

О.В. Пославська
І.С. Шпонька

ДЗ «Дніпропетровська
медична академія МОЗ
України»




Надійшла: 18.08.2019

Прийнята: 12.09.2019

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2019.3.99-106>

УДК: 616-006.04-076-097.3-079.4

ОСОБЛИВОСТІ ЕКСПРЕСІЇ ПРОГНОСТИЧНИХ МАРКЕРІВ P16^{INK4a}/HER2/NEU ТА ЗМІНИ ВІДПОВІДНИХ ГЕНІВ В ОКРЕМИХ ФЕНОТИПАХ РАКІВ НЕВІДОМОГО ПЕРВИННОГО ПОХОДЖЕННЯ

Poslavska O.V.  , Shponka I.S.  Features of the expression of prognostic markers p16, Her2 / new and changes in the corresponding genes in individual phenotypes of cancers of unknown primary origin.

SI «Dnipropetrovsk Medical Academy of the Ministry of Health of Ukraine», Dnipro, Ukraine

ABSTRACT. Background. Approximately 2/3 of cancers of unknown primary origin (CUP) are adenocarcinomas with mucin production, the formation of gland-like structures and immunohistochemistry results that can determine the histological subtype, but cannot determine the exact primary place of origin. The remaining 1/3 of CUP is a mixture of non-adenocarcinomas, including squamous cell carcinomas, neuroendocrine carcinomas, small-cell and large-cell undifferentiated carcinomas. **Objective.** In such cases, molecular profile identification and gene sequencing may be a promising approach to the classification and direct treatment of CUP. **Methods.** A retrospective analysis of biopsy or postoperative material of 61 patients (34 women and 27 men) aged 26 to 74 years (mean 53.4 ± 11.42 ; median 52) with an initial diagnosis of CUP was performed. Immunohistochemical studies were carried out according to the protocols of ThermoScientific (USA) with antibodies to p16^{INK4a} and HER2/neu. Fluorescence in situ hybridization was performed according to the protocol of ZytoVision GmbH (Germany). Changes in the ERBB2 and CDKN2A genes were evaluated for gene amplification and deletion of the 9p21 locus, respectively, with double-labeled DNA probes. **Results.** Of the 61 studied cases of CUP, p16 expression was positive in 31 cases (51%), the basis for which was 9 homozygous and 19 heterozygous 9p21 deletions, which were found in all but one of the studied CUP phenotypes. HER2 / neu expression was positive (2 + / 3 +) in 15 of 61 (25%) CUP, but only in 9 of them had actual amplification of the ERBB2 gene on FISH in 5 phenotypes. **Conclusion.** The reduced number of phenotypes with amplification of the ERBB2 gene makes it more specific for the differential diagnosis of CUP, compared with the deletion of 9p21 (p16 / CDKN2A), which is likely to be universal in acquiring an aggressive course of carcinomas of various localizations.


Key words: CUP, p16, 9p21 deletion, amplification of HER2 / neu.


Citation:

Poslavska OV, Shponka IS. [Features of the expression of prognostic markers p16, Her2 / new and changes in the corresponding genes in individual phenotypes of cancers of unknown primary origin]. Morphologia. 2019;13(3):99-106. Ukrainian.

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2019.3.99-106>

 Shponka I.S. 0000-0002-7561-6489

 Poslavska O.V. 0000-0002-3133-8413

 alexandra.poslavskaya@gmail.com

© SI «Dnipropetrovsk Medical Academy of the Ministry of Health of Ukraine», «Morphologia»

Вступ

Рак невідомого первинного походження (РНПП) трактується як метастатичне злоякісне утворення, в разі невизначеності первинної пухлини доступними діагностичними засобами (ендоскопія, колоноскопія і т.д.). Приблизно 2/3 РНПП - це аденокарциноми (АК) невідомого первинного походження з продукуванням муцину, утворенням залозисто-подібних структур та результатами імуногістохімії (ІГХ), які можуть визначити гістологічний підтип АК, але не мо-

жуть визначити точне первинне місце походження. Решта 1/3 РНПП являє собою суміш неаденокарцином, включаючи плоскоклітинні, нейроендокринні, дрібноклітинні та великоклітинні недиференційовані карциноми. В таких випадках терапія, на жаль, демонструє низьку ефективність, і ідентифікація молекулярного профілю та секвенування генів може бути перспективним підходом до класифікації та прямої терапії РНПП. Найбільш вагомими для впливу описують гени CDKN2A, ARF, KRAS та ERBB2

[1].

Коротке плече 9 хромосоми часто пошкоджується при багатьох видах ракових новоутворень. У локусі INK4A / ARF (9p21) клонувано і занесено в мапу два гени: ген p16 / INK4A / CDKN2A / MTS1 і ген p19 / ARF. p16, як інгібітор циклін-залежних кіназ, точкові мутації якого були визначені в разі сімейної меланоми, а також показані гомозиготні делеції в інших пухлинних клітинах (рак підшлункової залози, шийки матки, легенів, гліоми, Т- і В-клітинному лейкозі), є геном-супресором пухлинного росту і відноситься до групи "зберігачів клітинного цик-

лу". В цьому ж локусі був ідентифікований і другий транскрипт - p19 / ARF (ARF – alternative reading frame - альтернативна рамка зчитування). Цей ген кодує регулятор клітинного циклу, що запобігає деградації білку p53 (рис. 1). Ці два транскрипта кодуються різними першими екзонами (1 екзон гена p19 лежить в ділянці 13kb центромерного 1-го екзона p16), але однаковими 2 і 3 екзонами. Однак білки p16 / INK4A і p19 / ARF мають різні рамки зчитування в екзоні 2 і, тому, між ними немає ніякої амінокислотної подібності [2].

