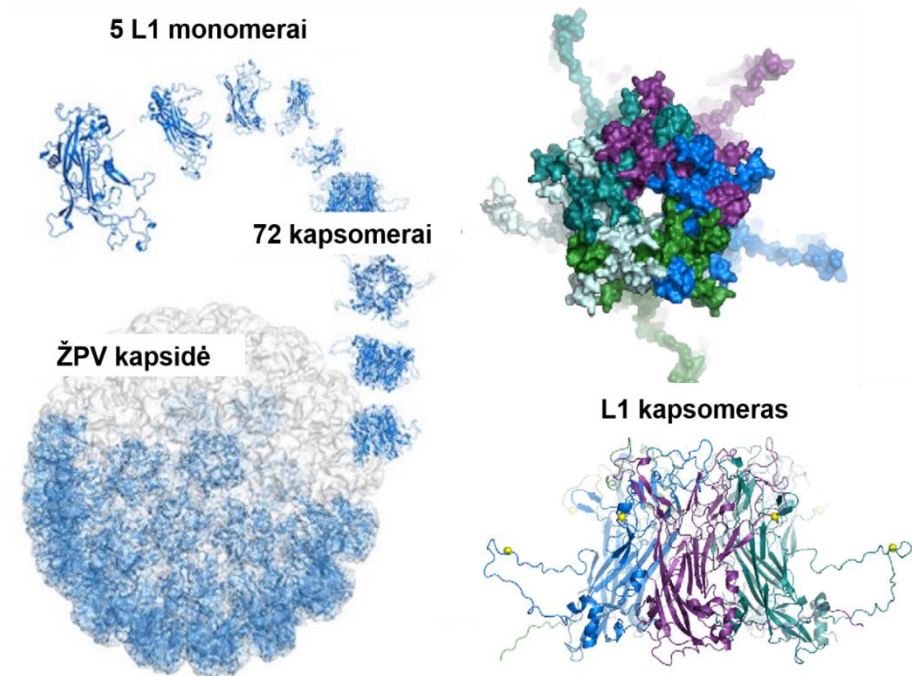
6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 ir CP6108

2 pav. ŽPV tipų onkogeninis potencialas. ŽPV tipų priskyrimas didelės ir mažos onkogeninės rizikos grupėms

Medicininis požiūris ŽPV yra epiteliotropiniai virusai, besiskiriantys savo tropizmu audiniui bei klinicine infekcijos eiga. Šis virusas gyvavimui ir dauginimuisi naudoja šeimininko odos ir gleivinių ląsteles. ŽPV per mikropažeidimus skverbiasi į epitelio pamatinio sluoksnio ląsteles, kur jis dauginasi, palaipsniui patenka į paviršiaus sluoksnius ir pradamas išskirti į aplinką. Apie 70-90 % atvejų ŽPV infekcija savaime išnyksta per vienus-trejus metus. Tai daliai infekuotųjų, kurių organizme virusas pasilieka persistuoti, laikui bėgant jis integruojasi į ląstelės genomą, sutrikdo normalų jos vystymąsi ir tokiu būdu sukelia ląstelės piktybėjimą⁶.

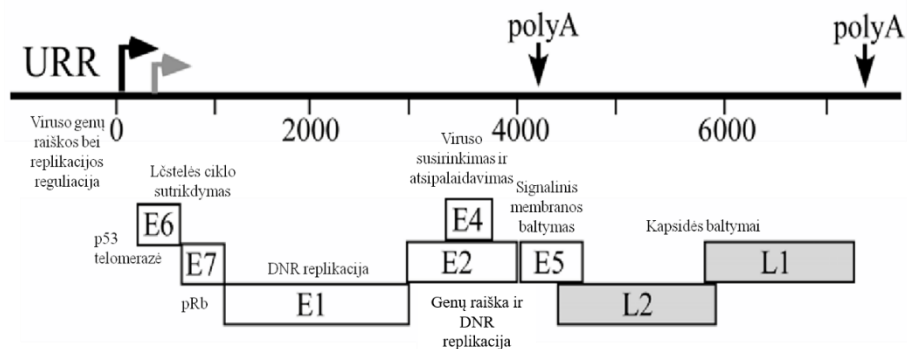
1.1.2 Žmogaus papildomos viruso morfologija, genai ir jų funkcijos

Viruso morfologija. ŽPV – tai mažas (52–55 nm skersmens), neturintis apvalkalėlio, genetiškai stabilus ikosaedrinės morfologijos virusas⁶ (3 pav.). Kapsidę sudaro 72 kapsomerai, kurių kiekvienas yra sudaryti iš penkių identiškų L1 baltymo molekulių, koduojamų paties viruso genomo¹⁰ (3 pav.). Be šio baltymo, į viriono sudėtį įeina ir mažojo kapsidės baltymo L2 molekulės, kurios nedalyvauja kapsomerų formavimo procese ir nėra būtinos viriono susirinkimui. Tokiu būdu L1 baltymas sudaro apie 90 % visos viruso baltyminės kapsidės¹¹. 60 viriono kapsomerų iš 72 sudaro šešiakampį, o likę 12 – penkiakampį. Kapsomerai išsidėsto laikydamiesi pentamerinės simetrijos ir suformuoja tvirtą kamieną, kurio galuose yra sustorėjimai^{10,11}.



3 pav. ŽPV erdvinė struktūra. Kairėje – virusinės dalelės erdvinė struktūra. Adaptuota pagal *Li et al*¹¹. Dešinėje – L1 baltymų pentamero erdvinė struktūra, rentgenostruktūrinės analizės metodais išspręsta 16 tipo ŽPV viruso L1 baltymo pavyzdžiu. Adaptuota pagal *Buck et al*¹².

Viruso genai ir jų veikla. ŽPV turi uždaros žiedinės formos dvigrandį trijų dalių DNR genomą, kurį sudaro apie 7500–8000 bazių porų^{8,13}. Virusinė DNR yra susijungusi su histonų pobūdžio baltymais ir padengta iš 72 kapsomerų sudaryta kapside. ŽPV genomą gali būti suskirstytas į 3 dalis: ilgą kontrolinį regioną (angl. *long control region* – LCR) ir ankstyvąjį (angl. *early* – E) bei vėlyvąjį (angl. *late* – L) rajonus⁶. Ilgasis LCR regionas sudaro apie 10 % viso viruso genomo¹⁴. Virusas savo struktūroje turi du struktūrinius (*L1–L2*) ir šešis funkcinis genus (*E1–E6*)^{6,15}, kurie atitinkamai sudaro apie 40 % ir 50 % viruso genomo¹⁴ (4 pav.). *L* genai koduoja viruso kapsidės struktūrinius baltymus, o *E* genai yra susiję su įvairiomis viruso reguliacinėmis funkcijomis, tokiomis kaip virusinės infekcijos persistencija, DNR replikacija, ląstelės lizės ciklo aktyvacija¹⁴.



4 pav. ŽPV genomo organizacija 16 tipo ŽPV viruso genomas. Adaptuota pagal Kumaraswamy *et al*¹⁶

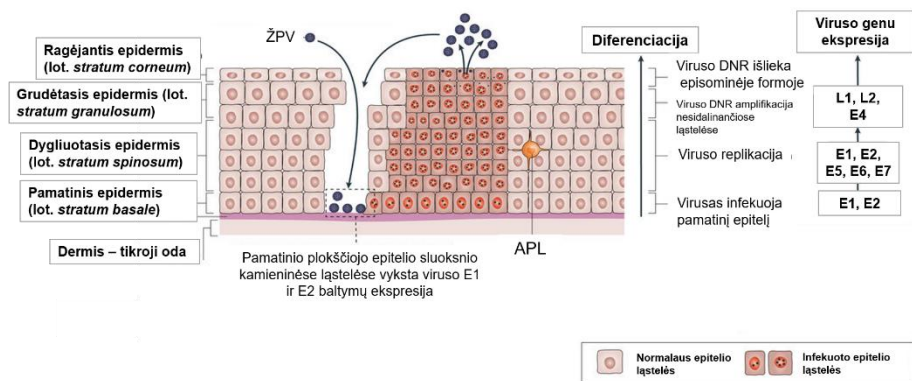
Struktūriniai viruso genai. Struktūrinius viruso baltymus koduoja vėlyvasis ŽPV genomo rajonas. Jam priklauso 2 kapsidės baltymus koduojantys genai – pagrindinio kapsidės baltymo *L1* ir mažojo kapsidės baltymo *L2* genai⁶. *L1* genas koduoja 55 kDa molekulinės masės pagrindinį kapsidės baltymą, kuris kartu yra ir stabiliausias, ir konservatyviausias iš visų papildomos viruso baltymų, atliekantis pagrindinį vaidmenį formuojantis viruso dalelėms^{17,12}. Šis baltymas formuoja pentamerus, kurie sudaro viruso kapsidės pagrindą (3 pav.)¹². Mažasis kapsidės baltymas, koduojamas *L2* geno, yra kur kas mažiau konservatyvus, jo struktūroje aptinkami įvairūs nukleotidų sekos pakitimai¹⁷. Šiuo metu jau žinoma, kad jis gali būti atsakingas už virusinės dalelės sąveiką su ląstelių paviršiaus receptoriais, aktino filamentais bei dalyvauti viruso DNR susidarant viriono struktūrai¹⁹.

Funkciniai viruso genai. Funkciniai ŽPV genai išsidėstę ankstyvajame (*E*) viruso genomo regione ir yra atsakingi už viruso gyvenimo ciklo realizavimą bei jo reguliaciją. Kaip minėta anksčiau, papildomos virusai yra dvigrandę DNR turintys virusai, kurie savo genomo replikacijai pagrindinai naudoja ląstelės šeimininkės replikacijos sistemas. Nepaisant to, ŽPV genomas koduoja vieną baltymą, kuris pats gali dalyvauti viruso replikacijoje^{17,20}. Tai – *E1* baltymas. *E1* atvirasis skaitymo rėmelis (ASR) yra labai konservatyvus ir nurašomas policistronine iRNR. Susintetintas baltymas jungiasi prie viruso DNR replikacijos ORI srities ir savo helikaziniu aktyvumu išvynioja DNR, taip paruošdamas ją replikavimui. *E1* turi savo sąveikos su DNR domeną, gali prisijungti adenozintrifosfatą (ATF) ir dalyvauti DNR hidrolizėje¹⁹. Jis taip pat gali sąveikauti su ląstelės DNR polimeraze α^6 . *E1* baltymo virusinis transaktyvatorius yra *E2* baltymas, kuris taip pat atsakingas už viruso gyvenimo ciklą bei ekstrachromosominę DNR replikaciją²¹. *E2* geno ASR

koduoja du ar net tris skirtingus baltymus, kurie gali veikti kaip transkripcijos veiksniai. Jie nevienodai veikia virusinių genų raišką ir, sąveikaudami su E1 baltymu, gali skatinti virusinės DNR replikaciją⁶. E4 baltymas susiformuoja iš virusinės RNR transkripto, atskėlus fragmentą tarp E1 ASR ir E4 ASR. Tokia mRNR yra pagrindinis transkriptas ŽPV infekuotose ląstelėse. Žinoma, kad *E4* genas atlieka svarbų vaidmenį vykstant viruso brendimui ir replikacijai. E4 baltymai organizme yra ilgalaikės virusinės infekcijos žymuo, tačiau *E4* genas nepasižymi transformuojančiomis savybėmis¹⁷. Nustatyta, kad šis baltymas atlieka svarbų vaidmenį ardant žmogaus keratinocitų citoplazmos citokeratiną, dėl ko įvyksta viruso išsilaisvinimas iš infekuotos ląstelės^{17,20}. *E5*, *E6* bei *E7* genai koduoja baltymus, kurie susiję su funkcijomis, skatinančiomis viruso augimą. ŽPV E5 baltymas pasižymi menku transformuojančiu aktyvumu ir neturi reikšmės ląstelių piktybėjimo procese, o pats *E5* genas dažnai prarandamas vystantis gimdos kaklelio vėžiui²⁰. *E6* ir *E7* genai atlieka svarbiausią vaidmenį vystantis piktybiniam procesui. Abu šie genai koduoja onkobaltymus, atsakingus už viruso replikaciją ir šeimininko ląstelių transformaciją bei jų nemirtingumą¹⁷.

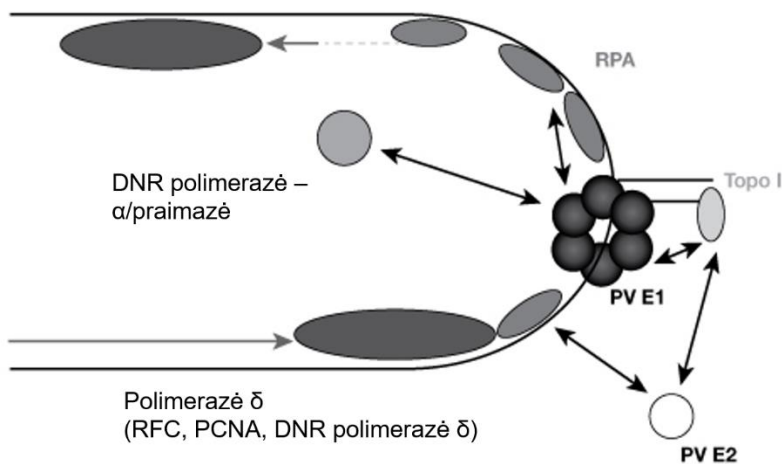
1.1.3 Žmogaus papilomos viruso gyvavimo ciklas

Į pamatinius plokščiojo epitelio sluoksnius epiteliotropinis virusas patenka per mikropažeidimus. Tuo tarpu į ląstelės vidų virusas patenka endocitozės būdu, sąveikaujant kapsidės baltymui L1 su ląstelės paviršiuje esančiu heparano sulfatu²². Virusui patekus į ląstelę vyksta E1 ir E2 baltymų raiška. Virusų DNR išlieka episominės formos²³, nors yra duomenų, rodančių, kad egzistuoja hibridinė viruso-šeimininko episominė forma²⁴. E1 jungiasi prie ATP helikazės, inicijuoja DNR replikaciją.



5 pav. ŽPV gyvavimo ciklas. Epitelio pokyčiai nuo viruso patekimo iki jo sukeltų ikivėžinių pokyčių bei vėžio. Adaptuota pagal Roden *et al*¹⁴

ŽPV replikacija vyksta ląstelės šeiminkės branduolyje. ŽPV replikacijai reikalingi ląstelės DNR replikacijos fermentai, kurių viruso genomai nekoduoja²⁵. ŽPV DNR replikacija prasideda nuo ORI srities, turinčios E1 ir E2 baltymų prisijungimo vietas, kiti reikalingi baltymai įjungiami iš ląstelės šeiminkės. Ląstelės veiksniai, kurie reikalingi ŽPV replikacijai: A (RPA) baltymas, viengrandę DNR prijungiantis baltymas, replikacijos veiksnys C (RFC), PCNA – slystančio žiedo kompleksas, DNR polimerazė – α praimazė. Dalijantis epitelio ląstelėms viruso kopijų skaičius didėja²³.

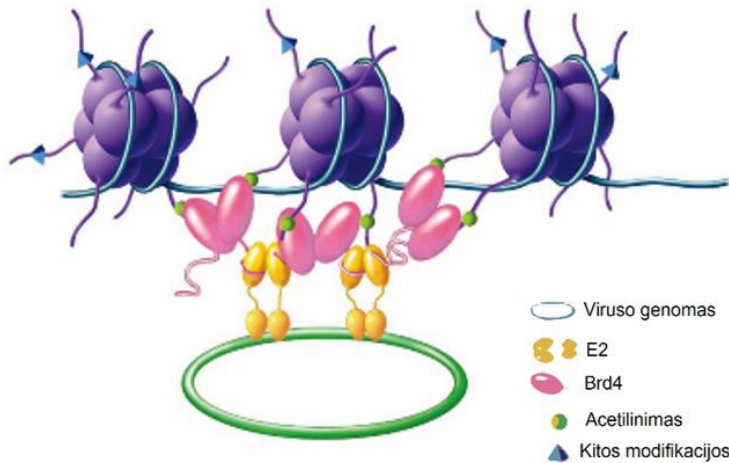


6 pav. ŽPV DNR replikacija. Pagal Kurg²³

Viruso genų raiška vyksta keliomis pakopomis. Ankstyvoji virusų genų transkripcija (ląstelės DNR polimerazė II)²³ – intensyvėja onkogenų E5, E6, E7 raiška, sutrikdomas ląstelės ciklas ir apoptozė²⁶. Vėlyvoji transkripcija – struktūrinių viriono baltymų sintezė paskutiniame transliacijos etape²⁵. Prasideda L1, L2 baltymų raiška ir kapsidės formavimas²⁷. ŽPV genomo transkripcija vyksta naudojant kelis promotorius bei skirtingus intronų „iškirpimo“ būdus. Po E ir L regionų yra poliA vietos. ŽPV ankstyvieji promotoriai (p105 ŽPV18) aktyvuojami prisijungiant transkripcijos veiksniams. Pagrindiniai replikacijos veiksniai yra Sp1 ir AP1. Ankstyvojo regiono baltymai E6, E7, E1, E2 yra transkribuojami nuo ŽPV ankstyvojo promotoriaus. E1 ir E2 yra tiesiogiai susiję su viruso DNR replikacija, E6 ir E7 – dalyvauja viruso DNR amplifikacijoje, netiesiogiai

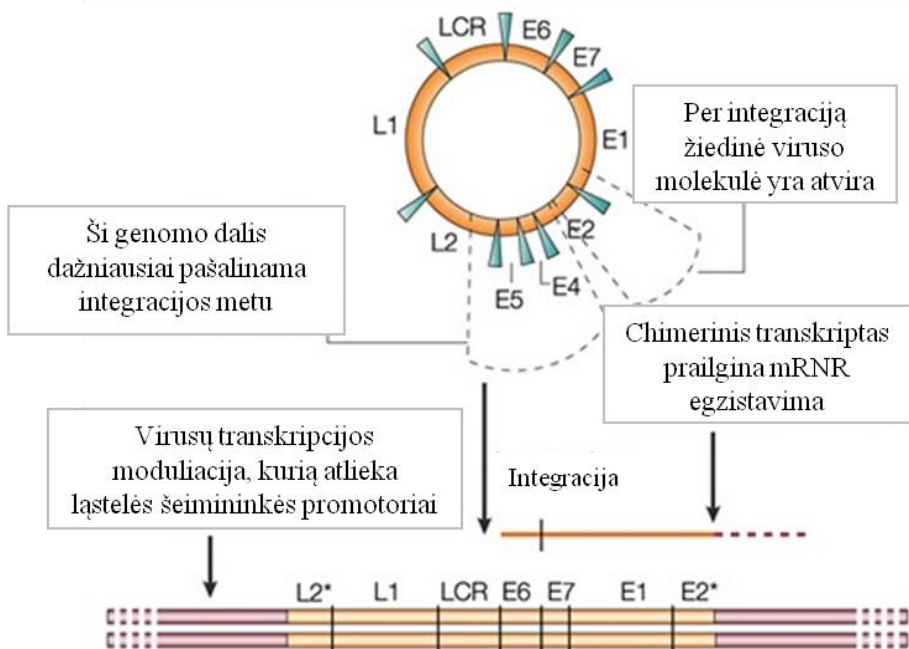
nukenksmindami pagrindinius supresorius ir aktyvuodami signalo perdavimo kelius²³.

Viruso geno prisijungimas prie ląstelės dalyvaujant E2 baltymui. E2 vykdo viruso geno prisijungimą prie ląstelės šeiminkės chromatino. E2 dalyvauja pririšant ŽPV DNR prie mitozinio chromatino. Proceso dalyvauja vadinamas Bromo domeną turintis 4 (Brd4) ląstelės baltymas. Brd4 baltymas sąveikauja su acetilinto lizino liekanomis, esančiomis histonų uodegose, kurios kyšo iš ląstelės šeiminkės nukleosomų²⁶. ŽPV E2 baltymas sąveikauja su Brd4 C galine sritimi per E2 transaktyvacijos domeną^{26,28}. E2 baltymo DNR prisirišimo-dimerizacijos domenas prisijungia virusinį genomą prie nukleosomos²⁶ (7 pav.).



7 pav. Viruso geno prisijungimas prie ląstelės šeiminkės chromatino dalyvaujant E2 baltymui. Pagal *McBride et al*²⁶

Integracijos metu viruso genomai dažniausiai nutrūksta *E1* ir *E2* genų atvirajame skaitymo rėmelyje. *E2* geno iškrita sąlygoja padidėjusią *E6* ir *E7* baltymų raišką, sutrikdomas ląstelių ciklas, apoptozė ir diferenciacija. *E6* ir *E7* baltymai inaktyvuoja ląstelės baltymus p53 ir pRb. *E7* genui susijungus su pRb genu atsipalaiduoja transkripcijos veiksnys E2F, kuris aktyvuoja genų, skatinančių DNR sintezę ląstelėje, raišką²⁹. pRb baltymas slopina p16 transkripciją. Po pRb inaktyvacijos ląstelėje gausiai sintetinamas p16²⁷. Įvykus ŽPV integracijai į ląstelės genomą kancerogenezės procesas tampa negrįžtamas.

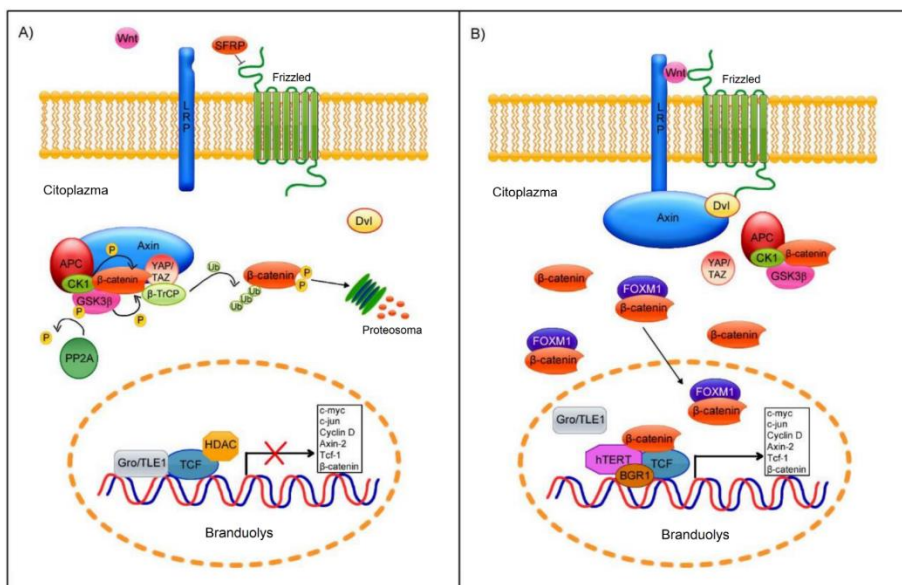


8 pav. Viruso integracija į šeiminių ląstelę. Žiedinėje ir linijinėje ŽPV geno struktūroje pažymėtos integracijos metu prarandamos sritys (*adaptuota pagal <http://www.nature.com/nrc/journal/v2/n5/images/nrc798-f2.jpg>*)

E6-E7 onkobaitymų ir p53 reikšmė Wnt signaliniame kelyje.

Wnt signalinis kelias – tai organizme išskiriamų glikoproteinų reguliuojamas kelias, priklausantis nuo β katenino. β kateninas yra transkripcijos koaktyvatorius, kurio kiekį ląstelėje reguliuoja β katenino destrukcijos kompleksas. Wnt signalinis kelias yra svarbus plaučių ir gerklų ligų patogenezėje¹²⁷. Wnt kelią aktyvuoja ŽPV E6-E7 onkobaitymai³⁰.

Wnt reguliuojami signaliniai keliai yra neaktyvūs, kai palaikomas mažas β katenino kiekis. Wnt ligandai prisijungia prie DVL receptorių. Aktyvuoti receptoriai perduoda signalą į ląstelės vidų. DVL baltymų aktyvacija kartu su LRP5/6 fosforilinimu sukelia β katenino destrukcijos komplekso inaktyvaciją – taip sudaromos sąlygos kauptis β kateninui. Transkripcijos koaktyvatorius β kateninas jungiasi su TCF transkripcijos veiksniais, taip sužadina genų transkripciją. E6-DVL kompleksas gali suardyti β kateniną degraduojantį kompleksą, dėl ko atsipalaidavęs β kateninas ima kauptis citoplazmoje. E6 sukeltas p53 degradavimas susijęs su β katenino degradacijos inaktyvacija, indukuojant FOXM1 transkripcijos faktoriaus ekspresiją. O E7 prisijungimas skatina β katenino stabilizavimą³⁰.



9 pav. E6-E7 onkobaltymų veikla Wnt/ β signalinio kelio etapuose

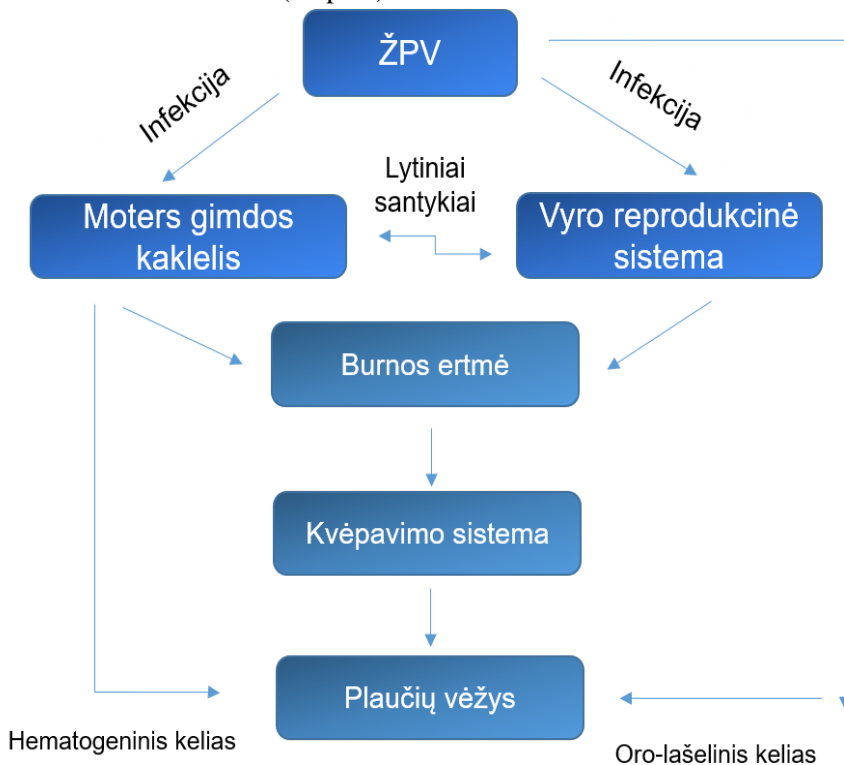
1.1.4 Žmogaus papilomos viruso perdavimo keliai

Ilgą laiką manyta, kad pagrindinis ir bene vienintelis ŽPV perdavimo kelias yra per gleivines lytinių santykių ar tiesioginio oda-oda kontakto metu, tačiau vėlesni tyrimai parodė, jog ŽPV gali būti perduodamas ne tik horizontaliuoju, bet ir vertikaliuoju keliu³¹. Horizontaliuoju keliu infekcija yra perduodama per lytinių organų, odos ar burnos gleivinę, o vertikalusis infekcijos perdavimo kelias – tai motinos viruso perdavimas naujagimiui gimdymo metu.

Dažniausiai ŽPV infekcija plinta horizontaliuoju keliu. Kliniškai tai buvo pademonstruota T. J. Barret ir jo kolegų 1954 m. atliktais eksperimentais. Moterims, kurių vyrai ant išorinių lytinių organų turėjo karpas, po 4-6 savaičių taip pat buvo pastebėtos lytinių organų karpas. Vėliau atlikus išsamesnius statistinius vertinimus buvo nustatyta, jog net 64 % asmenų, kurie lytiškai kontaktavo su ŽPV infekuotais partneriais, per maždaug porą mėnesių atsiranda lytinių organų karpų⁶.

Nepaisant to, kad lytinis perdavimo būdas ŽPV viruso atveju yra pagrindinis, atsiranda nemažai įrodymų, jog lytinis aktas nėra būtinas virusui perduoti. Šį faktą paremia eksperimentai, kuriais parodyta, kad net 15 % jaunų ir dar lytinių santykių neturėjusių merginų yra užsikrėtusios ŽPV. Tokiais atvejais ŽPV infekcija galėjo būti perduota motinos vaikui gimdymo

metu arba bet kuriuo vėlesniu laikotarpiu per viršutinių odos ir gleivinių sluosnių ląsteles³². Nemažas dėmesys skiriamas vertikaliajam ŽPV perdavimo būdui, kai motina perduoda ŽPV savo naujagimiui šio gimimo metu. Literatūroje toks kelias dar vadinamas perinataliniu keliu. Pastebėta, kad dažniausiai naujagimiai perinataliniu būdu užsikrečia 6 ir 11 tipų ŽPV³³. 2009 metais buvo atlikti tyrimai, kurių metu imti mėginiai iš naujagimių nosiaryklės ir lytinių takų gleivinės bei tirtas jų motinos infekuotumas ŽPV. Tyrimuose dalyvavusių motinų infekuotumas ŽPV siekė 21,6 %, o perdavimo dažnis naujagimiui buvo 9,4 %. Nustatyta, kad perinataliniu keliu virusas gali būti perduodamas net iki 24,5 % naujagimių, kuriuos gimdė ŽPV infekuotos motinos³⁴ (10 pav.).



