

**О.В. Пославська**

## **ОСОБЛИВОСТІ ЕКСПРЕСІЇ ОНКОПРОТЕЇНУ P16<sup>INK4A</sup> В ПЛОСКОКЛІТИННИХ РАКАХ ОРОФАРИНГЕАЛЬНОЇ ДІЛЯНКИ**

ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України»  
кафедра патологічної анатомії і судової медицини  
(зав. – д. мед. н., проф. І.С. Шпонька)  
вул. Дзержинського, 9, Дніпропетровськ, 49044, Україна  
SE «Dnipropetrovsk medical academy of Health Ministry of Ukraine»  
Department of pathological anatomy and forensic medicine  
Dzerzhinsky str., 9, Dnipropetrovsk, 49044, Ukraine  
e-mail: alexandra.poslavskaya@gmail.com

**Ключові слова:** плоскоклітинний рак орофарингеальної ділянки, ВПЛ, прогностичні та передбачувальні маркери, p16<sup>INK4a</sup>

**Key words:** squamous cell carcinoma of the oropharynx, HPV, prognostic and predictive markers, p16<sup>INK4a</sup>

**Реферат.** Особенности экспрессии онкопротеина p16INK4a в плоскоклеточных раках орофарингеальной области. Пославская А.В. До 40% плоскоклеточных раков орофарингеальной области (ПР ОФО) связаны с вирусом папилломы человека высокого онкогенного риска, который проявляет наибольшую тропность к эпителию миндалин. Одним из индикаторов последовательных этапов злокачественного преобразования клеток многослойного эпителия с признаками поражения ВПЧ является накопление онкопротеина p16<sup>INK4a</sup>, опухолевого супрессора из семейства Ink4. Нахождение чрезмерного количества p16<sup>INK4a</sup> в свободном состоянии доказывает снижение его супрессорной функции и является показателем активной экспрессии вирусного онкогена E7. Для многофакторного анализа молекулярных механизмов онкогенной трансформации полученные данные вариантов экспрессии p16<sup>INK4a</sup> были распределены в зависимости от клинико-морфологических характеристик плоскоклеточных раков. Смешанная ядерно-цитоплазматическая экспрессия p16<sup>INK4a</sup> более 5% опухолевых клеток наблюдалась в 73,6% случаев, что подтверждает связь пути канцерогенеза раков этой локализации с ВПЧ. Определена статистически достоверная связь между положительным p16<sup>INK4a</sup> статусом и снижением степени дифференцировки ПР ОФО ( $p=0,002$ ,  $r=-0,365$ ). Но в отношении других клинико-морфологических характеристик ПР ОФО и маркера p16<sup>INK4a</sup> статистически достоверной разницы между группами обнаружено не было ( $p>0,05$ ), что отрицает его прогностически-предсказательное значение в диагностике плоскоклеточных раков этой локализации.

**Abstract.** Features of expression of oncoprotein p16INK4a in squamous cell carcinomas of the oropharynx. Poslavskaya O.V. Up to 40% of squamous cell carcinoma of the oropharynx (SCCO) are associated with human papillomavirus of a high oncogenic risk, which shows the greatest affinity to the epithelium of the tonsils. One of the indicators of malignant transformation of the multilayered epithelium cells with evidence of HPV lesions is the accumulation of oncoprotein p16<sup>INK4a</sup>, tumor suppressor from Ink4 family. Presence of excessive amount of p16<sup>INK4a</sup> in a free state shows its reduced suppressor function and is an indication of the active expression of viral oncogene E7. For multivariate analysis of molecular mechanisms of oncogenic transformation, the obtained data of p16<sup>INK4a</sup> expression options were distributed according to the clinical and morphological characteristics of squamous cancers. Mixed nuclear-cytoplasmic expression of p16<sup>INK4a</sup> more than 5% of tumor cells was observed in 73.6% of cases, which confirms the relations of path of carcinogenesis of cancers of this localization with HPV. Statistically significant association between a positive p16<sup>INK4a</sup> status and decrease of the degree of of SCCO differentiation ( $p=0,002$ ,  $r=-0,365$ ) was determined. But with respect to other clinical and morphological characteristics of SCCO and marker p16<sup>INK4a</sup> statistically significant differences between groups were not found ( $p>0.05$ ), this denies its prognostic and predictive value in the diagnosis of SCCO.