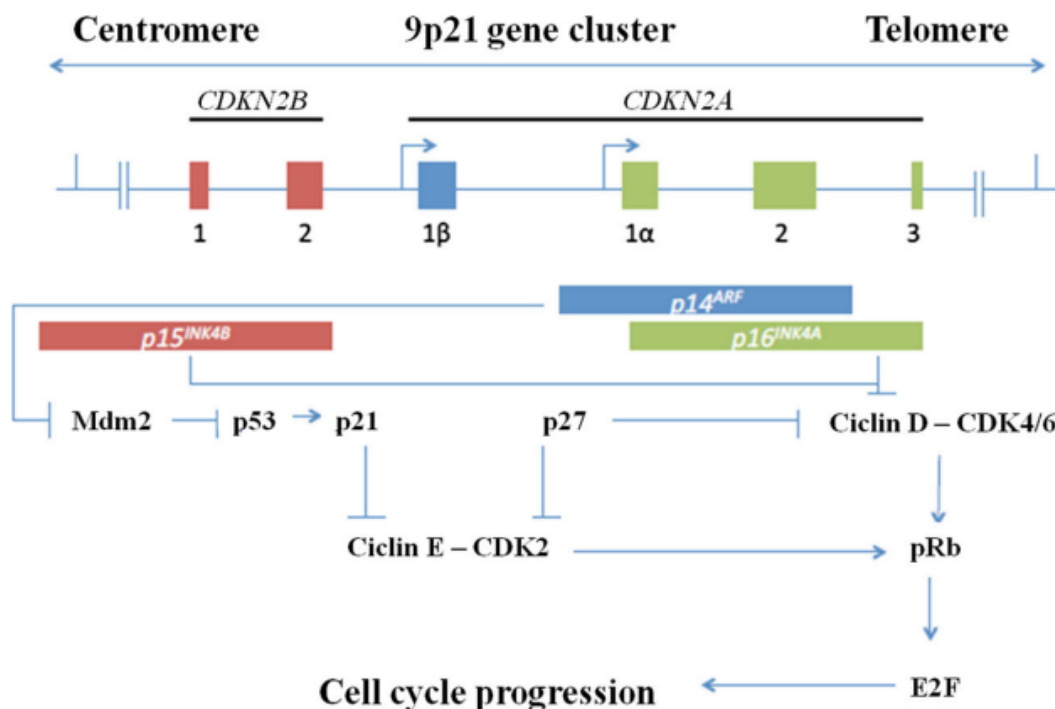


Рис.1. Геномна організація CDKN2A та CDKN2B генів на 9p21.

В дослідженнях останніх років демонструється, що ген p16 відіграє важливу роль в процесі канцерогенезу. На молекулярному рівні дія p16 пов'язана з біохімічним шляхом Rb/cyclin D / cdk4 / p16INK4a. p16 зв'язується з кіназами cdk4/6, і цей комплекс порушує взаємодію киназциклонів D, подальше інгібування кіназ призводить до гіпофосфорілювання протеїну pRB, що зменшує експресію E2F-залежних генів, блокується перехід клітини з фази G1 у фазу S. Таким чином, зниження експресії p16 призводить до гіперфосфорілювання pRB. В такому стані цей білок не може залишатися пов'язаним з фактором транскрипції E2F. Тому комплекс RB-E2F дисоціює і вільний фактор E2F активує транскрипцію генів, специфічних для S фази (починається проліферація) [2-3].

ERBB2 (англ. Erb-b2 receptor tyrosine kinase 2) – білок, який кодується однойменним геном,

розташованим у людей на короткому плечі 17-ї хромосоми. ERBB2 скорочено походить від еритробластичного онкогену B, гена, виділеного з геному птахів. Його також часто називають HER2 (від рецептора 2 епідермального фактора росту людини) або HER2/neu. Посилення або надмірна експресія HER2 є ціллю терапії приблизно для 30% хворих на рак молочної залози. Аналізи на основі гістологічних зрізів, такі як ІГХ та FISH, які оцінюють надмірну експресію цього білка та ампліфікацію гена, відповідно, є переважаючими методами, які використовуються для виявлення статусу ERBB2 (HER2) у РНПП [4-5].

Використання молекулярного профілювання та секвенування генів для пошуку можливих терапевтичних цілей активно розвивається останні десятиріччя. Але клінічні випробування для пацієнтів із РНПП викликають багато проблем, внаслідок складності діагностичного пошуку,

неоднорідності клінічних груп та попередніх діагнозів. Дослідження таких захворювань, як первинний рак молочної залози, недрібноклітинний рак легенів або колоректальна карцинома, свідчать про те, що використання цільової терапії, вибір якої базувався на інформації, отриманої в результаті секвенування генів, може значно покращити віддалені результати лікування [1,6-8].

