

**В.В. Рахманов**  
**І.С. Шпонька**




Дніпровський державний медичний університет, Дніпро, Україна

Надійшла: 24.05.2023  
Прийнята: 15.06.2023

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2023.2.52-60>

УДК: 616.321-006-036.4:575.21

## ОСОБЛИВОСТІ ЕКСПРЕСІЇ CYCLIN D1 ТА ОНКОПРОТЕЇНУ p27 В ПЛОСКОКЛІТИННИХ КАРЦИНОМАХ РОТОГЛОТКИ З РІЗНИМ ПРОЛІФЕРАТИВНИМ ПОТЕНЦІАЛОМ

Rakhmanov V.V.  , Shponka I.S.  Features of the expression of cyclin D1 and oncoprotein p27 in oropharyngeal squamous cell carcinomas with different proliferative potential.

Dnipro State Medical University, Dnipro, Ukraine.


**ABSTRACT. Background.** Squamous cell carcinoma of the head and neck, including oral, pharyngeal, larynx, and sinusal tract cancers, is the sixth most common cancer worldwide. The development of malignant tumors is associated with a series of changes in the activity of cell cycle regulators, which can be considered as positive and negative regulators. Positive regulators of the cell cycle can be considered cyclin A and cyclin D1, which contribute to the transition of the cell cycle from one phase to another; others, such as oncogene suppressors Rb, p16, p53, p21 and p27 are negative regulators that stop the cell cycle in the S phase. The aim of the study was to compare the expression levels of markers p27 and cyclin D1 in HPV-positive (p16+) and HPV-negative (p16-) squamous cell carcinomas of the oropharynx with different proliferative potential. **Methods.** In the work, the biopsy and surgical material of squamous cell carcinomas of 70 patients (22 women and 48 men) who were treated in the KP "Dnipropetrovsk Regional Clinical Hospital named after I.I. Mechnikova Hospital of Dnipro in the period from 2019 to 2022. The age of the patients ranged from 41 to 80 years; the average age was 59.75±9.16 years. Primary monoclonal antibodies to p16 (RTU), p53 (RTU), Cyclin D1 (EP12, RTU), Ki-67 (sp6, RTU), p27 (sp1, RTU) and the UltraVision Quanto imaging system (LabVision) were used for immunohistochemical study. **Results and conclusion.** Cyclin D1 marker, analyzed in groups ≤10% and >10% according to clinical and morphological indicators showed a statistically significant difference in age (p<0.05) and histological type (keratinized/non-keratinized), (p<0.05); the analysis of cyclin D1 expression showed an inverse trend to the p16/HPV status, the largest number of 80.85% of cases of squamous cell carcinomas of the oropharyngeal area cyclin D1 with >10% were found among p16/HPV (-) observations; 91.30% of cases of squamous cell carcinoma of the oropharyngeal area with cyclin D1 ≤10% had p53 expression below the level of 25% (p<0.05); the largest number of cases of p27 expression with a high score (2+,3+) was noted among patients aged 40-49 years (p<0.05).

**Key words:** squamous cell carcinoma, oropharynx, cyclin D1, p16, HPV, p27.


### Citation:

Rakhmanov VV, Shponka IS. [Features of the expression of cyclin D1 and oncoprotein p27 in oropharyngeal squamous cell carcinomas with different proliferative potential]. Morphologia. 2023;17(2):52-60. Ukrainian.

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2023.2.52-60>

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

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

 [grimm417@gmail.com](mailto:grimm417@gmail.com)

© Dnipro State Medical University, «Morphologia»

### Вступ

Плоскоклітинний рак голови та шиї, включаючи рак ротової порожнини, глотки, гортані та синоназального тракту є шостим за поширеністю раком у світі. І не дивлячись на те, що раки цих локалізацій пов'язані загальними клініко-патологічними ознаками, включаючи палінн, переважання у чоловіків, часте вживання алкоголю, доведено, що деякі раки цих локалізацій ма-

ють вірусну етіологію, а саме плоскоклітинний рак орофарингеальної ділянки (ПРОФ), часто викликана інфекцією вірусу папіломи людини (ВПЛ) [1-5]. Таким чином, наявність або відсутність ВПЛ може впливати на терапію або результати у пацієнтів з (ПРОФ), до того ж результати спостережень багатьох авторів свідчить про те, що ерадикація ВПЛ може запобігти розвитку ПРОФ [6-8].

Розвиток злоякісних пухлин пов'язують з серією змін у діяльності регуляторів клітинного циклу, які можна розглядати як позитивні та негативні регулятори. Позитивними регуляторами клітинного циклу можна вважати *cyclin A* і *cyclin D1*, які сприяють переходу клітинного циклу від однієї фази до іншої; інші, такі як онкогенні супресори *Rb*, *p16*, *p53*, *p21* і *p27* є негативними регуляторами, які зупиняють клітинний цикл в фазі *S*. *p27* є залежним від клітинного циклу інгібітором кінази, присутність якого в ядрі асоціюється з хорошим прогнозом. До того ж є дослідження, які враховують субклітинну локалізацію експресії *p27*: в ядрі, де має бути його нормальне розташування, *p27* працює дійсно як супресор, але в цитоплазмі *p27* функціонує як онкоген і дає гірший прогноз [9-11].