Дуже багато досліджень останніх років присвячено пошуку етіологічних чинників та обтяжуючих факторів виникнення плоскоклітинних раків орофарингеальної ділянки (ПР ОФО) з метою вивчення всіх ланок канцерогенезу та можливості впливу на них. Паління/жування тютюну та зловживання алкоголем – домінуючі фактори ризику, які при сумісній дії беруть на

себе до 75% випадків ПР ротової порожнини та глотки в країнах, що розвиваються. Проте до 40% ПР ОФО пов'язані з вірусом папіломи людини (ВПЛ) високого онкогенного ризику [11]. Особливу увагу приділяють різниці між ротовою порожниною та глоткою тому, що ВПЛ проявляє більшу тропність до епітелію мигдаликів [6, 10]. Поширення ВПЛ-позитивних ПР

серед когорт народження останніх десятиріч пов'язують зі зміною сексуальної активності й особливу роль в інфікуванні відводять оральному сексу та вживанню наркотиків серед молоді [10, 11].

Після глобальних клінічних досліджень епітелію шийки матки методом ПЛР в 1996 році ВООЗ прийняла положення, що ВПЛ високого онкогенного ризику (тип 16, 18, 31, 33, 45, 56) є чинником виникнення ПР шийки матки [1]. Морфологічна схожість епітелію ОФО та шийки матки дало підставу дослідникам поєднати і шляхи канцерогенезу. Дослідження по виявленню ролі ДНК ВПЛ в розвитку епітеліальних пухлин довело зв'язок ВПЛ з пухлинами ОФО, гортані, стравоходу, сечового міхура, але для діагностики та прогнозу передракових змін важливо не тільки знайти ДНК ВПЛ певного типу, але й об'єднати локалізацію ДНК з морфологічними змінами в епітелії [2]. ВПЛ-позитивні пухлини формують групу з клінічними особливостями та «базальною морфологією». Тому роль інтеграції ВПЛ, як потенційного фактору прогнозу для ПР ОФО, широко обговорюється в літературі [2, 10, 11].

Одним з індикаторів послідовних етапів злоякісного перетворення клітин багатошарового епітелію (БПЕ) ОФО, з ознаками ураження ВПЛ, є накопичення онкопротеїну p16<sup>INK4a</sup>, що є пухлинним супресором з родини Ink4. Члени цієї родини є інгібіторними субодиницями Cdk (CKIs – Cdk inhibitors), що зупиняють клітинний цикл у відповідь на різні поза- та внутрішньоклітинні сигнали. Знаходження надмірної кількості p16<sup>INK4a</sup> у вільному (незв'язаному з Cdk6) стані доводить зниження його супресорної функції і є показником активної експресії вірусного онкогену E7.

Мета дослідження: з'ясувати прогностично-передбачувальне значення маркеру p16<sup>INK4a</sup> в діагностиці плоскоклітинних раків орофарингеальної ділянки.

#### **МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ**

У дослідженні проведено ретроспективний аналіз первинного біопсійного матеріалу 72 пацієнтів (69 чоловіків - 95,8% і 3 жінок - 4,2%) з ПР ОФО III клінічної стадії (T<sub>3</sub>N<sub>0-2</sub>M<sub>0</sub>), які отримали комбіноване лікування без оперативного втручання в ЛОР-онкологічному відділенні Дніпропетровської обласної клінічної лікарні ім. І.І. Мечникова в період з 2000 по 2008 р. Вік у групі коливався в діапазоні 39 – 67 років, середній вік становив 53,92±1,15 року.

За гістологічною будовою всі спостереження були представлені ПР високого (n=26; 36%), помірного (n=38; 57,8%) та низького (n=8; 11,1%)

ступеня диференціювання. З них 42 (58,4%) випадки ПР мигдаликів з ураженням передньої або задньої дужки, 23 (31,9%) випадки ПР стінок глотки і 7 (9,7%) випадків ПР коріння язика. Також весь матеріал був розподілений на дві групи залежно від ураження лімфатичних вузлів ший: пацієнти без метастазів у регіональні лімфатичні вузли (T<sub>3</sub>N<sub>0</sub>M<sub>0</sub>) – 34 (47,2%) спостереження і пацієнти з виявленими регіонарними метастазами (T<sub>3</sub>N<sub>1-2</sub>M<sub>0</sub>) – 38 (52,8%) спостережень.