Мета

Дослідити відповідність показників імуногістохімічного дослідження експресії прогностичних маркерів p16^{INK4A}, HER2/neu та можливих генетичних ушкоджень в відповідних генах CDKN2A та ERBB2 FISH методом окремих фенотипів карцином невідомої первинної локалізації.

Матеріали та методи

В роботі проведено ретроспективний аналіз біопсійного або післяопераційного матеріалу 61 пацієнта (34 жінки та 27 чоловіків) віком від 26 до 74 років (середнє 53,4±11,42; медіана 52) з первинним діагнозом РНПП та подальшим визначеним фенотипом за Vajdic SM, Goldstein D. [3] після ІГХ дослідження на базі морфологічного відділу лікувально-діагностичного центру ТОВ «Аптеки медичної академії» (м. Дніпро) за період 2015 – 2018 рр.

З 61 спостереження РНПП, включених до цього дослідження, 3 (4,9%) були герміногенні пухлини екстрагонадного розташування (2 семіноми/герміноми середостіння з фенотипом PLAP+ / CD117 + / OCT3/4 + / AFP - / CD30- / та 1 ембріональна карцинома заочеревинного простору PLAP +, - / CD117 - / Pan AE1,3 + / EMA + / CD30 +); 6(9,8%) папілярних канцероматоза черевної порожнини вірогідно з яєчника (5 серозних естроген-залежних АК CA125+ / CK7+ / CK20- / WT1+ / ER+ та 1 муциозна естроген-залежна АК CA125+ / CK7+ / CK20 + / WT-1 - / ER+); 5 (8,2%) метастазів аксиллярних лімфатичних вузлів жінок (3 люмінального типу А з ER + / PGR + / Her-2-new + та 2 люмінального типу В з ER+ / PGR+ / Her-2-new-); 12 (19,7%) метастазів плоскоклітинних карцином (ПК) в лімфатичні вузли ший (CkPan AE1/AE3 + / Vimentin - / Ck HMW + / p63 + / Ck 7 - / Ck 20 - / TTF1 -); 9 (14,7%) пахових метастазів ПК (CkPan AE1/AE3 + / Vimentin - / Ck HMW + / p63 + / Ck 7 - / Ck 20 -); 10 (16,4%) низькодиференційованих нейроендокринних карцином без органоспецифічних ознак (CkPan AE1/AE3 + / Chromogranin A +/- і/або Synaptophysin +/-, для однорідності групи всі відібрані спостереження були із печінки); 4 (6,5%) метастаза в кістки у чоловіків (Ck 8 + / PSA + / AMACR (p504s) + / AR +/-), 9 (14,7%) метастазів з колоректальним фенотипом (Ck 7 - / Ck 20 + / CDX2 +); та 3 (4,9%) карциноми з клітин Меркеля (Ck 7 - / Ck 20 + / CDX2 +). Та-

ким чином серед гістологічних форм РНПП найчисельнішою виявилась група аденокарцином 26 (42,6%). Розподіл характеристик матеріалу дослідження занесений в таблицю 1.

Імуногістохімічне дослідження проводилось згідно протоколів компанії ThermoScientific (TS), (США). У зрізах завтовшки 4 мкм використовували систему візуалізації LabVisionQuanto (TS, США) з виявленням білкового ланцюга за допомогою DAB QuantoChromogen (TS, США). Титр первинних антитіл був підібраний для кожного маркера: p16^{INK4A} (клон DCS 240, 1:50, ThermoScientific, США), HER2/neu (клон Ab-1, 1:100, ThermoScientific, США).

Флуоресцентну in situ гібридизацію (FISH) виконували за протоколом виробника ZytoVisionGmbH (Німеччина) на базі морфологічно лабораторії ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України». В дослідженні використовували локус-специфічні зонди, які зв'язувались лише з частинами послідовностей нуклеїнових кислот із високим ступенем комплементарності. Зміни в гені ERBB2 оцінювались на предмет ампліфікації гену ДНК-зондом з подвійною міткою для гену та відповідної хромосоми (зонд ZytoDot 2C SPEC ERBB2/CEN 17, ZytoVisionGmbH, Німеччина), ген CDKN2A аналізувався на предмет делеції локусу 9p21 ДНК-зондом з подвійною міткою для гену та відповідної хромосоми (зонд ZytoDot 2C SPEC CDKN2A/CEN 9, ZytoVisionGmbH, Німеччина). Візуалізацію та кількісну оцінку проводили під флуоресцентним мікроскопом Axio ImagerA2 (CarlZeiss, Німеччина). Брало до уваги тільки окремі і добре окреслені клітини. Перемішані між собою клітини були виключені з аналізу. Кожну пухлину оцінювали за середнім та максимальним значенням кількості копій гену p16 та за середнім співвідношенням p16 гену до хромосоми 9 (CEN 9). Гомозиготний тип було визначено, якщо принаймні обидва сигнали 9p21 були втрачені.

Статистичний аналіз даних проводили в Microsoft Excel з розрахунком мінімального, максимального, медіани, середнього арифметичного та стандартного відхилення. Статистичну значущість відмінності результатів у групах було перевірено за допомогою тесту Фішера в програмі R version 3.4.1 (2017-06-30) -- "SingleCandle" Copyright (C) 2017; The R Foundation for Statistical Computing Platform: x86_64-w64-mingw32/x64 (64-bit). Значення p<0,05 було прийнято статистично значущим.

