

VILNIUS UNIVERSITY

Aušra

STUMBRYTĖ

Human papillomavirus and the gene
polymorphism involved in
tumorigenesis effects on laryngeal
and lung cancer patients survival

SUMMARY OF DOCTORAL DISSERTATION

Biomedical sciences,
Biology 01 B

VILNIUS 2018

The doctoral dissertation was prepared in 2013–2017 at the Vilnius University Life Sciences Center and the National Cancer Institute.

Scientific supervisor – Dr. Živilė Gudlevičienė (National Cancer Institute, biomedical sciences, biology – 01B, medicine - 06B).

The doctoral thesis will be defended at the public meeting of the Dissertation Defense Board.

Chairman – Prof. Habil. Dr. Juozas Rimantas Lazutka (Vilnius University, biomedical sciences, biology – 01B)

Members:

Prof. Dr. Sonata Jarmalaitė (Vilnius University, biomedical sciences, biology – 01B).

Prof. Dr. Kęstutis Sužiedėlis (Vilnius University, biomedical sciences, biochemistry– 04P).

Prof. Dr. Mindaugas Kliučinskas (Lithuanian University of Health Sciences, biomedical sciences, medicine – 01B).

Dr. Jolanta Vidugirienė (Promega Corporation, Madison, the USA, physical sciences, biochemistry – 04P).

The dissertation will be defended at the public meeting of the Dissertation Defense Board at 3 p.m. on the 26th of October 2018 in the Vilnius University Life Sciences Centre, auditorium R 403. Address: Saulėtekio avenua 7, Vilnius, Lithuania.

The summary of the doctoral dissertation was distributed on 26th of September, 2018.

The dissertation in full text is available at the library of Vilnius University and online on Vilnius University website:

<https://www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius>

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Aušra

STUMBRYTĖ

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

DAKTARO DISERTACIJOS SANTRAUKA

Biomedicinos mokslai,
biologija 01 B

VILNIUS 2018

Disertacija rengta 2013–2017 metais Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro Botanikos ir genetikos katedroje ir Nacionaliniame vėžio institute.

Mokslinė vadovė – dr. Živilė Gudlevičienė (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, biologija – 01 B, medicina – 06 B)

Disertacija ginama viešame disertacijos Gynimo tarybos posėdyje.

Pirmininkas – Prof. habil. dr. Juozas Rimantas Lazutka (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, biologija – 01 B).

Nariai:

Prof. dr. Sonata Jarmalaitė (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, biologija – 01B);

Prof. dr. Kęstutis Sužiedėlis (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, biochemija – 04P);

Prof. dr. Mindaugas Kliučinskas (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, medicina– 06B);

Dr. Jolanta Vidugirienė (Promega Korporacija, Madisonas, JAV; fiziniai mokslai, biochemija – 04P).

Disertacija ginama viešame Gynimo tarybos posėdyje, kuris vyks 2018 m. spalio 26 d. 15 val. Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centre, R. 403 auditorijoje.

Adresas: Saulėtekio al. 7, Vilnius, Lietuva.

Disertacijos santrauka išsiųsta 2018 m. rugsėjo 26 d.

Disertacija galima peržiūrėti Vilniaus universiteto bibliotekoje ir Vilniaus universiteto internetinėje svetainėje adresu:

<https://www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius>.

INTRODUCTION

Lung cancer, its diagnosis and treatment are relevant problems in oncology. Lung cancer is one of the most common oncological diseases not only in Lithuania, but also worldwide. According to the World Health Organization (WHO) in 2012, the incidence of lung cancer was 1.8 million, accounting for about 12.7% of all diagnosed cancer cases. The death rate was 1.59 million cases (18.2 %). The Data from the National Cancer Institute (NVI) Cancer Registry demonstrated similar trends - morbidity in 2012 reached 1421 new cases (8 % of all diagnosed cases of cancer), which resulted in 1355 deaths (16.97 %).

Laryngeal cancer is one of the most common head-neck malignant tumors. Laryngeal cancer is the 20th in the structure of oncological diseases, with 151,000 new cases of this disease being diagnosed and 90,000 deaths annually in the world. Despite the fact that the main risk factors for the disease are tobacco smoking and alcohol consumption, it cannot be excluded that infectious pathogens such as human papillomavirus (HPV) infection could contribute as a carcinogenic factor.

HPV infection has been shown to be one of the main intraepithelial cervical cancer changes and cancer risk factors. The role of HPV in laryngeal cancers is also extensively studied. Viral infection in these tumors usually is transmitted via a direct contact. However, it is believed that HPV is not limited to spread via a direct contact only (most often by sexual contact), but also via a hematogenous and air droplet pathways, thus reaching deeper tissues, for example, lung tissue cells.

In order to determine the process of laryngeal and lung carcinogenesis which might be potentially affected by active HPV genes, the search for gene candidates was performed by cluster analysis. The analysis combined clinical-pathological data from medical documentation, HPV infection, and the linkage between

single-nucleotide polymorphism (SNPs) associated with this infection in order to determine the long-term survival determinants of patients.

1. AIM OF DISSERTATION

The aim of the study was to evaluate the relationship between HPV infection and gene *TP53*, *MDM2*, *MDM4*, *MTHFR*, *CASP8* and *CCR5* SNP frequencies and clinical-pathological parameters, and their relevance to the survival of patients with laryngeal and lung cancers

2. OBJECTIVES OF THE DISSERTATION

1. To determine HPV infection in patients with cervical cancer, laryngeal and lung cancer.
2. To evaluate the frequencies of *TP53*, *MDM2*, *MDM4*, *MTHFR*, *CASP8*, *CCR5* in the test samples and the association with clinical-pathological data from patients.
3. To determine the survival dependence of laryngeal and lung cancer patients based on the molecular markers.
4. Selection of potential prognostic markers for assessing the course of the disease in patients with laryngeal and lung cancer.

