

В.В. Рахманов
І.С. Шпонька




Дніпровський державний
медичний університет,
Дніпро

Надійшла: 24.10.2022
Прийнята: 15.12.2022

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2022.4.19-25>

УДК: 616.321-006-036.4:575.21

ДОСЛІДЖЕННЯ ЕКСПРЕСІЇ ОНКОПРО- ТЕЇНУ p53 ТА EGFR В ПЛОСКОКЛІТИН- НИХ КАРЦИНОМАХ РОТОГЛОТКИ З ПОЗИТИВНИМ І НЕГАТИВНИМ p16 СТАТУСОМ

Rakhmanov V.V.  , Shponka I.S.  Study of p53 and EGFR oncoprotein expression in oropharyngeal squamous cell carcinomas with positive and negative p16 status. Dnipro State Medical University, Dnipro, Ukraine.


ABSTRACT. Background. Squamous cell carcinoma is the most common variant of oropharyngeal cancer, including such sites as the root of the tongue, tonsils, and adenoids. One of the main changes in the WHO classification of head and neck tumors in 2017 is the recognition of the oropharynx as an independent subsite, due to the significant distribution of high oncogenic risk human papillomavirus-related squamous cell carcinomas in this location. The risk group consists of white men over 40 years of age with a high social status, and the incidence of oropharyngeal squamous cell cancer increases with age. **The aim** of the study was to compare the expression levels of p53 and EGFR markers in HPV-positive (p16+) and HPV-negative (p16-) squamous cell carcinomas of the oropharynx (oropharyngeal carcinomas). **Methods.** In the work, the biopsy and surgical material of squamous cell carcinomas of 50 patients (16 women and 34 men) who were treated at the Dnipropetrovsk Regional Clinical Hospital named after I.I. Mechnikova Hospital of Dnipro in the period from 2019 to 2021. The age of the patients ranged from 41 to 80 years; the average age was 58.56±9.75 years. Primary monoclonal antibodies to p16 (RTU), p53 (RTU), EGFR (RTU) and the UltraVision Quanto imaging system (LabVision) were used for immunohistochemical examination. **Results and conclusion.** The positive status of oncoprotein p16 / HPV (+) showed a statistically significant increase in occurrence in samples of squamous cell carcinomas of the oropharynx among women (p<0.05) and in the age group of patients 50-59 years old (p<0.05); in addition, all p16 / HPV (+) oropharyngeal squamous cell carcinoma samples had p53 expression below the 25% threshold. The analysis of p53 oncoprotein expression revealed a reverse trend to p16, the largest number of cases of oropharyngeal squamous cell carcinomas with p53≥25% were found among men (p<0.05) and in the age group of patients 60-69 years old (p<0.05). The highest number of cases of EGFR expression with a high score (2+,3+) was noted among men (p<0.05) and in oropharyngeal squamous cell carcinomas with p53≥25% expression (p<0.05). **Key words:** squamous cell carcinoma, p16, HPV, p53, EGFR.


Citation:

Rakhmanov VV, Shponka IS. [Study of p53 and EGFR oncoprotein expression in oropharyngeal squamous cell carcinomas with positive and negative p16 status]. Morphologia. 2022;16(4):19-25. Ukrainian.

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2022.4.19-25>

 Rakhmanov V.V. 0000-0003-3200-6039

 Shponka I.S. 0000-0002-3133-8413

 grimm417@gmail.com

© Dnipro State Medical University, «Morphologia»

Вступ

Плоскоклітинний рак (ПР) є найбільш поширеним варіантом раку ротоглотки (РГ), що включає такі локалізації як коріння язика, мигдалики та аденоїди [1-4]. Рак глотки (C09-C14), за оцінками Національного канцер реєстру України, на 2020 рік мав 2065 нових випадків і 1449 смертей, що посіло для чоловіків 10 місце за показником захворюваності (питома вага 3,4%) і 9 місце за показником смертності (питома вага 3,6%) [5]. На 100 тис. населення за областя-

ми України визначились регіони найбільшого поширення РГ в Чернігівській (9,1), Житомирській (7,7) і Закарпатських (7,7) областях. Аналіз випадків смертності на 100 тис. населення за областями України показав для РГ найвищі показники в Хмельницькій (6,5), Чернігівській (6,3) і Сумській (5,9) областях [5].

