

Lek. Piotr Machczyński

Analiza kliniczno-patologiczna raków płaskonabłonkowych części ustnej gardła w aspekcie infekcji wirusem brodawczaka ludzkiego HPV

Rozprawa na stopień naukowy doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne

Promotor: prof. zw. dr hab. n. med. Wojciech Golusiński
Promotor pomocniczy: dr n. med. Ewa Majchrzak



Kolegium Nauk Medycznych
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Poznań, 2022

WYKAZ SKRÓTÓW UŻYWANYCH W TEKŚCIE:

CUP – PRZERZUT Z NIEZNANEGO OGNISKA PIERWOTNEGO (ANG. CARCINOMA OF UNKNOWN PRIMARY, CUP SYNDROME)

DFS – CZAS PRZEŻYCIA WOLNY OD CHOROBY (ANG. DISEASE FREE SURVIVAL)

DSS – CZAS PRZEŻYCIA SPECYFICZNY DLA CHOROBY (ANG. DISEASE SPECIFIC SURVIVAL)

EBM – MEDYCYNĄ OPARTA NA BADANIACH NAUKOWYCH (ANG. EVIDENCE BASED MEDICINE)

ENE – NACIEKANIE POZA TOREBKĘ WĘZŁA CHŁONNEGO (ANG. EXTRANODAL EXTENSION)

HPV – WIRUS BRODAWCZAKA LUDZKIEGO (ANG. HUMAN PAPILLOMAVIRUS)

ISH – HYBRYDYZACJA IN SITU (ANG. IN SITU HYBRIDIZATION)

LNR – WSPÓŁCZYNNIK WĘZŁÓW CHŁONNYCH (ANG. LYMPH NODE RATIO)

LN Y – LICZBA WĘZŁÓW CHŁONNYCH (ANG. LYMPH NODE YIELD)

LVI – NACIEKANIE NACZYŃ KRWIONOŚNYCH I CHŁONNYCH (ANG. LYMPHOVASCULAR INVASION)

OPSCC – RAK PŁASKONABŁONKOWY USTNEJ CZĘŚCI GARDŁA (ANG. OROPHARYNGEAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA)

OS – CZAS OGÓLNEGO PRZEŻYCIA (ANG. OVERALL SURVIVAL)

PCR – TEST ŁAŃCUCHOWEJ REAKCJI POLIMERAZY (ANG. POLYMERASE CHAIN REACTION)

PFS – CZAS WOLNY OF PROGRESJI CHOROBY (ANG. PROGRESSION FREE SURVIVAL)

PNI – NACIEKANIE WZDŁUŻ WŁÓKIEN NERWOWYCH (ANG. PERINEURAL INVASION)

TLM – PRZEZUSTNA MIKROCHIRURGIA LASEROWA (ANG. TRANSORAL LASER MICROSURGERY)

TORS – PRZEZUSTNA CHIRURGIA ROBOTOWA (ANG. TRANSORAL ROBOTIC SURGERY)

WHO – ŚWIATOWA ORGANIZACJA ZDROWIA (ANG. WORLD HEALTH ORGANIZATION)

Spis treści

1. Wstęp	5
1.1. Epidemiologia i charakterystyka raków płaskonabłonkowych ustnej części gardła	5
1.2. Infekcja wirusem brodawczaka ludzkiego	11
1.3. Leczenie raków płaskonabłonkowych ustnej części gardła	16
1.4. Klasyfikacja stopnia zaawansowania nowotworów TNM	21
2. Cele i założenia pracy	27
3. Materiał kliniczny	28
4. Metody badawcze	29
4.1. Retrospektywna analiza historii choroby	29
4.2. Badania immunohistochemiczne celem oceny ekspresji białka p16.....	30
4.3. Ponowna ocena stopnia zaawansowania według ósmej edycji klasyfikacji TNM	31
4.4. Analiza statystyczna	32
5. Wyniki badań	34
5.1. Charakterystyka badanej grupy chorych	34
5.2. Czas przeżycia chorych w zależności od statusu infekcji wirusem HPV.....	40
5.3. Stopnie zaawansowania choroby według siódmej i ósmej edycji klasyfikacji TNM	43
5.4. Czas przeżycia chorych w zależności od stopnia zaawansowania choroby według siódmej i ósmej edycji klasyfikacji TNM.....	49
5.5. Pozostałe czynniki prognostyczne.....	59
6. Omówienie wyników badań i dyskusja	68
6.1. Charakterystyka badanej grupy chorych	68
6.2. Czas przeżycia chorych w zależności od statusu infekcji wirusem HPV.....	70
6.3. Stopnie zaawansowania choroby według siódmej i ósmej edycji klasyfikacji TNM	76
6.4. Czas przeżycia chorych w zależności od stopnia zaawansowania choroby według siódmej i ósmej edycji klasyfikacji TNM.....	83
6.5. Pozostałe czynniki prognostyczne.....	89
7. Wnioski	97
8. Ograniczenia pracy	98
9. Streszczenie.....	99
10. Summary	100
11. Spis tabel i rycin.....	101
12. Piśmiennictwo	105

1. Wstęp

1.1. Epidemiologia i charakterystyka raków płaskonabłonkowych ustnej części gardła

Rak płaskonabłonkowy części ustnej gardła (ang. *oropharyngeal squamous cell carcinoma*, OPSCC) stanowi jedną z najczęściej spotykanych w praktyce klinicznej grup nowotworów złośliwych głowy i szyi. Anatomicznie ustna część gardła obejmuje migdałki podniebienne wraz z łukami podniebienno-językowymi i podniebienno-gardłowymi, nasadę języka, tylną ścianę ustnej części gardła oraz podniebienie miękkie wraz z jęczyzkiem.¹ Pod względem histopatologicznym rak płaskonabłonkowy stanowi około 95% nowotworów złośliwych części ustnej gardła.² Wśród objawów OPSCC wymienia się nieprzemijający ból gardła, zaburzenia przełykania i ból w trakcie przełykania oraz wyczuwalną masę guzową na szyi, a nowotwór w zaawansowanym stadium może objawiać się zagrażającym życiu krwawieniem i dusznością. Okolica ustnej części gardła (zwana też potocznie gardłem środkowym) jest kluczowa w aspekcie codziennych funkcji życiowych, takich jak mowa, przełykanie i drożność dróg oddechowych. Dlatego też wystąpienie nowotworu złośliwego tej okolicy, a także niezbędna terapia onkologiczna, mogą bezpowrotnie wpłynąć na funkcje życiowe chorego, znacznie pogarszając jakość życia.

Czynniki ryzyka występowania raków płaskonabłonkowych części ustnej gardła, podobnie jak raków całego regionu głowy i szyi, należą przede wszystkim do modyfikowalnych czynników zależnych od jednostki, a więc zależą od stylu życia. Głównym czynnikiem etiologicznym występowania raka płaskonabłonkowego głowy i szyi pozostaje palenie i żucie tytoniu oraz nadużywanie alkoholu, a jednocześnie stosowanie obu używek wywołuje synergistyczny efekt.³ Jednakże, w ciągu ostatnich lat nowe przypadki OPSCC coraz częściej zaczęły dotyczyć osób, które nigdy nie paliły, ani nie piły w ryzykowny sposób.

W ciągu ostatnich kilku dekad, pomimo spadku konsumpcji wyrobów tytoniowych oraz zmniejszającej się zachorowalności na nowotwory głowy i szyi na świecie, liczba zachorowań na OPSCC uległa znacznemu wzrostowi.⁴ Sumarycznie, w 2018 roku na świecie rozpoznano prawie 93000 przypadków raka płaskonabłonkowego ustnej części

gardła, co stanowi ponad 13% spośród wszystkich rozpoznanych nowotworów głowy i szyi.⁵ Nadal odnotowuje się jednak stały roczny przyrost nowych przypadków OPSCC w krajach rozwiniętych: między innymi o 5% w Stanach Zjednoczonych i o 6% w Finlandii.⁶ Co więcej, wzrost zachorowań na OPSCC jest wyraźniej zaznaczony u mężczyzn, niż u kobiet, a także w grupie chorych poniżej 60 roku życia; powyższe dane odnotowano w krajach rozwiniętych, wykazujących jednoczesny spadek zachorowań na raki płaskonabłonkowe jamy ustnej i płuc.⁷ Dane te okazały się zgodne z hipotezą, opisującą związek stałego wzrostu zachorowań na raka płaskonabłonkowego ustnej części gardła, ze wzrostem częstości występowania infekcji wirusem brodawczaka ludzkiego (ang. *human papillomavirus*, HPV). W ciągu ostatnich pięciu dekad liczba OPSCC zależnych od infekcji wirusem HPV wzrosła o ponad 22.5%, podczas gdy liczba zachorowań na raki płaskonabłonkowe krtani oraz jamy ustnej zwiększyła się minimalnie.⁸

Od wczesnych lat 80 dwudziestego wieku liczba zachorowań na HPV-dodatni OPSCC systematycznie wzrasta: z około 16% do ponad połowy spośród wszystkich zachorowań na OPSCC.⁹ Podwojenie w każdej dekadzie lat 1970-2006 zachorowań na raka migdałka podniebiennego w populacji szwedzkiej, zostało porównane do „epidemii raka wywołanego wirusem”.¹⁰ W Stanach Zjednoczonych rejon części ustnej gardła wyprzedził okolicę szyjki macicy jako najczęstszy rejon występowania HPV-dodatnich nowotworów i stanowi około 43% wszystkich nowotworów związanych z HPV.¹¹ Dla porównania, w Stanach Zjednoczonych liczba HPV-ujemnych OPSCC zależnych od palenia tytoniu spadła o 50% w związku ze spadkiem popularności palenia w populacji.⁷ Szacuje się, że przy obecnym tempie wzrostu zachorowań na HPV-dodatnie OPSCC, rejon ustnej części gardła wyprzedzi okolicę szyjki macicy w aspekcie występowania nowotworów zależnych od wirusa brodawczaka ludzkiego również w Europie.¹²

Geograficznie, zachorowania na HPV-dodatnie raki gardła środkowego występują częściej w krajach wysoko rozwiniętych, niż niżej rozwiniętych. Zachorowalność na HPV-dodatni OPSCC przekracza 50 % wszystkich zachorowań na OPSCC w Stanach Zjednoczonych i krajach skandynawskich; nie przekracza natomiast 50% w południowych krajach europejskich.¹³ Zjawisku towarzyszy coroczne zwiększanie zachorowalności na OPSCC o 3,5% w skali świata.¹⁴ Szacuje się, że rocznie około 38000 przypadków raka płaskonabłonkowego części ustnej gardła jest spowodowanych infekcją wirusem HPV.¹⁵ Infekcja wirusem brodawczaka ludzkiego w obrębie ustnej

części gardła jest jednak powszechna, a do powstania nowotworu złośliwego prowadzi jedynie część zakażeń. Szacuje się, że w grupie mężczyzn w szóstej dekadzie życia, jedynie u co dziesiątego mężczyzny zarażonego onkogennym wirusem HPV części ustnej gardła rozwinię się nowotwór złośliwy tego regionu.¹⁶ Znaczna część infekcji występuje w postaci poronnej i zwalczana jest przez prawidłowo funkcjonujący układ odpornościowy. Niekiedy też chory może nie doczekać rozwinięcia się nowotworu związanego z infekcją wirusem HPV. Czas upływający od momentu infekcji do czasu wystąpienia nowotworu zwykle przekracza dekadę, a w niektórych przypadkach może wynosić 30 lat.¹⁷

Spośród wszystkich lokalizacji nowotworów złośliwych głowy i szyi, jedynie HPV-dodatni rak części ustnej gardła wykazuje stały wzrost zachorowań globalnie.¹⁸ Nie zanotowano natomiast stałego wzrostu częstotliwości występowania innych raków głowy i szyi, niezwiązanych przeważnie z infekcją wirusem brodawczaka ludzkiego. Prawdopodobną przyczyną jest znacznie mniej powszechne występowanie HPV-dodatnich raków umiejscowionych w innych lokalizacjach anatomicznych głowy i szyi, w stosunku do HPV-dodatnich raków części ustnej gardła. Udział raków związanych z infekcją wirusem brodawczaka ludzkiego w obrębie jamy ustnej, gardła dolnego i krtani nie przekracza zwykle kilkunastu procent.¹⁹

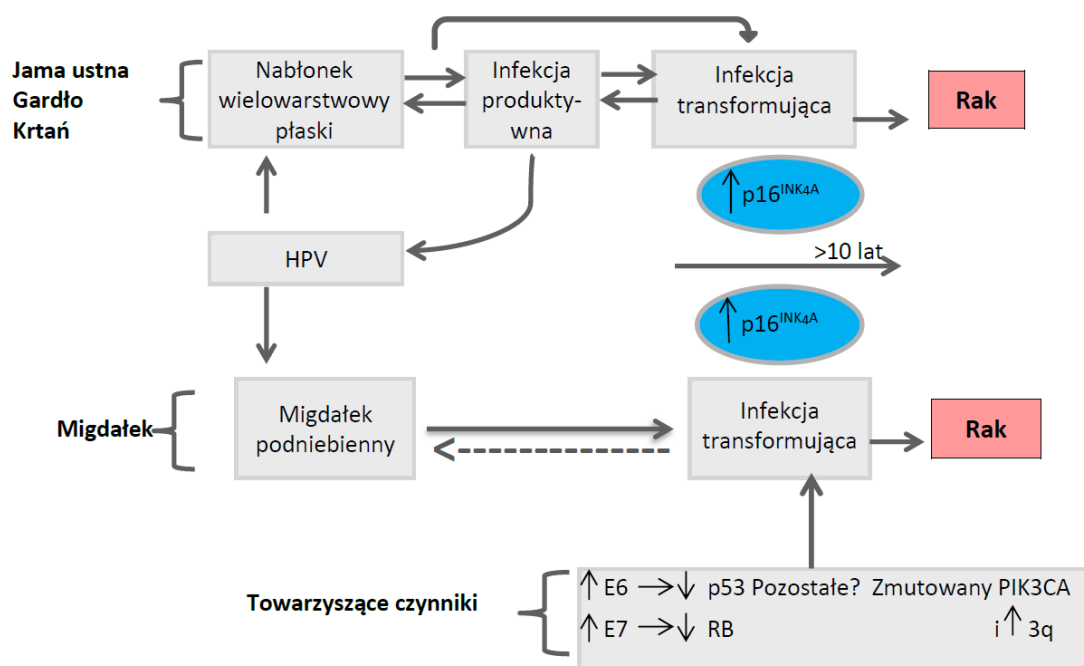
Rozpowszechnienie infekcji onkogennymi wirusami HPV jest największe w grupie chorych do 45 roku życia, określanej w literaturze mianem młodych dorosłych (ang. *young adults*).²⁰ Chorzy z HPV-dodatnim OPSCC stanowią grupę charakteryzującą się mniejszym przeciętnym spożyciem alkoholu oraz tytoniu, a także wcześniejszym wiekiem wystąpienia nowotworu, w porównaniu do grupy chorych na OPSCC niezwiązanego z infekcją HPV.²¹ Ponadto większość chorych stanowią mężczyźni oraz osoby o wyższym statusie socjoekonomicznym.²² Ryzykowne zachowania seksualne obecnie są uznane za jeden z głównych czynników ryzyka wystąpienia OPSCC związanego z infekcją wirusem brodawczaka ludzkiego. Liczba oralnych partnerów seksualnych wydaje się najistotniej i najbardziej specyficznie związana z ryzykiem wystąpienia raka płaskonabłonkowego w obrębie migdałka podniebiennego i nasady języka.⁷ Obie lokalizacje stanowią najczęstsze miejsce występowania raka płaskonabłonkowego związanego z infekcją wirusem HPV, a procentowy udział raków HPV-dodatnich w tych lokalizacjach jest znacznie większy, niż w przypadku raków podniebienia miękkiego i tylnej ściany części ustnej gardła

i wynosi odpowiednio 56% dla raków migdałka, 40% dla raków nasady języka, 12% dla raków podniebienia miękkiego i 19% dla raków tylnej ściany gardła.²³

HPV-dodatnie OPSCC w momencie rozpoznania charakteryzują się mniejszym guzem pierwotnym (niższa cecha T w klasyfikacji TNM) oraz większymi zmianami w układzie chłonnym szyi (wyższa cecha N) w porównaniu do guzów HPV-negatywnych.²⁴ Szacuje się, że w momencie rozpoznania nawet 40% HPV-dodatnich OPSCC wykazuje obecność tożsronnych przerzutowych węzłów chłonnych, z reguły w polach węzłowych II i III, nawet w przypadku niewielkich zmian pierwotnych (T0-T2).²⁵ Skłonność tych nowotworów do szybkiego przerzutowania do regionalnych węzłów chłonnych można tłumaczyć uwarunkowaniami biologicznymi i histologicznymi raków płaskonabłonkowych części ustnej gardła, leżących najczęściej w obrębie tkanki limfatycznej migdałka podniebiennego oraz nasady języka. Brak kolagenowej tkanki łącznej pod nabłonkiem tworzącym krypty migdałków podniebiennych i tkanki limfatycznej nasady języka może sprzyjać migracji komórek nowotworowych z drobnych, pierwotnych zmian ustnej części gardła do układu chłonnego szyi, jeszcze przed pierwszymi objawami ze strony pierwotnej zmiany w obrębie gardła.²⁶ Z powodu znacznych różnic w morfologii oraz w częstotści występowania HPV-pozytywności w wyżej wymienionych strukturach należących do ustnej części gardła, niektórzy naukowcy sugerują konieczność podziału części ustnej gardła na co najmniej dwie lokalizacje: w obrębie migdałka podniebiennego i nasady języka oraz w obrębie pozostałych struktur części ustnej gardła, co pozwoli na bardziej skuteczną ocenę częstotści występowania HPV-dodatniego OPSCC i ustalenia jego rokowania.²³ Migdałki podniebienne i nasada języka, zawierają podśluzówkową tkankę limfatyczną tworzącą krypty, które wielokrotnie zwiększają ich powierzchnię. Z tego powodu, rozległa i nierówna powierzchnia migdałków i nasady języka utrudnia skuteczne pobranie wymazu, a otrzymane wyniki są niemiernodajne i odznaczają się niską wartością predykcyjną.⁶ Z kolei budowa histologiczna podniebienia miękkiego, łuków podniebiennych i języczka, pokrytych nierogowaciejącym nabłonkiem wielowarstwowym płaskim, przypomina w większym stopniu budowę tkanek jamy ustnej, niż migdałków podniebiennych i nasady języka. Migdałek podniebienny jest okolicą, w której HPV-pozytywność stwierdzana jest najczęściej spośród wszystkich lokalizacji należących do części ustnej gardła.²⁷

Koncepcja karcynogenezy zależnej od wirusa brodawczaka ludzkiego została przedstawiona w pracy Leemansa i wsp. Według niej, nabłonek wielowarstwowy

płaski, znajdujący się między innymi w jamie ustnej oraz okolicy podniebienia miękkiego, łuków podniebiennych i języczka, sprzyja wystąpieniu produktywnej infekcji wirusem brodawczaka ludzkiego HPV. Podobnie jak w przypadku szyjki macicy, produktywne infekcje w obrębie jamy ustnej, krtani i gładkiej błony śluzowej gardła nieczęsto przekształcają się w fazę transformującą, prowadzącą w konsekwencji do rozwoju nowotworu. Produktywna infekcja tych okolic może natomiast wyzwać duże ilości cząsteczek wirusa, prowadząc w konsekwencji do wtórnego zakażenia w obrębie komórek nabłonka krypt migdałkowych. Krypty migdałkowe, cechujące się pofałdowaną strukturą, zwiększającą całkowitą powierzchnię ich błony śluzowej oraz brakiem podstawnej kolagenowej tkanki łącznej, sprzyjają wystąpieniu infekcji transformującej. Komórki nabłonka krypt migdałkowych nie podtrzymują zatem zwykłego, opisanego powyżej cyklu życia wirusa, podatne są natomiast na infekcję w fazie transformującej, sprzyjającej karcynogenezie. Infekcje transformujące charakteryzują się zderegulowaną ekspresją onkoprotein HPV E6 i E7. Białka te inaktywują, odpowiednio, RB i p53. (Rycina 1.) Infekcja transformująca w obrębie głowy i szyi może zająć ponad 10 lat.²⁸



Rycina 1. Karcynogeneza wyindukowana wirusem brodawczaka ludzkiego w rejonie głowy i szyi.

Co istotne, stwierdzenie infekcji wirusem HPV w przypadku OPSCC jest najbardziej korzystnym nieanatomicznym czynnikiem rokowniczym dla chorego. Jednym z pierwszych badań, które zasugerowało potrzebę wyodrębnienia grupy chorych z pozytywnym statusem infekcji HPV w rakach płaskonabłonkowych głowy i szyi ze względu na wyraźnie lepsze rokowanie (OPSCC stanowił około 1/4 wszystkich przypadków w wyżej wymienionym badaniu), było retrospektywne badanie M.L. Gillison z 2000 roku.²⁹ Badanie wykazało, że OPSCC zawierają DNA wirusa brodawczaka ludzkiego ponad 7 razy częściej, niż raki zlokalizowane poza ustną częścią gardła. Aktualne dane donoszą, że chorzy z HPV-dodatnim OPSCC wykazują zmniejszone ryzyko śmierci w związku z chorobą o 58-74% w stosunku do chorych z HPV-ujemnym OPSCC, związanym z typowymi czynnikami ryzyka.³⁰ HPV-dodatni rak płaskonabłonkowy ustnej części gardła charakteryzuje się też dobrą odpowiedzią na terapię przeciwnowotworową, co skutkuje dłuższym czasem ogólnego przeżycia (ang. *overall survival*, OS), przeżycia specyficznego dla choroby (ang. *disease specific survival*, DSS) oraz miejscowej i regionalnej kontroli (ang. *locoregional control*), niż HPV-ujemny OPSCC.³¹ Guzy te charakteryzują się też mniejszym odsetkiem występowania wznów lokoregionalnych i dłuższym czasem wolnym od progresji choroby (ang. *progression free survival*, PFS), niż w OPSCC HPV-ujemnych.³² Chorzy z HPV-dodatnim OPSCC rzadziej, niż chorzy z chorobą niezależną od wirusa HPV, rozwijają także drugie niezależne ognisko pierwotne, co mieć związek z mniejszą ekspozycją na typowe, charakterystyczne dla raków górnego odcinka dróg oddechowych i pokarmowych, czynniki ryzyka.³³ Ogólna częstość występowania wznów (sumarycznie: lokalnych, regionalnych i odległych) w grupie HPV-dodatnich OPSCC jest niższa, niż wśród HPV-ujemnych raków ustnej części gardła pomimo faktu, że HPV-dodatnie raki częściej niż raki niezwiązane z infekcją wirusem HPV charakteryzują się obecnością wznów odległych, a także ich występowania w nietypowych (tj. pozapłucnych) lokalizacjach.⁶ Chorzy z p16-dodatnim OPSCC charakteryzują się natomiast częstszym występowaniem odległych przerzutów do kości, niż chorzy z p16-ujemnym guzem.³⁴ W związku z wyraźnymi rozbieżnościami pomiędzy rokowaniem grup zależnych od statusu infekcji wirusem brodawczaka ludzkiego, konieczne stało się uwzględnienie powyższych różnic w nowej klasyfikacji stopnia zaawansowania nowotworów TNM.

1.2. Infekcja wirusem brodawczaka ludzkiego

Wirus brodawczaka ludzkiego jest uznawany za jedną z najbardziej zakaźnych chorób przenoszonych drogą płciową na świecie.³⁵ HPV został po raz pierwszy odkryty w podstawnej warstwie keranocytów skóry w latach 50 XX wieku, a obecnie znane jest jego występowanie onkogennych typów wirusa brodawczaka w błonie śluzowej i skórze szyjki macicy, odbytu, prącia, sromu, pochwy, jamy ustnej, krtani oraz gardła. Nierzadko spotykane są również dokuczliwe i nieestetyczne brodawki błony śluzowej jamy ustnej i gardła oraz skóry narządów płciowych i odbytu, spowodowane nieonkogennymi typami wirusa HPV i przenoszone drogą płciową, a także przez bezpośredni kontakt skórny. Nie każda infekcja wirusem HPV jest trwała: większość infekcji ma jedynie charakter przejściowy, a zakażenie przeważnie ustępuje po upływie 1-2 lat. Część infekcji unika natomiast odpowiedzi układu immunologicznego, przechodząc w trwałą infekcję wirusową. Ryzyko wystąpienia trwałej infekcji wirusowej jest wyższe u mężczyzn i zależy, oprócz męskiej płci, także od liczby partnerów seksualnych, wieku oraz palenia tytoniu.³⁶

Według szacunków, wirus HPV przenoszony drogą oralną w Stanach Zjednoczonych występuje u 11% populacji, co odpowiada liczbie 11 milionów mężczyzn i 3.2 miliona kobiet.³⁷ Za ponad połowę spośród wyżej opisanych infekcji w USA odpowiada typ wirusa brodawczaka ludzkiego wysokiego ryzyka - HPV 16, wykazując sześciokrotnie częstsze występowanie u mężczyzn, niż u kobiet. Według innych źródeł, infekcję wirusem HPV w obrębie jamy ustnej lub gardła stwierdza się u około 7% populacji.³⁸ Stosunek oralny pozostaje najsilniej związany z infekcją wirusem brodawczaka ludzkiego. U młodych dorosłych wykazano zwiększone ryzyko stwierdzenia infekcji wirusem HPV w przypadku odbycia stosunku oralnego w ciągu trzech miesięcy poprzedzających badanie. Ponadto opisano również zwiększone ryzyko infekcji wirusem HPV u mężczyzn (jako strona aktywna) po odbyciu stosunku oralnego z kobietą, lecz nie mężczyzny z mężczyzną, kobiety z kobietą, ani u kobiety (jako strona aktywna) po odbyciu oralnego stosunku z mężczyzną.³⁹

Wirus brodawczaka ludzkiego należy do rodziny papillomawirusów, niewielkich bezotczkowych wirusów występujących w skórze i błonie śluzowej, a jego informacja genetyczna jest zawarta w kolistym, dwuniciowym DNA.⁴⁰ W przeciwieństwie do szybko mutujących wirusów z informacją genetyczną zakodowaną w jednoniciowym

RNA (na przykład wirus HIV), dwuniciowe DNA wirusa brodawczaka ludzkiego pozwala na większą stabilność genomu i skutkuje mniejszą częstotliwością mutacji.⁴¹ Dzięki temu z jednej strony pozwala to badaczom lepiej poznać charakterystykę i biologię wirusa, a terapiom przeciwwirusowym pozostać aktualnym bez spodziewanej adaptacji ze strony wolno mutującego wirusa. Z drugiej natomiast strony, stabilność DNA wirusa pozwala na jednoczesne współistnienie wielu typów HPV: do dzisiaj wyszczególniono ponad 200 typów wirusa brodawczaka ludzkiego.⁴² Spośród nich, 40 typów występuje w okolicy anogenitalnej i przenoszonych jest drogą płciową, także genitalno-oralną.

Wśród licznych typów wirusa brodawczaka ludzkiego, najsilniej związany z występowaniem raka części ustnej gardła jest typ HPV 16, odpowiedzialny za powstanie około 90% HPV-dodatnich OPSCC, a następnie typ 18, który odpowiedzialny jest za występowanie nie więcej, niż kilku procent HPV-dodatnich OPSCC.⁴³ Natomiast w przypadku raków płaskonabłonkowych całego regionu głowy i szyi, oba typy odpowiedzialne są za około 85% infekcji HPV.¹⁵ Nie są to natomiast jedyne typy wirusa wysokiego ryzyka w obrębie głowy i szyi. Za onkogenne, poza typami 16 i 18, uznawane są przez WHO (Światowa Organizacja Zdrowia) typy 31, 33, 45, 51, 52, 56, 58 oraz 59.⁴⁴ Inni autorzy, jako onkogenne wymieniają również typy 35, 39, 54 i 67, dzieląc wszystkie typy wirusa brodawczaka ludzkiego według ich potencjalnego ryzyka onkologicznego: jako typy średniowysokiego ryzyka (31, 33, 35, 52, 58 i 67) i typy wysokiego ryzyka (przede wszystkim 16 i 18).⁴⁵ Znaczna większość spośród pozostałych typów wirusa zaliczana jest do grupy niskiego ryzyka (przede wszystkim typy 6, 11, 34, 40, 42, 43 i 44) i odpowiedzialna jest za występowanie wyżej opisanych zmian w obrębie skóry, także okolic anogenitalnych, oraz błon śluzowych. Zmiany te cechują się częstym występowaniem nawrotów.

Żadna metoda antykoncepcji nie stanowi skutecznej metody ochrony przed zakażeniem wirusem brodawczaka ludzkiego. W celu zapobiegania onkogennym infekcjom HPV, wytyczne Amerykańskiego Komitetu Doradczego ds. Szczepień Ochronnych (ACIP) z 2019 roku rekomendują szczepienia poliwalentne przeciwko wirusowi brodawczaka ludzkiego dla dzieci i młodych dorosłych obu płci, w wieku od 9 do 26 roku życia. Według ACIP optymalny wiek szczepienia znajduje się między 11 a 12 rokiem życia, natomiast późniejsze szczepienia są rekomendowane jedynie dla osób niezaszczepionych w tym wieku.⁴⁶ Polska rządowa strona internetowa szczepienia.info rekomenduje powyższe zalecenia.⁴⁷ Szczepionki zapobiegają do 90% nowotworów

wywołanych przez infekcję wirusem HPV.¹⁵ Nie zapobiegają natomiast nowotworom wywołanym przez już aktywną w momencie podania szczepionki infekcję. Z tego powodu istotne jest powszechne szczepienie obu płci przed inicjacją seksualną. Obecnie dostępne są trzy szczepionki oparte na cząsteczkach wirusopodobnych, stworzonych ze strukturalnych białek L1: dwuwalentna Cervarix (GlaxoSmithKline), czterowalentna Gardasil (Merck Inc.) i dziewięciowalentna Gardasil 9 (Merck Inc.). Cervarix zapobiega typom 16 i 18 wirusa HPV; Gardasil, poza powyższymi obu onkogennymi typami wirusa, dodatkowo zapobiega typom 6 i 11; natomiast Gardasil 9 dodatkowo zapobiega typom 31, 33, 45, 52 i 58. Wymienione szczepionki są zatwierdzone do stosowania w Stanach Zjednoczonych celem prewencji raka szyjki macicy i odbytu oraz kłykcin kończystych u obu płci. Ze względu na brak przeprowadzonych badań populacyjnych oceniających wpływ powszechnych szczepień w celu prewencji HPV-dodatniego OPSCC, nie uwzględniono tych nowotworów w oficjalnych zaleceniach. Badania retrospektywne potwierdziły natomiast skuteczność poliwalentnych szczepionek w zapobieganiu zakażeń wywoływanych przez typy wirusa brodawczaka ludzkiego, które obejmuje szczepienie.^{48 49}

Tabela I. Porównanie obecnie dostępnych szczepionek na wirusa brodawczaka ludzkiego. Według de Oliveiry.⁵⁰

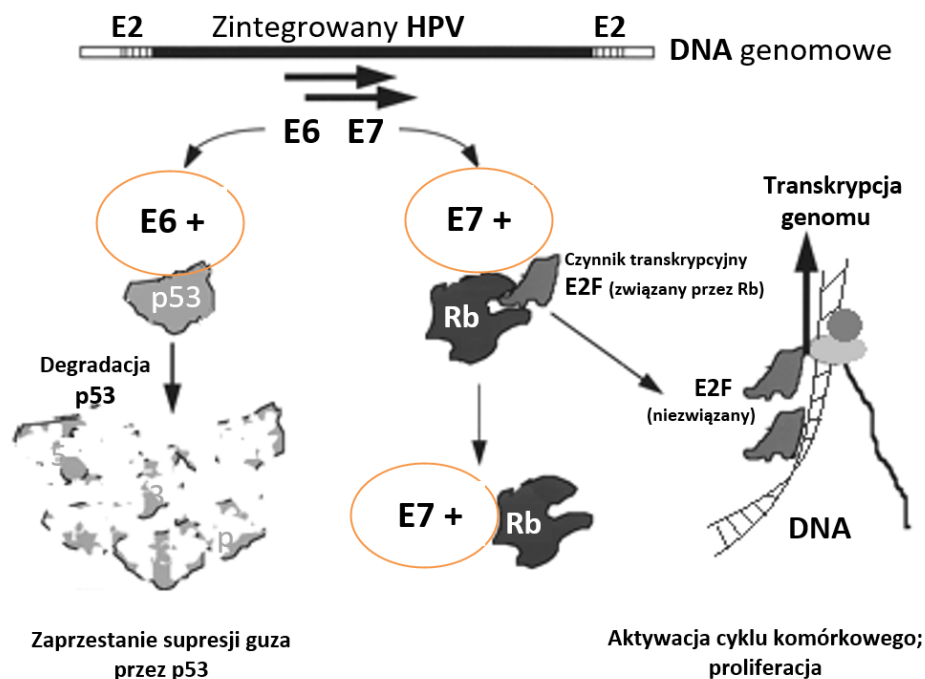
	Dwuwalentna szczepionka przeciwko HPV	Czterowalentna szczepionka przeciwko HPV	Dziewięciowalentna szczepionka przeciwko HPV
Producent	GlaxoSmithKline	Merck	Merck
Nazwa handlowa	Cervarix	Gardasil, silgard	Gardasil 9
Ochrona przeciwko	HPV-16/18	HPV-6/11/16/18	HPV-6/11/16/18/ 31/33/45/52/58
Ochrona krzyżowa	HPV-31/33/45	HPV-31	Brak danych

W przypadku rozpoznania raka płaskonabłonkowego ustnej części gardła, istotna jest ocena statusu infekcji wirusem HPV, ze względu na odmienne rokowanie dla chorych HPV-ujemnych i HPV-dodatnich. Wymagało to dokładnego poznania

mechanizmów genetycznych, co pozwoliło na wyizolowanie białek wykazujących zwiększoną ekspresję w przypadku infekcji onkogennym typem wirusa HPV. Powierzchnia wirionu HPV – pojedynczej, kompletnej cząstki wirusowej - pokryta jest białkami tworzącymi kapsyd, zwanymi onkoproteinami L1 i L2. Białko L1 występuje w formie pentameru połączonego wiązaniami disiarczkowymi, a ukończenie wiązań w nowo powstałym wirionie powoduje stabilizację struktury wirusa. Przed ukończeniem połączeń między cząstkami białkami L1 materiał genetyczny wirusa pozostaje wrażliwy na czynniki zewnętrzne.⁴⁰ Białko L2 odgrywa mniejszą rolę jako białko strukturalne, natomiast według hipotez prawdopodobnie umożliwia wirionowi wnikanie do komórek gospodarza.

Z punktu widzenia możliwości oceny udziału infekcji wirusem HPV w przypadku wystąpienia OPSCC, najbardziej istotne są białka E6 i E7. Te niewielkie (100-150 aminokwasów) białka są kluczowe dla rozwoju nowotworu na poziomie komórkowym. Działają wspólnie, nie tylko by inaktywować proces apoptozy kontrolowany przez komórkowe mechanizmy regulatorowe, ale też by sprzyjać proliferacji zakażonych komórek. Białko E6 powoduje degradację białka supresorowego p53, regulującego w cyklu komórkowym przejście z fazy G1 do fazy S. E6 rywalizuje też kompetycyjnie z cytokiną TNF- α o wiązanie do białka TNFR1. TNFR1 jest transbłonowym receptorem, który wiążąc TNF- α powoduje kaskadę procesów, prowadzących do kontrolowanej śmierci komórki. Inhibicja kompetycyjna spowodowana przez obecność onkoproteiny E6 w konsekwencji blokuje proces apoptozy i sprzyja nieśmiertelności komórki.⁴⁰

Onkoproteina E7 rozregulowuje cykl komórkowy, powodując nadmierną proliferację komórek. Białko to wiąże się z białkiem supresorowym Retinoblastoma (pRb). W normalnych warunkach pRb wiąże się z czynnikami transkrypcyjnymi z rodziny E2F w kompleks, uniemożliwiający zdrowej komórce niekontrolowane przejście do komórkowej fazy S. Białko E7 wykazuje wyższe powinowactwo do pRb, wypierając czynniki E2F z wiązania, co umożliwia wcześniejsze i niekontrolowane przejście do fazy podziału komórki.⁵¹ W tym momencie u zdrowej komórki nastąpiłoby uruchomienie mechanizmów broniących przed niekontrolowanym podziałem – poprzez apoptozę nadmiernie proliferujących komórek. Mechanizm ten w przypadku infekcji wirusem HPV jest jednak wyłączony przez opisane już białko E6. W ten sposób funkcje obu białek E6 i E7 są ze sobą nierozdzielnie związane. (Rycina 2.)