10 pav. ŽPV infekcijos kelias plaučių vėžio atveju. Galimi ŽPV plitimo keliai: hematogeninis ir oro-lašelinis infekcijos perdavimo kelias. Adaptuota pagal Xiong et al¹⁵

Taip pat anksčiau manyta, kad ŽPV nepatenka į kraują ar limfą, nesukelia viremijos, todėl organizme negali patekti į gilesnius vidaus organus. Tačiau naujausi tyrimų rezultatai duoda pagrindą naujoms hipotezėms, pagal kurias ŽPV gali plisti ir limfogeniniu-hematogeniniu keliu

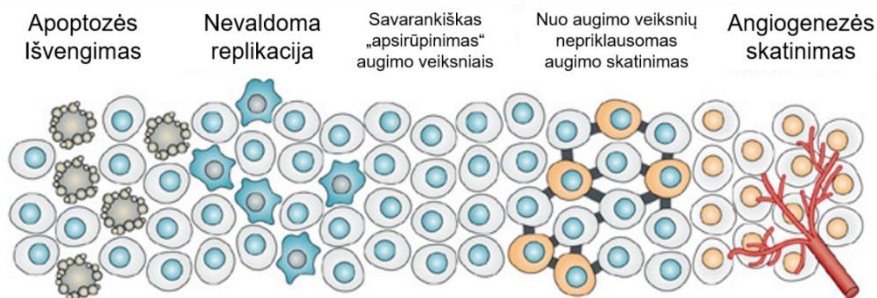
bei infekuoti krūtų³⁵ ar prostatos audinį³⁶. Tai pat yra duomenų, jog šis virusas aptinkamas ir plaučių navikiniuose audiniuose^{37,38}. Plaučių vėžio atveju ŽPV infekcijos sklaidos į plaučių periferiją kelias gali būti ir su oro srautu pernešamų infekuotų ląstelių kompleksų ar dalelių būdu³⁹. Tačiau ŽPV vaidmuo šių organų kancerogenezės procese dar nėra iki galo aiškus.

1.2 Kancerogenezės procesas. Vėžinės ląstelės bruožai. TNM klasifikacija

Vėžinės ląstelės bruožai. Mutacijoms veikiant genomo stabilumą, didėja tikimybė vykti kitoms mutacijoms. Mutacijos, sąlygojančios vėžinę transformaciją, dažniausiai nustatomos onkogenuose ir genuose navikų slopikliuose²⁵.

Vėžinės ląstelės bruožai:

- Nepriklausomas nuo augimo veiksnių augimo skatinimas (autokriniškas augimo skatinimas)
- Ląstelių augimo ir dalijimosi valdymo praradimas
- Atsparumas programuotos ląstelės mirties (apoptozės) signalams
- Sutrikę ląstelės senėjimo mechanizmai
- Angiogenozės skatinimas – suformavusios 2-3 mm³ tūrio naviką ląstelės „įjungia“ angiogenozės procesus
- Skvarba į sveikus audinius ir antrinių navikų formavimas⁴⁰.



11 pav. Vėžinės ląstelės bruožai. Adaptuota pagal Schmitt⁴⁰

TNM klasifikacija. Navikiniam procesui apibūdinti visame pasaulyje yra naudojama prancūzų onkologo P. Denua pasiūlyta ir Tarptautinės vėžio draugijos sąjungos patvirtinta Tarptautinė piktybinių navikų išplitimo vertinimo sistema (TNM klasifikacija):

- T – pirminio naviko išplitimas (angl. *Tumor*)
- N – metastazės sritiniuose limfmazgiuose (angl. *Nodus*)
- M – tolimosios metastazės (angl. *Metastasis*)⁴¹

Šios klasifikacijos reikšmė – teikti specialistams informaciją apie ligos prognozę, padedančią parinkti gydymo taktiką. Vienodai koduojamas

klinikinis ligos apibrėžimas įgalina efektyvią gydytojų, patologų, laboratorijos specialistų ir mokslininkų komunikaciją⁴².

1.3 Genai, kurių mutacijos gali sukelti vėžį. VNP vaidmuo kancerogenezės procese

Genai, kurių mutacijos gali sukelti vėžį, gali būti protoonkogenai ir naviko augimą slopinantys genai. Genai naviko slopikliai atsako už ląstelės dalijimosi slopinimą, pakitusių ląstelių apoptozės skatinimą, genomo stabilumo palaikymą. Šių genų funkcijos praradimo mutacijos skatina navikų atsiradimą. Protoonkogenai valdo ląstelių dalijimąsi ir diferenciaciją. Funkcijos įgijimo mutacijos šiuose genuose gali skatinti ląstelių dalijimąsi. Įvykus mutacijoms, protoonkogenai aktyvuojami ir tampa onkogenais. Protoonkogenai onkogenais tampa dviem keliais: dalyvaujant virusams ir įvykus mutacijoms²⁵.

Mutacijas ląstelės protoonkogenuose, sąlygojančias geno koduojamo baltymo pokyčius, pagal mutacijų atsiradimo pobūdį galima suskirstyti į kelias grupes:

- ▶ taškinės mutacijos
- ▶ genų amplifikacija
- ▶ chromosomų pertvarka:
 - ▶ translokacijos
 - ▶ srities DNR pertvarka (angl. *local DNA rearrangements*)²⁵

Genų mutacijos atlieka svarbų vaidmenį daugelio ligų etiologijoje. Kompleksinės vieno nukleotido variacijų kombinacijos gali tapti vienu svarbiausių genetinių tyrimų įrankiu. **Vieno nukleotido variantas** – taškinė mutacija, įvykusi vieną nukleotidą pakeičiant kitu. **Vieno nukleotido polimorfizmas** (VNP) (angl. *single nucleotide polymorphism* – SNP) yra genomo variantas, kurio retasis alelis populiacijoje pasireiškia didesniu dažniu nei 1 %⁴³.

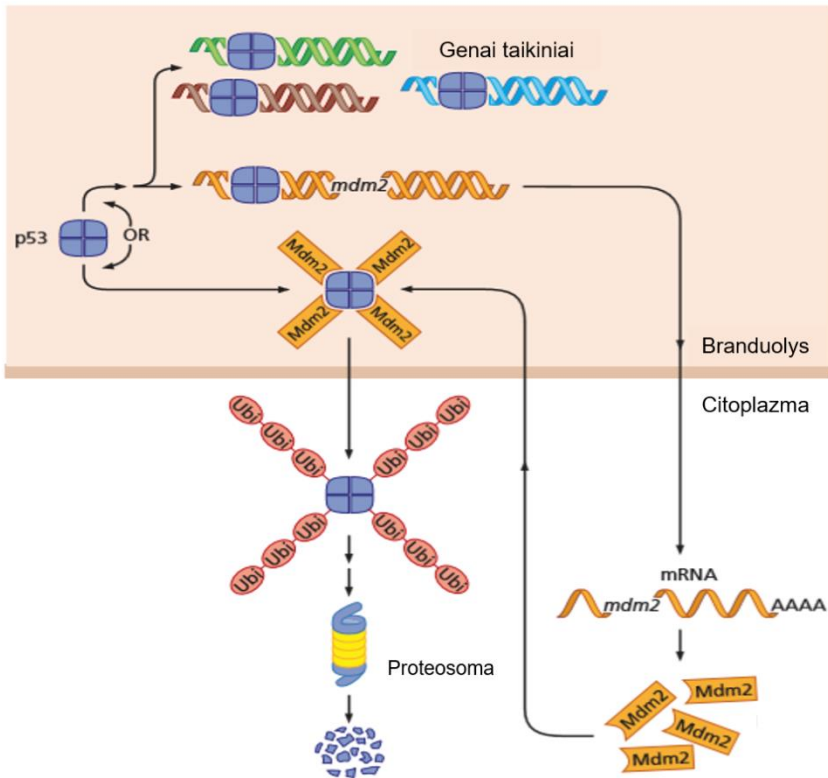
1.4 Kancerogenezės procese dalyvaujantys genai ir jų sąveika su ŽPV

Šio tyrimo metu analizuojama *TP53* (rs1042522), *MDM2* (rs2279744), *MDM4* (rs4245739), *CASP8* (rs3834129), *MTHFR* (rs1801133) ir *CCR5* (rs333) genų VNP sąsajos su pacientų, sergančių gerklų ir plaučių vėžiu, išgyvenamumo rodikliais, infekuotumu ŽPV ir su kitais klinikiniais parametrais. Naviko formavimosi procese dalyvauja daugelis genų, todėl

svarbu tirti jų tarpusavio sąveikos mechanizmus bei vertinti sinergistinio ryšio poveikį ląstelės piktybėjimo procesuose⁴⁴.

1.4.1 *TP53*, *MDM2* ir *MDM4* komplekso genai ir ŽPV

TP53 genas yra vienas iš geriausiai žinomų genų navikų slopiklių. *TP53* valdo DNR pažeidų kontrolės tašką, ląstelės senėjimą, programuotą mirtį²⁵. p53 baltymo kiekis ląstelėje yra reguliuojamas, tam pasitelkiama ubikvitino ligazė – Mdm2. Ši ligazė prijungia prie baltymų taikinių ubikvitiną, tokiu būdu siunčiamas signalas kompleksui suardyti proteosomoje (12 pav.). Mdm2 užtikrina nedidelis p53 baltymo kiekį. Mdm4 yra Mdm2 funkcinis analogas. Esant pažeidų, p53 fosforilina kelias kinazės. Fosforilinimas mažina p53 giminingumą Mdm2 ligazei. Taip slopinamas p53 ardymas, p53 kiekis ląstelėje išauga²⁵.



12 pav. *TP53*, *MDM2* komplekso veikimas. Mdm2 baltymo veikimu užtikrinamas nedidelis p53 baltymo kiekis. Ubikvitino ligazė prijungia ubikvitiną prie baltymo taikinio ir jis siunčiamas į proteosomą, kad būtų suardytas. Adaptuota pagal Weinberg et al²⁵

ŽPV E6 baltymui prisijungus prie p53, jis tampa neaktyvus, tad net įvykus DNR pažaidoms, ląstelės dalijasi, o apoptozė nevyksta²⁹ (13 pav.). E6 onkobaltymas sąveikauja per tikslinį ląstelinį baltymą. E6 prisijungimo prie p53 metu sukliamamas ubikvitilimas ir p53 skilimas, dėl ko stabdoma ir infekuotų ląstelių apoptozė⁴⁵.



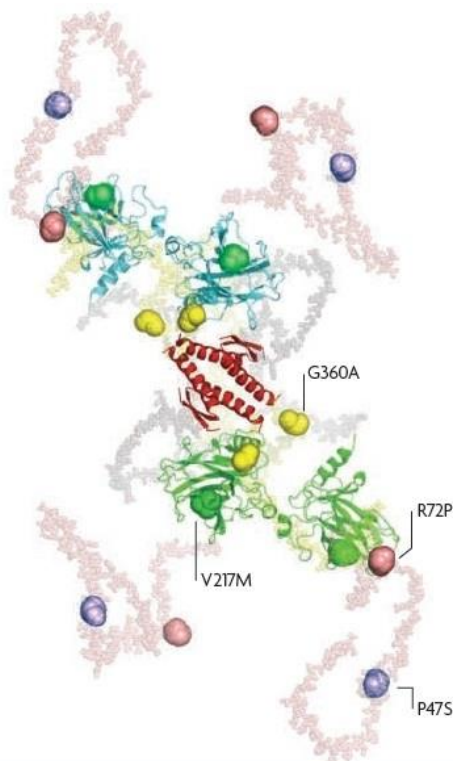
13 pav. *TP53*, *MDM2* ir ŽPV sąveika. Žmogaus p53 baltymo funkciniai domenai ir jų sąveikos su MDM2 ir ŽPV sritys. Skaitmenys žymi aminorūgštis baltymo sekoje. Adaptuota pagal *Ruttkay-Nedecky et al*⁴⁵.

1.4.2 *TP53* genas

Vienas iš svarbiausių naviką slopinančių genų yra p53 baltymą koduojantis *TP53* genas¹¹⁶. Geną sudaro 19 149 bp, jis lokalizuotas 17p13 chromosomoje. Pagrindinis *TP53* geno transkriptas yra 2 586 nukleotidų ilgio mRNR, kuri sudaryta iš 5' ir 3' netransliuojamų sričių (angl. *untranslated region*, UTR) ir koduojančios sekos (angl. *coding sequence*, CDS). Ji išsidėsto nuo 2 iki 11 egzono ir gali būti transliuojama į 393 aminorūgščių ilgio produktą⁴⁷. Šis genas atsakingas už ląstelės branduolio fosfoproteino (p53 baltymo) sintezę. Pagrindinė šio baltymo funkcija – proliferacijos reguliavimas, apoptozės indukavimas⁴⁶, senėjimo bei autofagijos procesų reguliavimas⁴⁸. Šio baltymo aktyvumo inhibicija yra siejama su kancerogenezės procesu ir ląstelių piktybėjimu. Jo aktyvumą lemia keletas veiksnių: mutacijos, VNP, potransliacinės modifikacijos. Nepaisant mutacijų ir potransliacinių modifikacijų svarbos, pastarąjį dešimtmetį atlikti tyrimai suteikia vis daugiau informacijos apie *TP53* geno 4 egzono 72 kodono pozicijoje vykstančios transversijos svarbą piktybinės transformacijos metu.

***TP53* geno 72 kodono polimorfizmas.** Kancerogenezės procese vienas iš labiausiai tyrinėjamų *TP53* geno VNP yra 4 egzono 72 kodonas. Šioje pozicijoje lokalizuotas VNP (rs1042522) žymi G transversiją į C, kuri lemia arginino (CGC) aminorūgšties pokyčių į proliną (CCC)⁴⁹. 72 kodono

VNP yra lokalizuotas prolino gausiam domene, kuris svarbus ląstelių augimo slopinimo ir apoptozės indukcijos procesams⁵⁰.



14 pav. Erdvinė p53 baltymo struktūra. R72P rausva spalva pavaizduota polimorfinė sritis, kurioje vyksta arginino aminorūgšties pokytis į proliną. Pagal *Tidow et al*⁵¹.

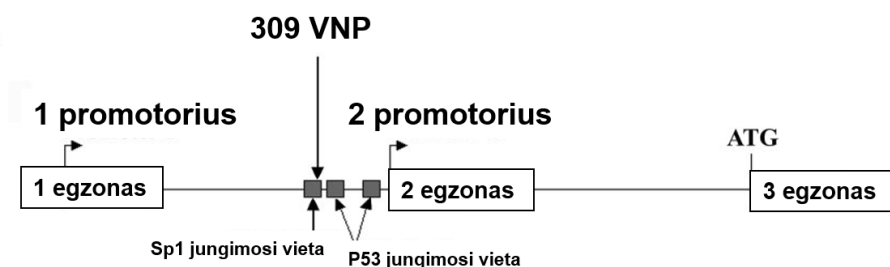
Šie variantai nesiskiria gebėjimu prisijungti prie specifinių DNR sekų, tačiau skiriasi jų funkcinės savybės⁵². Dėl efektyvesnės apoptozės indukcijos ir atsparumo degradacijai, Arg baltymo izoforma pasižymi didesniu naviko slopinimo potencialu (14 pav.). Manoma, kad šios izoformos skiriasi jautrumu chemoterapiniam gydymui platina ir gali turėti reikšmę pacientų išgyvenamumo rodikliams⁴⁴.

1.4.3 *MDM2* ir *MDM4* – genai homologai

MDM2 (angl. *murine double minute 2*) tai protoonkogenas, kuris dalyvauja ląstelės cikle ir yra atsakingas už ląstelių proliferaciją⁵³. Kaip jau minėta, tai neigiamas *TP53* geno reguliatorius, o *MDM2* kiekis ląstelėje veikia p53 antinavikinį aktyvumą. Dėl to pažeistos ląstelės gali išvengti ciklo

patikros kontrolės taške⁵⁴. Šis genas lokalizuotas 12 chromosomos ilgajame petyje (12q14.3-q15), jo dydis – 37 259 bp. *MDM2* geną sudaro 12 egzonų, dvi promotorinės sekos (P1 ir P2 aktyvuojama atsako į p53 metu)⁵⁵.

***MDM2* geno 309 pozicijos polimorfizmas.** *MDM2* geno VNP (rs2279744), lokalizuotas 1 introno 309 pozicijoje. T nukleotido transversija į G didina *MDM2* geno P2 promotoriaus afiniškumą Sp1 (angl. *specificity protein 1*) transkripcijos veiksmui, ši sąveika lemia didesnę Mdm2 baltymo kiekį ląstelėje⁵⁶ (15 pav.). Dalis pastaraisiais metais atliktų tyrimų patvirtino G/G genotipo sąsają su didesne vėžio rizika⁵⁷. Polimorfizmo dažnis populiacijose gana aukštas. Atlikti tyrimai parodė, jog šis VNP spartina onkogenės procesus, taip pat šis VNP dažniau identifikuojamas jaunesnio amžiaus pacientams⁵⁸.



15 pav. VNP *MDM2* geno promotoriuje. Sumažinamas p53 naviko supresoriaus aktyvumas ir skatinamas navikų formavimasis. Adaptuota pagal Arva et al⁵⁹.

Wo ir kolegų atlikta metaanalizė parodė, kad G/G VNP reikšmingai susijęs su padidėjusia plaučių vėžio rizika⁶⁰, tačiau daugelis kitų mokslininkų darbų rezultatų išlieka prieštaringi, tad reikalingi platesnės apimties tyrimai ir detalesnė analizė⁵⁷.

***MDM4* genas** aptinkamas 1-oje žmogaus chromosomoje, ilgojo peties 32 pozicijoje (1q32). Šis genas sudarytas iš 17 egzonų. *MDM4* genas yra *MDM2* homologas, sudarytas iš p53 prisijungimo vietos N-gale ir cinko pirštų motyvo C-gale¹⁸. *MDM4* geno sintetinamas baltymas slopina p53 veiklą, prisijungdamas prie transkripcijos aktyvacijos srities. Taip pat sąveikauja su *MDM2* baltymu per cinko pirštų domeną ir taip inaktyvuoja pastarojo degradaciją⁶¹.

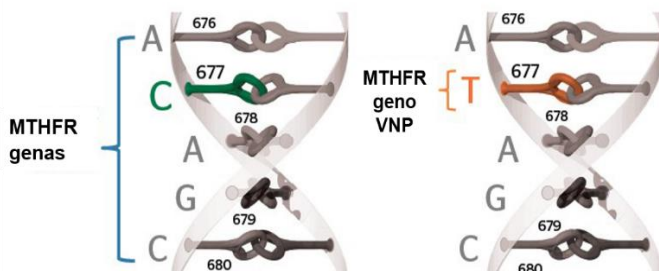
***MDM4* geno VNP34091.** *MDM4* geno VNP34091 (rs4245739) pakaita iš A į C vyksta 3' netransliuojamame regione (UTR), dėl ko sukuriame naują miR-191 prisijungimo vietą, tokiu būdu ekspresija silpnėja. Šis VNP siejamas su navikinio proceso iniciacija¹⁸. Gao ir kolegų atlikti

tyrimo rodo, jog A/C ir C/C variantai reikšmingai susiję su mažesniu jautrumu plaučių vėžio atveju, palyginti su A/A variantais⁶². Zhou ir kolegų atlikti pacientų, sergančių stemplės vėžiu, tyrimai, parodė, kad A/C ir C/C variantai susiję su sumažėjusia rizika susirgti šios lokalizacijos piktybiniais navikais⁶³.

1.4.4 *MTHFR*, *CASP8*, *CCR5* genai, jų VNP ir sąsajos su ŽPV

***MTHFR* genas.** Metilentetrahidrofolato reduktazė – *MTHFR* yra pagrindinis folio rūgšties ir nukleotidų metabolizmo fermentas, palaikantis DNR stabilumą, sukeldamas negrįžtamą 5,10-metilenetetrahidrofolato konversiją į 5-metiltetrahidrofolatą^{64,65,66}. Folatai yra būtini nukleotidų sintezei ir metilinimui⁶⁷. *MTHFR* lokalizuotas 1 chromosomoje, trumpajame petyje (1p36.3). Genas yra sudarytas iš 14 egzonų, 22 kb⁶⁸. Rai ir bendraautorių atlikti tyrimai rodo folio rūgšties svarbą nuo ŽPV priklausomiems kancerogenezės procesams gimdos kaklelio vėžio atveju⁶⁹.

MTHFR geno polimorfinis variantas, kai C pakeičiamas T (alaninas keičiamas valinu), yra gana dažnas. C677T (rs1801133) siejamas su fermentiniu aktyvumu^{70,71} (16 pav.). Palyginti su laukinio tipo genotipu, C/T variantas turi 65% fermentinio aktyvumo, o T/T varianto atveju fermentinis aktyvumas tesiekia 10-20%. Fermento aktyvumo pokyčiai siejami su kancerogenezės procesais⁷². Keletas autorių teigia, kad *MTHFR* C677T T/T variantas labiau padidina plaučių vėžio riziką, lyginti su C/C ir C/T genotipais⁷⁰.



16 pav. *MTHFR* geno 677 pozicijoje vykstanti C pakaita į T, alaninui keičiantis valinu Adaptuota pagal <https://www.puregenomics.com/whatsnppage.aspx>

***CASP8* genas.** *CASP8* (kaspazė-8) yra cisteino proteazių šeimos narys⁷³. Kaspazė yra labai svarbi ląstelių mirties signalams generuoti ir potencialiai piktybinėms ląstelėms pašalinti. *CASP8* dalyvauja ląstelių apoptozės procesuose, DNR fragmentacijoje, chromatinio kondensacijos

procesuose^{74,75}. *CASP8* genas lokalizuotas 2-oje chromosomoje, ilgojo peties 33–34 pozicijoje (2q33–34) ir yra sudarytas iš 11 polimorfinių egzonų⁷⁶. *CASP8* genetiniai pokyčiai gali paveikti jautrumą vėžiui^{77,78}.

Tyrimai rodo, kad *CASP8*-652 6N ins/del (rs3834129) polimorfizmas gali būti siejamas su kai kurių lokalizacijų vėžio progresavimu. Manoma, kad būtent *CASP8* geno variantai, įvykus 6 nukleotidų CTTACT delecijai, gali būti laikomi vienu iš vėžio rizikos veiksnių⁷⁷. Polimorfizmai įvykę *CASP8* gene keičia šio geno raišką ir aktyvumą, jie yra siejami su plaučių vėžio vystymusi⁷⁰. Manzo-Merino ir bendraautorių atlikti tyrimai rodo, jog įvairių ŽPV tipų *E6* onkogenas gali prisidėti prie *CASP8* aktyvumo reguliavimo ir tai yra svarbus viruso gyvavimo ciklo etapas keratinocitų diferenciacijos metu⁷⁹.

***CCR5* genas.** *CCR5* (cisteino-cisteino chemokino receptorius) lokalizuotas 3-oje žmogaus chromosomoje, trumpojo peties 21.31 regione (3p21.31) (GeneCards). *CCR5* atlieka svarbų vaidmenį vystantis uždegiminiam procesui, kuris taip pat yra svarbus piktybinių navikų progresijos ir metastazavimo elementas⁸⁰. Chemokinai reguliuoja angiogenezę ir dėl to gali kontroliuoti navikų augimą⁸¹.

CCR5Δ32 (rs333) – tai 32 nukleotidų sekos delecija (GTCAGTATCAATTCTGGAAGAATTTCCAGACA), kuri gali pakeisti geno raiškos lygį arba baltyminio produkto funkciją. To pasekmė – nefunkcionalus chemokino receptorius^{81,82}. Zheng ir bendraautoriai tyrimo metu analizavo *CCR5Δ32* geno VNP ir ŽPV sąsajas gimdos kaklelio vėžio atveju. Nors *CCR5Δ32* alelis yra retasis alelis, nustatytas tik keletu atvejų, tačiau šio alelio buvimas lėmė 4,58 karto didesnę gimdos kaklelio kancerogenezės procesų riziką⁸³.

1.5 Gimdos kaklelio vėžys ir jo sąsajos su ŽPV

Gimdos kaklelio vėžys – vienas dažniausių moterų piktybinių navikų. Lietuvoje sergamumas siekia 26,1, o mirtingumas – 7,5 atv. 100 tūstančių moterų. Tarptautinės vėžio tyrimų agentūros duomenimis, Europoje sergamumas – 11,4, mirtingumas – 3,8 atv. 100 tūkstančių moterų. Remdamiesi šiais duomenimis galime daryti išvadą, jog tiek sergamumo, tiek mirtingumo gimdos kaklelio vėžiu rodikliai Lietuvoje gerokai viršija Europos šalių vidurkį.

ŽPV infekcija gimdos kaklelio vėžio atveju. ŽPV yra pagrindinis šio vėžio rizikos veiksnys. Gimdos kaklelio vėžio atveju ŽPV nustatomas

85-99 % tiriamųjų¹³¹. Ilgą laiką Nacionaliniame vėžio institute vykdomų ŽPV infekcijos tyrimų duomenimis, gimdos kaklelio vėžiu sergančių moterų infekuotumas ŽPV siekė 74,2 % invazinio bei 86,9 % neinvazinio vėžio atvejais¹³³, dažniausiai identifikuotas 16 tipo ŽPV abiejų grupių moterims (48,5 % ir 50,0 %). Tyrinėjant virusinius variantus nustatyta, kad dažniausiai identifikuoti Europinio varianto 16 tipo ŽPV: CC Europinis L83V variantas identifikuotas 66,7 %, CIS – 62,0 %¹³³.

Plokščialąstelinio gimdos kaklelio vėžio kilmės teorija grindžiama tuo, kad vėžys prasideda iš pakitusio (atipinio ir displazinio) gimdos kaklelio transformacijos zonos epitelio. Pagal DNR sekų homologiją ir klinikines pasekmes ŽPV skirstomi į pažeidžiančius gleivinę, odą ir aptinkamus ant *epidermysplasia verruciformis*. ŽPV infekcija pasireiškia, kai daug virusų iš infekuotų paviršių ar keratino fragmentų pro epitelio pažeidimus patenka į bazinės ląsteles¹³⁵. ŽPV baltymai imortalizuoja ląstelę, tačiau ląstelės transformacija į naviknę įvyksta sukeliant ir genetinį nestabilumą¹³⁴. Šito proceso padarinys – ryški displazija, karcinoma *in situ* ir invazinis vėžys¹³⁵.

1.6 Gerklų vėžys ir jo sąsajos su ŽPV

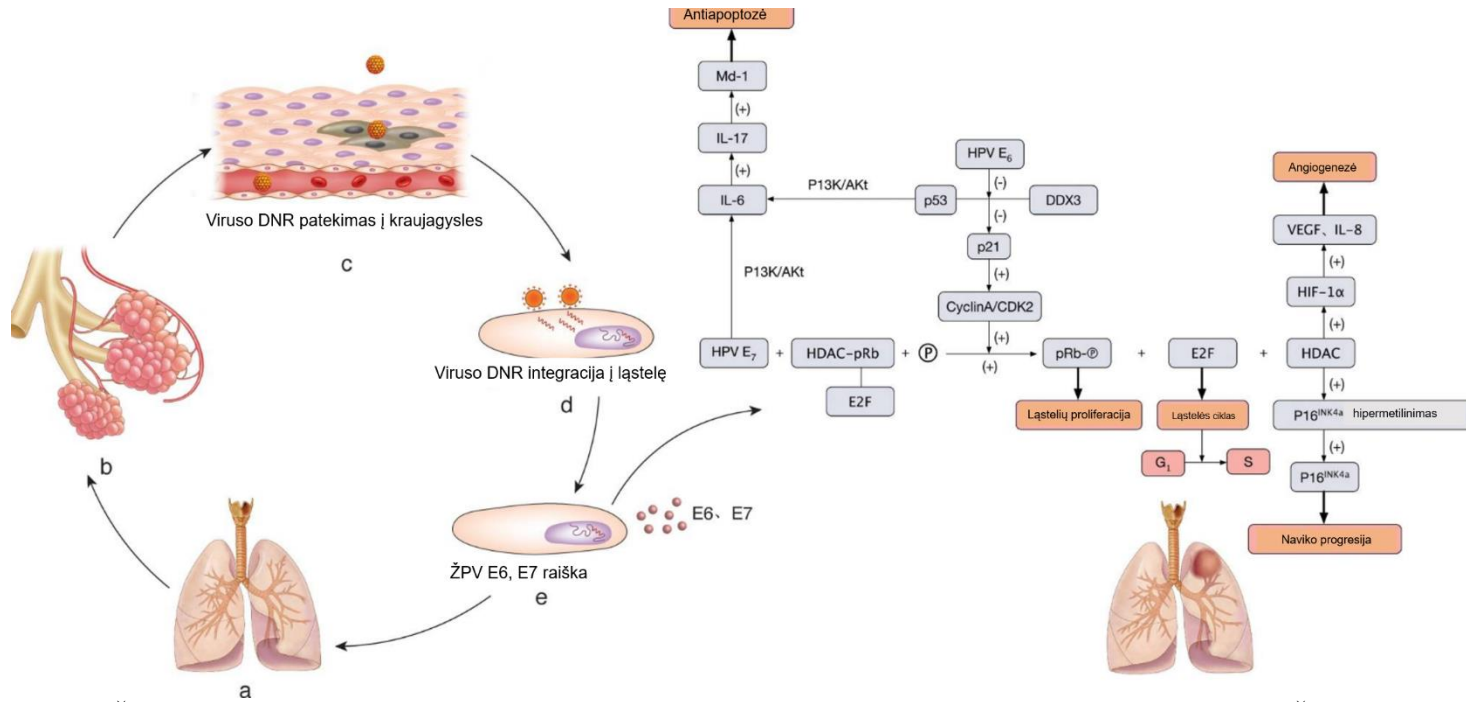
Gerklų vėžys yra vienas dažniausių galvos-kaklo piktybinių navikų^{84,85}. Kasmet diagnozuojama 151 tūkst. atvejų, iš kurių 90 tūkst. baigiasi mirtimi^{86,87}. Ši liga dažniausiai nustatoma vyrams penktąjį-šeštąjį gyvenimo dešimtmetį⁸⁸. Rūkymas bei alkoholio vartojimas yra pagrindiniai rizikos veiksniai, siejami su šia liga⁸⁹, tačiau manoma, jog infekciniai patogenai, tokie kaip ŽPV, gali turėti įtakos gerklų kancerogenezės procesui⁹⁰. Pažymėtina, kad apie 20 % pacientų, kuriems diagnozuojamas gerklų vėžys, teigia, kad nebuvo veikiami kancerogeninių veiksnių. Šis faktas duoda pagrindą iškelti hipotezes, jog šios lokalizacijos navikams vystytis svarbūs kiti – genetiniai, infekciniai ar aplinkos veiksniai bei jų tarpusavio sąveika⁹¹.