Результати та їх обговорення

Низькодиференційована карцинома з розподілом по середній лінії тіла (екстрагональний зародково-клітинний синдром) (n=3, 4,9%).

Екстрагональний зародково-клітинний синдром (позастатева неоплазія статевих клітин), характеризується триплоїдизацією та

асоціюється з характерною серією аномалій шляху ретинобластоми, включаючи регуляцію цикліну D, p27 та зниження активності інгібіторів циклінозалежних киназ p16, p18, p19 та p21. Деякі з них, а саме CDKN2A, CDKN2C та CDKN2D, часто зовсім інактивуються [9]. При

проведенні ІГХ з маркером p16 в 2 зразках позаганадних семіном та 1 ембріональній карциномі отримали негативний результат. FISH дослідження також продемонструвало відсутність делецій 9p21.

Характеристика клініко-морфологічних даних пацієнтів

Таблиця 1

Характеристики	n=61 (100%)
Стать:	
чоловіки	34 (55,7%)
жінки	27 (44,3%)
Вік:	
середнє ± стандартне відхилення, медіана	53,4±11,42; 54
Локалізація пухлин:	
середостіння	2 (3,3%)
заочеревинний простір	1 (1,6%)
канцероматоз очеревини	8 (13,1%)
аксиллярні лімфатичні вузли	6 (9,8%)
лімфатичні вузли ший	12 (19,7%)
пахові лімфатичні вузли	11 (18,0%)
кістки	4 (6,5%)
печінка	13 (21,3%)
яєчники	4 (6,5%)
Фенотипи пухлин за Vajdic CM, Goldstein D., (2015) [3]:	
низькодиференційована карцинома з розподілом по середній лінії тіла (екстраганадний зародково-клітинний синдром)	3 (4,9%)
жінки з папілярною аденокарциномою черевної порожнини	6 (9,8%)
жінки з аденокарциномою, що уражує тільки пахові лімфатичні вузли	5 (8,2%)
плоскоклітинна карцинома, що вражає шийні лімфатичні вузли	12 (19,7%)
ізольована пахова аденопатія (плоскоклітинна карцинома)	9 (14,7%)
низькодиференційована нейроендокринна карцинома	10 (16,4%)
чоловіки з бластними метастазами кісток і підвищенням сировоткового PSA (аденокарциноми)	4 (6,5%)
аденокарцинома з профілем товстої кишки (CK20+, CK7-, CDX2+)	9 (14,7%)
аденопатія з клітин Меркеля невідомого походження	3 (4,9%)
Гістологічна форма	
семінома/гермінома	2 (3,3%)
ембріональна карцинома	1 (1,6%)
аденокарцинома (помірно-, низькодиференційована)	26 (42,6%)
плоскоклітинна карцинома	19 (31,1%)
нейроендокринна карцинома (низькодиференційована)	10 (16,4%)
карцинома з клітин Меркеля	3 (4,9%)

HER-2 / neu є an рецептор епідермального фактора росту, який надмірно виражений на поверхні клітин приблизно 25-30% раку молочної залози. Потенційна роль HER-2/neu в пухлинах зародкових клітин вивчена недостатньо. Підвищена експресія HER-2/neu найчастіше результат ампліфікації онкогену HER-2/neu; надмірна експресія білка за відсутності ампліфікації генів рідкісна. Таким чином, HER-2 / neu виявляється корисною терапевтичною мішенню. За рекомендаціями Soule S. із співавторів. (2002) мембранне ІГХ фарбування ми оцінювали за шкалою підрахунку HER-2 / neu, від 0 до 3+,

розробленою для молочної залози [10]. Підвищеною експресією вважали 2+ або 3+ результат. Тільки в одному випадку первинної семіноми середостіння ІГХ продемонструвало HER-2/neu (2+) статус та FISH дослідження підтвердило наявність ампліфікації гену ERBB2.

Жінки з папілярною аденокарциномою черевної порожнини (n=6, 9,8%).

Оцінюючи види канцероматозу за фенотипом і ІГХ реакцією на p16, в дослідженні виявилось що серозні WT-1 + спостереження мали значно більш інтенсивне забарвлення та кількість p16 + клітин, порівняно із муцинозним

варіантом, що був негативним на p16. 4 з 5 (80%) «high-grade» серозних АК мали градацію в діапазоні 6+ – 12+. Критерії ІГХ оцінювались за рекомендаціями Phillips V. та співавт. (2009): по розподілу імунореактивності (0-5) і по інтенсивності (0-3), таким чином був розрахований імуногістохімічний бал (0-15) шляхом множення балів розподілу та інтенсивності [11]. Але FISH аналіз виявив тільки гетерозиготні делеції 9p21 у 3 з 6 досліджених канцероматозів (50%), всі вони були представлені серозними «high-grade» фенотипами ($p < 0,01$). Роботи з подібними даними рекомендують використовувати цей факт для метастатичних процесів черевної порожнини з яєчників в якості диференційної діагностики із злоякісною мезотеліомою, де гомозиготна делеція 9p21 зустрічається набагато частіше [12].

