А.М. Рябошапка
О.О. Ковальов
Н.М. Волошина

ДЗ «Запорізька медична академія післядипломної освіти МОЗ України», Запоріжжя, Україна

Ключові слова: *плоскоклітинний рак, ротова порожнина, ротоглотка, вірус папіломи людини 16/18-го типу, ДНК ВПЛ, Е6 ВПЛ, p16^{INK4a}, p53, койлоцитоз, полімеразна ланцюгова реакція, імуногістохімічний метод.*

ДІАГНОСТИКА РАКУ РОТОВОЇ ПОРОЖНИНИ І РОТОГЛОТКИ, АСОЦІЙОВАНОГО З ВІРУСОМ ПАПІЛОМИ ЛЮДИНИ

***Мета**: визначити ознаки інфікування вірусом папіломи людини (ВПЛ) 16/18-го типу в карциномі ротової порожнини і ротоглотки та розробити алгоритм діагностики ВПЛ-позитивних (ВПЛ+) і ВПЛ-негативних (ВПЛ–) пухлин. **Об'єкт і методи дослідження**: біоптати пухлин 128 хворих на плоскоклітинний рак ротової порожнини (РРП) та ротоглотки (РРГ). Використано полімеразну ланцюгову реакцію (визначення ДНК ВПЛ 16/18-го типу), імуногістохімічний (визначення білка Е6 ВПЛ 16/18-го типу, білків p16^{INK4a} і p53) та гістологічний методи (визначення койлоцитозу). **Результати**: ДНК ВПЛ 16/18-го типу виявлено у 8 (6,3%), койлоцитоз — у 69 (53,9%), одночасну експресію p16^{INK4a} і Е6 ВПЛ 16/18-го типу — у 60 (46,9%), експресію p53 — у 73 (57,0%) хворих. Показано, що одночасна експресія білків Е6 і p16 є ознакою наявності ВПЛ у пухлині. Чутливість і специфічність визначення койлоцитозу як маркера ВПЛ становлять відповідно 0,83 та 0,72. Розроблено алгоритм виявлення ВПЛ у РРП та РРГ. **Висновки**: плоскоклітинний РРП і РРГ у 46,9% випадків асоційований з ВПЛ 16/18-го типу. Розроблений алгоритм може бути рекомендований для діагностики ВПЛ+ і ВПЛ– форм злоякісних орофарингеальних пухлин.*

ВСТУП

Рак ротової порожнини (РРП) і ротоглотки (РРГ) належить до найбільш розповсюджених нозологічних форм у структурі захворюваності на злоякісні пухлини. У більшості країн світу загальна 5-річна виживаність хворих на РРП і РРГ не перевищує 50%. Майже у 60% пацієнтів при першому зверненні до онколога діагностують III–IV стадію пухлинного процесу, що значно знижує вірогідність радикального лікування або робить його неможливим [1]. Медіана загальної та безрецидивної виживаності таких хворих становить відповідно 27 і 11 міс [2]. Більше 90% пухлин цих локалізацій мають гістологічну будову плоскоклітинного раку. В Україні захворюваність на РРП і РРГ становила в 2011 р. відповідно 5,2 і 4,6 на 100 тис. населення (грубий показник), смертність до 1 року досягала 45,7% у хворих на РРП і 48,0% — у пацієнтів із РРГ. При цьому захворюваність чоловіків майже вдвічі вища за зазначені показники (РРП — 9,0, РРГ — 8,7), у структурі захворюваності на злоякісні новоутворення (за винятком немеланомних злоякісних пухлин шкіри) чоловічого населення України РРП посідає 10-те місце, а у віковій групі 30–54 роки — 5-те. У цьому самому віковому інтервалі серед чоловіків у структурі смертності від злоякісних новоутворень РРП посідає 4-те місце, РРГ — 5-те [3].

Вживання тютюну є найбільш вивченим фактором ризику розвитку орофарингеального раку. У багатьох дослідженнях показана важлива роль тютюнопаління, вживання жувальних сумішей на основі бетелю, алкоголю та їх адитивний ефект у розвитку РРП і РРГ [4]. В останні роки у якості етіологічного фактора у розвитку раку орофарингеальної зони розглядають вірус папіломи людини (ВПЛ) [5]. Деякими авторами [6] показано зростання частоти ВПЛ-асоційованого плоскоклітинного РРП з одночасним зниженням частоти випадків без ВПЛ-інфекції. Найчастіше у хворих на РРП і РРГ виявляють 16-й та 18-й типи ВПЛ [7–9]. В Україні фундаментальні дослідження щодо асоціації ВПЛ з плоскоклітинним РРП і РРГ відсутні.

Як відомо, онкогенний потенціал ВПЛ реалізується внаслідок інтеграції фрагментів ДНК вірусу в геном клітини, експресії ранніх вірусних білків Е5, Е6 і Е7 та інактивації останніми функції туморосупресорних білків p53 і pRb [10]. Онкобілок Е6, взаємодіючи з p53, прискорює убіквітинзалежну деградацію останнього, скорочує його напівперіод життя, у наслідок чого порушуються механізми, які забезпечують контроль репарації ДНК, клітинного циклу, проліферації й апоптозу. Крім того, Е6 активує теломеразу (ферментативний РНК-білковий комплекс, який підтримує розмір теломерних ділянок хромосом), що сприяє імморталізації клітин. Онкобілок Е7 інактивує пухлинний супресор pRb, внаслідок чого вивільняється транскрипційний фактор E2F, який активує гени-стимулятори переходу клітини в S-фазу клітинного циклу [11]. Крім того, Е7 забезпечує G1/S перехід та підвищує проліферативну активність клітин за рахунок нейтралізації або подолання ефекту інгібіторів циклінзалежних кіназ (cdk) p21$^{WAF/CIP1}$ і p27^{KIP1}. Функціональна інактивація pRB білком Е7 призводить до компенсаторної гіперекспресії клітинного супресорного білка p16^{INK4a} — інгібітора cdk4/6 [10].