ŽPV infekcija gerklų vėžio atveju. Nepaisant to, jog per keletą pastarųjų metų rūkančių asmenų pasaulyje mažėja, sergamumas gerklų vėžiu, ypač jaunesniame amžiuje, didėja. Ši tendencija dažnai siejama su plintančia ŽPV infekcija⁹². Gerklų epitelio pereinamoji zona, kurioje išorinis epitelis pereina į vidinį ir kuri anatomiškai yra labai artima gimdos kaklelio pereinamajai zonai, labai tinkama ŽPV virusams tarpti^{93,94}. Įvairių autorių duomenimis, ŽPV infekcija gerklų vėžio atveju nustatoma nuo 3 % iki 85 %⁹⁵.

1.7 Plaučių vėžys ir jo sąsajos su ŽPV

Plaučių vėžys yra vienas dažniausių piktybinių navikų⁷⁴, lemiančių didžiausius mirtingumo rodiklius visame pasaulyje⁹⁶. Pasaulio sveikatos organizacijos (PSO) duomenimis 2012 metais buvo diagnozuota 1,8 mln. (12 406 tūkst. vyrų, 491 200 moterų) naujų plaučių vėžio atvejų, tai sudaro 12,7% visų vėžio atvejų per metus. 1,59 mln. atvejų 2012 metais baigėsi mirtimi, tai sudaro 18,2% visų vėžio sukeltų mirčių^{96,97}. Nacionalinio vėžio instituto Vėžio registro duomenimis, 2012 metais nustatyti 1421 nauji plaučių vėžio atvejai bei užfiksuotos 1355 mirtys nuo šios ligos⁹⁸. Tabakas laikomas pagrindiniu plaučių vėžio rizikos veiksniu^{96,99,100}, tačiau 15-20% žmonių, sergančių šia liga, niekada nerūkė.

ŽPV infekcija plaučių vėžio atveju. Jau 1979 metais Syrjanen iškėlė hipotezę apie plaučių vėžio ir ŽPV sąsajas³⁸. Atlikti genų kandidatų tyrimai ir ŽPV viruso nustatymas plaučių navikiniame audinyje įrodo ne tik kancerogenų, bet ir virusinių ir genetinių veiksnių dalyvavimą plaučių vėžio kancerogenezės procese^{74,101,102} (17 pav.).



17 pav. ŽPV infekcijos perdavimo į plaučių alveoles mechanizmas. **A, B** – plaučių audinio struktūra; **C** – ŽPV DNR patekimas į plaučių audinio ląsteles hematogeniniu keliu; **D** – virusinės DNR integracija į ląstelę šeimininę; **E** – ŽPV E6 inaktyvina p53 ir slopina p21. Ciklono kompleksas A/CDK2 fosforilina pRb, skatinama proliferacija, E2F transkripcijos faktorius lemia ląstelės ciklo perėjimą iš G₁ į S fazę. E7 išardo HDAC/pRb/E2F kompleksą, p16^{INK4a} veikia slopinama, dėl ko navikas progresuoja. Adaptuota pagal Xiong et al¹⁵

2. TYRIMO METODIKA

2.1 Tiriamųjų atranka ir įtraukimas į tyrimą

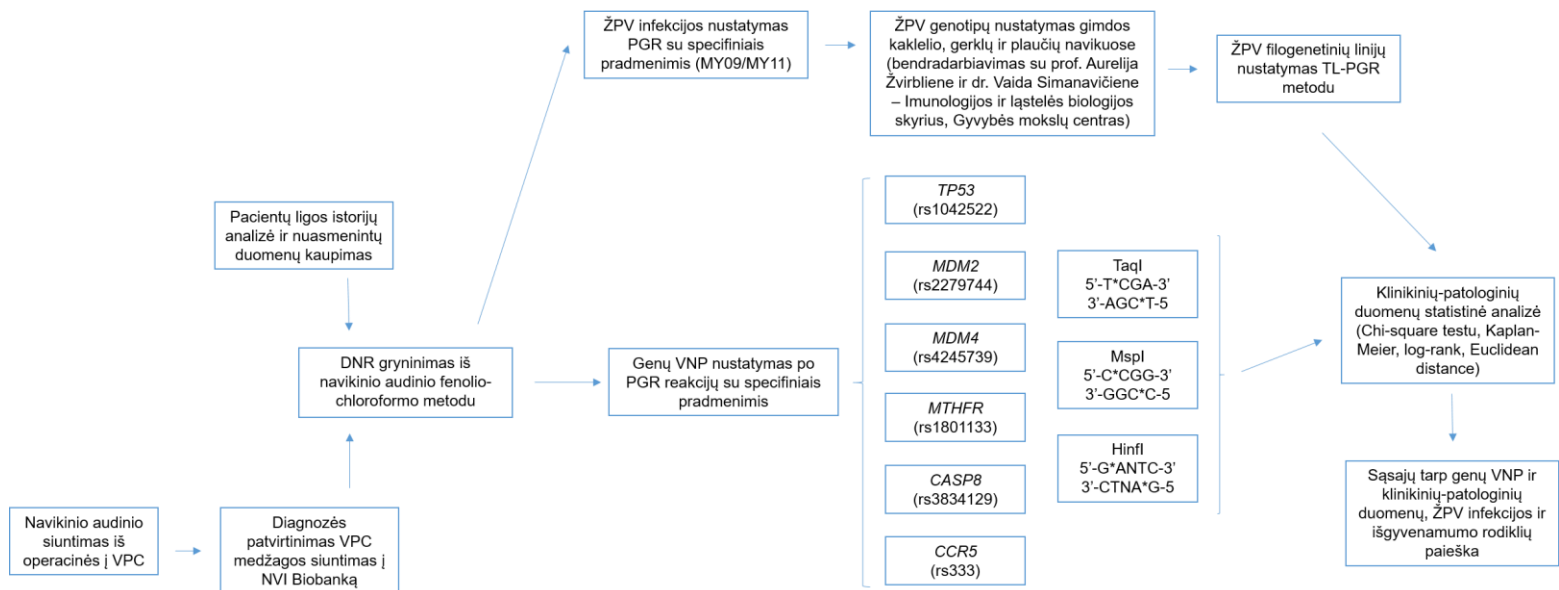
Tyrimas atliktas doktorantūros studijų metu Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centre ir Nacionaliniame vėžio institute (NVI). Darbas pradėtas rengti gavus Lietuvos biomedicininų tyrimų etikos komiteto leidimą biomedicininiam tyrimui NVI atlikti: 158200-13-638-204, papildymas 2014-01-23. Dalyvauti tyrime buvo kviečiami asmenys, kuriems pirmą kartą buvo diagnozuotas gimdos kaklelio, gerklų ar plaučių vėžys, ir kuriems pirmasis vėžio gydymo būdas buvo operacinis. Į tyrimą įtraukti pacientai, pasirašę Asmens informavimo ir Informuoto paciento sutikimo formas. Vėžio diagnozė buvo patvirtinta histologiniu tyrimu patyrusių patologų Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų filiale Valstybiniame patologijos centre. Naviko medžiaga moksliniam tyrimui buvo atidalyta patologų ir perduota saugoti į NVI Biobanką iki ištyrimo pradžios. 2013–2015 metais į tyrimą įtraukti 297 pacientai, operaciniu būdu gydyti Onkoginekologijos, Krūtinės chirurgijos ir onkologijos bei Galvos-kaklo ir odos navikų chirurgijos skyriuose.

2.2. Tyrimo dizainas

Tyrimo metu buvo vertinta ŽPV, atrinktųjų genų VNP ir klinikinių-patologinių duomenų sąsajos bei reikšmė gimdos kaklelio, gerklų ir plaučių vėžiu sergančių pacientų išgyvenamumui. Tyrimo metu kaupti bei analizuoti paciento ligos duomenys (naviko stadija, diferenciacijos laipsnis, TNM, ligos progresavimo ir paciento išgyvenamumo rodikliai) ir gyvenimo duomenys (amžius, nikotino, alkoholio vartojimo laikotarpis). Pirmiausia buvo atliktas infekuotumo ŽPV tyrimas, pagal kurio rezultatus pacientai buvo skirstomi į grupes. Įvertinus mokslinės literatūros duomenis paaiškėjo, kad ŽPV ir daugelio genų VNP plačiai ištyrinėti mokslininkų visame pasaulyje gimdos kaklelio vėžio atvejais, todėl tolesniems VNP tyrimams buvo atrinkti tik gerklų ir plaučių vėžiu sergantys pacientai (141 pacientas). Pastarųjų buvo vertinami klinikiniai-patologiniai duomenys, sudarytos tikslinės tiriamosios grupės. Pacientai į grupes buvo skirstomi remiantis klinikiniais-patologiniais duomenimis, kurie buvo gauti iš pacientų ligos istorijos ar ambulatorinės kortelės. Su biologiniu ėminiu susijusi informacija apie pacientą buvo renkama nuo tyrimo pradžios bei periodiškai atnaujinama (pvz., duomenys apie ligos progresavimą bei paciento išgyvenimo trukmę).

Visi surinkti pacientų biologiniai ėminiai pirmiausia buvo ištirti dėl infekotumo. Vėliau buvo atlikti numatytųjų genų VNP tyrimai. Toliau buvo atliktas visų parametrų vertinimas bei visuminė analizė siekiant nustatyti tirtųjų parametrų tarpusavio sąsajas bei reikšmę pacientų išgyvenamumo rodikliams bei ligos eigos prognozei. Tyrimo dizainą ir darbų eigą apibendrinanti schema pateikta 18 paveiksle.

18 pav. Tyrimo dizaino ir darbų eigos schema



2.3. Metodai

2.3.1. DNR gryninimas iš navikinio audinio

DNR buvo gryninama organinės ekstrakcijos būdu pagal Nacionalinio vėžio instituto Biobanke patvirtintą Standartinę veiklos procedūrą (SVP) bei metodiką. Naviko audinio mėginys (30–50 mg) iš gilaus šaldymo (-150°C) šaldiklio *Sanyo* (Japonija) nedelsiant perkeliamas į skysto azoto transportinę talpą ir transportuojamas į apdorojimo vietą. Apdorojimo vietoje, laminarinėje traukos spintoje *Kojair* (Singapūras) mėginys susmulkinamas skystame azote. Susmulkintas mėginys nedelsiant perkeliamas į 1,5 ml *Biopur* mikromėgintuvėlių *Eppendorf* (Vokietija), įpilama šviežiai pagaminto buferinio lizavimo tirpalo (50 mM Tris HCl, 200 mM NaCl; 20 mM EDTA, 1% SDS) ir 10 µl proteinazės K (10 mg/ml) tirpalo *Thermo Fisher Scientific* (Lietuva). Mišinys inkubuojamas 55° C temperatūroje nuo 12 valandų iki 3 parų (priklausomai nuo naviko ląstelių kiekio). DNR valymas atliktas fenolio-chloroformo tirpalais *Carl Roth* (Vokietija), nusodinimas – etanolio (96%) tirpalu. Po nusodinimo DNR džiovinama džiovinimo spintoje. Prieš atliekant ŽPV ir VNP tyrimus, išdžiovinta DNR tirpinama 500 µl steriliame vandenyje *Carl Roth* (Vokietija) 4° C temperatūroje.

2.3.2. Išgrynintos DNR kokybės vertinimas

DNR kokybės įvertinimas atliktas spektrofotometru NanoDrop™ 2000 UV-Vis Spectrophotometer *Thermo Fisher Scientific* (Lietuva), naudojant 1 µl išskirtos DNR iš mėginio. Esant 260 nm ir 280 nm bangos ilgiams, sugerties reikšmių santykis ($A_{260/280}$) turi būti 1,7-1,9.

2.3.3. DNR amplifikavimas PGR metodu

ŽPV ir tirtiesiems genams VNP nustatyti buvo naudota polimerazės grandininė reakcija (PGR). Išgrynintai DNR pagausinti atliktos PGR reakcijos pagal Saiki¹⁰⁸ ir bendraautorių metodiką, naudojant specifinius sintetinius oligodeoksiribonukleotidinius pradmenis (1 lentelė). Genominė DNR naudojama kaip DNR matrica. Reakcijos mišinį sudaro DNR (1µg), tiesioginis ir atvirkštinis pradmuo (100 pmol), *DreamTaq Green PCR Master Mix* (buferinis tirpalas *Taq* DNR polimerazei, dNTP mišinys, MgCl₂, *Taq* polimerazė) *Thermo Fisher Scientific* (Lietuva). Amplifikacijos programos parenkamos pagal standartinę schemą arba reakcijos sąlygos

modifikuojamos atsižvelgiant į pradmenų lydymosi temperatūrą (T_m) ir amplifikuojamo produkto ilgį. Tiriamųjų genų programų protokolai pateikti 1 priede.

TP53 geno 72 kodono polimorfinio varianto nustatymas. Prolino (Pro) ir Arginino (Arg) aleliui nustatyti naudotos atskiros pradmenų poros. Pro alelio atveju gaunamas 177 bp fragmentas, amplifikacijos metu naudojami pradmenys: TP53 Pro1 (5'-GCC AGA GGC TGC TCC CCC C) ir TP53 Pro2 (5'-CGT GCA AGT CAC AGA CTT) *UAB Grida* (Lietuva). Arg alelio atveju gaunamas 141 bp fragmentas, naudojami pradmenys: TP53 Arg1: 5'-TCC CCC TTG CCG TCC CAA ir TP53 Arg2 5'-CTG GTG CAG GGG CC CGC *UAB Grida* (Lietuva). Laminarinėje spintoje steriliomis sąlygomis šaldymo stovelyje ruošiamas 25 μ l PGR reakcijos mišinys bei neigiamos kontrolės mišinys, vietoj DNR įpilant 2 μ l sterilaus vandens. Reakcija ruošama 0,5 ml PGR mėgintuvėliuose – Biopur® *Eppendorf* (Vokietija). Reakcijos sudėtis: 12,5 μ l DreamTaq Green PCR Master Mix, 8,1 μ l sterilaus vandens, 1,2 μ l pirmojo ir antrojo pradmenų, 2 μ l išgrynintos mėginio DNR. Reakcijos mišinys išmaišomas purtyklėje ir dedamas į PGR termociklerį Labcycler *Senso Quest GmbH* (Vokietija). PGR reakcijos protokolas pateiktas 1 lentelėje. PGR ciklams pasibaigus, palaikoma 4 °C temperatūra. Po DNR pagausinimo atliekama PGR produktų vizualizacija 2 % agarozės gelyje.

MDM2 geno 309 polimorfinio varianto nustatymas. Šis variantas nustatomas amplifikuojant 89 bp ilgio fragmentą, turintį T/G polimorfinę sritį. Reakcijos sudėtis: 12,5 μ l DreamTaq Green PCR Master Mix, 8,5 μ l dejonizuoto vandens, 0,5 μ l pirmojo ir antrojo pradmenų *Interlux* (Lietuva), 3 μ l išgrynintos mėginio DNR. Reakcijos protokolas pateiktas 1 lentelėje. Amplifikacijos metu naudojami pradmenys: 5'-TTCGGAGGTCTC CGCGGGAGTTCAG ir 5'-TGCGATCATCCGGACCTCCCGCGT (komplementari atvirkštinė seka – 5'-GACGCGGGAGGTCCGGATGATC GCA). Gaunamas fragmentas (TTCGGAGGTCTCCGCGGGAGTTCA GGGTAAAGGTCACGGGGGCCGGGGCTGCGGGGCCGCT|CGAC GCGGGAGGTCCGGATGATCGCA) su modifikuota kirpimo sritimi, įvykus G pakaitai į A, dėl ko nustatoma *TaqI* fermento kirpimo vieta.

Restrikcijos reakcija MDM2 geno 309 pozicijos VNP nustatymo atveju. *MDM2* geno 309 pozicijos VNP nustatymas naudojant RFLP (angl. *restriction fragment length polymorphism*) metodą. PGR reakcijos metu gautų produktų restrikcija atliekama naudojant *TaqI* resriktazę. Laminaro spintoje atšaldytame stovelyje ruošiamas reakcijos mišinys, kurio sudedamosios dalys: 2 μ l FastDigest Green Buffer, 1 μ l FastDigest enzyme

TaqI, 17 µl dejonizuoto vandens, 10 µl PCR produkto. Supurtyti mėgintuvėliai sudedami į PGR termociklerį, kuriame paliekami 65 °C temperatūroje 8 minutes, šioje temperatūroje vyksta restrikcijos reakcijos. 89 bp produktas, gautas PGR reakcijos su specifiniais pradmenimis metu, esant *TaqI* fermento kirpimo vietai (T|CGA), sukarpomas į 64 bp ir 25 bp ilgio produktus. Restrikcijos produktų vizualizacija atliekama naudojant 3 % agarozės gelį. Genotipas identifikuojamas pagal gautų produktų ilgius.

***MDM4* geno 1q32 A>C VNP nustatymas.** Šis variantas nustatomas amplifikuojant 134 bp ilgio fragmentą. PGR reakcijos sudėtis: 12,5 µl DreamTaq™ Green PCR Master Mix, 7,5 µl dejonizuoto vandens, 1 µl pirmojo ir antrojo pradmenų *Interlux* (Lietuva), 3 µl išgrynintos mėginio DNR. PGR reakcijos protokolas pateiktas 1 lentelėje. Reakcijai naudojami pradmenys: 5'-AAGACTAAAGAAGGCTGGGG, 5'-TTCAAATAATGTG GCAAGTGACC (komplementari atvirkštinė seka 5'-GGTTCAC TTACCACATTATTTGAA). Gaunamas fragmentas modifikuota kirpimo sritimi: AAGACTAAAGAAGGCTGGGGCTTCATGCCCTATTTGCAAG AAAGAGATTCAGCTGGTTATTAAGGTTTTTATAGCATAATGGTAG TACGAACATAAAAATGCATTTATTC|CGGTCACTTACCACATTATT TGAAA. Įvyksta T pakaita į G, dėl ko suformuojama *Msql* kirpimo vieta.

Restrikcijos reakcija *MDM4* geno 1q32 A>C pozicijos VNP nustatymo atveju. Šio polimorfinio varianto atveju po PGR metodo buvo atliekama restrikcijos reakcija. Restrikcijos mišinį sudarė: 17 µl v dejonizuoto vandens, 10 µl PGR produkto, 2 µl reakcijos buferio (FastDigest Green Buffer), 1 µl FastDigest enzyme *Msql*. Restrikcijos reakcijos vyko 8 minutes 65 °C temperatūroje. Po restrikcijos reakcijos, vizualizuojant elektroforezės 3% agarozės gelyje pagalba. Esant *Msql* kirpimo vietai (C|CGG) fragmentų ilgiai yra 111 bp, 23 bp.

***MTHFR* geno C677T VNP nustatymas.** Šis variantas nustatomas amplifikuojant 294 bp ilgio fragmentą. Naudojami pradmenys pateikti 1 lentelėje *Interlux* (Lietuva). Reakcijos sudėtis: 12,5 µl DreamTaq™ Green PGR Master mišinio, 8,5 µl sterilaus vandens, 0,5 µl pirmojo ir antrojo pradmenų, 3 µl išgrynintos mėginio DNR. PGR reakcijos protokolas pateiktas 1 lentelėje. PGR ciklams pasibaigus, palaikoma 4 °C temperatūra.

Restrikcijos reakcija *MTHFR* geno C677T VNP nustatymo atveju. PGR reakcijos metu gautų produktų restrikcija atliekama naudojant *Hinfl* restriktazę. PGR reakcijos mišinio sudėtis: 2 µl *FastDigest Green* buferinis mišinys, 1 µl *FastDigest Hinfl*, 17 µl sterilaus vandens, 10 µl PGR produkto. Supurtyti mėgintuvėliai sudedami į PGR termociklerį, kuriame paliekami 65 °C temperatūroje 5-8 minutes, šioje temperatūroje vyksta

restrikcijos reakcijos. 294 bp produktas, gautas PGR reakcijos su specifiniais pradmenimis metu, esant *HinfI* fermento kirpimo vietai (G|ANTC), sukarpomas į 168 bp ir 126 bp ilgio produktus. Restrikcijos produktų vizualizacija atliekama naudojant 2 % agarozės gelį.

CASP8 geno ins/del VNP nustatymas. Šis variantas nustatomas naudojant skirtingas pradmenų poras *Interlux* (Lietuva). 396 bp ir 139 bp fragmentai žymi ins/ins genotipą, 396 bp ir 291 bp fragmentai rodo del/del genotipo buvimą. Esant 396, 139, 291 fragmentams, identifikuojamas heterozigotinis ins/del alelis (19 pav.). Reakcijos sudėtis: 12,5 μ l *DreamTaqTM Green PCR Master Mix* mišinys, 7,5 μ l dejonizuoto vandens, 1 μ l pirmojo ir antrojo pradmenų (1 lentelė), 3 μ l išgrynintos mėginio DNR. PGR reakcijos protokolas pateiktas 1 lentelėje.

CCR5 geno wt/ Δ 32 VNP nustatymas. Šis variantas nustatomas amplifikuojant 111 bp ir 79 bp ilgio fragmentą. Esant 79 bp fragmentui identifikuojamas Δ 32/ Δ 32 variantas, esant 111 bp fragmentui wt/wt variantas, esant 111 bp ir 79 bp fragmentams identifikuojamas Δ 32/wt variantas (19 pav.). Reakcijos sudėtis: 12,5 μ l *DreamTaqTM Green PCR Master Mix* mišinys, 8,5 μ l dejonizuoto vandens, 0,5 μ l pirmojo ir antrojo pradmenų (1 lentelė), 3 μ l išgrynintos mėginio DNR. PGR reakcijos protokolas pateiktas 1 lentelėje.

ŽPV nustatymas atliekant PGR. PGR atliekama 25 μ l tūrio PGR reakcijos mišinyje, naudojant: 5 μ l DNR, 20 μ l ŽPV Master Mix, prasminio ir priešprasminio pradmens (1 lentelė), dejonizuoto vandens, *DreamTaqTM Green PGR Master Mix* mišinys. Pradmenys MY09/MY11 komplementarūs L1 5' ir 3' geno galams. Gausinamas produktas – 450 bp. Elektroforezė buvo atliekama 2% agarozės gelyje.

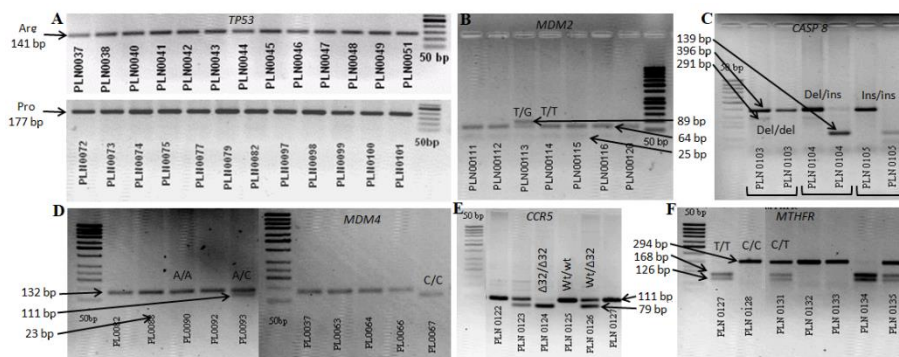
1 lentelė. PGR reakcijos naudoti sintetiniai DNR oligonukleotidai, PGR reakcijų programų protokolai

	Pradmuo	Oligonukleotidų seka	Amplifikacijos produktas (bp)	PGR sąlygų protokolai			Autorius
				Temperatūra (°C)	Laikas	Ciklas	
<i>TP53</i>	Arg F	5'→TCCCCCTGCCGTCCCAA→3'	141bp	95	3 min. 1 min. 1 min. 30 s 1 min. 10 min.	1	Li T. et al., 2002 ¹⁰³
	Arg R	5'→CTGGTGCAGGGGCCACGC→3'		95			
	Pro F	5'→GCCAGAGGCTGCTCCCCCC→3'	62	40			
	Pro R	5'→CGTGCAAGTCACAGACTT→3'	72				
			177 bp	72	1		
<i>MDM2</i>	F	5'→TTCGGAGGTCTCCGCGGGAGTTCAG →3'	89 bp, 64 bp, 25	95	12 min. 30 s 30 s	1	Horikawa Y. et al., 2008 ¹⁰⁴
	R	5'→TGCGATCATCCGGACCTCCCGCGTC →3'	bp	95			
				55	1 min.	35	
				72	7 min.	1	
<i>MDM4</i>	F	5'→AAGACTAAAGAAGGCTGGGG→3'	134 bp, 111 bp,	95	2 min. 30 s 30 s 30 s 10 min.	1	Liu J. et al., 2013 ¹⁰⁵
	R	5'→TTCAAATAATGTGGCAAGTGACC→3'	23 bp	94			
				58		35	
				72		1	
<i>MTHFR</i>	F	5'→CCTTGAACAGGTGGAGGCCAG→3',	294 bp, 168 bp,	95	10 min 1 min. 30 s	1	Boraldi F. et al., 2014 ¹⁰⁶
	R	5'→GCGGTGAGAGTGGGGTGGAG→3'	126 bp	95			
				65	1 min.	35	
				72	1 min.	1	
				72	7 min.	1	

CASP8	F	5'→AGTGAAAACCTTCTCCCATGGCCTC→3'	139 bp, 291 bp, 396 bp	95	5 min. 30 s 30 s 25 s 10 min.	1	Hashemi M. at al., 2012 ¹⁰⁷
	R	5'→ GATTGATACTGGCACAGTATACTTACC→3'		94		30	
	Ins	5'→GTAATTCTTGCTCTGCCAAGCTG→3';		64		1	
	Del	5'→CCAAGGTCACGCAGCTAGTAAG→3'		72			
CCR5	F	5'→ACCTGCAGCTCTCATTTC→3'	111 bp, 79 bp	95	1 min. 30 s 30 s 5 min. 5 min	1	Zheng B. et al., 2006 ⁸³
	R	5'→GCAGATGACCATGACAAGCA→3'		94		40	
ŽPV	MY09	5'→CGT-CCA-AAA-GGA-AAC-TGA-GC →3'	450 bp	60	3 min. 1 min. 1 min. 30 s 1 min. 10 min.	1	Qu W. et al., 1997 ¹⁰⁸
	MY11	5'→GCA-CAG-GGA-CAT-AAC-AAT-GG→3'		72		40	
				72		1	

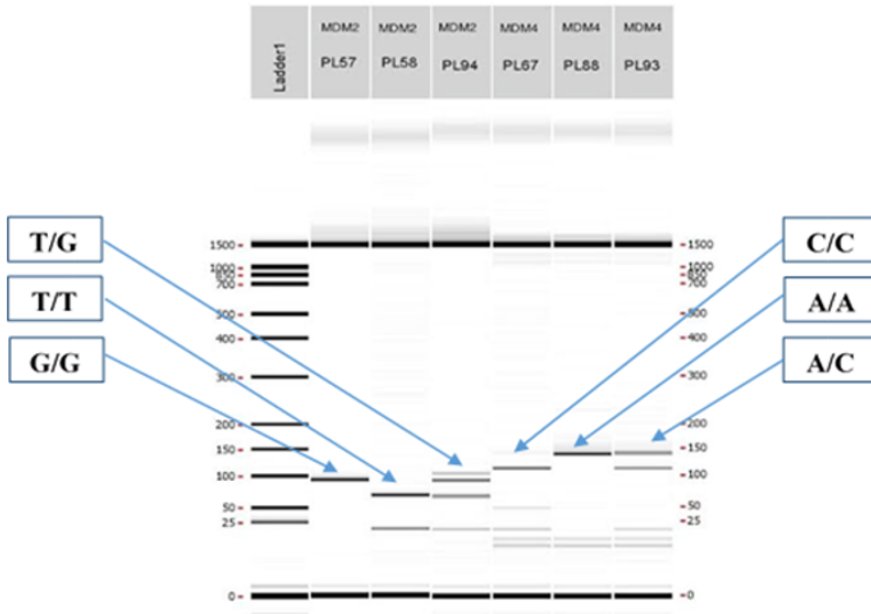
2.3.4. PGR produktų vizualizavimas elektroforezės pagalba

PGR produktų vizualizavimas panaudojant elektroforezę agaroziniame gelyje. Elektroforezei buvo naudojami 2-3 % agaroziniai geliai: agarozė – TopVision™ Agarose *Thermo Fisher Scientific* (Lietuva), TAE buferinis tirpalas – 50x TAE Electrophoresis Buffer *Thermo Fisher Scientific* (Lietuva), dažas – Roti®-Gel Stain *Carl Roth* (Vokietija). Elektroforezė vykdyta 50-65 min. esant 5–8 V/cm elektros lauko įtampai. Amplifikuoti fragmentai vizualizuojami UV šviesoje transiliumatoriuje *Herolab* (Vokietija). Išgrynintos ir amplifikuotos DNR pavyzdžiai lyginami su žinomu DNR ilgio standartu bei matomas ieškomo alelio buvimas (19 pav.).



19 pav. VNP vizualizavimas panaudojant elektroforezę agarozės gelyje. Tirtųjų genų VNP vizualizacija agarozės gelyje: **A** – *TP53*, **B** – *MDM2*, **C** – *CASP8*, **D** - *MDM4*, **E** – *CCR5*, **F** – *MTHFR* geno VNP nustatymas plaučių bei gerklų navikų audiniuose

VNP vizualizavimas LABCHIP GX I TOUCH kapiliarinės elektroforezės metodu. Bendradarbiaujant su *PerkinElmer* (Vokietija) ir UAB *InBio* (Lietuva) kompanijų atstovais naudojant kapiliarinę elektroforezę buvo patvirtinti atskiri VNP, kurių fragmentų analizė naudojant agarozės gelį buvo sunkiau atliekama dėl mažo fragmentų ilgio. Papildomai buvo atliktas *MDM2*, *MDM4* VNP vizualizavimas kapiliarinės elektroforezės metodu naudojant LabChip GX I Touch techniką (20 pav.).