Rycina 2. Wpływ infekcji wirusem HPV na mechanizmy komórkowe. Według El Mzibri.⁵²

W zdrowej komórce, p16^{INK4a} (p16), białko będące inhibitorem kinaz zależnych od cyklin, zmniejsza ekspresję kinaz CDK4 i CDK6 i zapobiega fosforylacji pRb przez obie kinazy. pRb w postaci nieufosforylowanej hamuje progresję cyklu komórkowego poprzez tworzenie nieefektywnych kompleksów pRb-E2F. Przyłączenie onkoproteiny E7 wirusa HPV do białka supresorowego pRb powoduje wyparcie, a w konsekwencji gromadzenie czynników z rodziny E2F. Nadmiar czynników E2F powoduje gromadzenie białka p16 na zasadzie sprzężenia zwrotnego dodatniego.⁵³ Immunohistochemiczne badanie (IHC) białka p16^{INK4a} pozostaje w klinicznym użyciu począwszy od 2003 roku i jest uznaną techniką diagnostyczną służącą do oceny statusu infekcji wirusem HPV w rakach płaskonabłonkowych głowy i szyi.⁵⁴ Immunohistochemiczne badanie obecności białka p16 (p16^{INK4a}) jest metodą wskazującą w pośredni sposób na obecność wirusa HPV. Wysoka nadekspresja p16 pozwala z wysoką czułością stwierdzić obecność transkrypcyjnie aktywnego wirusa HPV w OPSCC.⁵⁵

Poza badaniem immunohistochemicznym, w rozpoznawaniu infekcji HPV wykorzystywane są testy łańcuchowej reakcji polimerazy (ang. *polymerase chain reaction*, PCR) służące do wykrycia wirusowego DNA lub mRNA oraz hybrydyzacja in

situ (ang. *in situ hybridization*, ISH). Hybrydyzacja *in situ* jest metodą polegającą na wykrywaniu i lokalizacji specyficznych sekwencji DNA lub RNA, poprzez przyłączanie do nich komplementarnych nici kwasów nukleinowych. W przypadku diagnostyki wirusa HPV, wykrywane są przede wszystkim wirusowe onkogeny E6 i E7 zawarte w mRNA (matrycowym RNA). Badanie PCR pozwala na wykrycie obecności wirusowego DNA i umożliwia wykrycie materiału genetycznego w ilości poniżej jednej kopii wirusowego genomu na komórkę.⁵⁶

1.3. Leczenie raków płaskonabłonkowych ustnej części gardła

Terapia onkologiczna nowotworów złośliwych ustnej części gardła obejmuje leczenie ogniska pierwotnego, zmian regionalnych (węzłów chłonnych szyi, niekiedy z naciekaniem przyległych struktur, takich jak naczynia, nerwy, mięśnie, ślinianki czy skóra) oraz przerzutów odległych. W terapii, w zależności od lokalizacji i stopnia zaawansowania nowotworu oraz czynników zależnych od chorego (stan ogólny, przebyte leczenie onkologiczne, dostęp anatomiczny, niekiedy preferencje chorego) stosować można jedną, lub połączenie kilku metod leczenia - modalności. Wśród nich wymienia się chirurgię (klasyczną i małoinwazyjną, czasem uzupełnianą chirurgią rekonstrukcyjną), radioterapię (teleradioterapię i znacznie rzadziej - brachyterapię) oraz chemioterapię (standardową oraz immunoterapię i terapię celowaną). W ośrodkach specjalizujących się w leczeniu onkologicznym, konsylium onkologiczne jest instytucją sugerującą najbardziej właściwe postępowanie terapeutyczne indywidualnie dla każdego chorego w momencie zakończenia diagnostyki przed właściwym leczeniem, a także po ukończeniu każdego etapu leczenia – na przykład po uzyskaniu ostatecznych wyników badania histopatologicznego po pierwotnym leczeniu chirurgicznym lub po ukończeniu indukcyjnej chemioterapii, celem zatwierdzenia i koordynacji przebiegu następnego etapu leczenia. W skład konsyliów chirurgii głowy i szyi wchodzić powinni lekarze specjaliści z każdej z dziedzin otorynolaryngologii lub chirurgii szczękowej (chirurg głowy i szyi), radioterapii, onkologii klinicznej, radiologii i patomorfologii, a także specjaliści z zakresu logopedii, foniatrii, fizjoterapii, dietetyki, pielęgniarstwa oraz pracownik socjalny.⁵⁷ Pozwoli to na przeniesienie procesu decyzyjnego, opierającego się na wiedzy, kompetencji i doświadczeniu klinicznemu wszystkich członków konsylium, na szersze grono specjalistów, celem uniknięcia błędów

diagnostycznych i terapeutycznych. W ten skraca się również czas oczekiwania chorego na decyzję dotyczącą postępowania terapeutycznego, a dzięki obecności specjalistów tak różnorodnych dziedzin, możliwe jest uzupełnienie kompetencji poszczególnych członków konsylium w zakresie diagnostyki, leczenia i jakości życia chorego oraz właściwego leczenia wielomodalnego – z wykorzystaniem kilku metod leczenia onkologicznego. Podkreśla się jednak, że konsylium onkologiczne powinno raczej autoryzować proponowane leczenie przez lekarza prowadzącego oraz ewentualnie sugerować inne rozwiązania, niż wydawać odgórnie obowiązujące decyzje.⁵⁸ Podczas zgromadzeń Konsylium Onkologicznego oraz codziennej pracy klinicznej, istotne narzędzie stanowią zalecenia towarzystwa NCCN (ang. *National Comprehensive Cancer Network*), zrzeszającego trzydzieści wiodących centrów onkologicznych ze Stanów Zjednoczonych. W aktualnym zbiorze wytycznych NCCN z 2020 roku, zalecenia dotyczące postępowania terapeutycznego dla raków płaskonabłonkowymi części ustnej gardła przedstawione są dla szczegółowo zdefiniowanych grup chorych, podzielonych według statusu infekcji wirusem HPV oraz stopni zaawansowania T i N według klasyfikacji TNM.⁵⁹ Jako obowiązujące badanie stwierdzające obecność infekcji HPV uznano, podobnie jak w aktualnych wytycznych AJCC, badanie immunohistochemiczne (IHC) p16.

Rekomendacje co do diagnostyki, leczenia i monitorowania nowotworów głowy i szyi opublikowane wspólnie przez trzy uznane europejskie towarzystwa onkologiczne EHNS-EMSO-ESTRO (ang. *European Head and Neck Society, European Society for Medical Oncology, European Society for Radiotherapy and Oncology*) ukazały się w ostatnim kwartale 2020 roku.⁶⁰ Przedstawiono w nich 14 stron wytycznych, mających na celu ustandaryzowanie metod diagnostyki oraz badania histopatologicznego, a także przedstawienie zaleceń terapeutycznych dla każdej modalności w przypadku zmian wczesnych, zaawansowanych oraz wznów procesu nowotworowego. W publikacji znajdują się także wytyczne dla postępowania z rakami części ustnej gardła, z podziałem na grupę p16-dodatnią i p16-ujemną. W kwestii badania histopatologicznego, europejskie towarzystwa rekomendują immunohistochemiczne oznaczenie białka p16 w celu oceny statusu infekcji wirusem brodawczaka ludzkiego w przypadku guzów części ustnej gardła, pomimo dosyć wysokiego odsetka wyników fałszywie pozytywnych. Dodatkowe badania (DNA, RNA lub ISH) powinny zostać wykonane, by potwierdzić status infekcji HPV w przypadku przerzutu z nieznanego ogniska pierwotnego. Badanie histopatologiczne powinno zawierać informacje co do

liczby przerzutowych węzłów chłonnych, naciekania poza torebkę węzła chłonnego, naciekania okołonерwowego oraz naciekania naczyń limfatycznych oraz, oczywiście, marginesów chirurgicznych.

Wytyczne europejskich towarzystw wyraźnie określają ósmą edycję klasyfikacji TNM jako obecnie obowiązującą. Zalecają także identyczną strategię postępowania terapeutycznego przy leczeniu zarówno nowotworów HPV-ujemnych, jak i HPV-dodatnich, jako że obecnie brakuje dostatecznych dowodów na występowanie korzyści przy deeskalacji terapii w przypadkach OPSCC związanych z infekcją HPV. (Rycina 3.)

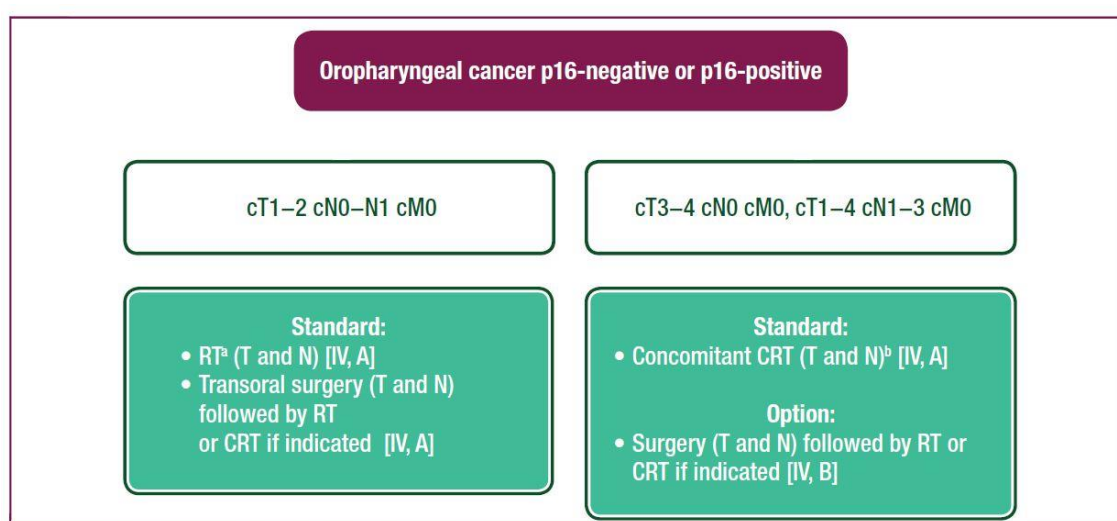


Figure 3. Management of oropharyngeal cancer (p16-negative stage I-IVB; p16-positive stage I-III).

CRT, chemoradiotherapy; M, metastasis; N, node; RT, radiotherapy; T, tumour.

^a Altered fractionation (accelerated or hyperfractionated) RT is a valid option for T1-N1, T2-N0 or T2-N1.

^b Altered fractionation (accelerated or hyperfractionated) RT is a valid option for T1-N1 or T2-N1.

Rycina 3. Schemat proponowanego leczenia dla OPSCC według wytycznych EHNS-ESMO-ESTRO z 2020 roku.

W leczeniu niewielkich zmianach pierwotnych części ustnej gardła bez towarzyszącego zajęcia regionalnych węzłów chłonnych szyi, leczenie pierwszego rzutu obejmuje samodzielne leczenie chirurgiczne (włączając w to chirurgię mało inwazyjną: przezustną chirurgię robotową (ang. *transoral robotic surgery*, TORS) i przezustną chirurgię laserową (ang. *transoral laser microsurgery*, TLM)) lub samodzielną radioterapię. Zmiany lokalnie zaawansowane zazwyczaj wymagają leczenia wielomodalnego: jednoczasowej radiochemioterapii z wykorzystaniem związków platyny lub leczenia chirurgicznego z terapią adjuwantową. Terapię adjuwantową może stanowić samodzielna radioterapia lub radiochemioterapia zależne od czynników

ryzyka wznowy procesu nowotworowego – wysokich cech T i N według klasyfikacji TNM, bliskich marginesów chirurgicznych, obecności przerzutów w IV i V grupie węzłowej szyi, wysokiego stopnia złośliwości histologicznej nowotworu (gradingu), naciekania pozatorebkowego węzła chłonnego – ENE (ang. *extranodal extension*), naciekania naczyń krwionośnych i chłonnych – LVI (ang. *lymphovascular invasion*).⁶¹ Leczenie chirurgiczne niewielkich zmian pierwotnych (T1-T2) jest możliwe przy użyciu technik minimalnie inwazyjnych (TORS, TLM) lub przy użyciu konwencjonalnych technik z dostępu przezustnego i pozwala często na uzyskanie dobrego efektu funkcjonalnego w aspekcie przełykania, mowy i wyglądu chorego. Techniki minimalnie inwazyjne w leczeniu HPV-dodatnich OPSCC pozwalają na uniknięcie przezskórnej endoskopowej gastrokopii (PEG) i tracheostomii w ponad 95% przypadków.⁶² Ponadto tonsillektomia i mukotomia nasady języka w technice TORS i TLM znalazły wykorzystanie do diagnostyki ogniska pierwotnego w przypadku przerzutu z nieznanego ogniska pierwotnego (ang. *carcinoma of unknown primary, CUP syndrome*), pozwalając na rozpoznanie około 80% przypadków pierwotnego guza migdałka podniebiennego lub guza nasady języka w przypadku niemych klinicznie zmian.⁶³

Leczenie rozległych zmian (T3-T4) jest wyzwaniem dla chirurga i może wymagać zaawansowanych technik operacyjnych, takich jak mandibulotomia, celem wystarczającej ekspozycji guza, czy chirurgia mikronaczyniowa, wykorzystująca wolne płaty tkankowe celem rekonstrukcji dużych ubytków nasady języka, przestrzeni przygardłowej, czy podniebienia miękkiego.⁶⁴ Chorzy z rakiem części ustnej gardła często wymagają czasowej lub stałej tracheotomii, niezbędnej do zabezpieczenia drożności dróg oddechowych w okresie okołoperacyjnym w nierzadkich przypadkach krwawienia lub obrzęku tkanek gardła. Wykonanie rozległych zabiegów także w przeważającej mierze wymaga czasowego odseparowania drogi pokarmowej od rany chirurgicznej oraz od drogi oddechowej. Z uwagi na to, większość chorych po mandibulotomii, faryngektomii częściowej, czy operacji z wykorzystaniem wolnego płata tkankowego, będzie wymagała założenia zgłębnika żołądkowego lub przezskórnej czasowej gastrostomii (PEG).

Nadal poszukuje się optymalnych metod leczenia OPSCC. W tym celu przeprowadzane są liczne badania kliniczne, zwłaszcza wśród grup chorych HPV-dodatnich: Zakończone badanie RTOG 1016 wykazało przewagę w zakresie przeżycia w grupie chorych z HPV-dodatnim OPSCC otrzymującej radiochemioterapię

opartą na cisplatynie, w stosunku do grupy otrzymującej radiochemioterapię z wykorzystaniem cetuximabu. Poprawę przeżycia wykazano zwłaszcza wśród chorych z przerzutowymi węzłami chłonnymi, sklasyfikowanych z I stopniem zaawansowania choroby według ósmej edycji klasyfikacji TNM.⁶⁵ Również zakończone badanie DeESCALaTE nie wykazało przewagi cetuximabu wobec standardowej terapii cisplatiną wśród chorych z OPSCC zależnym od wirusa brodawczaka ludzkiego.⁶⁶ ECOG 1308 jest trwającym badaniem klinicznym drugiej fazy dla chorych z HPV-dodatnim OPSCC. Badanie ma wyjaśnić skuteczność indukcyjnej chemioterapii z następczą radioterapią w zredukowanej dawce wśród chorych uzyskujących całkowitą odpowiedź w zakresie guza pierwotnego.⁶ Również w badaniu klinicznym drugiej fazy NRG-HN002, rekrutującym chorych z HPV-dodatnim OPSCC, u których nie występują czynniki ryzyka sprzyjające wystąpieniu wznowy, chorzy otrzymują zredukowaną dawkę radioterapii (60Gy, wobec 70Gy stosowanych w standardowej terapii). Chorych zrandomizowano na grupę otrzymującą samodzielną radioterapię oraz na grupę otrzymującą radiochemioterapię z wykorzystaniem związków platyny.⁶⁷ Badanie kliniczne drugiej fazy MC1273 stara się odpowiedzieć na pytanie dotyczące skuteczności leczenia i jakości życia po leczeniu pooperacyjną radioterapią w zredukowanej dawce (30-36Gy wobec standardowych 60-66Gy). Badanie jest przeprowadzane wśród chorych z zaawansowanym HPV-dodatnim OPSCC (III i IV patologiczny stopień zaawansowania według siódmej edycji klasyfikacji TNM).⁶⁸ ECOG-ACRIN 3311 obejmuje chorych z HPV-dodatnim OPSCC leczonych z wykorzystaniem przezustnej chirurgii robotowej (TORS). Badanie stratyfikuje chorych według histopatologicznych czynników ryzyka, by następnie po ich uwzględnieniu pozostawić chorych w obserwacji, leczyć samodzielną radioterapią (randomizowane: 50Gy lub 60Gy) lub radiochemioterapią.⁶⁹ EORTC 1420, trwające jeszcze badanie, znane także jako „Best of”, randomizuje chorych z niezaawansowanym OPSCC i znanym statusie infekcji HPV na grupy leczone z wykorzystaniem pojedynczej modalności: TORS lub samodzielnej radioterapii.⁷⁰ Badanie ORATOR skupiające się na jakości życia chorych po zakończonym leczeniu onkologicznym, również podzieliło badane grupy na chorych leczonych TORS z limfadenektomią oraz na chorych leczonych samodzielną radioterapią. Wyniki badania wykazały zbliżony poziom jakości życia pomiędzy grupami po otrzymanym leczeniu, przy odmiennym spektrum toksyczności obu terapii.⁷¹ ECOG-ACRIN 3311 jako jedyne stratyfikuje chorych według mikroskopijnego zakresu naciekania poza torebkę węzła chłonnego

(ENE).⁷² Badanie PATHOS, również wykorzystując niekorzystne czynniki patologiczne, randomizuje chorych z HPV-dodatnim OPSCC względem histopatologicznych czynników ryzyka – bliskich marginesów oraz ENE.⁷³ Znaczna większość powyższych badań stara się więc odpowiedzieć na zasadność deeskalacji terapii wśród chorych HPV-dodatnich, celem uzyskania lepszej jakości życia po zakończonej terapii onkologicznej, przy zachowanej skuteczności w zakresie przeżycia.

1.4. Klasyfikacja stopnia zaawansowania nowotworów TNM

Wraz z rozwojem współczesnej, dwudziestowiecznej medycyny i onkologii stało się jasne, że potrzebny jest zunifikowany, czytelny system klasyfikacji nowotworów złośliwych. Wstępna wersja systemu opartego na trzech podstawowych, odmiennych dla każdej lokalizacji anatomicznej, kryteriach nowotworu, – wielkości i zaawansowaniu guza pierwotnego (cecha T), zmian węzłowych (cecha N) i występowaniu ewentualnych odległych przerzutów (cecha M), została po raz pierwszy opracowana przez Komitet przewodzony przez francuskiego chirurga Pierre Denoix w Instytucie Gustave-Roussy w 1944 roku.⁷⁴ System w ciągu następnych dwóch dekad został zaadoptowany przez stworzoną w latach pięćdziesiątych XX wieku organizację UICC (The Union for International Cancer Control) założoną przez członków Komitetu z Instytutu Gustave-Roussy, a następnie udoskonalony. W 1977 roku powstał niezależny system klasyfikacji nowotworów złośliwych, wydany przez AJCC (American Joint Committee on Cancer). Pierwsza edycja klasyfikacji TNM została opublikowana wspólnie przez UICC i AJCC w 1987 roku, proponując znany dziś podział cechy N ze względu na wielkość i ilość przerzutowych węzłów chłonnych.⁷⁵ Przedostatnia, obowiązująca do niedawna siódma edycja klasyfikacji TNM UICC/AJCC wydana w 2009 roku obowiązywała do końca 2017 roku. Obecnie zastąpiona została przez udoskonaloną ósmą edycję klasyfikacji, opublikowaną w 2017 roku i obowiązującą w codziennej pracy klinicznej od stycznia 2018 roku.⁷⁶ Ósma edycja klasyfikacji TNM UICC/AJCC, ze względu na odmienne rokowanie, po raz pierwszy wyodrębniła dwie grupy wśród chorych z nowotworami złośliwymi części ustnej gardła w zależności od statusu infekcji wirusem brodawczaka ludzkiego: grupę chorych p16-ujemną i p16-dodatnią.

Kolejne zmiany w klasyfikacji nowotworów złośliwych na przestrzeni lat, podyktowane były potrzebą aktualizacji klasyfikacji wynikających z dostępności nowych badań naukowych oraz stworzenia coraz bardziej precyzyjnego i łatwiejszego w stosowaniu systemu klasyfikacyjnego. Przejrzysty i adekwatny system, pozwalający na klasyfikację nowotworów złośliwych, według zasad opracowanych przez Patti Groome, powinien opierać się w swoich założeniach na czterech kryteriach, pozwalających na uzyskanie wyraźnych różnic między ocenianymi grupami. Kryteria te obejmują następujące punkty:

- 1) spójność ryzyka: zbliżony odsetek przeżycia wśród chorych zakwalifikowanych do jednej grupy.
- 2) dyskryminację ryzyka: wyraźnie widoczne różnice w przeżyciu pomiędzy grupami.
- 3) przewidywanie rezultatu: możliwe do przewidzenia szanse na wyleczenie dla chorych zakwalifikowanych do jednej grupy.
- 4) równowagę w rozmieszczeniu ilościowym chorych pomiędzy grupami.

Co więcej, według Groome, dobry system klasyfikacji powinien być przyjazny użytkownikom i spójny na przestrzeni kolejnych edycji; powinien także wstępnie zarysowywać prognozę dla chorego.⁷⁷

W ciągu ostatnich lat stało się jasne, że obowiązująca od 2009 roku siódma edycja klasyfikacja TNM, nierozróżniająca pomiędzy grupami chorych HPV-ujemnych i HPV-dodatnich, w niewystarczający sposób oddaje opisywane w literaturze dla obu grup różnice w rokowaniu i odpowiedzi na terapię. Według licznych badań, dla chorych HPV-dodatnich, niższe stopnie zaawansowania choroby według siódmej edycji klasyfikacji TNM często wiązały się z krótszym czasem ogólnego przeżycia (OS), niż wyższe stopnie.⁷³ Poprzednio obowiązująca klasyfikacja nie spełniała też w wystarczający sposób postulatów Groome: ponad 80% chorych z HPV-dodatnimi OPSCC ocenianych według siódmej edycji klasyfikacji TNM było klasyfikowanych jako najbardziej zaawansowane, IV stadium choroby.⁷⁸

Wychodząc naprzeciwko potrzebom lepszej stratyfikacji ryzyka dla chorych z OPSCC w aspekcie infekcji wirusem brodawczaka ludzkiego, w ósmej edycji klasyfikacji TNM w rozdziale dotyczącym guzów części ustnej gardła zaszły znaczące zmiany. Najistotniejsza zmiana dotyczyła wprowadzenia podziału grup chorych w zależności od statusu infekcji wirusem HPV, stwierdzanej immunohistochemicznym badaniem

obecności białka p16. Nowa klasyfikacja TNM określa rozproszone barwienie ponad 75% komórek preparatu i co najmniej umiarkowaną intensywność barwienia jako p16-pozytywność, stanowiącą prawdopodobny i wystarczający dowód na występowanie onkogennej infekcji wirusem HPV.⁷⁹ Pozostałe badania służące do wykrycia infekcji wirusem brodawczaka ludzkiego w aspekcie kancerogenezy (PCR, ISH) nie zostały ujęte w ósmej edycji klasyfikacji.

Zmiany w ósmej edycji klasyfikacji TNM UICC/AJCC dotyczące nowotworów złośliwych ustnej części gardła obejmują, poza uwzględnieniem statusu HPV, kilka istotnych prognostycznie cech. Cecha Tis (T in situ - guz in situ w obrębie zmiany pierwotnej) nie jest już ujęta w klasyfikacji. Ma to związek z opisanym wcześniej brakiem podstawnej kolagenowej tkanki łącznej w obrębie tkanki limfatycznej ustnej części gardła. Brak naturalnej bariery ograniczającej infiltrację guza oraz architektura tkanki chłonnej (obecność krypt wnikaających w głąb migdałka) sprawia, że powierzchowny naciek nowotworowy w obrębie ustnej części gardła nie może być traktowany jako potencjalnie nieinwazyjny – jak w przypadku innych raków.⁸⁰

Cecha T0, dotychczas stosowana do określenia zmian przerzutowych z nieznanego ogniska pierwotnego (ang. *CUP syndrome*), według ósmej klasyfikacji TNM stosowana jest jedynie w przypadku potwierdzenia obecności p16-dodatnich przerzutowych węzłów chłonnych. Kategoria T0 została również przeniesiona do nowo stworzonego rozdziału: Nieznane ognisko pierwotne – węzły chłonne szyjne.

Najwięcej zmian w nowej, ósmej edycji klasyfikacji TNM, zaszło oczywiście wtórnie do podziału chorych z OPSCC na dwie grupy – w zależności od statusu HPV. Trudności w stosowaniu nowej klasyfikacji może sprzyjać fakt dodatkowego podziału cechy N, dotyczącej przerzutowych węzłów chłonnych układu chłonnego szyi, na klasyfikację kliniczną i patologiczną. Wpływa na to fakt niemożności rozpoznania mikroskopijnego, niemożności klinicznie naciekania pozatorebkowego węzła chłonnego, bez wykonania badania histopatologicznego. Pozostałych cech (T oraz M) nie dotyczy różnicowanie na wyżej wymienione klasyfikacje. Klasyfikacja kliniczna opiera się na informacjach zawartych w badaniach obrazowych i dotyczy przede wszystkim chorych leczonych nieoperacyjnie, dlatego też wiodącą porównywaną wartością jest wymiar i lokalizacja opisywanych węzłów chłonnych. Patologiczna klasyfikacja zawiera informacje uzyskane podczas badania histopatologicznego i dotyczy stwierdzonej liczby przerzutowych węzłów chłonnych oraz naciekania pozawęzłowego (w przypadku p16-ujemnych OPSCC). Wprowadzenie tego podziału podyktowane było faktem oceny

chorych odmiennymi metodami w publikacjach, stanowiących podstawę do wprowadzenia zasad obecnych w ósmej edycji klasyfikacji i stało się przedmiotem kontrowersji, które szerzej omówione zostaną w następnych rozdziałach tej rozprawy.

Liczne zmiany dotyczą chorych p16-dodatnich: Stopnie zaawansowania T4a i T4b zostały w p16-dodatnim OPSCC połączone we wspólny stopień T4. Kryteria cechy N uległy w znacznej mierze złagodzeniu w nowej klasyfikacji TNM względem poprzednio obowiązującej klasyfikacji, co skutkuje przypisywaniu chorym niższej cechy N. Obecnie, w klasyfikacji klinicznej jednostronnie występujące przerzutowe węzły chłonne, nie większe niż 6 centymetrów, scharakteryzowane są jako stopień N1. Obustronne, lub kontralateralne (przeciwnie do strony występowania guza) węzły chłonne o wielkości do 6 centymetrów, opisywane są jako kliniczna cecha N2. Cecha N2, w p16-dodatnich OPSCC, nie dzieli się obecnie na poprzednio występujące podgrupy (N2a, N2b, N2c). Węzły chłonne większe niż 6 centymetrów klasyfikowane są klinicznie jako N3.

Klasyfikacja patologiczna w p16-dodatnich OPSCC odnosi się, jak poprzednio zasugerowano, do chorych leczonych chirurgicznie i nie wymaga danych dotyczących wielkości węzłów chłonnych. Patologiczny stopień zaawansowania N1 opisywany jest jako zajęcie przez chorobę nowotworową nie więcej, niż czterech regionalnych węzłów chłonnych (bez względu na stronę występujących przerzutów). Patologiczna cecha N2 dotyczy więcej niż czterech przerzutowych węzłów chłonnych. Stopień N3 został usunięty z patologicznej klasyfikacji TNM.

Stopnie zaawansowania choroby w zależności od definiujących ich cech T i N zostały także przypisane dla chorych p16-dodatnich w zupełnie inny sposób. Zmiany dotyczące stopnia zaawansowania w p16-dodatnich OPSCC wynikają przede wszystkim z podziału na kliniczną i patologiczną klasyfikację oraz z lepszego rokowania chorych HPV-dodatnich i są przedstawione poniżej:

Tabela II. Podział stopni zaawansowania w p16-dodatnim OPSCC w zależności od cech T, N i M. Definicja poszczególnych cech T: T1: ≤ 2 cm, T2: >2 cm i ≤ 4 cm, T3: > 4 cm, T4: naciekanie krtani, zewnętrznych mięśni języka, mięśnia skrzydłowego przyśrodkowego, podniebienia twardego lub żuchwy.

P16-dodatnie OPSCC	Klasyfikacja kliniczna			Klasyfikacja patologiczna		
Stopień zaawansowania	T	N	M	T	N	M
I	T1/T2	N0 : brak węzłów N1 : tożstronne węzły ≤ 6 cm	M0	T1/T2	N0 : brak węzłów N1 : 1-4 węzły	M0
II	T1/T2	N2 : kontralateralne/ obustronne węzły $\leq$ 6 cm	M0	T1/T2	N2 : ≥ 5 węzłów	M0
	T3	N0 : brak węzłów N1 : tożstronne węzły ≤ 6 cm	M0	T3/T4	N0 : brak węzłów N1 : 1-4 węzły	M0
III	T4	Dowolne N	M0	T3/T4	N2 : ≥ 5 węzłów	M0
	Dowolne T	N3 : węzły > 6 cm	M0			M0
IV	Dowolne T	Dowolne N	M1	Dowolne T	Dowolne N	M1

Zmiany dotyczące chorych p16-ujemnych, w porównaniu z siódmą edycją klasyfikacji TNM, są znacznie mniejsze. Cechy T i M pozostają niezmienione, a stopnie zaawansowania są identyczne, jak w siódmej klasyfikacji (Tabela III). Cecha N3 uległa podziałowi na dwie podkategorie: N3a w przypadku przerzutowych węzłów chłonnych większych niż 6 centymetrów, lecz bez cech naciekania pozawęzłowego, oraz N3b, z klinicznymi lub radiologicznymi cechami nacieku pozawęzłowego. Dane przedstawione są poniżej:

Tabela III. Podział stopni zaawansowania w p16-ujemnym OPSCC w zależności od cech T, N i M. Definicja poszczególnych cech T: T1: ≤ 2 cm, T2: >2 cm i ≤ 4 cm, T3: > 4 cm lub naciek językowej powierzchni nagłośni, T4a: naciekanie krtani, zewnętrznych mięśni języka, mięśnia skrzydłowego przyśrodkowego, podniebienia twardego lub żuchwy, T4b: naciekanie mięśnia skrzydłowego bocznego, wyrostków skrzydłowatych, bocznej ściany nosowej części gardła, podstawy czaszki lub otaczanie tętnicy szyjnej. Definicja poszczególnych cech N: N2a: pojedynczy tożstronny węzeł chłonny > 3 cm i < 6 cm, bez ENE, N2b: co najmniej dwa tożstronne węzły chłonne < 6 cm, bez ENE, N2c: obustronne lub kontralateralne węzły chłonne < 6 cm, bez ENE, N3a: węzły chłonne > 6 cm, bez ENE, N3b: węzły klinicznie ENE-dodatnie.

P16-ujemne OPSCC			
Stopień zaawansowania	T	N	M
I	T1	N0: brak węzłów	M0
II	T2	N0: brak węzłów	M0
III	T1/T2/T3	N0: brak węzłów N1: pojedynczy tożstronny węzeł ≤ 3 cm, ENE(-)	M0
IVa	T1/T2/T3/T4a	N0: brak węzłów N1: pojedynczy tożstronny węzeł ≤ 3 cm, ENE(-) N2: (N2a, N2b, N2c)	M0
IVb	Dowolne T	N3: (N3a, N3b)	M0
	T4b	Dowolne N	M0
IVc	Dowolne T	Dowolne N	M1

2. Cele i założenia pracy

Głównym celem rozprawy doktorskiej jest analiza wieloczynnikowa kliniczno-patologiczna chorych z potwierdzonym rakiem płaskonabłonkowym części ustnej gardła w aspekcie zakażenia wirusem brodawczaka ludzkiego (HPV).

Cel główny zostanie osiągnięty przez realizację celów szczegółowych:

- Ponowną ocenę stopnia zaawansowania raka płaskonabłonkowego części ustnej gardła zgodnie z nową, ósmą edycją klasyfikacji TNM (UICC/AJCC 8th edition)
- Analizę wartości predykcyjnych dotyczących rokowania obu zastosowanych klasyfikacji TNM po przypisaniu chorych do poszczególnych stopni klasyfikacji (według UICC/AJCC 7th edition oraz UICC/AJCC 8th edition)
- Analizę przebiegu klinicznego choroby i określenie potencjalnych czynników niekorzystnie wpływających na rokowanie

3. Materiał kliniczny

Materiał obejmuje 233 chorych diagnozowanych w Katedrze i Klinice Chirurgii Głowy, Szyi i Onkologii Laryngologicznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu oraz leczonych w ww. Klinice lub w Oddziałach Radioterapii i/lub Oddziale Onkologii Klinicznej w Wielkopolskim Centrum Onkologii w Poznaniu od maja 2007 roku do października 2017 roku. Mężczyźni stanowili 69.1% (161/233), a kobiety 30.9% (72/233) chorych. Do I grupy chorych włączono 129 chorych z potwierdzoną immunohistochemicznie podwyższoną ekspresją białka p16, świadczącą o infekcji wirusem brodawczaka ludzkiego HPV. Do II grupy chorych włączono 104 chorych bez wykrytej podwyższonej ekspresji białka p16 w badaniu immunohistochemicznym, co przyjęto jako brak infekcji wirusem brodawczaka ludzkiego HPV.

4. Metody badawcze

Podstawowe metody badawcze zastosowane w niniejszej pracy obejmują:

- Retrospektywną analizę historii choroby każdego chorego,
- Wykonanie dodatkowych badań immunohistochemicznych p16 u chorych o nieznanym statusie infekcji wirusem HPV,
- Ponowną ocenę stopnia zaawansowania według ósmej edycji klasyfikacji TNM UICC/AJCC z 2017 roku,
- Analizę statystyczną otrzymanych danych.

Chorych podzielono na dwie grupy badane:

- Chorzy z rakiem ustnej części gardła, z potwierdzoną immunohistochemicznie infekcją wirusem brodawczaka ludzkiego HPV (p16-dodatni) – I grupa chorych (55.4%, 129/233)
- Chorzy z rakiem ustnej części gardła, bez wykrytej immunohistochemicznie infekcji wirusem HPV (p16-ujemni) – II grupa chorych (44.6%, 104/233)

4.1. Retrospektywna analiza historii choroby

Celem przeprowadzenia analizy kliniczno-patologicznej stanowiącej podstawę niniejszej rozprawy doktorskiej zebrano dane 270 chorych diagnozowanych i leczonych w Wielkopolskim Centrum Onkologii w Poznaniu z powodu raka płaskonabłonkowego części ustnej gardła od 30.05.2007 do 31.10.2017 roku. Dane chorych zebrano retrospektywnie, wyszukując rozpoznania według klasyfikacji ICD o numerach C01, C05, C09, C10 i C14.2. Czternastu chorych zdyskwalifikowano z badania z powodu występowania guza pierwotnie w innej lokalizacji (na przykład w obrębie części krtaniowej gardła, naciekającego jedynie ustną część gardła) lub z powodu wcześniejszej historii leczenia onkologicznego. Kolejnych osiemnastu chorych wyłączono z badania z powodu niewystarczających informacji klinicznych (m.in. brak dostępu do opisu badań obrazowych czy brak informacji co do daty zgonu lub wystąpienia wznowy procesu nowotworowego). U pięciu chorych

zdyskwalifikowanych z badania nie odnaleziono archiwalnych blozków celem wykonania badań immunohistochemicznych i określenia statusu infekcji HPV.

Ostatecznie materiał obejmuje 233 chorych z rakiem płaskonabłonkowym części ustnej gardła, o znanym statusie infekcji wirusem brodawczaka ludzkiego HPV, nie leczonych wcześniej onkologicznie. Leczenie obejmowało leczenie radykalne i paliatywne; w tym leczenie chirurgiczne, radioterapię, chemioterapię oraz połączenie dwóch i więcej modalności. 146 chorych pierwotnie leczonych było chirurgicznie, co skutkuje posiadaniem wiedzy na temat patomorfologicznego stopnia zaawansowania nowotworu części ustnej gardła i/lub przerzutowych węzłów chłonnych. Pozostali chorzy oceniani byli według klinicznej klasyfikacji TNM na podstawie co najmniej dwóch badań obrazowych (USG, tomografia komputerowa, rezonans magnetyczny). Chorzy wyrazili świadomą zgodę na proponowane leczenie, zależne od lokalizacji i zaawansowania choroby, możliwości terapeutycznych, preferencji, a także stanu ogólnego chorych. Od 2010 roku w Wielkopolskim Centrum Onkologii wstępna propozycja leczenia opiniowana jest przez Konsylium Onkologiczne w czasie cotygodniowych zebrań. U chorych podczas ustalania planu leczenia nie brano pod uwagę statusu infekcji wirusem HPV.

Wszyscy chorzy pozostawali pod stałą opieką Poradni Laryngologicznej w Wielkopolskim Centrum Onkologii przez co najmniej 24 miesiące lub do momentu zgonu, jeśli wystąpił przed upływem tego okresu. Wizyty kontrolne u wszystkich chorych odbywały się co 4 do 8 tygodni przez pierwszy rok po zakończonym leczeniu onkologicznym, co 2 miesiące przez drugi rok i co 3 miesiące przez trzeci rok. Po zakończeniu trzech lat obserwacji stopniowo wydłużano okres pomiędzy wizytami do 6 miesięcy, część chorych skierowano na regularne wizyty w rejonowej Poradni Laryngologicznej. Ze wszystkimi żyjącymi chorymi przeprowadzono rozmowę telefoniczną, w celu potwierdzenia stanu zdrowia. Dane na temat zgonu i ewentualnej wznowy procesu nowotworowego uzyskano z systemu medycznego Eskulap oraz z wywiadu telefonicznego z rodzinami chorych.

4.2. Badania immunohistochemiczne celem oceny ekspresji białka p16

U wszystkich chorych wykonano immunohistochemiczne badanie p16 z wykorzystaniem zestawu CINtec® Histology Kit (Ventana Medical Systems, Roche) stosowanego według zaleceń producenta. Do badania wykorzystano preparaty

histologiczne z pierwotnego guza części ustnej gardła utrwalone w roztworze formaliny i zatopione w bloczkach parafinowych. Zgodnie z wytycznymi ósmej edycji klasyfikacji TNM UICC/AJCC próbka została oceniona jako p16-pozytywna, jeśli w co najmniej 75% komórek tkanki nowotworowej stwierdzono rozproszone barwienie preparatu o co najmniej umiarkowanej intensywności. Próbkę o niskiej reaktywności lub o niedostatecznej intensywności barwienia uznawane były za p16-ujemne. Ocena intensywności barwienia i odsetka barwionych komórek została przeprowadzona dla każdej próbki niezależnie przez dwóch doświadczonych badaczy z Zakładu Patologii Nowotworów Wielkopolskiego Centrum Onkologii. Badanie immunohistochemiczne świadczące o infekcji wirusem HPV wykonane było w momencie sporządzania raportu patomorfologicznego u 73.4% (171/233) chorych. U pozostałych 62 chorych wykorzystano materiały archiwalne znajdujące się w Zakładzie Patologii Nowotworów celem przeprowadzenia badania ekspresji białka p16.

4.3. Ponowna ocena stopnia zaawansowania według ósmej edycji klasyfikacji TNM

Celem przeprowadzenia porównania pomiędzy dwiema ostatnimi klasyfikacjami TNM UICC/AJCC: siódmą, z 2009 roku oraz ósmą, opublikowaną w 2017 roku, zebrano dane na temat stopnia zaawansowania wszystkich chorych w obu klasyfikacjach. U większości chorych stopień zaawansowania raka ustnej części gardła według siódmej edycji (TNM UICC/AJCC 7th edition) ustalony był w rozpoznaniu znajdującym się w historii choroby. Dodatkowo, u wszystkich chorych cechy T, N oraz M, a także wynikający z nich stopień zaawansowania choroby sprawdzono powtórnie na podstawie podręcznika AJCC Cancer Staging Manual, Seventh Edition⁸¹, biorąc pod uwagę wyniki badań obrazowych przeprowadzonych przed leczeniem oraz szczegółowe raporty patomorfologiczne u chorych leczonych operacyjnie. Uzupełniono wszystkie rozpoznania, a sporadycznie pojawiające się błędy w rozpoznaniach (wynikające przede wszystkim z braku dostępności raportu patomorfologicznego w momencie ustalania rozpoznania w historii choroby) skorygowano. W ten sposób uzyskano dane dotyczące stopnia zaawansowania u wszystkich chorych na podstawie siódmej edycji klasyfikacji TNM.