Для визначення ВПЛ у пухлині використовують методи молекулярної біології. Зокрема, метод гібридизація *in situ* (Гіs) має високу чутливість та специфічність і дозволяє виявити та ідентифікувати ДНК ВПЛ як в цитологічних, так і гістологічних зразках. Метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з типоспецифічними або консенсусними праймерами при визначенні ДНК ВПЛ забезпечує більш високу специфічність, ніж Гіs [12]. ПЛР можна застосовувати для визначення ВПЛ у пухлинах, у тому числі й матеріалі, отриманому з парафінових блоків, даний метод може бути хорошим скринінговим тестом [13]. Оскільки нуклеотидна послідовність Е6/Е7 має низьку варіабельність і не втрачається при інтеграції вірусної ДНК у геном хазяїна, застосування адекватних праймерів до ділянок генів Е6/Е7 забезпечує об'єктивне визначення ВПЛ, зокрема його інтегрованої форми [14]. Прямі й сурогатні маркери ВПЛ-інфекції можна визначати й імуногістохімічним (ІГХ) методом, виявляючи як вірусні (капсидні антигени, білки Е5, Е6, Е7), так і клітинні білки ($p16^{INK4a}$, pRb, цикліни, p53), через зміну яких опосередковується онкогенна дія ВПЛ [15]. В останні роки як сурогатний маркер ВПЛ у карциномах орофарингеальної ділянки привертає увагу підвищена експресія $p16^{INK4a}$ [16]. Проте існують і дані, що у ВПЛ-позитивних (ВПЛ+) плоскоклітинних карциномах, локалізованих на голові та шиї, зміни експресії вищезгаданого білка можуть бути відсутніми [15].

Супресорний білок p53 залучений у клітині до таких ключових механізмів, як регуляція клітинного циклу, проліферації, репарації ДНК та апоптозу. Мутації гена *TP53* часто асоційовані зі злоякісною трансформацією клітин [17]. Водночас ВПЛ+ пухлини можуть містити *TP53* переважно дикого типу [18, 19], наслідком чого, як вважають, може бути значна чутливість ВПЛ+ пухлин до хіміопроменевого лікування [15].

Ознакою вірусної інфекції при цитологічному чи гістологічному дослідженні дисплазій багатошарового плоского епітелію та пухлин є койлоцитоз. Койлоцити в епітелії шийки матки — це вірус-інфіковані клітини багатошарового плоского епітелію; вірус, який виявляють у ядрах таких клітин у 75% випадків, — ВПЛ. Однак діагностична інформативність койлоцитозу в пухлинах плоскоклітинного раку інших локалізацій остаточно не встановлена [20, 21].

Відомо, що у хворих на ВПЛ+ рак відзначають значний клінічний об'єктивний ефект після променевої та/або хіміотерапії і кращий прогноз [6, 22], що може слугувати підґрунтям для проведення консервативного (органозберігаючого) лікування, тоді як низька ефективність хіміопроменевої терапії хворих на ВПЛ-негативний (ВПЛ–) рак зумовлює необхідність виконання хірургічної операції [15]. Тобто, наявність ВПЛ у пухлині може впливати на тактику лікування. Тому потрібно застосовувати чутливі, специфічні й точні методи виявлення ВПЛ, оскільки у випадках як хибнонегативних, так і хибнопозитивних результатів дослідження (або якщо таке дослідження взагалі не проводять) вибір неефективної лікувальної тактики може призвести до втрати часу і незадовільних результатів [15].

Виходячи з вищенаведеного, мета нашої роботи — визначити ознаки наявності ВПЛ 16/18-го типу у карциномах ротової порожнини та ротоглотки і розробити алгоритм діагностики ВПЛ+ і ВПЛ– РРП і РРГ.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

У дослідження включено 128 хворих у віці від 34 до 68 років (середній вік 56,6 ± 17,1 року) з клінічним діагнозом місцево-поширений (T2–4N1–2M0) РРП (63 хворих) і РРГ (65 хворих). У всіх пацієнтів діагностовано плоскоклітинний рак: у 50 — без зроговіння, у 78 — зі зроговінням. Хворі отримували лікування у комунальному закладі «Запорізький обласний клінічний онкологічний диспансер» Запорізької обласної ради з 2008 по 2011 р. Усі пацієнти були проінформовані та дали згоду на використання хірургічного матеріалу в дослідницьких цілях.

Для виявлення ВПЛ обрано комплекс діагностичних тестів, який включав: визначення ДНК ВПЛ 16/18-го типу шляхом ПЛР з типоспецифічними праймерами на матеріалі браш-біопсій; ІГХ визначення Е6 ВПЛ 16/18-го типу, $p16^{INK4a}$, p53; оцінку койлоцитозу.

Патогістологічне та ІГХ дослідження проводили на зразках пухлинної тканини, отриманих до початку лікування шляхом щипцевої біопсії ближче до краю пухлини на межі з нормальними тканинами. Койлоцитоз у гістологічних препаратах, забарвлених гематоксиліном та еозином, визначали шляхом підрахунку відсотка койлоцитів на 1 тис. пухлинних клітин. Депарафінізацію і регідратацію парафінових зрізів, високотемпературне демаскування антигенів і візуалізацію білків під час ІГХ дослідження проводили з використанням компонентів системи «EnVision™ FLEX+, Mouse, High pH» («DakoCytomation», Данія) згідно з рекомендаціями виробника. Виявлення Е6 ВПЛ 16/18-го типу проводили з використанням первинного мишачого моноклонального антитіла (МкАТ) «HPV16 E6/HPV18 E6» (клон C1P5) («Santa Cruz Biotechnology, Inc.», № sc-460, США); білка $p16^{INK4a}$ — первинного мишачого МкАТ «CDKN2A/p16INK4a antibody» (клон 2D9A12) («AbCam», № ab54210, Великобританія); p53 — первинного мишачого МкАТ «Monoclonal Mouse Anti-Human p53 Protein» (клон DO-7) («DakoCytomation», № M 7001, Данія). Для диференціації структури тканин зрізи додатково забарвлювали гематоксиліном. Мікроскопію виготовлених препаратів проводили за допомогою світлового мікроскопа Imager A1m AXIO («Carl Zeiss», Німеччина) з цифровою камерою Jenoptik ProgRes C10 («JENOPTIK Optical Systems, Inc.», США). У кожному випадку аналізували 1 тис. інвазивних пухлинних клітин для кожного марке-