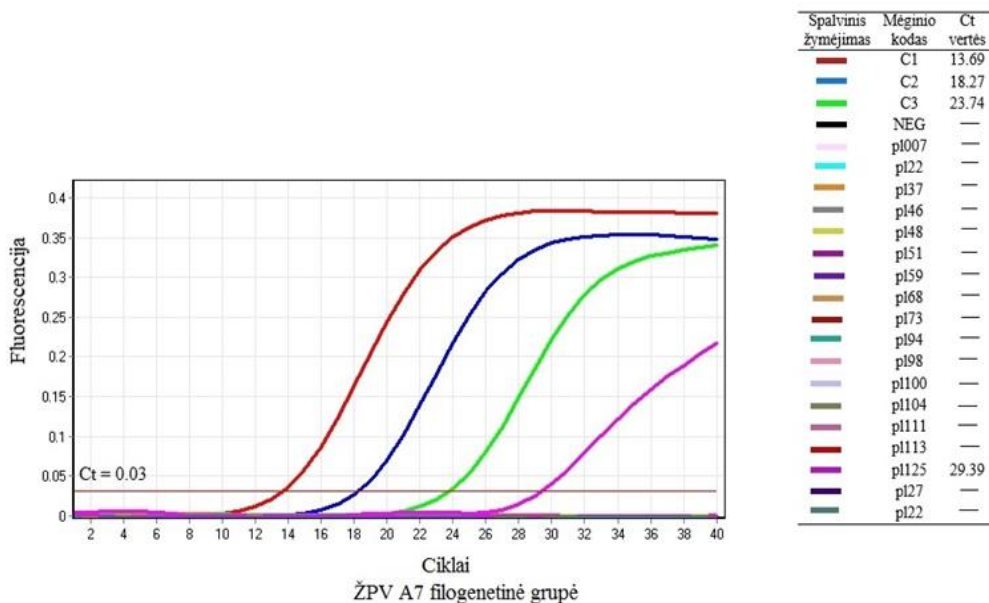


20 pav. Tirtųjų VNP vizualizavimas naudojant LabChip GX I Touch kapiliarinę elektroforezę. *MDM4*, *MDM4* geno polimorfinių variantų nustatymas plaučių bei gerklų navikų audiniuose naudojant LabChip GX I Touch kapiliarinės elektroforezės metodu.

2.3.5 Tikro laiko (TL) PGR ŽPV kopijoms nustatyti

Siekiant nustatyti ŽPV atliktos TL PGR reakcijos naudojant *AmpliSens HPV screen-titre-FRT PCR kit InterLabService* (Rusija) rinkinį. Šio rinkinio pradmenys *PCR-mix-1-FRT HPV* kurti *E1-E2* A9, A7 ir A5/A6 sukurti ŽPV filogenetinių linijų genų *E1-E2* pagrindu. A9 filogenetinei grupei priklauso ŽPV: 16, 31, 33, 35, 52, 58, A7 ŽPV: 18, 39, 45, 59 ir A5/A6: 51, 56. TL PGR metodu DNR dauginama eksponentiškai. DNR gausinimo metu aptinkamas fluorescuojantis signalas, kuris pereidamas į eksponentinę fazę, vadinamas slenkstiniu tašku – Ct (angl. *cycle threshold*). Slenkstinis taškas priklauso nuo pradinio DNR kopijų skaičiaus, tyrimui naudojamas vidinis standartas – β – globino genas. Produkto analizei naudojami *TaqMan* zondai (hidrolizės žymenys) – tai tiriamajai sekai atrankūs oligonukleotidai, turintys fluoroforą 5' gale ir fluorescenciją gesinantį (angl. *quencher*) dažą 3'gale. Po denatūracijos, pradmenys ir zondas prisitvirtina prie taikinio. Fluorescencija ryškėja, kai zondas skaidomas *Taq* polimerazės, taip gesinantis dažas ir fluoroforas yra

atskiriama, gaunamas fluorescuojantis signalas¹²⁸. TL PGR metodu nustatyta ŽPV priklausomybė filogenetinei grupei bei viruso kopijų skaičius plaučio navikinio audinio ląstelėse (21 pav.).



21 pav. TL PGR rezultatai, ŽPV nustatymas plaučių navikinio audinio ląstelėse. Plaučių mėginio atveju nustatyta ŽPV infekcija plaučių audinyje, Ct vertė – 29,39. Slenkstinis taškas (Ct = 0,03). Neigiama kontrolė (NEG) nepakilusi virš slenkstinio taško ir signalo neturi. ŽPV DNR standartai (C1, C2, C3) pakilę aukščiau slenkstinės ribos.

2.3.6 Duomenų statistinė analizė

Skirtumų tikimybė tarp lyginamų grupių buvo atlikta naudojant *Chi-square* testą. Išgyvenamumo rodikliai skaičiuoti pagal Kaplano-Meierio metodą. Skirtumai tarp išgyvenamumo kreivių nustatyti naudojant *log-rank* testą. SNP analizei atlikti pasitelkta klasterinė daugiamačių analizė (apimanti mirtingumo rodiklius, kvartilį (Q1), medianą (M), kvartilį (Q3), paciento išgyvenimo laiką) skaičiuojant Euklido atstumus tarp tiriamų objektų ir juos jungiant *Ward's* metodu. VNP ir klinikinių parametrų kombinacijos analizė buvo vertinama naudojant daugybinę koreliacinę analizę ir išgyvenamumo analizę. *Cox* analizės metu pasirinkti kintamieji su *log-rank* testo reikšme $P < 0,2$. Statistinė analizė buvo atlikta naudojant "SigmaPlot 12.3" ir "STATISTICA 10.0" programinę įrangą.

3. REZULTATAI

3.1 Gimdos kaklelio vėžiu sergančios moterys

3.1.1 Gimdos kaklelio vėžiu sergančių moterų klinikinių-patologinių duomenų analizė

156 moterys, sergančios gimdos kaklelio vėžiu, buvo tirtos dėl infekuotumo ŽPV. 66 moterims buvo diagnozuotas invazinis gimdos kaklelio vėžys (angl. *cervical carcinoma*, CC), 90 – neinvazinis gimdos kaklelio vėžys (angl. *carcinoma in situ*, CIS).

Pagal amžių visos moterys suskirstytos į amžiaus grupes: iki 25 m., 26-35 m., 36-45 m., 46-55 m. ir daugiau nei 56 m.. CC grupėje dauguma moterų (40,9 %, $n = 27$) buvo vyresnės nei 56 m. 24,2 % moterų ($n = 16$) buvo 46-55 m. amžiaus grupėje, 22,7 % ($n = 15$) 36-45 m. ir 12,1 % ($n = 8$) 26-35 m. CC moterų amžiaus vidurkis 52,82 m. CIS grupėje 4,4 % ($n = 4$) moterų buvo iki 25 m., 34,4 % ($n = 31$) 26-35 m., 33,3 % ($n = 30$) 36-45 m., 17,8 % ($n = 16$) 46–55 m. amžiaus grupėse ir 10 % ($n = 9$) daugiau kaip 56 m. CIS grupės moterų amžiaus vidurkis 39,76 m.

3.1.2 Gimdos kaklelio vėžiu sergančių moterų infekuotumo ŽPV tyrimai

Atlikus infekuotumo ŽPV tyrimus, nustatyta, kad 74,2 % CC moterų (49 iš 66) buvo infekuotos virusu. CIS grupėje buvo dar didesnis infekuotumas virusu – infekcija rasta 85,6 % moterų (77 iš 90) ($p = 0,08$). Atlikus ŽPV genotipavimą, dažniausiai identifikuotas 16 tipo ŽPV abiejų grupių moterims: CC grupėje jis identifikuotas 48,5 % moterų, CIS grupėje – 50,0 % ($p = 0,85$). 18 tipo ŽPV nustatytas 10,2 % CC moterų ir tik 2,6 % CIS grupėje ($p = 0,07$). Kitų tipų virusai, identifikuoti CIS grupėje, buvo ŽPV 33 (10,4 %), ŽPV 31 (9,1 %), ŽPV 58 (6,5 %), CC atveju – ŽPV 39, 45, 56 ir 59 (po 4,1 %). Kaip minėta anksčiau, kadangi gimdos kaklelio vėžys jau plačiai ištyrinėtas daugelio mokslininkų visame pasaulyje, todėl tolesnė mūsų analizė buvo nukreipta į gerklų ir plaučių vėžio kancerogenezės tyrimus.

3.2 Gerklų vėžiu sergančių pacientų tyrimai

3.2.1 Gerklų vėžiu sergančių pacientų klinikinių-patologinių duomenų analizė

Į galutinę analizę buvo įtraukti 49 gerklų vėžiu sergantys pacientai, kurie analizuoti pagal amžių, ligos stadiją, naviko dydį (T), limfmazgių pažeidimo laipsnį (N) ir metastazių buvimą (M). Didžiąją pacientų dalį sudarė vyrai (45–91,84 %), mažesniąją – moterys (4–8,16 %). Tirtų pacientų amžiaus vidurkis – 61 m., mediana – 63 m., jauniausias pacientas – 30 m., vyriausiasis pacientas – 82 m. Pacientai pagal amžių buvo suskirstyti į dvi grupes: ≤ 63 metų ir > 63 metų. Atliktus navikų histologinį ištyrimą, visiems tiriamiesiems buvo patvirtinta plokščialąstelinė gerklų karcinoma. Ankstyvosios I-II stadijos nustatytos 9 (18,37 %) pacientams, vėlyvosios III-IV stadijos – 40 (81,63 %) pacientų. Analizuojant pacientus pagal naviko išplitimo dydį ir infiltraciją į gretimus organus (T1-T4), T1-T2 nustatyta 13 (26,53 %) asmenų, T3-T4 – 36 (73,47 %). Įvertinus išplitimą į limfmazgius – 33 (67,35 %) pacientams išplitimo į limfmazgius nebuvo konstatuota (N0), pažeistas vienas ar keli limfmazgiai (N1) buvo 7 (14,29%) pacientams ir 9 (18,37%) buvo pažeista daugiau limfmazgių (N2). Vertinant kitus su liga bei jos prognoze susijusius rodiklius, nustatyta, kad 16 (32,6 %) pacientų po operacinio gydymo buvo taikyta chemoterapija, 39 (79,6 %) – spindulinis gydymas. Atlikus pacientų stebėseną, atkrytis po gydymo (ligos recidyvas) buvo nustatytas 5 (10,20 %) atvejais. Įvertinus pacientų žalingus įpročius, nustatyta, kad 45 (91,8 %) pacientai buvo rūkantys, 27 (55,1 %) vartojo alkoholį.

3.2.2 ŽPV infekcijos, *TP53*, *MDM2*, *MDM4*, *MTHFR*, *CASP8*, *CCR5* VNP dažnių sąsajos su klinikiniais-patologiniais rodikliais gerklų vėžiu sergančiųjų pacientų grupėje

ŽPV infekcijos paplitimas tarp gerklų vėžiu sergančių pacientų.

Infekuotumas ŽPV buvo nustatytas 21 tiriamam gerklų vėžiu sergančiam pacientui (42,86 %). Infekcija nustatyta 20 vyrų ir 1 moteriai. Daugumai – 17 pacientų (80,95 %) buvo nustatytas infekuotumas 16 tipo ŽPV, dviguba infekcija 16/18 tipų ŽPV nustatyta 3 (14,29 %) pacientams, 18 tipo virusas – vienam (2,04 %) pacientui. 16 ŽPV tipas priklauso A9, o 18 tipo infekcija priskiriama A7 filogenetinei linijai.

***TP53*, *MDM2*, *MDM4*, *MTHFR*, *CASP8*, *CCR5* VNP dažnių nustatymas.** Siekdami nustatyti genų *TP53*, *MDM2*, *MDM4*, *MTHFR*, *CASP8*, *CCR5* VNP sąsajas su ŽPV infekcija ir klinikinėmis-patologinėmis charakteristikomis pirmiausia atlikome tirtųjų genų VNP dažnių pasiskirstymą. Dažniausiai identifikuoti genų variantai: *TP53* Arg/Pro – 49 pacientams (100 %), *MDM2* T/G – 26 pacientams (53,1 %), *MDM4* A/A –

33 pacientams (67,3 %), *MTHFR* C/T – 24 pacientams (48,9 %), *CASP8* ind/del – 24 pacientams (49,0 %), *CCR5* wt/wt – 39 pacientams (79,6 %). Tirtųjų genų dažniai pateikti 2 lentelėje.

***TP53, MDM2, MDM4, MTHFR, CASP8, CCR5* VNP sąsajos su klinikinėmis- pataloginėmis charakteristikomis.** Suskirsčius pacientus į dvi grupes – sergančiųjų ankstyvųjų (I-II) ir vėlyvųjų (III-IV) stadijų gerklų vėžiu, nustatyta, kad esant ankstyvosioms stadijoms, *MDM2* G/G ir *MTHFR* T/T variantų nebuvo identifikuota, o pacientams, kuriems nustatytos III-IV stadijos gerklų vėžys, šie polimorfiniai variantai buvo aptikti 12,5 % (5 atvejai) tiriamųjų. Taip pat nustatytas dažnių skirtumas tarp *MTHFR* geno VNP C/T ir T/T variantų: ankstyvųjų stadijų atveju C/T VNP aptiktas dažniau, palyginti su vėlyvųjų stadijų vėžio atvejais (77,8 % ir 42,5 % atitinkamai, $p = 0,14$). Tačiau skirtumas nėra statistiškai reikšmingas.

Analizuojant tirtųjų genų VNP sąsajas su kitais klinikiniais parametrais – TNM rodikliais, nustatytos sąsajų tendencijos tarp *MDM2*, *CASP8*, *CCR5* genų ir naviko išplitimo į regioninius limfmazgius (N1-2) ($p = 0,24$; $p = 0,20$; $p = 0,11$). Pacientams, kuriems nustatytas navikinių ląstelių išplitimas į limfmazgius (N1-2), dažniausiai buvo identifikuoti *MDM2* T/G (62,5 %), *CASP8* ins/del (50,0 %), *CCR5* wt/wt (81,3 %) polimorfiniai variantai. Atlikus tirtųjų genų VNP sąsajų su pirminio naviko dydžiu bei infiltracija į gretimus organus (T) analizę nustatyta tendencija, kad esant naviko išplitimui į gretimus organus, dažniausiai nustatomas *MTHFR* C/T polimorfinis variantas. Tačiau sąsajos nėra statistiškai patikimai reikšmingos ($p = 0,21$). Sąsajoms patvirtinti reikalinga atlikti platesnės apimties ir ilgalaikės stebėsenos pacientų tyrimus.

ŽPV infekcijos ir *TP53, MDM2, MDM4, MTHFR, CASP8, CCR5* VNP sąsajos. Analizuojant galimą ryšį tarp gerklų vėžiu sergančių pacientų genų VNP dažnių ir pacientų infekuotumo ŽPV nustatyta, kad *MTHFR* T/T, *CASP8* ins/del, *CCR5* wt/wt dažniau aptinkami grupėse pacientų, kuriems identifikuotas ŽPV, o *CASP8* del/del, *CCR5* wt/ Δ 32, *MDM2* geno G/G VNP dažniau aptinkami grupėje pacientų, kuriems ŽPV virusas nebuvo aptiktas (2 lentelė). Pastebėta sąsajų tendencija tarp *MTHFR*, *CASP8*, *CCR5* genų VNP ir ŽPV infekcijos ($p = 0,21$; $p = 0,22$; $p = 0,16$ atitinkamai), tačiau aiškių sąsajų ir patikimų statistinių skirtumų tarp gerklų vėžiu sergančių pacientų genų VNP dažnių ir pacientų infekuotumo ŽPV nenustatyta.

2 lentelė. Genų VNP ir klinikinių-patologinių charakteristikų sąsajos gerklų vėžio atveju

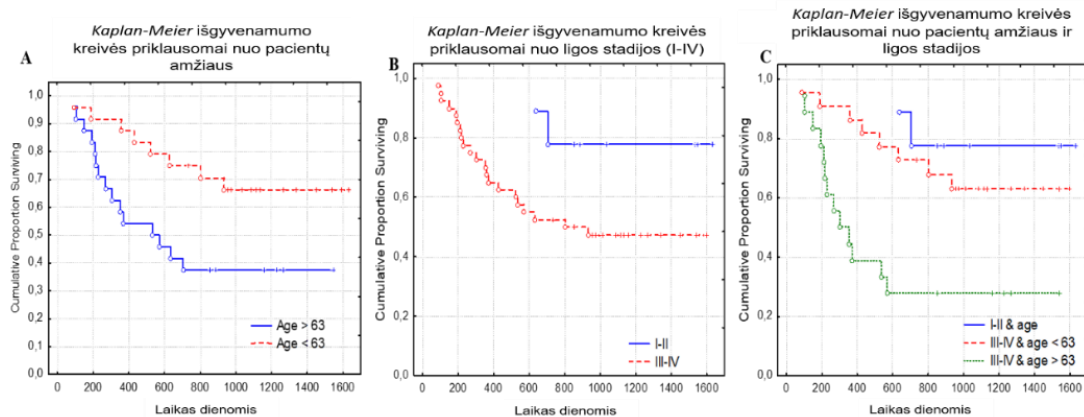
Genotipas	n (dažnis %)	ŽPV infekcija		P	Stadija		P
		+ (n=21)	- (n=28)		I-II (n=9)	III-IV (n=40)	
TP53 215 G>C (Arg72Pro)							
Arg/Arg	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	-	0 (0 %)	0 (0 %)	-
Arg/Pro	49 (100 %)	21 (100 %)	28 (100 %)		9 (100,0 %)	40 (100,0 %)	
Pro/Pro	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)		0 (0 %)	0 (0 %)	
MDM2 309 G>T							
T/T	18 (36,7 %)	7 (33,3 %)	11 (37,5 %)	0,42	3 (33,3 %)	15 (37,5 %)	0,46
T/G	26 (53,1 %)	13 (61,9 %)	13 (43,7 %)		6 (66,7 %)	20 (50,0 %)	
G/G	5 (10,2 %)	1 (4,8 %)	4 (18,8 %)		0 (0 %)	5 (12,5 %)	
MDM4 1q32 A>C							
A/A	33 (67,3 %)	14 (66,7 %)	19 (67,9 %)	0,97	7 (77,8 %)	26 (65,0 %)	0,70
A/C	15 (30,6 %)	7 (33,3 %)	8 (28,6 %)		2 (22,2 %)	13 (32,5 %)	
C/C	1 (2,1 %)	0 (0 %)	1 (3,6 %)		0 (0 %)	1 (2,5 %)	
MTHFR 677 C>T							
C/C	20 (40,8 %)	8 (38,0 %)	12 (42,9 %)	0,21	2 (22,2 %)	18 (45,0 %)	0,14
C/T	24 (48,9 %)	9 (42,9 %)	15 (53,6 %)		7 (77,8 %)	17 (42,5 %)	
T/T	5 (10,2 %)	4 (19,1 %)	1 (3,6 %)		0 (0 %)	5 (12,5 %)	
CASP8 652 6N ins/del							
Ins/ins	16 (32,7 %)	6 (28,6 %)	10 (35,7 %)	0,22	2 (22,2 %)	14 (35,0 %)	0,50
Ins/del	24 (49,0 %)	13 (61,9 %)	11 (39,3 %)		6 (66,7 %)	18 (45,0 %)	
Del/del	9 (18,3 %)	2 (9,5 %)	7 (25,0 %)		1 (11,1 %)	8 (20,0 %)	
CCR5-Δ32							
wt/wt	39 (79,6 %)	19 (90,5 %)	20 (71,4 %)	0,16	6 (66,7 %)	33 (82,5 %)	0,74
wt/Δ32	10 (20,4 %)	2 (9,5 %)	8 (28,6 %)		3 (33,3 %)	7 (17,5 %)	
Δ32/Δ32	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)		0 (0 %)	0 (0 %)	
		n=49			n=49		

2 lentelė (tęsinys). Genų VNP ir klinikinių-patologinių charakteristikų sąsajos gerklų vėžio atveju

Genotipas	n (dažnis %)	N		P	T				P
		N0 (n=33)	N1-2 (n=16)		T1 (n=3)	T2 (n=10)	T3 (n=19)	T4 (n=17)	
TP53 215 G>C (Arg72Pro)									
Arg/Arg	0 (0 %)	-	-	-					
Arg/Pro	49 (100 %)	33 (100,0 %)	16 (100,0 %)		3 (100 %)	10 (100 %)	19 (100 %)	17 (100 %)	-
Pro/Pro	0 (0 %)		-						
MDM2 309 G>T				0,24					0,34
T/T	18 (36,7 %)	14 (42,4 %)	4 (25,0 %)		1 (33,3 %)	3 (30,0 %)	5 (26,3 %)	9 (52,9 %)	
T/G	26 (53,1 %)	16 (48,5 %)	10 (62,5 %)		2 (66,7 %)	7 (70,0 %)	10 (52,6 %)	7 (41,1 %)	
G/G	5 (10,2 %)	3 (9,1 %)	2 (12,5 %)		-	-	4 (21,1 %)	1 (5,9 %)	
MDM4 1q32 A>C				0,74					0,58
A/A	33 (67,3 %)	23 (69,7 %)	10 (62,5 %)		3 (100 %)	6 (60,0 %)	13 (68,4 %)	11 (64,7 %)	
A/C	15 (30,6 %)	10 (30,3 %)	5 (31,3 %)		-	4 (40,0 %)	5 (26,3 %)	6 (35,3 %)	
C/C	1 (2,1 %)	-	1 (6,2 %)		-	-	1 (5,2 %)	-	
MTHFR 677 C>T				0,44					0,21
C/C	20 (40,8 %)	13 (39,4 %)	7 (43,8 %)		-	4 (40,0 %)	9 (47,4 %)	7 (41,2 %)	
C/T	24 (48,9 %)	15 (45,5 %)	9 (56,2 %)		3 (100 %)	6 (60,0 %)	6 (31,6 %)	9 (52,9 %)	
T/T	5 (10,2 %)	5 (15,2 %)	-		-	-	4 (21,0 %)	1 (5,9 %)	
CASP8-652 6N ins/del				0,20					0,66
Ins/ins	16 (32,7 %)	13 (39,4 %)	3 (18,8 %)		1 (33,2 %)	2 (20,0 %)	9 (47,4 %)	4 (23,5 %)	
Ins/del	24 (49,0 %)	16 (48,5 %)	8 (50,0 %)		2 (66,7 %)	6 (60,0 %)	7 (36,8 %)	9 (52,9 %)	
Del/del	9 (18,3 %)	4 (12,1 %)	5 (31,2 %)		-	2 (20,0 %)	3 (15,7 %)	4 (23,5 %)	
CCR5-Δ32				0,11					0,94
wt/wt	39 (79,6 %)	26 (78,8 %)	13 (81,3 %)		2 (66,7 %)	8 (80,0 %)	15 (78,9 %)	14 (82,4 %)	
wt/Δ32	10 (20,4 %)	7 (21,2 %)	3 (18,7 %)		1 (33,3 %)	2 (20,0 %)	4 (21,1 %)	3 (17,6 %)	
Δ32/Δ32	0 (0 %)	-	-		-	-	-	-	

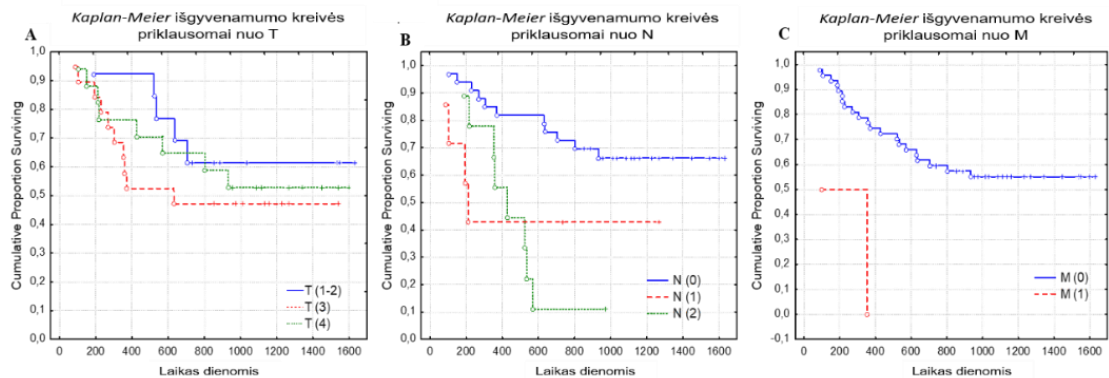
3.2.3 TP53, MDM2, MDM4, MTHFR, CASP8, CCR5 VNP dažnių, klinikinių-patologinių duomenų sąsajos su gerklų vėžiu sergančiųjų pacientų išgyvenamumo rodikliais

Vienas šio darbo uždavinių – atlikti TP53, MDM2, MDM4, MTHFR, CASP8, CCR5 VNP sąsajų su ŽPV infekcija ir pacientų išgyvenamumo rodikliais analizę bei atrinkti galimus prognozinis žymenis ligos eigos prognozei vertinti. Gerklų vėžiu sergančiųjų pacientų išgyvenamumas skaičiuotas taikant Kaplano ir Mejerio metodą. Atliktos analizės duomenimis, vertinant klasikinius išgyvenamumą nulemiančius parametrus (ligos stadiją ir paciento amžių diagnozės nustatymo metu) pacientų išgyvenamumas skyrėsi priklausomai nuo ligos stadijos (ankstyvosios ar pažengusios stadijos vėžys) bei pacientų amžiaus ($p = 0,003$) (22 C pav.). Pacientai buvo suskirstyti į dvi grupes: vyresnių nei 63 m. pacientų išgyvenamumas buvo 37,5 %, o pacientų iki 63 m. išgyvenamumas siekė 66,1 % ($p = 0,02$).



22 pav. Gerklų vėžiu sergančiųjų pacientų analizė pagal amžių, ligos stadiją bei šių parametru suminį poveikį išgyvenimo trukmei. Kaplano ir Mejerio išgyvenamumo kreivės: **A** – pacientų išgyvenimo trukmės vertinimas priklausomai nuo amžiaus iki 63 m. ir daugiau kaip 63 m. ($p = 0,02$); **B** – pacientų išgyvenimo trukmės rodiklių vertinimas priklausomai nuo diagnozuotos I–II arba III–IV ligos stadijos ($p = 0,06$); **C** – išgyvenimo trukmės vertinimas analizuojant suminį amžiaus (ligos nustatymo metu) ir ligos stadijos poveikį ($\chi^2 = 11,7$; $df = 2$; $p = 0,003$).

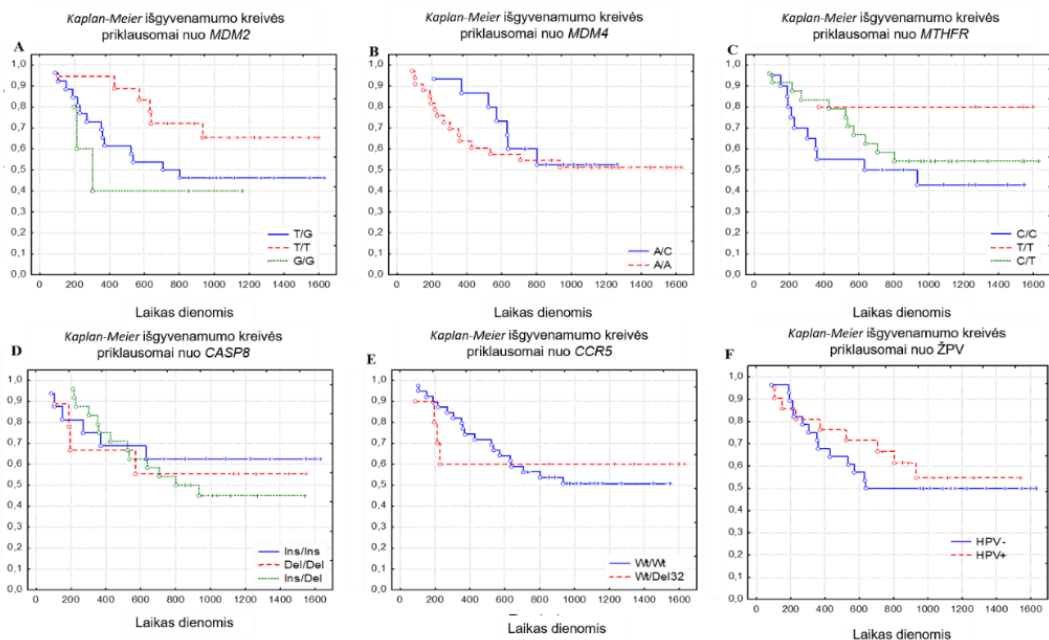
Atliktos analizės duomenimis, vertinant klinikinių parametru (TNM) vertę pacientų išgyvenamumui, reikšmingą įtaką turėjo naviko išplitimas į limfmazgius ($p = 0,007$). Pacientų, kuriems nebuvo nustatytas navikinio audinio išplitimas į limfmazgius (N0) išgyvenamumas siekė 66,3 %, pacientų, kuriems buvo nustatytas plitimas į N1 lygio limfmazgius išgyvenamumas siekė 42,9 %, pacientų, kuriems buvo pažeista daugiau limfmazgių ir nustatytas naviko plitimas į N2 lygio limfmazgius, išgyvenamumas tesiekė 11,1 % (23 B pav.). Vertinant naviko dydžio ir infiltracijos į gretimus organus bei tolimųjų metastazių formavimosi įtaką tiriamųjų išgyvenamumui, patikimų skirtumų nunustatyta.