Następnie, po uzyskaniu wszystkich wyników badań immunohistochemicznych determinujących status infekcji wirusem brodawczaka ludzkiego, przeprowadzono

powtórna ocenę stopnia zaawansowania OPSCC u wszystkich chorych na podstawie ósmej edycji klasyfikacji. Ocenę z uwzględnieniem statusu infekcji wirusem HPV wykonano na podstawie podręcznika AJCC Cancer Staging Manual, Eighth Edition.⁸² W ósmej edycji klasyfikacji TNM występuje wyraźne rozgraniczenie na klasyfikację kliniczną i patologiczną, zarówno wśród raków części ustnej gardła p16-dodatnich, jak i p16-ujemnych. Zgodnie z zaleceniami podręcznika TNM, w przypadku posiadania raportu histopatologicznego, powstałego w wyniku badania materiału pobranego w czasie operacji chirurgicznej, stosowano klasyfikację patologiczną. W przypadku braku takiego raportu, co wynikało z zastosowania leczenia nieoperacyjnego, stosowano klasyfikację kliniczną. Następnie porównano otrzymane wyniki w zakresie cechy T oraz N (cecha M nie uległa zmianie pomiędzy ostatnimi edycjami klasyfikacji TNM), a także wynikającego z nich stopnia zaawansowania choroby nowotworowej.

4.4. Analiza statystyczna

Do opisu podstawowych, jednoczynnikowych różnic pomiędzy poszczególnymi grupami chorych został zastosowany test t Studenta dla zmiennych o rozkładzie normalnym oraz test Chi-kwadrat dla zmiennych o rozkładzie Poisson. Tam, gdzie testowano różnice pomiędzy kombinacją każdych dwóch elementów z wielu grup, zastosowano korektę Bonferroniego.

W celu przeprowadzenia jednoczynnikowej analizy czasu ogólnego przeżycia (OS) oraz czasu wolnego od progresji choroby (PFS) zostały zastosowane estymaty Kaplana-Meiera z 95% przedziałem ufności. OS było obliczane jako czas od pierwszej wizyty do zgonu, a PFS jako czas od pierwszej wizyty do zgonu, wznowy lub progresji. Uwzględniono dane ucięte. Istotność statystyczna była oceniona z użyciem testu log-rank lub testu log-rank pomiędzy każdą parą grup.

Do analiz wieloczynnikowych OS oraz PFS został użyty model proporcjonalnego hazardu Coxa. Z modelu wyłączone zostały zmienne na podstawie zbyt małej wariancji lub zbyt małej liczby obserwacji. Zgodność z założeniami modelu została oceniona na podstawie analizy skalowanych rezyduów Schoenfelda oraz krzywej LOWESS.

We wszystkich analizach jako krytyczną wartość p ustalono 0.05. Wszystkie analizy statystyczne zostały przeprowadzone za pomocą języka Python (wersja 3.9.7) oraz bibliotek języka Python: lifelines do analizy przeżycia oraz scipy do ogólnych analiz, a pomocniczo także pandas, seaborn, matplotlib, oraz pySankey.

Przeanalizowano następujące wartości: wiek, płeć, status infekcji wirusem HPV na podstawie ekspresji białka p16, lokalizację guza pierwotnego, liczbę przerzutowych węzłów chłonnych (na podstawie pooperacyjnego raportu patomorfologicznego), wielkość przerzutowego węzła chłonnego (na podstawie pooperacyjnego raportu patomorfologicznego lub badania obrazowego u nieoperowanych chorych), obecność naciekania poza torebkę węzła chłonnego, stronę występowania przerzutów do układu chłonnego szyi, cechy T, N i M, a także wynikający z nich stopień zaawansowania choroby nowotworowej według siódmej i ósmej edycji klasyfikacji TNM. W pracy przyjęto kryteria podziału liczby przerzutowych węzłów chłonnych wynikające z ósmej edycji klasyfikacji TNM, dzielące cechę N w klasyfikacji patologicznej dla p16-dodatnich OPSCC w zależności od występowania do czterech lub powyżej czterech przerzutowych węzłów chłonnych.

Protokół badania został zatwierdzony przez Komisję Bioetyczną Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu dnia 15 marca 2019 roku. Badania nie miały charakteru eksperymentu medycznego.

5. Wyniki badań

5.1. Charakterystyka badanej grupy chorych

Średni wiek chorych wynosił 59.4 roku (maksimum 81 lat; minimum 24 lata; SD 10.0 lat). Większość chorych leczona była chirurgicznie (63.9%, 149/233): u 56.2% (131/233) chorych wykonano chirurgiczną resekcję guza, natomiast limfadenektomię szyjną wykonano u 60.0% (140/233) chorych. Około jedną trzecią chorych (33.5%, 78/233) leczono pierwotnie z wykorzystaniem radioterapii lub radiochemioterapii. Łącznie, z uwzględnieniem terapii adjuwantowej, radioterapię zastosowano u 91.8% (214/233) chorych. Chemioterapię zastosowano u 57.9% chorych (135/233), w tym u 8 chorych neoadjuwantowo oraz u 2 jako samodzielną paliatywną chemioterapię. Pozostałych 125 chorych otrzymało chemioterapię w skojarzeniu z radioterapią w ramach leczenia uzupełniającego lub pierwotnej radiochemioterapii. U trzech chorych w związku ze złym stanem ogólnym oraz rozległym guzem zastosowano wyłącznie leczenie objawowe.

U 15.2% (36/233) chorych zastosowano leczenie jednomodalne, z czego u 12 chorych było to samodzielne leczenie chirurgiczne, a u dwóch samodzielna chemioterapia. Pozostałych 22 chorych leczonych przy użyciu jednej modalności otrzymało samodzielną radioterapię. Około połowa chorych (53.6%, 125/233) otrzymała leczenie dwumodalne, w tym 65 chorych leczenie operacyjne z uzupełniającą radioterapią, a 55 radiochemioterapię. U 29.6% (69/233) chorych niezbędne było leczenie trójmodalne z wykorzystaniem chirurgii, radioterapii i chemioterapii. W związku z zastosowanym leczeniem, u 62.2% (145/233) chorych zastosowano klasyfikację kliniczną podczas ponownej oceny według ósmej edycji klasyfikacji TNM, a u 37.8% (88/233) chorych klasyfikację patologiczną. Lokalizacja guza w obrębie ustnej części gardła obejmowała najczęściej migdałek podniebienny (64.4%, 150/233), następnie nasadę języka (18.5%, 43/233), podniebienie miękkie (11.6%, 27/233) oraz inne umiejscowienia (5.6%, 13/233). Charakterystyka całej badanej kohorty chorych, z uwzględnieniem podziału na grupę I oraz II zaprezentowana jest w poniższej tabeli.

Tabela IV. Charakterystyka obu badanych grup chorych w zakresie czynników omawianych w pracy. W nawiasach podano wartości procentowe. Interpretacja: mężczyźni stanowią 69.1% wszystkich badanych chorych. p16-dodatni mężczyźni stanowią 49.7% wszystkich mężczyzn, podczas gdy p16-ujemni mężczyźni stanowią 50.3% wszystkich mężczyzn.

czynnik	przedział wartości	liczba chorych (%)	chorzy p16-dodatni (%)	chorzy p16-ujemni (%)
wiek (lata)	średnia w momencie rozpoznania	59.4 ±10.0	60.0 ±10.9	58.7 ±8.7
płeć	wszyscy	233 (100.0)	129 (55.4)	104 (44.6)
	męczyzna	161 (69.1)	80 (49.7)	81 (50.3)
	kobieta	72 (30.9)	49 (68.1)	23 (31.9)
lokalizacja	migdałek podniebienny	150 (64.4)	98 (65.3)	52 (34.7)
	nasada języka	43 (18.5)	22 (51.2)	21 (48.8)
	podniebienie miękkie	27 (11.6)	3 (11.1)	24 (88.9)
	inna lokalizacja	13 (5.6)	6 (46.1)	7 (53.8)
wznowa	bez cech wznowy wznowa ¹	141 (60.5)	92 (65.2)	49 (34.8)
		suma	21 (46.7)	24 (53.3)
		miejskowa	9	8
		regionalna	3	10
		odległa	11	6
	przetrwwały guz/brak radykalnego leczenia	47 (20.2)	16 (34.0)	31 (66.0)
klasyfikacja	kliniczna	88 (37.8)	41 (46.6)	47 (53.4)
	patologiczna	145 (62.2)	88 (60.7)	57 (39.3)
liczba przerzutowych węzłów chłonnych	0	34 (24.8)	10 (29.4)	24 (70.6)
	1-4	91 (66.4)	64 (70.3)	27 (29.7)
	≥5	12 (8.8)	9 (75.0)	3 (25.0)
wielkość przerzutowego węzła chłonnego (mm)	0-30	84 (45.9)	46 (54.8)	38 (45.2)
	31-60	83 (45.3)	55 (66.3)	28 (33.7)
	≥60	16 (8.7)	9 (56.3)	7 (43.8)
naciekanie poza torebkę węzła chłonnego ENE	ENE+	61 (26.2)	34 (55.7)	27 (44.3)
	ENE-	172 (73.8)	95 (55.2)	77 (44.8)
T według 7 i 8 edycji TNM	1	64 (27.5)	47 (73.4)	17 (26.6)
	2	87 (37.3)	49 (56.3)	38 (43.7)
	3	42 (18.0)	21 (50.0)	21 (50.0)
	4	40 (17.2)	12 (30.0)	28 (70.0)

¹ jednocześnie mógł wystąpić więcej, niż jeden rodzaj wznowy

N według 7 edycji TNM	0	49 (21.0)	18 (36.7)	31 (63.3)
	1	28 (12.0)	16 (57.1)	12 (42.9)
	2	128 (54.9)	81 (63.3)	47 (36.7)
	3	28 (12.0)	14 (50.0)	14 (50.0)
N według 8 edycji TNM	0	49 (21.0)	18 (36.7)	31 (63.3)
	1	92 (39.5)	80 (87.0)	12 (13.0)
	2	60 (25.8)	24 (40.0)	36 (60.0)
	3	32 (13.7)	7 (21.9)	25 (78.1)
M według 7 i 8 edycji TNM	0	228 (97.9)	127 (55.7)	101 (44.3)
	1	5 (2.1)	2 (40.0)	3 (60.0)
staging według 7 edycji TNM	1	10 (4.3)	4 (40.0)	6 (60.0)
	2	28 (12.0)	8 (28.6)	20 (71.4)
	3	31 (13.3)	19 (61.3)	12 (38.7)
	4	164 (70.4)	98 (59.8)	66 (40.2)
staging według 8 edycji TNM	1	84 (36.1)	78 (92.9)	6 (7.1)
	2	50 (21.5)	30 (60.0)	20 (40.0)
	3	32 (13.7)	20 (62.5)	12 (37.5)
	4	67 (28.8)	1 (1.5)	66 (98.5)

W I grupie chorych 62.0% (80/129) stanowili mężczyźni, a 38.0% (49/129) kobiety. Średni wiek chorych w momencie rozpoznania choroby wynosił 60.0 lat (maksimum 81 lat, minimum 24 lata; SD 10.9 lat). Lokalizacja guza w obrębie ustnej części gardła u chorych p16-dodatnich obejmowała najczęściej migdałek podniebienny (76.0%, 98/129), nasadę języka (17.1%, 22/129), inne umiejscowienia (4.7%, 6/129) oraz podniebienie miękkie (2.3%, 3/129). U 68.2% (88/129) chorych leczonych chirurgicznie znany był szczegółowy raport patomorfologiczny prezentujący dane na temat zaawansowania patologicznego guza pierwotnego i ewentualnych przerzutowych węzłów chłonnych. Wobec tego, podczas oceny tych chorych według ósmej edycji klasyfikacji TNM zastosowano klasyfikację patologiczną. U pozostałych 31.8% (41/129) chorych zastosowano klasyfikację kliniczną, opierającą się na ocenie według badań obrazowych sprzed leczenia.

Wszyscy chorzy ocenieni byli według siódmej edycji klasyfikacji TNM UICC/AJCC z 2009 roku. Wczesne zaawansowanie miejscowe choroby (T1 i T2 wg siódmej edycji TNM) stwierdzono u 74.4% (96/129) chorych. Zaawansowany miejscowo nowotwór (T3 i T4 wg siódmej edycji TNM) wykazano u 25.6% (33/129) chorych. U 14.0% chorych nie stwierdzono przerzutów do układu chłonnego szyi. U pozostałych chorych na podstawie biopsji cienkoigłowej lub preparatu histopatologicznego rozpoznano co najmniej jeden przerzutowy węzeł chłonny w obrębie szyi.

Czas obserwacji chorych wynosił średnio 70.5 miesiąca (minimum 2 miesiące, maksimum 161 miesięcy; SD 42.9 miesiąca).

W II grupie chorych 77.9% (81/104) stanowili mężczyźni, a 22.1% (23/104) kobiety. Średni wiek chorych w momencie rozpoznania choroby wynosił 58.7 lat (maksimum 75 lat, minimum 29 lat; SD 8.7 lat). Nie wykazano różnicy w wieku rozpoznania choroby pomiędzy I a II grupą ($p=0.30$). Lokalizacja guza w obrębie ustnej części gardła u chorych p16-ujemnych obejmowała najczęściej migdałek podniebienny (50.0%, 52/104), podniebienie miękkie (23.1%, 24/104), nasadę języka (20.2%, 21/104) oraz inne umiejscowienia (6.7%, 7/104). U 54.8% (57/104) chorych sporządzono szczegółowy raport patomorfologiczny warunkujący zastosowanie klasyfikacji patologicznej. U pozostałych 45.2% (47/104) chorych zastosowano klasyfikację kliniczną.

Wszyscy chorzy z grupy II również ocenieni byli według siódmej edycji klasyfikacji TNM UICC/AJCC z 2009 roku. Wczesne zaawansowanie miejscowe choroby (T1 i T2 wg siódmej edycji klasyfikacji TNM) wykazano u 52.9% (55/104) chorych. Zaawansowany miejscowo nowotwór (cecha T3 i T4 wg siódmej edycji TNM) stwierdzono u 47.1% (94/104) chorych. U 29.8% chorych nie stwierdzono przerzutów do układu chłonnego szyi, u pozostałych chorych obecność przerzutów do węzłów chłonnych szyi została potwierdzona histopatologicznie. Czas obserwacji chorych wynosił średnio 44.7 miesiąca (minimum 1 miesiąc, maksimum 148 miesięcy; SD 40.0 miesiąca).

Tabela V. Przyporządkowanie stopni zaawansowania klinicznego według siódmej i ósmej edycji klasyfikacji TNM w p16-ujemnych oraz p16-dodatnich rakach części ustnej gardła.

		chorzy p16-dodatni (%)	chorzy p16-ujemni (%)
T według 7 edycji TNM	1	47 (36.4)	17 (16.3)
	2	49 (38.0)	38 (36.5)
	3	21 (16.3)	21 (20.2)
	4	suma	12 (9.3)
		4a	11 (8.5)
		4b	1 (0.8)
N według 7 edycji TNM	0	18 (14.0)	31 (29.8)
	1	16 (12.4)	12 (11.5)
	2	suma	81 (62.8)
		2a	17 (13.2)
		2b	51 (39.5)
		2c	13 (10.1)
	3	14 (10.9)	14 (13.5)
T według 8 edycji TNM	1	47 (36.4)	17 (16.3)
	2	49 (38.0)	38 (36.5)
	3	21 (16.3)	21 (20.2)
	4	suma	12 (9.3)
		4	12 (9.3)
		4a	-
		4b	-
N według 8 edycji TNM	0	18 (14.0)	31 (29.8)
	1	80 (62.0)	12 (11.5)
	2	suma	24 (18.6)
		2	24 (18.6)
		2a	-
		2b	-
		2c	-
	3	suma	7 (5.4)
		3	7 (5.4)
		3a	-
		3b	-
M według 7 i 8 edycji TNM	0	127 (98.4)	101 (97.1)
	1	2 (1.6)	3 (2.9)

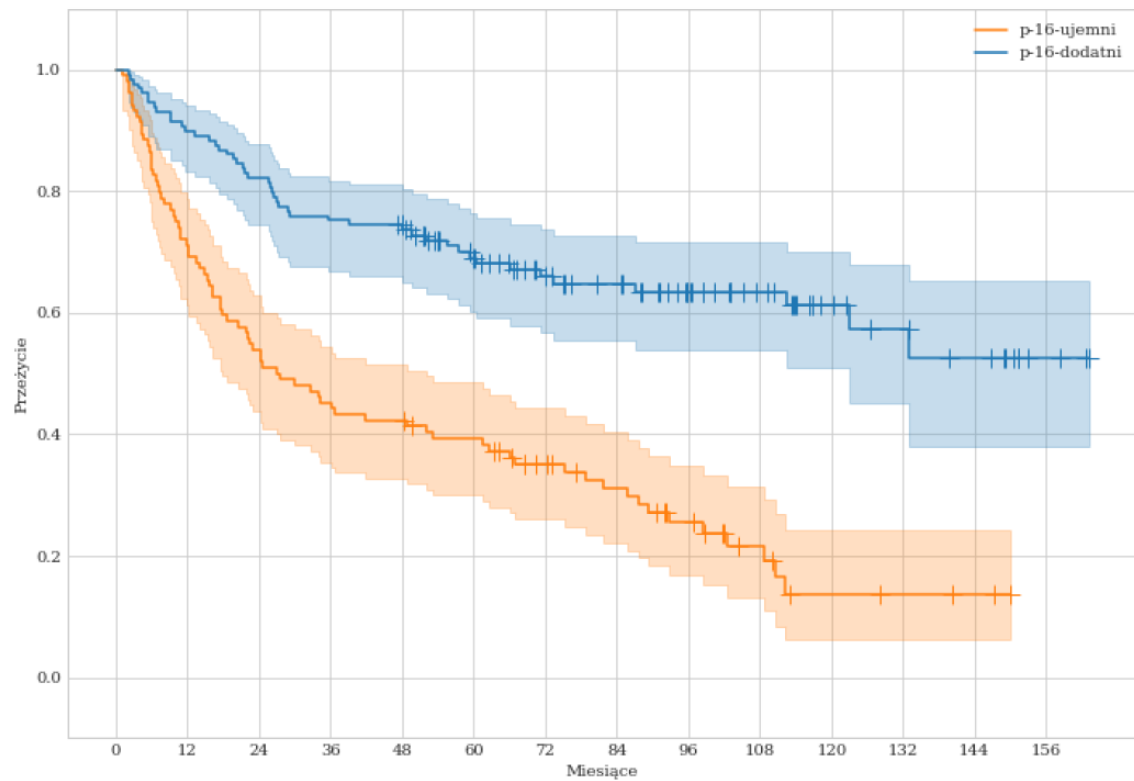
staging według 7 edycji TNM	1		4 (3.1)	6 (5.8)
	2		8 (6.2)	20 (19.2)
	3		19 (14.7)	12 (11.5)
	4	suma	98 (76.0)	66 (63.5)
		4a	82 (63.6)	48 (46.2)
		4b	15 (11.6)	15 (14.4)
		4c	1 (0.8)	3 (2.9)
staging według 8 edycji TNM	1		78 (60.5)	6 (5.8)
	2		30 (23.3)	20 (19.2)
	3		20 (15.5)	12 (11.5)
	4	suma	1 (0.8)	66 (63.5)
		4	1 (0.8)	-
		4a	-	38 (36.5)
		4b	-	25 (24.0)
		4c	-	3 (2.9)

5.2. Czas przeżycia chorych w zależności od statusu infekcji wirusem HPV

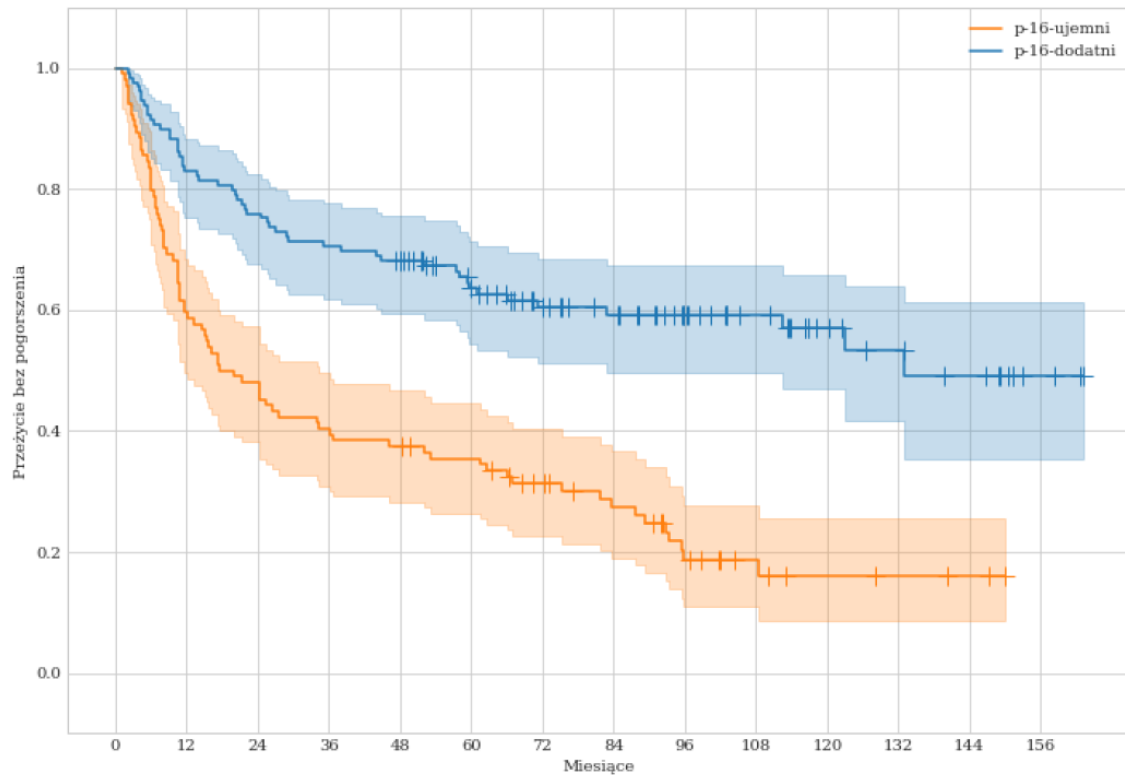
W badaniu oceniono 233 chorych ze znanym statusem infekcji wirusem brodawczaka ludzkiego. U 55.4% chorych (129/233, I grupa chorych) rozpoznano OPSCC zależny od infekcji wirusem HPV, u pozostałych 44.6% (104/233, II grupa chorych) badanych z OPSCC nie stwierdzono ekspresji białka p16. Średni czas ogólnego przeżycia (OS) w I grupie chorych wyniósł 70.5 miesięcy (mediana 66 miesięcy, maksimum 161 miesięcy; minimum dwa miesiące; SD 42.9 miesięcy), podczas gdy średnie OS w II grupie chorych wyniosło 44.7 miesiąca (mediana 27 miesięcy, maksimum 148 miesięcy; minimum jeden miesiąc; SD 40.0 miesięcy).

Odsetek 3-letniego OS w całej badanej kohorcie wyniósł 62%, natomiast odsetek 5-letniego przeżycia wyniósł 56%. Wykazano statystycznie istotną różnicę w OS obu grup chorych, na korzyść chorych p16-dodatnich ($p < 0.005$, test log rank). W I grupie odsetek 3-letniego przeżycia wyniósł 75%, a 5-letniego przeżycia 69%. W II grupie odsetek 3-letniego przeżycia wyniósł 45%, a 5-letniego przeżycia 39% ($p < 0.005$). (Rycina 4.).

Odsetek 3-letniego PFS w całej badanej kohorcie wyniósł 57%, natomiast odsetek 5-letniego przeżycia wyniósł 51%. Wykazano statystycznie istotną różnicę w PFS obu grup chorych, na korzyść chorych p16-dodatnich ($p < 0.005$, test log rank). W I grupie odsetek 3-letniego przeżycia wyniósł 71%, a 5-letniego przeżycia 64%. W II grupie odsetek 3-letniego przeżycia wyniósł 40%, a 5-letniego przeżycia 35% ($p < 0.005$). (Rycina 5.)



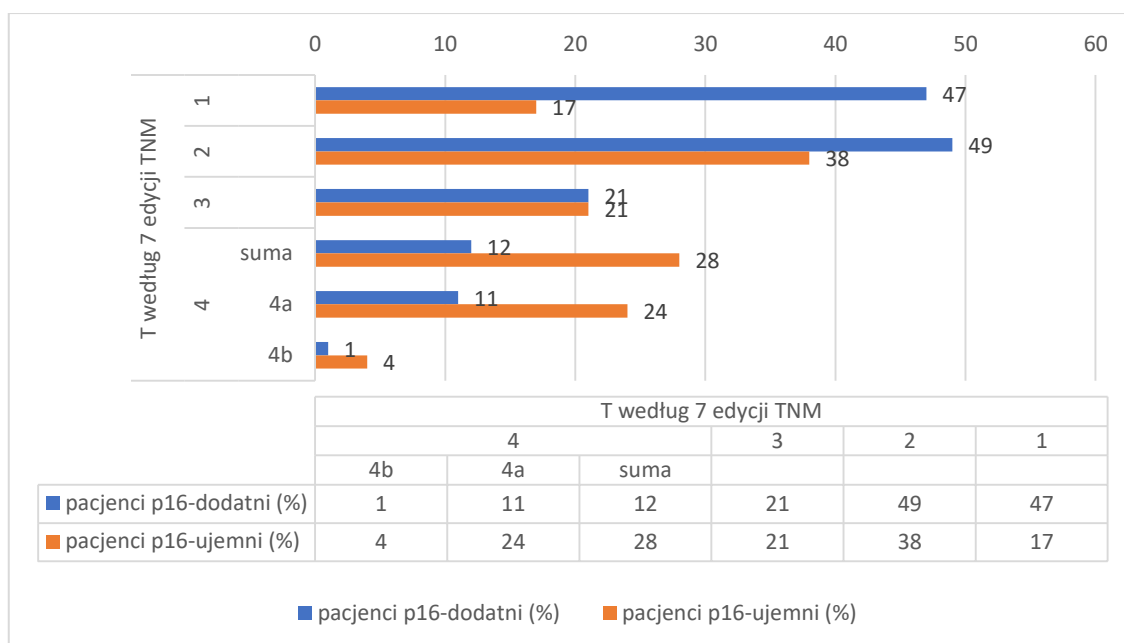
Rycina 4. Krzywe czasu ogólnego przeżycia OS w I grupie badanych (p16-dodatnich – niebieski kolor) oraz II grupie badanych (p16-ujemnych, pomarańczowy kolor). Wykres estymaty Kaplana-Maiera.



Rycina 5. Krzywe czasu wolnego od progresji PFS w I grupie badanych (p16-dodatnich – niebieski kolor) oraz II grupie badanych (p16-ujemnych, pomarańczowy kolor). Wykres estymaty Kaplana-Maiera.

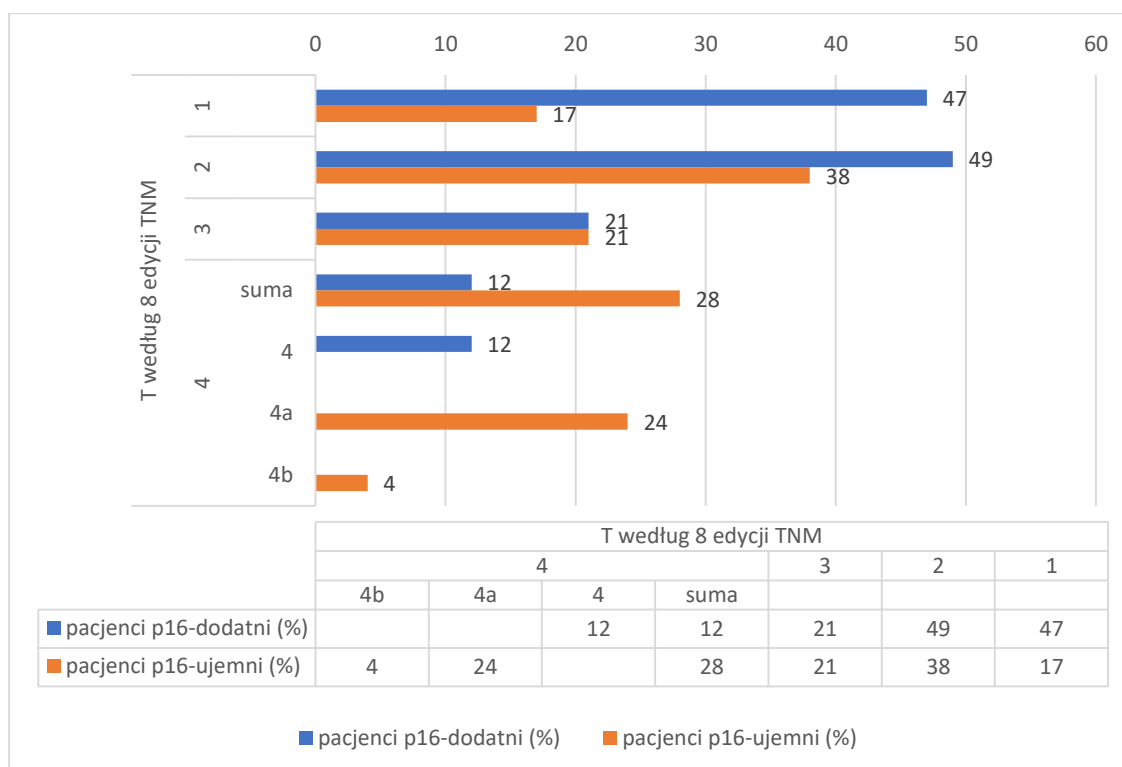
5.3. Stopnie zaawansowania choroby według siódmej i ósmej edycji klasyfikacji TNM

U wszystkich chorych wykonano ponowną ocenę według ósmej edycji klasyfikacji TNM UICC/AJCC z 2017 roku. Porównując otrzymane wyniki pod względem cechy T, nie stwierdzono zasadniczych zmian pomiędzy obiema edycjami klasyfikacji. Według siódmej edycji, cechę T1 stwierdzono u 27.5% (64/233), T2 u 37.3% (87/233), T3 u 18.0% (42/233), a T4 u 17.2% (40/233) badanych. (Rycina 6.)



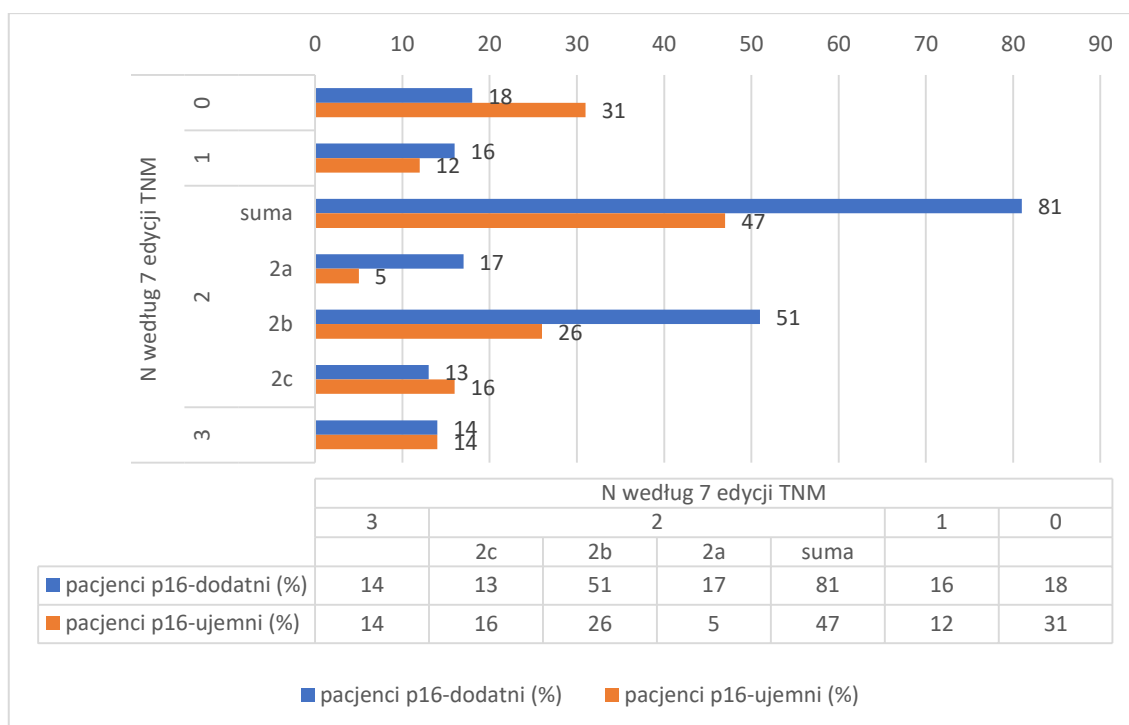
Rycina 6. Przyporządkowanie cechy T dotyczącej miejscowego zaawansowania raka płaskonabłonkowego ustnej części gardła w ocenie według siódmej edycji klasyfikacji TNM z 2009 roku.

Po ponownej ocenie grupy wszystkich chorych według ósmej edycji klasyfikacji TNM liczba chorych przyporządkowanych do poszczególnych stopni cechy T nie różniła się wobec liczby chorych przypisanych do stopni cechy T według siódmej edycji. (Rycina 7.) Jedyna różnica wystąpiła w liczebności podgrup czwartego stopnia cechy T: cechy T4 (według ósmej edycji, w klasyfikacji patologicznej nie stosuje się obecnie podgrup) oraz T4a i T4b (stosowanych obecnie wyłącznie w klasyfikacji klinicznej).



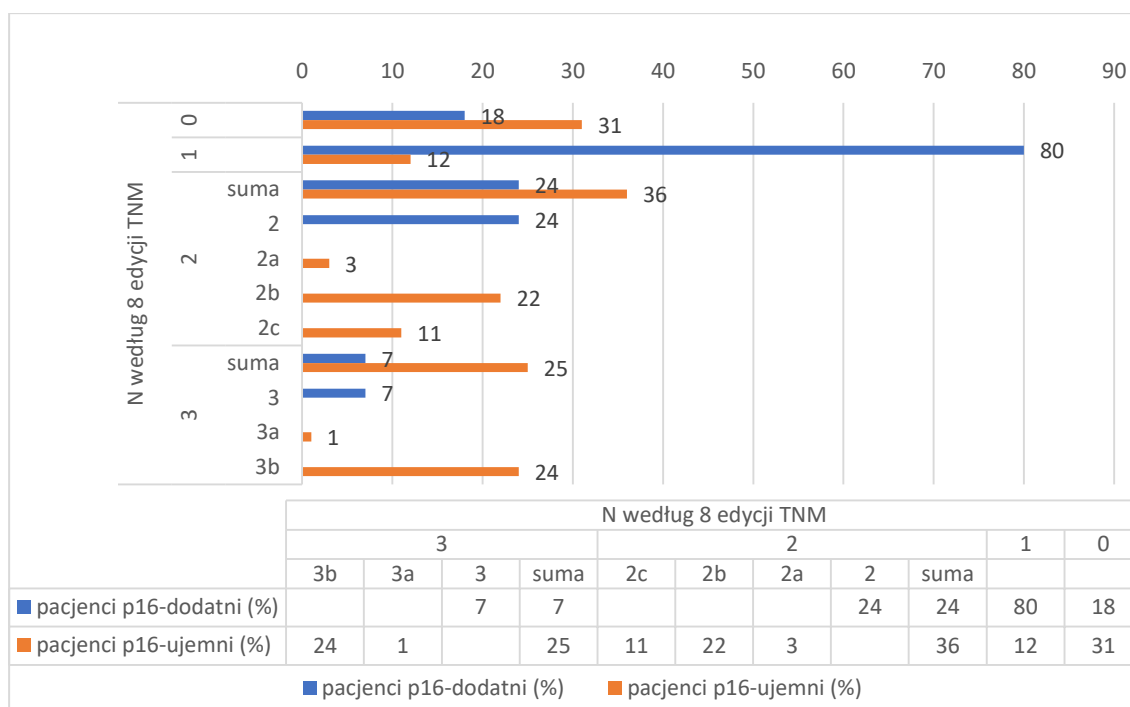
Rycina 7. Przyporządkowanie cechy T dotyczącej miejscowego zaawansowania raka płaskonabłonkowego ustnej części gardła w ocenie według ósmej edycji klasyfikacji TNM z 2017 roku.

Zasadnicze zmiany pomiędzy obiema edycjami zaobserwowano w przyporządkowaniu cechy N, świadczącej o zaawansowaniu regionalnym choroby nowotworowej. Według siódmej edycji, cechę N0 stwierdzono u 21.0% (49/233), N1 u 12.0% (28/233), N2 u 54.9% (128/233), a N3 u 12.0% (28/233) chorych. Ponad połowie chorych przypisano tym samym cechę N2, warunkującą według siódmej edycji klasyfikacji co najmniej stopień zaawansowania nowotworu IVa. U co trzeciego chorego (33.0%, 77/233) stwierdzono cechę N2b, której przypisywano chorych z co najmniej dwoma przerzutowymi węzłami chłonnymi po jednej stronie szyi. (Rycina 8.)



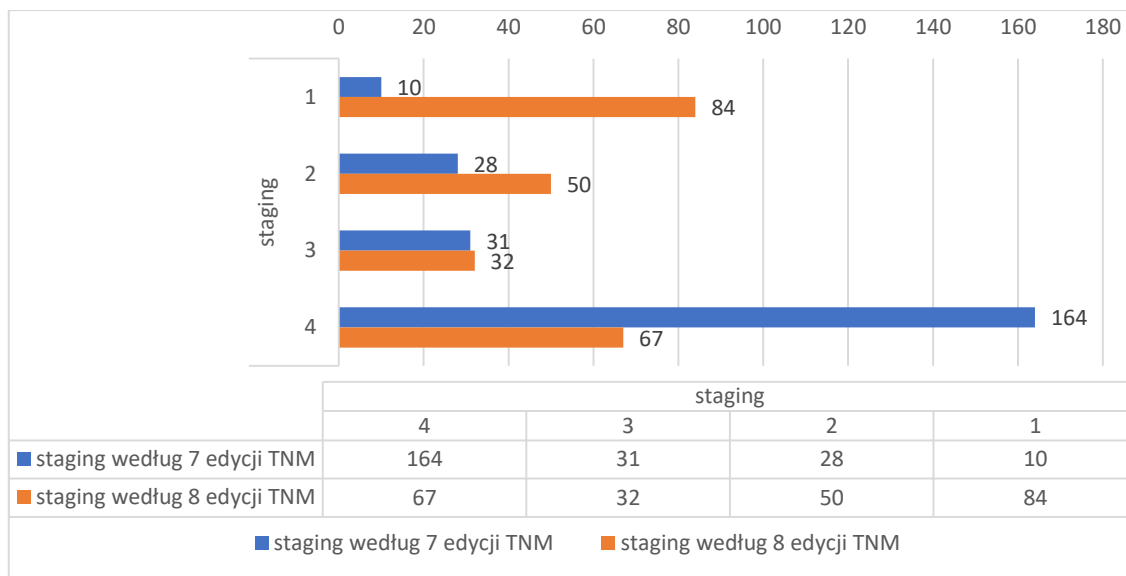
Rycina 8. Przyporządkowanie cechy N dotyczącej regionalnego zaawansowania raka płaskonabłonkowego ustnej części gardła w ocenie według siódmej edycji klasyfikacji TNM z 2009 roku.