Клінічний ефект лікування оцінювався на 14-й день після закінчення неoad'ювантного лікування (два курси поліхіміотерапії (ПХТ) за схемою РВМФ: цисплатин 50 мг, метотрексат 50 мг, блеоцин 30 мг, фторурацил 500 мг) та ½ лікувального курсу променевої терапії (СОД=40Гр) за критеріями RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors) Version 1.0 (2000) при врахуванні візуального (за даними орофарингоскопії, цифрової відеоендоскопії глотки з масштабною фотографією пухлини й регіонарних метастазів у лімфатичні вузли) та топічного (за даними КТ, УЗД) регресу пухлини в комплексі зі шкалою лікувального патоморфозу пухлини й регіонарних метастазів у лімфатичні вузли (визначення ОДЖОП). Позитивний ефект від лікування визначався при клінічних ознаках наявності "часткового", "позитивного" або "повного" візуального та топічного регресу пухлини в поєднанні з наявністю 2-6-го ступеня морфологічного лікувального патоморфозу (ОДЖОП ≤ 75 %). Для отримання достовірних даних дослідження групи пацієнтів ідентичні за основними параметрами. З метою стандартизації результатів лікування як критерій оцінювання був обраний ступінь регресу пухлини у відсотках лише після першого курсу ПХТ. Негативною відповіддю вважався ступінь візуального регресу ПР ОФО 0-50%, позитивною – 51-100%. За цим критерієм пацієнтів також було розподілено на 2 групи: з позитивною відповіддю на ПХТ – 40 (55,6%) випадків і з негативною відповіддю – 32 (44,4%) спостереження.

Для проведення ІГХ дослідження використовували формалін-фіксовані і парафін-залиті примірники біопсійного матеріалу ПР ОФО. В якості первинних використовувалися моноклональні антитіла до p16<sup>INK4a</sup> (клон JC8, LabVision). Титр розведення 1:50 з використанням у якості розчинника спеціального розчину Antibody Diluent (DakoCytomation). Для ідентифікації реакції використовували надчутливу систему візуалізації UltraVision Quanto (LabVision), з нанесенням в якості хромогену 3-діамінобензидин

тетрахлориду (ДАБ) (Quanto, LabVision). Для відокремлення неспецифічних тканинних структур зрізи додатково забарвлювали гематоксиліном Майєра протягом 1-3 хвилин. p16<sup>INK4a</sup>-позитивним статус ПР вважався, якщо коричневих ядер/клітин налічувалося >5%, згідно з рекомендаціями інших авторів [5]. Отримані дані розраховувалися за допомогою IBM PC сумісного комп'ютера "Pentium 4" в програмі SPSS Statistica 17.0., за методологією, рекомендованою багатьма дослідниками [2, 3, 7-9].

### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Всі ПР ОФО за експресією маркеру p16<sup>INK4a</sup> були поділені на дві групи:

- ПР ОФО з p16<sup>INK4a</sup>-позитивним статусом, p16<sup>INK4a</sup> (+), куди ввійшла найбільша частка спостережень – 53 випадки (73,6%) із середнім значенням експресії більше 5%.
- ПР ОФО з p16<sup>INK4a</sup>-негативним статусом, p16<sup>INK4a</sup> (-), що об'єднали 19 спостережень (26,4%) із середнім значенням експресії на рівні 5% і менше.