Аномальна експресія білків, пов'язаних із клітинним циклом, часто зустрічається при різних видах раку. Наприклад, коли позитивні регулятори (наприклад, *cyclin A*, *cyclin D1*) демонструють надекспресію в ракових клітинах, негативні регулятори, такі як *p21* і *p27*, можуть демонструвати низьку експресію [12-14].

За даними останніх досліджень, онкогенна природа ВПЛ базується на трансформуючих властивостях онкобілків *E6* і *E7*, які відповідно впливають на супресори *p53* і *Rb*, і роблять інфіковані клітини сприйнятливими до мутацій і розвитку онкогенної трансформації. Але онкогенна природа ВПЛ може бути пов'язана з аномаліями білків клітинного циклу. Таким чином, дослідження полягало в визначенні зв'язків ПРОФ з ВПЛ, а саме з характеристикою імунoproфілів ВПЛ-позитивних та ВПЛ-негативних варіантів з фокусом на експресії білків, пов'язаних з клітинним циклом [15-16].

**Метою** дослідження було порівняти рівні експресії маркерів *p27* та *cyclin D1* в ВПЛ-позитивних (*p16+*) та ВПЛ-негативних (*p16-*) плоскоклітинних карциномах ротоглотки з різним проліферативним потенціалом.

#### **Матеріали та методи**

В роботі досліджено біопсійний та операційний матеріал плоскоклітинних карцином 70 пацієнтів (22 жінок і 48 чоловіків), що проходили лікування в КП «Дніпропетровська обласна клінічна лікарня ім. І.І. Мечникова» ДОР м. Дніпра в період з 2019 по 2022 рр. Вік пацієнтів коливався в діапазоні 41 – 80 років, середній вік склав  $59,75 \pm 9,16$  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 плоскоклітинними карциномами з незроговілими 38 (54,29%) та зроговілими 32 (45,71%) гістологічними формами. Та-

кож весь матеріал ПРОФ був розподілений на групи в залежності від наявності метастазів та рецидивів: ПРОФ без метастазів 34 (48,57%) та ПРОФ з метастазами 36 (51,43%); ПРОФ без рецидивів 65 (92,86%) та ПРОФ з рецидивом 5 (7,14%).

*Морфологічний метод.* Зразки пухлин ПРОФ фіксованих у формаліні і залиті парафіном були взяті з архіву КЗ «Дніпровське обласне патологоанатомічне бюро». Парафінові зрізи 4-5мкм були отримані на мікросомі Microm HM-340 і забарвлені за стандартною методикою гематоксилином й еозином. За внутрішній контроль приймали багат шаровий плоский епітелій без диспластичних змін. Мікроскопія проводилась за допомогою світлового мікроскопу ZEISS "Primo Star" (об'єктиви  $\times 10$ ,  $\times 20$ ,  $\times 40$ ). 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 ендогенної пероксидази, проводили інкубацію зрізів з первинними антитілами у вологих камерах при температурі 23 – 25°C на протязі 30 хвилин. Використовувались первинні моноклональні антитіла до *p16* (RTU), *p53* (RTU), *Cyclin D1* (EP12, RTU), *Ki-67* (sp6, RTU), *p27* (sp1, 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 забарвлювали гематоксилином Майєра протягом 1-3 хвилини [18].

*Оцінка імуногістохімічного забарвлення.* За рекомендаціями Chrystiano de C. Ferreira et al. (2021), експресія маркеру *p16*, що була розцінена нами як еквівалент позитивності ПРОФ на ВПЛ, вважалась позитивною тільки якщо демонструвала сильне дифузне ядерно-цитоплазматичне забарвлення в більше ніж 75% клітин [2].

Експресія маркеру *p53* вважалась позитивною, якщо щонайменше 25% та більше 25% пухлинних клітин демонстрували ядерну експресію маркера, за рекомендаціями Plath M. et al. (2018) [12].

За рекомендацією Yadav P. et al. (2019), оцінка індексу проліферації була проведена за експресію *Ki-67*, відповідно до відсотка позитивно забарвлених клітин на 1000 підрахованих клітин у полі мікроскопа  $\times 40$ : 0 ( $<10\%$  забарвлених клітин), 1 (10%-50%) і 2 ( $>50\%$ ). Тільки оцінки 1 або 2 вважались позитивною імуноекспресією, 0 балів вважались негативними [19].