ра з підрахунком відсотка позитивно забарвлених клітин, в яких маркерний білок виявляли в ядрі та/або цитоплазмі. Оскільки алгоритм обчислення результатів ІГХ забарвлення не є стандартизованим, експресію всіх досліджуваних білків інтерпретували із застосуванням німецької напівкількісної системи підрахунку для оцінки інтенсивності фарбування, адаптованої іншими дослідниками. Для оцінки експресії Е6 ВПЛ 16/18-го типу застосовували напівкількісну шкалу з урахуванням інтенсивності забарвлення ядер і цитоплазми та відсотка позитивних клітин (0–4% — відсутність експресії; 5–25% — 1+; 26–50% — 2+; > 50% — 3–4+). Експресію Е6 вважали негативною за відсутності забарвлення тканини у зразку або наявності < 5% забарвлених клітин [23]. Для оцінки експресії $p16^{INK4a}$ застосовували адаптовану напівкількісну шкалу, що враховувала інтенсивність ядерного та цитоплазматичного забарвлення у балах (відсутнє — 0; слабке — 1; помірне — 2; сильне — 3 бали) та відсоток позитивних клітин (0% — 0; 1–10% — 1; 11–50% — 2; 51–80% — 3; 81–100% — 4). Загальну оцінку визначали множенням показника інтенсивності на показник відсотка забарвлених клітин. Поріг відсічення встановлено на рівні 2 балів за допомогою аналізу ROC-кривої: 2 бали і вище вважали ознакою експресії p16 [24]. Експресію p53 оцінювали на основі обчислення відсотка забарвлених ядер; позитивною реакцією вважали наявність > 0% забарвлених клітин, негативною реакцією — 0–9% [25]. Градацію експресії p53 проводили за напівкількісною шкалою: < 10% позитивних клітин — 0; 10–25% — 1+; 26–50% — 2+; 51–75% — 3+; 76–100% — 4+ [26].

Для виявлення і диференціації ДНК ВПЛ 16/18-го типу у цитологічних зразках методом ПЛР використовували набір реагентів «АмплиСенс® ВПЧ16/18-FL» (ФГУН «ЦНИИ Эпидемиологии» Роспотребнадзора, Росія) з типоспецифічними праймерами, розташованими в ділянці Е6-Е7 генів ВПЛ. ПЛР-дослідження виконували із застосуванням термостата для ПЛР-аналізу ТП4-ПЦР-01-«Терцик» (ООО «НПО ДНК-Технология», Росія) і флуориметра АЛА-1/4 («BioSan», Латвія) з оцінкою результатів за принципом флуоресцентної детекції за «кінцевою точкою». Усі процедури ПЛР-аналізу проводилися згідно з рекомендаціями виробників апаратури і реагентів.

Непараметричний аналіз за Манном — Уїтні (U-критерій) використовували для порівняння кількісних показників з розподілом, відмінним від нормального, і якісних порядкових показників. Для встановлення зв'язку між номінальними і порядковими показниками застосовували критерій χ^2 Пірсона. Оцінку достовірності різниці між групами проводили за допомогою точного двобічного тесту Фішера. Кореляцію між перемінними оцінювали за допомогою коефіцієнта рангової кореляції Спірмена, ρ. У всіх випадках показники вважали статистично значимими, якщо рівень значимості був < 0,05 (p < 0,05).

Чутливість і специфічність діагностичного тесту виявлення ВПЛ розраховували за формулами:

$$\textit{чутливість} = a / (a + c);$$
$$\textit{специфічність} = d / (b + d),$$

де *a* — кількість випадків позитивного тесту серед ВПЛ+ пухлин; *b* — кількість випадків позитивного тесту серед ВПЛ−; *c* — кількість випадків негативного тесту серед ВПЛ+ пухлин; *d* — кількість випадків негативного тесту серед ВПЛ− пухлин [27].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

За загальними результатами проведеного комплексного дослідження встановлено, що з 128 хворих ДНК ВПЛ 16/18-го типу визначено у 6,3%, койлоцитоз — у 53,9%, Е6 ВПЛ 16/18-го типу — у 46,9%, експресію $p16^{INK4a}$ — у 50,0%, експресію p53 — у 57% хворих (табл. 1). Ці маркери відзначали з різною частотою, тому їх сукупний аналіз у кожному конкретному випадку дозволив виділити ВПЛ+ (60 хворих, 46,9%) та ВПЛ− пухлини (68 хворих, 53,1%). До останніх віднесені пухлини, в яких не виявлено специфічних маркерів ВПЛ, а саме ДНК ВПЛ та Е6 ВПЛ 16/18-го типу. У 27,9% ВПЛ− пухлин відзначено койлоцитоз, у 52,9% — експресію p53, у 5,9% — експресію $p16^{INK4a}$.

Таблиця 1

Частота виявлення маркерів ВПЛ у біоптатах пухлин РРП та РРГ

Показник (метод дослідження)	Усі зразки		ВПЛ+		ВПЛ−		p
	n	%	n	%	n	%	
Усього	128*	100,0*	60*	100,0*	68	100,0	
ДНК ВПЛ 16/18-го типу (ПЛР)	8	6,3	8	13,3	0	0	< 0,001
Койлоцитоз (гістологічний)	69	53,9	50	83,3	19	27,9	< 0,001
Е6 ВПЛ 16/18-го типу (ІГХ)	60	46,9	60	100	0	0	< 0,001
$p16^{INK4a}$ (ІГХ)	64	50	60	100	4	5,9	< 0,001
p53 (ІГХ)	73	57,0	37	61,7	36	52,9	0,373

*Сума абсолютних і відносних показників перевищує загальну кількість хворих, тому що в одному і тому ж зразку пухлини відзначали декілька ознак інфікування ВПЛ.