Спостережувані показники надмірної експресії / посилення HER2 в карциномах яєчників показують значну різницю між дослідженнями, коливаючись від 8% до 66%, але ефективність лікування таргетним до HER2 препаратом в поєднанні з хімотерапією не перевірена [13]. Аналіз ІГХ дослідження проводили за стандартною схемою [10], отримали 2 з 6 (33%) позитивних HER2 2+/3+ спостереження, що FISH також визначило ампліфікацію гену ERBB2.

Жінки з аденокарциномою, що уражує тільки пахові лімфатичні вузли (n=5, 8,2%).

За результатом внутрішнього контролю та літературними даними базовий рівень ІГХ експресії p16 в нормальних тканинах молочної залози негативний або низької інтенсивності і охоплює <5% клітин. В клітинах 2 метастатичних карцином (40%) експресія p16 набувала помірного значення (+2), і в 1 спостереженні (20%) слабкого (+1). Критерії ІГХ оцінювались за рекомендаціями Patrick Lebok та співавт. (2016): (0) - відсутність фарбування; (1+) слабе фарбування у $\leq 70\%$ клітин або помірне фарбування у $\leq 30\%$; (2+) помірне фарбування у $> 70\%$ клітин або сильне фарбування у $> 30\%$; (3+) сильне фарбування у $> 70\%$ клітин [14]. Репрезентативні ділянки карцином були проаналізовані FISH: гомозиготна делеція 9p21 у 1 спостереженні (20%) та гетерозиготна у 2 метастазах (40%), треба відзначити, що всі виявлені випадки мали (2+ або 3+) за HER2/ neu статусом (тісний зв'язок $p < 0,01$).

Аналізи ІГХ та FISH, які оцінюють надмірну експресію HER2 та ампліфікацію гена є золотим стандартом дослідження раку молочної залози. Метастатичні фенотипи, що відповідали люмінальному типу А (HER2+) та В (HER2-) (3:2), мали ампліфікацію за FISH у випадках наявності строгої ІГХ експресії (всі спостереження люмінального типу А).

Плоскоклітинна карцинома, що вражає шийні лімфатичні вузли (n=12, 19,7%).

Повідомлення про порушення CDKN2A (p16) є частим явищем в плоскоклітинних карциномах голови та шиї, що автори пов'язують з несприятливим прогнозом. ІГХ p16 аналіз метастатичних плоскоклітинних карцином продемонстрував значні відмінності в гендерному співвідношенні: 4 з 5 (80%) метастазів у жінок мали + або +/- за експресією p16, на відміну від них 7 чоловічих випадків поділились 2:5 (p16+ (29%) до p16- (71%)), що в літературних джерелах пов'язують з особливостями канцерогенного впливу вірусу папіломи людини. Позитивність на p16+ (або надекспресія) нами визначалась як помірне або сильне забарвлення у $> 70\%$ пухлинних клітин, за рекомендаціями Lim AM та співавт. (2016) [15]. FISH дослідження виявило гомозиготну делецію 9p21 у 4 метастазах (33%) (3 жінки та 1 чоловік) та гетерозиготну у 2 спостереженнях (17%) (1 жінка і 1 чоловік).

Ампліфікацію гену ERBB2 описують як спорадичні випадки серед плоскоклітинних карцином різних локалізацій голови та шиї, пов'язуючи його із судинною інвазією та метастазуванням в регіонарні лімфатичні вузли. Але аналіз ІГХ реакцій з маркером HER2/ neu лише в 1 спостереженні мав рівень 2+, і не мав ампліфікацію гену ERBB2 на FISH дослідженні.

Ізольована пахова аденопатія (плоскоклітинна карцинома) (n=9, 14,7%).

Ушкодження пахових лімфатичних вузлів у жінок плоскоклітинною карциномою вірогідно пов'язано із дисемінацією раку шийки матки, що як і в випадку карциноми ротоглотки має прямий зв'язок із ВПЛ. 5 з 9 (55%) досліджуваних метастазів плоскоклітинних карцином визначились у жінок і мали p16+ ІГХ статус, чоловічі метастази p16- ІГХ статус. FISH дослідження виявило гомозиготну делецію 9p21 у 2 метастазах (22%) (жінки) та гетерозиготну у 2 спостереженнях (22%) (жінки) плоскоклітинних карцином.

Аналіз ІГХ реакцій з маркером HER2/ neu лише в 2 спостереженнях показав рівень до 2+, але після FISH дослідження вони не підтвердили ампліфікацію гену ERBB2.

Низькодиференційована нейроендокринна карцинома (n=10, 16,4%).

Всі випадки нейроендокринних карцином були представлені метастазами печінки і мали вкрай низький ступінь диференціювання. ІГХ дослідження p16 показало частково + експресію тільки в 2 (20%) випадках жіночих спостережень, що до того ж мали слабку експресію естрогенових рецепторів і вірогідно мали первинне походження з молочної залози. Саме в цих випадках FISH дослідження виявило гетерозиготну делецію 9p21 (20%).

Аналіз ІГХ реакцій з маркером HER2/ neu в 2 (20%) спостереженнях показав рівень до 2+/3+, останнє мало ампліфікацію гену ERBB2 на FISH.

Чоловіки з бластними метастазами кісток і підвищенням сироваткового PSA (аденокарциноми) (n=4, 6,5%).