Відсоток *p27* позитивних клітин класифіку-

вали наступним чином: негативні, немає пофарбованих клітин; осередково позитивний, менше 25% пофарбованих клітин (+); помірно позитивний, більше 25% і менше 50% забарвлених клітинки (++); дифузно позитивний, більше 50% пофарбованих клітин (+++), за рекомендаціями Queiroz AB et al. (2010) [20].

Картина фарбування cyclin D1 була класифікована як негативна (-), коли  $\leq 10\%$  клітин були забарвлені на cyclin D1 і позитивна (+), коли було більше 10% клітин забарвлені на cyclin D1, за рекомендацією Moharil RB et al. (2020) [21].

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  $p < 0,05$  [22].

#### Результати та їх обговорення

Аналіз експресії cyclin D1, як маркеру клітинного циклу, був проведений в залежності від клініко-морфологічних характеристик ПРОФ та експресії маркерів p16, p53 та Ki-67, як золотого стандарту дослідження карцином цієї локалізації.

Більшість зразків ПРОФ мали експресію cyclin D1 на рівні більше ніж 10% забарвлених клітин – 47 з 70 (67,14%), порівняно із зразками ПРОФ з експресією cyclin D1 менше 10% – 23 з 70 (32,86%) (рис. 1). Відношення чоловіків і жінок в групах ПРОФ з cyclin D1 ( $\leq 10\%$ ) та cyclin D1 ( $> 10\%$ ) не показало статистично достовірної різниці ( $p > 0,05$ ), не дивлячись на те, що кількість чоловіків в підгрупі з високою експресією cyclin D1 виявилась значною – 74,47% (35 з 47) (табл. 1). Аналіз контингенту за віковими групами показав найбільшу кількість cyclin D1 ( $\leq 10\%$ ) ПРОФ в віці 50-59 років – 9 з 23 (39,13%), в той час як найбільша кількість cyclin D1 ( $> 10\%$ ) ПРОФ припала на старший вік 60-69 років – 24 з 47 (51,06%), ( $p < 0,05$ ). Середній вік пацієнтів з cyclin D1 ( $\leq 10\%$ ) ПРОФ склав  $56,86 \pm 10,05$  років, в той час як середній вік пацієнтів з cyclin D1 ( $> 10\%$ ) ПРОФ виявився трохи старшим –  $63,61 \pm 9,19$  років.

Кількість незроговілих ПРОФ значно переважала в підгрупі пацієнтів з cyclin D1 ( $\leq 10\%$ ) – 18 з 2 (78,26%), в порівнянні з підгрупою ПРОФ з cyclin D1 ( $> 10\%$ ), де їх кількість складала менше половини – 20 з 47 (42,55%),  $p < 0,05$ . Але для підгруп з різним статусом за наявністю метастазів та рецидивів статистично достовірної різниці знайдено не було (всі  $p > 0,05$ ).