Експресія цих маркерів у ВПЛ+ пухлинах була іншою. У 100% таких пухлин виявлено експресію Е6 ВПЛ 16/18-го типу (рис. 1) і $p16^{INK4a}$ (рис. 2); у 83,3% — койлоцитоз; у 61,7% — експресію p53. У 8 хворих цієї групи, за даними ПЛР, визначено ДНК ВПЛ 16-го типу (5 хворих) і 18-го типу (3 хворих). У 6 з 8 хворих діагностовано РРГ (піднебінних мигдаликів), у 2 — РРП (по 1 випадку раку слизової оболонки альвеолярного відростка і дна ротової порожнини, в яких виявлено ДНК ВПЛ 18-го типу). У 7 з них констатовано койлоцитоз.

На увагу заслуговують результати ІГХ дослідження, згідно яким у препаратах пухлин 60 пацієнтів (включаючи 8 ДНК ВПЛ+ випадків) виявлено паралельно експресію як Е6 ВПЛ 16/18-го типу, так

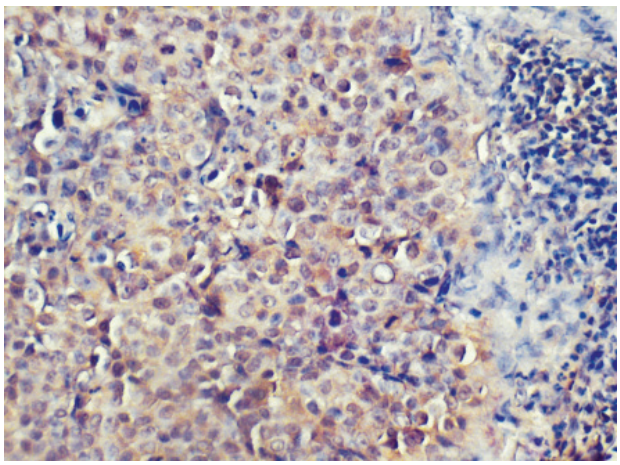

Рис. 1. Плоскоклітинний РРГ без зроговіння. Позитивна ІГХ реакція на Е6 ВПЛ 16/18-го типу (х200)

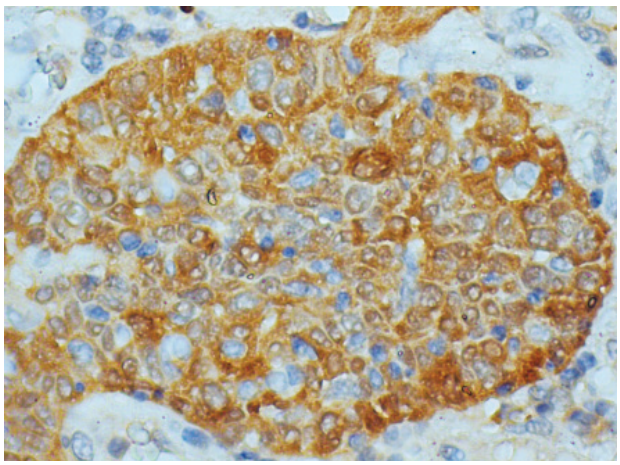

Рис. 2. Плоскоклітинний РРГ (піднебінного мигдалика) без зроговіння. Позитивна ІГХ реакція на $p16^{INK4a}$ у ВПЛ+ пухлині (х400)

і сурогатного маркера ВПЛ $p16^{INK4a}$. Даний результат підтвердив, що експресія в пухлині як вірусспецифічного білка Е6, так і дослідженого сурогатного маркера ВПЛ свідчить про асоціацію цієї пухлини з ВПЛ навіть за умови негативного результату ПЛР діагностики. Експресію $p16^{INK4a}$ порогового рівня відзначено також у 4 хворих на ВПЛ– рак за відсутності експресії Е6. Різниця в частоті виявлення досліджених молекулярних та ІГХ ознак в ВПЛ+ і ВПЛ– біоптатах, крім експресії p53, достовірна.

Встановлений нами розподіл пацієнтів залежно від частоти асоціації пухлин з маркерами інфікування ВПЛ не суперечить даним інших дослідників: частота ВПЛ-асоційованого раку у світі широко варіює — від 40 до 80% (Північна Америка), від 20 до 90% (Європа) [8]. Вказані цифри відображають, вірогідно, як різну поширеність ВПЛ серед населення, так і різницю в інформативності між застосованими методами виявлення ВПЛ в пухлинах.

Клініко-морфологічні характеристики досліджених пухлин наведено у табл. 2: групи хворих з ВПЛ+ і ВПЛ– пухлинами суттєво не відрізнялися за локалізацією пухлини, макроскопічною формою росту, гістологічною будовою і ступенем диференціювання.

Таблиця 2

Клініко-морфологічні характеристики ВПЛ+ і ВПЛ– РРП і РРГ

Характеристика	Усі зразки		ВПЛ+		ВПЛ–		p*
	n	%	n	%	n	%	
Усього	128	100,0	60	100,0	68	100,0	
Локалізація пухлини							
ротова порожнина	63	49,2	26	43,3	37	54,4	
ротоглотка	65	50,8	34	56,7	31	45,6	0,221
Макроскопічна форма росту							
змішана	82	64,1	35	58,4	47	69,1	
виразкова	15	11,7	11	18,3	4	5,9	
виразково-інфільтративна	27	21,1	12	20,0	15	22,1	
інфільтративна	4	3,1	2	3,3	2	2,9	0,152
Гістологічна будова – плоскоклітинна карцинома							
зі зроговінням	78	60,9	36	60,0	42	61,8	
без зроговіння	50	39,1	24	40,0	26	38,2	0,858
Ступінь злоякісності							
G1	52	40,6	20	33,3	32	47,1	
G2	47	36,7	27	45,0	20	29,4	
G3	29	22,7	13	21,7	16	23,5	0,293

*Значення p одержано при зіставленні ВПЛ+ і ВПЛ– пухлин.