За даними звіту Всесвітньої організації охорони здоров'я, РГ у країнах, що розвиваються, є шостим за поширеністю раком у чоловіків і десятим найпоширенішим раком у жінок [6]. Однією

з головних змін у WHO класифікації пухлин голови та шиї 2017 року є визнання ротоглотки як самостійного субсайту, через значне поширення в цій ділянці плоскоклітинних карцином, пов'язаних з вірусом папіломи людини (ВПЛ) високого онкогенного ризику [7]. Незважаючи на прогрес у діагностичних методиках, ПР РГ має високу захворюваність у багатьох частинах світу, включаючи Азію та Західну Європу. Групу ризику складають білі чоловіки старше 40 років з доволі високим соціальним статусом, і з віком захворюваність ПР РГ збільшується [2, 8-10].

Незважаючи на широкі знання про патогенез і нові підходи до діагностики ПР РГ, лікування їх залишається незадоволеним у більшості пацієнтів [7-9]. ВПЛ високого ризику є важливим етіологічним фактором у ротоглотці і вважається причиною зростання захворюваності на цей тип раку, особливо серед молодших пацієнтів. Вважається, що ВПЛ-позитивний ПР РГ зазвичай має більш сприятливий прогноз, ніж ВПЛ-негативний ПР РГ [9-11]. Така етіологічна неоднорідність проявляється на генетичному/геномному, епідеміологічному та клінічному рівнях. Тютюн і алкоголь залишаються основними етіологічними факторами раку ротової порожнини, тоді як ВПЛ є основною причиною раку ротоглотки. Таким чином, боротьба з тютюном і алкоголем і профілактична вакцинація проти ВПЛ залишаються найбільш перспективними засобами профілактики раку ротової порожнини і ротоглотки на даний момент [11-12]. Важливо, що постійно з'являються альтернативні тютюнові вироби, такі як бездимний тютюн/снус, кальян і кальян, електронні сигарети, ароматизовані сигари та сигарилі, а також вироби, що розчиняються в ротовій порожнині, становлять ключову проблему для громадського здоров'я, а канцерогенний вплив цих продуктів залишається активна область дослідження [1, 7-9].

p16^{INK4a} (CDKN2A) є інгібітором циклін-залежної кінази, який пригнічує фосфорилування pRb і блокує прогресування клітинного циклу в контрольній точці G1 до S. Втрата експресії p16 через делецію, мутацію або гіперметилоування є поширеними при ПР голови та шиї. Однак функціональна інактивация pRb білком E7 ВПЛ призводить до надмірної експресії p16^{INK4a}, що робить його сурогатним маркером для ВПЛ. Подібним чином, білок ВПЛ E6 може інактивувати p53; таким чином, спостерігається нижча частота мутацій p53 у ВПЛ-позитивних пухлинах [8-13].

Аномальна функція рецептора епідермального фактора росту EGFR впливає на прогресування клітинного циклу, апоптозу, ангиогенезу, мобільності пухлинних клітин і метастазів і корелює з поганим прогнозом при ПР голови та шиї. Дослідження Singla S. et al. (2018) показу-

ють високу експресію EGFR пухлин та асоціацію з нижчою виживаністю у випадках ПР голови та шиї [14], тоді як інші дослідження не виявили кореляції між експресією EGFR і виживанням пацієнтів [15-16].

Онкопротеїн p53 часто мутує, надмірно експресується у ПР голови та шиї різних локалізацій та пов'язаний з поганим прогнозом [8-10]. Таким чином, залишаються суперечки щодо прогностичного значення p53 та EGFR в ПР ротоглотки, а тим більше в залежності від ВПЛ статусу.

Метою дослідження було порівняти рівні експресії маркерів p53 та EGFR в ВПЛ-позитивних (p16+) та ВПЛ-негативних (p16-) плоскоклітинних карциномах ротоглотки (орофарингеальних карциномах).

Матеріали та методи

В роботі досліджено біопсійний та операційний матеріал плоскоклітинних карцином 50 пацієнтів (16 жінок і 34 чоловіків), що проходили лікування в КП «Дніпропетровська обласна клінічна лікарня ім. І.І. Мечникова» ДОР м. Дніпра в період з 2019 по 2021 рр. Вік пацієнтів коливався в діапазоні 41 – 80 років, середній вік склав 58,56±9,75 років. Дослідження проведено згідно з письмовою згодою учасників і відповідно до принципів біоетики, викладених у Гельсінській декларації «Етичні принципи медичних досліджень за участю людей» та «Загальній декларації про біоетику та права людини (ЮНЕСКО)».

За гістологічною будовою всі спостереження були представлені плоскоклітинною карциномою. Також гістологічний матеріал ПР РГ був розподілений на групи в залежності від наявності метастазів та рецидивів: ПР без метастазів 27 (54,00) та ПР з метастазами 23 (46,00%); ПР без рецидивів 46 (92,00) та ПР з рецидивом 4 (8,00%).