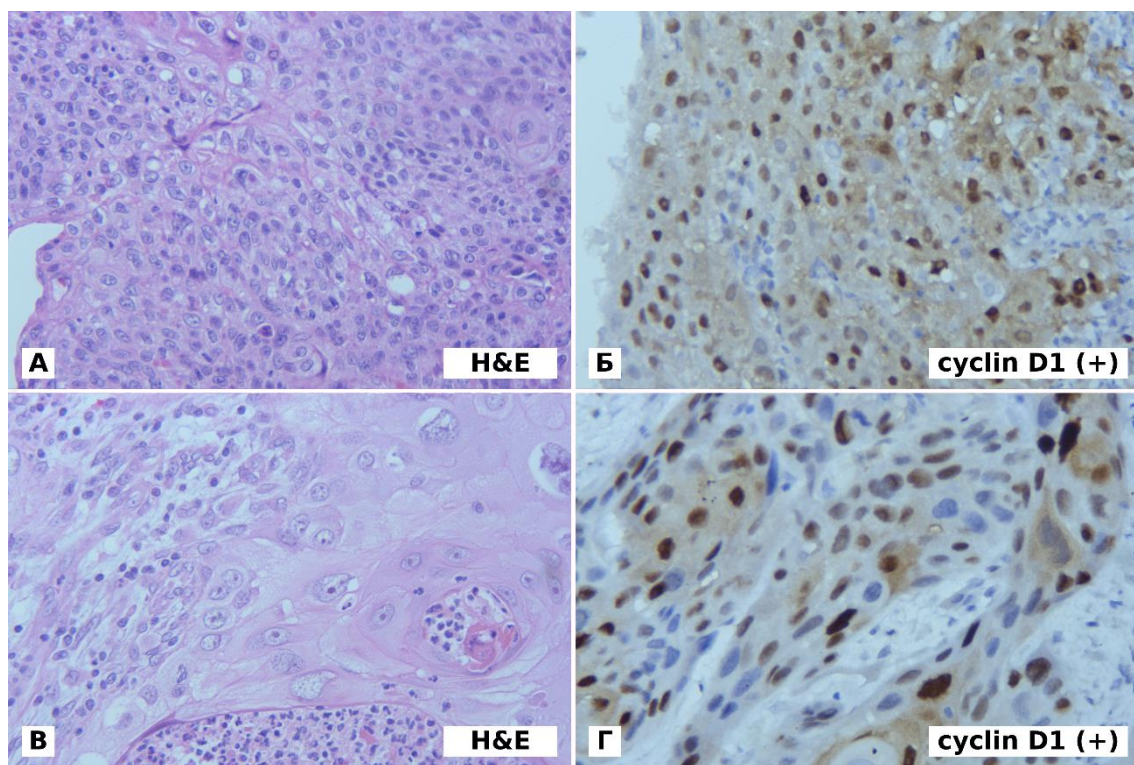


Рис. 1. А. Незроговілий ПР ротоглотки, забарвлення гематоксином і еозином ( $\times 400$ ). Б. Ядерно-цитоплазматична реакція з маркером cyclin D1, більше 10%, імуногістохімічний метод забарвлення з гематоксином Майєра ( $\times 400$ ). В. Зроговілий ПР ротоглотки, забарвлення гематоксином і еозином ( $\times 400$ ). Б. Ядерно-цитоплазматична реакція з маркером cyclin D1, більше 10%, імуногістохімічний метод забарвлення з гематоксином Майєра ( $\times 400$ ).



Таблиця 1

Розподіл варіантів експресії cyclin D1 за клініко-морфологічними характеристиками плоскоклітинних карцином ротоглотки

Клініко-морфологічна характеристика	n (%) n=70, (100%)	Варіант експресії cyclin D1	
		≤10% n=23 (32,86%)	>10% n=47 (67,14%)
Чоловіки	48 (68,57)	13 (56,52)	35 (74,47)
Жінки	22 (31,43)	10 (43,48)	12 (25,53)
<b>P</b>		<b>p&gt;0,05</b>	
Вік (роки) 40-49	11 (15,71)	6 (26,09)	5 (10,64)
50-59	22 (31,43)	9 (39,13)	13 (27,66)
60-69	27 (38,57)	3 (13,04)	24 (51,06)
70-80	10 (14,00)	5 (21,74)	5 (10,64)
<b>P</b>		<b>p&lt;0,05</b>	
Зроговілі ПР	32 (45,71)	5 (21,74)	27 (57,45)
Незроговілі ПР	38 (54,29)	18 (78,26)	20 (42,55)
<b>P</b>		<b>p&lt;0,05</b>	
Без метастазів	34 (48,57)	7 (30,43)	27 (57,45)
З метастазами	36 (51,43)	16 (69,57)	20 (42,55)
<b>P</b>		<b>p&gt;0,05</b>	
Без рецидиву	65 (92,86)	20 (86,96)	45 (95,74)
З рецидивом	5 (7,14)	3 (13,04)	2 (4,26)
<b>P</b>		<b>p&gt;0,05</b>	

Примітка: p - встановлення достовірності міжгрупових зв'язків за кількісним розподілом проводився точним тестом Фішера, відмінність вважали достовірною при  $p<0,05$ .

Багато досліджень описують перебіг p16/ВПЛ (+) ПРОФ як «менш агресивний та повільний»; в цьому дослідженні кількість випадків з низькою експресією cyclin D1 (≤10%) вияви-

лась статистично достовірно більшою в підгрупі p16/ВПЛ (+) ПРОФ ( $p<0,05$ ) та в підгрупі з низькою експресією p53 ( $p<0,05$ ), (табл. 2).

Таблиця 2

Розподіл варіантів експресії cyclin D1 в залежності від експресії маркерів p16, p53 та Ki-67у плоскоклітинних карциномах ротоглотки

Клініко-морфологічна характеристика	n (%) n=70, (100%)	Варіант експресії cyclin D1	
		≤10% n=23 (32,86%)	>10% n=47 (67,14%)
p16 / ВПЛ (-)	44 (62,86)	6 (26,09)	38 (80,85)
p16 / ВПЛ (+)	26 (37,14)	17 (73,91)	9 (19,15)
<b>P</b>		<b>p&lt;0,05</b>	
p53 ≤ 25%	47 (67,14)	21 (91,30)	26 (55,32)
p53 > 25%	23 (32,86)	2 (8,70)	21 (44,68)
<b>P</b>		<b>p&lt;0,05</b>	
Ki-67 <10%	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
10-50%	53 (75,71)	20 (86,96)	33 (70,21)
>50%	17 (24,29)	3 (13,04)	14 (29,79)
<b>P</b>		<b>p&gt;0,05*</b>	

Примітка: p - встановлення достовірності міжгрупових зв'язків за кількісним розподілом проводився точним тестом Фішера, p\* - статистичний аналіз даних проводився між підгрупами (Ki-67 10-50%) та (Ki-67>50%), через відсутність зразків в підгрупі (Ki-67<10%), відмінність вважали достовірною при  $p<0,05$ .