Аналіз пухлинного процесу за класифікацією TNM6 та стадією захворювання показав, що пацієнти з ВПЛ+ пухлинами частіше мають менш розповсюджений пухлинний процес (за категорією T та стадією). Значна поширеність процесу у пацієнтів з ВПЛ– пухлинами може свідчити про його більш агресивний перебіг. За частотою метастатичного ураження регіонарних лімфатичних колекторів (категорія N) пацієнти з ВПЛ+ і ВПЛ– пухлинами суттєво не відрізнялися (рис. 3). Що стосується локалізації пухлин, то ВПЛ+ РРГ діагностовано у 34 (52,3%) пацієнтів, ВПЛ– РРГ — у 31 (47,7%). Серед 63 хворих на РРП 26 (41,3%) були ВПЛ+, 37 (58,7%) — ВПЛ– (рис. 4), однак виявлені відмінності статистично незначущі ($p = 0,221$).

Серед ВПЛ+ новоутворень переважали пухлини піднебінних мигдаликів (35,5%), дна ротової порожнини (21,7%), язика (10,0%) і одночасне ураження кількох суміжних ділянок ротоглотки (10,0%) (рис. 5). Такий розподіл був пропорційний частоті ураження плоскоклітинною карциномою відповідних анатомічних ділянок і суттєво не відрізнявся від такого самого розподілу серед ВПЛ– пухлин ($p = 0,669$).

Койлоцитоз (рис. 6) діагностували у 53,9% досліджених зразків. У групі хворих на ВПЛ+ рак койлоцитоз визначався частіше (50 хворих, 83,3%), ніж у хворих на ВПЛ– рак — 19 (27,9%). Спираючись на ці дані, розраховано чутливість і специфічність койлоцитозу як маркера ВПЛ у плоскоклітинних РРП і РРГ за відповідними формулами [27]. Розрахунки показали, що чутливість визначення койлоцитозу для діагностики ВПЛ в РРП і РРГ становила 0,83, специфічність — 0,72. За даними літератури, трансформація епітеліальної клітини в койлоцит індукується спільною активністю вірусних білків Е5 і Е6 ВПЛ високого онкогенного ризику [28]. Це підтверджено результатами аналізу отриманих нами даних: виявлено позитивний кореляційний зв'язок ($\rho = 0,32$; $p = 0,012$) між експресією Е6 ВПЛ 16/18-го типу і вираженістю койлоцитозу у пухлинах (рис. 7).

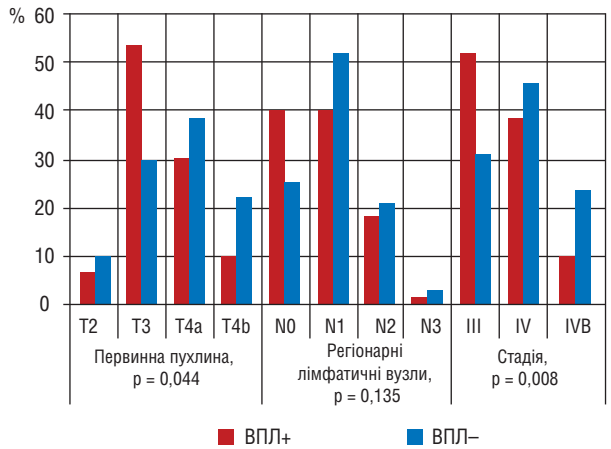

Рис. 3. Частота ВПЛ+ і ВПЛ– РРП та РРГ залежно від поширеності та стадії пухлинного процесу

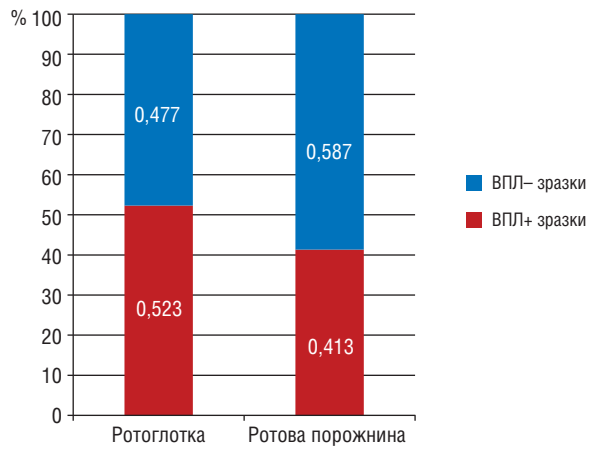

Рис. 4. Частота виявлення ВПЛ у пухлинах залежно від їх локалізації у ротовій порожнині або ротоглотці (p = 0,221)

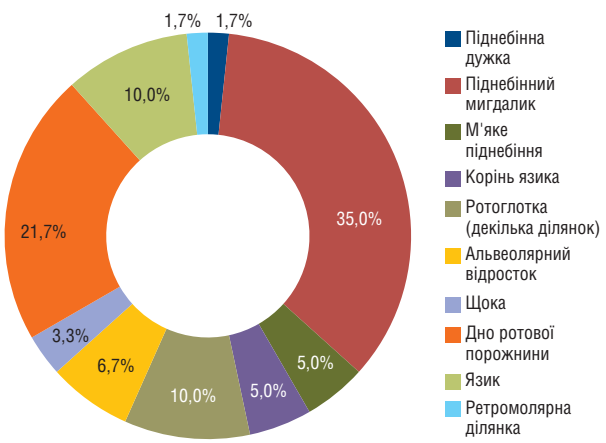

Рис. 5. Розподіл ВПЛ+ пухлин за локалізацією

Експресію p53 (рис. 8) визначено у 61,7% ВПЛ+ і у 52,9% ВПЛ– пухлин (рис. 9), різниця не була статистично значущою. Зважаючи на це, ми не розглядали експресію p53 в якості маркера ВПЛ. p53 дикого типу має короткий період напівжиття і тому, на відміну від продукту мутантного гена *TP53*, у нормальних тканинах за звичайних умов ІГХ методом не визначається. На стабільність й активність p53 впливають багато факторів, які можуть викликати його післятрансляційну модифікацію [29]. Внаслідок та-