Морфологічний метод. Зразки пухлин ПР РГ фіксованих у формаліні і залиті парафіном були взяті з архіву КЗ «Дніпровське обласне патологоанатомічне бюро». Парафінові зрізи 4-5мм були отримані на мікротомі Microm HM-340 і забарвлені за стандартною методикою гематоксиліном й еозином. За внутрішній контроль приймали багат шаровий плоский епітелій, що потрапляв в зріз поруч з плоскоклітинною карциномою. Мікроскопія проводилась за допомогою світлового мікроскопу ZEISS "Primo Star" (об'єктиви ×10, ×20, ×40). Цифрові зображення були отримані камерою мікроскопу Zeiss Primo Star - AxioCam ERC 5s з ліцензованим програмним забезпеченням ZEN 2 blue edition [17].

Імуногістохімічний метод. Парафінові зрізи наносили на адгезивні предметні скельця SuperFrost Plus. Після депарафінізації, регідратації, температурного демаскування антигенів та пригнічення активності ендogenous пероксидази, проводили інкубацію зрізів з первинними ан-

титілами у вологих камерах при температурі 23 – 25°C на протязі 30 хвилин. Використовувались первинні моноклональні антитіла до p16 (RTU), p53 (RTU), EGFR (RTU) та система візуалізації UltraVision Quanto, (LabVision). Для ідентифікації реакції наносився розчин хромогену 3-діамінобензидин тетрахлориду (Quanto, LabVision) під контролем мікроскопу протягом від 20 секунд до 3 хвилин, з проявом у вигляді коричневого забарвлення. Ядра додатково за-

барвлювали гематоксином Майєра протягом 1-3 хвилини [18].

Оцінка імуногістохімічного забарвлення. За рекомендаціями Chrystiano de C. Ferreira et al. (2021) [1], експресія маркера p16, що була розцінена нами як еквівалент позитивності ПР РГ на ВПЛ, вважалась позитивною тільки якщо демонструвала сильне дифузне ядерно-цитоплазматичне забарвлення в більше ніж 75% клітин (рис. 1 (А-Б)).