3. RELEVANCE AND SCIENTIFIC NOVELTY OF THE RESEARCH

During this study, the cluster analysis aimed to evaluate the active genes of the cervical cancer, laryngeal and lung carcinogenesis process and their interactions with HPV infection. The prevalence of HPV in cervical cancer remained unchanged compared with the data of previous Lithuanian researchers and are equal to 74.2 % for invasive and 85.6 % for non-invasive cancer. For the first time in Lithuania, infection with HPV in lung cancer patients has been evaluated (3.3 %). 48.86% of laryngeal cancer patients were positive for HPV infection. Cluster analysis was performed of HPV infection,

the analyzed genes (*TP53*, *MDM2*, *MDM4*, *MTHFR*, *CASP8*, *CCR5*) SNP frequencies and survival dependence of SNPs and clinical-pathological analysis. Several combinations of SNPs, clinical-pathological data and HPV infection have been identified that are likely to affect the survival of the patients. The distribution of tumor cells to the regional lymph nodes, the *CASP8* ins/del and the negative HPV test, have been shown to be indicators of poor survival prediction in laryngeal cancer cases. *MDM2* T/T, non-proliferation of the tumor to the lymph nodes - served as a good survival prognosis in laryngeal cancer cases. The *MTHFR* gene C/T and the *MDM2* gene T/T combination can serve as a prognostic marker for the selection of primary patients for non-surgical treatment of lung cancer.

4. MATERIALS AND METHODS

The research was performed during doctoral studies at the Department of Botany and Genetics at the Biomedical Institute of Vilnius University Life Sciences Center and the National Cancer Institute (NVI). The project received a bioethical permission of the Lithuanian Biomedical Research Ethics Committee for biomedical research: 158200-13-638-204, with the addition of 2014-01-23.

Patients, selected to participate in the study, were chosen following the main criteria: patients who were diagnosed with cervical cancer, laryngeal or lung cancer for the first time and patients who underwent surgery as the first cancer treatment. The participants enrolled to the study signed Personal Information and Informed Patient Consent Forms. During the period from 2013 to 2015, 297 patients surgically treated in Oncogynecology Surgery, Chest Surgery and Oncology and Head-Neck and Skin Tumors Surgery departments were enrolled.

The study evaluated the relationship between HPV, selected genomic SNPs and clinical-pathological data and the survival rate of laryngeal and lung cancer patients. The patient's cancer data (tumor stage, degree of differentiation, TNM, disease progression and patient

survival rates) and lifestyle data (age, tobacco smoking, alcohol consumption) were collected and analyzed during the study. At the beginning the clinical-pathological data were evaluated for patients with laryngeal and lung cancer, and then patients were divided into groups based on the clinical-pathological data obtained from medical records. All collected biological samples were tested for HPV infection. Later, SNPs of selected genes were determined by PCR, RT-PCR and RFLP. Subsequently, all parameters were evaluated and overall analysis was performed in order to determine the interrelationships between the parameters and the importance of patient survival indicators and the prognosis of the course of the disease.

5. RESULTS AND DISCUSSION

5.1. HPV infection in the cervical cancer, laryngeal and lung tumor tissues

The role of HPV infection in the process of carcinogenesis in the cervix has a clear pattern and a proven carcinogenicity, but the role of HPV in other tissues of carcinogenesis remains elusive. According to the different authors sources in cervical cancer cases HPV infection is found up to 100 %. From 66 tested CC specimens 74.2% of specimens ($n = 49$) were found to be HPV DNA positive. In CIS group 85.6% of specimens ($n = 77$) were HPV DNA positive ($p = 0.08$). After HPV typing the most prevalent HPV type was found to be HPV 16 in both groups of patients. In CC group HPV 16 was confirmed for 48.5 % of patients ($n = 32$), in CIS group – for 50.0 % of patients ($n = 45$) ($p = 0.85$). The European HPV 16 L83V variant is usually associated with high risk of cervical cancer among women. A link between the HPV and laryngeal carcinogenesis process is based on the morphological similarity of the squamous epithelium of the larynx to the cervical transitional epithelium, which is favorable for the spread of the virus. According to the literature, HPV infection in the case of

laryngeal cancer is found to be between 3 % to 85 %¹ of all cases. However, the meta-analysis by Gama and co-authors covering 7347 cases from 179 studies conducted in different geographic regions has shown somewhat lower limits on the prevalence of HPV in laryngeal cancer. Studies have shown that the incidence of HPV infection varies from 20 % to 30 %² in laryngeal cancer. In this study the rate of HPV infection in the tissues was detected in 42.86 % of laryngeal cancer patients. The rate of infection with HPV infected in our study was greater than was observed in the previous studies in Lithuanian population. In the previous studies, the incidence of HPV infection was reported to be 20.9 %³ and 30.8 %⁴.

The first evidence of possible association between HPV infection and bronchial lesions was published by Rubel and Reynolds⁵. Syrjänen with co-authors in 1979 raised the idea that HPV infection may be one of the risk factors for lung carcinogenesis⁶. Recent studies suggest that HPV infection in lung cancer can reach 78 %, according to Hsu and co-authored studies, HPV infection in developed countries is 36 %, while in Asia it is 9-78 %⁷. Ahmadi and co-authors conducted a meta-analysis covering 14 studies and found 16 % HPV infection in 413 cases. A meta-analysis by Xiong and co-authors, covering 6980 cases of lung cancer from 17 different countries, showed that the HPV infection rate in the populations tested was 3.64 %⁹. Previously, Hasegawa and co-authors studied non-smokers and have revealed the inter-boundary differences between HPV infection and lung cancer. In the Asian countries, the prevalence was 28.1 %, in Europe - 8.4 %, in the North and South Africa - 21.3 %¹⁰. The prevalence of HPV in this study in lung cancer patients was 3.3 %.