Według ósmej edycji, cechę N0 stwierdzono u 21.0% (49/233), N1 u 39.5% (92/233), N2 u 25.8% (60/233), a N3 u 13.7% (32/233) chorych. Tym samym liczba chorych z przypisaną cechą N1 według ósmej edycji klasyfikacji TNM potroiła się względem grupy z cechą N1 według edycji siódmej (odpowiednio 92 i 28 chorych), a liczba chorych z cechą N2 według ósmej edycji klasyfikacji TNM zmniejszyła się ponad dwukrotnie względem grupy z cechą N2 według edycji siódmej (odpowiednio 60 i 128 chorych). Podczas oceny według ósmej edycji klasyfikacji przybyło czterech chorych z przypisaną cechą N3 (32 chorych względem 28 chorych według siódmej edycji). Fakt ten wynika z przypisywania chorym p16-ujemnym cechy N3b w przypadku potwierdzenia naciekania poza torebkę węzła chłonного według klinicznej klasyfikacji ósmej edycji a także w przypadku potwierdzenia naciekania poza torebkę węzła chłonного przy co najmniej dwóch przerzutowych węzłach chłonnych według klasyfikacji patologicznej ósmej edycji. Sumarycznie, cechę N zmieniono pomiędzy edycjami klasyfikacji u 81 chorych: u 14 na wyższą i u 67 na niższą względem siódmej edycji. (Rycina 9.)



Rycina 9. Przyporządkowanie cechy N dotyczącej regionalnego zaawansowania raka płaskonabłonkowego ustnej części gardła w ocenie według ósmej edycji klasyfikacji TNM z 2017 roku.

Według siódmej edycji klasyfikacji, I stopień zaawansowania stwierdzono u 4.3% (10/233), II u 12.0% (28/233), III u 13.3% (31/233), a IV u 70.4% (164/233) chorych. Wczesny i średni (I i II) stopień zaawansowania choroby nowotworowej stwierdzono jedynie u 16.3% (38/233) chorych. Zaawansowaną chorobę nowotworową (III i IV stopień zaawansowania) rozpoznano u 83.7% (195/233) badanych. Po ponownej ocenie kohorty chorych według ósmej edycji klasyfikacji TNM UICC/AJCC z 2017 roku, I stopień zaawansowania rozpoznano u 36.1% (84/233), II u 21.5% (50/233), III u 13.7% (32/233), a IV u 28.8% (67/233) chorych. Wczesny i średni (I i II) stopień zaawansowania choroby nowotworowej stwierdzono u 57.5% (134/233) chorych. Zaawansowaną chorobę nowotworową (III i IV stopień zaawansowania) rozpoznano u 42.5% (99/233) badanych. (Rycina 10.)

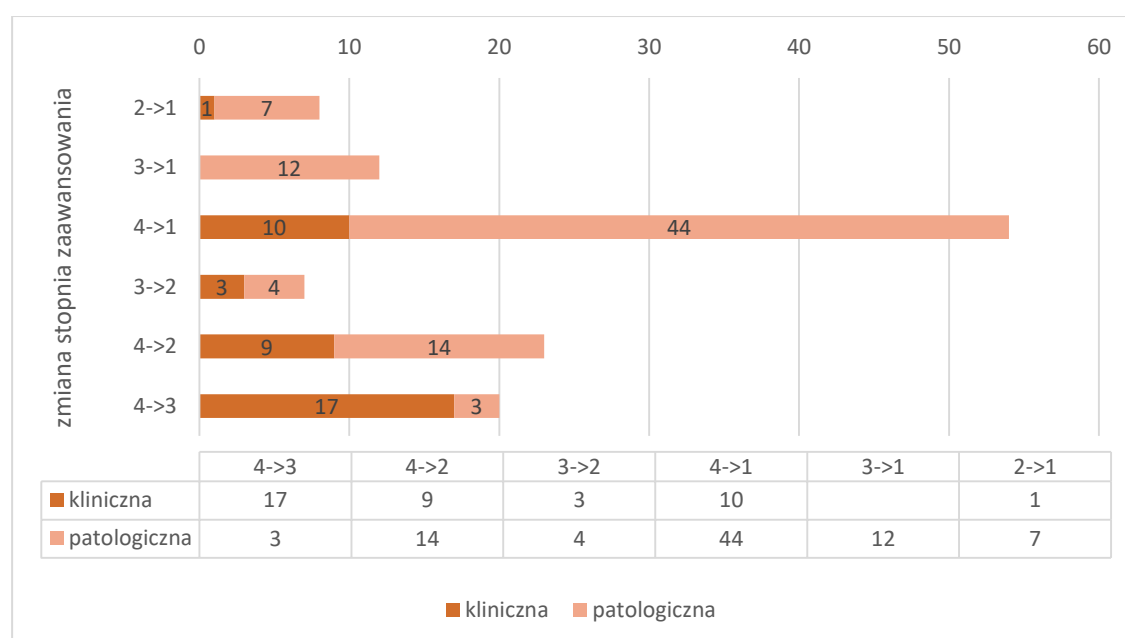


Rycina 10. Przyporządkowanie poszczególnych stopni zaawansowania raka płaskonabłonkowego ustnej części gardła według siódmej oraz ósmej edycji klasyfikacji TNM.

Wobec licznych zmian cechy N pomiędzy dwiema edycjami klasyfikacji TNM oraz innej zależności stopnia zaawansowania choroby od cech T i N według ósmej edycji klasyfikacji dla chorych p16-dodatnich, podczas ponownej oceny chorych według ósmej edycji klasyfikacji TNM UICC/AJCC u 53.2% (124/233) chorych zmieniono stopień zaawansowania choroby względem edycji siódmej. Zmiana ta dotyczyły wyłącznie I grupy badanych (chorych p16-dodatnich), a wszystkie odnotowane zmiany odbyły się wyłącznie w kierunku niższych stopni zaawansowania choroby (ang. *downstaging*). W ten sposób *downstaging* stwierdzono u 96.1% (124/129) chorych p16-dodatnich po zastosowaniu kryteriów nowej, ósmej edycji klasyfikacji TNM. Zmianę stopnia zaawansowania na niższy stwierdzono u 84 chorych z grupy I ocenianych według klasyfikacji patologicznej oraz 40 ocenianych według klasyfikacji klinicznej. Każdy z czterech p16-dodatnich chorych, u których nie stwierdzono *downstagingu*, rozpoznany był z pierwszym stopniem zaawansowania (T1N0M0) według klasyfikacji patologicznej. Najczęściej występująca zmiana stopnia zaawansowania (43.5%, 54/124 chorych, u których zanotowano *downstaging*) zachodziła pomiędzy czwartym, a pierwszym stopniem zaawansowania, w tym u 44 chorych ocenianych według klasyfikacji patologicznej i 10 ocenianych według klasyfikacji klinicznej. U 17.1% (23/124) chorych, u których zmieniono stopień zaawansowania choroby, zmiana zaszła pomiędzy czwartym, a drugim stopniem, w tym

u 14 chorych ocenianych według klasyfikacji patologicznej i 9 ocenianych według klasyfikacji klinicznej. U następnych 16.1% (20/124) chorych zanotowano zmianę pomiędzy czwartym, a trzecim stopniem zaawansowania, w tym u 3 chorych ocenianych według klasyfikacji patologicznej i 17 ocenianych według klasyfikacji klinicznej. Zmiany stopnia zaawansowania ze stopni trzeciego i drugiego (według siódmej edycji) na niższe wystąpiły u 21.8% (27/124) chorych, w tym u 23 chorych ocenianych według klasyfikacji patologicznej i 4 ocenianych według klasyfikacji klinicznej. Zmiany stopni zaawansowania występowały zatem częściej u chorych ocenianych według klasyfikacji patologicznej, z wyjątkiem zmiany ze stopnia czwartego na trzeci, gdzie większość chorych stanowili chorzy oceniani według klasyfikacji klinicznej. (Rycina 11.)

W grupie II badanych (chorych p16-ujemnych) nie stwierdzono zmiany stopnia zaawansowania choroby nowotworowej u żadnego chorego. U 9.6% (10/104) chorych z II grupy stwierdzono jedynie zmianę podgrupy w obrębie tego samego stopnia zaawansowania (ze stopnia 4a na 4b), na co wpłynęło stwierdzenie u tych chorych naciekania poza torebkę węzłów chłonnych, co warunkowało zwiększenie wartości cechy N z N2 do N3b.



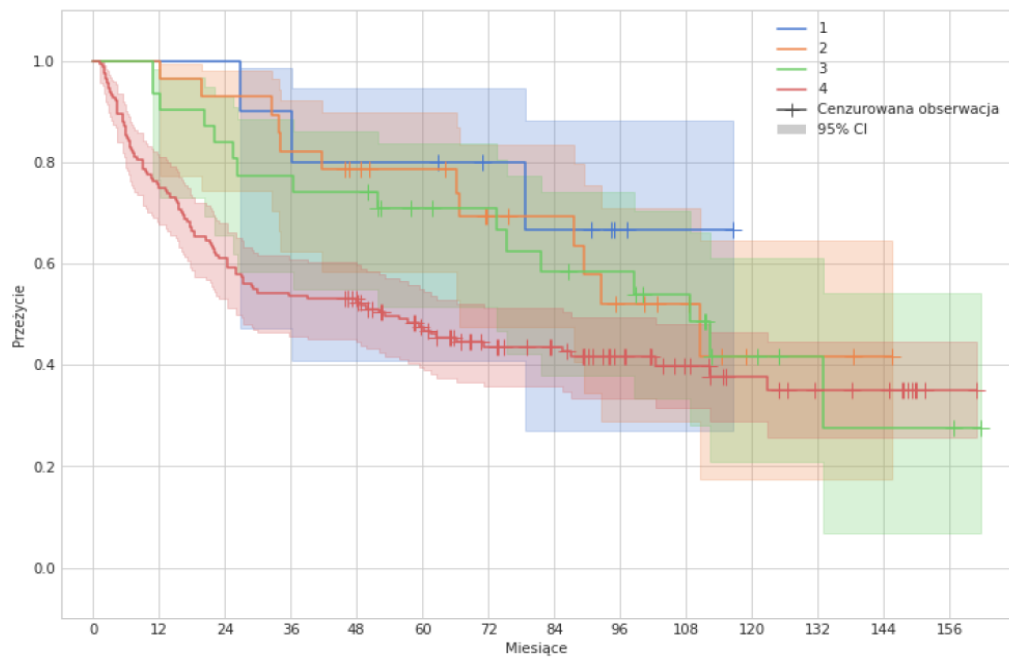
Rycina 11. Zmiana stopnia zaawansowania (downstaging) pomiędzy siódmą, a ósmą edycją klasyfikacji TNM u chorych z rakiem płaskonabłonkowym ustnej części gardła. Uwzględniono podział na klasyfikację kliniczną oraz patologiczną ósmej edycji klasyfikacji TNM.

5.4. Czas przeżycia chorych w zależności od stopnia zaawansowania choroby według siódmej i ósmej edycji klasyfikacji TNM

Na podstawie uzyskanych wyników czasu ogólnego przeżycia obu analizowanych grup chorych wyznaczono krzywe czasu ogólnego przeżycia dla wszystkich chorych stratyfikowanych według poszczególnych stopni zaawansowania choroby nowotworowej według siódmej i ósmej edycji klasyfikacji TNM. Podczas stosowania siódmej edycji klasyfikacji TNM, krzywe dla OS nie zostały istotnie odseparowane od siebie, a grupy chorych z I, II lub III stopniem zaawansowania choroby po trzech latach obserwacji rokowały w pewnych punktach obserwacji gorzej, niż grupy chorych z wyższym stopniem zaawansowania.

Dla siódmej edycji klasyfikacji TNM, 3-letnie OS wynosiło dla I, II, III i IV stopnia zaawansowania odpowiednio: 90%, 82%, 77% i 54%, podczas gdy 5-letnie OS wynosiło dla I, II, III i IV stopnia zaawansowania odpowiednio: 80%, 79%, 71% i 48%. W teście log rank statystycznie istotną różnicę w OS stwierdzono jedynie pomiędzy drugim, a czwartym stopniem zaawansowania choroby. Różnice te nie były zauważalne pomiędzy żadnymi innymi stopniami zaawansowania. (Rycina 12.)

Staging (7thAJCC)



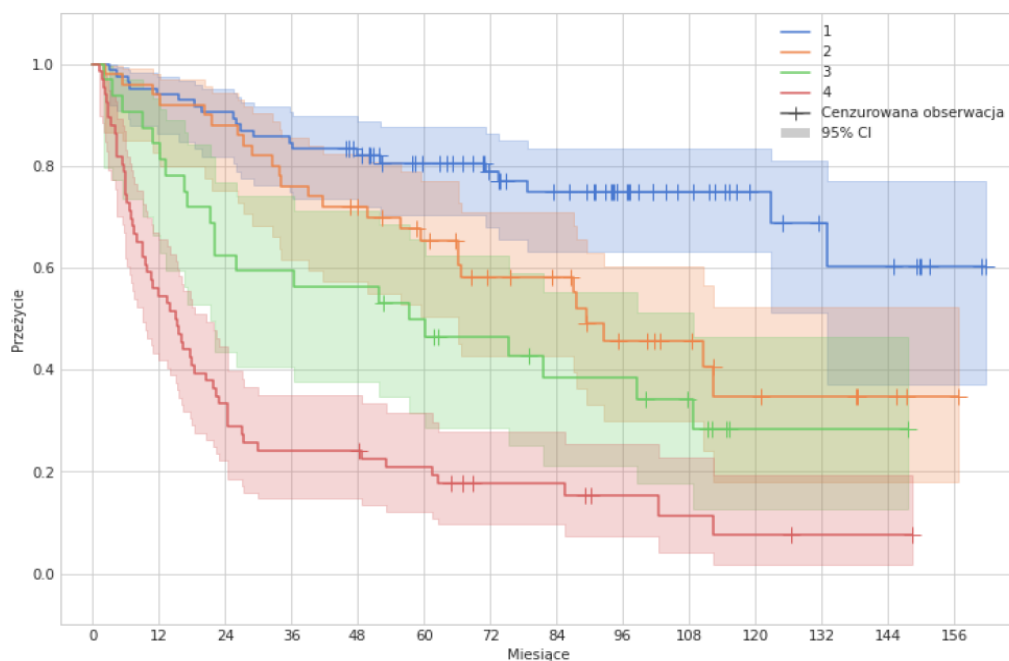
Rycina 12. Graficzne przedstawienie odsetka OS dla chorych przynależących do poszczególnych stopni zaawansowania choroby nowotworowej według siódmej edycji klasyfikacji TNM z 2009 roku. Kolorem niebieskim zaznaczono pierwszy stopień zaawansowania, pomarańczowym – drugi, zielonym – trzeci, czerwonym – czwarty stopień. Jaśniejszym odcieniem powyższych kolorów zaznaczono 95% przedział ufności.

Tabela VI. Siódma edycja klasyfikacji TNM – ocena różnicy OS pomiędzy chorymi przynależącymi do poszczególnych stopni zaawansowania. Istotna statystycznie różnica ($p < 0.05$) w całkowitym przeżyciu wystąpiła jedynie pomiędzy chorymi przypisanymi do drugiego, a chorymi przypisanymi do czwartego stopnia zaawansowania choroby, podczas oceny według siódmej edycji klasyfikacji. Brak statystycznej różnicy występującej pomiędzy pozostałymi stopniami zaawansowania choroby. Test log rank.

		test_statistic	p	-log2(p)
1.0	2.0	0.43	0.51	0.97
	3.0	0.52	0.47	1.09
	4.0	3.11	0.08	3.69
2.0	3.0	0.12	0.73	0.45
	4.0	4.13	0.04	4.57
3.0	4.0	2.34	0.13	2.99

Podczas zastosowania ósmej edycji klasyfikacji TNM, krzywe czasu ogólnego przeżycia dla wszystkich chorych stratyfikowanych według poszczególnych stopni zaawansowania choroby nowotworowej zostały wyraźnie odseparowane od siebie. Dla ósmej edycji klasyfikacji TNM, 3-letnie OS wynosiło dla I, II, III i IV stopnia zaawansowania odpowiednio: 85%, 76%, 59% i 24%, podczas gdy 5-letnie OS wynosiło dla I, II, III i IV stopnia zaawansowania odpowiednio: 81%, 66%, 50% i 21%. W teście log rank wykazano statystycznie istotną różnicę w OS pomiędzy prawie każdymi stopniami zaawansowania: pomiędzy I, a II stopniem, pomiędzy I, a III stopniem, pomiędzy I, a IV stopniem, pomiędzy II, a IV stopniem oraz pomiędzy III, a IV stopniem zaawansowania. Nie wykazano jedynie różnicy w OS pomiędzy II, a III stopniem zaawansowania choroby.

Staging (8thAJCC)

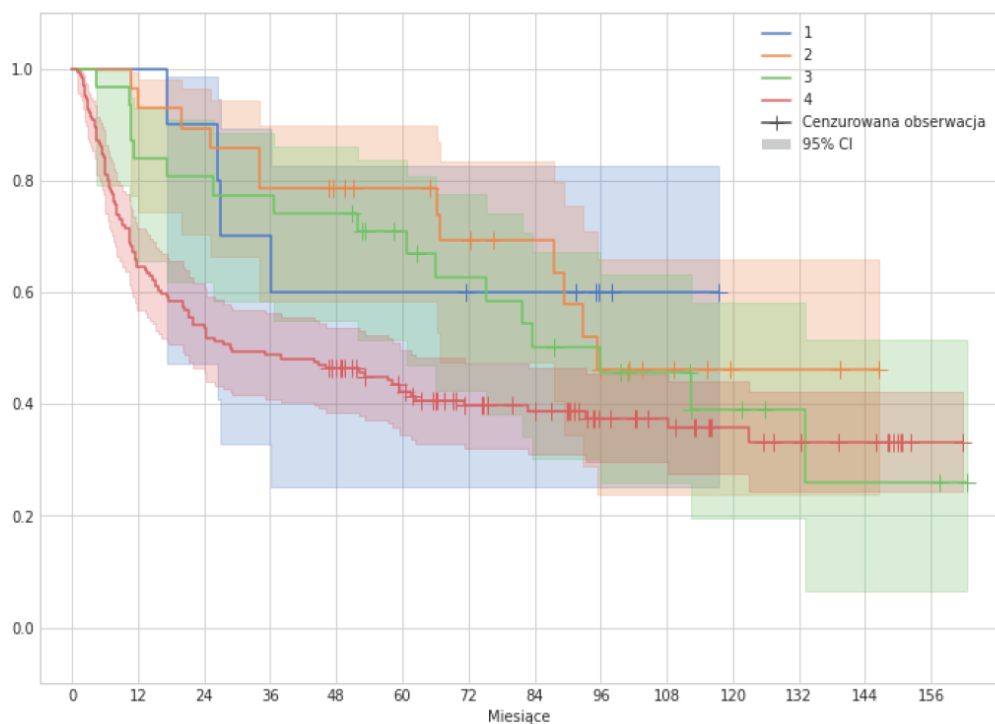


Rycina 13. Graficzne przedstawienie odsetka OS dla chorych przynależących do poszczególnych stopni zaawansowania choroby nowotworowej według ósmej edycji klasyfikacji TNM z 2017 roku. Kolorem niebieskim zaznaczono pierwszy stopień zaawansowania, pomarańczowym – drugi, zielonym – trzeci, czerwonym – czwarty stopień. Jaśniejszym odcieniem powyższych kolorów zaznaczono 95% przedział ufności.

Tabela VII. Ósma edycja klasyfikacji TNM – ocena różnicy OS pomiędzy chorymi przynależącymi do poszczególnych stopni zaawansowania. Brak statystycznej różnicy jedynie pomiędzy chorymi przynależącymi do drugiego, a chorymi przynależącymi do trzeciego stopnia zaawansowania choroby podczas oceny według ósmej edycji klasyfikacji. Istotna statystycznie różnica ($p < 0.05$) w całkowitym przeżyciu pomiędzy wszystkimi innymi grupami chorych. Test log rank.

		test_statistic	p	-log2(p)
1.0	2.0	8.01	<0.005	7.75
	3.0	17.66	<0.005	15.21
	4.0	75.99	<0.005	58.28
2.0	3.0	2.21	0.14	2.86
	4.0	30.88	<0.005	25.12
3.0	4.0	9.69	<0.005	9.08

Analogiczną analizę przeprowadzono dla PFS przy zastosowaniu siódmej edycji klasyfikacji TNM. Dla siódmej edycji klasyfikacji TNM, 3-letnie PFS dla I, II, III i IV stopnia zaawansowania wynosiło odpowiednio: 70%, 79%, 77% i 49%, podczas gdy 5-letnie PFS dla I, II, III i IV stopnia zaawansowania wynosiło odpowiednio: 60%, 79%, 71%, 42%. Krzywe uzyskane podczas analizy nie zostały istotnie odseparowane od siebie, a grupy chorych z I i II stopniem zaawansowania choroby po dwóch latach obserwacji rokowały w pewnych punktach obserwacji gorzej, niż grupy chorych z wyższym stopniem zaawansowania. W teście log rank statystycznie istotną różnicę w PFS stwierdzono również (jak w przypadku OS) wyłącznie pomiędzy drugim, a czwartym stopniem zaawansowania choroby ($p=0.02$). Różnice te nie były zauważalne pomiędzy żadnymi innymi stopniami zaawansowania.

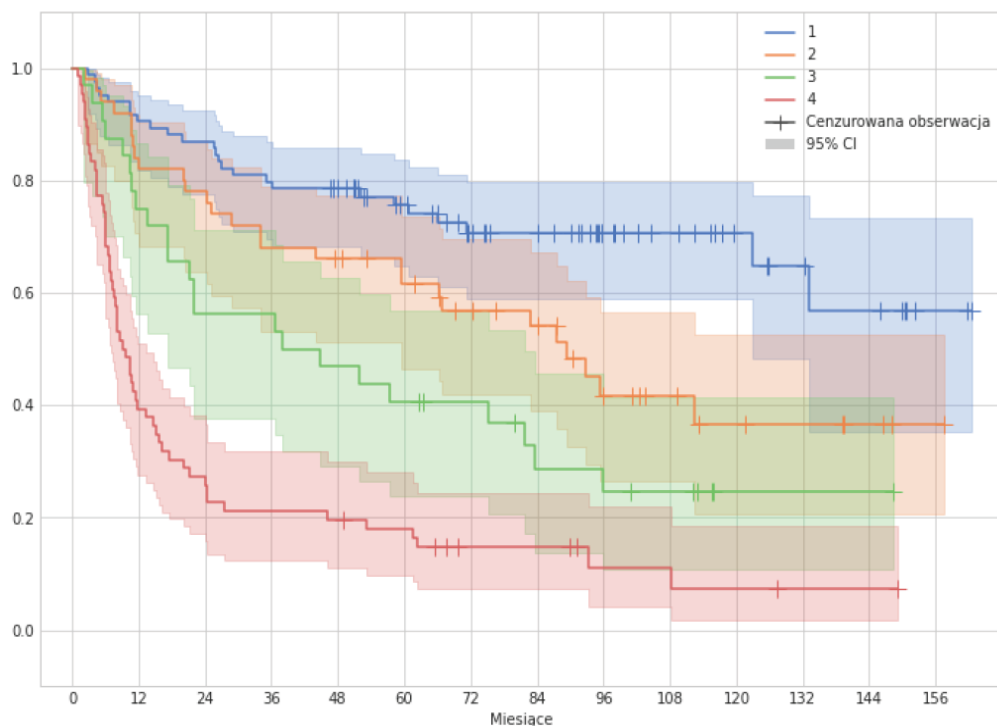


Rycina 14. Graficzne przedstawienie odsetka PFS dla chorych przynależących do poszczególnych stopni zaawansowania choroby nowotworowej według siódmej edycji klasyfikacji TNM z 2009 roku. Kolorem niebieskim zaznaczono pierwszy stopień zaawansowania, pomarańczowym – drugi, zielonym – trzeci, czerwonym – czwarty stopień. Jaśniejszym odcieniem powyższych kolorów zaznaczono 95% przedział ufności.

Tabela VIII. Siódma edycja klasyfikacji TNM – ocena różnicy PFS pomiędzy chorymi przynależącymi do poszczególnych stopni zaawansowania. Istotna statystycznie różnica ($p < 0.05$) w całkowitym przeżyciu wystąpiła jedynie pomiędzy chorymi przypisanymi do drugiego, a chorymi przypisanymi do czwartego stopnia zaawansowania choroby, podczas oceny według siódmej edycji klasyfikacji – podobnie jak w analogicznej analizie dla OS. Brak statystycznej różnicy występującej pomiędzy pozostałymi stopniami zaawansowania choroby. Test log rank.

		test_statistic	p	-log2(p)
1.0	2.0	0.02	0.90	0.16
	3.0	0.19	0.66	0.60
	4.0	2.22	0.14	2.87
2.0	3.0	0.54	0.46	1.12
	4.0	5.65	0.02	5.84
3.0	4.0	2.59	0.11	3.21

Analizę dla PFS przeprowadzono również przy zastosowaniu ósmej edycji klasyfikacji TNM. Dla ósmej edycji klasyfikacji TNM, 3-letnie PFS wynosiło dla I, II, III i IV stopnia zaawansowania odpowiednio: 80%, 68%, 56% i 21%, podczas gdy 5-letnie PFS dla I, II, III i IV stopnia zaawansowania wynosiło odpowiednio: 76%, 62%, 41%, 18%. Krzywe czasu wolnego od progresji dla wszystkich chorych stratyfikowanych według poszczególnych stopni zaawansowania choroby nowotworowej zostały wyraźnie odseparowane od siebie. W teście log rank wykazano statystycznie istotną różnicę w PFS pomiędzy prawie każdymi stopniami zaawansowania, z wyjątkiem jednej kombinacji: pomiędzy I, a II stopniem, pomiędzy I, a III stopniem, pomiędzy I, a IV stopniem, pomiędzy II, a IV stopniem oraz pomiędzy III, a IV stopniem zaawansowania. Nie wykazano jedynie statystycznie istotnej różnicy w PFS pomiędzy II, a III stopniem zaawansowania choroby ($p=0.08$).

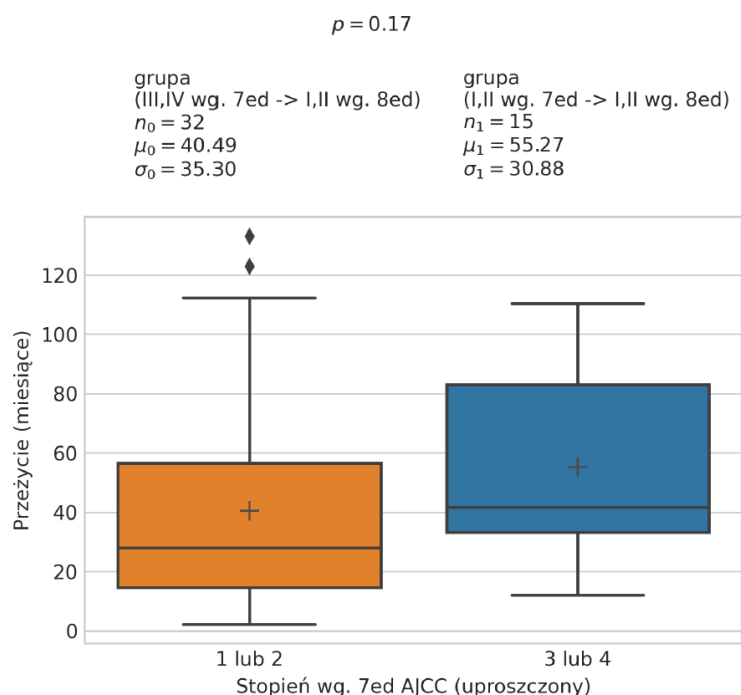


Rycina 15. Graficzne przedstawienie odsetka PFS dla chorych przynależących do poszczególnych stopni zaawansowania choroby nowotworowej według ósmej edycji klasyfikacji TNM z 2017 roku. Kolorem niebieskim zaznaczono pierwszy stopień zaawansowania, pomarańczowym – drugi, zielonym – trzeci, czerwonym – czwarty stopień. Jaśniejszym odcieniem powyższych kolorów zaznaczono 95% przedział ufności.

Tabela IX. Ósma edycja klasyfikacji TNM – ocena różnicy PFS pomiędzy chorymi przynależącymi do poszczególnych stopni zaawansowania. Brak statystycznej różnicy jedynie pomiędzy chorymi przynależącymi do drugiego, a chorymi przynależącymi do trzeciego stopnia zaawansowania choroby - podobnie jak w analogicznej analizie dla OS. Istotna statystycznie różnica ($p < 0.05$) w całkowitym przeżyciu pomiędzy wszystkimi innymi grupami chorych. Test log rank.

		test_statistic	p	-log2(p)
1.0	2.0	5.99	0.01	6.12
	3.0	18.16	<0.005	15.59
	4.0	72.47	<0.005	55.71
2.0	3.0	3.14	0.08	3.71
	4.0	30.18	<0.005	24.60
3.0	4.0	9.73	<0.005	9.11

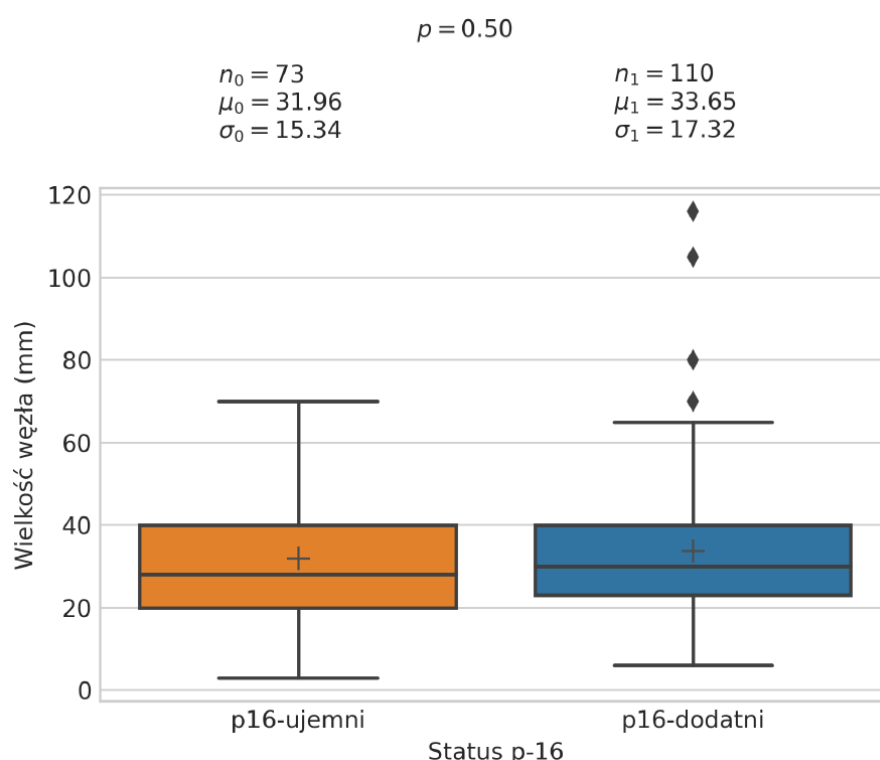
W celu wyodrębnienia populacji pośredniego ryzyka wśród lepiej rokujących, p16-dodatnich chorych z wczesnym, I lub II stopniem zaawansowania według ósmej edycji klasyfikacji TNM, grupę tę podzielono na dwie mniejsze podgrupy: podgrupę z niższym stopniem zaawansowania (I lub II stopień, $n=15$) oraz podgrupę z wyższym stopniem zaawansowania (III lub IV stopień, $n=32$) podczas wcześniejszej oceny według siódmej edycji klasyfikacji TNM. Porównano czas ogólnego przeżycia pomiędzy podgrupą, która podczas oceny według obu edycji przypisany miała niższy stopień zaawansowania oraz podgrupą, u której wykazano downstaging pomiędzy edycjami klasyfikacji. Podgrupa, która miała przypisany niższy stopień wg obu edycji charakteryzowała się dłuższym średnim czasem ogólnego przeżycia (średnio 40 ± 35 miesięcy) względem podgrupy, u której wykazano downstaging (średnio 55 ± 31 miesięcy). Nie stwierdzono jednak statystycznej różnicy w OS pomiędzy badanymi podgrupami ($p=0.17$).



Rycina 16. Porównanie czasu przeżycia pomiędzy chorymi, u których wystąpił zgon, w zależności od przypisanych im stopni zaawansowania. Kolor pomarańczowy: chorzy, którzy znajdowali się w III lub IV stopniu zaawansowania według siódmej edycji klasyfikacji TNM z 2009 roku, a których przypisano do I lub II stopnia zaawansowania według ósmej edycji klasyfikacji TNM z 2017 roku (3,4 7th ed. -> 1,2 8th ed.). Średnie OS w tej podgrupie wyniosło 40.49 miesięcy, SD 35.30 miesięcy. Liczebność podgrupy: 32 osoby. Kolor niebieski: chorzy, którzy znajdowali się w I lub II stopniu zaawansowania według siódmej edycji klasyfikacji TNM z 2009 roku i którzy pozostali przypisani do I lub II stopnia zaawansowania według ósmej edycji klasyfikacji TNM z 2017 roku (1,2 7th ed. -> 1,2 8th ed.). Średnie OS w tej podgrupie wyniosło 55.27 miesięcy, SD 30.88 miesięcy. Liczebność podgrupy: 15 osób.

5.5. Pozostałe czynniki prognostyczne

Wykonano analizę dotyczącą wielkości przerzutowych węzłów chłonnych oraz obecności naciekania poza torebkę węzła chłonnego (ENE) w badanych grupach. Dane uzyskano na podstawie badania histopatologicznego, lub, jeśli to nie było przeprowadzone, badań obrazowych. Średnia wielkość największego przerzutowego węzła chłonnego na podstawie badań histopatologicznych oraz badań obrazowych w I grupie chorych wyniosła 33.7 milimetra (mediana 30mm, maksimum 116 mm; minimum 6mm; SD 17.3mm). Średnia wielkość przerzutowego węzła chłonnego na podstawie badań histopatologicznych oraz badań obrazowych w II grupie chorych wyniosła 32.0 milimetra (mediana 28mm, maksimum 70 mm; minimum 3mm; SD 15.3mm). Nie uzyskano statystycznie istotnej różnicy w wielkości przerzutowego węzła chłonnego pomiędzy badanymi grupami ($p=0.50$).

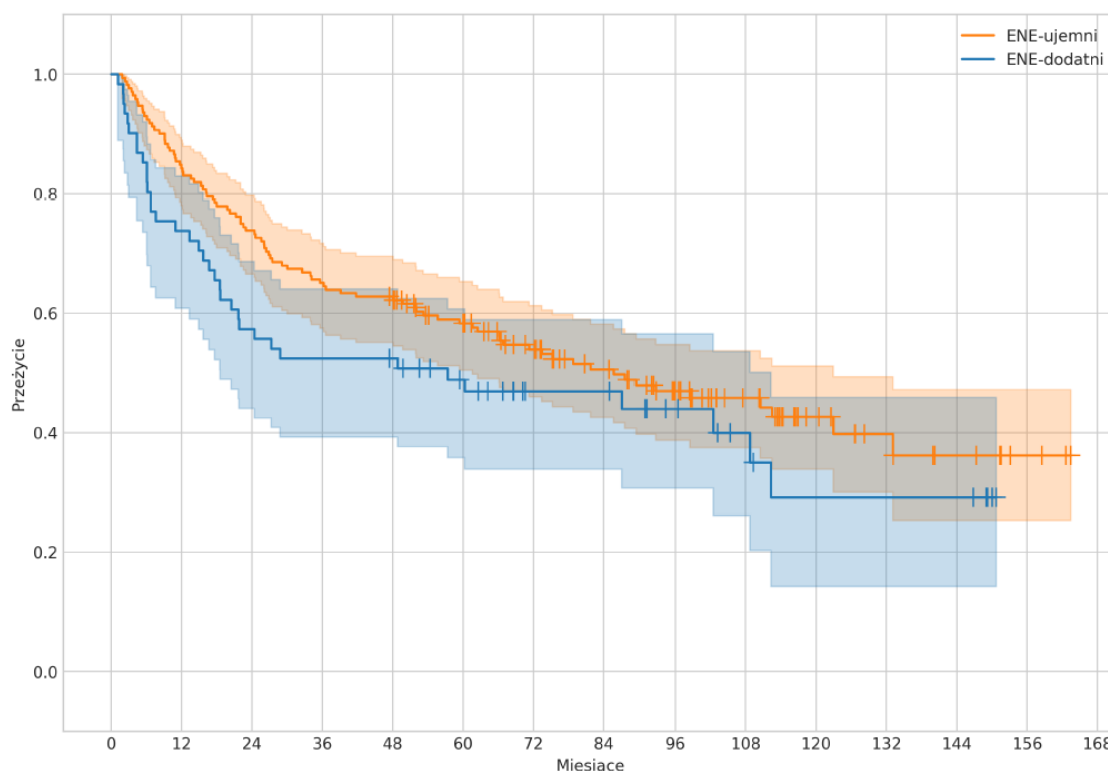


Rycina 17. Porównanie wielkości największego przerzutowego węzła chłonnego pomiędzy I (kolor pomarańczowy), a II grupą chorych (kolor niebieski). Brak statystycznie istotnej różnicy pomiędzy porównywanymi grupami.

Naciekanie poza torebkę węzła chłonnego rozpoznano u 26.2% (61/233) badanych chorych oraz u 33.2% (61/184) chorych, u których stwierdzono obecność co najmniej jednego przerzutowego węzła chłonnego. W grupie I ENE wystąpiło u 26.4% (34/129) chorych, podczas gdy w grupie II u 26.0% (27/104). Przeanalizowano czas ogólnego przeżycia w zależności od występowania naciekania pozatorebkowego. Nie stwierdzono istotnej różnicy statystycznej w 3-letnim oraz 5-letnim OS pomiędzy chorymi, u których stwierdzono ENE oraz chorymi ENE-ujemnymi ($p=0.13$). Odsetek 3-letniego OS w grupie chorych ENE-ujemnych wyniósł 65%, natomiast odsetek 5-letniego przeżycia wyniósł 58%. Odsetek 3-letniego OS w grupie chorych ENE-dodatnich wyniósł 52%, natomiast odsetek 5-letniego przeżycia wyniósł 49%.

Przeprowadzono następnie osobne analizy dla I oraz II grupy chorych. W I grupie odsetek 3-letniego OS u chorych ENE-ujemnych wyniósł 78%, a 5-letniego OS 71%. W I grupie odsetek 3-letniego OS u chorych ENE-dodatnich wyniósł 68%, a 5-letniego OS 64%. Nie wykazano istotnej różnicy statystycznej pomiędzy podgrupami w obrębie I grupy badanej ($p=0.37$).