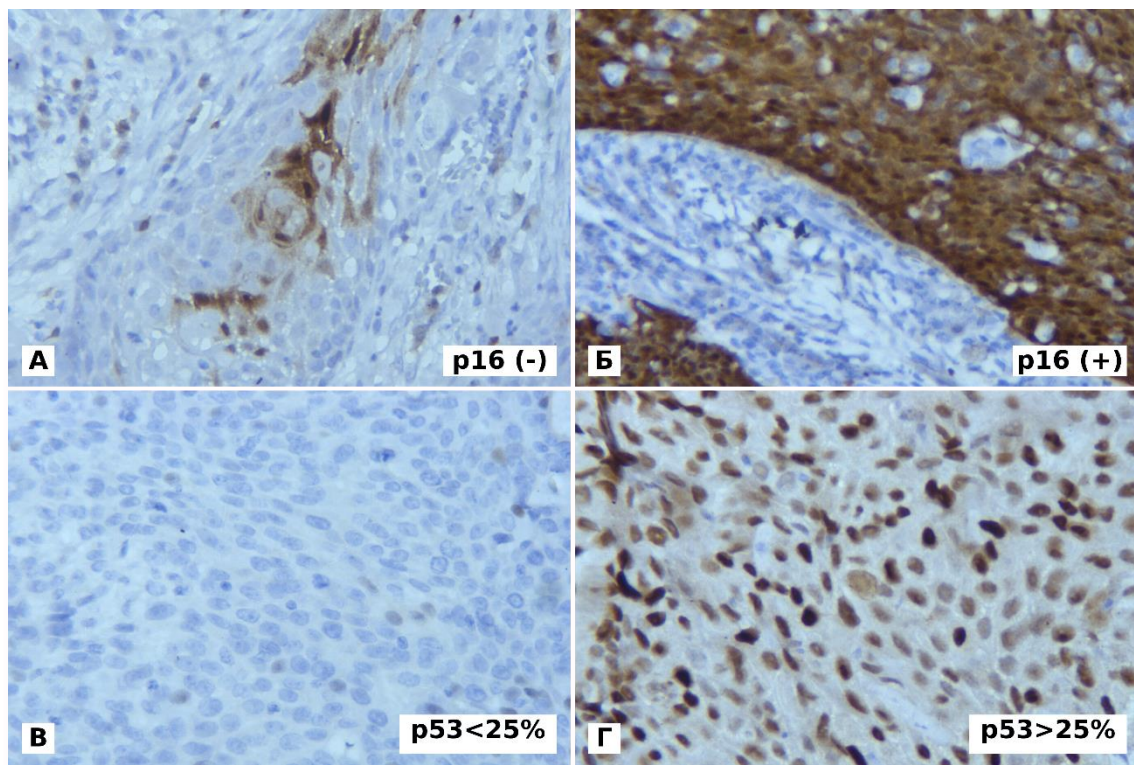


Рис. 1. Плоскоклітинний рак ротоглотки, імуногістохімічний метод забарвлення з гематоксином Майєра (×400). А. Негативна експресія маркера p16 (ядерне, ядерно-цитоплазматичне забарвлення поодиноких клітин). Б. Позитивна експресія маркера p16 (сильне дифузне ядерно-цитоплазматичне забарвлення в більше ніж 75% клітин). В. Інтрануклеарна експресія p53 на рівні 1,5% (дикий тип). Г. Інтрануклеарна експресія p53 на рівні 80% (мутантний тип).

Експресія маркера p53 вважалась позитивною, якщо щонайменше або більше 25% пухлинних клітин демонстрували ядерну експресію маркера (рис. 1 В-Г), за рекомендаціями Plath M. et al. (2018) [12].

Фарбування на EGFR вважалось позитивним, якщо щонайменше 10% або більше пухлинних клітин виявляли мембранну експресію маркера зі слабкою до помірної або сильною інтенсивністю фарбування. Інтенсивність EGFR оцінювали за шкалою від 1 до 3, де 1 = слабе, 2 = помірне і 3 = сильне однорідне або нерівне фарбування (рис. 2), за рекомендаціями Mohanapure N. S. et al. (2022) [16].

Статистичний аналіз даних проводили в програмному середовищі R version 3.4.1 (2017-06-30) -- "Single Candle" Copyright (C) 2017; The R Foundation for Statistical Computing Platform:

x86_64-w64-mingw32/x64 (64-bit), що поширюється безкоштовно за ліцензією GNU General Public License.

Встановлення достовірності міжгрупових зв'язків за кількісним розподілом проводилось за допомогою точного тесту Фішера. Для всіх критеріїв відмінності вважали достовірними при $p < 0,05$ [19].

Результати та їх обговорення

Дослідження особливостей експресії онкопротеїну p16 (як маркера етіологічного впливу ВПЛ інфекції) в ПР ділянок ротоглотки (орофарінгеальної області) продемонструвало розподіл на більшість p16 (-) / (ВПЛ негативних) зразків 30 з 50 (60,0%) та меншість p16 (+) / (ВПЛ позитивних) - 20 з 50 (40,0%). Співвідношення чоловіків і жінок в p16/ВПЛ (-) ПР РГ та p16 (+) ПР РГ виявилось статистично достовірно

відмінним: у p16/ВПЛ (-) ПР РГ 25 чоловіків (83,33 %) та 5 жінок (16,67%), порівняно з p16/ВПЛ (+) ПР РГ, де було 9 чоловіків (45,00%) і 11 жінок (55,00%), ($p < 0,05$). Аналіз контингенту за віковими групами показав найбільшу кількість p16/ВПЛ (-) ПР РГ в віці 60-69 років - 12 з 30 (40,0%), в той час як найбільша кількість

p16/ВПЛ (+) ПР РГ припала на молодший вік 50-59 років - 10 з 20 (50,0%), ($p < 0,05$). Середній вік пацієнтів з p16/ВПЛ (-) ПР РГ склав $60,4 \pm 9,39$ років, в той час як середній вік пацієнтів з p16/ВПЛ (+) ПР РГ виявився на п'ять років молодшим - $55,8 \pm 9,87$ років.