Thus, in our study, HPV infection has a more pronounced role in cervical cancer (74.2-85.6 %) and larynx (42.9 %) in carcinogenesis. The development of lung cancer is mostly influenced by other risk factors, and HPV infectivity was the lowest (3.3 %).

5.2. *TP53*, *MDM2*, *MDM4*, *MTHFR*, *CASP8* and *CCR5* SNP frequencies associated with clinical-pathological characteristics

In this study, *MDM2* G/G and *MTHFR* T/T variants were only identified for patients who were diagnosed with stage III-IV laryngeal cancer, these SNPs were not typical for early stages of laryngeal cancer. According to a study by Hong with co-authors, SNP of *MDM2* G/G is associated with poor tumor cell differentiation and advanced laryngeal cancer stages¹¹. Bhowmik and co-authors study showed that patients with G/G polymorphism have a higher risk of laryngeal cancer than wild type T/T variants, among women the risk was found to even 4 times greater, with a 5-fold higher risk for *TP53* Arg/Pro and the combination of polymorphic variants of *MDM2* G/G¹².

In this study, the *MDM2* G/G variant for women with lung cancer was found to be higher in women (18.8 %) than in men (18.8 % and 4.0 %) respectively. By analyzing the links between SNPs of the tested genes and N, a relationship was established between the *MDM2*, *CASP8*, *CCR5* genes, and the spread of the tumor to the regional lymph nodes. Patients with laryngeal tumor cells spread to the lymph nodes, were mostly identified with *MDM2* T/G (62.5 %), *CASP8* ins/del (50.0 %), and *CCR5* wt/wt (81.3 %) polymorphic variants.

5.3. *TP53*, *MDM2*, *MDM4*, *MTHFR*, *CASP8* and *CCR5* gene SNPs, clinical-pathological data association for laryngeal and lung cancer patient survival rates

The results of the analysis showed that the evaluation of clinical parameters - N value for patient survival, had a significant influence on the distribution of laryngeal tumor into lymph nodes ($p = 0.007$). The results of the analysis of the SNP association of the investigated genes with the size of the primary tumor and the results of infiltration into adjacent organs showed that in the presence of tumor to adjacent organs (N1-2), *MTHFR* C/T SNP was most

commonly determined, but the relationship was not statistically significant ($p = 0.21$). In the case of lung cancer, there were no statistically significant correlations found between SNPs and clinical parameter.

The analysis of the survival of patients with laryngeal cancer did not show statistically significant differences, however, patients with *MDM2* gene T/T variants at the end of the follow-up were 65.6 % while the survival rates of T/G patients were 46.0 %. It should be noted that Enokida and co-authors found that the survival of patients with stage I lung cancer with *MDM2* T/T genotype was significantly shorter than that of patients with T/G or G/G genotypes ($p = 0.02$)¹³. In another study, Dong and co-authors found that *MDM2* G/T and T/T genotypes are associated with significantly worse survival¹⁴. Association of patient survival differences were also found for *MTHFR* variants: survival rates in patients with T/T variant at the end of the study was 80.0 %, C/T was 54.0 %, and in the case of C/C was 43.5 %. These results indicate that the SNPs of the examined genes could serve as a prognostic marker for the assessment of the course and prognosis of patients with laryngeal cancer, but more extensive monitoring and covering different populations are needed.

5.4. Survival values depending on the SNPs of tested genes of the lung cancer

According to some authors, the homozygous SNP of the *MTHFR* gene 677 is associated with improved survival without progression compared to patients with a wild type or heterozygous SNPs^{13,14}. The results of this study showed that the survival of patients with SNP of *MTHFR* C/C was 62.7 % and in C/T-patients 42.0 % ($p = 0.17$). At the end of our study, survival rates were more than 10 % among patients diagnosed with Stage I-II and identified as *CASP8* ins/ins (70.6 %), ins/del (53.0 %) ($p = 0.33$) and patients with stage III-IV diagnosis and *CCR5-Δ32* SNP: wt/wt (26.5 %) and wt/Δ32 (46.3 %) ($p = 0.33$). The results of this study showed different survival

trends in patients with lung cancer, depending on SNPs, but the results were not statistically significant. These results also indicate that the SNPs of the examined genes may be a prognostic marker for the assessment of the disease course and disease prognosis, but more investigation is needed.

5.5. Patient survival cluster analysis depending on the examined genes SNP

In the laryngeal cancer group, after the cluster analysis, patients with *MDM2* T/T variants were found to have the best survival rates, the group was evaluated as the longest survived compared to other variants tested. Meanwhile, in the case of lung cancer, there were several variants that had the lowest mortality rates: *CCR5* wt/ Δ 32, *MDM2* T/G, *MTHFR* C/T, *CASP8* ins/del. A mortality analysis showed that *MTHFR* C/C SNP was identified in both lung and laryngeal cancer patients with the highest mortality. It is important to note that, according to Andres and co-authors studies, the presence of at least one T allele has better survival rates¹⁵, and our results confirmed the previously published findings.