У дослідженнях раку передміхурової залози людини виявлено відхилення експресії p16, в залежності від клінічної стадії, ступеня диференціювання та гормонального статусу [1]. Проаналізувавши випадки метастазів АК кісток у чоловіків в 2(50%) з них ми знайшли позитивний статус за p16 хоча б частково. Позитивною вважали інтрануклеарну та цитоплазматичну реакції за Remo A. і співавт. (2016) [16]. Крім того яскравість забарвлення p16 була досить інтенсивною не дивлячись на деяке зниження рівня експресії діагностичного маркера AMACR (p504s). FISH аналіз виявив тільки гетерозиготну делецію 9p21 у 1 з 4 спостережень (25%).

Аналіз HER2/neu статусу ІГХ та FISH дослідженням в усіх випадках показав негативні результати.

Аденокарцинома з профілем товстої кишки (CK20+,CK7-,CDX2+) (n=9, 14,7%).

Позитивний статус за p16 був притаманний більшості зразків метастазів колоректального фенотипу, але різної інтенсивності: 5 (2+), 2 (1+). Шкала від 0 до 3 балів рекомендована Al-Ahwal M. із співавт. (2016): (3+) - ІГХ реакція > 40% клітин, (2+) 10–40% клітин, (1+) в <10% [17]. Дослідження колоректальних карцином FISH виявило гомозиготну делецію 9p21 у 2 метастазах печінки (22%) та гетерозиготну у 4 інших спостереженнях (2 яєчника та 2 канцероматозу очеревини) (44%).

За даними літератури, зареєстровані показники надмірної експресії білка HER2/neu навіть в первинних колоректальних карциномах коливалися в межах від 3% до 47,4% [18], що свідчить про те, що клінічна значимість HER2/neu для метастатичних форм тим більше повністю не з'ясована. Аналіз ІГХ реакцій з маркером HER2/neu в 4 метастазах (44%) показав рівень до 2+/3+. Але тільки 2 з них мали ампліфікацію гену ERBB2 на FISH.

Аденопатія з клітин Меркеля невідомого походження (n=3, 4,9%).

Поліомавірус карциноми з клітини Меркель (MCV), нещодавно виявленій онкогенний вірус людини, зустрічається в більшості карцином з клітин Меркеля. Великий Т-антиген цього вірусу зв'язується з Rb, і функціонально аналогічний білку E7 вірусу папіломи людини (HPV) високого онкогенного ризику. Добре зафіксовано, що інактивація Rb призводить до надекспресії p16 [19].

В нашому дослідженні ІГХ реакції з p16 виявились строго позитивними (ядерно-цитоплазматичне забарвлення) в зразках карцином з клітин Меркеля. Це свідчить про спорідненість онкогенних шляхів MCV та HPV.

Крім того, позитивність p16 може бути корисним діагностичним інструментом при диференціації карциноми з клітин Меркеля від інших блакитно-мілко-кругло-клітинних анапластичних пухлин, до групи яких вони відносяться. FISH продемонструвало наявність гетерозиготної делеції 9p21 у 2 досліджених метастатичних ушкодженнях.

Аналіз HER2/neu статусу ІГХ та FISH дослідженням в усіх випадках показав негативні результати.

Висновки

Карциноми невідомого первинного походження складають дуже неоднорідну за гістологічними, імуногістохімічними та молекулярно-генетичними характеристиками групу, тому оцінка первинного анатомічного місця походження повинна включати інвазивні дослідження з біопсією та аналізами на основі гістологічних зрізів, такими як ІГХ та FISH.

З 61 дослідженого випадку РНПП, експресія p16 виявилась позитивною в 31 спостереженні (51%), підґрунтям для чого стали 9 гомозиготних та 19 гетерозиготних делецій 9p21, що зустрічались у всіх досліджених фенотипах РНПП, окрім низькодиференційована карцинома з розподілом по середній лінії тіла (екстрагональний зародково-клітинний синдром).

Експресія HER2/neu виявилась позитивною (2+/3+) в 15 з 61 (25%) РНПП, але тільки в 9 з них мала дійсну ампліфікацію гену ERBB2 на FISH в фенотипах низькодиференційовані карциноми з розподілом по середній лінії тіла; жінки з папілярною аденокарциномою черевної порожнини; жінки з аденокарциномою, що уражує тільки пахвові лімфатичні вузли; низькодиференційовані нейроендокринна карцинома (але які мали вірогідне походження з молочної залози) та аденокарциноми з профілем товстої кишки.

Зменшений спектр фенотипів виявлення ампліфікації гену ERBB2 на FISH робить його більш специфічним для диференційної діагностики РНПП, порівняно із делецією 9p21 (p16/CDKN2A), що вірогідно носить універсальний характер набуття інвазивного та агресивного перебігу карцином різних локалізацій.

Перспективи подальших розробок

Визначення морфологічних та клінічних відповідностей змін молекулярного профілю генів KRAS, BRAS є перспективним напрямком подальшого дослідження різних фенотипів раків невідомої первинної локалізації.

Інформація про конфлікт інтересів

Потенційних або явних конфліктів інтересів, що пов'язані з цим рукописом, на момент публікації не існує та не передбачається.