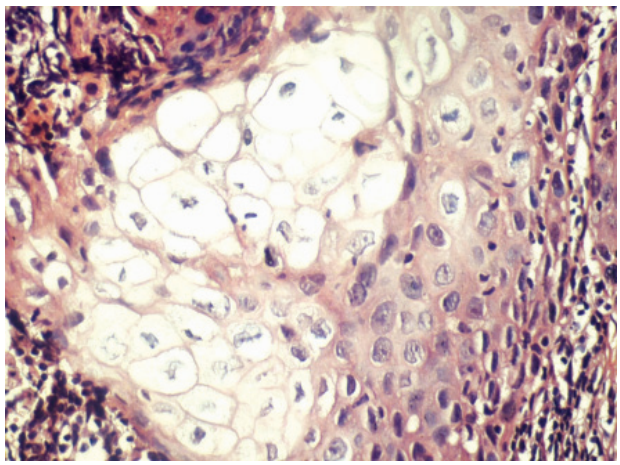

Рис. 6. Плоскоклітинний ВПЛ+ РРГ. Клітини з койлоцитарною атипією, зроговілі клітини. Забарвлення гематоксиліном, еозином (x400)

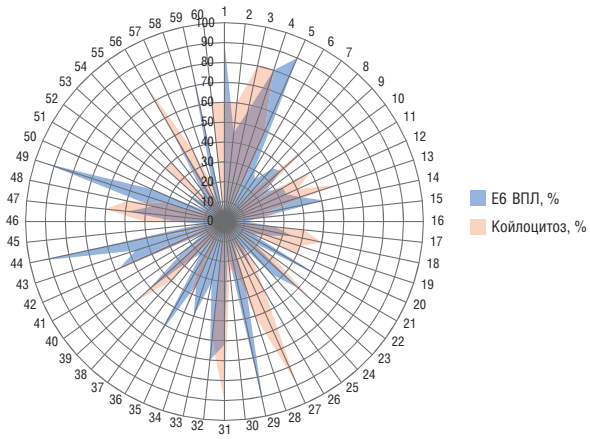

Рис. 7. Частота експресії E6 і койлоцитозу у ВПЛ+ пухлинах (ρ = 0,32; p = 0,013). Пронумеровані радіальні лінії сітки відповідають кількості спостережень

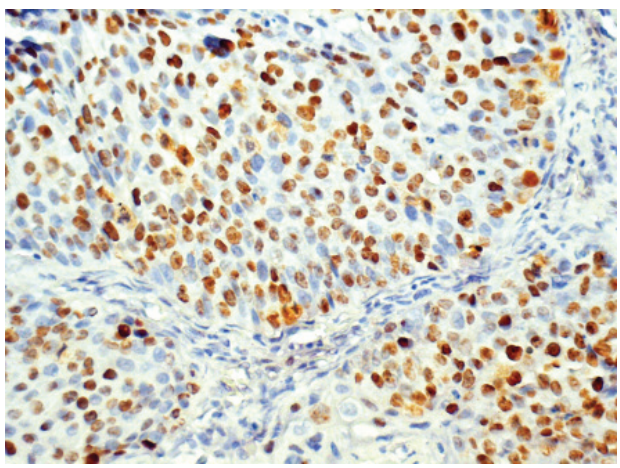

Рис. 8. Плоскоклітинний ВПЛ+ РРГ без зроговіння. Позитивна ІГХ реакція на p53 (x200)

ких модифікацій нормальний (дикого типу) білок p53 може накопичуватися і виявлятися за допомогою ІГХ реакції в ушкоджених клітинах (у тому числі інфікованих ВПЛ) [30, 31]. Застосовані нами МкАТ до p53 не дають можливості відрізнити дикий і мутантний типи p53. Зважаючи на вищевикладене, оцінити стан і роль p53 у РРП і РРГ в рамках цього дослідження не-

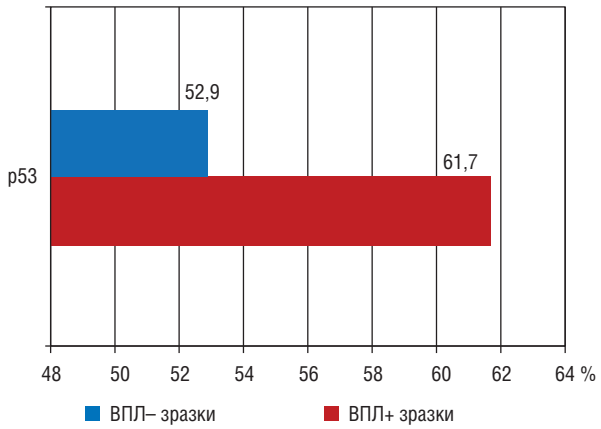

Рис. 9. Частота експресії p53 у ВПЛ– і ВПЛ+ пухлинах (p = 0,373)

можливо. Однак можна констатувати наявність позитивної кореляції між експресією p53 і поширеністю первинної пухлини (категорія T; ρ = 0,25; p = 0,038), метастатичним ураженням регіонарних лімфатичних вузлів (категорія N; ρ = 0,42; p < 0,001) і стадією захворювання (ρ = 0,37; p = 0,002) у групі пацієнтів з ВПЛ– пухлинами. Подібних зв'язків у групі з ВПЛ+ пухлинами не виявлено.