Діапазон значень експресії маркеру p16<sup>INK4a</sup> в ПР ОФО відзначався в межах від 2% до 67% і в середньому становив 46,7±1,52%. Забарвлення

виявлялося у вигляді дифузного розміщення імуногістохімічної мітки або «гніздами» та «язиками». Особливо до себе привертала увагу осередки ПР ОФО з ознаками койлоцитарної атипії. При забарвленні гематоксиліном-еозином такі осередки відрізнялися наявністю клітин, що значно варіювали за розміром та формою, мали перинуклеарну світлу цитоплазматичну зону і ядерну атипію: центрально або ексцентрично розміщені зменшені й пікнотичні ядра койлоцитів, що мали нерівні контури і гіперхромазію. Такі клітини мали змішане ядерно-цитоплазматичне розміщення імуногістохімічної мітки, що є наслідком глибоких дегенеративних змін і накопичення пероксидази, яка дає неспецифічне цитоплазматичне забарвлення з хромогеном ДАБ. Саме з цим пов'язана і ядерно-цитоплазматична реакція з p16<sup>INK4a</sup> високої інтенсивності в клітинах ПР ОФО з вираженими дистрофічними змінами та ознаками апоптозу. Для багатофакторного аналізу молекулярних механізмів онкогенної трансформації в ПР ОФО отримані дані варіантів експресії p16<sup>INK4a</sup> були розподілені залежно від клініко-морфологічних характеристик (табл.).

Розподіл клініко-морфологічних характеристик ПР ОФО за експресією p16<sup>INK4a</sup>

Клініко-морфологічні характеристики ПР ОФО	Всього n = 72	p16 <sup>INK4a</sup> ≤ 5%	p16 <sup>INK4a</sup> > 5%	p
Стать				0,782
Чоловіки	69	18 (26,1%)	51 (73,9%)	
Жінки	3	1 (33,3%)	2 (66,7%)	
Первинна локалізація				0,177
Мигдалики	42	19 (21,5%)	33 (78,5%)	
Глотка	23	6 (26,1%)	17 (73,9%)	
Коріння язика	7	4 (57,1%)	3 (42,9%)	
Ступінь диференціювання				0,002
Високий	26	11 (42,3%)	15 (57,7%)	
Помірний	38	8 (21,1%)	30 (78,9%)	
Низький	8		8 (100%)	
Метастази в л/в шії				0,585
T <sub>3</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	34	10 (29,4%)	24 (70,6%)	
T <sub>3</sub> N <sub>1-2</sub> M <sub>0</sub>	38	9 (23,7%)	29 (76,3%)	
Відповідь на ХТ				0,440
Позитивна	40	12 (30%)	28 (70%)	
Негативна	32	7 (21,9%)	25 (78,1%)	

Примітка. Статистично достовірним зв'язок вважався при p<0,05.

Дані таблиці свідчать про відсутність статистично достовірної різниці в групах з позитивним і негативним p16<sup>INK4a</sup>-статусом у пацієнтів різної статі (p=0,782). Також відносна кількість випадків ПР ОФО з p16<sup>INK4a</sup> > 5% у підгрупах різних первинних локалізацій була досить однорідною (ПР мигдаликів 78,5%, ПР

глотки 73,9%) окрім ПР коріння язика (42,9%), але, за результатами точного тесту Фішера, залежності експресії від первинної локалізації знайдено не було (p=0,177).

Підгрупи ПР ОФО різного ступеня диференціювання суттєво відрізнялися кількістю позитивних за p16<sup>INK4a</sup>-статусом спостережень з

чіткою тенденцією до збільшення експресії з одночасним зниженням ступеня диференціювання – 57,7%, 78,9% і 100% відповідно. Тобто кількість низькодиференційованих ПР ОФО з високою експресією p16<sup>INK4a</sup> збільшилася в 1,3 разу відносно помірнодиференційованих ПР ОФО і в 1,7 порівняно з ПР ОФО високого ступеня диференціювання. Визначений помірний негативний кореляційний зв'язок між p16<sup>INK4a</sup>(+) статусом і зниженням ступеня диференціювання ПР ОФО ( $p=0,002$ ,  $r=-0,365$ ). Ці дані узгоджуються з результатами й інших дослідників [3, 4, 8]. Hafkamp H.C. et al. (2008) знайшли інтеграцію ВПЛ 16 типу в 41% ПР мигдаликів і її значну кореляцією з надекспресією p16<sup>INK4a</sup>, що підтверджує надійність цього маркера для виявлення ВПЛ. Присутність ВПЛ інфекції значно корелювала з низьким вживанням тютюнових ( $p=0,002$ ) і алкогольних ( $p=0,011$ ) виробів, низьким ступенем диференціації ( $p=0,019$ ) (як і в нашому дослідженні), невеликим об'ємом пухлини ( $p=0,024$ ) і меншим відсотком локально-регіональних рецидивів ( $p=0,039$ ) [6]. Але треба відзначити, що в підгрупах з метастазами і без та різною відповіддю на ХТ статистично достовірної різниці між експресією маркера p16<sup>INK4a</sup> нами визначено не було ( $p=0,585$  і  $p=0,440$  відповідно), що суперечить даним деяких авторів. Lewis J.S. et al. (2010) із 239 випадків ПР ОФО в 187 (78%) знайшли суттєву експресію маркера p16<sup>INK4a</sup>, з яких 139 (74%) були позитивними і на ВПЛ високого онкогенного ризику. У зразках позитивних за p16<sup>INK4a</sup>-статусом дослідники не знайшли статистично достовірної різниці у виживаності між ВПЛ (+) і ВПЛ (-)