W II grupie odsetek 3-letniego OS u chorych ENE-ujemnych wyniósł 49%, a 5-letniego OS 43%. W II grupie odsetek 3-letniego OS u chorych ENE-dodatnich wyniósł 33%, a 5-letniego OS 30%. Nie wykazano istotnej różnicy statystycznej pomiędzy podgrupami w obrębie II grupy badanej ($p=0.20$).



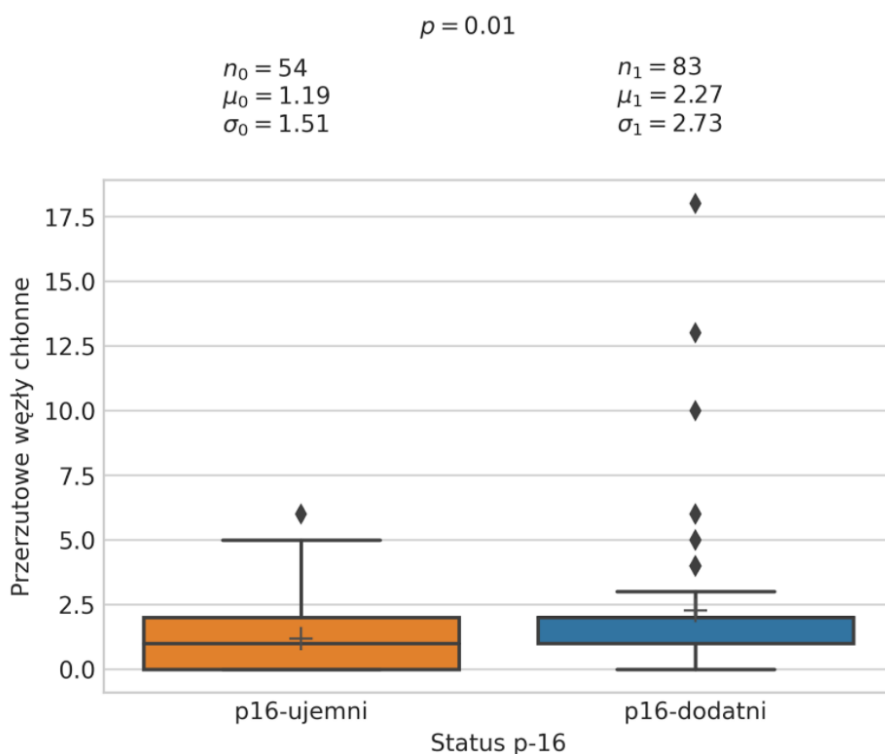
Rycina 18. Krzywe czasu ogólnego przeżycia OS dla obu badanych grup w zależności od statusu naciekania poza torebkę węzła chłonnego (ENE). Kolorem pomarańczowym zaznaczono grupę ENE-ujemną. W tej grupie odsetek 3-letniego przeżycia wyniósł 65%, a 5-letniego przeżycia wyniósł 52%. Kolorem niebieskim zaznaczono grupę ENE-dodatnią - w tej grupie odsetek 3-letniego przeżycia wyniósł 52%, a 5-letniego przeżycia wyniósł 49%. Brak statystycznie istotnej różnicy pomiędzy badanymi grupami ($p=0.13$). Wykres estymaty Kaplana-Maiera.

Nie stwierdzono również istotnej różnicy statystycznej w 3-letnim oraz 5-letnim PFS pomiędzy chorymi ENE-ujemnymi oraz ENE-dodatnimi ($p=0.07$). Odsetek 3-letniego PFS w grupie ENE-ujemnej wyniósł 60%, natomiast odsetek 5-letniego PFS wyniósł 54%. Odsetek 3-letniego PFS w grupie ENE-dodatniej wyniósł 48%, natomiast odsetek 5-letniego PFS wyniósł 42%.

Przeanalizowano liczbę przerzutowych węzłów chłonnych wśród chorych leczonych chirurgicznie i u których znany był szczegółowy raport patomorfologiczny (I grupa: $n=83$, II grupa: $n=54$). Nie stwierdzono przerzutowych węzłów chłonnych u 24.8% (34/137) chorych, od jednego do czterech przerzutowych węzłów stwierdzono u 66.4% (91/137) chorych, a więcej niż pięć przerzutowych węzłów rozpoznano u 8.8%

(12/137) chorych. W I grupie badanych, nie stwierdzono przerzutowych węzłów chłonnych u 12.0% (10/83) chorych, od jednego do czterech przerzutowych węzłów stwierdzono u 77.1% (64/83) chorych, a więcej niż pięć przerzutowych węzłów rozpoznano u 10.8% (9/83) chorych. W II grupie badanych, nie stwierdzono przerzutowych węzłów chłonnych u 44.4% (24/54) chorych, od jednego do czterech przerzutowych węzłów stwierdzono u 50.0% (27/54) chorych, a więcej niż pięć przerzutowych węzłów rozpoznano u 5.6% (3/54) chorych.

Przeprowadzono następnie analizę dotyczącą występowania liczby przerzutowych węzłów w badanych grupach. Średnia liczba przerzutowych węzłów chłonnych (stwierdzona na podstawie raportu patomorfologicznego) w I grupie chorych wyniosła 2.27 (mediana dwa węzły chłonne, maksimum 18; minimum 0; SD 2.73). Średnia liczba przerzutowych węzłów chłonnych w II grupie chorych wyniosła 1.19 (mediana jeden węzeł chłonny, maksimum 6; minimum 0; SD 1.51). Uzyskano statystycznie istotną różnicę w liczbie przerzutowych węzłów chłonnych pomiędzy badanymi grupami ($p=0.01$).

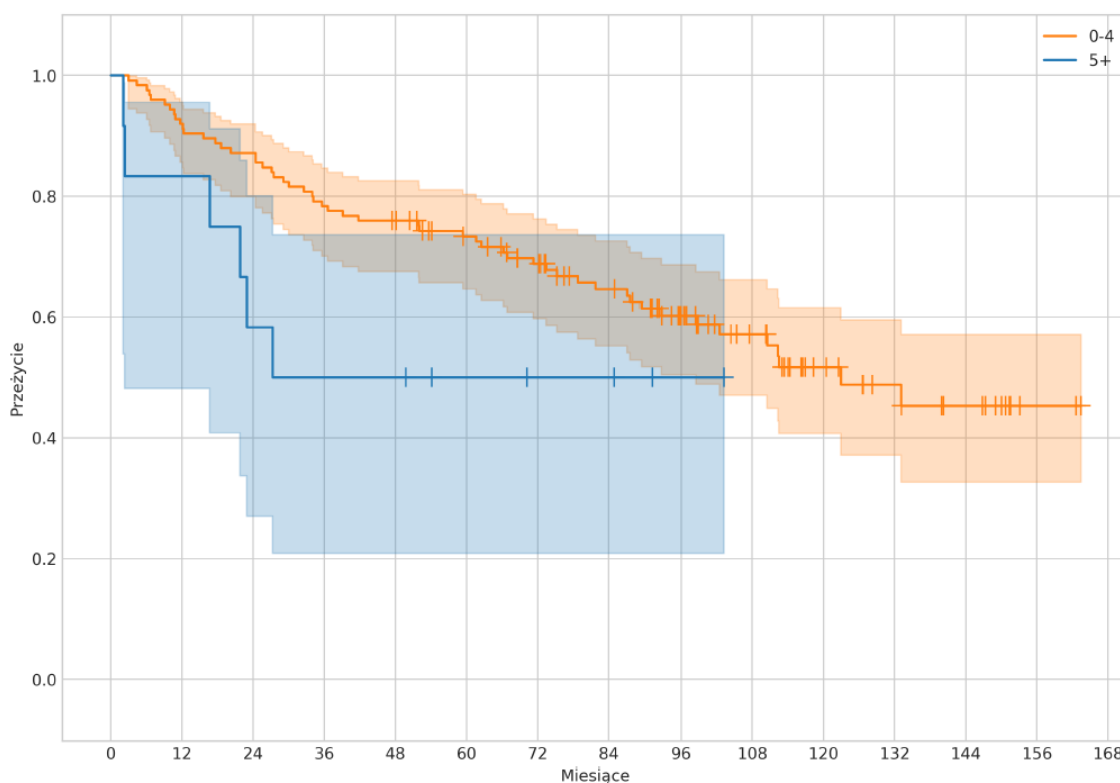


Rycina 19. Porównanie liczby przerzutowych węzłów chłonnych pomiędzy I (kolor pomarańczowy), a II grupą chorych (kolor niebieski). Większa średnia liczba przerzutowych węzłów chłonnych w grupie chorych p16-dodatnich ($p=0.01$). Test Chi-kwadrat.

Wykonano analizę czasu ogólnego przeżycia w zależności od liczby przerzutowych węzłów chłonnych opisanych w pooperacyjnym raporcie badania histopatologicznego. Jako kryterium podziału grup przyjęto kryteria patologicznej klasyfikacji TNM według ósmej edycji, proponujące podział do czterech oraz powyżej czterech przerzutowych węzłów chłonnych. Nie stwierdzono istotnej różnicy statystycznej w 3-letnim oraz 5-letnim OS pomiędzy chorych, u których stwierdzono ≤ 4 przerzutowych węzłów chłonnych oraz chorych, u których stwierdzono ≥ 5 przerzutowych węzłów chłonnych ($p=0.11$). Odsetek 3-letniego OS w grupie chorych, u których stwierdzono ≤ 4 przerzutowych węzłów chłonnych wyniósł 78%, natomiast odsetek 5-letniego przeżycia wyniósł 73%. Odsetek 3-letniego OS w grupie chorych, u których stwierdzono ≥ 5 przerzutowych węzłów chłonnych wyniósł 50%. Odsetek 5-letniego przeżycia wyniósł również 50%.

Przeprowadzono następnie osobne analizy dla I oraz II grupy chorych. W I grupie 3-letniego OS w grupie chorych, u których stwierdzono ≤ 4 przerzutowych węzłów chłonnych wyniósł 85%, natomiast odsetek 5-letniego przeżycia wyniósł 81%. W I grupie odsetek 3-letniego OS w grupie chorych, u których stwierdzono ≥ 5 przerzutowych węzłów chłonnych wyniósł 56%. Odsetek 5-letniego OS w tej podgrupie wyniósł również 56%. Nie wykazano istotnej różnicy statystycznej pomiędzy podgrupami w obrębie I grupy badanej ($p=0.06$).

W II grupie 3-letniego OS w grupie chorych, u których stwierdzono ≤ 4 przerzutowych węzłów chłonnych wyniósł 69%, natomiast odsetek 5-letniego przeżycia wyniósł 63%. W II grupie odsetek 3-letniego OS w grupie chorych, u których stwierdzono ≥ 5 przerzutowych węzłów chłonnych wyniósł 33%. Odsetek 5-letniego przeżycia w tej podgrupie wyniósł również 33%. Nie wykazano istotnej różnicy statystycznej pomiędzy podgrupami w obrębie II grupy badanej ($p=0.19$).



Rycina 20. Krzywe czasu ogólnego przeżycia OS dla obu badanych grup w zależności od liczby przerzutowych węzłów chłonnych. Kolorem pomarańczowym zaznaczono grupę chorych, u których stwierdzono ≤ 4 przerzutowych węzłów chłonnych. W tej grupie odsetek 3-letniego przeżycia wyniósł 78%, a 5-letniego przeżycia wyniósł 73%. Kolorem niebieskim zaznaczono grupę chorych, u których stwierdzono ≥ 5 przerzutowych węzłów chłonnych. W tej grupie odsetek zarówno 3-letniego, jak i 5-letniego OS wyniósł 50%. Brak statystycznie istotnej różnicy pomiędzy badanymi grupami ($p=0.11$). Wykres estymaty Kaplana-Maiera.

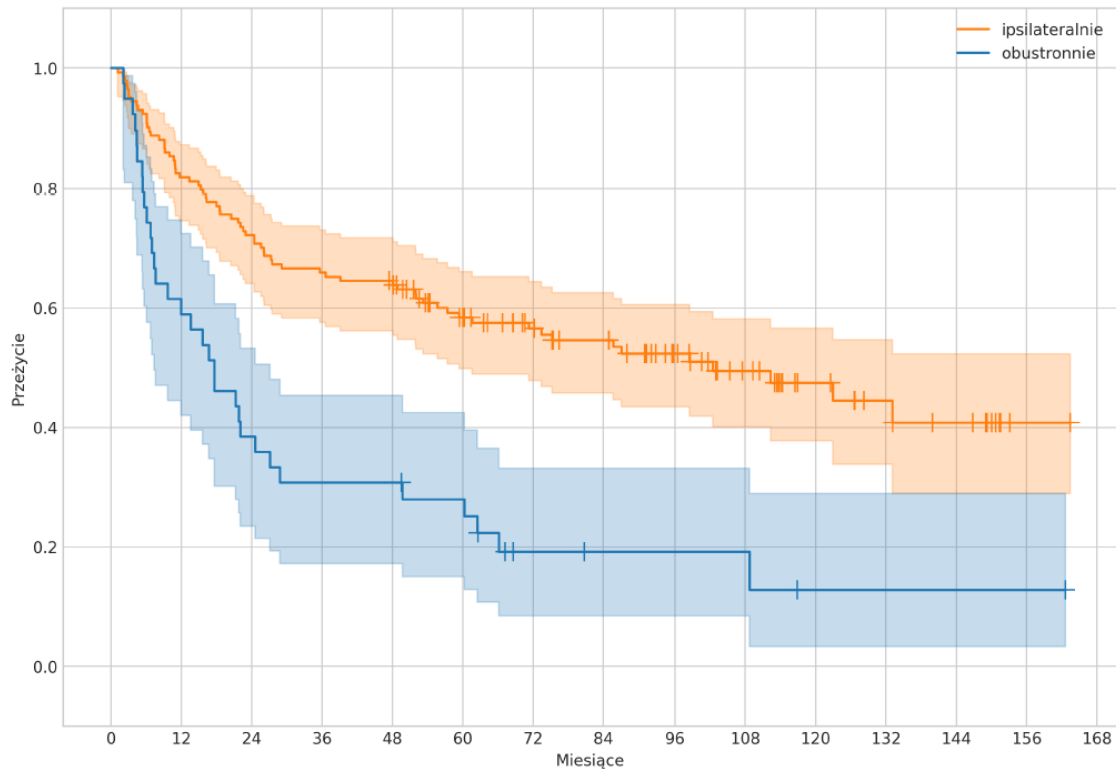
Wykonano analogiczną analizę dla PFS. Nie stwierdzono istotnej różnicy statystycznej w 3-letnim oraz 5-letnim PFS pomiędzy chorymi, u których stwierdzono ≤ 4 oraz co najmniej 5 przerzutowych węzłów chłonnych ($p=0.20$). Odsetek 3-letniego i 5-letniego PFS w grupie chorych, u których stwierdzono ≤ 4 przerzutowych węzłów chłonnych wyniósł odpowiednio 74% i 70%, natomiast odsetek 5-letniego i 3-letniego PFS w grupie chorych, u których stwierdzono ≥ 5 przerzutowych węzłów chłonnych wyniósł 50%.

Przeprowadzono analizę czasu ogólnego przeżycia w zależności od strony występowania przerzutów do węzłów chłonnych szyjnych, opisanych w pooperacyjnym raporcie histopatologicznym lub, w razie jego braku u chorych nieleczonych

operacyjnie, opisanych w badaniu obrazowym. Porównano OS pomiędzy chorymi, u których stwierdzono ipsilateralne przerzuty (jednostronne w stosunku do strony występowania guza, $n=70$) oraz u których rozpoznano przerzuty obustronne ($n=32$). Jedynie u jednego chorego stwierdzono obecność przerzutowych węzłów chłonnych wyłącznie po stronie przeciwnej do guza. Nie włączono go zatem do poniższej analizy. Wykazano istotną statystycznie różnicę w 3-letnim oraz 5-letnim OS pomiędzy chorymi różniącymi się stroną występowania przerzutów do układu chłonnego szyi ($p<0.005$). Odsetek 3-letniego OS w grupie chorych, u których stwierdzono ipsilateralne przerzutowe węzły chłonne wyniósł 66%, natomiast odsetek 5-letniego przeżycia wyniósł 58%. Odsetek 3-letniego OS w grupie chorych, u których rozpoznano obustronne przerzuty do węzłów chłonnych wyniósł 31%, natomiast odsetek 5-letniego przeżycia wyniósł 28%.

Przeprowadzono następnie osobne analizy dla I oraz II grupy chorych. W I grupie odsetek 3-letniego OS u chorych, u których stwierdzono ipsilateralne przerzutowe węzły chłonne wyniósł 79%, a 5-letniego przeżycia 72%. W I grupie odsetek 3-letniego OS u chorych, u których stwierdzono obustronne przerzutowe węzły chłonne wyniósł 56%, a 5-letniego przeżycia 49%. Wykazano statystycznie istotną różnicę pomiędzy podgrupami w obrębie I grupy badanej ($p=0.007$).

W II grupie odsetek 3-letniego OS u chorych u których stwierdzono ipsilateralne przerzutowe węzły chłonne wyniósł 41%, a 5-letniego przeżycia 32%. W II grupie odsetek 3-letniego OS u chorych, u których rozpoznano obustronne przerzutowe węzły chłonne wyniósł 13%. Odsetek 5-letniego OS w tej podgrupie również wyniósł 13%. Wykazano statystycznie istotną różnicę pomiędzy podgrupami w obrębie II grupy badanej ($p=0.01$).



Rycina 21. Krzywe czasu ogólnego przeżycia OS dla obu badanych grup w zależności od liczby przerzutowych węzłów chłonnych. Kolorem pomarańczowym zaznaczono grupę chorych, u których rozpoznano ipsilateralne (jednostronne) przerzuty do węzłów chłonnych szyi. W tej grupie odsetek 3-letniego przeżycia wyniósł 66%, a 5-letniego przeżycia wyniósł 58%. Kolorem niebieskim zaznaczono grupę chorych, u których stwierdzono obustronne przerzuty do węzłów chłonnych. W tej grupie odsetek 3-letniego przeżycia wyniósł 31%, a 5-letniego przeżycia wyniósł 28%. Wykazano statystycznie istotną różnicę pomiędzy badanymi grupami ($p < 0.005$). Wykres estymaty Kaplana-Maiera.

Wykonano analogiczną analizę dla PFS. Wykazano istotną statystycznie różnicę w 3-letnim oraz 5-letnim PFS pomiędzy chorymi różniącymi się stroną występowania guza ($p < 0.005$). Odsetek 3-letniego OS w grupie chorych, u których stwierdzono ipsilateralne przerzutowe węzły chłonne wyniósł 60%, natomiast odsetek 5-letniego przeżycia wyniósł 54%. Odsetek 3-letniego OS w grupie chorych, u których rozpoznano obustronne przerzuty do węzłów chłonnych wyniósł 31%, natomiast odsetek 5-letniego przeżycia wyniósł 23%.

Przeprowadzono także analizę wieloczynnikową danych kliniczno-patologicznych. W analizie obejmującej całą kohortę chorych przeanalizowano wpływ na OS i PFS poniższych cech: ENE, lateralizację zmian węzłowych (jednostronnie oraz obustronnie), liczbę i wielkość przerzutowych węzłów chłonnych, status p16 oraz wiek i płeć. Spośród nich, jedynie liczba przerzutowych węzłów chłonnych (HR 1.32, 95%CI [1.14-1.52], $p < 0.005$) oraz status p16 HR 0.30, 95%CI [0.15-0.58], $p < 0.005$) miała wpływ na OS. Pozostałe cechy nie wykazały istotnego statystycznie wpływu na czas ogólnego przeżycia. W aspekcie PFS, również jedynie liczba przerzutowych węzłów chłonnych (HR 1.29, 95%CI [1.12-1.48], $p < 0.005$) oraz status p16 HR 0.33, 95%CI [0.18-0.63], $p < 0.005$) wpłynęły na czas wolny od progresji. Wykonano następnie dwie osobne analizy dla grupy I oraz grupy II pod względem czasu ogólnego przeżycia. W I grupie (p16-dodatniej), jedynie liczba przerzutowych węzłów chłonnych miała wpływ na OS. W II grupie (p16-ujemnej), nie wykazano wpływu żadnego z wymienionych czynników na OS.

6. Omówienie wyników badań i dyskusja

6.1. Charakterystyka badanej grupy chorych

Średni wiek chorych w niniejszym badaniu wynosił 59.4 ± 10.0 lat, a w obu badanych grupach większość chorych stanowili mężczyźni (62.0% w grupie p16-dodatniej oraz 77.9% w grupie p16-ujemnej). W podobny sposób prezentują się dane demograficzne w pracach autorów, którzy także porównują obie edycje klasyfikacji TNM: średni wiek wyniósł w nich od 56 do 62 lat, natomiast odsetek mężczyzn wyniósł od 74.0% do 89.0%.^{78 83 84 85} Zgodne dane tej oraz innych prac świadczą o wystąpieniu szczytu zachorowań na OPSCC wśród mężczyzn w szóstej i siódmej dekadzie życia. Nie wykazano natomiast istotnej statystycznie różnicy w wieku rozpoznania choroby pomiędzy I a II grupą ($p=0.30$), podobnie jak w pracach Jacobiego oraz Beltz.^{83 86} We wstępie pracy przedstawiono opublikowane przez wielu autorów założenie, że HPV-dodatni chorzy przeciętnie są młodszy, niż chorzy HPV-ujemni.⁸⁷ Na podstawie uzyskanych w niniejszej analizie danych oraz ich metaanalizy, nie potwierdzono tych założeń: wiek chorych p16-dodatnich oraz p16-ujemnych nie różnił się w istotny sposób. Co interesujące, średni wiek chorych p16-dodatnich był wyższy, niż chorych p16-ujemnych.

Lokalizacja guza w obrębie ustnej części gardła u chorych p16-dodatnich obejmowała najczęściej migdałek podniebienny (76.0%) oraz nasadę języka (17.1%). W II grupie chorych lokalizacja guza obejmowała najczęściej migdałek podniebienny (50.0%), podniebienie miękkie (23.1%) oraz nasadę języka (20.2%). W całej badanej kohorcie, bez uwzględnienia podziału na grupy, guz zlokalizowany był w co najmniej połowie przypadków w obrębie migdałka podniebiennego. Mniej więcej u co piątego chorego (18.5%, 43/233) nowotwór umiejscowiony był w obrębie nasady języka. W literaturze, przewagę występowania OPSCC w obrębie migdałka podniebiennego stwierdzono także w sześciu na dziewięć prac opisujących procentowy rozkład umiejscowienia nowotworu, opisujących łącznie ponad jedenaście tysięcy chorych. Dwie z dziewięciu prac opisały najczęstsze występowanie OPSCC w innych lokalizacjach, niż migdałek podniebienny oraz nasada języka. W jednej pracy,

opisującej wyłącznie p16-dodatnich chorych, wymieniono nasadę języka jako najczęstsze miejsce występowania OPSCC.

Tabela X. Porównanie procentowego rozkładu najczęstszych lokalizacji OPSCC w kolejności malejącej. BOT – nasada języka (ang. *base of tongue*). Według Miccio i wsp., Gallitto i wsp., Freitag i wsp., Bauera i wsp., Zengi i wsp., Parka i wsp., Beltz i wsp., Porceddu i wsp. oraz Gupty i wsp.

Migdałek 65.6% BOT 29.7% Inne 4.7% n3407 (chorzy p16+).¹¹⁵

Migdałek 57.5% BOT 42.4% n45 (chorzy leczeni TORS).⁸⁸

Migdałek 65.2% BOT 17.4% Podniebienie 4.3% Inne 13% n92 (chorzy p16+).¹¹⁴

Migdałek 70,4% BOT 25,3% Inne 4,3% n4153 (chorzy p16+).¹²⁹

Migdałek 68.0% BOT 29.0% Inne 3% n2554 (chorzy p16+).¹⁴⁰

Migdałek 85.1% BOT 12.8% Podniebienie 2.1% n188 (chorzy p16+).¹¹³

Migdałek 32.9% BOT 22.7% Podniebienie 11.8% Inne 32.6% n255.⁸⁵

Migdałek 35.8% BOT 25.4% Inne 38.7% (chorzy p16+) n279.¹²⁰

BOT 62.0% Migdałek 34.0% Inne 4.0% (chorzy p16+) n218 ⁸⁴

Sześć badań, wskazujących na najczęstsze występowanie OPSCC w okolicy migdałka podniebiennego i stanowiących dwie trzecie analizowanych prac, opisują przeżycie aż 10439 chorych spośród wszystkich 11191 chorych opisanych w dziewięciu pracach. Należy zatem uznać, że dane niniejszej pracy dotyczące lokalizacji guza pierwotnego są zgodne z przeanalizowaną literaturą i świadczą o najczęstszym występowaniu OPSCC w obrębie migdałka podniebiennego, a następnie w obrębie nasady języka.

6.2. Czas przeżycia chorych w zależności od statusu infekcji wirusem HPV

W badaniu wykazano dłuższe średnie OS w I grupie chorych (70.5 miesięcy), niż w II grupie chorych (44.7 miesiąca). Potwierdza to przyjęte założenie, że chorzy p16-dodatni żyją przeciętnie dłużej po uzyskaniu diagnozy, niż chorzy p16-ujemni. Różnica w OS pomiędzy grupami wyniosła 25.8 miesięcy, a zatem w niniejszym badaniu chory p16-dodatni żył przeciętnie 2 lata dłużej, niż chory p-16 ujemny. W I grupie odsetek 3- i 5-letniego OS wyniósł odpowiednio 75% i 69%, podczas gdy w II grupie wyniósł odpowiednio 45% i 39% ($p < 0.005$). W badaniu wykazano również istotną różnicę pomiędzy badanymi grupami w zakresie czasu wolnego od progresji choroby. W I grupie odsetek 3- i 5-letniego przeżycia wyniósł odpowiednio 71% i 64%, podczas gdy w II grupie wyniósł odpowiednio 40% i 35% ($p < 0.005$).

W każdym z analizowanych badań w literaturze, odsetek przeżycia również jest większy w grupie HPV-dodatniej, niż HPV-ujemnej. W badaniu Amini i wsp. odsetek dwuletniego OS jest istotnie większy w grupie HPV-dodatniej w porównaniu do grupy HPV-ujemnej (odpowiednio 93.1% i 77.8%, $p < 0.001$). W tejże pracy, również w analizie jedno- i wieloczynnikowej, HPV-pozytywność wpływała pozytywnie na czas przeżycia.⁸⁹ Jest to spójne z wynikami niniejszego badania, gdzie w analizie wieloczynnikowej wykazano korzystny wpływ ekspresji p16 zarówno na OS, jak i PFS, a odsetek 3-letniego OS jest wyraźnie większy w I grupie chorych. W badaniu Lewisa również wykazano dłuższe przeżycie w grupie HPV-dodatniej: odsetek dwuletniego DSS u chorych p16-dodatnich wynosił ponad 85%, podczas gdy u chorych p16-ujemnych niecałe 45%.⁹⁰ Także u Rietbergen chorzy z HPV-dodatnim OPSCC rokowali znacznie lepiej (pięcioletnie OS: 73.5%, pięcioletnie PFS: 70.0%), niż chorzy z HPV-ujemnym OPSCC (pięcioletnie OS: 40.9%, pięcioletnie PFS: 42.6%).³² W badaniu Bryanta analizującym przeżycie w aspekcie infekcji wirusem HPV porównano nie tylko grupy chorych p16-dodanych oraz p16-ujemnych z nowotworem części ustnej gardła, lecz także z nowotworem obejmującym lokalizacje pozagardłowe (jamy ustnej, krtani i krtaniowej części gardła). W tym badaniu pięcioletnie OS było dłuższe u p16-dodatnich chorych w stosunku do chorych p16-ujemnych nie tylko dla lokalizacji obejmującej ustną część gardła, lecz także w lokalizacjach pozagardłowych.⁹¹ Wyniki te świadczą o lepszym rokowaniu p16-dodatnich chorych, bez względu na lokalizację guza. Występowanie p16-dodatnich raków

płaskonabłonkowych w lokalizacjach pozagardłowych w literaturze szacuje się na 10-20%.^{92 93} Powyższe wyniki jednoznacznie wskazują na lepsze rokowanie w grupie chorych z potwierdzoną infekcją wirusem brodawczaka ludzkiego, względem grupy HPV-ujemnej.

Bardzo istotna w określeniu rokowania chorych z OPSCC pozostaje natomiast diagnostyczna metoda określenia statusu infekcji wirusem brodawczaka ludzkiego. We wstępie wymieniono obecnie stosowane badania służące wykryciu infekcji HPV: Immunohistochemiczne badanie obecności białka p16^{INK4a} (ISH), test łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) i hybrydyzacja in situ (ISH). Niestety, żadne z pojedynczych wyżej wymienionych badań nie pozwala stwierdzić infekcji wirusem HPV z wystarczającą, bliską 100% skutecznością. Według pracy przeglądowej Prigge i wsp., podsumowującej wyniki 23 prac, oceniających skuteczność immunohistochemicznego testowania p16^{INK4a}, badanie p16 IHC odznacza się wysoką czułością (średnio 94%), lecz niewystarczającą specyficznością, wynoszącą średnio 83%.⁹⁴ Zbliżonym marginesem błędu obarczona również jest detekcja wirusa HPV badaniem PCR. W tym przypadku, niewystarczająca specyficzność badania prowadzi do niemożności odróżnienia aktywnego transkrypcyjnie i potencjalnie prowadzącego do kancerogenezy zakażenia, od nieistotnej klinicznie infekcji.⁹⁵ Ponadto uważa się, że HPV DNA PCR i ISH mogą wykazywać niewystarczającą czułość w przypadku niskiego poziomu wirerii.⁹⁶

Badania w kierunku infekcji wirusem HPV, wykonane różnymi metodami u tego samego chorego, mogą prowadzić więc do uzyskania odmiennych wyników. Istnieje grupa raków części ustnej gardła dodatnia w immunohistochemicznym badaniu p16, ale z niewykrywalnym materiałem genetycznym wirusa w badaniu PCR. (p16+/HPV-) Może to wskazywać na istnienie mechanizmu molekularnego zwiększającego ekspresję białka p16, nie będącego jednocześnie właściwym mechanizmem onkogenezy HPV.⁵⁴ Jako przypuszczalny mechanizm, wymienia się inaktywację białka supresorowego Retinoblastoma (pRb) przez delecje genów, punktowe mutacje, czy mutacje funkcjonalne. Przypuszczalnie, rezultat p16-ujemny/HPV DNA PCR-dodatni (p16-/HPV+) może odzwierciedlać przejściową infekcję wirusem HPV lub zanieczyszczenie próbki, a nie prawdziwą infekcję prowadzącą do kancerogenezy. Analogicznie, rezultat p16+/HPV- może nie być związany z infekcją wirusem HPV prowadzącą do powstania nowotworu.⁹⁷ Szacuje się, że zależne od metod różnice w wynikach badań na obecność wirusa brodawczaka ludzkiego obejmują od kilku do kilkunastu procent chorych.

W pracy Larsena i wsp. na grupie ponad 1500 chorych, około 5% chorych z HPV-dodatnim OPSCC jest HPV DNA pozytywnych w badaniu PCR, lecz p16 negatywnych w badaniu IHC. Co więcej, około 9% chorych jest HPV DNA negatywnych, będąc jednocześnie p16 pozytywnymi.⁹⁸ W badaniu zespołu Taberny na grupie 788 chorych z OPSCC, testowanych na obecność wirusa HPV co najmniej dwiema spośród trzech metod: HPV DNA PCR oraz p16 IHC lub E6*I mRNA RT-PCR (PCR w czasie rzeczywistym dla matrycowego RNA kodującego białko E6 wirusa), za pozytywne uznano jedynie wyniki podwójnie dodatnie, stanowiące 8.4% zbadanych OPSCC. U ponad 20% p16-dodatnich chorych nie potwierdzono infekcji HPV przy wykorzystaniu drugiej metody.⁹⁹ W badaniu Nauty i wsp. przeprowadzonym na grupie 1204 chorych z OPSCC, odnotowano odsetek 32.2% p16-pozytywnych chorych. U 12.4% chorych nie potwierdzono infekcji wirusem HPV podczas zastosowania badania PCR.¹⁰⁰ W niniejszej analizie zastosowano pojedynczą metodę oceny statusu infekcji wirusem HPV, zgodnie z zaleceniami ósmej edycji podręcznika AJCC Cancer Staging Manual. W metodach badawczych nie uwzględniono testowania statusu infekcji HPV drugą metodą diagnostyczną, nie dysponowano także wynikami innej metody potwierdzenia infekcji HPV w archiwalnych danych, niż immunohistochemicznym badaniem ekspresji białka p16. Celem przeprowadzenia analizy, wykonano natomiast dodatkowe badania ekspresji p16 u 62 chorych, u których status infekcji HPV pozostawał nieznany. Według Golusińskiego i wsp., p16 pozostaje uznanym markerem infekcji HPV, jednak z powodu występowania istotnej klinicznie grupy p16+/HPV-, zaleca się łączenie badania IHC z drugą metodą diagnostyczną.¹⁰¹

Co szczególnie interesujące, niektóre badania wykazały różnicę w rokowaniu nie tylko pomiędzy grupami podwójnie dodatnimi (p16-dodatnią i HPV DNA PCR-dodatnią – czyli p16+/HPV+) i podwójnie ujemnymi (p16-/HPV-), lecz także pomiędzy nimi, a opisanymi powyżej grupami pośredniego ryzyka (p16+/HPV- i p16-/HPV+). Rietbergen i wsp. we wspomnianym już retrospektywnym badaniu na grupie 723 chorych ze znanym statusem infekcji HPV, wykazali, że grupa podwójnie dodatnia (p16+/HPV+) rokuje lepiej w kwestii OS i PFS nie tylko od grupy HPV-ujemnej (p16-/HPV-), lecz także grupy o niejednoznacznym statusie p16+/HPV-. Podwójnie dodatnia grupa charakteryzowała się ponad 70% pięcioletnim przeżyciem, podczas gdy w grupach p16+/HPV- i p16-/HPV- wskaźnik ten nieznacznie przekraczał 40%. Podobne różnice kształtowały się również dla pięcioletniego współczynnika PFS.³² Dobre rokowanie dla grup p16-dodanych, wśród chorych testowanych na obecność

infekcji wirusem HPV co najmniej dwiema metodami, wykazali również cytowaniu Lewis i wsp. W badaniu przeprowadzonym na grupie 239 chorych z OPSCC, wyodrębniono trzy kohorty p16-dodatnie, w zależności od statusu infekcji HPV potwierdzanej dodatkowo badaniem ISH i PCR, oraz kohortę p16-ujemną. Każda z trzech p16-dodatnich grup (HPV-dodatnia również w badaniu ISH, HPV-ujemna według ISH, lecz dodatnia według PCR oraz HPV-ujemna według IHS i PCR) rokowała lepiej w zakresie OS, DFS oraz DSS, niż grupa p16-ujemna. Odsetek dwuletniego DSS dla grupy podwójnie dodatniej wynosił ponad 86%, podczas gdy odsetek ten dla grupy podwójnie ujemnej (p16-ujemnej/ISH-ujemnej) wynosił jedynie 44%. Autorzy nie zauważyli istotnych różnic w przeżywalności pomiędzy trzema p16-dodatnimi kohortami. Według nich, powyższe dane wskazują, że immunohistochemiczne badanie p16 jest najważniejszym testem w stratyfikacji ryzyka chorych z OPSCC.⁸⁸

Do odmiennych wniosków doszli Perrone i wsp. badając przeżywalność chorych o niejednoznacznym statusie infekcji HPV, potwierdzanym co najmniej dwiema metodami (p16 IHC oraz PCR lub ISH). Grupa chorych p16+/HPV- nie rokowała lepiej od grupy p16-/HPV-, a wyraźnie korzystne różnice w przeżywalności występowały jedynie w grupie podwójnie dodatniej p16+/HPV+.¹⁰² Badanie to przeczy wnioskowi Rietbergena i Lewisa co do lepszej przeżywalności niejednoznacznych (HPV-ujemnych) grup p16-dodatnich i przestrzega przed wyciąganiem zbyt daleko idących wniosków co do skuteczności samodzielnego immunohistochemicznego badania p16 w prognozowaniu rokowania. Z drugiej strony, badanie Perrone zostało przeprowadzone na niewielkiej (n=72) grupie chorych i opublikowane jedynie jako komentarz do pracy Lewisa. Do podobnych wniosków doszli również Sharma i wsp., w których badaniu pięcioletni czas przeżycia u niejednoznacznych (p16+/HPV- i p16-/HPV+) grup był o ponad 30% niższy, niż w grupie „prawdziwie” dodatniej (p16+/HPV+).¹⁰³

Interesujące badanie Vainshteina i wsp. miało na celu odpowiedzieć na pytanie, czy występujące po latach od pierwotnego leczenia samodzielną radioterapią lub radiochemioterapią wznowy p16+/HPV+ raków części ustnej gardła zachowują ekspresję obu markerów infekcji HPV. Autorzy wysnuli hipotezę, że za proces wznowy może być odpowiedzialna niewielka subpopulacja HPV-ujemnych komórek znajdująca się w heterogennym guzie, zawierającym dominującą populację komórek HPV-dodatnich. Analiza 37 chorych wykazała jednak, że aż 36 spośród nich zachowało podwójnie dodatnią (p16-dodatnia/ISH-dodatnia) populację komórek raka w materiale

pobranym podczas rozpoznania wznowy lokoregionalnej. Autorzy nie wykazali zatem odpowiedzialności subpopulacji HPV-ujemnych komórek w HPV-dodatnim OPSCC za występowanie agresywnego przebiegu choroby.¹⁰⁴ W badaniu będącym podstawą niniejszej rozprawy przeprowadzenie analizy przeżycia dla grup pośredniego ryzyka (p16+/HPV- i p16-/HPV+) nie było możliwe, gdyż chorzy testowani byli celem określenia statusu infekcji wirusem HPV wyłącznie za pomocą badania immunohistochemicznego. Wyniki niniejszej pracy wskazują natomiast, że rokowanie grupy p16-dodatniej jest wyraźnie lepsze od grupy p16-ujemnej, zarówno pod względem OS, jak i PFS.