Базуючись на аналізі отриманих даних, нами розроблено алгоритм виявлення ВПЛ у тканині РРП і РРГ (рис. 10). Перший крок — це визначення ДНК ВПЛ 16/18-го типу у цитологічному матеріалі та визначення койлоцитозу під час рутинного патогістологічного дослідження біоптатів або пухлин. Якщо результат позитивний (виявлено ДНК ВПЛ 16/18-го типу, наявність койлоцитозу), присутність вірусу доведено. Якщо результат негативний (ДНК ВПЛ не виявлено, койлоцитоз є або немає), проводять ІГХ аналіз для визначення E6 ВПЛ 16/18-го типу та p16 як сурогатного маркера ВПЛ. За наявності експресії E6 і $p16^{INK4a}$ пухлину вважають ВПЛ+. При негативному результаті визначення ДНК ВПЛ, E6 і $p16^{INK4a}$ пухлина може бути визнана ВПЛ–. Розроблений алгоритм може бути рекомендовано для діагностики ВПЛ+ або ВПЛ– форм РРП і РРГ з метою вибору подальшої тактики лікування таких хворих.

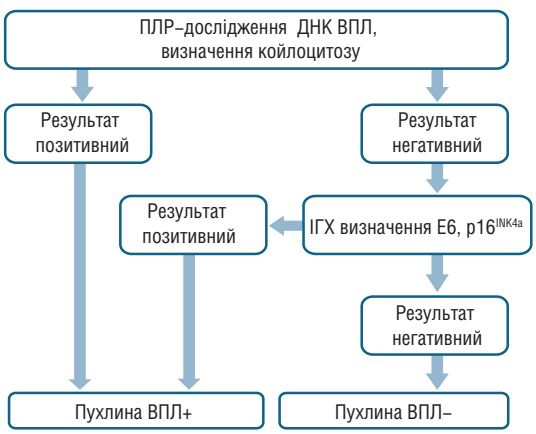

Рис 10. Алгоритм діагностики ВПЛ+ або ВПЛ– форм РРП та РРГ

ВИСНОВКИ

1. Плоскоклітинний РРП і РРГ у 46,9% випадків асоційований з ВПЛ 16/18-го типу, що підтверджується виявленням синхронної експресії вірусного білка E6 і білка $p16^{INK4a}$ — сурогатного маркера ВПЛ.

2. Койлоцитоз у плоскоклітинному РРП і РРГ може бути цитологічним маркером ВПЛ, чутливість і специфічність цього показника становлять 0,83 і 0,72 відповідно.

3. У хворих на ВПЛ– рак встановлено кореляцію між експресією p53 і поширеністю первинної пухлини (категорія T; ρ = 0,25; p = 0,038), метастатичним ураженням регіонарних лімфатичних вузлів (категорія N; ρ = 0,42; p < 0,001) і стадією захворювання (ρ = 0,37; p = 0,002).

4. РРП або РРГ можна вважати позитивними на ВПЛ 16/18-го типу за умови ІГХ виявлення в одній і тій самій пухлині експресії E6 і $p16^{INK4a}$ або за умови виявлення ДНК ВПЛ 16/18-го типу у цитологічному матеріалі (браш-цитологія).

5. Негативний результат одного лише ПЛР-дослідження цитологічного матеріалу не може бути підставою для виключення ВПЛ-інфекції у пухлині.

6. Розроблений алгоритм може бути рекомендовано для діагностики ВПЛ+ і ВПЛ– форм РРП і РРГ з метою визначення тактики терапії та розробки нових підходів до лікування хворих з ВПЛ+ пухлинними процесами.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. **Warnakulasuriya S.** Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. Oral Oncol 2009; **45**: 309–16.

2. **Hauswald H, Simon C, Hecht S, *et al.*** Long-term outcome and patterns of failure in patients with advanced head and neck cancer. Rad Oncol 2011; **6**: 70–7.

3. Рак в Україні, 2010–2011. Захворюваність, смертність, показники діяльності онкологічної служби. Бюл нац канцер-реєстру України 2012; (**13**): 12, 22–25.

4. **Saman MD.** A review of the epidemiology of oral and pharyngeal carcinoma: update. Head Neck Oncol 2012; **4** (1): 1–7.

5. **Chaudhary AK, Singh M, Sundaram S, Mehrotra R.** Role of human papillomavirus and its detection in potentially malignant and malignant head and neck lesions: updated review. Head Neck Oncol 2009; **1** (1): 22–33.

6. **Chaturvedi AK, Engels EA, Anderson WF, Gillison ML.** Incidence trends for human papillomavirus-related and -unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States. J Clin Oncol 2008; **26**: 612–9.

7. **Schache AG, Liloglou T, Risk JM, *et al.*** Evaluation of human papilloma virus diagnostic testing in oropharyngeal squamous cell carcinoma: sensitivity, specificity and prognostic discrimination. Clin Cancer Res 2011; **17** (19): 6262–71.

8. **Marur S, D'Souza G, Westra W, Forastiere A.** HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. Lancet Oncol 2010; **11**: 781–9.

9. **Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S.** Human Papillomavirus Types in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas Worldwide: A Systematic Review. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2005; **14**: 467–75.

10. **Ragin CCR, Modugno F, Gollin SM.** The epidemiology and risk factors of Head and Neck Cancer: a focus on Human Papillomavirus. J Dent Res 2007; **86**: 104–14.

11. **Munger K, Baldwin A, Edwards K, *et al.*** Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. J Virol 2004; **78** (21): 11451–60.

12. **Remmerbach TW, Brinckmann UG, Hemprich A, *et al.*** PCR detection of human papillomavirus of the mucosa: comparison between MY09/11 and GP5+/6+ primer sets. J Clin Virol 2004; **30** (4): 302–8.

13. **Morshed K, Polz-Dacewicz M, Szymajski M, Polz D.** Short-fragment PCR assay for highly sensitive broad-spectrum detection of human papillomaviruses in laryngeal squamous cell carcinoma and normal mucosa: clinico-pathological evaluation. Eur Arch Otorhinolaryngol 2008; **265** (Suppl 1): S89–S96.