групами. Але p16<sup>INK4a</sup>(+) ПР ОФО мали набагато кращий прогноз, ніж p16<sup>INK4a</sup>(-) [7]. Кuo K.T. et al. (2008) відзначають кращий прогноз для пацієнтів з ПР мигдаликів і з надекспресією p16<sup>INK4a</sup>, і з інфекцією ВПЛ, порівняно з ПР, що мають негативний статус за обома категоріями [9]. Це підтверджує і робота Kumar V. et al. (2008), які досліджували ПР ОФО і також відмічають сильний кореляційний зв'язок між інфікуванням ВПЛ і надекспресією p16<sup>INK4a</sup> ( $p=0,0001$ ), а з боку p16<sup>INK4a</sup> – значну асоціацію з відповіддю на передопераційну хіміотерапію ( $p=0,008$ ), комбіновану хіміопроменеву терапію ( $p=0,009$ ) і загальну виживаність ( $p=0,001$ ) [5].

### ВИСНОВКИ

1. При виявленні плоскоклітинного раку орофарингеальної ділянки необхідно проводити додаткове імуногістохімічне дослідження з прогностичною та передбачувальною метою для вибору доцільної схеми лікування.

2. Змішана ядерно-цитоплазматична експресія онкопротеїну p16INK4a більше 5% пухлинних клітин спостерігалася в 73,6% ПР ОФО, що підтверджує зв'язок шляху канцерогенезу раків цієї локалізації з ВПЛ.

3. Визначений статистично достовірний зв'язок між позитивним p16INK4a(+) статусом і зниженням ступеня диференціювання ПР ОФО ( $p=0,002$ ,  $r=-0,365$ ). Але відносно інших клініко-морфологічних характеристик ПР ОФО і маркера p16INK4a статистично достовірної різниці між групами знайдено не було ( $p>0,05$ ), що заперечує його прогностично-передбачувальне значення в діагностиці ПР ОФО.

### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Запорожан В.М. Гінекологічна патологія: атлас: навч. посібник / В.М. Запорожан, М.Р. Цегельський. – Одеса: Одес. держ. мед. ун-т, 2002. – 308 с.
2. Петров С.В. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека. – 3-е изд., доп. и перераб / С.В. Петров, Н.Т. Райхлин. – Казань: Титул, 2004. – 456 с.
3. Bradley K.T. Immunohistochemical detection of p16INK4a in dysplastic lesions of the oral cavity / K.T. Bradley, S.D. Budnick, S. Logani // *Modern Pathology*. – 2006. – Vol. 19, N 2. – P. 1310-1316.
4. Combined analysis of HPV DNA, p16, p21 and p53 to predict prognosis in patients with stage IV hypopharyngeal carcinoma / P. Ernoux-Neufcoeur, M. Arafa, Ch. Decaestecker [et al.] // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* – 2011. – Vol. 137. – P. 173-181.
5. EGFR, p16, HPV Titer, Bcl-xL and p53, sex, and smoking as indicators of response to therapy and survival in oropharyngeal cancer / B. Kumar, K. G. Cordell, J. S. Lee [et al.] // *Clin. Oncol.* – 2008. – Vol. 26, N 19. – P. 3128-3137.
6. Marked differences in survival rate between smokers and nonsmokers with HPV 16-associated tonsillar carcinomas / H.C. Hafkamp, J.J. Manni, A. Haesevoets [et al.] // *Cancer*. – 2008. – Vol. 122, N 12. – P. 2656-2664.
7. p16 positive oropharyngeal squamous cell carcinoma: an entity with a favorable prognosis regardless of tumor HPV status / J.S. Jr. Lewis, W.L. Thorstad, R.D. Chernock [et al.] // *Amer. J. Surgical Pathology*. – 2010. – Vol. 34, N 8. – P. 1088-1096.
8. Prognostic significance of p16 protein levels in oropharyngeal squamous cell cancer / P.M. Weinberger,