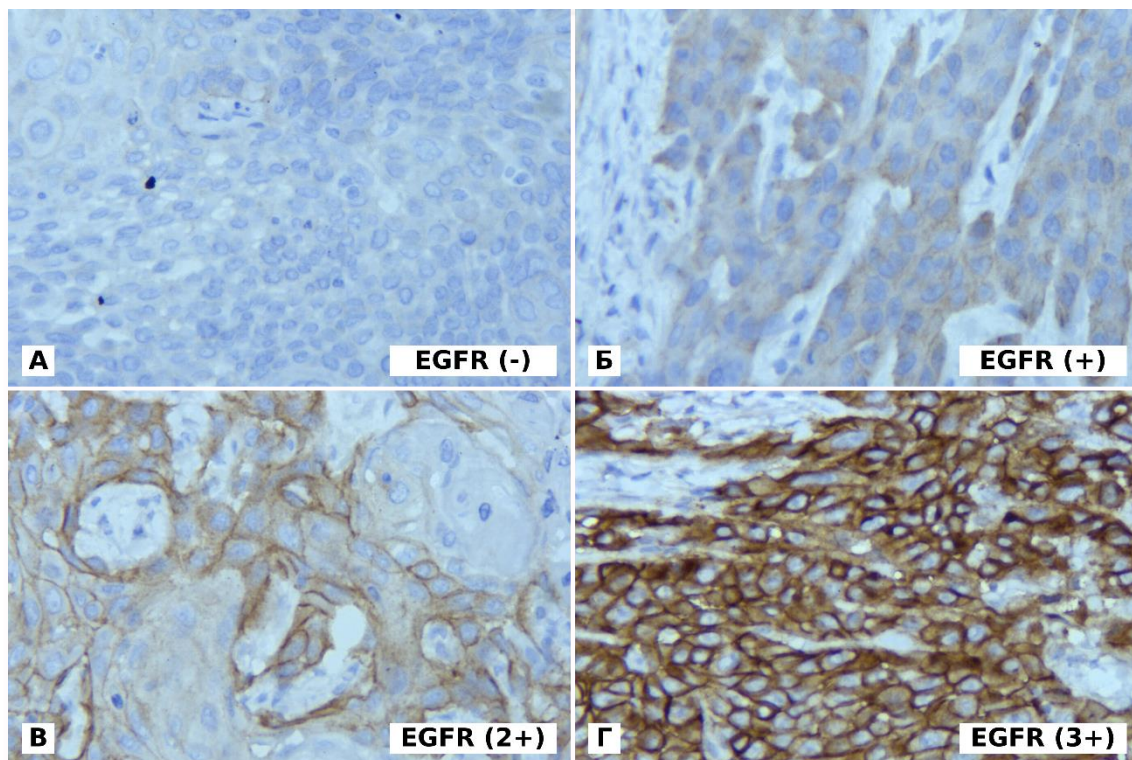


Рис. 2. Варіанти експресії маркера EGFR в плоскоклітинних карциномах ротоглотки, імуногістохімічний метод забарвлення з гематоксином Майєра ($\times 400$). А. Score експресії 0 (-): менше 10% пухлинних клітин виявляли мембранну експресію маркера EGFR вважалось позитивним. Б. Score експресії 1+: більше 10% пухлинних клітин виявляли мембранну експресію маркера EGFR слабкої інтенсивності. В. 25-50% мічених мембран пухлинних клітин високої інтенсивності (2). Б. Score експресії 2+: >10% мічених мембран пухлинних клітин помірної інтенсивності. Г. Score експресії 3+: >10% мічених мембран пухлинних клітин високої інтенсивності.

Але не дивлячись на дані Wang H et al. (2020) про більш «доброякісний» перебіг p16/ВПЛ (+) ПР РГ [3], в нашому дослідженні кількість випадків p16/ВПЛ (+) ПР РГ з метастазами з'ясувалась більшою ніж в ПР РГ p16/ВПЛ (-) - 8 з 20 (40,0%) проти 10 з 30 (33,33%), відповідно, але статистично вірогідної різниці за точним тестом Фішера знайдено не було ($p > 0,05$). Випадків ПР РГ з рецидивами серед p16/ВПЛ (+) пацієнтів також було більше ніж серед p16/ВПЛ (-) - 1 з 20 (5,0%) порівняно з 3 з 30 (1,0%), відповідно, ($p > 0,05$).

Цікавим виявився аналіз розподілу варіантів експресії онкопротеїну p53 в ПР РГ в залежності від наявності / відсутності p16 /ВПЛ, а саме, всі p16/ВПЛ (+) зразки ПР РГ (20 з 20; 100%) мали експресію p53 нижче 25% порогового значення, що підтверджує різницю в походженні p16 (+) /p53 (-) та p16 (-) /p53 (+) ПР РГ через етіологічний вплив ВПЛ та тютюну / алкоголю,

відповідно, що активно просувається в дослідженнях багатьох авторів [1-4,9-12]. Дані розподілу варіантів експресії p53 за клініко-морфологічними характеристиками плоскоклітинних карцином ротоглотки занесені в таблицю 1.

Варіанти експресії EGFR (0, 1+, 2+, 3+) в p16/ВПЛ (-) та p16/ВПЛ (+) ПР РГ для зручності статистичного обліку були об'єднані в 2 групи низький score (EGFR 0,+1) та високий score (EGFR +2,+3) (табл. 2). Кількість p16/ВПЛ (-) та p16/ВПЛ (+) зразків ПР РГ, що мали експресію маркера EGFR на рівні 2+/3+, виявилась майже однаковою - 23 з 30 (76,67%) порівняно з 14 з 20 (70,00%), відповідно, ($p > 0,05$). Що говорить про вірогідну незалежність цього патогенетичного шляху розвитку ПР орофарингеальної ділянки від ВПЛ інфекції. Такі думки висловлюють і інші автори, що мають подібні результати своїх досліджень [14,16]. Дані розподілу варіантів

експресії EGFR за клініко-морфологічними характеристиками плоскоклітинних карцином ротоглотки занесені в таблицю 2.