Розподіл випадків ПРОФ з різним проліферативним потенціалом виявився досить нерівномірним: в підгрупу з Ki-67 <10% - не потрапило

жодного спостереження ПРОФ, в той час як 86,96% ПРОФ (20 з 23) із експресією cyclin D1 (≤10%) демонстрували помірний індекс проліфе-

рації (10-50%) і 70,21% ПРОФ (33 з 47) із експресією *sucln D1* (>10%) мали також помірну експресію Ki-67 (10-50%). Пошти третина (29,79%) карцином з експресією *sucln D1* (>10%) мала індекс проліферації >50%, але статистично достовірної різниці знайдено не було ( $p>0,05$ ), (табл. 2). Дані розподілу варіантів експресії *sucln D1* занесені в таблиці 1 і 2.

Розподіл відсотків інтрануклеарної експресії маркеру p27, що попередньо класифікувався на 4

градації – (0) негативні, (1+) осередково позитивні (<25%); (2+) помірно позитивні (25% - 50%); (3+) дифузно позитивні (>50%), за Queiroz AB et al. (2010) [20], (рис. 2), для зручності статистичної обробки розподілили на 2 підгрупи: ПРОФ з низьким score p27 (0, 1+) – 48 з 70 зразків (68,57%) та ПРОФ з високим score p27 (2+, 3+) – 22 з 70 зразків (31,43%). Дані розподілу варіантів експресії p27 за клініко-морфологічними характеристиками ПРОФ були занесені в таблицю 3.

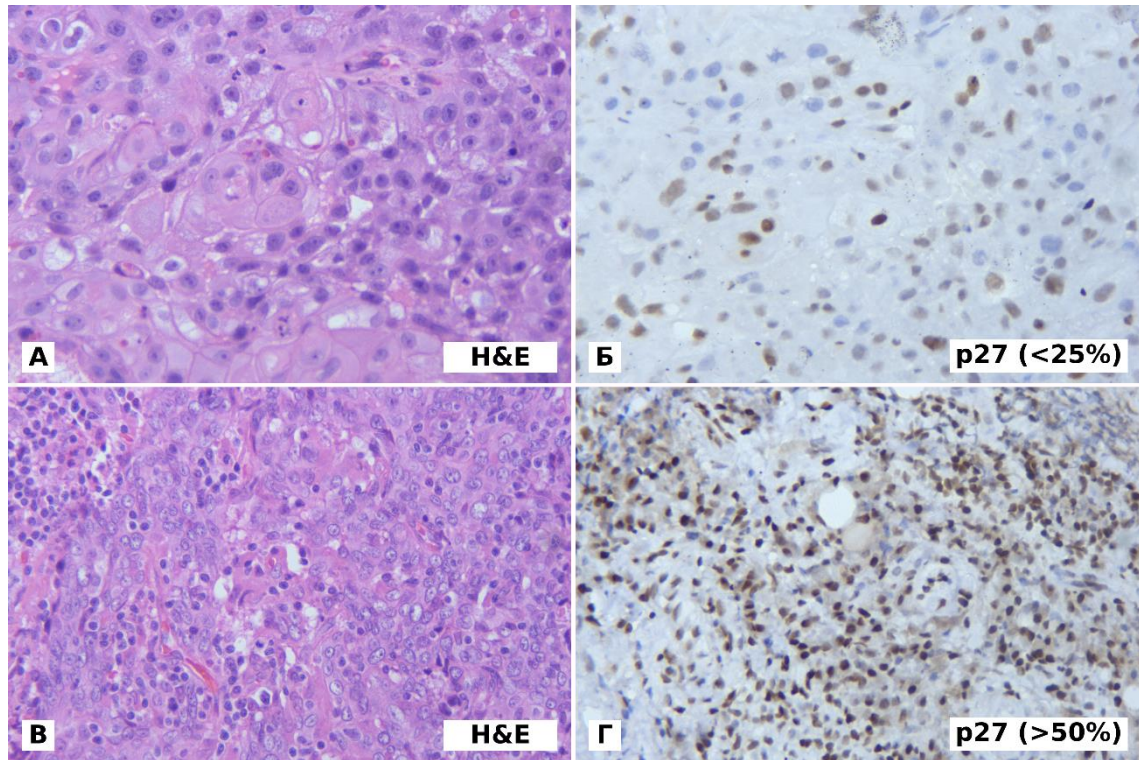


Рис. 2. А. Зроговілий ПР орофарінгеальної ділянки, забарвлення гематоксиліном і еозином ( $\times 400$ ). Б. Ядерне забарвлення з маркером p27, менше 25%, імуногістохімічний метод забарвлення з гематоксиліном Майєра ( $\times 400$ ). В. Незроговілий ПР орофарінгеальної ділянки, забарвлення гематоксиліном і еозином ( $\times 400$ ). Д. Ядерна реакція з маркером p27, більше 50%, імуногістохімічний метод забарвлення з гематоксиліном Майєра ( $\times 400$ ).