Джерела фінансування

Дослідження проведено в рамках науково-дослідної теми «Морфологічні та молекулярно-

Літературні джерела References

- 1 Ross JS, Wang K, Gay L, Otto GA, White E, Iwanik K, Palmer G, Yelensky R, Lipson DM, Chmielecki J, Erlich R, Rankin AN, Ali SM, Elvin JA, Morosini D, Miller VA, Stephens PJ. Comprehensive Genomic Profiling of Carcinoma of Unknown Primary Site New Routes to Targeted Therapies. *JAMA Oncol.* 2015;1(1):40-49.
- 2 Smeds J, Berggren P, Ma X, Xu Z, Hemminki K, Kumar R. Genetic status of cell cycle regulators in squamous cell carcinoma of the oesophagus: The CDKN2A (p16INK4a and p14ARF) and p53 genes are major targets for inactivation. *Carcinogenesis.* 2002;23(4):645-655.
- 3 Vajdic CM, Goldstein D. Cancer of unknown primary site. *Aust Fam Physician.* 2015; 44(9):640-643.
- 4 Okani U, Dreadin-Pulliam J, Shams Z, Adams M, Mancuso P. Breast Cancer as Isolated Axillary Lymphadenopathy. *The Internet Journal of Advanced Nursing Practice.* 2012;11(2):1-11.
- 5 Tomuleasa C, Zaharie F, Muresan M-S, Pop L, Fekete Z, Dima D, Frinc I, Trifa A, Berce C, Jurj A, Berindan-Neagoe I, Zdrenghia M, Ciuleanu T-E. How to Diagnose and Treat a Cancer of Unknown Primary Site. *J Gastrointestin Liver Dis.* 2017;26(1):69-79.
- 6 Beganoyic S. Clinical significance of the KRAS mutation. *Bosn J Basic Med Sci.* 2009;9(1): S17-S20.
- 7 Lin F, Haiyan Liu. Immunohistochemistry in Undifferentiated Neoplasm / Tumor of Uncertain Origin. *Arch Pathol Lab Med.* 2014;138:1583-1610.
- 8 Zaun G, Schuler M, Herrmann K, Tannapfel A: CUP syndrome – metastatic malignancy with unknown primary tumor. *Dtsch Arztebl Int.* 2018;115:157-162.
- 9 Finn Edlervon Eyben. Chromosomes, genes, and development of testicular germ cell tumors. *Cancer Genetic sand Cytogenetics.* 2004;151(2):93-138.
- 10 Soule S, Baldrige L, Kirkpatrick K, Cheng L, Gilbert JL, Smith LR, Thurston VC, Vance GH, Einhorn L, Miller K. HER-2/neu expression in germ cell tumours. *J Clin Pathol.* 2002;55:656-658.
- 11 Phillips V, Kelly P, McCluggage WG. Increased p16 expression in high-grade serous and undifferentiated carcinoma compared with other morphologic types of ovarian carcinoma. *Int J Gynecol Pathol.* 2009;28(2):179-186.
- 12 Ito T, Hamasaki M, Matsumoto S, Hiroshima K, Tsujimura T, Kawai T, Shima Y, Marutsuka K, Moriguchi S, Maruyama R, Miyamoto S, Nabeshima K. p16/CDKN2A FISH in Differentiation of Diffuse Malignant Peritoneal Mesothelioma From Mesothelial Hyperplasia and Epithelial Ovarian Cancer. *Am J Clin Pathol.* 2015;143:830-838.
- 13 Tuefferd M, Couturier J, Penault-Llorca F, Vincent-Salomon A, Broët P, Guastalla J-P, Allouache D, Combe M, Weber B, Pujade-Lauraine E, Camilleri-Broët S. HER2 Status in Ovarian Carcinomas: A Multicenter GINECO Study of 320 Patients. *PLoS One.* 2007;2(11):e1138.
- 14 Lebok P, Roming M, Kluth M, Koop C, Özden C, Taskin B, Hussein K, Lebeau A, Witzel I, Wölber L, Geist S, Paluchowski P, Wilke C, Heilenkötter U, Müller V, Schmalfeldt B, Simon R, Sauter G, Terracciano L, Krech RH, von der Assen A, Burandt E. p16 overexpression and 9p21 deletion are linked to unfavorable tumor phenotype in breast cancer. *Oncotarget.* 2016; 7(49):81322-81331.
- 15 Lim AM, Do H, Young RJ, Wong SQ, Angel C, Collins M, Takano EA, Corry J, Wiesenfeld D, Kleid S, Sigston E, Lyons B, Fox SB, Rischin D, Dobrovic A, Solomon B. Differential mechanisms of CDKN2A (p16) alteration in oral tongue squamous cell carcinomas and correlation with patient outcome. *Int. J. Cancer.* 2014;135:887-895.
- 16 Remo A, Pancione M, Zanella C, Manfrin E. p16 Expression in Prostate Cancer and Nonmalignant Lesions: Novel Findings and Review of the Literature. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2016;24(3):201-206.
- 17 Al-Ahwal M, Gomaa W, Emam E, Qari Y, Buhmeida A, Radwi S, Al-Maghrabi B, Al-Qahtani M, Al-Maghrabi J. p16 protein is upregulated in a step wise fashion in colorectal adenoma and colorectal carcinoma. *Saudi J Gastroenterol.* 2016;22:435-40.
- 18 Xin-Yu Wang, Zhi-Xue Zheng, YuSun, Yan-Hua Bai, Yun-Fei Shi, Li-Xin Zhou, Yun-Feng Yao, Ai-Wen Wu, and Deng-Feng Cao. Significance of HER2 protein expression and HER2 gene amplification in colorectal adenocarcinomas. *World J Gastrointest Oncol.* 2019;11(4):335-347.
- 19 Veija T, Koljonen V, Bohling T, Kero M, Knuutila S, Sarhadi VK. Aberrant expression of ALK and EZH2 in Merkel cell carcinoma. *BMC Cancer volume.* 2017;17:236.