5.6. Analysis of *TP53*, *MDM2*, *MDM4*, *MTHFR*, *CASP8* and *CCR5* SNPs and the combination of HPV and association with survival

A total analysis of patients with laryngeal cancer incidence including clinical-pathological parameters, SNPs combinations, and HPV infection revealed a few trends and possible combinations that could determine patient survival rates. Patients with a combination of tumor cells in the regional lymph nodes and the *CASP8* ins/del variant and who did not have HPV infection survived for up to 600 days and 430 days after the start of the study, survival rates in this group were only 16.6 % ($p = 0.006$) (Fig. 1A). The combination of *CASP8* ins/del variant for patients without tumor tissue progression to the regional lymph nodes, and positive HPV infection, at the end of the study was

approximately 60.0 % ($p = 0.24$) (Fig. 1B). Consequently, as most authors point out, survival of the HPV positive individuals was better compared to unaffected patients, apparently due to HPV-derived tissue susceptibility to anti-tumor therapy. In a multivariate analysis, another combination was identified that may determine good survival rates. Patients who were identified with gene *MDM2* T/T variants, and whose tumor cells did not spread to regional lymph nodes (N1-2), showed better survival compared to other patients. About 80 % of patients who were identified with this combination survived for more than 4.5 years, and all patients lived for at least 23 months ($p = 0.01$).

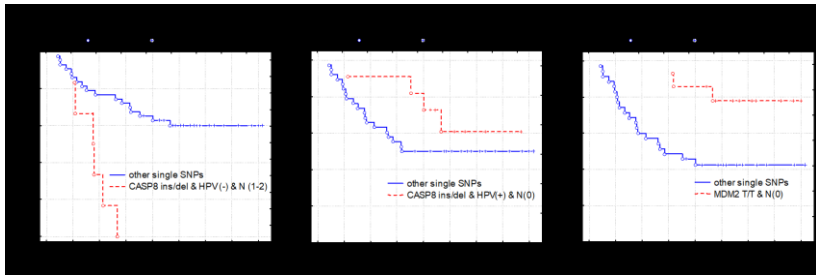


Fig. 1. Estimated survival prognostic values (good and poor prognosis) of laryngeal cancer patients according to investigated factors

Kaplan-Meier estimator: **A** – survival of the patients, who were identified to harbour *CASP8* ins/del variants, with metastasis in lymph nodes N (1-2) ir HPV (-) ($p = 0,006$); **B** – *CASP* ins/del, N (0) ir HPV (+) ($p = 0.245$); **C** – *MDM2* gene T/T ir N (0) ($p = 0.01$).

A cluster analysis of lung cancer patients showed that the worst survival could be due to SNPs of cluster I: *MDM4* A/A, *CCR5* wt/ Δ 32, *MTHFR* C/T, *MDM2* T/T. The results indicate that in patients undergoing monitoring, there is a decrease in the number of survived patients who were diagnosed with stage III-IV and the C/T polymorphism of the *MTHFR* gene ($p = 0.12$). A similar situation was observed in patients with late-stage lung cancer and *MDM2* T/T

variant ($p = 0.11$). Such endpoint monitoring results could be associated with worse patient survival at the very first stage of the disease. Therefore, it is worthwhile to check the importance of these genes during the first stages of the disease and in the initial stages of treatment - after surgery. Survival results showed that patients who were identified with the combination of polymorphic variants of the *MTHFR* gene C/T and the *MDM2* gene T/T died immediately after the surgery ($p = 0.04$) (Fig. 2A). Therefore, this combination of SNPs can serve as a prognostic marker for the selection of patients for a different, rather than primary, surgical treatment for lung cancer.

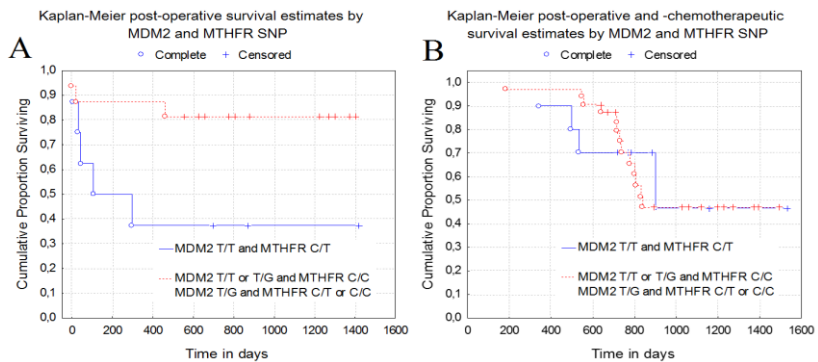


Fig. 2. Lung cancer patients survival dependence on identified SNP combinations

Kaplan-Meier estimator: **A** – patients harbouring *MTHFR* gene C/T and *MDM2* gene T/T SNP combination was found to lower survival after surgery ($p = 0.04$); **B** – *MTHFR* gene C/T and *MDM2* gene T/T SNP combination was not affecting survival after chemotherapy or other therapy ($p = 0.96$). Individual SNPs did not show significant impact on patient survival after surgery: *MDM2* T/T ($p = 0.49$), *MTHFR* C/T ($p = 0.38$).

Meanwhile, there was no significant difference observed in survival of individual SNPs in lung cancer after operation: *MDM2* T/T ($p = 0.49$), *MTHFR* C/T ($p = 0.38$). After the operation and chemotherapy and/or other therapies for patients with lung cancer, the

combination of *MDM2* T/T, *MTHFR* C/T had no significant effect on the survival compared with other combinations of polymorphic variants of genes *MDM2*, *MTHFR* ($p = 0.96$). Patients undergoing surgery who had combination of *MDM2* T/T, *MTHFR* C/T had a survival rate of 37.5 % for one year, and patients with the same combination of SNPs who received chemotherapy - 90.0 %, the survival rates at the end of the study were 37.5 % and 50.0 % respectively. According to Liu and co-authored studies, the survival of patients with lung cancer patients with *TP53* Pro/Pro-*MDM2* G/G genotypes at the end of the observation was twice as short as those with other combinations of these genes SNPs¹⁸.