Rozbieżności pomiędzy badaniami mogą wynikać także z metodologii oznaczania statusu infekcji HPV. Nie wszyscy autorzy stosują identyczne kryteria oceny immunohistochemicznego badania p16, co autorzy ósmej edycji podręcznika AJCC Cancer Staging Manual. Zarówno w podręczniku, jaki i w niniejszym badaniu, jako HPV-pozytywność, przyjęto rozproszone barwienie ponad 75% komórek preparatu i co najmniej umiarkowaną intensywność barwienia. Niektórzy autorzy stosują też kryteria barwienia 40%,¹⁰⁵ 50%¹⁰⁶ lub 70%¹⁰⁷ komórek preparatu lub też kryterium silnego barwienia jądra komórkowego i cytoplazmy.¹⁰⁸

Z powodu różnic pomiędzy wynikami badania immunohistochemicznego i badania PCR oraz rozbieżności, co do przyjętych kryteriów p16-pozytywności, część autorów sugeruje niewystarczającą skuteczność samodzielnie stosowanego badania p16, a co za tym idzie, konieczność testowania statusu infekcji wirusem HPV przy użyciu co najmniej dwóch metod. Bussu i wsp. uznają specyficzność testu p16 IHC za niewystarczającą, by na jego podstawie decydować o potencjalnej (i rozważanej przez niektórych autorów do wprowadzenia w przyszłości – o tym w części poświęconej badaniom klinicznym) dezintensyfikacji terapii.¹⁰⁹ Autorzy proponują wykorzystanie testu E6/E7 mRNA do oceny statusu infekcji HPV w OPSCC, nazywając postępowanie złotym standardem, a samą metodę za wiarygodną, lecz niewystarczająco łatwą do wykonania w codziennej klinicznej praktyce. Izolacja mRNA wymaga przechowywania świeżo pobranego materiału histopatologicznego w utrwalaczu oraz, dla idealnego zachowania materiału genetycznego, jego mrożenia w -20 stopniach Celsjusza. Tymczasem badania p16 IHC oraz PCR służące do oceny statusu infekcji HPV mogą być przeprowadzone z wykorzystaniem niedawno pobranego materiału histopatologicznego lub archiwalnych blozków parafinowych. Brytyjscy i holenderscy badacze zalecają z kolei dwuetapowe badanie statusu infekcji wirusem HPV w rakach

głowy i szyi: Immunohistochemiczne badanie białka p16 i, w przypadku dodatniego wyniku, potwierdzenie badania przy użyciu PCR.^{110 111} Dwuetapowa procedura, poza wyższym kosztem, jest także bardziej czasochłonna od pojedynczego badania. Badacze opisują natomiast jej wysoką skuteczność (czułość wynoszącą 97% i specyficzność wynoszącą 94%).¹¹² Kwon i wsp. również zalecają jednoczesowe użycie co najmniej dwóch technik wykrywania infekcji HPV, sugerując zastosowanie HPV DNA PCR jako jednej z nich.¹¹³ W ośrodku, w którym przeprowadzono badania będące podstawą niniejszej rozprawy, zgodnie z zaleceniami ósmej edycji podręcznika AJCC Cancer Staging Manual, przeprowadza się weryfikację jednoetapową, wykonując badania immunohistochemiczne ekspresji białka p16.

6.3. Stopnie zaawansowania choroby według siódmej i ósmej edycji klasyfikacji TNM

Wyodrębnienie dwóch grup chorych na podstawie statusu infekcji wirusem HPV w ósmej edycji klasyfikacji TNM umożliwiło zastosowanie innych kryteriów do oceny obu grup chorych (p16-dodatnich i p16-ujemnych). Sprawia to, że poznanie statusu infekcji HPV w trakcie diagnostyki może wpłynąć na zmianę przypisanego choremu stopnia zaawansowania choroby nowotworowej: W niniejszym badaniu, u 62-letniego chorego z licznymi jednostronnymi przerzutowymi węzłami chłonnymi klasyfikacja TNM wg ósmej edycji dla OPSCC o nieznanym statusie infekcji p16 prezentowała się następująco: T2N2bM0, stopień zaawansowania IVa. Po poznaniu statusu infekcji wirusem HPV (chory p16-dodatni), zastosowano klasyfikację TNM dla OPSCC p16-dodatnich: T2N1M0, stopień zaawansowania I. Co więcej, zmiana stopnia zaawansowania choroby nowotworowej może ulec radykalnej zmianie podczas ponownej oceny według nowej, ósmej edycji klasyfikacji TNM u chorego poprzednio ocenionego według siódmej edycji klasyfikacji TNM: W niniejszym badaniu, u 63-letniego p16-dodatniego chorego z trzema przerzutowymi węzłami chłonnymi i ENE+, klasyfikacja TNM według siódmej edycji prezentowała się następująco: T3N3M0, stopień zaawansowania IVb. Po zastosowaniu ósmej edycji patologicznej klasyfikacji TNM osiągnięto następujący status: T3N1M0, stopień zaawansowania II.

Różnice w ocenie stopnia zaawansowania choroby nowotworowej pomiędzy dwiema najnowszymi edycjami (siódmą i ósmą) klasyfikacji TNM dotyczą ponad połowy analizowanych przypadków. W badaniu stanowiącym podstawę tej rozprawy, różnice te dotyczyły 53.2% (124/233) wszystkich chorych i aż 96.1% (124/129) spośród chorych p16-dodatnich. Szczególnie częstą przyczyną występowania rozbieżności pomiędzy edycjami klasyfikacji, poza stwierdzoną infekcją wirusem HPV, wydaje się sam fakt zastosowania leczenia chirurgicznego wraz z limfadenektomią. Pozwala to na zastosowanie patologicznej klasyfikacji ósmej edycji TNM, w której cecha N1 dotyczy od 1 do 4 przerzutowych węzłów chłonnych, bez względu na ich umiejscowienie, wielkość, czy ewentualne naciekanie poza torebkę węzła chłonnego. W przypadku zmian węzłowych kontralateralnych (występujących po przeciwnej stronie w stosunku do strony umiejscowienia guza), obustronnych lub większych niż 3 cm, lecz nadal mieszczących się w stopniu N1 według ósmej edycji, może prowadzić to do znacznego

obniżenia stagingu. W opisywanej w niniejszej rozprawie grupie chorych, różnice pomiędzy edycjami na podstawie klasyfikacji patologicznej dotyczyły 95.5% (84/88) chorych. Powyższe dane świadczą o niekompatybilności obu edycji klasyfikacji i konieczności oceny chorych wyłącznie według ósmej edycji klasyfikacji TNM z 2017 roku.

W badanej populacji chorych z OPSCC, podczas oceny według siódmej edycji klasyfikacji TNM, cechę T1 stwierdzono u 27.5%, T2 u 37.3%, T3 u 18.0%, a T4 u 17.2% badanych. Podczas oceny według ósmej edycji, ilościowe rozmieszczenie cechy T w badanej populacji nie uległo zmianie. Według siódmej edycji, cechę N0 stwierdzono u 21.0%, N1 u 12.0%, N2 u 54.9%, a N3 u 12.0% chorych. Po zastosowaniu ósmej edycji klasyfikacji TNM, cechę N0 stwierdzono również u 21.0%, uzyskano natomiast przesunięcie pozostałej części populacji w kierunku niższych wartości cechy N: cechę N1 stwierdzono u 39.5%, N2 u 25.8%, a N3 u 13.7% chorych. Cechę N zmieniono zatem pomiędzy edycjami klasyfikacji u 81 chorych: u 14 na wyższą i u 67 na niższą względem siódmej edycji. Odsetek chorych z zaawansowaną cechą N (N2 i N3) zmalał z około 67% (siódma edycja) do niecałych 40% (ósma edycja).

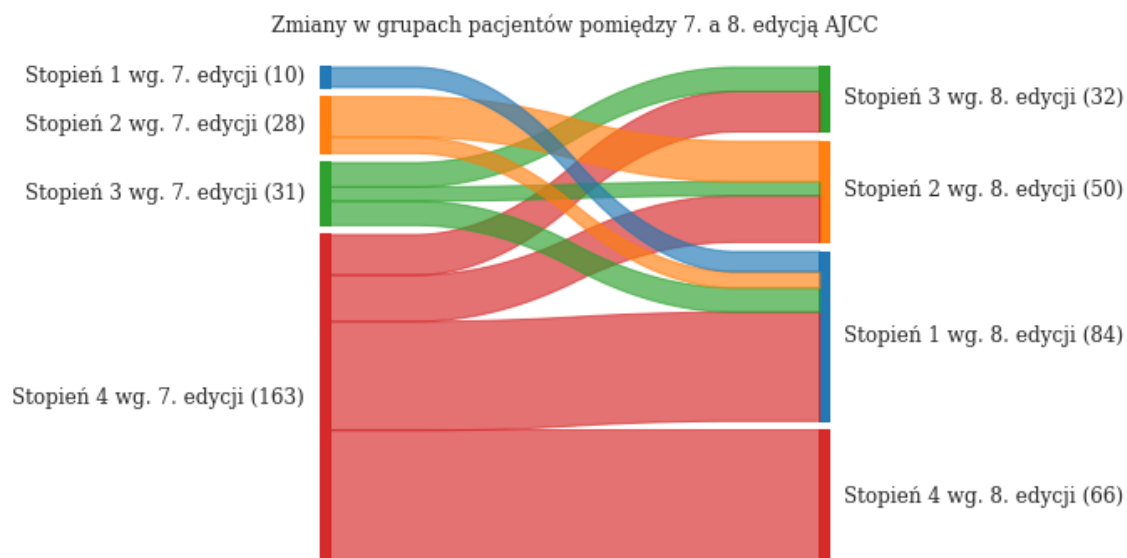
Wyniki te korelują z pracami innych badaczy, u których także stwierdzono przesunięcie w kierunku niższych wartości cechy N względem siódmej edycji klasyfikacji TNM po zastosowaniu kryteriów ósmej edycji klasyfikacji. W badaniu Zhana i wsp., autorzy ocenili według kryteriów dwóch najnowszych edycji klasyfikacji TNM kohortę 3745 leczonych chirurgicznie chorych z p16-dodatnim OPSCC. Po zastosowaniu kryteriów ósmej edycji klasyfikacji odsetek chorych z cechą pN1 wzrósł z 17.3% (przy stosowaniu siódmej edycji klasyfikacji) do ponad 75%. Odsetek chorych z zaawansowaną cechą N (N2 i N3) zmalał z ponad 70% (siódma edycja) do 12.6% (ósma edycja). W badaniu tym, w przeciwieństwie do niniejszej rozprawy, nie oceniano grupy chorych p16-ujemnych.⁸²

Jacobi i wsp. ocenili według kryteriów dwóch edycji klasyfikacji TNM 137 chorych ze znanym statusem infekcji HPV leczonych pierwotnie chirurgicznie z powodu OPSCC. W grupie chorych p16-dodatnich, odsetek chorych z cechą pN1 wzrósł z 16% (siódma edycja) do 67% (ósma edycja). Odsetek chorych z zaawansowaną cechą N (pN2 i pN3) zmalał z około 70% (siódma edycja) do 19% (ósma edycja). W grupie chorych p16-ujemnych odsetek chorych przypisanych do poszczególnych cech N pozostał prawie niezmienny pomiędzy dwiema edycjami klasyfikacji.⁸³

Zarówno w tym, jak i dwóch innych opisanych badaniach oceniających tę samą kohortę chorych przy zastosowaniu dwóch edycji klasyfikacji TNM stwierdzono przesunięcie w kierunku niższych wartości cechy N, zwłaszcza wśród chorych p16-dodatnich. Odsetek chorych z zaawansowaną cechą N (N2 i N3) zmalał według danych niniejszej pracy o 27 punktów procentowych, podczas gdy w dwóch analizowanych pracach odpowiednio o 59 i 51 punktów procentowych. Różnice w odsetku chorych, u których stwierdzono downstaging cechy N, pomiędzy niniejszą rozprawą, a przytoczonymi pracami, przypuszczalnie wynika z faktu, że dwie powyższe prace opisują grupy chorych leczonych wyłącznie chirurgicznie. Warunkuje to zastosowanie klasyfikacji patologicznej podczas stosowania jej ósmej edycji, charakteryzującej się brakiem występowania cechy N3 oraz przypisywaniem cechy N1 przy stwierdzeniu do czterech przerzutowych węzłów chłonnych, nawet przy stwierdzeniu ENE lub masywnych rozmiarów przerzutowego węzła chłonnego. W tej analizie stosowano natomiast zarówno klasyfikację patologiczną, jak i kliniczną, co mogło przełożyć się na mniej zauważalny downstaging cechy N, niż w literaturze. Powyższe dane, pomimo niewielkich różnic, świadczą o wyraźnym efekcie zmiany kryteriów dotyczących przerzutowych węzłów chłonnych: Chorzy oceniani według ósmej edycji klasyfikacji TNM sklasyfikowani są z niższymi wartościami cechy N, niż ci sami chorzy oceniani według siódmej edycji.

Wobec zmian cechy N pomiędzy siódmą i ósmą edycją klasyfikacji TNM, u 53.2% chorych, ocenianych według kryteriów nowej edycji klasyfikacji, zmieniono także stopień zaawansowania choroby względem edycji siódmej. Przy ocenie stopnia zaawansowania nowotworu według siódmej edycji klasyfikacji, I stopień stwierdzono u 4.3%, II u 12.0%, III u 13.3%, a IV u 70.4% chorych. Po ponownej ocenie chorych według ósmej edycji klasyfikacji, I stopień zaawansowania rozpoznano u 36.1%, II u 21.5%, III u 13.7%, a IV u 28.8% chorych. Jak podkreślono w wynikach badań, wszystkie zmiany stopnia zaawansowania odbyły się w kierunku niższych stopni zaawansowania (downstaging) i wyłącznie wśród chorych p16-dodatnich. Downstaging stwierdzono u 96.1% chorych p16-dodatnich: u 84 chorych ocenianych według klasyfikacji patologicznej oraz 40 ocenianych według klasyfikacji klinicznej. Wczesny i średni (I i II) stopień zaawansowania choroby nowotworowej według siódmej edycji stwierdzono jedynie u 16.3% chorych, podczas gdy zaawansowaną chorobę nowotworową rozpoznano u 83.7% chorych. Przy zastosowaniu kryteriów ósmej edycji klasyfikacji, wczesny i średni (I i II) stopień zaawansowania choroby nowotworowej

stwierdzono u 57.5% chorych, podczas gdy zaawansowaną chorobę nowotworową rozpoznano u 42.5% chorych. Zmiany w stopniu zaawansowania OPSCC pomiędzy dwiema edycjami klasyfikacji przedstawiono graficznie poniżej. (Rycina 22.)



Rycina 22. Ilustracja zmian w liczebności poszczególnych stopnia zaawansowania choroby nowotworowej według siódmej (lewa strona ryciny) oraz ósmej edycji klasyfikacji TNM. W nawiasach podano liczbę chorych przypisanych do poszczególnego stopnia zaawansowania według odpowiedniej edycji klasyfikacji

Podobne wnioski przedstawiają inni badacze, również dokonujący ponownej oceny według ósmej klasyfikacji TNM u chorych ze znanym statusem infekcji wirusem HPV. Park i wsp. ocenili 188 chorych z p16-dodatnim OPSCC według siódmej i ósmej edycji klasyfikacji TNM. Przy zastosowaniu siódmej edycji klasyfikacji, ponad 85% przypadków zostało ocenionych jako zaawansowana choroba nowotworowa w III i IV stopniu zaawansowania (odpowiednio 19.1% i 67.6% przypadków). Jedynie ośmiu (4.3%) chorym został przypisany pierwszy stopień zaawansowania nowotworu. Co interesujące, odsetek ten (4.3%) był identyczny jak w niniejszym badaniu. Po ponownej ocenie według ósmej edycji klasyfikacji, znaczna większość chorych została przypisana do grupy wczesnego i średniego stopnia zaawansowania nowotworu (I i II stopień zaawansowania, odpowiednio 76.1% i 20.7%).¹¹⁴ W niniejszym badaniu również ponad połowa chorych ocenianych według kryteriów ósmej edycji klasyfikacji TNM została przypisana do I lub II stopnia zaawansowania.

W opisanym już badaniu Zhana, jedynie co dziesiąty chory przypisany został do grupy wczesnego i średniego stopnia zaawansowania nowotworu (I i II stopień, odpowiednio 3.6% i 6.6%), podczas gdy ponad połowa chorych znajdowała się w IV stopniu zaawansowania (53.7%). Przy zastosowaniu kryteriów ósmej edycji klasyfikacji TNM, ponad 95% przypadków zostało zaklasyfikowanych do I i II stopnia zaawansowania (odpowiednio 80.2% i 17.7%).⁸²

W badaniu Freitag i wsp. na grupie 92 chorych z zaawansowanym OPSCC (III i IV stopień zaawansowania według siódmej edycji klasyfikacji TNM) leczonym chirurgicznie, również stwierdzono zmianę stopnia zaawansowania choroby przy ponownej ocenie chorych według ósmej edycji klasyfikacji. Prawie 40% chorym obniżono stopień zaawansowania choroby (downstaging) do I stopnia (u 36 z 92 chorych, u 10 z nich ze stopnia III, u 26 z nich ze stopnia IVa). W tym samym badaniu obniżono również stopień zaawansowania do II stopnia według ósmej edycji TNM (28.3% badanych), a także do III stopnia (32.6% badanych, u 28 z nich ze stopnia IVa, u 2 z nich ze stopnia IVb).¹¹⁵

Beltz i wsp. opisała grupę 255 chorych z OPSCC ze znany status p16. Po ponownym zastosowaniu ósmej edycji klasyfikacji TNM liczba chorych zaklasyfikowanych do I stopnia zaawansowania choroby nowotworowej wzrosła z 10.6% (siódma edycja) do 27.5% (ósma edycja). Liczba chorych zaklasyfikowanych do IV stopnia zaawansowania zmalała z 64.7% (siódma edycja) do 39.6% (ósma edycja).⁸⁵ Wyniki te są spójne z niniejszym badaniem, w którym liczba chorych zaklasyfikowanych do IV stopnia zaawansowania zmalała z 70.4% (siódma edycja) do 28.8% (ósma edycja).

Wuerdemann i wsp. opisali 378 chorych z OPSCC ze znany status infekcji HPV. Znaczna większość chorych (79.4%) była p16-ujemnych. Przy użyciu siódmej edycji klasyfikacji TNM (status infekcji HPV pozostawał wówczas nieistotny) w kolejnych stopniach zaawansowania nowotworu znajdowało się odpowiednio 10.3%, 9.8%, 15.9% i 64.0% dla I, II, III i IV stopnia zaawansowania nowotworu. Po zastosowaniu ósmej edycji klasyfikacji odsetek chorych z zaawansowaną chorobą nowotworową (III i IV stopień) znacznie się zmniejszył dla chorych p16-dodatnich: Rozkład populacji z p16-dodatnim OPSCC w kolejnych stopniach zaawansowania wynosił odpowiednio 56.4%, 19.2%, 23.1% i 1.3% dla I, II, III i IV stopnia zaawansowania nowotworu.¹¹⁶

W opisanym już badaniu Jacobiego, podczas zastosowania kryteriów siódmej edycji, większość chorych została zaklasyfikowana do grupy z zaawansowaną chorobą

nowotworową (III i IV stopień zaawansowania, odpowiednio 19% i 62%). Po zastosowaniu ósmej edycji klasyfikacji TNM, 95% p16-dodatnich chorych zostało przydzielonych do grupy wczesnego i średniego stopnia zaawansowania nowotworu (I i II stopień zaawansowania), podczas gdy 85% p16-ujemnych chorych zaklasyfikowanych zostało do II i III stopnia zaawansowania.⁸³ Powyższe dane są spójne z wynikami niniejszej pracy, gdzie według kryteriów siódmej edycji klasyfikacji, zaawansowaną chorobę nowotworową (III i IV stopień zaawansowania) rozpoznano u 83.7% badanych. Po zastosowaniu ósmej edycji, zaawansowaną chorobę nowotworową rozpoznano u 42.5% badanych.

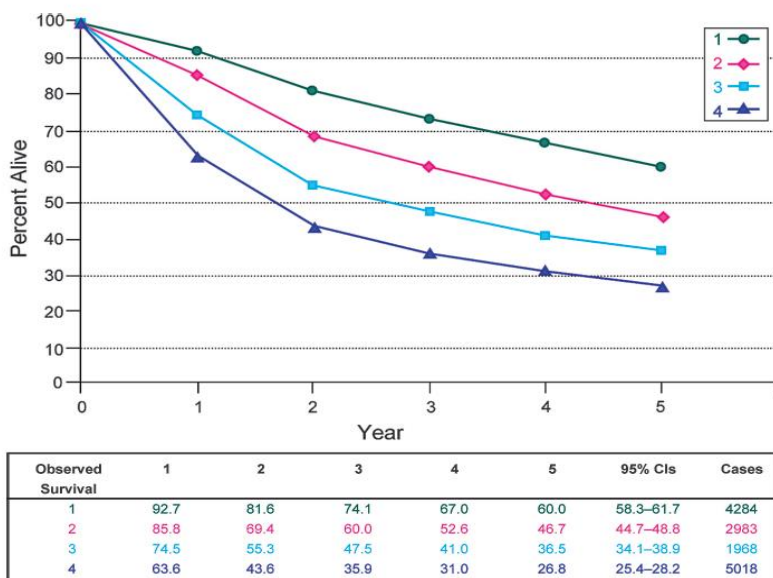
Uzyskane wyniki świadczą, o znacznie lepszym rozmieszczeniu chorych przyporządkowanych do poszczególnych stopni zaawansowania OPSCC według kryteriów ósmej edycji klasyfikacji TNM. Zarówno w niniejszej pracy, jak i przeanalizowanej literaturze zastosowanie ósmej edycji pozwoliło zmienić stopień zaawansowania choroby znacznej części chorych w kierunku niższych wartości klasyfikacji. Podczas stosowania kryteriów siódmej edycji, widoczna była znaczna nadreprezentacja chorych znajdujących się w IV stopniu zaawansowania choroby. We wszystkich przeanalizowanych badaniach, włącznie z niniejszym, u ponad 70% chorych rozpoznano zaawansowaną chorobę nowotworową (III i IV stopień zaawansowania) według kryteriów siódmej edycji klasyfikacji TNM choroby (ponad 83% wg niniejszej pracy, ponad 85% wg Parka, 90% wg Zhan, ponad 81% u Beltz, 80% u Wuerdemann, 81% u Jacobiego). Po zastosowaniu kryteriów ósmej edycji klasyfikacji TNM, uzyskano znacznego stopnia downstaging, a odsetek chorych, u których rozpoznano zaawansowaną chorobę nowotworową nie przekroczył 60% (42.5% wg niniejszej pracy, 3,2% wg Parka, 2,1% wg Zhan, niecałe 25% w grupie p16-dodatniej u Wuerdemann, jedynie u Beltz oraz Jacobiego wynosił nieco ponad 55%.) Wyniki niniejszej pracy mieszczą się zatem w spektrum wyników osiągniętych w podobnej analizie wykonanej przez innych autorów. Ewentualne różnice pomiędzy badaniami wynikają prawdopodobnie z wykorzystania odmiennej metodologii: doboru grup w zakresie statusu infekcji HPV oraz doboru grup w zakresie leczenia operacyjnego oraz nieoperacyjnego, co przekłada się na zastosowanie odpowiednio klasyfikacji patologicznej lub klinicznej. Powyższe dane świadczą o znacznych różnicach w przyporządkowaniu stopnia zaawansowania chorym ocenianym według obu edycji klasyfikacji TNM. Liczne przytoczone przykłady dowodzą, że chorzy oceniani według siódmej edycji, zazwyczaj klasyfikowani są z wyższymi stopniami zaawansowania, niż

ci sami chorzy oceniani według kryteriów ósmej edycji. Dzięki zastosowaniu ósmej edycji klasyfikacji TNM, zbliżono się do spełnienia założeń Patti Groome dotyczących prawidłowego doboru grup w zakresie równowagi w rozmieszczeniu chorych pomiędzy grupami.

6.4. Czas przeżycia chorych w zależności od stopnia zaawansowania choroby według siódmej i ósmej edycji klasyfikacji TNM

Wobec prezentowanych we wstępie rozprawy odkryć, potwierdzających jednoznacznie lepszą prognozę w przypadku OPSCC związanych z infekcją wirusem brodawczaka ludzkiego, stało się jasne, że siódma edycja klasyfikacji TNM może w niewłaściwy sposób przewidywać prognozę oraz niedokładnie ustalać stratyfikację ryzyka dla chorych HPV-dodatnich. Jako że u znacznej części chorych HPV-dodatnich choroba nowotworowa rozpoznawana jest już w momencie występowania zmian węzłowych, chorzy ci często przypisywani byli do wysokich stopni zaawansowania według siódmej edycji klasyfikacji TNM.

Nieprawidłowa stratyfikacja rokowania dla poszczególnych stopni zaawansowania choroby nowotworowej (u chorych, u których nie uwzględniano ówczesnie statusu infekcji wirusem HPV) nie została zauważona w momencie publikacji siódmej edycji klasyfikacji TNM UICC/AJCC z 2009 roku. W rozdziale siódmej edycji klasyfikacji dotyczącym nowotworów gardła, autorzy zaprezentowali wyniki dokonujące walidacji ówczesnej edycji. W badaniu walidacyjnym na grupie 14253 chorych, pięcioletnie całkowite przeżycie (OS) dla poszczególnych stopni zaawansowania choroby było dla każdego roku prowadzonej obserwacji tym niższe, im wyższy stopień zaawansowania nowotworu, co miało świadczyć o prawidłowym doborze grup według zasad Groome. W prezentowanym wykresie nie podano natomiast mocy statystycznej badania. (Rycina 23.)



Rycina 23. Krzywe całkowitego pięcioletniego przeżycia (OS) według stopnia zaawansowania choroby dla chorych z OPSCC niestratyfikowanych według statusu infekcji HPV. Według badania walidującego siódmą edycję klasyfikacji TNM z 2009 roku na grupie 14253 chorych. Według AJCC cancer staging manual, 7th edition.⁸⁰

W czasie codziennej pracy klinicznej, po uzyskaniu doświadczenia co do oceny rokowania grup chorych ocenianych według siódmej edycji klasyfikacji TNM, liczni autorzy opisali swoje zastrzeżenia co do stratyfikacji ryzyka według tejże edycji. Taberna i wsp. porównali w 2017 roku cztery systemy służące klasyfikacji HPV-dodatnich raków części ustnej gardła, w tym siódmą edycję klasyfikacji TNM, badanie ICON-S stanowiące merytoryczną podstawę, na której opierała się wkrótce powstała ósma edycja klasyfikacji TNM oraz dwie inne, mniej istotne w codziennej pracy klinicznej klasyfikacje. W porównaniu z siódmą edycją klasyfikacji TNM, wszystkie inne klasyfikacje lepiej oddawały różnice w przeżyciu pomiędzy grupami. Szczególnie interesujący jest fakt, że pomimo, iż żadna z trzech nowych opisywanych w badaniu klasyfikacji (wyłączając oczywiście siódmą edycję, która nie dyskryminuje pomiędzy chorymi HPV-ujemnymi i dodatnimi) nie uwzględnia testowania co najmniej dwiema metodami, autorzy uzyskali najlepsze wyniki podczas stosowania klasyfikacji ICON-S przy zastosowaniu dwóch biomarkerów do oznaczenia HPV-pozytywności: HPV-DNA oraz p16 IHC lub HPV-mRNA.⁹⁷

W badaniu Miccio i wsp. na grupie ponad trzech tysięcy chorych z HPV-dodatnim OPSCC i potwierdzonymi histopatologicznie przerzutami do układu chłonnego szyi,

cecha N według siódmej edycji klasyfikacji TNM nie wpłynęła na OS zgodnie z oczekiwaniami: jedynie cecha N2c wiązała się z gorszym czasem ogólnego przeżycia w stosunku do cechy N0; czasy przeżycia grup z cechą N1, N2a, N2b i N3 były natomiast porównywalne do N0.¹¹⁷ Podobne wyniki osiągnęli Han i wsp., którzy nie wykazali istotnych różnic w przeżyciu grup z cechą pN0, pN1 i pN2 podczas oceny według siódmej edycji klasyfikacji TNM.¹¹⁸

W opisywanym już badaniu Nauty i wsp. na grupie 1204 chorych, podczas zastosowania siódmej edycji klasyfikacji TNM, chorzy w I i II stopniu zaawansowania charakteryzowali się wbrew przewidywaniom krótszym OS, niż chorzy w stopniu III i IV.⁹⁸

Powyższe dane potwierdziły odczucia klinicystów, że poprzednio stosowana edycja klasyfikacji TNM w nieprawidłowy sposób dyskryminuje ryzyko oraz oszacowuje rokowanie chorych z rakami ustnej części gardła wywołanymi infekcją wirusem brodawczaka ludzkiego. W efekcie, na podstawie badania International Collaboration on Oropharyngeal Cancer Network for Staging (ICON-S) zawierającego dane z pięciu północnoamerykańskich i dwóch europejskich ośrodków powstała nowa, ósma edycja klasyfikacji TNM, zawierająca zupełnie nowy system oceny HPV-dodatnich OPSCC. Opublikowane w 2016 roku badanie ICON-S opisuje grupę 2603 chorych z OPSCC, bez stwierdzonych odległych przerzutów (M0), ze znanym statusem infekcji HPV (stwierdzonym przy użyciu pojedynczej metody: p16 IHC lub ISH). U większości chorych stwierdzono OPSCC zależny od infekcji wirusem brodawczaka ludzkiego (1907 z 2603, 65%). Co bardziej istotne, przeważająca większość chorych leczona była pierwotnie radioterapią lub radiochemioterapią (2553 z 2603 chorych, 98%), w związku z czym znany był wyłącznie status kliniczny (c-) zaawansowania choroby. Jedynie u 2% chorych zastosowano pierwotne leczenie chirurgiczne.¹¹⁹ Niezbędną do powstania uniwersalnej klasyfikacji grupę 702 chorych leczonych chirurgicznie, a więc ze znanym patologicznym statusem (p-) zaawansowania choroby, pozyskano z osobnego badania HPV-Path. Interesujący jest fakt, że w badaniu HPV-Path czas przeżycia dla grupy z patologicznym trzecim stopniem zaawansowania choroby wyznaczono na podstawie analizy jedynie 23 chorych, co mogło prowadzić do uzyskania mało wiarygodnych wyników.¹²⁰ Wyniki obu badań (ICON-S oraz HPV-Path) zostały następnie połączone, prowadząc do stworzenia rozdziału o HPV-dodatnim i HPV-ujemnym OPSCC w ósmej edycji klasyfikacji UICC/AJCC.⁸⁴ W związku z tym, w klasyfikacji dotyczącej p16-dodatnich

OPSCC występują znaczne różnice pomiędzy kliniczną i patologiczną oceną węzłów chłonnych szyi: kliniczna klasyfikacja (cN) opiera się na rozmiarze i stronie występowania przerzutowych węzłów chłonnych na podstawie obrazu radiologicznego, podczas gdy patologiczna klasyfikacja (pN) wymaga jedynie informacji na temat potwierdzonych w badaniu histopatologicznym liczby przerzutowych węzłów chłonnych. Dla chorych p16-ujemnych różnica między kliniczną i patologiczną klasyfikacją dotyczącą węzłów chłonnych jest nieznaczna i dotyczy przede wszystkim występowania naciekania poza torebkę węzła chłonnego (ENE).

Badanie Porceddu i wsp. służące walidacji systemu klasyfikacji ICON-S wykazało, że ICON-S w lepszy sposób oddaje zróżnicowanie czasu przeżycia (OS) dla poszczególnych stopni zaawansowania u leczonych nieoperacyjnie chorych z p16-dodatnim OPSCC, niż siódma edycja klasyfikacji TNM.¹²¹ Dlatego też, pomimo wynikających z rozbieżności pomiędzy systemem klinicznym i patologicznym niedoskonałości ósmej edycji klasyfikacji TNM, system ten z powodzeniem zastąpił niedostosowaną do oceny HPV-dodatnich OPSCC siódmą edycję klasyfikacji, stając się podstawą do stworzenia ósmej edycji klasyfikacji TNM.

W niniejszym badaniu przeanalizowano krzywe OS oraz PFS a także wynikające z nich różnice pomiędzy poszczególnymi stopniami zaawansowania według dwóch ostatnich edycji klasyfikacji TNM: siódmej oraz ósmej. Podczas stosowania siódmej edycji klasyfikacji TNM, krzywe dla OS oraz PFS nie zostały istotnie odseparowane od siebie. W teście log rank statystycznie istotną różnicę, zarówno dla OS, jak i PFS, stwierdzono jedynie pomiędzy drugim, a czwartym stopniem zaawansowania choroby, nie zauważono natomiast różnic pomiędzy żadnymi innymi stopniami zaawansowania. Podczas zastosowania ósmej edycji klasyfikacji TNM, zarówno dla OS, jak i PFS, krzywe czasu ogólnego przeżycia dla wszystkich chorych stratyfikowanych według poszczególnych stopni zaawansowania choroby nowotworowej zostały wyraźnie odseparowane od siebie. Wykazano istotne różnice w OS oraz PFS pomiędzy prawie każdymi stopniami zaawansowania. Nie wykazano jedynie różnicy w OS oraz PFS pomiędzy II, a III stopniem zaawansowania choroby.

Przedstawione wyniki są spójne z badaniami, w których zastosowano podobną metodologię pracy. W badaniu Gupty i wsp. oceniającym 218 p16-dodatnich chorych z OPSCC według obu edycji klasyfikacji, nie stwierdzono istotnych różnic w pięcioletnim przeżyciu (OS) dla poszczególnych stopni zaawansowania choroby nowotworowej podczas wykorzystania siódmej edycji klasyfikacji TNM. Przy

zastosowaniu kryteriów ósmej edycji, jedynie patologiczna (lecz nie kliniczna) klasyfikacja osiągnęła istotne statystycznie zróżnicowanie pod względem pięcioletniego OS dla poszczególnych stopni zaawansowania. Świadczy to o lepszej, lecz nie idealnej dyskryminacji ryzyka dla ósmej edycji klasyfikacji TNM względem edycji siódmej.⁸⁴ W niniejszej pracy nie wykonano osobnej analizy przeżywalności dla klasyfikacji patologicznej oraz klinicznej (według ósmej edycji), natomiast istotne różnice w OS oraz PFS pomiędzy poszczególnymi stopniami zaawansowania OPSCC podczas oceny według kryteriów ósmej edycji klasyfikacji świadczą o znacznej lepszej dyskryminacji ryzyka, niż przy ocenie według edycji siódmej.

W cytowanej już pracy Wuerdemann i wsp., podczas zastosowania kryteriów siódmej edycji TNM, nie udało się wykazać statystycznie istotnej różnicy pod względem OS wśród grupy chorych p16-ujemnych oraz p16-dodatnich. Ponadto, chorzy z I i IV stopniem zaawansowania cechowali się takim samym odsetkiem pięcioletniego OS. Po zastosowaniu kryteriów edycji ósmej, mimo niewielkiej badanej grupy chorych (n=77), uzyskano istotną statystycznie różnicę w pięcioletnim przeżyciu pomiędzy poszczególnymi stopniami zaawansowania. Zgodnie z oczekiwaniami, chorzy z niższym stopniem zaawansowania choroby, podobnie jak w niniejszej rozprawie doktorskiej, rokowali też lepiej, niż chorzy z wyższym stopniem zaawansowania. W badaniu Wuerdemann różnica w pięcioletnim czasie OS była wyraźnie przesunięta na korzyść chorych p16-dodatnich (81.1% vs 39.7%).¹¹⁴ Dane te są spójne z wynikami niniejszej analizy. Odsetek pięcioletniego OS jest znacznie wyższy w I grupie badanych (69%), niż w II grupie (39%). Różnica w pięcioletnim OS pomiędzy I i II grupą wyniosła 40 punktów procentowych i jest zbliżona do różnicy uzyskanej w cytowanym badaniu Wuerdemann, wynoszącej 41 punktów procentowych.

Zarówno Wuerdemann jak i cytowana wcześniej van Gysen doszli do identycznych jak w niniejszej rozprawie wniosków, zauważając, że ósma edycja klasyfikacji TNM nie dyskryminuje w wystarczający sposób pomiędzy drugim i trzecim stopniem zaawansowania u p16-dodatnich chorych. Przypuszczalnie, na powyższe dane mógł wpłynąć opisany we wcześniejszym akapicie tego rozdziału fakt, że patologiczną klasyfikację trzeciego stopnia zaawansowania utworzono na podstawie badania zawierającego jedynie 23 chorych w tymże stopniu zaawansowania choroby. W ten sposób, badacze opracowujący podstawy ósmej edycji klasyfikacji TNM mogli niewłaściwie sformułować kryteria doboru chorych do trzeciego stopnia zaawansowania. Jednakże, w cytowanym w tym akapicie badaniu Gupty, to

klasyfikacja patologiczna, a nie kliniczna wykazała prawidłowe zróżnicowanie pod względem przeżycia.

Powyższe dane świadczą o znacznych różnicach co do oceny rokowania chorych pomiędzy dwiema opisywanymi edycjami klasyfikacji TNM. Wyniki niniejszego badania oraz dane z cytowanej literatury dowodzą, że chorzy oceniani według siódmej edycji klasyfikacji, zazwyczaj nie wykazują zróżnicowania co do przeżywalności pomiędzy poszczególnymi stopniami zaawansowania choroby. Ci sami chorzy, oceniani według kryteriów ósmej edycji, co do zasady wykazywali istotne różnice w przeżyciu pomiędzy poszczególnymi stopniami zaawansowania, a rokowanie poprawiało się wraz ze spadkiem stopnia zaawansowania choroby. Siódma edycja, w przeciwieństwie do nowej edycji klasyfikacji, wydaje się zatem nie stratyfikować we właściwy sposób ryzyka chorych. Dzięki zastosowaniu ósmej edycji klasyfikacji TNM, zbliżono się do spełnienia założeń Patti Groome dotyczących prawidłowego doboru grup: spójności i dyskryminacji ryzyka pomiędzy grupami chorych.

W niniejszym badaniu podjęto także próbę wyodrębnienia populacji pośredniego, podwyższonego ryzyka wśród dobrze rokujących chorych przypisanych do I oraz II stopnia zaawansowania według ósmej klasyfikacji TNM. W tym celu porównano ze sobą grupę z niższym stopniem zaawansowania również według siódmej edycji, z grupą z wyższym (III i IV) stopniem zaawansowania według siódmej edycji. Nie wykazano jednak istotnej różnicy co do przeżycia pomiędzy obu grupami, pomimo faktu, że grupa mieszcząca się we wczesnym stopniu zaawansowania według obu edycji klasyfikacji charakteryzowała się dłuższym średnim OS o 15 miesięcy względem grupy, u której obniżono stopień zaawansowania. Brak statystycznej różnicy może jednak wynikać z faktu niewielkiej liczebności obu podgrup, zawierających łącznie jedynie 47 osób. W literaturze opisano próby wydzielenia populacji pośredniego ryzyka wśród dobrze rokujących chorych p16-dodatnich. Powyżej przedstawiono dobrze opisane grupy p16+/HPV- oraz p16-/HPV+, nie będące przedmiotem niniejszej analizy. Niektórzy badacze dowodzą także, że w grupie p16-dodatnich OPSCC, chorzy palący tytoń rokują gorzej, niż ci niepalący.¹²² Według stanu wiedzy autora, niniejsza analiza jest pierwszą opisaną w literaturze próbą określenia populacji pośredniego ryzyka, zestawiając ze sobą siódmą i ósmą edycję klasyfikacji TNM. Dalsza analiza obu podgrup na większej kohorcie chorych pozwoliłaby ocenić przydatność przeprowadzonego porównania i przypuszczalnie określić kryteria grupy pośredniego ryzyka wśród chorych z wczesnym p16-dodatnim OPSCC.