Аналізуючи експресію онкопротеїну p53 в плоскоклітинних карциномах орофарингеальної області, треба зазначити, що серед чоловіків p53 \geq 25% зразків ПР РГ виявилось статистично

достовірно більше ніж серед жінок (p<0,05), (табл. 1). Також різниця за експресією p53 була знайдена в вікових підгрупах пацієнтів: найбільша кількість випадків ПР РГ з p53<25% виявилась в підгрупі 50-59 років, в той час як більшість пацієнтів з ПР РГ з p53 \geq 25% припала на 60-69 років, (p<0,05), (табл. 1)

Таблиця 1
Розподіл варіантів експресії p53 за клініко-морфологічними характеристиками плоскоклітинних карцином ротоглотки

Клініко-морфологічна характеристика	n (%) n=50, (%)	Варіант експресії p53	
		p53<25% n=38, (%)	p53 \geq 25% n=12, (%)
Чоловіки	34 (68,00)	24 (63,16)	10 (83,33)
Жінки	16 (32,00)	14 (36,84)	2 (16,67)
p		p<0,05	
Вік (роки) 40-49	10 (20,00)	9 (23,68)	1 (8,33)
50-59	18 (36,00)	15 (39,47)	3 (25,00)
60-69	15 (30,00)	9 (23,68)	6 (50,00)
70-80	7 (14,00)	5 (13,16)	2 (16,67)
p		p<0,05	
p16 / ВПЛ (-)	30 (60,00)	18 (47,37)	12 (100,00)
p16 / ВПЛ (+)	20 (40,00)	20 (52,63)	0 (0,00)
p		p*	
Без метастазів	27 (54,00)	19 (50,00)	8 (66,67)
З метастазами	23 (46,00)	19 (50,00)	4 (33,33)
p		p>0,05	
Без рецидиву	46 (92,00)	35 (92,10)	11 (91,67)
З рецидивом	4 (8,00)	3 (7,90)	1 (8,33)
p		p>0,05	

Примітка: p – встановлення достовірності міжгрупових зв'язків за кількісним розподілом проводився точним тестом Фішера, p* - статистичний аналіз даних не проводився через відсутність зразків в деяких підгрупах, відмінність вважали достовірною при p<0,05.

Досліджуючи експресію маркеру EGRF в плоскоклітинних карциномах ротоглотки виявилось, що серед чоловіків випадків ПР РГ з високим score EGFR (+2, +3) виявилось статистично достовірно більше ніж серед жінок (p<0,05), (табл. 2). Також різниця за експресією EGRF була знайдена в підгрупах пацієнтів з різною експресією онкомаркеру p53: в підгрупі ПР РГ з p53<25% виявилась більшість ПР РГ з низьким score EGFR (0, +1) 11 з 13 (84,62%), і навпаки, в підгрупі ПР РГ з p53 \geq 25% виявилась більшість випадків ПР РГ з p53 \geq 25% 35 з 37 (94,59%), (p<0,05), (табл. 2).

Висновки

Позитивний статус за онкопротеїном p16 / ВПЛ (+) показав статистично достовірне збільшення зустрічності в зразках плоскоклітинних карцином ротоглотки серед жінок (p<0,05) та в віковій групі пацієнтів 50-59 років (p<0,05); до того ж всі p16 / ВПЛ (+) зразки плоскоклітинних карцином ротоглотки мали експресію p53 нижче 25% порогового значення.

Аналіз експресії онкопротеїну p53 виявив

зворотну до p16 тенденцію, найбільша кількість випадків плоскоклітинних карцином ротоглотки з p53 \geq 25% виявились серед чоловіків (p<0,05) та в віковій групі пацієнтів 60-69 років (p<0,05);

Найбільша кількість випадків експресії EGFR з високим score (2+,3+) відмічалась серед чоловіків (p<0,05) та в плоскоклітинних карциномах ротоглотки з експресією p53 \geq 25% (p<0,05).

Перспективи подальших досліджень

Планується дослідити особливості експресії цитокератинів різних груп в залежності від клініко-морфологічних характеристик та проліферативної активності орофарингеальних плоскоклітинних карцином.