23 pav. Sirgusiųjų gerklų vėžiu išgyvenamumo analizė pagal TNM. Kaplano ir Mejerio išgyvenamumo kreivės: **A** – pacientų išgyvenimo trukmės vertinimas priklausomai nuo T ($p = 0,448$); **B** – pacientų išgyvenimo trukmės vertinimas priklausomai nuo N ($p = 0,007$); **C** – išgyvenimo trukmė priklausomai nuo M ($p = 0,075$).

Atlikta gerklų vėžiu sergančių pacientų išgyvenamumo rodiklių analizė pagal tirtųjų genų VNP statistškai patikimų skirtumų neparodė, tačiau pacientų, kuriems identifikuoti *MDM2* genų T/T variantai, išgyvenamumas stebėjimo pabaigoje buvo 65,6 %, o T/G variantą turinčių pacientų išgyvenamumo rodikliai siekė 46,0 % ($\chi^2 = 2,6$; $df = 2$; $p = 0,13$) (24 pav. A). Taip pat nustatyti skirtumai tarp *MTHFR* genų variantų. Išgyvenamumo rodikliai pacientams, kuriems identifikuotas T/T variantas stebėjimo pabaigoje siekė 80,0 %, C/T – 54,0 %, o C/C atveju – 43,5 % ($\chi^2 = 2,6$; $df = 2$; $p = 0,27$) (24 pav. C). Dėl vienalytės imties *TP53* geno polimorfinių variantų atveju išgyvenamumo analizė negalima. *MDM4* 1q32 A>C, *CASP8* 652 6N ins/del ir *CCR5*- Δ 32 polimorfinių variantų sąsajos ar sąsajų tendencijos su išgyvenamumo rodikliais nebuvo aptiktos.

Atlikus pacientų išgyvenamumo analizę tarp 2 grupių, kur vienoje grupėje buvo aptikta ŽPV infekcija, o kitoje infekcijos nebuvo, statistškai patikimo skirtumo n nustatyta. Ir ŽPV infekuotų gerklų vėžiu sergančių pacientų ir neturinčių šios infekcijos gerklų vėžiu sergančių pacientų išgyvenamumas buvo panašus. Pacientų, kuriems buvo identifikuotas ŽPV išgyvenamumas siekė 54,9 %, pacientų, kuriems infekcija nebuvo nustatyta – 50,0 % ($p = 0,59$) (24 F pav.). Pacientų stebėsenai įpusėjus (po 600 dienų) šis skirtumas buvo didžiausias, neinfekuotų pacientų išgyvenamumas siekė 57,1 %, o turinčių ŽPV infekciją – 71,4 %. Taip pat svarbu pabrėžti, kad tik 5 pacientams iš 16, kuriems buvo nustatytas naviko išplitimas į regioninius limfmazgius (N2), buvo identifikuotas ŽPV virusas.



24 pav. Gerklų vėžiu sergančių pacientų išgyvenimo trukmės analizė pagal *MDM2*, *MDM4*, *MTHFR*, *CASP8*, *CCR5* genų VNP ir pagal infekuotumą ŽPV. Kaplano ir Mejerio išgyvenamumo kreivės: **A** – išgyvenamumas pacientų, kuriems buvo identifikuoti *MDM2* geno T/T ir T/G, G/G VNP ($p = 0,13$); **B** – *MDM4* geno A/C ir A/A VNP ($p = 0,64$); **C** – *MTHFR* geno C/C, T/T ir C/T VNP ($p = 0,27$); **D** – *CASP8* geno ins/ins, ins/del ir del/del VNP ($p = 0,92$); **E** – *CCR5-Δ32* geno wt/wt ir wt/Δ32 VNP ($p = 0,89$); **F** – išgyvenamumo rodikliai ŽPV infekciją turinčių (ŽPV+) pacientų ir neinfekuotų (ŽPV-) ($p = 0,72$) pacientų.

3.2.4 ŽPV infekcijos, *TP53*, *MDM2*, *MDM4*, *MTHFR*, *CASP8*, *CCR5* VNP dažnių klasterinė analizė

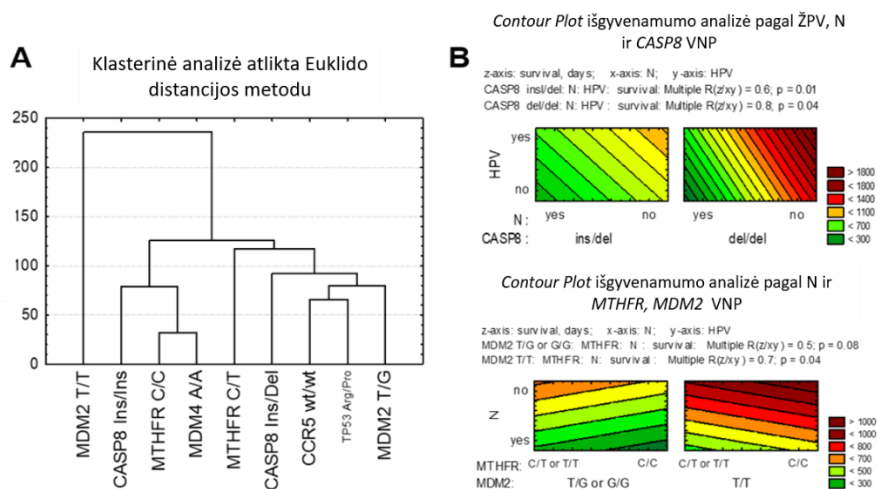
Klasterinė analizė atlikta remiantis mirusių pacientų išgyvenamumo rodikliais. Vertinamas pacientų mirtingumas (%) ir išgyvenimo trukmė (M; IQR) (25 pav., 3 lentelė). Žemiausi mirtingumo rodikliai buvo pacientų, kuriems identifikuoti *MDM2* T/T variantai (33 %). Didžiausias mirtingumas buvo pacientų, kuriems identifikuoti *MTHFR* C/C (55 %), *MDM2* T/G (54 %) ir *CASP8* ins/del (54 %) variantai. Vertinant išgyvenimo trukmę, ilgiausiai išgyveno pacientai (601 diena), kuriems buvo identifikuoti *MDM2* T/T variantai (3 lentelė), trumpiausiai išgyveno *CASP8* ins/del, *MTHFR* C/C, *MDM4* A/A variantų turėtojai. Remiantis šiais parametrais išskirti trys klasteriai (25 pav.). Pirmasis klasteris (I) apima tik vieną pacientų šaką, kuriems buvo identifikuoti *MDM2* T/T variantai, šiems pacientams nustatytas ilgiausias išgyvenimo laikotarpis iš mirusiųjų imties (>600 dienų). Antrasis klasteris (II) apima pacientų grupę, kuriems buvo identifikuoti *MDM2* T/G, *TP53* Arg/Pro, *CASP8* ins/del, *MTHFR* C/T, *CCR5* wt/wt polimorfiniai variantai. Šio klasterio pacientų išgyvenimo laikotarpis apėmė 312–522 dienų. Trečiajam klasteriui (III) priklausė grupės pacientų, kuriems buvo identifikuoti *MDM4* A/A, *CASP8* ins/ins, *MTHFR* C/C polimorfiniai variantai. *MDM4* A/A ir *MTHFR* C/C polimorfinių variantų priskyrimą III klasteriui nulėmė aukšti mirtingumo rodikliai – *CASP8* ins/ins polimorfinių variantą turėję pacientai teišgyveno 210 dienų (3 lentelė).

3 lentelė. Išgyvenamumo (%) priklausomybė nuo tirtųjų genų VNP

Klasteris	I	II					III		
VNP	MDM2 T/T	MDM2 T/G	TP53 Arg/Pro	CASP8 ins/del	MTHFR C/T	CCR5 wt/wt	MDM4 A/A	CASP8 ins/ins	MTHFR C/C
%*	33	54	47	54	46	49	48	38	55
M** (IQR)	601 (170)	312 (289)	353 (350)	428 (330)	522 (360.5)	369 (358)	250 (197)	210 (228)	229 (166)

% – gerklų vėžių sergančių pacientų mirtingumas
M (IQR)** – išgyvenimo trukmė (dienomis)

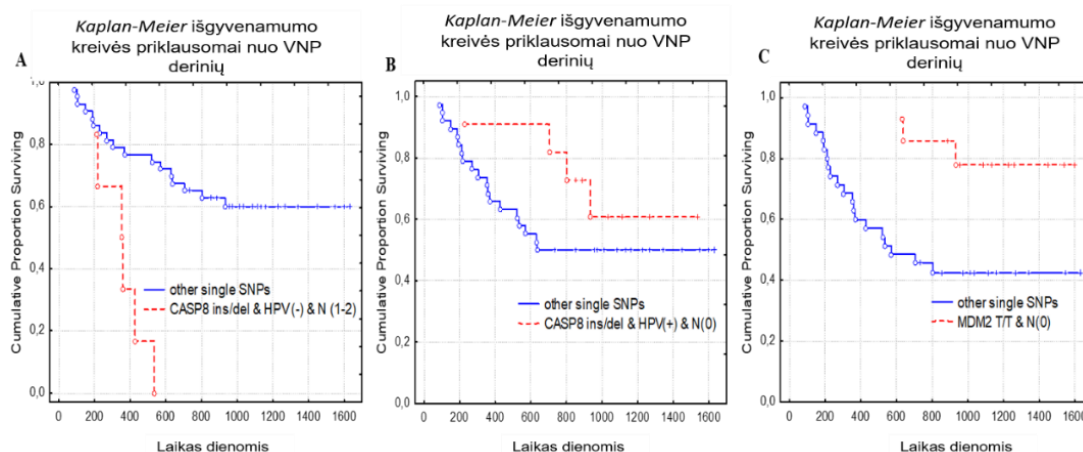
Atlikus daugiaveiksne koreliacinę analizę, nustatyta, kad pacientai, kurie buvo infekuoti ŽPV, turėjo *CASP8* ins/del variantą ir kuriems nenustatytas navikinio audinio išplitimas į regioninius limfmazgius (N0), pasižymėjo geriausiu išgyvenamumu. *CASP8* ins/ins varianto atveju nustatytas dvigubai trumpesnė išgyvenimo trukmė ir mažesnis imlumas ŽPV infekcijai. Tarp mirusiųjų ženkliai ilgiau išgyveno pacientai, kuriems buvo nustatyta ŽPV infekcija, palyginti su bendra mirusiųjų pacientų išgyvenimo trukmės mediana.



25 pav. Prognoziinių VNP ir klinikinių parametrų derinių paieška gerklų vėžių sergančių pacientų grupėje. **A** – klasterinė analizė pagal tirtųjų genų VNP atlikta remiantis išgyvenimo trukmės mediana ir mirtingumo rodikliais. Klasterizacijai atlikti naudotas Euklido distancijos bei *Ward's* metodai. **B** – *Contour Plot* analizė remiasi VNP ir klinikinių duomenų daugybinės koreliacijos analize.

Atlikus grafinį kontūrų (angl. *contour plots*) vaizdavimą ir pritaikius daugybinės koreliacijos analizę, įvertinta, kad išgyvenamumui didelę reikšmę gali turėti keletas veiksnių derinys. Iš 11 gerklų vėžių sergančių pacientų (kuriems buvo nustatytas navikinių ląstelių išplitimas į regioninius limfmazgius ir kuriems nenustatyta ŽPV infekcijos) 6 identifikuoti kaip ins/del varianto turėtojai, 3 – del/del, 2 pacientams nustatytas ins/ins variantas. Gerklų vėžių sergantys pacientai, kuriems nebuvo ŽPV infekcijos, tačiau nustatytas navikinių ląstelių išplitimas į regioninius limfmazgius (N1-2) ir *CASP8* ins/del varianto derinys (ŽPV(-) – N(1-2) – *CASP8* ins/del) (n=6), gyveno trumpiau nei pacientai, kuriems buvo nustatyti kiti tirti VNP deriniai (p = 0,006). Šių derinių turintys pacientai išgyveno tik iki 600 dienų, o praėjus 430 dienų nuo tyrimo pradžios šioje grupėje išgyvenamumo rodikliai siekė tik 16,6 % (26 A pav.). 4 pacientams, turintiems šį derinį, taikytas spindulinis gydymas, 2 chemoterapinis

gydymas. O pacientų, infekuotų ŽPV, kuriems nebuvo nustatyta navikinio audinio išplitimo į regioninius limfmazgius (N0) ir kurie turėjo *CASP8* ins/del variantą (ŽPV(+) – N0 – *CASP8* ins/del), išgyvenamumo rodikliai tyrimo pabaigoje siekė apie 60,0 % ($p = 0,24$). Ši derinį turinčių pacientų imtį sudarė 12 pacientų. Nors šis skirtumas tarp kreivių nėra statistiškai reikšmingas, tačiau 55 % pacientų, turinčių šį derinį (ŽPV(+) – N0 – *CASP8* ins/del), išgyveno ilgiau nei 600 dienų ir šie išgyvenamumo rodikliai išliko stabilūs iki tyrimo pabaigos (1600 dienų) (26 B pav.). 11 pacientų, kuriems buvo nustatytas šis derinys, po operacijos buvo taikytas spindulinis gydymas, 5 pacientams chemoterapinis gydymas, 1 pacientui po operacijos kitas gydymo būdas netaikytas. Šios grupės analizės metu nustatyta, kad jai priklausė pats vyriausias tyrime dalyvavęs pacientas, o šiame tyrime amžius yra vienas svarbiausių pacientų išgyvenamumą lemiančių veiksnių, tad šį atvejį eliminavus iš tirtosios grupės, matoma derinio tendencija ($p = 0,1$). Tokie gauti rezultatai rodo, kad reikalinga atlikti didesnės apimties ir ilgesnės stebėsenos tyrimus šio derinio reikšmingumui pacientų gyvenimo trukmei nustatyti. Sujungus keletą parametrų, aptiktas kitas derinys, sietinas su gera išgyvenimo prognoze. Pacientai, kuriems buvo identifikuoti *MDM2* T/T variantai ir kuriems navikinės ląstelės nebuvo išplitusios į regioninius limfmazgius (N0), pasižymėjo geresniu išgyvenamumu, palyginti su kitais pacientais. Apie 80 % pacientų, kuriems buvo identifikuota ši kombinacija, išgyveno ilgiau nei 4,5 metų, o visi pacientai gyveno ne trumpiau kaip 23 mėnesius ($p = 0,01$) (26 C pav.).



26 pav. Gerklų vėžiu sergančių pacientų išgyvenimo trukmė pagal prognozinis (geros ir blogos prognozės) tirtųjų rodiklių derinius. Kaplano ir Mejerio išgyvenamumo kreivės: **A** – išgyvenamumas pacientų, kuriems buvo identifikuoti *CASP8* ins/del variantai, nustatytos metastazės limfmazgius N (1–2) ir ŽPV (-) ($p = 0,006$); **B** – *CASP8* ins/del, N (0) ir ŽPV (+) ($p = 0,245$); **C** – *MDM2* geno T/T ir N (0) ($p = 0,01$)

Pritaikius daugiamačią *Cox* modelį, nustatyta reikšminga amžiaus ir navikinių ląstelių infiltracijos į limfmazgius laipsnio prognozinė vertė ($p = 0,04$, $p = 0,03$). Atsižvelgus į klasterinės analizės rezultatus, buvo iškelta hipotezė, kad išgyvenimo trukmei prognozinę vertę galėtų turėti ne tik pavieniai veiksniai, bet ir jų deriniai, o pastarųjų prognozinė vertė gali būti daug reikšmingesnė nei pavienių veiksnių. Taigi, derinių daugybė analizė parodė, kad navikinių ląstelių plitimo į limfmazgius (N) ir VNP deriniai gali būti prognoziniai žymenys modeliuojant gerklų vėžiu sergančių pacientų ligos eigą ir prognozuojant išgyvenamumą. *CASP8* VNP išgyvenamumo analizė neparodė reikšmingo skirtumo ($p = 0,98$) (24 D pav.), tačiau *CASP8* derinyje su ŽPV bei navikinių ląstelių plitimu į limfmazgius įgyja didesnę prognozinę vertę ($p = 0,15$, $p = 0,21$) (4 lentelė). Analogiškai *MDM2* VNP

atveju pavienių VNP atveju analizė neparodė reikšmingų išgyvenimo trukmės skirtumų ($p = 0,42$) (24 A pav.), tačiau šio geno T/T VNP derinys su N (0) lemia geros prognozės derinio tendenciją ($p = 0,21$). Tad VNP analizė galimas papildantis prognozinis veiksnys (4 lentelė).

4 lentelė. Daugybiniu Cox modeliu paremta gerklų vėžiu sergančių pacientų išgyvenamumo analizė

	RS	95% PI	P
Daugybinė analizė			
N			
N (1-2)	1		
N (0)	0,36	0,14–0,92	0,03
Amžius			
<63	1		
>63	2,60	1,03–6,60	0,04
Stadija			
Stadija (3–4)	1		
Stadija (1–2)	0,35	0,07–1,76	0,20
MDM2			
MDM2 T/G	1		
MDM2 G/G	0,99	0,25–3,94	0,98
MDM2 T/T	0,66	0,24–1,8	0,42
Derinių daugybinė analizė			
VNP derinys su N			
N (1–2)	1		
CASP8 ins/del, ŽPV (-) ir N (1–2)	2,86	0,69–11,75	0,15
CASP8 ins/del, ŽPV (+) ir N(0); MDM2 T/T ir N(0)	0,41	0,10–1,65	0,21
N (0)	0,78	0,19–3,3	0,73
Stadijos ir amžiaus kriterijų derinys			
I–II stadija ir III–IV stadija, amžius <63	1		
III–IV stadija ir amžius >63	2,33	0,92–5,88	0,08

*RS – rizikos santykis, ** PI – pasikliautiniai intervalai

3.3 Plaučių vėžiu sergančių pacientų grupės tyrimai

3.3.1 Plaučių vėžiu sergančių pacientų klinikinių-patologinių duomenų analizė

Plaučių vėžiu sergantys pacientai ($n = 92$) buvo analizuojami pagal amžių, ligos stadiją, naviko dydį, limfmazgių pažeidimą ir metastazes. Tarp tiriamųjų buvo 76 (82,6 %) vyrai ir 16 (17,4 %) moterų. Visų pacientų amžiaus vidurkis – 63 m., mediana – 63 m., jausias pacientas – 45 m., vyriausias – 86 m. Tolesnėje analizėje pacientai pagal amžių suskirstyti į dvi grupes: ≤ 63 metų ir > 63 metų. Pagal histologinį naviko tipą pacientams dažniausiai buvo diagnozuota plokščialąstelinė karcinoma – 41 atvejis (45,1 %) ir adenocarcinoma – 31 atvejis (34,1 %). Kitais atvejais buvo diagnozuota pleomorfinė karcinoma – 6 atvejai (6,6 %), didelių ląstelių karcinoma – 5 atvejai (5,5 %), smulkiųjų ląstelių karcinoma – 4 atvejais (4,4 %), karcinoidai – 2 atvejai (2,2 %) ir po 1 atvejį (1,1 %) gigantinių ląstelių karcinoma, choriokarcinoma ir nepatikslingos histologijos navikas. Atlikus pacientų ligos stadijų analizę nustatyta, kad ankstyvosios I-II ligos stadijos nustatytos 64 (69,6 %) pacientams, vėlyvosios III-IV ligos stadijos – 28 (30,4 %). Pagal naviko išplitimo laipsnį ir infiltraciją į gretimus organus T1 naviko dydis nustatytas 22 (24,2 %) pacientams, T2 – 51 (56,0 %), T3 – 17 (18,7 %), T4 – 1 (1 %) pacientui. Vieno paciento TNM duomenys nebuvo patikslinti. Pagal limfmazgių pažeidimo lygį (N) 50 (55,0 %) pacientų limfmazgiai nebuvo pažeisti (N0), 25 (27,5 %) pacientams nustatytas naviko plitimas į regioninius (N1) limfmazgius. 16 (17,6 %) pacientų navikas buvo išplitęs į atokesnius (N2) limfmazgius. Iš ligos istorijų įvertinus informaciją apie žalingus pacientų įpročius, nustatyta, kad 75 pacientai (81,5 %) buvo rūkantys.

3.3.2 ŽPV infekcijos, *TP53*, *MDM2*, *MDM4*, *MTHFR*, *CASP8*, *CCR5* VNP dažnių ir klinikinių-patologinių rodiklių sąsajos plaučių vėžiu sergančių pacientų grupėje

Infekuotumas ŽPV plaučių vėžiu sergančių pacientų grupėje. Infekuotumas ŽPV plaučių vėžiu sergančių pacientų grupėje buvo nustatytas 3 tiriamiesiems ir siekė 3,3 %. Vienu atveju nustatytas A9 filogenetinės linijos 16 tipo ŽPV, kitu atveju – A5/A6 filogenetinės linijos ir joms priklausantys 51 ir 56 tipų ŽPV. Trečiuoju atveju buvo identifikuoti A9 ir A7 filogenetinės linijos ir joms priklausantys 16, 18 tipų ŽPV. Siekiant patvirtinti ŽPV infekciją plaučių navikiniame audinyje, atliktos TL-PGR reakcijos viruso kopijų skaičiui infekuotose ląstelėse įvertinti (5 lentelė). Visais tirtaisiais atvejais ŽPV infekcija patvirtinta, nustatytas 0,98, 2,2, 2,7 lg ŽPV kopijų skaičius/ląst. (5 lentelė). Pacientų, kuriems buvo nustatyta ŽPV infekcija, tirtųjų genų VNP pasiskirstymas pateiktas 5 lentelėje.

5 lentelė. Pacientų, sergančių plaučių vėžiu ir infekuotų ŽPV *TP53*, *MDM2*, *MDM4*, *MTHFR*, *CASP8*, *CCR5-Δ32* genų VNP analizė

Nr.*	Filogenetinės linijos	Viruso kopijų skaičius**	<i>TP53</i> 215 G>C (Arg72Pro)			<i>MDM2</i> 5+309 G>T			<i>MDM4</i> 1q32 A>C			<i>MTHFR</i> 677 C>T			<i>CASP8</i> 652 6N ins/del			<i>CCR5-Δ32</i>		
			Arg/Arg	Arg/Pro	Pro/Pro	T/T	T/G	G/G	A/A	A/C	C/C	C/C	C/T	T/T	Ins/ins	Ins/del	Del/del	Wt/wt	Wt/Δ32	Δ32/Δ32
1	A9	0,98																		
2	A9,A7	2,7																		
3	A5/6	2,2																		

*Paciento eilės numeris

**Viruso kopijų skaičius – viruso kopijų skaičius infekuotose ląstelėse (lg ŽPV kopijos/ ląst. = suminis lg ŽPV kopijų skaičius/ 10⁵ ląstelių)

***TP53, MDM2, MDM4, MTHFR, CASP8, CCR5* VNP dažnių analizė plaučių vėžiu sergančiųjų pacientų grupėje.** Siekdami nustatyti genų *TP53, MDM2, MDM4, MTHFR, CASP8, CCR5* VNP sąsajas su ŽPV infekcija ir klinikinėmis-patologinėmis charakteristikomis atlikome 92 plaučių vėžiu sergančiųjų pacientų genų dažnių įvertinimą. *TP53* geno atveju Arg/Pro polimorfinis variantas buvo nustatytas daugumai tiriamų pacientų – 88 (95,7 %), o Arg/Arg polimorfinis variantas tik 4 (4,3 %) pacientams. *TP53* geno Pro/Pro variantas nebuvo identifikuotas. *MDM2* T/T polimorfinis variantas buvo aptinkamas dažniausiai – 46 (50,0 %) pacientams, taip pat pakankamai dažnai nustatytas ir T/G variantas – 40 (43,5 %) atveju. Trečiasis polimorfinis G/G variantas nustatytas tik 6 (6,5 %) pacientams. *MDM4* geno atveju galimi trys genotipų variantai: A/C, A/A, C/C. Gauti rezultatai rodo, kad dažniausiai buvo identifikuojamas *MDM4* geno homozigotinis A/A genotipas – 55 (59,8 %) pacientams. Heterozigotinis A/C variantas buvo identifikuotas kiek rečiau – 30 (32,6 %) pacientų. O C/C homozigotinis variantas nustatytas tik 7 (7,6 %) plaučių vėžiu sergantiems pacientams. *CASP8* geno atveju nustatyti visi trys polimorfiniai variantai: ins/del polimorfinis variantas – 61 (66,3 %) pacientui, ins/ins – 26 (28,3 %), o del/del variantas nustatytas tik 5 (5,4 %) pacientams. *MTHFR* geno atveju nustatyti polimorfiniai variantai: C/C variantas nustatytas 54 pacientams (58,7 %), C/T variantas – 34 (36,9 %), T/T variantas nustatytas tik 4 (4,4 %) pacientams. *CCR5* geno atveju nustatyti visi trys polimorfiniai variantai: wt/wt polimorfinis variantas buvo identifikuotas dažniausiai – 77 (83,7 %) pacientams, wt/ Δ 32 polimorfinis variantas – 13 (14,1 %) pacientų, o Δ 32 / Δ 32 variantas aptiktas rečiausiai – 2 (2,2 %) atvejais (6 lentelė). Tačiau statistiškai reikšmingų VNP dažnių pasiskirstymo skirtumų tarp visų plaučių vėžiu sergančiųjų nustatyta nebuvo.

6 lentelė. *TP53*, *MDM2*, *MDM4*, *MTHFR*, *CASP8*, *CCR5* genų VNP dažnių pasiskirstymas pagal pacientų lytį ir ligos stadiją

Genotipas	n (%)	Lytis		P	Stadija		P
		Vyrai (n = 76)	Moterys (n = 16)		I-II (n=63)	III-IV (n=28)	
<i>TP53</i> 215 G>C							
Arg/Arg	4 (4,3 %)	3 (3,9 %)	1 (6,3 %)	0,54	2 (3,2 %)	2 (7,1 %)	0,46
Arg/Pro	88 (95,7 %)	73 (96,1 %)	15 (93,7 %)		61 (96,8 %)	26 (92,9 %)	
Pro/Pro	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)		0 (0 %)	0 (0 %)	
<i>MDM2</i> 309 G>T							
T/T	46 (50,0 %)	40 (52,6 %)	6 (37,5 %)	0,08	36 (57,1 %)	10 (35,7 %)	0,24
T/G	40 (43,5 %)	33 (43,4 %)	7 (43,7 %)		24 (38,0 %)	15 (53,6 %)	
G/G	6 (6,5 %)	3 (4,0 %)	3 (18,8 %)		3 (4,8 %)	3 (10,7 %)	
<i>MDM4</i> 1q32 A>C							
A/A	55 (59,8 %)	45 (59,2 %)	10 (62,5 %)	0,44	37 (58,7 %)	17(60,7 %)	0,45
A/C	30 (32,6 %)	24 (31,6 %)	6 (37,5 %)		21 (33,3 %)	9 (32,1%)	
C/C	7 (7,6 %)	7 (9,2 %)	0 (0 %)		5 (7,9 %)	2 (7,1 %)	
<i>MTHFR</i> 677 C>T							
C/C	54 (58,7 %)	42 (55,3 %)	12 (75,0 %)	0,25	33 (52,4 %)	20 (71,4 %)	0,18
C/T	34 (36,9 %)	31 (40,8 %)	3 (18,7 %)		27 (42,9 %)	7 (25,0 %)	
T/T	4 (4,4 %)	3 (3,9 %)	1 (6,3 %)		3 (4,7 %)	1 (3,6 %)	
<i>CASP8</i> 652 6N ins/del							
Ins/ins	26 (28,3 %)	22 (28,9 %)	4 (25,0 %)	0,51	15 (23,8 %)	11 (39,3 %)	0,50
Ins/del	61 (66,3 %)	49 (64,5 %)	12 (75,0 %)		44 (69,8 %)	16 (57,1 %)	
Del/del	5 (5,4 %)	5 (6,6 %)	0 (0 %)		4 (6,3 %)	1 (3,57 %)	
<i>CCR5</i>-Δ32							
wt/wt	77 (83,7 %)	64 (84,2 %)	13 (81,3 %)	0,69	55 (87,3 %)	21 (75,0 %)	0,74
wt/Δ32	13 (14,1 %)	10 (13,2 %)	3 (18,7 %)		7 (11,1 %)	6 (21,4 %)	
Δ32/Δ32	2 (2,2 %)	2 (2,6 %)	0 (0 %)		1 (1,59 %)	1 (3,6 %)	
N = 92					N = 91*		

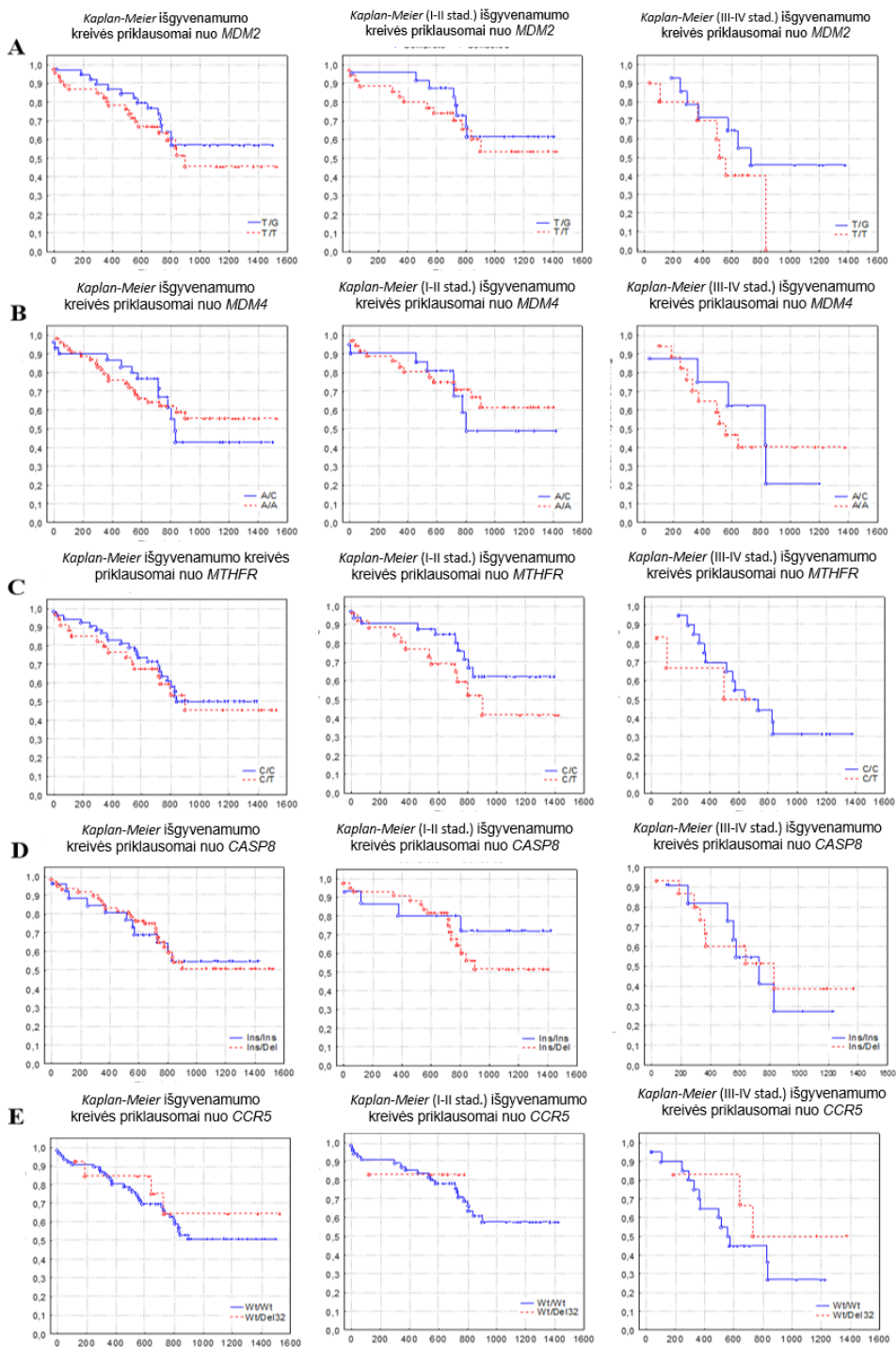
* Vieno paciento duomenų apie ligos stadiją duomenų bazėje nebuvo pateikta

TP53, MDM2, MDM4, MTHFR, CASP8, CCR5 VNP dažnių sąsajos su klinikinėmis-patologinėmis charakteristikomis. Atrinkus statistiškai apdoroti tinkamas imtis, analizuotos minėtųjų genų VNP sąsajos su pacientų lytimi ir ankstyvosiomis (I-II) bei vėlyvosiomis (III-IV) ligos stadijomis. Nustatyta, kad *MDM2* geno G/G VNP dažniau aptinkamas (18,8 %) moterų grupėje (3 iš 16 pacienčių), o vyrų grupėje šis VNP nustatytas tik 4,0 % (3 iš 76) atvejų. *MDM2* geno T/T polimorfinis variantas buvo nustatytas 52,6 % (40 iš 70 pacientų) vyrų ir tik 37,5 % (6 iš 16 pacienčių) moterų ($p = 0,08$). *MTHFR* geno C/C VNP dažniau nustatomas moterų navikų mėginiuose – 75,0 % (12 iš 16 pacienčių), palyginti su 55,3 % (42 iš 76 pacientų) vyrų, C/T polimorfinis variantas dažniau aptinkamas 40,8 % (31 iš 76 pacientų) vyrų ir tik 18,7 % (3 iš 16) moterų ($p = 0,25$). Atlikus analizę tarp pacientams identifikuotų genų VNP dažnių bei nustatytų ankstyvųjų ir vėlyvųjų stadijų, skirtumai išryškėjo *MDM2* geno G/G VNP atveju: šis variantas dažniau nustatytas vėlyvųjų stadijų pacientams – 10,7 %, o ankstyvųjų stadijų atveju identifikuotas 4,8 % tiriamųjų ($p = 0,24$). *MTHFR* geno C/T variantas identifikuotas dažniau ankstyvųjų stadijų atveju – 42,9 %, o vėlyvųjų stadijų atveju – 25,0 % ($p = 0,18$). Tačiau ir šiais atvejais VNP pasiskirstymo skirtumai buvo statistiškai reikšmingi (6 lentelė).