6. CONCLUSIONS

- a. In the groups of patients differences were determined according to prevalence of HPV infection in the cervical, laryngeal and lung cancer (74.2-85.6 %, 42.86 % and 3.3 % respectively) and it was dominated by type 16 HPV.
 - b. In laryngeal cancer cases *MDM2* T/G, *CASP8* ins/del, *CCR5* wt/wt SNPs were found to be prognostic markers for the evaluation of the tumor spread to the lymph nodes and the progression of the disease;
 - c. Tumor cell proliferation in regional lymph nodes, SNP of *CASP8* ins/del and negative HPV test – were identified as a poor survival prediction sign in laryngeal cancer cases;
 - d. SNP of *MDM2* T/T, non-proliferation of the tumor in the lymph nodes – were identified as a good survival prediction sign in cases of laryngeal cancer;
7. The combination of genes SNPs *MTHFR* C/T and *MDM2* T/T could serve as a prognostic marker for the selection of primary patients for non-surgical treatment of lung cancer.

7. PRACTICAL RECOMMENDATIONS

1. Combination of tumor cells spreading to regional lymph node, *CASP8* ins/del SNP and negative HPV tests and *MDM2* T/T SNP together with local tumor progression without spread to lymph nodes, as a good and bad prognosis factors, application in clinical practice.
2. Combination of *MTHFR* gene C/T and *MDM2* gene T/T SNP application as a prognostic biomarker for additional post surgery treatment practice.

CURRICULUM VITAE

Name	Aušra Stumbrytė	
Date and place of birth	1986 07 23, Vilnius Lithuania	
Professional address	Faculty of Natural Sciences Vilnius University Saulėtekio al. 7, Vilnius, LT-10257, Lithuania Phone: +3705 2234435	Biobank, National Cancer Institute P. Baublio str. 3b, Vilnius, LT-08406, Lithuania Phone: +3705 2190909
E-mail	ausra.stumbryte@gf.stud.lt,	ausra.stumbryte@nvi.lt.
Educational background		
2012-2018	Junior Research Associate Biobank, National Cancer Institute	
Internships		
2014-11-11- 12-01	International Agency of Research on Cancer, IARC, Lyon, France. Aim: Human papillomavirus infection detection in head-neck and lung cancer.	

8. SUMMARY OF THE DISSERTATION IN THE LITHUANIAN LANGUAGE

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. Mirtingumas 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), dėl ko fiksuota 1355 mirčių (16,97 %).

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 tabakas 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 intraepitelinių gimdos kaklelio ikivėžinių pokyčių ir vėžio rizikos veiksnių. ŽPV vaidmuo gerklų vėžio atveju taip pat yra plačiai tyrinėjamas. Užsikrėtimas virusu šių navikų atvejais yra tiesioginio kontakto būdu. Tačiau manoma, kad ŽPV gali plisti ir hematogeniniu bei oro lašelinio būdu, taip pasiekdamas ir giliau esančių organų, pvz. plaučių audinių ląsteles.

Siekiant nustatyti gerklų ir plaučių kancerogenezės proceso, kurį galimai veikia ŽPV, veikiančiuosius genus, atlikta genų kandidatų paieška klasterinės analizės būdu. Šios analizės dėka apjungiami klinikiniai-patologiniai duomenys iš paciento ligos istorijos, ŽPV infekcijos ir su šia infekcija susijusių genų vieno nukleotido polimorfizmo (VNP) sąsajos, siekiant nustatyti ilgesnį pacientų išgyvenamumą lemiančius veiksnius.

DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI

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.

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 molekulinųjų žymenų.
4. Atrinkti potencialius prognostinius žymenis gerklų ir plaučių vėžiu sergančių pacientų ligos įvertinimui.

MOKSLINIS NAUJUMAS

Tyrimo metu, klasterinės analizės būdu, buvo siekiama įvertinti ne tik ŽPV sąveiką plačiai tyrinėto gimdos kaklelio, gerklų ir plaučių kancerogenezeje, bet ir šiame procese veikiančiuosius genų polimorfizmus. ŽPV paplitimas gimdos kaklelio vėžio atveju išliko nepakitęs lyginant su ankstesnių Lietuvos tyrėjų duomenimis ir siekė 74,3 % invazinio bei 85,6 % neinvazinio vėžio atvejais, gerklų vėžio – 42,86 %. Tuo tarpu 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 limfinus mazgus, *CASP8* ins/del VNP ir ŽPV nebuvimas navikiniame audinyje – blogos išgyvenamumo prognozės žymenų derinys gerklų vėžio atvejais. Tuo tarpu *MDM2* T/T VNP, naviko neplitimas į limfinius mazgus – geros išgyvenamumo prognozės žymenys gerklų vėžio atvejais. *MTHFR* geno C/T ir *MDM2* geno T/T VNP derinys gali būti prognostinis žymuo, operacinio ar konservatyvaus gydymo taktikai parinkti plaučių vėžio atvejais.

TYRIMO METODAI

Tyrimas atliktas doktorantūros studijų metu Vilniaus Universiteto Gyvybės mokslų centro Botanikos ir genetikos katedroje ir Nacionaliniame vėžio institute (NVI). Darbas pradėtas rengti gavus Lietuvos biomedicininį tyrimų etikos komiteto leidimą biomedicininiam tyrimui NVI atlikti: 158200-13-638-204, su papildymu 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 patologų Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų filiale Valstybiniame patologijos centre. Naviko medžiaga moksliniam tyrimui buvo atidalinta patologų ir perduota saugojimui 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.