Пославська О.В., Шпонька І.С. Особливості експресії прогностичних маркерів p16^{her2/neu} та зміни відповідних генів в окремих фенотипах раків невідомого первинного походження.

РЕФЕРАТ. Актуальність. Приблизно 2/3 раків невідомого первинного походження (РНПП) є аденокарцинами з продукуванням муцину, утворенням залозисто-подібних структур та результатами імуногістохімії, які можуть визначити гістологічний підтип, але не можуть визначити точне первинне місце походження. Решта 1/3 РНПП являє собою суміш не-аденокарцином, включаючи плоскоклітинні, нейроендокринні, дрібноклітинні та великоклітинні недиференційовані карциноми. **Мета.** В таких випадках ідентифікація молекулярного профілю та секвенування генів може бути перспективним підходом до класифікації та прямої терапії РНПП. **Методи.** В роботі проведено ретроспективний аналіз біопсійного або післяопераційного матеріалу 61 пацієнта (34 жінки та 27 чоловіків) віком від 26 до 74 років (середнє 53,4±11,42; медіана 52) з первинним діагнозом РНПП. Імуногістохімічне дослідження проводилось згідно протоколів ThermoScientific (США) з антитілами до p16^{INK4A} та HER2/neu. Флуоресцентну *in situ* гібридизацію виконували за протоколом ZytoVisionGmbH (Німеччина). Зміни в генах ERBB2 та CDKN2A оцінювались на предмет ампліфікації гену та делеції локусу 9p21 відповідно ДНК-зондами з подвійною міткою. **Результати.** З 61 дослідженого випадку РНПП, експресія p16 виявилась позитивною в 31 спостереженні (51%), підґрунтям для чого стали 9 гомозиготних та 19 гетерозиготних делецій 9p21, що зустрічались у всіх досліджених фенотипах РНПП, окрім одного. Експресія HER2/neu виявилась позитивною (2+/3+) в 15 з 61 (25%) РНПП, але тільки в 9 з них мала дійсну ампліфікацію гену ERBB2 на FISH в 5 фенотипах. **Підсумок.** Зменшена кількість фенотипів з ампліфікацією гену ERBB2 робить його більш специфічним для диференційної діагностики РНПП, порівняно із делецією 9p21 (p16/CDKN2A), що вірогідно носить універсальний характер набуття агресивного перебігу карцином різних локалізацій.

Ключові слова: карцинома без первинної локалізації, p16, делеція 9p21, ампліфікація HER2/neu.

Пославская А.В., Шпонька И.С. Особенности экспрессии прогностических маркеров p16, Her2/neu и изменения соответствующих генов в отдельных фенотипах раков неизвестного первичного происхождения.

РЕФЕРАТ. Актуальность. Примерно 2/3 раков неизвестного первичного происхождения (РНПП) является аденокарциномами с продукцией муцина, образованием железисто-подобных структур и результатами иммуногистохимии, которые могут определить гистологический подтип, но не могут определить точное первичное место происхождения. Остальная 1/3 РНПП представляет собой смесь не-аденокарцином, включая плоскоклеточные, нейроэндокринные, мелкоклеточные и крупноклеточные недифференцированные карциномы. **Цель.** В таких случаях идентификация молекулярного профиля и секвенирование генов может быть перспективным подходом к классификации и прямой терапии РНПП. **Методы.** В работе проведен ретроспективный анализ биопсийного или послеоперационного материала 61 пациента (34 женщины и 27 мужчин) в возрасте от 26 до 74 лет (среднее 53,4 ± 11,42; медиана 52) с первичным диагнозом РНПП. Иммуногистохимическое исследование проводилось согласно протоколам ThermoScientific (США) с антителами к p16INK4a и HER2/neu. Флуоресцентную *in situ* гибридизацию выполняли по протоколу ZytoVisionGmbH (Германия). Изменения в генах ERBB2 и CDKN2A оценивались на предмет амплификации гена и делеции локуса 9p21 соответственно ДНК-зондами с двойной меткой. **Результаты.** Из 61 исследованного случая РНПП, экспрессия p16 оказалась положительной в 31 наблюдении (51%), основой для чего стали 9 гомозиготных и 19 гетерозиготных делеций 9p21, что встречались во всех исследованных фенотипах РНПП, кроме одного. Экспрессия HER2/neu оказалась положительной (2 + / 3 +) в 15 из 61 (25%) РНПП, но только в 9 из них имела действительную амплификацию гена ERBB2 на FISH в 5 фенотипах. **Заключение.** Уменьшено количество фенотипов с амплификацией гена ERBB2 делает его более специфичным для дифференциальной диагностики РНПП, по сравнению с делецией 9p21 (p16 / CDKN2A), которая вероятно носит универсальный характер приобретения агрессивного течения карцином различных локализаций.

Ключевые слова: карцинома без первичной локализации, p16, делеция 9p21, амплификация HER2 / neu.