3.3.3 ŽPV infekcijos, *TP53, MDM2, MDM4, MTHFR, CASP8, CCR5 VNP* dažnių, klinikinių-patologinių charakteristikų sąsajos su plaučių vėžiu sergančių pacientų išgyvenamumo rodikliais

Atlikta statistinė analizė, siekiant nustatyti, kurie iš tirtųjų genų polimorfinių variantų gali turėti įtakos plaučių vėžiu sergančių pacientų išgyvenamumo rodikliams. I-II stadijos plaučių vėžiu sergančių pacientų išgyvenamumo rodiklių skirtumas esant įvairiems VNP nebuvo statistiškai patikimas, tačiau pažymėtina, kad *MTHFR* C/C VNP turinčių pacientų išgyvenamumas siekė 62,7 %, o turinčių C/T pacientų – 42,0 % ($p = 0,17$) (27 C (viduryje) pav.). III-IV stadijos plaučių vėžiu sergančių pacientų išgyvenamumo rodiklių skirtumas taip pat buvo statistiškai nereikšmingas, tačiau pažymėtina, kad *MDM2* T/T turintys pacientai išgyveno iki 800 dienų po operacijos, o pacientų, turinčių T/G VNP – 43,9 %, išgyveno iki stebėjimo pabaigos ($p = 0,23$) (27 A pav.). Stebėjimo pabaigoje išgyvenamumo rodikliai daugiau nei 10 % skyrėsi tarp pacientų, kuriems buvo diagnozuota I-II vėžio stadija bei nustatyti *CASP8* VNP: ins/ins (70,6 %), ins/del (53,0 %) ($p = 0,33$) (27 D pav.). Tokie patys skirtumai nustatyti ir tarp pacientų, kuriems buvo diagnozuota III–IV vėžio stadija bei

nustatyti *CCR5*- Δ 32 VNP: wt/wt (26,5 %) ir wt/ Δ 32 (46,3 %) ($p = 0,33$) (27 E pav.).



27 pav. Plaučių vėžiu sergančių pacientų išgyvenamumo kreivės *MDM2*, *MDM4*, *MTHFR*, *CASP8*, *CCR5* genų polimorfinių variantų atvejais. **A, B, C, D, E** (kairėje) – išgyvenamumas pacientų, kuriems buvo identifikuoti *MDM2* geno T/T ir T/G, *MDM4* geno A/C ir A/A, *CASP8* geno C/C ir C/T, *MTHFR* geno ins/ins ir ins/del, *CCR5-Δ32* geno wt/wt ir wt/Δ32 polimorfiniai variantai ($p = 0,38, = 0,84, = 0,66, = 0,99, = 0,85$). **A, B, C, D, E** (viduryje ir dešinėje) ankstyvųjų (I-II) ir vėlyvųjų (III-IV) stadijų plaučių vėžiu sergančių pacientų, kuriems buvo identifikuoti *MDM2* geno T/T ir T/G, *MDM4* geno A/C ir A/A, *CASP8* geno C/C ir C/T, *MTHFR* geno ins/ins ir ins/del, *CCR5-Δ32* geno wt/wt ir wt/Δ32 polimorfiniai variantai, išgyvenamumas (viduryje: $p = 0,49, = 0,61, = 0,17, = 0,33, = 0,76$; dešinėje: $p = 0,23; = 0,87, = 0,73, = 0,74, = 0,33$). Stebėjimo laikas vertinamas dienomis, išgyvenamumo skalė 0,1–1,0.

3.3.4 ŽPV infekcijos, *TP53*, *MDM2*, *MDM4*, *MTHFR*, *CASP8*, *CCR5* VNP dažnių klasterinė analizė

Klasterinė analizė atlikta remiantis mirusiųjų pacientų išgyvenamumo rodikliais. Didžiausias mirtingumas, analizuojant pacientus pagal nustatytus polimorfinius variantus, nustatytas *MDM2* T/T ir *CCR5* wt/wt (43,4%), *MDM4* A/C ir *MTHFR* C/C (43,3 %) VNP turinčių pacientų grupėse. Mažiausias mirtingumas buvo nustatytas tų pacientų grupėse, kuriose identifikuoti *CCR5* wt/Δ32, *MDM2* T/G, *MTHFR* C/T ir *CASP8* ins/del polimorfiniai variantai, atitinkamai 30,7 %, 38,4 %, 39,4 % ir 40,0 %. Pacientų, kuriems buvo nustatyti *MDM4* A/A, *CASP8* ins/ins, *TP53* Arg/Pro polimorfiniai variantai, mirtingumo rodikliai buvo atitinkamai 40,7 %, 42,3 % ir 42,5 % (7 lentelė).

7 lentelė. Plaučių vėžiu sergančių pacientų išgyvenamumas (%) priklausomai nuo tirtųjų genų VNP

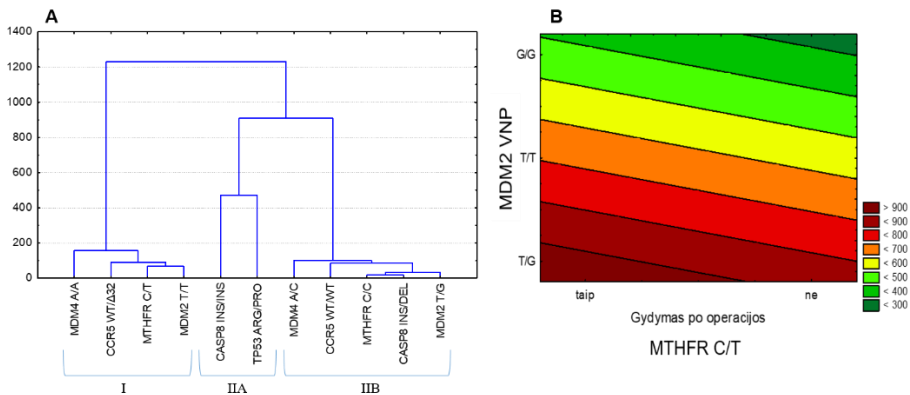
Klasteris	I				IIA		IIB				
	<i>MDM4</i> A/A	<i>CCR5</i> wt/Δ32	<i>MTHFR</i> C/T	<i>MDM2</i> T/T	<i>CASP8</i> ins/ins	<i>TP53</i> Arg/Pro	<i>MDM4</i> A/C	<i>CCR5</i> wt/wt	<i>MTHFR</i> C/C	<i>CASP8</i> ins/del	<i>MDM2</i> T/G
VNP											
%*	40,7	30,7	39,4	43,4	42,3	42,5	43,3	43,4	43,3	40,0	38,4

M** (IQR)	355 (353)	413 (492)	375 (518)	437 (516)	723 (716)	711 (153)	572 (416)	498 (437)	557 (423)	542 (412)	572 (398)
----------------------	--------------	--------------	--------------	--------------	--------------	--------------	--------------	--------------	--------------	--------------	--------------

%* - mirtingumas.

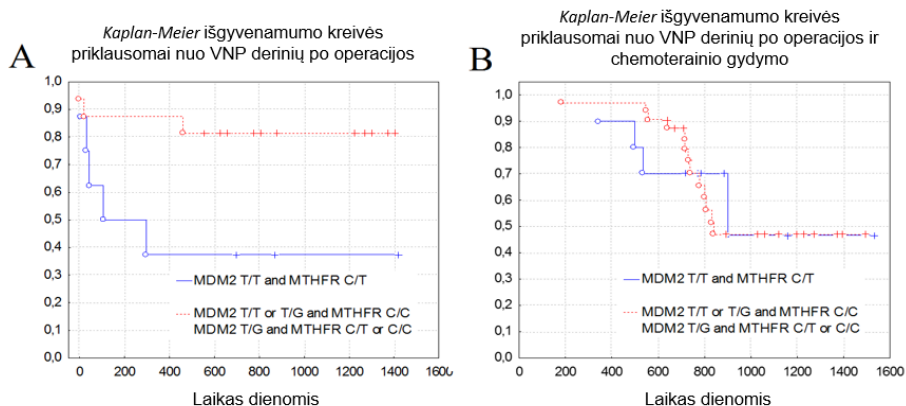
M (IQR)** - išgyvenimo trukmė (dienomis).

Klasterizacijos metodu siekta nustatyti, kurie iš tirtųjų VNP lėmė didžiausią išgyvenimo trukmę neišgyvenusių iki tyrimo pabaigos pacientų grupėje. Apskaičiavus nuo kiekvieno VNP priklausančią išgyvenamumo vidutinę medianą (q_3-q_1), nustatyta, kad geriausia išgyvenamumo vidutinė mediana buvo tų pacientų, kuriems identifikuoti *CASP8* ins/ins ir *TP53* Arg/Pro genų polimorfiniai variantai (IIA klasteris, 28 A pav.). *CASP8* ins/ins atveju nustatyta išgyvenimo trukmės mediana – 722,5 dienos, *TP53* Arg/Pro atveju nustatyta išgyvenimo trukmės mediana – 711 dienų. Kitą klasterį (IIB klasteris, 28 A pav.) sudarė pacientai, kuriems identifikuoti *MDM4* A/C, *CCR5* wt/wt, *MTHFR* C/C, *CASP8* ins/del, *MDM2* T/G genų polimorfiniai variantai. Jų išgyvenimo trukmės medianos atitinkamai: 572, 498, 557, 541,5, 572 dienų. Paskutinįjį klasterį (I klasteris, 28 A pav.) sudaro pacientai, kuriems buvo identifikuoti *MDM4* A/A, *CCR5* wt/ Δ 32, *MTHFR* C/T, *MDM2* T/T genų polimorfiniai variantai ir kurių išgyvenimo trukmės medianos atitinkamai: 355, 413, 375, 436,5 dienų.



28 pav. Prognozinių VNP ir klinikinių parametų deriniai plaučių vėžiu sergančiųjų pacientų grupėje. **A** – klasterinė analizė pagal tirtųjų genų VNP atlikta remiantis išgyvenimo trukmės mediana ir mirtingumo rodikliais. Klasterizacijai atlikti buvo naudojamas Euklido distancijos bei *Ward's* metodai. **B** – *Contour Plot* analizė remiasi VNP ir klinikinių duomenų daugybinės koreliacijos analize. Pacientai, turintys *MTHFR* geno C/T ir *MDM2* geno T/T VNP derinį, pasižymi blogesne išgyvenimo trukme po operacijos, kai toliau netaikomas kitas gydymo metodas ($p = 0,08$).

Tirtųjų genų klasterinė analizė parodė, kad mažiausią išgyvenimo trukmę gali lemti I klasterio genų VNP: *MDM4* A/A, *CCR5* wt/ Δ 32, *MTHFR* C/T, *MDM2* T/T (28 A pav.). Gautieji rezultatai rodo, kad pacientams, kuriems buvo diagnozuota III-IV plaučių vėžio stadija, reikšmingai mažėja *MTHFR* geno C/T VNP dažnis ($\chi^2 = 2,4, p = 0,12, df = 1$). *MDM2* geno T/T VNP dažnis taip pat reikšmingai mažėja pacientams, kuriems diagnozuotas vėlyvųjų stadijų plaučių vėžys ($\chi^2 = 2,6, p = 0,11, df = 1$). Tai galima sieti su blogesniu šių pacientų išgyvenamumu, esant jau ankstyvosiomis ligos stadijoms. Todėl būtų prasminga patikrinti šių genų svarbą esant ankstyvosioms ligos stadijoms ir pradiniais gydymo etapais – po operacijos. Atlikus *Contour Plot* analizę, nustatytas *MTHFR* geno C/T ir *MDM2* geno T/T VNP derinys, lemiantis blogesnes išgyvenamumo po operacijos prognozes ($p = 0,08$) (28 B pav.). Pastebėjus šią tendenciją, atlikta išgyvenamumo derinių analizė, kurios rezultatai parodė, kad pacientų, kuriems identifikuotas *MTHFR* geno C/T ir *MDM2* geno T/T VNP derinys, yra didesnė rizika mirti iš karto po operacijos ($p = 0,04$) (29 A pav.), todėl tokiais atvejais galbūt galima pradėti gydymą kitais metodais. O atskiri genų VNP reikšmingo poveikio pacientų išgyvenamumui po operacijos neturi: *MDM2* T/T ($p = 0,49$), *MTHFR* C/T ($p = 0,38$). Po operacijos plaučių vėžiu sergantiems pacientams pritaikius chemoterapiją bei kitus gydymo metodus, *MDM2* T/T, *MTHFR* C/T derinys reikšmingos įtakos išgyvenamumui neturėjo, palyginti su kitais *MDM2*, *MTHFR* genų VNP deriniais ($p = 0,96$). Pacientai, kuriems buvo taikytas operacinis gydymas ir kurie turėjo *MDM2* T/T, *MTHFR* C/T derinį, vienu metų išgyvenamumas siekė 37,5 %, o pacientų, turėjusių tą patį VNP derinį, kuriems buvo taikytas chemoterapinis gydymas, vienu metų išgyvenamumas siekė net 90,0 %. Iki tyrimo pabaigos šių pacientų išgyvenamumas buvo 37,5 % ir 50,0 % atitinkamai.



29 pav. Plaučių vėžiu sergančių pacientų išgyvenamumo priklausomybė nuo VNP derinių. Kaplano ir Mejerio išgyvenamumo kreivės: **A** – pacientai, turintys *MTHFR* geno C/T ir *MDM2* geno T/T VNP derinį, pasižymi blogesniu išgyvenamumu po operacijos ($p = 0,04$); **B** – *MTHFR* geno C/T ir *MDM2* geno T/T VNP derinys nepasižymi blogesniais pacientų po chemoterapijos ar kito gydymo ($p = 0,96$) išgyvenamumo rodikliais. Atskirų genų VNP reikšmingo poveikio pacientų išgyvenamumui po operacijos neturi: *MDM2* T/T ($p = 0,49$), *MTHFR* C/T ($p = 0,38$).

Pritaikius daugiamačią *Cox* modelį, nustatyta reikšminga pažengusiųjų stadijų reikšmė ($p = 0,018$). Atsižvelgus į klasterinės analizės rezultatus, iškelta hipotezė, kad išgyvenamumui prognozinę vertę gali turėti deriniai. *MTHFR* C/T ir *MDM2* T/T derinys po operacijos siejamas su blogesne prognoze, o pacientai, neturintys šio derinio, arba pacientai, kuriems po operacijos taikytas kitas gydymo būdas, siejami su geresnėmis gydymo prognozėmis ($p = 0,014$) (8 lentelė).

8 lentelė. Daugybiniu *Cox* modeliu paremta plaučių vėžiu sergančių pacientų išgyvenamumo analizė

	RS	95% PI	P
<i>Cox</i> daugybinė analizė			
Stadija			
I-II	1		
III-IV	2,34	1,16-4,71	0,018
VNP ir gydymas			
<i>MTHFR</i> C/T ir <i>MDM2</i> T/T	1		
<i>MTHFR</i> C/T ir <i>MDM2</i> T/T ir kitas gydymas po operacijos; operuoti pacientai, neturintys šio derinio	0,29	0,11-0,78	0,014

*RS – rizikos santykis, **PI – pasikliautiniai intervalai

Įvertinus gautuosius rezultatus matome, kad ŽPV infekcija dažniau buvo identifikuojama gimdos kaklelio (ŽPV teigimų nuo 74,2 % iki 85,6 %) ir gerklų (ŽPV teigimų 42,86 %) vėžio atvejais. Plaučių vėžio atveju infekuotumas ŽPV buvo mažiausias (ŽPV teigimų 3,3 %), $p < 0,05$.

4. REZULTATŲ APTARIMAS

4.1 ŽPV infekcija gimdos kaklelio, gerklų ir plaučių navikiniame audinyje

ŽPV infekcijos vaidmuo gimdos kaklelio kancerogenezės procesui turi aiškų modelį ir įrodytą kancerogeniškumą, tačiau keliamos hipotezės skatina tirti šio viruso vaidmenį ir kitų lokalizacijų kancerogenezės procesuose. Įvairių autorių duomenimis, ŽPV infekcija gimdos kaklelio vėžio atvejais aptinkama net iki 100%. Mūsų tyrimo metu nustatyta, kad

74,2 % CC moterų (49 iš 66) buvo infekuotos ŽPV. CIS grupėje infekcija nustatyta 85,6 % moterų (77 iš 90) ($p = 0,07$). Atlikus ŽPV genotipavimą, dažniausiai identifikuotas 16 tipo ŽPV abiejų grupių moterims: CC grupėje jis identifikuotas 48,5 % moterų, CIS grupėje – 50,0 %, $p = 0,85$, Taip pat dažniausiai identifikuojami europinio varianto 16 tipo ŽPV. Ryšys tarp ŽPV ir gerklų kancerogenezės proceso pagrįstas morfologiniu gerklų plokščiojo epitelio panašumu į gimdos kaklelio pereinamosios zonos epitelį, kuris palankus virusui tarpti. Literatūros duomenimis, ŽPV infekcija gerklų vėžio atveju nustatoma nuo 3 % iki 85 % atvejų⁹⁵. Tačiau Gama ir bendraautorių atlikta metaanalizė, apimanti 7347 atvejus iš 179 tyrimų, atliktų skirtinguose geografiniuose regionuose, parodė kiek siauresnes ŽPV paplitimo gerklų vėžio atveju, ribas. Tyrimo duomenys rodo, kad ŽPV infekcijos dažnis gerklų vėžio atveju gali varijuoti nuo 20 % iki 30 %⁹¹. Šio tyrimo metu gerklų vėžiu tarp sergančių pacientų nustatytas ŽPV infekcijos dažnis siekė 42,86 %. Mūsų tyrimo metu nustatytas ŽPV infekcijos dažnis didenis, nei buvo nustatytas ankstesnių tyrimų Lietuvoje metu. Ankstesnių tyrimų duomenimis, ŽPV infekcijos dažnis siekė 20,9 %¹²⁹ ir 30,8 %¹³⁰.

Pirmieji įrodymai, kad galimas ryšys tarp ŽPV infekcijos ir bronchų pažeidimų, buvo paskelbti Rubel ir Reynolds⁹⁶. Syrjänen su bendraautoriais 1979 m. iškėlė idėją, kad ŽPV infekcija gali būti vienas rizikos veiksnių, susijusių su plaučių kancerogenezės procesu¹⁰. Pastarųjų metų tyrimų duomenys rodo, kad ŽPV infekcija plaučių vėžio atveju gali siekti net 78 %, Hsu su bendraautoriais atliktų tyrimų duomenimis, ŽPV infekcija išsivysčiusiose šalyse siekia 36 %, tuo tarpu Azijoje – 9-78 %¹¹¹. Ahmadi su bendraautoriais atlikta metaanalizė, apimanti 14 tyrimų ir 413 atvejų, parodė 16 % infekuotumą ŽPV¹¹². Xiong ir bendraautorių atlikta metaanalizė, apimanti 6980 plaučių vėžio atvejus iš 17 skirtingų šalių, parodė, kad ŽPV infekcijos dažnis tirtose populiacijose siekia 3,64 %¹⁵. Kiek ankstesni Hasegawa ir bendraautorių tyrimai, atlikti su niekada nerūkšiais asmenimis, atskleidė tarpžemyninius ŽPV infekcijos sąsajų su plaučių vėžiu skirtumus. Azijos šalyse paplitimas siekė 28,1 %, Europoje – 8,4 %, Šiaurės ir Pietų Afrikoje – 21,3 %¹¹³. Iki šiol pasaulyje atliktų ŽPV infekcijos identifikavimo plaučių vėžio atveju studijos pateiktos 9 lentelėje. Mūsų tyrimo metu nustatytas ŽPV paplitimas tarp plaučių vėžiu sergančių pacientų buvo 3,3 %.

9 lentelė. Plaučių vėžiu sergančių pacientų infekuotumo ŽPV tyrimų metaanalizė, adaptuota pagal *Xiong et al*¹⁵

Autorius (publikavimo metai)	ŽPV tipai	Medžiagos tyrimui tipas	Infekcijos atvejai / tyrimo imtis
Bėjui-Thivolet (1990 m.)	6, 11, 16, 18	Audinys	6/33
Li (1995 m.)	16, 18	Audinys	16/50
Fong (1995 m.)	6, 11, 16, 18, 31, 33, 52, 58	Audinys	2/104
Yang (1998 m.)	6/11, 16, 31/33	Audinys	13/50
Niyaz (2000 m.)	16, 18	Audinys	44/110
Cheng (2001 m.)	16, 18	Audinys	77/141
Chiouc (2003 m.)	16, 18	Kraujas	71/149
Cheng (2004 m.)	6, 11	Audinys	40/141
Jain (2005 m.)	16, 18	Kraujas, audinys	2/40
Ciotti (2006 m.)	16, 18, 31	Audinys	8/38
Fei (2006 m.)	16, 18	Audinys	23/73
Giuliani (2007 m.)	-	Audinys	10/78
Nadji (2007 m.)	-	Audinys	33/129
Buyru (2008 m.)	16, 18	Blood	1/65
Wang (2008 m.)	16, 18	Audinys	138/313
Yu (2009 m.)	25	Audinys	43/109
Xu (2009 m.)	16/18	Audinys	32/44
Krikelis (2010 m.)	16	Audinys	36/58
Wang (2010 m.)	16, 18	Audinys	18/45
Joh (2010 m.)	-	Audinys	5/30
Carpagnano (2011 m.)	16, 18, 30, 31, 33, 45, 35/68, 39/56, 58/52, 59/51, 6/11	Audinys	12/89
Galvan (2012 m.)	35	Audinys	0/100
Gatta (2012 m.)	16, 18, 33, 35, 52, 58	Audinys	2/50
Yu (2013 m.)	25 types	Audinys	75/170
Anantharaman (2014 m.)	6, 11, 16, 18, 31	Kraujas	791/1634
Sagerup (2014 m.)	15	Audinys	13/334
Sarchianaki (2014 m.)	37	Audinys	19/100
Yu (2015 m.)	L1, 16, 18	Audinys	100/180
Fan (2016 m.)	16	Pleuros išskyros	42/95
Gupta (2016 m.)	16, 18, 31, 33, 45	Aspiracinis citologinis ėminys	5/73

Lu (2016 m.)	16, 18	Audinys	33/72
Robinson (2016 m.)	28	Audinys	15/57
Xiong (2016 m.)	21	Audinys	7/83
Simen (2010 m.)	16, 18	Serumas	67/311
Anantharaman (2014 m.)	6, 11, 16, 18, 31	Kraujas	604/1449
Colombara (2015 m.)	6, 11, 16, 18, 31, 33, 52, 58	Serumas	4/200
Colombara (2016 m.)	6, 11, 16, 18, 31, 33, 52, 58	Serumas	8/183

Taigi mūsų tyrimo atveju ŽPV infekcija ryškesnį vaidmenį vaidina gimdos kaklelio (74,2 %-85,6 %) ir gerklų (42,86 %) kancerogenezėje. Plaučių vėžio vystymuisi didesnę įtaką daro VNP bei kiti rizikos veiksniai, o infekuotumas ŽPV buvo mažiausias (3,3 %).

4.2 Tirtųjų genų VNP funkcija ir sinergistinis veikimas gimdos kaklelio, gerklų ir plaučių kancerogenezės procesuose

TP53 kelio genų mechanizmų analizės dėka, buvo išsiaiškinta, kad yra keletas galimų strategijų *TP53* geno, kaip “genomo sargo“, funkcijoms išsaugoti. Viena iš jų susijusi su *MDM2* VNP variantais. Antroji susijusi su ŽPV onkogenų veikimu. p53 aktyvacijos ir stabilumo palaikymą reguliuoja Mdm2. Didenis p53 kiekis suaktyvina Mdm2 sintezę – reguliuojamas reguliacinis grįžtamasis ryšys. Manoma, kad su *MDM2* T>G VNP yra susijęs šio baltymo kiekio reguliavimas, o inhibuojant šį procesą, išsaugoma *TP53* funkcija, silpninant ryšį tarp *TP53* ir *MDM2* N-galo blokada. Antruoju atveju p53 funkcija atstatoma inhibuojant E6 onkogeno veikimą¹¹⁴.

Šių genų polimorfinių variantų rinkiniai buvo pasirinkti siekiant aptikti ŽPV infekcijos mechanizmuose dalyvaujančius svarbius veikiančiuosius gerklų ir plaučių vėžio atvejais bei atlikti lyginamąją analizę remiantis tyrimais, apimančiais ŽPV nulemtą gimdos kaklelio kancerogenezės procesą. ŽPV infekcijos vystymosi procese dalyvauja daugelis genų, o kancerogenezės iniciacijai ypač svarbūs pokyčiai, įvykstantys genuose.

Gimdos kaklelio vėžio atveju *TP53* geno tyrimų rezultatai rodo, kad Arg variantas aptinkamas dažniau ir gali būti vienas iš genetinio nestabilumo veikiančiųjų¹³⁶. Bojesen ir bendraautorių atlikti *TP53* tyrimai gerklų vėžio atveju Arg>Pro variantą sieja su geresniu išgyvenamumu¹¹⁵. O plaučių vėžio atveju 2013 m. atlikta metaanalizė parodė, kad G transversija į C susijusi su plaučių vėžio rizika, Arg izoforma pasižymi efektyvesne apoptozės indukcija ir didesniu naviko slopinimo potencialu¹³⁷. Šio tyrimo atveju gerklų vėžiu

sergančiųjų imtyje visiems pacientams buvo nustatytas heterozigotinis variantas, plaučių vėžio atveju nustatyti 4 homozigotiniai Arg/Arg variantai.

Manoma, kad *MDM2* T>G VNP gimdos kaklelio vėžio atveju lemia polinkį supiktybėti, tai analizuojama Singhal su bendraautorais atliktuose tyrimuose¹¹⁶. Plaučių vėžio atveju nustatytas *MDM2* T/T polimorfinio varianto apsauginis vaidmuo¹³⁸. O galvos-kaklo navikų metaanalizės duomenys rodo G/G polimorfinio varianto sąsajas su kancerogenezes procesu¹³⁹.