Tyrimo metu buvo vertinta ŽPV, atrinktųjų genų VNP ir klinikinių-patologinių duomenų sąsajos bei reikšmė gerklų ir plaučių vėžiu sergančiųjų pacientų išgyvenamumui. Tyrimo metu kaupti bei analizuoti paciento ligos (naviko stadija, diferenciacijos laipsnis, TNM, ligos progresavimo ir paciento išgyvenamumo rodikliai) ir gyvenimo duomenys (amžius, nikotino, alkoholio vartojimo

laikotarpis). Pirmiausia buvo atliktas ŽPV infekcijos tyrimas, pagal kurio rezultatus pacientai buvo skirstomi į grupes. Įvertinus mokslinės literatūros duomenis, ŽPV ir daugelio genų VNP buvo plačiai ištyrinėti mokslininkų visame pasaulyje gimdos kaklelio vėžio atvejais, todėl tolesniems VNP tyrimams buvo atrinkti tik gerklų ir plaučių vėžiu sergantys pacientai (141 pacientas). Pastariesiems 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 išgyvenamumą). Visi surinkti pacientų biologiniai ėminiai pirmiausia buvo ištyti dėl infekcijos. Vėlesniame etape buvo atlikti numatytųjų genų VNP tyrimai. Toliau buvo atliktas visų parametru vertinimas bei visuminė analizė siekiant nustatyti tirtųjų parametru tarpusavio sąsajas bei reikšmę pacientų išgyvenamumo rodikliams bei ligos eigos prognozei.

REZULTATŲ APIBENDRINIMAS

ŽPV infekcija gimdos kaklelio, gerklų ir plaučių navikiniame audinyje.

ŽPV infekcijos vaidmuo gimdos kaklelio kancerogenezės procesui turi aiškų modelį ir įrodytą kancerogeniškumą, tačiau atliekami tyrimai 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 yra 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 %¹. Tačiau Gama ir bendraautorių atlikta meta-analizė 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 %². Šio tyrimo metu gerklų vėžiu sergančiųjų pacientu tarpe ŽPV infekcijos dažnis siekė 42,86 %. Mūsų tyrimo metu nustatytas ŽPV infekcijos dažnis didesnis nei buvo nustatytas ankstesnių tyrimų Lietuvoje metu. Ankstesniuose tyrimuose ŽPV infekcijos dažnis siekė 20,9 %³ ir 30,8 %⁴.

Pirmieji įrodymai, kad galimas ryšys tarp ŽPV infekcijos ir bronchų pažeidimų buvo paskelbti Rubel ir Reynolds⁵. Syrjänen su bendraautoriais 1979 m. iškėlė idėją, kad ŽPV infekcija gali būti vienas rizikos veiksnių, susijusių su plaučių kancerogenezės procesu⁶. 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 %⁷. Ahmadi su bendraautoriais atlikta meta-analizė apimanti 14 tyrimų ir 413 atvejų parodė 16 % infekuotumą ŽPV⁸. Xiong ir bendraautorių atlikta meta-analizė, apimanti 6980 plaučių vėžio atvejus iš 17 skirtingų šalių, parodė, kad ŽPV infekcijos dažnis tirtose populiacijose siekia 3,64 %⁹. Kiek ankstesni, Hasegawa ir bendraautoriai tyrimai atlikti su niekada nerūkiusiais 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 %¹⁰. Šiame tyrime nustatytas ŽPV paplitimas plaučių vėžiu sergančiųjų pacientų tarpe buvo 3,3 %.

TP53, MDM2, MDM4, MTHFR, CASP8, CCR5 VNP dažnių sąsajos su klinikinėmis – pataloginėmis 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. Pagal Hong su bendraautorais atlikto tyrimo duomenis, *MDM2* G/G VNP siejamas su bloga navikinių ląstelių diferenciacija ir pažengusiomis gerklų vėžio stadijomis¹¹. Bhowmik ir bendraautorai atliktu tyrimu parodė, kad pacientams, turintiems G/G polimorfinį variantą gerklų vėžio rizika yra didesnė nei esant laukinio tipo variantui T/T, moterų tarpe ši rizika yra net 4 kartus didesnė, 5 kartus didesnė rizika nustatyta esant *TP53* Arg/Pro ir *MDM2* G/G polimorfinių variantų kombinacijai¹².

Šio tyrimo metu nustatyta, kad plaučių vėžiu sergančioms moterims *MDM2* G/G variantas buvo nustatytas dažniau nei vyrams (18,8 % ir 4,0 %) atitinkamai. Analizuojant tirtųjų genų VNP sąsajas su N, nustatytas ryšys tarp *MDM2, CASP8, CCR5* genų ir naviko išplitimo į regioninius limfinius mazgus. Pacientams, kuriems nustatytas gerklų navikinių ląstelių išplitimas į limfinius mazgus, dažniausiai buvo identifikuoti *MDM2* T/G (62,5 %), *CASP8* ins/del (50,0 %), *CCR5* wt/wt (81,3 %) polimorfiniai variantai.

Genų *TP53, MDM2, MDM4, MTHFR, CASP8, CCR5* VNP, klinikinių–patologinių duomenų sąsajos su plaučių ir gerklų vėžiu sergančiųjų pacientų išgyvenamumo rodikliais.

Atliktos analizės duomenimis vertinant klinikinių parametru – N vertę pacientų išgyvenamumui, reikšmingą įtaką turėjo gerklų naviko išplitimas į limfinius mazgus ($p = 0,007$). 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.