Ретельно досліджуючи експресію онкопротеїну p27 в ПРОФ, треба зазначити, що розподіл за гендерним показником в групах з низьким та високим score p27 статистично достовірної різниці не показав ( $p>0,05$ ), але різниця за експресією p27 була знайдена в вікових підгрупах пацієнтів: найбільша кількість випадків ПРОФ з  $p27<25\%$  виявилась в підгрупі 60-69 років, в той час як більшість пацієнтів з ПРОФ з  $p27\geq 25\%$  припала на 40-49 років, ( $p<0,05$ ) (табл. 3).

Серед випадків з низьким score за p27 переважали незроговілі ПРОФ – 29 з 48 (60,42%), натомість в підгрупі з високим score ситуація виявилась протилежною – більшість була саме зроговілих ПРОФ – 13 з 22 (59,09%), але досто-

вірної різниці точним тестом Фішера знайдено не було ( $p>0,05$ ), (табл. 3). Для підгруп з різним статусом за наявністю метастазів та рецидивів розподіл випадків з високим та низьким score маркеру p27 виявився практично однаковим і статистично достовірної різниці знайдено не було (всі  $p>0,05$ ).

Аналіз експресії p27 в підгрупах з високим та низьким score не показала достовірної статистичної відмінності від експресії маркерів p16, p53 та Ki-67 в зразках ПРОФ (всі  $p>0,05$ ), але виявились певні тенденції: в ПРОФ ділянки з високим score (2+, 3+) p27 було більше p16/ВПЛ (+),  $p53>25\%$  та Ki-67 >50% випадків, порівняно з ПРОФ з низьким score (табл. 4).

Таблиця 3

Розподіл варіантів експресії p27 за клініко-морфологічними характеристиками плоскоклітинних карцином ротоглотки

Клініко-морфологічна характеристика	n (%) n=70, (100%)	Варіант експресії p27	
		низький score (0, 1+) n=48 (68,57%)	високий score (2+, 3+) n=22 (31,43%)
Чоловіки	48 (68,57)	31 (64,58)	17 (77,27)
Жінки	22 (31,43)	17 (35,42)	5 (22,73)
<b>P</b>		<b>p&gt;0,05</b>	
Вік (роки) 40-49	11 (15,71)	2 (4,17)	9 (40,91)
50-59	22 (31,43)	19 (39,58)	3 (13,64)
60-69	27 (38,57)	23 (47,92)	4 (18,18)
70-80	10 (14,00)	4 (8,33)	6 (27,27)
<b>P</b>		<b>p&lt;0,05</b>	
Зроговілі ПР	32 (45,71)	19 (39,58)	13 (59,09)
Незроговілі ПР	38 (54,29)	29 (60,42)	9 (40,91)
<b>P</b>		<b>p&gt;0,05</b>	
Без метастазів	34 (48,57)	23 (47,92)	11 (50,00)
З метастазами	36 (51,43)	25 (52,08)	11 (50,00)
<b>P</b>		<b>p&gt;0,05</b>	
Без рецидиву	65 (92,86)	44 (91,67)	21 (95,45)
З рецидивом	5 (7,14)	4 (8,33)	1 (4,54)
<b>P</b>		<b>p&gt;0,05</b>	

Примітка: p - встановлення достовірності міжгрупових зв'язків за кількісним розподілом проводився точним тестом Фішера, відмінність вважали достовірною при  $p<0,05$ .

Таблиця 4

Розподіл варіантів експресії p27 в залежності від експресії маркерів p16, p53 та Ki-67 у плоскоклітинних карциномах ротоглотки

Клініко-морфологічна характеристика	n (%) n=70, (100%)	Варіант експресії p27	
		низький score (0, 1+) n=48 (68,57%)	високий score (2+, 3+) n=22 (31,43%)
p16 / ВПЛ (-)	44 (62,86)	31 (64,58)	13 (59,09)
p16 / ВПЛ (+)	26 (37,14)	17 (35,42)	9 (40,91)
<b>p</b>		<b>p&gt;0,05</b>	
p53 ≤ 25%	47 (67,14)	36 (75,00)	11 (50,00)
p53 > 25%	23 (32,86)	12 (25,00)	11 (50,00)
<b>p</b>		<b>p&gt;0,05</b>	
Ki-67 <10%	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
10-50%	53 (75,71)	38 (79,17)	15 (68,18)
>50%	17 (24,29)	10 (20,83)	7 (31,82)
<b>p</b>		<b>p&gt;0,05*</b>	

Примітка: p - встановлення достовірності міжгрупових зв'язків за кількісним розподілом проводився точним тестом Фішера, p\* - статистичний аналіз даних проводився між підгрупами (Ki-67 10-50%) та (Ki-67>50%), через відсутність зразків в підгрупі (Ki-67<10%), відмінність вважали достовірною при  $p<0,05$ .