Pagal Wynendaele ir bendraautorius gimdos kaklelio vėžio atveju *MDM4* A>C VNP A pagrindinis alelis veikia kaip rizikos veiksnys¹¹⁷. *MTHFR* geno C677T C>T VNP gimdos kaklelio vėžio atveju generuoja fermento sintezės aktyvumą ir kancerogenezę¹¹⁸. *CASP8* del/del VNP susijęs su ŽPV infekcija ir svarbus ikivėžiniams pokyčiams identifikuoti¹¹⁹. *CCR5* wt/Δ32 VNP siejamas su ankstyvosiomis gimdos kaklelio vėžio stadijomis ir ikivėžiniais pokyčiais⁸³.

4.2.1 *TP53*, *MDM2*, *MDM4*, *MTHFR*, *CASP8*, *CCR5* VNP dažnių sąsajos su klinikinėmis-patologinėmis charakteristikomis

Atlikto tyrimo metu *MDM2* G/G ir *MTHFR* T/T variantai buvo nustatyti tik tiems pacientams, kuriems buvo nustatytas III–IV stadijos gerklų vėžys, ankstyvosioms stadijoms šie VNP būdingi nebuvo. Hong su bendraautorais atlikto tyrimo duomenimis, *MDM2* G/G VNP siejamas su bloga navikinių ląstelių diferenciacija ir pažengusių stadijų gerklų vėžiu¹²⁰. Bhowmik ir bendraautorai atlikto tyrimu parodė, kad pacientams, turintiems G/G VNP, gerklų vėžio rizika yra didesnė nei esant laukinio tipo variantui T/T. Tarp moterų ši rizika yra net 4 kartus didesnė, 5 kartus didesnė rizika nustatyta esant *TP53* Arg/Pro ir *MDM2* G/G polimorfinių variantų kombinacijai¹²¹. Irane atliktas tyrimas parodė *MTHFR* T/T varianto apsauginį veikimą¹⁴⁰.

Mūsų tyrimo metu nustatyta, kad plaučių vėžiu sergančioms moterims *MDM2* G/G variantas buvo nustatytas dažniau nei vyrams (18,8 % ir 4,0 % atitinkamai). Šis rezultatas patvirtina anksčiau pateiktą Zhuo ir kolegų idėją apie dažnesnį *MDM2* G/G varianto identifikavimą moterų grupėje bei šio varianto turėtojų sąsajas su plaučių vėžio rizika, ypač tarp nerūkančiųjų¹⁴¹. Tačiau šio polimorfinio varianto vaidmuo gali skirtis priklausomai nuo skirtingų lokalizacijos mechanizmų. Yra duomenų, jog G alelio buvimas sąlygoja apsauginę funkciją galvos-kaklo vėžio atveju baltaodžių populiacijoje¹⁴². Analizuojant tirtųjų genų VNP sąsajas su N, nustatytas ryšys tarp *MDM2*, *CASP8*, *CCR5* genų ir naviko išplitimo į

regioninius limfmazgius. Pacientams, kuriems nustatytas gerklų navikinių ląstelių išplitimas į limfmazgius, dažniausiai buvo identifikuoti *MDM2* T/G (62,5 %), *CASP8* ins/del (50,0 %), *CCR5* wt/wt (81,3 %) polimorfiniai variantai.

4.2.2 Genų *TP53*, *MDM2*, *MDM4*, *MTHFR*, *CASP8*, *CCR5* VNP, klinikinių-patologinių duomenų sąsajos su plaučių ir gerklų vėžiu sergančių pacientų išgyvenimo trukmės rodikliais

Išgyvenamumo vertės priklausomai nuo klinikinių-patologinių charakteristikų gerklų ir plaučių vėžio atvejais. Atliktos analizės duomenimis, vertinant klinikinių parametrų – N vertę pacientų išgyvenamumui, reikšmingą įtaką turėjo gerklų naviko išplitimas į limfmazgius ($p = 0,007$). Atlikus tirtųjų genų VNP sąsajų analizę su pirminio naviko dydžiu bei infiltracija į gretimus organus, gautieji rezultatai parodė, kad esant naviko išplitimui į gretimus organus (N1-2) dažniausiai nustatomas *MTHFR* C/T VNP, tačiau nustatytas ryšys nėra statistiškai reikšmingas ($p = 0,21$). Plaučių vėžio atveju statistiškai reikšmingų VNP sąsajų su klinikinių parametrų vertėmis nustatyta nebuvo.

Išgyvenamumo vertės priklausomai nuo tirtųjų genų VNP gerklų vėžiu sergančiųjų grupėje. Atlikta gerklų vėžiu sergančių pacientų išgyvenamumo analizė statistiškai patikimų skirtumų neparodė, tačiau pacientų, kuriems identifikuoti *MDM2* genų T/T variantai, išgyvenamumo stebėjimo pabaigoje siekė 65,6 %, o T/G variantą turinčių pacientų išgyvenamumo rodikliai siekė vos 46,0 %. Pažymėtina, kad Enokida ir bendraautorai nustatė, kad pacientų, sergančių I stadijos plaučių vėžiu ir turinčių *MDM2* T/T genotipą, išgyvenimo trukmė buvo žymiai mažesnė nei T/G ar G/G genotipų turinčių pacientų ($p = 0,02$)¹²². Kito tyrimo metu Dong ir bendraautorai nustatė, kad *MDM2* G/T ir T/T genotipai yra susiję su žymiai blogesniu išgyvenimu¹²³. Taip pat nustatyti pacientų išgyvenamumo skirtumai esant *MTHFR* VNP: pacientams, kuriems identifikuotas T/T variantas stebėjimo pabaigoje išgyvenamumo rodikliai siekė 80,0 %, C/T – 54,0 %, o C/C atveju – 43,5 %. Anders ir kolegų atlikto tyrimo rezultatai patvirtina, kad T alelio buvimas sumažina mirtingumą 3 kartus. Kelinama hipotezė, kad apsauginis T alelio poveikis pacientams, kuriems taikomas spindulinis gydymas, pasireiškia įvykus aminorūgščių Ala/Val pakaitai¹²⁶. Tokie rezultatai rodo, kad tirtųjų genų VNP gali būti prognozinis žymeniu gerklų vėžiu sergančiųjų pacientų ligos eigai ir prognozei vertinti, tačiau

reikalingi platesnės apimties ilgesnės stebėsenos ir apimantys skirtingas populiacijas tyrimai.

Išgyvenamumo vertės priklausomai nuo tirtųjų genų VNP plaučių vėžiu sergančiųjų grupėje. Kai kurių autorių duomenimis, *MTHFR* geno 677 homozigotinė VNP forma siejama su kur kas geresniu išgyvenamumu iki prasidedant ligos progresavimui, palyginti su išgyvenamumu pacientų kuriems, identifikuotas laukinis tipas ar heterozigotinis VNP^{124,125}. Šio tyrimo rezultatai parodė, kad *MTHFR* C/C VNP turinčių pacientų išgyvenamumas siekė 62,7 %, o C/T turinčių pacientų – 42,0 % ($p = 0,17$). Taip pat mūsų tyrimo stebėjimo pabaigoje išgyvenamumo rodikliai daugiau nei 10 % skyrėsi tarp pacientų, kuriems buvo diagnozuota I-II stadija bei nustatyti *CASP8* VNP: ins/ins (70,6 %), ins/del (53,0 %) ($p = 0,33$), ir pacientų, kuriems buvo diagnozuota III-IV stadija bei nustatyti *CCR5*- Δ 32 VNP: wt/wt (26,5 %) ir wt/ Δ 32 (46,3 %) ($p = 0,33$). Taigi šio tyrimo rezultatai parodė skirtingas plaučių vėžiu sergančių pacientų išgyvenimo trukmės tendencijas priklausomai nuo VNP, tačiau rezultatai nebuvo statistiškai reikšmingi. Tokie rezultatai taip pat rodo, kad tirtųjų genų VNP gali būti prognozinis žymeniu plaučių vėžiu sergančiųjų pacientų ligos eigai ir prognozei vertinti, tačiau, kaip ir gerklų vėžio atveju, reikalingi platesnės apimties, ilgesnės stebėsenos ir apimantys skirtingas populiacijas tyrimai.

Pacientų išgyvenamumo klasterinė analizė priklausomai nuo tirtųjų genų VNP. Gerklų vėžiu sergančiųjų grupėje atliktos klasterinės analizės duomenimis, geriausiai išgyvenamumo rodikliais pasižymėjo pacientai, kuriems identifikuoti *MDM2* T/T variantai, ši grupė buvo vertinama kaip ilgiausiai išgyvenusiųjų tarp turėjusiųjų tirtuosius variantus. Plaučių vėžio atveju išsiskyrė keli variantai, kuriems esant pacientų mirtingumo rodikliai buvo mažiausi: *CCR5* wt/ Δ 32, *MDM2* T/G, *MTHFR* C/T, *CASP8* ins/del. Atlikus mirtingumo rodiklių analizę, nustatyta, kad ir plaučių, ir gerklų vėžiu sergantiems pacientams, kurių mirtingumas buvo didžiausias, identifikuotas *MTHFR* C/C VNP. Svarbu pažymėti, kad Andres ir bendraautorių atlikto tyrimo duomenimis, bent vieno T alelio buvimas lamia geresnius išgyvenamumo rodiklius¹²⁶, o mūsų gautieji rezultatai tik patvirtina tokius duomenis.

4.2.3 *TP53, MDM2, MDM4, MTHFR, CASP8, CCR5* VNP ir ŽPV kombinuoto veikimo analizė bei sąsajų su išgyvenamumu paieška

Gerklų vėžiu sergančių pacientų visuminė analizė, apimanti klinikinius-patologinius rodiklius, VNP derinius ir ŽPV infekciją, parodė tendencijas ir galimus derinius, galinčius nulemti pacientų išgyvenamumo rodiklius. Pacientams, kuriems buvo nustatyta navikinių ląstelių išplitimo į regioninius limfmazgius ir *CASP8* ins/del varianto derinys ir kurie neturėjo ŽPV infekcijos, išgyveno tik iki 600 dienų, o praėjus 430 dienų nuo tyrimo pradžios šioje grupėje išgyvenamumo rodikliai siekė tik 16,6 %. Pacientų, kuriems nebuvo nustatyta navikinio audinio išplitimo į regioninius limfmazgius, *CASP8* ins/del varianto derinys ir kurie buvo infekuoti ŽPV, išgyvenamumo rodikliai tyrimo pabaigoje siekė apie 60,0 % ($p = 0,24$). Vadinasi, kaip ir dauguma autorių nurodo, asmenys, infekuoti ŽPV, pasižymi geresniu išgyvenamumu, matyt, dėl ŽPV paveikto audinio imlumo antinavikinei terapijai. Atliekant daugiaveiksnę analizę, buvo nustatytas dar vienas derinys, galbūt lemiantis gerus išgyvenamumo rodiklius. Pacientai, kuriems buvo identifikuoti *MDM2* T/T variantai ir kuriems navikinės ląstelės nebuvo išplitusios į regioninius limfmazgius (N1–2), pasižymėjo geresniu išgyvenamumu, palyginti su kitų pacientų išgyvenamumu. Apie 80 % pacientų, kuriems buvo identifikuota šis derinys, išgyveno ilgiau nei 4,5 metų, o visi pacientai gyveno kiek ilgiau kaip 23 mėnesius ($p = 0,01$).

Plaučių vėžiu sergančių pacientų tirtųjų genų klasterinė analizė parodė, kad blogiausią išgyvenamumą gali lemti I klasterio genų VNP: *MDM4* A/A, *CCR5* wt/ Δ 32, *MTHFR* C/T, *MDM2* T/T. Gautieji rezultatai rodo, kad pacientų stebėseną parodo, kad mažėja išgyvenusių pacientų, kuriems buvo diagnozuota III-IV stadija ir *MTHFR* geno C/T polimorfinis variantas ($p = 0,12$). Panaši situacija ir tų pacientų, kuriems buvo diagnozuotas vėlyvųjų stadijų plaučių vėžys ir *MDM2* geno T/T VNP ($p = 0,11$). Tokie galutiniai stebėsenos rezultatai galėtų būti siejami su blogesniu šių pacientų išgyvenamumu, esant jau pirmosioms ligos stadijoms. Todėl prasminga patikrinti šių genų svarbą pirmųjų ligos stadijų metu ir pradiniais gydymo etapais – po operacijos. Išgyvenamumo rezultatai parodė, kad pacientai, kuriems identifikuotas *MTHFR* geno C/T ir *MDM2* geno T/T polimorfinių variantų derinys, mirė iš karto po atliktos operacijos ($p = 0,04$). Todėl šis VNP derinys gali būti prognozinis žymeniu atrenkant pacientus kitam, o ne pirminiam operaciniam plaučių vėžio gydymui. Kita vertus, atskirų genų VNP reikšmingo poveikio plaučių vėžiu sergančiųjų pacientų išgyvenamumui po operacijos neturėjo: *MDM2* T/T ($p = 0,49$),

MTHFR C/T ($p = 0,38$). Po operacijos plaučių vėžiu sergantiems pacientams pritaikius chemoterapiją bei kitus gydymo metodus, *MDM2 T/T*, *MTHFR C/T* derinys reikšmingos įtakos išgyvenamumui neturi, palyginti su kitais *MDM2*, *MTHFR* genų polimorfinių variantų deriniais ($p = 0,96$). Pacientų, kuriems buvo taikytas operacinis gydymas ir kurie turėjo *MDM2 T/T*, *MTHFR C/T* derinį, vienų metų išgyvenamumas siekė 37,5 %, o pacientams, kurie turėjo tą patį VNP derinį ir kuriems buvo pritaikyta chemoterapija – 90,0 %. Iki tyrimo pabaigos išgyvenamumas buvo atitinkamai 37,5 % ir 50,0 %. Liu su bendraautoriais atliktų tyrimų duomenimis, *TP53 Pro/Pro-MDM2 G/G* genotipų derinius turinčių plaučių vėžiu sergančių pacientų išgyvenimas stebėjimo pabaigoje buvo du kartus trumpesnis nei pacientų, turinčių kitus šių genų VNP derinius⁴⁴.

IŠVADOS

1. Nustatyti ŽPV infekcijos paplitimo skirtumai gimdos kaklelio, gerklų ir plaučių vėžiu sergančių pacientų grupėse (74,2-85,6 %, 42,86 % ir 3,3 % atitinkamai), tirtų lokalizacijų navikuose dominavo 16 tipo ŽPV.
2. Gerklų vėžio atveju *MDM2* T/G, *CASP8* ins/del, *CCR5* wt/wt VNP yra patikimi prognoziniai naviko plitimo į limfmazgius ir ligos progresavimo žymenys.
3. Navikinių ląstelių plitimas į regioninius limfmazgius, *CASP8* ins/del VNP ir neigiamas ŽPV testas – žymi blogą išgyvenimo trukmės prognozę sergant gerklų vėžiu.
4. *MDM2* T/T VNP, naviko neplitimas į limfmazgius – geros išgyvenamumo prognozės žymenys gerklų vėžio atvejais.
5. *MTHFR* geno C/T ir *MDM2* geno T/T VNP derinys gali būti predikcinis žymenis, atrenkant pirminius pacientus konservatyviam plaučių vėžio gydymui.

PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS

1. Rekomenduojame pritaikyti klinikinėje praktikoje derinius, apimančius navikinių ląstelių plitimą į regioninius limfmazgius, *CASP8* ins/del VNP ir neigiamą ŽPV testą, kaip blogos prognozės veiksnius, o *MDM2* T/T VNP bei naviko neplitimą į limfmazgius, kaip geros prognozės veiksnus.

2. Rekomenduojame papildomo pooperacinio gydymo praktikoje panaudoti *MTHFR* geno C/T ir *MDM2* geno T/T VNP derinius, kaip predikcinius žymenis.

MOKSLINIŲ STRAIPSNIŲ IR PRANEŠIMŲ PUBLIKACIJOS DISERTACIJOS TEMA

MOKSLINIAI STRAIPSNIAI DISERTACIJOS TEMA:

Publikacijos mokslinės informacijos instituto duomenų bazės „ISI Web of Science“ leidiniuose, turinčiuose citavimo rodiklį:

1. Gudlevičienė Ž, Kanopienė D, **Stumbrytė A**, Baušytė R, Kirvelaitis E, Simanavičienė V, Žvirblienė A. Integration of human papillomavirus type 16 in cervical cancer cells. *Central European Journal of Medicine* (IF=0,153). 2015;10:1–7.

2. Simanavičienė V, Gudlevičienė Ž, Pependikyte V, Dekaminavičiūtė D, **Stumbrytė A**, Rubinaite V, Žvirbliene A. Studies on the prevalence of oncogenic HPV types among Lithuanian women with cervical pathology. *Journal of Medical Virology* (IF=1,998). 2015;87:461–471.

3. Gudlevičienė Ž, **Stumbrytė A**, Juknė G, Simanavičienė V, Žvirblienė A. Distribution of Human papillomavirus type 16 variants in Lithuanian women with cervical pathology. *Medicina (Lithuanian)* (IF=0,77). 2015;51:328–335.

4. **Stumbrytė A**, Gudlevičienė Ž, Kundrotas G, Dabkevičienė D, Kunickaite A, Cicėnas S. Individual and Combined Effect of *TP53*, *MDM2*, *MDM4*, *MTHFR*, *CCR5*, and *CASP8* gene Polymorphisms in Lung Cancer. *Oncotarget* (IF= 5,168). 2018;9:3214–3229.

MOKSLINIAI PRANEŠIMAI DISERTACIJOS TEMA:

1. Association of HPV frequencies and genes polymorphisms in various cancers. **Stumbrytė A**, Gudlevičienė Ž, Mažul J, Jankauskaitė EA. Global Virus network Conference. Laulasmaa (Estonia). Skandinavijos-Baltijos šalių- Ukrainos virusologijos konferencija „Global Virus Network conference of virologists for the Scandinavia–Baltic–Ukraine region“. 2014 m. birželio 11–13 d. Laulasmaa (Estija).

2. Frequencies of HPV infection, p53 and *MDM2* polymorphisms in laryngeal cancer. Mackevičienė I, Gudlevičienė Ž, **Stumbrytė A**. International Symposium on HPV infection in Head and Neck Cancer. Centre of Poznan University of Medical Sciences. 2014 m. gruodžio 13–14 d. Poznań (Lenkija).

3. Interaction of HPV and gene polymorphisms in breast and lung cancerogenesis. **Stumbryte A**, Gudlevičienė Ž, Jankauskaitė EA, Mažul J. 6-asis Baltijos šalių onkologų kongresas "Multidisciplinary approach in cancer care". 2014 m. spalio 3-4 d. Vilnius.
4. HPV related research at the National Cancer Institute in Lithuania. **Stumbrytė A**. Stažuotė Tarptautiniame vėžio tyrinėjimų centre (International Agency of Research on Cancer, IARC). 2014 m. lapkričio 11–gruodžio 1 d. Lijonas (Prancūzija).
5. HPV DNA detection in lung cancer patients. Tarptautinė ŽPV 2015 konferencija. **Stumbrytė A**, Gudlevičienė Ž. 2015 m. rugsėjo 17–21 d. Lisabona (Ispanija).
6. Combined Effect of HPV and SNPs of *TP53*, *MDM2*, *MDM4*, *MTHFR*, *CASP8* Genes in Lung Cancer. **Stumbrytė A**, Pliplyte R, Kunickaite A, Gudlevičienė Ž. Conference of Natural and Life sciences (COINS). Jungtinis gyvybės mokslu centras. 2016 m. vasario 29–kovo 3 d. Lietuva (Vilnius).
7. Association of *P53*, *MDM2* and *MDM4* polymorphysm in breast cancer cases as new possibilities for cancer target therapy. **Stumbrytė A**, Pliplyte R, Jankauskaite EA, Liudkevičienė R, Garmienė G, Gudlevičienė Ž. Progress in molecular oncology at the Maria Skłodowska-Curie Memorial Cancer Center - Institute of Oncology and MD Anderson Cancer Center – looking to the future. 2016 m. balandžio 5 d. Varšuva (Lenkija).
8. Distribution of HPV infection and various genes polymorphisms in laryngeal cancer. Kunickaitė A, **Stumbrytė A**, Simanavičienė V, Juškevičiūtė E, Gudlevičienė Ž. Progress in molecular oncology at the Maria Skłodowska-Curie Memorial Cancer Center - Institute of Oncology and MD Anderson Cancer Center – looking to the future. 2016 m. balandžio 5 d. Varšuva (Lenkija).
9. Combined effect of HPV and genetic polymorphisms in *TP53*, *MDM2*, *MDM4*, *MTHFR*, *CASP8*, *CCR5* in Lung cance. Kunickaitė A, **Stumbrytė A**, Gudlevičienė Ž, Dabkevičienė D, Liudkevičienė R, Garmienė G, Cicėnas S. International conference of Life Sciences – COINS 2017.) 2017 m. vasario 28–kovo 2 d. Vilnius.
10. Combined effect of HPV and genetic polymorphisms in *TP53*, *MDM2*, *MDM4*, *MTHFR*, *CASP8*, *CCR5* in Laryngial cancer. **Stumbrytė A**, Kunickaitė A, Olendraitė U, Gudlevičienė Ž, Mackevičienė I, Bunikis A. International conference of Life Sciences – COINS 2017.) 2017 m. vasario 28 – kovo 2 d. Vilnius.

11. Combined effect of HPV and genetic polymorphisms in *TP53*, *MDM2*, *MDM4*, *MTHFR*, *CASP8*, *CCR5* in Lung cancer. Kunickaitė A, **Stumbrytė A**, Gudlevičienė Ž, Dabkevičienė D, Liudkevičienė R, Garmienė G, Cicėnas S. 60TH International conference for students of physics and natural sciences „Open Readings. 2017 m. kovo 14–17 d. Vilnius.
12. Detection of Human Papillomavirus in Lung Metastasis Case. Mironova J. Gudlevičienė Ž, **Stumbrytė A**. Bialystok International Medical Congress for Young Scientists. 2017 balandžio 20–22 d. Bialystok (Lenkija).
13. Papillomavirus in Lung Metastasis Case. Mironova J, Gudlevičienė Ž, **Stumbrytė A**. 13 th Warsaw international medical congress for young scientists. 2017 m. gegužės 11–14 d. Varšuva (Lenkija).
14. Study on clinicopathological and genetical factors associated with biochemical recurrence of prostate cancer after radical prostatectomy. Ladukas A, Kinčius M, **Stumbrytė A**, Ulys A, Smailyte G, Gudlevičienė Ž. EAU. 2017 m. gegužės 26 d. Vilnius.

FINANSINĖ PARAMA

„Aukštos kvalifikacijos specialistų, atitinkančių valstybės ir visuomenės poreikius, biomedicinos srityje rengimo tobulinimas – BIOMEDOKT“ (Nr. VP1-3.1-SMM-01-V-03-002), iš kurio buvo finansuojamos doktorantūros studijos.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Cao S, Wendl MC, Wyczalkowski MA, Wylie K, Ye K, Jayasinghe R, Xie M, Wu S, Niu B, Grubb R 3rd, Johnson KJ, Gay H, Chen K, Rader JS, Dipersio JF, Chen F, Ding L. Divergent viral presentation among human tumors and adjacent normal tissues. *Sci Rep.* 2016;6:28294.
2. Stanley M. Pathology and epidemiology of HPV infection in females. *Gynecol Oncol.* 2010;117:S5-10.
3. Khoury R, Sauter S, Butsch Kovacic M, Nelson AS, Myers KC, Mehta PA, Davies SM, Wells SI. Risk of Human Papillomavirus Infection in Cancer-Prone Individuals: What We Know. *Viruses.* 2018;20:10.
4. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology.* 2004;324:17–27.
5. Schmitt M, Dondog B, Waterboer T, Pawlita M, Tommasino M, Gheit T. Abundance of multiple high-risk human papillomavirus (HPV) infections found in cervical cells analyzed by use of an ultra-sensitive HPV genotyping assay. *J Clin Microbiol.* 2010;48:143-149.
6. World Health Organization International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs on the Evaluation of carcinogenic Risk to Human, Human Papillomaviruses. 2008. 91.
7. Gottschling M, Köhler A, Stockfleth E, Nindl I. Phylogenetic analysis of beta-papillomaviruses as inferred from nucleotide and amino acid sequence data. *Mol Phylogenet Evol.* 2007;42:213-222.
8. Mirabello L, Clarke MA, Nelson CW, Dean M, Wentzensen N, Yeager M, Cullen M, Boland JF; NCI HPV Workshop, Schiffman M, Burk RD. The Intersection of HPV Epidemiology, Genomics and Mechanistic Studies of HPV-Mediated Carcinogenesis. *Viruses.* 2018;10.
9. Reddout N, Christensen T, Bunnelli A, Jensen D, Johnson D, O'Malley S, Kingsley K. High risk HPV types 18 and 16 are potent modulators of oral squamous cell carcinomaphenotypes in vitro. *Infect Agent Cancer.* 2007;2:21.
10. Siddiqua A, Léon KC, James CD, Bhatti MF, Roberts S, Parish JL. The human papillomavirus type 16 L1 protein directly interacts with E2 and enhances E2-dependent replication and transcription activation. *J Gen Virol.* 2015;96:2274-2285.
11. Li Z, Yan Xiaodong, Yu Hai, Wang D, Song S, Li Y, He M, Hong Q, Zheng Q, Zhao Q, Gu Y, Zhang J, Janssen MEW, Cardone G, Olsn NH, Baker TS, Li S, Xia N. The C-Terminal Arm of the Human Papillomavirus

Major Capsid Protein Is Immunogenic and Involved in Virus-Host Interaction. *ScienceDirect*. 2016;24:874-885.

12. Buck CB, Day PM, Trus BL. The Papillomavirus Major Capsid Protein L1. *Virology*. 2013;445:169-174.

13. Kalvatchev Z, Rosl F. Human papillomaviruses: Realities and perspectives. *Review Medical Biotechnology*. 2007;21:137–144.

14. Roden RBS, Stern PL. Opportunities and challenges for human papillomavirus vaccination in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2018;18:240-254.

15. Xiong WM, Xu QP, Li X, Xiao RD, Cai L, He F. The association between human papillomavirus infection and lung cancer: a system review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2017;8:96419-96432.

16. Kumaraswamy KL, Vidhya M. Human papilloma virus and oral infections: an update. *J Cancer Res Ther*. 2011;7:120-127.

17. Matoyama S, Ladines-Llave CA, Luis Villanueva S, MaruoT. The role human papilloma virus in the molecular Biology of Cervical Carcinogenesis. *Kobe J Med Sci*. 2004;50:9-19.

18. Xu C, Zhu J, Fu W, et al. *MDM4* rs4245739 A > C polymorphism correlates with reduced overall cancer risk in a meta-analysis of 69477 subjects. *Oncotarget*. 2016;7:71718-71726.

19. Lambert PF, Collins S. Papillomaviruses: Molecular Biology of human Viruses. 2008;3.

20. Thiery F, Benotmane MA, Demeret C, Mori M, Teissier S, Desaintes C. A genomic approach reveals a novel mitotic pathway in papillomavirus carcinogenesis. *Cancer Res*. 2004;64:895-903.

21. Pinidis P, Tsikouras P, Iatrakis G, Zervoudis S, Koukouli Z, Bothou A, Galazios G, Vladareanu S. Human Papilloma Virus' Life Cycle and Carcinogenesis. *Maedica (Buchar)*. 2016;11:48-54.

22. Giroglou T, Florin L, Schafer F, Streeck RE, Sapp M. Human papillomavirus infection requires cell surface heparin sulfate. *J Virol*. 2001;75:1565-1570.

23. Kurg R. The Role of E2 Proteins in Papillomavirus DNA Replication. *DNA Replication Herve Seligmann*. IntechOpen. 2011.

24. Morgan IM, DiNardo LJ, Windle B. Integration of Human Papillomavirus Genomes in Head and Neck Cancer: Is It Time to Consider a Paradigm Shift? *Viruses*. 2017;3:9.