Atlikta gerklų vėžiu sergančiųjų pacientų išgyvenamumo analizė statistiškai patikimų skirtumų neparodė, tačiau pacientų, kuriems identifikuoti *MDM2* genų T/T variantai išgyvenamumo stebėjimo pabaigoje siekė 65,6 %, tuo tarpu 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, išgyvenimas buvo žymiai trumpesnis nei T/G ar G/G genotipų turinčių pacientų ($p = 0,02$)¹³. Kitame tyrime Dong ir bendraautorai nustatė, kad *MDM2* G/T ir T/T genotipai yra susiję su žymiai blogesniu išgyvenimu¹⁴. Taip pat nustatyti pacientų išgyvenamumo skirtumai esant *MTHFR* VNP: išgyvenamumo rodikliai pacientams, kuriems identifikuotas T/T variantas stebėjimo pabaigoje siekė 80,0 %, C/T – 54,0 %, o C/C atveju – 43,5 %. Tokie rezultatai rodo, kad tirtųjų genų VNP gali būti prognostiniu 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 be progresavimo, lyginat su pacientais kuriems identifikuotas laikinis tipas ar heterozogotinis VNP^{13,14}. 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 tendencijas priklausomai nuo VNP, tačiau rezultatai nebuvo statistiškai reikšmingi. Tokie rezultatai taip pat rodo, kad tirtųjų genų VNP gali būti prognostiniu 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, po atliktos klasterinės analizės, geriausiai išgyvenamumo rodikliais pasižymėjo pacientai, kuriems identifikuoti *MDM2* T/T variantai, ši grupė buvo vertinama kaip ilgiausiai išgyvenusiųjų tarp tirtųjų variantų. Tuo tarpu 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, kurių mirtingumas buvo didžiausias, buvo identifikuotas *MTHFR* C/C VNP. Svarbu pažymėti, kad Andres ir bendraautorių atlikto tyrimo duomenimis bent vieno T alelio buvimas lemia geresnius išgyvenamumo rodiklius¹⁵, o mūsų gautieji rezultatai tik patvirtina tokius duomenis.

TP53, *MDM2*, *MDM4*, *MTHFR*, *CASP8*, *CCR5* VNP ir ŽPV derinio analizė bei sąsąją su išgyvenamumu paieška.

Gerklų vėžiu sergančiųjų 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 limfinius mazgus ir *CASP8*

ins/del variantu 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 limfinius mazgus, *CASP8* ins/del variantu 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, matomai dėl ŽPV paveikto audinio imlumo antinavikinei terapijai. Atliekant daugiaveiksę analizę, buvo nustatytas dar vienas derinys, galimai lemiantis gerus išgyvenamumo rodiklius. Pacientai, kuriems buvo identifikuoti *MDM2* T/T variantai ir kuriems navikinės ląstelės nebuvo išplitę į regioninius limfinius mazgus (N1-2) pasižymėjo geresniu išgyvenamumu, lyginant su kitais pacientais. Apie 80 % pacientų, kuriems buvo identifikuota šis derinys išgyveno ilgiau nei 4,5 metų, o visi pacientai gyveno ne trumpiau 23 mėnesių ($p = 0,01$).

Plaučių vėžiu sergančiųjų pacientų tirtųjų genų klasterinė analizė parodė, kad blogiausią išgyvenamumą gali lemti I klasterio genų VNP: *MDM4* A/A, *CCR5* wt/ $\Delta 32$, *MTHFR* C/T, *MDM2* T/T. Gautieji rezultatai rodo, kad atliekant pacientų stebėseną, mažėja išgyvenusių pacientų, kuriems buvo diagnozuota III–IV stadija ir *MTHFR* geno C/T polimorfinis variantas ($p = 0,12$). Panaši situacija stebima 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, mire iš karto po atliktos operacijos ($p = 0,04$). Tuo tarpu 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, lyginant su kitais *MDM2*, *MTHFR* genų polimorfinių variantų deriniais ($p = 0,96$). Pacientai, kuriems buvo taikytas operacinis gydymas ir kurie turėjo *MDM2* T/T, *MTHFR* C/T derinį, vienerių metų išgyvenamumas siekė 37,5 %, o pacientams, turėjusiems tą patį VNP derinį ir kuriems buvo pritaikyta chemoterapija – 90,0 %, iki tyrimo pabaigos išgyvenamumas buvo atitinkamai 37,5 % ir 50,0 %. Pagal Liu su bendraautorais atliktus tyrimus, *TP53* Pro/Pro-*MDM2* G/G genotipų derinius turinčių, plaučių vėžiu sergančių, pacientų išgyvenimas stebėjimo pabaigoje buvo du kart trumpesnis nei pacientų, turinčių kitus šių genų VNP derinius¹⁶.

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), tirtose lokalizacijose dominavo 16 tipo ŽPV.
2. Gerklų vėžio atveju *MDM2* T/G, *CASP8* ins/del, *CCR5* wt/w VNP yra patikimi prognostiniai naviko plitimo į limfinius mazgus ir ligos progresavimo žymenys.
3. Navikinių ląstelių plitimas į regioninius limfinius mazgus, *CASP8* ins/del VNP ir neigiamas ŽPV testas – žymi blogą išgyvenamumo prognozę sergant gerklų vėžiu.
4. *MDM2* T/T VNP, naviko neplitimas į limfinius mazgus – geros išgyvenamumo prognozės žymenys gerklų vėžio atvejais.
5. *MTHFR* geno C/T ir *MDM2* geno T/T VNP derinys gali pasitarnauti predikciniu žymeniu, atrenkant pirminius pacientus konservatyviam plaučių vėžio gydymui.

9. PUBLICATIONS

ARTICLES PUBLISHED ON THE PRESENT RESEARCH FINDINGS:

1. Gudleviciene Z, Kanopiene D, **Stumbryte A**, Bausyte R, Kirvelaitis E, Simanaviciene V, Zvirbliene A. Integration of human papillomavirus type 16 in cervical cancer cells. Central European Journal of Medicine (IF=0,153). 2015;10:1-7.
2. Simanaviciene V, Gudleviciene Z, Pependikyte V, Dekaminaviciute D, **Stumbryte A**, Rubinaite V, Zvirbliene 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. Gudleviciene Z, **Stumbryte A**, Jukne G, Simanaviciene V, Zvirbliene A. Distribution of Human papillomavirus type 16 variants in Lithuanian women with cervical pathology. Medicina (Lithuanian) (IF= 0,77). 2015;51:328-335.
4. **Stumbryte A**, Gudleviciene Z, Kundrotas G, Dabkeviciene D, Kunickaite A, Cicenas 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.