**Обговорення.** Карциноми голови та шиї посідають шосте місце за поширенням у всьому світі, і приблизно 85% з усіх гістологічних різновидів є плоскоклітинним раком [2-4, 16]. Покращене розуміння біології плоскоклітинного раку орофарингеальної ділянки потрібно для прогнозування індивідуальної траєкторії ведення паціє-

нтів. Зміни в генах та їх відповідних продуктах є важливим етапом розуміння біології онкогенезу та пов'язаного з ним прогнозу.

Контроль клітинного циклу виконується циклінами і циклін-залежними кіназами (cdk). Як відомо, активність цих ферментів регулюється інгібіторною дією членів родини CipKip [2-4,

16]. А саме, члени сімейства CipKip, білок p21 і p27, що мають блокувати активність CDK2 в комплексах циклін E / A - CDK2. Тобто циклін-залежні кінази впливають на критичний перехід із фази G1 клітинного циклу до S-фази. P21 регулюється двома різними шляхом p53-залежного та p53-незалежного шляху. Пошкодження клітинної ДНК через активацію p53 призводить до підвищення регуляції p21, щоб спричинити зупинку клітинного циклу у фазі G1 з клітинною можливістю репарації ДНК або індукції апоптозу [5- 6]. Крім того, p21 може регулюватися незалежно від p53 клітинними факторами росту, що описують деякі автори [23-25]. Вважається, що p27 є структурним гомологом p21. І експресія p27 збільшується за допомогою сигналів пригнічення росту та призводить до зупинки клітинного циклу, але з іншого боку, вона має зменшуватись від сигналів, що стимулюють ріст. В даний час прогностичне значення p21 і p27 при плоскоклітинних раках орофарингеальної ділянки досить суперечливо обговорюється в фаховій літературі [26-27].

#### Висновки

1. Експресія маркеру cyclin D1, проаналізована в групах  $\leq 10\%$  та  $>10\%$  за клініко-

морфологічними показниками показала статистично достовірну різницю за віком, ( $p<0,05$ ), та гістологічним типом (зроговілі /незроговілі), ( $p<0,05$ );

2. аналіз експресії cyclin D1 показав зворотну до p16/ВПЛ статусу тенденцію, найбільша кількість 80,85% випадків плоскоклітинних карцином орофарингеальної ділянки cyclin D1 з  $>10\%$  виявились серед p16/ВПЛ (-) спостережень;

3. 91,30% випадків плоскоклітинних раків орофарингеальної ділянки з cyclin D1 з  $\leq 10\%$  мали експресію p53 нижче рівня 25% ( $p<0,05$ );

4. найбільша кількість випадків експресії p27 з високим score (2+,3+) відмічалась серед пацієнтів віком 40-49 років ( $p<0,05$ ).

#### Перспективи подальших досліджень

Планується дослідити особливості експресії маркерів апоптозу в залежності від клініко-морфологічних характеристик та проліферативної активності плоскоклітинних карцином орофарингеальної ділянки.

#### Інформація про конфлікт інтересів

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

#### Літературні джерела References

1. Awawdeh MA, Sasikumar R, Aboalela AA, et al. Evaluation of Prognostic Significance of the Expression of p53, Cyclin D1, EGFR in Advanced Oral Squamous Cell Carcinoma after Chemoradiation – A Systematic Review. *Appl. Sci.* 2023;13(9):5292. <https://doi.org/10.3390/app13095292>.

2. 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.

3. Ramos-García P, González-Moles MÁ, González-Ruiz L, et al. Clinicopathological significance of tumor cyclin D1 expression in oral cancer. *Archives of Oral Biology.* 2019;99:177-182. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2019.01.018>.

4. Vallonthaiel AG, Singh MK, Dinda AK, et al. Prognostic significance of cytoplasmic p27 in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2016;45(7):475-80. doi: 10.1111/jop.12392.

5. Gao L, Gu W, Zheng J, et al. Clinicopathological and Prognostic Significance of p27 Expression in Oral Squamous Cell Carcinoma: A Meta-Analysis. *The International Journal of Biological Markers.* 2013;28(4):329-335. doi:10.5301/IJBM.5000035.

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. 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.

8. 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>.

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. Benzerdjeb N, Tantot J, Blanchet C, 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. Plath M, Broglie MA, Förbs D, 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, Khandeparkar SGS, Saragade PB, 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, Dzerzhynskiy 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. Yadav P, Malik R, Balani S, et al. Expression of p16, Ki-67 and p53 markers in dysplastic and malignant lesions of the oral cavity and oropharynx. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2019;23(2):224-230. doi: 10.4103/jomfp.JOMFP\_299\_18

20. Queiroz AB, Focchi G, Dobo C et al. Expression of p27, p21<sup>WAF/Cip1</sup>, and p16<sup>INK4a</sup> in Normal

Oral Epithelium, Oral Squamous Papilloma, and Oral Squamous Cell Carcinoma. *Anticancer Research.* 2010;30(7):2799-2803.