Інформація про конфлікт інтересів

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

Розподіл варіантів експресії EGFR за клініко-морфологічними характеристиками плоскоклітинних карцином ротоглотки

Клініко-морфологічна характеристика	n (%) n=50	Варіант експресії EGFR	
		Score EGFR 0,+1 низький, n=13	Score EGFR +2, +3 високий, n=37
Чоловіки	34 (68,00)	7 (53,85)	27 (72,97)
Жінки	16 (32,00)	6 (46,15)	10 (27,03)
p		p<0,05	
Вік 40-49	10 (20,00)	3 (23,08)	7 (18,92)
50-59	18 (36,00)	4 (30,77)	14 (37,84)
60-69	15 (30,00)	2 (15,38)	13 (35,13)
70-80	7 (14,00)	4 (30,77)	3 (8,11)
p		p>0,05	
p16 / ВПЛ (-)	30 (60,00)	7 (53,85)	23 (62,16)
p16 / ВПЛ (+)	20 (40,00)	6 (46,15)	14 (37,84)
p		p>0,05	
Без метастазів	27 (54,00)	6 (46,15)	21 (56,76)
З метастазами	23 (46,00)	7 (53,85)	16 (43,24)
p		p>0,05	
Без рецидиву	46 (92,00)	11 (84,62)	35 (94,59)
З рецидивом	4 (8,00)	2 (15,38)	2 (5,41)
p		p>0,05	
p53 <25%	13 (26,00)	11 (84,62)	2 (5,41)
p53 ≥25%	37 (74,00)	2 (15,38)	35 (94,59)
p		p<0,05	

Примітка: p - встановлення достовірності міжгрупових зв'язків за кількісним розподілом проводився точним тестом Фішера, p* - статистичний аналіз даних не проводився через відсутність зразків в деяких підгрупах, відмінність вважали достовірною при p<0,05.

Літературні джерела References

1. De C Ferreira C, Dufloth R, de Carvalho AC, et al. Correlation of p16 immunohistochemistry with clinical and epidemiological features in oropharyngeal squamous-cell carcinoma. *PLoS One*. 2021;16 (6):e0253418.
2. Sabu A, Ratna Mouli NV, Tejaswini N. Human papillomavirus detection in oropharyngeal squamous cell carcinoma using p16 immunohistochemistry. *International Journal of Applied and Basic Medical Research*. 2019;9(4):212-216. doi: 10.4103/ijabmr.IJABMR_221_18.
3. Huanhuan Wang, Yuyu Zhang, Wei Bai, et al. Feasibility of Immunohistochemical p16 Staining in the Diagnosis of Human Papillomavirus Infection in Patients With Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front. Oncol*. 2020;10:524928. doi: 10.3389/fonc.2020.524928.
4. Orsaria M, Marzinotto S, De Marchi L, et al. HPV-related Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma: p16INK4A Immunohistochemistry or HPV Genotyping. *Anticancer research*. 2015;35: 4733-4740.
5. Fedorenko ZP, Hulak LO, Mykhailovych YuY, et al. [Cancer in Ukraine, 2019-2020. Morbidity, mortality, performance indicators of the oncology service]. *Bulletin of the National Chancery Register of Ukraine*. 2021;22. Ukrainian. http://www.ncru.inf.ua/publications/BULL_22/.
6. World Health Organisation Classification of Head and Neck Tumours, 4th ed. A. K. El-Naggar, J. K. C. Chan, J. R. Grandis, T. Takata, P. J. Slootweg C. D. (Eds.). IARC Press: Lyon, France, 2017. Vol. 9. P. 136-138.
7. Updated WHO nomenclature of head and neck lesions and associated imaging findings. N. Oren, A. Vaysberg, D. T. Ginat. *Insights into Imaging*. 2019. Vol. 10. P. 72. <https://doi.org/10.1186/s13244-019-0760-4>.
8. Shelton J, Purgina BM, Cipriani NA et al. p16 immunohistochemistry in oropharyngeal squamous cell carcinoma: a comparison of antibody clones using patient outcomes and high-risk human papillomavirus RNA status. *Modern Pathology*.

2017;30:1194-1203. doi:10.1038/modpathol.2017.31.

9. Adilbay D, Adilbayev G, Kidirbayeva G, et al. HPV infection and P16 expression in oral and oropharyngeal cancer in Kazakhstan. *Infectious Agents and Cancer*. 2018;13:2. DOI 10.1186/s13027-018-0175-8.

10. Hashmi AA, Younus N, Naz S. p16 Immunohistochemical expression in head and neck squamous cell carcinoma: association with prognostic parameters. *Cureus*. Vol. 12 (6). P. e8601. doi:10.7759/cureus.8601.

11. Nazim Benzerdjeb, Juliet Tantot, Christophe Blanchet, et al. Oropharyngeal squamous cell carcinoma: p16/p53 immunohistochemistry as a strong predictor of HPV tumour status. *Histopathology*. 2021;79(3):381-390. doi: 10.1111/his.14350

12. Michaela Plath, Martina A Broglie, Diana Förbs, et al. Prognostic significance of cell cycle-associated proteins p16, pRB, cyclin D1 and p53 in resected oropharyngeal carcinoma. *J Otolaryngol Head Neck Surg*. 2018;47(1):53. doi: 10.1186/s40463-018-0298-3.