6.5. Pozostałe czynniki prognostyczne

Od momentu publikacji w 2017 roku ósmej edycji klasyfikacji TNM, nowy system podlega nieprzerwanej weryfikacji przez publikacje, wykorzystujące oba (siódmy i ósmy) systemy klasyfikacji do oceny własnych populacji chorych. Autorzy publikacji weryfikujących założenia klasyfikacji TNM są co do zasady zgodni, że nowa edycja w lepszy sposób, niż edycja siódma, przewiduje ryzyko i pozwala na skuteczniejszą ocenę rokowania dla chorych HPV-dodatnich.⁷³ Jednakże nie wszystkie czynniki, które mogą, według niektórych publikacji, mieć wpływ na rokowanie (takie jak: naciekanie poza torebkę węzła chłonnego (ang. *extranodal extension*, ENE), współczynnik przerzutowych do wszystkich pobranych w czasie limfadenektomii węzłów chłonnych (ang. *lymph node ratio*, LNR) a także strona występowania przerzutowych węzłów chłonnych) są uwzględnione w patologicznej części klasyfikacji TNM w HPV-dodatnich OPSCC.

Pierwszy opis naciekania poza torebkę węzła chłonnego (ENE) pojawił się w pracy Willisa w 1930 opisującej sekcje zwłok chorych z zaawansowanym rakiem głowy i szyi.¹²³ Niekorzystny wpływ naciekania poza torebkę węzła chłonnego na rokowanie chorych z rakami krtani i części krtaniowej gardła został opisany po raz pierwszy przez Bennetta w 1971 roku.¹²⁴ Od tego czasu, coraz więcej dowodów wskazywało nie niekorzystny wpływ występowania ENE na rokowanie chorych z rakiem głowy i szyi. Nie do końca poznane natomiast jest znaczenie naciekania pozatorebkowego w HPV-dodatnich OPSCC. ENE jest jednym z czynników, które zdecydowano się pominąć w zarówno klinicznej, jak i patologicznej klasyfikacji TNM dla p16-dodatnich raków części ustnej gardła. Naciekanie poza torebkę węzła chłonnego nie było uwzględnione dla oceny cechy N również w siódmej edycji klasyfikacji TNM, gdzie jedynymi kryteriami pozostawały wielkość oraz lateralizacja węzłów. ENE włączono natomiast w kryteria ósmej edycji klinicznej i patologicznej klasyfikacji dla p16-ujemnych OPSCC. Występowanie naciekania pozatorebkowego (ENE+) przypisuje nowotworowi cechę N3 (według klasyfikacji klinicznej) lub co najmniej cechę N2 (dla klasyfikacji patologicznej), co skutkuje oceną zaawansowania choroby co najmniej w stopniu IVa.

Naciekanie poza torebkę węzła jest opisywane u około 60% chorych z rakiem głowy i szyi dającym przerzuty do układu chłonnego szyi, a częstość występowania ENE

potwierdzonego w badaniu histopatologicznym u chorych z kliniczną cechą N0 szacuje się na 10.5-25%.¹²⁵ Odsetek występowania ENE w niniejszej rozprawie jest zatem niższy, niż w przytoczonej literaturze: ENE stwierdzono u 26.2% wszystkich chorych oraz u 33.2% chorych, u których stwierdzono obecność co najmniej jednego przerzutowego węzła chłonnego.

Przy ocenie naciekania pozatorebkowego należy zwrócić uwagę na możliwość uzyskania fałszywie dodatniego wyniku. Możliwość taką sugerują wyniki badania przeprowadzonego na Uniwersytecie Waszyngtońskim, według którego zastosowanie uważnej i systematycznej oceny (wykluczającej naciekanie torebki bez jej przekraczania jako ENE+) zmniejszyło odsetek naciekania poza torebkę węzła chłonnego z 82% do 52%, co świadczy o potrzebie stosowania ściśle wystandaryzowanych definicji ENE.¹²⁶ W innej pracy zbadano zgodność klinicznej oceny występowania ENE u p16-dodatnich chorych w badaniu tomografii komputerowej, przeprowadzonej niezależnie przez dwóch radiologów. Niezależnie od oceniającego radiologa, czułość badania nie przekraczała 61%, podczas gdy specyficzność nie przekraczała 73%. Wykazało to, że w ocenie klinicznej występowania naciekania poza torebkę węzła radiologom łatwiej było trafnie wykluczyć ENE, niż je potwierdzić, a badanie tomografii komputerowej ma ograniczoną skuteczność wykrywania ENE.¹²⁷

W niniejszej analizie nie wykazano istotnej różnicy statystycznej w OS ani PFS pomiędzy chorymi, u których stwierdzono ENE oraz chorymi ENE-ujemnymi. Wnioski te dotyczą całej badanej kohorty chorych oraz I i II grupy chorych, analizowanych osobno. Nie potwierdzono zatem związku występowania ENE z gorszym rokowaniem. Odsetek 3-letniego i 5-letniego OS w grupie chorych ENE-ujemnych wyniósł odpowiednio 65% i 58%, natomiast odsetek 3-letniego i 5-letniego OS w grupie chorych ENE-dodatnich wyniósł odpowiednio 52 i 49%.

Wśród chorych p16-dodatnich, odsetek trzyletniego OS wyniósł 78% u chorych ENE-ujemnych oraz 68% u ENE-ujemnych. Nie wykazano statystycznie istotnej różnicy pomiędzy tymi podgrupami ($p=0.37$). Odmienne wyniki uzyskano w pracach autorów, którzy dowodzą, że występowanie ENE może być niekorzystnym czynnikiem rokowniczym również w HPV-dodatnich OPSCC, pomimo pominięcia ENE w ocenie stopnia zaawansowania HPV-dodatnich OPSCC w ósmej edycji klasyfikacji TNM. W opisywanym już w niniejszej rozprawie badaniu Miccio i wsp. na grupie ponad trzech tysięcy chorych leczonych chirurgicznie z powodu HPV-dodatniego OPSCC

z potwierdzonymi przerzutami do układu chłonnego, wykazano związek występowania ENE z gorszym rokowaniem.¹¹⁵ Do podobnych wniosków doszli An i wsp. w badaniu na grupie ponad tysiąca chorych leczonych również chirurgicznie z powodu HPV-dodatniego OPSCC. Występowanie ENE związane było z niższym odsetkiem trzyletniego przeżycia (89.3% w grupie ENE-dodatniej i 93.6% w grupie ENE-ujemnej, $p=0.01$).¹²⁸ W cytowanym badaniu, odsetek trzyletniego OS dla grupy p16-dodatniej był zatem wyższy, niż w wynikach niniejszej rozprawy (odpowiednio 68% w grupie ENE-dodatniej i 78% w grupie ENE-ujemnej). W badaniu An i wsp. wykazano ponadto związek występowania ENE z innymi niekorzystnymi czynnikami rokowniczymi: naciekaniem naczyń krwionośnych i chłonnych (LVI) oraz większą liczbą przerzutowych węzłów chłonnych. Zhan i wsp. również wykazali, że obecność ENE niekorzystnie wpływa na odsetek czteroletniego przeżycia (85% w grupie ENE-dodatniej i 92% w grupie ENE-ujemnej).⁸² Kompelli i wsp. porównywali grupy chorych z OPSCC zróżnicowane pod względem statusu infekcji wirusem HPV oraz nikotynizmu. Według nich, występowanie ENE miało szczególnie niekorzystny wpływ na przeżycie u palaczy tytoniu, co zbliżało tę kohortę do wyników przeżycia grupy HPV-ujemnej.¹²⁹ Bauer i wsp. również wykazali, że obecność ENE jest silnie związana z przeżyciem w HPV-dodatnich OPSCC. Według nich, uwzględnienie ENE w klasyfikacji TNM dla p16-dodatnich OPSCC pozwoliłoby lepiej spełnić cztery postulaty Groome opisujące idealny system klasyfikacji.¹³⁰ W cytowanym już badaniu Han na grupie 736 p16-dodatnich chorych leczonych chirurgicznie, zarówno mikroskopowe jak i makroskopowe ENE wpływało na zwiększone ryzyko śmierci chorego w analizie jedno- i wieloczynnikowej.¹¹⁶ Podobnie, w badaniu Freitag i wsp. wszystkie modele analizy wykazały, że występowanie cechy ENE związane było z krótszym OS, PFS i DFS.¹¹³ W niniejszym badaniu, w analizie wieloczynnikowej nie wykazano wpływu występowania ENE na OS, ani na PFS. Cztery badania, w których natomiast nie wykazano statystycznie istotnej różnicy pomiędzy chorymi ENE-dodatnimi oraz ENE-ujemnymi, przeprowadzone były na stosunkowo niewielkiej liczbie chorych (odpowiednio 188, 152, 76 i 171).^{112 124 131 132} Wyniki tych prac są zatem podobne do wyników niniejszego badania, obejmującego liczniejszą grupę chorych ($n=233$). Przypuszczalnie, dane świadczące o braku różnicy w przeżywalności pomiędzy chorymi ENE-dodatnimi oraz ENE-ujemnymi mogą wynikać z niedostatecznie licznej grupy opisanych chorych. Mimo to, dane dotyczące wpływu ENE na rokowanie chorych w populacji stratyfikowanej według statusu infekcji wirusem HPV płynące

z niniejszej pracy oraz cytowanej literatury nie są spójne i nie upoważniają do postawienia jednoznacznych wniosków.

Średnia wielkość przerzutowego węzła chłonnego na podstawie badań histopatologicznych oraz badań obrazowych nie różniła się istotnie pomiędzy grupami chorych ($p=0.50$): w I grupie chorych wyniosła 33.7 mm, podczas gdy w II grupie wyniosła 32.0 mm. Wyniki świadczące o braku różnicy pomiędzy grupami różnią się od danych opisanych w literaturze. Joo i wsp. wykazali istotną różnicę w wielkości przerzutowego węzła chłonnego pomiędzy grupą HPV-dodatnią, a HPV-ujemną w rakach ustnej części gardła oraz jamy ustnej. Wielkość przerzutowego węzła chłonnego była znacznie większa (średnio 27.3 mm) w grupie HPV-dodatniej, niż HPV-ujemnej (średnio 18.0 mm).¹³³

Następny parametr analizowany w rozprawie, to liczba przerzutowych węzłów chłonnych. U niektórych autorów wartość ta podawana jest jako współczynnik węzłów chłonnych. LNR informuje o liczbie przerzutowych węzłów chłonnych, znajdującej się w liczniku, w stosunku do całkowitej liczby węzłów chłonnych usuniętych podczas operacji i przekazanych do badania histopatologicznego, znajdującej się w mianowniku. Współczynnik ten ma udowodnioną wartość prognostyczną w raku jamy ustnej, lecz nie jest uwzględniony w klasyfikacji TNM dotyczącej nowotworów głowy i szyi.^{134 135} Wykazano także przydatność LNR jako czynnika prognostycznego dla leczenia uzupełniającego raka pęcherza moczowego, przełyku¹³⁶ i żołądka.¹³⁷ Chociaż w obecnie stosowanej edycji klasyfikacji TNM LNR również nie jest uwzględniony jako wyrażany procentowo współczynnik, w klasyfikacji patologicznej dla p16-dodatnich OPSCC cechę N posegregowano po raz pierwszy ilościowo według liczby przerzutowych węzłów chłonnych (a więc licznika LNR): N0 – gdy nie stwierdzono przerzutowych węzłów chłonnych, N1 – od jednego do czterech przerzutowych węzłów chłonnych i N2 – powyżej pięciu węzłów.

W niniejszym badaniu u około ¼ chorych nie stwierdzono przerzutów do układu chłonnego szyi, co najmniej jeden przerzutowy węzeł chłonny rozpoznano natomiast u ponad ¾ badanych. U zdecydowanej większości chorych (66.4%) rozpoznano od jednego do czterech przerzutowych węzłów chłonnych. Odsetek chorych, u których nie stwierdzono przerzutowych węzłów chłonnych był większy w II grupie (44.4%), niż w grupie I (12.0%). Średnia liczba przerzutowych węzłów chłonnych w I grupie chorych była też wyższa, niż w grupie II ($p=0.01$). W przeprowadzonej analizie czasu przeżycia nie wykazano wpływu liczby przerzutowych węzłów chłonnych na OS

($p=0.11$) ani PFS ($p=0.20$) pomiędzy chorymi, u których stwierdzono ≤ 4 przerzutowych węzłów chłonnych oraz chorymi, u których stwierdzono ≥ 5 przerzutowych węzłów chłonnych. Wnioski te dotyczą całej badanej kohorty chorych oraz I i II grupy chorych, które analizowano osobno. Nie potwierdzono więc związku występowania przyjętej liczby przerzutowych węzłów chłonnych z gorszym rokowaniem. W analizie wieloczynnikowej wykazano natomiast wpływ liczby przerzutowych węzłów chłonnych zarówno na OS, jak i PFS.

Podobne kryteria podziału badanych grup w kontekście liczby przerzutowych węzłów chłonnych przyjęto w badaniu Sinhy i wsp. prezentującym przeżycie grupy 220 p16-dodatnich chorych leczonych chirurgicznie. Autorzy, w przeciwieństwie do wyników niniejszego badania, potwierdzili w nim związek występowania ≥ 5 przerzutowych węzłów chłonnych ze skróconym czasem przeżycia zależnym od choroby (DSS).¹³⁸ W badaniu nie analizowano czasu ogólnego przeżycia (OS), a DSS był przyjęty jako główny punkt końcowy. W tymże badaniu wykazano także czterokrotnie częstsze występowanie wznów regionalnych oraz odległych przerzutów u chorych z ≥ 5 przerzutowymi węzłami chłonnymi, wobec chorych z czterema i mniej przerzutowymi węzłami.

Han i wsp. wykazali wyraźnie niższy odsetek przeżycia u chorych z ≥ 5 przerzutowymi węzłami chłonnymi wobec chorych z < 5 węzłami (odpowiednio 59% i 93% odsetek 3-letniego OS). Badanie to pokazało też, że współczynnik węzłów chłonnych LNR $\geq 10\%$ jest niezależnym czynnikiem ryzyka wcześniejszego zgonu.¹¹⁶ Należy jednak podkreślić, że autorzy analizowali kohortę chorych leczonych wyłącznie chirurgicznie, którzy nie otrzymali uzupełniającej radioterapii, ani radiochemioterapii. Do podobnych wniosków doszli Jacobi i wsp., wskazując na niekorzystne rokowanie w zakresie OS i DSS u p16-dodanych chorych z LNR powyżej 10%. Badacze nie stwierdzili tej prawidłowości w grupie chorych p16-ujemnych.⁸³ Autorzy tej publikacji wskazali też na potrzebę zawarcia większej ilości informacji przedstawianych we współczynniku LNR. Zaproponowali, by LNR nie opisywało wyłącznie współczynnika wyrażanego procentowo, lecz także całkowitą liczbę pobranych do badania węzłów chłonnych, na przykład w formule $LNR^{LNY} = 8^{26}$, gdzie 8 wyrażałoby ośmioprocentowy współczynnik LNR, a 26 liczbę usuniętych w trakcie operacji węzłów chłonnych: LNY (ang. *lymph node yield*). Kunzel i wsp. również uznali, że LNR $\geq 10\%$ jest najsilniejszym prognostycznym czynnikiem w badaniu na grupie 384 chorych z OPSCC, która nie była jednak podzielona pod względem infekcji wirusem brodawczaka ludzkiego.¹³⁹ LNR

okazało się ważnym współczynnikiem w cytowanym już badaniu Beltz i wsp. Autorzy wykazali dłuższy czas OS u p16-dodatnich chorych z $LNR \leq 10\%$ względem grupy ze współczynnikiem $LNR > 10\%$. Podobnie jak u Jacobiego, nie wykazano tych różnic w grupie chorych p16-ujemnych.⁸⁵ Autorzy próbowali także wykorzystać inny punkt odcięcia dla LNR wynoszący 13.6% i stanowiący medianę wartości w tymże badaniu. Analogicznie, chorzy p16-dodatni z $LNR \leq 13.6\%$ rokowali lepiej, niż ci z wyższym współczynnikiem. W grupie p16-ujemnej ponownie nie wykazano istotnych statystycznie różnic.

Do odmiennych konkluzji doszli Meyer i wsp. badając wpływ LNR u chorych leczonych chirurgicznie z powodu OPSCC, ze znanym statusem infekcji HPV. W ich publikacji, LNR było czynnikiem prognostycznym wyłącznie u HPV-ujemnych chorych, podczas gdy u chorych HPV-dodatnich jedynym czynnikiem związanym z rokowaniem pozostawała cecha T.¹⁴⁰ Autorzy badania wysnuli hipotezę, że rokowanie u HPV-dodatnich chorych leczonych chirurgicznie może być bardziej zależne od rozmiaru guza pierwotnego, natomiast u chorych HPV-negatywnych od zaawansowania przerzutów do układu chłonnego szyi. Należy zaznaczyć, że badacze doszli do wniosków na podstawie niewielkiej grupy opisanych chorych, liczącej jedynie 88 osób. Zenga i wsp. w swojej pracy obejmującej 2554 przypadków niezaawansowanego miejscowo (T1-T2) p16-dodatniego OPSCC wykazali, że u chorych z maksymalnie jednym potwierdzonym patologicznie przerzutowym węzłem chłonnym znaczenie prognostyczne ma też liczba pobranych węzłów chłonnych, wynosząca powyżej 26 węzłów. U chorych z ≥ 2 przerzutowymi węzłami, LNY nie było już istotne statystycznie.¹⁴¹ Autorzy tłumaczą te wyniki przypuszczeniem, że choroba nowotworowa u chorych z większą liczbą przerzutowych węzłów chłonnych przebiega bardziej agresywnie, dlatego też operacja układu chłonnego szyi o poszerzonym zakresie nie jest w stanie zmienić już rokowania. U chorych z co najwyżej jednym przerzutowym węzłem chłonnym, operacja węzłowa o większym zakresie prawdopodobnie jest w stanie zapewnić onkologiczną kontrolę. W niniejszej pracy nie wykonano analizy współczynnika LNR, co uzasadnione jest faktem braku różnicy co do przeżycia pomiędzy chorymi, u których stwierdzono ≤ 4 przerzutowych węzłów chłonnych oraz chorymi, u których stwierdzono ≥ 5 przerzutowych węzłów chłonnych. Podobnie jak w przypadku analizy w aspekcie naciekania poza torebkę węzła chłonnego, dane świadczące o braku różnicy w przeżywalności pomiędzy chorymi, u których stwierdzono ≤ 4 przerzutowych węzłów

chłonnych oraz chorymi, u których stwierdzono ≥ 5 przerzutowych węzłów chłonnych, mogą przypuszczalnie wynikać z niedostatecznie licznej grupy opisanych chorych. Dane płynące z analizowanej literatury, świadczą jednak, że liczba przerzutowych węzłów chłonnych oraz pośrednio wynikający z niej LNR mogą być istotnymi czynnikami rokowniczymi, przede wszystkim dla chorych p16-dodatnich.

W badaniu przeanalizowano także wpływ strony występowania przerzutów do układu chłonnego szyi na przeżycie. Chorzy, u których stwierdzono ipsilateralne przerzutowe węzły chłonne rokowali lepiej pod względem OS oraz PFS, niż chorzy z przerzutami obustronnymi. Odsetek 3-letniego i 5-letniego OS w grupie chorych u których stwierdzono ipsilateralne przerzutowe węzły chłonne wyniósł odpowiednio 65% i 58%, natomiast odsetek 3-letniego i 5-letniego OS w grupie chorych u których stwierdzono obustronne przerzutowe węzły chłonne wyniósł odpowiednio 31% i 28%. Różnice te były także istotne statystyczne podczas osobnej analizy I i II badanej grupy chorych. Nie wykazano natomiast wpływu strony występowania przerzutów do układu chłonnego szyi na OS oraz PFS w analizie wieloczynnikowej.

Do analogicznych wniosków doszli Tritter i wsp. W ich badaniu na grupie 178 chorych ze znanym statusem infekcji HPV, odsetek 5-letniego OS w grupie chorych, u których stwierdzono ipsilateralne przerzutowe węzły chłonne wyniósł 65.2%, podczas gdy ten odsetek u chorych u których rozpoznano obustronne lub kontralateralne przerzuty do węzłów chłonnych wyniósł 45.4%.¹⁴² W niniejszym badaniu również uzyskano wyraźną różnicę w 5-letnim przeżyciu między grupami (odpowiednio 58% i 28%). Także w badaniu Jacobiego i wsp. występowanie obustronnych przerzutowych węzłów chłonnych w grupie chorych z OPSCC o znanym statusie infekcji HPV wiązało się z wyraźnie krótszym OS i DSS, w porównaniu z grupą chorych z jednostronnymi przerzutowymi węzłami chłonnymi. Cecha ta była zauważalna zarówno dla grupy HPV-dodatniej, jak i HPV-ujemnej.⁸³ Według wiedzy autora, dwa cytowane powyżej badania stanowią jedyną próbę odpowiedzi na pytanie, w jaki sposób występowanie jednostronnych lub obustronnych przerzutów do układu chłonnego szyi wpływa na przeżycie w rakach części ustnej gardła, stratyfikowanych w aspekcie infekcji wirusem brodawczaka ludzkiego HPV. Występowanie zatem wyraźnych różnic w przeżyciu, zarówno w tej analizie, jak i obu przedstawionych badaniach, świadczyć może o silnym negatywnym wpływie występowania obustronnych przerzutów do układu chłonnego szyi na przeżycie. Strona występowania przerzutowych węzłów chłonnych nie została zawarta w kryteriach patologicznej części ósmej edycji klasyfikacji TNM dla p16-

dodatnich OPSCC. Pozostaje jednak ważnym kryterium zarówno ósmej edycji klasyfikacji dla 16-ujemnych OPSCC, jak i klasyfikacji klinicznej dla p16-dodatnich raków części ustnej gardła. Dane płynące z niniejszej pracy wskazują, że strona występowania przerzutowych węzłów chłonnych pozostaje istotnym kryterium oceny zaawansowania chorego, świadczącym o jego rokowaniu.

Badania będące podstawą niniejszej rozprawy doktorskiej zostały sfinansowane przez grant Wielkopolskiego Centrum Onkologii numer 23/2019(227).

7. Wnioski

1. Wobec lepszego rokowania u chorych z p16-dodatnim rakiem płaskonabłonkowym części ustnej gardła, ósma edycja klasyfikacji TNM UICC/AJCC z 2017 roku znacznie lepiej od edycji siódmej stratyfikuje ryzyko w aspekcie infekcji wirusem HPV i powinna całkowicie zastąpić poprzednią edycję w codziennej praktyce klinicznej.
2. Ósma edycja klasyfikacji TNM, w odróżnieniu od edycji siódmej, w znacznym stopniu spełnia założenia Patti Groome dotyczące dobrego systemu klasyfikacji, w zakresie równowagi w rozmieszczeniu chorych pomiędzy grupami, spójności i dyskryminacji ryzyka.
3. Czynniki prognostyczne, takie jak naciekanie poza torebkę węzła chłonnego, liczba i strona występowania przerzutowych węzłów chłonnych, mogą stanowić istotny aspekt rokowniczy, także dla chorych p16-dodatnich.

8. Ograniczenia pracy

W niniejszej rozprawie doktorskiej można wskazać kilka czynników, które stanowią jej istotne ograniczenia:

- Długi czas upływający pomiędzy diagnostyką pierwszego oraz ostatniego chorego, obejmujący dziesięć lat, mogący wpływać na zmianę standardów postępowania diagnostycznego i terapeutycznego w wyżej wymienionym okresie
- Rozpoczęcie zebrań Konsylium Onkologicznego trzy lata po zdiagnozowaniu pierwszego chorego z przedstawionego badania
- Brak oceny statusu infekcji wirusem HPV z uwzględnieniem drugiej niezależnej metody (PCR lub ISH)

Przypuszczalnie, dwa pierwsze ograniczenia mogą wpływać na standaryzację leczenia, a w konsekwencji na uzyskiwane rezultaty dotyczące przeżycia chorych. Nie powinny natomiast mieć wpływu na wystąpienie różnic pomiędzy I i II badaną grupą, gdyż w momencie stosowania terapii onkologicznej nie uwzględniano statusu infekcji wirusem HPV. Ostatnie ograniczenie może mieć wpływ na odsetek chorych z rozpoznaną infekcją wirusem HPV. Z drugiej strony, oznaczenie wyłącznie z zastosowaniem immunohistochemicznego badania p16 wynika z zaleceń podręcznika TNM z 2017 roku.

9. Streszczenie

Cel: Celem rozprawy doktorskiej jest analiza wieloczynnikowa kliniczno-patologiczna chorych z potwierdzonym rakiem płaskonabłonkowym części ustnej gardła w aspekcie infekcji wirusem brodawczaka ludzkiego, a także analiza wartości predykcyjnych dotyczących rokowania chorych według poprzedniej, siódmej edycji klasyfikacji TNM oraz obecnie obowiązującej, ósmej edycji klasyfikacji.

Materiał i metoda: Materiał obejmuje 233 chorych diagnozowanych i leczonych z powodu raka płaskonabłonkowego części ustnej gardła. Mężczyźni stanowili 69.1%, a kobiety 30.9% chorych. U chorych, u których nieznany był status ekspresji białka p16, świadczą o infekcji wirusem brodawczaka ludzkiego HPV, wykonano dodatkowe badania immunohistochemiczne p16. Chorych podzielono na dwie grupy badane: chorzy z potwierdzoną immunohistochemicznie podwyższoną ekspresją białka p16 – I grupa chorych (55.4%) oraz chorych bez podwyższonej ekspresji p16 – II grupa chorych (44.6%). U wszystkich chorych znany był stopień zaawansowania raka według siódmej edycji klasyfikacji TNM, następnie wykonano u nich ponowną ocenę stopnia zaawansowania choroby według ósmej edycji klasyfikacji.

Wyniki: W I grupie odsetek 5-letniego OS i PFS był istotnie wyższy (odpowiednio 69% i 64%), niż w II grupie (odpowiednio 39% i 35%; $p < 0.005$). Po ponownej ocenie chorych według kryteriów ósmej edycji klasyfikacji TNM, u 53.2% wszystkich chorych oraz u 96.1% chorych p16-dodatnich zmieniono stopień zaawansowania choroby na niższy, względem edycji siódmej. Podczas stosowania siódmej edycji klasyfikacji TNM, 5-letnie OS wynosiło dla I, II, III i IV stopnia zaawansowania odpowiednio: 80%, 79%, 71% i 48%, podczas gdy dla ósmej edycji klasyfikacji odpowiednio 81%, 66%, 50% i 21%. Nie wykazano ewidentnego wpływu ENE i liczby przerzutowych węzłów chłonnych na OS i PFS, stwierdzono natomiast niekorzystny wpływ występowania obustronnych przerzutów do węzłów chłonnych zarówno na OS, jak i PFS.

Wnioski: Wobec znacznie lepszego rokowania chorych p16-dodatnich, ósma edycja klasyfikacji TNM lepiej stratyfikuje ryzyko u chorych z rakiem części ustnej gardła i powinna całkowicie zastąpić w codziennej praktyce klinicznej edycję siódmą, która nie dyskryminuje we właściwy sposób pomiędzy stopniami zaawansowania choroby.

10. Summary

Title: Clinicopathologic analysis of oropharyngeal squamous cell carcinomas in the context of the human papillomavirus infection.

Objective: To analyze patients diagnosed with oropharyngeal squamous cell carcinoma in the context of HPV infection and in the context of the seventh and the eighth edition of the TNM staging system.

Materials and methods: There were 233 patients treated due to oropharyngeal squamous cell carcinoma included in the study. Men accounted for 69.1%, women for 30.9%. Additional p16 immunochemistry tests were performed in patients with unknown HPV status. Patients were divided into two groups: p16-positive – 1st group of patients (55.4%) and p16-negative – 2nd group (44.6%). All patients with a known stage according to the 7th TNM staging system were reclassified according to the 8th TNM staging system.

Results: In the 1st group 5-year OS and PFS rates were significantly higher (69% and 64%, respectively) than in the 2nd group (39% and 35%, respectively; $p < 0.005$). Under the eighth edition of the TNM staging system, the stage was downgraded in 53.2% of patients and in 96.1% p16-positive patients, compared to the seventh edition. Under the seventh TNM edition the 5-year OS rates for stage I, II, III and IV were 80%, 79%, 71% and 48%, respectively, while under the eighth edition the 5-year OS rates for stage I, II, III and IV were 81%, 66%, 50% and 21%, respectively. While ENE and the number of metastatic lymph nodes did not affect the survival rates, the occurrence of bilateral lymph node metastasis had a negative effect on both OS and PFS.

Conclusions: Due to the fact that patients with p16-positive oropharyngeal squamous cell carcinoma have better survival outcomes, the eighth edition of the TNM staging system stratifies the risk better than the seventh edition. Therefore it should entirely replace the former edition, which does not discriminate well between the stages of the disease.

11. Spis tabel i rycin

Tabela I. Porównanie obecnie dostępnych szczepionek na wirusa brodawczaka ludzkiego. Według de Oliveiry.⁵⁰ str. 13

Tabela II. Podział stopni zaawansowania w p16-dodatnim OPSCC w zależności od cech T, N i M. str. 25

Tabela III. Podział stopni zaawansowania w p16-ujemnym OPSCC w zależności od cech T, N i M. str. 26

Tabela IV. Charakterystyka obu badanych grup chorych w zakresie czynników omawianych w pracy. str. 35

Tabela V. Przyporządkowanie stopni zaawansowania klinicznego według siódmej i ósmej edycji klasyfikacji TNM w p16-ujemnych oraz p16-dodatnich rakach części ustnej gardła. str. 38

Tabela VI. Siódma edycja klasyfikacji TNM – ocena różnicy OS pomiędzy chorymi przynależącymi do poszczególnych stopni zaawansowania. Test log rank. str. 51

Tabela VII. Ósma edycja klasyfikacji TNM – ocena różnicy OS pomiędzy chorymi przynależącymi do poszczególnych stopni zaawansowania. Test log rank. str. 53

Tabela VIII. Siódma edycja klasyfikacji TNM – ocena różnicy PFS pomiędzy chorymi przynależącymi do poszczególnych stopni zaawansowania. Test log rank.

str. 55

Tabela IX. Ósma edycja klasyfikacji TNM – ocena różnicy PFS pomiędzy chorymi przynależącymi do poszczególnych stopni zaawansowania. Test log rank. str. 57

Tabela X. Porównanie procentowego rozkładu najczęstszych lokalizacji OPSCC w literaturze. str. 69

Rycina 1. Karcynogeneza wyindukowana wirusem brodawczaka ludzkiego w rejonie głowy i szyi. Według Leemansa i wsp.²⁸ str. 9

Rycina 2. Wpływ infekcji wirusem HPV na mechanizmy komórkowe. Według El Mzibri.⁵² str.15

Rycina 3. Schemat proponowanego leczenia dla OPSCC według wytycznych EHNS-ESMO-ESTRO z 2020 roku. Według Machielsa i wsp.⁵⁹ str. 18

Rycina 4. Krzywe czasu ogólnego przeżycia OS w I oraz II grupie badanych. Wykres estymaty Kaplana-Maiera str. 41

Rycina 5. Krzywe czasu wolnego od progresji PFS w I oraz II grupie badanych. Wykres estymaty Kaplana-Maiera str. 42

Rycina 6. Przyporządkowanie cechy T dotyczącej miejscowego zaawansowania raka płaskonabłonkowego ustnej części gardła w ocenie według siódmej edycji klasyfikacji TNM z 2009 roku. str. 43

Rycina 7. Przyporządkowanie cechy T dotyczącej miejscowego zaawansowania raka płaskonabłonkowego ustnej części gardła w ocenie według ósmej edycji klasyfikacji TNM z 2017 roku. str. 44

Rycina 8. Przyporządkowanie cechy N dotyczącej regionalnego zaawansowania raka płaskonabłonkowego ustnej części gardła w ocenie według siódmej edycji klasyfikacji TNM z 2009 roku. str. 45

Rycina 9. Przyporządkowanie cechy N dotyczącej regionalnego zaawansowania raka płaskonabłonkowego ustnej części gardła w ocenie według ósmej edycji klasyfikacji TNM z 2017 roku. str. 46

Rycina 10. Przyporządkowanie poszczególnych stopni zaawansowania raka płaskonabłonkowego ustnej części gardła według siódmej oraz ósmej edycji klasyfikacji TNM. str. 47

Rycina 11. Zmiana stopnia zaawansowania (downstaging) pomiędzy siódmą, a ósmą edycją klasyfikacji TNM u chorych z rakiem płaskonabłonkowym ustnej części gardła. str. 48

Rycina 12. Graficzne przedstawienie odsetka OS dla chorych przynależących do poszczególnych stopni zaawansowania choroby nowotworowej według siódmej edycji klasyfikacji TNM z 2009 roku. str. 50

Rycina 13. Graficzne przedstawienie odsetka OS dla chorych przynależących do poszczególnych stopni zaawansowania choroby nowotworowej według ósmej edycji klasyfikacji TNM z 2017 roku. str. 52

Rycina 14. Graficzne przedstawienie odsetka PFS dla chorych przynależących do poszczególnych stopni zaawansowania choroby nowotworowej według siódmej edycji klasyfikacji TNM z 2009 roku. str. 54

Rycina 15. Graficzne przedstawienie odsetka PFS dla chorych przynależących do poszczególnych stopni zaawansowania choroby nowotworowej według ósmej edycji klasyfikacji TNM z 2017 roku. str. 56

Rycina 16. Porównanie czasu przeżycia pomiędzy chorymi, u których wystąpił zgon, w zależności od przypisanych im stopni zaawansowania. str. 58

Rycina 17. Porównanie wielkości największego przerzutowego węzła chłonnego pomiędzy I, a II grupą chorych. str. 59

Rycina 18. Krzywe czasu ogólnego przeżycia OS dla obu badanych grup w zależności od statusu naciekania poza torebkę węzła chłonnego (ENE). Wykres estymaty Kaplana-Maiera. str. 61

Rycina 19. Porównanie liczby przerzutowych węzłów chłonnych pomiędzy I (kolor pomarańczowy), a II grupą chorych (kolor niebieski). Test Chi-kwadrat. str. 62

Rycina 20. Krzywe czasu ogólnego przeżycia OS dla obu badanych grup w zależności od liczby przerzutowych węzłów chłonnych. Kolorem pomarańczowym zaznaczono grupę chorych, u których stwierdzono ≤ 4 przerzutowych węzłów chłonnych. Wykres estymaty Kaplana-Maiera. str. 64

Rycina 21. Krzywe czasu ogólnego przeżycia OS dla obu badanych grup w zależności od liczby przerzutowych węzłów chłonnych. Wykres estymaty Kaplana-Maiera. str. 66

Rycina 22. Ilustracja zmian w liczebności poszczególnych stopnia zaawansowania choroby nowotworowej według siódmej (lewa strona ryciny) oraz ósmej edycji klasyfikacji TNM. str. 79

Rycina 23. Krzywe całkowitego pięcioletniego przeżycia (OS) według stopnia zaawansowania choroby dla chorych z OPSCC niestratyfikowanych według statusu infekcji HPV. Według Edge i wsp.⁸⁰ Str. 84

12. Piśmiennictwo

-
- ¹ Shah J, Patel S, Bhuvanesh S. Head and Neck Surgery and Oncology 4th edition. 1st polish edition, Elsevier Urban & Partner, Wrocław, 2012
- ² Fossum CC, Chintakuntlawar AV, Price DL, Garcia JJ. Characterization of the oropharynx: anatomy, histology, immunology, squamous cell carcinoma and surgical resection. *Histopathology*. 2017;70(7):1021-1029.
- ³ Hashibe M, Brennan P, Chuang SC et al. Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; 18(2): 541–550.
- ⁴ Simard EP, Torre LA, Jemal A. International trends in head and neck cancer incidence rates: differences by country, sex and anatomic site. *Oral Oncol*. 2014;50(5):387-403.
- ⁵ Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, Bray F (2018) Global cancer observatory: cancer today. International Agency for Research on Cancer, Lyon. <https://gco.iarc.fr/today>. Dostęp na dzień 22 lipca 2020.
- ⁶ Pytynia KB, Dahlstrom KR, Sturgis EM. Epidemiology of HPV-associated oropharyngeal cancer. *Oral Oncol*. 2014 May;50(5):380-6.
- ⁷ Gillison ML, Chaturvedi AK, Anderson WF, Fakhry C. Epidemiology of Human Papillomavirus-Positive Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *J Clin Oncol*. 2015;33(29):3235-3242.
- ⁸ Tumban E. A Current Update on Human Papillomavirus-Associated Head and Neck Cancers. *Viruses*. 2019 Oct 9;11(10):922.
- ⁹ Lee B, Choi YJ, Kim SO, et al. Prognostic Value of Radiologic Extranodal Extension in Human Papillomavirus-Related Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *Korean J Radiol*. 2019;20(8):1266-1274.
- ¹⁰ Berman TA, Schiller JT. Human papillomavirus in cervical cancer and oropharyngeal cancer: One cause, two diseases. *Cancer*. 2017 Jun 15;123(12):2219-2229.
- ¹¹ Centers for Disease Control and Prevention (CDC). HPV-Associated Cancer Statistics, 2020. <http://www.cdc.gov/cancer/hpv/statistics/cases.htm>. Dostęp na dzień 29 października 2020.
- ¹² Chaturvedi AK, Engels EA, Pfeiffer RM, et al. Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. *J Clin Oncol*. 2011;29:4294-4301.
- ¹³ Stransky N, Egloff AM, Tward AD et al (2011) The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. *Science* 333(6046):1157–1160.
- ¹⁴ Blomberg M, Nielsen A, Munk C, Kjaer SK. Trends in head and neck cancer incidence in Denmark, 1978-2007: focus on human papillomavirus associated sites. *Int J Cancer*. 2011;129:733-741.
- ¹⁵ de Martel C, Plummer M, Vignat J, Franceschi S. Worldwide burden of cancer attributable to HPV by site, country and HPV type. *Int J Cancer*. 2017;141(4):664-670.
- ¹⁶ D'Souza G, McNeel TS, Fakhry C. Understanding personal risk of oropharyngeal cancer: risk-groups for oncogenic oral HPV infection and oropharyngeal cancer. *Ann Oncol*. 2017;28(12):3065-3069.
- ¹⁷ Timbang MR, Sim MW, Bewley AF, Farwell DG, Mantravadi A, Moore MG. HPV-related oropharyngeal cancer: a review on burden of the disease and opportunities for prevention and early detection. *Hum Vaccin Immunother*. 2019;15(7-8):1920-1928.
- ¹⁸ Sheedy T, Heaton C. HPV-associated oropharyngeal cancer [published correction appears in JAAPA. 2019 Nov;32(11):1]. *JAAPA*. 2019;32(9):26-31.
- ¹⁹ Wookey VB, Appiah AK, Kallam A, Ernani V, Smith LM, Ganti AK. HPV Status and Survival in Non-Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Anticancer Res*. 2019;39(4):1907-1914.
- ²⁰ de Camargo Cancela M1, de Souza DL, Curado MP. International incidence of oropharyngeal cancer: a population-based study. *Oral Oncol*. 2012;48(6):484-490.
- ²¹ Carlander ALF, Grønhoj Larsen C, Jensen DH, et al. Continuing rise in oropharyngeal cancer in a high HPV prevalence area: a Danish population-based study from 2011 to 2014. *Eur J Cancer*. 2017;70:75–82.