Articles published in other peer-reviewed journals:

1. Kundrotas G, Gasperskaja E, Slapsyte G, Gudleviciene Z, Krasko J, Stumbryte A, Liudkeviciene R. Identify, proliferation capacity, genomic stability and novel senescence markers of mesenchymal stem cells isolated from low volume of human bone marrow. Oncotarget (IF=6,36). 2016;7:10788-10802.

10. PRESENTATIONS

SCIENTIFIC PRESENTATIONS ON THE THEME OF THE DISSERTATION:

1. Association of HPV frequencies and genes polymorphisms in various cancers. **Stumbryte A**, Gudleviciene Z, Mazul J, Jankauskaite EA. Global Virus network Conference „Global Virus Network conference of virologists for the Scandinavia-Baltic-Ukraine region”. 2014 06 11-13. Laulasmaa, Estonia.
2. Frequencies of HPV infection, p53 and *MDM2* polymorphisms in laryngeal cancer. Mackeviciene I, Gudleviciene Z, **Stumbryte A**. International Symposium on HPV infection in Head and Neck Cancer. 2014 12 13-14. Poznań, Poland.
3. Interaction of HPV and gene polymorphisms in breast and lung cancerogenesis. **Stumbryte A**, Gudleviciene Z, Jankauskaite EA, Mazul J. The 6th Baltic Congress of Oncology. 2014 10 3-4. Vilnius.
4. HPV related research at the National Cancer Institute in Lithuania. **Stumbryte A**. International Agency of Research on Cancer, IARC. 2014 11 11-12 01. Lyon, France.
5. HPV DNA detection in lung cancer patients. **Stumbryte A**, Gudleviciene Z. 30th Annual International Papillomavirus Conference. 2015 09 17-21. Lisbon, Portugal.
6. Combined Effect of HPV and SNPs of *TP53*, *MDM2*, *MDM4*, *MTHFR*, *CASP8* Genes in Lung Cancer. **Stumbryte A**, Plioplyte R, Kunickaite A, Gudleviciene Z. Conference of Natural and Life sciences (COINS). 2016 02 29 – 03 03. Lietuva (Vilnius).
7. Association of *P53*, *MDM2* and *MDM4* polymorphysm in breast cancer cases as new possibilities for cancer target therapy. **Stumbryte A**, Plioplyte R, Jankauskaite EA, Liudkeviciene R, Garmiene G, Gudleviciene Z. 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 04 05. Warsaw, Poland.
8. Distribution of HPV infection and various genes polymorphisms in laryngeal cancer. Kunickaite A, **Stumbryte A**, Simanaviciene V, Juskeviciute E, Gudleviciene Z. 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 04 05. Warsaw, Poland.
 9. Combined effect of HPV and genetic polymorphisms in *TP53*, *MDM2*, *MDM4*, *MTHFR*, *CASP8*, *CCR5* in Lung cancer. Kunickaite A, **Stumbryte A**, Gudleviciene Z, Dabkeviciene D, Liudkeviciene R, Garmiene G, Cicenas S. International conference of Life Sciences – COINS. 2017 02 28 – 03 02. Vilnius.
 10. Combined effect of HPV and genetic polymorphisms in *TP53*, *MDM2*, *MDM4*, *MTHFR*, *CASP8*, *CCR5* in Laryngial cancer. **Stumbryte A**, Kunickaite A, Olendraite U, Gudleviciene Z, Mackeviciene I, Bunikis A. International conference of Life Sciences – COINS. 2017 02 28 – 03 02. Vilnius.
 11. Combined effect of HPV and genetic polymorphisms in *TP53*, *MDM2*, *MDM4*, *MTHFR*, *CASP8*, *CCR5* in Lung cancer. Kunickaite A, **Stumbryte A**, Gudleviciene Z, Dabkeviciene D, Liudkeviciene R, Garmiene G, Cicenas S. 60TH International conference for students of physics and natural sciences „Open Readings”. 2017 03 14-17. Vilnius.
 12. Detection of Human Papillomavirus in Lung Metastasis Case. Mironova J. Gudleviciene Z, **Stumbryte A**. Bialystok International Medical Congress for Young Scientists. 2017 04 20-22. Bialystok, Poland.
 13. Papillomavirus in Lung Metastasis Case. Mironova J, Gudleviciene Z, **Stumbryte A**. 13 th Warsaw international medical congress for young scientists. 2017 05 11-14. Warsaw, Poland.

14. Study on clinicopathological and genetical factors associated with biochemical recurrence of prostate cancer after radical prostatectomy. Ladukas A, Kincius M, **Stumbryte A**, Ulys A, Smailyte G, Gudleviciene Z. EAU. 2017 05 26. Vilnius.

11. REFERENCES

1. 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.
2. 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.
3. Simanavičienė V. Molecular diagnostics of human papillomavirus (HPV) and studies on hpv prevalence. *Disertacija*, 2017.
4. 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.
5. 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.
6. Syrjänen K. Detection of human papillomavirus in lung cancer: systematic review and meta-analysis. *Anticancer Res*. 2012;32:3235-3250.
7. Hsu NY, Lee H, Yen Y, Cheng YW. Human papillomavirus and non-small cell lung cancer. *Thorac Cancer*. 2013;4:345-353.
8. 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.

9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.

16. 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.

Vilniaus universiteto leidykla
Universiteto g. 1, LT-01513 Vilnius
El. p. info@leidykla.vu.lt,
www.leidykla.vu.lt
Tiražas 40 egz.