Z. Yu, B.G. Haffty [et al.] // Clin. Cancer Res. – 2004. – Vol. 10. – P. 5684-5691.

9. The biomarkers of human papillomavirus infection in tonsillar squamous cell carcinoma-molecular basis and predicting favorable outcome / K.T. Kuo, C.H. Hsiao, C.H. Lin [et al.] // Mod. Pathol. - 2008. - Vol. 21, N 4. - P. 376-386.

10. The role of human papillomavirus 16 E6 in anchorage-independent and invasive growth of mouse

tonsil epithelium / A.C. Hoover, W.C. Spanos, G.F. Harris [et al.] // Arch. Otolaryngol Head Neck Surg.-2007.- Vol. 133, N5.-P. 495-502.

11. World Health Organization of tumours pathology and genetics of head and neck tumours / L. Barnes, J. Eveson, P. Richard [et al.]. - Lyon, France: IARC Press, 2005. – 430 p.

## REFERENCES

1. Zaporozhan VM, Tsehelsky MR. [Gynecological pathology: Atlas]. Odessa: Odessa medical university. 2002;308. Ukrainian.

2. Petrov SV, Reichlin NT. [Guide on immunohistochemical diagnosis of human tumors: 3-rd ed.]. Kazan: Titul. 2004;456. Russian.

3. Bradley KT, Budnick SD, Logani S. Immunohistochemical detection of p16INK4a in dysplastic lesions of the oral cavity. Modern pathology. 2006;19(2):1310-16.

4. Ernoux-Neufcoeur P, Arafa M, Decaestecker C, et al. Combined analysis of HPV DNA, p16, p21 and p53 to predict prognosis in patients with stage IV hypopharyngeal carcinoma. J. cancer res. clin. oncol. 2011;137:173-81.

5. Kumar B, Cordell K G, Lee JS, et al. EGFR, p16, HPV Titer, Bcl-xL and p53, sex, and smoking as indicators of response to therapy and survival in oropharyngeal cancer. Clin. oncol. 2008;26(19):3128-37.

6. Hafkamp HC, Manni JJ, Haesevoets A, et al. Marked differences in survival rate between smokers and

nonsmokers with HPV 16-associated tonsillar carcinomas. Cancer. 2008;122(12):2656-64.

7. Lewis JSJr, Thorstad WL, Chernock RD, et al. p16 positive oropharyngeal squamous cell carcinoma:an entity with a favorable prognosis regardless of tumor HPV status. American journal of surgical pathology. 2010;34(8):1088-96.

8. Weinberger PM, Yu Z, Haffty BG, et al. Prognostic significance of p16 protein levels in oropharyngeal squamous cell cancer. Clin. cancer res. 2004;10:5684-91.

9. Kuo KT, Hsiao CH, Lin CH, et al. The biomarkers of human papillomavirus infection in tonsillar squamous cell carcinoma-molecular basis and predicting favorable outcome. Mod. pathol. 2008;21(4):376-86.

10. Hoover AC, Spanos WC, Harris GF, et al. The role of human papillomavirus 16 E6 in anchorage-independent and invasive growth of mouse tonsil epithelium. Arch. otolaryngol head neck surg. 2007;133(5):495-502.

11. Barnes L, Eveson J, Richard P, et al. World Health Organization of tumours pathology and genetics of head and neck tumours. Lyon, France: IARC Press, 2005;430.

Стаття надійшла до редакції  
29.02.2016