- ²² Gillison ML, D'Souza G, Westra W, Sugar E, Xiao W, Begum S, Viscidi R. Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst.* 2008;100(6):407–20.
- ²³ Haeggeblom L, Ramqvist T, Tommasino M, Dalianis T, Näsman A. Time to change perspectives on HPV in oropharyngeal cancer. A systematic review of HPV prevalence per oropharyngeal sub-site the last 3 years. *Papillomavirus Res.* 2017;4:1-11.
- ²⁴ Stjernström KD, Jensen JS, Jakobsen KK, Grønhoj C, von Buchwald C. Current status of human papillomavirus positivity in oropharyngeal squamous cell carcinoma in Europe: a systematic review. *Acta Otolaryngol.* 2019;139(12):1112-1116.
- ²⁵ Chan MW, Yu E, Bartlett E, et al. Morphologic and topographic radiologic features of human papillomavirus-related and -unrelated oropharyngeal carcinoma. *Head Neck.* 2017;39(8):1524-1534.
- ²⁶ Billfalk-Kelly A, Yu E, Su J, et al. Radiologic Extranodal Extension Portends Worse Outcome in cN+ TNM-8 Stage I Human Papillomavirus-Mediated Oropharyngeal Cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2019;104(5):1017-1027.
- ²⁷ Carlander ALF, Grønhoj Larsen C, Jensen DH, et al. Continuing rise in oropharyngeal cancer in a high HPV prevalence area: a Danish population-based study from 2011 to 2014. *Eur J Cancer.* 2017;70:75–82.
- ²⁸ Leemans CR, Snijders PJF, Brakenhoff RH. The molecular landscape of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer.* 2018 May;18(5):269-282.
- ²⁹ Gillison ML, Koch WM, Capone RB, et al. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92(9):709-720.
- ³⁰ Smeets SJ, Hesselink AT, Speel E-JM, Haesevoets A, Snijders PJF, Pawlita M, et al. A novel algorithm for reliable detection of human papillomavirus in paraffin embedded head and neck cancer specimen. *Int J Cancer.* 2007; 121: 2465-2472.
- ³¹ Ang KK, Harris J, Wheeler R, et al. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med.* 2010;363(1):24-35.
- ³² Rietbergen MM, Brakenhoff RH, Bloemena E, Witte BI, Snijders PJ, Heideman DA, Boon D, Koljenovic S, Baatenburg-de Jong RJ, Leemans CR. Human papillomavirus detection and comorbidity: critical issues in selection of patients with oropharyngeal cancer for treatment De-escalation trials. *Ann Oncol.* 2013 Nov;24(11):2740-5.
- ³³ Jain KS, Sikora AG, Baxi SS, Morris LG. Synchronous cancers in patients with head and neck cancer: risks in the era of human papillomavirus-associated oropharyngeal cancer. *Cancer.* 2013 May 15;119(10):1832-7.
- ³⁴ Harris AS, Thomas RG, Passant CD. Do patients with p16-positive oropharyngeal squamous cell carcinoma get more bone metastasis than p16-negative patients? *J Laryngol Otol.* 2018 May;132(5):429-433.
- ³⁵ WHO. *Human papillomavirus (HPV)*; 2018. <http://www.who.int/immunization/diseases/hpv/en/>. Dostęp na dzień 2 sierpnia 2020.
- ³⁶ Rettig E, Kiess AP, Fakhry C. The role of sexual behavior in head and neck cancer: implications for prevention and therapy. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2015;15(1):35-49.
- ³⁷ Sonawane K, Suk R, Chiao EY, et al. Oral human papillomavirus infection: differences in prevalence between sexes and concordance with genital human papillomavirus infection, NHANES 2011 to 2014. *Ann Intern Med.* 2017;167(10): 714-724.
- ³⁸ Pickard RK, Xiao W, Broutian TR, He X, Gillison ML. The prevalence and incidence of oral human papillomavirus infection among young men and women, aged 18-30 years. *Sex Transm Dis.* 2012 Jul;39(7):559-66.
- ³⁹ D'Souza G, Wentz A, Kluz N, et al. Sex differences in risk factors and natural history of oral human papillomavirus infection. *J Infect Dis.* 2016;213(12):1893-1896.
- ⁴⁰ Rupar MJ, Golusinski P, Golusinski W, Masternak MM. Human Papillomavirus and the use of nanoparticles for immunotherapy in HPV-related cancer: A review. *Rep Pract Oncol Radiother.* 2019;24(6):544-550.
- ⁴¹ Combes JD, Franceschi S. Human papillomavirus genome variants and head and neck cancers: a perspective. *Infect Agent Cancer.* 2018;13:13.
- ⁴² Doorbar J, Quint W, Banks L, et al. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine.* 2012;30 Suppl 5:F55-F70.
- ⁴³ Donà MG, Spriano G, Pichi B, et al. Human papillomavirus infection and p16 overexpression in oropharyngeal squamous cell carcinoma: a case series from 2010 to 2014. *Future Microbiol.* 2015;10(8):1283–1291.

- ⁴⁴ Bouvard V, Baan R, Straif K, et al. A review of human carcinogens--Part B: biological agents. *Lancet Oncol*. 2009;10(4):321-322.
- ⁴⁵ Kim SM. Human papilloma virus in oral cancer. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg*. 2016 Dec;42(6):327-336.
- ⁴⁶ Meites E, Szilagyi PG, Chesson HW, Unger ER, Romero JR, Markowitz LE. Human Papillomavirus Vaccination for Adults: Updated Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2019 Aug 16;68(32):698-702.
- ⁴⁷ Szczepienia info. *Szczepionka przeciw HPV*. <https://szczepienia.pzh.gov.pl/szczepionki/hpv/?strona=5#kto-powinien-zostac-zaszczepiony-przeciw-zakazeniom-hpv-i-kiedy> . Dostęp na dzień 15 stycznia 2021.
- ⁴⁸ Chaturvedi AK, Graubard BI, Broutian T, Pickard RKL, Tong ZY, Xiao W, Kahle L, Gillison ML. Effect of Prophylactic Human Papillomavirus (HPV) Vaccination on Oral HPV Infections Among Young Adults in the United States. *J Clin Oncol*. 2018 Jan 20;36(3):262-267.
- ⁴⁹ Hirth JM, Chang M, Resto VA; HPV Study Group. Prevalence of oral human papillomavirus by vaccination status among young adults (18-30years old). *Vaccine*. 2017 Jun 14;35(27):3446-3451.
- ⁵⁰ de Oliveira CM, Fregnani JHTG, Villa LL. HPV Vaccine: Updates and Highlights. *Acta Cytol*. 2019;63(2):159-168.
- ⁵¹ Hoppe-Seyler K, Bossler F, Braun JA, Herrmann AL, Hoppe-Seyler F. The HPV E6/E7 Oncogenes: Key Factors for Viral Carcinogenesis and Therapeutic Targets. *Trends Microbiol*. 2018;26(2):158-168.
- ⁵² M. El Mzibri, M. Attaleb, R. Ameziane El Hassani, M. Khyatti, L. Benbacer, M. M. Ennaji and M. Amrani. Evaluation of p53, p16INK4a and E-Cadherin Status as Biomarkers for Cervical Cancer Diagnosis, Topics on Cervical Cancer With an Advocacy for Prevention, Rajamanickam Rajkumar, *IntechOpen*. 2012.
- ⁵³ Cheah PL, Koh CC, Nazarina AR, Teoh KH, Looi LM. Correlation of p16INK4a immunoexpression and human papillomavirus (HPV) detected by in-situ hybridization in cervical squamous neoplasia. *Malays J Pathol*. 2016;38(1):33-38.
- ⁵⁴ Klusmann JP, Gültekin E, Weissenborn SJ, et al. Expression of p16 protein identifies a distinct entity of tonsillar carcinomas associated with human papillomavirus. *Am J Pathol*. 2003;162(3):747-753.
- ⁵⁵ Randén-Brady R, Carpén T, Jouhi L, Syrjänen S, Haglund C, Tarkkanen J, Remes S, Mäkitie A, Mattila PS, Silén S, Hagström J. In situ hybridization for high-risk HPV E6/E7 mRNA is a superior method for detecting transcriptionally active HPV in oropharyngeal cancer. *Hum Pathol*. 2019 Aug;90:97-105.
- ⁵⁶ Schwartz SR, Yueh B, McDougall JK, Daling JR, Schwartz SM. Human papillomavirus infection and survival in oral squamous cell cancer: a population-based study. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2001 Jul;125(1):1-9.
- ⁵⁷ De Felice F, Tombolini V, de Vincentiis M, et al. Multidisciplinary team in head and neck cancer: a management model. *Med Oncol*. 2018;36(1):2.
- ⁵⁸ Ghazal Asswad R, Alvi S, Davies K, et al. The role of multidisciplinary decision making in oropharyngeal cancer: do we follow guidelines and are treatment decisions being implemented?. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2020;277(3):947-952.
- ⁵⁹ National Comprehensive Cancer Network. Cancer of the Oropharynx (Version 2.2020). https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/head-and-neck.pdf. Dostęp na dzień 15 sierpnia 2020
- ⁶⁰ Machiels JP, René Leemans C, Golusinski W, Grau C, Licitra L, Gregoire V; EHNS Executive Board. Electronic address: secretariat@ehns.org; ESMO Guidelines Committee. Electronic address: clinicalguidelines@esmo.org; ESTRO Executive Board. Electronic address: info@estro.org. Squamous cell carcinoma of the oral cavity, larynx, oropharynx and hypopharynx: EHNS-ESMO-ESTRO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2020 Nov;31(11):1462-1475.
- ⁶¹ Bates JE, Hitchcock KE, Mendenhall WM, Dziegielewski PT, Amdur RJ. Comparing national practice versus standard guidelines for the use of adjuvant treatment following robotic surgery for oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2020 Sep;42(9):2602-2606.
- ⁶² Van Abel KM, Quick MH, Graner DE, et al. Outcomes following TORS for HPV-positive oropharyngeal carcinoma: PEGs, tracheostomies, and beyond. *Am J Otolaryngol*. 2019;40(5):729-734.
- ⁶³ Fu TS, et al: The role of transoral robotic surgery, transoral laser microsurgery, and lingual tonsillectomy in the identification of head and neck squamous cell carcinoma of unknown primary origin: a systematic review. *J Otolaryngol Head Neck Surg* 2016;45:28
- ⁶⁴ Hatten KM, Brody RM, Weinstein GS, et al. Defining the Role of Free Flaps for Transoral Robotic Surgery. *Ann Plast Surg*. 2018;80(1):45-49.
- ⁶⁵ Gillison ML, Trotti AM, Harris J, Eisbruch A, Harari PM, Adelstein DJ, Jordan RCK, Zhao W, Sturgis EM, Burtress B, Ridge JA, Ringash J, Galvin J, Yao M, Koyfman SA, Blakaj DM, Razaq MA, Colevas

AD, Beitler JJ, Jones CU, Dunlap NE, Seaward SA, Spencer S, Galloway TJ, Phan J, Dignam JJ, Le QT. Radiotherapy plus cetuximab or cisplatin in human papillomavirus-positive oropharyngeal cancer (NRG Oncology RTOG 1016): a randomised, multicentre, non-inferiority trial. *Lancet*. 2019 Jan 5;393(10166):40-50.

⁶⁶ Mehanna H, Robinson M, Hartley A, Kong A, Foran B, Fulton-Lieuw T, Dalby M, Mistry P, Sen M, O'Toole L, Al Booz H, Dyker K, Moleron R, Whitaker S, Brennan S, Cook A, Griffin M, Aynsley E, Rolles M, De Winton E, Chan A, Srinivasan D, Nixon I, Grumett J, Leemans CR, Buter J, Henderson J, Harrington K, McConkey C, Gray A, Dunn J; De-ESCALaTE HPV Trial Group. Radiotherapy plus cisplatin or cetuximab in low-risk human papillomavirus-positive oropharyngeal cancer (De-ESCALaTE HPV): an open-label randomised controlled phase 3 trial. *Lancet*. 2019 Jan 5;393(10166):51-60.

⁶⁷ Yom SS, Torres-Saavedra P, Caudell JJ, Waldron JN, Gillison ML, Xia P, Truong MT, Kong C, Jordan R, Subramaniam RM, Yao M, Chung CH, Geiger JL, Chan JW, O'Sullivan B, Blakaj DM, Mell LK, Thorstad WL, Jones CU, Banerjee RN, Lominska C, Le QT. Reduced-Dose Radiation Therapy for HPV-Associated Oropharyngeal Carcinoma (NRG Oncology HN002). *J Clin Oncol*. 2021 Mar 20;39(9):956-965.

⁶⁸ Waddle MR, Ma DJ, Visscher SL, Borah BJ, May JM, Price KA, Moore EJ, Patel SH, Hinni ML, Chintakuntlawar AV, Garcia JJ, Graner DE, Neben-Wittich MA, Garces YI, Hallemeier CL, Price DL, Kasperbauer JL, Janus JR, Foote RL, Miller RC. Costs of Definitive Chemoradiation, Surgery, and Adjuvant Radiation Versus De-Escalated Adjuvant Radiation per MC1273 in HPV+ Cancer of the Oropharynx. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2021 Jun 1;110(2):396-402.

⁶⁹ Ferris RL, Flamand Y, Holsinger FC, Weinstein GS, Quon H, Mehra R, Garcia JJ, Hinni ML, Gross ND, Sturgis EM, Duvvuri U, Méndez E, Ridge JA, Magnuson JS, Higgins KA, Patel MR, Smith RB, Karakla DW, Kupferman ME, Malone JP, Judson BL, Richmon J, Boyle JO, Bayon R, O'Malley BW Jr, Ozer E, Thomas GR, Koch WM, Bell RB, Saba NF, Li S, Sigurdson ER, Burtneess B. A novel surgeon credentialing and quality assurance process using transoral surgery for oropharyngeal cancer in ECOG-ACRIN Cancer Research Group Trial E3311. *Oral Oncol*. 2020 Nov;110:104797.

⁷⁰ Stelmes JJ, Gregoire V, Poorten VV, Golusiński W, Szweczyk M, Jones T, Ansarin M, Broglie MA, Giger R, Klussmann JP, Evans M, Bourhis J, Leemans CR, Spriano G, Dietz A, Hunter K, Zimmermann F, Tinhofe I, Patterson JM, Quaglini S, Govaerts AS, Fortpied C, Simon C. Organ Preservation and Late Functional Outcome in Oropharyngeal Carcinoma: Rationale of EORTC 1420, the "Best of" Trial. *Front Oncol*. 2019 Oct 22;9:999.

⁷¹ Nichols AC, Theurer J, Prisman E, Read N, Berthelet E, Tran E, Fung K, de Almeida JR, Bayley A, Goldstein DP, Hier M, Sultanem K, Richardson K, Mlynarek A, Krishnan S, Le H, Yoo J, MacNeil SD, Winquist E, Hammond JA, Venkatesan V, Kuruvilla S, Warner A, Mitchell S, Chen J, Corsten M, Johnson-Obaseki S, Eapen L, Odell M, Parker C, Wehrli B, Kwan K, Palma DA. Radiotherapy versus transoral robotic surgery and neck dissection for oropharyngeal squamous cell carcinoma (ORATOR): an open-label, phase 2, randomised trial. *Lancet Oncol*. 2019 Oct;20(10):1349-1359.

⁷² Patel MR, Hudgins PA, Beitler JJ, Magliocca KR, Griffith CC, Liu Y, Bougnon K, El-Deiry M, Saba NF, Aiken AH. Radiographic Imaging Does Not Reliably Predict Macroscopic Extranodal Extension in Human Papilloma Virus-Associated Oropharyngeal Cancer. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*. 2018;80(2):85-95.

⁷³ Hargreaves S, Beasley M, Hurt C, Jones TM, Evans M. Deintensification of Adjuvant Treatment After Transoral Surgery in Patients With Human Papillomavirus-Positive Oropharyngeal Cancer: The Conception of the PATHOS Study and Its Development. *Front Oncol*. 2019 Oct 1;9:936.

⁷⁴ Machczyński P, Majchrzak E, Niewinski P, Marchlewska J, Golusiński W. A review of the 8th edition of the AJCC staging system for oropharyngeal cancer according to HPV status. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2020;277(9):2407-2412.

⁷⁵ TNM History, Evolution and Milestones.

https://www.uicc.org/sites/main/files/atoms/files/TNM_History_updated_June2017.pdf. Dostęp na dzień 15 sierpnia 2020

⁷⁶ Amin MB, editor. AJCC cancer staging manual. 8. New York: Springer; 2017.

⁷⁷ Groome PA, Schulze K, Boysen M, Hall SF, Mackillop WJ. A comparison of published head and neck stage groupings in carcinomas of the oral cavity. *Head Neck*. 2001;23(8):613-624.

⁷⁸ van Gysen K, Stevens M, Guo L, et al. Validation of the 8th edition UICC/AJCC TNM staging system for HPV associated oropharyngeal cancer patients managed with contemporary chemo-radiotherapy. *BMC Cancer*. 2019;19(1):674.

⁷⁹ Würdemann N, Wagner S, Sharma SJ, et al. Prognostic Impact of AJCC/UICC 8th Edition New Staging Rules in Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *Front Oncol*. 2017;7:129.

- ⁸⁰ Lewis JS Jr, Chernock RD. Human papillomavirus and Epstein Barr virus in head and neck carcinomas: suggestions for the new WHO classification. *Head Neck Pathol.* 2014 Mar;8(1):50-8.
- ⁸¹ Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A, (editors). *AJCC cancer staging manual, 7th edition.* France: Springer; 2010
Dostępny ze strony: <https://www.springer.com/gp/book/9780387884424>. Dostęp na dzień 26 sierpnia 2021
- ⁸² Amin MB, Edge S, Greene F, Byrd DR, Brookland RK, Washington MK, Gershenwald JE, Compton CC, Hess KR, et al. (Eds.). *AJCC Cancer Staging Manual (8th edition).* Springer International Publishing: American Joint Commission on Cancer; 2017 Dostępny ze strony: <https://www.springer.com/gp/book/9783319406176>. Dostęp na dzień 26 sierpnia 2021
- ⁸³ Zhan KY, Eskander A, Kang SY, Old MO, Ozer E, Agrawal AA, Carrau RL, Rocco JW, Teknos TN. Appraisal of the AJCC 8th edition pathologic staging modifications for HPV-positive oropharyngeal cancer, a study of the National Cancer Data Base. *Oral Oncol.* 2017 Oct;73:152-159.
- ⁸⁴ Jacobi C, Rauch J, Hagemann J, Lautz T, Reiter M, Baumeister P. Prognostic value of the lymph node ratio in oropharyngeal carcinoma stratified for HPV-status. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2018 Feb;275(2):515-524.
- ⁸⁵ Gupta P, Migliacci JC, Hay A, Rosenthal M, Mimica X, Lee N, Wong RJ, Shah J, Patel S, Ganly I. Validation and assessment of discordance of the 8th edition AJCC (American Joint Committee on Cancer) clinical and pathologic staging systems in patients with p16+ oropharyngeal cancer treated with surgery and adjuvant radiation at a single institution. *Oral Oncol.* 2018 Aug;83:140-146.
- ⁸⁶ Beltz A, Gösswein D, Zimmer S, Limburg I, Wünsch D, Gribko A, Deichelbohrer M, Hagemann J, Stauber RH, Künzel J. Staging of oropharyngeal squamous cell carcinoma of the head and neck: Prognostic features and power of the 8th edition of the UICC staging manual. *Eur J Surg Oncol.* 2019 Jun;45(6):1046-1053.
- ⁸⁷ Taberna M, Mena M, Pavón MA, Alemany L, Gillison ML, Mesía R. Human papillomavirus-related oropharyngeal cancer. *Ann Oncol.* 2017 Oct 1;28(10):2386-2398.
- ⁸⁸ Gallitto M, Sindhu K, Wasserman I, De B, Gupta V, Miles BA, Genden EM, Posner M, Misiukiewicz K, Bakst RL. Trimodality therapy for oropharyngeal cancer in the TORS era: Is there a cohort that may benefit? *Head Neck.* 2019 Sep;41(9):3009-3022.
- ⁸⁹ Amini A, Jasem J, Jones BL, Robin TP, McDermott JD, Bhatia S, Raben D, Jimeno A, Bowles DW, Karam SD. Predictors of overall survival in human papillomavirus-associated oropharyngeal cancer using the National Cancer Data Base. *Oral Oncol.* 2016 May;56:1-7.
- ⁹⁰ Lewis JS Jr, Thorstad WL, Chernock RD, Haughey BH, Yip JH, Zhang Q, El-Mofty SK. p16 positive oropharyngeal squamous cell carcinoma: an entity with a favorable prognosis regardless of tumor HPV status. *Am J Surg Pathol.* 2010 Aug;34(8):1088-96.
- ⁹¹ Bryant AK, Sojourner EJ, Vitzthum LK, Zakeri K, Shen H, Nguyen C, Murphy JD, Califano JA, Cohen EEW, Mell LK. Prognostic Role of p16 in Nonoropharyngeal Head and Neck Cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2018 Dec 1;110(12):1393-1399.
- ⁹² Fakhry C, Westra WH, Wang SJ, van Zante A, Zhang Y, Rettig E, Yin LX, Ryan WR, Ha PK, Wentz A, Koch W, Richmon JD, Eisele DW, D'Souza G. The prognostic role of sex, race, and human papillomavirus in oropharyngeal and nonoropharyngeal head and neck squamous cell cancer. *Cancer.* 2017 May 1;123(9):1566-1575.
- ⁹³ Chung CH, Zhang Q, Kong CS, Harris J, Fertig EJ, Harari PM, Wang D, Redmond KP, Shenouda G, Trotti A, Raben D, Gillison ML, Jordan RC, Le QT. p16 protein expression and human papillomavirus status as prognostic biomarkers of nonoropharyngeal head and neck squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 2014 Dec 10;32(35):3930-8.
- ⁹⁴ Prigge ES, Arbyn M, von Knebel Doeberitz M, Reuschenbach M. Diagnostic accuracy of p16^{INK4a} immunohistochemistry in oropharyngeal squamous cell carcinomas: A systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer.* 2017;140(5):1186-1198.
- ⁹⁵ Mills AM, Dirks DC, Poulter MD, Mills SE, Stoler MH. HR-HPV E6/E7 mRNA In Situ Hybridization: Validation Against PCR, DNA In Situ Hybridization, and p16 Immunohistochemistry in 102 Samples of Cervical, Vulvar, Anal, and Head and Neck Neoplasia. *Am J Surg Pathol.* 2017 May;41(5):607-615.
- ⁹⁶ Mirghani H, Casiraghi O, Amen F, He M, Ma XJ, Saulnier P, Lacroix L, Drusch F, Ben Lakdhar A, Saint Guily JL, Badoual C, Scoazec JY, Vielh P. Diagnosis of HPV-driven head and neck cancer with a single test in routine clinical practice. *Mod Pathol.* 2015 Dec;28(12):1518-27.
- ⁹⁷ Garnaes E, Frederiksen K, Kiss K, et al. Double positivity for HPV DNA/p16 in tonsillar and base of tongue cancer improves prognostication: Insights from a large population-based study. *Int J Cancer.* 2016;139(11):2598-2605.

- ⁹⁸ Larsen CG, Jensen DH, Carlander AF, et al. Novel nomograms for survival and progression in HPV+ and HPV- oropharyngeal cancer: a population-based study of 1,542 consecutive patients. *Oncotarget*. 2016;7(44):71761-71772.
- ⁹⁹ Taberna M, Mena M, Tous S, Pavón MA, Oliva M, León X, Garcia J, Guix M, Hijano R, Bonfill T, Aguilà A, Alemany L, Mesia R. HPV-relatedness definitions for classifying HPV-related oropharyngeal cancer patient do impact on TNM classification and patients' survival. *PLoS One*. 2018 Apr 17;13(4):e0194107.
- ¹⁰⁰ Nauta IH, Rietbergen MM, van Bokhoven AAJD, Bloemena E, Lissenberg-Witte BI, Heideman DAM, Baatenburg de Jong RJ, Brakenhoff RH, Leemans CR. Evaluation of the eighth TNM classification on p16-positive oropharyngeal squamous cell carcinomas in the Netherlands and the importance of additional HPV DNA testing. *Ann Oncol*. 2018 May 1;29(5):1273-1279.
- ¹⁰¹ Golusiński P, Pazdrowski J, Szewczyk M, Misiołek M, Pietruszewska W, Klatka J, Okła S, Kaźmierczak H, Marszałek A, Filas V, Schneider A, Masternak MM, Stęplewska K, Miśkiewicz-Orczyk K, Golusiński W. Is immunohistochemical evaluation of p16 in oropharyngeal cancer enough to predict the HPV positivity? *Rep Pract Oncol Radiother*. 2017 May-Jun;22(3):237-242.
- ¹⁰² Perrone F, Gloghini A, Cortelazzi B, Bossi P, Licitra L, Pilotti S. Isolating p16-positive/HPV-negative oropharyngeal cancer: an effort worth making. *Am J Surg Pathol*. 2011 May;35(5):774-7; author reply 777-8.
- ¹⁰³ Sharma SJ, Wagner S, Reder HSF, Kroll T, Wuerdemann N, Klusmann JP, Wittekindt C. The 8th edition AJCC/UICC TNM staging for p16-positive oropharyngeal carcinoma: is there space for improvement? *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2018 Dec;275(12):3087-3091.
- ¹⁰⁴ Vainshtein J, McHugh JB, Spector ME, Walline HM, Komarck CM, Stenmark MH, Prince ME, Worden FP, Wolf GT, Bradford CR, Chepeha DB, Carey T, Eisbruch A. Human papillomavirus-related oropharyngeal cancer: HPV and p16 status in the recurrent versus parent tumor. *Head Neck*. 2015 Jan;37(1):8-11.
- ¹⁰⁵ Deng Z, Hasegawa M, Aoki K, Matayoshi S, Kiyuna A, Yamashita Y, Uehara T, Agha S, Maeda H, Xie M, Suzuki M. A comprehensive evaluation of human papillomavirus positive status and p16INK4a overexpression as a prognostic biomarker in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Oncol*. 2014 Jul;45(1):67-76.
- ¹⁰⁶ Rotnáglóvá E, Tachezy R, Saláková M, Procházka B, Košťalová E, Veselá E, Ludvíková V, Hamšíková E, Klozar J. HPV involvement in tonsillar cancer: prognostic significance and clinically relevant markers. *Int J Cancer*. 2011 Jul 1;129(1):101-10.
- ¹⁰⁷ Cerezo L, López C, de la Torre A, Suárez D, Hervás A, Ruiz A, Ballestín C, Martín M, Sandoval P. Incidence of human papillomavirus-related oropharyngeal cancer and outcomes after chemoradiation in a population of heavy smokers. *Head Neck*. 2014 Jun;36(6):782-6.
- ¹⁰⁸ Quabius ES, Haag J, Kühnel A, Henry H, Hoffmann AS, Görögh T, Hedderich J, Evert M, Beule AG, Maune S, Knecht R, Óvári A, Durisin M, Hoppe F, Tribius S, Röcken C, Ambrosch P, Hoffmann M. Geographical and anatomical influences on human papillomavirus prevalence diversity in head and neck squamous cell carcinoma in Germany. *Int J Oncol*. 2015 Jan;46(1):414-22.
- ¹⁰⁹ Bussu F, Ragin C, Boscolo-Rizzo P, Rizzo D, Gallus R, Delogu G, Morbini P, Tommasino M. HPV as a marker for molecular characterization in head and neck oncology: Looking for a standardization of clinical use and of detection method(s) in clinical practice. *Head Neck*. 2019 Apr;41(4):1104-1111.
- ¹¹⁰ Braakhuis BJ, Brakenhoff RH, Meijer CJ, Snijders PJ, Leemans CR. Human papilloma virus in head and neck cancer: the need for a standardised assay to assess the full clinical importance. *Eur J Cancer*. 2009 Nov;45(17):2935-9.
- ¹¹¹ Smeets SJ, Hesselink AT, Speel EJ, Haesevoets A, Snijders PJ, Pawlita M, Meijer CJ, Braakhuis BJ, Leemans CR, Brakenhoff RH. A novel algorithm for reliable detection of human papillomavirus in paraffin embedded head and neck cancer specimen. *Int J Cancer*. 2007 Dec 1;121(11):2465-72.
- ¹¹² Schache AG, Liloglou T, Risk JM, Filia A, Jones TM, Sheard J, Woolgar JA, Helliwell TR, Triantafyllou A, Robinson M, Sloan P, Harvey-Woodworth C, Sisson D, Shaw RJ. Evaluation of human papilloma virus diagnostic testing in oropharyngeal squamous cell carcinoma: sensitivity, specificity, and prognostic discrimination. *Clin Cancer Res*. 2011 Oct 1;17(19):6262-71.
- ¹¹³ Kwon IJ, Lee JH, Kim SM. Evaluation of HPV-related oral cancer using DNA microarray technology according to the 8th edition of the AJCC staging system. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2020 Oct 12.
- ¹¹⁴ Park YM, Kang MS, Koh YW, Choi EC, Kim SH. Does p16+ Predict a Favorable Prognosis for Oropharyngeal Cancer? Risk Factors for Treatment Failure for Patients Who Underwent Surgery-Based Therapy. *Ann Surg Oncol*. 2019 Feb;26(2):547-554.

- ¹¹⁵ Freitag J, Wald T, Kuhnt T, Gradistanac T, Kolb M, Dietz A, Wiegand S, Wichmann G. Extracapsular extension of neck nodes and absence of human papillomavirus 16-DNA are predictors of impaired survival in p16-positive oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Cancer*. 2020 Jan 1;126(9):1856-1872.
- ¹¹⁶ Wuerdemann N, Wittekindt C, Sharma SJ, Prigge ES, Reuschenbach M, Gattenlöhner S, Klusmann JP, Wagner S. Risk Factors for Overall Survival Outcome in Surgically Treated Human Papillomavirus-Negative and Positive Patients with Oropharyngeal Cancer. *Oncol Res Treat*. 2017;40(6):320-327.
- ¹¹⁷ Miccio JA, Verma V, Kelly J, Kann BH, An Y, Park HS, Eskander A, Burtneess B, Husain Z. Impact of contralateral lymph nodal involvement and extranodal extension on survival of surgically managed HPV-positive oropharyngeal cancer staged with the AJCC eighth edition. *Oral Oncol*. 2019 Dec;99:104447.
- ¹¹⁸ Han M, Stanford-Moore GB, Larson AR, Schoppy DW, Cognetti DM, Joshi AS, Houlton JJ, Ryan WR. Predictors of Mortality in HPV-Associated Oropharynx Carcinoma Treated With Surgery Alone. *Laryngoscope*. 2020 Jul;130(7):E423-E435.
- ¹¹⁹ O'Sullivan B, Huang SH, Su J, Garden AS, Sturgis EM, Dahlstrom K, Lee N, Riaz N, Pei X, Koyfman SA, Adelstein D, Burkey BB, Friborg J, Kristensen CA, Gothelf AB, Hoebbers F, Kremer B, Speel EJ, Bowles DW, Raben D, Karam SD, Yu E, Xu W. Development and validation of a staging system for HPV-related oropharyngeal cancer by the International Collaboration on Oropharyngeal cancer Network for Staging (ICON-S): a multicentre cohort study. *Lancet Oncol*. 2016 Apr;17(4):440-451.
- ¹²⁰ Fakhry C, Zevallos JP, Eisele DW. Imbalance Between Clinical and Pathologic Staging in the Updated American Joint Commission on Cancer Staging System for Human Papillomavirus-Positive Oropharyngeal Cancer. *J Clin Oncol*. 2018 Jan 20;36(3):217-219.
- ¹²¹ Porceddu SV, Milne R, Brown E, Bernard A, Rahbari R, Cartmill B, Foote M, McGrath M, Coward J, Panizza B. Validation of the ICON-S staging for HPV-associated oropharyngeal carcinoma using a pre-defined treatment policy. *Oral Oncol*. 2017 Mar;66:81-86.
- ¹²² Maxwell JH, Kumar B, Feng FY, Worden FP, Lee JS, Eisbruch A, Wolf GT, Prince ME, Moyer JS, Teknos TN, Chepeha DB, McHugh JB, Urba SG, Stoerker J, Walline HM, Kurnit DM, Cordell KG, Davis SJ, Ward PD, Bradford CR, Carey TE. Tobacco use in human papillomavirus-positive advanced oropharynx cancer patients related to increased risk of distant metastases and tumor recurrence. *Clin Cancer Res*. 2010 Feb 15;16(4):1226-35.
- ¹²³ Willis RA. Epidermoid carcinoma of the head and neck, with special reference to metastasis. *J Pathol Bacteriol* 1930;33:501-26.
- ¹²⁴ Bennett SH, Futrell JW, Roth JA, Hoyer RC, Ketcham AS. Prognostic significance of histologic host response in cancer of the larynx or hypopharynx. *Cancer* 1971;28:1255-65.
- ¹²⁵ Mermod M, Tolstonog G, Simon C, Monnier Y. Extracapsular spread in head and neck squamous cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol*. 2016 Nov;62:60-71.
- ¹²⁶ Sinha P, Lewis JS Jr, Piccirillo JF, Kallogjeri D, Haughey BH. Extracapsular spread and adjuvant therapy in human papillomavirus-related, p16-positive oropharyngeal carcinoma. *Cancer*. 2012 Jul 15;118(14):3519-30.
- ¹²⁷ Noor A, Mintz J, Patel S, Bajic N, Boase S, Sethi N, Foreman A, Krishnan S, Hodge JC. Predictive value of computed tomography in identifying extracapsular spread of cervical lymph node metastases in p16 positive oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J Med Imaging Radiat Oncol*. 2019 Aug;63(4):500-509.
- ¹²⁸ An Y, Park HS, Kelly JR, Stahl JM, Yarbrough WG, Burtneess BA, Contessa JN, Decker RH, Koshy M, Husain ZA. The prognostic value of extranodal extension in human papillomavirus-associated oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Cancer*. 2017 Jul 15;123(14):2762-2772.
- ¹²⁹ Kompelli AR, Morgan P, Li H, Harris W, Day TA, Neskey DM. Prognostic Impact of High-Risk Pathologic Features in HPV-Related Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma and Tobacco Use. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2019 May;160(5):855-861.
- ¹³⁰ Bauer E, Mazul A, Chernock R, Rich J, Jackson RS, Paniello R, Pipkorn P, Oppelt P, Gay H, Daly M, El-Mofty S, Thorstad W, Adkins D, Zevallos J. Extranodal extension is a strong prognosticator in HPV-positive oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Laryngoscope*. 2020 Apr;130(4):939-945.
- ¹³¹ Maxwell JH, Ferris RL, Gooding W, Cunningham D, Mehta V, Kim S, Myers EN, Johnson J, Chiosea S. Extracapsular spread in head and neck carcinoma: impact of site and human papillomavirus status. *Cancer*. 2013 Sep 15;119(18):3302-8.
- ¹³² Haughey BH, Sinha P. Prognostic factors and survival unique to surgically treated p16 + oropharyngeal cancer. *Laryngoscope* 2012;122(suppl 2):S13-S33.
- ¹³³ Joo YH, Cho KJ, Park JO, Nam IC, Kim CS, Kim MS. High-risk human papillomavirus and lymph node size in patients with single node metastasis of oral and oropharyngeal cancer. *Acta Otolaryngol*. 2014 Apr;134(4):395-400.

-
- ¹³⁴ Ebrahimi A, Clark JR, Zhang WJ, Elliott MS, Gao K, Milross CG, Shannon KF. Lymph node ratio as an independent prognostic factor in oral squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2011 Sep;33(9):1245-51.
- ¹³⁵ Shrimel MG, Bachar G, Lea J, Volling C, Ma C, Gullane PJ, Gilbert RW, Irish JC, Brown DH, Goldstein DP. Nodal ratio as an independent predictor of survival in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Head Neck*. 2009 Nov;31(11):1482-8.
- ¹³⁶ Gil Z, Carlson DL, Boyle JO, Kraus DH, Shah JP, Shaha AR, Singh B, Wong RJ, Patel SG. Lymph node density is a significant predictor of outcome in patients with oral cancer. *Cancer*. 2009 Dec 15;115(24):5700-10.
- ¹³⁷ Medina-Franco H, Cabrera-Mendoza F, Almaguer-Rosales S, Guillén F, Suárez-Bobadilla YL, Sánchez-Ramón A. Lymph node ratio as a predictor of survival in gastric carcinoma. *Am Surg*. 2013 Mar;79(3):284-9.
- ¹³⁸ Sinha P, Kallogjeri D, Gay H, Thorstad WL, Lewis JS Jr, Chernock R, Nussenbaum B, Haughey BH. High metastatic node number, not extracapsular spread or N-classification is a node-related prognosticator in transorally-resected, neck-dissected p16-positive oropharynx cancer. *Oral Oncol*. 2015 May;51(5):514-20.
- ¹³⁹ Künzel J, Psychogios G, Mantsopoulos K, Grundtner P, Waldfahrer F, Iro H. Lymph node ratio as a predictor of outcome in patients with oropharyngeal cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2014 May;271(5):1171-80.
- ¹⁴⁰ Meyer MF, Meinrath J, Seehawer J, Lechner A, Odenthal M, Quaas A, Semrau R, Huebbers CU, Marnitz S, Büttner R, Beutner D. The relevance of the lymph node ratio as predictor of prognosis is higher in HPV-negative than in HPV-positive oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Clin Otolaryngol*. 2018 Feb;43(1):192-198.
- ¹⁴¹ Zenga J, Stadler M, Massey B, Campbell B, Shukla M, Awan M, Schultz CJ, Wong S, Jackson RS, Pipkorn P. Lymph node yield from neck dissection in HPV-associated oropharyngeal cancer. *Laryngoscope*. 2020 Mar;130(3):666-671.
- ¹⁴² Tritter AG, Mehta V, Samuelson M, deGravelle G, Ma X, Medlin-Moore T, Takalkar A, Caldito G, Nathan CO. Incidence of contralateral-bilateral nodes in the human papillomavirus era. *Laryngoscope*. 2017 Jun;127(6):1328-1333.