25. Weinberg RA. The biology of cancer. Second edition. Gerland Science. 2014.

26. McBride AA, Warburton A. The role of integration in oncogenic progression of HPV-associated cancers. *PLoS Pathog.* 2017;13:e1006211.
27. Pyeon D, Pearce SM, Lank SM, Ahlquist P, Lambert PF. Establishment of human papillomavirus infection requires cell cycle progression. *PloS Pathog.* 2009;5:e1000318.
28. Wu SY, Nin DS, Lee AY, Simanski S, Kodadek T, Chiang CM. BRD4 Phosphorylation Regulates HPV E2-Mediated Viral Transcription, Origin Replication, and Cellular MMP-9 Expression. *Cell Rep.* 2016;16:1733-1748.
29. Moody CA, Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer.* 2010;10:550-560.
30. Bello JO, Nieva LO, Paredes AC, Gonzalez AM, Zavaleta LR, Lizano M. Regulation of the Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway by Human Papillomavirus E6 and E7 Oncoproteins. *Viruses.* 2015;7:4734-4755.
31. Zgura AF, Bratila E, Vladareanu S. Transplacental Transmission of Human Papillomavirus. *Maedica (Buchar).* 2015;10:159-162.
32. Stern PL, Kitchener HC. Vaccines for the Prevention of Cervical Cancer. Oxford University Press. 2009.
33. Harman EM. Recurrent Respiratory Papillomatosis. Emedicine from WebMD. 2008.
34. Rombaldi R, Serafini E, Mandelli J, Zimmermann E, Losquiavo KP. Transplacental transmission of human papillomavirus. *Virology Journal.* 2008;5:106-120.
35. Zhou Y, Li J, Ji Y, Ren M, Pang B, Chu M, Wei L. Inconclusive role of human papillomavirus infection in breast cancer. *Infect Agent Cancer.* 2015;10:36
36. Singh N, Hussain S, Kakkar N, Singh SK, Sobti RC, Bharadwaj M. Implication of high risk human papillomavirus HR-HPV infection in prostate cancer in Indian population – a pioneering case-control analysis. *Sci Rep.* 2015;5:7822.
37. van Boerdonk RA, Daniels JM, Bloemena E, Krijgsman O, Steenbergen RD, Brakenhoff RH, Grunberg K, Ylstra B, Meijer CJ, Smit EF, Snijders PJ, Heideman DA. High-risk Human papillomavirus-positive lung cancer: molecular evidence for a pattern of pulmonary metastasis. *J Thorac Oncol.* 2013;8:711-718.
38. Zhai K, Ding J, Shi HZ. HPV and lung cancer risk: a meta-analysis. *J Clin Virol.* 2015;63:84-90.
39. Chiou HL, Wu MF, Liaw YC, Cheng YW, Wong RH, Chen CY, Lee H. The presence of human papillomavirus type 16/18 DNA in blood circulation

- may act as a risk marker of lung cancer in Taiwan. *Cancer*. 2003;97:1558-1563.
40. Schmitt CA. Senescence, apoptosis and therapy – cutting the lifelines of cancer. *Nature reviews*. 2003;3:286-295.
41. Brierley JD, Gospodarowicz MK, Wittekind C. TNM Classification of malignant tumours. Union for international cancer control. Eighth edition. 2017.
42. Mayer EL. Breast Cancer Axillary Staging: Much Ado About Micrometastatic Disease. *Journal of clinical oncology* [teštinis leidinys internete].
43. Miller DR, Phillips MS, Jo I, Donaldson MA, Studebaker JF, Addleman N, Alfisi SV, Ankener WM, Bhatti HA, Callahan CE, Carey BJ, Conley CL, Cyr JM, Derohannessian V, Donaldson RA, Elosua C, Ford SE, Forman AM, Gelfand CA, Grecco NM, Gutendorf SM, Hock CR, Hozza MJ, Hur S, In SM, Jackson DL, Jo SA, Jung SC, Kim S, Kimm K, Kloss EF, Koboldt DC, Kuebler JM, Kuo FS, Lathrop JA, Lee JK, Leis KL, Livingston SA, Lovins EG, Lundy ML, Maggan S, Minton M, Mockler MA, Morris DW, Nachtman EP, Oh B, Park C, Park CW, Pavelka N, Perkins AB, Restine SL, Sachidanandam R, Reinhart AJ, Scott KE, Shah GJ, Tate JM, Varde SA, Walters A, White JR, Yoo YK, Lee JE, Boyce-Jacino MT, Kwoka PY, The SNP Consortium Allele Frequency Project. High-density single-nucleotide polymorphism maps of the human genome. *Genomics*. 2005;86:117-126.
44. Liu L, Wu C, Wang Y, Zhong R, Duan S, Wei S, Lin S, Zhang X, Tan W, Yu D, Nie S, Miao X, Lin D. Combined Effect of Genetic Polymorphisms in *P53*, *P73* and *MDM2* on Non-small Cell Lung Cancer Survival. *J Thorac Oncol*. 2011;6:1793-1800.
45. Ruttkay-Nedecky B, Jimenez Jimenez AM, Nejdil L, Chudobova D, Gumulec J, Masarik M, Adam V, Kizek R. Relevance of infection with human papillomavirus: the role of the p53 tumor suppressor protein and E6/E7 zinc finger proteins (Review). *Int J Oncol*. 2013;43:1754-62.
46. Glebov OK, Mc Kenzie KE, White CA, Sukumar S. Frequent p53 gene mutations and novel alleles in familial breast cancer. *Cancer Res*. 1994;54:3703–3709.
47. Xu-Monette ZY, Medeiros LJ, Li Y, Orłowski RZ, Andreeff M, Bueso-Ramos CE, Greiner TC, McDonnell TJ, Young KH. Dysfunction of *TP53* tumor suppressor in lymphoid malignancies. *Blood*. 2012;16:3668-83.
48. Xu-Monette ZY, Medeiros LJ, Li Y, Orłowski RZ, Andreeff M, Bueso-Ramos CE, Greiner TC, McDonnell TJ, Young KH. Dysfunction of *TP53* tumor suppressor in lymphoid malignancies. *Blood* 2012; 16:3668-83.

49. Ozeki C, Sawai Y, Shibata T, Kohno T, Okamoto K, Yokota J, Tashiro F, Tanuma S, Sakai R, Kawase T, Kitabayashi I, Taya Y, Ohki R. Cancer susceptibility polymorphism of p53 at codon 72 affects phosphorylation and degradation of p53 protein. *J Biol Chem.* 2011;286:18251-18260.
50. Soussi T, Wiman KG. Shaping Genetic Alteration in Human Cancer: The p53 Mutation Paradigm. *Cancer Cell.* 2007;12:303-312.
51. Tidow H, Melero R, Mylonas E, Freund SM, Grossman JG, Carazo JM, Svergun DI, Valle M, Fersht AR. Quaternary structures of tumor suppressor p53 and a specific p53 DNA complex. *Proc. Natl Acad. Sci.* 2007;104:12324-12329.
52. Eltahir HA, Elhassan AM, Ibrahim ME. Contribution of retinoblastoma LOH and the p53 Arg/Pro polymorphism to cervical cancer. *Molecular Medicine Reports.* 2012;6:473-476.
53. Zajac A, Smolarz B, Stachowiak G, Jacek R, Wilczynski JR. TP53 and *MDM2* polymorphisms and the risk of endometrial cancer in postmenopausal women. *Med Oncol.* 2014;31:286.
54. Pan X, Li Y, Feng J, Wang X, Hao B, Shi R, Zhang G. A functional polymorphism T309G in *MDM2* gene promoter, intensified by *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide, is associated with both an increased susceptibility and poor prognosis of gastric carcinoma in Chinese patients. *BMC Cancer.* 2013;13:126.
55. Nag S, Qin J, Srivenugopal KS, Wang M, Zhang R. The *MDM2-p53* pathway revisited. *J Biomed Res.* 2013;27:254-271.
56. Wang X, Jin L, Cui J, Ma K, Chen X, Li W. Mouse double minute-2 homolog (*MDM2*)-rs2279744 polymorphism associated with lung cancer risk in a Northeastern Chinese population. *Thorac Cancer.* 2015;6:91-96.
57. Zhuo W, Zhang L, Zhu B, Ling J, Chen Z. Association of *MDM2* SNP309 variation with lung cancer risk: evidence from 7196 cases and 8456 controls. *PLoS One.* 2012;7:e41546.
58. Nunobiki O, Sawada H, Ueda M. *MDM2* SNP309 (rs2279744) and p53 Codon Arg72Pro (rs1042522) SNP in Cervical Carcinogenesis. *Advances in Bioscience and Biotechnology.* 2014;5:617-622.
59. Arva NC, Gopen TR, Talbott KE, Campbell LE, Chicas A, White DE, Bond GL, Levine AJ, Bargonetti J. A chromatin-associated and transcriptionally inactive p53-Mdm2 complex occurs in *mdm2* SNP309 homozygous cells. *J Biol Chem.* 2005;280:26776-87.
60. Wo X, Han D, Sun H, Liu Y, Meng X, Bai J, Chen F, Yu Y, Jin Y, Fu S. *MDM2* SNP309 contributes to tumor susceptibility: a meta-analysis. *J Genet Genomics.* 2011;38:341-350.

61. Yu H, Sturgis EM, Liu Z, Wang LE, Wei Q, Li G. Modifying effect of *MDM4* variants on risk of HPV16-associated squamous cell carcinoma of oropharynx. *Cancer*. 2012;118:1684-92.
62. Gao F, Xiong X, Pan W, Yang X, Zhou C, Yuan Q, Zhou L, Yang M. A Regulatory *MDM4* Genetic Variant Locating in the Binding Sequence of Multiple MicroRNAs Contributes to Susceptibility of Small Cell Lung Cancer. *PLoS One*. 2015;10:e0135647.
63. Zhou L1, Zhang X, Li Z, Zhou C, Li M, Tang X, Lu C, Li H, Yuan Q, Yang M. Association of a genetic variation in a miR-191 binding site in *MDM4* with risk of esophageal squamous cell carcinoma. *PLoS One*. 2013;8:e64331.
64. Rai V. Folate pathway gene *MTHFR* C677T polymorphism and risk of lung cancer in Asian populations. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014; 15: 9259-9264.
65. Yuan JM, Lu SC, Van Den Berg D, Govindarajan S, Zhang ZQ, Mato JM, Yu MC. Genetic polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase and thymidylate synthase genes and risk of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2007; 46: 749–758.
66. Durda K, Kaklewski K, Gupta S, Szydłowski M, Baszuk P, Jaworska-Bieniek K, Sukiennicki G, Kaczmarek K, Waloszczyk P, Narod S, Lubinski J, Jakubowska A. Serum folate concentration and the incidence of lung cancer. *PLoS One*. 2017; 12: e0177441. doi: 10.1371/journal.pone.0177441PONE-D-16-34113.
67. Botezatu A, Socolov D, Iancu IV, Huica I, Plesa A, Ungureanu C, Anton G. Methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) polymorphisms and promoter methylation in cervical oncogenic lesions and cancer. *J Cell Mol Med*. 2013; 17: 543-549.
68. Xie SZ, Liu ZZ, Yu JH, Liu L, Wang W, Xie DL, Qin JB. Association between the *MTHFR* C677T polymorphism and risk of cancer: evidence from 446 case-control studies. *Tumour Biol*. 2015; 36: 8953-8972.
69. Rai V. Methylenetetrahydrofolate Reductase A1298C Polymorphism and Breast Cancer Risk: A Meta-analysis of 33 Studies. *Ann Med Health Sci Res*. 2014;4:841-851.
70. Zhang XD, Li YT, Yang SY, Li W. Meta-analysis on *MTHFR* polymorphism and lung cancer susceptibility in East Asian populations. *Biomed Rep*. 2013; 1: 440-446.
71. Long S, Yang X, Liu X, Yang P. Methylenetetrahydrofolate Reductase (*MTHFR*) Polymorphisms and Susceptibility for Cervical Lesions: A Meta-Analysis. *PLoS ONE*. 2012; 7: e52381.

72. Zhuo X, Song J, Li D, Wu Y, Zhou Q. *MTHFR* C677T polymorphism interaction with heavy alcohol consumption increases head and neck carcinoma risk. *Sci Rep*. 2015;5:10671.
73. Ji GH, Li M, Cui Y, Wang JG. The relationship of *CASP8* polymorphism and cancer susceptibility: a meta-analysis. *Cell Mol Biol*. 2014;60:20-28.
74. Zhang ZY, Xuan Y, Jin XY, Tian X, Wu R. A literature-based systematic HuGE review and meta-analysis show that *CASP* gene family polymorphisms are associated with risk of lung cancer. *Genet Mol Res*. 2013; 12: 3057-3069.
75. Theodoropoulos GE, Gazouli M, Vaiopoulou A, Leandrou M, Nikouli S, Vassou E, Kouraklis G, Nikiteas N. Polymorphisms of caspase 8 and caspase 9 gene and colorectal cancer susceptibility and prognosis. *Int J Colorectal Dis*. 2011;26:1113-1118.
76. Li C, Lu J, Liu Z, Wang LE, Zhao H, EI-Naggar AK, Sturgis EM, Wei Q. The six-nucleotide deletion/insertion variant in the *CASP8* promoter region is inversely associated with risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2010;3:246-253.
77. Chen D, Ma T, Liu XW, Liu Z. *CASP-8* -652 6N ins/del polymorphism and cancer risk: A literature-based systematic HuGE review and meta-analysis. *Exp Ther Med*. 2012;4:762-770.
78. Liu D, Xu W, Ding X, Yang Y, Lu Y, Fei K, Su B. Caspase 8 polymorphisms contribute to the prognosis of advanced lung adenocarcinoma patients after platinum-based chemotherapy. *Cancer Biol Ther*. 2017; 0. doi: 10.1080/15384047.2016.1276128.
79. Manzo-Merino J1, Massimi P2, Lizano M3, Banks L4. The human papillomavirus (HPV) E6 oncoproteins promotes nuclear localization of active caspase 8. *Virology*. 2014;450-451:146-52.
80. Degerli N, Yilmaz E, Bardakci F. The delta32 allele distribution of the *CCR5* gene and its relationship with certain cancers in a Turkish population. *Clin Biochem*. 2005;38:248-252.
81. Suzuki PS, de Oliveira KB, Aoki MN, Tatakihara VLH, Borelli SD, Watanabe MAE. Investigating the association of chemokine receptor 5 (*CCR5*) polymorphism with cervical cancer in human papillomavirus (HPV) positive patients. *Capa*. 2008;30:2.
82. Ying H, Wang J, Gao X. *CCL5*-403, *CCR5*-59029, and Delta32 polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis based on 20,625 subjects. *Tumor Biol*. 2014;35:5895-5904.

83. Zheng B, Wiklund F, Gharizadeh B, Sadat M, Gambelunghe G, Hallmans G, Dillner J, Wallin KL, Ghaderi M. Genetic polymorphism of chemokine receptors CCR2 and CCR5 in Swedish cervical cancer patients. *Anticancer Res.* 2006;26:3669-3674.
84. Praça JR, Bueno Rde B, Pinheiro DG, Panepucci RA, de Araújo LF, Mamede RC, Figueiredo DL, Silva WA Jr. Gene expression analysis of laryngeal squamous cell carcinoma. *Genom Data.* 2015;5:9-12.
85. Zhang SY, Lu ZM, Luo XN, Chen LS, Ge PJ, Song XH, Chen SH, Wu YL. Retrospective Analysis of Prognostic Factors in 205 Patients with Laryngeal Squamous Cell Carcinoma Who Underwent Surgical Treatment. *PLoS One.* 2013;8:e60157.
86. Sánchez Barrueco A, González Galán F, Lora Pablos D, Villacampa Aubá JM, Ballestín Carcavilla C, Cenjor Español C, Almodóvar Álvarez C. HPV in Larynx Squamous Cell Carcinoma: New Serotypes and Survival Study within 10-Year Follow-up. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2017;156:677-682.
87. Quan F, Zhang F, Bai Y, Zhou L, Yang H, Li B, Jin T, Li H, Shao Y. Association of genetic polymorphisms with laryngeal carcinoma prognosis in a Chinese population. *Oncotarget.* 2017;8:10255-63.
88. Morbini P, Benazzo M. Human papillomavirus and head and neck carcinomas: focus on evidence in the babel of published data. *Acta Otorhinolaryngol Ital.* 2016; 36:249-258.
89. Hassumi-Fukasawa MK, Miranda-Camargo FA, Guimarães MC, Simões RT, Donadi EA, Soares CP, Soares EG. Possible implication of Mdm2 as a prognostic marker in invasive laryngeal carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2012;269:1795-804.
90. Bychkov VA, Nikitina EG, Ibragimova MK, Kaigorodova EV, Choinzonov EL, Litviakov NV. Comprehensive meta-analytical summary on human papillomavirus association with head and neck cancer. *Exp Oncol.* 2016;38:68-72.
91. Gama RR, Varvalho AL, Longatto Filho A, Scorsato AP, Lopez RV, Rautava J, Syrjanen S, Syrjanen K. Detection of human papillomavirus in laryngeal squamous cell carcinoma: Systematic review and meta-analysis. 2016;126:885-893
92. Chen X, Sturgis EM, Lei D, Dahlstrom K, Wei Q, Li G. Human papillomavirus seropositivity synergizes with *MDM2* variants to increase the risk of oral squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 2010 Sep 15;70(18):7199-208.

93. Tsimplaki E, Argyri E, Sakellaridis A, Kyrodimos E, Xesfyngi D, Panotopoulou E. Oropharyngeal and laryngeal but not oral cancers are strongly associated with high-risk human papillomavirus in 172 Greek patients. *J Med Virol.* 2017;89:170-176.
94. Seifi S, Asvadi Kermani I, Dolatkah R, Asvadi Kermani A, Sakhinia E, Asgarzadeh M, Dastgiri S, Ebrahimi A, Asghari Haggi A, Nadri M, Asvadi Kermani T. Prevalence of oral human papilloma virus in healthy individuals in East azerbaijan province of iran. *Iran J Public Health.* 2013;42:79-85.
95. Nowińska K, Ciesielska U, Podhorska-Okołów M, Dzięgiel P. The role of human papillomavirus in oncogenic transformation and its contribution to the etiology of precancerous lesions and cancer of the larynx: A review. *Adv Clin Exp Med.* 2017; 26:539-547.
96. de Freitas AC, Gurgel AP, de Lima EG, de Franca São Marcos B, do Amaral CM. Human papillomavirus and lung carcinogenesis: an overview. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2016; 142: 2415-2427.
97. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2012; 65: 87–108.
98. Smailytė G, Aleknavičienė B. (2012). *Vežys Lietuvoje 2012 metais.* (NCI:Vilnius)(http://www.nvi.lt/wpcontent/uploads/2016/04/Vezys_lietuvoje_2012).
99. Chen ZM, Peto R, Iona A, Guo Y, Chen YP, Bian Z, Yang L, Zhang WY, Lu F, Chen JS, Collins R, Li LM, China Kadoorie Biobank Collaborative Group. Emerging tobacco-related cancer risks in China: A nationwide, prospective study of 0.5 million adults. *Cancer.* 2015; 121 Suppl 17: 3097–3106.
100. Yang P. Lung cancer in never smokers. *Semin Respir Crit Care Med.* 2011; 32: 10-21.
101. Torok S, Hegedus B, Laszlo V, Hoda MA, Ghanim B, Berger W, Klepetko W, Dome B, Ostoros G. Lung cancer in never smokers. *Future Oncol.* 2011; 7: 1195–1211
102. Lind H, Zienolddiny S, Ekstrøm PO, Skaug V, Haugen A. Association of a functional polymorphism in the promoter of the *MDM2* gene with risk of nonsmall cell lung cancer. *Int J Cancer.* 2006; 119: 718-721.
103. Li T, Lu ZM, Guo M, Wu QJ, Chen KN, Xing HP, Mei Q, Ke Y. p53 codon 72 polymorphism (C/G) and the risk of human papillomavirus-associated carcinomas in China. *Cancer.* 2001;95:2571-2576.
104. Horikawa Y, Nadaoka J, Saito M, Kumazawa T, Inoue T, Yuasa T, Tsuchiya N, Nishiyama H, Ogawa O, Habuchi T. Clinical implications of the

MDM2 SNP309 and p53 Arg72Pro polymorphisms in transitional cell carcinoma of the bladder. *Oncol Rep.* 2008;20:49-55.

105. Liu J, Tang X, Li M, Lu C, Shi J, Zhou L, Yuan Q, Yang M. Functional *MDM4* rs4245739 genetic variant, alone and in combination with p53 Arg72Pro polymorphism, contributes to breast cancer susceptibility. *Breast Cancer Res Treat.* 2013;140:151-157.

106. Boraldi F, Costa S, Rabacchi C, Ciani M, Vanakker O, Quaglino D. Can APOE and *MTHFR* polymorphisms have an influence on the severity of Cardiovascular manifestations in Italian Pseudoxanthoma elasticum affected patients? *Mol Genet Metab Rep.* 2014;1:477-482

107. Hashemi M, Eskandari-Nasab E, Fazaeli A, Rezaei H, Mashhabi MA, Arbabi F, Taheri M. Bi-directional PCR allele-specific amplification (bi-PASA) for detection of caspase-8-652 6N ins/del promoter polymorphism (rs3834129) in breast cancer. *Gene.* 2012;505:176-179.

108. Qu W, Jiang G, Cruz Y, Chang CJ, Ho GY, Klein RS, Burk RD. PCR detection of human papillomavirus: comparison between MY09/MY11 and GP5+/GP6+ primer systems. *J Clin Microbiol.* 1997;35:1304-1310.

109. Saiki R K, Walsh P S, Levenson CH, Erlich HA. Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989;86:6230-6234.

110. Syrjänen K. Detection of human papillomavirus in lung cancer: systematic review and meta-analysis. *Anticancer Res.* 2012;32:3235-3250.

111. Hsu NY, Lee H, Yen Y, Cheng YW. Human papillomavirus and non-small cell lung cancer. *Thorac Cancer.* 2013;4:345-353.

112. Ahmadi N, Ahmadi N, Chan MV, Huo YR, Sritharan N, Chin R. Laryngeal Squamous Cell Carcinoma Survival in the Context of Human Papillomavirus: A Systematic Review and Meta-analysis. 2018;10:e2234.

113. Hasegawa Y, Ando M, Kubo A, Isa S, Yamamoto S, Tsujino K, Kurata T, Ou SH, Takada M, Kawaguchi T. Human papilloma virus in non-small cell lung cancer in never smokers: a systematic review of the literature. *Lung Cancer.* 2014;83:8-13.

114. Khoo KH, Verma CS, Lane DP. Drugging the p53 pathway: understanding the route to clinical efficacy. *Nat Rev Drug Discov.* 2014;13:217-36.

115. Bojesen SE, Nordestgaard BG. The common germline Arg72Pro polymorphism of p53 and increased longevity in humans. *Cell Cycle.* 2008;7:158-163.

116. Singhal P, Hussain S, Thakur N, Batra S, Salhan S, Bhambani S, Bharadwaj M. Association of *MDM2* and p53 polymorphisms with the advancement of cervical carcinoma. *DNA Cell Biol.* 2013;32:19-27.
117. Wynendaele J, Böhnke A, Leucci E, Nielsen SJ, Lambertz I, Hammer S, Sbrzesny N, Kubitzka D, Wolf A, Gradhand E, Balschun K, Braicu I, Sehoul J, Darb-Esfahani S, Denkert C, Thomssen C, Hauptmann S, Lund A, Marine JC, Bartel F. An illegitimate microRNA target site within the 3' UTR of *MDM4* affects ovarian cancer progression and chemosensitivity. *Cancer Res.* 2010;70:9641-9649.
118. Mostowska A, Myka M, Lianeri M, Roszak A, Jagodziński PP. Folate and choline metabolism gene variants and development of uterine cervical carcinoma. *Clin Biochem.* 2011;44:596-600.
119. Chatterjee K, Williamson AL, Hoffman M, Dandara C. CASP8 promoter polymorphism is associated with high-risk HPV types and abnormal cytology but not with cervical cancer. *J Med Virol.* 2011;83:630-636.
120. Hong Y, Miao X, Zhang X, Ding F, Luo A, Guo Y, Tan W, Liu Z, Lin D. The role of *P53* and *MDM2* polymorphisms in the risk of esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 2005;65:9582-9587.
121. Bhowmik A, Das S, Bhattacharjee A, Choudhury B, Naiding M, Deka S, Ghosh SK, Choudhury Y. *MDM2* and *TP53* Polymorphisms as Predictive Markers for Head and Neck Cancer in Northeast Indian Population: Effect of Gene-Gene and Gene-Environment Interactions. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015;16:5767-5772.
122. Enokida Y, Shimizu K, Kakegawa S, Atsumi J, Takase Y, Miyamae Y, Nagashima T, Ohtaki Y, Kaira K, Sunaga N, Yanagitani N, Yoshino R, Tsunekawa K, Igai H, Kamiyoshihara M, Usui K, Lezhava A, Tomizawa Y, Ishikawa T, Murakami M, Hayashizaki Y, Takeyoshi I. Single-nucleotide polymorphism (c.309T>G) in the *MDM2* gene and lung cancer risk. *Biomed Rep.* 2014; 2: 719-724.
123. Dong J, Ren B, Hu Z, Chen J, Hu L, Dai J, Jin G, Xu L, Shen H. *MDM2* SNP309 contributes to non-small cell lung cancer survival in Chinese. *Mol Carcinog.* 2011;50:433-438.
124. Smit EF, Burgers SA, Biesma B, et al. Randomized phase II and pharmacogenetic study of pemetrexed compared with pemetrexed plus carboplatin in pretreated patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2009;27:2038-45.
125. Lan G1, Lin L1, Chen X1, Chen L1, Chen X1. Correlation Between Methylenetetrahydrofolate Reductase (*MTHFR*) C677T Polymorphisms and

Pemetrexed Chemotherapy Efficacy/Toxicity in Non-Squamous Non-Small Cell Lung Cancer. *Med Sci Monit.* 2017;23:5683-5689.

126. Anders QS, Stur E, Agostini LP, Garcia FM, Reis RS, Santos JA, Mendes SO, Maia LL, Peterle GT, Stange V, Carvalho MB, Tajara EH, Santos M, Silva-Conforti AM, Louro ID. *MTHFR* C677T and A1298C polymorphisms as predictors of radiotherapy response in head and neck squamous cell carcinoma. *Genet Mol Res.* 2015;14:13105-9.

127. González-Moles MA, Ruiz-Ávila I, Gil-Montoya JA, Plaza-Campillo J, Scully C. β -catenin in oral cancer: an update on current knowledge. *Oral Oncol.* 2014;50:818-824.

128. Jarmalaitė S, Klezaitė V, Sužiedėlis K, Žvingila D. Molekulinės genetikos pratybos. 2008.

129. Simanavičienė V. Molecular diagnostics of human papillomavirus (HPV) and studies on hpv prevalence. Disertacija, 2017.

130. Gudleviciene Z, Smailyte G. Survival of patients with head and neck squamous cell carcinoma in association with human papillomavirus and p53 polymorphism. *Cent Eur J Med.* 2012;7:349-353.

131. Alsbeih GA, Al-Harbi NM, Bin Judia SS, Khoja HA, Shoukri MM, Tulbah AM. Reduced rate of human papillomavirus infection and genetic overtransmission of *TP53* 72C polymorphic variant lower cervical cancer incidence. *Cancer.* 2017;123:2459-2466.

132. Simanaviciene V, Gudleviciene Z, Popendikyte V, Dekaminaviciute D, Stumbryte A, Rubinaite V, Zvirbliene A. Studies on the prevalence of oncogenic HPV types among Lithuanian women with cervical pathology. *J Med Virol.* 2015;87:461-471.

133. Gudlevičienė Ž, Stumbrytė A, Juknė G, Simanavičienė V, Žvirblienė A. Distribution of human papillomavirus type 16 variants in Lithuanian women with cervical cancer. *Medicina.* 2015;51:328-35.

134. Didžiapetrienė J, Domža G, Drąsutienė G, Gudlevičienė Ž, Kazbarienė B, Šepetienė A, Valuckas KP. Žmogaus papilomos viruso infekcija, jos sukeliama patologija ir laboratorinė diagnostika. 2013;21-39.

135. Žilinskas K, Čigriejienė MV, Inčiūra A. Gimdos kaklelio vėžio diagnostika ir gydymo pagrindai. *Vaistų žinios.* 2002;4-29.

136. Alsbeih GA, Al-Harbi NM, Bin Judia SS, Khoja HA, Shoukri MM, Tulbah AM. Reduced rate of human papillomavirus infection and genetic overtransmission of *TP53* 72C polymorphic variant lower cervical cancer incidence. *Cancer.* 2017;123:2459-2466.

137. Wang S1, Lan X, Tan S, Wang S, Li Y. P53 codon 72 Arg/Pro polymorphism and lung cancer risk in Asians: an updated meta-analysis. *Tumour Biol.* 2013;34:2511-20.
138. Li W, Wang SS, Deng J, Tang JX. Association of p73 gene G4C14-A4T14 polymorphism and *MDM2* gene SNP309 with non-small cell lung cancer risk in a Chinese population. *Oncol Lett.* 2017;14:1817-1822.
139. Zhang Y, Bai Y, Zhang Y, Guan J, Chen L. The *MDM2* 309 T/G polymorphism is associated with head and neck cancer risk especially in nasopharyngeal cancer: a meta-analysis. *Onkologie.* 2012;35:666-670.
140. Hajiesmaeil M, Tafvizi F, Sarmadi S. The effect of methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms on susceptibility to human papilloma virus infection and cervical cancer. *Infect Genet Evol.* 2016;46:1-6.
141. Zhuo W, Zhang L, Zhu B, Ling J, Chen Z. Association of *MDM2* SNP309 variation with lung cancer risk: evidence from 7196 cases and 8456 controls. *PLoS One.* 2012;7:e41546.
142. Liu J, Zheng Y, Lei D, Liu D, Xu F, Jin T, Cao X, Zhao X, Yu X, Pan X. *MDM2* 309T>G polymorphism and risk of squamous cell carcinomas of head and neck: a meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2011;12:1899-903.

Duomenų bazės:

Genomo vieno nukleotido polimorfizmų duomenų bazė dbSNP

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>. Naudotasi 2018 m. vasario 15 d.

Genų duomenų bazė (GeneCards)

<https://genecards.weizmann.ac.il/v3/>. Naudotasi 2018 m. sausio 4 d.

PADĖKA

Esu labai dėkinga savo mokslinio darbo vadovei dr. Živilei Gudlevičienei už suteiktą galimybę dirbti laboratorijose ir įgyvendinti šio tyrimo idėją, pagalbą, diskusijas ir vertingas pastabas rengiant šią daktaro disertaciją.

Nuoširdžiai dėkoju visam Vilniaus Universiteto Gyvybės mokslų centro ir Nacionalinio vėžio instituto Biobanko kolektyvui už suteiktą visokeriopą pagalbą ir draugišką darbo aplinką.

Atskirai dėkoju kitiems bendradarbiams už produktyvų bendradarbiavimą: dr. Daivai Dabkevičienei už statistikos konsultacijas, Genovefai Garmienei už praktines metodines konsultacijas, Reginai Liudkevičienei už lietuvių kalbos redagavimą.

Dėkoju visiems pacientams, kurių plaučių ir gerklų audinio mėginiai buvo panaudoti šiame tyrime.

Esu labai dėkinga savo artimiesiems ir draugams už supratimą ir nuolatinį palaikymą.

Vilniaus universiteto leidykla
Universiteto g. 1, LT-01513 Vilnius
El. p. info@leidykla.vu.lt,
www.leidykla.vu.lt
Tiražas 20 egz.