13. Hashmi AA, Hussain ZF, Hashmi SK, et al. Immunohistochemical over expression of p53 in head and neck squamous cell carcinoma: clinical and prognostic significance. *BMC Res Notes*. 2018;11(433):1-5. <https://doi.org/10.1186/s13104-018-3547-7>.

14. Singla S, Singla G, Zaheer S, et al. Expression of p53, epidermal growth factor receptor, c-erbB2 in oral leukoplakias and oral squamous cell carcinomas. *J Cancer Res Ther*. 2018;14(2):388-393. doi: 10.4103/0973-1482.191027.

15. Kumar B, Cordell KG, 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. *J Clin Oncol*. 2008 Jul 1; 26(19): 3128–3137. doi: 10.1200/JCO.2007.12.7662.

16. Mohanapure NS, Siddhi Gaurish Sinai Khandeparkar, Pradnya B Saragade et al. Immunohistochemical study of epidermal growth factor receptor, human epidermal growth factor receptor 2/neu, p53, and Ki67 in oral squamous cell carcinoma. *JOMFP*. 2022; 26(1):127-128. DOI: 10.4103/jomfp.jomfp_310_21.

17. Vareniuk IM, Dzerzhynskyi ME. [Methods of cyto-histological diagnosis: study guide]. Kyiv. 2019. 256 p. Ukrainian.

18. Nguyen T. *Immunohistochemistry: A Technical Guide to Current Practices*. Cambridge: Cambridge University Press. 2022. 272 p.

19. Strahova OP, Androsov OI. [Statistical methods of processing the results of medical and biological research]. Lviv. 2021. 164 p. Ukrainian.

Рахманов В.В., Шпонька І.С. Дослідження експресії онкопротеїну p53 та EGFR в плоскоклітинних карциномах ротоглотки з позитивним і негативним p16 статусом.

РЕФЕРАТ. Актуальність. Плоскоклітинний рак є найбільш поширеним варіантом раку ротоглотки, що включає такі локалізації як коріння язика, мигдалики та аденоїди. Однією з головних змін у ВООЗ класифікації пухлин голови та шиї 2017 року є визнання ротоглотки (орофарингеальної ділянки) як самостійної одиниці, через значне поширення в цій локалізації плоскоклітинних карцином, пов'язаних з вірусом папіломи людини високого онкогенного ризику. Групу ризику складають білі чоловіки старше 40 років з доволі високим соціальним статусом, і з віком захворюваність на плоскоклітинний рак ротоглотки збільшується. **Метою** дослідження було порівняти рівні експресії маркерів p53 та EGFR в ВПЛ-позитивних (p16+) та ВПЛ-негативних (p16-) плоскоклітинних карциномах ротоглотки (орофарингеальних карциномах). **Методи.** В роботі досліджено біопсійний та операційний матеріал плоскоклітинних карцином 50 пацієнтів (16 жінок і 34 чоловіків), що проходили лікування в КП «Дніпропетровська обласна клінічна лікарня ім. І.І. Мечникова» ДОР м. Дніпра в період з 2019 по 2021 рр. Вік пацієнтів коливався в діапазоні 41 – 80 років, середній вік склав $58,56 \pm 9,75$ років. Для імуногістохімічного дослідження використовувалися первинні моноклональні антитіла до p16 (RTU), p53 (RTU), EGFR (RTU) та система візуалізації UltraVision Quanto, LabVision). **Результати та підсумок.** Позитивний статус за онкопротеїном p16 / ВПЛ (+) показав статистично достовірне збільшення зустрічаємості в зразках плоскоклітинних карцином ротоглотки серед жінок ($p < 0,05$) та в віковій групі пацієнтів 50-59 років ($p < 0,05$); до того ж всі p16 / ВПЛ (+) зразки плоскоклітинних карцином ротоглотки мали експресію p53 нижче 25% порогового значення. Аналіз експресії онкопротеїну p53 виявив зворотну до p16 тенденцію, найбільша кількість випадків плоскоклітинних карцином ротоглотки з $p53 \geq 25\%$ виявились серед чоловіків ($p < 0,05$) та в віковій групі пацієнтів 60-69 років ($p < 0,05$). Найбільша кількість випадків експресії EGFR з високим score (2+,3+) відмічалась серед чоловіків ($p < 0,05$) та в плоскоклітинних карциномах ротоглотки з експресією $p53 \geq 25\%$ ($p < 0,05$).

Ключові слова: плоскоклітинний рак, p16, ВПЛ, p53, EGFR.