14. **Morris BJ.** Cervical human papillomavirus screening by PCR: advantages of targeting the E6/E7 region. Clin Chem Lab Med 2005; **43** (11): 1171–7.

15. **Pannone G, Santoro A, Papagerakis S, *et al.*** The role of human papillomavirus in the pathogenesis of head & neck squamous cell carcinoma: an overview. Infect Agents Cancer 2011; **6**: 4–14.

16. **Sherr CJ, Roberts JM.** CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. Genes Dev 1999; **13**: 1501–12.

17. **Peltonen JK, Helppi HM, Pääkkö P, *et al.*** p53 in head and neck cancer: Functional consequences and environmental implications of TP53 mutations. Head Neck Oncol 2010; **2**: 36–45.

18. **Penhallow J, Steingrimsdottir H, Elamin F, *et al.*** p53 alterations and HPV infections are common in oral SCC: p53 gene mutations correlate with the absence of HPV 16-E6 DNA. Int J Oncol 1998; **12** (1): 59–68.

19. **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**: 709–20.

20. **Seema Aggarwal DNB, Vinod K, Arora MD, *et al.*** Koilocytosis: Correlations with high-risk HPV and its comparison on tissue sections and cytology, urothelial carcinoma. Diagnostic Cytopathol 2009; **37** (3): 174–7.

21. **Al-Qahtani K, Brousseau V, Paczesny D, *et al.*** Koilocytosis in oral squamous cell carcinoma: what does it mean? J Otolaryngol 2007; **36** (1): 26–31.

22. **Rischin D, Young RJ, Fisher R, *et al.*** Prognostic significance of p16INK4A and human papillomavirus in patients with oropharyngeal cancer treated on TROG 02.02 phase III trial. J Clin Oncol 2010; **28** (27): 4142–8.

23. **Yao PF, Li GC, Li J, *et al.*** Evidence of human papilloma virus infection and its epidemiology in esophageal squamous cell carcinoma. World J Gastroenterol 2006; **12** (9): 1352–5.

24. **Koo Ch-L, Kok L-F, Lee M-Y.** Scoring mechanisms of p16INK4a immunohistochemistry based on either independent nucleic stain or mixed cytoplasmic with nucleic expression can significantly signal to distinguish between endocervical and endometrial adenocarcinomas in a tissue microarray study. J Translat Med 2009; **7**: 25.

25. **Kyzas PA, Loizou KT, Ioannidis JPA.** Selective Reporting Biases in Cancer Prognostic Factor Studies. J Natl Cancer Inst 2005; **97** (14): 1043–55.

26. **McDonald JW, Pilgram TK.** Nuclear expression of p53, p21 and cyclin D1 is increased in bronchioloalveolar carcinoma. Histopathol 1999; **34** (5): 439–46.

27. **Altman DG, Bland JM.** Statistics Notes: Diagnostic tests 1: sensitivity and specificity. Brit Med J 1994; **308**: 1552.

28. **Krawczyk E, Suprynowicz FA, Liu X, *et al.*** Koilocytosis. A Cooperative Interaction between the Human Papillomavirus E5 and E6 Oncoproteins. Amer J Pathol 2008; **173** (3): 682–8.

29. **Lavin MF, Gueven N, Melino G.** The complexity of p53 stabilization and activation. Cell Death Different 2006; **13:** 941–50.

30. **Gopalacrishnan R, Weghorst CM, Lehman TA, *et al.*** Mutated and wild-type p53 expression and HPV integration in proliferative verrucous leukoplakia and oral squamous cell carcinoma. Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol 1997; **83** (4): 471–7.

31. **Nordi QC.** Epitopes: p53 protein (http://www.nordiqc.org/Epitopes/p53/p53.htm) [accessed Jan 09, 2013].

DIAGNOSIS OF THE MOUTH AND OROPHARYNX CANCER ASSOCIATED WITH HUMAN PAPILLOMA VIRUS

A.M. Ryaboshapka, A.A. Kovalev, N.M. Voloshina

Summary. ***Objective:*** *to determine the characteristics of human papillomavirus (HPV) 16/18 types of the oral cavity and oropharynx carcinomas and develop an algorithm for diagnosis of HPV-positive (HPV+) and HPV-negative (HPV-) tumors.* ***Object and Methods:*** *128 tumor biopsies of patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx were investigated. Polymerase chain reaction (determination of DNA HPV 16/18 types), immunohistochemical (determination E6 protein of HPV 16/18 types, of proteins $p16^{INK4a}$ and p53) and histologic examination (determination of koilocytosis) were used.* ***Results:*** *HPV DNA 16/18 types was found in 8 (6,3%), koilocytosis — in 69 (53,9%), while the expression of $p16^{INK4a}$ and HPV E6 16/18 — 60 (46,9%), the expression of p53 — in 73 (57,0%) patients. It was shown that the simultaneous expression of proteins E6 and p16 is a sign of the presence of HPV in the tumor. Sensitivity and specificity determination of koilocytosis as a marker of HPV is respectively 0,83 and 0,72. An algorithm for detecting HPV in carcinoma of the oral cavity and oropharynx was investigated.* ***Conclusions:*** *squamous carcinoma of the oral cavity and oropharynx in 46,9% of cases are associated with HPV 16/18 types. The algorithm can be recommended for the diagnosis of HPV + and HPV– oropharyngeal forms of malignant tumors.*

Key words: squamous-cell carcinoma, oral cavity, oropharynx, human papilloma virus 16/18 types, E6, $p16^{INK4a}$, p53, koilocytosis, PCR, immunohistochemical method.

Адреса для листування:
Рябошапка А.М.
69040, Запоріжжя, вул. Культурна, 177А
ДЗ «Запорізька медична академія післядипломної освіти МОЗ України»
E-mail: lik_ar@ukr.net

Получено: 30.01.2013