21. Moharil RB, Khandekar S, Dive A, Boddhade A. Cyclin D1 in oral premalignant lesions and oral squamous cell carcinoma: An immunohistochemical study. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology.* 2020;24:397. doi: 10.4103/jomfp.JOMFP\_164\_20.

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

23. Chaturvedi AK, Freedman ND, Abnet CC. The Evolving Epidemiology of Oral Cavity and Oropharyngeal Cancers. *Cancer Res.* 2022;82(16):2821-2823.

<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-22-2124>.

24. Robbins HA, Ferreiro-Iglesias A, Waterboer T, et al. Absolute Risk of Oropharyngeal Cancer After an HPV16-E6 Serology Test and Potential Implications for Screening: Results From the Human Papillomavirus Cancer Cohort Consortium. *Journal of Clinical Oncology.* 2022;40(13):3613-3622. <https://doi.org/10.1200/JCO.21.01785>.

25. Tsuchida K, Sugai T, Uesugi N, et al. Expression of cell cycle-related proteins in oropharyngeal squamous cell carcinoma based on human papilloma virus status. 2017;38(2):908-916. <https://doi.org/10.3892/or.2017.5720>.

26. Gültekin SE, Sengüven B, Klussmann JP, Dienes HP. p16INK4a and Ki-67 expression in human papilloma virus-related head and neck mucosal lesions. *Invest Clin.* 2015;56(1):47-59.

27. Anand C, Pallavi K, Pravin G, et al. Expression of cyclin D1 in oral squamous cell carcinoma and its correlation with histological differentiation An immunohistochemical study. *Journal of Indian Academy of Oral Medicine and Radiology.* 2016;28(2):140-144. DOI: 10.4103/0972-1363.195099.

**Рахманов В.В., Шпонька І.С. Особливості експресії cyclin D1 та онкопротеїну p27 в плоскоклітинних карциномах ротоглотки з різним проліферативним потенціалом.**

**РЕФЕРАТ. Актуальність.** Плоскоклітинний рак голови та шиї, включаючи рак ротової порожнини, глотки, гортані та سینоназального тракту є шостим за поширеністю раком у світі. Розвиток злякисних пухлин пов'язують з серією змін у діяльності регуляторів клітинного циклу, які можна розглядати як позитивні та негативні регулятори. Позитивними регуляторами клітинного циклу можна вважати cyclin A і cyclin D1, які сприяють переходу клітинного циклу від однієї фази до іншої; інші, такі як онкогени-супресори Rb, p16, p53, p21 і p27 є негативними регуляторами, які зупиняють клітинний цикл в фазі S. **Метою** дослідження було порівняти рівні експресії маркерів p27 та cyclin D1 в ВПЛ-позитивних (p16+) та ВПЛ-негативних (p16-) плоскоклітинних карциномах ротоглотки з різним проліферативним потенціалом. **Методи.** У роботі досліджено біопсійний та операційний матеріал плоскоклітинних карцином 70 пацієнтів (22 жінок і 48 чоловіків), що проходили лікування в КП «Дніпропетровська обласна клінічна лікарня ім. І.І. Мечникова» ДОР м. Дніпра в період з 2019 по 2022 рр. Вік пацієнтів коливався в діапазоні 41 – 80 років, середній вік склав 59,75±9,16 років. Для імуногістохімічного дослідження використовувалися первинні моноклональні антитіла до p16 (RTU), p53 (RTU), Cyclin D1 (EP12, RTU), Ki-67 (sp6, RTU), p27 (sp1, RTU) та система візуалізації UltraVision Quanto, (LabVision). **Результати та підсумок.** Динаміка маркеру cyclin D1, проаналізована в групах ≤10% та >10% за клініко-морфологічними показниками, показала статистично достовірну різницю за віком, (p<0,05), та гістологічним типом (зроговілі



/незроговілі), ( $p < 0,05$ ); аналіз експресії *sucln D1* показав зворотну до p16/ВПЛ статусу тенденцію, найбільша кількість 80,85% випадків плоскоклітинних карцином орофарінгеальної ділянки *sucln D1* з  $>10\%$  виявились серед p16/ВПЛ (-) спостережень; 91,30% випадків плоскоклітинних раків орофарінгеальної ділянки з *sucln D1* з  $\leq 10\%$  мали експресію p53 нижче рівня 25% ( $p < 0,05$ ); найбільша кількість випадків експресії p27 з високим score (2+,3+) відмічалась серед пацієнтів віком 40-49 років ( $p < 0,05$ ).

**Ключові слова:** плоскоклітинний рак, орофарінгеальна ділянка, *sucln D1*, p16, ВПЛ, p27.